Optimizacija modularnog sustava ekspresijskih vektora za primjenu CRISPR/Cas9 tehnologije u kulturi animalnih stanica

Bračun, Bruno

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:784953

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Optimizacija modularnog sustava ekspresijskih vektora za primjenu CRISPR/Cas9 tehnologije u kulturi animalnih stanica

DIPLOMSKI RAD

Bruno Bračun

Zagreb, svibanj, 2021.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij

Genetika i oplemenjivanje životinja

Optimizacija modularnog sustava ekspresijskih vektora za primjenu CRISPR/Cas9 tehnologije u kulturi animalnih stanica

DIPLOMSKI RAD

Bruno Bračun

Mentori:
izv.prof.dr.sc. Vlatka Čubrić Čurik
doc.dr.sc. Aleksandar Vojta

Zagreb, svibanj, 2021

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Bruno Bračun**, JMBAG 01190152373, rođen 3. svibnja 1992. godine u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

Optimizacija modularnog sustava ekspresijskih vektora za primjenu CRISPR/Cas9 tehnologije u kulturi animalnih stanica.

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

_____

Potpis studenta

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Brune Bračuna**, JMBAG 01190152373, naslova

Optimizacija modularnog sustava ekspresijskih vektora za primjenu CRISPR/Cas9 tehnologije u kulturi animalnih stanica

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo: potpisi:

- Izv. prof. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik mentor _____
  Doc. dr. sc. Aleksandar Vojta mentor _____
- Prof. dr. sc. Ino Čurik član _____
- Doc. dr. sc. Maja Ferenčaković član _____

Sadržaj

1. UVOD 1
2. CILJ 11
3. MATERIJALI I METODE 12
3.1. Stvaranje *backbone* plazmida 12
3.2. Konstrukcija sustava za višestruko navođenje gRNA 16
3.3. Stvaranje dual marker sustava 18
3.3.1. Oligo kloniranje varijabilnih dijelova gRNA modula 19
3.3.2. Potvrđivanje dvojne transfekcije koristeći fluorescentne markere 21
3.3.3. SnapGene viewer i Ligase Fidelity viewer 22
4. REZULTATI 26
4.1. Stvaranje minimalnog plazmida 26
4.2. Određivanje optimalnih Golden Gate krajeva 40
5. RASPRAVA 41
6. ZAKLJUČAK 43
7. LITERATURA 44

Zahvala

Ovime zahvaljujem svojoj obitelji na podršci i financijskoj pomoći u odlučnosti da podrže moje studiranje neovisno o neodlučnosti i produživanju školovanja. Posebno zahvaljujem svojoj majci i sestri koje su me gurale i potaknule da ne odustajem kada sam mislio da je najbolje da odustanem. Zahvaljujem svojim psima Marleyu i Ziggiu koji su tu bili samnom kada nitko nije te mački Princess-Anna Tilda Sarabi što je zadnju godinu mog školovanja učinila turbulentnom i punom neočekivanih situacija.

Zahvaljujem svom genotipu što je jako dobro opremljen za stresne situacije i odlično se prilagođava i najtežim trenucima. Na kraju, zahvalio bih se svima na Zavodu za epigenetiku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta koji su omogućili da tamo obavljam stručnu praksu te mi dali da pišem o temi CRISPR, a posebno mentoru doc.dr.sc. Aleksandru Vojti te mentorici sa svog matičnog fakulteta izv.prof.dr.sc. Vlatki Čubrić Čurik te svima na Zavodu za stočarstvo Agronomskog fakulteta.

Sažetak

Diplomskog rada studenta Brune Bračuna, naslova

Optimizacija modularnog sustava ekspresijskih vektora za primjenu CRISPR/Cas9 tehnologije u kulturi animalnih stanica.

CRISPR/Cas9 modularni sustav je sustav koji se koristi za epigenetičku manipulaciju, odnosno za aktivaciju ili deaktivaciju genske transkripcije putem metilacije, odnosno demetilacije CpG otoka u individualnim promotorima i acetilacije i deacetilacije krajeva histonskih repova. No, za samu ekspresiju modularnog sustava, najprije je potrebno konstruirati plazmid, koji se zatim prenosi u eukariotsku stanicu. Takav vektor trebao bi biti najmanji mogući tj. trebao bi sadržavati samo sekvence koje se sastoje od komponenate koje čine CRISPR/Cas9 modularni sustav. Takva zadaća omogućena je konstrukcijom minimalnog plazmida koji će biti optimiziran koristeći najbolje krajeve za sklapanje metodom Golden Gate, svih potrebnih dijelova koje će plazmid u eukariotskoj stranici eksprimirati. Dobiveni podaci su potvrdili uspješnost sklapanja minimalnog plazmida sa krajevima koji će omogućiti daljnju uspješnu manipulaciju konstruktom korištenim u CRISPR/Cas9 tehnologiji.

Ključne riječi: CRISPR/Cas9, plazmid,epigenetička regulacija

Summary

The CRISPR/Cas9 modular system is a system for epigenetic manipulation, i.e., activation and deactivation of gene transcription by metilation or demetilation of CpG islands in individual promoter regions or by acetilation and deacetilation of the remaining histone tails. For expression of the modular system itself, a plasmid must first be made to be transfected into the eukaryotic cell. This system should be as small as possible, with sequences containing only parts that make up the modular CRISPR/Cas9 system for epigenetic manipulation. Such a mission would only be successful by making the smallest possible plasmid, optimized by the best possible overhangs for assembling all the parts that this plasmid will express in the eukaryotic cell. Recieved data have shown success in folding minimal plasmid with ends that will allow further succes with manipulation of construct used in CRISPR/Cas9 technology.

Keywords: CRISPR/Cas9, plasmid, epigenetic regulation

1. UVOD

CRISPR/Cas9 (*engl. "Clustered regulated interspaced palindromic regions"*) tehnologija moderan je znanstveni pristup koji je posljednjih nekoliko godina pod velikim interesom molekularne biologije kao mogući pristup za upravljanje genetičkim materijalom (*gene knockout*), odnosno regulaciju genske ekspresije. Otkriven prije nekoliko godina kao dio bakterijskog obrambenog mehanizma protiv invazije bakteriofaga, ovaj sustav postao je važan za razvoj budućeg pristupa u istraživanju genske ekspresije u eukariotskim stanicama, kao i mogućnosti za liječenje mnogih bolesti, uzrokovanih genetičkim pogreškama. Najprije se CRISPR/Cas9 tehnologija koristila kao molekularne škare koje bi izrezale dio molekule DNA od interesa i na tom mjestu uvele mutaciju (popravak bez kalupa) ili omogućile preciznu ugradnju ciljane DNA. CRISPR/Cas9 sustav pomoću navodeće molekule RNA (guidance RNA, gRNA) prepoznaju PAM sekvence (*The protospacer adjacent motif*) (NGG). Cas9 protein, u kompleksu sa specifičnom gRNA veže ciljanu sekvencu koja je određena sa prvih 20 nukleotida na 5' kraju gRNA, CRISPR sekvencom, a služi kao rezač određenih djelova DNA. Iako se prije ponajviše koristio kao molekularne škare takav sustav je genetičkim inženjerstvom došao do primjene gdje su proteinu Cas9 ciljanim mutacijama deaktivirane katalitičke domene odgovorne za nukleaznu aktivnost, a uz to su i različite katalitičke domene fuzionirane s ciljem da se stvori fuzijski protein. Takav fuzijski konstrukt može imati različitu funkciju na molekuli DNA poput metilacije, demetilacije, CpG nukleotida, odnosno acetilacije i deacetilacije histonskih repova. Protein dCas9 ima brojne ortologe, odnosno različite izoforme koje kodiraju za Cas9 protein, a mogu dolaziti iz različitih bakterija, koje su predmet mnogih istraživanja, kao što su *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pyogenes* pa govorimo o SaCas9 ili SpCas9, odnosno u slučaju katalitički inaktivne forme, o dSaCas9 i dSpCas9. DNMT3A, TET1, VPR, VP64 i p300 samo su neke od katalitičkih domena koje fuzioniramo na naš dCas9 protein. Da bismo eksprimirali ovakav sustav, najprije je potrebno prilagoditi iz bakterijske stanice i to konstrukcijom plazmida koji sadrži sve komponente za epigenetičku modulaciju. Upravo je konstrukcija plazmida od velikog interesa jer o njoj ovisi naša epigenetička modulacija. Javlja se problem oko unosa takvog plazmida u stanicu jer je prevelik pa se danas nastoji maksimalno smanjiti veličina plazmida, a da se zadrže sva pozitivna svojstva konstrukta. S obzirom na to da želimo vidjeti kako će se naš konstrukt ponašati u stanici i je li se ili nije eksprimirao, potrebne su sekvence za navodeću RNA (gRNA), sekvence za ekspresiju ortologa dCas9 proteina, sekvence za funkcionalne domene koje ćemo fuzionirati na dCas9 protein, promotorska i terminatorska regija, markeri pomoću kojih ćemo vidjeti koji je od tih plazmida funkcionalan (ekspresija flourescentnog proteina), odnosno koji su pogodni za selekciju transfeciranih stanica (rezistencija na antibiotik).Da bismo konstruirali najbolji minimalni

plazmid, moramo utvrditi koji su krajevi istovjetni restrikcijskim enzima najbolji u svojstvima za konstrukciju takvog plazmida.

Također, CRISPR/dCas9 bazirani alat za simultano epigenetičko uređivanje ima potencijala revolucionizirati polje epigenetike omogućujući determinaciju odnosa između direktno manipuliranih, individualnih epigenetičkih oznaka i transkripcijske aktivnosti, kao i pomoći u razumijevanju kompleksnosti kromatinskog sloja, uključenog u transkripcijsku regulaciju. Sve do danas, nema jasne slike kauzalnog odnosa između genske promotorske regulacije metilacije i transkripcijskog statusa gena niti broja i pozicije CpG-a u određenom promotoru koji regulira transkripciju odgovarajućeg gena.

Bazirajući se na uspješno konstruiranoj C-terminalnoj dSpCas9-DNMT3A fuziji, uspjeli smo dizajnirati okosnicu (engl.*backbone*) plazmida s izmjenjivim modulima, stvarajući tako molekularni alat koji se može ponovno iskoristiti, a koji je proširen s novim funkcionalniom modulima i lako rekonfiguriran za očekivani eksperimentalni postav. (Josipović i sur.2019.).

Minimalni plazmid igra esencijalnu ulogu u međukoracima u molekularnoj biologiji. Na primjer, plazmidi mogu stvarati gradivne blokove u sintetičkoj biologiji ili mogu biti plazmidi za kloniranje u međukoracima. Mali *backbone* također otvara jedinstvene klonirajuće strane na restrikcijskim enzimima. Opisuje se generacija funkcionalnih kopija pICOz plazmida veličine 1185-bp, proširenih na mjestima za višestruko kloniranje *(MCS multi-cloning site*) (Staal i sur.,2019.).

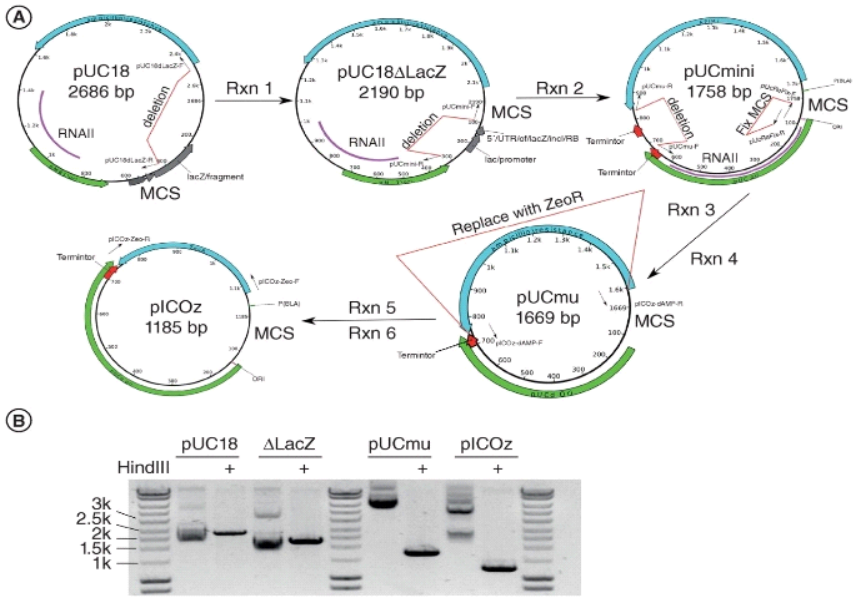
Mnoge obitelji plazmida već su naširoko poznate. U ovom radu, naglasak je stavljen na pUC i pUK obitelji plazmida zasebno, ali i na optimizirane plazmide za završno Golden Gate kloniranje.

Stvaranje minimalnog plazmida ima esencijalnu važnost u molekularnoj biologiji. Velika pozornost treba se obratiti i na dodatne sekvence koje su u završnom Golden Gate kloniranju, fuzionirane na naš minimalni plazmid. Od dodatnih sekvenci misli se na sustav za višestruko navođenje i dualni marker sustav koji nisu esencijalni za stvaranje minimalnog plazmida, a čija učinkovitost fuzije na minimalni plazmid kao i sama funkcionalnost Golden Gate plazmida ima izrazito veliku ulogu u konačnoj zadaći CRISPR/Cas9 modularnog sustava za epignetičku manipulaciju. Oligokloniranje također je vrlo bitan segment stvaranja modularnog CRISPR/Cas9 sustava za epigenetičku manipulaciju.

Kao početni plazmid za kreiranje minimalnog plazmida pICOz poslužio je pUC18. Prva reakcija (Rxn1; Slika1.) eliminira LacZ i neke adicijske sekvence uzvodno od pBla promotora omogućujući ampilicinsku rezistenciju. Eliminirajuća sekvenca bila je

amplificirana nekim adicijskim restrikcijskim enzimima (MluI, NruI, SfiI, NdeI, NcoI, MscI;) koji su bili dodani višestruko klonirajućoj strani (MCS). Rezultat je da je pUC18 deltaLacZ plazmid manji za 496 bp nego pUC18 plazmid. U drugoj reakciji (Rxn2, Slika1.) eliminirani su adicijski djelovi LacZ promotora i beskorisni krajevi između MCS i ORI iz pUC18□LacZ, a ove su sekvence bile zamjenjene adicionalnim restrikcijskim enzimima u MCS (EcoRV, XhoI, SpeI, ApaI, PmeI;).(Staal i sur.,2019.)

Klon koji je pokupljen pokazuje deleciju u pUC ORI, a dio klona MCS nije pokazao deterministički efekt na prinos plazmida. To se najčešće događa zbog alternativne rekombinirajuće reakcije umjesto intendne ligacije plazmida PCR produkta(Staal i sur.,2019.).



Slika 1. Pregled klonirajuće sheme za generaciju minimalnog animalnog vektorskog backbone palzmida.

Legenda: Grafički pregled modifikacije napravljene za svaki korak u procesu smanjenja. Rxn = reakcija;. Crvene linije predstavljaju područje koje je modificirano u pratećoj reakciji,a krajevi linija indiciraju poziciju početnica korištenih za tu reakciju, dok crne strelice indiciraju početnice prikazane u tablici 1. Zeleni plazmidni elementi pokazuju izvorište replikacije u plazmidu; sivi plazmidni elementi su beznačajni; plavi plazmidni elementi predstavljaju antibiotski selekcijski marker; crveni plazmidni elementi prikazuju prokariotske transkripcijske terminatore. Roze linije u pUC18, pUC18ΔLacZ i pUCmini indiciraju lokaciju RNAII transkripta, koji je potreban za plazmidnu replikaciju, ali nije uključen u prikaz pMB1 izvorišta replikacije (Lin-Chao S i sur.,1992.) Novi prikaz izvorišta replikacije (u pUCmini, pUCmu i pICOz) nakon pUCmini delecije uključuje RNAII transkript. (B) HindIII probavlja (indiciran sa '+') 1 µg pUC18, ΔlacZ (=pUC18ΔLacZ), pUCmu i pICOz na 1% Agarose/TAE gela. Veličina na SmartLadder (Eurogentec) indicira na kbp ('k') (Staal i sur.,2019.).

Taj plazmid bio je dizajniran kao pUCmini, koji je 432 bp manji nego li pUC18ΔLacZ parentalni plazmid. S ciljem dodatnog smanjenja plazmida, adicijske regije s nepotrebnim genetskim kodom definirane su između ampilicinske rezistencije i izvorišta replikacije, a delecija je napravljena da stvori rezistentni marker koristeći terminatorsku sekvencu, prisutnu u izvorištu replikacije. (Rxn 3, Slika1.) (Staal i

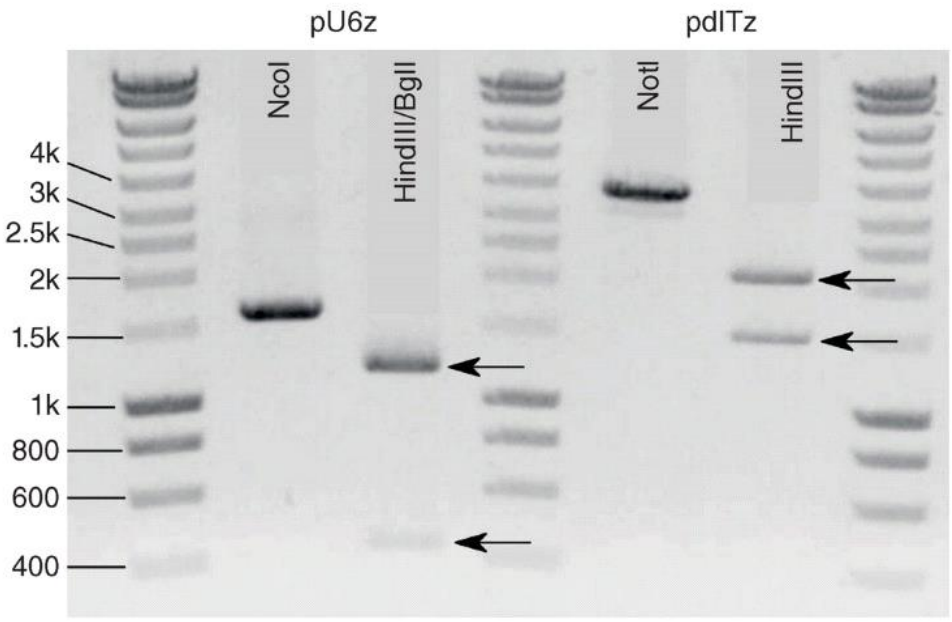
sur.,2019.)

Budući da plazmid pUCmini također ima deleciju na višestruko-klonirajućoj strani, napravljeno je tako da se višestrukoklonirajuća strana restaurira stranama restrikcijskih enzima (Rxn 4, Slika1.).(Staal i sur.,2019.)

Rezultirajući pUCmu plazmid završava s 89 bp manje nego pUCmini plazmid s kompletno proširenom višestruko-klonirajućom stranom. Nakon ovoga, suvišni genetički kod može se detektiran u sekvenci jedino na način da se sigurno smanji plazmid zamjenjujući antibiotičke selekcijske markere s preklopivim ekstezijskim kloniranjem (Bryksin AV. i sur.,2010.) ili rekombinirajućim kloniranjem. Kao dokaz koncepta, ampilicinska rezistencija zamijenjena je zeocinskom rezistencijom.(Staal i sur.,2019.)

Rezultirajući plazmid rezultira pICOz plazmidom koji je 484 bp manji nego minimalni pUCmu parentalni plazmid. S ova četiri sekvencionalna koraka eliminacije, plazmid pUC18 koji je dug 2686 bp smanjen je na 1185 pb dug pICOz plazmid, koji sadrži više korisnih klonirajućih strana kao i totalno smanjenje veličine na 56%.(Staal i sur.,2019.)

Bez obzira na povijest nasumične delecije tijekom generacije ovog minimalnog plazmida, inserti klonirani i propagirani u minimalni pICOz *backbone* su stabilni. Klonirali smo nekoliko cDNAs u pICOz kao intermedijarni koraci za PCR-baziranu mutagenezu MALT1 [LMBP 11225], CARD9 [LMBP 11224], CARD11 [LMBP 11222] i CARD14 [LMBP 11223]), koja ostaje stabilna nakon više ciklusa propagacije.
Također generirane su korisne vektorske okosnice s dugim insertima. Kao pdITz (LMBP 11273), koja koristi spavajuće transpozon ruke i višestrane *multi-site gateway* destinacijske kazete i vektore sa jako malim insertima kao pU6z (LMBP 11144), koji sadrži klonirajuće strane za SpCas9 CRISPR guideRNA (gRNA) ekspresiju i za U6 promotor. Kao demonstraciju za stabilnost nakon nekoliko ciklusa amplifikacije ovih generalno korisnih vektora, testirali smo digestijom pdITz i pU6z.(Slika 2.).



Slika 2. Verifikacija stabilnosti pICOz-baziranog klona koji je bio propagiran nekoliko puta (Izvor:Staal i sur.,2019.)

Legenda: Plazmid pU6z je lineariziran sa NcoI, rezultirajući sa 1553-bp fragmentom. Za verifikaciju integriteta ostalog MCS pored inserta provodi se HindIII/BglI dvostruko rezanje u MCS te je Zeo rezistencijski gen gotov. Rezultati su 1143-bp i 410-bp fragmenti (strelica). Slično, pdlTz plazmid s većim insertima je lineariziran sa NotI te nastajefragment 3534 bp,a dio inserta je izbačen s HindIII i nastaju fragmenti 2085-bp i 1449-bp (strelica). Veličina je određenapomoću SmartLadder (Eurogentec) u kbp ('k'). (Staal i sur.,2019.)

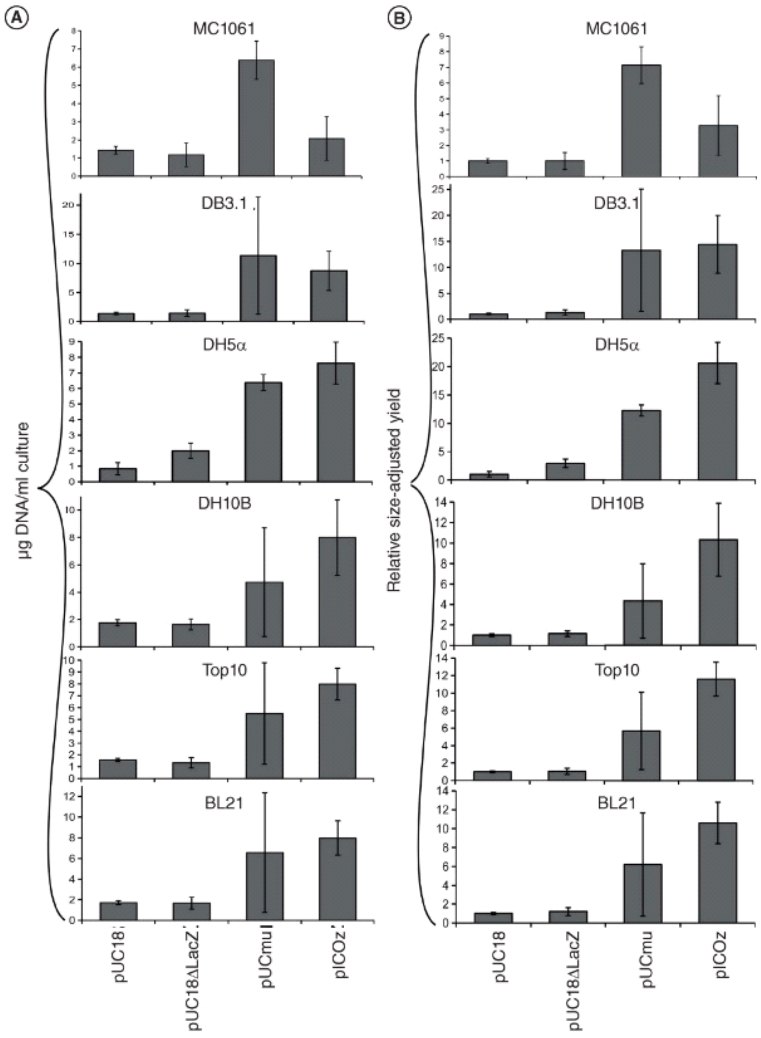
Može se navesti nekoliko potencijalnih slučajeva korištenja kada je riječ o malim okosnicama plazmida. Jedan vrlo koristan slučaj je onaj u kojem se pICOz koristi kao intermedijarni klonirajući plazmid s PCR-posredovanom mutagenezom da bi se pomoću njega, klonirali generirani mutanti u ekspresijski vektor. Tri glavne i velike prednosti su sljedeće:

1) PCR-om se trebaju amplificirati samo mali produkti (insert + 1 kb) prije nego cijeli ekspresijski vektor (tipično insertiran + 5–6 kb za ekspresijski vektor u sisavaca);
2) nema rizika za PCR amplifikaciju koja bi uzrokovala bilo koju nenamjernu modifikaciju ekspresijskim vektorom.
3) sb obzirom na to da je najveći broj vektora ampilicinske rezistencije kloniran od zeonin rezistentnog pICOz vektora, smanjuje se rizik kontaminacije pICOz vektora.

pICOz i pUCmu vektori okosnice također mogu biti zanimljivii kao eukariotski ekspresijski vektori u nekim slučajevima. Iako,adiranjem kompletne ekspresijske kazete sisavaca, SV40 ORI brani svrhu malog plazmida od nekoliko kb spremljenih na

backbone, rezultirat će malom razlikom u krajnjoj veličini ekspresijskog vektora. Tu su javljaju i mnogo manje ekspresijske kazete kao što je CRISPR/Cas9 gRNA ekspresija od U6 promotora i terminatora (npr., pU6mu LMBP 09491 i pU6z LMBP 11144). Ekspresije ovih gRNAs su također su referentno prolazne pa stoga nije potrebno imati SV40 ORI. Neke stanice lakše su transfecirane sa malim ekspresijskim plazmidima. (npr., elektroporation Jurkat T cells) a ovaj postupak također je prikazan i kod drugih autora (Hornstein BD. i sur.,2016.), što ukazuje na to da ovi mali ekspresijski plazmidi imaju primjenu. Ovdje je također riječ o puno potencijalnih korisnih slučajeva malih *backbone* vektora u polju molekularne biologije te se potiče kreativno korištenje tih alata za razvoj novosti u nizvodnim aplikacijama (Staal i sur.,2019.).

Da bismo odredili apsolutni i relativni prinos minimalno klonirajućeg vektora, s ciljem verifikacije delecije i potvrđivanja da nije eliminirano ništa što bi imalo utjecaj na kopiju plazmida i totalni prinos, napravljeno je nekoliko paralelnih toplinskih šokova na E. Coli te transfekcija i mini plazmidna preparacija 4 konstrukta (pUC18, pUC18ΔLacZ, pUCmu i pICOz). Iznenađujuće, pUCmu i pICOz pokazuju vrlo visok prinos u konačnom broju DNA produkta prekonoćne kulture (Slika 3.A) i više kada je faktirajući u onim plazmidima koji su mnogo manji nego li pUC18 plazmid (Slika 3.B).(Staal i sur.,2019.)



Slika 3. Usporedba prinosa minimalnog plazmida i roditeljskog plazmida u višestrukim Escherichia coli varijetetima (Izvor: Staal i sur.,2019.)

Legenda: (A) Apsolutni prinos (µg/ml prekonočna kultura) za četiri konstrukta. (B) Plazmidna veličina prilagođava relativni prinos (prosječan pUC18 prinos do 1) i razdijeljen relativnom veličinom (pUC18 = 1, pUC18ΔLacZ = 0.81, pUCmu = 0.62 i pICOz = 0.44). Veličina plazmida prilagođena prinosu trebala bi biti u korelaciji s brojem plazmida ekstrahiranih/ml prekonoćne kulture. Pogreška predstavlja 95% sigurnosni interval. (Staal i sur.,2019.)

Generacija minimalnog plazmida veličine ~1-kb potpuno funkcionalnog klonirajućeg plazmida najviše je zasad smanjena. Sve nepotrebne sekvence bile su eliminirane u prostoru između višeklonirajuće strane (*MCS multi-cloning site*), izvorišta replikacije i selektibilnih markera. Trenutačno se koristi najmanji divlji rezistencijski marker i jedini način za daljnje smanjenje plazmida je delecija izvorišta replikacije ili zamjena izvorišta replikacije s alternativnim manjim izvorištem replikacije.(Staal i sur.,2019.).

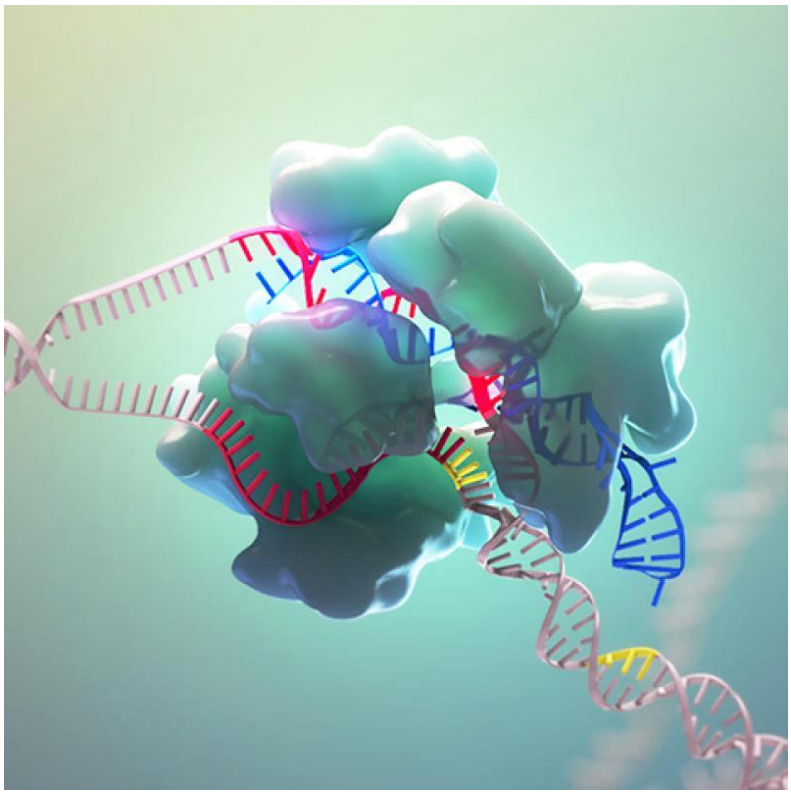
Slučajnošću je indentificirana pUC varijanta pMB1 ORI, koja smanjuje pUC ORI sa 750 bp na 616 bp. Minimalni pUC dobiven ORI od 674 bp (*GenBank:* EU496091.1) objašnjen je u BioBrick sustavu (Shetty RP i sur.,2011.). Komparacija sekvenci pokazuje poravnjavanje između pICOz i baza 3–618 BioBrick pUC ORI-a je također otkrio da BioBrick pUC sadrži nekoliko mutacija za eliminaciju restrikcijskih strana u ORI-ju. Najmanji vektor okosnice može se jako lako napraviti potpuno sintetički, gdje, u teoriji, sve restrikcijske strane u okosnici mogu biti eliminirane i nadalje proširene u MCS. To se može smatrati zanimljivom perspektivom za daljnji razvoj pICOz okosnica kao standardnog IGEM 'dijela' za sintetičku biologiju (Ellis Ti i sur.,2008.; Heinemann M. i sur.,2006.). Nasumična delecija pUC ORI-ja je mutant koji lako može biti skoro najmanja varijanta pUC ORI koja se može generirati, za što je potrebna RNAII (27–615 bp u BioBrick banki gena) i ostale uzvodne baze potrebne za ekspresiju (3–27 na BioBrick banki gena) RNAII. Ekspresija RNAII nekad nije uključena u pUC ORI (pMB1). Minimalni ORI od nisko kopirajućeg plazmida pSC101 od samo 220 bp bio je prethodno opisan. U teoriji, moguće je smanjiti pICOz na 789 bp s minimalnim ORI ako se radi s adicijskim sekvencama pUC ORI.(Sugiura S. i sur.,1993.)

Ovisno o RNAII sa 1185 bp, već su jako blizu najmanjem plazmidu nađenom u prirodi (746 bp), i treba općenito visoko kopirajući plazmid i selektibilni marker da se generira korisni klonirajući vektor, čija restrikcija određuje buduću optimizaciju veličine. Drugi korišteni slučajevi traže niske kopije plazmida (e.g., for *E. coli* proteinsku ekspresiju) i u tim slučajevima adicijske optimizirajuće veličine kao pSC101 ORI mogu biti od interesa. Selektibilni marker bezuvjetno adira 458 bp (promotor + kodirajuću domenu sekvencu [CDS] + terminator), pa bi moglo biti da je najmanji limit koji se može ostaviti potpuno opremljenom funkcionalnom visoko kopirajućim klonirajućim vektorom u *E.coli.* (Staal i sur.,2019.)

Plazmid pUC18 reduciran je u veličini u nekoliko različitih reakcijskih (Rxn) koraka PCR-a. Početnice su dobivene iz Invitrogena *in silico* kloniranjem, generacija grafičkih vektorskih mapa i analiza sekvence napravljena je u UGENE (http://ugene.net). Fuzija DNA polimeraze (New England Biolabs) PCR reakcije su napravljene sa pratećim generalnim programima: 3 min na 98°C denaturacija, 35x (10 s 98°C denaturacija, 20 s na 57°C *annealing*, 20 s/kbp na 72°C elongacije), 10 min na 72°C. DNA polimeraza (Biotool) PCR program je 5 min na 95°C denaturacije, 35x (20 s na 95°C denaturacije, 20 s na 57°C *annealing*, 45 s/ kbp na 72°C elongacije), 10 min na 72°C elongacije na GeneAmp 9700 (PE Biosystems) thermocycler-u. Ligacija sa T4 DNA ligazom (Promega) napravljena je na sobnoj temperaturi preko noći. CloneEZ (GenScript) reakcije su napravljene tokom 30 min na sobnoj temperaturi. Svi DNA produkti su transformirani u kompetentnu MC1061 *Escherichia coli* u trajanju od 30 s uz toplinski šok pri 42°C u vodenoj kupelji (Staal i sur.,2019.).

Prinos plazmida pUC18 (LMBP 7874), pUC18deltaLacZ (LMBP 9213), pUCmu (LMBP 9329) i pICOz (LMBP 11103) su determinirani iz MC1061 (LMBP 472), DH5(Invitrogen), DH10B (Genome Systems), BL21 (Stratagene), Top10 (Invitrogen) i DB3.1 (LMBP 4098) *E. coli*. Svaki plazmid je narastao u kvadriduplikatima startajući od individualnih klonova izabranih iz pločice za svaki soj domaćina, i plazmidi su prepipetirani iz 3ml (MC1061) ili 5ml (drugi sojevi) kulture po plazmidu i replikacije koristeći HQ Mini Plasmid Purification Kit (Invitrogen) (MC1061) ili QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) (drugi sojevi). DNA koncentracije su determinirane NanoDrop-om ND-8000 (ThermoFisher) (Staal i sur.,2019.).

Svi plazmidi u ovoj studiji su deponirani prema ISO 9001 (ISO B.,2010.) sukladno BCCM/GeneCorner kolekciji kultura (www.genecorner.ugent.be). Svi plazmidi su verificirani Sanger-ovim sekvenciranjem (internal sequencing facility) i restrikcijskom enzimskom digestijom (Promega)(Staal i sur.,2019.).



Slika 4. Molekulski model CRISPR/Cas9 modularnog sustava (Izvor: https://www.biointeractive.org/sites/default/files/styles/square_thumbnail/public/biointeractive/images/crispr-thumbnail.jpg?itok=IRUIIxwz

2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Hipoteza ovog rada je da vektor okosnice plazmida ima težu primjenu u različitim eukariotskim stanicama.

Pokazalo se potrebnim redizajnirati vektor okosnice s obzirom na težu primjenu većih vektora u različitim eukariotskim stanicama te s obzirom na veću učinkovitost sklapanja sustava u transfeciranim stanicama, a zbog smanjene učinkovitosti dosada poznatih metoda za sklapanje plazmida.

Ciljevi ovog rada su:

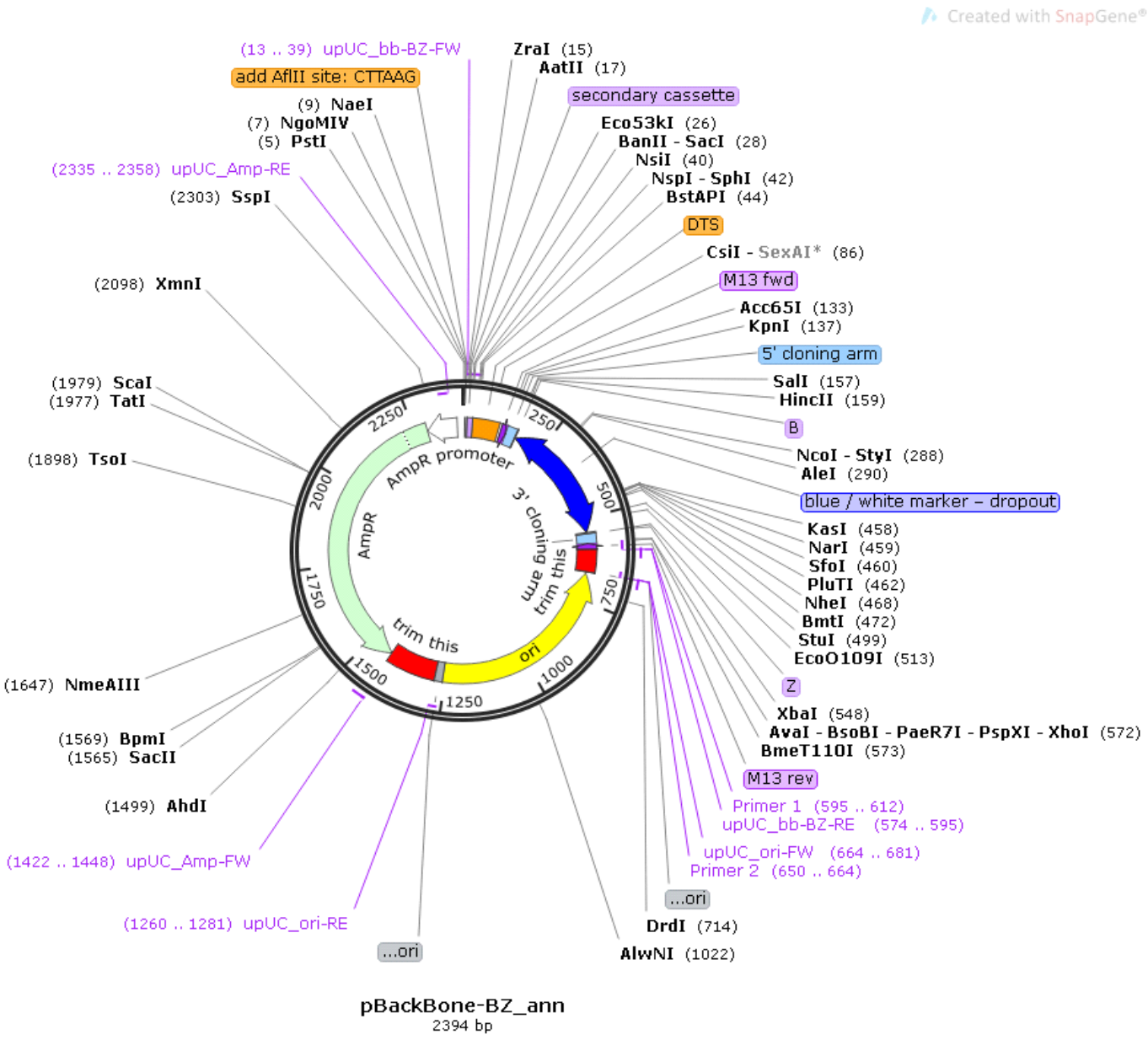
1. Stvaranje minimalnog vektora okosnice iz početnog *backbone* plazmida čime bi se maksimalno smanjio broj nukleotida i napravio učinkovitiji vektor za sklapanje našeg CRISPR/Cas9 modularnog sustava za epignetičku modifikaciju da bi se tako olakšala transfekcija takvog vektora u animalne stanice od interesa.
2. Redizajn odabranih vektora
3. Pronalaženje optimalnih krajeva za Golden Gate sklapanje modularnog vektora koji imaju visoku specifičnost slaganja većeg broja fragmenata i kodiraju za aminokiseline, koje su u otvorenom okviru čitanja, neutralne za funkciju fuzijskog proteina. Takvi krajevi trebali bi biti nepalindromne sekvence i trebale bi pokazivati visok stupanj ligacije, odnosno spajanja Watson-Crickovih baza.
4. Primjenom odgovarajućih programskih sustava za sklapanje vektora kao što je SnapGene viewer te prikaza i razrade njihove strukture za lakšu vizualizaciju, omogućit će se uvid u postupak smanjenja plazmida i njegovu strukturu postepenim oduzimanjem, ali i dodavanjem fragmenata drugih DNA plazmida, koji su pokazali manji broj baznih parova, ali i jednaku učinkovitost ili zamjenom pojedinih dijelova konstrukta koji imaju istu zadaću.
5. Pomoću programskih sustava kao što je *Ligase Fidelity Viewer* prikazati će se učinkovitost sklapanja pojedinih krajeva kratkih, 4-baznih dugih sekvenci DNA plazmida, odnosno ligacijsku vjernost T4 DNA ligaza. Dijelovi plazmida koje zovemo krajevima zapravo su istovjetni sekvencama restrikcijskih enzima koji režu polinukleotidni lanac pa ću time dati uvid u kombinacije četiriju baznih parova koje je najbolje koristiti u sklapanju krajeva takvih vektora.

Primjenom *oligo-annealing* procesa što je zagrijavanje i hlađenje dvaju jednolančana oligonukleotida s komplementarnim sekvencama, postupka moguće je sklopiti fragment koji će također biti ligiran unutar određenog plazmida u međukoraku ili krajnjeg plazmida.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Stvaranje backbone plazmida

Backbone plazmid kao osnovni plazmid za stvaranje minimalnog plazmida (pBackBone-BZ) (Slika 5.) dobiven je iz pUC19 plazmida (Addgene plasmid #50005).



Slika 5. pBackBone-BZ

Prvo, neželjena *BsaI* restrikcijska strana u beta laktamaza ORF uklonjena je postraničnom mutagenezeom. Sljedeće, 1800 bp fragment koji sadrži beta laktamaznu ekspresijsku kazetu i ORI je amplificiran PCR-om iz pUC19 koristeći primere pUC19-FW i pUC19-RE. PCR produkt je spojen, koristeći *Acc65*I i *AgeI* restrikcijske endonukleaze sa sintetiziranim fragmentima "Gblock-BB" amplificiranih koristeći C9seq1 i C9seq2 i sječenih sa tip IIS restrikcijskim endonukleazama *Esp3I* za generiranje kompatibilnih krajeva. SV40 ORI replikacija je maknuta restrikcijom sa NgoMIV i re-ligacijom šireg fragmenta. Finalni konstrukt sadržava DTS regiju (TF vezujuću regiju SV40) za efikasan unos plazmida u jezgru (Dean., 1997) i selekciju s *BsaI* restrikcijskom stranom okrenutom prema van stvarajući "B" i "Z" tip krajeva za Golden Gate sklapanje (Slika 5.). Ta sekcija također sadrži ekspresijku kazetu za LacZα s lac promotorom i L3S1P13 sintetičkim terminatorom (Chen i sur.,2013) za plavo-bijelu selekciju nedigestiranih ili re-ligiranih vektora okosnice tijekom GoldenGate sklapanja.

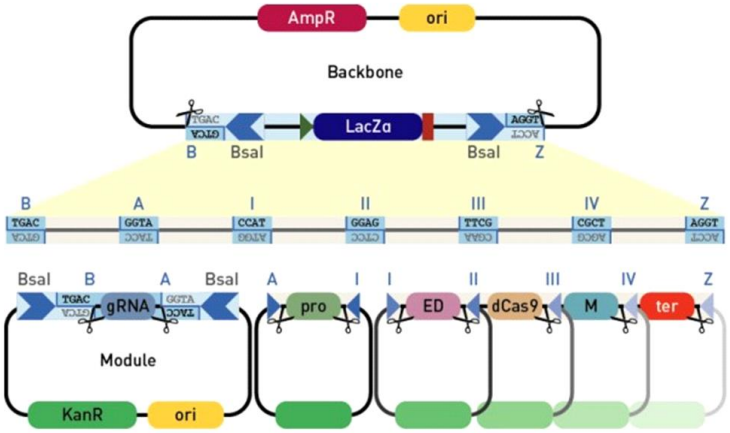
Kako bi se CRISPR/Cas9 sustav u stanicama kreirao potrebno je na osnovni plazmid fuzionirati sve komponente potrebne za ekspresiju CRISPR/Cas9 modularnog sustava za epigenetičku modulaciju.

Moduli su klonirani u pUK21 vektor (Addgene plasmid #49788) ili u vektora pUK21gg (optimiziranog za Golden Gate kloniranje koristeći tip IIS restrikcijske endonukleaze). Svaki modul je amplificiran PCR-om koristeći primere s prihvatljivim restrikcijskim stranama kompatibilnima za pUK21 MCS. Primeri također sadrže *BsaI* prepoznavajuću sekvencu prema van koja ostavlja prihvatljive 4 pb krajeve korištene za Golden Gate sklapanje (tip ovisan o modularnim pozicijama; Slika 6.). Sve neželjene *BpiI*, *BsaI* i *Esp3I* restrikcijske strane su maknute postraničnom mutagenezom, odnosno one koje sadrže fluorescentni i antibiotički otporni marker (PuroR, mRuby3, mClover3), a klonirane su koristeći pojednostavljenu strategiju, a NcoI restrikcijskim mjestima oko start kodona i KasI mjestom prepoznavanja koja kodiraju za 2 zadnje aminokiseline (Gly-Ala). Sva NcoI i KasI restrikcijska mjesta su uklonjena iz kodirajuće sekvence markera introducirajući tihu mutaciju usmjerenom mutagenezom. (Josipović i sur.2019.)

Destinacijski plazmid za selekcijske module (fluorescentni i antibiotički otporni marker) je pUK21_FP_entry koji sadrži sintetizirani genski fragment pFP-Entry kloniran između PstI i XhoI restrikcijskih strana u pUK21 vektoru kojem nedostaju KasI restrikcijske strane. KasI restrikcijska mjesta su uklonjena umetanjem kratkih oligonuklotida (pUK21_KasI-BamHI) između KasI i BamHI restrikcijskih mjesta u pUK21 vektor. Fragment pFP-Entry sadrži eukariotski promotor EFS, kao i prokariotski Lac promotor za vrednovanje fluorescentnih signala u životinjskim i bakterijskim stanicama. Dodatno 2 BpiI restrikcijske strane u fragmentu mogu poslije otpustiti fluorescentni

modul pod Lac promotorom za njihovu inserciju u gRNA module i u bijelo-crvenu selekciju. PCR amplificiran fluorescentnim modulom mRuby3 i mClover3 su onda bili klonirani koristeći NcoI i KasI strategiju u pUK21_FP_entry, rezultirajući s plazmidima pUK21_FP_mClover3 i pUK21_FP_mRuby3, koji mogu biti korišteni za konstrukciju jednog ili dvostrukog markernog modula. (Josipović i sur.2019.)

Za bijelo-crvenu selekciju, kodirajuća sekvenca za mRuby3 pod Lac promotorom je izrezana od završenog mRuby3 modula sa BpiI restrikcijskim enzimima (opisanima gore) i umetnutih unutar pSg-Sp modula (gRNA module za SpCas9) untar dviju BpiI restrikcijskih mjesta korištenih za inserciju gRNA varijabilnih djelova. Modul pSg-Sa (gRNA modul za SaCas9) je amplificiran iz pX601-AAV-CMV::NLS-SaCas9-NLS-3xHA-bGHpA;U6:BsaI-sgRNA (Addgene plasmid #61591); originalno Esp3I restrikcijsko mjesto za gRNA kloniranje je zamjenjeno s BpiI stranom i mRuby3 kazeta za bijelo-crvenu selekciju je dodana analogno pSg-Sp. (Josipović i sur.2019.)



Slika 6. Golden Gate sklapanje individualnih modula u kazetu za eukariotsku ekspresiju. (Izvor: Josipović i sur.2019.)

Prema Slici 6. komponente su spojene kroz nepalindromna 4 kohezivna kraja generirana s tipom IIS restrikcijskim enzimima (Golden Gate kloniranje), koje omogućuje efikasno sklapanje velikog broja DNA fragmenata. *Backbone* plazmid sadrži lacZα kazete za bijelo-plavu selekciju bakterijskih kolonija sa necjepanim/religiranim okosnicama, dok bakterija uzima samo module plazmide koji su eliminirani *counter* selekcijom sa ampilicinom. Bijele kolonije sadrže korektno sklopljene eukariotske ekspresijske kazete za selektirani dCas9 fuzijski konstrukt. Ako gRNA moduli nemaju prethodno klonirane varijabilne djelove ili prihvaćene višestruke djelove ili drugi ciklus viševodnog sklapanja, pozitivne kolonije su crvene i gRNA (ili viševodne) kloniranje je

olakšano plavo-bijelom selekcijom. (Josipović i sur.2019.)

Moduli za dSpCas9 i dSaCas9, inicijalno napravljeni za C-terminalnu fuziju efektorske domene su prenamjenjeni za ulogu N-terminalne fuzije. Specifični Golden Gate krajevi “I” i “II” su promjenjeni u “II” i “III”. Zbog toga su, specifično *oligo-annealed* nukleotidi (N-C9), koji definiraju nove krajeve, klonirani između HindIII i XhoI restrikcijske strane u pUK21gg vektor. Moduli u dSpCas9 i dSaCas9 tada su izrezani koristeći BsaI i klonirani u dvije BpiI restrikcijske stane u pUK21gg_N-C9 vektor.(Josipović i sur.2019.)

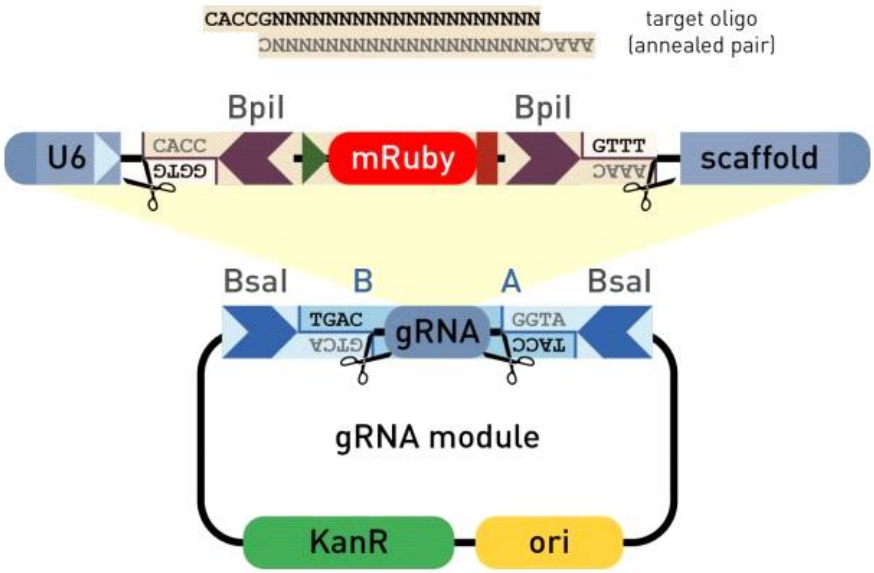
Funkcionalni moduli za N-terminalnu fuziju sa dCas9 modulom su napravljeni analogno. Inicijalno, krajevi tipa “II” i “III” su promjenjeni u krajeve tip “I” i “II” kloniranjem DNMT3A, TET1 i VPR modula u 2 BpiI restrickcijske strane u pUK21gg_N-FD. (Josipović i sur.2019.)

U C-terminalnoj fuziiji sa dCas9, nukleoplazmin NLS može biti povezan s efektorskom domenom (DNMT3A). Tako, za testiranje efekta nukleoplasmina NLS na C-terminalnu DNMT3A efektorsku domenu, specifično *oligo-annealed* nukleotid FD_c-NLS-NP je kloniran između KasI i XhoI restrikcijske strane u pUK21gg vektoru. Oligonuleotidi sadrže dvije Esp3I restrikcijske strane za DNMT3A kloniranje sa nukleoplazminom NLS nizvodno od klonirajuće strane. DNMT3A efektorske domene su tada izrezane od završnog modularnog vektora, inicijalno napravljeno za C-terminalnu fuziju sa dCas9, sa BsaI restrikcijskim enzimima i kloniranima u pFD_c-NLS-NP vektor. (Josipović i sur.2019.)

3.2. Konstrukcija sustava za višestruko navođenje gRNA

Prvo, "individualni" moduli za Golden Gate sklapanje gRNAs na poziciji 1-6 u sustavu za višestruko navođenje su stvoreni kako slijedi. Neželjene NgoMIV i XhoI restrikcijske strane su maknute iz plazmida pFUS_A (Addgene plasmid #31028) i nove NgoMIV restrikcijske strane su introducirane nizvodno iz višeklonirajuće strane postraničnom mutagenezom. Bivše klonirajuće strane iz plazmida pUK21 (Addgene plasmid #49788) su izrezane sa SapI i NgoMIV i umetnute u izmjenjeni pFUS_A, te daju plazmid pUS21gg. Šest različitih parova *oligo-annealed* nukleotida (sgM1-6) su klonirani u KasI i XhoI restrikcijske strane, a svaka nosi 2 Esp3I restrikcijske strane koje stvaraju različite 4 nt 5' ljepljive krajeve označene sa rimskim znakovima od I do VII, odgovarajući krajevima od B-Z u sustavu za sklapanje fuzijskog konstrukta. Adaptirana (XbaI_B_C9seq1_A_NcoI) je *oligo-annealed*sekvenca i umetnuta između XbaI i NcoI strane, olakšavajući BsaI kloniranje završenih plazmida gRNA kazeta (uključujući mRuby3 ekspresiju za bijelo-crvenu selekciju) niz modula pSg-Sa i pSg-Sp, prethodno stvarajući 4 za jedno gRNA kloniranje u sustavu za dCas9 fuzije (opisanih u prethodnoj sekciji). Dva seta od 6 različitih plazmida za kloniranje individualnih gRNA molekula za SaCas9 i SpCas9 su napravljeni (pSgMxA predstavlja plazmide za SaCas9 gRNA molekule dok pSgMxG predstavljaju plazmid za SpCas9 gRNA molekule, x = (1, 2, 3, 4, 5, 6)), kako bi bilo moguće sklapanje (koristeći Esp3I tip IIS enzime) do 6 različitih gRNA modula, svaki noseći gRNA ekspresijsku kazetu. Sljedeći, "*multi-guide*" moduli su stvarani da zamjenjuju gRNA modul u sklapanju fuzijskog konstrukta i omogućuju kloniranje od 1 do 6 "individualnih" gRNA modula sustava za višestruko navođenje. Kanamicin rezistentni gen i ORI su amplificirani iz pUK21 (Addgene plasmid #49788) s početnicama koji omogućuju ligaciju na više-klonirajućim stranama izrezanim iz istog plazmida s NgoMIV i SapI, koji rezultira micanjem dviju neželjenih Esp3I restrikcijskih strana. Treća mutageneza sa Esp3I restrikcijskom stranom (lociranom unutar kanamicin rezistentnog gena) je maknuta postraničnom mutagenezom, dajući plazmid pUK21gg. Par *oligo-annealed* nukleotida (SgMult) sadržavajući jednu restikcijsku stranu za Esp3I koja definira kohezivni kraj "I" potreban je za sklapanje prvih gRNA modula i BsaI restrikcijskih strana koje definiraju ljepljivi kraj imena “B” potrebnog za sklapanje funkcionalnih konstrukta za epigenetičku modulaciju te je kloniran unutar KasI i NcoI restrikcijskih strana. Šest različitih *annealed* parova (SgMx1-6), svaki sadržavajući Esp3I restikcijske strane definiraju druge ljepljive krajeva imena “2-7” koji determiniraju kapacitet prihvatljiv do 6 različitih gRNA sklopljenih modula i BsaI restrikcijske strane koji definiraju ljepljiv kraj imena “A” su klonirani unutar NcoI i XhoI strana. U završnom koraku, mRuby3 fluorescentni markeri pod Lac promotorima izrezani su iz plazmida sadržavajući mRuby3 module (opisane u prijašnjim sekcijama) sa BpiI i kloniranih između BpiI restrikcijske strane koje su bile predstavljene s kloniranjem prvih parova *oligo-annealed* nukleotida (SgMult). Marker mRuby je korišten za bijelo-crvenu selekciju

točnog gRNA modula prateći sklapanje sa Esp3I restrikcijskim enzimima. Krajnji produkt ovoga koraka su plazmidi (pSg-x1 to pSg-x6) koji imaju kapacitet za prihvaćanje do šest gRNA modula s Esp3I-posredovanim sklapanjem. (Josipović i sur.2019.)



Slika 7. 20 bp gRNA variijabilna regija je klonirana u modularni vektor *oligo-annealing* metodom (Izvor: Josipović i sur.2019.)

Slika 8 prikazuje 20 bp gRNA varijabilnu regiju jkoja e klonirana u modularni vektor *oligo-annealing* metodom. Svaki individualni gRNA modul sadrži U6 promotor, gRNA *scaffold* ili SaCas9 ili SpCas9 i fragment da bude izrezan tipom IIS endonukleaza BpiI na 5' kraju gRNA skele, koji priprema vektor za prihvaćanje 20 bp varijabilnih gRNA fragmenata (umetnutog oligo kloniranjem) dodjeljujući specifičnost za partikularnu genomsku regiju. Izrezani dio kodira za bakterijsku kazetu za ekspresiju mRuby3 fluorescentnog proteina, koji daje kolonijama crvenu boju i tako olakšava bijelo-plavu selekciju. Alternativno, gRNA modul može biti substituiran za više-vođeni model prihvaćajući jedan do šest gRNA modula za drugi krug sklapanja (Josipović i sur.2019.).

3.3. Stvaranje dual marker sustava

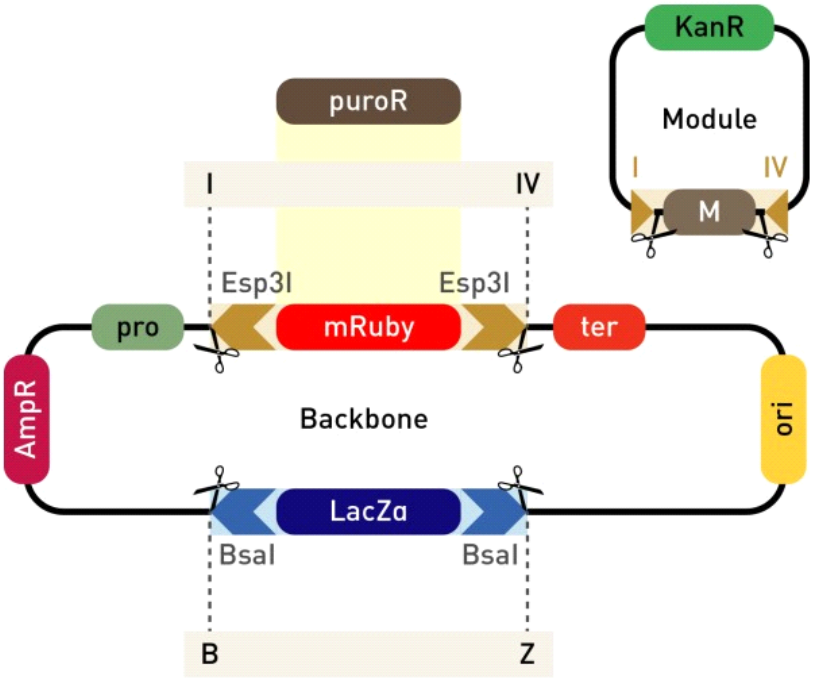
Plazmidi za dvostruki marker sustav na prvoj poziciji sa krajevima "III" do "X" su generirani iz korespondirajućih modula sa krajevima tip "III" i „IV“ amplificirajuci T2A regiju plazmida pUK21_FP_T2A koristeći početnice T2A_X-FW i T2A_X-RE, koje adiraju nekomplementarnu ekstenziju potrebnu za pretvorbu kraja "IV" u "X". PCR produkt poslije kloniran između HindIII i XhoI restrikcijske strane u plazmid pUK21_no KasI i intermedijarni plazmid je tada imenovan u pM2-FP_T2A-X. (Josipović i sur.2019.)

Za sekundarnu poziciju, "prazni" plazmid pM2-FP_X-P2A je generiran amplificirajući DNA fragment Gblock-BB (također korišten za konstrukciju *backbone* plazmida) koristeći početnice C9seq3 i C9seq4 i kloniranje PCR produkta u pUK21_FP_T2A vektor između NcoI i HindIII restrikcijske strane.

Marker kodirajuća sekvenca za rezistenciju na antibiotik ili fluorescentni protein umetnuta je u pM2-FP_T2A-X i pM2-FP_X-P2A. (Josipović i sur.2019.)

3.3.1. Oligo kloniranje varijabilnih djelova gRNA modula

Varijabilni djelovi gRNA su klonirani u pravilne modele esencijalne kako je opisano (Cong i sur., 2013). Oligonukleotidi dizajnirani za tvorbu dsDNA sa visećim kompatibilnim krajevima sa gRNA modulima (Slika 5.) su sintetizirani. Bili su fosforilirani na 5' kraju i *annealed* u reakciji sadržavajući 100 pmol svakog nukelotida, 1× T4 ligacijski pufer (TaKaRa) i 5 U od T4 polinukleotidne kinaze (NEB). Fosforilacija je napravljena na 37°C tijekom 30 min, praćena denaturacijom na 95°C tijekom 5 min. Oligonukleotidi su *annealed* u thermocycleru postepenim smanjenjem temperature za 5°C po minuti, od 95°C do dolje 25°C. Fosforilirani i *annealed* oligonukleotidi su tada klonirani u module plazmida u jednu reakciju sadržavajući 1× Buffer G (Thermo Fisher Scientific), 0.5 mM DTT (Thermo Fisher Scientific) 0.5 mM ATP, 350 U od T4 DNA ligaze i 10 U tipa IIS restrkcijskih enzima BpiI (Thermo Fisher Scientific). Reakcijski uvjeti se sastoje od šest ciklusa na 37°C tijekom 5 min i 23°C tijekom 5 min. Tretman egzonukleazom V je napravljen direktno dodajući 10 U enzima u reakcijski mix zajedno sa adicionalnim 0.5 mM ATP i inkubirajući za 30 min na 37°C da bi maknuli zaostale linearne DNA. Nakon 6 bakterijskih tranformacija, bijele kolonije su selektirane za daljnju verifikaciju (crvene kolonije predstavaljaju nerezani ili prazni *backbone* vektor). (Josipović i sur.2019.)



Slika 8. Sekundarna kazeta za ekspresiju selekcijskog markera odvojenog od dCas9/ED fuzije. (Izvor: Josipović i sur.2019.)

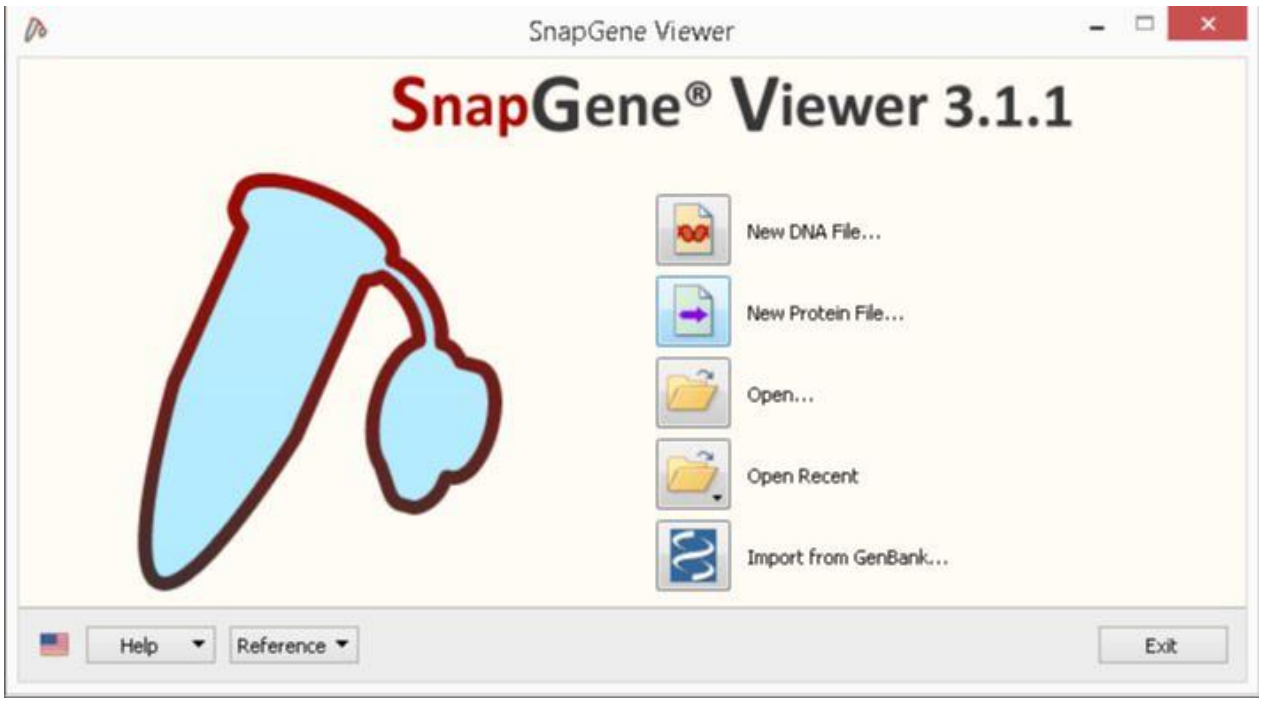
Legenda: prema slici 9. prikazana je sekundarna kazeta za ekspresiju selekcijskog markera odvojenog od dCas9/ED fuzije. *Backbona* prihvaća adicionalni modul za proteinski marker putem Esp3I Golden Gate kloniranja. Nakon toga, marker je ekspresiran pod jakim (SV40) promotorom nezavisnim od glavnog fuzijskog konstrukta sklopljenog koristeći standardni protokol. To omogućuje strogu kontrolu (specijalno od puromicina) dok daje fleksibilnost za biranje slabijeg promotora za glavnu dCas9 fuzijsku kazetu, time omogućujući fino ugađanje potrebno za kontroliranje *off-target* utjecaja. (Josipović i sur.2019.).

3.3.2. Potvrđivanje dvojne transfekcije koristeći fluorescentne markere

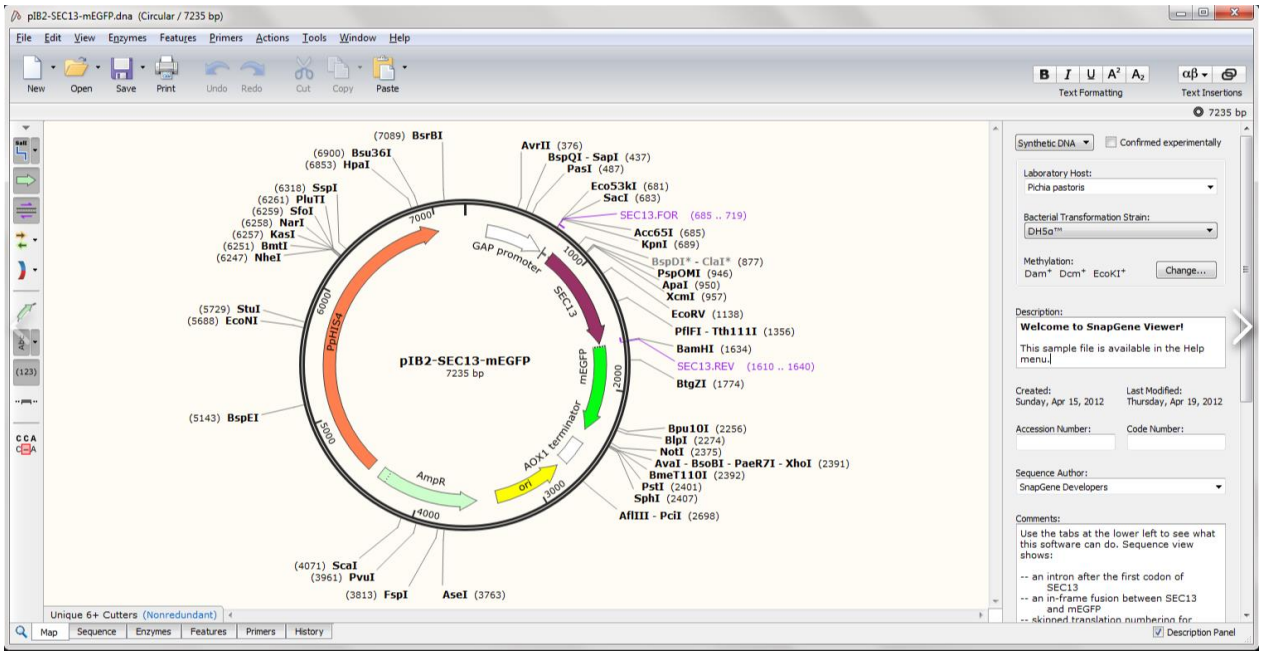
Praćena je transfekcija HEK293 i BG1 stranica sa plazmidom za ekspresiju fuzijskog proteina promatrajući crvenu mRuby3 i žuto-zeleni mClover3 (Bajar i sur., 2016.) te fluorescenciju fuzioniranih fluorescentnih proteina prevedenih u isti okvir za čitanje kao i dCas9 fuzijski konstrukt koji je povezan putem samo-cjepajućih 2A peptida. Slike su sakupljene pod istim uvjetima koristeći Olympus IX73 mikroskop. Pozitivne stanice za mClover3 i mRuby3 fluorescenciju su prebrojane koristeći Object Count alat u Olympus cellSens Standard software-u. Fluorescencija je slikana koristeći Olympus filter sets U-FRFP (mRuby3) i U-FYFP (mClover3), koji osigurava dobru odvojenost fluorescentnog signala. (Josipović i sur.2019.)

3.3.3. SnapGene viewer i Ligase Fidelity viewer

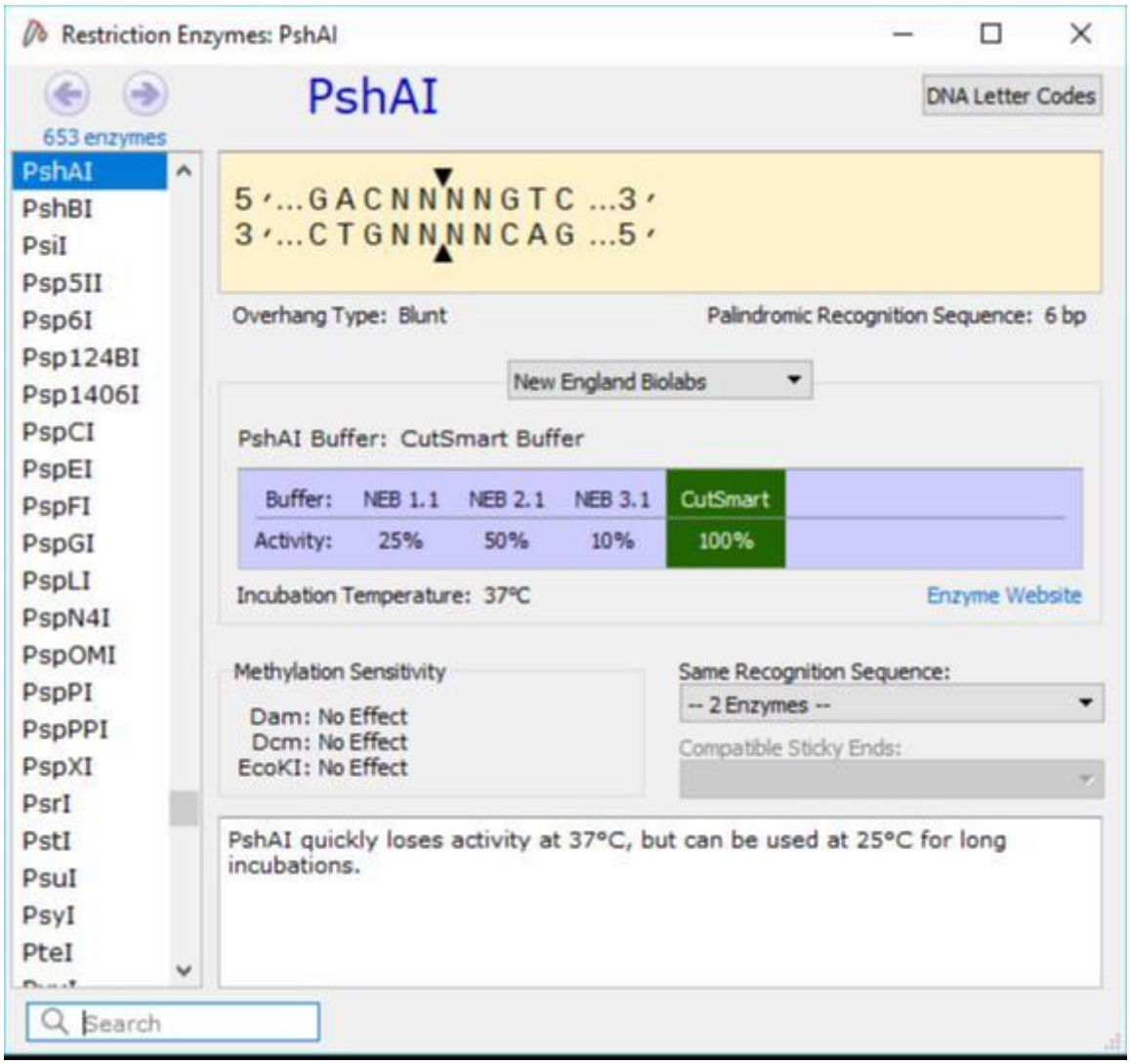
SnapGene viewer je programski softvare za virtualnu konstrukciju nukelotidnih fragmenata i cijelih plazmida. U SnapGene vieweru možemo već konstuirane plazmide prenamjenit i dizajnirati za naše potrebe. Daje nam uvid u redoslijed DNA baza, pojedinih sekvenci, kompletnih plazmida i restrikcijskih enzima, njihovih prepoznavajućih i sječućih strana i mogućnost obilježavanja onih djelova fragmenata koje želimo naglasiti i koji su bitni u konstrukciji našeg novog plazmida. Daje nam uvid u povijest korištenih konstrukta i njihov pregled kako smo do njih došli. Sam softwere sadrži sve dosada poznate komercijalne restrikcijske enzime koje možemo koristiti za otvaranje i sklapanje naših plazmida (Slika 10,11, 12.).



Slika 9. Početno sučelje SnapGene viewer 3.1.1. (Izvor:https://snapgene-viewer.software.informer.com/#google_vignette)

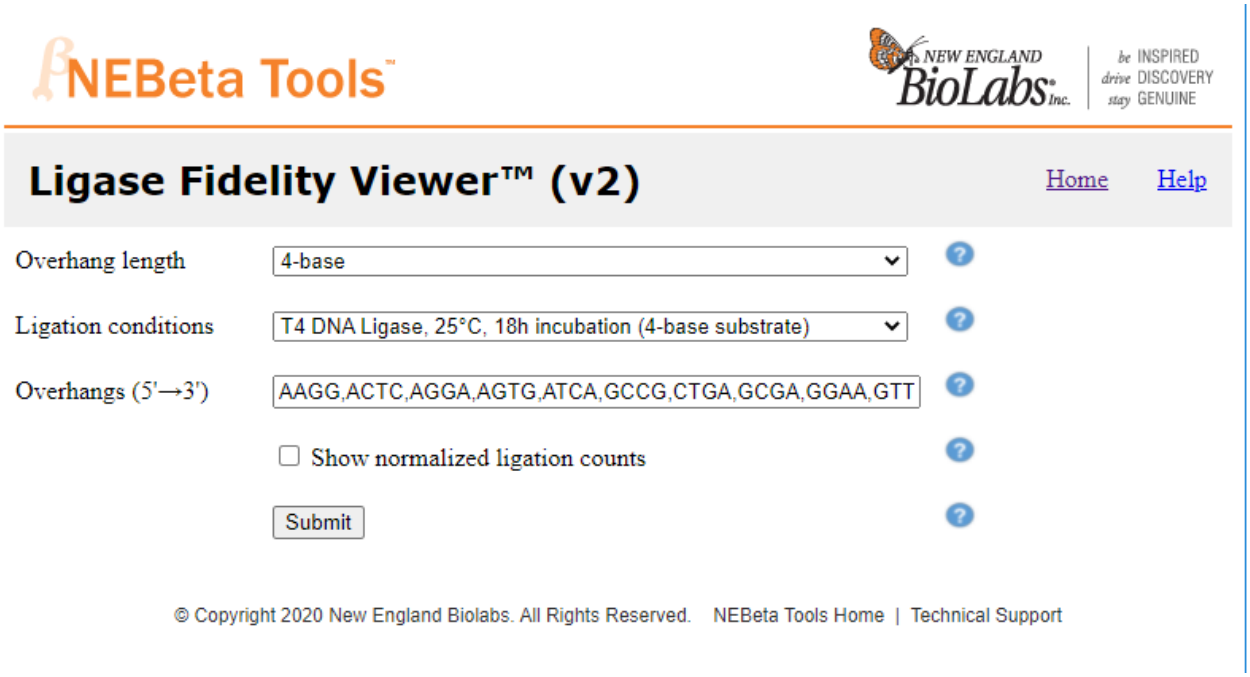


Slika 10.Radno sučelje SnapGene viewer-a 3.1.1. (Izvor:https://snapgene-viewer.software.informer.com/#google_vignette)



Slika 11. Pretraživač restrikcijskih enzima u SnapGene vewer 3.1.1.(Izvor: https://snapgene-viewer.software.informer.com/#google_vignette)

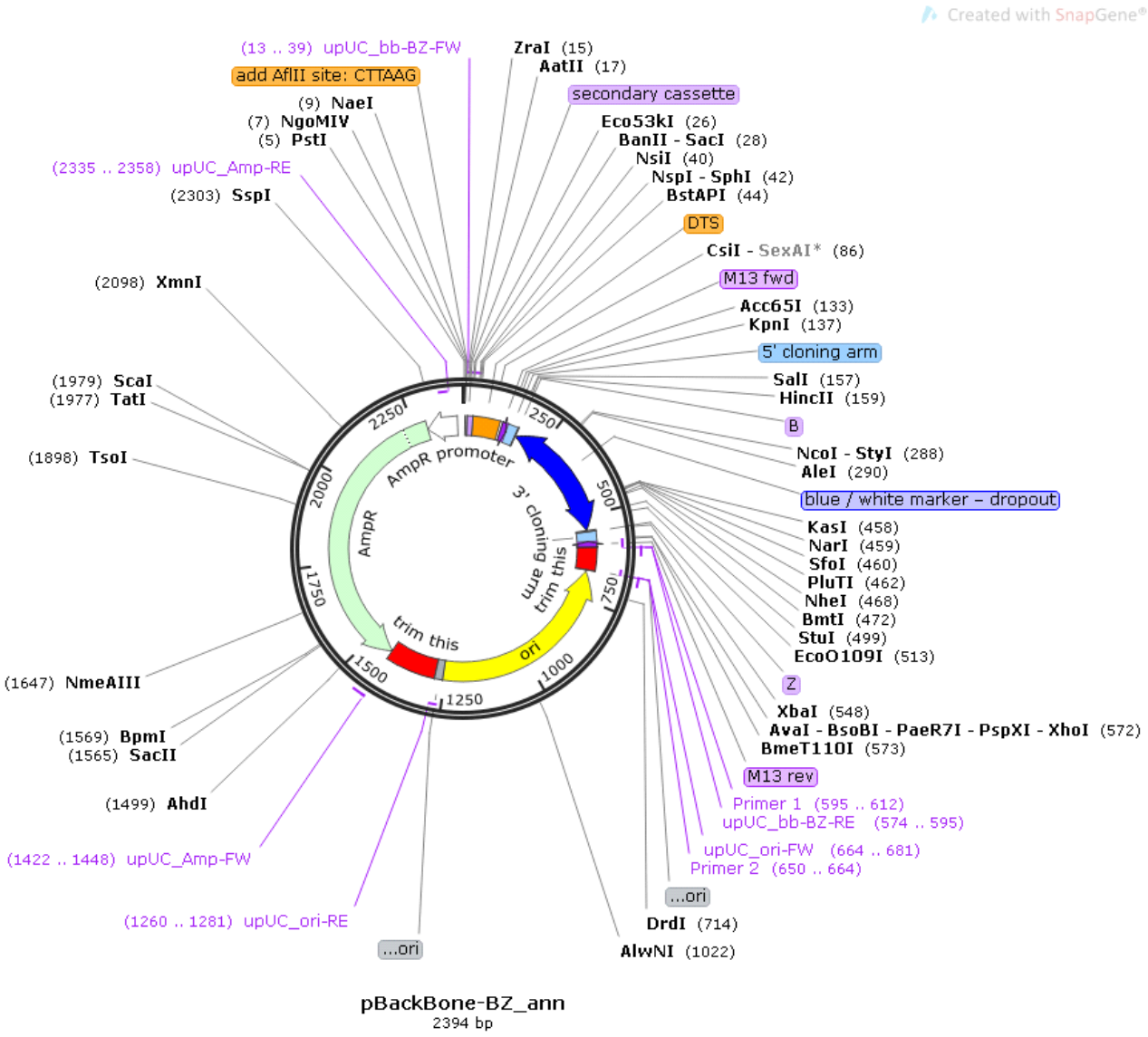
*Ligase fidelity viewe*r (http://ggtools.neb.com/viewset/run.cgi) nam daje uvid koji krajevi su međusobno kompatibilni odnosno koje kombinacije od 4 bazna ili 3 baznih parova su najbolji za sparivanje. Također možemo birati uvjete ligacije odnosno ligazu, temperaturu i vrijeme inkubacije (Slika 13).



Slika 12. Ligase Fidelity viewer sučelje (Izvor: https://ggtools.neb.com/viewset/run.cgi)

4.REZULTATI

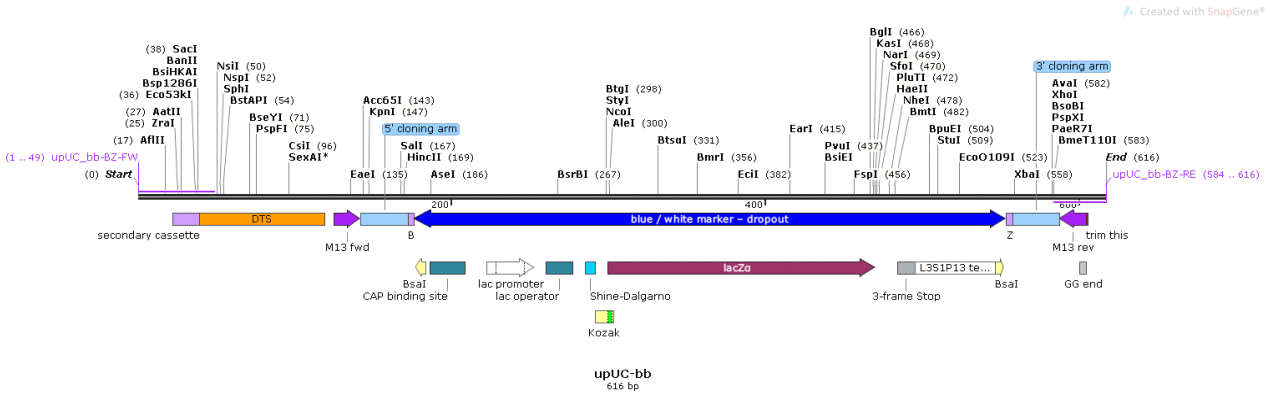
4.1. Stvaranje minimalnog plazmida



Slika 13. pBackBone-BZ_ann

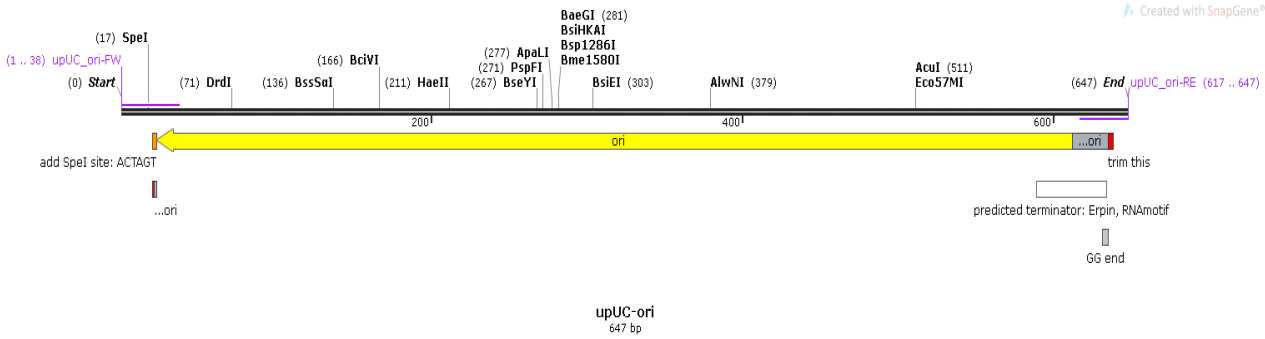
Plazmid pBackBone-BZ_ann(Slika 13.) ima 2394 bp) sastoji se od 8 početnica upUC_bb-BZ-FW, upUC_b b-BZ-RE, Primer 1, Primer 2, upUC_ori-FW, upUC_ori-RE,

upUC_Amp-FW, upUC_Amp-RE. Unutar sekvenci nukleotida dvostruke cirkularne plazmidne DNA nalazi se 666 komercijalnih restrikcijskih strana za cijepanje (Slika 14.) te pBackBone-BZ_ann ligiranje djelova plazmida od čega 51 jedinstveni rezač, 79 jedinstvenih i dvostrukih rezača, 198 6+ rezača, 47 jedinstvenih 6+ rezača, 61 tip2 enzima i 12 nicked endonukleaza. Unutar pBackBone-BZ_ann plazmida možemo promatrati i regiju origin of replication (ORI) na čijem se početku nalazi i početnica upUC_ori-FW koja služi za početak replikacije bakterijskog plazmida u bakterijskoj stanici a koja završava sori sekvencomkoja je sastavni dio terminatora Erpina i RNAmotif-a.Osim zadnjeg nukelotidnog para CG na 1278 poziciji koji pak zajedno s tri nukleotidne sekvence kraja terminatora Erpin i RNAmotif ORI regije čini Golden Gate kraj. Na samom kraju ORI regije nalazi se i početnica upUC_ori-RE. Plazmid bBackBone-BZ_ann sadrži i gen AmpR koji počinje s početnicom upUC_Amp-RE za ampicilinsku rezistenciju koja bakterijskoj stanici omogućava otpornost na prisutnost antibiotika ampicilina iz okoliša a završava sa početnicom upUC_Amp-FW te s promotornom sekvencom Amp promotor. Plazmid pBackBone-BZ_ann sadrži i marker za plavo-bijelu selekciju omeđenog *BsaI* restrikcijskim stranama unutar kojih se od uzvodno prema nizvodno najprije nalazi CAP vezujuća strana, lac promotor, lac operator, Shine-Dalgarno, Kozak sekvenca, fragment gena lacZα, 3-frame Stop te L3S1PI3 terminatorska sekvenca koja završava s *BsaI* restrikcijskom stranom. Nizvodno se nastavlja Z tip kraja za Golden Gate kloniranje, a slijedi ga 3' klonirajuća ruka, M13 rev s Golden Gate krajem. Regija trim this koja će biti isključena u sljedećem koraku počinje sa početnicom Primer 1. Nakon nje slijedi regija ORI koja zajedno s krajem trim this djeli početnicu upUC_ori-FW. Fragmente pBackBone-BZ plazmida točnije fragment upUC-ori koji nosi origin of replication (ORI), fragment upUC-Amp nosača gena AmpR za ampicilinsku rezistenciju kao i fragment upUC-bb koji sadrži marker za plavo-bijelu selekciju omeđenog sa 5' i 3' klonirajućom rukom zajedno sa DTS regijom koja sadrži TF iz SV40 vektora za unos plazmida u jezgru stanice amplificirali smo koristeći početnice. Za amplifikaciju fragmenta upUC-bb iz bBackBone-BZ_ann od BbsI(13) restrikcijske strane do BbsI(545) restrikcijske strane PCR-om koristili smo upUC_bb-BZ-FW i upUC_bb-BZ-RE početnice iz M13 vektora; za amplifikaciju upUC-ori fragmenta iz bBackBone-BZ_ann plazmida od BbsI (664) restrikcijske strane do BbsI(1281) restrikcijske strane PCR-om koristili smo upUC_ori-FW i upUC_ori-RE početnice; za amplifikaciju fragmenta upUC-Amp iz bBackBone-BZ_ann plazmida od BbsI(1422) restrikcijske strane do BbsI(2358) restrikcijske strane PCR-om koristili smo upUC_Amp-FW i upUC_Amp-RE početnice. Amplificirani fragment upUC-Amp ima 962 bazna para, fragment upUC-ori ima 647 parova baza i fragment upUC-bb 616 parova baza. Svaki od tih fragmenata smo cijepali koristeci *Bbs*I tipII restrikcijsku endonukleazu koja prepoznaje nepalindromne sekvence od 6 pb koje imaju slijed nukelotida GAAGAC, a ostavljaju ljepljive krajeve. Dobivene umnožene fragmente upUC-bb od BbsI(600) restrikcijske strane do BbsI(12) restrikcijske strane prikazuje Slika15.

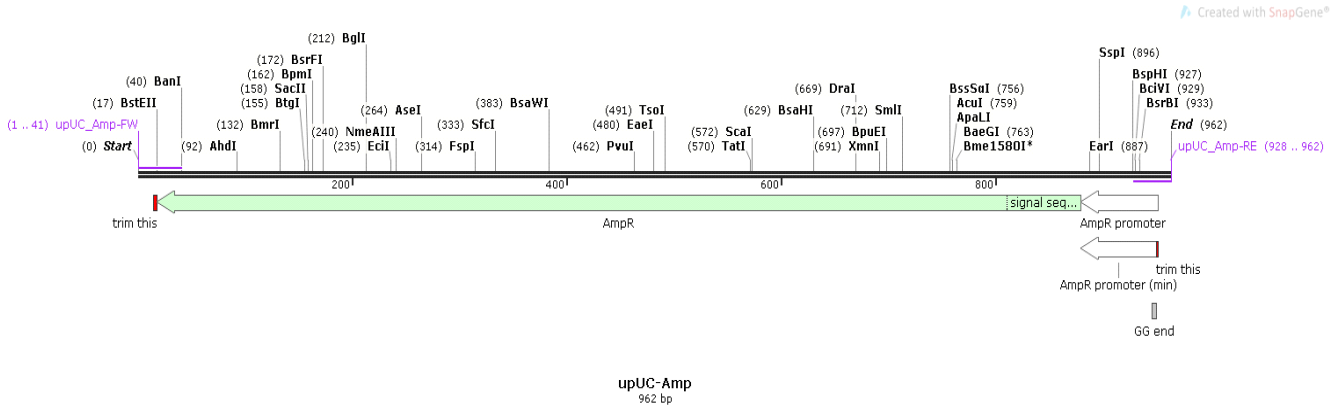


Slika 14. Ampilicinski fragment za marker za plavo-bijelu selekciju iz pBacBoneBZ_ann plazmida (upUC-bb)

Restirkcijske strane upUC-ori od BbsI(12) do Bbsi(631) restrikcijske strane prikazuje Slika15.

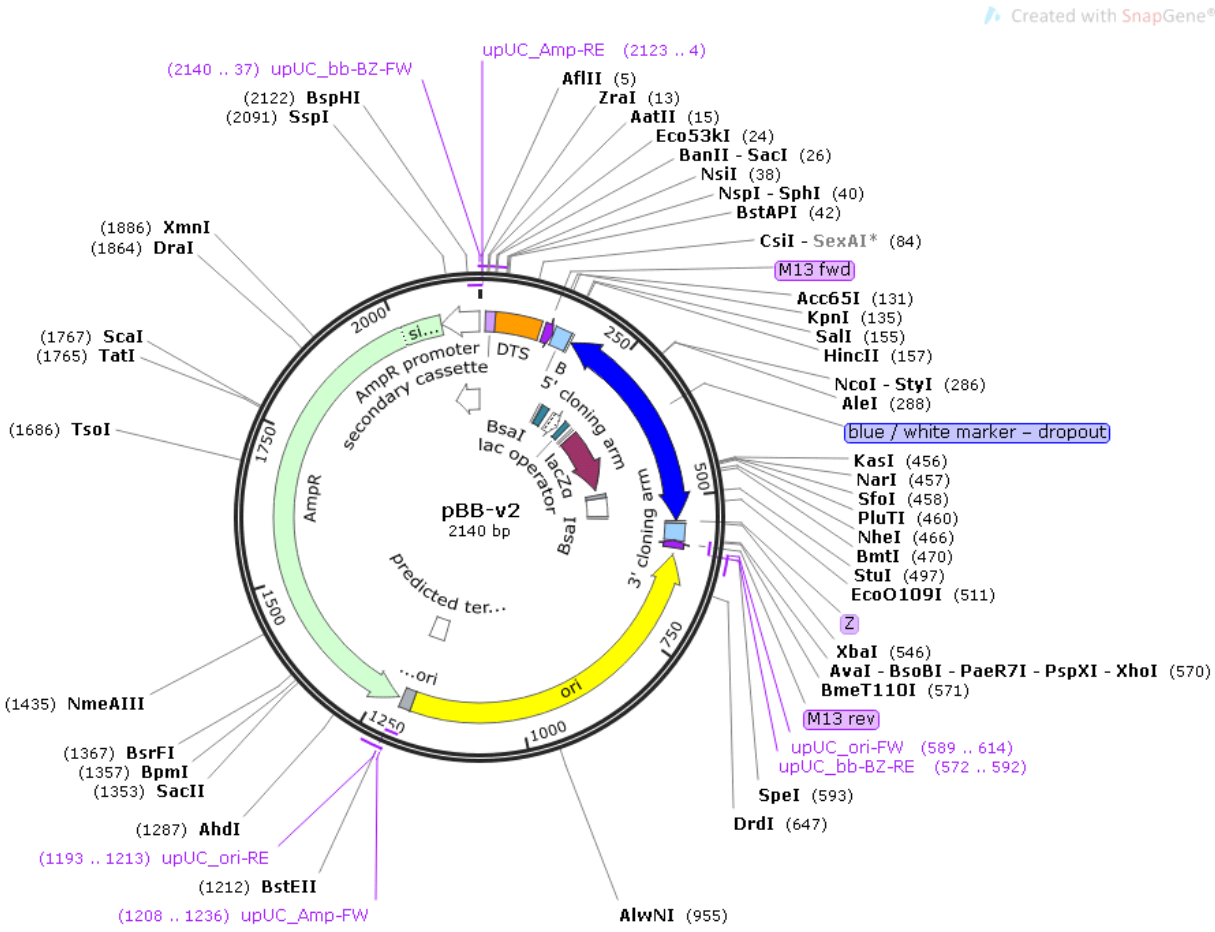


Slika15. Amplificirani fragment ORI-a iz pBackBoneBZ_ann plazmida (upUC-ori)



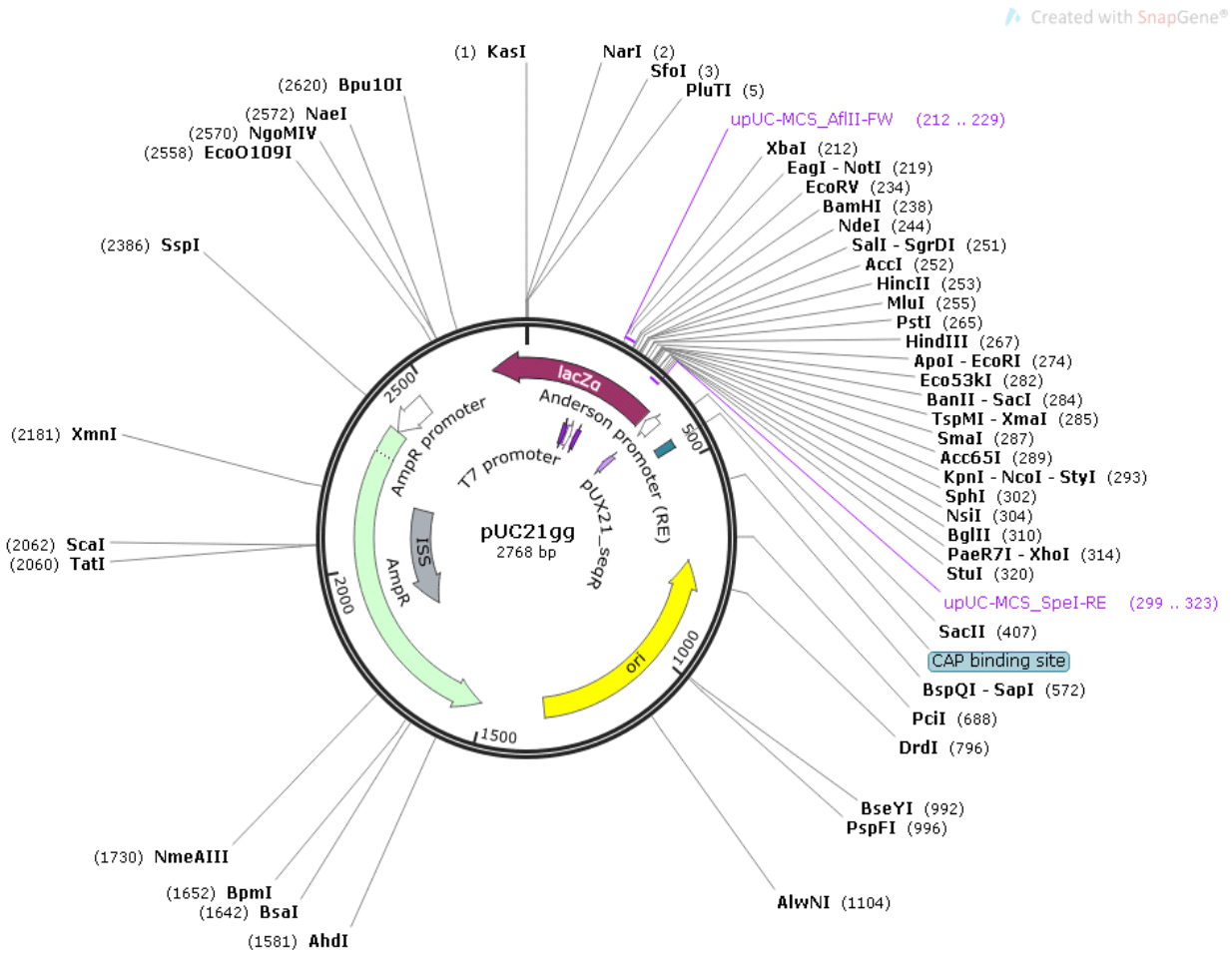
Slika 16. Amplificirani fragment ampilicinske rezistencije iz pBackBoneBZ_ann (upUC-AmpR)

Slika 16. prikazuje upUC-Amp od BbsI(12) do BbsI(945) restrikcijske strane koje smo ligirali DNA ligazom koristeći BbsI ljepljive restrikcijske strane te smo konstruriali plazmid pBB-v2 (Slika 17.) koji ima 2140 pb te je stoga za 240 pb manji od pBackBone-BZ_ann plazmida.



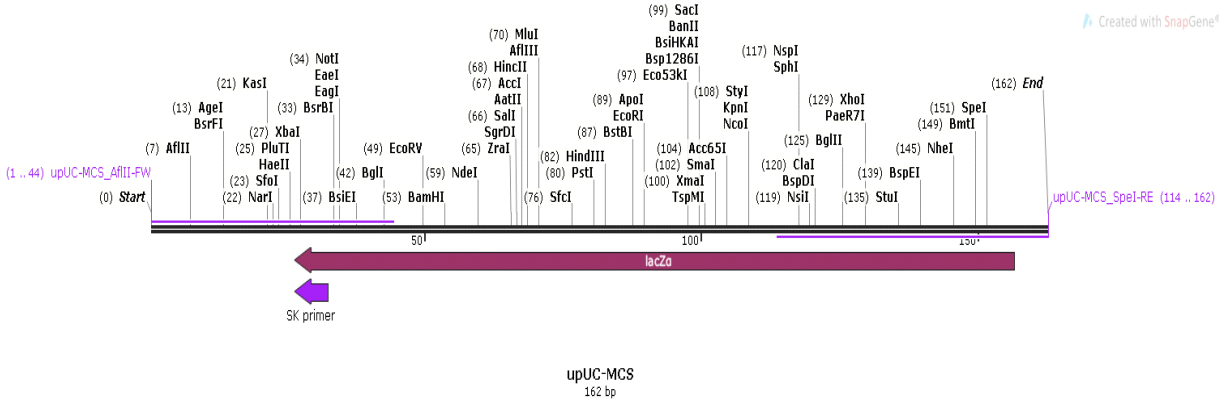
Slika 17. pBB-v2 plazmid

Plazmid pUC21gg (Slika 18.) od 2768 pb koji sadrži gen za ampicilinsku rezistenciju AmpR i ORI regiju te fragment gena lacZα koji kodira za enzim β-galaktozidazu koji u sebi osim što nosi višestruko klonirajuću regiju MCS *(multi-cloning site)* sadrži i M13 fwd početnicu i SK početnicu, T7 promotor i pUK21-seqF i djelomično M13 rev početnicu. Plazmid pUC21gg sadrži i lac operator unutar Andersenovog promotora i pUX21_seqR.



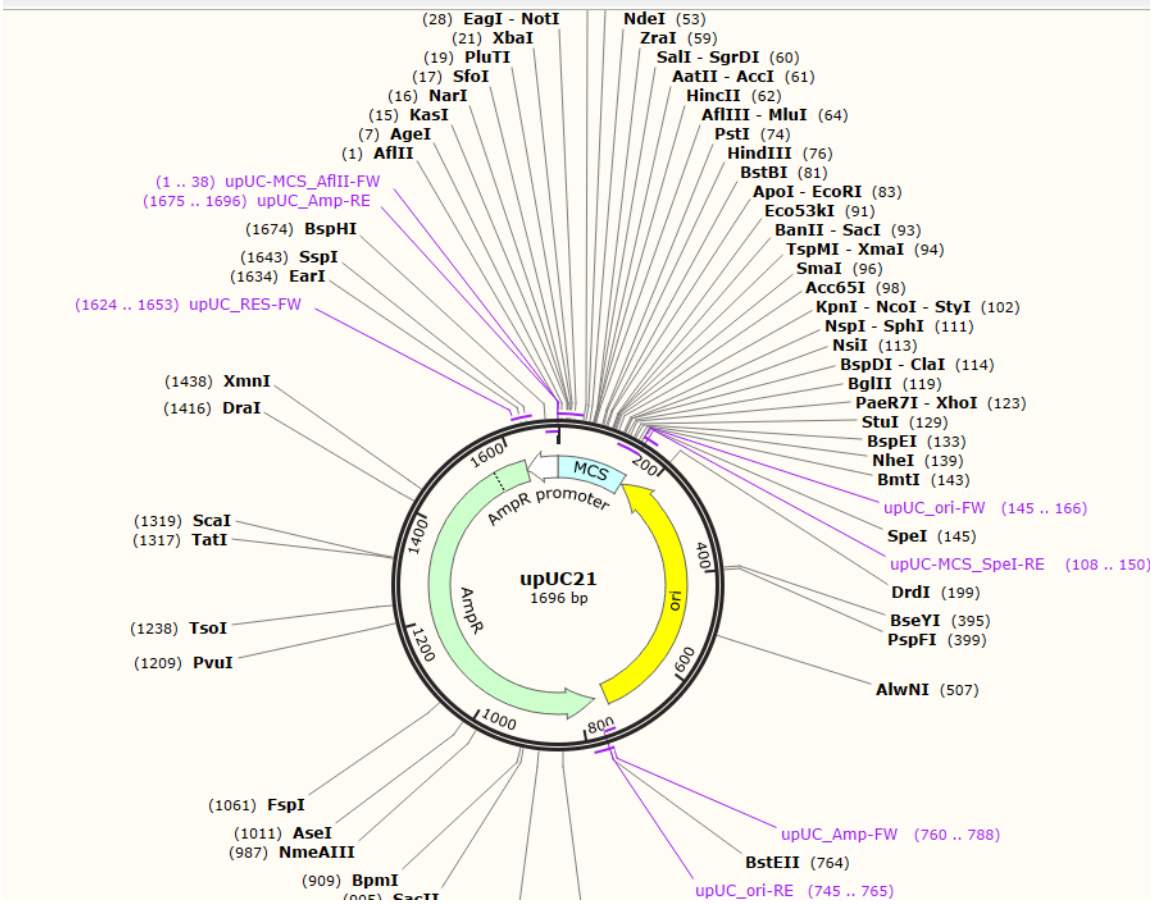
Slika 18. pUC21gg plazmid

Upravo fragment upUC-MCS fragmenta lacZα gena, lacZα nam je potrebno umnožiti pomoću PCR-a koristeći upUC-MCS_AflII-FW i upUC-MCS_SpeI-RE početnice te dobiti fragment upUC-MCS (Slika 19.).

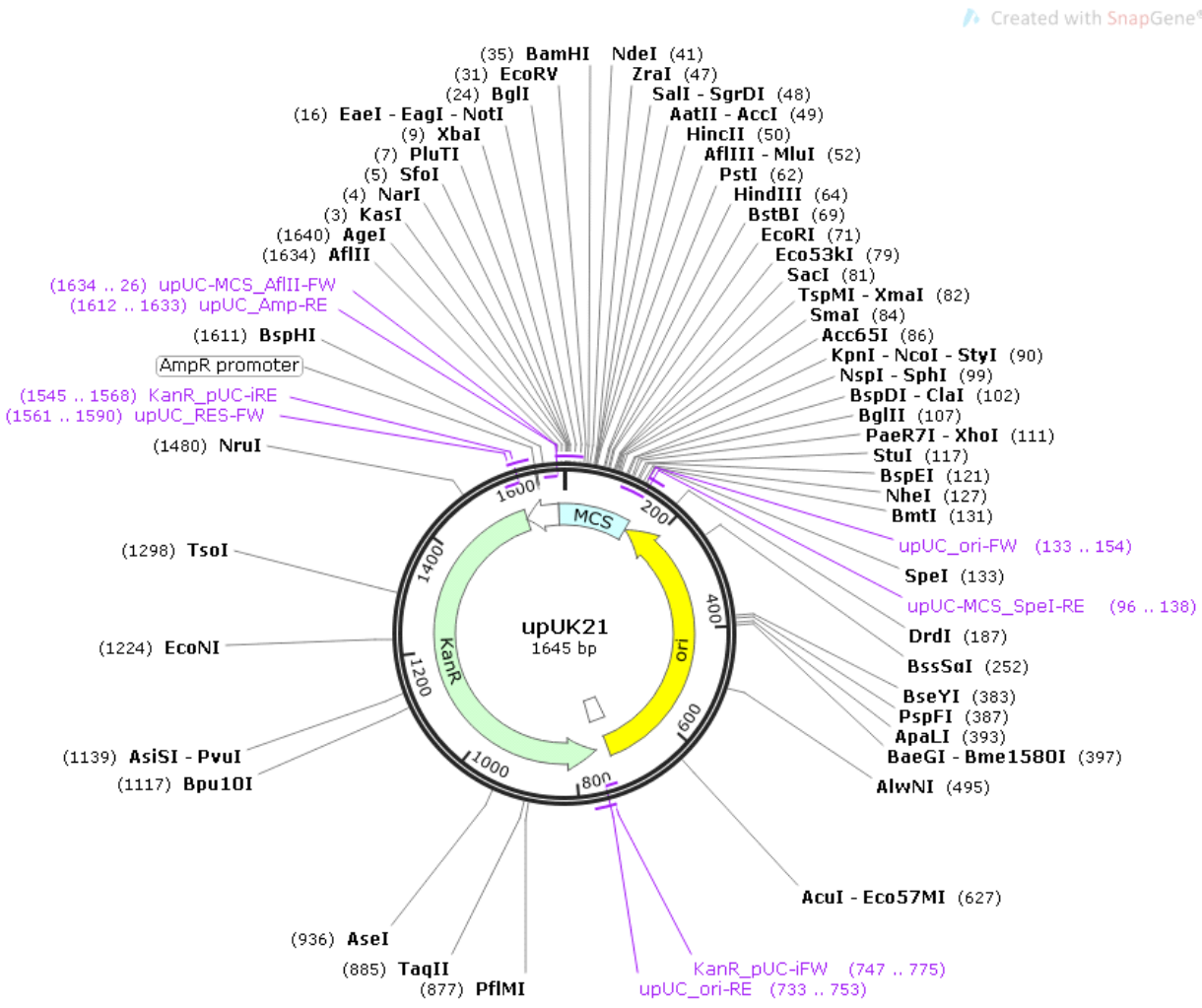


Slika 19. Amplificirani fragmenat za lacZα promotor iz plazmida pUC21gg (upUC-MCS)

Taj fragmentima 162 pb koristeći *AflII* restrikcijski enzim koji prepoznaje slijed nukleotida CTTAAG na AflII(212) restrikcijskoj strani i *SpeI* restrikcijski enzim koji prepoznaje ACTAGT slijed nukelotida na SpeI (332) restrikcijskoj strani. Fragment upUC-MCS smo ligirali u pBB-v2 plazmid zamjenjujući dio pBB-v2 plazmida od AflII(1) restrikcijske strane do SpeI(589) restrikcijske strane koja sadrži DTS regiju, marker za plavo bijelu selekciju između 5' i 3' klonirajućih ruku s B i Z krajevima za GG kloniranje s AflII(7) restrikcijskom stranom do SpeI(151) restrikcijske strane novog fragmenta upUC-MCS koji nosi fragment fragmenta lacαZ gen te smo dobili upUC21 (Slika 20.) plazmid.

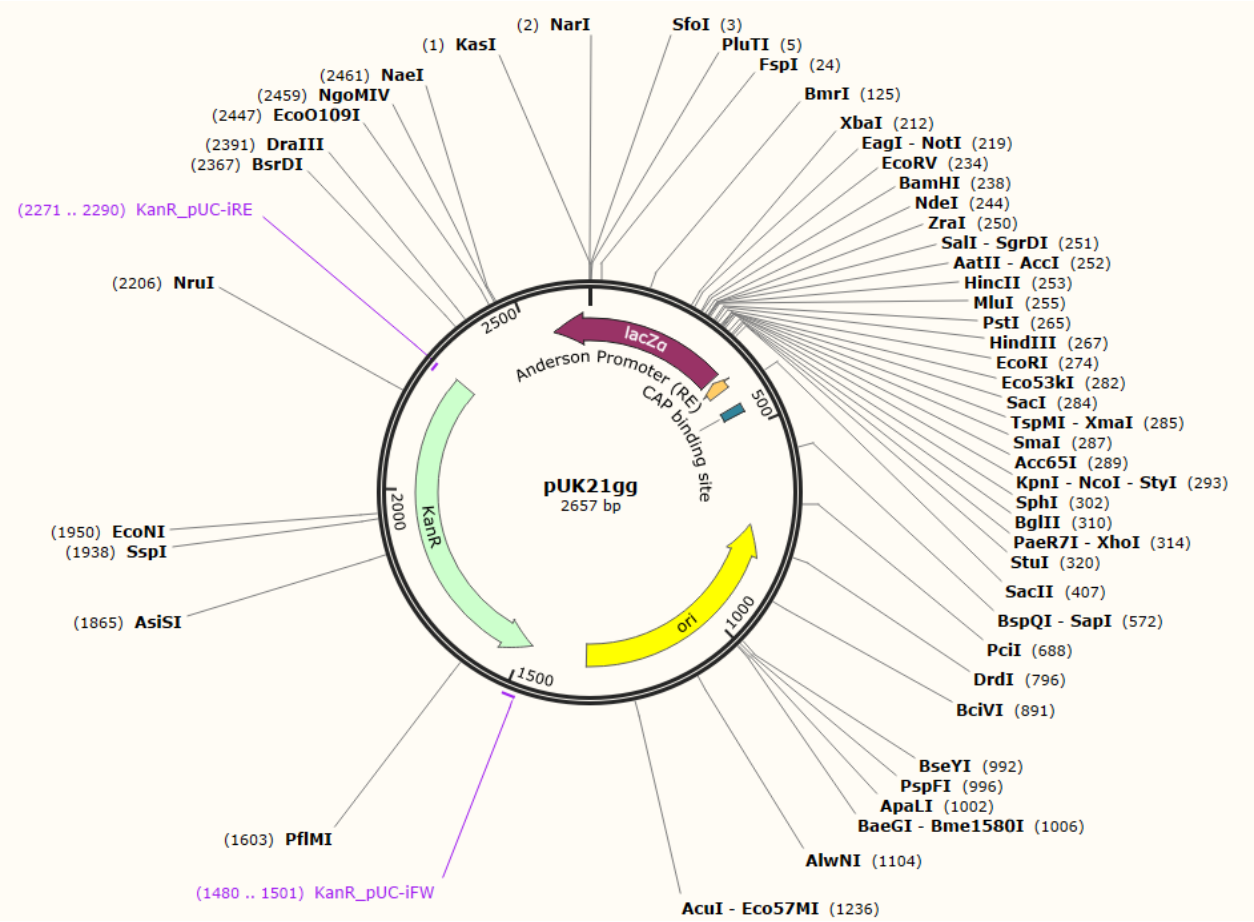


Slika 20. upUC21 plazmid



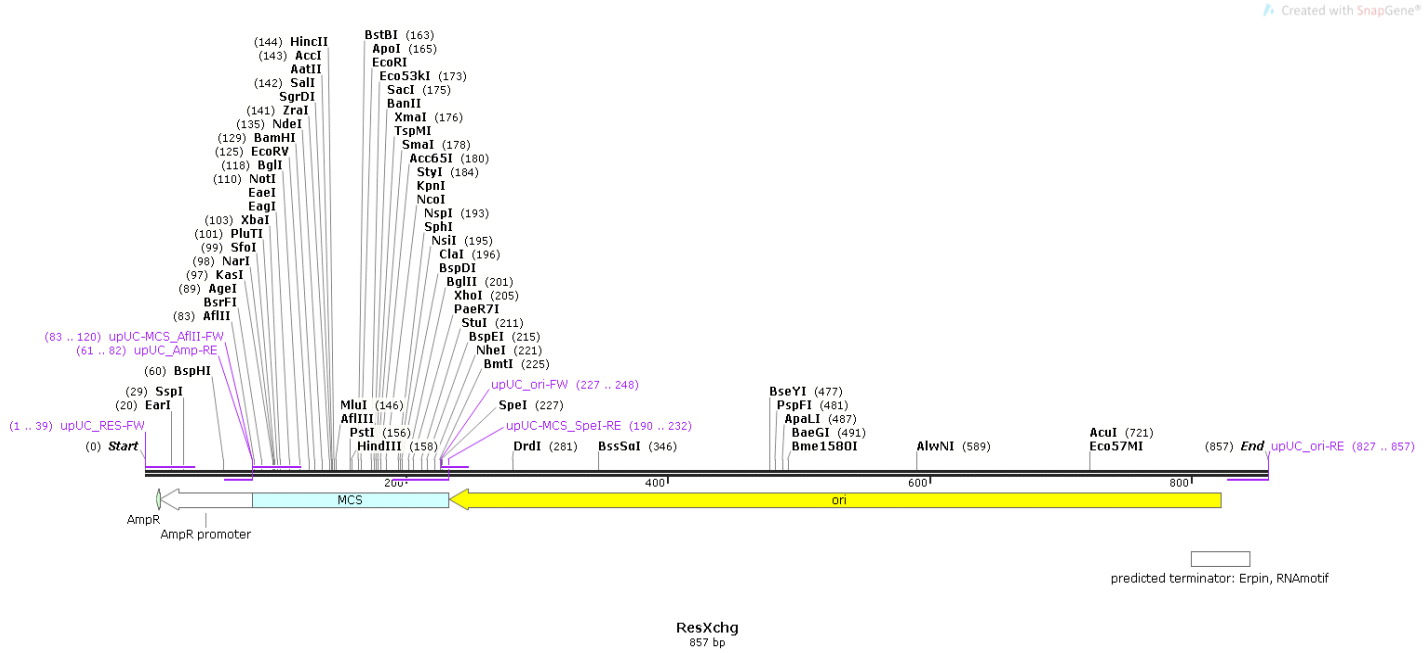
Slika 21. upUK21 plazmid

Proces stvaranja minimalnog plazmida dalje se nastavlja konstrukcijom upUK21 plazmida (Slika21.) ligiranjem fragmenta dobivenih restrikcijom iz pUK21gg (Slika 22.) plazmida koji ima 2657 pb, a nastao je iz pUC21gg plazmida veličine 2768 (Slika 18.) te u sebi za razliku od pUC21gg plazmida nosi gen za kanamicinsku rezistenciju KanR, a ne gen za ampilicinsku rezistenciju AmpR čime je kraći za 111 pb. To je zato jer KanR-GG fragment gena KanR za kanamicinsku rezistenciju ima 844 pb dok sam gen KanR 810 pb, a fragment gena AmpR koji je istovjetan samom genu za ampilicinsku rezistenciju iz upUC21gg plazmida 862pb.



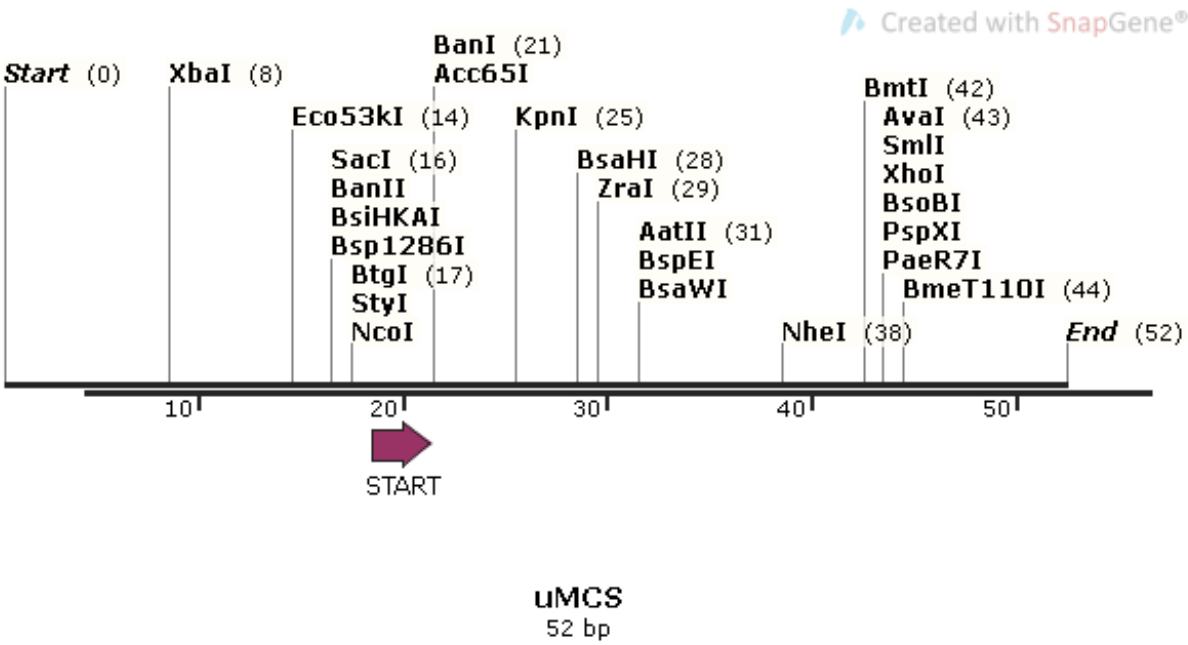
Slika 22. pUK21gg plazmid

Gen za kanamicinsku rezistenciju KanR veličine 810 pb smo dobili PCR-om amplificirajući KanR-GG fragment veličine 844 pb koristeći početnice KanR_pUC-iFR i KanR_Puc-iRE i cjepajući sa BbsI restrikcijskim enzimima na BbsI(1480) i BbsI(2290) restrikcijskoj strani u pUK21gg plazmidu. Na BbsI(1624) i BbsI(765) restrikcijskoj strani plazmida upUC21 cjepali smo fragment ResXchg BbsI restrikcijskim enzimima te smo PCR-om amplificirali ResXchg fragment veličine 857 (Slika 23.) koristeći početnice upUC_RES-FW i upUC_ori-RE.



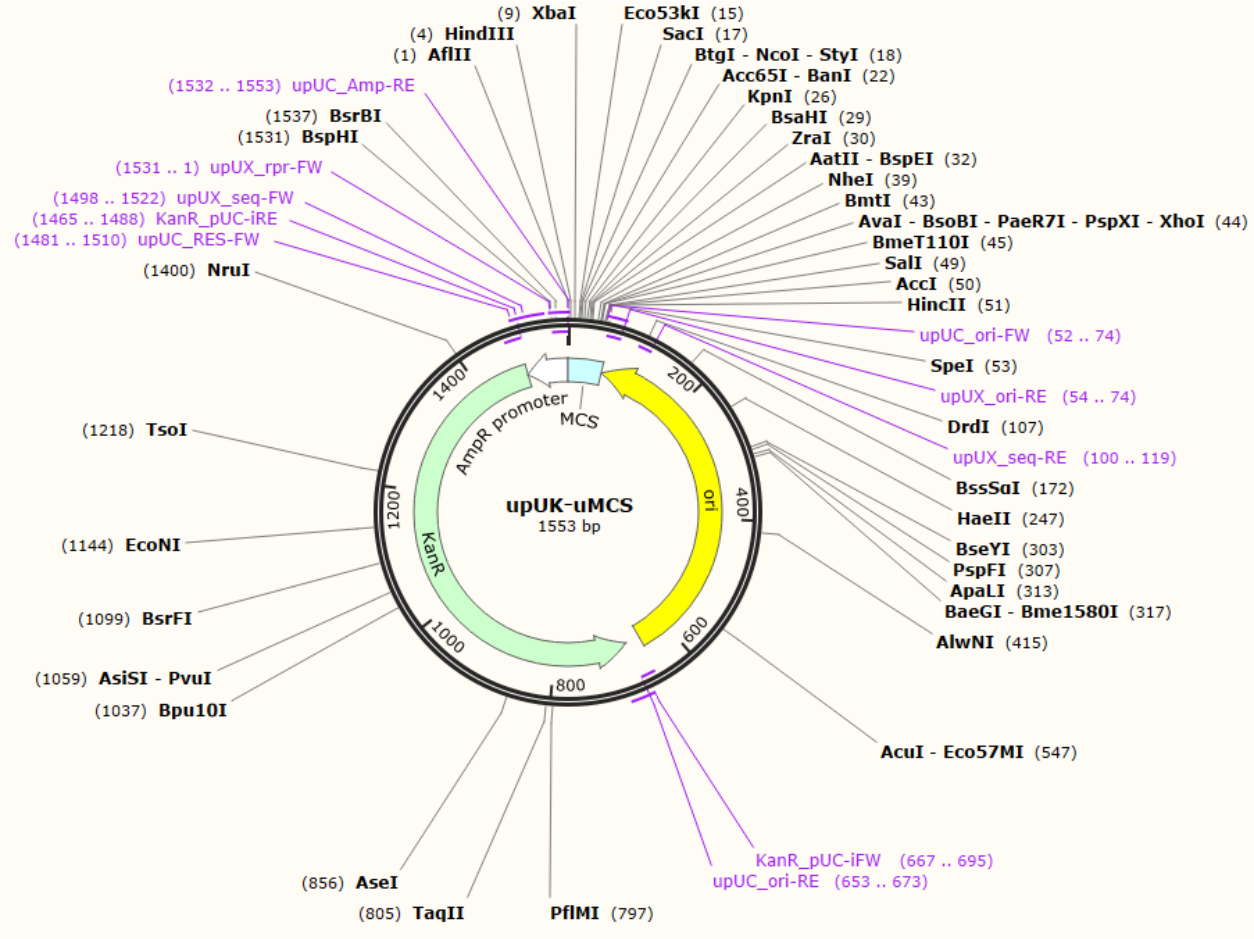
Slika 23. Amplificirani ResXchg fragment iz upUC21 plazmida koji sadrzi ORI i MCS

ResXchg fragment od BbsI(841) restrikcijske strane do BbsI(12) restrikcijske strane koji sadrži ORI i MCS regije te ampicilinski promotor Amp gena AmpR smo ligirali s fragmentom KanR-GG gena KanR za kanamicinsku rezistenciju od BbsI(12) restrikcijske strane do BbsI(828) restrikcijske strane iz pUK21gg koristeći DNA ligazu na BbsI restrikcijskim stranama. Novonastali upUK21 plazmid je veličine 1645 i manji je za 51 bazni par a nastao je spajanjem fragmenta veličine 857 pb koji se zove ResXchg i fragmenta KanR-GG od 844 pb. upUK21 plazmid od 1645 pb smo smanjili tako što smo sekvencu od restrikcijskih krajeva AflII (1) do SpeI(145) fragmenta MCS-a dobivenog u koraku zamjene fragmenta fragmentom lacZα gena iz upUC21gg plazmida s upUC-bb fragmentom iz pBB-v2 plazmida koji smo zamjenili s uMCS fragmentom (Slika 24.) od 52 pb i dobili smo upUK-uMCS (Slika 25.) plazmid od 1553 pb. Fragment uMCS dobili smo oligokloniranjem.



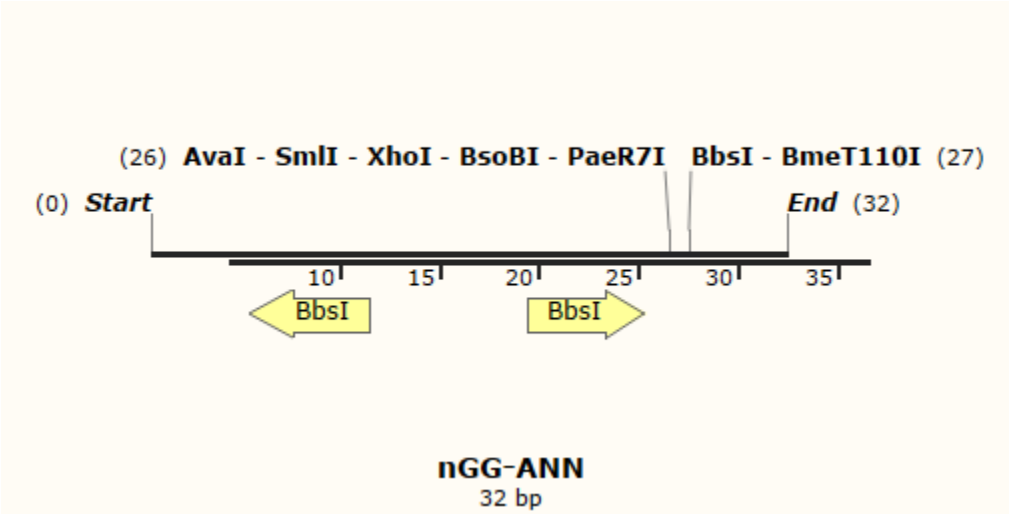
uMCS
52 bp

Slika 24. uMCS iz aneliranih oligonukleotida



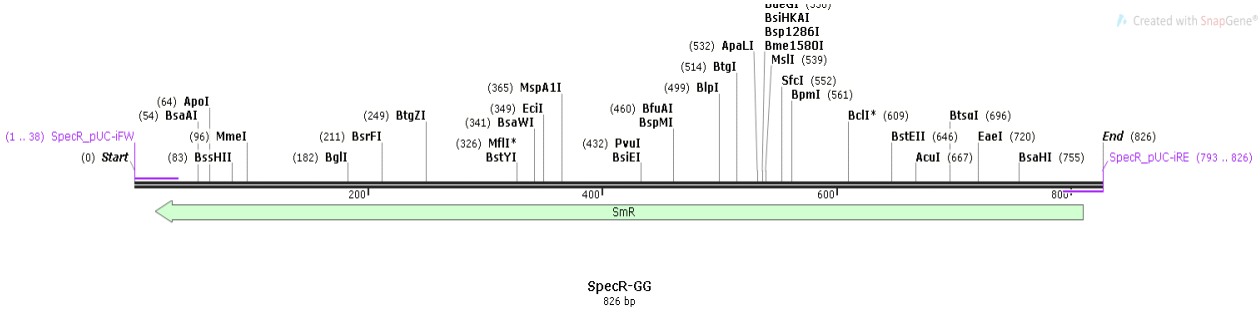
Slika 25. upUK-uMCS plazmid

Smanjeni fragment MCS još smo smanjili tako što smo iz upUK-uMCS plazmida zamjenili dio uMCS od restrikcijskog kraja HindII(4) do SpeI(53) s nGG-ANN fragmentom (Slika 26.) veličine 32 pb i dobili plazmid upUKnGG_CS od 1536 pb što je manje za 17 pb.



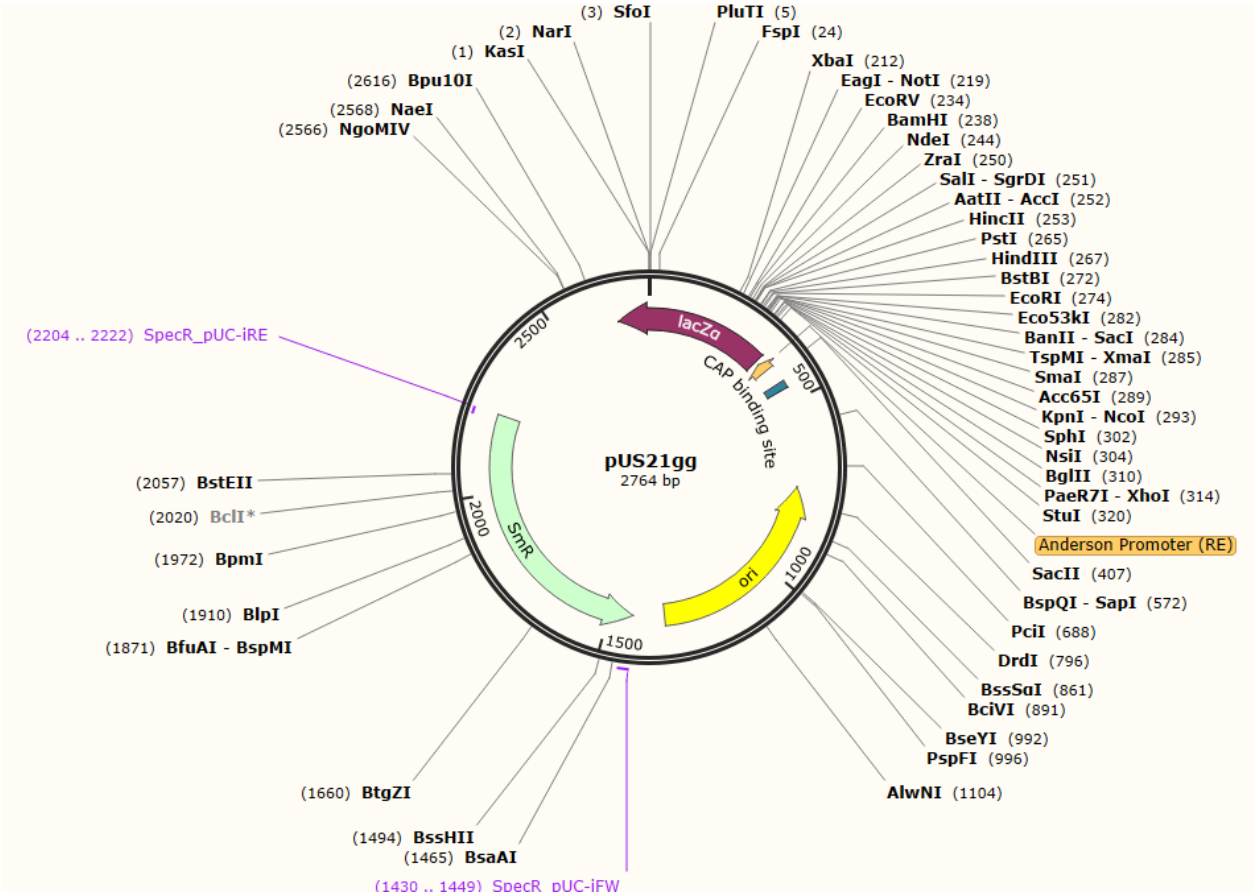
Slika 26. nGG-ANN fragment

Nakon konstrukcije pBB-v2 plazmida spajanjem fragmenata upUC-Amp, upUC-ori i upUC-bb, proces možemo nastaviti iz upUC21 plazmida iz kojeg smo amlificirali PCR-om vec spomenuti fragment ResXchg veličine 857 pb te ga ligirali uz pomoć DNA ligaze na BbsI restrikcijskim stranama s fragmentom SpeecR-GG (Slika 27.) veličine 826 pb kojeg smo dobili iz plazmida pUS21gg (Slika 28.) veličine 2764 pb sa SpecR_pUC-iFW i SpecR_pUC-iRE početnicama, a nosi gen SmR za streptomicinsku rezistenciju.

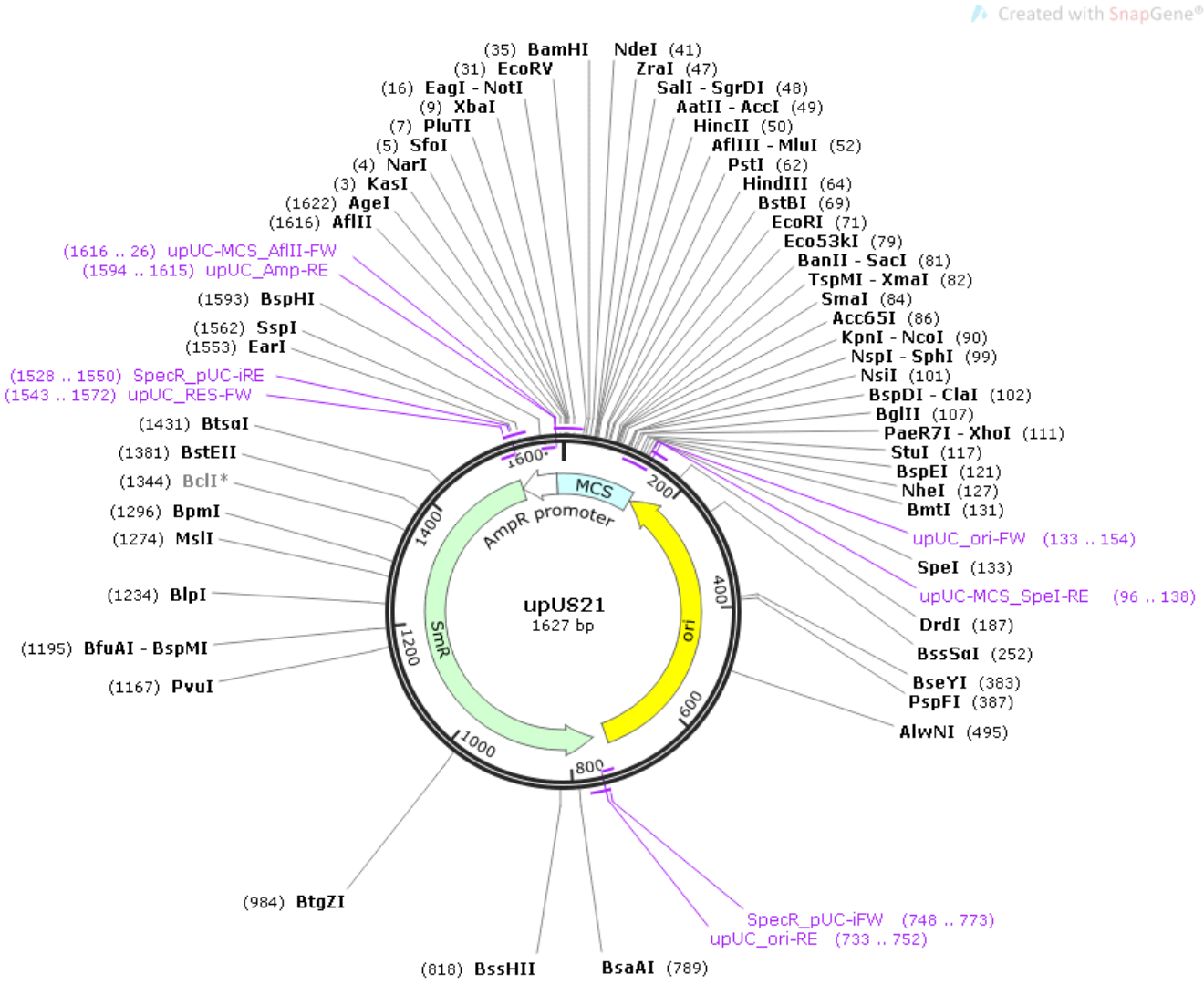


Slika 27. Amlificirani fragment SpeecR-GG iz pUS21gg plazmida

Taj fragment SpeecR-GG nam je bio važan jer smo pomoću njega zamjeniti gen za rezistenciju, u ovom slučaju riječ je o streptomicinu kojeg ovaj fragmenat nosi. Zamjenili smo restrikcijske strane od BsaI(841) do BsaI(12) iz upUC21 plazmida sa stranama od BsaI(12) do BsaI(810) iz novosintetiziranog fragmenta SpeecR-GG te dobili plazmid upUS21 (Slika 29.) veličine 1627 pb koji nosi gen za streptomicinsku rezistenciju.



Slika 28. pUS21gg plazmid



Slika 29. upUS21 plazmid

4.2. Određivanje optimalnih Golden Gate krajeva

Određivanje optimalnih Golden Gate krajeva značajno je kako bismo bili sigurni da smo našli krajeve koji će vrlo precizno konstruirati naš završni ekspresijski vektor. S obzirom na konstrukciju završnog vektora i kompatibilnosti krajeva određenih u Ligase Fidelity viewer-u (Slika 21.) najznačajniji su sljedeći krajevi: TAGC,CATC,CCAT,GGAG,AGCG,TCCA,TGAC,AGGT,GGTT i AGTA. Prema završnom Golden Gate kloniranju krajevi su dodijeljeni na sljedeći način: B: TAGC A:CATC I: CCAT II: GGAG III: AGCG X: TCCA IV: TGAC Z: AGGT Xtra1: GGTT Xtra2: AGTA. Vidljivo je da su Watson-Crickovi parovi jako dobro spareni na što inducira zelena boja u Slici 30.

	TAGC	GCTA	CATC	GATG	CCAT	ATGG	GGAG	CTCC	AGCG	CGCT	TCCA	TGGA	TGAC	GTCA	AGGT	ACCT	GGTT	AACC	AGTA	TACT
TAGC	0	318	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GCTA	318	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CATC	0	0	0	297	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GATG	0	0	297	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCAT	0	0	0	0	0	312	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ATGG	0	0	0	0	312	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GGAG	0	0	0	0	0	0	0	224	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTCC	0	0	0	0	0	0	224	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AGCG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	223	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CGCT	0	0	0	0	0	0	0	0	223	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TCCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	332	0	0	0	0	0	0	0	0
TGGA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	332	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TGAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	273	0	0	0	0	0	0
GTCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	273	1	0	0	0	0	0	0
AGGT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	319	0	0	0	0
ACCT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	319	0	0	0	0	0
GGTT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	359	0	1
AACC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	359	0	0	0
AGTA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	344
TACT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	344	0

Slika 30. Kompatibilnost krajeva određenih za Golden Gate kloniranje.

5.RASPRAVA

Modifikacija *backbone* plazmida (pBackBoneBZ_ann plazmida) i stvaranje optimalnog plazmida za epigenetičku modulaciju CRISPR/Cas9 tehnologije u kulturi animalnih stanica uključuje procese poput usmjerene mutageneze, izrezivanja i multipliciranja dijelova koje želimo u našem novom optimiziranom minimalnom plazmidu. Za naš *backbone* plazmid to znači traženje najmanjeg mogućeg, a funkcionalnog izvorišta replikacije (ORI), selekcijskog markera (ampilicin, kanamicin,streptomicin) te grupiranje velikog broja restrikcijskih strana za dodavanje željenih djelova u krajnji plazmid odnosno za stvaranje optimalnih krajeva za završno Golden Gate kloniranje. Golden Gate kloniranje zahtijeva pronalaženje plazmida koji se sastoji od višeklonirajućih strana (MCS-*multi cloning site*), a sadrži veliki broj restrikcijskih strana koje možemo cijepati odnosno otvarati i slagati naš završni modularni sustav za epigenetičku modulaciju prema unaprijed određenim krajevima. Upravo je stvaranje takvog najmanjeg mogućeg*backbone*plazmida koji sadrži izvorište replikacije (ORI), otpornost na antibiotik (kanamicin, ampicilin, streptomicin) te više-klonirajuću stranu (MCS-*multi cloning site*) bio naš zadatak. Plazmid pUC21gg koji nosi fragment upUC-MSC smo ligirali u pBB-v2 plazmid te dobiveni upUC21 plazmid koji je veličine 1696 pb dalje koristili za stvaranje našeg minimalnog plazmida s optimalnim krajevima za krajnje Golden Gate kloniranje koje će služiti za stvaranje modularnog sustava za epigenetičku modulaciju. Nastavak stvaranja minimalnog plazmida najprije zahtjeva zamjenu fragmenta KanR-GG za kanamicinsku rezisteniciju koji nosi gen KanR u upUK21gg plazmidu s već postojećim genom AmpR koji je veći nego gen KanR te stoga neprihvatljiv za konstrukciju minimalnog plazmida te stvaranje upUK21 plazmida manjih dimenzija. Plazmid upUS 21 nosi u sebi gen SmR za streptomicinsku rezistenciju kao alternativu za stvaranje plazmida koji sadrži otpornost na određeni antibiotik. Golden Gate kloniranje zahtjeva visoku specifičnost slaganja većeg broja fragmenata te da mjesta na kojima se slažu fragmenti budu kodirane aminokiseline koje su u otvorenom okviru čitanja neutralne za funkciju fuzijskog proteina što smo i napravili pravim odabirom krajeva. Također, da bismo uspjeli napraviti ovakvo kloniranje potrebno je odrediti tip kraja kao i aminokiselinski slijed poželjan za konstrukciju CRISPR/Cas9 modularnog sustava. Naš slijed krajeva za Golden Gate kloniranje i pripadajuće aminokiseline dane su u Tablici 3. Takvi krajevi bi trebali biti nepalindromne sekvence i trebale bi pokazivati visok stupanj ligacije odnosno spajanja Watson-Crickovih baza, a oba uvijeta prema rezultatima ostvaruju očekivano. Stvaranje minimalnog plazmida koji smo u ovom radu i stvorili omogućuje lakšu transfekciju plazmida u stanice od interesa, a time i točniji i precizniji rezultat prilikom proučavanje genoma pomoću CRISPR/Cas9 modularnog sustava za epigenetičku modulaciju.

Tablica 1. Tip krajeva, sekvenca kraja za Golden Gate kloniranje i aminokiseline pripadajućim krajevima koje bi u otvorenom okviru čitanja trebale biti neutralne za funkciju fuzijskog proteina.

Tip kraja za GG	Sekvenca kraja za GG	Aminokiseline kodirane slijedom postavljenim za krajnje GG kloniranje
B	TAGC	izoleucin
A	CATC	valin
I	CCAT	glicin
II	GGAG	prolin
III	AGCG	serin
X	TCCA	arginin
IV	TGAC	treonin
Z	AGGT	serin
Xtra1	GGTT	prolin
Xtra2	AGTA	serin

6. ZAKLJUČCI

Stvaranje minimalnog plazmida i optimizacija krajeva za Golden Gate sparivanje fundamentalan je proces za daljnju manipulaciju CRISPR/Cas9 tehnologijom i stvaranje modularnog CRISPR/Cas9 sustava za epigentičku manipulaciju.

1. Izabor najmanjeg mogućeg broja nukleotida, a da sve komponente budu sadržane i da pritom plazmid sadrži optimalne krajeve za Golden Gate sparivanje uspješno je postignuto konstrukcijom minimalnog plazmida.
2. Minimalni plazmid je sadržavao 1627 pb čime smo ga od početnog *backbone* plazmida koji sadrži 2394 pb smanjili za 767 pb, a sama konstrukcija nastala je u SnapGene programu dok sama vjernost krajeva za sklapanje završnog plazmida odnosno Golden Gate kloniranje postignuta je analizom kompatibilnosti u Ligase Fidelity viewer-u.
3. Dobiveni podaci su potvrdili uspješnost sklapanja našeg minimalnog plazmida s krajevima koji će nam omogućiti daljnju uspješnu manipulaciju konstruktom korištenim u CRISPR/Cas9 tehnologiji.

7. LITERATURA

1. Bryksin AV., Matsumura I. (2010). Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. BioTechniques 48(6), 463–465.

2. Chen Y. J., Liu P., Nielsen, A. A., Brophy, J. A., Clancy, K., Peterson, T., i Voigt, C. A. (2013). Characterization of 582 natural and synthetic terminators and quantification of their design constraints. Nature Methods 10(7), 659-664.

3. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 339(6121), 819-823. doi:10.1126/science.1231143 Dean, D. A. (1997). Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. Exp Cell Res, 230(2), 293-302.

4. Dean, D. A. (1997). Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. Exp Cell Res, 230(2), 293-302.

5. Ellis T, Adie T, Baldwin GS. DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. Integr. Biol. 3(2), 109–118 (2011).

6. Heinemann M., Panke S.(2006). Synthetic biology – putting engineering into biology. Bioinformatics. 22(22), 2790–2799

7. Josipovic G, Vanja Tadic, Marija Klasic, Vladimir Zanki, Ivona Beceheli ˇ 1, Felicia Chung, Akram Ghantous, Toma Keser, Josip Madunic, Maria Boskovi, Gordan Lauc, Zdenko Herceg, Aleksandar Vojta i Vlatka Zoldos Antagonistic and synergistic epigenetic modulation using orthologous CRISPR/dCas9-based modular system Nucleic Acids Research, 2019, Vol. 47, No. 18 9637–9657

8. Lin-Chao S, Chen W-T, Wong T-T. (1992). High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. Mol. Microbiol**.** 6(22), 3385–3393

9. Shetty RP, Endy D, Knight TF. (2008). Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. J. Biol. Eng. 2, 5

10. Staal J., Alci K., De Schamphelaire W., Vanhoucke M., Beyaert R. (2019). Engineering a minimal cloning vector from a pUC18 plasmid backbone with an extended multiple cloning site. BIOTECHNIQUESVOL. 66, NO. 6

11. Sugiura S., Ohkubo S, Yamaguchi K. (1993). Minimal essential origin of plasmid pSC101 replication: requirement of a region downstream of iterons. J. Bacteriol. 175(18), 5993–6001

12. Snap Gene 5.3.2. (2021) Insightful science GSL Biotech LLC 2365 Northside Dr. Suite 560 San Diego, CA 92108

Životopis

Bruno Bračun rođen je u Zagrebu 03.05.1992. godine kao sin majke Ljiljane Bračun rođene Dobrić i oca Zorana Bračuna. Pohađao je OŠ Josipa Račića i srednju jezičnu IV. Gimnaziju. Rođen i odrastao na Srednjacima gdje su i mnoge poznate osobe startale od Željka Mavrovića „šake sa srednjaka“ pa sve do još prisutne Josipe Lisac legende hrvatske glazbe. Vrlo sretno i aktivno dijete koje voli provoditi vrijeme u prirodi i u igri i sportu. Izvrsno se koristi engleskim jezikom u govoru,pismu i slušanju dok njemački jezik samo razumije u govoru. Izvrsno poznaje MS Office i društvene mreže. Volontirao je na EUSA odnosno Europskim Sveučilišnim igrama a i pohađao je Psihozij što je Simpozij o psihologiji kojeg organiziraju studenti Psihologije Filozofskog fakulteta u Zagrebu. U slobodno vrijeme pišem poeziju i prozu a ponešto se može pročitati i na mome blogu Home | Business Boy (wixsite.com) koji je tek u nastajanju. Blog je prvenstveno za bliske prijatelje no planiram napraviti nešto i za šire mase. Kroz školovanje zanimao sam se za različite stvari od geografije i povijesti preko likovne kulture i arhitekture pa sve do biologije, biokemije i molekularne biologije.