

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nejc RAČKI

**IZDELAVA Poročevalnega vektorja z
dvema poročevalcema za spremljanje
izražanja izbranega gena v celičnih
kulturah**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nejc RAČKI

**IZDELAVA Poročevalnega vektorja z dvema
poročevalcema za spremjanje izražanja izbranega
gena v celičnih kulturah**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DESIGN AND ASSEMBLY OF DOUBLE REPORTER VECTOR FOR
MONITORING EXPRESSION OF SELECTED GENE IN CELL
CULTURE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

»Kdor išče cilj, bo ostal prazen, ko ga bo dosegel.
Kdor pa najde pot, bo cilj vedno nosil v sebi.«

(Nejc Zaplotnik, 1981)

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v laboratoriju prof. dr. Tanje Dominko, na oddelku za biologijo in biotehnologijo (Biology and Biotechnology Department) na Politehničnem inštitutu v Worcesterju (Worcester Polytechnic Institute) v zvezni državi Massachusetts, ZDA, v sodelovanju z Zavodom RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji 20. 7. 2011 za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miomira Kneževića, za somentorja izr. prof. dr. Primoža Rožmana in za recenzentko doc. dr. Tanjo Kunej.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Miomir KNEŽEVIC
Biobanka d.o.o., Trzin

Član: izr. prof. dr. Primož ROŽMAN
Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Članica: doc. dr. Tanja KUNEJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 26. 8. 2011

Izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Nejc RAČKI

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 575(043.2)=163.6
KG molekularna genetika/poročevalni vektorji/epigenetsko reprogramiranje/transfekcija/virusni vektorji/transdukacija
AV RAČKI, Nejc
SA KNEŽEVIĆ, Miomir (mentor)/ROŽMAN, Primož (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2011
IN IZDELAVA POROČEVALNEGA VEKTORJA Z DVEMA POROČEVALCEMA ZA SPREMLJANJE IZRAŽANJA IZBRANEGA GENA V CELIČNIH KULTURAHL
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XVI, 86 str., 14 pregl., 36 sl., 2 pril., 120 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Možnost opazovanja *in vivo* in spremljanja aktivacije ali izklopa posameznega gena značilnega za določen celični tip, bi bila zelo uporabna pri razvoju in ocenjevanju protokolov celičnega reprogramiranja. Tukaj predstavljamo izdelavo poročevalnega vektorja z dvema poročevalcema, s katerim spremljamo aktivacijo promotorja opazovanega gena v realnem času v živih celicah. Z metodami molekulskega kloniranja smo združili izbrane funkcionalne elemente vektorjev pAcGFP1-N1 in pDsRed-Express1 ter sestavili vektor FV-MCS. Ta po vstavitvi izbranega promotorja omogoča opazovanje izražanja izbranega gena, kar smo dokazali z integracijo promotorja *OCT4* (*POU5F1*) in *CRIPERO-1* (*TDGF1*). Delovanje vektorja z dvema poročevalcema smo ocenili s transfekcijo teratokarcinomskih celic (izražajo *CRIPERO-1* in *OCT4*) in primarnih fibroblastov (ne izražajo *CRIPERO-1* in *OCT4*). Prvi poročevalec, DsRedExpress, je pod nadzorom konstitutivnega CMV promotorja in je pokazatelj uspešnosti transfekcije. Drugi poročevalec, AcGFP, je pod nadzorom izbranega promotorja in je pokazatelj izražanja opazovanega gena. Transfekcija obeh celičnih tipov se je odrazila v izražanju DsRedExpress, vendar so samo teratokarcinomske celice hkrati izražale tudi AcGFP. Poročevalni konstrukt smo zaradi uporabe v lentivirusnem vektorskem sistemu prenesli v plazmid pLVX-Puro. Dokazali smo, da vektor z dvema poročevalcema FV-MCS deluje in da lahko z vgradnjo izbranega promotorja opazujemo izražanje poljubnega izbranega gena.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DD UDC 575(043.2)=163.6
CX molecular genetics/reporter vectors/epigenetic reprogramming/transfection/viral vectors/transduction
AU RAČKI, Nejc
AA KNEŽEVIĆ, Miomir (supervisor)/ROŽMAN, Primož (co-supervisor)
PP SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY 2011
TI DESIGN AND ASSEMBLY OF DOUBLE REPORTER VECTOR FOR MONITORING EXPRESSION OF SELECTED GENE IN CELL CULTURE
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XVI, 86 p., 14 tab., 36 fig., 2 ann., 120 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The ability to monitor activation of cell type-specific promoters in living cells would greatly aid in evaluation of strategies developed for cell reprogramming. Here we present design and expression of a double reporter construct which enables detection of selected promoter activation in real time in living human cell lines. Restrictions and molecular cloning techniques were used to manipulate and fuse the functional elements from pAcGFP1-N1 and pDsRed-Express1 plasmid (both from Clontech) to create FV-MCS, backbone of double reporter construct. Human *OCT4* (*POU5F1*) promoter and human *CRIPTO-1* (*TDGF1*) promoter were cloned into FV-MCS. Performance of double reporter for both promoters was evaluated using teratocarcinoma cells as a positive, and primary fibroblasts as a negative control. Expression of DsRedExpress is used to evaluate transfection efficiency (under control of constitutive CMV promoter) while expression of AcGFP is used to monitor activation of promoter of interest in cells simultaneously. Both cell types activated CMV promoter, but only teratocarcinomas activated *OCT4* or *CRIPTO-1* promoter. Reporter construct was also cloned into pLVX-Puro plasmid in order to be used with lentiviral system. We showed that double reporter vector FV-MCS is functional and that with integration of a selected promoter into it, it is possible to monitor expression of a selected gene.

KAZALO VSEBINE

| | str. |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Ključna dokumentacijska informacija | III |
| Key words documentation | IV |
| Kazalo vsebine | V |
| Kazalo preglednic | VIII |
| Kazalo slik | IX |
| Kazalo prilog | XI |
| Okrajšave in simboli | XII |
| Slovarček | XV |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 NAMEN DELA..... | 2 |
| 1.2 HIPOTEZE..... | 3 |
| 2 PREGLED OBJAV | 4 |
| 2.1 SPREMLJANJE IZRAŽANJA GENOV | 4 |
| 2.1.1 Poročevalni vektor..... | 5 |
| 2.1.2 Poročevalni proteini | 7 |
| 2.1.3 Primeri poročevalnih proteinov | 7 |
| 2.1.4 Uporaba poročevalnih vektorjev pri celičnem reprogramiraju | 11 |
| 2.2 CELIČNA DIFERENCIACIJA IN REPROGRAMIRANJE | 12 |
| 2.2.1 Embrionalne matične celice..... | 15 |
| 2.2.2 Inducirane pluripotentne matične celice..... | 15 |
| 2.3 METODE VNOSA VEKTORJEV V CELICE | 17 |
| 2.3.1 Kemijske metode | 17 |
| 2.3.2 Fizikalne metode..... | 18 |
| 2.3.3 Biološke metode | 18 |
| 2.3.4 Virus HIV in lentivirusni vektorji | 20 |
| 2.4 GEN <i>CRIPTO-1</i> | 22 |
| 2.5 GEN <i>OCT4</i> | 23 |
| 3 MATERIALI IN METODE | 24 |
| 3.1 MATERIAL | 24 |
| 3.2 POSTOPKI, UPORABLJENI PRI SESTAVLJANJU VEKTORJA | 29 |
| 3.2.1 Načrtovanje vektorja | 29 |
| 3.2.2 Priprava LB gojišča | 29 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.3 Priprava selektivnih LB agar plošč | 29 |
| 3.2.4 Transformacija kompetentnih <i>E. coli</i> s plazmidom..... | 30 |
| 3.2.5 Pomnoževanje bakterij <i>E. coli</i> s plazmidom..... | 30 |
| 3.2.6 Izolacija plazmidne DNA | 30 |
| 3.2.7 Restriktivna razgradnjna plazmidne DNA | 32 |
| 3.2.8 Priprava 1 % agaroznega gela za elektroforezo..... | 32 |
| 3.2.9 Nanašanje vzorcev na agarozni gel..... | 32 |
| 3.2.10 Zapolnjevanje lepljivih 5' koncov DNA | 32 |
| 3.2.11 Odstranjevanje 5' lepljivih koncov DNA | 33 |
| 3.2.12 Odstranjevanje končnih fosfatov | 33 |
| 3.2.13 Izrezovanje DNA fragmentov iz agaroznega gela | 33 |
| 3.2.14 Čiščenje plazmidne DNA | 33 |
| 3.2.15 Ligacija | 34 |
| 3.2.16 Transformacija kompetentnih <i>E. coli</i> s produkтом ligacije | 34 |
| 3.2.17 Merjenje koncentracij DNA ali RNA | 35 |
| 3.2.18 Fotografiranje agaroznih gelov..... | 35 |
| 3.3 POSTOPKI UPORABJENI ZA OCENO FUNKCIONALNOSTI VEKTORJEV | 35 |
| 3.3.1 Odmrzovanje celic..... | 35 |
| 3.3.2 Menjava gojišča | 35 |
| 3.3.3 Presajevanje celic | 35 |
| 3.3.4 Štetje celic..... | 36 |
| 3.3.5 Izolacija RNA iz celic | 36 |
| 3.3.6 Reverzni prepis RNA v cDNA | 36 |
| 3.3.7 Verižna reakcija s polimerazo – PCR | 37 |
| 3.3.8 Gojenje embrionalnih matičnih celic na matrigelu..... | 38 |
| 3.3.9 Transfekcija celic s FuGENE 6 reagentom..... | 39 |
| 3.3.10 Transfekcija celic s HiliMax reagentom..... | 39 |
| 3.3.11 Transformacija primarnih neonatalnih fibroblastov | 39 |
| 3.3.12 Elektroporacija..... | 40 |
| 3.4 POSTOPKI DELA Z LENTIVIRUSOM | 41 |
| 3.4.1 Delo z lentivirusom..... | 41 |
| 3.4.2 Producija lentivirusnega vektorja | 41 |
| 3.4.3 Žetev lentivirusnih vektorjev | 41 |
| 3.4.4 Transdukcija celic | 42 |
| 3.4.5 Izolacija lentivirusne RNA | 42 |
| 3.4.6 Določanje koncentracije virusnih kopij v suspenziji virusov | 42 |
| 3.4.7 Obdelava podatkov qRT-PCR | 44 |
| 3.4.8 Koncentriranje suspenzije virusov | 45 |
| 3.5 ZAPOREDJE RESTRIKCIJSKIH KORAKOV MED IZDELAVO VEKTORJA | 45 |
| 3.5.1 Izdelava vektorja FV-MCS | 45 |
| 3.5.2 Kloniranje <i>CRIPTO-1</i> promotorja v vektor FV-MCS..... | 48 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5.3 Kloniranje promotorja <i>OCT4</i> v vektor FV-MCS..... | 48 |
| 3.5.4 Prenos poročevalnega konstrukta iz FV-MCS v plazmid pLVX-Puro..... | 50 |
| 4 REZULTATI..... | 53 |
| 4.1 SESTAVLJANJE POROČEVALNEGA VEKTORJA FV-MCS | 53 |
| 4.2 VGRADNJA PROMOTORJEV <i>OCT4</i> IN <i>CRYPTO-1</i> V VEKTOR FV-MCS | 56 |
| 4.3 FUNKCIONALNI PREIZKUS VEKTORJEV FV-MCS, FV-CRIPTO IN FV-OCT4. | 59 |
| 4.4 PRENOS POROČEVALNIH KONSTRUKTOV V VEKTOR PLVX-PURO | 61 |
| 4.5 FUNKCIONALNI PREIZKUS VEKTORJEV PLVX-MCS, PLVX-CRIPTO IN PLVX-OCT4 | 66 |
| 4.6 PRODUKCIJA LENTIVIRUSNIH VEKTORJEV LENTI-PLVX-CRIPTO IN LENTI-PLVX-OCT4..... | 67 |
| 4.7 FUNKCIONALNI PREIZKUS LENTIVIRUSNIH VEKTORJEV | 68 |
| 4.8 PREVERJANJE IZRAŽANJA GENOV Z RT-PCR | 69 |
| 5 RAZPRAVA IN SKLEPI..... | 70 |
| 5.1 RAZPRAVA | 70 |
| 5.2 SKLEPI | 74 |
| 5.3 PRIHODNJE DELO..... | 74 |
| 6 POVZETEK | 75 |
| 7 VIRI | 77 |
| ZAHVALA | |
| PRILOGE | |

KAZALO PREGLEDNIC

| | str. |
|---------------------------------------------------------------------------|------|
| Preglednica 1: Lastnosti najpogostejših fluorescentnih proteinov | 11 |
| Preglednica 2: Primerjava metod vnosa vektorjev v sesalske celice | 19 |
| Preglednica 3: Geni virusa HIV | 20 |
| Preglednica 4: Seznam vseh uporabljenih kemikalij | 25 |
| Preglednica 5: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za RT-PCR | 27 |
| Preglednica 6: Uporabljene gojilne posode | 27 |
| Preglednica 7: Sestava uporabljenih gojišč | 28 |
| Preglednica 8: Naprave, uporabljene pri izvedbi raziskovalnega dela | 28 |
| Preglednica 9: Primer reakcije z dvema restriktičnimi encimoma | 32 |
| Preglednica 10: Primer ligacijske reakcije | 34 |
| Preglednica 11: Reagenti za produkcijo lentivirusnih vektorjev | 41 |
| Preglednica 12: Reakcija za odstranitev DNA | 42 |
| Preglednica 13: Glavna mešanica qRT-PCR | 43 |
| Preglednica 14: Priprava vzorcev in redčitev za standardno krivuljo | 43 |

KAZALO SLIK

| | str. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Slika 1: Shema osnovnega poročevalnega plazmidnega vektorja | 5 |
| Slika 2: Shema epigenetske pokrajine | 13 |
| Slika 3: Shema življenjskega cikla virusa HIV | 21 |
| Slika 4: Shema izdelave in testiranja vektorja z dvema poročevalcema | 29 |
| Slika 5: Shema izdelave vektorja FV-MCS..... | 47 |
| Slika 6: Shema kloniranja <i>CRIPTO-1</i> in <i>OCT4</i> promotorjev v vektor FV-MCS..... | 49 |
| Slika 7: Shema prenosa poročevalnih konstruktov v pLVX ogrodje | 51 |
| Slika 8: Shema produkcije in uporabe lentivirusnih vektorjev lenti-pLVX-Oct4 in lenti-pLVX-Cripto | 52 |
| Slika 9: Zgradba vektorjev FV-MCS in pLVX-MCS | 52 |
| Slika 10: Restrikcijska analiza vektorjev pAcGFP1-N1 in pDsRed-Express1 | 53 |
| Slika 11: Restrikcijska analiza vektorja pCMV-DsRed-Express | 54 |
| Slika 12: Funkcionalni preizkus vektorja pCMV-DsRed..... | 54 |
| Slika 13: Restrikcijska analiza – iskanje vektorja pCMV-DsRed – MCS. | 55 |
| Slika 14: Dodatna restrikcijska analiza plazmida pCMV-DsRed – MCS | 55 |
| Slika 15: Restrikcijska analiza vektorja FV-MCS..... | 56 |
| Slika 16: Restrikcijska analiza vektorja pGL3-CR1-promoter..... | 57 |
| Slika 17: Restrikcijska analiza vektorja human Oct4-GFP | 57 |
| Slika 18: Restrikcijska analiza - iskanje vektorja FV-Cripto | 58 |
| Slika 19: Restrikcijska analiza - iskanje vektorja FV-Oct4..... | 58 |
| Slika 20: Funkcionalni preizkus vektorjev FV-MCS, FV-Cripto in FV-Oct4 v teratokarcinomskih celicah CRL2073 | 60 |
| Slika 21: Funkcionalni preizkus vektorjev FV-Cripto in FV-Oct4 v fibroblastih CRL2097 | 61 |
| Slika 22: Restrikcijska analiza – iskanje vektorja FV-MCS – poly A | 61 |
| Slika 23: Restrikcijska analiza – iskanje vektorja FV-MCS – poly A – CMV | 62 |
| Slika 24: Restrikcijska analiza vektorja pLVX-Puro | 62 |
| Slika 25: Restrikcijska analiza – iskanje vektorja pLVX-MCS | 63 |
| Slika 26: Dodatne restrikcijske analize vektorja pLVX-MCS | 63 |
| Slika 27: Restrikcijska analiza - iskanje vektorja pLVX-Cripto | 64 |
| Slika 28: Dodatna restrikcijska analiza plazmidov, izoliranih iz kolonij 1 in 5 | 64 |
| Slika 29: Restrikcijska analiza – iskanje vektorja pLVX-Oct4 | 65 |
| Slika 30: Dodatna restrikcijska analiza plazmida, izoliranega iz kolonije 7 | 65 |
| Slika 31: Funkcionalni preizkus vektorjev pLVX-MCS, pLVX-Cripto in pLVX-Oct4 v teratokarcinomskih celicah CRL2073 | 66 |
| Slika 32: Test Lenti-X™ GoStix™ | 67 |
| Slika 33: qRT-PCR, število izmerjenih lentivirusnih kopij..... | 67 |
| Slika 34: Funkcionalni preizkus vektorjev Lenti-pLVX-Cripto in Lenti-pLVX-Oct4 v fibroblastih CRL 2352 | 68 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 35: Neuspešna transdukcija hEMC z vektorjem Lenti-pLVX-Oct4 | 68 |
| Slika 36: RT-PCR, preverjanje izražanja genov <i>CRIPTO-1</i> , <i>OCT4</i> in <i>GAPDH</i> | 69 |

KAZALO PRILOG

Priloga A: Nukleptidno zaporedje vektorja FV-MCS

Priloga B: Nukleotidno zaporedje vektorja pLVX-MCS

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AcGFP | Zeleni fluorescirajoči protein iz meduze <i>Aequorea coerulescens</i> |
| ATCC | Ameriška zbirka celičnih kultur (angl. <i>American Type Culture Collection</i>) |
| ATP | Adenozin trifosfat |
| BSA | Goveji serumski albumin (angl. <i>bovine serum albumin</i>) |
| CAT | Kloramfenikol acetiltransferaza (angl. <i>Chloramphenicol acetyltransferase</i>) |
| cDNA | DNA komplementarna mRNA (angl. <i>complementary DNA</i>) |
| CIP | Alkalna fosfataza iz telečjega črevesa (angl. <i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>) |
| CMV | Citomegalovirus (angl. <i>Cytomegalovirus</i>) |
| c-MYC | Staro ime za gen <i>MYC</i> |
| <i>CRIPTO-1</i> | Staro ime za gen <i>TDGF1</i> |
| DEAE | Dietil amino etil |
| DMEM | Eaglovo gojišče, modificirano po Dulbeccu (angl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>) |
| DMEM/F12 | Eaglovo gojišče, modificirano po Dulbeccu: hranilna mešanica F-12 (angl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium: nutrient mixture F-12</i>) |
| DNA | Deoksiribonukleinska kislina |
| DsRedExpress | Rdeči fluorescirajoči protein (angl. <i>variant of Discosoma sp. red fluorescent protein</i>) |
| EDTA | Etilendiamintetraocetna kislina (angl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>) |
| EGF-CFC | Angl. <i>extracellular growth factor-like and/or co-receptor-like</i> |
| EMC | Embrionalne matične celice (angl. <i>embryonic stem cells</i>) |

| | |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EtBr | Etidijev bromid |
| FACS | Ločevanje fluorescentno označenih celic (angl. <i>cell fluorescence-activated cell sorting</i>) |
| FBS | Fetusni serum goveda (angl. <i>fetal bovine serum</i>) |
| FP | Fluorescentni protein (angl. <i>fluorescent protein</i>) |
| GAPDH | Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (angl. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>) |
| GFP | Zeleni fluorescirajoči protein (angl. <i>green fluorescent protein</i>) |
| GUS | β -glukuronidaza (angl. <i>β-glukuronidase</i>) |
| h | Humani |
| hGH | Humani rastni hormon (angl. <i>human growth hormone</i>) |
| HIV | Virus humane imunske pomanjkljivosti (angl. <i>human immunodeficiency virus</i>) |
| ICM | Notranja celična masa (angl. <i>inner cell mass</i>) |
| iPSC | Inducirane pluripotentne matične celice (angl. <i>iPSC, induced pluripotent stem cells</i>) |
| KLF4 | Angl. <i>Krüppel-like factor 4</i> |
| LB (gojšče) | Lauria-Bretani (gojišče) |
| LIN28A | Angl. <i>lin-28 homolog A</i> |
| LTR | Dolge končne ponovitve (angl. <i>long terminal repeats</i>) |
| mRNA | Informacijska RNA |
| mTeSR1 | Definirano gojišče za gojenje EMC |
| MYC | Angl. <i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i> |
| NANOG | Angl. <i>Nanog homeobox</i> |
| OCT4 | Staro ime za gen <i>POU5F1</i> |

| | |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ORI | Mesto začetka podvojevanja (angl. <i>origin of replication</i>) |
| PBS | Fosfatni pufer (angl. <i>phosphate buffered saline</i>) |
| PCR | Verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>) |
| POU | Angl. Pit-Oct-Unc (<i>family of transcription factors</i>) |
| <i>POU5F1</i> | Angl. <i>POU class 5 homeobox 1</i> |
| qRT-PCR | Kvantitativni RT-PCR (angl. <i>quantitative RT-PCR</i>) |
| RNA | Ribonukleinska kislina |
| RT-PCR | Obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>reverse transcription PCR</i>) |
| S.O.C. gojišče | Angl. super-optimal broth with cabolite repression |
| SEAP | Sekrecijska alkalna fosfataza (angl. <i>secreted alkaline phosphatase</i>) |
| SIN | Samo-inaktivirajoči (angl. <i>self-inactivating</i>) |
| <i>SOX2</i> | Angl. <i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i> |
| TAE | Tris-acetat-EDTA |
| <i>TDGF1</i> | Angl. <i>teratocarcinoma-derived growth factor 1</i> |
| U3 (regija) | Angl. <i>U3 region of LTR</i> |
| UV | Ultravijoličen |
| X-Gal | X-Galaktoza ali 5-bromo-4-kloro-3-indolil galaktopiranozid |
| X-Gluc | X-Glukoza ali 5-bromo-4-kloro-3-indolil glukuronid |

SLOVARČEK

| | |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CMV promotor | Izvira iz citomegalovirusa in spada med najpogosteje uporabljene konstitutivne promotorje v umetno narejenih konstruktih DNA. |
| Dediferenciacija* | Proces, v katerem se diferencirane somatske celice vrnejo v manj diferencirano multipotentno stanje. |
| Diferenciacija* | Proces postopne, napredujoče specializacije celic glede na njihovo kemično zgradbo, morfološke značilnosti in funkcije: celična ~ kemična, morfološka in funkcionalna specializacija celic. |
| Epigenetska pokrajina | Predstavlja model ponazoritve epigenetskega reprogramiranja s kroglicami in reliefom z dolinami. Kroglice, ki se kotalijo po hribu v različne doline, predstavljajo padajoči diferenciacijski potencial opazovane celice skozi razvoj osebka. Kroglica na poti prečka številne razcepe proti različnim dolinam, ki simbolizirajo določen celični tip. Vsakokrat, ko se kroglica (celica) znajde pod točko razcepa, se možna izbira njenih končnih poti in dolin (celični tip) zmanjša. Prvi je takšen model predstavil Waddington leta 1957 za prikaz epigenetskih sprememb v procesu diferenciacije. |
| Epigenetsko reprogramiranje | Imenovano tudi celično ali jedno reprogramiranje; označuje proces spremembe celičnega tipa, ki je posledica spremembe epigenetskega in ne genetskega materiala. |
| Izbirni označevalec* | Izbirni označevalec (angl. <i>selectable marker</i>) je gen, ki ga vsadimo v celico (v bakterijo ali celice v kulturi) in ki prenese določeno dedno znamenje, primerno za selekcijo. Ti označevalci pomagajo določiti uspešnost transfekcije. Mnogokrat se za to uporablajo geni za odpornost na antibiotike. Bakterije, ki imajo vsajen ustrezen gen, so odporne na antibiotike in tako lahko osamimo kolonije, ki imajo vsajen naš genetski material. |
| Kapsida | Virusna ovojnica. |
| Kompetentna celica | Celica, ki je sposobna iz okolja vnesti tujo golo DNA (gola pomeni, da je brez proteinov, ki so običajno vezani na DNA) in jo izražati. Poznamo naravno kompetentne in umetno pridobljene kompetentne celice. |
| Lentivirus* | Rod virusov iz družine retrovirusov. Tip RNA virusa, ki ga lahko spremenimo tako, da z njegovo pomočjo v celice vstavimo nov genetski material. Lentivirusi imajo več prednosti pred uporabo retrovirusov, med katerimi je zelo pomembna njihova zmožnost vstavljanja genetskega materiala tudi v jeda nedelečih se celic. |
| Mesto kloniranja* | Imenovano tudi mesto MCS (angl. <i>multiple cloning site</i> , MCS; imenovan tudi polilinker) je kratek odsek DNA, ki vsebuje približno 20 restrikcijskih mest (specifična zaporedja nukleotidov, ki jih prepozna restrikcijski encimi in jih cepijo; npr. restrikcijski encim <i>EcoRI</i> prepozna zaporedje GAATTC in ga cepi točno med G in A). |
| Mesto ORI | (angl. <i>origin of replication</i>) Imenovano tudi mesto začetka replikacije plazmida je nekaj sto baznih parov dolg segment DNA, definiran kot najkrajši del plazmidne DNA, ki se je še sposoben avtonomno replicirati. Določa tudi število kopij plazmida v bakteriji. Ločimo mesta ORI, ki določajo visoko število kopij plazmida (500–700 kopij na bakterijsko celico), in mesta ORI, ki določajo majhno število kopij plazmida (tipično 15–20 kopij na bakterijsko celico). |
| Multipotentna celica | Celica, ki se je sposobna diferencirati v več različnih celičnih linij, vendar ne v vse tri zarodne plasti. |
| Plazmid* | Plazmidi so krožne dvojnovijačne molekule DNA, ki niso vključene v kromosome in se lahko samostojno razmnožujejo. Plazmidi so prenosni genski elementi (replikoni) in se samostojno razmnožujejo v ustreznom gostitelju. Za razliko od virusov so plazmidi sestavljeni iz gole DNA in nimajo genov, ki bi kodirali vse potrebne molekule za prenos genetskega materiala v novega gostitelja, zato je za njihov prenos potrebna mehanska pomoč ali pa pomoč gostitelja. Transformacija mikrobov s plazmidno DNA ni niti simbolična niti parazitska, saj oboje pomeni, da v neki celici gostuje dodatno živo bitje, kar pa plazmidi po sedanji definiciji življenja niso. Plazmide uporabljamo tudi v biotehnologiji in takrat jih imenujemo vektorji. |

| | |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pluripotentna matična celica* | Pluripotentna matična celica je celica, sposobna tvoriti vse telesne celice, vključno z germinalnimi celicami. Primer so embrionalne matične celice. Znanstveni dokaz, da so neke celice pluripotentne, je njihova sposobnost diferenciacije v celice vseh treh embrionalnih plasti (endoderm, ektoderm in mezoderm). |
| Poliadenilacija mRNA | Je proces, pri katerem se na skrajni 3' konec mRNA doda poliadenilacijski rep, dalje zaporedje adenozin monofosfatnih molekul. Spada med procese zorenja mRNA molekule, njegov namen pa je povečanje stabilnosti in s tem zaščita mRNA molekule. |
| Poliadenilacijski signal | Zaporedje DNA, ki sproži poliadenilacijo mRNA. |
| Policistronek vektor | (angl. <i>polycistronic vector</i>) Vrsta vektorja, za katerega velja, da nosi zapis za več različnih proteinov pod nadzorom enega promotorja. |
| Poročevalni gen | Imenovan tudi poročevalec (angl. <i>reporter</i>); zapisuje protein s posebno lastnostjo, ki olajša njegovo detekcijo. Primer takega gena je gen GFP z zapisom za zeleni fluorescirajoči protein, ki izvira iz meduze, lahko pa ga vstavimo v DNA katerekoli celice. Fluorescanca omogoča detekcijo proteina GFP. |
| Profil izražanja genov | Predstavlja nabor genov, ki se izražajo v določenem celičnem tipu v določenem trenutku. |
| Progenitorska celica* | Imenovana tudi predniska celica; je hčerinska celica, usmerjena potomka matične celice v neposredni liniji. Je že delno diferencirana celica, ki je lahko tudi materinska celica različnim, bolj diferenciranim celičnim tipom celic. Iz nje nastanejo nove celice po seriji celičnih delitev. |
| Promotor* | Promotor je v molekularni biologiji izraz za nukleotidno zaporedje, ki omogoči, da se gen lahko prepisuje. To zaporedje prepozna polimeraza RNA, ki prične s prepisovanjem DNA v mRNA. Na ta način promotorji določajo, kateri geni se bodo izrazili v obliki proteinov. |
| Psevdotipizacija (angl. <i>pseudotyping</i>) | Proces zamenjave prvotnih glikoproteinov virusne ovojnici z glikoproteini ovojnici drugih virusov. Glikoproteini na virusni ovojnici določajo, katere celice je virus sposoben transducirati, zato se psevdotipizacija uporablja za izboljševanje virusnih vektorjev. |
| Totipotentna celica* | Je celica, sposobna tvoriti celoten organizem, vključno z ekstraembrionalnim tkivom (trofoblast). Totipotentne celice v naravi so samo zigota in blastomere, ki nastanejo v zgodnjih celičnih delitvah zarodka do stadija morule. Po nastanku blastociste pride do prve diferenciacije celic in izgube totipotentnosti. Pri rastlinah so totipotentne meristemske celice. |
| Transdiferenciacija* | Transdiferenciacija je proces, pri katerem se tkivne matične celice iz enega tkiva odraslega spremenijo (ozioroma diferencirajo) v specializirane celice drugega tkiva. Transdiferenciacija je naraven pojav in je eden od mehanizmov plastičnosti matičnih celic. Mehanizem še ni popolnoma pojasnjen. |
| Transdukcija | Imenovana tudi virusna transfekcija, je proces vnosa tujega zaporedja DNA v celico s pomočjo virusa. |
| Transfekcija* | Transfekcija je prenos tuge DNA v celice evkariontskega prejemnika. Tuja DNA se pri tem lahko vgradi v kromosomske DNA. Tujo DNA vnesemo lahko z elektroporacijo, raznimi vektorji (plazmidi, virusi, kozmidi, umetni kromosomi), fizikalno in s kemikalijami. Navadno uspe transfekcija samo pri določenem odstotku tarčnih celic. |
| Transformacija | Proces vnosa DNA v kompetentne prokariotske celice. |
| Unipotentna celica* | Je celica, sposobna le razvoja v eno celično linijo. |
| Vektor* | Vektor je vsaka molekula DNA, s katero prenesemo dedno informacijo v tujo celico. Ta prenos imenujemo tudi "transfekcija", prenos in vsaditev virusnih vektorjev pa tudi "transdukcija". Namen prenosa genske informacije z vektorji je, da bi zaželeno DNA zaporedje namnožili, izolirali ali pa samo izrazili v tarčni celici. |

*Rožman in Jež, 2011

1 UVOD

Opazovanje izražanja genov v realnem času v živih celicah je z uporabo tradicionalnih metod – kot so reakcija PCR, prenos western in imunocitokemija – nemogoče. Za analizo je treba celice lizirati in jih s tem uničiti. Za vsak trenutek, v katerem želimo preveriti stanje izražanja opazovanega gena, je zato treba uničiti nov vzorec celic. Spremljanje izražanja gena skozi daljše časovno obdobje tako zahteva gojenje velikega števila celic, kar pomeni več dela, porabljenega gojišča in gojilnih posod ter podražitev eksperimenta.

Do celic prijaznejšo metodo spremeljanja aktivacije ali utišanja določenega promotorja v živih celicah v realnem času omogoča uporaba poročevalnega vektorja. Ta predstavlja umetni fizijski konstrukt DNA med promotorjem opazovanega gena in sekvenco za poročevalni protein. Ob vnosu vektorja v celico se hkrati z endogenim promotorjem aktivira tudi promotor na poročevalnem vektorju in posledično pride do izražanja poročevalnega proteina. Uporaba poročevalnih vektorjev za spremeljanje aktivacije izbranega promotorja je poznana že dalj časa (Kain in Ganguly, 2001). Časovno potratna izdelava in izbor poročevalnih molekul, katerih detekcija je zahtevala uporabo radioaktivnih izotopov in dragih substratov, je vplivala na njihovo nepriljubljenost. Šele odkritja novih poročevalnih molekul in predvsem kloniranje cDNA zelenega fluorescirajočega proteina – GFP so povečala uporabnost poročevalnih vektorjev. GFP je bil sicer odkrit in opisan že leta 1961 (Shimomura in sod., 1962; Shimomura, 2005), njegova uporaba kot poročevalnega proteina pa je bila omogočena šele 30 let po njegovem odkritju. Leta 1994 je Chalfie s sodelavci uspelo klonirati GFP cDNA v vektor in jo tudi uspešno izraziti (Chalfie in sod., 1994). GFP je zaradi svoje netoksičnosti in zelo enostavne detekcije postal ena izmed najbolj priljubljenih poročevalnih molekul. Danes so na voljo številne barvne različice fluorescirajočih proteinov, kar pomeni, da je mogoče spremljati več poročevalnih molekul hkrati (Shaner in sod., 2005).

Celično ali epigenetsko reprogramiranje je lahko naraven ali umetno voden proces spremnjanja usode celic. Naravno je pri sesalskih celicah celično reprogramiranje praviloma usmerjeno samo v specializacijo celic in s tem njihovo diferenciacijo. Spoznanja pri proučevanju celičnega reprogramiranja drugih živalskih skupin pa so pripeljala do novih odkritij na področju plastičnosti sesalskih celic. Dokazano je bilo, da so diferencirane somatske sesalske celice pod točno določenimi pogoji sposobne dediferenciacije v pluripotentno stanje in celo transdiferenciacije v specializirane somatske celice, ki bi naravno izhajale iz druge zarodne plasti (Nicholas in Kriegstein, 2010; Joplin in sod., 2011). Seveda je bilo treba pred izvedbo umetnega epigenetskega reprogramiranja obvladati nekaj osnovnih načinov manipulacije dednine v sesalskih celicah. Za prelomne dogodke na področju celičnega reprogramiranja lahko označimo tehniko prenosa somatskega jedra (SCNT) (Briggs in King, 1952) in iz nje razvito reproduktivno kloniranje, primer ovce Dolly (Wilmut in sod., 1997), uspešno izolacijo in gojenje

humanih embrionalnih matičnih celic (Thomson in sod., 1998), odkritje metode indukcije pluripotentnih celic iz humanih fibroblastov (Takahashi in sod., 2007; Yu in sod., 2007) in transdiferenciacije iz fibroblastov v nevrone (Vierbuchen in sod., 2010).

Celično reprogramiranje prinaša možnosti za nove vire celic, s pomočjo katerih bi lahko zdravili paciente z zaenkrat neozdravljenimi poškodbami in boleznimi. Največ si od celičnega reprogramiranja obetata prav regenerativna medicina in tkivno inženirstvo (Hanna in sod., 2010; Hankowski in sod., 2011).

Proces celičnega reprogramiranja je pogosto dolgotrajen in zahteva večtedensko gojenje celic v določenih pogojih, pri čemer se v celici dogajajo kompleksne epigenetske spremembe. Prihaja do globalne genomske demetilacije, modifikacij histonov in reorganizacije kromatina (Hochedlinger in Plath, 2009).

Kljub kompleksnosti procesov, ki se odvijajo med celičnim reprogramiranjem, je končni rezultat vedno enak in predstavlja spremembo v aktivaciji ali deaktivaciji izražanja za celični tip značilnih genov, pri čemer se ponovno začnejo izražati geni predhodnih stadijev normalne diferenciacije celic (dediferenciacija) ali geni, značilni za nov celični tip (diferenciacija in transdiferenciacija) (Ieda in sod., 2010; Papp in Plath, 2011).

Validacija uspešnosti reprogramiranja je relativno poenostavljena, saj je treba dokazati zgolj spremembo profila izražanja genov celic. Kot primer lahko navedemo umetno dediferenciacijo, kjer je treba vedno dokazati, da se začno izražati geni, značilni za zgodnejše obdobje razvoja embria. Vzorec izražanja genov se spremeni za veliko genov, vendar je za prvo oceno dovolj, če opazujemo le posamezne, ki so značilni za določen celični tip. Primer uporabnosti te zadnje poenostavitev je spremeljanje izražanja gena za težko verigo α -miozina pri transdiferenciaciji fibroblastov v kardiomiocite. Že samo spremeljanje izražanja gena za težko verigo α -miozina je zadostovalo za uspešno oceno transdiferenciacijskega protokola (Ieda in sod., 2010).

1.1 NAMEN DELA

Glavni namen našega eksperimenta je izdelava molekulskega orodja oziroma poročevalnega vektorja za spremljanje izražanja izbranega gena z dvema poročevalcema (**Slika 9**). Prvi poročevalec je zaporedje DNA, ki je pod nadzorom konstitutivnega citomegalovirusnega (CMV) promotorja in služi kot indikator uspešne transfekcije celic z vektorjem. Omogoča enostavno in hitro vizualno oceno uspešnosti transfekcije tudi v celicah, ki še ne izražajo opazovanega gena. Ta se pri celičnem reprogramiraju izraža šele v ciljnem in ne v začetnem celičnem tipu, zato v začetnem celičnem tipu ne pride do aktivacije drugega poročevalca. Tradicionalna metoda preverjanja uspešnosti transfekcije, selekcija z izbirnim označevalcem (npr. odpornost na neomicin), poda oceno njene uspešnosti šele po nekaj dneh gojenja pod selekcijskim pritiskom, omenjeni prvi poročevalec pa že po enem dnevu. Kljub temu naš vektor omogoča tudi selekcijo z

izbirnim označevalcem. Pred drugi poročevalec pa smo umestili mesto MCS, s pomočjo katerega je v vektor možno enostavno klonirati sekvenco promotorja gena, katerega izražanje želimo opazovati. Izbrani poljubni promotor, vgrajen v poročevalni vektor in vnesen v celico, se aktivira skupaj z endogenim (naravno prisotnim promotorjem v celici) promotorjem, zaradi česar se ob izražanju gena, ki ga nadzoruje endogeni promotor, izraža tudi drugi poročevalec, ki ga nato detektiramo.

1.2 HIPOTEZE

Naša prva delovna hipoteza je, da je v poročevalni vektor z dvema poročevalcema možno uspešno vgraditi katerikoli promotor in da bo tako spremenjeni vektor uspešno poročal o izražanju izbranega gena (drugi poročevalec) ter da bo s poročevalnim vektorjem možno enostavno in hitro razločevati med uspešno transficiranimi in netransficiranimi celicami (prvi poročevalec). Ključna je torej izgradnja funkcionalnega poročevalnega konstrukta.

Naša druga delovna hipoteza pa je, da je možno poročevalni konstrukt prenesti v vektor, ki omogoča učinkovitejšo in enostavnejšo transfekcijo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPREMLJANJE IZRAŽANJA GENOV

Celice večceličnih organizmov se kljub praviloma identičnemu genetskemu materialu lahko funkcionalno in morfološko močno razlikujejo. Pri primerjavi nevrona z limfocitom težko verjamemo, da imata celici v jedru identičen genom. To je bil tudi razlog, da so včasih verjeli, da se med celično diferenciacijo posamezni geni izločijo iz genoma. Danes vemo, da se med razvojem organizma in nastankom novih celičnih tipov geni fizično ne izločijo, pač pa se spremeni nabor genov, ki se izražajo. Razlike med različnimi tipi celic v organizmu tako niso odraz genoma, temveč uravnavanja izražanja genov (Alberts in sod., 1994).

Uravnavanje izražanja genov je kompleksen proces, ki poteka na osnovnih nivojih, od reorganizacije dednega zapisa v kromatinu do transkripcije, procesiranja nastale mRNA, translacije in posttranslacijskega procesiranja.

Med reorganizacijo kromatina je izražanje genov nadzorovano s spremembami na ravni DNA. pride do sprememb v kondenzaciji kromatina (evkromatin, heterokromatin), povečane ali zmanjšane metilacije DNA in kemijskih sprememb histonov (metilacije, acetilacije ...).

Na ravni uravnavanja prepisa genov sinteza RNA uravnavajo številne interakcije med proteinskimi kompleksi, ki sestavljajo celični mehanizem za transkripcijo.

Na ravni procesiranja RNA poteka uravnavanje preko alternativnega spajanja eksonov in modifikacij, ki vplivajo na stabilnost mRNA.

Na ravni translacije poteka uravnavanje izražanja genov preko interakcij med proteinskimi kompleksi celičnega mehanizma translacije.

Na ravni posttranslacijskega procesiranja obstajajo številni mehanizmi, ki regulirajo encimsko aktivnost, aktivacijo, stabilnost itd.

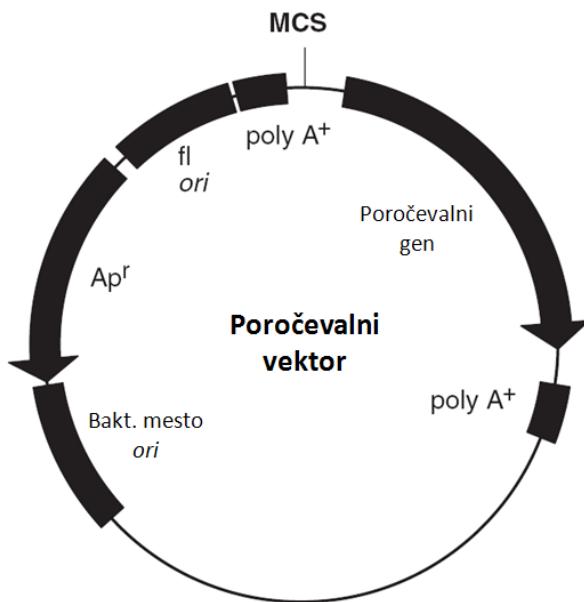
Uravnavanje izražanja genov je zelo zapleteno, ker se poleg posameznih nivojev vse ravni med seboj prepletajo (Hartl in Jones, 1998). Kljub kompleksnosti mehanizmov uravnavanja izražanja genov pa lahko izražanje posameznih genov relativno dobro spremljamo z enostavnimi metodami. Tradicionalne metode, kot so reakcija PCR, prenos western in imunocitokemija, so zelo izpopolnjene in občutljive, vendar ne omogočajo spremmljanja sprememb v realnem času in v živih celicah. Slednje omogoča uporaba poročevalnih vektorjev, s pomočjo katerih lahko spremljamo aktivacijo promotorja opazovanega gena in s tem izražanje tega gena (Kain in Ganguly, 2001). Ta metoda nam omogoča spremmljanje prvih dveh prej omenjenih ravni uravnavanja izražanja genov, to je

uravnavanje na ravni kromatina in na ravni transkripcije, in je zato konkurenčna metoda PCR. Pri metodi PCR se pojavljajo težave pri razlikovanju med geni in psevdogeni, saj so si ti po sekvenci pogosto zelo podobni (Ambady in sod., 2010). Ker s poročevalnim vektorjem zaznavamo aktivacijo promotorja in ne sekvence opazovanega gena, lahko brez težav razlikujemo med izražanjem pravih in psevdogenov, če so ti pod nadzorom različnih promotorjev (Redshaw in Strain, 2010).

2.1.1 Poročevalni vektor

Poročevalni vektor je fuzijski konstrukt DNA, sestavljen iz promotorske regije gena, katerega izražanje želimo opazovati, in gena z zapisom za poročevalni protein. Zaradi enostavne manipulacije se kot vektorje najpogosteje uporablja plazmide. Ob vnosu vektorja v celico se pri izražanju opazovanega gena poleg endogenega promotorja aktivira tudi homologni eksogeni promotor na vektorju, ki nadzira izražanje poročevalnega proteina. Z detekcijo poročevalnega proteina lahko tako spremljamo izražanje izbranega gena (Kain in Ganguly, 2001).

Ostali elementi, ki so skupni večini poročevalnih vektorjev, so mesto ORI (angl. *origin of replication*), izbirni označevalec (odpornost na antibiotik), mesto MCS in poliadenilacijski signal (**Slika 1**).



Slika 1: Shema osnovnega poročevalnega plazmidnega vektorja (Kain in Ganguly, 2001: 5)

MCS označuje mesto kloniranja, kamor vstavimo želeni promotor. Poly A⁺ označuje položaj poliadenilacijskih signalov. Ori označuje bakteriofagno (fl ori) in bakterijsko mesto začetka replikacije plazmida. Puščice prikazujejo smer transkripcije poročevalnega gena in gena za odpornost na antibiotik (Ap^r) (Kain in Ganguly, 2001).

Mesto ORI ali mesto začetka replikacije plazmida je nekaj sto baznih parov dolg segment DNA, definiran kot najkrajši del plazmidne DNA, ki se je še sposoben avtonomno replicirati. Določa tudi število kopij plazmida v bakteriji. Ločimo mesta ORI, ki določajo visoko število kopij plazmida (500–700 kopij na bakterijsko celico) in se uporabljajo za namene molekulskega kloniranja, ter mesta ORI, ki določajo majhno število kopij plazmida (tipično 15–20 kopij na bakterijsko celico). Ta zadnja se uporabljajo za kloniranje nestabilnih DNA sekvenc in genov, ki so letalni, če so v celici prisotni v prevelikem številu (Sambrook in Russell, 2001). Pogosto najdemo v plazmidih poleg bakterijskega mesta ORI tudi mesto ORI bakteriofagnega izvora. To omogoča proizvodnjo enovijačnih plazmidov, uporabnih za sekvenciranje ali raziskovanje mutageneze (Kain in Ganguly, 2001).

V laboratoriju plazmidno DNA vnašamo v bakterije s postopkom transformacije, ki ni zelo učinkovit proces. Izbirni označevalci, geni z zapisom za odpornost na antibiotik, omogočajo enostavno selekcijo uspešno transformiranih bakterij. Najpogosteje se uporablja odpornost na kanamicin, ampicilin ali tetraciklin. Prvič so bili uporabljeni že v osemdesetih letih prejšnjega stoletja (Sambrook in Russell, 2001).

Mesto, s pomočjo katerega v vektor vnesemo promotorsko sekvenco želenega opazovanega gena, se imenuje mesto MCS (angl. *multiple cloning site*) ali mesto kloniranja. Sestavljen je iz treh ali več za izbrani plazmid unikatnih restriktijskih mest na DNA sekvenci dolžine nekaj deset baznih parov (Sambrook in Russell, 2001).

Promotorska regija določa gen, katerega izražanje želimo spremljati. V poročevalnih vektorjih pogosto ne najdemo klonirane celotne promotorske regije, saj bi bilo to zaradi velikosti nekaterih promotorjev nepraktično. Za uspešno poročanje o izražanju izbranega gena velikokrat zadostuje že minimalni promotor z določenimi regulacijskimi elementi, ki so del nativne promotorske sekvence. Ker pa promotorska regija pomeni stikalo, ki mora biti sinhronizirano z aktivacijo endogenega promotorja opazovanega gena, je treba eksperimentalno ugotoviti, kako velik del endogene promotorske regije zadostuje za ustrezno poročanje o aktivaciji opazovanega gena. Eksperimentalno določanje minimalne, a še vedno učinkovite promotorske regije zna biti dolgotrajno in zahtevno. Nemalokrat pa lahko ta korak preskočimo (Kain in Ganguly, 2001). Za številne gene je bila minimalna promotorska regija iz različnih vzrokov že ovrednotena in klonirana v plazmidni vektor (Mancino in sod., 2007; Green in sod., 2008). Izbrani promotor tako lahko poiščemo in naročimo v banki plazmidov, kot je npr.: Addgene (Plasmid 21153..., 2011).

Za pravilno in učinkovito procesiranje RNA transkripta poročevalnega proteina poskrbi poliadenilacijsko mesto, ki se nahaja takoj za poročevalnim genom (Kain in Ganguly, 2001).

2.1.2 Poročevalni proteini

Poročevalni protein pomeni ključno komponento za funkcionalno uporabnost reporterskega sistema. Ustrezati mora štirim osnovnim zahtevam: a) protein ne sme biti naravno prisoten v organizmu ali celici, da ga lahko ločimo od endogenih proteinov; b) imeti mora posebno lastnost, zaradi katere ga lahko enostavno, hitro in brez večjih stroškov zaznamo; c) metoda za zaznavo poročevalnega proteina mora imeti čim širše linearne območje korelacije med količino proteina in jakostjo signala, ki ga merimo; in d) izražanje poročevalnega proteina ne sme vplivati na fiziološke procese, ki se odvijajo v celici. Reporterske proteine glede na namen delimo v dve skupini. Prvi se uporabljam v sistemih *in vitro*, drugi pa v sistemih *in vivo* (Kain in Ganguly, 2001).

Za proteine, ki se uporabljam v sistemih *in vitro*, je značilno, da koncentracijo poročevalnega proteina merimo v celičnih ali tkivnih lizatih ali v mediju, v katerem so bile gojene transficirane celice, če se poročevalni protein izloča v medij. S pomočjo takšnih proteinov lahko merimo le jakost signala, ne moremo pa določiti natančne lokacije signala (na primer tega, ali je izražanje proteina omejeno samo na določene celice) (Kain in Ganguly, 2001).

Za poročevalne proteine, uporabne v sistemih *in vivo*, pa je značilno, da njihov signal merimo pri živih celicah, tkivih ali celo celih organizmih (Chalfie in sod., 1994). Sem spadajo tudi aplikacije, pri katerih signal merimo v fiksiranih tkivih ali celicah, saj kljub temu, da fiksirani preparati niso živi, kvantitativno in kvalitativno odražajo trenutek stanja v živih celicah. Prednost poročevalnih proteinov *in vivo* je poleg kvantifikacije signala v tem, da lahko določimo natančno lokacijo signala (Kain in Ganguly, 2001).

2.1.3 Primeri poročevalnih proteinov

Najpogosteje uporabljeni poročevalni proteini so: kloramfenikol acetiltransferaza, luciferaza, β -galaktozidaza, sekrecijska alkalna fosfataza, humani rastni hormon, β -glukuronidaza in fluorescentni proteini.

Koramfenikol acetiltransferaza ali CAT je encim prokariotskega izvora. Primeren je za uporabo kot poročevalni protein za spremljanje izražanja proteinov v evkariotskih celicah, saj ga tam nativno ne najdemo (Gorman in sod., 1982). Razpolovna doba encima v sesalskih celicah je 50 h (Thomson in sod., 1991). Funkcija CAT je prenos acetilne skupine iz acetil-koencima A na kloramfenikol. Najpogosteje se v testu z CAT uporablja ^{14}C -označen kloramfenikol, ki se ga skupaj z acetil-koencimom A doda v celični lizat. Acetiliran in neacetiliran kloramfenikol se loči s tankoplastno kromatografijo na steklenih ploščah, prevlečenih s posebno silikonsko plastjo. Plošče se nato izpostavijo rentgenskemu filmu, s pomočjo katerega se zazna signal izotopsko označenega kloramfenikola. Obstaja več različic testov zaznave aktivnosti CAT – tudi testi, pri katerih se ne uporabljam radioaktivni izotopi. Uporaba CAT kot reporterske molekule je zaradi časovne potratnosti,

delovne intenzivnosti, slabe občutljivosti in uporabe radioaktivnih izotopov (pri večini aplikacij) pri metodah detekcije upada, saj je na voljo veliko boljših reporterskih proteinov. Uporaba CAT je omejena na *in vitro* poročevalne sisteme (Kain in Ganguly, 2001; Gorman in sod., 1982).

Luciferaza iz kresničke (*P. pyralis*) je bil prvi poročevalski protein, ki za detekcijo ni potreboval radioaktivnih izotopov. Gen za luciferazo je bil iz *Photinus pyralis* kloniran leta 1987 (de Wet in sod, 1987). Bioluminiscentna reakcija, ki jo katalizira luciferaza, potrebuje substrat luciferin, ATP, Mg²⁺ ione in kisik. Ko se celičnemu lizatu, v katerem je luciferaza, doda mešanica substrata in kofaktorjev, to povzroči blisk svetlobe. Za detekcijo bliska je potreben luminometer s sistemom avtomatskega vbrizgavanja, saj lahko le tako dosežemo ponovljivost rezultatov. Kot detektor se lahko uporabi tudi scintilacijski števec. Zaradi kratke razpolovne dobe (3 h) je luciferaza dober poročevalec za preučevanje dinamike izražanja določenega gena. Težava pri uporabi luciferaze kot poročevalca je – zaradi kratkotrajnosti bliska, ki ga detektiramo – ponovljivost rezultatov. Problem je bil delno rešen z dodatkom koencima A v reakcijsko mešanico. Zaradi tekmovanja med substratoma koencimom A in luciferinom traja blisk dlje. Odkritje substratov, ki lahko prehajajo celično membrano, je omogočilo uporabo luciferaze tudi v *in vivo* sistemih (Bronstein in sod., 1994). Luciferazni sistem je relativno občutljiv (10- do 1000-krat bolj od CAT), njegove pomanjkljivosti pa so problem ponovitve rezultatov ter drage aparature za zaznavo in analizo signala (Kain in Ganguly, 2001).

β-galaktozidaza je poročevalni encim, ki je sposoben katalize različnih substratov z *in vitro* in *in vivo* aplikacijami. Zapisuje jo gen *lacZ* bakterije *E. coli*. β-galaktozidaza katalizira hidrolizo različnih β-galaktozidov. Za uporabo v *in vitro* aplikacijah je bilo razvitih nekaj različnih substratov, ki omogočajo kolorimetrično, fluorimetrično ali kemiluminiscentno detekcijo. Najbolj poznan substrat, namenjen uporabi *in vivo*, je X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil galaktopiranozid) (Alam in Cook, 1990). Reakcija β-galaktozidaze z X-Gal povzroči močno modroobarvanje. Detekcija izražanja genov z β-galaktozidaznim poročevalcem je veliko prispevala k razumevanju tkivno specifičnega izražanja genov med razvojem zarodkov. Odkrit je bil tudi substrat, di-β-D-galaktopiranozid, ki omogoča fluorimetrično zaznavo β-galaktozidaze v živih celicah. Uporaba β-galaktozidaze kot reporterskega proteina ima številne možnosti detekcije, uporaba kemiluminiscentnih substratov omogoča relativno dobro občutljivost. Zaradi široke uporabnosti je uporaba β-galaktozidaze dobro ovrednotena in pogosto služi kot interna kontrola za ovrednotenje drugih poročevalnih proteinov. Njena glavna slabost pa je, da imajo številne celice že same po sebi visoko endogeno β-galaktozidazno aktivnost (Kain in Ganguly, 2001).

Sekrecijska alkalna fosfataza ali SEAP se od ostalih poročevalcev razlikuje po tem, da jo transficirane celice izločajo v medij, kar omogoča detekcijo izražanja opazovanega gena že samo z odvzemom alikvota medija, zato metoda do celic ni destruktivna. Gen z zapisom za

SEAP predstavlja skrajšano obliko gena za humano alkalno fosfatazo iz placente, ki mu manjka zapis za transmembransko domeno. To omogoča prosto sekrecijo SEAP v medij. Koncentracije SEAP v mediju so neposredno proporcionalne z intraceličnimi koncentracijami SEAP mRNA in proteina (Berger in sod., 1988). Aktivnost endogenih alkalnih fosfataz pri uporabi SEAP kot poročevalca ni problematična. Njihovo delovanje je enostavno inhibirati, saj je SEAP v nasprotju z endogenimi fosfatazami izredno odporna na temperaturo in fosfatazni inhibitor L-homoarginin. Prvotna metoda detekcije je bila kolorimetrična in je kot substrat uporabljala *p*-nitrofenil fosfat. Postopek je bil hiter, enostaven in poceni, vendar neobčutljiv. Občutljivost so močno povečali z uporabo kemiluminiscentnih substratov. SEAP je poročevalni encim, uporaben samo v aplikacijah spremljanja izražanja genov *in vitro* (Bronstein in sod., 1994).

Humani rastni hormon ali hGH nativno izražajo samo celice prednjega režnja hipofize, zato ga lahko uporabljamо kot poročevalni protein v vseh drugih sesalskih celicah. Podobno kot SEAP se tudi hGH izloča v medij. Metoda za detekcijo hGH je neobčutljiva in zahteva uporabo dragih radioaktivnih izotopov. Primeren je za uporabo kot interna kontrola drugih poročevalnih sistemov (Selden in sod., 1986).

β -glukuronidaza ali GUS je encim bakterijskega izvora in se uporablja predvsem kot poročevalni gen v rastlinah, saj rastline nimajo endogene GUS aktivnosti. Rastline, transformirane z GUS so zdrave, se normalno razvijejo in so plodne. Podobno kot β -galaktozidaza je tudi GUS sposobna katalizirati različnih substratov. Med najbolj priljubljenimi substrati za kolorimetrično detekcijo je X-Gluc (5-bromo-4-kloro-3-indolil glukuronid). Razviti pa so bili tudi kemiluminiscentni substrati, ki omogočajo do stokrat bolj občutljivo metodo kot substrati X-Gluc (Bronstein in sod., 1994). Uporabna je tako v *in vitro* kot v *in vivo* aplikacijah.

Fluorescentni proteini

Odkritje zelenega fluorescirajočega proteina (GFP) leta 1961 je bilo, tako kot velika večina pomembnih odkritij, naključno (Shimomura in sod., 1962; Shimomura, 2005). Pri izolaciji in prečiščevanju bioluminiscentnega proteina akveorina (angl. *aequorin*) iz meduz vrste *Aequorea victoria* so Shimomura in sodelavci opazili, da ena izmed proteinskih frakcij, izoliranih iz svetilnih organov meduz, na sončni svetlobi sveti rahlo zelenkasto, če pa so jo obsvetili z UV lučjo, je svetila svetlo zeleno (Shimomura in sod., 1962; Tsien, 2008). Kmalu za tem je ista znanstvena skupina objavila tudi emisijski spekter GFP, katerega vrh je pri 508 nm (Tsien, 1998). Čeprav so se nekatere znanstvene skupine trudile s fizikalno in kemijsko karakterizacijo GFP (Prendergast in Mann, 1978), je šele razkritje sekvence cDNA (Prasher in sod., 1992) in nato njeno kloniranje in izražanje v *E. coli* in *C. elegans* leta 1994 razkrilo pravi potencial trideset let starega odkritja (Inouye in Tsuji, 1994; Chalfie in sod., 1994).

Odkritje GFP in razvoj drugih variant fluorescentnih proteinov sta znanstvenikom zagotovila močno orodje za opazovanje izražanja, utišanja in prostorske lokalizacije genov v živih celicah, tkivih in celo v nekaterih organizmih (Chalfie in sod., 1994; Zhou in sod., 2005).

238 aminokislinskih ostankov dolga in 26,9 kDa velika molekula GFP je hitro prehitela priljubljenost drugih poročevalnih sistemov, ki so uporabljali β -galaktozidazo in luciferazo, saj obe metodi za detekcijo potrebujeta eksogene substrate in kofaktorje, kar omejuje njuno uporabnost v sistemih *in vivo*. Ker je za vzbuditev fluorescence GFP potreben samo svetlobni vir v modrem spektru, je odlično orodje za spremljanje izražanja genov in lokalizacije proteinov v živih celicah. Zaradi svoje netoksičnosti in inertnosti glede na celično fiziologijo je zelo uporaben kot pokazatelj učinkovitosti transfekcije in omogoča enostavno ločevanje fluorescentno označenih celic s pretočnim citometrom – FACS (Chalfie in sod., 1994; Yeh in sod., 1995; Houtefort in Hinton, 2000).

Danes poznamo številne barvne različice proteina GFP, ki so bile pridobljene s točkovnimi mutacijami nativnega gena GFP, druge pa so izpopolnjene različice fluorescentnih proteinov podobnih GFP, izoliranih iz meduze *A. coerulescens* (protein AcGFP), *Discosoma sp.* (morski polipi), *F. concinna* (vrsta morskega polža) itd. Nove različice fluorescentnih proteinov (FP) so tudi bolj obstojne v različnih pH, bolj odporne na fotobleedenje in močneje svetijo (Shaner in sod., 2005). Barvne različice so omogočile hkratno spremljanje več različnih genov ali proteinov (Isseva in sod., 2010). Najpogosteje uporabljeni fluorescentni蛋白 so zbrani v **Preglednici 1**, kjer so podane primerjave med njimi glede na valovno dolžino vzbujevalne (ekscitacija) in oddane (emisija) svetlobe, svetlost in fotostabilnost.

Preglednica 1: Lastnosti najpogostejših fluorescentnih proteinov (Shaner in sod., 2005; 907)

| Barva | Protein | Ekscitacija (nm) | Emisija (nm) | Svetlost ^a | Fotostabilost ^b (s) |
|------------------------|---------------|---------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------------------|
| Violična | mPlum | 590 | 649 | 4,1 | 53 |
| Rdeča | mCherry | 587 | 610 | 16,0 | 96 |
| | tdTomato | 554 | 581 | 95,0 | 98 |
| | mStrawberry | 574 | 596 | 26,0 | 15 |
| | J-Red | 584 | 610 | 8,8 | 13 |
| | DsRed-monomer | 556 | 586 | 3,5 | 16 |
| Oranžna | mOrange | 548 | 562 | 49,0 | 9 |
| | mKO | 548 | 559 | 31,0 | 122 |
| Rumena | mCitrine | 516 | 529 | 59,0 | 49 |
| | Venus | 515 | 528 | 53,0 | 15 |
| | YPet | 517 | 530 | 80,0 | 49 |
| | EYFP | 514 | 527 | 51,0 | 60 |
| Zelena | Emerald | 487 | 509 | 39,0 | 0,69 |
| | EGFP | 488 | 507 | 34,0 | 174 |
| Modrozelena | CyPet | 435 | 477 | 18,0 | 59 |
| | mCFPm | 433 | 475 | 13,0 | 64 |
| | Cerulean | 433 | 475 | 27,0 | 36 |
| UV-zelena ^c | T-Sapphire | 399 | 511 | 26,0 | 25 |

^aVečja vrednost pomeni večjo svetlost. Vrednosti so bile pridobljene pri primerjavi enake koncentracije FP pri enakem pH. ^bČas, ki je potreben, da emisija pade s 1000 fotonov/s na 500 fotonov/s. ^cEkscitacija FP v UV spektru, emisija v zelenem spektru.

Sposobnost vizualizacije, sledenja in kvantifikacije produktov genetskega izražanja v živih tkivih in celicah je močno pripomogla k hitrejšemu razumevanju funkcije posameznih genov in procesov, v katerih sodelujejo (Shaner in sod., 2005).

2.1.4 Uporaba poročevalnih vektorjev pri celičnem reprogramiraju

Aplikacija poročevalnih vektorjev pri celičnem reprogramiraju ni tako pogosta, kljub temu pa obstajajo primeri njihove uspešne uporabe. Večinoma so kot označevalec pluripotentnosti spremljali izražanje gena *OCT4*.

Poročevalni vektor z mišjim promotorjem *OCT4* so uporabili za opazovanje izražanja gena *OCT4* v mišjih, govejih in prašičjih zgodnjih zarodkih pri naravnem procesu diferenciacije. Kljub mišjemu promotorju se je poročevalec obnesel tudi v zarodkih drugih dveh vrst (Kirchhof in sod., 2000). Kmalu zatem je sledila uporaba podobnega poročevalnega sistema za kvantifikacijo izražanja gena *OCT4* v govejih zarodkih pridobljenih s tehniko prenosa somatskega jedra – SCNT (Wuensch in sod., 2007). Za oceno uspešnosti SCNT pri miših so razvili poročevalec s promotorjem *OCT4*, ki je nadzoroval izražanje β -galaktozidaze (Munsie in sod., 2002).

Poročevalec GFP pod nadzorom promotorja *OCT4* so uporabili tudi kot pokazatelj uspešnega reprogramiranja v pluripotentnim podobne celice pri metodi s celično fuzijo. Pri tem so uporabili mišje celice (Do in Schöler, 2010). Podobno so dokazali uporabnost

poročevalca *OCT4*-GFP pri metodi reprogramiranja s celično fuzijo pri prašičjih celicah (Ozawa in sod., 2010).

Ustvarili so transgensko linijo mišjih nevralnih matičnih celic, pri čemer so s stabilno integriranim poročevalcem *OCT4*-GFP preverili uspešnost indukcije iPSC z različnimi kombinacijami dejavnikov (Kim in sod., 2008).

Kot uporabno orodje pri ocenjevanju uspešnosti transdiferenciacije se je izkazal poročevalec s promotorjem težke verige α -miozina, ki je nadziral izražanje GFP. Izdelali so transgensko linijo mišjih fibroblastov s stabilno integriranim poročevalcem, s pomočjo katere so ocenjevali učinkovitost različnih kombinacij dejavnikov za reprogramiranje v kardiomiocite (Ieda in sod., 2010).

Pri celičnem reprogramiranju humanih fibroblastov pa je poročevalec GFP pod nadzorom konstitutivnega CMV promotorja služil kot pokazatelj uspešne transfekcije. V policistronski vektor za indukcijo induciranih pluripotentnih matičnih celic (iPSC) so poleg vseh štirih Yamanaka dejavnikov vgradili tudi zapis za GFP (Montserrat in sod., 2011).

2.2 CELIČNA DIFERENCIACIJA IN REPROGRAMIRANJE

Razvoj sesalskega osebka je usmerjen ireverzibilen proces, preko katerega celice ob specializaciji postopoma izgubljajo širino diferenciacijskega potenciala. Začne se z nastankom zigote in konča z več kot 220 specializiranimi celicami, ki sestavljajo odraslo telo. Glede na padajoč diferenciacijski potencial celične populacije delimo na totipotentne, pluripotentne, multipotentne in unipotentne celice (Hochedlinger in Plath, 2009).

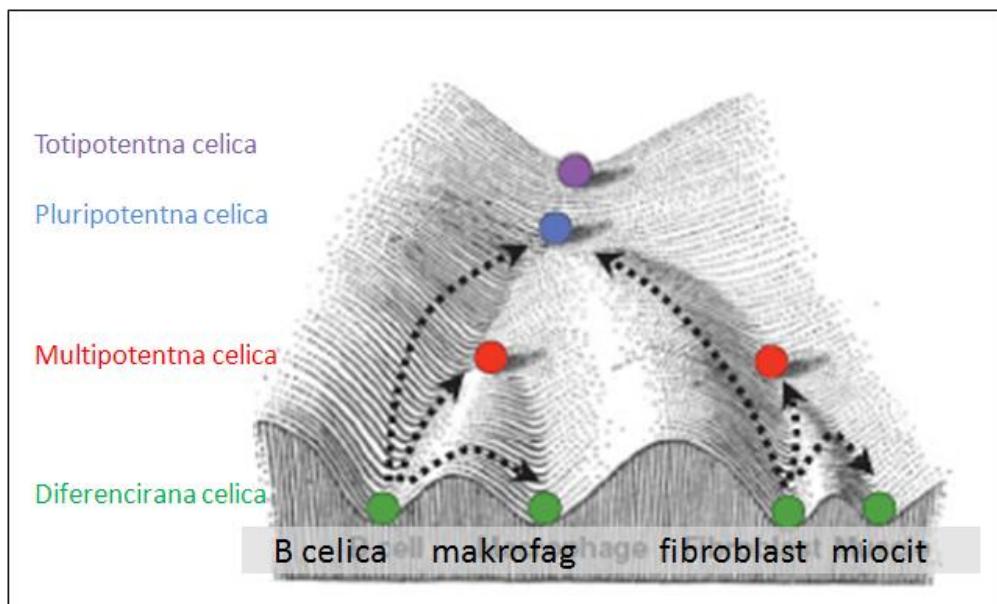
Totipotentne celice so celice z najvišjim diferenciacijskim potencialom, saj so sposobne tvoriti vse tipe celic organizma, vključno z embrionalnimi in zunajembrionalnimi tkivi. Primer takšne celice je zigota (Jopling in sod., 2011).

Pluripotentnost je lastnost celic, ki so sposobne diferenciacije v vse tri zarodne plasti (mezoderm, ektoderm in endoderm), vendar pa so izgubile sposobnost za tvorbo ekstraembrionalnih tkiv. Primer pluripotentnih celic so celice notranje celične mase blastociste (ICM) in njen derivat – embrionalne matične celice (EMC) (Thomson in sod., 1998).

Multipotentne celice so se sposobne diferencirati v različne celične tipe, vendar ne v vse. Sem prištevamo večino odraslih matičnih celic v različnih tkivih, kot so črevesne matične celice, kožne matične celice, krvotvorne matične celice, nevralne matične celice (Hochedlinger in Plath, 2009). Našli so celo matičnim celicam podobne celice v ovarijih (Virant-Klun in sod., 2008).

Unipotentne celice lahko tvorijo samo en tip celic. Primer so nekatere odrasle matične celice (matične celice testisov) in predniške celice (eritroblasti in predniške epitelne matične celice) (Hochedlinger in Plath, 2009).

Vsaka celična populacija ima značilen epigenetski profil, ustrezen njenemu diferenciacijskemu potencialu. Epigenetski profil ali epigenetski podpis določajo vse epigenetske spremembe določene celične populacije, kot so metilacija DNA, spremembe v kondenzaciji kromatina, modifikacije histonskih repkov itd. Njenostavne je ga razložimo z tako imenovanim modelom epigenetske pokrajine (angl. *epigenetic landscape model*), ki ga je prestavil Waddington že leta 1957 (1957, cit. po Slack, 2002) (**Slika 2**). Kroglice, ki se kotalijo po hribu v različne doline, predstavljajo padajoči diferenciacijski potencial opazovane celice skozi razvoj osebka. Kroglica na poti prečka mnoge razcepe proti različnim dolinam, ki simbolizirajo določen celični tip. Vsakokrat, ko se kroglica (celica) znajde pod točko razcepa, se možna izbira njenih končnih poti in dolin (celični tip) zmanjša (Slack, 2002).



Slika 2: Shema epigenetske pokrajine (Hochedlinger in Plath, 2009: 510)

Pod določenimi eksperimentalnimi pogoji se lahko diferencirane celice vrnejo po poti nazaj v manj diferencirane celice (črtkane puščice na **Sliki 2**, ki kažejo navzgor). Proses nadzorovanega spremicanja usode celic imenujemo jedrno ali epigenetsko reprogramiranje. Epigenetsko reprogramiranje je pravzaprav epigenetska sprememba, ki poteka v naravi pri nastanku gamet in po oploditvi jajčeca in je namenjeno izbrisu neželenih epigenetskih modifikacij, ki bi jih osebek lahko podedoval od obeh gamet. Poznamo tudi načine, kako umetno izzvati reprogramiranje. Med pionirji na tem področju sta bila Briggs in King, ki sta leta 1952 opisala postopek prenosa somatskega jedra (SCNT)

končno diferencirane celice v jajčno celico, ki sta ji predhodno odstranila jedro. Uporabila sta žabje celice (*R. pipiens*) in dokazala, da je diferencirani celici možno povrniti sposobnost tvorbe blastule (Briggs in King, 1952; Hochedlinger in Jaenisch, 2002). Ta tehnika je v javnosti bolj poznana pod izrazom kloniranje, predvsem po zaslugi medijsko zelo odmevnega eksperimenta, kloniranja ovce Dolly. Ovca Dolly je bila dokaz, da je možno popolnoma diferencirano celico – v tem primeru je bila to celica mlečne žleze – s pomočjo SCNT reprogramirati v totipotentno stanje zigote (Wilmut in sod., 1997).

Čeprav metoda SCNT omogoča tvorbo genetsko identičnih celic darovalcu odraslega jedra, npr. pacientu (terapevtsko kloniranje), so etični in pravni problemi pri pridobivanju celic s tvorbo zarodka trenutno še prevelika ovira, zato nekateri menijo, da tehnika v medicini nima perspektive (Deng, 2010).

Nekoliko manj odmeven način reprogramiranja je fuzija diferenciranih celic s pluripotentnimi celicami. Rezultat so hibridne pluripotentne celice (Miller in Ruddle, 1976). Čeprav s fuzijo celic dobimo tetraploidne celice, neuporabne v medicinske namene, pa to dokazuje dominantnost pluripotentnega stanja nad diferenciranim stanjem (Hochedlinger in Plath, 2009).

Za področje celičnega reprogramiranja je bilo prelomno leto 2006, ko sta Takahashi in Yamanaka predstavila reprogramiranje mišjih fibroblastov v inducirane pluripotentne celice (IPMC), naslednje leto pa je identični postopek vodil do reprogramiranja humanih fibroblastov. Odkritje je močno razburkalo strokovno javnost, odprlo veliko novih vprašanj in ustvarilo novo področje znanosti (Baker, 2010). (Več o tem v poglavju 2.2.2 Inducirane pluripotentne matične celice.)

Celično reprogramiranje pa ne predstavlja samo dediferenciacije, pri kateri celici povrnemo diferenciacijski spekter (kroglica se pomakne navzgor proti vrhu epigenetske pokrajine, **Slika 2**). Leta 1987 je Davis s sodelavci odkril, da je možno z ektopičnim izražanjem gena (izražanje umetno vnesenega gena) MyoD fibroblaste reprogramirati v mišične celice. Tak proces neposredne spremembe iz diferenciranega celičnega tipa v drug diferenciran celični tip imenujemo transdiferenciacija. Na epigenetski pokrajini bi proces ponazorili s kroglico, ki je ostala na enaki nadmorski višini, zamenjala je samo dolino, v kateri se nahaja (**Slika 2**: puščici, ki kažeta v sosednji dolini). Transdiferenciacija ostaja zanimiv pristop v regenerativni medicini, kar je pokazalo veliko zanimanje za nedavno objavljenimi odkritji transdiferenciacije fibroblastov v nevrone (Vierbuchen in sod., 2010) in celice krvi (Szabo in sod., 2010). Oba eksperimenta sta temeljila na podobnem principu kot eksperiment Davisa in sodelavcev, na ektopičnemu izražanju izbranih dejavnikov (Davis in sod., 1987). Prednost neposrednega prehoda celic iz enega končno diferenciranega stanja v drugo končno diferencirano stanje je v tem, da take celice po transplantaciji nimajo sposobnosti tvorbe tumorjev, kar pomeni večjo varnost pri potencialni klinični uporabi. Pojavi pa se nova omejitev: ker celice med transdiferenciacijo

ne dosežejo pluripotentnega stanja, so omejene z majhnim končnim številom celičnih delitev (Masip in sod., 2010).

2.2.1 Embrionalne matične celice

Prve opisane matične celice so bile embrionalne karcinomske celice. Te celice so zlahka gojili v celični kulti in dokazali, da je ena sama celica embrionalnega karcinoma sposobna tvoriti populacijo celic, ki tvorijo teratom (tumor, sestavljen iz vseh treh zarodnih plasti). Slednje je bil dokaz pluripotentnosti (Kleinsmith in Pierce, 1964).

Embrionalne karcinomske celice so zaradi svojih morfoloških in diferenciacijskih podobnosti celicam zgodnjih mišjih zarodkov služile kot model *in vitro* zgodnjega mišjega embrionalnega razvoja. Kljub znanemu dejstvu, da imajo teratokarcinomske matične celice številne kromosomske nepravilnosti (Martin, 1980), so uspeli boljši model *in vitro* uvesti šele leta 1981, ko sta dve neodvisni raziskovalni skupini dokazali uspešno izolacijo in gojenje mišjih embrionalnih matičnih celic (Martin, 1981; Evans in Kaufnam, 1981).

Sedemnajst let po izolaciji mišjih EMC iz blastociste pa je Thomson s sodelavci iz notranje celične mase človeškega zarodka prvič uspešno izoliral in gojil tudi humane embrionalne matične celice (Thomson in sod., 1998).

EMC so zaradi svoje neomejene sposobnosti proliferacije in pluripotentnosti zanimive za farmacevtsko industrijo, predvsem za testiranje učinkovin, saj predstavljajo dobro nadomestilo za poskuse na živalih. Še posebej pa so EMC zanimive za regenerativno medicino, saj bi bile odličen vir katerihkoli celic človeškega telesa (Belmonte in sod., 2011).

Vendar pa se ob številnih možnostih, ki jih ponujajo EMC, pojavlja nekaj ključnih problemov. Pridobivanje EMC je etično sporno, saj se v procesu izolacije notranje celične mase iz blastule uniči zarodek. V primeru uporabe tujih EMC kot vira celic za uporabo v regenerativni medicini bi bile te celice izpostavljene tudi imunski zavrnitvi vsadka (Yamanaka, 2009). Za rešitev tega problema ocenjujejo in preizkušajo dve možni rešitvi. Prva je etično sporna rešitev, terapevtsko kloniranje (Jeanisch in sod., 2002), druga novejša metoda, s katero se je mogoče izogniti uničevanju zarodkov in veliko obljudila, pa so inducirane pluripotentne matične celice (iPSC).

2.2.2 Inducirane pluripotentne matične celice

Inducirane pluripotentne matične celice sta odkrila Takahashi in Yamanaka leta 2006 (Takahashi in Yamanaka, 2006). Odkritje je pomenilo pomembno prelomnico pri pridobivanju potencialno uporabnih pluripotentnih celic brez uničevanja zarodkov. Prav tako je bilo odkritje odmevno na področju jedrnega reprogramiranja, saj so dokazali, da je mogoč z retroviralnim vnosom in ektopičnim izražanjem štirih dejavnikov – *OCT4*, *SOX2*,

KLF4 in *MYC* (*c-MYC*) – diferencirane mišje fibroblaste vrniti v pluripotentno stanje (Yamanaka, 2009).

Prve IPMC so kazale močna odstopanja od metilacijskega vzorca DNA značilnega za EMC in ob injiciranju v blastocisto niso bile sposobne tvoriti gamet (Baker, 2010). Kmalu zatem je več raziskovalnih skupin uspešno pridobilo mišje IPMC, ki so bile po presaditvi v mišji zarodek sposobne tvoriti himerne miši in so prispevale k razvoju vseh celic, tudi gamet (Okita in sod., 2007; Wernig in sod. 2007; Maherali in sod., 2007).

Istega leta 2007 sta dve neodvisni raziskovalni skupini objavili uspešno pridobitev IPMC celic iz humanih odraslih fibroblastov. Yamanaka s sodelavci je uporabil tehniko viralnega vnosa štirih »Yamanakinih dejavnikov«: *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* in *MYC* (Takahashi in sod., 2007). Druga raziskovalna skupina pod vodstvom Thomsona pa je objavila uspešen rezultat dediferenciacije humanih fibroblastov s štirimi »Thomsonovih dejavnikov«: *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* in *LIN28A* (Yu in sod., 2007). Dejstvo, da sta obe raziskovalni skupini prišli do podobnih rezultatov z uporabo nekaterih različnih dejavnikov, je potrdilo robustnost metode in pokazalo velik potencial uporabe IPMC v farmacevtske in regenerativno medicinske namene (Deng, 2010; Belmonte in sod., 2009).

Do danes so avtorji dokazali, da je dediferenciacija do pluripotentnih IPMC možna iz zelo različnih somatskih celic, npr. iz fibroblastov (Takahashi in sod., 2007), celic dermalne papile (Tsai in sod., 2010), celic iz popkovnične krvi (Haase in sod., 2009), keratinocitov (Asen in sod., 2008), nevralnih matičnih celic (Kim in sod., 2009), melanocitov (Utikal in sod., 2009), celic kostnega mozga, celic periferne krvi in adipocitov (Belmonte in sod., 2009).

Čeprav je že moč pridobiti pluripotentne celice brez uničevanja zarodkov in je vsaj teoretično enostavno dobiti pluripotentne celice z genomom pacienta, je do klinične uporabe IPMC še dolga pot. Prvi velik problem je uporaba retrovirusnih vektorjev, ki povzročijo naključno vgradnjo konstruktov DNA, ki nosijo zapis za dejavnike, v genom in s tem povzročijo trajno spremembo dednega zapisa celic. Posledice takšne trajne in naključne vgradnje v genom so potencialna rakotvornost ali moteno delovanje določenih genov. Sporna je bila tudi uporaba dejavnika c-Myc, ki je znan onkogen. Z odkrivanjem novih nevirusnih in neintegracijskih metod indukcije IPMC celic ter z uporabo različnih somatskih celičnih virov kot začetne stopnje v procesu dediferenciacije so do danes že premagali številne začetne ovire (Page in sod. 2009; Belmonte in sod., 2009; Huang 2010). Največji napredek je bil dosežen ravno pri razvoju nevirusnih metod indukcije IPMC. Za dostavo dejavnikov so razvili plazmidne sisteme, ki pa še vedno pomenijo možnost integracije tuje DNA v celice. Med najbolj perspektivne metode, ki bi bile uporabne za klinične namene pridobivanja IPMC, sodí indukcija s proteinskimi dejavniki ali z mikro RNA. Z uporabo nekaterih kemikalij so lahko zmanjšali tudi število dejavnikov, potrebnih za indukcijo pluripotentnosti (Maherali in Hochedlinger, 2008; Yang in sod., 2011).

Najblžje praktični uporabi so IPMC celice na farmakološkem področju, saj so zanimivo orodje za testiranje toksičnosti in delovanja novih substanc. Uporabne so tudi pri proučevanju bolezni; tam so bile kot model različnih bolezni iz celic pacientov razvite številne IPMC linije (Hankowski in sod., 2011), saj odpravijo nekatere pomanjkljivosti živalskih modelov (Deng, 2010).

Najnovejše primerjave morfoloških, epigenetskih in površinskih označevalcev med EMC in IPMC so pokazale razlike med obema tipoma celic. Te razlike so včasih celo večje med samimi celičnimi linijami IPMC kot v primerjavi z EMC. Te veljajo kot standard za primerjavo z IPMC (Lako in sod., 2010; Zhou in Ding, 2010). Dokazali so tudi, da so razlike med zgodnjimi pasažami IPMC in EMC večje in se z višjim številom pasaž izgubljajo, kakor da bi reprogramiranje še vedno potekalo (Hankowski in sod., 2011). Številni diferenciacijski protokoli, ki so bili odkriti s pomočjo EMC, delujejo tudi z IPMC, vendar manj učinkovito (Lako in sod., 2010).

Trenutno IPMC celice ostajajo velik up regenerativne medicine, vendar bo pred uporabo v kliniki treba izpopolniti metode indukcije in karakterizacije induciranih pluripotentnih matičnih celic. IPMC pa so se kot vir modelnih celičnih linij že izkazale za zelo uporabne pri proučevanju redkih bolezni (Hanna in sod., 2010; Hankowski in sod., 2011).

2.3 METODE VNOSA VEKTORJEV V CELICE

Vnos vektorske DNA v celico lahko razdelimo v tri osnovne skupine: kemijski, fizikalni in biološki vnos (pogosteje so v **Preglednici 2**). Skupno ime za vnos DNA z nevirusnimi metodami je transfekcija. Bistvo vnosa DNA s transfekcijo je prenos negativno nabite DNA v celico preko negativno nabite membrane (Transfection, 2011). Biološke metode so ene izmed najučinkovitejših metod vnosa DNA v celico, saj izkoriščajo tehniko, izpopolnjeno skozi tisočletja evolucije – virus.

2.3.1 Kemijske metode

Kemikalije, kot so kalcijev fosfat, DEAE-dekstran ali kationski lipidi, okoli DNA ustvarijo plašč, ki njen negativni naboj nevtralizira ali pa celo ustvari celokupni pozitivni naboj kompleksa. Kompleks se zato lahko močno približa membrani in se nato z endo- ali fagocitozo vnese v celico (Kim in Eberwine, 2010). DEAE-dekstran je bil prvi predstavnik kationskih polimerov. Njegovo sposobnost vnosa nukleinskih kislin v celice sta leta 1965 odkrila Vaheri in Pagano. Metode kemijske transfekcije so uporabne za prehodno transfekcijo, saj pri njihovi uporabi katerekoli kemijske transfekcije redko pride do integracije vektorja v genom (Karra in Dahm, 2010; Kim in Eberwine, 2010). Predstavnik kationskih polimerov je tudi polibren (Kawai in Nishizawa, 1984).

Koprecipitacija DNA s kalcijevim fosfatom je pogosteje metoda kemijske transfekcije. Kalcijev fosfat s tvorjenjem kompleksa z DNA nevtralizira negativni naboj DNA in tako

omogoči endocitozo kompleksa. Opazili so, da kalcijev fosfat transgensko DNA zaščiti pred delovanjem nukleaz. Na učinkovitost te metode močno vpliva pH (Loyter in sod., 1982).

Uporaba kationskih lipidov velja za najučinkovitejšo kemijsko transfekcijo. Metoda ni omejena z velikostjo DNA fragmentov, saj omogoča vnos kratkih oligonukleotidov ali pa celo več kb dolgih umetnih kromosomov kvasovk. Do vstopa liposomskega kompleksa v celico pride z endocitozo ali s fuzijo s plazmalemo (Felgner in sod., 1995).

2.3.2 Fizikalne metode

Mikroinjeciranje, biolistika, elektroporacija in ostale fizikalne metode uporabljam za premostitev celične membrane fizikalne sile. Pri mikroinjeciraju se DNA s posebno aparatujo neposredno vbrizga v citoplazmo ali v jedro celice. Metoda je delovno izjemno intenzivna, njen obvladovanje pa zahteva veliko prakse. Pri biolistični metodi DNA vežemo na delce inertne kovine (zlato) in jih pri velikih hitrostih izstrelimo v celično kulturo. Metoda je relativno enostavna, vendar zahteva drago opremo in hkrati fizično poškoduje celice (Kim in Eberwine, 2010).

Elektroporacija je najpogosteje uporabljeni fizikalni metoda transfekcije. Čeprav natančen mehanizem vnosa DNA na ta način še ni pojasnjen, je znano, da kratek električni pulz povzroči nastanek kratkotrajnih por v membrani. Skozi pore DNA vstopi v celico. Z elektroporacijo je možno učinkovito in hitro transficirati veliko število celic, vendar je potrebno vložiti veliko dela v iskanje optimalnih parametrov za transfekcijo posamezne celične linije. Problem predstavlja tudi nizek odstotek preživelih celic po elektroporaciji (Kim in Eberwine, 2010; Karra in Dahm, 2010).

2.3.3 Biološke metode

Odkritje, da je virusne elemente možno umetno rekombinirati in nepotrebne segmente zamenjati z zaporedjem, ki ga želimo vnesti v celico (Goff in Berg, 1976), je pripeljalo do razvoja ene izmed najučinkovitejših metod vnosa transgenov v celice. Virusni vektorji, ki se danes uporabljajo v laboratorijskih in kliničnih raziskavah, temeljijo na naravnih RNA in DNA virusnih prednikih. Ti omogočajo učinkovit vnos in izražanje transgenskega konstrukta. Pri razvoju novih, izboljšanih virusnih vektorjev so bili močno popadarjeni varnost, izboljšana infektivnost širšega spektra različnih tipov celic, stabilnejše izražanje transgena in zmanjšanje citotoksičnosti. Najpogosteje se uporablja RNA retrovirusni in lentivirusni vektorji, ki omogočajo integracijo transgena v genom. Povečuje pa se tudi uporaba DNA virusnih vektorjev, kot so adenovirusni, adenovirusom podobni in herpes-simpleks virusni vektorji. Sposobni so transdukcije širokega spektra celičnih tipov, pri čemer se transgen praviloma ne vgradi v genom, razen pri adenovirusom podobnih vektorjih. Glavna ovira za širšo uporabo virusnih vektorjev je draga in delovno intenzivna izdelava (Walther in Stein, 2000; Karra in Dham, 2010).

Preglednica 2: Primerjava metod vnosa vektorjev v sesalske celice (Karra in Dahm, 2010; ¹Kawai in Nishizawa, 1984; ²(Cruz in sod., 2011; Wathler in Stein, 2000))

| Metoda | Prednosti | Omejitve | Toksičnost | Integ. v genom | Maks. velikost transgena |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Precipitacija s kalcijevim fosfatom in kationskimi polimeri ¹ | Poceni, ne zahteva dodatne opreme, relativno enostaven postopek optimizacije za različne celice in plazamide, nežna metoda do celic | Nizka učinkovitost transfekcije, metoda s kalcijevim fosfatom je časovno potratna in občutljiva na pH | Nizka, če je bil izveden postopek optimizacije | Ne* | Ni omejitve |
| Lipofekcija | Poceni, enostaven in hiter postopek, primeren za trajno in začasno transfekcijo, enostavna možnost ponovitve rezultatov | Relativno nizka učinkovitost transfekcije, ki jo je možno z optimizacijo za posamezni celični tip izboljšati | Nizka | Ne* | Ni omejitve |
| Mikroinjiciranje | Možnost neposrednega injiciranja v jedro celice, transfekcija posamezne celice | Potrebna draga oprema, nizka učinkovitost in delovno zelo intenziven postopek | Smrt celic zaradi fizične poškodbe | Ne* | Ni omejitve |
| Biolistika | Hiter protokol, ni omejitev glede tipa celic | Potrebna draga oprema, nizka učinkovitost, močne poškodbe celic | Delci, ki pod visokim tlakom priletijo v celice, jih močno poškodujejo | Ne* | Ni omejitve |
| Elektroporacija | Enostaven in hiter protokol, možnost trasnfekcije velikega števila celic hkrati | Potrebna elektroporacijska oprema, učinkovitost transfekcije je boljša od kemičnih metod, vendar še vedno relativno nizka | Močno variira glede na celični tip | Ne* | Ni omejitve |
| Adenovirusi vektorji | Visoka učinkovitost transdukcije delečih se in nedelečih se celic, ni insercijske mutageneze, saj se vektor ne integrira v genom | Draga in delovno intenzivna metoda, potreba po laboratoriju II. biološke varnostne stopnje | Visoka pri uporabi visokih titrih virusa | Ne* | Do 7,5 kb |
| Adenovirusom podobni vektorji | Visoka učinkovitost transdukcije delečih se in nedelečih se celic, integracija v genom, replikacijsko nekompetentni | Draga in delovno intenzivna metoda, potreba po laboratoriju II. biološke varnostne stopnje, integracija v genom je naključna | Nizka | Da | 5 kb |
| Herpes-simpleks virusni vektorji | Visoka učinkovitost transdukcije delečih se in nedelečih se celic, ni insercijske mutageneze, saj se vektor ne integrira v genom, možnost vnosa velikih insertov | Draga in delovno intenzivna metoda, potreba po laboratoriju II. biološke varnostne stopnje, preferenca do okužbe celic nevralnega izvora | Relativno visoka | Ne* | Z uporabo dodatnih amplicon ³ vektorjev lahko tudi več kot 100 kb |
| Retrovirusni vektorji ² | Visoka učinkovitost transdukcije celic, integracija v genom, virus se producira v visokih titrih, koncentracija in čiščenje nista potrebna | Draga in delovno intenzivna metoda, potreba po laboratoriju II. biološke varnostne stopnje, integracija v genom je naključna, možnost insercijske mutageneze, ni transdukcije nedelečih se celic | Nizka | Da | 7-8kb |
| Lentivirusni vektorji | Visoka učinkovitost transdukcije delečih se in nedelečih se celic, integracija v genom, virus se producira v visokih titrih, koncentracija in čiščenje nista potrebna | Draga in delovno intenzivna metoda, potreba po laboratoriju II. biološke varnostne stopnje, integracija v genom je naključna, možnost insercijske mutageneze | Nizka | Da | 10 kb |

* vgradnja vektorja v genom je možna, vendar je posledica naključnih dogodkov, nepovezanih z metodo transfekcije. ³Amplikon vektorji so močno predelani herpes-simpleks virusni vektorji, ki nimajo sposobnosti pomnoževanja in integracije v genom transducirane celice. Z njihovo pomočjo je možen vnos do 150 kb transgene DNA (Epstein, 2009).

Ne glede na metodo transfekcije moramo, če želimo doseči optimalno učinkovitost vnosa transgena, paziti na ustrezeno zdravje oziroma kondicijo celic, stopnjo konfluentnosti transficiranih celic in čistoto DNA, ki jo vnašamo (Transfection, 2011).

2.3.4 Virus HIV in lentivirusni vektorji

Lentivirusi so podskupina retrovirusne družine virusov. Najbolj proučevan in poznan lentivirus je zagotovo virus človekove zmanjšane odpornosti oziroma HIV-1. Kapsida tega virusa je dodatno obdana z lipidnim dvoslojem, ki izvira iz gostiteljske celice in vsebuje glikoproteine. Glikoproteini na ovojnici določajo, katero vrsto celic lahko lentivirus inficira (Warnock in sod., 2011). V vsako virusno ovojnico sta zapakirani dve linearni kopiji RNA lentivirusnega genoma, dolžina vsake je 9,7 kb. Med reverzno transkripcijo v celici pogosto prihaja do rekombinacij med obema kopijama in tako do nastanka novih virusnih tipov. To je eden izmed razlogov, zakaj se je pri HIV-u hitro pojavila rezistenca proti nekaterim zdravilnim učinkovinam (Rhodes in sod., 2003).

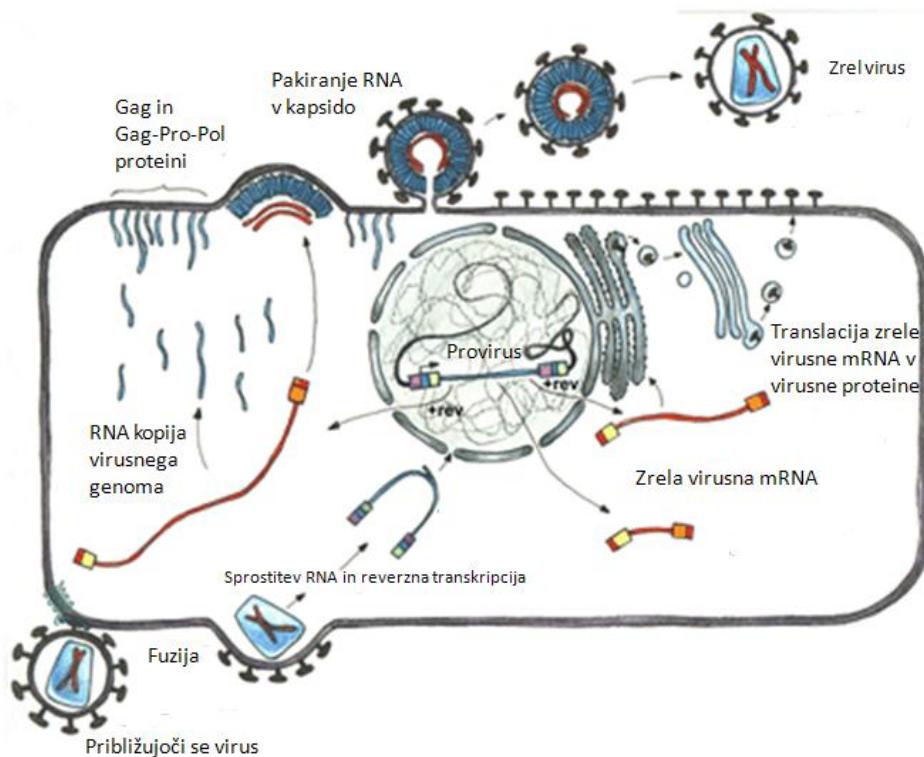
Genom lentivirusa HIV-1 zapisuje devet genov (podani so v **Preglednici 3**), vsak ima specifično funkcijo v življenjskem ciklu virusa.

Preglednica 3: Geni virusa HIV (Warnock in sod., 2011: 11 in 13)

| Gen | Funkcija |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>gag</i> | Kodira elemente notranjega proteinskega plašča |
| <i>pol</i> | Kodira reverzno transkriptazo in integrazo |
| <i>env</i> | Kodira površinske in transmembranske proteine, ki jih najdemo v zunanjem lipidnem dvosloju virusne kapside |
| <i>rev</i> | Kodira protein, ki se veže na RNA in regulira prehod med zgodnjo in pozno fazo HIV genskega izražanja |
| <i>tat</i> | Kodira protein, močan ojačevalec virusne transkripcije |
| <i>nef</i> | Kodira protein, ki onemogoči aktivacijo T-celic in tako stimulira infektivnost HIV |
| <i>vpr</i> | Kodira protein, ki omogoča infekcijo nedelečih se celic |
| <i>vpu</i> | Kodira protein, ki omogoča lažjo sprostitev virusa v celico |
| <i>vif</i> | Kodira polipeptid, pomemben pri razmnoževanju HIV |

Protein zapisujoč sekvenco obdajata regiji 5' in 3' LTR (ponavljača se zaporedja končne regije), ki vsebuje cis-regulatorne virusne elemente, elemente, pomembne pri procesu integracije virusa v genom, in signal za pakiranje RNA v kapsido.

Življenski cikel lentivirusa (**Slika 3**) se začne, ko se glikoproteini, vsidrani v lipidni dvosloj, vežejo na določen receptor gostiteljske celice. pride do zlitja virusne ovojnica s celično membrano, proteinska ovojnica, ki še vedno obdaja virusno RNA, pa se sprosti v citoplazmo. Proteini, potrebni za začetek transformacije virusa (kodira jih gen *pol*), so reverzna transkriptaza in integraza, so že prisotni znotraj proteinske ovojnice in jih virus prinese s seboj. Reverzna transkriptaza ustvari dvovijačno DNA kopijo virusnega genoma. Proteini, zapisani z genom *vpr*, lentivirusom omogočajo aktivен vnos DNA kopije genoma v jedro in s tem transdukциjo nedelečih se celic. Integriza poskrbi za vgradnjo DNA v gostiteljevo DNA. Trajno integrirano virusno zaporedje v genomu imenujemo provirus (**Slika 3**). Po integraciji virusne DNA se lahko prične njeno namnoževanje. Izražanje virusnih genov poteka v dveh fazah – zgodnji in pozni. V slednji celična polimeraza RNA II prepiše celoten provirus v RNA. pride do translacije vseh potrebnih proteinov za izgradnjo virusa. V citoplazmi se vsi elementi sestavijo in z brstenjem se virus odcepi od gostiteljske celice (**Slika 3**) (Pluta in Kacprzak, 2009; Warnock in sod., 2011).



Slika 3: Shema življenskega cikla virusa HIV (Poescha, 2011)

Lentivirusni vektorji izkoriščajo za vnos transgenske DNA iste mehanizme kot naravni virus HIV-1, vendar je bilo zaradi varnosti in potrebe po možnosti vnosa čim večjih konstruktov narejenih več sprememb. Prvi korak je bil odstranitev genov, pomembnih za virulenco in patogenost HIV-1, kot so *vif*, *vpr*, *vpu* in *nef*. Ti odstranjeni geni niso nujno potrebni za transdukcijsko. Nadalje so ločili *cis*-regulatorne sekvene, ki narekujejo

integracijo virusnega genoma v gostiteljsko celico, od *trans*-regulatornih sekvenc z zapisom za strukturne virusne elemente. To so storili tako, da so transgensko sekvenco obdali z obema LTR regijama in jo spravili na en vektorski plazmid, vse potrebne trans elemente pa so spravili na drug, tako imenovani pomožni plazmid. Producjsko celično linijo (celična linija, ki je služila za proizvodnjo virusov) so nato transficirali z obema plazmidoma. Rezultat je bila produkcija virusnih vektorjev, sposobnih infekcije, ne pa tudi reprodukcije, saj se je v kapsido zapakiral samo RNA prepis plazmida z LTR regijami. Povečani varnostni ukrepi so pripeljali do tretje in četrte generacije lentivirálnih vektorjev, pri katerih so posamezni *trans*-regulatorni virusni geni razdeljeni med tri ali več pomožnih plazmidov. S tem je zmanjšana možnost rekombinacije, ki bi pripeljala do povrnitve razmnoževalne sposobnosti virusa (Pauwels in sod., 2009). S psevdotipizacijo (angl: *pseudotyping*) je znanstvenikom nato uspelo zamenjati glikoproteine v lipidnem dvoслоju kapside virusa HIV z glikoproteini drugih virusov in s tem doseči širši spekter celic, ki jih lahko transduciramo z virusom (Cronin in sod., 2005). Najpogosteje se uporablja glikoproteine virusa vezikularnega stomatitisa, ki omogočajo širok tropizem in povečujejo stabilnost viroidnih delcev. Za transgensko sekvenco so v vektorski plazmid dodali še Woodchukov posttranskripcijski regulatorni element hepatitisnega virusa (WPRE), ki povečuje stabilnost virusnega prepisa RNA in tako tudi titre produciranega virusa. Z izbrisom regije U3 iz 3'LTR, ki predstavlja viralni promotor pomemben pri replikaciji naravnega virusa, so ustvarili samo-inaktivirajoče lentivirusne vektorje ali SIN levtivirusne vektorje. Ti imajo zaradi mankajoče U3 regije še dodatno zmanjšano možnost povrnitve sposobnosti replikacije (Giry-Laterrière in sod., 2011).

2.4 GEN *CRIPTO-1*

CRIPTO-1 (TDGF1) je bil odkrit kot cDNA, izolirana iz humanih teratokarcinomskih celic NTERA-D2 in mišij F9 teratokarcinomskih celic (Ciccodicola in sod., 1989; Dono in sod., 1993). Velja za prvoodkritega člena družine genov EGF-CFC, ki so pomembni ekstracelularni dejavniki pri zgodnjem razvoju vretenčarjev (Minchiotti in sod., 2002). Visoko izražanje gena *CRIPTO-1* najdemo v številnih humanih tumorjih, ki jih tvorijo rakave celice dojk, prebavil, pankreasa, pljuč, materničnega vrata, kože, testisov, mehurja ali ovarijev pa tudi pri normalnih EMC in IPMC. *CRIPTO-1* so v zadnjem času umestili tudi med pomembnejše označevalce pluripotentnosti (Bianco in sod., 2010). V zgodnjem embrionalnem razvoju je *CRIPTO-1* pomemben dejavnik med gastrulacijo in razvojem anteriorno-posteriorne osi. Homozigotni mutanti z nedelujočim genom *CRIPTO-1* niso sposobni tvoriti primitivne proge in embrionalnega mezoderma. Mutacija se je izkazala za letalno, embriji so propadli med 8,5 do 9,5 dni po oploditvi (Ding in sod., 1998).

CRIPTO-1 ima vlogo tudi pri diferenciaciji embrionalnih matičnih celic v kardiomiocite, saj pri mutantih *CRIPTO-1*^{-/-} diferenciacija v kardiomiocite ni bila mogoča (Xu in sod., 1998).

Naravno povečano izražanje gena *CRIPTO-1* so opazili v razvijajočem se epiteliju mlečnih žlez pri miših (Adamson in sod., 2002).

Z uporabo vektorja, v katerem je bilo izražanje luciferaze pod nadzorom humanega promotorja *CRIPTO-1*, so tudi dokazali, da je izražanje *CRIPTO-1* možno spremljati s poročevalnim vektorjem (Mancino in sod., 2008).

2.5 GEN *OCT4*

OCT4 (POU5F1) spada v družino POU transkripcijskih dejavnikov, vključenih v zgodnji embrionalni razvoj in celično diferenciacijo. Potreben je kot transkripcijski aktivator genov, potrebnih za vzdrževanje nediferenciranega pluripotentnega stanja. Med embrionalnim razvojem se *OCT4* izraža v vseh celicah do kompaktizacije morule. Kasneje je njegovo izražanje omejeno na celice notranje celične mase blastociste. Po implantaciji embrija je izražanje *OCT4* omejeno na celice epiblasta, občasno se za kratek čas pojavi tudi v celicah hipoblasta. Med gastrulacijo pa se izražanje *OCT4* omeji samo na primordialne germinalne celice (Nordhoff in sod., 2001).

Izražanje *OCT4* je zato značilno tudi za embrionalne matične celice, saj te izvirajo iz notranje celične mase blastule in pluripotentne teratokarcinomske celice (Chambers in Smith, 2004).

OCT4 je bil vedno eden izmed dejavnikov, uporabljenih za indukcijo prvih IPMC, in je edini dejavnik, katerega uporaba je pri indukciji pluripotence nujna (Sommer in Mostoslavsky, 2010).

Izražanje gena *OCT4* je povezano s pluripotentnostjo celic, zato lahko s spremeljanjem izražanja *OCT4* posredno spremljamo, kaj se dogaja s pluripotentnostjo opazovanih celic (Kirchhof in sod., 2000; Munsie in sod., 2002; Green in sod., 2008; Do in Schöler, 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

Vektorji pAcGFP1-N1 (PT3716-5), pDsRed-Express-1 (PT3679-5) in pLVX-Puro (PT4002-5) so bili kupljeni pri podjetju Clontech. Podatki o vektorjih so prek kataloške številke (v oklepaju) dostopni na spletni strani podjetja (Clontech home page, 2011).

Vektor pGL3-CR1-promoter smo dobili iz laboratorija dr. Bianco C. (Mammary Biology and Tumorigenesis Laboratory, Bethesda, Maryland, ZDA). Podrobnejše informacije o vektorju so navedene v članku Regulation of Human Cripto-1 Gene Expression by TGF- β 1 and BMP-4 in Embryonal and Colon Cancer Cells (Mancino in sod., 2007).

Vektor human Oct4-GFP (Plasmid 21153) smo kupili preko banke plazmidov Addgene. Podrobnejše informacije o vektorju so dostopne na spletni strani banke Addgene (Plasmid21153..., 2011) in v članku Nanoparticles for gene transfer to human embryonic stem cell colonies (Green in sod., 2008).

Kompetentne bakterije *E. coli* so One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, kupljene pri podjetju Invitrogen. Kataloška številka C4040-10.

Teratokarcinomske celice ali CRL2073 (CRL-2073, 2011), neonatalne humane fibroblaste ali CRL2097 (CRL-2097, 2011) in odrasle humane fibroblaste ali CRL2352 (CRL-2352, 2011) smo pridobili iz zbirke ATCC (American Type Culture Collection).

Embrionalne matične celice linije H9 so bile pridobljene z inštituta WiCell (Wisconsin, ZDA). Podrobnejši podatki o celični liniji so dostopni na spletni strani inštituta (WA09..., 2011).

Celična linija Lenti-X™ 293T je bila kupljena pri podjetju Clontech. Podrobnejše informacije in opis linije so na voljo na spletni strani podjetja. (Clontech..., 2011)

CHO K1 celice so bile dar podjetja BlueSky Biotech, Inc., 60 Prescott Street, Worcester, MA, ZDA.

Vse uporabljene kemikalije (**Preglednica 4**), začetni oligonukleotidi (**Preglednica 5**), gojilne posode (**Preglednica 6**), gojišča (**Preglednica 7**) in instrumenti (**Preglednica 8**) so navedeni v preglednicah.

Preglednica 4: Seznam vseh uporabljenih kemikalij

| Okrajšava | Celotno ime | Proizvajalec | Šifra proizvoda |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------|
| <i>Af</i> II | <i>Af</i> II | New England Biolabs | R0520 |
| <i>Ase</i> I | <i>Ase</i> I | New England Biolabs | R0526 |
| <i>Bam</i> HI | <i>Bam</i> HI | New England Biolabs | R0136 |
| <i>Bgl</i> II | <i>Bgl</i> II | New England Biolabs | R0144 |
| <i>Eco</i> RI | <i>Eco</i> RI | New England Biolabs | R0101 |
| <i>Kpn</i> I | <i>Kpn</i> I | New England Biolabs | R0142 |
| <i>Mfe</i> I | <i>Mfe</i> I | New England Biolabs | R0589 |
| <i>Nco</i> I | <i>Nco</i> I | New England Biolabs | R0193 |
| <i>Nhe</i> I | <i>Nhe</i> I | New England Biolabs | R0131 |
| <i>Not</i> I | <i>Not</i> I | New England Biolabs | R0189 |
| <i>Nsi</i> I | <i>Nsi</i> I | New England Biolabs | R0127 |
| <i>Sma</i> I | <i>Sma</i> I | New England Biolabs | R0141 |
| <i>Spe</i> I | <i>Spe</i> I | New England Biolabs | R0133 |
| <i>Xba</i> I | <i>Xba</i> I | New England Biolabs | R0145 |
| <i>Xma</i> I | <i>Xma</i> I | New England Biolabs | R0180 |
| CIP | Alkalna fosfataza iz telečjega želodca (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal) | New England Biolabs | M0290 |
| Mung Bean | Mung bean nukleaza (Mung Bean Nuclease) | New England Biolabs | M0250 |
| DNA polimeraza I Klenow fragment | DNA polimeraza I, veliki Klenow fragment (DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment) | New England Biolabs | M0210 |
| T4 ligaza | T4 DNA ligaza (T4 DNA Ligase) | New England Biolabs | M0202 |
| BSA | Goveji serumski albumin | New England Biolabs | B9001 |
| NEBuffer 1 | NEBuffer 1 | New England Biolabs | B7001 |
| NEBuffer2 | NEBuffer 2 | New England Biolabs | B7002 |
| NEBuffer 3 | NEBuffer 3 | New England Biolabs | B7003 |
| NEBuffer 4 | NEBuffer 4 | New England Biolabs | B7004 |
| T4 puffer | Pufer za T4 DNA ligazo (T4 DNA Ligase Reaction Buffer) | New England Biolabs | B0202 |
| dNTP mix | Mešanica deoksinukleotidov (Deoxynucleotide Solution Mix) | New England Biolabs | N0447 |
| H ₂ O | Voda molekularne čistote (Water for embryo transfer) | Sigma | W1503 |
| Glicerol | Glicerol (Glycerol, molecular biology grade) | Calbiochem | 356352 |
| Agaroza | Agaroza (Agarose, General Purpose LE) | Apex | 20-102 |
| LB gojišče | Luria-Bretani gojišče (Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bretani)) | BD | 244620 |
| LB Agar | Luria-Bretani agar (Difco™ LB AGAR, Miller (Luria-Bretani)) | BD | 244520 |
| S.O.C. gojišče | S.O.C. gojišče (S.O.C. media) | Invitrogen | 15544034 |
| TAE puffer | 50 X Tris-acetat-EDTA (Tris-Acetate-EDTA) | Rockland | MB-020 |
| NucleoSpin® Plasmid | Komplet za čiščenje plazmidne DNA NucleoSpin® Plasmid (Plasmid DNA purification kit NucleoSpin® Plasmid) | Macherey-Nagel | 740588.250 |

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

| Okrajšava | Celotno ime | Proizvajalec | Šifra proizvoda |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------|
| NucleoSpin® Extract II | Komplet za čiščenje DNA fragmentov NucleoSpin® Extract II (PCR clean up and gel extraction kit NucleoSpin® Extract II) | Macherey-Nagel | 740609.250 |
| EtBr | 1 % Etidijevbromid (Ethidium Bromide 1 % solution) | Fisher BioReagents | BP1302-10 |
| EDTA | Etilendiamintetraacetna kislina (Ethylenediaminetetraacetic acid) | Bio Rad | 161-0729 |
| NaOH | Natrijev hidroksid (sodium hydroxide) | EMD | SX0590-3 |
| Tris-HCl | Tris(hidroksimetil)aminomethanvodiko vklorid (tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride) | Invitrogen | 15506-017 |
| SDS | Natrijev dodecilsulfat (sodium dodecyl sulfat) | Bio Rad | 161-0418 |
| glukoza | D-(+)-glukoza (D-(+)-glucose) | Sigma | G5767 |
| Kalijev acetat | Kalijev acetat (potassium acetate) | EMD | PX1330-1 |
| Ledocetna kislina | Ledocetna kislina (glacial acetic acid) | EMD | B10001-78 |
| Fugene | FuGENE® 6 transfekcijski reagent (FuGENE® 6 Transfection Reagent) | Roche | 11 815 091 001 |
| HilyMax | HilyMax transfekcijski reagent (HilyMax Transfection Reagent) | Dojindo | H357-10 |
| L-glutamin | L-glutamin (L-glutamin) | Cellgro | 61-030-RM |
| Ampicilin | Ampicillin (ampicillin) | IBI | IB02040 |
| Kanamicin | Kanamicin (kanamycin) | IBI | IB02120 |
| G418 | G418 sulfat (G418 sulfate) | Goldbio Com | G-418-5 |
| PBS (brez Mg ²⁺ in Ca ²⁺) | Slana fosfatna puferska raztopina brez Mg ²⁺ in Ca ²⁺ (Phosphate buffered saline without Mg ²⁺ and Ca ²⁺) | Cellgro | 21-040-CM |
| DMEM | Eaglovo gojišče, modificirano po Dulbeccu (Dulbecco's modification of Eagle's medium) | Cellgro | 17-205-CV |
| Iscove's DMEM | Eaglovo gojišče, modificirano po Dulbeccu, modificirano po Iscoveu (Iscove's Dulbecco's modification of Eagle's medium) | Cellgro | 10-016-CV |
| F-12 | Hamovo F-12 gojišče (Ham's F-12) | Cellgro | 10-080-CV |
| FBS | Fetusni serum goveda (fetal bovine serum) | Thermo Hyclone | SH30071.03 |
| Tripsin | Tripsin z EDTA (Trypsin EDTA) | Cellgro | 25-053-Cl |
| TRIzol reagent | TRIzol® reagent (TRIzol® Reagent) | Invitrogen | 15596-018 |
| Kloroform | Kloroform (chloroform) | IBI | IB05040 |
| Propanol | 2-propanol | J.T.Baker | 9827-03 |
| EtOH | Etanol (ethyl alcohol) | Acros | 61509-0040 |
| Sprej proti RNazam | Sprej proti RNazam (RNas ZAP) | Biohit | 724000 |
| Komplet za reverzni prepis RNA | Komplet za reverzni prepis RNA QuantiTech® (QuantiTech® Reverse Transcription Kit) | Qiagen | 205311 |
| GoTaq® Green Master MIX | Mešanica encimov in reagentov za PCR (GoTaq® Green Master MIX) | Promega | M7122 |

Se nadaljuje.

Nadaljevanje.

| Okrajšava | Celotno ime | Proizvajalec | Šifra proizvoda |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------|
| mTeSR™1 osnovno gojišče | mTeSR™1 osnovno gojišče (mTeSR™1 basal medium) | Stem cell technologies | 05851 |
| mTeSR™1 dodatek | mTeSR™1 dodatek (mTeSR™1 5X supplement) | Stem cell technologies | 05852 |
| Dispaza | Dispaza (dispase) | Stem cell technologies | 07913 |
| Matrikel™ | Podlaga za pritrdev hEMC (BD Matrikel™hESC-qualified matrix) | BD | 354277 |
| Neon™ Transfekcijski komplet | Neon™ Transfekcijski komplet reagentov in kivet (Neon™ Transfection System 10 µl Kit) | Invitrogen | MPK1096 |
| Virocid | Virocid (Decon-Quat 100 Quaternary Ammonium Solution) | Vai | 14003-702 |
| NucleoSpin® RNA Virus | Komplet za izolacijo virusne RNA NucleoSpin® RNA Virus (Viral RNA isolation kit NucleoSpin® RNA Virus) | Macherey-Nagel | 740956.10 |
| FBS brez tetriciklinov | FBS brez tetriciklinov (FBS Tet System Approved) | Clontech | 631101 |
| Polibren | Polibren (polybrene) | Millipore | TR-1003-G |
| Lenti-X™GoStix™ | Komplet za hitro detekcijo lentivirusov (Lenti-X™GoStix™) | Clontech | 631243 |
| Lenti-X™qRT-PCR | komplet qRT-PCR za določanje koncentracije lentivirusnih kopij (Lenti-X™qRT-PCR Titration Kit) | Clontech | 631235 |

Preglednica 5: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za RT-PCR

| Ime začetnega oligonukleotida | Zaporedje DNA | Velikost produkta | Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------------------------------|
| <i>CRYPTO-1</i> (L) | GCCTCTTTCCCCCTAATTG | 144 bp | 53 °C |
| <i>CRYPTO-1</i> (D) | GACGAGCAAATCCCTGATGG | | |
| <i>OCT4</i> (L) | AGTTTGTGCCAGGGTTTTG | 197 bp | 60 °C |
| <i>OCT4</i> (D) | TGTGTCTATCTACTGTGTCCCAGG | | |
| <i>GAPDH</i> (L) | ATCACCATCTTCCAGGAGCGA | 101 bp | 53 °C |
| <i>GAPDH</i> (D) | TTCTCCATGGTGGTAAGACG | | |

Preglednica 6: Uporabljeni gojilne posode

| Gojilna posoda | Šifra proizvoda (proizvajalec) |
|------------------------|--------------------------------|
| 10 cm petrijevka | 172958 (Nulon) |
| Plošča s 6 vdolbinami | 353043 (Falcon) |
| Plošča s 12 vdolbinami | 353046 (Falcon) |

Preglednica 7: Sestava uporabljenih gojišč

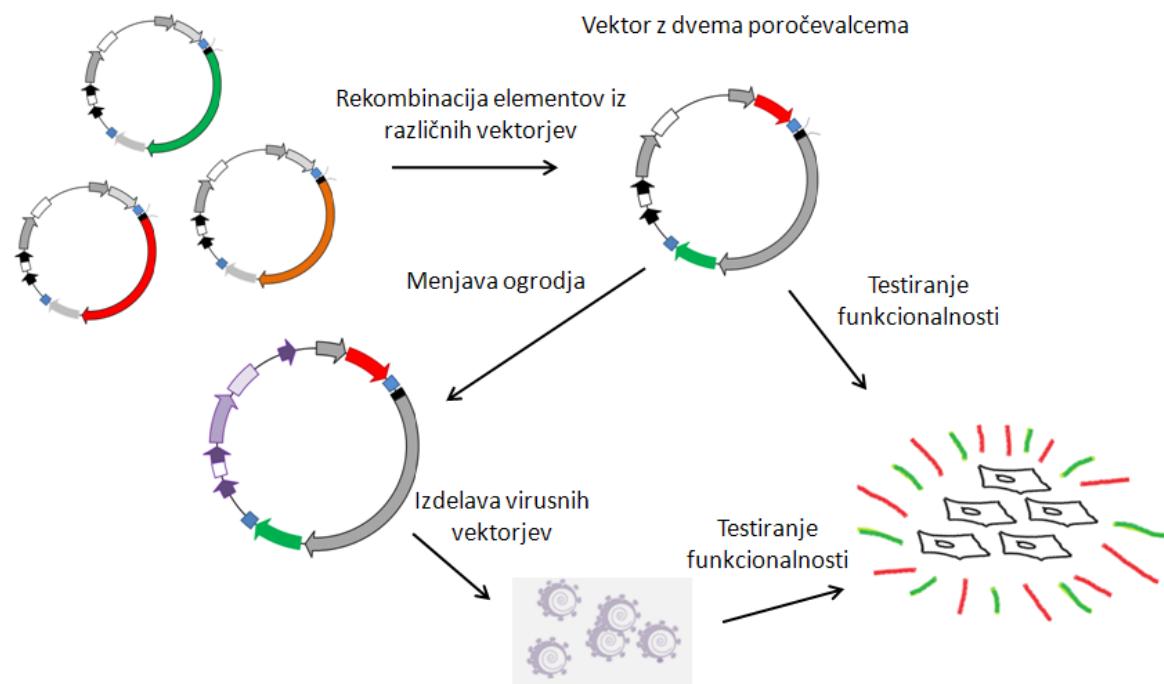
| | |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Gojišče 1 ali gojišče za gojenje CRL2073 in CRL2352 celic | 45 % DMEM (z dodanim L-glutaminom do 4 mM) 45 % F-12 10 % FBS |
| Gojišče 2 ali gojišče za gojenje CRL2097 celic | 90 % Iscove's DMEM 10 % FBS |
| Gojišče 3 ali gojišče za 293T virus producirajoče celice | 45 % DMEM (z dodanim L-glutaminom do 4 mM) 45 % F-12 10 % FBS brez tetraciklinov |
| Gojišče 4 ali hEMC gojišče za gojenje na Matrigel™-u | 80 % mTeSR™1 osnovno gojišče 20 % mTeSR™1 dodatka |

Preglednica 8: Naprave, uporabljene pri izvedbi raziskovalnega dela

| Naprava | Proizvajalec |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Centrifuga, model Legend RT | Sorvall |
| Inkubator Heracell 150i | Thermo Scientific |
| Invertni svetlobni mikroskop, model AE30-31 | Motic |
| Fazno kontrastni fluorescentni mikroskop, model IX81 | Olympus |
| Pipete 0,1–2 µl; 2–20 µl; 20–200 µl; 100–1000 µl Labvette Discovery | Labnet |
| Pipetor, Powerpette plus | Jencons |
| Spektrofotometer, NanoDrop 2000 | Thermo Scientific |
| Brezprašna komora, Forma 1400 series | Thermo Scientific |
| Avtoklav model 2540E | Tuttnauer Brinkman |
| Aparatura za PCR, DNA Engine - Peltier Thermal Cycler | BioRad |
| Tehtnica, Pioneer PA114 | Ohaus |
| Vodna kopel | VWR |
| Magnetno mešalo | VWR |
| Aparatura za qPCR, 7500 Real Time PCR System | Applied Biosystems |
| Naprava za fotografiranje gelov, Image station 4000 | Kodak |
| Stresalni inkubator, Excella E24 | New Brunswick Scientific |
| Inkubator za gojenje bakterij, Imperial Incubator II | Lab-Line |
| Naprava za elektroforezo, Power Source 300V | VWR |
| Elektroporator, Neon Transfection System | Invitrogen |

3.2 POSTOPKI, UPORABLJENI PRI SESTAVLJANJU VEKTORJA

Okviren potek izdelave in testiranja izdelanih vektorjev je prikazan na **Sliki 4.**



Slika 4: Shema izdelave in testiranja vektorja z dvema poročevalcema

3.2.1 Načrtovanje vektorja

Načrtovanje vektorja z dvema poročevalcema, digitalna restrikcija in manipulacija vseh uporabljenih sekvenc so bili opravljeni s prosto dostopnim programom NEBCutter, <http://tools.neb.com/NEBCutter2/> (NEBCutter..., 2011), spletno stranjo Sequence Manipulation Suite, <http://www.bioinformatics.org/sms2/> (Sequence..., 2011) in programom Microsoft Office Word.

3.2.2 Priprava LB gojišča

LB gojišče smo uporabljali za pomnoževanje bakterij *E. coli*. 25 g LB gojišča v prahu smo raztopili v 1 l dH₂O in 15 min avtoklavirali pri 121 °C. Do uporabe smo LB gojišče hranili na sobni temperaturi.

3.2.3 Priprava selektivnih LB agar plošč

Selektivna gojišča smo uporabljali za selekcijo uspešno transformiranih *E. coli*. 40 g LB agar praška smo raztopili v 1 l dH₂O, dobro premešali in zavreli v mikrovalovni pečici, da se je agar raztopil. Gojišče smo 15 min avtoklavirali pri 121 °C in nato termostatirali eno uro v kopeli pri 56 °C. Dodali smo antibiotik in dobro premešali. Uporabljali smo

kanamicin ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) in ampicilin ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$), odvisno od plazmida, s katerim so bile transformirane *E. coli*. Gojišče smo vlili v plošče in počakali, da se je agar strdil. Plošče smo do uporabe shranili v hladilniku na 4°C .

3.2.4 Transformacija kompetentnih *E. coli* s plazmidom

Za pomnoževanje plazmidov smo uporabili kompetentne bakterije *E. coli* (One Shot TOP 10 Competent Cells, Invitrogen). Mikrocentrifugirko bakterij smo odtalili na ledu, dodali $0,3 \mu\text{l}$ plazmida (koncentracije cca: $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) in inkubirali na ledu 15 min. Sledil je toplotni šok 60 s v vodni kopeli pri 42°C . Dodali smo $250 \mu\text{l}$ SOC gojišča in 45 min stresali na 290 vrt./min pri 37°C . Tako tretirane bakterije smo razmazali na dve selektivni plošči z antibiotikom. Na prvo ploščo smo razmazali $20 \mu\text{l}$ suspenzije *E. coli* in jo označili z LOW, na drugo pa $100 \mu\text{l}$ suspenzije in jo označili z HIGH. To je omogočilo, da smo vedno dobili posamezne dobro ločene kolonije, ki jih je bilo nato moč klonirati. Plošči smo čez noč inkubirali na 37°C .

3.2.5 Pomnoževanje bakterij *E. coli* s plazmidom

Delo je potekalo aseptično ob gorilniku. 20 ml LB gojišča smo prelili v 50-ml centrifugirko in mu dodali antibiotik (kanamicin $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ in ampicilin $100 \mu\text{g}/\text{ml}$), na katerega rezistenco je nosil izbrani plazmid. Gojišče smo dobro premešali in razdelili v štiri 15-ml centrifugirke, po 5 ml v vsako. S sterilnim zobotrebcem smo izbrano kolonijo na plošči prenesli v 15-ml centrifugirko s 5 ml LB gojišča z antibiotikom. Inokulirane centrifugirke smo čez noč stresali na 290 vrt./min pri 37°C .

3.2.6 Izolacija plazmidne DNA

I.

Če smo izolacijo plazmidov opravljali po inokulaciji bakterij z ligacijskim produktom, smo uporabili naslednji postopek, ki ne vključuje uporabe kompleta za čiščenje. Po pomnoževanju bakterij *E. coli* s plazmidom smo inokulirane centrifugirke 30 min centrifugirali na 3500 vrt./min, odlili supernatant in pelet resuspendirali v $250 \mu\text{l}$ pufra A11. Suspenzijo bakterij smo prenesli v $1,5\text{-ml}$ centrifugirko, dodali $250 \mu\text{l}$ pufra A2, premešali in 5 min inkubirali na sobni temperaturi. Delovanje pufra A12 smo inhibirali z dodatkom $300 \mu\text{l}$ pufra A13. Centrifugirke smo premešali z obračanjem in jih nato 5 min centrifugirali pri $11000 \times g$. Supernatant smo prenesli v novo $1,5\text{-ml}$ centrifugirko, pelet smo zavrgli. Ponovili smo 5 min centrifugiranje pri $11000 \times g$ in ponovno prenesli supernatant v novo $1,5\text{-ml}$ centrifugirko. Pelet smo zavrgli. Supernatantu smo dodali 1 ml 100 % izopropanola in inkubirali 30–60 min pri -20°C . Sledilo je 10 min centrifugiranje pri $14000 \times g$ pri 4°C . Odstranili smo supernatant, peletu dodali 1 ml 70 % etanola in vorteksirali. Suspenzijo smo ponovno 10 min centrifugirali pri $14000 \times g$ pri 4°C .

Supernatant smo odlili in pelet posušili na zraku v 15–20 min. Posušen pelet smo raztopili v 42 µl H₂O.

Sestavine pufrov:

A11 – pufer za alkalno lizo 1

- 50 mM glukoze
- 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 10 mM EDTA (pH 8,0)

A12 – pufer za alkalno lizo 2

- 0,2 N NaOH
- 1 % (m/v) SDS

A13 – pufer za alkalno lizo 3

- 5 M kalijev acetat 60,0 ml
- ledocetna kilsina 11,5 ml
- H₂O 28,5 ml

II.

Za izolacijo plazmida iz bakterij *E. coli* smo uporabili komplet NucleoSpin® Plasmid podjetja Macherey-Nagel po priloženem protokolu.

Inokulirane centrifugirke po koraku pomnoževanja bakterij *E. coli* s plazmidom smo 30 min centrifugirali na 3500 vrt./min, odlili supernatant in pelet resuspendirali v 250 µl pufra A1. Suspenzijo bakterij smo prenesli v 1,5-ml centrifugirko, dodali 250 µl pufra A2, premešali in 5 min inkubirali na sobni temperaturi. Delovanje pufra A2 smo inhibirali z dodatkom 300 µl pufra A3. Centrifugirke smo premešali z obračanjem in jih nato 5 min centrifugirali pri 11000 x g. Supernatant smo prenesli na NucleoSpin® Plasmid kolono in 1 min centrifugirali pri 11000 x g. Eluat smo zavrgli in kolono sprali z 600 µl pufra A4 pri 11000 x g za 1 min. Eluat smo ponovno zavrgli. Kolono smo posušili s 5 min centrifugiranjem pri 11000 x g. Plazmidno DNA smo 5 min eluirali v 42 µl tople H₂O pri 11000 x g. Na napravi NanoDrop smo izmerili koncentracijo plazmidne DNA, nato pa jo do uporabe shranili pri -20 °C.

Glede na protokol v knjižici smo spremenili samo zadnji korak (elucija DNA), saj smo namesto predlaganega AE pufra uporabili H₂O kakovosti PCR, segreto na 50 °C.

3.2.7 Restriktivna razgradnjna plazmidne DNA

V 0,2-ml mikrocentrifugirki smo zamešali naslednje reakcijske komponente: plazmidno DNA, restriktivni pufer, restriktivni encim (pogosto smo dodali dva različna encima hkrati), BSA, nato smo s H₂O zapolnili do želenega volumna. Količine posameznih komponent so bile od reakcije do reakcije različne, saj so odvisne od koncentracije in mase plazmidne DNA, koncentracije in aktivnosti encimov. Reakcijsko mešanico smo inkubirali 1,5 h pri 37 °C. Primer reakcije prikazuje **Preglednica 9**.

Preglednica 9: Primer reakcije z dvema restriktivnimi encimoma

| | |
|---------------------------------------------|---------|
| Plazmidna DNA (pAcGFP1-N1; c = 0,403 µg/µl) | 25,0 µl |
| Encim <i>Bam</i> HI | 2,0 µl |
| Encim <i>Not</i> I | 4,0 µl |
| Restriktivni pufer 10X NEBuffer 3 | 5,0 µl |
| 100 X BSA | 2,0 µl |
| H ₂ O čistote PCR | 12,0 µl |
| Skupni volumen | 50,0 µl |

3.2.8 Priprava 1 % agaroznega gela za elektroforezo

1 g agaroze smo raztopili v 100 ml TAE pufra in večkrat zavreli v mikrovalovki, da se je agarosa popolnoma raztopila. Raztopino smo nekoliko ohladili, dodali 5 µl EtBr in jo vlili v kad z glavničkom, ki določa število in velikost žepkov v gelu. Ko se je gel strdil, smo ga namočili v TAE pufer v elektroforezni kadi in izvlekli glavniček. Gel je bil tako pripravljen za uporabo.

3.2.9 Nanašanje vzorcev na agarozni gel

Pred nanosom vzorcev z DNA (po restriktiji in korakih, ki modifirajo konci DNA) smo vzorcem dodali nanašalni pufer (1/6 skupnega volumna). Na gel smo – glede na namen – nanašali od 5 µl do 50 µl vzorcev. V prvi žepek na gelu smo vedno dodali 2log DNA lestev, ki nam je služila kot označevalec velikosti z restriktijo dobljenih DNA fragmentov.

3.2.10 Zapolnjevanje lepljivih 5' koncov DNA

Po končani restriktivni razgradnji smo v mikrocentrifugirko dodali 10 X restriktivni pufer (do končne koncentracije 1 X), mešanico dNTP-jev (do končne koncentracije 33 µM), DNA polimerazo I, nato smo s H₂O čistote PCR zapolnili do želenega volumna. Mešanico smo inkubirali točno 15 min na sobni temperaturi. Sledil je korak deaktivacije aktivnosti DNA polimeraze I z dodatkom EDTA (do končne koncentracije 10 mM) in inkubacijo za 20 min pri 75 °C. DNA smo očistili s kompletem ragentov NucleoSpin® Extract II.

3.2.11 Odstranjevanje 5' lepljivih koncev DNA

Ker smo odstranjevanje 5' lepljivih koncev uporabljali samo po restrikcijskih reakcijah, ki so potekale v restrikcijskih pufrih NEBuffer 1, 2 ali 4, čiščenje DNA ni bilo potrebno. Po končani restrikcijski razgradnji smo v mikrocentrifugirko dodali 10 X restrikcijski pufer (do končne koncentracije 1 X), Mung Bean nukleazo in toliko H₂O čistote PCR, da je bila končna koncentracija DNA enaka ali manjša od 0,1 µg/µl. Mešanico smo inkubirali 30 min pri 30 °C. Aktivnost Mung Bean nukleaze smo inhibirali z dodatkom SDS do končne koncentracije 0,01 %. Sledilo je čiščenje DNA s kompletom reagentov NucleoSpin® Extract II.

3.2.12 Odstranjevanje končnih fosfatov

Ta postopek smo izvedli samo na večjem fragmentu oziroma tistem, ki nosi zapis za odpornost na antibiotik in smo ga kasneje uporabili v ligaciji. Namen je bil preprečiti avtoligacijo večjega fragmenta DNA. Odstranjevanje končnih fosfatov smo izvedli takoj po restrikciji oziroma po zapolnjevanju oziroma odstranjevanju 5' lepljivih koncev DNA. Čiščenje DNA ni bilo potrebno, če je restrikcija, po kateri smo odstranjevali končne fosfate, potekala v restrikcijskih pufrih NEBuffer 2, 3 ali 4. Če je restrikcija potekala v NEBuffer 1 smo pred odstranjevanjem končnih fosfatov opravili korak čiščenja plazmidne DNA. V mikrocentrifugirko, v kateri je potekala restrikcija, smo dodali 1 µl fosfataze iz telečjega želodca (CIP) in inkubirali 1 h pri 37 °C.

3.2.13 Izrezovanje DNA fragmentov iz agaroznega gela

Gel smo pred razrezom fotografirali z napravo Kodak Image Station. V zatemnjjenem prostoru smo si pod lučjo s kratkimi UV valovi gel ogledali, da smo določili položaj izbranih DNA fragmentov. S sterilno britvico smo izrezali pas z želenim fragmentom DNA. Izpostavitev DNA UV žarkom smo poskušali čim bolj zmanjšati, zato smo luč med potezami z britvico ugašali. Izrezani košček gela smo do čiščenja spravili v 1,5-ml centrifugirki.

3.2.14 Čiščenje plazmidne DNA

DNA smo med koraki, ki so to zahtevali, očistili s kompletom reagentov NucleoSpin® Extract II podjetja Macherey-Nagel, po dveh protokolih:

Po izrezovanju iz agaroznega gela smo košček gela z izbranim DNA fragmentom stehtali in mu dodali 200 µl NT pufra na 100 mg gela. Gel smo raztopili v pufru tako, da smo mikrocentrifugirko s pufrom in gelom 5–10 min inkubirali na 50 °C in jo občasno pretresli. Raztopino smo nanesli na NucleoSpin® Extract II kolono in centrifugirali 1 min pri 11000 x g. Eluat smo zavrgli, kolono sprali s 700 µl NT3 pufra in 1 min centrifugirali pri 11000 x g. Eluat smo zopet zavrgli. Kolono smo posušili s 5 min centrifugiranjem pri

11000 x g. Plazmidno DNA smo 5 min eluirali v 15–42 µl tople H₂O pri 11000 x g. Na napravi NanoDrop smo izmerili koncentracijo plazmidne DNA, nato pa jo do uporabe shranili pri –20 °C.

Po vseh ostalih korakih pa smo vzorcu dodali NT pufer (dvakratni volumen vzorca). Raztopino smo nanesli na NucleoSpin® Extract II kolono in centrifugirali 1 min pri 11000 x g. Eluat smo zavrgli, kolono sprali z 700 µl NT3 pufra in centrifugirali 1 min pri 11000 x g. Eluat smo zopet zavrgli. Kolono smo posušili s 5 min centrifugiranjem pri 11000 x g. Plazmidno DNA smo 5 min eluirali v 15–42 µl tople H₂O pri 11000 x g. Na napravi NanoDrop smo izmerili koncentracijo plazmidne DNA, nato pa jo do uporabe shranili pri –20 °C.

3.2.15 Ligacija

Prvi korak je bil izračun molarnih razmerij vektorja (večjega fragmenta, ki nosi zapis za rezistenco na antibiotik) in inserta (manjši fragment, ki ga želimo vgraditi v vektor). Enote velikosti posameznih DNA fragmentov so bazni pari (bp). Izračunali smo, kolikokrat je vektor večji od inserta, in tako dobili faktor X. Maso uporabljenega vektorja smo nato delili z faktorjem X. Vedno smo uporabili 20 ng vektorja. Kvocient nam je povedal maso inserta, če bi želeli imeti molarno razmerje med vektorjem in insertom 1 : 1. Ker smo želeli, da je molarno razmerje med vektorjem in insertom 1 : 3, smo kvocient pomnožili s 3 in tako dobili maso inserta v ng, ki smo jo nato uporabili v ligaciji. V **Preglednici 10** je predstavljen primer ligacijske reakcije.

Preglednica 10: Primer ligacijske reakcije

| | |
|------------------------------|---------|
| Vektor (20 ng, 3992 bp) | 0,3 µl |
| Insert (10,5 ng, 697 bp) | 0,9 µl |
| 10X pufer za T4 ligazo | 2,0 µl |
| T4 ligaza | 1,0 µl |
| H ₂ O (DNA grade) | 15,5 µl |
| Skupni volumen | 20,0 µl |

Vedno smo poleg ligacijske reakcije nastavili še slepo reakcijo. V tej v reakcijski mešanici ni bilo inserta. Slepa ligacija je služila za oceno samoligacije vektorja.

Mešanici (ligacija in slepa ligacija) smo inkubirali na sobni temperaturi čez noč.

3.2.16 Transformacija kompetentnih *E. coli* s produktom ligacije

Na ledu smo odtalili vialo kompetentnih *E. coli*, dodali 5 µl ligacijske reakcije/slepe ligacije (po končani inkubaciji) in inkubirali na ledu 15–30 min. Sledil je toplonti šok, 60 s inkubacija pri 42 °C. Takoj zatem smo vialo ohladili na ledu in dodali 250 µl SOC gojišča. Od tu naprej je bil postopek enak transformaciji kompetentnih *E. coli* z plazmidom.

3.2.17 Merjenje koncentracij DNA ali RNA

Za merjenje koncentracije nukleinskih kislin smo uporabljali spektrofotometer NanoDrop® 2000, proizvajalca Thermo Scientific.

3.2.18 Fotografiranje agaroznih gelov

Za zajem in vizualizacijo DNA fragmentov, ločenih po velikosti z elektroforezo, smo uporabljali KODAK Image Station 4000 in program KODAK Molecular Imaging Software, Version 4.0.

3.3 POSTOPKI UPORABJENI ZA OCENO FUNKCIONALNOSTI VEKTORJEV

3.3.1 Odmrzovanje celic

Vialo s celicami smo iz tekočega dušika prenesli v vodno kopel temperature 37 °C in jo odtalili. Odtaljeno vialo smo prenesli v brezprašno komoro, kjer smo vsebino prenesli v 15-ml centrifugirko in celice razredčili v 10 ml medija. Suspenzijo smo 5 min centrifugirali pri 1000 x g, aspirirali supernatant in pelet resuspendirali v 10 ml svežega medija. Suspenzijo celic smo nasadili v 10 cm petrijevko in jo postavili v inkubator.

3.3.2 Menjava gojišča

Celice smo gojili v inkubatorju pri 37 °C, v atmosferi s 5 % CO₂. Petrijevko s celicami smo prenesli v brezprašno komoro. Pred uporabo smo gojišče termostatirali v vodni kopeli pri 37 °C. Izrabljeno gojišče smo aspirirali in ga zamenjali z enakim volumnom svežega, celice pa prenesli nazaj v inkubator. Prvič smo gojišče zamenjali 24 h po odmrzovanju, nato pa po potrebi dva do trikrat na teden (v povprečju na vsake tri dni).

3.3.3 Presajevanje celic

Za presajevanje smo uporabljali 20 % tripsin v PBS (brez Ca²⁺ in Mg²⁺ ionov). Pred uporabo smo tripsin in gojišče termostatirali v vodni kopeli na 37 °C. Od tu naprej je delo potekalo v brezprašni komori. Celicam smo aspirirali gojišče, jih sprali s PBS (brez Ca²⁺ in Mg²⁺ ionov) in ponovno aspirirali. Tripsina smo dodali le toliko, da so bile celice pokrite po celotni površini gojilne posode in inkubirali 5 min v inkubatorju na 37 °C. Med tem smo si pripravili 15-ml centrifugirko v katero smo odpipetirali 2-kratni volumen prvotnega gojišča. Po končani inkubaciji smo celice v tripsinu prenesli v pripravljeno centrifugirko z gojiščem (Ca²⁺ in Mg²⁺ ioni v gojišču so inaktivirali delovanje tripsina) in centrifugirali 5 min pri 1000 x g. Aspirirali smo supernatant, pelet pa resuspendirali v želenem volumnu gojišča. Če je bilo treba celice prešteti, smo vzeli alikvot za štetje, drugače pa smo celice razdelili med želeno število gojilnih posod z že prej pripravljenim gojiščem. Posode smo postavili v inkubator.

3.3.4 Štetje celic

Celice smo šteli z Bürker-Türkovo števno komoro. Po potrebi smo suspenzijo celic predhodno redčili z gojiščem. Iz dobljenega števila smo izračunali celokupno število celic v 15-ml centrifugirki. Za štetje smo uporabljali inverzni svetlobni mikroskop Motic AE30-31.

3.3.5 Izolacija RNA iz celic

Pred začetkom izolacije smo ves material poškropili s sprejem proti RNAAZam, vedno smo uporabljali rokavice.

Celice smo poželi z uporabo tripsina, jih centrifugirali in aspirirali supernatant. Pelet smo lizirali v 1 ml reagenta TRIzol tako, da smo suspenzijo grobo mešali s pipetiranjem.

Homogenizirano suspenzijo smo na sobni temperaturi inkubirali 5 min in nato dodali 0,2 ml kloroform. Centrifugirke smo zaprli, jih močno stresali 15 s in nato inkubirali 3 min pri sobni temperaturi.

Sledilo je centrifugiranje pri 12000 x g, 4 °C za 15 min. Dobili smo tri faze: spodnjo rdečkasto fenol-kloroformno fazo, belkasto interfazo in prozorno vodno fazo. RNA je v vodni fazi, zato smo jo odpipetirali in prenesli v novo mikrocentrifugirko.

Vodni fazi smo dodali 0,5 ml 100 % izopropanola, inkubirali 10 min na sobni temperaturi in nato centrifugirali pri 12000 x g, 4 °C za 10 min. Dobili smo majhen pelet na dnu centrifugirke.

Odstranili smo supernatant in pelet sprali z 1 ml 75 % etanola tako, da se je pelet odlepil od dna centrifugirke. Sledilo je centrifugiranje pri 7500 x g, 4 °C za 5 min. Odstranili smo supernatant in pelet sušili v odprti centrifugirki na zraku 15–20 min. V zadnjem koraku smo pelet raztopili v 30 µl vode brez RNAAZ, zmerili koncentracijo na napravi NanoDrop in raztopino do reverzne transkripcije shranili pri –80 °C.

3.3.6 Reverzni prepis RNA v cDNA

Za reverzni prepis RNA smo uporabljali komplet za reverzni prepis RNA QuantiTech®. RNA smo odtalili, Quantiscript Reverse Transcriptase pa shranili na led. gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix in RNase-free vodo smo odtalili na sobni temperaturi. Vse oddaljene reagente smo premešali, na hitro centrifugirali, da se je tekočina s sten zbrala na dnu mikrocentrifugirk, in jih do uporabe shranili na led.

Za pripravo reakcije za odstranitev genomske DNA smo zmešali 2 µl 7x gDNA Wipeout Buffer in 1 µg izolirane RNA (volumen je bil odvisen od koncentracije RNA). Z RNase-free vodo smo dopolnili do končnega volumena 14 µl, premešali in prestavili na led.

Slednjo mešanico smo inkubirali v vodni kopeli 2 min pri 42 °C in jo nato takoj prestavili na led.

Za pripravo mešanice za reverzni prepis smo na ledu zmešali 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 µl 5x Quantiscript RT Buffer, 1 µl RT Primer Mix (vsebuje Mg²⁺ in dNTP-je). Dodali smo še celoten volumen (14 µl) reakcije za odstranitev genomske DNA, premešali in postavili nazaj na led. Sledila je inkubacija v vodni kopeli za 15 min pri 42 °C, nato pa še 3 min pri 95 °C. Z zadnjim korakom smo inaktivirali Quantiscript Reverse Transcriptase. Dobili smo 20 µl cDNA, ki smo jo do uporabe v reakciji PCR shranili pri -20 °C.

3.3.7 Verižna reakcija s polimerazo – PCR

Za izvedbo reakcije PCR smo vedno uporabljali GoTag® Green Master Mix (Promega).

Na sobni temperaturi smo odtalili GoTag® Green Master Mix, ga vorteksirali in centrifugirali za nekaj sekund, da se je vsa tekočina zbrala na dnu centrifugirke. Volumen posamezne reakcije je znašal 25 µl. Tako smo za eno reakcijo zmešali 12,5 µl GoTag® Green Master Mix-a, 2 µl (10 µM) levega in 2 µl (10 µM) desnega začetnega oligonukleotida, 7,5 µl vode in 1 µl cDNA. Če smo hkrati preverjali več različnih cDNA za isti gen, smo si pripravili ustrezno količino mešanice brez cDNA, jo razpipetirali (po 24 µl) v PCR tubice in nato dodali 1 µl cDNA. Mešanico smo dobro premešali, jo centrifugirali za nekaj sekund in jo čim prej postavili v napravo za PCR in zagnali program.

Zaporedje korakov programa PCR

95 °C za 2 min

*94 °C za 15 s

*53 °C za 30 s (*CRIPTO-1* in *GAPDH*); 60 °C za 30 s (*OCT4*)

*72 °C za 1 min

72 °C za 10 min

4 °C za ∞

Koraki, označeni z *, so se ponovili 31-krat. Zadnji korak je bil sprogramiran za neskončno dolgo, tako da so lahko vzorci po končani reakciji počakali v napravi PCR čez noč. Ta zadnji korak ne predstavlja dela reakcije PCR, pač pa korak hrambe produktov pri nižji temperaturi do njihove uporabe.

3.3.8 Gojenje embrionalnih matičnih celic na matrigelu

MatrigelTM je poseben gel, ki omogoča gojenje hEMC brez uporabe celic hrnilne plasti.

Oblaganje plošč z BD MatrigelomTM

Na ledu smo odtalili vialo zamrznjenega MatrigelaTM in ohladili DMEM/F-12 gojišče ter sterilno 50 ml centrifugirko. Delo je potekalo v brezprašni komori. V 50-ml centrifugirko smo odpipetirali 25 ml DMEM/F-12, mu dodali 250 µl MatrigelaTM in premešali s pipetiranjem. Za oblogo ene vdolbine na plošči s šestimi vdolbinami smo odpipetirali 1 ml razredčenega MatrigelaTM in krožno premešali, da je raztopina oblila vso površino. Sledila je inkubacija 1 h na sobni temperaturi. Na tako pripravljene plošče smo takoj nasadili hEMC ali pa smo jih ovili v Parafilm® in shranili v hladilniku pri 4 °C, vendar ne za več kot 7 dni. Če smo za nasajanje hEMC uporabili plošče, shranjene v hladilniku, smo jih pred uporabo 30 min ogrevali na sobni temperaturi.

Nasajanje hEMC na MatrigelTM

Pred uporabo smo mTeSR^{TM1} gojišče termostatirali v vodni kopeli pri 37 °C. Delo je potekalo v brezprašni komori. S plošče s šestimi vdolbinami, obložene z MatrigelomTM, smo aspirirali odvečno raztopino MatrigelaTM in v vdolbino takoj nato odpipetirali hEMC v mTeSR^{TM1} gojišče. Ploščo smo premešali z gibi naprej-nazaj in levo-desno in jo postavili v inkubator pri 37 °C, 5 % CO₂ in 95 % zračni vlažnosti. Celice smo nasadili tako, da so bile posamezne kolonije hEMC (velikosti 50 do 60 µm) druga od druge razmaknjene za približno velikost kolonije. Gojišče smo menjali dnevno.

Presajevanje hEMC, gojenih na MatrigeluTM

Kultura hEMC je bila zrela za presajevanje, ko so se kolonije začele dotikati in zlivati. V vodni kopeli pri 37 °C smo ogreli mTeSRTM gojišče, dispazo, PBS in DMEM/F-12. V brezprašni komori smo s plošče s celicami aspirirali izrabljeno gojišče in vsako vdolbino sprali z 2 ml PBS in ga ostranili z aspiracijo. V vsako vdolbino s celicami smo dodali 1 ml raztopine dispaze (razgradi MatrigelTM) s koncentracijo 1 mg/ml in inkubirali 5–7 min na sobni temperaturi. Raztopino dispaze smo aspirirali in vdolbino dvakrat sprali z 2 ml DMEM/F-12. Nato smo v vsako vdolbino dodali po 2 ml mTeSR^{TM1}, celice postrgali s strgalom in jih prenesli v 15-ml centrifugirko. Vdolbino smo sprali še z 2 ml mTeSR^{TM1} gojiščem, da smo sprali vse preostale celice in tudi te prenesli v 15 ml centrifugirko. Suspenzijo celic smo 5 min centrifugirali na 800 x g, aspirirali supernatant in pelet reuspendirali v mTeSR^{TM1} gojišču. Večje skupke celic smo razbili z rahlim pipetiranjem gor in dol. Celice smo nasadili v razmerju 1 : 6 (iz ene plošče smo dobili dovolj celic za 6 novih) na plošče, obložene z matrigelom. Za enakoverno razporeditev kolonij smo ploščo, preden smo jo postavili v inkubator, premešali z gibi naprej-nazaj in levo-desno.

3.3.9 Transfekcija celic s FuGENE® 6 reagentom

Delo je potekalo v brezprašni komori. Za transfekcijo ene vdolbine 50–70 % konfluentnih celic na plošči s šestimi vdolbinami smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 97 µl gojišča brez dodanega seruma. V serum smo odpipetirali 3 µl FuGENE® 6 reagenta in dobro premešali na stresalniku. Dodali smo 1 µg plazmidne DNA, ponovno dobro premešali na stresalniku in inkubirali 45 min pri sobni temperaturi. Pripravljena mešanica je zadostovala za transfekcijo ene luknje 60–70 odstotne konfluentne kulture celic na plošči s šestimi luknjami. Mešanico smo preprosto dodali v gojišče, v katerem so rasle celice, in ploščo postavili nazaj v inkubator. 24 h po transfekciji smo zamenjali gojišče in celice so bile pripravljene za mikroskopiranje.

3.3.10 Transfekcija celic s HilyMax reagentom

Delo je potekalo v brezprašni komori. Za transfekcijo ene vdolbine 50–70 % konfluentnih celic v plošči s šestimi vdolbinami smo v mikrocentrifugirko zamešali 120 µl gojišča brez dodanega seruma in 2 µg plazmidne DNA. Vsebino smo premešali s pipetiranjem, dodali 10 µl HilyMax reagenta in ponovno premešali. Po 15-minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo mešanico dodali v gojišče v katerem so rasle celice in ploščo vrnili nazaj v inkubator. 24 h po transfekciji smo zamenjali gojišče in celice so bile pripravljene za mikroskopiranje.

3.3.11 Transformacija primarnih neonatalnih fibroblastov

Priprava medija za selekcijo stabilno transfeciranih celic

Za pripravo 250 ml selektivnega gojišča smo 225 ml Iscove's DMEM dodali 25 ml FBS in nato še 2 ml založne raztopine G418 s koncentracijo 50 mg/ml. Končna koncentracija G418 je bila 400 µg/ml (396,8 µg/ml).

Priprava celic za elektroporacijo

Pri 70–90 % konfluentnosti smo celice sprali s PBS (brez Ca²⁺ in Mg²⁺ ionov) in jih tripsinizirali tako, da so se odlepile od podlage. Suspenzijo celic v tripsinu smo nato odpipetirali v 15-ml centrifugirko, v katero smo si pripravili 5–6 ml gojišča (DMEM/F-12 + 10 % FBS). Sledilo je 5 min centrifugiraje na 1000 vrt./min. Supernatant smo aspirirali. Pelet smo resuspendirali v 7 ml gojišča (DMEM/F-12 + 10 % FBS), vzeli alikvot suspenzije in celice prešteli. Koncentracijo celic smo pomnožili z volumnom suspenzije (7 ml) in dobili celotno število celic. Suspenzijo smo centrifugirali pri 1000 vrt./min za 5 min in aspirirali supernatant. Pelet smo sprali z PBS (brez Ca²⁺ in Mg²⁺ ionov) in suspenzijo ponovno 5 min centrifugirali na 1000 vrt./min. Supernatant smo aspirirali. Tokrat smo pelet resuspendirali v Buffer R (vključen v NEON™ kompletu reagentov),

tako da je bila končna koncentracija $1,0 \times 10^7$ celic/ml, in suspenzijo prenesli v sterilno 1,5-ml centrifugirko.

Pred elektroporacijo smo si pripravili ploščo z dvanajstimi luknjicami, tako da smo v štiri luknjice dodali po 1,5 do 2 ml Iscove's DMEM + 10 % FBS (brez G418) in jo za 15–30 min pogreli v inkubatorju za celične kulture pri 37 °C, 100 % vlažnosti in 5 % CO₂.

3.3.12 Elektroporacija

NeonTM Tube smo napolnili s 3 ml pufra E in jo vstavili v NeonTM Pipett Station (elektroporacijska komora). Iz suspenzije celic v 1,5 ml-centrifugirki smo vzeli 50 µl alikvota in mu dodali 2,5 µg plazmidne DNA (plazmid FV-Oct4) in nežno premešali.

Na NeonTM pipeto smo nataknili 10 µl NeonTM Tip in ga napolnili s suspenzijo celic, plazmida in Buffer R. NeonTM pipeto smo vstavili v NeonTM Pipette Station. Pritisnili smo gumb Start in naprava NeonTM Cube je izvedla elektroporacijski protokol. Celice smo nato z NeonTM Pipeto prenesli v luknijo z ogretim gojiščem.

Postopek, opisan v gornjem odstavku, smo ponovili za vsako od štirih luknjic, napolnjenih z gojiščem Iscove's DMEM + 10 % FBS.

Uporabili smo dva različna protokola elektroporacije – celice v prvih dveh luknjicah smo tretirali s prvim in celice v drugih dveh z drugim protokolom:

Prvi protokol

- napetost (V): 1700
- dolžina pulza (ms): 20
- število pulzov: 1

Drugi protokol

- napetost (V): 1400
- dolžina pulza (ms): 20
- število pulzov: 2

Po končani elektroporaciji smo ploščo s celicami prestavili v inkubator pri 37 °C, 100 % vlažnosti in 5 % CO₂.

Selekcija elektroporiranih celic

24 ur po elektroporaciji smo celicam aspirirali gojišče in ga zamenjali s selekcijskim gojiščem (Iscove's DMEM + 10 % FBS + 400 µg/ml G418). Seleksijsko gojišče smo menjavali vsake 3 dni.

3.4 POSTOPKI DELA Z LENTIVIRUSOM

3.4.1 Delo z lentivirusom

Vse delo, ki je vključevalo delo z lentivirusom in z lentivirusom okuženimi celičnimi linijami, je potekalo v ločenem prostoru, z ločeno opremo (brezprašna komora, centrifuga, mikroskop in inkubator). Uporabljali smo dvojne rokavice in dodatne zaščitne rokave za enkratno uporabo. Med delom smo zunanjji par rokavic pogosto menjavali. Pred delom in po njem smo površine, ki so bile v stiku z kužnimi vzorci, razkužili z virocidom in nato še s 70-odstotnim etanolom.

3.4.2 Producija lentivirusnega vektorja (Slika 8)

Uporabili smo Lenti-X™ HTX Packaging System proizvajalca Clontech. Dan pred transfekcijo smo v 10-cm petrijevko nasadili 5×10^6 Lenti-X™ 293T celic in jih čez noč inkubirali na 37 °C in 5 % CO₂. Za vsak vektor posebej smo pripravili po dve mikrocentrifugirki, v katerih smo zamešali reagente, kot je navedeno v **Preglednici 11**.

Preglednica 11: Reagenti za produkcijo lentivirusnih vektorjev

| 1. mikrocentrifugirka | 2. mikrocentrifugirka | | |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------|
| Xfect Reaction Buffer | 557,0 µl | | |
| Lenti-X HTX Packaging Mix | 36,0 µl | Xfect Reaction Buffer | 592,5 µl |
| pLVX-Oct4 ali pLVX-Cripto (7 µg) | 7,0 µl | Xfect polymer | 7,5 µl |
| Skupni volumen | 600,0 µl | Skupni volumen | 600,0 µl |

Obe mikrocentrifugirki smo dobro premešali, volumen druge mikrocentrifugirke dodali v prvo in ponovno dobro premešali. Mešanico smo 10 min inkubirali na sobni temperaturi, da smo omogočili nastanek kompleksov DNA-Xfect Polymer, in jo po kapljicah dodali v medij v petrijevko z 293T celicami, nasajenimi prejšnji dan. Petrijevko smo premešali z gibi naprej-nazaj in nato levo-desno. Po inkubaciji na 37 °C in 5 % CO₂ čez noč smo celicam zamenjali medij. 48 h po transfekciji smo prvič poželi suspenzijo virusov, gojišče z lentivirusi. Druga žetev je sledila 72 h po transfekciji.

3.4.3 Žetev lentivirusnih vektorjev

Gojišče, v katerem so rastle transficirane celice 293T, smo odpipetirali v 15-ml centrifugirko, celicam pa dodali sveže gojišče. Suspenzijo virusov smo prefiltrirali skozi 0,45 µm filter (z nizko afiniteto do vezave proteinov), da smo se znebili celičnih ostankov in jo takoj uporabili za transdukcijo želenih celic. Preostanek suspenzije virusov smo po 1 ml alikvotih razdelili v krioviale in jo do uporabe zamrznili na -20 °C. Za potrditev

prisotnosti lentivirusnih vektorjev v gojišču smo po žetvi uporabili Lenti-X GoStix™, na katerega smo kapnili 20 µl suspenzije virusov, nato pa še štiri kapljice priloženega topila. Pri pozitivnem rezultatu sta se pojavili dve črtici, sicer pa samo ena.

3.4.4 Transdukacija celic

Za transdukциjo smo celice nasadili v plošče s 6 luknjami. Prefiltrirani suspenzioni virusov smo tik pred transdukциjo dodali polibren do končne koncentracije 4 µg/ml. Polibren je polikation, ki zmanjša odbojnost med virusom in celično membrano, zato poveča učinkovitost transdukcije. Ko so celice dosegle od 80 do 90 % konfluentnost, smo jim gojišče zamenjali z 1 ml (namesto 3 ml) svežega gojišča. V to gojišče smo nato dodali 1ml suspenzije virusov z polibrenom ali 1 ml koncentrata suspenzije virusov. Celice smo inkubirali 24 h na 37 °C in 5 % CO₂ in jim nato normalno (3 ml) zamenjali gojišče. Uspešnost transdukcije smo preverjali s fluorescenčnim mikroskopom.

3.4.5 Izolacija lentivirusne RNA

Virusno RNA smo izolirali s kompletom reagentov NucleoSpin® RNA Virus. 150 µl prefiltrirane suspenzije virusov smo dodali 600 µl RAV1 reagenta in lizirali 5 min pri 70 °C. Dodali smo 600 µl 96-odstotnega etanola in celotno mešanico v dveh korakih po 675 µl naložili na kolono. Po vsakem nalaganju vzorca smo kolono 1 min centrifugirali pri 8000 x g. Sledilo je spiranje kolone. Prvič smo jo sprali z 500 µl RAW pufra 1 min pri 8000 x g, drugič s 600 µl RAV3 pufra 1 min prav tako pri 8000 x g, tretjič pa 5 min z 200 µl RAV3 pufra pri 11000 x g. RNA smo eluirali 3 min v 50 µl vode molekularne čistote ogrete na 70 °C pri 11000 x g.

3.4.6 Določanje koncentracije virusnih kopij v suspenziji virusov

Za določanje koncentracije virusnih kopij v suspenziji virusov smo uporabili Lenti-X™ qRT-PCR Titration komplet. Vse potrebne reagente smo odtalili na ledu.

- Prvi korak je bil odstranitev DNA z encimom DNase I. Zmešali smo naslednjo reakcijo, prikazano v **Preglednici 12**.

Preglednica 12: Reakcija za odstranitev DNA

| | |
|------------------------------|---------|
| Vzorec izolirane virusne RNA | 12,5 µl |
| DNase I Buffer | 2,5 µl |
| DNase I | 4,0 µl |
| Vode molekularne čistote | 6,0 µl |
| Skupni volumen | 25,0 µl |

Dobro smo premešali in 30 min inkubirali na 37 °C, nato pa še 5 min na 70 °C. Mešanico smo do nadaljnje uporabe shranili na ledu.

- Sledila je priprava glavne mešanice PCR (»angl. *mastermix*«) za qRT-PCR. Pripravili smo dovolj za 17,6 reakcij, torej 10 % več, kot smo potrebovali. Na ledu smo zmešali reakcijo, prikazano v **Preglednici 13**.

Preglednica 13: Glavna mešanica qRT-PCR

| | |
|--------------------------|----------|
| Voda molekularne čistote | 140,8 µl |
| Quant-X Buffer | 220,0 µl |
| Lenti-X Forward Primer | 8,8 µl |
| Lenti-X Reverse Primer | 8,8 µl |
| ROX™ Reference Dye LMP | 8,8 µl |
| Quant-X Enzyme | 8,8 µl |
| RT Enzyme Mix | 8,8 µl |
| Skupni volumen | 404,8 µl |

Mešanico smo s pipetiranjem premešali in do uporabe shranili na ledu.

- V mikrocentrifugirkah (skupaj jih je bilo osem, povezanih v eno vrsto) smo si pripravili redčitve vzorcev in Lenti-X RNA kontrole za standardno krivuljo, kot je prikazano v **Preglednici 14**.

Preglednica 14: Priprava vzorcev in redčitev za standardno krivuljo

| Luknjica | 1. vrsta mikrocentrif., std. krivulja in slepi vzorci | | | 2. vrsta mikrocentrif., vzorci in redčitve | | |
|----------|-------------------------------------------------------|----------|-----------------|--------------------------------------------|----------|---------------|
| | EASY D. B. ¹ | dodatek* | kopij/ µl | EASY D. B. ¹ | dodatek* | količina |
| 1 | 18 µl | 2 µl | 5×10^7 | - | 20 µl | Vzorec1; 1x |
| 2 | 27 µl | 3 µl | 5×10^6 | 27 µl | 3 µl | Vzorec1; 0,1x |
| 3 | 27 µl | 3 µl | 5×10^5 | - | 20 µl | Vzorec2; 1x |
| 4 | 27 µl | 3 µl | 5×10^4 | 27 µl | 3 µl | Vzorec2; 0,1x |
| 5 | 27 µl | 3 µl | 5×10^3 | - | 20 µl | Vzorec3; 1x |
| 6 | 10 µl | - | Nič | 27 µl | 3 µl | Vzorec3; 0,1x |
| 7 | 10 µl | - | Nič | - | 20 µl | Vzorec4; 1x |
| 8 | 10 µl | - | Nič | 27 µl | 3 µl | Vzorec4; 0,1x |

*za razlago glej besedilo; ¹EASY Dilution Buffer

V vsako izmed luknjic obeh vrst mikrocentrifugirk smo, kot prikazuje zgornja preglednica, dodali ustrezni volumen EASY Dilution Buffer-a.

V luknjicah od 1 do 5 prve vrste mikrocentrifugirk smo pripravili 10 x redčitve Lenti-X RNA kontrole po sledеčem principu: v prvi luknjici smo 2 µl Lenti-X RNA kontrole razredčili v 18 µl EASY Dilution Buffer in dobro premešali s pipetiranjem. Nato smo iz prve luknjice prenesli 3 µl v drugo luknjico, premešali s pipetiranjem in ponovno prenesli 3 µl iz druge luknjice v tretjo. Postopek smo ponavljali do pete luknjice. V luknjice od 6 do 8 smo dali samo EASY Dilution Buffer za negativno kontrolo.

V drugi vrsti osmih mikrocentrifugirk smo v vsako drugo luknjico (1, 3, 5, 7) odpipetirali 20 µl vzorca, nato v naslednjo luknjico prenesli 3 µl in premešali s pipetiranjem. S tem smo dobili 10 x redčitve vzorcev.

- V vsako luknjico prvih dveh stolpcov plošče z 96-luknjicami smo odpipetirali 23 µl glavne mešanice PCR. Nato smo z multikanalno pipeto iz vsake luknjice vrstic prvi vrsti osmih mikrocentrifugirk prenesli po 2 µl v prvi stolpec in iz vsake luknjice vrstic drugi vrsti osmih mikrocentrifugirk po 2 µl v drugi stolpec plošče s 96 luknjicami. Ploščo smo zlepili s priloženo folijo in s centrifugiranjem pri 2000 x g za 2 min odstranili vse mehurčke v luknjicah z vzorci.
- Napravo za PCR v realnem času (angl. *real-time qPCR*) smo sprogramirali glede na spodaj navedeni program in jo zagnali.

Reverzna transkripcija

- 42 °C za 5 min
- 95 °C za 10 s

qPCR 40 ciklov

- 95 °C za 5 s
- 60 °C za 32 s

Diasociacijska krivulja

- 95 °C za 15 s
- 60 °C za 1 min

3.4.7 Obdelava podatkov qRT-PCR

Dobljene podatke smo obdelali s programom Sequence Detection Software Version 1.4; 7500 System SDS Software, priloženim aparaturi za qPCR. Dobljene vrednosti so bile števila kopij RNA v posamezni vdolbinici na plošči z 96 vdolbinicami (v enačbi spremenljivka Z). Ker smo želeli imeti število virusnih kopij RNA na ml virusne suspenzije smo uporabili naslednjo enačbo:

$$\text{kopij/ml} = \frac{(redčit. vzorca \times Z) \times (1000 \frac{\mu\text{l}}{\text{ml}}) \times (2 \times redči. v DNAZnem koraku) \times (50 \mu\text{l elucijski vol.})}{(150 \mu\text{l alikvota virusne susp.}) \times (2 \mu\text{l vzorca dodanega v luknjico v qPCRreakcijo})} \dots (1)$$

Ker smo imeli dve ponovitvi vsakega vzorca, smo izračunali povprečje kopij/ml za vsak vzorec suspenzije virusov, ki smo ga poželi.

3.4.8 Koncentriranje suspenzije virusov

Ker transdukcija z nekoncentrirano virusno suspenzijo ni bila uspešna, smo uporabili Lenti-X™ Concentrator. 10 ml požete in prefiltrirane virusne suspenzije smo dodali 3,4 ml Lenti-X™ Concentrator reagenta in dobro premešali. Mešanico smo dva dni inkubirali v hladilniku pri 4 °C, da se je virus oboril iz raztopine. Sledilo je centrifugiranje pri 1500 x g za 45 min. Supernatant smo aspirirali, pelet pa resuspendirali v 1 ml svežega medija. Tako pripravljen koncentrat smo takoj uporabili za transdukcijo.

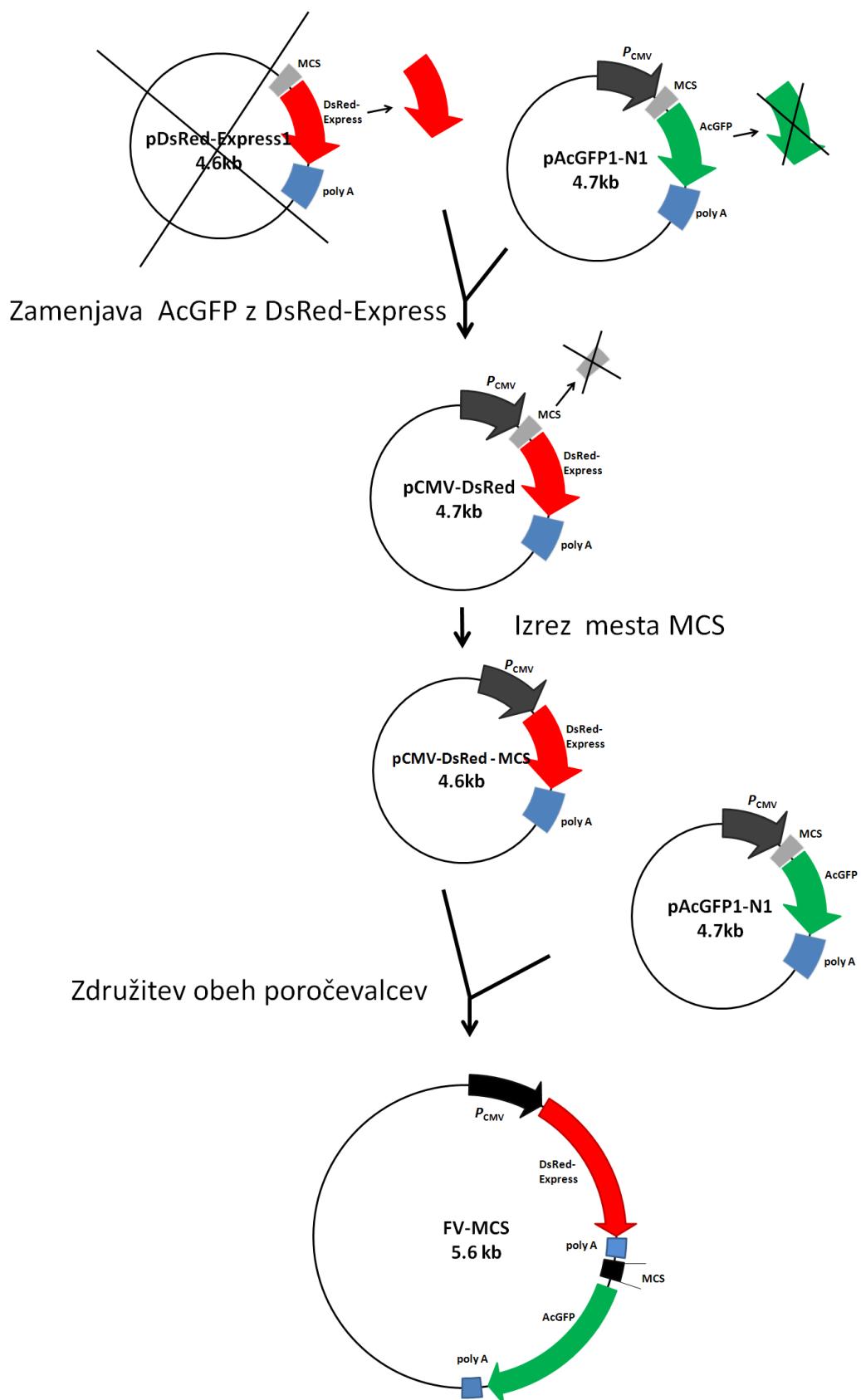
3.5 ZAPOREDJE RESTRIKCIJSKIH KORAKOV MED IZDELAVO VEKTORJA

Med zapisovanjem imen plazmidnih vektorjev smo imeni poročevalnih proteinov DsRed-Express in AcGFP pogosto skrajšali na DsRed in GFP.

3.5.1 Izdelava vektorja FV-MCS (Slika 5)

1. Z restrikcijo z encimoma **BamHI** in **NotI** smo plazmidu pAcGFP1-N1 izrezali AcGFP in ga zamenjali z DsRed-Express, ki smo ga z **BamHI** in **NotI** izrezali iz plazmida pDsRed-Express1. Dobili smo plazmid pCMV-DsRed-Express.
2. Izrez mesta MCS je potekal v dveh korakih. Najprej smo plazmid pCMV-DsRed-Express odprli z encimom **NheI** in lepljive konce zapolnili z DNA polimerazo I. S tem smo ohranili restriktionsko mesto za **NheI**.
3. V drugem koraku smo odprtenu in topemu plazmidu z **BamHI** izrezali MCS mesto. Tokrat smo lepljive konce odstranili z Mung Bean eksonukleazo. Po ligaciji smo dobili plazmid pCMV-DsRed-Express minus MCS.
4. Prav tako je v dveh korakih potekal izrez CMV promotorja iz plazmida pAcGFP1-N1. Plazmid smo najprej odprli z encimom **NheI** in lepljive konce zapolnili z DNA polimerazo I.
5. Odprtemu vektorju s topimi konci smo nato z **AseI** izrezali CMV promotor in dobili linearen plazmid pAcGFP1-N1 minus CMV.
6. Vrnili smo se k plazmidu pCMV-DsRed-Express minus MCS, ga odprli z encimom **AflII** in odstranili lepljive konce z Mung Bean eksonukleazo.
7. Linearen in topi pCMV-DsRed-Express minus MCS smo razrezali še s **AseI**. S tem smo iz pCMV-DsRed-Express minus MCS izrezali CMV-DsRed-Express minus MCS konstrukt.

8. Konstrukt iz koraka 7 smo ligirali z plazmidom pAcGFP1-N1 minus CMV in dobili vektor z dvojnim poročevalcem, pripravljen za sprejem poljubnega promotorja. Poimenovali smo ga FV-MCS (FV za *final vector*, MCS za *multiple cloning site*, v katerega kloniramo promotor).



Slika 5: Shema izdelave vektorja FV-MCS

3.5.2 Kloniranje *CRIPTO-1* promotorja v vektor FV-MCS (Slika 6)

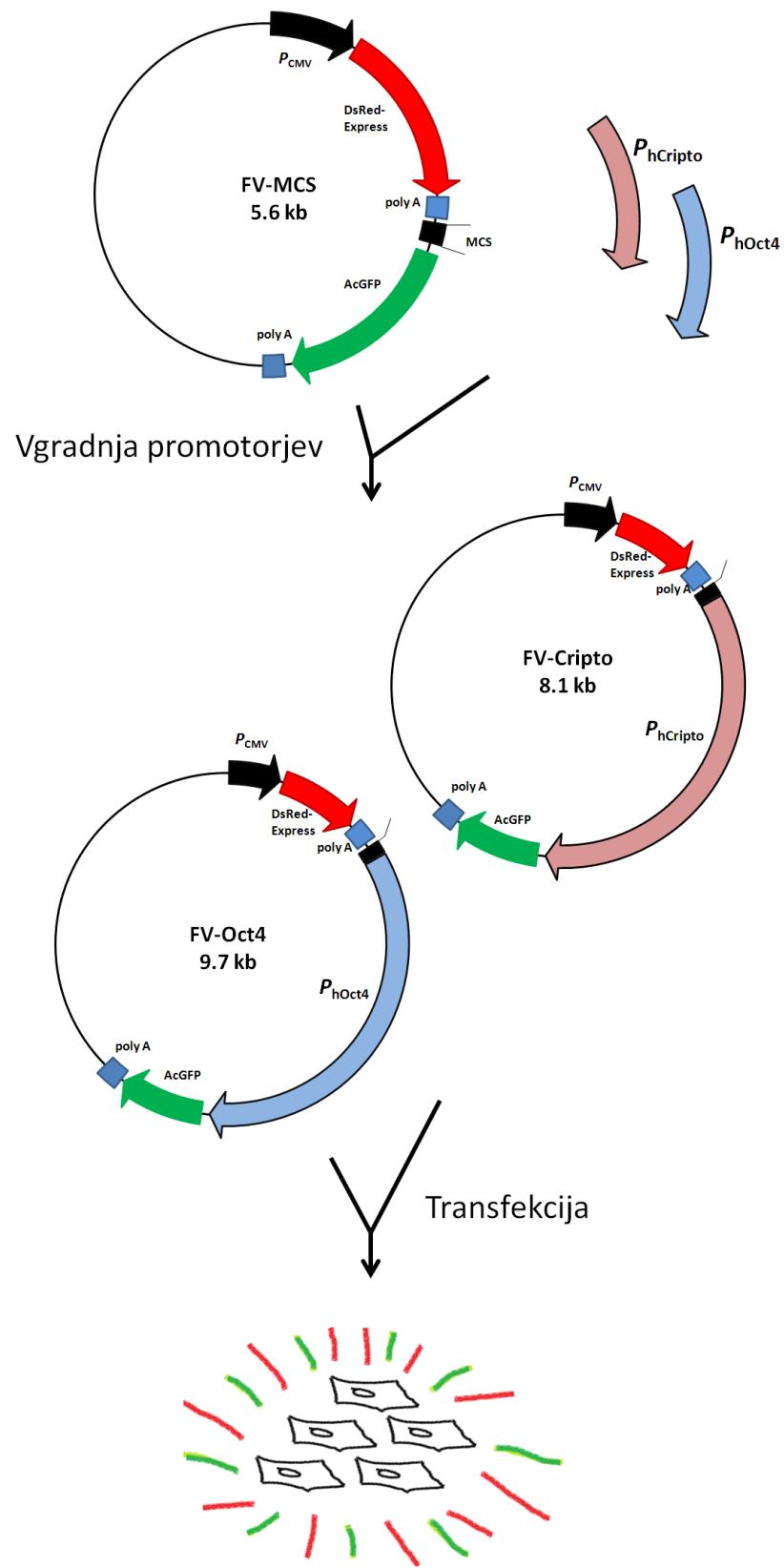
1. Kot vir promotorja *CRIPTO-1* nam je služil plazmid pGL3-CR1-promoter. Prvi korak pri izrezu je bila restrikcija z encimom **XhoI**. Lepljive konce smo zapolnili z DNA polimerazo I.
2. Linearnemu in topemu plazmidu smo promotor *CRIPTO-1* izrezali z encimom **KpnI**.
3. Vektor FV-MCS smo odprli z **BamHI** in tope konce zapolnili z DNA polimerazo I.
4. Dodatna restrikcija odprtrega in topega vektorja z **KpnI** je omogočila usmerjeno kloniranje promotorja *CRIPTO-1* v FV-MCS in s tem manj obsežen in lažji izbor pregleda kolonij *E. coli* s pravilno sestavljenim poročevalnim vektorjem.

Dobili smo poročevalni vektor za spremljanje izražanja gena *CRIPTO-1* (po starem *CRIPTO-1*), FV-Cripto.

3.5.3 Kloniranje promotorja *OCT4* v vektor FV-MCS (Slika 6)

1. Kot vir promotorja *OCT4* nam je služil plazmid human oct4-GFP. Prvi korak pri izrezu je bila restrikcija z encimom **NcoI**. Lepljive konce smo zapolnili z DNA polimerazo I.
2. Linearnemu in topemu plazmidu smo promotor *OCT4* izrezali z encimom **KpnI**.
3. Vektor FV-MCS smo odprli z **BamHI** in tope konce zapolnili z DNA polimerazo I.
4. Dodatna restrikcija odprtrega in topega vektorja z **KpnI** je omogočila usmerjeno kloniranje promotorja *OCT4* v FV-MCS in s tem manj obsežen in lažji izbor pregleda kolonij *E. coli* s pravilno sestavljenim poročevalnim vektorjem.

Dobili smo poročevalni vektor za spremljanje izražanja gena *OCT4*, FV-Oct4.



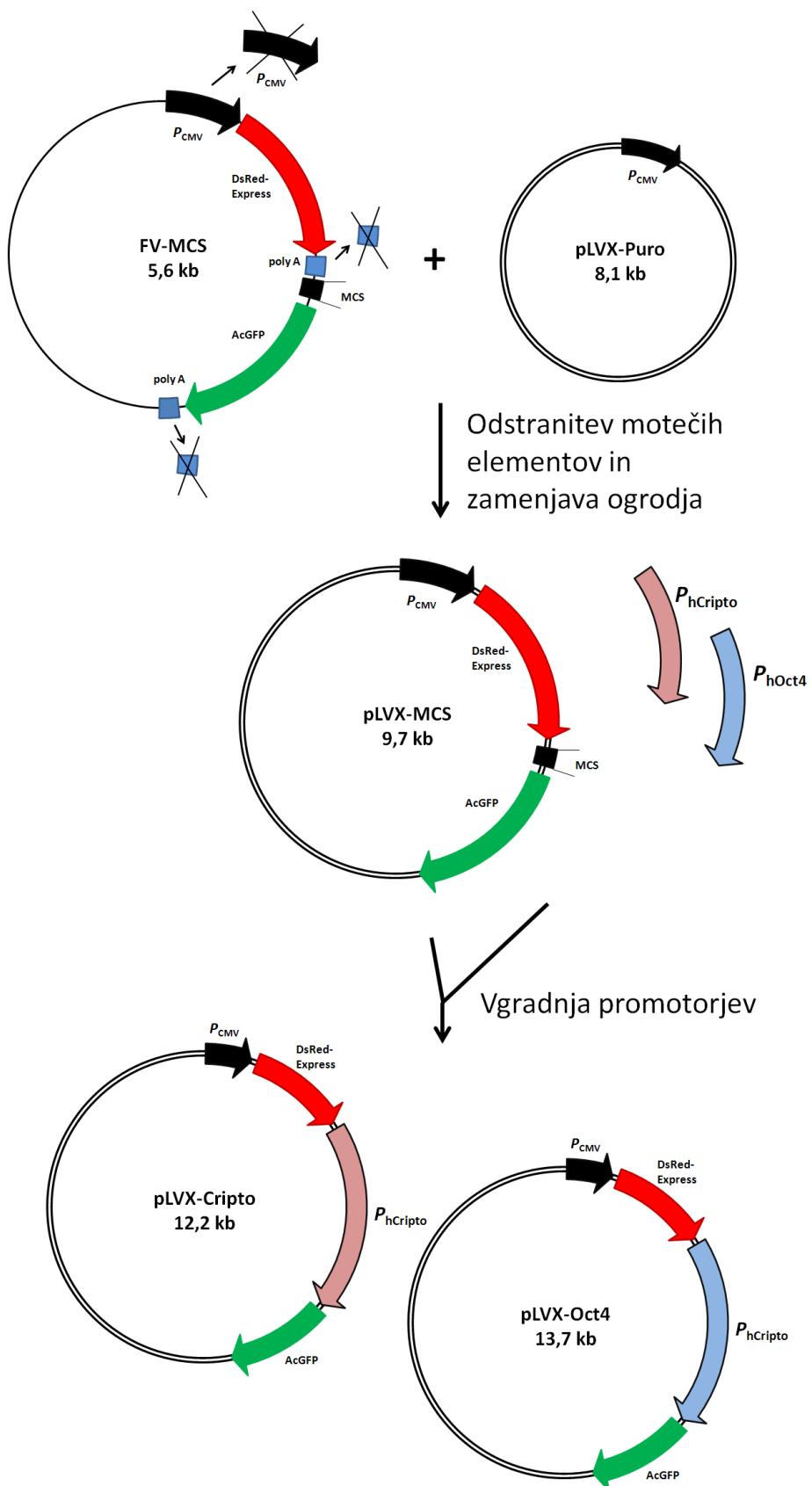
Slika 6: Shema kloniranja *CRIPTO-1* in *OCT4* promotorjev v vektor FV-MCS

3.5.4 Prenos poročevalnega konstrukta iz FV-MCS v plazmid pLVX-Puro

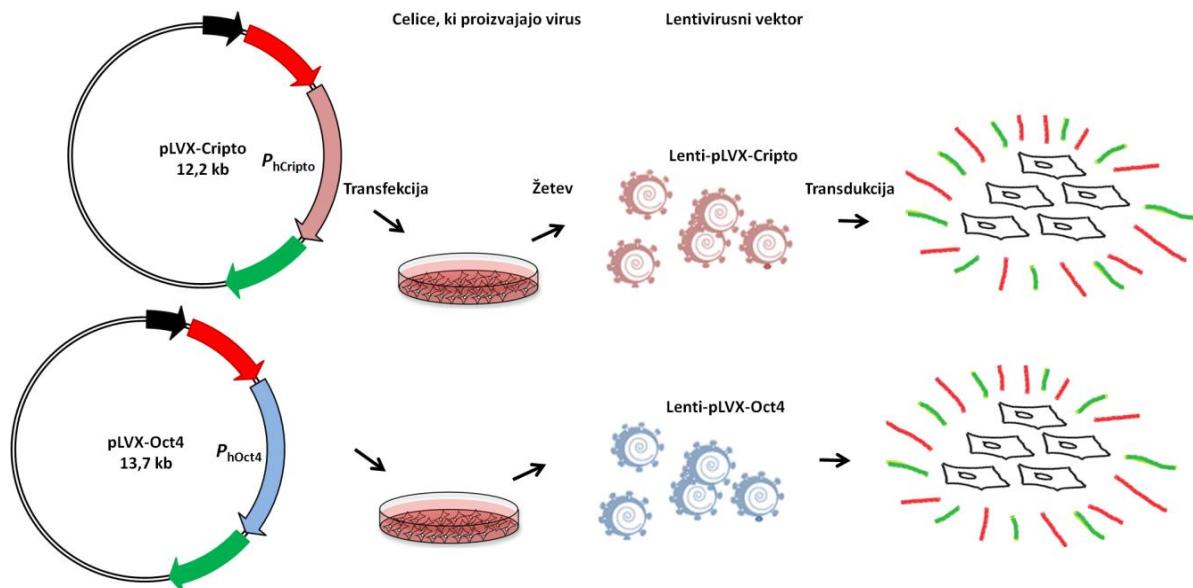
Za uporabo našega poročevalnega konstrukta v virusnih vektorjih je bilo treba zamenjati osnovno ogrodje plazmida, v katerem je bil poročevalni konstrukt (**Slika 7**). Ogródje vektorja FV-MCS temelji na vektorju pAcGFP1-N1 in ni primerno za uporabo v virusnih vektorjih, zato smo konstrukt DsRedExpress-MCS-GFP prenesli v ogrodje vektorja pLVX-Puro. Promotorja CMV, ki nadzoruje izražanje DsRedExpress, nismo prenašali, saj ga vektor pLVX že vsebuje. Iz poročevalnega konstrukta je bilo treba izrezati tudi oba poliadenilacijska signala, saj motita pakiranje RNA v virusno ovojnico.

1. Vektor FV-MCS smo odprli z encimom **BglIII** in nato lepljive konce zapolnili z DNA polimerazo I.
2. Hkrati smo drugi alikvot vektorja FV-MCS odprli z encimom **NotI** in lepljive konce zapolnili z DNA polimerazo I.
3. Oba linearna in topa vektorja smo nato razrezali z encimom **NheI**.
4. Iz restriktijske reakcije vektorja FV-MCS z encimoma **BglIII** in **NheI** smo v ligaciji uporabili večji fragment, iz restriktijske reakcije z encimoma **NotI** in **NheI** pa smo uporabili najmanjši DNA fragment. Tako smo se znebili poliadenilacijskega signala za sekvenco DsRedExpress.
5. Izrez CMV promotorja smo opravili s hkratno restrikcijo plazmida iz koraka 4 z **AseI** in **NheI**. Lepljive konce smo zapolnili z DNA polimerazo I in nato plazmid avtoligirali.
6. Sledil je izrez konstrukta DsRedExpress-MCS-GFP s hkratno restrikcijo z **NsiI** in **MfeI**. Encim **MfeI** reže takoj za sekvenco AcGFP, tako da smo s tem poskrbeli še za odstranitev drugega poliadenilacijskega signala. Lepljive konce smo zapolnili z DNA polimerazo I.
7. Vektor pLVX-Puro smo odprli z encimom **SmaI** (reže tako, da so konci topi).
8. Zadnji korak je bila ligacija konstrukta DsRedExpress-MCS-GFP z odprtим in topim pLVX-Puro vektorjem. Dobili smo vektor pLVX-MCS z dvojnim poročevalcem, pripravljen za sprejem poljubnega promotorja in sposoben za uporabo v virusnih poročevalnih sistemih.
9. Kloniranje promotorjev *OCT4* in *CRIPTO-1* je potekalo podobno kot v FV-MCS.

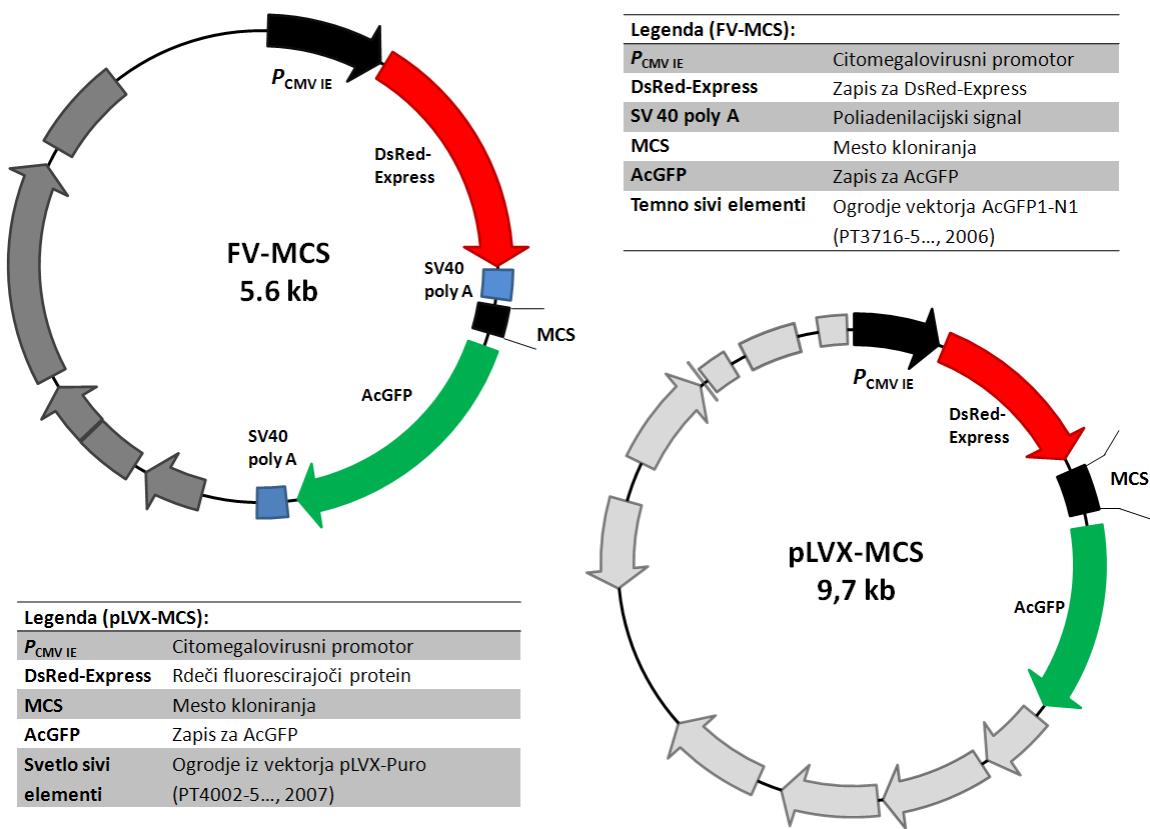
Po potrebi smo med koraki produkte restrikcij očistili. Po vsaki ligaciji je sledila transformacija kompetentnih *E. coli*, nato izolacija plazmidov in restriktijska analiza. Ta je omogočila izbiro pravilno sestavljenega plazmida.



Slika 7: Shema prenosa poročevalnih konstruktorjev v pLVX ogrodje



Slika 8: Shema proizvodnje in uporabe lentivirusnih vektorjev lenti-pLVX-Oct4 in lenti-pLVX-Cripto



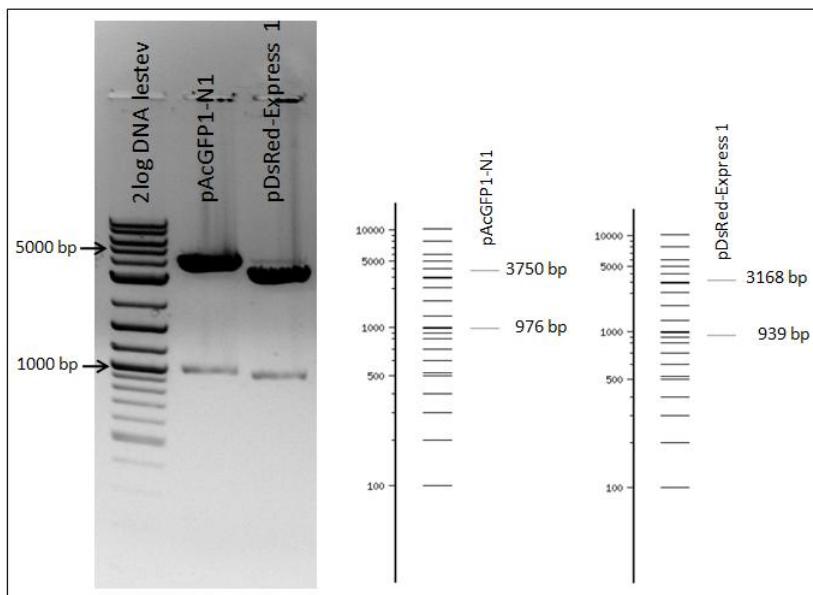
Slika 9: Zgradba vektorjev FV-MCS in pLVX-MCS

4 REZULTATI

Elektroforezne slike agaroznih gelov restrikcijskih reakcij so predstavljene tako, da imamo na levi fotografijo eksperimentalno pridobljenih podatkov, na desni strani pa je predstavljen pravilen pričakovani rezultat, simuliran z digitalno restrikcijo v programu NEBcutter (NEBcutter..., 2011). Za enostavnejšo primerjavo eksperimentalno in digitalno pridobljenih restrikcijskih slik sta oba tipa slik opremljena z označevalcem velikosti 2log DNA lestvijo (**Slike 10, 11, 13–19, 22–30**). Prikazane so samo elektroforezne slike agaroznih gelov restrikcijskih reakcij glavnih korakov pri sestavljanju poročevalnega vektorja. Vse prikazane eksperimentalne restrikcijske slike so negativi originalnih slik, saj tako lažje vidimo šibkejše pasove fragmentov DNA na gelu.

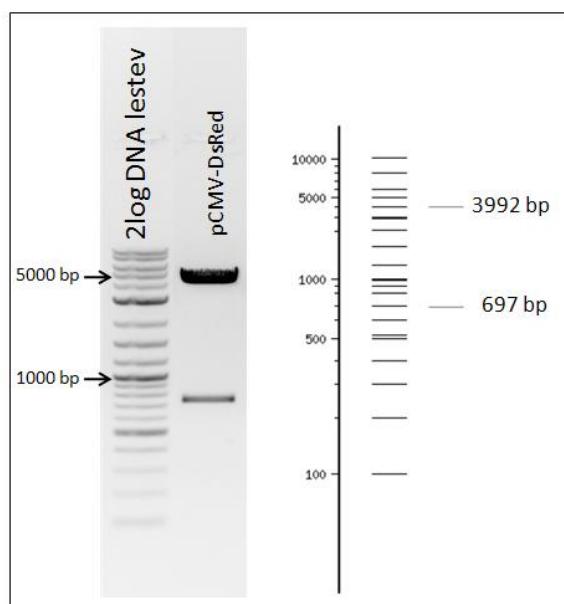
4.1 SESTAVLJANJE POROČEVALNEGA VEKTORJA FV-MCS

Pomembnejši koraki pri sestavljanju poročevalnega vektorja FV-MCS so prikazani na **Slikah 10–15**.



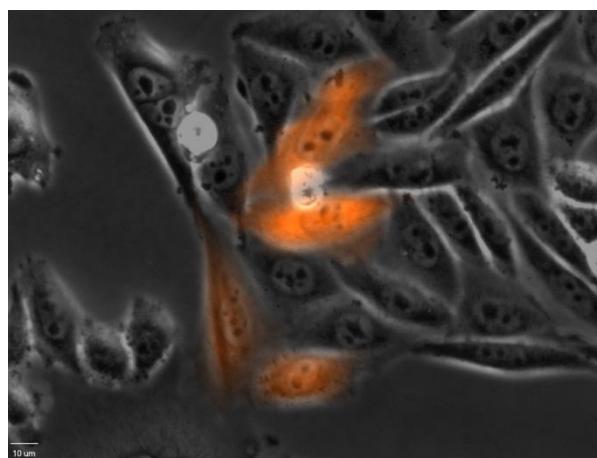
Slika 10: Restrikcijska analiza vektorjev pAcGFP1-N1 in pDsRed-Express1

Potrditev pristnosti z restrikcijo z encimoma *AflII* in *XmaI*. Velikosti pasov na eksperimentalni restrikcijski slikici ustrezajo predvidenim velikostim na digitalni restrikcijski slikici, zato lahko potrdimo pristnost plazmidov pAcGFP1-N1 in pDsRed-Express1.



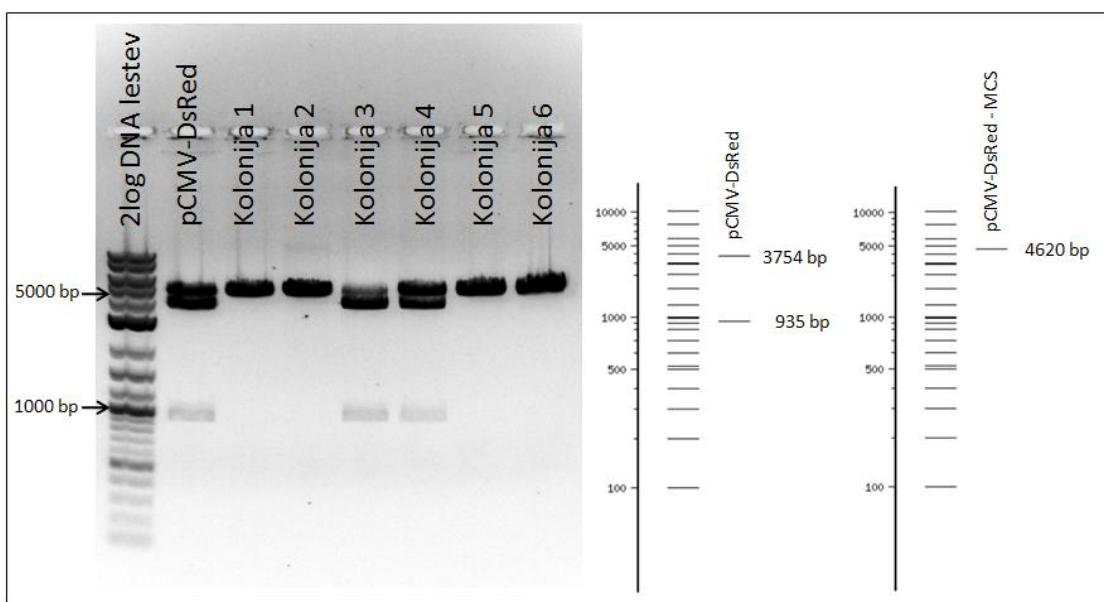
Slika 11: Restriktijska analiza vektorja pCMV-DsRed-Express (pCMV-DsRed)

Preverjanje sestave vektorja z restrikcijo z encimoma *Bam*H I in *Not*I. Velikosti pasov na eksperimentalni sliki ustrezajo velikostim pasov digitalne restrikcije, zato lahko trdimo, da je analizirani plazmid sestavljen pravilno.



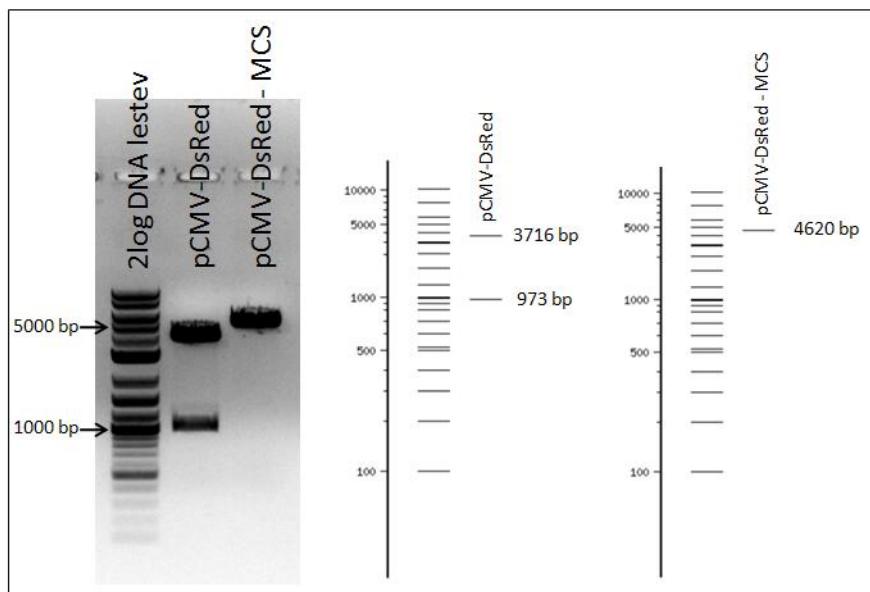
Slika 12: Funkcionalni preizkus vektorja pCMV-DsRed

Slika prikazuje funkcionalni test uspešnosti zamenjave AcGFP z DsRed-Express v plazmidu pAcGFP1-N1. Za transfekcijo vektorja v celice CHO K1 smo uporabili FuGENE6™ reagent. Slika je bila zajeta s fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom Olympus IX81. Celice, ki fluorescirajo, so bile uspešno transficirane, rdeča barva pa je dokaz uspešne zamenjave AcGFP z DsRed-Express.



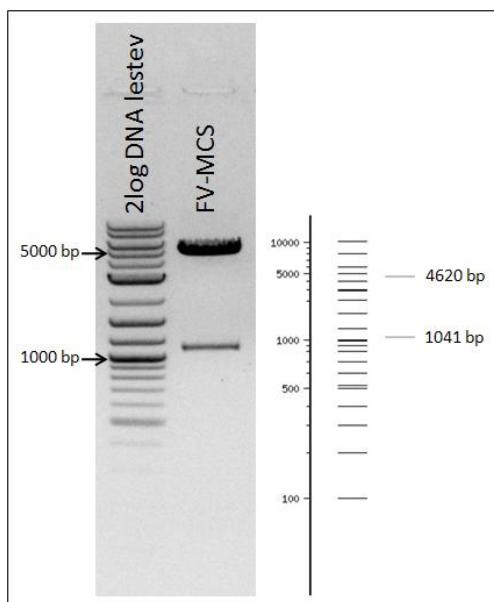
Slika 13: Restriktionska analiza – iskanje vektorja pCMV-DsRed – MCS.

Med izoliranimi plazmidi iz kolonij, ki so zrasle po ligaciji, smo iskali plazmid pCMV-DsRed z uspešno eliminiranim MCS mestom. Restrikcija je bila opravljena z encimoma *Bam*HI in *Af*III. Uspešno eliminacijo MCS mesta kažejo plazmidi, izolirani iz kolonij 1, 2, 5 in 6. V naslednjem koraku smo uporabili plazmid, izoliran iz kolonije 1. Restrikcija pCMV-DsRed ni bila popolna, saj na eksperimentalni sliki vidimo tri pasove namesto dveh predvidenih. Prvi pas (od zgoraj navzdol) je posledica nepopolne restrikcije in predstavlja linearen pCMV-DsRed, razgrajen samo z enim od obenh encimov. Spodnja dva pasova predstavljata delež plazmida, ki je bil razgrajen z obema encimoma, saj velikosti pasov ustrezajo predvidenim velikostim na digitalni restriktionski sliki.



Slika 14: Dodatna restriktionska analiza plazmida pCMV-DsRed – MCS

Na Sliki 13 je plazmid pCMV-DsRed – MCS predstavljen kot kolonija 1. Restrikcija je bila opravljena s *Hind*III in *Af*III. Velikosti pasov na eksperimentalni sliki ustrezajo velikostim pasov digitalne restrikcije. Restrikcija pCMV-DsRed predstavlja neuspešno eliminacijo MCS mesta, negativno kontrolo.

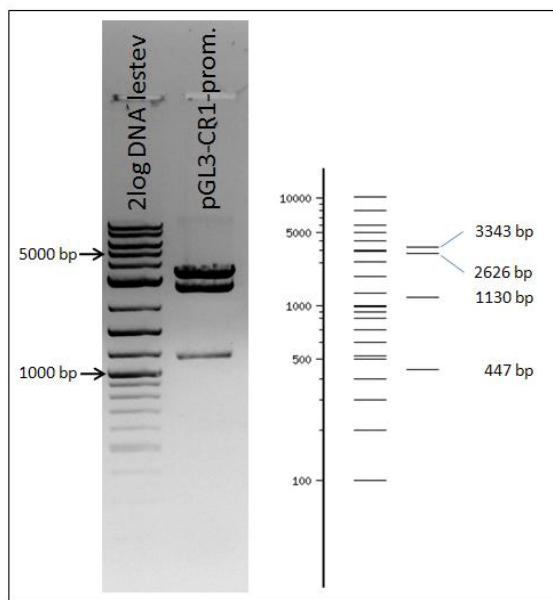


Slika 15: Restriktionska analiza vektorja FV-MCS

Restriktionska analiza je bila opravljena z *NotI*. Velikosti pasov na eksperimentalni restriktionski sliki ustrezajo predvidenim velikostim na digitalni restriktionski sliki, zato lahko potrdimo, da je vektor FV-MCS sestavljen pravilno.

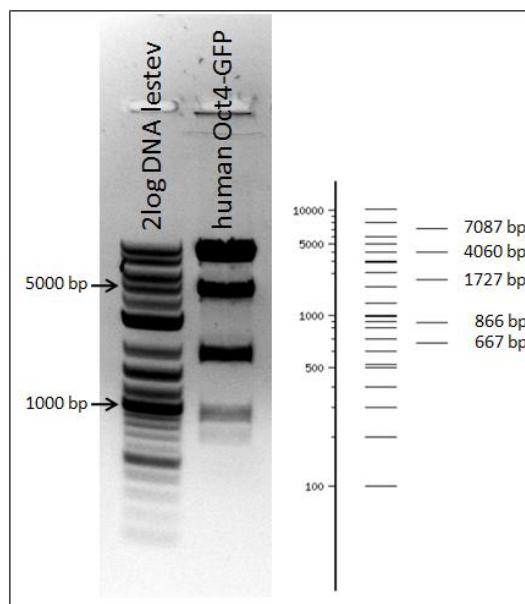
4.2 VGRADNJA PROMOTORJEV *OCT4* IN *CRIPTO-1* V VEKTOR FV-MCS

Pomembnejši koraki vgradnje promotorjev *OCT4* in *CRIPTO-1* v vektor FV-MCS so prikazani na **Slikah 16–19**.



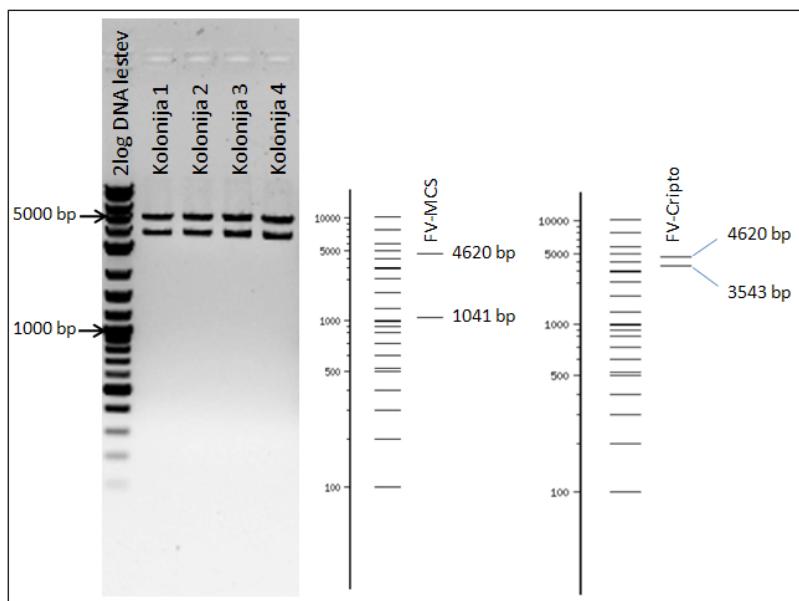
Slika 16: Restriktionska analiza vektorja pGL3-CR1-promoter

Restriktionska analiza je bila opravljena z *NheI* in *XbaI*. Skrajno spodnji pas v eksperimentalni restriktionski sliki ni viden. Velikosti ostalih pasov ustrezajo predvidenim velikostim na digitalni restriktionski sliki, zato lahko potrdimo pristnost plazmida pGL3-CR1-promotor.



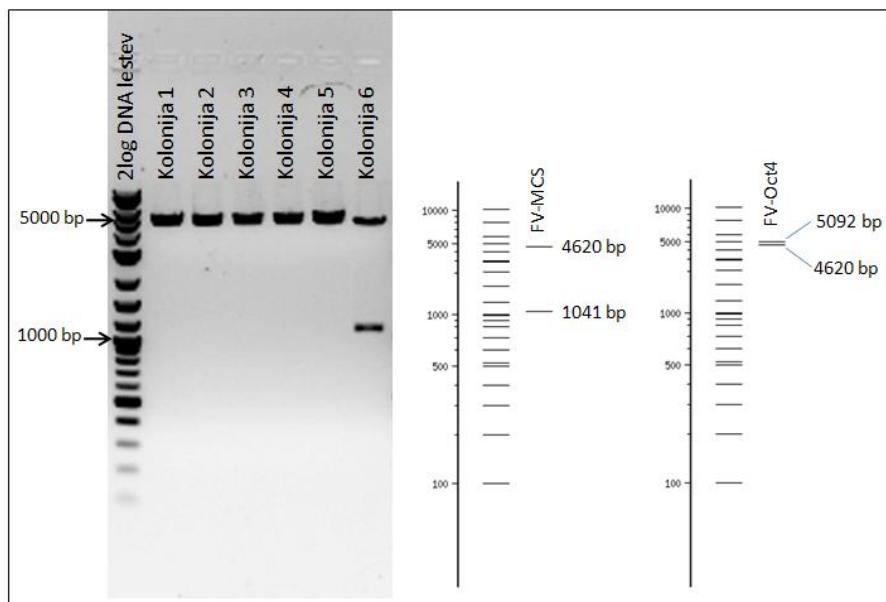
Slika 17: Restriktionska analiza vektorja human Oct4-GFP

Restriktionska analiza je bila opravljena s *KpnI* in *NcoI*. Velikosti pasov na eksperimentalni restriktionski sliki ustrezajo predvidenim velikostim na digitalni restriktionski sliki, zato lahko potrdimo pristnost plazmida human Oct4-GFP.



Slika 18: Restriktivna analiza - iskanje vektorja FV-Cripto

Iskali smo uspešno integriran promotor *CRIPTO-1* v vektor FV-CMV. Restriktivacija je bila opravljena z encimom *MfeI*. Vsi analizirani plazmidi kažejo uspešno integracijo promotorja *CRIPTO-1*. Prikazana je tudi digitalna restriktivna slika neuspešne integracije promotorja *CRIPTO-1*, FV-MCS. V naslednjem koraku smo uporabili plazmid, izoliran iz kolonije 1.



Slika 19: Restriktivna analiza - iskanje vektorja FV-Oct4

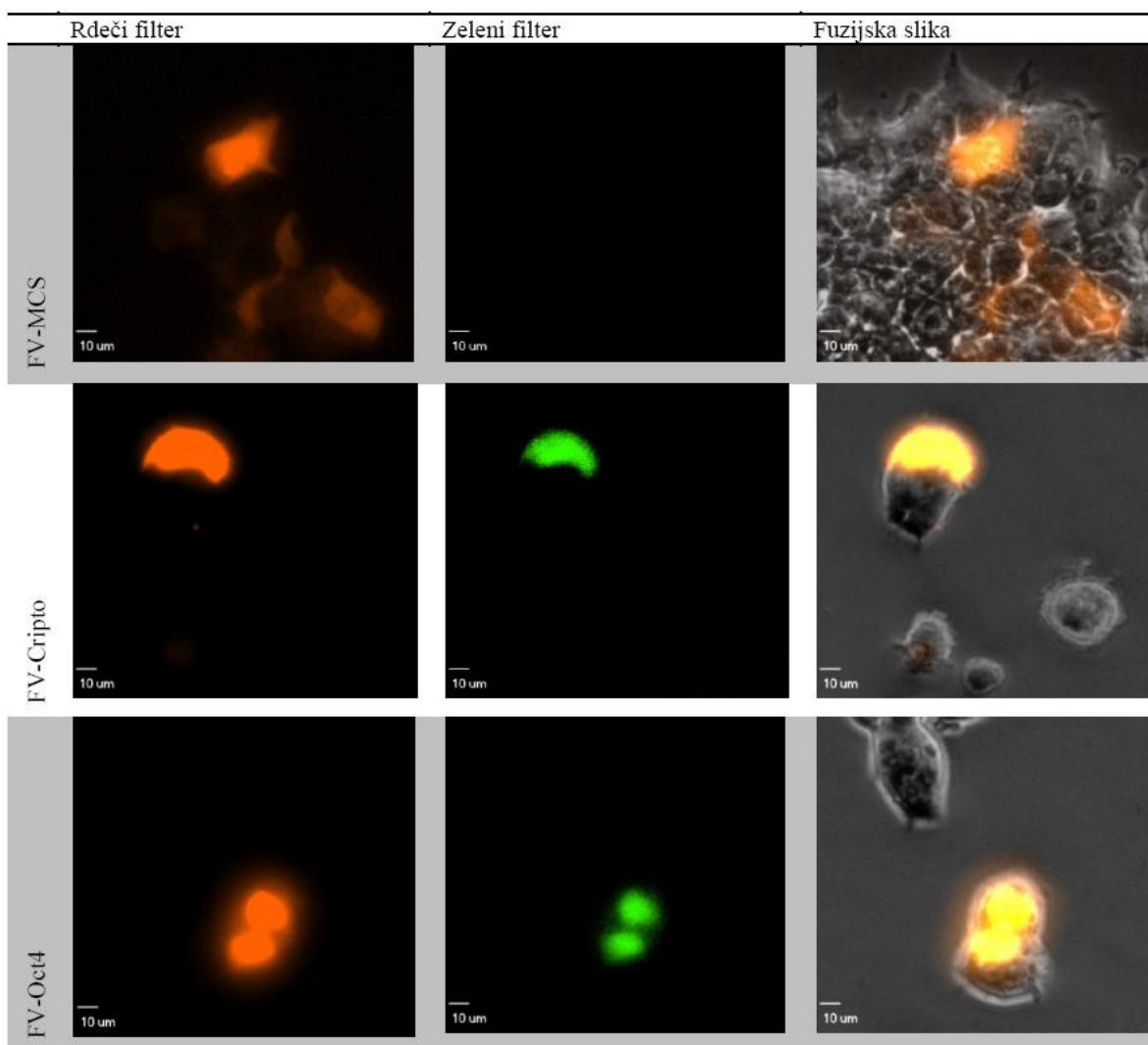
Iskali smo uspešno integriran promotor *OCT4* v vektor FV-CMV. Restriktivacija je bila opravljena z encimom *MfeI*. Pravilno integracijo promotorja *OCT4* kažejo plazmidi, izolirani iz kolonij 1, 2, 3, 4 in 5. Prikazana je tudi digitalna restriktivna slika neuspešne integracije promotorja *OCT4*, FV-MCS. Na eksperimentalni sliki jo predstavlja plazmid, izoliran iz kolonije 6. V naslednjem koraku smo uporabili plazmid, izoliran iz kolonije 1.

4.3 FUNKCIONALNI PREIZKUS VEKTORJEV FV-MCS, FV-Cripto IN FV-Oct4

Po restrikcijski analizi končnih vektorjev je sledil njihov funkcionalni preizkus. Teratokarcinomske celice (CRL2073) so bile uporabljeni kot pozitivna kontrola, saj izražajo oba opazovana gena, *CRIPTO-1* in *OCT4* (to smo potrdili z RT-PCR, glej **Sliko 36**). Negativno kontrolo so predstavljali neonatalni humani fibroblasti (CRL2097), saj ne izražajo gena *OCT4* niti gena *CRIPTO-1* (**Slika 36**).

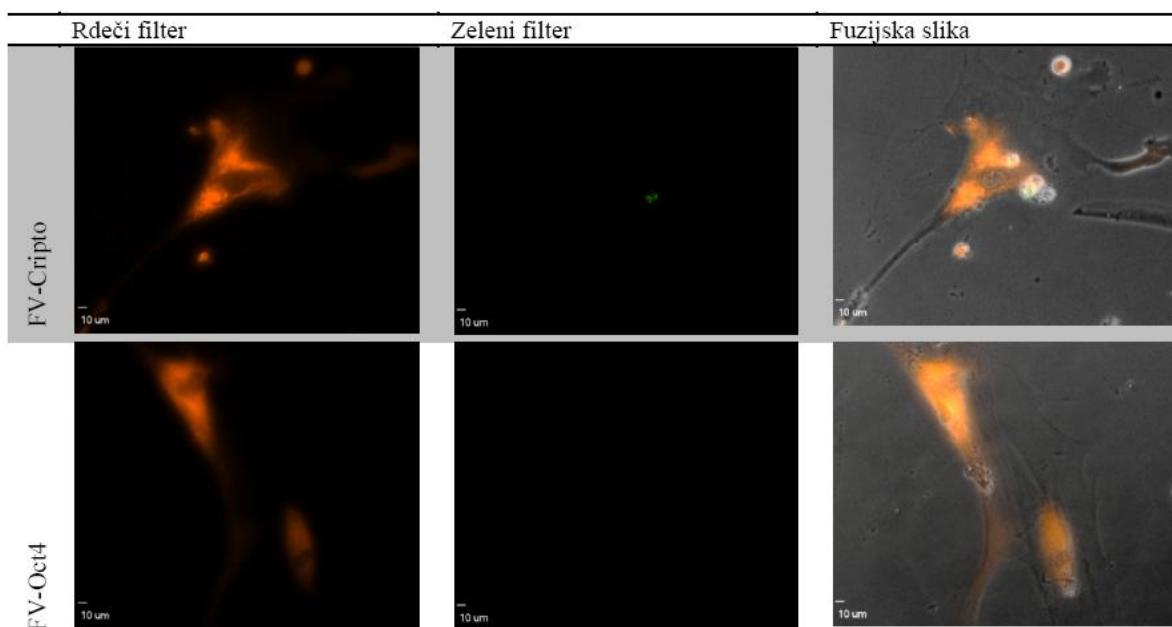
Slika 20 predstavlja primerjavo delovanja vektorjev FV-MCS, FV-Cripto in FV-Oct4 v teratokarcinomskih celicah CRL 2073, ki izražajo gena *CRIPTO-1* in *OCT4*. Rdeča fluorescencija označuje uspešno transficirane celice s posameznim vektorjem. Zelena fluorescencija pa pomeni, da je transficirani vektor sposoben poročati izražanje izbranega gena.

Na **Sliki 21** je predstavljena primerjava delovanja vektorjev FV-Cripto in FV-Oct4 v fibroblastih CRL 2097, ki ne izražajo genov *CRIPTO-1* ali *OCT4*. Rdeča fluorescencija označuje uspešno transficirane celice s posameznim vektorjem.



Slika 20: Funkcionalni preizkus vektorjev FV-MCS, FV-Cripto in FV-Oct4 v teratokarcinomskih celicah CRL2073

Transfekcija vektorjev v celice je bila opravljena z FuGENE6™ reagentom. Slike so bile zajete s fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom Olympus IX81.

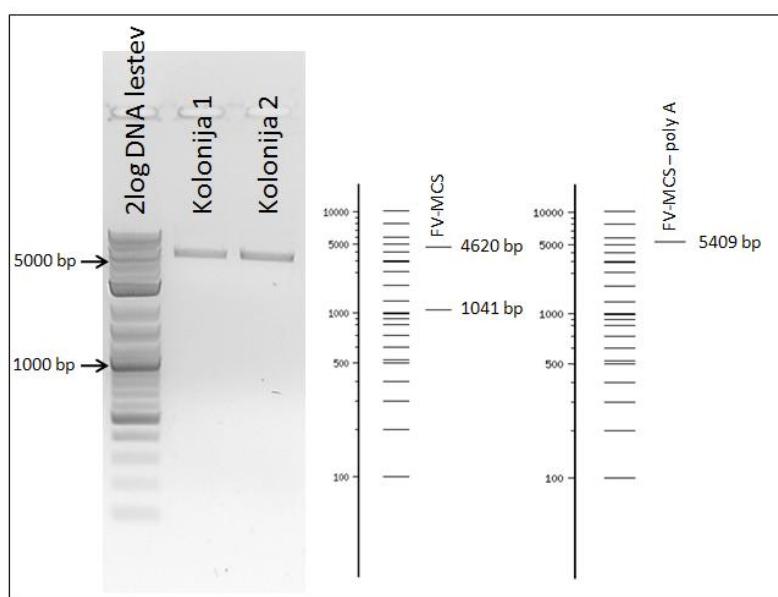


Slika 21: Funkcionalni preizkus vektorjev FV-Cripto in FV-Oct4 v fibroblastih CRL2097

Transfekcija vektorjev v celice je bila opravljena z elektroporacijo. Slike so bile zajete s fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom Olympus IX81, po končani selekciji z G418.

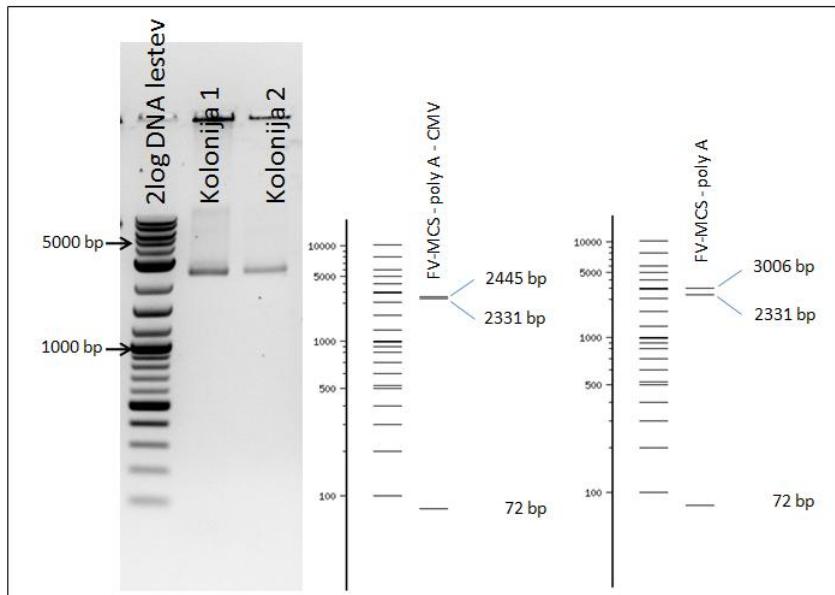
4.4 PRENOS POROČEVALNIH KONSTRUKTOV V VEKTOR pLVX-Puro

Slike 22-30 prikazujejo pomembnejše korake pri prenosu poročevalnih konstruktov v vektor pLVX.Puro.



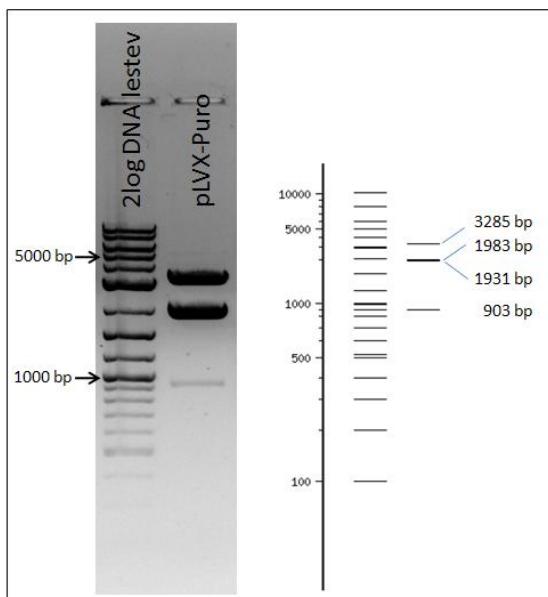
Slika 22: Restriktionska analiza – iskanje vektorja FV-MCS – poly A

Iskali smo vektor FV-MCS z uspešno eliminiranim poliadenilacijskim signalom. Restriktcija je bila opravljena z encimoma *NheI* in *MfeI*. Oba analizirana vektorja kažeta uspešno eliminacijo poliadenilacijskega signala. Prikazana je tudi digitalna restriktionska slika neuspešne eliminacije poliadenilacijskega signala – FV-MCS. V naslednjem koraku smo uporabili plazmid, izoliran iz kolonije 1.



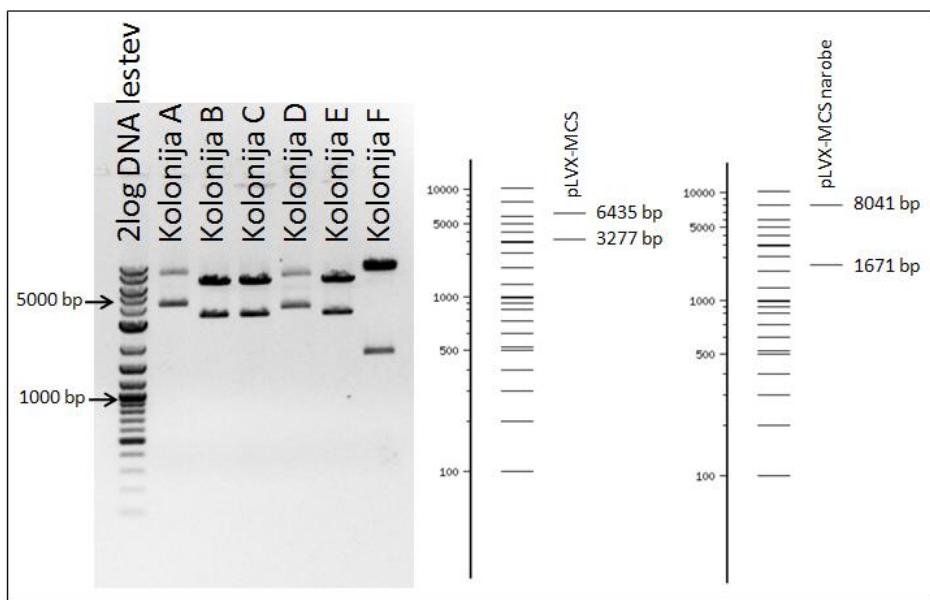
Slika 23: Restriktionska analiza – iskanje vektorja FV-MCS – poly A – CMV

Iskali smo vektor FV-MCS – poly A z uspešno eliminiranim CMV promotorjem. Restriktija je bila opravljena z encimom *Nsi*I. Oba analizirana plazmida kažeta uspešno eliminacijo CMV promotorja. V naslednjem koraku smo uporabili plazmid iz kolonije 1.



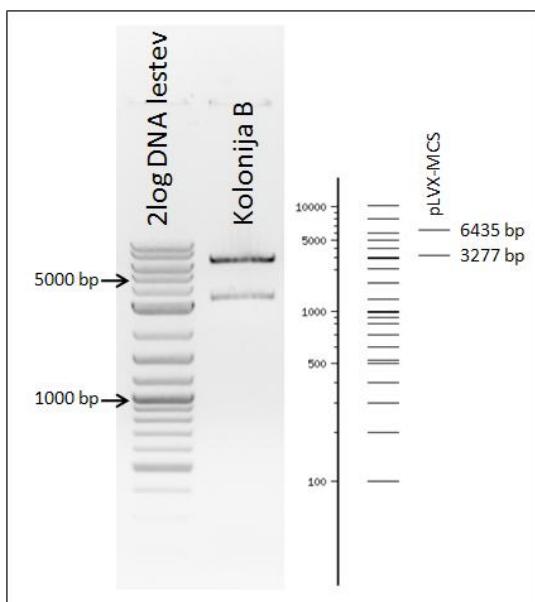
Slika 24: Restriktionska analiza vektorja pLVX-Puro

Restriktija je bila opravljena z encimoma *Afl*III in *Nco*I. Velikosti pasov na eksperimentalni restriktionski sliki ustrezajo predvidenim velikostim na digitalni restriktionski sliki, zato lahko potrdimo pristnost vektorja pLVX-Puro.



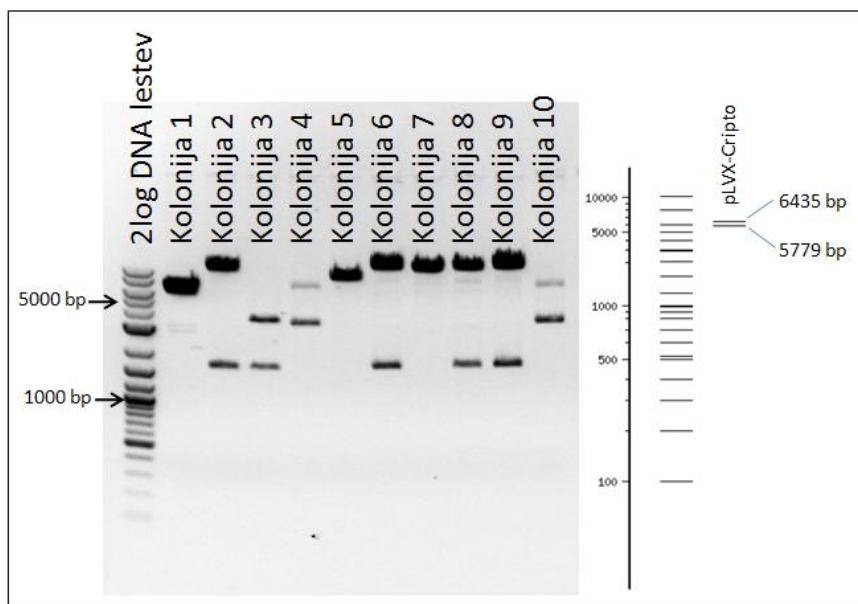
Slika 25: Restriktivna analiza – iskanje vektorja pLVX-MCS

Iskali smo vektor pLVX-Puro z uspešno integriranim poročevalnim konstruktom DsRedExpress-MCS-GFP. Restriktivna analiza je bila opravljena z encimom *MfeI*. Pravilno orientirano integracijo poročevalnega konstruktka kažejo plazmidi, izolirani iz kolonij B, C in E. V naslednjih korakih smo uporabili plazmid iz kolonije B.



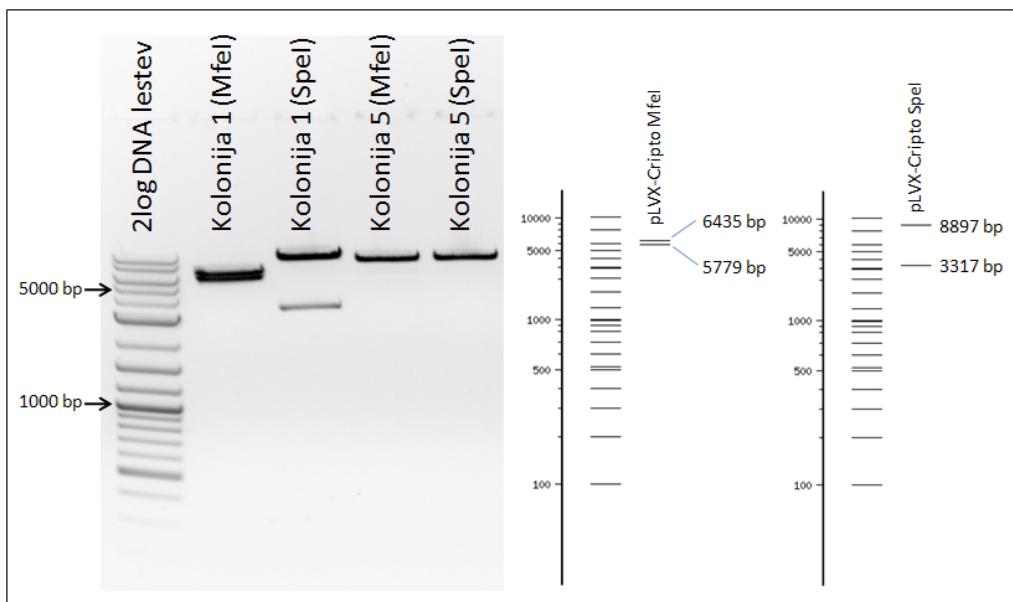
Slika 26: Dodatne restriktivne analize vektorja pLVX-MCS (na sliki Kolonija B)

Restriktivna analiza je bila opravljena z *MfeI*. Velikosti pasov na eksperimentalni restriktivni sliki ustrezajo predvidenim velikostim na digitalni restriktivni sliki, zato lahko potrdimo, da je vektor, izoliran iz kolonije B, pravilno sestavljen vektor pLVX-MCS.



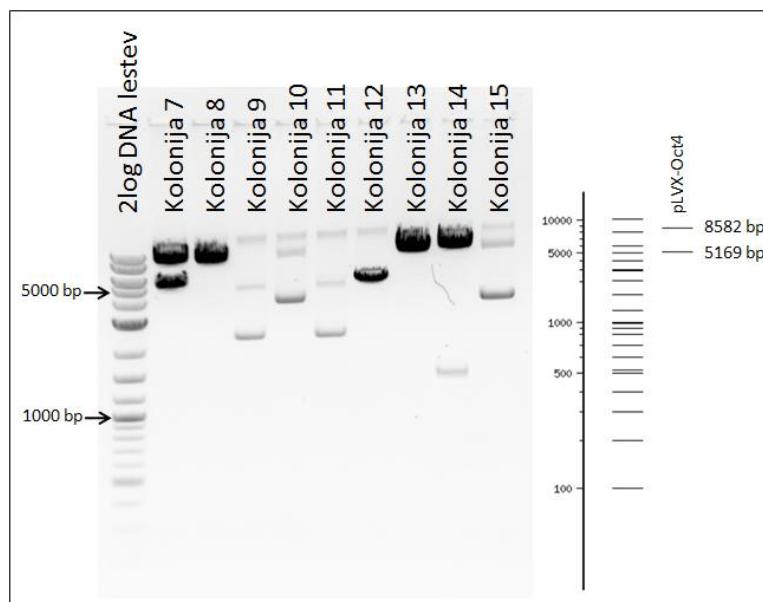
Slika 27: Restriktivna analiza - iskanje vektorja pLVX-Cripto

Iskali smo vektor pLVX-Puro z uspešno integriranim promotorjem *CRIPTO-1*. Restriktivacija je bila opravljena z *MfeI*. Uspešno integracijo promotorja *CRIPTO-1* kažeta plazmida iz kolonij 1 in 5.



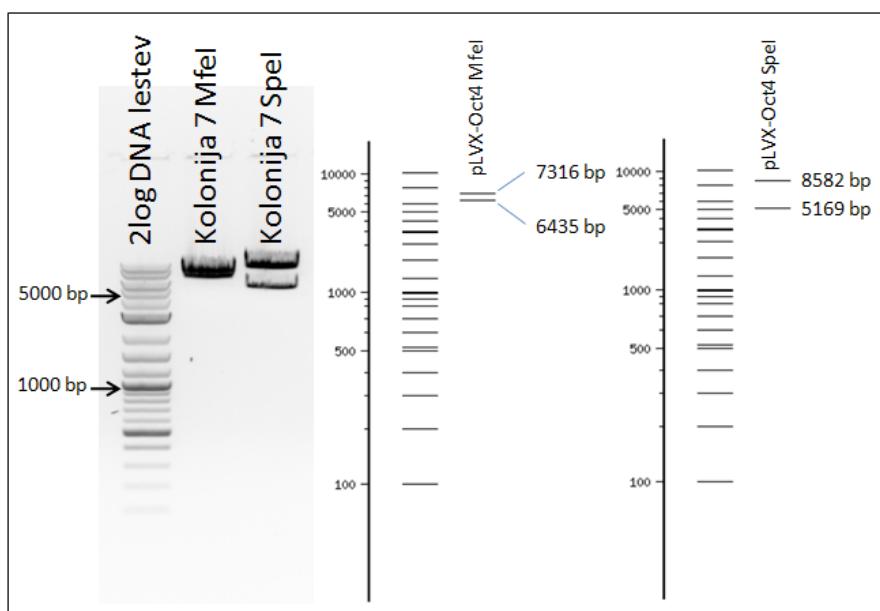
Slika 28: Dodatna restriktivna analiza plazmidov, izoliranih iz kolonij 1 in 5 (s Slike 27)

Iskali smo pravilno sestavljen vektor pLVX-Cripto. Restriktivacija je bila opravljena ločeno z encimoma *MfeI* in *SphI*. Pravilno sestavo kaže samo plazmid, izoliran iz kolonije 1, pri katerem velikosti pasov ustrezajo velikostim pasov predvidene digitalne restriktivne plazmida pLVX-Cripto.



Slika 29: Restriktionska analiza – iskanje vektorja pLVX-Oct4

Iskali smo vektor pLVX-Puro z uspešno integriranim promotorjem *OCT4*. Restrikcija je bila opravljena s *SpeI*. Pravilno sestavo kaže samo plazmid, izoliran iz kolonije 7.

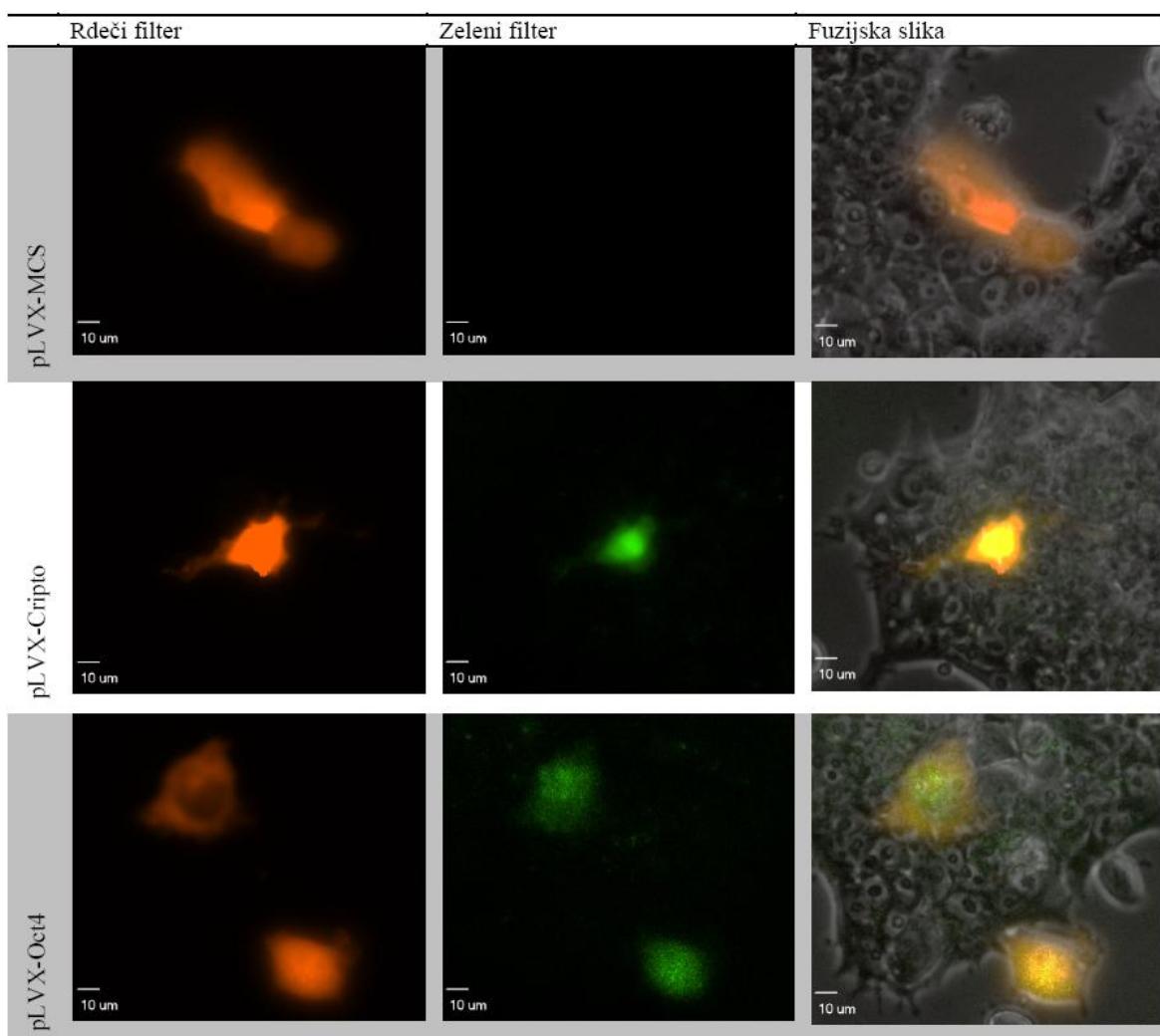


Slika 30: Dodatna restriktionska analiza plazmida, izoliranega iz kolonije 7 (s Slike 29)

Restrikcija je bila opravljena ločeno z encimoma *MfeI* in *SpeI*. Velikosti pasov eksperimentalne restrikcije ustrezajo velikostim pasov predvidene digitalne restrikcije plazmida, zato lahko potrdimo, da je plazmid, izoliran iz kolonije 7, vektor pLVX-Oct4.

4.5 FUNKCIONALNI PREIZKUS VEKTORJEV pLVX-MCS, pLVX-Cripto IN pLVX-Oct4

Ohranitev sposobnosti poročanja o izražanju opazovanih genov po prenosu konstrukta v novo ogrodje smo preverili v teratokarcinomskih celicah. **Slika 31** prikazuje primerjavo delovanja vektorjev pLVX-MCS, pLVX-Cripto in pLVX-Oct4 v teratokarcinomskih celicah CRL 2073, ki izražajo gena *CRIPTO-1* in *OCT4*. Rdeča fluorescencija označuje uspešno transficirane celice s posameznim vektorjem. Zelena fluorescencija pa pomeni, da je transficirani vektor sposoben poročati izražanje izbranega gena.

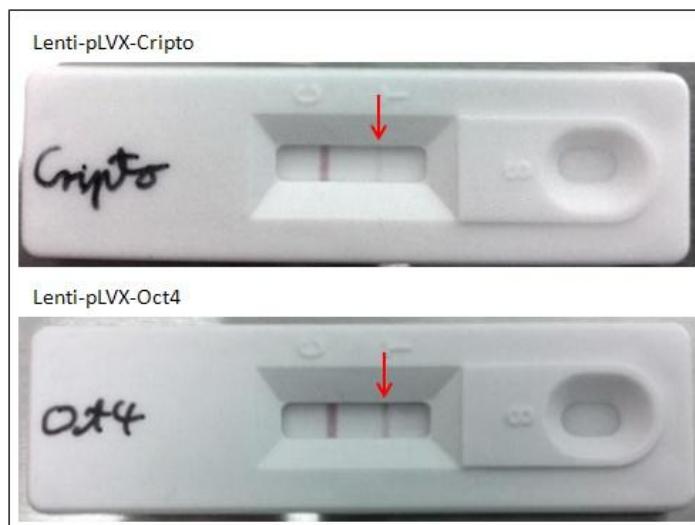


Slika 31: Funkcionalni preizkus vektorjev pLVX-MCS, pLVX-Cripto in pLVX-Oct4 v teratokarcinomskih celicah CRL2073

Transfekcija vektorjev v celice je bila opravljena s HilyMax reagentom. Slike so bile zajete s fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom Olympus IX81.

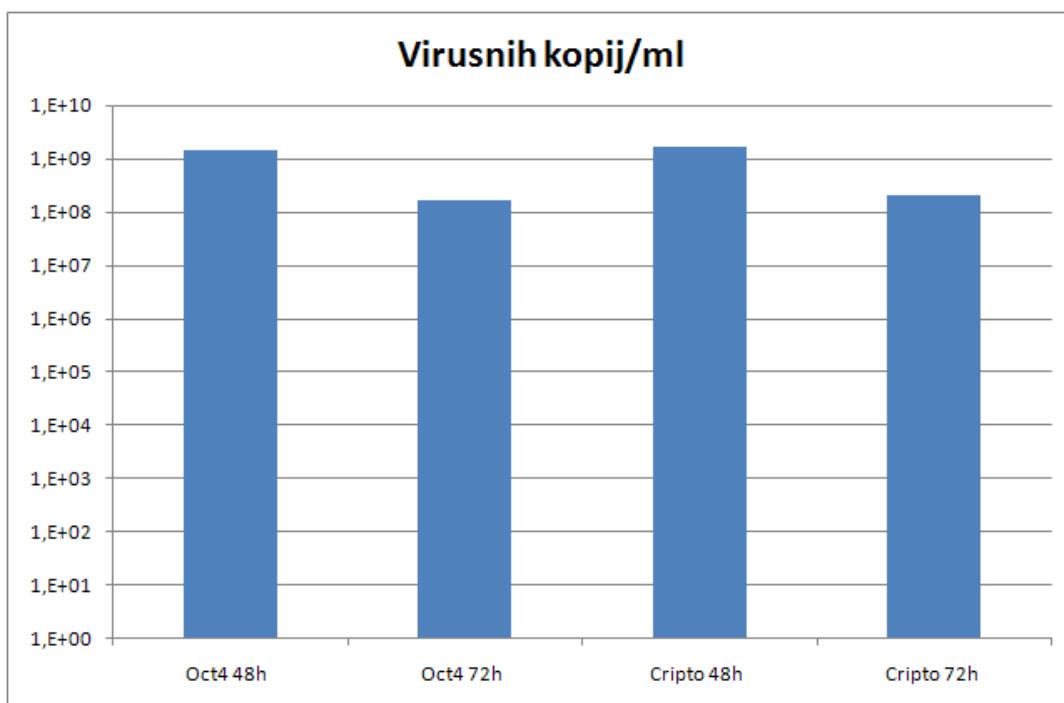
4.6 PRODUKCIJA LENTIVIRUSNIH VEKTORJEV LENTI-PLVX-CRIPTO IN LENTI-PLVX-OCT4

Najprej smo uspešnost produkcije lentivirusnih vektorjev Lenti-pLVX-Cripto in Lenti-pLVX-Oct4 preverili s testoma Lenti-X™ GoStix™ (**Slika 32**) in qRT-PCR (**Slika 33**).



Slika 32: Test Lenti-X™ GoStix™ (Clontech)

Črtica na levi predstavlja pozitivno kontrolo. Rdeči puščici označuje mesto, na katerem se pojavi črtica, ki označuje prisotnost virusa.



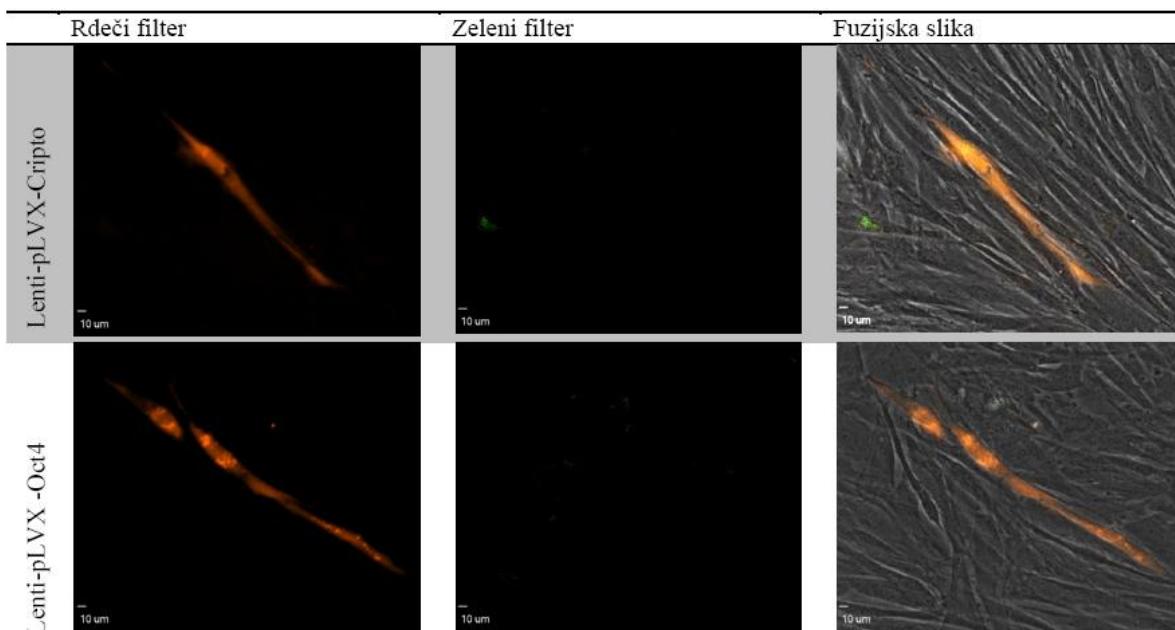
Slika 33: qRT-PCR, število izmerjenih lentivirusnih kopij

Na osi x Oct4/Cripto označuje Lenti-pLVX-Cripto/Lenti-pLVX-Oct4, 48 h in 72 h pa čas žetve suspenzije virusov po transfekciji.

4.7 FUNKCIONALNI PREIZKUS LENTIVIRUSNIH VEKTORJEV

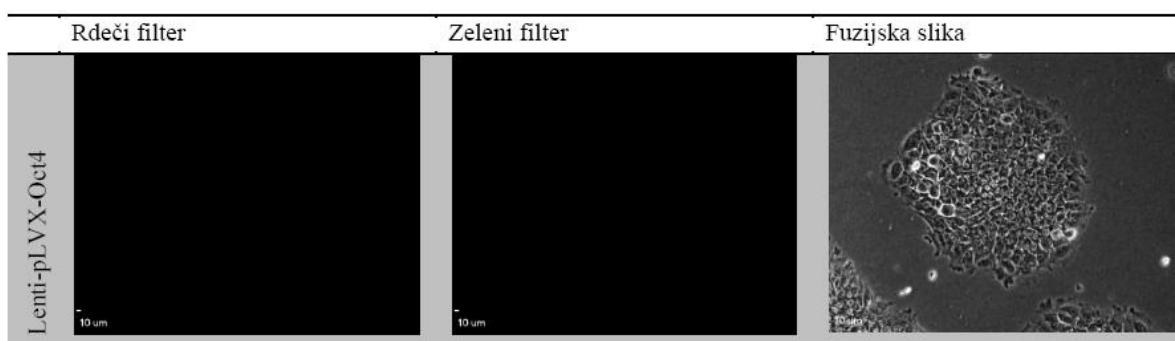
Na **Sliki 34** je prikazan rezultat transdukcije fibroblastov CRL2352 z vektorjem Lenti-pLVX-Cripto in Lenti-pLVX-Oct4. Rdeča fluorescencija označuje uspešno transficirane celice s posameznim vektorjem.

Predstavljeni so tudi neuspešni rezultati transdukcije humanih embrionalnih matičnih celic z vektorjem Lenti-pLVX-Oct4 (**Slika 35**).



Slika 34: Funkcionalni preizkus vektorjev Lenti-pLVX-Cripto in Lenti-pLVX-Oct4 v fibroblastih CRL 2352

Vektorja sta bila v celice vnesena z lentivirusno transdukcijo po koncentraciji suspenzije virusov. Slike so bile zajete s fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom Olympus IX81.

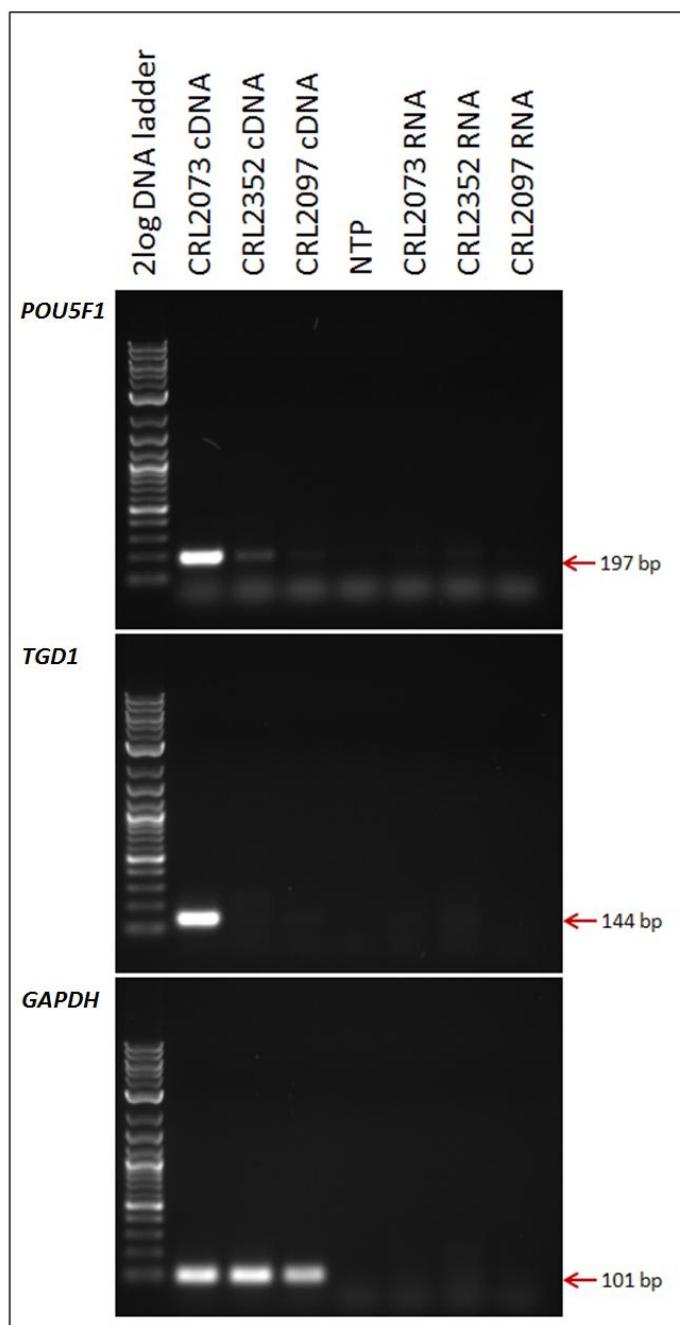


Slika 35: Neuspešna transdukcija hEMC z vektorjem Lenti-pLVX-Oct4

Uporabljena je bila koncentrirana suspenzija virusov. Slike so bile zajete s fazno kontrastnim fluorescentnim mikroskopom Olympus IX81.

4.8 PREVERJANJE IZRAŽANJA GENOV Z RT-PCR

Izražanje genov *OCT4*, *CRIPTO-1* in *GAPDH* v celicah, ki smo jih uporabljali za transfekcijo s poročevalnimi vektorji, smo preverili z reakcijo RT-PCR (**Slika 36**).



Slika 36: RT-PCR, preverjanje izražanja genov *CRIPTO-1*, *OCT4* in *GAPDH*

Izražanje genov *CRIPTO-1*, *OCT4* in *GAPDH* smo preverili v teratokarcinomskeh celicah (CRL2073), odraslih humanih fibroblastih (CRL2352) in neonatalnih humanih fibroblastih (CRL2097). *GAPDH* predstavlja pozitivno kontrolo reakcije RT-PCR. Vsi trije tipi celic so bili pred izolacijo RNA gojeni pri 37 °C, 95 % vlažnosti zraka, 19 % O₂ in 5 % CO₂. NTP predstavlja slepo kontrolo. CRL2073 RNA, CRL2352 RNA in CRL2097 RNA predstavljajo kontrole za kontaminacijo izolirane RNA z genomsko DNA.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Poročevalni vektorji so relativno učinkovit način za spremljanje aktivacije promotorja; s tem omogočajo spremljanje izražanja izbranega gena v realnem času v živih celicah. Čeprav so bili že objavljeni primeri uporabe poročevalnih vektorjev za spremljanje izražanja ključnih genov v nekaterih procesih epigenetskega reprogramiranja (Kirchhof in sod., 2000; Munsie in sod., 2002; Kim in sod., 2008; Ieda in sod., 2010), pa po našem mnenju na tem področju manjka univerzalen vektor, prilagojen za spremljanje izražanja izbranega gena, še posebej v celicah, ki jih želimo reprogramirati.

V procesu epigenetskega reprogramiranja začetni celični tip ne izraža ključnih genov končnega celičnega tipa. Celic začetnega celičnega tipa, ki so transficirane s poročevalnim vektorjem za spremljanje enega izmed genov, izraženega v končnem celičnem tipu, vizualno ni mogoče ločiti od netransficiranih celic, saj poročevalec ni aktiviran. Če na primer opazujemo izražanje gena *OCT4* pri indukciji IPMC, so začetni tip celic fibroblasti, ki ne izražajo gena *OCT4*, zato celice, transficirane s poročevalnim vektorjem *OCT4*, ne izgledajo nič drugače od neuspešno transficiranih fibroblastov, saj poročevalec zaradi neizražanja *OCT4* ni aktiviran. Vektor je bilo treba zato zasnovati z dvema poročevalcema, tako da je prvi poročevalec (DsRed-Express) pod nadzorom konstitutivnega promotorja CMV vedno aktiviran in je indikator uspešnosti transfekcije z vektorjem. Rezultat uspešnosti transfekcije je bil viden že po 24 urah (rezultat ni prikazan). Drugi poročevalec, AcGFP, pa je nameščen za mestom MCS, v katerega lahko vstavimo poljuben promotor in tako prilagodimo poročevalni vektor za opazovanje izražanja poljubnega gena. Ta poročevalec se vključi takrat, ko se začne izražati tarčni gen.

Med sestavo poročevalnega vektorja smo pravilnost sestave preverjali in potrjevali z restrikcijsko analizo (**Slike 10, 11, 13–19, 22–30**). Prav tako smo z restrikcijo uspešno potrdili pristnost vektorjev, ki smo jih kupili ali dobili iz drugih laboratorijskih vektorjev: vektorja pAcGFP1-N1 in pDsRed-Express1 (**Slika 10**), vektor pGL3-CR1-promoter (**Slika 16**), vektor human Oct4-GFP (**Slika 17**) in vektor pLVX-Puro (**Slika 24**).

Pri potrjevanju vektorjev pGL3-CR1-promoter (**Slika 16**) in pLVX-Puro (**Slika 24**) na eksperimentalni restrikcijski sliki ni vidnega pasu najmanjšega DNA fragmenta. Kljub temu lahko na podlagi primerjave eksperimentalne in digitalne restrikcijske slike potrdimo, da sta bila analizirana vektorja res vektorja pGL3-CR1-promoter in pLVX-Puro, saj velikosti vidnih pasov ustrezajo predvideni velikosti pasov na digitalni restrikcijski sliki. Razlog za to, da najmanjši pas ni viden, je v tem, da krajsi DNA fragmenti vežejo manj EtBr, kar posledično pomeni šibkejši signal. Razpon jakosti signala med najmanjšim in največjim fragmentom je bil prevelik, da bi ga naprava KODAK image station 4000 lahko zajela, zato je šibkejši pas izpadel.

Pri restrikcijski analizi, s pomočjo katere smo iskali uspešno sestavljen plazmid pCMV-DsRed – MCS (**Slika 13**), je prišlo do nepopolne restrikcije z encimom *BamHI*, zato smo namesto dveh predvidenih pasov dobili tri. Prvi zgornji pas predstavlja linearen pCMV-DsRed, razgrajen samo z *AfII*. Spodnja dva pasova predstavljata delež plazmida, ki je bil razgrajen z obema encimoma, saj velikosti pasov ustrezajo predvidenim velikostim na digitalni restrikcijski sliki. Da je za nepopolno restrikcijo odgovoren encim *BamHI*, lahko trdimo zato, ker je bila restrikcijska razgradnja plazmidov z uspešno eliminiranim MCS mestom popolna, saj so bili vsi plazmidi linearni. Mesto MCS vsebuje prepoznavno mesto za encim *BamHI*, zato vemo, da je plazmide z uspešno eliminiranim mestom MCS zagotovo rezal samo *AfII*. V primeru, da bi bil za nepopolno restrikcijo odgovoren *AfII*, bi se pri plazmidih z uspešno eliminiranim MCS mestom pojavila vsaj dva pasova. Eden bi predstavljal linearen plazmid, drugi pa dodatno zavit plazmid (angl. *supercoiled plasmid*) (Austgen in sod., 2000).

Med sestavljanjem poročevalnega vektorja FV-MCS smo po potrditvi pravilne sestave plazmida pCMV-DsRed-Express z restrikcijo opravili še funkcionalni test. Uspešno zamenjavo AcGFP z DsRed-Express v plazmidu pAcGFP1-N1 (plazmid pCMV-DsRed-Express) smo potrdili s transfekcijo celic CHO K1 z omenjenim plazmidom (**Slika 12**). Transficiранe celice so fluorescirale rdeče in s tem dokazale ne samo uspešno strukturno sestavljen, temveč tudi funkcionalen plazmid.

Transfekcija teratokarcinomskeh celic (CRL2073) z vektorji FV-MCS, FV-Cripto in FV-Oct4 je potrdila uspešno poročanje vseh treh vektorjev (**Slika 20**). Rdeča fluorescencija celic transficiranih z FV-MCS, FV-Cripto ali FV-Oct4 dokazuje uspešno delovanje prvega poročevalca, indikatorja uspešne transfekcije. Vidimo lahko, da celice, transficiowane z vektorjem FV-MCS, fluorescirajo samo rdeče, ne pa tudi zeleno, saj vektor nima vgrajenega promotorja, ki bi aktiviral izražanje AcGFP. To je dokaz, da je za izražanje poročevalca AcGFP nujna vgradnja promotorja v mesto MCS in delovanje stop kodona za DsRedExpress. Teratokarcinomske celice izražajo tako *CRIPTO-1* kot tudi *OCT4* (**Slika 36**), zato zelena fluorescencija celic, transficiranih z vektorjem FV-Cripto ali FV-Oct4, dokazuje uspešno poročanje obeh vektorjev glede izražanja gena *CRIPTO-1* ozziroma gena *OCT4*.

Z vektorjem FV-Cripto in FV-Oct4 smo transficirali tudi neonatalne humane fibroblaste – CRL2097 (**Slika 21**). Rdeča fluorescencija transficiranih celic CRL2097 potrjuje uspešno transfekcijo. Odsotnost zelene fluorescence pa potrjuje, da vektorja poročata pravilno, saj primarni humani fibroblasti ne izražajo niti gena *CRIPTO-1* niti gena *OCT4* (**Slika 36**).

Na podlagi **Slik 20** in **21** lahko trdimo, da je vektor FV-Cripto sposoben poročati razliko med celicami, ki izražajo gen *CRIPTO-1*, in celicami, ki tega gena ne izražajo. Enako velja za vektor FV-Oct4, le da je ta sposoben poročati glede izražanja *OCT4*.

Elektroporacija se je pri uporabljenih pogojih izkazala za uničujočo in slabo učinkovito metodo vnosa vektorjev FV-Cripto in FV-Oct4 v neonatalne humane fibroblaste; po selekciji z G418 je preživelilo le nekaj deset celic (rezultati niso prikazani). Preživele celice so bile sicer uspešno transfisirane z enim od vektorjev FV-Cripto ali FV-Oct4 (**Slika 21**), vendar je bilo njihovo stanje preslabo, število pa premajhno za poskuse epigenetskega reprogramiranja. Neonatalni humani fibroblasti (CRL2097) so primarna celična linija, ki ima omejeno število celičnih delitev (CRL-2097, 2011). Nekaj deset celic v višjih pasažah zato ni možno namnožiti do večjega števila, potrebnega za nadaljnji eksperiment.

Zaradi nizke učinkovitosti elektroporacijske metode transfekcije s FV-Cripto in FV-Oct4 smo se odločili poročevalni konstrukt prenesti v novo ogrodje, ki omogoča uporabo lentivirusnih vektorjev. Ti so znani po zelo visoki učinkovitosti vnosa (transdukcije) v širok spekter celičnih tipov (Pauwels in sod., 2009).

Pred prenosom poročevalnega konstrukta v novo ogrodje smo morali odstraniti poliadenilacijski mesti na koncu protein kodirajočih sekvenc za DsRedExpress in AcGFP, saj motijo v kasnejšem procesu pakiranja virusno-vektorske RNA v virusno ovojnicu (PT5135-1..., 2010). **Slika 22** prikazuje potrditev eliminacije poliadenilacijskega mesta za DsRedExpress kodirajočo sekvenco. Odstranitev poliadenilacijskega mesta za AcGFP kodirajočo sekvenco je bila opravljena z izrezom samega konstrukta iz vektorja (podatki niso prikazani).

Poročevalnemu konstraktu smo odstranili tudi CMV promotor (**Slika 23**), saj ga je novo ogrodje vektorja pLVX-Puro že vsebovalo.

Potrditev uspešnega prenosa poročevalnega konstrukta lahko vidimo na **Sliki 25** in **Sliki 26**, kjer plazmid, izoliran iz kolonije B, predstavlja pravilno sestavljen vektor pLVX-MCS.

Po potrditvi pravilne sestave vektorjev pLVX-Cripto (**Sliki 27** in **28**) in pLVX-Oct4 (**Sliki 29** in **30**) smo s transfekcijo teratokarcinomskih celic CRL2073 z vektorji pLVX-MCS, pLVX-Cripto in pLVX-Oct4 (**Slika 31**) preverili, ali so se sposobnosti poročanja konstrukta po odstranitvi poliadenilacijskih mest in prenosa v novo ogrodje spremenile. Primerjava **Slik 20** in **31** potrjuje, da spremembe niso vplivale na sposobnost poročanja, saj vektorji v pLVX ogrodju ohranjajo funkcionalnost svojih predhodnikov v ogrodju vektorja pAcGFP1-N1 (»FV-...« vektorji).

Namen zamenjave ogrodja, v katerem se nahaja poročevalni konstrukt, je bil razširiti uporabo na lentivirusni sistem. Prvi test uspešnosti proizvodnje virusov je predstavljal Lenti-X™ GoStix™ test (**Slika 32**). Signal prisotnosti virusa je pri vektorju lenti-pLVX-CRIPTO-1 opazno šibkejši kot pri vektorju lenti-pLVX-Oct4. Povsem drugačen rezultat je pokazala analiza s qRT-PCR, kjer ni bilo vidnih razlik med številom

proizvedenih virusnih kopij med vektorjem (**Slika 33**), nasprotno, število virusnih kopij na ml je bilo zelo visoko. Funkcionalni test transdukcije je pokazal, da so bili rezultati qRT-PCR lažno visoki, lažno pozitivni so bili tudi Lenti-X™ GoStix™ testi. Transdukcija odraslih humanih fibroblastov (CRL2352) je bila uspešna šele po transdukciji s koncentrirano suspenzijo virusov. Učinkovitost transdukcije je bila tako nizka, da je bilo v eni vdolbini plošče s šestimi vdolbinami komaj nekaj uspešno transduciranih celic (**Slika 34**). Trandukcija hEMC pa je bila neuspešna tudi s koncentrirano suspenzijo virusov (**Slika 35**).

Razlog visokih pozitivnih rezultatov qRT-PCR testov je najverjetneje neučinkovit korak razgradnje DNA pri izolaciji virusne RNA, saj suspenzija virusov vsebuje relativno visoko koncentracijo plazmidov, s katerimi smo transformirali produkcijsko linijo Lenti-X™ 293T celic. Ker je vektorsko zaporedje, ki ga želimo zapakirati v virus, vsebovano na vektorskem plazmidu, ga – če je razgradnja DNA neuspešna – začetni oligonukleotidi v reakciji PCR ne razlikujejo od cDNA, pridobljene z obratnim prepisom virusne RNA. Tako pride do pomnoževanja obeh predlog in, ker je število plazmidov visoko, do lažnih visokih pozitivnih rezultatov.

Razlog lažnih pozitivnih Lenti-X™ GoStix™ testov pa je najverjetneje neučinkovito pakiranje vektorske RNA v virusne ovojnice, zato so celice producirale prazne ovojnice. Lenti-X™ GoStix™ test temelji na zaznavi proteinov virusnih ovojnici (PT5123-2..., 2011), zato smo dobili lažno pozitiven rezultat. Brez vektorske RNA v virusni ovojnici transdukcija z vektorjem ne more biti uspešna. Razloga za neučinkovito pakiranje vektorske RNA v virusne ovojnike nismo uspeli odkriti.

Kljub zelo nizki učinkovitosti transdukcije odraslih humanih fibroblastov nam nekaj uspešno transduciranih celic s rdečo fluorescenco in brez zelene (**Slika 34**) sporoča, da razlog neuspešne transdukcije ni nefunkcionalnost poročevalnih vektorjev lenti-pLVX-Cripto ali lenti-pLVX-Oct4. Odrasli humani fibroblasti ne izražajo *CRIPTO-1* gena (**Slika 36**). Omenjeni fibroblasti glede na RT-PCR, prikazan na **Sliki 36**, izražajo *OCT4*, vendar je pas zelo šibak. Zato lahko sklepamo, da je izražanje Oct4 tako šibko, da je pod mejo detekcije s poročevalnim vektorjem lenti-pLVX-Oct4. Možno je tudi, da je šibko pozitiven RT-PCR posledica izražanja katerega izmed psevdo genov *OCT4*. Ker je zaporedje mRNA psevdogenov zelo podobno mRNA sekvenci pravega gena, začetni oligonukleotidi med njima ne razlikujejo, zato lahko pride do lažnih pozitivnih rezultatov. Ker pa so psevdogeni *OCT4* pod nadzorom drugih endogenih promotorjev, kot je gen *OCT4* (Redshaw in Strain, 2010), poročevalni vektor pravilno ne pokaže pozitivnega rezultata.

Dokazali smo, da je z vektorjem z dvema poročevalcema možno enostavno ločiti uspešno transformirane celice od netransformiranih celic, saj prve fluorescirajo rdeče, tudi če transformirane celice še ne izražajo opazovanega gena. Ta zadnja ugotovitev je uporabna

pri epigenetskem reprogramiraju. Naredili smo dva univerzalna poročevalna vektorja, FV-MCS in pLVX-MCS, za katera smo dokazali, da ju je možno z vgradnjo dveh različnih promotorjev (promotorja humanega *CRIPTO-1* in humanega *OCT4*) enostavno prilagoditi za opazovanje izražanja opazovanega gena v živih celicah. Dokazali smo tudi, da je mogoče vektorje z ogrodjem pLVX, ki vsebujejo poročevalni konstrukt z dvema poročevalcema, uporabiti v lentivirusnem vektorskem sistemu, vendar zaradi težav s pakiranjem vektorske RNA v virusne ovojnice nismo mogli učinkovito transducirati celic.

5.2 SKLEPI

- Potrdili smo, da je v poročevalni vektor z dvema poročevalcema možno uspešno vgraditi katerikoli promotor in da tako spremenjen vektor uspešno poroča o izražanju izbranega gena (drugi poročevalec) ter da je s poročevalnim vektorjem možno enostavno in hitro ločiti med uspešno transficiranimi in netransficiranimi celicami (prvi poročevalec).
- Delno smo potrdili, da je možno poročevalni konstrukt prenesti v vektor, ki praviloma omogoča učinkovitejšo in enostavnejšo transfekcijo, saj smo poročevalni konstrukt prenesli v novo ogrodje vektorja pLVX-Puro. Neuspešni smo bili pri produkciji virusnih vektorjev (omogoča jo pLVX-Puro ogrodje) in pri dokazovanju, da novi tip vektorja z vgrajenim našim konstruktom omogoča boljšo učinkovitost transfekcije.

5.3 PRIHODNJE DELO

Vektor z dvema poročevalcema deluje in je potencialno uporaben pri ocenjevanju protokolov za jedrno reprogramiranje, vendar je treba pred tem razrešiti problem pakiranja RNA v virusne vektorje in dokazati, da je vektor sposoben poročati izklop ali vklop izražanja opazovanega gena (dinamične spremembe izražanja celic). Preveriti bi bilo treba, kje je meja detekcije opazovanja s poročevalnim vektorjem, kako dobro korelirata ocena uspešnosti transfekcije s prvim poročevalcem (Dsred-Express) in uporaba selekcije na podlagi izbirnega označevalca. Odzivnost na dinamične spremembe izražanja bi lahko preverili z integracijo inducibilnega promotorja v mesto MCS, v celicah CHO K1, ki jih je relativno enostavno transficirati. Občutljivost detekcije s plazmidom bi lahko po potrebi povečali s svetlejšimi fluorescentnimi proteini, na primer z rumenim fluorescentnim proteinom venus (Shaner in sod., 2005).

6 POVZETEK

Celično reprogramiranje predstavlja kompleksen proces, pri katerem zaradi epigenetskih sprememb pride do spremembe celičnega tipa. Sprememba se najprej odrazi v spremenjenem profilu izraženih genov, zato je kljub kompleksnosti procesa epigenetskega celičnega reprogramiranja spremljanje njegove uspešnosti relativno enostavno. Kot prvi indikator uspešne spremembe izvornega tipa celic v novi želeni tip se opazuje aktivacija genov, specifičnih za novi celični tip. Metoda, ki bi za razliko od tradicionalnih metod (PCR, prenos western in imunocitokemija) omogočala opazovanje izražanja izbranih genov pri živih celicah v realnem času, bi močno skrajšala čas in obseg dela pri ocenjevanju protokola za celično reprogramiranje. Takšna metoda obstaja in vključuje uporabo poročevalnih vektorjev. Njihovo načrtovanje in izdelava je dolgotrajen proces, zato smo se odločili narediti univerzalen poročevalni vektor, ki ga bo mogoče hitro prilagoditi za opazovanje poljubnega gena in bo uporaben predvsem pri nadzoru celičnega reprogramiranja.

Z metodami molekulskega kloniranja smo funkcionalne elemente vektorjev pAcGFP1-N1 in pDsRed-Express1 preuredili in združili v vektor z dvema poročevalcema, plazmid FV-MCS. Prvi poročevalec, DsRedExpress, je pod nadzorom konstitutivnega CMV promotorja in je indikator uspešne transfekcije z vektorskim plazmidom. Omogoča hitro oceno uspešnosti tudi takrat, ko transficirani celični tip še ne izraža gena, katerega izražanje želimo opazovati, kar je značilno za začetni celični tip pri celičnem reprogramiranju. Pred drugi poročevalec, AcGFP, smo vstavili mesto MCS, ki omogoča enostavno vstavitev poljubnega promotorja. S tem lahko poročevalni vektor hitro prilagodimo za opazovanje izražanja poljubnega gena. DsRedExpress je tako nespecifični poročevalec, ki je aktiviran konstantno, AcGFP pa je specifični poročevalec, katerega aktivacija je odvisna od izražanja opazovanega gena.

Pravilno sestavo plazmidov med koraki izgradnje končnega poročevalnega vektorja smo sproti preverjali z restriktionsko analizo. Funkcionalnost končnih vektorjev smo dokazali s transfekcijo teratokarcinomskih celic (izražajo gena *CRIPTO-1* in *OCT4*) in primarnih fibroblastov (ne izražajo genov *CRIPTO-1* in *OCT4*). Kot dokaz, da je vektor FV-MCS možno prilagoditi opazovanju izbranega gena, smo v MCS mesto klonirali humani promotor *CRIPTO-1* – in dobili vektor FV-Cripto – ter humani promotor *OCT4* – in dobili vektor FV-Oct4. Aktivacija poročevalca DsRedExpress v obeh celičnih tipih in aktivacija AcGFP samo v teratokarcinomskih celicah, pri obeh vektorjih (FV-Cripto in FV-Oct4), je potrdila sposobnost vektorja za poročanje izražanja opazovanega gena.

Ker nismo bili zadovoljni z učinkovitostjo transfekcijskih metod, pri katerih v celice vnašamo vektor v plazmidni obliki, smo se odločili poročevalni konstrukt prenesti v vektor pLVX-Puro, ki omogoča uporabo lentivirusnega vektorskoga sistema. Iz poročevalnega konstrukta v plazmidu FV-MCS smo odstranili poliadenilacijska mesta in CMV promotor,

saj ga je vektor pLVX-Puro že vseboval. Dobili smo vektor pLVX-MCS, v katerega smo ponovno vgradili promotorja *OCT4* in *CRIPTO-1*. Transfekcija teratokarcinomskih celic z vsemi tremi vektorji (pLVX-MCS/Cripto/Oct4) je dokazala, da prenos poročevalnega konstrukta ni vplival na funkcionalnost poročanja.

Rezultati testov, s katerimi smo merili število proizvedenih virusnih ovojnici in qRT-PCR, so kazali na uspešno produkcijo lentivirusnih vektorjev. Vendar je zelo nizka uspešnost transdukcije odraslih humanih fibroblastov in neuspešna transdukcija hEMC pokazala lažnost začetnih pozitivnih testov. Menimo, da je prišlo do neučinkovitega pakiranja vektorske RNA v virusne ovojnice, zato smo dobili lentivirusne vektorje, nezmožne uspešne transdukcije. Zakaj je prišlo do tega, nismo uspeli ugotoviti. Kljub temu neuspehu je nekaj uspešno transduciranih odraslih humanih fibroblastov z lenti-pLVX-Cripto ali lenti-pLVX-Oct4 dokazalo, da je uspešna transdukcija poročevalnega vektorja z dvema poročevalcema funkcionalna.

V prihodnosti bi morali rešiti problem pakiranja vektorske RNA v virusne ovojnice. Oceniti bi morali občutljivost metode zaznavanja izražanja opazovanega gena s poročevalnim vektorjem, saj smo odkrili, da je reakcija RT-PCR občutljivejša metoda. Dokazali smo, da vektor z dvema poročevalcema deluje in bi lahko bil potencialno uporaben pri ocenjevanju protokolov za jedrno reprogramiranje, vendar je pred tem nujno najti ustrezne tehnološke rešitve.

7 VIRI

- Adamson E. D., Minchiotti G., Salomon D. S. 2002. Cripto: a tumor growth factor and more. *Journal of Cellular Physiology*, 190, 3: 267–278
- Alam J., Cook J. L. 1990. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Analytical Biochemistry*, 188, 2: 245–54
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. 1994. Molecular biology of the cell. Third edition. New York, Garland Publishing: 1294 str.
- Ambady S., Malcuit C., Kashpur O., Kole D., Holmes W. F., Hedblom E., Page R. L., Dominko T. 2010. Expression of NANOG and NANOGP8 in a variety of undifferentiated and differentiated human cells. *The International Journal of Developmental Biology*, 54, 11–12; 1743–1754
- Asen T., Raya A., Barrero M. J., Garreta E., Consiglio A., Gonzalez F., Vassena R., Bilić J., Pekarik V., Tiscornia G., Edel M., Boué S., Izpisúa Belmonte J. C. 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature Biotechnology*, 26, 11: 1276–1284
- Austgen L., Bowen R. A., Rouge M. 2000. Preparing and Running Standard Agarose DNA Gels. *Biotechnology and Genetic Engineering*. Colorado State University (15. jan. 2000) <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html> (3. jul. 2011)
- Baker M. 2010. iPS cells: potent stuff. *Nature Methods*, 7, 1: 17–19
- Belmonte J. C., Ellis J., Hochedlinger K., Yamanaka S. 2009. Induced pluripotent stem cells and reprogramming: seeing the science through the hype. *Nature Reviews. Genetics*, 10, 12: 878–883
- Berger J., Hauber J., Hauber R., Geiger R., Cullen B. R. 1988. Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene*, 66, 1: 1–10
- Bianco C., Rangel M. C., Castro N. P., Nagaoka T., Rollman K., Gonzales M., Salomon D. S. 2010. Role of Cripto-1 in stem cell maintenance and malignant progression. *The American Journal of Pathology*, 177, 2: 532–540
- Briggs R., King T. J. 1952. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 38, 5: 455–63

- Bronstein I., Fortin J., Stanley P. E., Stewart G. S., Kricka L. J. 1994. Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Analytical Biochemistry*, 219, 2: 169–181
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., William W. W., Prasher D. C. 1994. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*, 263, 5148: 802–805
- Chambers I., Smith A. 2004. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*, 23, 43: 7150–7160
- Ciccodicola A., Dono R., Obici S., Simeone A., Zollo M., Persico M. G. 1989. Molecular characterization of a gene of the 'EGF family' expressed in undifferentiated human NTERA2 teratocarcinoma cells. *The EMBO Journal*, 8, 7: 1987–1991
- Clontech home page. 2011. Clontech Laboratories, Inc.
<http://www.clontech.com/SI/Home?sitex=10023:22372:US> (1. jun. 2011)
- CRL-2073. 2011. LGC/ATCC.
<http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2073&Template=cellBiology> (29. jul. 2011)
- CRL-2097. 2011. LGC/ATCC.
<http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2097&Template=cellBiology> (29. jul. 2011)
- CRL-2352. 2011. LGC/ATCC.
<http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2352&Template=cellBiology> (29. jul. 2011)
- Cronin J., Zhang X. Y., Reiser J. 2005. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Current Gene Therapy*, 5, 4: 387–398
- Cruz P. E., Rodrigues T., Carmo M., Wirth D., Amaral A. I., Alves P. M., Coroadinha A. S. 2011. Manufacturing of Retroviruses. *Methods in Molecular Biology*, 737: 157–182
- Davis R. L., Weintraub H., Lassar A. B. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 51, 6: 987–1000
- de Wet J. R., Wood K. V., DeLuca M., Helinski D. R., Subramani S. 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 7, 2: 725–737

- Deng W. 2010. Induced pluripotent stem cells: paths to new medicines. A catalyst for disease modelling, drug discovery and regenerative therapy. *EMBO Reports*, 11, 3: 161–165
- Ding J., Yang L., Yan Y. T., Chen A., Desai N., Wynshaw - Boris A., Shen M. M. 1998. Cripto is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo. *Nature*, 395, 6703: 702–707
- Do J. T., Schöler H. R. 2010. Cell fusion-induced reprogramming. *Methods in Molecular Biology*, 636: 179–190
- Dono R., Scalera L., Pacifico F., Acampora D., Persico M. G., Simeone A. 1993. The murine cripto gene: expression during mesoderm induction and early heart morphogenesis. *Development*, 118, 4: 1157–1168
- Epstein A. L. 2009. HSV-1-derived amplicon vectors: recent technological improvements and remaining difficulties – a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 3: 399–410
- Evans M. J., Kaufman M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 5819: 154–156
- Felgner P. L., Tsai Y. J., Sukhu L., Wheeler C. J., Manthorpe M., Marshall J., Cheng S. H. 1995. Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 772: 126–139
- Giry - Laterrière M., Verhoeven E., Salmon P. 2011. Lentiviral vectors. *Methods in Molecular Biology*, 737: 183–209
- Goff S. P., Berg P. 1976. Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell*, 9, 4: 695–705
- Gorman C. M., Moffat L. F., Howard B. H. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 2, 9: 1044–1051
- Green J. J., Zhou B. Y., Mitalipova M. M., Beard C., Langer R., Jaenisch R., Anderson D. G. 2008. Nanoparticles for gene transfer to human embryonic stem cell colonies. *Nano Letters*, 8, 10: 3126–3130

- Haase A., Olmer R., Schwanke K., Wunderlich S., Merkert S., Hess C., Zweigerdt R., Gruh I., Meyer J., Wagner S., Maier L. S., Han D. W., Glage S., Miller K., Fischer P., Schöler H. R., Martin U. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell*, 5, 4: 434–441
- Hankowski K. E., Hamazaki T., Umezawa A., Terada N. 2011. Induced pluripotent stem cells as a next-generation biomedical interface. *Laboratory Investigation*. <http://www.nature.com/labinvest/journal/vaop/ncurrent/pdf/labinvest201185a.pdf> (9. maj 2011)
- Hanna J. H., Saha K., Jaenisch R. 2010. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*, 143, 4: 508–525
- Hartl D. L., Jones E. W. 1998. GENETICS. Principles and Analysis. Fourth edition. Boston, Toronto, London, Singapur, Jones and Bartlett Publishers: 840 str.
- Hochedlinger K., Jaenisch R. 2002. Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice. *Current Opinion in Cell Biology*, 14, 6: 741–748
- Hochedlinger K., Plath K. 2009. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*, 136, 4: 509–523
- Huang G. T. J. 2010. Induced Pluripotent Stem Cells—A New Foundation in Medicine. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*, 2, 5: 202–217
- Ieda M., Fu J. D., Delgado - Olguin P., Vedantham V., Hayashi Y., Bruneau B. G., Srivastava D. 2010. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 142, 3: 375–386
- Inouye S., Tsuji F. I. 1994. Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters*, 21, 341: 277–280
- Isseva I., Cohen A. A., Eden E., Choen - Saidon C., Danon T., Choen L., Alon U. 2010. Generation of Double-Labeled Reporter Cell Lines for Studying Co-Dynamics of Endogenous Proteins in Individual Human Cells. *PLoS One*, 5, 10: e13524
- Jeanisch R., Eggan K., Humpherys D., Rideout W., Hochedlinger K. 2002. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. *Cloning and Stem Cells*, 4, 4: 389–396
- Jopling C., Boue S., Izpisua Belmonte J. C. 2011. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12, 2: 79–89

- Kain S. R., Ganguly S. 2001. Current protocols in molecular biology, Chapter 9: Unit 9.6. Overview of genetic reporter systems. Wiley.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142727.mb0906s36/pdf> (1. jul. 2011)
- Karra D., Dahm R. 2010. Transfection techniques for neuronal cells. *The Journal of Neuroscience*, 30, 18: 6171–6177
- Kawai S, Nishizawa M. 1984. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Molecular and Cellular Biology*, 4, 6: 1172–1174
- Kim J. B., Greber B., Araúzo - Bravo M. J., Meyer J., Park K. I., Zaehres H., Schöler H. R. 2009. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature*, 461, 7264: 649–653
- Kim J. B., Zaehres H., Wu G., Gentile L., Ko K., Sebastian V., Araúzo - Bravo M. J., Ruau D., Han D. W., Zenke M., Schöler H. R. 2008. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 454, 7204: 646–650
- Kim T. K., Eberwine J. H. 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 8: 3173–3178
- Kirchhof N., Carnwath J. W., Lemme E., Anastassiadis K., Schöler H., Niemann H. 2000. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biology of Reproduction*, 63, 6: 1698–1705
- Kleinsmith L. J., Pierce G. B. 1964. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Research*, 24: 1544–1551
- Lako M., Armstrong L., Stojkovic M. 2010. Induced pluripotent stem cells: it looks simple but can look deceive? *Stem Cells*, 28, 5: 845–850
- Loyter A, Scangos G. A., Ruddell F. H. 1982. Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 2: 422–426
- Maherali N., Hochedlinger K. 2008. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 3, 6: 595–605
- Maherali N., Sridharan R., Xie W., Utikal J., Eminli S., Arnold K., Stadtfeld M., Yachechko R., Tchieu J., Jaenisch R., Plath K., Hochedlinger K. 2007. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 1, 1: 55–77

- Mancino M., Strizzi L., Wechselberger C., Watanabe K., Gonzales M., Hamada S., Normanno N., Salomon D. S., Bianco C. 2008. Regulation of human Cripto-1 gene expression by TGF-beta1 and BMP-4 in embryonal and colon cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 215, 1: 192–203
- Martin G. R. 1980. Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science*, 209, 4458: 768–776
- Martin G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 12: 7634–7638
- Masip M., Veiga A., Izpisúa Belmonte J. C., Simón C. 2010. Reprogramming with defined factors: from induced pluripotency to induced transdifferentiation. *Molecular Human Reproduction*, 16, 11: 856–868
- Miller R.A., Ruddle F.H. 1976. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell*, 9, 1: 45–55
- Minchietti G., Parisi S., Liguori G. L., D'Andrea D., Persico M. G. 2002. Role of the EGF-CFC gene cripto in cell differentiation and embryo development. *Gene*, 287, (1–20): 33–37
- Montserrat N., Garreta E., González F., Gutiérrez J., Eguizábal C., Ramos V., Borrós S., Izpisua Belmonte J. C. 2011. Simple generation of human induced pluripotent stem cells using poly-beta-amino esters as the non-viral gene delivery system. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 14: 12417–12428
- Munsie M., O'Brien C., Mountford P. 2002. Transgenic strategy for demonstrating nuclear reprogramming in the mouse. *Cloning and Stem Cells*, 4, 2: 121–130
- NEBcutter V2.0. 2011. New England Biolabs
<http://tools.neb.com/NEBcutter2/> (1. jun. 2011)
- Nicholas C. R., Kriegstein A. R. 2010. Regenerative medicine: Cell reprogramming gets direct. *Nature*, 463, 7284: 1031–1032
- Nordhoff V., Hübner K., Bauer A., Orlova I., Malapetsa A., Schöler H. R. 2001. Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mammalian Genome*, 12, 4: 309–317
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448, 7151: 313–317

- Ozawa A., Akasaka E., Watanabe S., Yoshida M., Miyoshi K., Sato M. 2010. Usefulness of a non-invasive reporter system for monitoring reprogramming state in pig cells: results of a cell fusion experiment. *The Journal of Reproduction and Development*, 56, 4: 363–369
- Page R. L., Ambady S., Holmes W. F., Vilner L., Kole D., Kashpur O., Huntress V., Vojtic I., Whitton H., Dominko T. 2009. Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes. *Cloning and Stem Cells*, 11, 3: 417–426
- Papp B., Plath K. 2011. Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Research*, 21, 3: 486–501
- Pauwels K., Gijsbers R., Toelen J., Schambach A., Willard - Gallo K., Verheust C., Debyser Z., Herman P. 2009. State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. *Current Gene Therapy*, 9, 6: 459–474
- Plasmid 21153: human oct4-GFP. 2011. Addgene.
<http://www.addgene.org/21153/> (1. jun. 2011)
- Pluta K., Kacprzak M. M. 2009. Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochimica Polonica*, 56, 4: 531–595
- Poescha E. M. 2011. The HIV-1 Life Cycle. Mayo Foundation for Medical Education and Research.
http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/poeschla/life_cycle.cfm (10. avg. 2011)
- Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G., Cormier M. J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111, 2: 229–233
- Prendergast F. G., Mann K. G. 1978. Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequoreaforskålea*. *Biochemistry*, 17, 17: 3448–3453
- PT3716-5. pAcGFP1-N1 Vector information. Version PR651709. 2006. Clontech Laboratories, Inc.
- PT4002-5. pLVX-Puro Vector Information. Version PR782350. 2007. Clontech Laboratories, Inc.
- PT5123-2. Lenti-X GoStix Protocol-at-a-glance. Version PR143853. 2011. Clontech Laboratories, Inc.

PT5135-1. Lenti-X Lentiviral Expression Systems User Manual. Version PR0Y3745.
2010. Clontech Laboratories, Inc.

Redshaw Z., Strain A. J. 2010. Human haematopoietic stem cells express Oct4 pseudogenes and lack the ability to initiate Oct4 promoter-driven gene expression. *Journal of Negative Results in Biomedicine*, 9, 1: 2

Rhodes T., Wargo H., Hu W. S. 2003. High rates of human immunodeficiency virus type 1 recombination: near-random segregation of markers one kilobase apart in one round of viral replication. *Journal of Virology*, 77, 20: 11193–11200

Rožman P., Jež M. 2011. Matične celice in napredno zdravljenje. Pojmovnik. Celje, Celjska Mohorjeva družba: 296 str.

Sambrook J., Russell D. W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Selden R. F., Howie K. B., Rowe M. E., Goodman H. M., Moore D. D. 1986. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 6, 9: 3173–3179

Sequence Manipulation Suite. 2011. (20. jul. 2011).
<http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html> (26. jul. 2011)

Shaner N. C., Steinbach P. A., Tsien R. Y. 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2, 12: 902–909

Shimomura O. 2005. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy*, 217, 1: 1–15

Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59: 223–39

Slack J. M. 2002. Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist. *Nature Reviews. Genetics*, 3, 11: 889–895

Sommer C. A., Mostoslavsky G. 2010. Experimental approaches for the generation of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 1, 3: 26

Szabo E., Rampalli S., Risueño R. M., Schnersh A., Mitchell R., Fiebig - Comyn A., Levadoux - Martin M., Bhatia M. 2010. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature*, 468, 7323: 521–526

Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 5: 861–872

Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 4: 663–676

Thompson J. F., Hayes L. S., Lloyd D. B. 1991. Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene*, 103, 2: 171–177

Thomson J. A., Itskovitz - Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 5391: 1145 –1147

Transfection. 2011. Promega.

<http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection/> (5. jul. 2011)

Tsai S. Y., Clavel C., Kim S., Ang Y. S., Grisanti L., Lee D. F., Kelley K., Rendl M. 2010. Oct4 and Klf4 reprogram dermal papilla cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 28, 2: 221–228

Tsien Y. R. 1998. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67: 509–544

Utikal J., Maherali N., Kulalert W., Hochedlinger K. 2009. Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *Journal of Cell Science*, 122, 19: 3502–3510

Vaheri A., Pagano J. S. 1965. Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology*, 27, 3: 434–436

Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z. P., Kokubu Y., Südhof T. C., Wernig M. 2010. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 463, 7284: 1035–1041

Virant - Klun I., Zech N., Rožman P., Vogler A., Cvjeticanin B., Klemenc P., Malicev E., Meden-Vrtovec H. 2008. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation*, 76, 8: 843–856

WA09 (H9). 2011. WiCell Research Institute.

http://www.wicell.org/index.php?option=com_content&task=view&id=147&Itemid=0 (1. jun. 2011)

- Walther W., Stein U. 2000. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs*, 60, 2: 249–271
- Warnock J. N., Daigre C., Al-Rubeai M. 2011. Introduction to viral vectors. *Methods in Molecular Biology*, 737: 1–25
- Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B. E., Jaenisch R. 2007. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 448, 7151: 318–324
- Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 6619: 810–813
- Wuensch A., Habermann F. A., Kurosaka S., Klose R., Zakhartchenko V., Reichenbach H. D., Sinowitz F., McLaughlin K. J., Wolf E. 2007. Quantitative monitoring of pluripotency gene activation after somatic cloning in cattle. *Biology of Reproduction*, 76, 6: 983–991
- Xu C., Liguori G., Adamson E. D., Persico M. G. 1998. Specific arrest of cardiogenesis in cultured embryonic stem cells lacking Cripto-1. *Developmental Biology*, 196, 2: 237–247
- Yamanaka S. 2009. Ekiden to iPS Cells. *Nature Methods*, 15, 10: 1145–1148
- Yang C. S., Li Z., Rana T. M. 2011. microRNAs modulate iPS cell generation. *RNA*, 17, 8: 1451–1460
- Yeh E., Gustafson K., Boulian G. L. 1995. Green Fluorescent Protein as a Vital Marker and Reporter of Gene Expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 15: 7036–7040
- Yu J., Vodyanik M. A., Smuga - Otto K., Antosiewicz - Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I. I., Thomson J. A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 5858: 1917–1920
- Zhou H., Ding S. 2010. Evolution of induced pluripotent stem cell technology. *Current Opinion in Hematology*, 17, 4: 276–280
- Zhou X., Carranco R., Vitha S., Hall T. C. 2005. The Dark Side of Green Fluorescent Protein. *The new Phytologist*, 168: 313–22

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju doc. dr. Miomiru Kneževiću, ki me je navdušil za področje regenerativne medicine in tkivnega inženirstva in mi s tem, ko me je predstavil prof. dr. Tanji Dominko, odprl vrata v ta svet.

S mentorju izr. prof. dr. Primožu Rožmanu se zahvaljujem za podporo, strokovne nasvete in natančen pregled naloge.

Posebna zahvala prof. dr. Tanji Dominko, da me je gostoljubno sprejela v svoj laboratorij, me podpirala, strokovno vodila in bila odlična mentorica.

Hvala celotni ekipi laboratorija prof. Dominko: Aleksandri R. Grella, Denisu Kole, Sakthikumarju Ambadyju, Olgi Kashpur, Sarah Runge, Lucy Vilner, Christopherju Malcuitu, Emmetu Hedblomu in Raymondu L. Pagu, da so neutrudno odgovarjali na moja številna vprašanja, mi pomagali in dajali koristne nasvete ter me sprejeli za svojega.

Hvala tudi recenzentki doc. dr. Tanji Kunej za strokovni pregled naloge.

Hvala Mojci Jež, za podporo in pomoč med časom mojega bivanja v ZDA. Hvala tudi za nasvete pri oblikovanju diplomske naloge.

Želji Cilenšek Bončina se zahvaljujem za hitro in natančno lektoriranje naloge.

Iskrena hvala vsem, ki ste me podpirali in kakorkoli drugače pripomogli pri nastanku tega dela.

Najlepša hvala tudi staršem, dedkoma in babicama za podporo pri uresničevanju mojih študijskih ambicij in želja. Iskrena hvala Maši, da mi je stala ob strani in z razumevanjem in ponosom sprejela mojo daljšo odsotnost.

Zahvaljujem se tudi Javnemu skladu Republike Slovenije za razvoj kadrov in štipendije za dodelitev štipendije in s tem finančno pomoč pri mojem obisku v tujini.

PRILOGE

Priloga A:

Nukleotidno zaporedje vektorja FV-MCS

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTCATAGCCCATATGGAGTTCCCGCTTACATAACTTACGGTAAA
TGGCCCGCCTGGCTGACGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTCCTTCCATAGTAACGCCAATAGG
GACTTCCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAG
TACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGACTTCTAC
TTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTATGCCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCG
GTTTGACTCACGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGAGTTGGCACCAAATCAACGGACTT
TCCAAAATGTCGAACAACCTCCCCATTGACGAAATGGCGTAGGCAGTGTACGGTGGAGGTCTATATAAGCAGAGC
TGGTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCACCGGTCGCCACCATGCCCTCCGAGGACGTACAGGAGTTCATGCGC
TTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCGTGAACGCCACGAGTCAGGGCGAGGGCGAGGGCCCTACGAGGGC
ACCCAGACGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTGCCTGGACATCCTGCCCCAGTTCCAGTAC
GGCTCCAAGGTGACGTGAAGCACCCGCCACATCCCCGACTACAAGAAGCTGCCCTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGAG
CGCGTATGAACTTCGAGGACGGCGGTGGTACCGTACCGACTCCTCCGCAGGACGGCTCCTCATCTACAAG
GTGAAGTTCATGGCGTGAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGAGAAGAAACTATGGCTGGAGGCCTCACCAGAG
CGCCTGTACCCCGCGACGGCGTGTGAAGGGCGAGATCCACAAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGT
GAGTTCAAGTCCATCTACATGGCCAAGAAGGCCGTGACGCTGCCGCTACTACTACGTGGACTCCAAGTGGACATCACC
TCCCACAAAGAGGACTACACCATCGTGGAGCAGTACAGCGCGCCAGGGCCGACCCACCTGTTCTGTAGCGGCCGGA
CTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTGTAGAGGTTTACTGCTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTG
AAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTAACTTGTATTGAGCTTATAATGGTACAAATAAGCAATAGCATCACA
AATTTCACAAATAAGCATTTTTCACTGCATTCTAGTTGTTGTTCAACTTGTATTGAGCTTATAATGGTACAAATAAGCAATAGCATCACA
ACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTCGAATTCTGCACTGAGCTACAGGCTACCGCAGGCGCCGGGATCCACCGGTATGGTAGCAAGG
GCGCGAGCTGTTACCGGCATCGTGCCTGATCGAGCTGAATGGCAGTGTGAATGGCACAAGTTCAGCGTGAAGCG
GCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCAACCGGAAGCTGCCGTGCCCTGGC
CCACCCCTGGTGAACCAACCTGAGCTACGGCGTGCAGTGCCTCTACGCTACCCGATCACATGAAGCAGCACGACTTCTCA
AGAGGCCATGCCCTGAGGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCTTCTCGAGGATGACGGCAACTACAAGTCGCGCGCCGAGG
TGAAGTTGAGGGCGATACCCCTGGTGAATCGCATCGAGCTGACCCGACCGATTCAAGGAGGATGGCACACATCCTGGCA
ATAAGATGGAGTACAACATCACAGGCCACAATGTGTACATCATGACCGACAAGGCAAGAATGGCATCAAGGTGAACCTCA
AGATCCGCCACAACATCGAGGATGGCAGCGTGCAGCTGCCGACCACTACCAGCAGAATAACCCCATCGCGATGCCCTG
TGCTGCTGCCGATAACCAACTACCTGTCCACCCAGAGGCCCTGTCCAAGGACCCAAACGAGAAGCGCATCACATGATCT
ACTTCGGCTCGTGAACGCCGCCATCACCCACGGCATGGATGAGCTGTACAAGTGAGCGGCCGACTCTAGATCATA
ATCAGCCATACCACATTGTAGAGGTTTACTGCTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATG
AATGCAATTGTTGTTAACTTGTATTGAGCTTATAATGGTACAAATAAGCAATAGCATCACAAATTCAACAAAT
AAAGCATTTTTCACTGCATTCTAGTTGTTGTTGCTAAACTCATCAATGTATCTTAAGGCGTAAATTGTAAGCGTAA
TATTGTTAAATTGCGTAAATTGTTAAATCAGCTCATTGTTAACCATAGGCCAAATCGGAAACATCCCTTA
TAAATCAAAGAAATAGCCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTC
CAACGTCAAAGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTGGGTC
GAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCGATTAGAGCTTGACGGGAAAGCGGCCGAAACGTGGC
GAGAAAGGAAGGGAAAGCAAGGAGCGGGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCCGTAAACCAC
ACCGCGCGCTTAATCGCCGCTACAGGGCGCTCAGGTGGCACTTTCGGGGAAATGTGCCGGAACCCATTGTT
ATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAA
GAGTCCTGAGGGCGAAAAGAACCGACTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCAGCAGGCGA
AGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCAGCAGGCGAAGTATGCAA
AGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGTCAGGCTCCGCCCTAATCCGCCCATCCGCCCTAATCCGCCAGTCCGCC
CATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTGTTTATTGAGCTGAGGCTTGTGAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGT
TAGTGGAGGCTTTGGAGGCCTAGGCTTGTGAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTGTGAGCTATTCCAGAAG
ACAAGATGGATTGACGCACTGGCTCCGGCCGTTGGTGGAGAGGCTATTGCGTATGACTGGCACAACAGACAATCGG
CTGCTCTGATGCCGCGTGTCCGGCTGTCAGCGCAGGGCGCCGTTCTGGTCAAGACCGACCTGCGTGGCT
GAATGAAGTCAAGACGAGGCAGCGCGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGCGTCCCTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGT
CACTGAAGCGGGAAAGGGACTGGCTGCTATTGGCGAAGTGCCTGGCAGGATCTCTGTCATCTCACCTGCTCTGCCGA
GAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATCGGGCGCTGCACTACGCTTGTGAGCTGGCAGGATCTGCTGAGCTTGTG
ACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTGGATGGAAGCGGTCTGGTCAAGGAGCTGGCAGGATCTGCTGAGCTTGTG
CGGCCAGCGAAGTGTGCGCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCGACGGCGAGGATCTGCTGAGCCATGGCGATGCC
CTTGCGAATATCATGGTGGAAAATGGCGCTTTCTGGATTGACTCGACTGTGGCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCA
GGACATAGCGTGGCTACCGTGTATTGCTGAAGAGCTGGCGGCCAATGGCGTACCGCTCGTGTGCTTACGGTAT

CGCCGCTCCGATTCGCAGCGCATGCCTTATGCCTTGTGACGAGTTCTTGAGCAGGGACTCTGGGTTCGAAATG
ACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCATCACGAGATTGATCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATC
GTTTCCGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTCGCCACCTAGGGGAGGCTA
ACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCCGCTATGACGGCAATAAAAGACAGAATAAACGCACGGTGT
GGTCGTTGTTCATAAACGCCGGGTCGGTCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCACCGAGACCCCATTGGGCCAA
TACGCCCGCTTCTCCTTCCCCACCCCCAACGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGCG
GCAGGCCCTGCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTAGATTGATTAAAACCTCATTTTAATTAAAAGGATCTAG
GTGAAGATCCTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGTGAGTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAA
AAGATCAAAGGATCTCTTGAGATCCTTTCTGCGCTAATCTGCTGCTGCAAACAAAAAACCCGCTACCAGCG
GTGGTTGTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACCAAATACT
GTCCTCTAGTGTAGCGTAGTTAGGCCACCACTCAAGAACTCTGTCAGCAGGCCACATACCTGCTCTGCTAATCCTG
TTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGATAAGGCCAG
CGGTGGCTGAACGGGGGTTCGTCACACAGCCCAGTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAACCTACAGCGT
GAGCTATGAGAAAGGCCACGCTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTGGAACAGGAGAG
CGCACGAGGGAGCTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTATAGTCTGTCGGGTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGA
TTTTGATGCTCGCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCCCTTTTACGGTTCTGGCTTTGC
TGGCCTTTGCTCACATGTTCTGCTTATCCCCGATTCTGTTGATAACCGTATTACCGCCATGCAT

Priloga B:

Nukleotidno zaporedje vektorja pLVX-MCS

TGGAAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAACAGATATCCTGATCTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATT
ACGAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAAGATATCCACTGACCTTGGATGGTGCATAAGCTAGTACCGAGTGAGCCAG
ATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTACCCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGA
GAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTGACAGCCGCTAGCATTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGA
ACTGCTGATATCGAGCTGCTACAAGGGACTTCCGTPGGGACTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGCGGACTGGGAGT
GGCAGGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTGCCTGTACTGGGTCTCTGGTAGACCAGATCTGAGCCTGG
GAGCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTAATAAAGCTTGCCTGAGTGCTCAAGTAGTGTGCCCCGT
CTGGTGTGACTCTGTTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTGTAGTCAGTGTGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCGAAACA
GGGACTTGAAGCGAAAGGGAAACCAAGAGGGCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCG
AGGGCGCGACTGGTAGTACGCCAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAGGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTA
TTAAGCGGGGAGAATTAGATCGCATGGGAAAAAAATCGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAAAATAAATTAAACATA
TAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTGCAAGTTAACCTGGCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGAGACAATAC
TGGGACAGCTACAACCATCCCTCAGACAGGATCAGAACAACTTAGATCATTATATAACAGTAGCAACCCCTTATGTG
TGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCG
CACAGCAAGCGGCCGCCGCTGATCTCAGACCTGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATA
TAAAGTAGTAAAATGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGAAAGAGAAGAGTGGTAGAGAGAGAAAAAGAGCAGT
GGGAATAGGAGCTTGTCTGGTTCTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGAGCGTCAATGACGCTGACGGTACA
GGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTCAGCAGCAGAACAACTTGTGAGGGCTATTGAGGCAGCACAGCATCTGTGCA
ACTCACAGTCTGGGCATCAAGCAGCTCCAGGAAGAACATCCTGGCTGAAAGATACTAAAGGATCAACAGCTCTGG
GATTGGGAGTCTGGGAAACTCATTGCAACCCTGCTGTCCTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGAAACA
GATTGGAAATCACAGACCTGGATGGAGTGGAGCAGAGAAATTAAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAAGA
ATCGCAAAACCAAGCAAGAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAATGGCAAGTTGTGGAATTGGTTAACAT
ACAAATTGGCTGTGGTATATAAATTATCATAATGATAGTAGGAGGCTGGTAGGTTAAGAATAGTTTTGCTGTACT
TTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCAACATTATCGTTTCAAGCCCACCTCCCAACCCGAGGGACCCGACAG
GCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATCTGACGGTATCG
CCTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATAACAAACTA
AAGAATTACAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTCGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTATCGATAAG
CTTGGGAGTTCGCGTTACATAACTACGGTAAATGGCCCGCTGGTGACCGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAA
TAATGACGTATGTCATAGTAACGCAATAGGACTTCCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCC
ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCGCTGGCATT
ATGCCAGTACATGACCTTATGGACTTCCACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTTACCATGGTATGC
GGTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGATTTCAGTCTCCACCCATTGACGTCAATG
GGAGTTTGTGACGGGACCAAAATCAACGGACTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGCGGTA
GGCGTGTACGGTGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTT
TTGACCTCCATAGAACACCGACTCTACTAGAGGATCGCTAGCGTACCGGACTCAGATCTCGAGCTAACGCTTCGAATT
CTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCTGCATTAGTTACTAGCACCGGTCGCCACCATGGCCTCCTCCGAGGACGTCTC
AAGGAGTTCATGCGCTCAAGGTGCGATGGAGGGCTCCGTGAACGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGC
CGCCCTACAGGGCACCCAGACGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGCCCCCTGCCCTGCCCTGGACATCCTGTCC
CCCCAGTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCGCCACATCCCCACTACAAGAAGCTGCTCCCTGCCAG
GGCTCAAGTGGGAGCGCTGATGAACCTCGAGGACGGCGGTGGTGACCGTGAACCGACTCCTCCCTGCCAG
TCCTCATCTACAAGGTGAAGTTCATCGCGTGAACCTCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAAGAAGACTATGGCTGG
GAGGCCTCACCGAGCGCCTGTACCCCCCGCAGCGCTGAAGGGCAGATCCACAAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGC
GGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCGACTACTACGTGGACTCC
AAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAGCAGTACGAGCGCGCAGGGCGCCACCACTGTT
CTGTAGCGGCCATCGAGCTCAAGCTCGAATTCTGAGTCAGCAGATCCACCGGTATGGTAGCAAGGGCGCCAG
GTTCACCGGCATCGTCCCATTGATCGAGCTGAATGGCGATGTGAATGCCACAAGTTCAAGCTGAGCGCAGGGCGA
GGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCACTGACCCACCGCAAGCTGCTGTGCCCTGCCACCGTGG
GACCACCTGAGCTACGGCGTGCAGTGTCTCACGCTACCCGATCACATGAAGCAGCACGACTTCTCAAGAGGCCAT
GCCTGAGGGCTACCCAGGAGCGCACCCTTCTCGAGGATGACGGCAACTACAAGTCGCGCGAGGTGAAGTCGA
GGCGATAACCTGGTGAATCGCATCGAGCTGACCGGCACCGATTCAAGGAGGATGGCAACATCCTGGCAATAAGATGGA
GTACAACATAACGCCACAATGTTACATCATGACCGACAAGGCCAAGAATGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATGCCA
CAACATCGAGGATGGCAGCGTGCAGCTGCCGACCACTACCGCAGAACATCCCCATCGCGATGCCCTGTGCTGCTGCC
CGATAACCAACTACCTGTCCACCCAGAGCGCCCTGTCCAAGGACCCCAACGAGAACGCGCAGTACATGATCTACTCGCTT
CGTAGCCGCCGCACCATCACCGATGGTAGCTGAGCTGAGCTACAAGTGAGCGCCGACTCTAGATCATAATGCCATA
CCACATTGTAGAGGTTACTTGCTTAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTG

GGATCCCGCAGCTAGATAATTCTACCGGGTAGGGAGGCCTTCCCAGGGAGCTGGAGCATGCGCTTAGCACCC
CCGCTGGCACTTGGCGTACACAAGTGGCTCTGCCCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGCAGCAACCGGCTCCG
TTCTTGGTGGCCCTCGGCCACCTCTACTCCCTCCCTAGTCAGGAAGTCCCCCGGCCAGCTCGCTCGTGC
AGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGCTCAGTCAGTCAGTCAGGAGCAGCACCGCTAGCAATGGAAGCGGTAGGC
CTTGGGGCAGGGCCAATAGCAGCTTGCTCTCGCTTCTGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGTGGTCCGGGGCGGG
CTCAGGGCGGGCTCAGGGCGGGCGCCCGAAGGTCTCCGGAGGCCGATTCTGCACGCTCAAAGCGCACG
TCTGCCGCGCTTCTCCCTCATCTCCGGCTTCTGCACGCTCAGGCCAAGCTTACCATGACCGAGTACAAGGCCA
CGGTGCCCTGCCACCCCGGACGACGCCCCAGGGCGTACGCCCTCGCCGCCGTTGCCGACTACCCGCCACGC
GCCACACCGTCATCGGACGCCACATCGAGCGGGTCAACGAGCTGCAAGAACCTTCTCACGCGCTGGCTCGACA
TCGGCAAGGTGTGGGTGCGGACGACGGCGCGGTGGCGTCTGGACCACGCCAGAGCGTCAAGCGGGGGCGGTGT
TCGCGAGATCGGCCCGCATGCCAGGTTGAGCGGTTCCCGCTGGCGCAGCAACAGATGGAAGGCCCTCTGGC
CGCACCGCCAAGGAGCCCGGTGGTCTGGCACCGTCGGCTCGCCGACCACCAAGGGCAAGGGCTGGCAGCG
CCGTCGTCTCCCGAGTGGAGGCGGCCAGCGCAGCGCCGGGTGCCGCTTCTGGAGACCTCCGCCCGCAACCTCC
CCTCTACGAGCGGCTCGGCTCACCGTCACCGCCAGTCAGGTGCCGAAGGACCGCGCACGGTGCATGACCCGA
AGCCCGGTGCTGACCGCTCTGGAAACAATCACCTCTGGATTACAAAATTGTAAGGATTGACTGGTATTCTTAACAT
GTTGCTCCTTACGCTATGTGGATACTGCTGCTTAATGCCCTTGATCATGCTATTGCTCCCGTATGGCTTCATTTC
TCCTCCTGTATAAACTCTGGTGTCTCTTATGAGGAGTTGCGGCCGTTGTCAGGCAACGTCGGCTGGTGTGACT
GTGTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTGGGGATTGCCACCGCTGCAGCTCCTTCCGGACTTCGCTTCCCCCTC
CCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCCTGCCCTGCCGCTGCTGGACAGGGCTCGGCTGGGACTGACAATTCC
GTGGTGTGCGGGAAAGCTGACGCTTCCATGGCTGCTCGCTGTGGCACCTGGATCTGCGCGGGACGTCCTTC
TGCTACGTCCTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCGCCGCTGCTGCCGCTCTGCCGCTCTCCGCTT
CGCCTCGCCCTCAGCGAGTCGGATCTCCCTTGGCCGCTCCCGCTGGATTAAATTGCACTGAGTCAGACCTAGAAA
AACATGGAGCAATACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGATTGTCCTGGCTAGAACGACAAGAGGAGGAGGAG
TGGGTTTCCAGTCACACTCAGTACCTTAAGCCAATGACTTACAAGGCAGCTGAGATCTAGCCACTTTAAAG
AAAGAGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAGAACAGATATCCTGATCTGGAATCACACACACAAGGCT
ACTTCCCTGATTAGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGTCAGATATCCACTGACCTTGGATGGTCTACAAGCTAGTAC
CAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAACAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTACACCCTGAGCCTGATGGATGG
ATGACCCGGAGAGAACAGTGTAGAGTGGAGGTTGACAGCCGCTAGCATTCATCACGTCGGCCGAGAGCTGCATCCGG
AGTACTTCAAGAACGCTGATATCGAGCTGCTACAAGGGACTTCCGCTGGGACTTCCAGGGAGGCCGCTGGCTGGCG
GGACTGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATCTGCATATAAGCAGCTGCTTTGCCGTACTGGCTCTCTGGTTAGACAG
ATCTGAGGCTGGAGCTCTGGCTAACTAGGAAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAGCTTGCCTGAGTGCCTCAAGTA
GTGTTGCCGCTCTGGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCTTTAGTCAGTGTGAAATCTCTAGCAGT
AGTAGTCATGTCATTTATTACAGTATTATAACTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGCCCTGACATTG
TAGCGTTTACCGTGCACCTCTAGCTAGAGCTGGCTAATCATGGCATAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATCCGCT
ACAATTCCACACACATACGAGCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGTCATAAGCTAACAGCTAACATTAA
TGCCTGCCGCTACTGCCGCTTCCAGTCGGAAACCTGCTGTCAGCTGCATTAAATGAATCGGCCACGCGCGGGGAG
AGCGGTTTGCCTGGCGCTTCCGCTTCCGCTACTGACTCGCTGCCGCTGGCTCGGCCAGGG
ATCAGCTCACTCAAAGCGGTAAACGGTTATCCACAGAACGAGGGATAACGAGAACATGTGAGCAAAAGGCCA
GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCTGGCTGGCTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAAAA
TCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGCGTTCCCGCTGGAGCTCCCTCGTGC
CTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCGCCCTTCCCTGCCAGGGAGCTGGCCTTCTCATAGCT
ACGCTGTAGGTATCTCAGTCGGTGTAGGTGCTCGCTCAAGCTGGCTGTGTCAGAACCCCCCGTCAAGCCGACCG
CTGCCGCTTATCCGTTAACTATCGCTTGAGTCAACCCGTAAGACACGACTTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAA
CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTCTACAGAGTTCTGAAAGTGGCTAACACTACGGCTACACTAGAAC
AGTATTGGTATCTCGCTCTGCTGAAAGCCAGTACCTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTTGTGATCCGGCAAACAAACAC
CGCTGGTAGCGGTGGTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAGGATCTCAAGAAGATCTTGTGATCTT
TTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTACGTTAAAGGATTGGTCTGAGATTATCAAAAGGATCTTAC
CTAGATCTTAAATTAAAGTGAAGTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTGGTCTGACAGTTACCAATG
CTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTATTGCTTACCATAGTGCCTGACTCCCCGTCGTGAGATAAC
TACGATAACGGGAGGGTTACCATCTGCCCAAGTCGCTGCAATGATAACCGCGAGACCCACGCTACCGGCTCCAGATTAC
AGCAATAAACCAGCCAGCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGCTGCAACTTATCCGCTTCCATCCAGTCTATTAAATTG
TTGCCGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTGTGCTGCCAGTTAATAGTTGCGCAACGTTGCTGCAAGGCTACAGGATCGTGGTGC
ACGCTGCTGTTGGTATGGCTTACCTACGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCAGTTACATGATCCCCCATGGTGTGCA
AAAAGCGTTAGCTCTCGGTCTCCGATCGTGTAGAAGTAAGTTGGCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGC
ACTGCATAATTCTCTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGA
ATAGTGTATGCGCGACCGAGTTGCTCTGCCGGCTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACCTTAAAGT
GCTCATCTGGAAAAGCTTCTCGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGGTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCAC
TCGTGCACCCAACTGATCTCAGCATCTTACTTACCGCTGGTGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAATGCCG
AAAAAGGAAATAAGGGCAGACGGAAATGTAAGTACTCATCTCTCTTCAATATTGAAAGCATTTATCAGGG

TTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGTTCCGCGCACATTCCCCGAAA
AGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCAACTTGTATTGCAGCTTATAATGGTTACAATAAGCAATAGCATCA
CAAATTCACAAATAAAGCATTTCAGTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCT
GGATCAACTGGATAACTCAAGCTAACCAAAATCATCCCAAACCTCCCACCCCATACCCTATTACCACTGCCAATTACCTGT
GGTTTCATTTACTCTAAACCTGTGATTCCCTCTGAATTATTTCAATTAAAGAAATTGTATTGTTAAATATGTA
ACTTAGTAGTTTAAAGAAATTGTATTGTTAAATATGTA
CTACAAACTTAGTAGT