

Vektorski sustav za stabilnu genomsku ugradnju ekspresijske kazete transpozazama

Mijakovac, Anika

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:282048>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Anika Mijakovac

Vektorski sustav za stabilnu genomsku ugradnju ekspresijske kazete
transpozazama

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom doc. dr. sc Aleksandra Vojte i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Vanje Tadić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Iskreno se zahvaljujem mentoru doc. dr. sc Aleksandru Vojti na velikoj podršci koju mi je pružio tokom izrade ovog rada. Hvala na strpljenju, izdvojenom vremenu i nezamjenjivim savjetima.

Hvala dr. sc. Vanji Tadić uz koju sam stekla znanja i vještine potrebne za samostalan rad u laboratoriju te na svim savjetima, strpljenju i razumijevanju.

Hvala mag. biol. mol. Goranu Josipoviću koji mi je strpljivo odgovarao na sva pitanja i uvijek bio spreman pomoći. Također se zahvaljujem mag. biol. mol. Stjepanu Rakitiću za pomoć u izradi i pisanju ovog rada.

Hvala svim kolegama iz grupe koji su mi priskakali u pomoć kad god je bilo potrebno.

Posebno se zahvaljujem prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš na ukazanom povjerenju da budem dio istraživačke grupe Laboratorija za epigenetiku. Hvala na svim profesionalnim i životnim savjetima i na potpori koju ste mi pružili.

Od srca se zahvaljujem svim prijateljima koji su me podržavali i tješili u teškim trenucima. Posebno hvala Marinu i mojoj obitelji na neizmjernoj ljubavi i vjeri u moj uspjeh.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek
Diplomski rad

Vektorski sustav za stabilnu genomsku ugradnju ekspresijske kazete transpozazama
Anika Mijakovac
Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

DNA transpozoni su pokretni genetički elementi koji sadrže gen koji kodira enzim transpozazu omeđen terminalnim sljedovima IR (eng. *inverted repeats*). Transpozaza veže terminalne sljedove IR i katalizira transpoziciju omeđenog gena, što omogućuje pokretanje DNA transpozona. Na temelju mehanizma transpozicije DNA transpozona izvedeni su sintetički vektorski sustavi za prijenos gena kod kojih je slijed od interesa na plazmidu omeđen terminalnim sljedovima IR dok je transpozaza eksprimirana *in trans*. Ovakvi sustavi omogućuju ugradnju ekspresijske kazete u genom animalnih stanica te nude alternativu dosadašnjim viralnim i neviralnim metodama prijenosa gena. Kako bi se omogućila dugotrajna ekspresija transgena u vektore se dodaju izolatori, regulatorni sljedovi DNA koji stvaranjem kromatinskih barijera štite transgene od utišavanja. Cilj ovog istraživanja je bio izrada vektorskog sustava zasnovanog na tehnologiji transpozona koji će omogućiti stabilnu ugradnju i dugotrajnu ekspresiju transgena u genomu domaćina. Uspješno su izrađena dva plazmidna vektorska sustava zasnovana na DNA transpozonomima *sleeping beauty* (SB) odnosno *piggyBac* (PB). Metodama restrikcije i ligacije su u svaki plazmid ugrađena dva terminalna slijeda IR SB odnosno dva terminalna slijeda IR PB te po četiri izolatorska slijeda. Istim metodama je izrađen ekspresijski vektor za ekspresiju transpozaze PB *in trans*. Ispravnost svih plazmidnih konstrukata je potvrđena metodom restrikcijske analize ili metodom analize kolonija putem PCR reakcije te sekvenciranjem.

(46 stranica, 18 slika, 3 tablice, 26 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: transpozon, vektor, *sleeping beauty*, *piggyBac*, izolator

Voditelj: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
Neposredni voditelj: dr. sc. Vanja Tadić
Ocjenitelji: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
doc. dr. sc. Sunčica Bosak
prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Rad prihvaćen: 28. veljače 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology
Graduation Thesis

A vector system for transposase-mediated stable genomic integration of an expression cassette
Anika Mijakovac
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

DNA transposons are mobile genetic elements made of a gene coding for the enzyme transposase flanked by terminal inverted repeats. Transposase binds terminal inverted repeats and catalyzes transposition of the transposase gene which enables DNA transposons to mobilize. Based on the transposition mechanism employed by DNA transposons, synthetic transposon systems, that utilize a plasmid with region of interest flanked by terminal inverted repeats and *in trans* expression of the transposase, were developed. These systems ensure stable genomic integration of an expression cassette into genomes of animal cells and are an alternative to viral and non-viral methods for gene transfer. In order to have long lasting expression of transgenes insulator sequences are added to vectors. Insulators are regulatory DNA sequences that make chromatin barriers which protect genes from silencing. The aim of this thesis was the construction of vector system based on transposon technology that will ensure stable integration and long-lasting expression of transgene in the host genome. Two plasmid vector systems based on *sleeping beauty* (SB) and *piggyBac* (PB) DNA transposons respectively were successfully constructed. Two SB inverted terminal repeats and two PB inverted terminal repeats were cloned into both plasmids respectively with addition of four insulator sequences in each plasmid using restriction and ligation methods. Same methods were used to construct an expression vector that will express PB transposase *in trans*. Validity of all plasmid construct was confirmed using restriction analysis or colony PCR and sequencing.

(46 pages, 18 figures, 3 tables, 26 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library
Key words: transposon, vector, *sleeping beauty*, *piggyBac*, insulator

Supervisor: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
Assistant supervisor: dr. sc. Vanja Tadić
Reviewers: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
doc. dr. sc. Sunčica Bosak
prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Thesis accepted: February 28, 2019.

SADRŽAJ

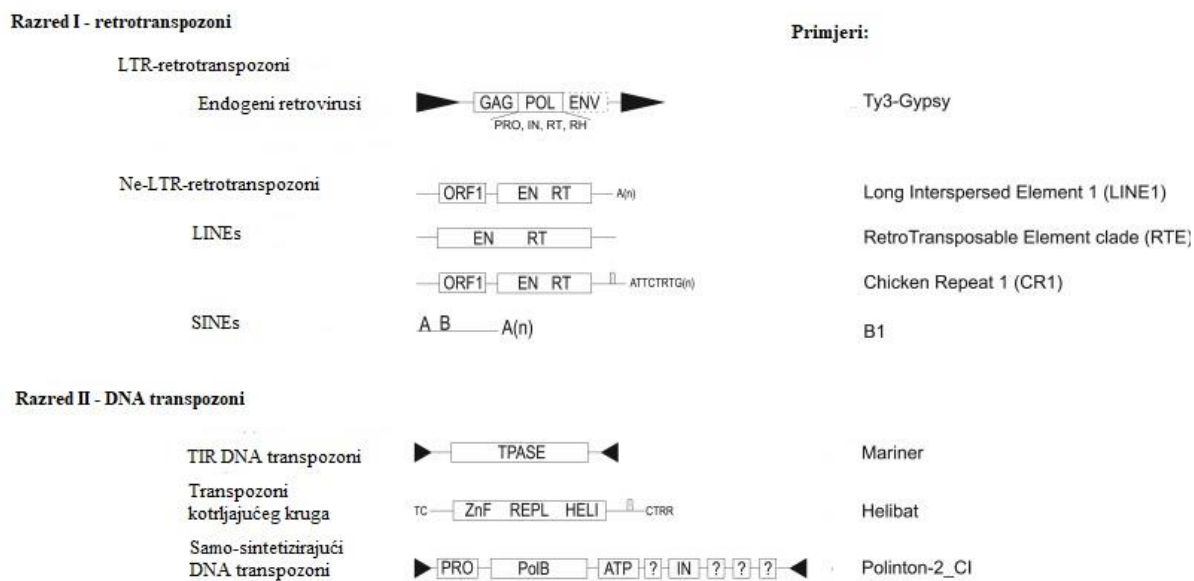
1. UVOD	1
1.1. TRANSPONIRAJUĆI ELEMENTI.....	1
1.2. DNA TRANSPOZONI.....	2
1.2.1 NATPORODICA TC1/ <i>MARINER</i>	3
1.2.2. NATPORODICA <i>PIGGYBAC</i>	4
1.3. DNA TRANSPOZONI KAO MOLEKULARNI ALATI.....	5
1.3.1. SLEEPING BEAUTY.....	7
1.3.2. PIGGYBAC.....	8
1.4. IZOLATORI.....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	12
3. MATERIJAL I METODE	13
3.1. MATERIJAL.....	13
3.2. METODE.....	14
3.2.1. UGRADNJA RESTRIKCIJSKIH MJESTA Esp3I I BbsI U PLAZMIDNU OKOSNICU.....	14
3.2.2. UGRADNJA IZOLATORSKIH SLJEDOVA U PLAZMID pUK21gg.....	17
3.2.3. IZOLACIJA, AMPLIFIKACIJA I UGRADNJA TERMINALNIH SLJEDOVA IR TRANSPOZONA <i>SLEEPING BEAUTY</i> U PLAZMID XX-pUK-INSx2.....	20
3.2.4. IZOLACIJA, AMPLIFIKACIJA I UGRADNJA TERMINALNIH SLJEDOVA IR TRANSPOZONA <i>PIGGYBAC</i> U PLAZMID XX-pUK-INSx2.....	22
3.2.5. UGRADNJA TERMINALNI SLJEDOVA IR TRANSPOZONA <i>SLEEPING BEAUTY</i> ODNOSNO <i>PIGGYBAC</i> I IZOLATORSKIH SLJEDOVA U PLAZMIDNU OKOSNICU pBB- ARMS.....	22
3.2.6. AMPLIFIKACIJA SLIJEDA TRANSPOZAZE PB I <i>ASSEMBLY</i> EKSPRESIJSKOG VEKTORA.....	24
4. REZULTATI	27
4.1. IZRADA PLAZMIDNE OKOSNICE I UGRADNJA IZOLATORSKIH SLJEDOVA U PLAZMID pUK21gg.....	27
4.2. IZRADA TRANSPOZONSKOG VEKTORSKOG SUSTAVA ZASNOVANOG NA TRANSPOZONU <i>SLEEPING BEAUTY</i>	28
4.3 IZRADA TRANSPOZONSKOG VEKTORSKOG SUSTAVA ZASNOVANOG NA TRANSPOZONU <i>PIGGYBAC</i>	34
5. RASPRAVA	39
6. ZAKLJUČAK	42

7. LITERATURA.....	43
8. ŽIVOTOPIS.....	46

1. UVOD

1.1. TRANSPONIRAJUĆI ELEMENTI

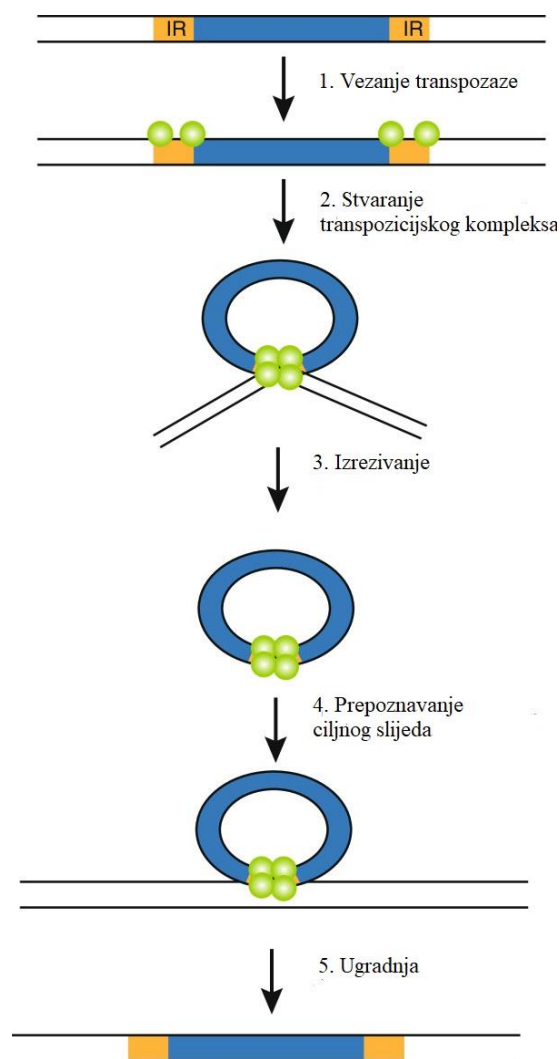
Sredinom 40-ih godina prošlog stoljeća Barbara McClintock je otkrila sljedove DNA koji mogu mijenjati svoju lokaciju unutar genoma organizama (Fedoroff, 2012). Takvi transponirajući elementi su identificirani kod prokariota i eukariota te su značajno zastupljeni u njihovim genomima (Munoz-Lopez and Garcia-Perez, 2010) Godinama su transponirajući elementi svrstavani u takozvanu *junk DNA*, no danas se zna da oni imaju veliku ulogu u evoluciji, regulaciji i arhitekturi genoma svih živih organizama. Transponirajući elementi se dijele u dva razreda (I i II) ovisno o mehanizmu transpozicije (Slika 1). Retrotranspozoni čine razred I i mobiliziraju se u genomu mehanizmom kopiranja i ugradnje odnosno pomoću RNA intermedijara. Oni se dalje dijele na SINEs (eng. *short interspersed elements*), LINEs (eng. *long interspersed elements*) i LTR (eng. *long terminal repeats*) retrotranspozone. Transponirajući elementi razreda II ili DNA transpozoni se mobiliziraju mehanizmom izrezivanja i ugradnje koji ne zahtijeva reverznu transkripciju. DNA transpozone čine DNA transpozoni TIR (eng. *terminal inverted repeat*) koji spadaju u podrazred I te transpozoni kotrljajućeg kruga i samo-sintetizirajući DNA transpozoni unutar podrazreda II. Svi navedeni transponirajući elementi u genomu mogu biti autonomni odnosno samo-mobilizirajući ili ne-autonomni tj. ovisni o autonomnim elementima za mobilizaciju (Sotero-Caio et al., 2017).



Slika 1. Klasifikacija, struktura i primjeri transponirajućih elemenata. Strukturalne komponente su prikazane kako slijedi: LTR-retrotranspozoni – nukleokapsidni protein (GAG), protein omotnice (ENV), poliprotein (POL) koji uključuje proteazu (PRO), integrazu (IN), reverznu transkriptazu (RT) i RNazu H (RH). Ne-LTR retrotranspozoni – jezgrin šaperonski protein (ORF1), endonukleazna domena (EN), promotor RNA polimeraze III (A i B), poli-A ili bilo koji drugi ponavljajući rep ($A_{(n)}$ ili $ATTCTRTG_{(n)}$). Razred II – transpozaza (TPASE), domena cinkovih prstiju (ZnF), replikaza (REPL), helikaza (HELI), polimeraza B (PolB), ATPaza (ATP), proteini nepoznate funkcije („?“) i integraza (INT). Kodirajuće regije su prikazane kao pravokutnici. Ne-kodirajuće regije su prikazane kao crte. Neki endogeni retrovirusi nemaju gen ENV (točkasta linija). Trokuti predstavljaju ponavljajuće sljedove DNA dok njihova orijentacija pokazuje orijentaciju samih ponavljanja. Preuzeto i prilagođeno prema radu Sotero-Caio i sur. (2017).

1.2. DNA TRANSPOZONI

DNA transpozoni se pokreću mehanizmom izrezivanja i ugradnje tako da se izrezuju iz jednog mjesta u genomu i reintegriraju u drugo ((Munoz-Lopez i Garcia-Perez, 2010)). Svi DNA transpozoni se sastoje od centralne regije koja kodira enzim transpozazu te terminalnih sljedova IR (eng. *inverted repeats*) koji ju okružuju. Kod transpozicije transpozaza se veže za terminalne sljedove IR te katalizira transesterifikaciju i izrezivanje transpozona. Takav transpozon vezan za transpozazu se onda integrira u drugo mjesto u genomu (Slika 2). Općeniti mehanizam transpozicije dijele sve natporodice DNA transpozona dok sami molekularni detalji procesa variraju (Skipper i sur. 2013)



Slika 2. Model *cut paste* transpozicije. Transpozaze (zelene kuglice) prepoznaju terminalne IR sljedove (narančasti pravokutnici) i stvaraju kružni pre-ekscizijski sinaptički kompleks iz kojeg se transpozon izrezuje i ugrađuje u ciljni sljed. Prikazan je model transpozicije Tc1/*mariner* elemenata. Preuzeto i prilagođeno prema radu Skipper i sur. (2013)

1.2.1 NATPORODICA TC1/MARINER

DNA transpozoni natporodice Tc1/*mariner* su najrasprostranjeniji transponirajući elementi u prirodi. Do danas je poznato samo četrnaest elemenata iz ove natporodice koji su aktivni, a samo deset ih nalazimo u prirodi. Ostala četiri su rekonstruirana u laboratoriju iz svojih inaktivnih predaka, a to su *Sleeping beauty* iz riba porodice *Salmonidae*, *Himar1* iz muhe vrste *Hematobia irritans*, *Frog prince* iz vrste žabe *Rana pipiens* te *Hsmar1* iz čovjeka. Elementi Tc1/*mariner* se sastoje od gena za transpozazu okruženog dvama terminalnim sljedovima IR dugim od 17 do 1100 pb. Sama transpozaza se sastoji od oko 300

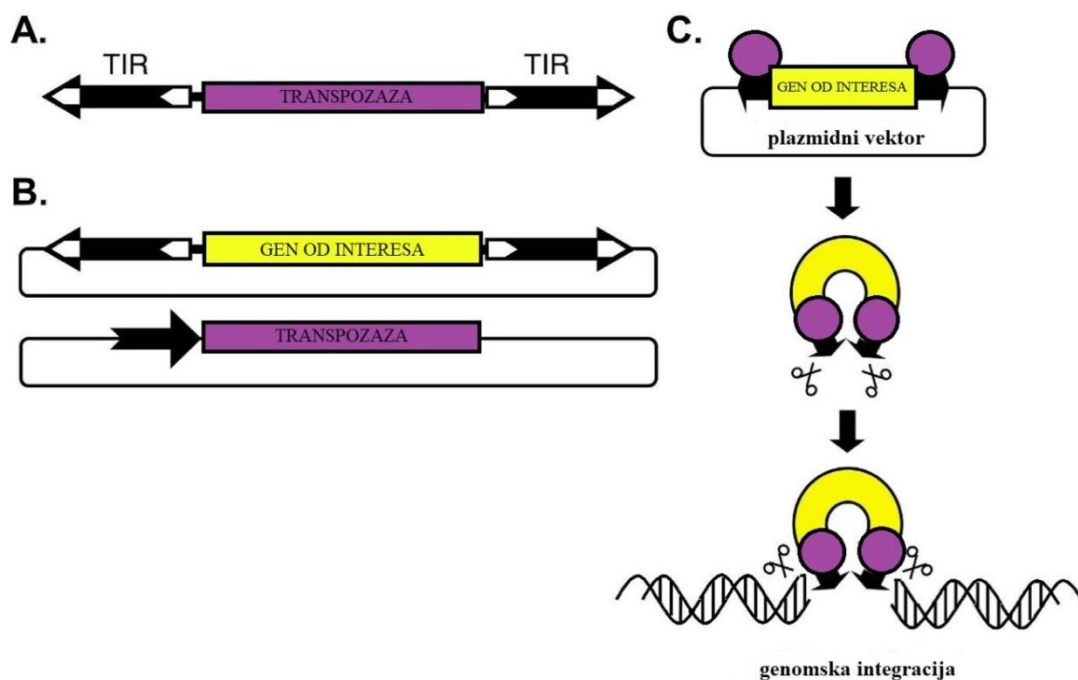
aminokiselina te sadrži dvije karakteristične domene. Domena koja veže DNA se nalazi na N-terminalnom kraju i sadrži motiv HTH (eng. *helix-turn-helix*) potreban za prepoznavanje i vezanje terminalnih sljedova IR. Katalitička domena na C-terminalnom kraju nosi katalitički motiv DDD (asp-asp-asp) kod elemenata *mariner* odnosno DDE (asp-asp-glu) kod elemenata Tc1 zaslužan za izrezivanje i integraciju ovih transpozona. Kako bi došlo do transpozicije Tc1/*mariner* elemenata, dvije molekule transpozaze moraju prepoznati i vezati terminalne sljedove IR svojim HTH motivom čime formiraju kompleks SEC (eng. *Single-End Complex*). Potom transpozaze režu 5' krajeve terminalnih sljedova IR hidrolizom fosfodieterske veze kako bi se oslobodili ne-transferirajući lanci koji ne sudjeluju u daljnjim koracima transpozicije. Onda dvije molekule transpozaze dimeriziraju te zajedno s krajevima transpozona stvaraju kompleks PEC (eng. *Paired-End Complex*) gdje se hidrolizira fosfodieterska veza na 3' krajevima kako bi se stvorili transferirajući lanci. Nakon ovog koraka slijedi integracija transpozona u drugo mjesto u genomu. Ciljno mjesto Tc1/*mariner* elemenata su TA dinukleotidi za koje se veže kompleks PEC. 3'OH skupine transferirajućih lanaca nukleofilno napadaju 5' krajeve ciljne DNA kako bi došlo do integracije transpozona. Praznine na 5' krajevima transpozona popunjava sustav za popravak domaćina stvarajući karakteristične duplikacije (TSD, eng. *Target site duplication*) koje okružuju transpозон. Dvolančani lom nastao izrezivanjem transpozona se popravlja homolognom rekombinacijom ili nehomolognim sparivanjem krajeva ovisno o vrsti domaćina (Munoz-Lopez i Garcia-Perez 2010).

1.2.2. NATPORODICA *PIGGYBAC*

Predstavnik natporodice *piggyBac* je istoimeni DNA transpозон identificiran u vrsti noćnog leptira *Trichoplusia ni* 1983. godine. Dug je 2475 pb i sadrži terminalne sljedove IR, sub-terminalne asimetrične sljedove IR i jedan otvoreni okvir čitanja (ORF, eng. *open reading frame*). Njegova transpozaza sadrži 594 aminokiseline, dok joj molekularna težina iznosi 68 kDa. Mehanizam transpozicije transpozona *piggyBac* je jednak onome elemenata Tc1/*mariner* osim što se *piggybac* ne ugrađuje u dinukleotid TA već u slijed TTAA te nakon njegovog izrezivanja slijed DNA ostaje intaktan (Muñoz-López i García-Pérez 2010, Bouallègue i sur. 2017).

1.3. DNA TRANSPOZONI KAO MOLEKULARNI ALATI

Identifikacija mehanizama transpozicije mobilnih elemenata je dovela do razvitka transpozonskih sustava u svrhu prijenosa gena. Transpozicija izrezivanjem i ugradnjom DNA transpozona se pokazala iznimno korisnom u konstrukciji vektorskih sustava za genetičko inženjerstvo. U prirodi se DNA transpozoni sastoje od gena za transpozazu omeđenog terminalnim sljedovima IR koji nose vezna mjesta za transpozazu. Iz takvih transpozona su u laboratoriju razvijeni binarni sustavi koji se temelje na dva plazmida, gdje jedan nosi gen za transpozazu, a drugi terminalne sljedove IR koji okružuju DNA slijed od interesa. Ko-transfekcijom binarnog sustava u ciljne stanice dolazi do sinteze transpozaze koja veže terminalne sljedove IR, izrezuje DNA od interesa i integrira je u genom stanice (Slika 3) (Munoz-Lopez i Garcia-Perez 2010, Ivics i Izsvák, 2010).



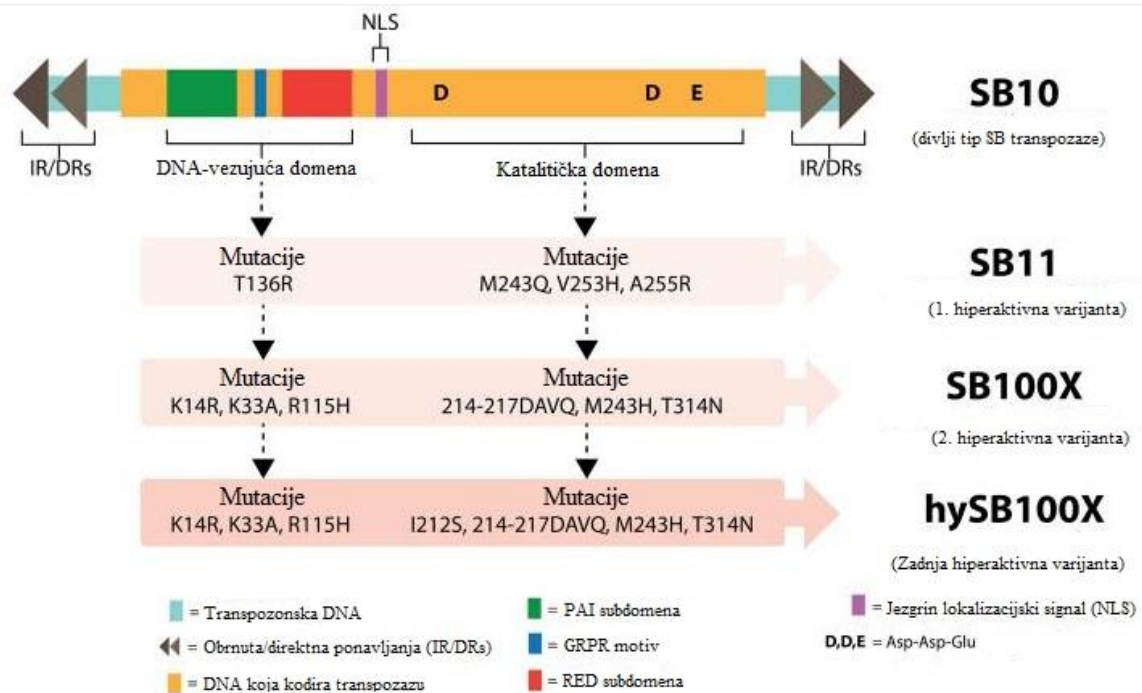
Slika 3. Usporedba prirodnih DNA transpozona i transpozonskih vektorskih sustava. (A) Autonomni DNA transpozoni se sastoje od terminalnih sljedova IR (TIR) koji okružuju gen za transpozazu. **(B)** Binarni transpozonski vektorski sustav koji se sastoji od dva plazmida gdje jedan nosi gen od interesa omeđen terminalnim sljedovima IR, a drugi promotor (crna strelica) i gen za transpozazu. **(C)** Transpozaza (ljubičasti krugovi) izrezuje gen od interesa s donorskog plazmida i ugrađuje ga u ciljno mjesto u genomu. Preuzeto i prilagođeno prema radu Ivics i Izsvák (2010)

Prije razvitka transpozonskih sustava postojale su mnoge viralne i ne-viralne metode dostave DNA u stanice sa svojim prednostima i ograničenjima. Glavni nedostaci viralnih vektora su imunogenost kod primjene *in vivo*, ugradnja u blizini 5' UTR (eng. *untranslated region*) regija što može inducirati onkogenezu, nemogućnost prijenosa većih DNA sljedova te trošak njihove proizvodnje. Ne-viralne metode unosa gena u stanice su zaobišle većinu ovih ograničenja, ali nisu omogućile integraciju ciljane DNA u genom stanica. Takva DNA, u obliku episoma, s vremenom se razgrađuje i razrjeđuje staničnim diobama, što narušava gensku ekspresiju. Transpozonski vektori objedinjuju prednosti viralnih i ne-viralnih metoda tako što omogućuju relativno nasumičnu ugradnju većih sljedova DNA u genom stanice ne izazivajući imuni odgovor, a sve to uz niske troškove proizvodnje (Muñoz-López i García-Pérez 2010, Tipanee i sur. 2017). Zbog odličnih karakteristika transpozonskih sustava razvijeni su mnogi vektori kao *Sleeping beauty*, *piggyBac*, *Minos*, *Frog Prince*, *Toll*, *Tol2*, *Passport*, itd (Ivics i Izsvák 2010). Transpozonski vektorski sustavi ipak imaju neke nedostatke koje je potrebno riješiti. Viralni vektori koriste molekularne mehanizme virusa za unos ciljane DNA u stanice dok transpozonski sustavi ovise o metodama transfekcije za eksperimente *in vitro* i *in vivo*. Kako bi se riješio taj problem adenovirusi, lentivirusi i retrovirusi su iskorišteni za dostavu transpozonskih vektora u stanice *in vivo* što je omogućilo primjenu transpozonskih vektora i u genskoj terapiji (Vargas i sur., 2016). Nakon integracije slijeda DNA od interesa transpozaza se ne smije ekspimirati predugo zbog opasnosti od insercijske onkogeneze. Iako se gen za transpozazu nalazi na episomalnom plazmidu, ponekad dolazi do kontinuirane ekspresije pa je sigurnija verzija dostava transpozaze u obliku mRNA molekule. Transpozaze u prirodi su kontrolirane mehanizmom. OPI (eng. *overproduction inhibition*) gdje se aktivnost transpozaze smanjuje kada dosegne određeni prag koncentracije. Zbog toga je potrebno precizno optimizirati omjer transpozaze i transpozona, što povećava efikasnost integracije. Postoje transpozoni koji preferiraju heterokromatin za mjesto ugradnje, što ih čini sigurnijom opcijom za gensku terapiju. Neki drugi transpozoni pak preferiraju transkripcijske jedinice pa su bolji izbor za eksperimente mutageneze. Još jedan fenomen prirodnih transpozona je lokalno skakanje (eng. *local hopping*) odnosno tendencija ugradnje u blizini donorskog lokusa, što može biti prednost, ali i nedostatak u eksperimentima mutageneze. Lokalno skakanje se može iskoristiti za uvođenje mutacija u specifičnoj kromosomskoj regiji, ali kad želimo obuhvatiti veće dijelove kromosoma potrebno je imati više donorskih lokusa (Muñoz-López i García-Pérez 2010, Tipanee i sur. 2017). Sve navedene karakteristike transpozona su omogućile upotrebu transpozonskih vektorskih sustava kao molekularnih alata u različitim poljima genetičkog

inženjerstva uključujući uspostavljanje stabilnih staničnih linija, stvaranje transgeničnih životinja, insercijsku mutagenezu, gensku terapiju i mnoge druge (Ivics i Izsvák 2010).

1.3.1. SLEEPING BEAUTY

Sleeping beauty (SB) je sintetički transponirajući sustav, pripadnik natporodice Tc1/*mariner*, rekonstruiran iz inaktivnih transpozona vrsti riba iz porodice *Salmonidae* reverznim inženjerstvom. U prirodi ovaj transpozon nosi mnoštvo inaktivirajućih mutacija u genu za transpozazu i ne može se mobilizirati. Ivics i sur. (1997) su metodama reverzne evolucije eliminirali inaktivirajuće mutacije unutar okvira čitanja gena za transpozazu i time po prvi put stvorili transpozonski sustav aktivan u kralješnjaka (Ivics i Izsvák, 2015). Prva konstruirana transpozaza SB10 je imala nisku efikasnost transpozicije, što je otežavalo njenu primjenu. Zbog toga su razvijene mnoge hiperaktivne mutante uvođenjem specifičnih mutacija u originalni slijed, kao što je SB100X koja ima 100 puta veću transpozicijsku aktivnost od originalne SB10 (Slika 4). Najnovija razvijena varijanta transpozaze SB je hySB100X, koja u usporedbi s SB100X ima 30% veću transpozicijsku aktivnost (Tipanee i sur. 2017). SB transpozonski sustav se sastoji od dvije komponente: SB transpozonskog vektora koji sadrži terminalne sljedove IR i slijed DNA od interesa te SB ekspresijskog vektora koji sadrži ORF (eng. *open reading frame*) transpozaze SB omeđen jakim promotorom i poli(A) signalom. Kotransfekcijom ova dva vektora dolazi do ekspresije transpozaze koja veže terminalne sljedove IR i integrira DNA od interesa u TA dinukleotid u genomu domaćina (Munoz-Lopez i Garcia-Perez 2010). Transpozaza SB, na razini slijeda DNA, preferira ugradnju u TA dinukleotide koji se nalaze u sljedovima bogatim AT ponavljanjima, dok na razini genoma ima gotovo nasumičan uzorak integracije. Jedna trećina integracija se odvija unutar transkripcijskih jedinica, s time da se većinom radi o intronima, dok ostatak otpada na intergenska područja. Zbog gotovo nasumičnog uzorka ugradnje, čime je smanjena vjerojatnost insercijske mutageneze, SB transpozonski vektorski sustavi su primjenjivi u mnogim eksperimentima. Između terminalnih sljedova IR se mogu ugraditi raznovrsne ekspresijske kazete počevši od fluorescentnih markera, shRNA ekspresijskih kazeta do terapijskih genskih konstrukata. Zato se SB danas koristi za stvaranje transgeničnih stanica, tkiva i životinja, insercijsku mutagenezu, gensku terapiju i mnoštvo drugih metoda (Ivics i Izsvák 2015).



Slika 4. Struktura transpozona *sleeping beauty* i evolucija transpozaza za SB transpozonski vektorski sustav. Transpozon SB je dug 1,6 kb i sastoji se od dva obrnuta i dva direktna ponavljanja koja okružuju gen koji kodira transpozazu. Nativna aktivna transpozaza (SB10) sadrži DNA-vezujuću i katalitičku domenu te je duga 360 aminokiselina. Unutar DNA-vezujuće domene se nalaze dvije zavojnica-okret-zavojnica domene (PAI i RED) odvojene GRPR motivom. Unutar katalitičke domene se nalazi visoko konzervirani motiv DDE koji je odgovoran za cijepanje DNA tokom transpozicije. Aktivnost transpozaze SB je uspješno pojačana metodama usmjerene evolucije kroz supstitucije aminokiselina kako bi nastale hiperaktivne varijante SB11, SB100X i hySB100X. Preuzeto i prilagođeno iz rada Tipanee i sur. (2017).

1.3.2. PIGGYBAC

Transpozon *piggyBac* (PB) otkriven je u staničnoj liniji TN-386 izoliranoj iz leptira *Trichoplusia ni* tokom proučavanja propagacije bakulovirusa kada je ovaj transpozon transponirao u genom bakulovirusa i stvorio plakove u staničnoj kulturi (Woodard i Wilson, 2016). PB transpozonski vektorski sustav se sastoji od dvije komponente, kao i SB sustav, te s njime dijeli mnoge karakteristike (Tablica 1). Izvorna transpozaza PB nije imala dovoljnu aktivnost pa je uz pomoću strategije kodonske optimizacije razvijena transpozaza specifična za stanice miša mPB i čovjeka hPB s povećanom aktivnošću. Uvođenjem sedam aminokiselinskih supstitucija razvijena je do danas najaktivnija transpozaza PB hyPBBase s 20

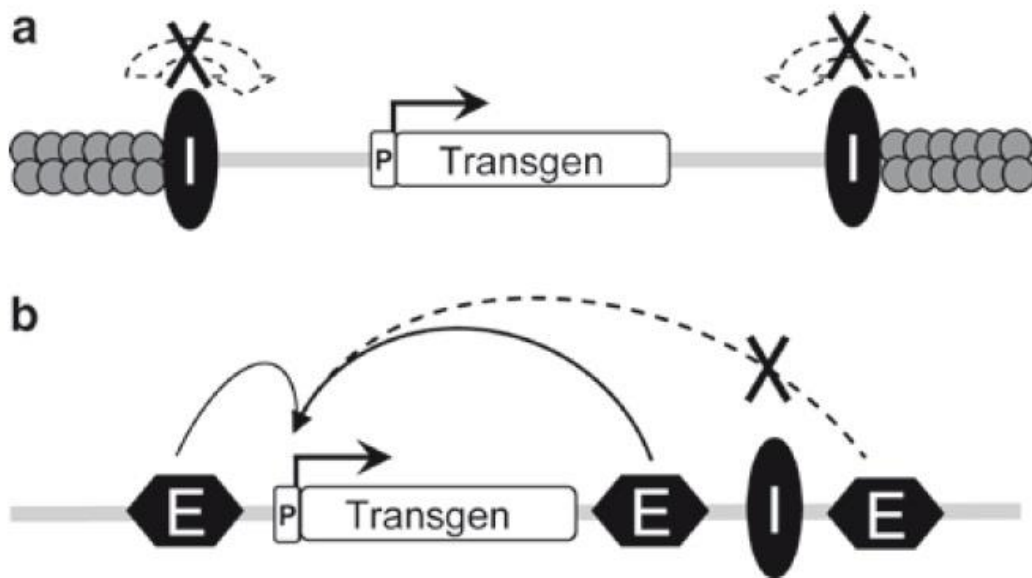
puta većom aktivnosti u usporedbi s mPB (Walker, 2009, Tipanee i sur. 2017). PB transpozaza specifično prepoznaje sljedove TTAA i u njih ugrađuje ciljanu DNA. Na razini genoma ova transpozaza preferira introne transkripcijskih jedinica, CpG otoke i mjesta početka transkripcije (Galvan i sur. 2010). Zbog toga se PB transpozonski sustav pokazao kao dobar alat za insercijsku mutagenezu. PB transpozoni mogu prenositi DNA veliku i do 200 kb, što im uz ostale karakteristike daje iznimnu prednost nad drugim vektorskim sustavima u prijenosu gena.

Tablica 1. Usporedba SB i PB transpozonskih vektorskih sustava. Preuzeto i prilagođeno prema radu Tipanee i sur. (2017).

Karakteristike	SB	PB
Podrijetlo	<i>Salmonidae</i>	<i>Trichoplusia ni</i>
Klasifikacija	Natporodica Tc1/ <i>mariner</i>	Natporodica <i>piggyBac</i>
Molekularna struktura	Dužina ~ 1.6 kb Dva terminalna slijeda IR Transpozaza duga 360 aminokiselina	Dužina ~ 2.5 kb Dva terminalna slijeda IR Transpozaza duga 594 aminokiseline
Ciljno mjesto ugradnje	AT	TTAA
Transpozonski otisak	Da	Ne
Kapacitet	Do 12 kb	Do 200 kb
Lokalno skakanje	Da (30-60% unutar donorskog kromosoma)	Da (9-30% unutar donorskog kromosoma)
OPI	Da	Da
Integracijski profil	~25-45% u RefSeq gene <2% u start mjesta transkripcije ~2% u CpG otoke <1% u DNaza I hipersenzitivne regije	~50-55% u RefSeq gene ~2-20% u start mjesta transkripcije ~4-18% u CpG otoke ~1-5% u DNaza I hipersenzitivne regije

1.4. IZOLATORI

Genomi eukariota su visoko organizirani i regulirani kompleksnim sustavom DNA elemenata te RNA molekula i proteina koji interagiraju s njima (Bushey, Dorman i Corces 2008). Izolatori su regulatorni sljedovi DNA koji stvaraju granice u kromatinu i čuvaju određene regije genoma od vanjskog regulatornog utjecaja, čime održavaju organizaciju i regulaciju eukariotskih genoma (Recillas-Targa i sur. 2002). Prema funkciji izolatore dijelimo na dva tipa: one koji blokiraju pojačivače (eng. *enhancer-blocking insulator*) i granične izolatore (eng. *barrier insulator*). Izolatori koji blokiraju pojačivače sprječavaju interakciju pojačivača i pripadnih promotora kada se nalaze između njih. Granični izolatori služe kao kromatinske barijere koje sprečavaju širenje heterokromatina i time utišavanje gena (Gaszner and Felsenfeld, 2006). Izolatori se često koriste u izradi vektorskih sustava kako bi onemogućili interakciju transgena s okolnim regulatornim elementima te spriječili njihovo utišavanje heterokromatinizacijom (Slika 5). Utišavanje transgena predstavlja veliki problem kod uspostave staničnih linija u svrhu dugotrajne ekspresije transgena zbog heterokromatinizacije ugrađenog slijeda DNA. Izolatori s graničnom funkcijom rješavaju taj problem stvarajući kromatinske barijere koje sprečavaju heterokromatinizaciju i utišavanje ugrađenog transgena. cHS4 (eng. *chicken hypersensitive site 4*) je 1,2 kb dug izolator koji posjeduje pojačivač-blokirajuću i graničnu funkciju te se zbog toga često koristi u genetičkom inženjerstvu (Benabdellah i sur. 2014) Daljnjim proučavanjem cHS4 izolatora je utvrđeno da se njegova pojačivač-blokirajuća i granična aktivnost mogu razdvojiti što je olakšalo njegovu upotrebu u izradi različitih vektora (Recillas-Targa i sur. 2002).



Slika 5. Usporedba izolatora koji blokira pojačivače i graničnog izolatora u modelnom vektorskom sustavu. (a) Granični izolator (I) sprječava utišavanje transgena tako što onemogućava širenje heterokromatina (sive kuglice). **(b)** Izolator koji blokira pojačivače (I) može spriječiti interakciju pojačivača (E) i promotora (P) samo ako se nalazi između njih. Preuzeto i prilagođeno prema radu Ramezani i Hawley (2010).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je izrada plazmidnih vektora zasnovanih na sintetičkim transpozonskim sustavima koji bi omogućili nasumičnu i stabilnu integraciju bilo kojeg gena od interesa te njegovu dugotrajnu ekspresiju u stanicama primateljima. U tu svrhu su izabrani transpozoni *sleeping beauty* (SB) i *piggyBac* (PB) koji su se dosada pokazali kao odlični alati za genomsku integraciju zbog svoje gotovo nasumične ugradnje te snažne aktivnosti njihovih transpozaza. Cilj je konstruirati dva binarna vektorska sustava bazirana na transpozonima SB odnosno PB koji se sastoje od po dva plazmida, gdje jedan nosi terminalne sljedove IR koji okružuju odsječak DNA za ugradnju ekspresijske kazete, a drugi gen za transpozazu. Dodatni cilj je ugradnja izolatorskih sljedova u plazmide koji će sadržavati ekspresijsku kazetu kako bi se spriječilo utišavanje iste heterokromatinizacijom te omogućila njena dugotrajna ekspresija u staničnoj kulturi. Ovi vektorski sustavi koristit će se u istraživanjima gdje je na jednostavan način potrebno dobiti stanične linije koje dugotrajno ekspimiraju stabilno ugrađeni gen od interesa.

Specifični ciljevi

- Izolacija, amplifikacija i ugradnja terminalnih sljedova IR SB odnosno PB transpozona u plazmidnu okosnicu
- Ugradnja četiri izolatorska slijeda, po dva sa svake strane mjesta za ugradnju ekspresijske kazete, u plazmidni vektor SB odnosno PB
- Amplifikacija i ugradnja gena za transpozazu PB u ekspresijski vektor
- Provjera završnih konstrukata sekvenciranjem

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

Komercijalni setovi kemikalija

Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD); EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (Takara, Tokio, Japan); ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, SAD); QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka); QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka).

Enzimi i pridruženi puferi

Acc65I (10 U/ μ L; New England BioLabs, Ipswich, SAD); Sall (10 U/ μ L; New England BioLabs, Ipswich, SAD); XbaI (10 U/ μ L; New England BioLabs, Ipswich, SAD); XhoI (10 U/ μ L; New England BioLabs, Ipswich, SAD); NheI (10 U/ μ L; New England BioLabs, Ipswich, SAD); XmaI (10 U/ μ L; New England BioLabs, Ipswich, SAD); HindIII (10 U/ μ L; New England BioLabs, Ipswich, SAD); Esp3I (10 U/ μ L; Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD); BpiI (10 U/ μ L; Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD); 10x NEBuffer 1.1, 2.1, 3.1, 10x CutSmart (New England BioLabs, Ipswich, SAD); 10x Tango Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD); 10x G Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD); FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/ μ L; Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD); FastAP Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD); T4 DNA Ligase (350 U/ μ L; Takara, Tokio, Japan); 10x T4 DNA Ligation Buffer (Takara, Tokio, Japan); T4 Polynucleotide Kinase (10 U/ μ L; Takara, Tokio, Japan);

Boje i markeri molekulskih masa

6x DNA loading dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD); 100 bp DNA ladder (Solis Biodyne, Tartu, Estonija); GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD); QuickLoad Purple 1 kb DNA ladder (New England BioLabs, Ipswich, SAD); GelGreen Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, SAD)

Plazmidi

pSBtet-RB (Addgene plazmid #60506); pBCAG-eGFP (Addgene plazmid #40973); pUK21gg; pBackBone-BZ; tNS-pPro-CBh

Kemijski kompetentne bakterijske stanice

NEB Stable Competent *Escherichia coli* (New England BioLabs, Ipswich, SAD), *Escherichia coli* XL10-Gold (Agilent, Santa Clara, SAD)

Uredaji

Centrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka); Mini centrifuga Combi-Spin FVL-2400N (BioSan, Riga, Latvija); Termoblok tresilica Mixer HC (StarLab, Milton Keynes, Ujedinjeno kraljevstvo); Inkubator EN 300 (Nuve, Ankara, Turska); Uređaj za lančanu reakciju polimerazom Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, SAD); Uređaj za elektroforezu PowerPac Basic (Bio-Rad, Hercules, SAD); Tresilica s inkubatorom Orbi-Safe (Sanyo, Osaka, Japan); UV transiluminator (Clever Scientific, Rugby, Ujedinjeno kraljevstvo); ne-UV transiluminator UVI Blue (Uvitec, Cambridge, Ujedinjeno kraljevstvo); spektrofotometar NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)

Ostalo

Luria-Bertani (LB) tekući medij (5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L BactoTrypton, 10 g/L NaCl); Luria-Bertani (LB) kruti medij (5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L BactoTrypton, 15 g/L agar); destilirana voda; kanamicin (50 mg/mL); ampicilin (100 mg/mL); pufer TAE (1mM Tris, 1mM octena kiselina, 1 mM EDTA, pH 8.0); agaroza (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD); etanol; početnice (Macrogen, Seul, Južna Koreja); DTT (10 mM), IPTG (100 mM), X-gal (20 mg/mL), program SnapGene (GSL Biotech, Chicago, SAD), program Adobe Phostoshop CC (Adobe, San Jose, SAD), program Human splicing finder (Verzija 3.1; Desmet i sur. 2009).

3.2. METODE

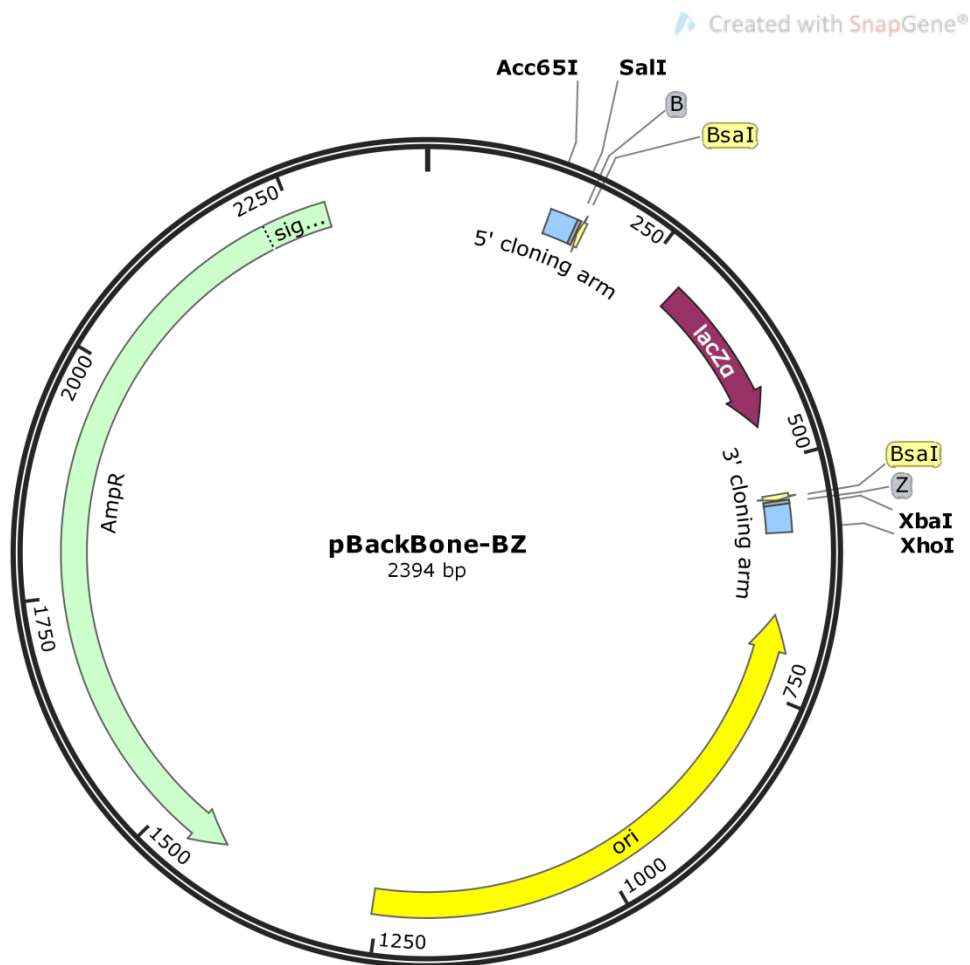
3.2.1. UGRADNJA RESTRIKCIJSKIH MJESTA Esp3I I BbsI U PLAZMIDNU OKOSNICU

Plazmid pBackBone-BZ (Slika 6) je iskorišten kao okosnica za kloniranje terminalnih sljedova IR transpozona *sleeping beauty* i *piggyBac* te izolatorskih sljedova. Kako bi to bilo moguće, okosnica mora sadržavati restrikcijska mjesta za enzime Esp3I i BbsI. Prvo su dizajnirani oligonukleotidi dugi 48 pb koji sparivanjem daju kohezivne krajeve identične

onima koje ostavljaju restrikcijski enzimi Acc65I i Sall te sadrže restrikcijsko mjesto za enzim Esp3I. Kako bi se oligonukleotidi sparili u dvolančanu DNA, dodan je po 1 μ L svakog oligonukleotida (100 μ M), 0.5 μ L T4 polinukleotid kinaze, 1 μ L 10x T4 ligacijskog pufera i 6.5 μ L destilirane vode kako bi ukupni volumen bio 10 μ L. Smjesa je stavljena u PCR uređaj te je odabran sljedeći program: 37°C / 30 min, 95°C / 5 min, spuštanje temperature do 25°C, 5°C / 1 min. Potom je okosnica pocijepana restrikcijskim enzimima Acc65I i Sall tako što je dodano po 10 U svakog enzima u otopinu koja sadrži 10x pufer NEB 3.1, 500 ng pBackBone-BZ plazmida ($\nu=215$ ng/ μ L) i destiliranu vodu do ukupnog volumena od 20 μ L te je cijela smjesa stavljena u PCR uređaj na sljedeći program: 37°C / 3 h, 65°C / 20 min. Nakon restrikcije je napravljena defosforilacija pocijepanog plazmida miješanjem digestiranog pBackBone-BZ plazmida ($\nu=25$ ng/ μ L) s 1 U FastAP enzima, 10x FastAP puferom i destiliranom vodom. Defosforilacija je provedena na 37°C / 20 min i 75°C / 5 min. Onda je postavljena reakcija ligacije s omjerom inserta i plazmida, 3:1 s masom vektora koja iznosi 50 ng. Volumeni potrebni za reakciju su izračunati pomoću programa NEBioCalculator (New England BioLabs, Ipswich, SAD) unošenjem duljina vektora i inserta koje iznose 2370 pb odnosno 48 pb te koncentracije defosforiliranog vektora koja iznosi 5 ng/ μ L. Na kraju je dodana destilirana voda do ukupnog volumena od 20 μ L. Reakcija ligacije je provedena na 16°C, 45 min. 5 μ L ligacijske reakcije je potom transformirano u kemijski kompetentne bakterije *E. coli* soja NEB Stable metodom toplinskog šoka. Bakterije su stavljene na led 10 min pa u termoblok na 42°C, 35 sekundi. Onda su vraćene led gdje su inkubirane 5 min te im je zatim dodano 450 μ L tekućeg LB medija. Prebačene su na oporavak u termobloku na kojem je odabran sljedeći program: 37°C, 15 min, 300 rpm. Nakon oporavka na ploču s ampicilinom je dodano 150 μ L bakterija te je ploča stavljena u inkubator preko noći (16 h) na 37°C. Kako bi se potvrdila uspješnost ligacije napravljena je reakcija PCR kolonija s početnicama C9_seq1 i ori_seq_FW (Tablica 2) na 10 bakterijskih kolonija prema protokolu proizvođača (EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix). Prema dužini i nukleotidnom sastavu početnica izračunata je optimalna temperatura prijanjanja. Nakon reakcije PCR kolonija su svi uzorci u volumenu od 5 μ L nanoseni na 1% agarozni gel u koji je prethodno dodana DNA interkalirajuća boja GelGreen. Elektroforeza pri jakosti električnog polja od 10 V/cm trajala je 20 min. Kao marker je korišten 100 bp DNA ladder kojeg je dodano 6 μ L. Iz pozitivnih bakterijskih kolonija su postavljene prekonoćne kulture u 5 μ L tekućeg LB medija u koji je dodano 5 μ L ampicilina. Kulture su stavljene u tresilicu s inkubatorom na 37°C, 190 rpm, 16 h. Sljedeći dan su iz prekonoćnih kultura izolirani plazmidi uz pomoć komercijalno dostupnog

seta ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit te su njihove koncentracije izmjerene na uređaju NanoDrop 8000.

Kako bi plazmidna okosnica sadržavala i restrikcijsko mjesto za BbsI enzim dizajniran je par oligonukleotida koji sparivanjem stvaraju ovo restrikcijsko mjesto te su im kohezivni krajevi komplementarni restrikcijskim mjestima koje ostavljaju enzimi XbaI i XhoI. Sparivanje oligonukleotida je napravljeno kao u prethodnom koraku. Izolirana plazmidna okosnica je pocijepana s enzimima XbaI i XhoI tako što je u reakciju od 20 μ L dodano po 10 U svakog enzima, 10x CutSmart pufer, 500 ng plazmidne okosnice koncentracije 296 ng/ μ L i destilirana voda. Reakcija je stavljena u PCR uređaj na sljedeći program: 2 h i 30 min / 37°C, 20 min / 65°C. Defosforilacija, ligacija i transformacija su provedene prema prethodno opisanom protokolu. Kako bi se potvrdila uspješnost ugradnje sparenih oligonukleotida u plazmidnu okosnicu napravljena je reakcija PCR kolonija s početnicama C9_seq1 i C9_seq2 (Tablica 2) prema protokolu proizvođača (EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix). Produkt reakcije je razdvojen elektroforezom u gelu agaroze. Iz pozitivnih bakterijskih kolonija postavljene su prekonoćne kulture iz kojih su sljedeći dan izolirani plazmidi te izmjerena njihova koncentracija prema prethodno opisanom protokolu. Po tri klona su sekvencirana u servisu Macrogen (Amsterdam, Nizozemska) kako bi se potvrdila uspješnost ugradnje sparenih oligonukleotida koji sadrže restrikcijska mjesta Esp3I i BbsI u plazmidnu okosnicu. Potvrđeni klonovi su nazvani pBB-ARMS.

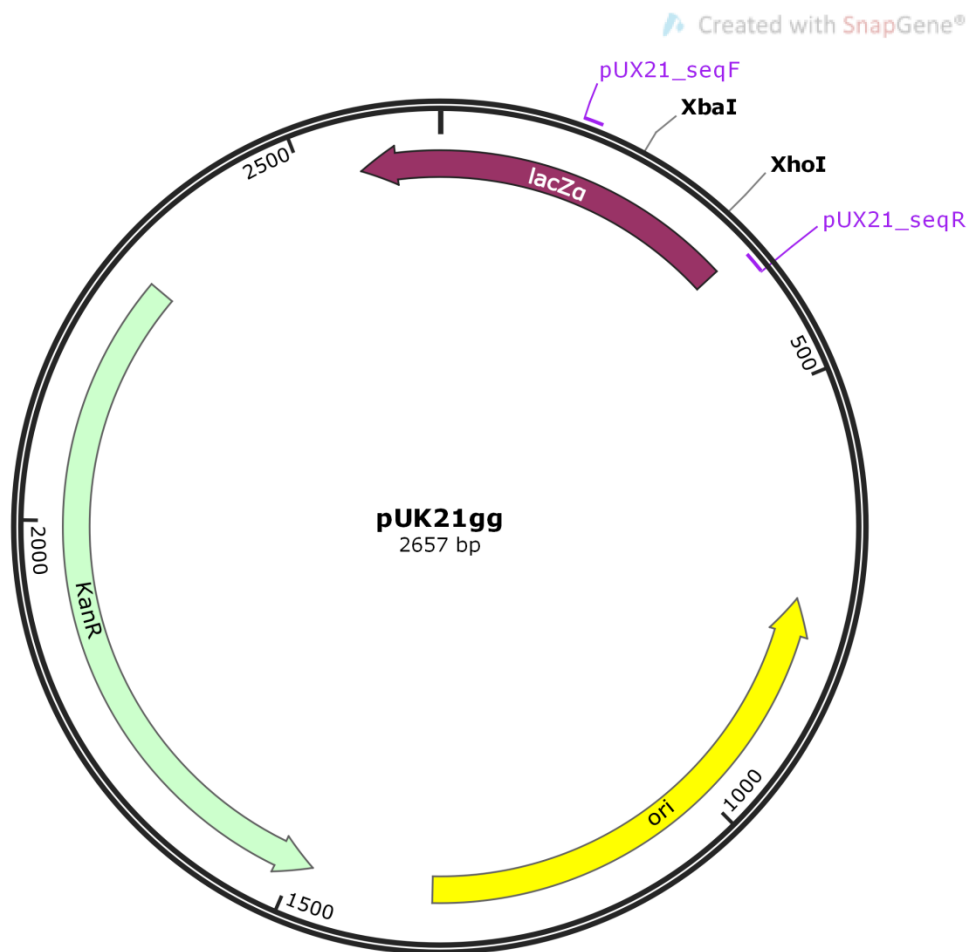


Slika 6. Shematski prikaz plazmidne okosnice pBackBone-BZ. Acc65I – restrikcijsko mjesto enzima Acc65I; 5' cloning arm – 5' mjesto za kloniranje; SalI – restrikcijsko mjesto enzima SalI; B i Z – mjesta cijepanja restrikcijskog enzima BsaI; BsaI – mjesto vezanja restrikcijskog enzima BsaI; lacZ α – gen za α podjedinicu β -galaktozidaze; XbaI – restrikcijsko mjesto enzima XbaI; 3' cloning arm – 3' mjesto za kloniranje; XhoI – restrikcijsko mjesto enzima XhoI; ori – izvorište replikacije; AmpR – gen za β -laktamazu koja daje otpornost na antibiotik ampicilin. Mapa plazmida je napravljena u programu SnapGene.

3.2.2. UGRADNJA IZOLATORSKIH SLJEDOVA U PLAZMID pUK21gg

Plazmid pUK21gg (Slika 7), 432 pb kraća verzija plazmida pUK21, je korišten kao intermedijarni vektor za ugradnju izolatorskih sljedova i terminalnih sljedova IR transpozona *sleeping beauty* odnosno *piggyBac*. Kako bi se navedeni sljedovi kasnije mogli ugraditi u plazmidnu okosnicu pBackBone-BZ u pUK21gg je prvo ugrađen 84 pb dug odsječak DNA

koji sadrži restrikcijska mjesta BsaI i Esp3I. Odsječak DNA je naručen preko servisa Macrogen u obliku dva komplementarna oligonukleotida koji sparivanjem daju dvolančanu DNA s kohezivnim krajevima kakve ostavljaju enzimi XbaI i XhoI. Sparivanje oligonukleotida je provedeno prema protokolu opisanom u prethodnom poglavlju. Potom je pUK21gg ($\gamma=149$ ng/ μ L) porezan restrikcijskim enzimima XbaI i XhoI te je defosforiliran kao i prethodni plazmidi. Ligacija pUK21gg (2657 pb) i odsječka DNA (84 pb) je provedena prema uputama programa NEBioCalculator (New England BioLabs, Ipswich, SAD) te je izabran omjer inserta i vektora jednak 3:1 s masom vektora od 50 ng. Ligacijska reakcija je inkubirana na 16°C, 45 min nakon čega su transformirane u bakterije NEB Stable metodom toplinskog šoka opisanom u prethodnom poglavlju. S obzirom da plazmid pUK21gg nosi otpornost na antibiotik kanamicin, vrijeme oporavka bakterija u tekućem LB mediju je produženo na 30 min te su bakterije dodane na ploče s krutim LB medijem koji sadrži kanamicin. Ploče s bakterijama su inkubirane 16 h na 37°C. Iz 6 bakterijskih kolonija su postavljene prekonoćne kulture u 5 mL tekućeg LB medija i 5 μ L kanamicina te su inkubirane u tresilici s inkubatorom na 37°C, 190 rpm, 16 h. Sljedeći dan su iz njih izolirani plazmidi, proizvoljno nazvani XX-pUK-ENx2, pomoću seta ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit te su im izmjerene koncentracije na uređaju NanoDrop 8000. Kako bi se potvrdila uspješnost ligacije napravljena je restrikcijska analiza svih šest XX-pUK-ENx2 plazmida enzimom BsaI koji cijepa ugrađeni odsječak DNA na dva mjesta. U svaku reakciju je dodano 10 U BsaI, 500 ng plazmida XX-pUK-ENx2, 10x NEB 3.1. pufera i destilirane vode do ukupnog volumena od 20 μ L. Restrikcija reakcija je inkubirana na temperaturi od 37°C, 1 h. Potom je napravljena elektroforeza u 1% gelu agaroze uz interkalirajuću boju GelGreen. U svaku reakciju restrikcije je dodana boja za nanošenje 6x DNA loading dye te je ukupni volumen reakcije nanesen na gel. Elektroforeza je trajala 20 min pri jakosti električnog polja od 10 V/cm.



Slika 7. Shematski prikaz intermedijarnog plazmida pUK21gg. *lacZα* – gen za α podjedinicu β -galaktozidaze; pUX21-seqF – *forward* početnica; XbaI – restrikcijsko mjesto enzima XbaI; XhoI – restrikcijsko mjesto enzima XhoI; pUX21_segR – *reverse* početnica; ori – izvorište replikacije, KanR – gen za aminoglikozid fosfotransferazu koja daje otpornost na antibiotik kanamicin. Mapa plazmida je napravljena u programu SnapGene.

Sljedeći korak je ugradnja izolatora (United States Patent No. US8133699B2, 2012) u plazmid XX-pUK-ENx2. Izolatorski slijed je naručen u obliku dva para oligonukleotida koji komplementarnim sparivanjem daju dva odsječka DNA gdje svaki na jednoj strani ima kohezivne krajeve potrebne za ligaciju u vektor, a na drugoj nepalindromske kohezivne krajeve kojima se međusobno ligiraju kako bi stvorili kompletan izolatorski slijed dug 146 pb. Oligonukleotidi su spareni prema opisanom protokolu. Potom je napravljena restrikcijska digestija plazmida XX-pUK-ENx2 enzimima NheI i XhoI koji ostavljaju kohezivne krajeve komplementarne izolatorskim odsječcima. U reakciju je dodano po 10 U svakog enzima, 500

ng XX-pUK-ENx2 ($\gamma = 319.6 \text{ ng}/\mu\text{L}$), 10x pufera NEB 2.1. i destilirane vode do ukupnog volumena od 20 μL . Reakcija je stavljena u PCR uređaj te je odabran sljedeći program: 37°C / 16 h, 65°C / 20 min. Nakon restrikcijske digestije plazmid XX-pUK-ENx2 je defosforiliran nakon čega je postavljena reakcija ligacije plazmida i dvaju izolatorskih odsječaka prema protokolima iz prethodnih poglavlja. Transformacija ligacijske reakcije u NEB Stable bakterije je napravljena prema protokolu iz ovog poglavlja. Kako bi se potvrdila uspješnost ligacije napravljena je reakcija PCR kolonija na 6 bakterijskih kolonija korištenjem početnica pUX21_seqF i pUX21_seqR (Tablica 2). Reakcija PCR kolonija je napravljena pomoću komercijalno dostupnog seta EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix prema uputama proizvođača. Produkti reakcije su stavljeni na 1% agarozni gel prema prethodno opisanom protokolu. Iz pozitivnih klonova su izolirani plazmidi korištenjem komercijalno dostupnog seta ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit. Idući korak je bio ponovna ugradnja dvaju izolatorskih odsječaka kako bi plazmid XX-pUK-ENx2 sadržavao dva uzastopna kompletna izolatorska slijeda. U tu svrhu je cijeli prethodno opisani protokol ponovljen osim što su u ovom koraku za restrikcijsku digestiju korišteni enzimi XbaI i SalI koji ostavljaju iste palindromske kohezivne krajeve (izokaudomeri) kao i prethodno korišteni NheI i XhoI. Plazmid izoliran nakon ovog koraka je proizvoljno nazvan XX-pUK-INSx2. Kako bi se potvrdila ugradnja oba izolatorska slijeda XX-pUK-INSx2 je poslan na sekvenciranje u servis MacroGen.

3.2.3. IZOLACIJA, AMPLIFIKACIJA I UGRADNJA TERMINALNIH SLJEDOVA IR TRANSPOZONA *SLEEPING BEAUTY* U PLAZMID XX-pUK-INSx2

Terminalni sljedovi IR transpozona *sleeping beauty* su izolirani restrikcijskom digestijom komercijalno dostupnog plazmida pSBtet-RB enzimima BsaI i HindIII. U restrikcijsku reakciju je dodano 10 U HindIII enzima, 15 U BsaI enzima, 10x NEB 2.1 pufera, 1000 ng plazmida pSBtet-RB ($\gamma = 781.4 \text{ ng}/\mu\text{L}$) i destilirane vode do ukupnog volumena od 20 μL . Digestija je provedena na 37°C, 16 h nakon čega su dobiveni fragmenti nanoseni na 1% agarozni gel u koji je dodana DNA interkalirajuća boja GelGreen. U uzorak je prije nanošenja na gel dodana boja 6x loading dye, a kao standard je korišten GeneRuler DNA Ladder Mix. Elektroforeza je provedena pri jakosti električnog polja od 5 V/cm te je nakon završetka agarozni gel prebačen na ne-UV transiluminator UVI Blue kako bi se vizualizirali fragmenti. Fragmenti koji sadrže lijevi odnosno desni terminalni slijed IR su

izrezani i pročišćeni iz gela korištenjem komercijalnog seta QIAquick Gel Extraction Kit te im je izmjerena koncentracija na uređaju NanoDrop 8000.

Idući korak je amplifikacija lijevog odnosno desnog terminalnog slijeda IR lančanom reakcijom polimeraze. U tu svrhu je korišten komercijalno dostupan set Herculase II Fusion DNA Polymerase i početnice SB-LoRo_L-FW, $T_m = 60^\circ\text{C}$ i SB-inside_R-RE, $T_m = 58^\circ\text{C}$ (Tablica 2) koje specifično umnažaju lijevi odnosno desni terminalni slijed IR. Lančana reakcija polimerazom je napravljena prema uputama proizvođača s tim da je prijanjanje početnica provedeno na 60°C . Potom su PCR produkti vizualizirani elektroforezom u gelu agaroze nakon čega su pročišćeni pomoću seta QIAquick PCR Purification Kit te im je koncentracija izmjerena na uređaju NanoDrop 8000.

PCR produkti terminalnih sljedova IR su pocijepani restriksijskim enzimom BsaI kako bi dobili viseće krajeve potrebne za ugradnju u plazmid XX-pUK-INSx2. U svaku reakciju digestije je dodano 10 U enzima BsaI, 10x CutSmart pufer, 400 ng lijevog ($\gamma = 67.14 \text{ ng } / \mu\text{L}$) odnosno desnog ($\gamma = 35.94$) terminalnog slijeda IR i destilirane vode do ukupnog volumena od 20 μL . Također je pocijepan i plazmid XX-pUK-INSx2 restriksijskim enzimom Esp3I. U reakciju je dodano 10 U enzima Esp3I, 2 μL DTT-a (10 mM), 10x Tango pufer, 400 ng plazmida XX-pUK-INSx2 ($\gamma = 148.1 \text{ ng } / \mu\text{L}$) i destilirane vode do ukupnog volumena od 20 μL . Obe digestije su provedene na 37°C , 16 h, a inaktivacija enzima je odrađena na 65°C , 20 min. Potom je pocijepan plazmid defosforiliran prema opisanom protokolu. Nakon defosforilacije su postavljene dvije reakcije ligacije za ugradnju lijevog (280 pb) odnosno desnog (275 pb) terminalnog slijeda IR u plazmid XX-pUK-INSx2 (2917 pb). Duljine vektora i inserta su unijete u program NEBioCalculator kao i željena masa vektora (40 ng) te omjer inserta i vektora (3:1). Pomoću dobivenih volumena su postavljene dvije ligacijske reakcije koje su inkubirane 45 min na 16°C . Dobiveni konstrukti proizvoljno nazvani ARM-L (lijevi terminalni slijed IR ugrađen u XX-pUK-INSx2) i ARM-R (desni terminalni slijed IR ugrađen u XX-pUK-INSx2) su transformirani u bakterije NEB Stable te su transformirane bakterije razmazane na ploče s krutim LB medijem koji sadrži kanamicin prema protokolu opisanom u prethodnom poglavlju. Ploče su inkubirane na 37°C , 16 h nakon čega je napravljena reakcija PCR kolonija kako bi potvrdili uspješnost ligacije. Reakcija PCR kolonija je napravljena pomoću seta EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix te su odabrane početnice SB-LoRo_L-FW i pUX21_seqR (Tablica 2) za oba konstrukta. Produkti reakcije PCR kolonija su provjereni gel elektroforezom kao i u prethodnim poglavljima. Iz pozitivnih klonova su postavljene prekonoćne kulture (po 3 za svaki uzorak) nakon čega je napravljena izolacija

plazmida kao u prethodnom poglavlju. Kako bi se potvrdila ispravnost lijevog odnosno desnog terminalnog slijeda IR uzorci su poslani na sekvenciranje u servis Macrogen.

3.2.4. IZOLACIJA, AMPLIFIKACIJA I UGRADNJA TERMINALNIH SLJEDOVA IR TRANSPOZONA *PIGGYBAC* U PLAZMID XX-pUK-INSx2

Terminalni sljedovi IR transpozona *piggyBac* su izolirani iz plazmida pBCAG-eGFP (Addgene, plazmid #40973) lančanom reakcijom polimerazom. U tu svrhu je korišten set Herculase II Fusion DNA Polymerase za dvije reakcije. U jednu reakciju je dodan pBCAG-eGFP i početnice specifične za PB3 terminalni slijed IR, PB3-FW, $T_m = 54^\circ\text{C}$ i PB3-RE, $T_m = 54^\circ\text{C}$ dok je u drugu dodan isti plazmid s početnicama specifičnim za PB5 terminalni slijed IR, PB5-FW, $T_m = 52^\circ\text{C}$ i PB5-RE, $T_m = 51^\circ\text{C}$ (Tablica 2). Obje reakcije su pripremljene prema uputama proizvođača. Produkti PCR reakcije su pročišćeni pomoću seta QIAquick PCR Purification Kit te su im koncentracije izmjerene na uređaju NanoDrop 8000. PB3 i PB5 terminalni slijed IR su ugrađeni u plazmid XX-pUK-INSx2 na isti način kao i terminalni sljedovi transpozona *sleeping beauty* što je opisano u prethodnom poglavlju. Za provjeru uspješnosti ugradnje je napravljena reakcija PCR kolonija pomoću seta EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix te su odabrane početnice pUX21_seqF i pUX21_seqR (Tablica 2). Izolirani plazmidi su proizvoljno nazvani ARM-L_pb (PB5 ugrađen u XX-pUK-INSx2) i ARM-R_pb (PB3 ugrađen u XX-pUK-INSx2). Kako bi se potvrdila ispravnost terminalnih sljedova IR PB5 i PB3 izolirani plazmidi su poslani na sekvenciranje u servis Macrogen.

3.2.5. UGRADNJA TERMINALNI SLJEDOVA IR TRANSPOZONA *SLEEPING BEAUTY* ODNOSNO *PIGGYBAC* I IZOLATORSKIH SLJEDOVA U PLAZMIDNU OKOSNICU pBB-ARMS

Ugradnja terminalnih sljedova IR i izolatorskih sljedova u plazmidnu okosnicu pBB-ARMS je provedena u dva koraka koja su identična za sustave *sleeping beauty* i *piggyBac*. Prvo je plazmid pBB-ARMS ($\gamma = 255 \text{ ng}/\mu\text{L}$) porezan restrikcijskim enzimom Esp3I kako bi se linearizirao i dobio kohezivne krajeve potrebne za ugradnju inserta. Istovremeno je pocijepan plazmid ARM-L ($\gamma = 112.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$) restrikcijskim enzimom BsaI kako bi nastao insert koji sadrži lijevi terminalni slijed IR i dva uzastopna izolatorska slijeda. Također je na

isti način pocijepan plazmid ARM-L_pb ($\gamma = 239.4 \text{ ng}/\mu\text{L}$) kako bi se izolirao insert koji sadrži PB5 terminalni slijed IR i dva uzastopna izolatorska slijeda. Potom je plazmid pBB-ARMS defosforiliran te su u njega zasebno ligirani dobiveni inserti. Konstrukti su transformirani u NEB Stable bakterije te su transformanti razmazani na ploče s krutim LB medijem koji sadrži ampicilin. Dobiveni konstrukti su proizvoljno nazvani pBB-ARMS-L i pBB-ARMS-L_pb. Kako bi se provjerila uspješnost ligacija napravljena je reakcija PCR kolonija (EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix). Za konstrukt pBB-ARMS-L su izabrane početnice SB-LoRo-FW i C9_seq2, a za konstrukt pBB-ARMS-L_pb početnice PB5-FW i lacZ_1 (Tablica 2). Reakcije su pripremljene prema uputama proizvođača. Produkti reakcije PCR kolonija su vizualizirani gel elektroforezom nakon čega su iz pozitivnih klonova postavljene prekonoćne kulture u tekućem LB mediju s ampicilinom. Sljedeći dan su plazmidi izolirani iz bakterija pomoću seta ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit te su im koncentracije izmjerene na uređaju NanoDrop 8000. Svi opisani postupci su napravljeni prema prethodno opisanim protokolima. Zadnji korak je ugradnja desnog terminalnog slijeda IR i dvaju uzastopnih izolatorskih slijedova u plazmid pBB-ARMS-L odnosno ugradnja PB3 terminalnog slijeda IR i dvaju uzastopnih izolatorskih slijedova u plazmid pBB-ARMS-L_pb. Kako bi se to postiglo plazmidi ARM-R ($252.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$) i ARM-R_pb ($248.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$) su pocijepani restriktivnim enzimom BsaI čime su dobiveni fragmenti koji sadrže desni terminalni slijed IR i dva uzastopna izolatora odnosno lijevi terminalni slijed IR i dva uzastopna izolatora. Istovremeno su pocijepani plazmidi pBB-ARMS-L i pBB-ARMS-L_pb enzimom BpI tako što je u svaku reakciju dodano 15 U enzima BpI, 10x pufer G, 500 ng pBB-ARMS-L ($203.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$) odnosno 500 ng pBB-ARMS-L_pb ($273 \text{ ng}/\mu\text{L}$) i destilirane vode do ukupnog volumena od $20 \mu\text{L}$. Reakcije su stavljene u PCR uređaj te je odabran sljedeći program: 16 h / 37°C , 20 min / 65°C . Potom su porezani plazmidi pBB-ARMS-L i pBB-ARMS-L_pb defosforilirani nakon čega je postavljena reakcija ligacije svakog vektora s pripadnim insertom. Dobiveni konstrukti su transformirani u NEB Stable bakterije koje su nakon transformacije razmazane na ploče krutim LB medijem i ampicilinom. Svi postupci su napravljeni prema protokolima iz prethodnih poglavlja. Kako bi se potvrdila uspješnost ugradnje PB3 terminalnog slijeda IR i dvaju uzastopnih izolatora u plazmid pBB-ARMS-L_pb napravljena je reakcija PCR kolonija s početnicama pUX21-seqR i ori_seq1 (Tablica 2) korištenjem seta EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix. PCR produkti su potom stavljeni na 1% agarozni gel kako bi se vizualizirali. Iz pozitivnih klonova su postavljene prekonoćne kulture iz kojih je sljedeći dan napravljena izolacija plazmida. Izolirani plazmid je nazvan pBB-PB_BZ. Kako bi se potvrdila uspješnost ugradnje desnog terminalnog slijeda IR i dvaju

uzastopnih izolatora u plazmid pBB-ARMS-L napravljena je restrikcijska analiza dobivenih konstrukata. Kako bi se to postiglo prvo su postavljene prekonoćne kulture iz 6 nasumičnog odabranih kolonija. Potom je napravljena izolacija plazmida iz prekonoćnih kultura pomoću seta ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit te im je koncentracija izmjerena na uređaju NanoDrop 8000. Izolirani konstrukti nazvani pBB-SB_BZ su onda porezani s restrikcijskim enzimom XmaI koji cijepa unutar izolatorskih sljedova da bi potvrdili ugradnju zadnjeg inserta. U svaku reakciju digestije je dodano po 10 U enzima XmaI, 10x CutSmart pufer, 500 ng pBB-SB_BZ koncentracija: 401.2 ng/μL, 330.2 ng/μL, 419.9 ng/μL, 365.1 ng/μL, 369.9 ng/μL, 298.5 ng/μL i destilirane vode do volumena od 20 μL. Reakcija je inkubirana 16 h na 37°C. Pozitivni klonovi su poslani na sekvenciranje u servis Macrogen kako bi se potvrdila ispravnost ugrađenih sljedova.

3.2.6. AMPLIFIKACIJA SLIJEDA TRANSPOZAZE PB I ASSEMBLY EKSPRESIJSKOG VEKTORA

Transpozaza PB je dizajnirana prema aminokiselinskom slijedu opisanom u radu Doherty i sur. (2012). Dizajn transpozaze PB je uključivao optimizaciju kodona za ekspresiju u staničnim linijama temeljenim na ljudskim stanicama i uklanjanje restrikcijskih mjesta te potencijalnih *splicing* donora i akceptora koji su predviđeni uz pomoć programa Human splicing finder. Sinteza slijeda transpozaze PB je naručena preko servisa Integrated DNA Technologies. Dobivena transpozaza PB je prvo amplificirana korištenjem seta Herculase II Fusion DNA Polymerase i početnica C9_seq1 i C9_seq2 (Tablica 2). Kako bi se slijed transpozaze PB uspješno amplificirao protokol za lančanu reakciju polimerazom je optimiziran tako što je broj ciklusa amplifikacije smanjen na 10. Dobiveni produkt PCR reakcije je pročišćen korištenjem seta QIAquick PCR Purification Kit te mu je izmjerena koncentracija na uređaju NanoDrop8000. Sljedeći korak je ugradnja amplificiranog slijeda transpozaze PB u intermedijarni vektor pUK21gg. PCR produkt ($\gamma = 32.9 \text{ ng}/\mu$) i pUK21gg ($\gamma = 48.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$) su u tu svrhu porezani enzimima XbaI i XhoI kako bi dobili kompatibilne kohezivne krajeve. Zatim je porezani plazmid pUK21gg defosforiliran te je u njega ligiran porezani slijed transpozaze PB. Ligacijska reakcija je transformirana u kompetentne bakterije XL10-Gold te su transformante razmazane na ploče s krutim LB medijem koji sadrži kanamicin. Svi postupci su napravljeni prema prethodno opisanim protokolima. Kako bi se potvrdila uspješnost ligacije napravljena je reakcija PCR kolonija korištenjem seta

EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix i početnica pUX21-seqF i HyPB_seq3 (Tablica 2). PCR produkti su zatim potvrđeni elektroforezom u gelu agaroze te su iz pozitivnih klonova postavljene prekonoćne kulture. Iz njih su sljedeći dan izolirani plazmidi koji su poslani na sekvenciranje u servis Macrogen kako bi se potvrdila ispravnost slijeda PB tranpozaze. Dobiveni konstrukt je proizvoljno nazvan hyPB-14.

Plazmid pBackBone-BZ je odabran kao okosnica ekspresijskog vektora. Kako bi se transpozaza PB mogla eksprimirati u animalnim stanicama u ekspresijski vektor su, osim modula koji nosi gen transpozaze PB, ugrađena tri modula: terminator, promotor i Ig-dual. Terminatorski slijed se nalazi na plazmidu tNS-pTer-H, promotorski na plazmidu tNS-pPro-CBh dok je Ig-dual naručen u obliku dvaju komplementarnih oligonukleotida koji sparivanjem daju DNA odsječak s visećim krajevima potrebnim za ugradnju u plazmidnu okosnicu. Prije nego je napravljeno sklapanje (eng. *assembly*) opisanih DNA fragmenata Ig-dual oligonukleotidi su spareni prema protokolu iz prvog poglavlja. Ugradnja svih DNA odsječaka u plazmidnu okosnicu je provedena pomoću Golden Gate sklapanja prema protokolu opisanom u tablici 3. U reakciju ligacije je osim modula dodan 10x pufer CutSmart, 10mM ATP, 10 U enzima BsaI, 350 U T4 DNA ligaze i destilirana voda do ukupnog volumena od 20 μ L. Reakcija je stavljena u PCR uređaj te je odabran sljedeći program: (37°C / 5 min, 16°C / 10 min) x 30, 50°C / 5 min, 80°C / 10 min. Nakon završetka programa reakcijske smjese su transformirane u bakterije XL10-Gold prema već opisanom protokolu. Transformirane bakterije su potom nanese na ploču s krutim LB medijem koja sadrži ampicilin, 100 mM IPTG i X-gal (γ = 20 mg/mL). Ploče s bakterijama su inkubirane 16 h na 37°C u inkubatoru. Kako bi se potvrdila uspješnost ugradnje svih odsječaka DNA u plazmidnu okosnicu napravljena je reakcija PCR kolonija korištenjem seta EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix i početnica pro_SV40_PstI-FW i ter_SV40_XhoI-RE (Tablica 2). PCR produkti su vizualizirani na pomoću elektroforeze u gelu agaroze. Iz pozitivnih klonova su postavljene prekonoćne kulture iz kojih je sljedeći dan napravljena izolacija plazmida korištenjem seta ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit te je dobiveni konstrukt nazvan hyPB-Xpress_SV40.

Tablica 2. Sljedovi početnica korištenih tokom izrade konstrukata

Naziv	Sljed (5' - 3')
C9_seq1	TGAACCCCGACAACAGCGAC
ori_seq_FW	TTGTTTGCCGGATCAAGAGC
C9_seq2	ATCCTGACCTTCCGCATCCC
pUX21_seqF	GTAACGACGGCCAGT
pUX21_seqR	AGCGGATAACAATTCACACAGG
SB-LoRo_L-FW	TAATGGTCTCATCCCTATACAGTTGAAGTCGGAAGTTTAC
SB-inside_R-RE	CTATGGTCTCAGGCTGGACCCCTTACCGAAACATCGC
PB3-FW	CAATGGTCTCAGGCTTAAAAGTTTTGTTACTTTATAGAAGAAATTTTGAG
PB3-RE	CATAGGTCTCTCCCTTAAACCCTAGAAAGATAATCATATTGTG
PB5-FW	CAATGGTCTCATCCCTTAAACCCTAGAAAGATAGTCTGC
PB5-RE	CATAGGTCTCTGGCTGTCACGATATCTATAACAAGAAAAT
lacZ_1	GGATGTGCTGCAAGGCG
ori_seq1	CACCTCTGACTTGAGCGTCG
HyPB_seq3	CTCTGAAGGTGGCGCTGG
pro_SV40_PstI-FW	TAATCTGCAGGGTCTCAGGTAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTG
ter_SV40_XhoI-RE	TAATCTCGAGGTCTCAACCTCCAGTTGATCCAGACATGATAAGATACATTG

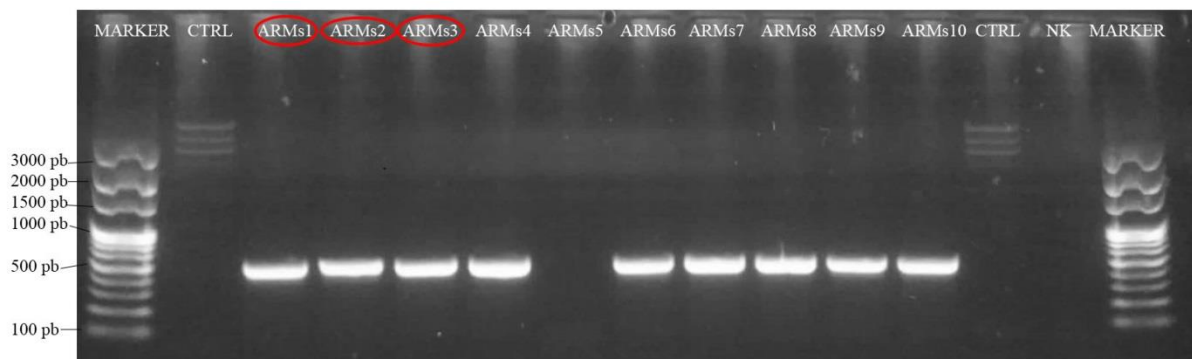
Tablica 3. Protokol za *assembly* ekspresijskog vektora transpozonskog sustava zasnovanog na transpozonu *piggyBac*.

NAZIV MODULA	KONCENTRACIJA (ng/μL)	DULJINA VEKTORA (pb)	DULJINA INSERTA (pb)	SKALIRANA KONCENTRACIJA VEKTORA (duljina inserta/duljina vektora*koncentracija)	MASA MODULA (ng) za omjer inserta i vektora 3:1
Ig-dual	2,846	46	46	2,85	3,48
tNS-pPro-SV40	197	2997	369	24,26	27,5
hyPB-14	676,4	4377	1798	277,85	133,98
tNS-pTer-SV40	146	2784	151	7,92	11,25
pBackBone-BZ	100	2394	2013	84,09	50

4. REZULTATI

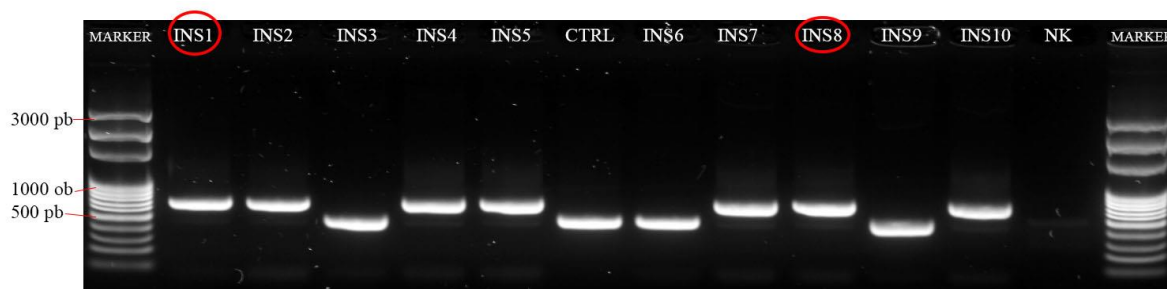
4.1. IZRADA PLAZMIDNE OKOSNICE I UGRADNJA IZOLATORSKIH SLJEDOVA U PLAZMID pUK21gg

Kako bi se izradila plazmidna okosnica, u koju će se ugraditi terminalni sljedovi IR transpozona *sleeping beauty* odnosno *piggyBac* i izolatorski sljedovi, plazmid pBackBone-BZ je modificiran dodavanjem dvaju odsječaka DNA koji sadrže restrikcijska mjesta za enzime Esp3I i BbsI. Ugradnja navedenih odsječaka DNA u plazmid pBackBone-BZ je provedena u dva koraka kloniranja. Uspješnost ugradnje obaju odsječaka DNA je provjerena metodom reakcije PCR kolonija korištenjem početnica C9_seq1 i C9_seq2 na deset kolonija. Obje početnice su komplementarne insertima te daju produkt dužine 461 pb. Kao negativna kontrola reakcije je korišten plazmid pBackBone-BZ koji sadrži samo odsječak DNA s restrikcijskim mjestom za enzim Esp3I. Produkti reakcije PCR kolonija su vizualizirani elektroforezom u gelu agaroze (Slika 8) te je potvrđena uspješnost ligacije kod devet od deset klonova. Dobiveni konstrukt je nazvan pBB-ARMs. Ispravnost ugrađenih sljedova je dodatno potvrđena sekvenciranjem Sangerovom metodom.



Slika 8. Elektroforeza u 1% gelu agaroze plazmida pBB-ARMs nakon reakcije PCR kolonija. MARKER – 100 bp DNA ladder; CTRL – negativna kontrola (pBackBone + odsječak DNA s restrikcijskim mjestom za enzim Esp3I); ARMs1-ARMs10 – odabrani bakterijski klonovi transformirani konstruktom pBB-ARMs; NK – negativna kontrola reakcije PCR kolonija. Klonovi zaokruženi crvenom bojom su dodatno potvrđeni sekvenciranjem. Svi klonovi osim ARMs5 su pozitivni jer daju amplikon duljine oko 400 pb. Signali kod uzoraka ctrl vjerojatno predstavljaju genomsku DNA. Fotografija gela nakon elektroforeze je prilagođena (kontrast, ekspozicija, oznake uzoraka) programom Adobe Phostoshop CC.

Plazmid pUK21gg je iskorišten kao intermedijarni vektor za ugradnju dvaju uzastopnih izolatorskih sljedova i terminalnih sljedova IR. Kako bi navedeni sljedovi mogli kasnije biti ubačeni u prethodno modificiranu plazmidnu okosnicu pBB-ARMs, u plazmid pUK21gg je ugrađen odsječak DNA koji sadrži restrikcijska mjesta za enzime BsaI i Esp3I. Nakon potvrde ugradnje odsječka DNA restrikcijskom analizom slijedila je ugradnja dvaju uzastopnih izolatorskih sljedova u dva koraka kloniranja. Uspješnost ugradnje oba slijeda je provjerena metodom reakcije PCR kolonija korištenjem početnica pUX21_seqF i pUX21_seqR koje daju produkt dug 496 pb. Kao negativna kontrola reakcije korišten je plazmid koji sadrži samo jedan izolatorski slijed te nakon PCR reakcije s istim početnicama daje produkt dug 357 pb. Produkti PCR reakcije su vizualizirani elektroforezom u gelu agaroze (Slika 9). Ispravnost ugrađenih sljedova je dodatno potvrđena sekvenciranjem dvaju klonova XX-pUK-ENx2 konstrukata.



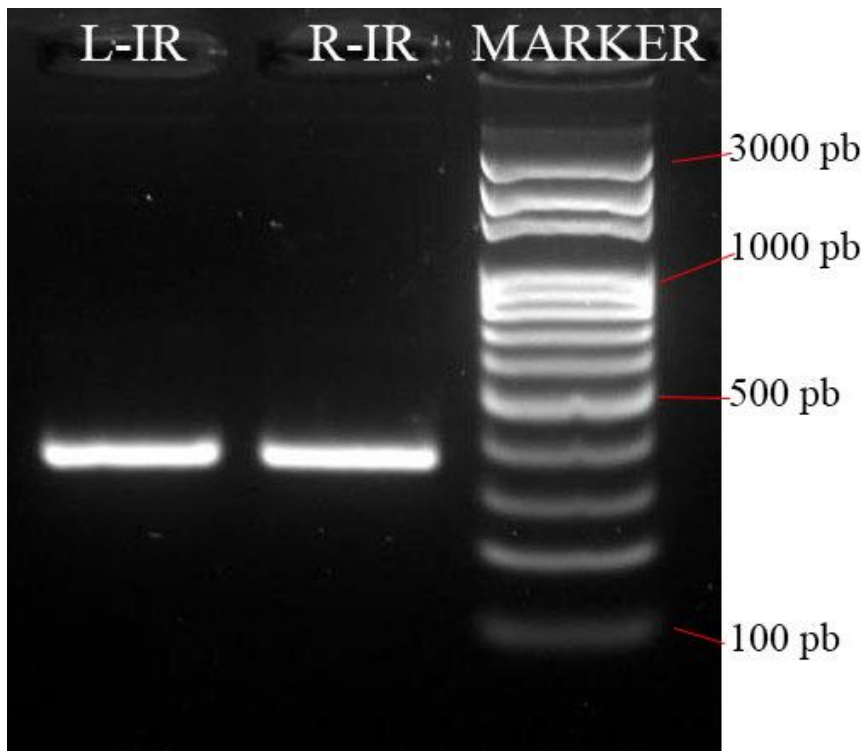
Slika 9. Elektroforeza u 1% gelu agaroze plazmida XX-pUK-INSx2 koji sadrži dva izolatorska slijeda nakon reakcije PCR kolonija. MARKER – 100 bp DNA ladder; INS1-INS10 - odabrani bakterijski klonovi transformirani konstruktom XX-pUK-ENx2; CTRL – negativna kontrola (plazmid s jednim izolatorskim slijedom); NK – negativna kontrola reakcije PCR kolonija. Klonovi zaokruženi crvenom bojom su dodatno potvrđeni sekvenciranjem. Klonovi INS3, INS6 i INS9 su negativni jer daju produkt veličine 357 pb identičan produktu negativne kontrole (CTRL). Ostali klonovi su pozitivni i daju produkt dug 496 pb što odgovara dvama ugrađenim izolatorskim sljedovima. Fotografija gela nakon elektroforeze je prilagođena (kontrast, ekspozicija, oznake uzoraka) programom Adobe Phostoshop CC.

4.2. IZRADA TRAN스포ZONSKOG VEKTORSKOG SUSTAVA ZASNOVANOG NA TRAN스포ZONU *SLEEPING BEAUTY*

Lijevi i desni terminalni sljedovi IR transpozona *sleeping beauty* su razdvojeni u fragmente različite dužine restrikcijom pSBtet-RB plazmida. Na taj način je omogućena

amplifikacija oba slijeda jednakim početnicama. Očekivana dužina PCR produkta lijevog terminalnog slijeda IR je 306 pb, a desnog 301 pb. Dobiveni PCR produkti su vizualizirani elektroforezom u gelu agaroze (Slika 10). Potvrđeni PCR produkt lijevog terminalnog slijeda IR je potom ugrađen u intermedijarni plazmid pUK21gg koji sadrži dva uzastopna izolatorska slijeda. U isti intermedijarni plazmid je ugrađen PCR produkt desnog terminalnog slijeda IR. Novoizrađeni konstrukti su nazvani ARM-L i ARM-R te je ispravnost sljedova koje sadrže provjerena sekvenciranjem (Slika 11). Zatim je lijevi terminalni slijed IR zajedno s dva uzastopna izolatorska slijeda restriksijskom digestijom izoliran s plazmida ARM-L te ugrađen u plazmidnu okosnicu pBB-ARMs kako bi dobili konstrukt pBB-ARMs-L. Zatim je u konstrukt pBB-ARMs-L ugrađen desni terminalni slijed zajedno s dva uzastopna izolatora koji su izolirani s plazmida ARM-R. Uspješnost ugradnje navedenih sljedova u plazmidnu okosnicu pBB-ARMs je potvrđena restriksijskom analizom enzimom XmaI koji cijepa unutar izolatorskog slijeda. Kao negativna kontrola reakcije je korišten konstrukt pBB-ARMs-L koji nakon restrikcije daje produkte duge 2848 pb i 156 pb. Očekivani produkti restrikcije dugi 2648 pb, 595 pb i 156 pb su vizualizirani elektroforezom u gelu agaroze (Slika 12). Ispravnost dobivenog finalnog konstrukta pBB-SB-BZ (Slika 13) je potvrđena sekvenciranjem.

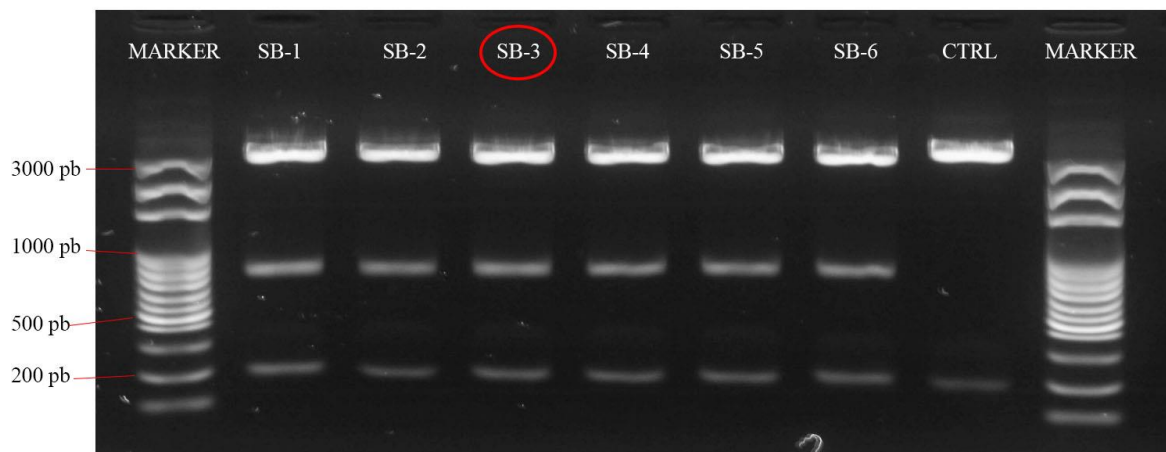
Ekspresijski vektor koji sadrži transpozazu *sleeping beauty* SB100X je naručen preko servisa Addgene (Addgene plasmid #34879).



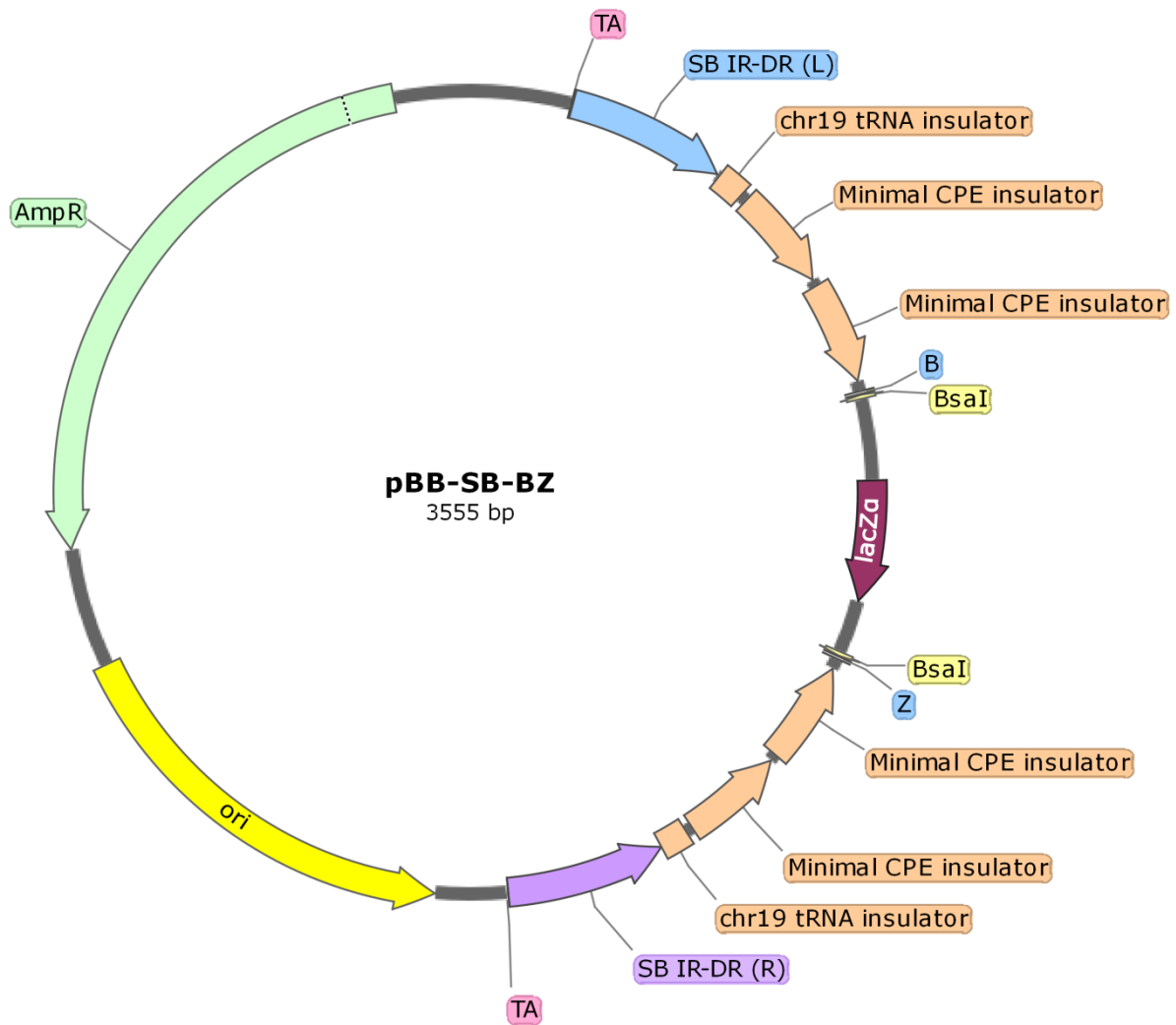
Slika 10. Elektroforeza u 1% gelu agaroze amplificiranih terminalnih sljedova IR transpozona *sleeping beauty*. L-IR – ampikon lijevog terminalnog sljedova IR; R-IR – ampikon desnog terminalnog sljedova IR; MARKER – 100 bp DNA ladder. Oba PCR produkta su pozitivna jer daju ampikon veličine 306 odnosno 301 pb. Fotografija gela nakon elektroforeze je prilagođena (kontrast, ekspozicija, oznake uzoraka) programom Adobe Phostoshop CC.



Slika 11. Primjer poravnanja A – desnog terminalnog slijeda IR u kosntruktu ARM-R i B – lijevog terminalnog slijeda IR u konstrukturu ARM-L. lacZ α - gen za α podjedinicu β -galaktozidaze; TA – TA dinukleotid; SB-LoRo_L-FW – početnica iskorištena za amplifikaciju lijevog i desnog terminalnog slijeda IR; SB IR-DR (R) – desni terminalni slijed IR; SB IR-DR(L) – lijevi terminalni slijed IR. Poravnanje je napravljeno u programu SnapGene.



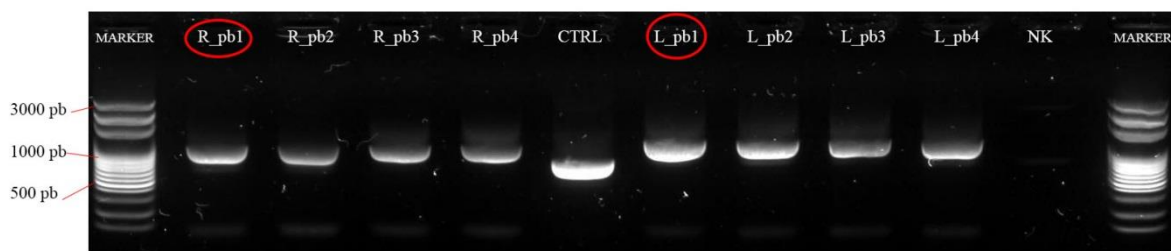
Slika 12. Elektroforeza u 1% gelu agaroze nakon restrikcijske analize finalnog konstrukta pBB-SB-BZ enzimom XmaI. MARKER – 100 bp DNA ladder; SB-1-SB6 - odabrani bakterijski klonovi transformirani konstruktom pBB-SB-BZ. CTRL – negativna kontrola (pBB-ARMs-L). Ispravnost slijeda konstrukta zaokruženog crvenom bojom je potvrđena sekvenciranjem. Svi klonovi su pozitivni jer daju tri produkta nakon restrikcijske analize dok kod negativne kontrole postoje samo dva produkta. Fotografija gela nakon elektroforeze je prilagođena (kontrast, ekspozicija, oznake uzoraka) programom Adobe Phostoshop CC.



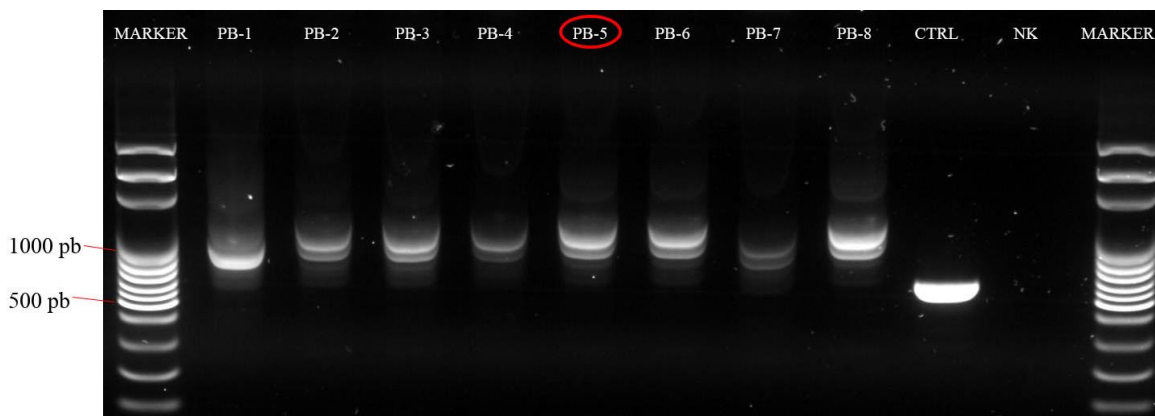
Slika 13. Shematski prikaz vektorskog transpozonskog sustava zasnovanog na transpozonu *sleeping beauty*. TA – TA dinukleotid; SB IR-DR(L) – lijevi terminalni slijed IR; chr19 tRNA insulator – kromatinski izolator; Minimal CPE insulator – izolatorski slijed; B i Z – mjesta cijepanja restriksijskog enzima BsaI; BsaI – mjesto vezanja restriksijskog enzima BsaI; lacZ α - gen za α podjedinicu β -galaktozidaze; SB IR-DR (R) – desni terminalni slijed IR; ori – izvorište replikacije; AmpR – gen za β -laktamazu koja daje otpornost na antibiotik ampicilin. Mapa plazmida je izrađena programom SnapGene.

4.3 IZRADA TRANSPOZONSKOG VEKTORSKOG SUSTAVA ZASNOVANOG NA TRANSPOZONU *PIGGYBAC*

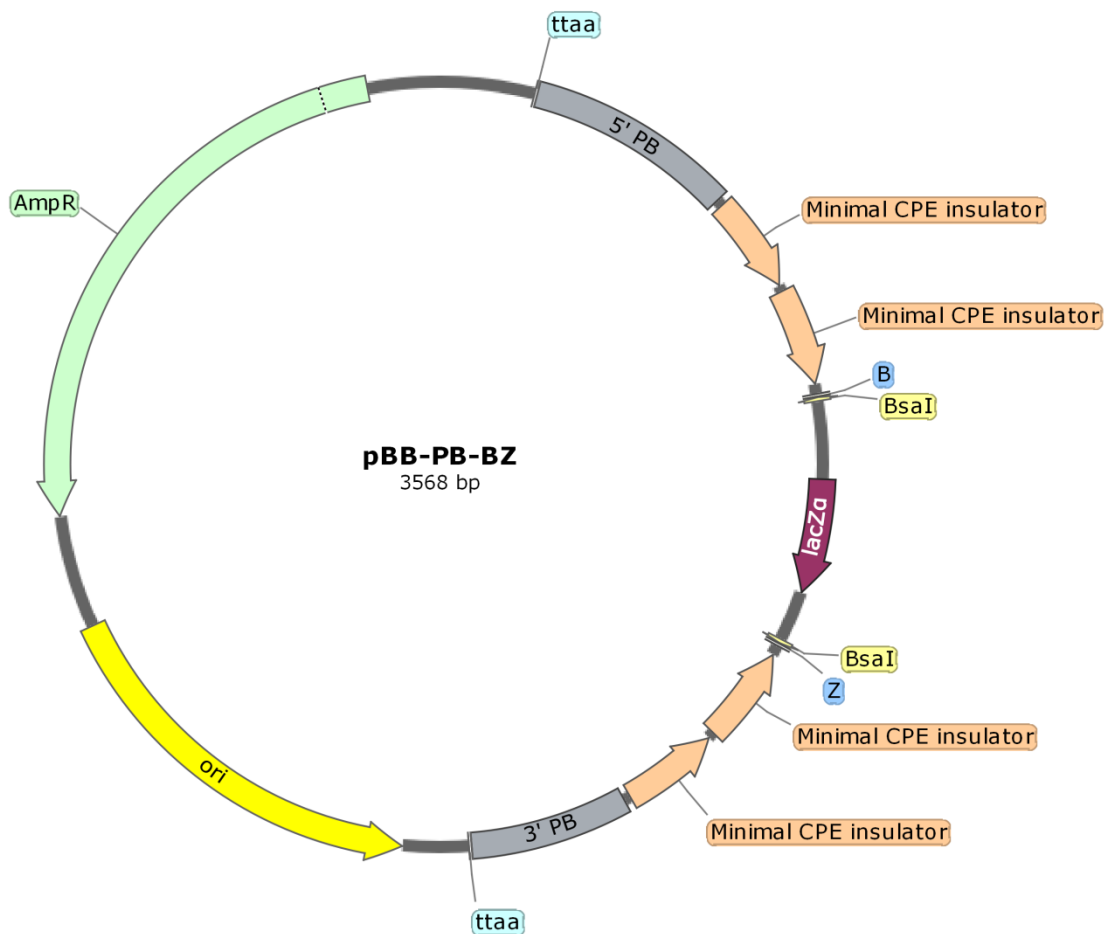
Terminalni sljedovi IR transpozona *piggyBac* su amplificirani direktno s plazmida pBCAG-eGFP korištenjem dva seta početnica. Nakon amplifikacije terminalni slijed IR PB3 je ugrađen u intermedijarni plazmid pUK21gg koji sadrži dva uzastopna izolatorska slijeda. Isto je napravljeno s terminalnim slijedom IR PB5. Uspješnost ugradnje je provjerena metodom reakcije PCR kolonija korištenjem početnica pUX21_seqF i pUX21_seqR koje se vežu za pUK21gg plazmid i daju produkt od 797 pb (konstrukt ARM-L_pb) odnosno produkt od 721 pb (konstrukt ARM-R_pb). Kao negativna kontrola reakcije je korišten isti plazmid bez ugrađenih terminalnih sljedova IR (XX-pUK-ENx2) kod kojeg iste početnice daju produkt dug 496 pb. Produkti reakcije su vizualizirani agaroznom gel elektroforezom (Slika 14) te je potvrđena uspješnost ugradnje kod svih klonova. Po jedan klon od svakog konstrukta je potvrđen sekvenciranjem. Potom su terminalni sljedovi IR zajedno s izolatorskim slijedovima izolirani restrikcijom konstrukata ARM-L_pb i ARM-R_pb te su u dva koraka kloniranja ugrađeni u plazmidnu okosnicu pBB-ARMS kako bi dobili finalni konstrukt. Uspješnost izrade finalnog konstrukta je provjerena metodom reakcije PCR kolonija te su produkti vizualizirani agaroznom gel elektroforezom. Za provjeru su korištene početnice pUX21-seqR i ori_seq1 koje se vežu za samu okosnicu i daju produkt dug 1020 pb. Kao negativna kontrola je korišten plazmid pBB-ARMS s ugrađenim terminalnim slijedom IR PB5 i dva uzastopna izolatora (pBB-ARMS-L) kod kojeg iste početnice daju produkt dug 498 pb. Uspješnost ugradnje je potvrđena kod svih klonova agaroznom gel elektroforezom (Slika 15). Ispravnost dobivenog finalnog konstrukta pBB-PB-BZ (Slika 16) je dodatno potvrđena sekvenciranjem.



Slika 14. Elektroforeza u 1% gelu agaroze plazmida ARM-L_pb i ARM-R_pb nakon reakcije PCR kolonija. MARKER – 100 bp DNA ladder; R_pb1-R_pb4 - odabrani bakterijski klonovi transformirani konstruktom ARM-R_pb; CTRL – negativna kontrola (XX-pUK-ENx2); L_pb1-L_pb4 - odabrani bakterijski klonovi transformirani konstruktom ARM-L_pb; NK – negativna kontrola reakcije PCR kolonija. Svi ARM-R_pb klonovi su pozitivni jer daju PCR produkt duljine 721 pb. Također su svi ARM-L-PB klonovi pozitivni jer daju PCR produkt duljine 797 pb. Negativna kontrola nakon reakcije PCR kolonija daje amplikon dug 496 pb. Ispravnost sljedova zaokruženih klonova je provjerena sekvenciranjem. Fotografija gela nakon elektroforeze je prilagođena (kontrast, ekspozicija, oznake uzoraka) programom Adobe Phostoshop CC.



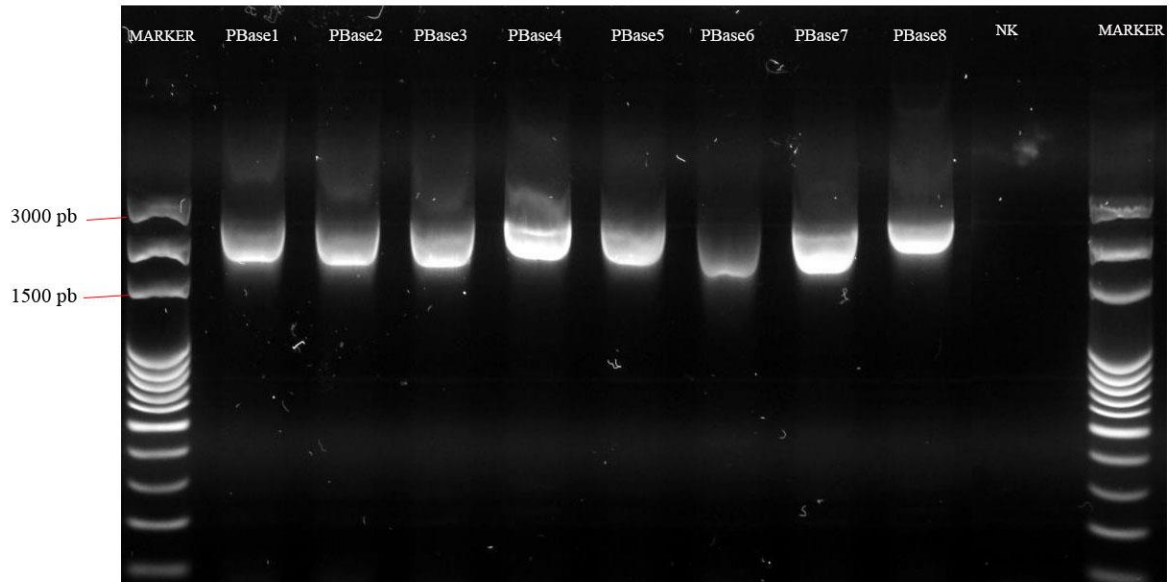
Slika 15. Elektroforeza u gelu agaroze finalnog konstrukta pBB-PB-BZ nakon reakcije PCR kolonija. MARKER – 100 bp DNA ladder; PB-1-PB8 - odabrani bakterijski klonovi transformirani konstruktom pBB-PB-BZ; CTRL – negativna kontrola (pBB-ARMs-L); NK – negativna kontrola reakcije PCR kolonija. Klon zaokružen crvenom bojom je dodatno potvrđen sekvenciranjem. Svi klonovi su pozitivni jer nakon reakcije PCR kolonija daju amplikon dug 1020 pb. Negativna kontrola daje PCR produkt dug 498 pb. Fotografija gela nakon elektroforeze je prilagođena (kontrast, ekspozicija, oznake uzoraka) programom Adobe Phostoshop CC.



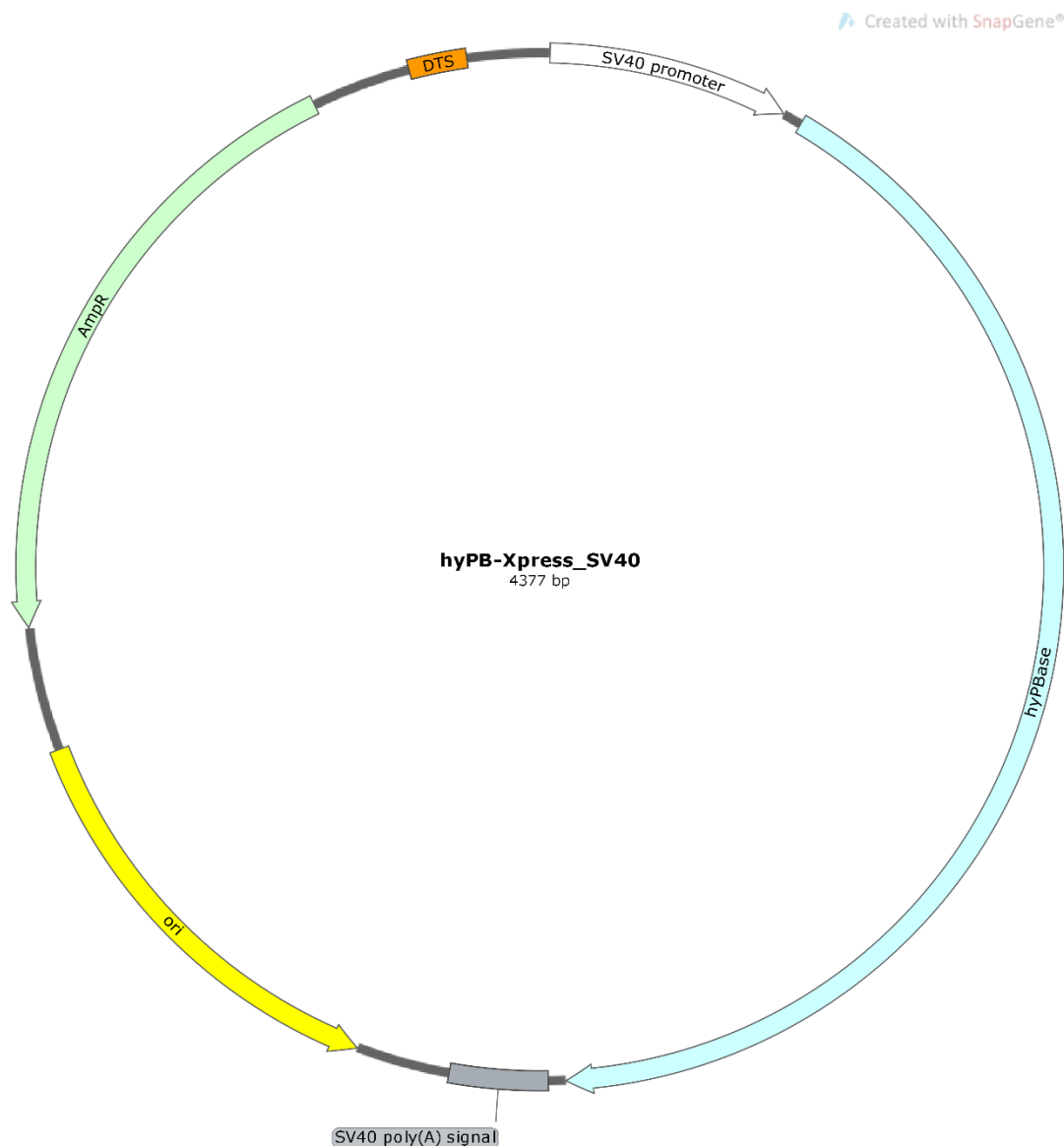
Slika 16. Shematski prikaz vektorskog transpozonskog sustava zasnovanog na transpozonu *piggyBac*. ttaa – ttaa nukleotidni slijed; 5'PB – terminalni slijed IR PB5; Minimal CPE insulator – izolatorski slijed; B i Z – mjesta cijepanja restriksijskog enzima BsaI; BsaI – mjesto vezanja restriksijskog enzima BsaI; lacZ α - gen za α podjedinicu β -galaktozidaze; 3'PB – terminalni slijed IR PB3; ori – izvorište replikacije; AmpR – gen za β -laktamazu koja daje otpornost na antibiotik ampicilin. Mapa plazmida je napravljena u programu SnapGene.

Ekspresijski vektor transpozonskog vektorskog sustava zasnovanog na transpozonu *piggyBac* je izrađen ugradnjom slijeda transpozaze PB te odsječaka DNA koji omogućuju ekspresiju transpozaze u animalnim stanicama u plazmidnu okosnicu pBackBone-BZ. Prije ovog koraka slijed transpozaze PB je amplificiran i potom ugrađen u intermedijarni plazmid pUK21gg. Uspješnost sklapanja svih modula (Tablica 2) je provjerena metodom reakcije PCR kolonija korištenjem početnica pro_SV40_PstI-FW i SV40_XhoI-RE koje se vežu za dva vanjska modula (tNS-pPro-SV40 odnosno tNS-pTer-SV40) i daju produkt dug 2323 pb.

Produkti su vizualizirani elektroforezom u gelu agaroze te je potvrđena ugradnja kod svih klonova (Slika 17). Finalni konstrukt nazvan hyPB-Xpress_SV40 je shematski prikazan na slici 19.



Slika 17. Elektroforeza u 1% gelu agaroze ekspresijskog vektora hyPB-Xpress_SV40 nakon reakcije PCR kolonija. MARKER – 100 bp DNA ladder; PBase1-PBase8 - odabrani bakterijski klonovi transformirani konstruktom hyPB-Xpress_SV40; NK – negativna kontrola PCR reakcije. Svi klonovi su pozitivni jer nakon reakcije PCR kolonija daju ampikon dug 2323 pb. Fotografija gela nakon elektroforeze je prilagođena (kontrast, ekspozicija, oznake uzoraka) programom Adobe Phostoshop CC.



Slika 18. Shematski prikaz ekspresijskog vektora **hyPB-Xpress_SV40** transpozonskog sustava zasnovanog na transpozonu *piggyBac*. SV40 promoter – promotorski slijed za ekspresiju u animalnim stanicama; hyPBBase – slijed transpozaze PB; SV40 poly(A) signal – poliadenilacijski signal; ori – izvorište replikacije; AmpR – gen za β -laktamazu koja daje otpornost na antibiotik ampicilin; DTS – slijed za unos vektora u jezgru. Mapa plazmida je napravljena u programu SnapGene.

5. RASPRAVA

DNA transpozoni *sleeping beauty* i *piggyBac* DNA su mobilni elementi koji se pokreću mehanizmom izrezivanja i ugradnje tako da se izrezuju iz jednog mjesta u genomu i reintegriraju u drugo. Identifikacija mehanizama njihove transpozicije je započela razvitak transpozonskih vektorskih sustava u svrhu prijenosa gena (Munoz-Lopez i Garcia-Perez 2010, Ivics i Izsvák 2015). Vektorski sustavi SB i PB su se pokazali kao odlična alternativa viralnim vektorima za uspostavljanje stabilnih staničnih linija, stvaranje transgeničnih životinja, eksperimente insercijske mutageneze i gensku terapiju (Ivics i Izsvák 2015, Tipanee i sur. 2017)).

Cilj ovog istraživanja je bio izrada dvaju transpozonskih vektorskih sustava zasnovanih na transpozonima *sleeping beauty* odnosno *piggyBac* u svrhu uspostave stabilnih staničnih linija koje će eksprimirati transgen od interesa. Upotreba neviralnih metoda dostave transgena koje ne uključuju njegovu integraciju u genom se pokazala neefikasnom zbog gubitka ekspresije transgena diobom stanica čime se gubi plazmidni vektor te niskog udjela transfeciranih stanica kod velikih transgena. Veličina transgena predstavlja značajan problem i kod upotrebe viralnih vektora zbog potrebe pakiranja viralnih čestica. Transpozonski sustavi nadilaze probleme ostalih metoda prijenosa gena jer nemaju definiran limit veličine sljedova koje nose te omogućuju njihovu ugradnju u genom stanica domaćina čime se omogućava dugotrajna ekspresija transgena. U pogledu kapaciteta vektori *piggyBac* imaju prednost jer mogu nositi sljedove do 200 kb. Li i sur. (2013) su korištenjem PB vektorskog sustava uspješno unijeli 207 kb dug slijed DNA u genom HEK293 stanica. Prednost vektora *sleeping beauty* nad svim ostalim vektorskim sustavima je njihova gotovo nasumična integracija u genom. Vektori PB pokazuju karakteristike viralnih vektora preferencijalnom ugradnjom u blizini mjesta inicijacije transkripcije, što povećava vjerojatnost insercijske mutageneze.

Kako bi se transgen od interesa zaštitio od utišavanja, u oba transpozonska vektorska sustava su dodani izolatorski sljedovi. Sharma i sur. (2012) su pokazali da dolazi do utišavanja ekspresijske kazete heterokromatinizacijom u ARPE-19 stanicama 8 tjedana nakon njene ugradnje pomoću SB i PB vektora. Zaštitom ekspresijske kazete *chs4* izolatorom došlo je do povećanja ekspresije, ali ne i do stabilizacije ekspresije nakon dužeg vremena u kulturi. Kod F9 teratokarcinoma stanica transfeciranih SB vektorom isti je izolator pak doveo do stabilizacije ekspresije (Dalsgaard i sur. 2009). Pozitivan učinak izolatorskih sljedova na dugotrajnu ekspresiju transgena korištenjem vektora PB je pokazan i u TRAMP i K562

stanicama (Mossine i sur. 2013). Izolatorski sljedovi povećavaju ekspresiju transgena te ga štite od utišavanja epigenetičkim modifikacijama ovisno o staničnom tipu.

Ugradnja četiri identična izolatorska slijeda, po dva sa svake mjesta za ugradnju ekspresijske kazete, u vektorske sustave zasnovane na transpozonu *sleeping beauty* odnosno *piggyBac* je dovela do problema u reakcijama sekvenciranja i reakcijama PCR kolonija zbog stvaranja sekundarnih struktura. Provjera finalnih konstrukata SB i PB vektora metodom reakcije PCR kolonija je zato bila neuspješna te smo primijenili druge strategije. Ispravnost PB vektora smo potvrdili reakcijom PCR kolonija uz korištenje početnica koje ne obuhvaćaju sva četiri izolatorska slijeda dok smo ispravnost SB vektora potvrdili restriksijskom analizom. Kako bi potvrdili da nije došlo do mutacija ili rearanžmana ugrađenih sljedova finalni konstrukti su sekvencirani Sangerovom metodom. Rezultati sekvenciranja su bili izrazito loše kvalitete zbog višestrukih ponavljanja izolatorskih sljedova te bogatog udjela GC parova baza. Iz tog razloga smo klonove sekvencirali s više preklapajućih početnica. Pokazalo se da klonovi SB plazmida nose inserciju timina unutar dvaju izolatorskih sljedova. S obzirom da se izolatori ne transliraju u proteine te da su objavljene brojne sekvence tog izolatora s manjim varijacijama, pretpostavili smo da takva insercija neće dovesti do gubitka izolatorske aktivnosti nakon transfekcije stanica.

Oba transpozonska sustava kao i ekspresijski vektor za transpozon PB smo prilagodili za GoldenGate kloniranje korištenjem pBackBone-BZ plazmidne okosnice koja sadrži BsaI restriksijsko mjesto. Na taj način smo transpozonske sustave učinili jednostavnijim za ugradnju različitih ekspresijskih kazeta, odnosno kompatibilnim s već postojećim modularnim sustavom za slaganje ekspresijskih kazeta fuzija Cas9 proteina koji se u laboratoriju već koristi u sklopu drugih projekata. Okosnicom koja je donorski vektor za transpozone PB i SB postojeći modularni sustav dobiva mogućnost stabilne ugradnje ekspresijskih kazeta u genom animalnih stanica u kulturi.

Transpozonski sustavi slični našem su već uspješno iskorišteni za uspostavu stabilnih staničnih linija. Kowarz i sur. (2015) su modifikacijom SB transpozonskog sustava uspješno generirali stabilne linije HEK293T i HeLa stanica koje eksprimiraju GFP (eng. *green fluorescent protein*). Modificirani PB transpozonski sustav je iskorišten za uspostavu HEK293S i HEK293T stabilnih staničnih linija koje eksprimiraju eukariotske proteine u svrhu proučavanja njihovih domena (Li i sur.2013). Field i sur. (2013) su pokazali prednosti SB

vektora u usporedbi s lentivirusima u stvaranju staničnih linija T-limfocita koji ekspimiraju $\alpha\beta$ T-stanični receptor.

Izrađeni vektorski sustavi zasnovani na transpozonima *sleeping beauty* odnosno *piggyBac* će omogućiti ugradnju bilo kojeg gena od interesa u genom animalnih stanica te njegovu dugotrajnu i stabilnu ekspresiju tokom vremena u staničnoj kulturi.

6. ZAKLJUČAK

- Terminalni sljedovi IR transpozona *sleeping beauty* su amplificirani i ugrađeni u intermedijarni plazmid
- Terminalni sljedovi IR transpozona *piggyBac* su amplificirani i ugrađeni u intermedijarni plazmid
- Četiri izolatorska slijeda su ugrađena u intermedijarni plazmid (po dva sa svake strane mjesta za ugradnju gena od interesa)
- Uspješno je izrađen sintetički transpozonski sustav zasnovan na transpozonu *sleeping beauty* koji sadrži terminalne sljedove IR transpozona *sleeping beauty* i četiri izolatorska slijeda prilagođen za kloniranje GoldenGate
- Uspješno je izrađen sintetički transpozonski sustav zasnovan na transpozonu *piggyBac* koji sadrži terminalne sljedove IR transpozona *piggyBac* i četiri izolatorska slijeda prilagođen za kloniranje GoldenGate
- Gen za transpozazu PB je amplificiran i ugrađen u intermedijarni plazmid
- Uspješno je izrađen ekspresijski vektor sintetičkog transpozonskog sustava zasnovanog na transpozonu *piggyBac*

7. LITERATURA

- Benabdellah, K., Gutierrez-Guerrero, A., Cobo, M., Muñoz, P., Martín, F., 2014. A chimeric HS4-SAR insulator (IS2) that prevents silencing and enhances expression of lentiviral vectors in pluripotent stem cells. *PLoS One* 9, e84268.
- Bouallègue, M., Rouault, J.D., Hua-Van, A., Makni, M., Capy, P., 2017. Molecular Evolution of piggyBac Superfamily: From Selfishness to Domestication. *Genome Biol. Evol.* 9, 323–339.
- Bushey, A.M., Dorman, E.R., Corces, V.G., 2008. Chromatin insulators: regulatory mechanisms and epigenetic inheritance. *Mol Cell.* 32, 1–9.
- Chatellard, P., Imhof, M., 2012. Minimal DNA sequence acting as a chromatin insulator and its use in protein expression. *US8133699B2*.
- Dalsgaard, T., Moldt, B., Sharma, N., Wolf, G., Schmitz, A., Pedersen, F.S., Mikkelsen, J.G., 2009. Shielding of sleeping beauty DNA transposon-delivered transgene cassettes by heterologous insulators in early embryonal cells. *Mol. Ther.* 17, 121–130.
- Doherty, J.E., Huye, L.E., Yusa, K., Zhou, L., Craig, N.L., Wilson, M.H., 2012. Hyperactive *piggyBac* Gene Transfer in Human Cells and *In Vivo*. *Hum. Gene Ther.* 23, 311–320.
- Fedoroff, N. V., 2012. Transposable elements, epigenetics, and genome evolution. *Science.* 338, 758–767.
- Field, A., Vink, C., Gabriel, R., Al-subki, R., Schmidt, M., Goulden, N., Stauss, H., Thrasher, A., Morris, E., Qasim, W., 2013. Comparison of Lentiviral and Sleeping Beauty Mediated ab T Cell Receptor Gene Transfer. *PLoS One* 8, e68201.
- Galvan, D.L., Nakazawa, Y., Kaja, A., Kettlun, C., Laurence, J.N., Rooney, C.M., Wilson, M.H., 2010. Genome-wide mapping of PiggyBac transposon integrations in primary human T cells. *J Immunother.* 32, 837–844.
- Gaszner, M., Felsenfeld, G., 2006. Insulators: Exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* 7, 703–713.
- Ivics, Z., Izsvák, Z., 2015. Sleeping Beauty Transposition. *Microbiol. Spectr.* 3, 1–21.
- Ivics, Z., Izsvák, Z., 2010. The expanding universe of transposon technologies for gene and

- cell engineering. *Mob. DNA* 1, 1–15.
- Kowarz, E., Löscher, D., Marschalek, R., 2015. Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines. *Biotechnol. J.* 10, 647–53.
- Li, R., Zhuang, Y., Han, M., Xu, T., Wu, X., 2013. piggyBac as a high-capacity transgenesis and gene-therapy vector in human cells and mice. *Dis. Models. Mech.* 6, 828–833.
- Li, Z., Michael, I.P., Zhou, D., Nagy, A., Rini, J.M., 2013. Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 5004–5009.
- Mossine, V. V., Waters, J.K., Hannink, M., Mawhinney, T.P., 2013. PiggyBac transposon plus insulators overcome epigenetic silencing to provide for stable signaling pathway reporter cell lines. *PLoS One* 8, 1–12.
- Munoz-Lopez, M., Garcia-Perez, J., 2010. DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Curr. Genomics* 11, 115–128.
- Ramezani, A., Hawley, R.G., 2010. Strategies to insulate lentiviral vector-expressed transgenes. *Methods Mol. Biol.* 614, 77–100.
- Recillas-Targa, F., Pikaart, M.J., Burgess-Beusse, B., Bell, A.C., Litt, M.D., West, A.G., Gaszner, M., Felsenfeld, G., 2002. Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken γ -globin insulator are separable activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 6883–6888.
- Sharma, N., Hollensen, A.K., Bak, R.O., Staunstrup, N.H., Schröder, L.D., Mikkelsen, J.G., 2012. The Impact of cHS4 Insulators on DNA Transposon Vector Mobilization and Silencing in Retinal Pigment Epithelium Cells. *PLoS One* 7, e48421.
- Skipper, K.A., Andersen, P.R., Sharma, N., Mikkelsen, J.G., 2013. DNA transposon-based gene vehicles - Scenes from an evolutionary drive. *J. Biomed. Sci.* 20, 92.
- Sotero-Caio, C.G., Platt, R.N., Suh, A., Ray, D.A., 2017. Evolution and diversity of transposable elements in vertebrate genomes. *Genome Biol. Evol.* 9, 161–177.
- Tipanee, J., Chai, Y.C., VandenDriessche, T., Chuah, M.K., 2017. Preclinical and clinical advances in transposon-based gene therapy. *Biosci. Rep.* 37, BSR20160614.

- Vargas, J.E., Chicaybam, L., Stein, R.T., Tanuri, A., Cañedo, A.D., Bonamino, M.H., 2016. Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy : advances , current challenges and perspectives. *J. Transl. Med.* 14, 288.
- Walker, J.M., 2009. *Mobile Genetic Elements Protocols and Genomic Applications Second Edition* Edited, Life Sciences.
- Woodard, L.E., Wilson, M.H., 2016. piggyBac-ing models and new therapeutic strategies. *Trends Biotechnol.* 33, 525–533.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 18.8.1995. godine u Zadru, ali sam odrasla u Kninu gdje sam nakon završetka osnovne škole upisala jezični smjer srednje škole Lovre Montija. 2014. godine sam upisala Preddiplomski studij biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te sam 2017. godine stekla zvanje sveučilišnog prvostupnika biologije. Iste godine sam upisala Diplomski studij molekularne biologije jer sam razvila veliki interes za genetičko inženjerstvo, medicinsku genetiku i epigenetiku. Tokom studija sam odradila tri laboratorijske prakse, jednu u Laboratoriju za oceanografiju gdje sam savladala metodu fluorescencijske mikroskopije te dvije u Laboratoriju za epigenetiku gdje sam naučila osnovne molekularne metode. Također sam radila praksu u znanstveno-istraživačkom laboratoriju Genos i bila demonstrator u sklopu kolegija Genetika. Volontirala sam na znanstveno-popularizacijskom događaju Noć Biologije 2016. i 2017. godine te sam 2016. godine sudjelovala u simpoziju *Power of Microbes in Industry and Environment*. Član sam Udruge studenata biologije BIUS gdje sam bila dio Sekcije za mikrobiologiju i Sekcije za genetiku.