

# Konstrukcija TALEN-a za inaktivaciju gena HNF1A u stanicama HepG2

---

Tremski, Mihaela

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:217:229537>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-24**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Mihaela Tremški

Konstrukcija TALEN-a za inaktivaciju gena HNF1A u stanicama  
HepG2

Diplomski rad

Zagreb, 2016

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za epigenetiku na Zavodu za molekularnu biologiju pod vodstvom doc. dr. sc. Aleksandra Vojte i neposrednim vodstvom mag. biol. mol. Dore Markulin, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Iskreno hvala doc. dr. sc. Aleksandru Vojta na nezamjenjivoj stručnoj pomoći, savjetima i iskazanom strpljenju tijekom izrade i pisanja ovog rada te na prilici za stjecanjem dragocjenog iskustva u znanstvenom istraživanju.

Hvala izv. prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš na ukazanom povjerenju da budem dio istraživačke grupe Laboratorija za epigenetiku.

Posebno se zahvaljujem mag. biol. mol. Dori Markulin na velikoj pomoći tijekom izrade i pisanja ovog rada, trudu i vremenu uloženom u razvoj mog znanstvenog i kritičkog mišljenja, također hvala na ugodnom druženju između eksperimenata.

Isto tako, zahvaljujem se mag. biol. mol. Pauli Dobrinić na vremenu i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem svim ostalim članovima Laboratorija za epigenetiku i Zavoda za Molekularnu biologiju na korisnim savjetima i ugodnom druženju.

Velika hvala mojim roditeljima i mojoj obitelji, Mirku i mojim prijateljima, na moralnoj i svakoj drugoj potpori koju su mi pružali tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Konstrukcija TALEN-a za inaktivaciju gena HNF1A u stanicama HepG2

Mihaela Tremski

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Tehnologija genomske inženjerstva omogućava specifičnu i efikasnu modifikaciju u genomu domaćina za razliku od prijašnjih metoda mutageneze pomoću rekombinaza, virusnih integreza i transpozaza. Kimerna nukleaza TALEN je fuzija proteina TALE i FokI nukleaze. TALEN vezujućom domenom specifično prepoznaje ciljnu sekvencu DNA, a nukleazna domena uvodi dvolančani lom. Popravak ovakvih lomova NHEJ mehanizmom često rezultira malim delecijama ili insercijama koje dovode do pomaka u okviru čitanja te inaktivacije ciljanog gena.

Cilj ovog rada bio je konstrukcija TALEN-a za ciljno mjesto u genu HNF1A i transfekcija u HepG2 stanice. TALEN-i su uspješno konstruirani metodom Golden Gate kloniranja i transfecirani u HepG2 stanice. Detekcijom fluorescencije proteina EGFP utvrđena je umjerena efikasnost transfekcije. Proveden je T7E1 test koji nije dovoljno osjetljiv za detekciju mutanata u HepG2 stanicama potvrđene efikasnosti transfekcije.

Za dobivanje stabilne stanične linije s inaktiviranim genom HNF1A treba provesti selekciju na linijama dobivenim uzgojem od pojedinačnih stanica. Stanična linija s inaktiviranim HNF1A bila bi izvrstan model za istraživanja funkcije gena HNF1A.

(64 stranice, 20 slika, 4 tablice, 71 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: genomske inženjerstvo, TALEN, inaktivacija gena, HNF1A, HepG2 stanična linija, transfekcija

Voditelj: Dr. sc. Aleksandar Vojta, doc.

Neposredni voditelj: Mag. biol. mol. Dora Markulin, znanstveni novak

Ocjenitelji: Dr. sc. Aleksandar Vojta, doc.

Dr. sc. Damjan Franjević, doc.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Rad prihvaćen: 18. 02. 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation thesis

TALEN construction for knockout of the HNF1A gene in HepG2 cells

Mihaela Tremski

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Genomic engineering technology enables specific and efficient modification of the genome of the host cell, as opposed to previous mutagenesis methods using site-specific recombinases, viral integrases and transposases. The chimeric nuclease TALEN is the result of a fusion of the TALE protein and the FokI nuclease. TALEN's protein-binding domain specifically recognizes a target DNA sequence and the nuclease domain introduces a double-strand break. Repair by NHEJ often results in small deletions or insertions which cause frameshift mutations and inactivation of targeted genes.

The aim of this study was to design a TALEN constructs specific for the target location in the HNF1A gene and transfect it into HepG2 cells. TALENs were successfully constructed by the Golden Gate cloning method and transfected into HepG2 cells. Moderate transfection efficiency was identified after fluorescence microscopy of EGFP. The T7E1 assay was not sensitive enough to detect knock out mutants in HepG2 cells for which efficient transfection was confirmed.

Stable cell lines with knockout HNF1A could be obtained by selection of cell lines derived from single cells. The cell line with inactivated HNF1A gene would represent an excellent model for studies of HNF1A gene function.

(64 pages, 20 figures, 4 tables, 71 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: genomic engineering, TALEN, knock out, HNF1A gene, HepG2 cell line, transfection

Supervisor: Dr. sc. Aleksandar Vojta, Assistant Professor

Assistant Supervisor: Mag. biol. mol. Dora Markulin, Graduate Research Assistant

Reviewers: Dr. sc. Aleksandar Vojta, doc.

Dr. sc. Damjan Franjević, doc.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Thesis accepted: 18. 02. 2016.

# Sadržaj:

1 Uvod .....	1
1.1 Razvoj genetičkog inženjerstva kao temelj za razvoj genomskog inženjerstva ...	1
1.2 Pregled metoda unosa transgena u genom eukariotskih stanica.....	2
1.3 Uvođenje genomskih modifikacija i integracija transgena u genom eukariotskih stanica.....	4
1.3.1 Proces prepoznavanja ciljne sekvence DNA pomoću proteina.....	6
1.3.1.1 Sustav integracije pomoću virusnih integraza .....	6
1.3.1.2 Sustav integracije pomoću rekombinaza za mjesno specifičnu rekombinaciju .....	7
1.3.1.3 Sustav integracije pomoću transpozona klase II.....	8
1.3.2 Sustav prepoznavanja sekvence DNA pomoću nukleinskih kiselina.....	9
1.3.2.1 Homologna rekombinacija.....	9
1.4 Sustav uvođenja genomskih modifikacija pomoću kimernih nukleaza ZFN i TALEN i sustava CRISPR/Cas .....	10
1.5 Struktura TALEN-a (transcription activator-like effector nucleases) .....	13
1.5.1 Proteini TALE kao DNA vezujuća domena TALEN-a.....	13
1.5.2 Fok I nukleaza kao efektorska domena TALEN-a.....	16
1.5.3 Aktivnost i specifičnost TALEN-a.....	17
1.6 Mehanizam djelovanja TALEN-a i popravak dvolančanog loma .....	19
1.7 Metode konstrukcije TALEN-a.....	22
1.7.1 Konstrukcija Golden Gate kloniranjem.....	22
1.7.2 Konstrukcija Golden Gate PCR-om.....	22
1.7.3 Konstrukcija restriktivnim endonukleazama i ligacijom (REAL) .....	23
1.7.4 Konstrukcija automatiziranim sustavom brze ligacije na čvrstoj fazi visoke propusnosti (FLASH) .....	23
1.8 Gen HNF1A.....	25
2 Cilj rada .....	26
3 Materijali i metode .....	27
3.1 Materijali .....	27
3.2 Metode .....	28
3.2.1 Konstrukcija TALEN-a metodom Golden Gate kloniranja .....	28
3.2.1.1 Transformacija kemijski kompetentnih bakterija (XL10-Gold) „heat shock“ postupkom .....	31
3.2.1.2 Priprava bakterijske prekonoćne kulture i pohrana u obliku glicerolskog „stock“-a .....	32
3.2.2 Priprema HepG2 stanične kulture za transfekciju.....	32
3.2.2.1 Odmrzavanje HepG2 stanica .....	32
3.2.2.2 Presađivanje i održavanje HepG2 stanica.....	33
3.2.2.3 Nasađivanje HepG2 stanica za transfekciju.....	34
3.2.3 Transfekcije HepG2 stanica .....	34
3.2.3.1 Prva transfekcija HepG2 stanica.....	35
3.2.3.2 Izolacija genomske DNA iz HepG2 stanica prve transfekcije.....	37
3.2.3.3 Druga transfekcija HepG2 stanica .....	37
3.2.3.4 Fluorescencijsko mikroskopiranje HepG2 stanica nakon druge transfekcije .....	38
3.2.4 T7E1 test .....	39
3.2.4.1 Umnažanje, elektroforeza i pročišćavanje PCR produkta ciljne sekvence gena HNF1A.....	39

3.2.4.2 Digestija T7 endonukleazom 1 .....	40
4 Rezultati.....	41
4.1. Konstrukcija TALEN-a za ciljno mjesto u genu HNF1A .....	41
4.2. Transfekcija HepG2 stanica .....	44
4.3. T7E1 test.....	48
5 Rasprava .....	50
5.1 Konstrukcija TALEN-a za ciljno mjesto u genu HNF1A .....	50
5.2 Provjera aktivnosti TALEN-a u transfeciranim HepG2 stanicama T7E1 testom .....	51
5.3 Provjera efikasnosti transfekcije HepG2 stanica fluorescencijskim mikroskopiranjem.....	53
6 Zaključak .....	55
7 Literatura .....	56
8 Prilog .....	65



# 1 Uvod

## 1.1 Razvoj genetičkog inženjerstva kao temelj za razvoj genomskog inženjerstva

Brojna znanstvena dostignuća u području molekularne genetike, biokemije i mikrobiologije do 1970. godine proširila su spoznaje i znanja o nasljeđivanju kod živih bića, te omogućila uvjete za spajanje dviju molekula DNA *in vitro*. Bila su to fundamentalna otkrića strukture DNA, regulacijske regije operona, restrikcijsko-modifikacijskog sustava i T4 DNA ligaze (Delić 2004). Razdoblje tehnologije genetičkog inženjerstva ili tehnologije rekombinantne DNA započelo je otkrićem metode kovalentnog povezivanja dviju molekula DNA *in vitro*. Grupa znanstvenika na čelu s Paulom Bergom (1972) konstruirala je hibridnu molekulu SV40 DNA koja je sadržavala integriran segment DNA s genima  $\lambda$  faga i galaktoznom operonom. Cilj istraživanja je bio razvitak metode koja omogućuje prenošenje gena u stanice sisavaca, a da SV40 DNA molekula služi kao vektor prijenosa strane DNA (Jackson i sur. 1972). Nakon Bergova otkrića Stanley Cohen i sur. (1974) objavili su rad o uspješnoj konstrukciji biološki funkcionalnog bakterijskog plazmida *in vitro*. To je otvorilo vrata primjeni novo otkrivenih metoda u području moderne biotehnologije, koja je ostvarila ogroman napredak i čiji su produkti danas sveprisutni (Delić 2004).

Tijekom 1991. godine započet je projekt humanog genoma koji je uspješno završen već 2001. godine. Taj projekt rezultirao je razvojem bržih i jeftinijih metoda sekvenciranja te su sekvencirani genomi mnogih drugih vrsta. Bez obzira na vrijednost informacija koje su dobivene sekvenciranjem kasnije je postalo jasno da je potrebno razjasniti funkcije gena koji su sadržani u tom genetskom kodu. Mogućnost manipulacije genetskim kodom ostala je uvelike ograničena metodama genetičkog inženjerstva koje nisu omogućavale efikasno dodavanje novih sekvenci DNA na točno određena mjesta ili promjenu specifičnih sekvenci DNA u genomu (Gersbach 2014).

Među brojnim metodama genetičkog inženjerstva metoda homologne rekombinacije (HR) pokazala se kao najbolji način za analizu funkcije gena, ali je pogodna samo za analizu funkcije gena kod miša i kvasca. Kako bi se prevladala nepristupačnost metode HR razvijene su metode inhibicije ekspresije pojedinih gena (engl. *knock-down*) pomoću molekula shRNA (engl. *short hairpin RNA*), siRNA (engl. *short inhibitory RNA*) ili kemijskih tvarima. Takve metode imaju brojna ograničenja poput slučajne integracije transgena, nestabilne i prolazne

ekspresije shRNA i siRNA. Nasumična mutageniza kemijskim mutagenima ili transpozonomima također je efikasna metoda, ali rezultira velikim brojem mutacija, a ne samo specifičnom genetskom promjenom (Ochiai i Yamamoto 2015).

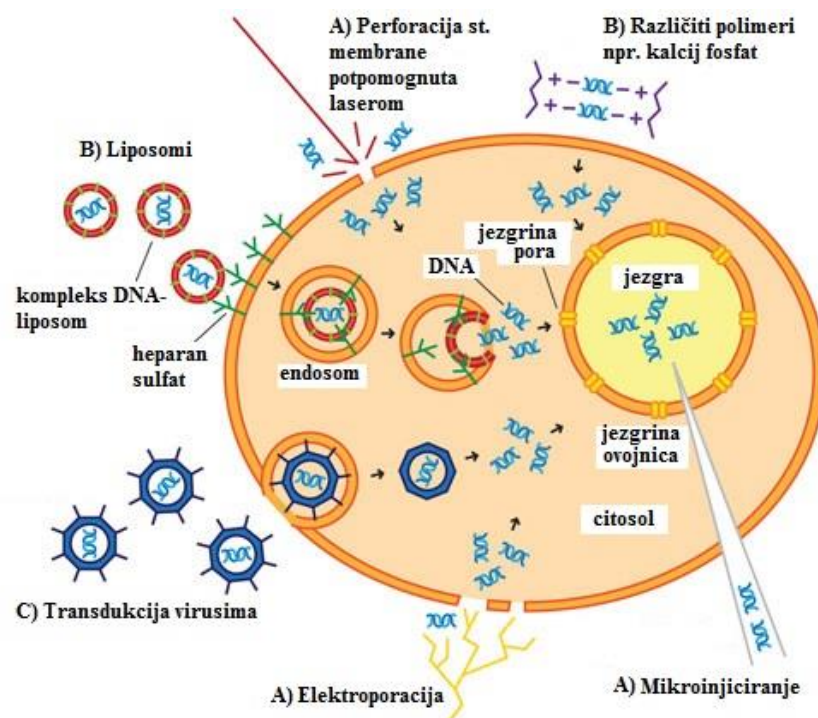
Važno otkriće 1991. godine jest otkriće prstastih, ZF proteina (engl. *zinc-finger* – ZF) koji imaju sposobnost prepoznavanja specifične sekvence DNA unutar genoma. Desetak godina kasnije kreirana je fuzija FokI endonukleazne katalitičke domene sa ZFP koja je 2005. godine primijenjena za ciljano uređivanje genoma (engl. *genom editing*). Uslijedio je ogroman napredak pojavom nove tehnologije koja je omogućila ciljano uređivanje genomskih sekvenci, tj. razvoj tehnologije genomskog inženjerstva (Gersbach 2014). Otkriće TALE (engl. *transcription activator-like effector* – TALE) proteina i razvoj TALEN (engl. *transcription activator-like effector nucleases* – TALEN) sustava 2010. godine omogućio je uređivanje genoma mnogih različitih organizama, a pojava CRISPR/Cas (engl. *clustered regularly-interspaced short palindromic repeat* – CRISPR) sustava 2013. godine najavila je novu eru istraživanja u području genomskog uređivanja. Kod ovih novih metoda genomskog inženjerstva alat za uređivanje genoma su rekombinantne nukleaze ili „molekularne škare“ koje se pomoću fuzijskog dijela mogu vezati na točno određeno mjesto u genomu i uzrokovati preciznu genomsku modifikaciju u stanicama i organizmima u kojima do sada to nije bilo moguće. Omogućeno je narušavanje funkcije specifičnog gena, delecije specifičnih genomskih regija, dodavanje egzogene DNA na točno određeno genomsko mjesto, uvođenje supstitucije jednog nukleotida i mnoge druge primjene (Ochiai i Yamamoto 2015).

## **1.2 Pregled metoda unosa transgena u genom eukariotskih stanica**

Proces uvođenja strane DNA u eukariotsku stanicu naziva se transfekcija. Za transfekciju stanica sisavaca koriste se eukariotski ekspresijski vektori. Na ekspresiju transfeciranih vektora utječu tri faktora, to su: 1) tip sekvence promotor/pojačivač, 2) tip ekspresije (stabilna ili prolazna), 3) stupanj očekivane transfekcije. Regulacija genske ekspresije u virusnom ili plazmidnom vekturu je pod kontrolom promotor/pojačivač sekvence najčešće virusnog podrijetla kojem je pridružena LCR (engl. *location control region* – LCR) sekvenca za tkivno specifičnu ekspresiju. Tip ekspresije strane DNA ovisi o zadržavanju transgena u stanici. Proces kojim se strana DNA integrira u genom transfecirane stanice ili ostaje prisutna kao ekstrakromosomski element naziva se stabilna transfekcija. Suprotno od toga, proces kod kojega se strana DNA ne integrira nego je privremeno prisutna i eksprimira

se u transfeciranoj stanici naziva se prolazna transfekcija. Kod prolazne transfekcije ekspresija je prisutna 12-72 sata nakon transfekcije i gubi se uslijed smrti stanica ili gubitka ekspresijskog vektora. Razina ekspresije transgena u stanici ovisi o broju kopija unesenog transgena, udjelu transkripcije, stabilnosti mRNA transkripta, mjestu ugradnje u genomu i regijama koje omeđuju transgen (Colosimo i sur. 2000).

S obzirom na princip unošenja transgena metode transfekcije se mogu podijeliti na tri tipa, to su: fizičke, kemijske i biološke metode (Slika 1.). Fizičke metode unošenja transgena obuhvaćaju unošenje elektroporacijom, injektiranje egzogene DNA u stanici, ultrazvučno unošenje, unošenje pomoću lasera, te unošenje „Biolistic“ sustavom bombardiranja mikročesticama. Kod kemijski baziranog sustava unošenja koriste se reagensi kalcijev fosfat, kationski polimeri uključujući DEAE dekstran i polietilenimin (PEI) te liposomi. Ove metode mogu biti vrlo efikasne te se stabilna integracija transgene DNA u domaćinski genom događa u malom postotku stanica u kojima je transfekcija bila uspješna (Colosimo i sur. 2000; Sorrel i Korb 2005). Biološka metoda unošenja transgena podrazumijeva korištenje različitih virusnih sustava, a taj proces nazivamo transdukcija (Coates i sur. 2005; Sorrel i Korb 2005).

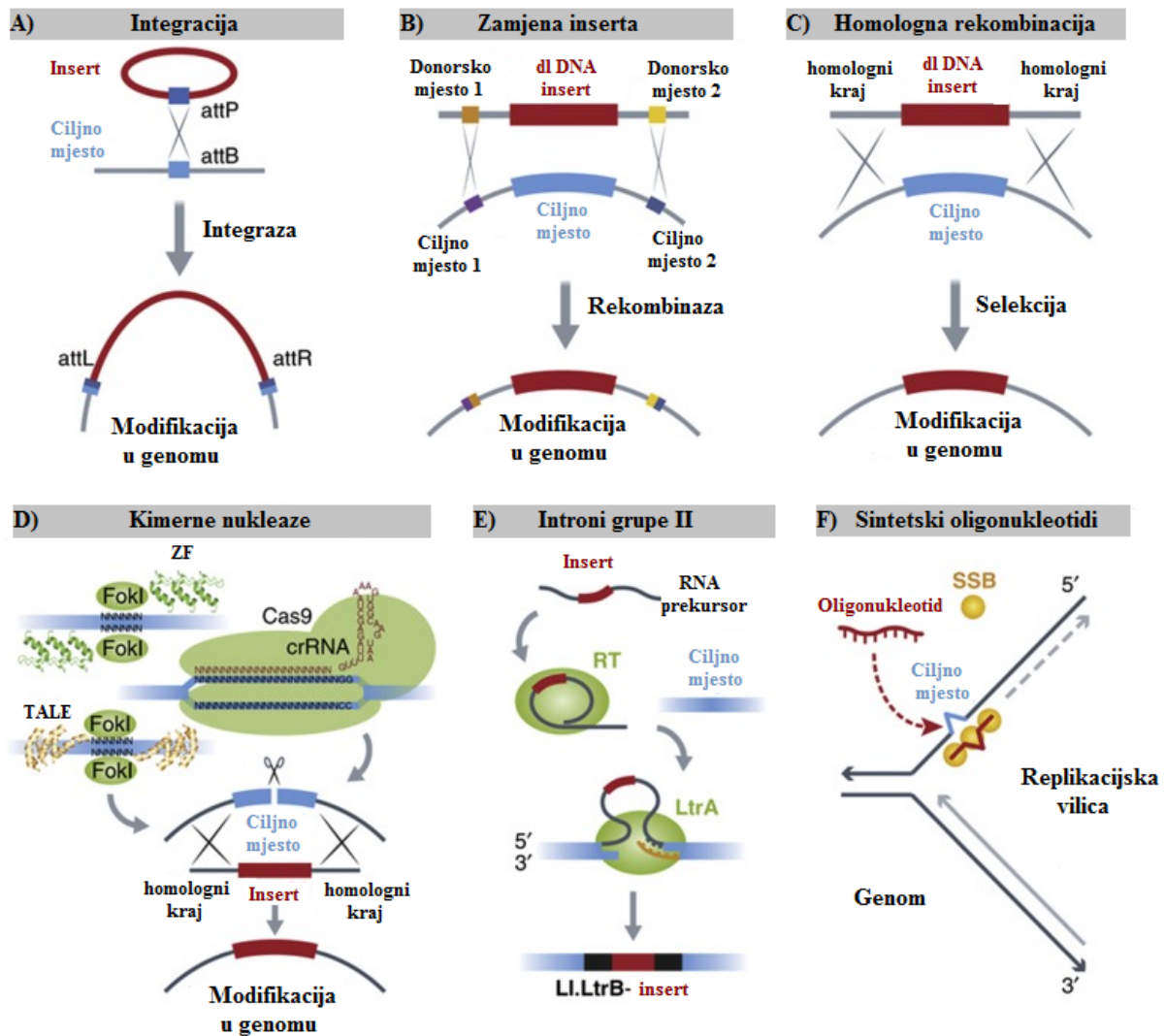


**Slika 1. Prikaz nekih metoda unosa strane DNA u eukariotsku stanicu. A) fizičke metode: elektroporacija, mikroinjekcija, perforacija pomoću lasera; B) kemijske metode: različiti polimeri, liposomi i C) biološke metode: transdukcija virusima (Labant 2013).**

### **1.3 Uvođenje genomskih modifikacija i integracija transgena u genom eukariotskih stanica**

Kako bi nastala trajna modifikacija u genomu stanice nakon transfekcije nužna je stabilna integracija transgena u genom stanice, a ona se događa u malom broju transfeciranih stanica. Dobro integracijsko mjesto trebalo bi omogućiti stalnu ekspresiju ugrađenog transgena ili terapijskog gena. Osim toga, integracija ne smije izazvati genetički defekt poput inaktivacije tumor supresora ili aktivacije onkogeno. Postoje dva sustava prepoznavanja DNA u prirodi. Prvi sustav temelji se na specifičnom prepoznavanju sekvence DNA pomoću DNA vezujućih proteina, a drugi sustav prepoznavanja specifične sekvence DNA događa se mehanizmom komplementarnog sparivanja baza. Na taj se način transgen uveden u stanicu može ugraditi na nasumično mjesto u genomu pomoću enzima za popravak DNA, ali ako sadrži sekvencu koja se može komplementarno spariti sa sekvencom u genomu, tada se ugrađuje procesom homologne rekombinacije. Osim enzima staničnog popravka, koristan alat za mjesno usmjereno ili mjesno specifično uvođenje genomskih modifikacija su virusne integraze, transpozaze i rekombinaze. Sustav specifičnog prepoznavanja sekvence DNA komplementarnim sparivanjem baza za ciljano uvođenje genetičkih modifikacija koristi se i kod ugradnje transgena pomoću introna grupe II, genskog popravka sintetskim oligonukleotidima te kod rekombinantnog sustava CRISPR/Cas (Kolb i sur. 2005; Coates i sur. 2005).

Poznat je i dostupan širok izbor metoda za ciljano narušavanje sekvence endogenog gena (engl. *knock out*) i transgenezu, tj. uvođenje novog gena u stanicu i njegova integracija u genom domaćina (engl. *knock in*). Te metode međusobno se razlikuju po efikasnosti uvođenja ciljane promjene, specifičnosti prepoznavanja sekvence, lakoći višestrukog ciljanja sekvenci unutar istog gena i učinkovitosti primjene na različitim organizmima. Na slici (Slika 2.) je prikazano nekoliko najvažnijih metoda koje omogućuju ciljanu modifikaciju unutar jednog ili više genoma integracijom većih sekvenci ili većim brojem manjih modifikacija (Esvelt i Wang 2014).



Slika 2. Različite metode i mehanizmi uvođenja modifikacija i integracije transgena na ciljna mjesta u genomu. A) Integracija transgena na ciljno mjesto *attB* koju katalizira integraza; B) Integracija dvolančanog DNA inserta na ciljna mjesta koju katalizira rekombinaza; C) Ugradnja dvolančanog DNA inserta pod djelovanjem staničnih enzima za popravak DNA tj. homologne rekombinacije (HR); D) Nukleaze (FokI i Cas9) usmjerene na ciljno mjesto ZF i TALE proteinima ili crRNA uvode ciljanu genomsku modifikaciju ili omogućuju ciljanu integraciju; E) Introni grupe II i insercijski elementi mogu biti dizajnirani za ciljanu inserciju; F) Kratki oligonukleotidi ubacivanjem u replikacijske rašlje mogu izazvati ciljanu mutaciju (Esvelt i Wang 2012).

### **1.3.1 Proces prepoznavanja ciljne sekvence DNA pomoću proteina**

Integraze i rekombinaze su proteini koji prepoznaju i uvode različite modifikacije u DNA. Takvi proteini izolirani iz različitih organizama koristan su alat u genetičkom inženjerstvu za uvođenje genomskih modifikacija. Uspješnost uvođenja modifikacije pomoću ovih DNA enzima ovisi o stupnju selektivnosti, tj. preciznosti prepoznavanja točno određene sekvence DNA u genomu i njihovoj efikasnosti u stanici domaćinu. Katalitička aktivnost i selektivnost proteina mogu se mijenjati do određenog stupnja. Tako je moguće dobiti mutante enzima koji će biti efikasniji u stanici domaćinu ili dodavanjem nove DNA vezne domene poboljšati selektivnost tog enzima. To je rijetko moguće, jer kod većine proteina vezna i katalitička domena se prostorno nalaze vrlo blizu (Coates i sur. 2005).

#### **1.3.1.1 Sustav integracije pomoću virusnih integraza**

Najčešće korišteni virusni vektori sami posreduju integraciju transgena u genom stanice sisavaca. Reakciju integracije katalizira retrovirusna integraza (dio *pol* transkripta) i nekoliko dodatnih virusnih proteina. Prvi retrovirusni vektorski sustav razvijen je od MLV (engl. *murine leukemia virus* – *MLV*) retrovirusa koji se integrira samo u stanicama koje su u diobi. Ovakvi retrovirusni vektori s pridodanim transgenom se integriraju na neodređenim mjestima duž genoma te se mjesto tako ugrađenog transgena ne može predvidjeti (Coates i sur. 2005). Zbog toga je ugrađeni transgen često epigenetički utišan zbog efekta pozicije gena (engl. *position effect*) koji može izazvati mutageni efekt inhibicijom ili aktivacijom gena domaćina (Pannell i Ellis 2001; Sorrel i Kolb 2005). Kasnije je razvijen sustav vektora izveden od lentivirusa u koje spadaju HIV (engl. *human immunodeficiency virus* – *HIV*) i SIV (engl. *simian immunodeficiency virus* – *SIV*) koji integrira u stanice neovisno o staničnoj diobi. Ograničenja retrovirusnih sustava su veličina inserta i nasumična integracija koja može rezultirati aktivacijom onkogena ili inaktivacijom tumor supresor gena (Günzburger i Salmons 1999; Sorrel i Kolb 2005).

Veću selekciju integracije pokazuje humani adeno asocirani virus (AAV). To je parvovirus koji je korepliciran u stanicama sisavaca zajedno s pomoćničkim virusima kao adenovirus, herpes simpelks virus i ljudski citomegalovirus. Pomoću Rar proteina u 70-85% slušajeva AAV se integrira na duži krak 19. kromosoma unutar lokusa 13.42. Kod virusa

izvedenih iz AAV često se zbog veličine transgena izbacuje *rar* gen što rezultira slučajnom integracijom u genom domaćina (Dutheil i sur. 2003; Kolb i sur. 2005).

### 1.3.1.2 Sustav integracije pomoću rekombinaza za mjesno specifičnu rekombinaciju

Rekombinaze za mjesno specifičnu rekombinaciju (engl. *site-specific recombinases*) su enzimi koji kataliziraju izmjenu lanaca DNA čije su sekvence u malom stupnju homologne. Enzim se veže na mjesto prepoznavanja koje je dugačko 30-400 nt, zareže DNA, izmijeni lance homolognih sekvenci te ponovo poveže lance DNA. Unutar obitelji mjesno specifičnih rekombinaza razlikujemo tirozinske rekombinaze (npr.  $\lambda$  integraza, Cre, FLP, XerC rekombinaze) i serinske rekombinaze (npr.  $\phi$ C31 integraza) (Coates i sur. 2005). Takve rekombinaze našle su široku primjenu u genetičkom inženjerstvu.

**Integraza  $\lambda$**  (Slika 2. A) je tirozinska rekombinaza iz bakteriofaga koja posreduje jednosmjernu mjesno specifičnu rekombinaciju između attP veznog mjesta u genomu bakteriofaga i attB veznog mjesta na bakterijskom kromosomu. Reakcija rezultira ugradnjom genoma faga u bakterijski kromosom koji je okružen s dva hibridna att mjesta, attL i attR. Uspješno je primijenjena u GATEWAY<sup>TM</sup> sustavu kloniranja *in vitro*. Mutanti Int-h i Int-h/218 integraze  $\lambda$  kataliziraju integraciju s maksimalnom efikasnošću do 30% na attB i attP mjesta na slobodnom plazmidu, kao i plazmidu integriranom u kromosom sisavaca. To znači da ne kataliziraju ugradnju DNA na druga mjesta unutar genoma sisavaca (Groth i Calos 2003).

Veću primjenu u integraciji terapijskih gena ima  **$\phi$ C31 integraza** koja pripada obitelji serinskih rekombinaza. Ova integraza može koristiti preko 100 pseudo-att mjesta u humanom genomu. Kod transfekcije humanih keratinocita integracijska efikasnost je 15%, što je slično efikasnosti retrotranspozona (npr. Sleeping Beauty) (Coates i sur. 2005).

**Cre rekombinaza** (Slika 2. B) iz bakteriofaga P1 je enzim koji pripada obitelji tirozinskih rekombinaza te je učinkovita u prokariotskim i eukariotskim stanicama. U životnom ciklusu faga katalizira reakciju izrezivanja DNA segmenta koji je okružen loxP mjestima. Vezno mjesto loxP sadrži 34 bp koje se sastoji od 13 bp invertiranih ponavljanja odvojenih razmaknicom od 8 bp (Abremski i sur. 1987). Cre katalizira stvaranje ureza u području središnje 8 pb sekvence ostavljajući ljepljive krajeve od 6 pb. Ako imamo dvije DNA okružene loxP mjestima ljepljivi krajevi će se komplementarno povezati, a Cre će ponovo katalizirati reakciju ligacije (Sorrel i Kolb 2005). Najčešća primjena Cre rekombinaze

jest za inaktivaciju i aktivaciju gena u određenim razvojnim stadijima ili tkivno specifičnim područjima ili za izrezivanje selekcijskog markera. Većina ovih primjena provedena je na embrionskim matičnim stanicama u miša (Nagy 2000). **Flp** rekombinaza pripada obitelji tirozinskih rekombinaza i prepoznaje ciljna mjesta FRT koja su slična loxP mjestima. Katalizira rekaciju integracije kao i Cre rekombinaza (Sorrel i Kolb 2005). Nakon integracije pomoću Cre ili Flp rekombinaze sekvenca ciljnog mjesta se ne mijenja. Zbog toga ista rekombinaza može procesom reverzibilne katalize izrezati ugrađeni transgen iz genoma (Coates i sur. 2005).

### 1.3.1.3 Sustav integracije pomoću transpozona klase II

Još jedna metoda integracije je pomoću transpozona klase II (Slika 1. E), koji se premještaju procesom „cut-and-paste“ u kojem se točno određena sekvenca DNA izrezuje s jednog izvora DNA i ugrađuje u drugu DNA. Takav sustav integracije sastoji se od dvije komponente: transpozonskog vektora koji sadrži transgen omeđen invertirajućim terminalnim ponavljanjima (ITR) i izvora enzima transpozaze. Klasa II transpozona klonirana u plazmid koristi se jer integrira samo transgen s njegovim regulatorima, ostavljajući neugrađen ostatak plazmida sa selekcijskim markerima. Prvi transpozonski sustav korišten u animalnim stanicama bio je reaktiviran, sintetski promijenjen transpozon *Sleeping Beauty*. Kasnije su razvijeni brojni transpozonski sustavi za upotrebu u stanicama kralježnjaka i gensku terapiju koja ne uključuje virusne vektore (Tan i sur. 2012). Većina transpozona pokazuje obrazac insercije koji nije sasvim nasumičan, već postoje mjesta ugradnje unutar genoma (engl. *hot spots*) koja se preferiraju pred drugima. Na primjer, transpozon PiggBac cilja sekvencu AATT, dok svi Tc1-mariner transpozonski elementi (*Sleeping Beauty*, *Frog*, *Prince*, *Minos* i *Hsmar1*) ciljaju TA dinukleotide.

Sposobnost određenih transpozonskih elemenata da se ugrađuju unutar gena ili unutar nekodirajuće DNA se međusobno razlikuje (Ivics i sur. 2009). Integracijska frekvencija transpozona *Sleeping Beauty* kreće se oko 10% stabilno transformiranih HeLa stanica te 17,5% transfeciranih primarnih humanih keratinocita eksprimira reporter gen za  $\beta$ -galaktozidazu u prisutnosti transpozaze (Coates i sur. 2005).



## 1.3.2 Sustav prepoznavanja sekvence DNA pomoću nukleinskih kiselina

Drugi alat za specifično prepoznavanje ciljne sekvence u genomu jesu nukleinske kiseline. Prepoznavanje se događa procesom sparivanja baza ciljnog mjesta s kemijski dobivenim analogom nukleinskih kiselina.

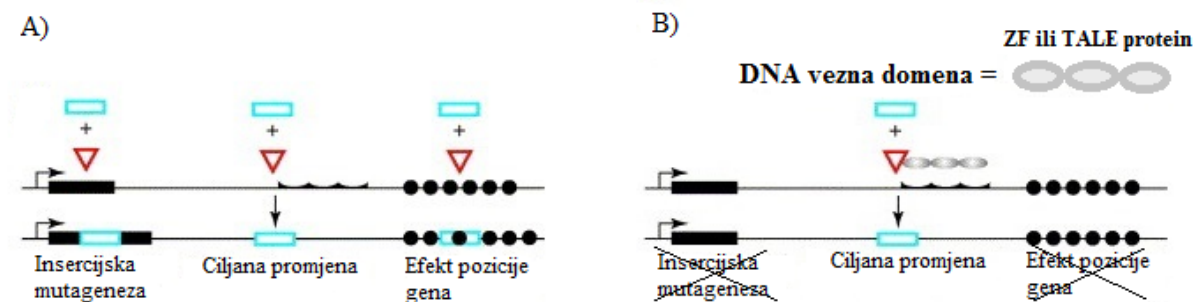
### 1.3.2.1 Homologna rekombinacija

Prve metode razvijene za ciljanu modifikaciju genoma sisavaca temelje se na procesu homologne rekombinaciji (HR) (Slika 2. C). U tom procesu uneseni fragment DNA prepoznaje protein RAD5, formira se nukleofilament koji sudjeluje u potrazi i prepoznavanju homologne sekvence na kromosomu. Djelovanjem proteina uključenih u popravak DNA (poglavlje 1.6.) ugrađuje se na točno ograničen dio genomske sekvence (Esvelt i Wang 2012). Ovo je česta metoda za modifikaciju mišjeg genoma ciljanjem gena od interesa u embrionalnim matičnim stanicama te ugradnjom selekcioniranih stanica u blastocistu. Najčešće se koriste dva tipa vektora: zamjenski (engl. *replacement vector*) i insercijski vektor (engl. *insertion vector*). Oba tipa vektora sadrže pozitivan selekcijski marker obrubljen homolognim sekvencama. Razlikuju se s obzirom na princip linearizacije prije elektroporacije u stanice. Zamjenski vektor se linearizira na restrikcijskim mjestima izvan sekvence homologije, dok se insercijski linearizira unutar homologne sekvence. Proces ugradnje homolognom rekombinacijom je vrlo rijedak događaj, osobito u somatskim stanicama pa do integracije dolazi u vrlo malom postotku stanica. Stoga je nužan korak kod ove metode proces selekcije stanica. Ograničenja ove metode su mala efikasnosti integracije, otežana primjena na stanicama u kulturi zbog potrebne selekcije te veličina fragmenta kojeg vektor može prenijeti u stanicu (Sorrell i Kolb 2005).

## 1.4 Sustav uvođenja genomskih modifikacija pomoću kimernih nukleaza ZFN i TALEN i sustava CRISPR/Cas

Zajedničko svojstvo starijih i novijih metoda za uvođenje genomskih modifikacija su dva tipa prepoznavanja DNA ovisno o interakcijama koje se ostvaruju između kimernih nukleaza ZFN, TALEN, CRISPR/Cas i određene sekvence DNA. Kod endonukleaza ZFN i TALEN prisutan je sustav prepoznavanja ciljnog mjesta interakcijom proteinskih modula i DNA, dok kod CRISPR sustava imamo tip prepoznavanja ciljne DNA pomoću gRNA (engl. *guide RNA*). Na proteinski dio ZF i TALE proteina fuzionirana je nukleazna domena FokI koja na ciljnom mjestu stvara urez u dvolančanoj DNA, dok kod CRISPR-a urez stvara Cas. Ovu cijelu skupinu kimernih nukleaza povezuju dva ključna procesa, neovisno o vrsti interakcija koje se ostvaruju u prepoznavanju DNA, a to su: uvođenje dvolančanog loma DNA na točno definiranom mjestu i mehanizam popravka dvolančanog loma u stanici (Ochiai i Yamamoto 2015).

Kimerne endonukleaze ZFN i TALEN sastoje se od specifične DNA vezujuće domene na koju je fuzionirana nespecifična nukleazna domena, poput FokI nukleaze (poglavlje 1.5.2). Fuzijom takvih domena omogućeno je uvođenje efikasnih i preciznih genomskih modifikacija (Slika 3. A).



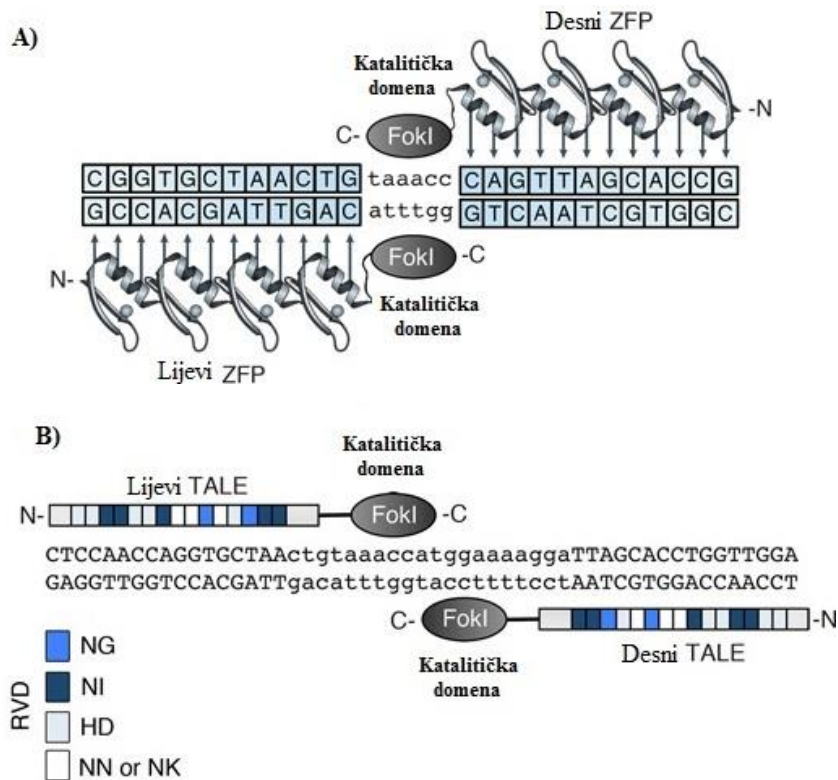
Slika 3. Mehanizmi ciljane integracije na temelju proteinskog prepoznavanja DNA na primjeru ZFN i TALEN. A) Endonukleaze, integraze, rekombinaze, transpozaze (crveni trokut) mogu ugraditi transgen (plavi pravokutnik) nasumično ili ciljano na više mjesta u genomu, što može dovesti do negativnih efekata: insercijske mutageneze ili efekta pozicijskog utišavanja. B) Fuzija ZF ili TALE modula (sive elipse) s odgovarajućim efektorskim domenama (crveni trokut) omogućavaju djelovanje endonukleaze na točno određenom mjestu u genomu (Kolb i sur. 2005).

Mnogi proteini koji djeluju samostalno poput endonukleaza, integraza, rekombinaza ili transpozaza nemaju takvu razinu specifičnosti i efikasnosti. Takvi enzimi nasumično ugrađuju insert ili ugrađuju insert na više mjesta unutar genoma, što dovodi do insercijske mutageneze ili utišavanja zbog efekta pozicije gena (engl. *position effect*) (Slika 3. B) (Gaj i sur. 2013; Kolb i sur. 2005).

Konstrukcija specifične DNA vezujuće domene moguća je zbog modularne strukture ZF i TALE proteina. ZF protein ima konzerviranu  $\beta\beta\alpha$  strukturu dugačku 30 aminokiselina te pomoću aminokiselina na površini jedne  $\alpha$  zavojnice prepoznaje 3 bp u velikom utoru DNA. Kombiniranjem niza modula koji sadrže više od prirodno prisutne tri ZF domene, konstruiran je sintetski ZF protein koji može prepoznati sekvencu dugačku 9-18 pb (Gaj i sur. 2013; Liu i sur. 1997).

Rekombinantni sustav ZFN konstruiran je tako da je nizu ZF proteina (ZFP) pridodana nespecifična endonukleaza, a često je to katalitička domena tipa II restriksijske endonukleaze FokI. Dvije FokI domene moraju dimerizirati kako bi efikasno stvorile urez u DNA. Stoga se ZF-FokI za neko ciljno mjesto uvijek konstruira u paru (Kolb i sur. 2005). Kod TALEN-a je također nužna dimerizacija FokI katalitičkih domena fuzioniranih na lijevi i desni TALE protein, kao i kod ZFN (Slika 4.).

Upotrebom ovih sustava endonukleaza omogućena je velika prilagodljivost ciljnom mjestu u genomu. Ciljno mjesto više nije ograničeno na određena područja genomske sekvence, zahvaljujući mogućnosti programiranja DNA vezujućih modula ZFP i TALE proteina za vezanje na bilo koju sekvencu u genomu. Odabrana kombinacija DNA vezujućih modula može se kombinirati s velikim brojem efektorskih domena, npr. nukleaze, transkripcijski aktivatori i represori, rekombinaze, transpozaze, DNA i histonske metiltransferaze ili histonske acetilaze, koje uvode željene modifikacije (Gaj i sur. 2013).



**Slika 4. ZFN i TALEN vezani na ciljno mjesto u DNA. A) ZFN ciljno mjesto koje sadrži dva vezna mjesta za lijevi i desni ZFP, razmaknuta sekvencom od 5-7 bp koju prepoznaje FokI katalitička domena. B) TALEN vezno mjesto koje sadrži dva jedinstvena vezna mjesta za TALE protein razmaknuta sekvencom od 12-20 bp (Gaj i sur. 2013).**

Drugi potpuno različit sustav genomske inženjerstva je CRISPR sustav. Kod nekih arhea i bakterija pronađen je CRISPR lokus koji zajedno s Cas proteinom djeluje kao adaptivni imunološki sustav protiv strane DNA koja uđe u prokariotskoj stanici. Nakon ulaska u prokariotsku stanicu strana DNA se uklopi u CRISPR lokus, transkribira i prerađuje u oblik crRNA. Kod tipa II CRISPR/Cas sustava pre-crRNA se kratkim dijelom „spacer“ regije komplementarno spari sa trans-crRNA (tracrRNA). Konačni crRNA-tracrRNA heterodupleks cilja egzogenu DNA s identičnim sekvencama kao crRNA i zajedno s Cas proteinom izaziva lom DNA molekule na točno određenim mjestima. Metoda CRISPR/Cas primijenjena u genomskom inženjerstvu koristi samo gRNA umjesto crRNA-tracrRNA i Cas protein s nukleaznom aktivnošću (Barrangou i Marraffini 2014; Westra i sur. 2014; Ochiai i Yamamoto 2015).

## 1.5 Struktura TALEN-a (transcription activator-like effector nucleases)

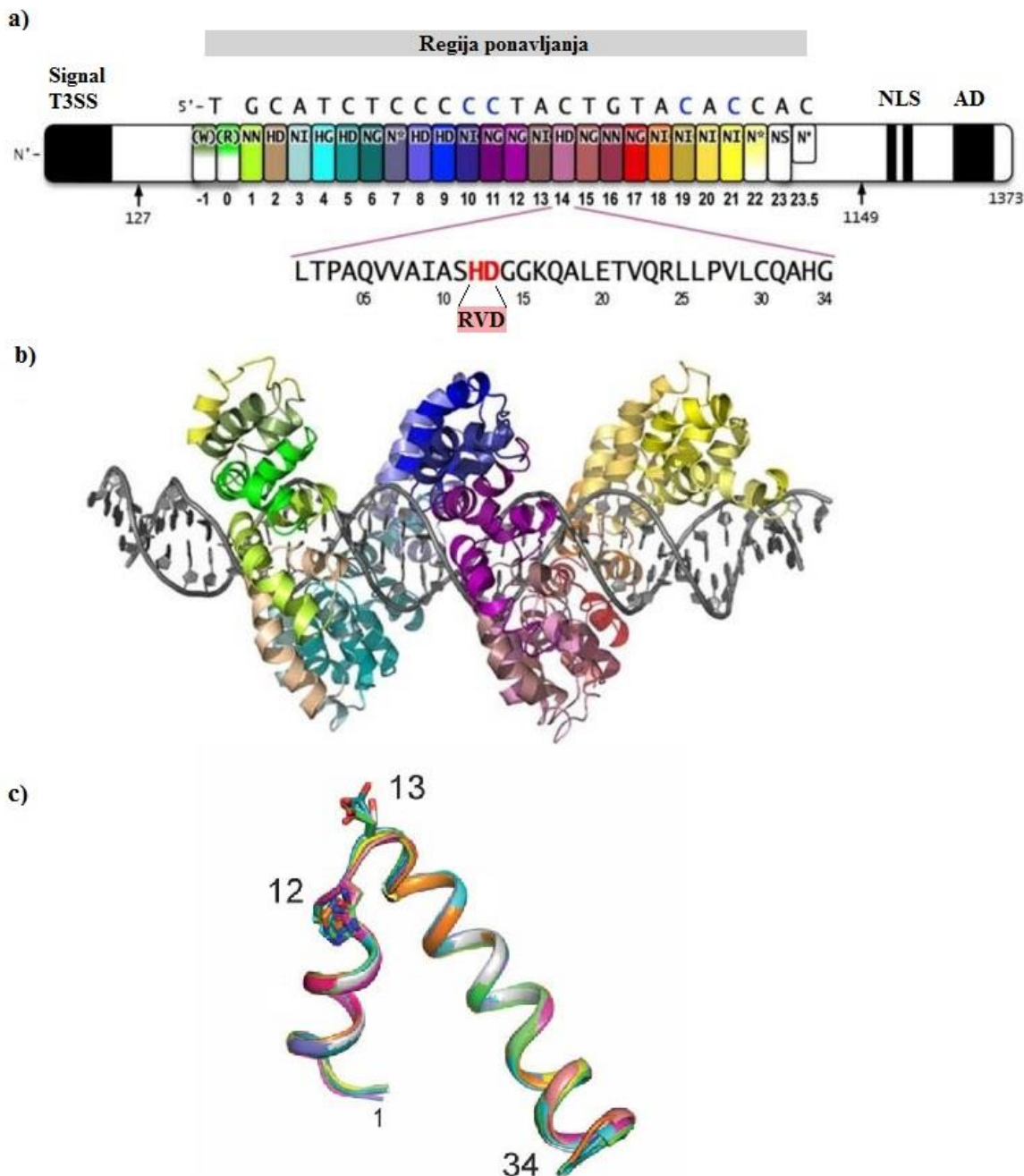
Znanstvenici su pokazali da se spajanjem određenih monomernih ponavljanja mogu uspješno dizajnirati TALE proteini koji ciljaju samo odabrane sekvence DNA (Boch i sur. 2009). Iskorištena je modularnost proteina TALE i specifičnost prepoznavanja DNA za postizanje kontrole nad genetskim materijalom *in vitro* i *in vivo* (Bogdanove i Voytas 2011). Moguće je kreirati brojne fuzije TALE DNA vezujuće domene i različitih efektorskih domena. Za potrebu uvođenja DNA dvolančanog loma na točno određenom mjestu, fuzioniran je TALE protein i FokI nukleaza (Li i sur. 2011; Miller i sur 2011; Mahfouz i sur. 2011).

### 1.5.1 Proteini TALE kao DNA vezujuća domena TALEN-a

Proteini TALE otkriveni su u fitopatogenim bakterijama roda *Xanthomonas*. Pojedini soj bakterija može sadržavati jedan do nekoliko desetaka proteina TALE, koje unosi u biljnu stanicu sekrecijskim mehanizmom tipa III. Nakon interakcije s importinom  $\alpha$  protein TALE se translocira u jezgru gdje se veže na UPT (engl. *upregulated by TALE – UPT*) motiv u promotorskoj regiji specifičnog efektorskog gena. Djeluje kao transkripcijski aktivator gena uključenih u razvoj bolesti biljke npr. gena UPA20, Os8N3, OsTFIIA $\gamma$ 1, orOsTFX1 i drugih, te gena uključenih u otpornost biljne stanice npr. Bs3, Xa27, Xa7, Xa10 i drugih (Romer i sur. 2007; Bogdanove i sur. 2010).

Proteini TALE sastoje se od N terminalne domene važne za unos sekrecijskim putem, C terminalne domene s jezgrinim lokalizacijskim signalom i aktivacijske domene karakteristične za transkripcijske faktore (Bogdanove i sur. 2010; Mak i sur. 2012). Središnji dio proteina sastoji se od niza monomernih ponavljanja, tzv. modula (Slika 5.). Broj modula kod proteina TALE je između 13 i 28 modula. Svako ponavljanje najčešće sadrži 34 aminokiseline (Boch i Bonas 2010; Wei i sur. 2013; Bogdanove i Voytas 2011).

Svaki modul prepoznaje jedan nukleotid sekvence DNA, a niz modula prepoznaje specifičnu sekvencu DNA. Veznu specifičnost svakog modula određuju aminokiseline na poziciji 12 i 13 koje još nazivamo RVD (engl. *repeat variable di-residues*) (Slika 5. A i C).



Slika 5. Model i kristalna struktura TALE proteina.

A) Organizacija domena TALE proteina PthXo1; B) Kristalna struktura PthXo1 DNA vezujuće regije u kompleksu sa ciljnim mjestom; C) Struktura TALE monomernog ponavljanja, tj. modula dobivena steričkim preklapanjem više TALE modula. U području 12 i 13 aminokiselinskog ostatka tzv. RVD-a (engl. *repeat variable di-residues* – RVD) vidljivo je karakteristično steričko nepreklapanje TALE modula (Mak i sur. 2012).

Nukleotide C, T, A, G prepoznaje više od 20 različitih RVD-a, a sedam najčešćih su: HD (His Asp), NG (Asn Gly), NI (Asn Ile) i NN (Asn Asn), NS i N\* (Slika 6.). Kod N\* modula nedostaje aminokiselina na poziciji 13 što rezultira sa ukupno 33 aminokiseline tog modula (Boch i sur. 2009; Moscou i Bogdanove 2009; Bogdanove i Voytas 2011; Mak i sur. 2012).



**Slika 6. Slikovni prikaz udjela određenih RVD-ova u prepoznavanju pojedine baze DNA, kod 20 različitih TALE proteina prisutnih u prirodi. Najviše su zastupljena modul ponavljanja s RVD-ovima: HD, NG, NI, NN u prepoznavanju baza: C, T, A i G (Moscou i Bogdanove 2009).**

Isključivo drugi aminokiselinski ostatak u RVD-u ostvaruje specifične Van der Waalsove interakcije i vodikove veze sa bazom DNA stoga ta interakcija omogućuje specifično prepoznavanje različitih nukleotida. Zanimljiv primjer vezanja nukleotide je RVD (HD) kod kojeg aspartat ostvaruje hidrofobne interakcije sa amidnim prstenom i vodikove veze s dušikom (N4) u citozinu, te je vjerojatno osjetljiv na metilaciju citozina (5mC) (Deng i sur. 2012; Mak i sur. 2012). Valton i sur. (2012) utvrdili su da je RVD (N\*) neosjetljiv na metilirani citozin i u jednakoj mjeri prepoznaje baze C, T i stoga omogućuje efikasno vezanje metilirane sekvence. Uvođenjem modula s RVD-om (N\*) u TALEN niz, pronađen je prihvatljiviji način prepoznavanja metiliranog citozina od prethodne upotrebe kemijske demetilacije ciljnog mjesta u genomu domaćina (Valton i sur. 2012). U rezultatima grupe Reyon i sur. (2012) primijećen je negativan efekt metilacije citozina na vezanje i aktivnost TALEN-a. Postoje indikacije da na vezanje TALEN-a osim metilacijskog statusa mogu utjecati kompakcija kromatina, ciljna sekvenca i sama ekspresija TALEN-a (Reyon i sur. 2012; Valton i sur. 2012). Problem nedovoljno specifičnog prepoznavanja pojedinih nukleotida pomoću prirodno prisutnih RVD-a riješen je otkrićem dvadeset novih kombinacija nekanonskih RVD-a (Miller i sur. 2015).

Zadnji modul u središnjoj ponavljajućoj domeni proteina TALE sadrži samo prvih 20 aminokiselina, unutar kojeg i RVD, te se zbog toga naziva i polu-ponavljanje. Na 5' kraju sekvence koju prepoznaju prirodni TALE proteini prethodi konzervirana baza timin. U

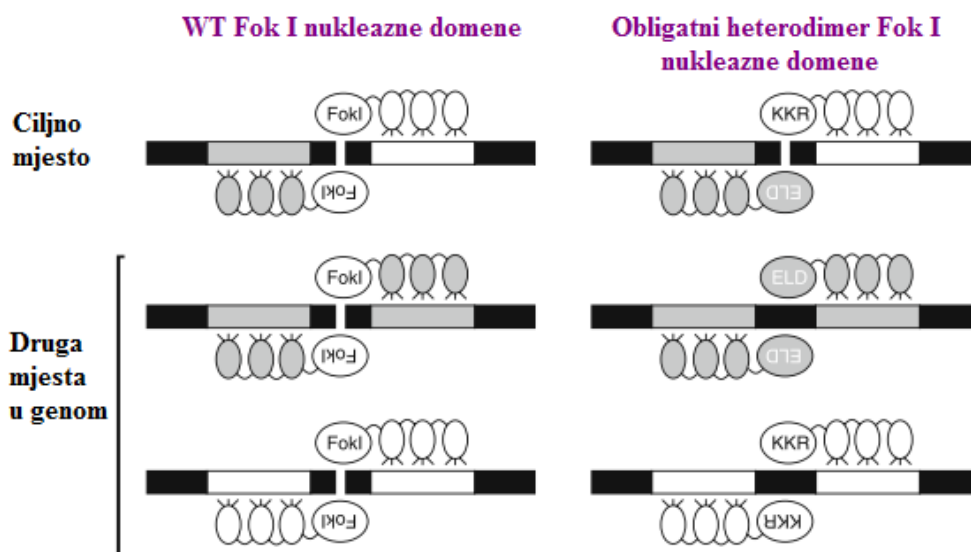
slučaju PthXo1 TALE proteina bazu T prepoznaju dva degenerirana ponavljanja koja se nalaze na poziciji 0 i -1, te zajedno formiraju  $\alpha$  heliks i petlju koji slične na heliks i RVD kod kanonskih modula (Boch i sur. 2009; Mak i sur. 2012).

### **1.5.2 Fok I nukleaza kao efektorska domena TALEN-a**

FokI je tip II endonukleaze izoliran iz bakterije *Flavobacterium okeanokoites*. Sastoji se od N terminalne DNA vezujuće domene i C terminalne DNA katalitičke domene. DNA vezujuća domena prepoznaje ne-palindromsku sekvencu 5'-GGATG-3'·5'-CATCC-3' u dvolančanoj DNA, dok 9-13 nt nizvodno od mjesta prepoznavanja katalitička domena nespecifično stvara urez u DNA. Dvije molekule FokI nukleaze vežu se na sekvencu DNA, gdje dimeriziraju njihove katalitičke domene tvoreći funkcionalan kompleks endonukleaze. Taj kompleks stvara urez na oba lanca DNA, nizvodno od mjesta prepoznavanja (Li i sur. 1992; Pernstich i sur. 2012).

Kako bi se izbjeglo uvođenje dvolančanog loma na mjestima koja se ne ciljaju konstruirani su obligatni heterodimerni mutanti (ELD:KKR) FokI nukleaze za fuzije sa ZF i TALE proteinima. Kod ovih mutanata inhibirana je homodimerizacija, što rezultira značajnim smanjenjem citotoksičnosti zbog uvođenja nespecifičnih dvolančanih lomova u genomu (Slika 7.). Osim primjene heterodimera uvedene su mutacije N496D i H537R čime je dobivena hiperaktivna varijanta FokI nukleaze nazvana Sharkey. FokI nukleaza kod koje su ove dvije mutacije Sharkey i ELD:KKR uvedene zajedno pokazuje značajno povećanje aktivnosti i selektivnosti ZFN s obzirom na FokI nukleazu sa samo jednom mutacijom (Doyon i sur. 2010; Guo i sur. 2010).





Slika 7. Mehanizam djelovanja ZFN-a i TALEN-a s divljim tipom (WT) FokI nukleaze ili s mutiranim tipom (ELD:KKR) FokI nukleaze.

Kod ZFN-a ili TALEN-a s fuzioniranom WT FokI nukleazom vežu se dva lijeva konstrukta (sive elipse na sivim pravokutnicima) ili dva desna konstrukta (bijeje elipse na bijelim pravokutnicima) na sekvence u genomu koja nisu ciljna mjesta, dolazi do homodimerizacije WT FokI nukleaze koja uvodi dvolančane lomove.

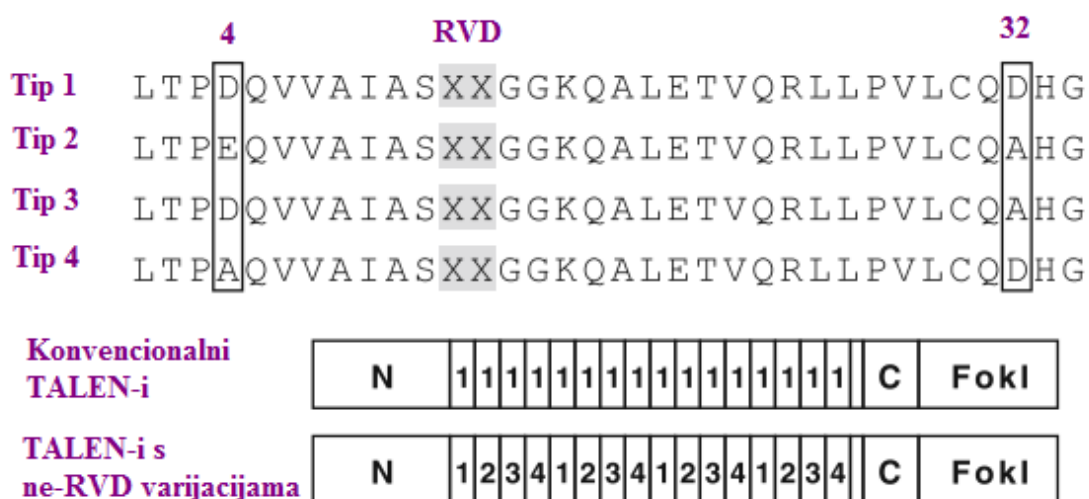
Kod ZFN-a ili TALEN-a s fuzioniranom mutiranom (ELD:KKR) FokI nukleazom vežu se dva lijeva konstrukta (sive elipse na sivim pravokutnicima) ili dva desna konstrukta (bijeje elipse na bijelim pravokutnicima) na sekvence u genomu koja nisu ciljna mjesta, homodimerizacija između mutanata (ELD:ELD) ili (KKR:KKR) FokI nukleaza je onemogućena kao i nastajanje dvolančanih lomova. Nastajanje dvolančanog loma moguće je jedino između (ELD:KKR) FokI nukleaza lijevog (bijeje elipse) i desnog konstrukta (sive elipse) (Ochiai i Yamamoto 2015).

### 1.5.3 Aktivnost i specifičnost TALEN-a

Razvijeno je nekoliko različitih TALEN-a s obzirom na promjene u N i C terminalnoj domeni, jer je potvrđeno da duljina N i C terminalne regije utječe na aktivnost TALEN-a. Miller i sur. (2011) dobili su aktivne mutante skraćivanjem C terminalne domene sa 278 na 63 aminokiselinska ostatka. Uz C terminalnu deleciju ( $\Delta 215$ ) sadrži i skraćenje N terminalne domene sa 288 na 136 aminokiselinska ostatka tj.  $\Delta 152$  (Miller i sur. 2011; Ochiai i

Yamamoto 2015). Za +163/+63 TALEN mutante utvrđena je optimalna dužina sekvence između dva TALEN-a i ona se kreće od 13 do 33 nt (Christian i sur. 2012).

Povećanju aktivnosti genomskog uređivanja TALEN-a doprinose i aminokiselinske varijacije prisutne u području izvan RVD. U prirodi postoje TALE proteini koji sadrže varijacije i u području 4. i 32. aminokiselinskog ostatka (Boch i Bonas 2010; Ochiai i Yamamoto 2015). Frekvencija aminokiselina koje se najčešće pojavljuju na poziciji 4. aminokiseline je D (Asp): E (Glu): A (Ala) = 2:1:1, tj. na poziciji 32. aminokiseline D (Asp): A (Ala) = 1:1. Ipak, komercijalno najšire upotrebljavan set TALE modula (Golden Gate TALEN i TAL effector – Addgene) za konstrukciju sadrže 32 identične aminokiseline i varijaciju u RVD području 12. i 13. aminokiselinskog ostatka. Sakuma i sur. (2013b) uspjeli su konstruirati TALEN-e s ne-RVD varijabilnim aminokiselinama tzv. Platinum TALEN-i (Slika 8.). Pokusi *in vivo* potvrdili su znatno veću aktivnost Platinum TALEN-a od konvencionalnih TALEN-a (Ochiai i Yamamoto 2015).



**Slika 8. Konvencionalni TALEN-i s varijabilnim aminokiselinama u području RVD-a i Platinum TALEN-i s varijacijama u ne-RVD području (aminokiseline 4 i 32) (Ochiai i Yamamoto 2015).**

TALEN-i su pokazali veću aktivnost genomskog uređivanja i manju toksičnost od ZFN (Chen i sur. 2013). To je posljedica visoke specifičnosti, tj. niskog postotka djelovanja na neciljnim mjestima u genomu. U razumijevanju specifičnosti TALEN-a doprinijele su brojne računalne predikcije i analize. U radu objavljenom u časopisu Nature, Guilinger i suradnici (2014) su analizirali sposobnost TALEN-a različite dužine i sekvence

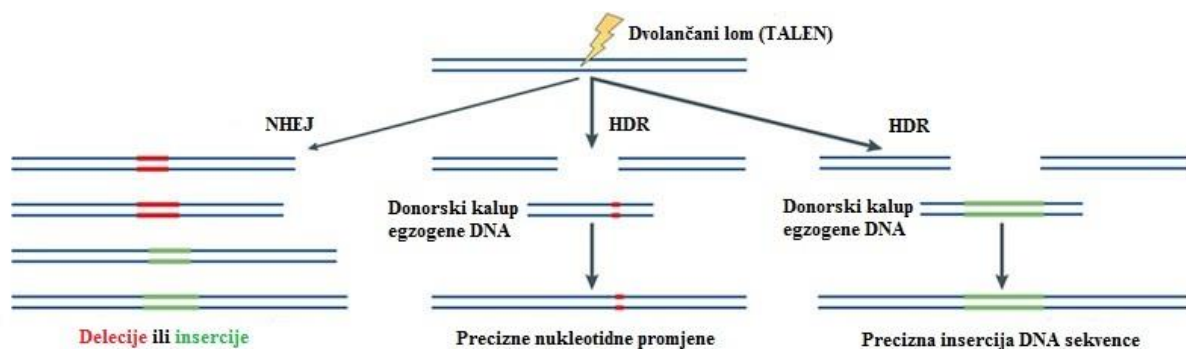
prepoznavanja za stvaranje uzreza na nespecifičnim mjestima u genomu. Rezultati su pokazali da su TALE proteini neovisni u vezanju na DNA, duži TALEN-i su tolerantniji na male promjene u ciljnoj sekvenci (engl. *mismatch*) i specifičniji za sekvencu unutar genoma. Utvrđeno je da velika vezna energija DNA i TALEN-a može reducirati specifičnost TALENA-a (Gulinger i sur. 2014).

## 1.6 Mehanizam djelovanja TALEN-a i popravak dvolančanog loma

Mehanizam djelovanja kimernih nukleaza temelji se na uvođenju dvolančanog loma DNA koji stimulira stanični popravak DNA. Pošto je popravak dvolančanog loma evolucijski konzerviran proces od kvasaca do sisavaca primjena TALEN-a nije ograničena te se može koristiti za ciljanu promjenu gena i kod životinja i kod biljaka. Postoje dva različita rekombinacijska popravka dvolančanog loma u stanici, a to su nehomologni (engl. *non-homologous end joining – NHEJ*) i homologni (engl. *homology directed repair – HDR*) mehanizam popravka (Wyman i Kanaar 2006; Miller i sur. 2011; Yamamoto i Ochiai 2015).

Glavni put popravka dvolančanog loma u stanici je nehomologni popravak koji se događa tijekom cijelog staničnog ciklusa i u mirujućoj fazi G<sub>0</sub>, a najčešći je mehanizam popravka u vremenu izvan S/G<sub>2</sub> faze. Ovaj mehanizam najčešće sudjeluje u popravku egzogeno izazvanih dvolančanih lomova DNA. Nehomologni popravak dvolančanog loma DNA temelji se na izravnoj ligaciji dva kraja DNA koji ne moraju biti homologni, ali mogu imati homologne privjeske nastale djelovanjem NHEJ enzima (Takeda i Yamazoe 2003; Reed i Watters 2003). Proces NHEJ popravka provode protein helikaza Ku, nukleazni kompleks: nukleaza Artemis i DNA ovisna protein kinaza (Artemis:DNA-PK), DNA polimeraze  $\mu$  i  $\lambda$  (Pol  $\mu$  i  $\lambda$ ) i ligazni kompleks: DNA ligaza IV, XRCC4 i Cre-XLF. Na krajeve DNA s visokim afinitetom se veže Ku70/Ku80 heterodimer koji postaje vezno mjesto za nukleazni kompleks, kompleks DNA polimeraze ili ligazni kompleks. Vezanjem Artemis:DNA-PK kompleksa na Ku helikazu fosforilira se Artemis i djeluje nukleaznom aktivnošću na 3' i 5' krajevima DNA. Vezanjem Pol  $\mu$  može dodavati nasumične nukleotide neovisno o DNA kalupu. Kad nastane nekoliko homolognih nukleotida DNA ovisna Pol  $\lambda$  može popuniti nastalu pukotinu, a može formirati i uzastopna ponavljanja. Vrlo fleksibilan ligazni kompleks DNA ligaze IV, XRCC4 i Cre-XLF katalizira reakciju ligacije dvolančane molekule DNA s malim homolognim privjescima, također ligira i DNA s tupim krajevima. Postoje mnogobrojne kombinacije ovih enzima i stoga je moguć velik broj intermedijernih oblika

DNA (Lieber 2008; Wu i sur. 2009; Lieber 2010). Popravak dvolančanog loma procesom NHEJ, nastalog djelovanjem TALEN-a i drugih kimernih nukleaza, dovodi do pojave delecija ili insercija nt na mjesto popravka. Posljedica tih modifikacija je pomak okvira čitanja kodirajuće sekvence ili promjena veznih mjesta za transkripcijske faktore u promotorskoj ili pojačivačkoj regiji gena, što može narušiti funkciju tog gena ili ga potpuno inaktivirati (Slika 9.). Stoga su TALEN-i jedna od preferiranih metoda za dobivanje mutanata za određene gene i u istraživanjima funkcije gena (Joung i Sander 2014; Li i Hotta 2015).



**Slika 9. Popravak dvolančanog loma DNA.**

Dvolančani lom uveden djelovanjem TALEN-a može se popraviti nehomolognim (NHEJ) ili homolognim (HDR) rekombinacijskim popravkom. Rezultat NHEJ popravka su različito dugačke insercije i delecije na mjestu popravka. Kod HDR mehanizma imamo mogućnost ugradnje egzogene DNA koja može poslužiti kao lanac kalup te je na taj način moguće uvesti preciznu inserciju manje nukleotidne modifikacije ili veće transgene sekvence DNA (Joung i Sander 2014).

Za popravak dvolančanog loma homolognim rekombinacijskim popravkom potreban je lanac kalup sa sestrinske kromatide, homolognog kromosoma ili egzogeno uvedene DNA. Ovaj tip popravka najčešće se odvija u S/G2 fazi staničnog ciklusa kao mehanizam popravka endogeno uzrokovanih oštećenja tijekom replikacije DNA (Ochiai i Yamamoto 2015). Proces homolognog popravka uključuje velik broj proteina koji pripadaju grupi RAD52 te su uključeni u formiranje i razrješenje Hollidayeve strukture. početni korak posredovan je kompleksom RAD50/NBS1/MRE11. Egzonukleazom 3'→5' aktivnošću MRE11 može procesirati oštećene krajeve DNA i izložiti jednolančane krajeve. Na jednolančanu DNA veže se najprije replikacijski protein A (RPA) kojeg zamjenjuje RAD51 uz pomoć RAD52. Nukleoproteinski filament s RAD51 sudjeluje u potrazi i prepoznavanju homologne sekvence

na lancu kalupu. Dolazi do formiranja strukture između oštećene i homologne DNA koju dodatno stimuliraju proteini RAD52 i RAD54. BRCA1 i BRCA2 su multifunkcionalni proteini uključeni u HDR tako da BRCA1 inhibira nukleaznu aktivnost MRE11, dok BRCA2 regulira dostupnost i aktivnost RAD51. Nakon formiranja Hollidayeve strukture polimeraznom aktivnošću popunjavaju se praznine, ligiraju lanci DNA i razrješava Hollidayeva struktura (Takeda i Yamazoe 2003).

## **1.7 Metode konstrukcije TALEN-a**

Zbog mnogih prednosti naspram prethodnih metoda, jednostavnosti prepoznavanja ciljnih sekvenci i dizajna ciljnog mjesta, TALEN je postao poželjan alat za ciljano preuređivanje genomskih sekvenci. Do danas su razvijene različite metode kako bi se pojednostavio i ubrzao proces konstrukcije TALEN-a (Ochiai i Yamamoto 2015).

### **1.7.1 Konstrukcija Golden Gate kloniranjem**

Za konstrukciju TALEN-a Golden Gate kloniranjem potreban je set plazmida s TALE modulima, destinacijski plazmid, DNA ligaza i specifične restriksijske endonukleaze tipa II (Cermak i sur. 2011). Takve endonukleaze, poput BsaI i Esp3I, režu izvan mjesta prepoznavanja i formiraju jedinstvene ljepljive krajeve duljine 4 bp. Smjesa ovih enzima s odgovarajućim plazmidima s modulima i ciljnim vektorom omogućava povezivanje dva do deset TALE modula točno određenim redoslijedom (Slika 10. A). U samo jednoj reakcijskoj smjesi odvija se digestija i ligacija. Kroz dvije Golden Gate reakcije moguće je konstruirati TALEN od 12-31 RVD modula unutar pet dana. Plazmidni vektor s TALEN konstruktom umnaža se u bakterijama, što omogućava selekciju, umnažanje i izolaciju točno određenog plazmida s TALEN konstruktom. Ova metoda je široko prihvaćena i korištena zbog svoje jednostavnosti i brzine. Do danas je objavljeno nekoliko verzija originalne metode Golden Gate kloniranja za konstrukciju konvencionalnih TALEN-a (Ding i sur. 2013; Kim i sur. 2013; Sakuma i sur. 2013a). Za konstrukciju TALEN-a s ne-RVD varijacijama razvijena je metoda Platinum Gate kloniranja (Sakuma i sur. 2013b; Ochiai i Yamamoto 2015).

### **1.7.2 Konstrukcija Golden Gate PCR-om**

U prvom koraku ove metode PCR reakcijom su umnoženi moduli fragmenti od početna četiri plazmida za NN, NG, NI i HD module i specifičnih početnica s adapterima koji nose ligacijsko i restriksijsko mjesto za kasniju Golden Gate reakciju (Sanjana i sur. 2012). S umnoženim i pročišćenim modul fragmentima kreće se u prvu Golden Gate reakciju u kojoj nastaju heksameri TALE modula (Slika 10. B). Nakon umnažanja PCR-om i pročišćavanja ligiranih heksamera kreće se u drugu Golden Gate reakciju. Ova metoda zahtijeva manji broj

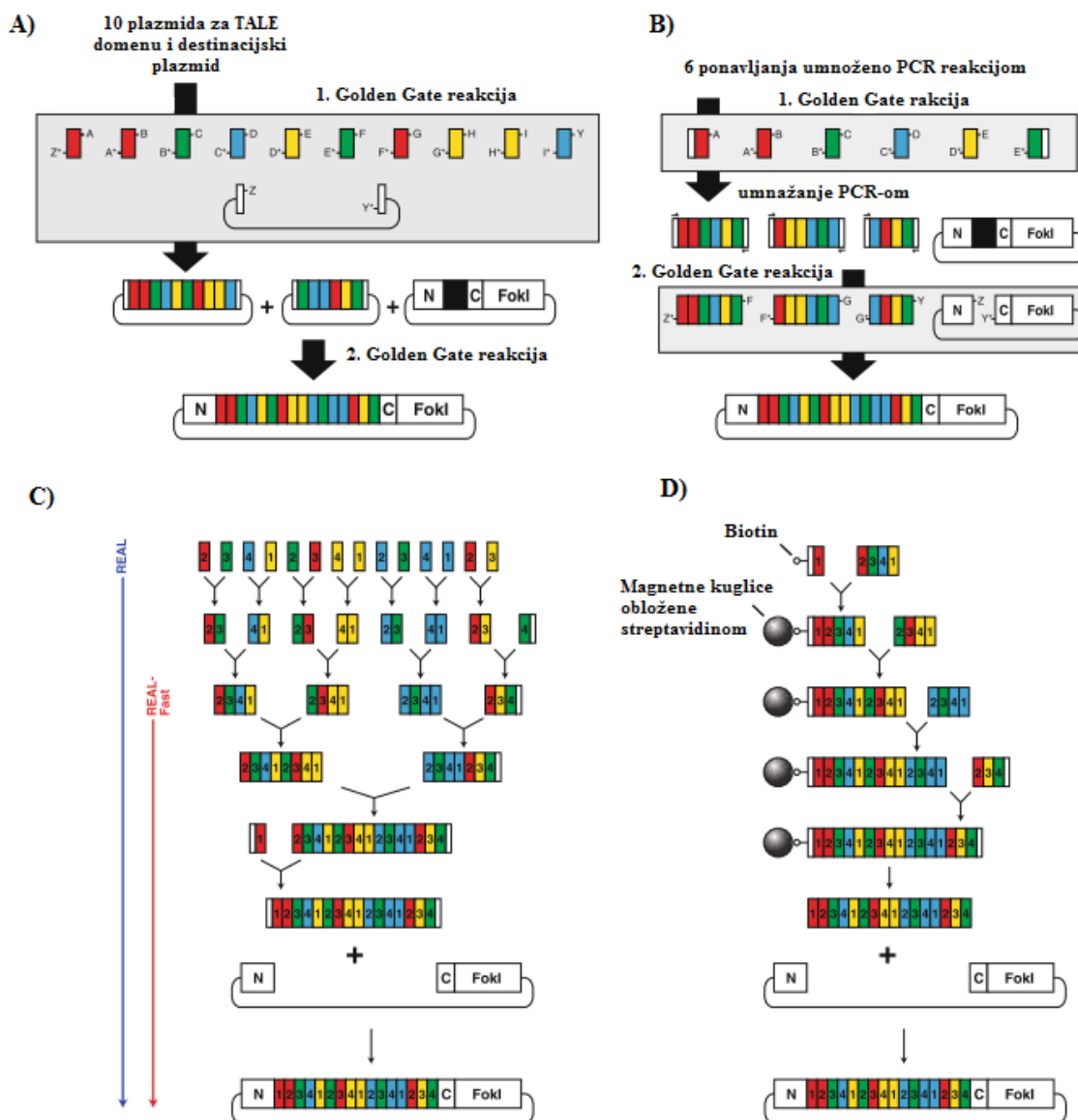
plazmida i kraće vrijeme pripreme od metode Golden Gate kloniranja. Umnažanje PCR-om sličnih modul ponavljanja može dovesti do pojave mutacija u amplikonima (Sanjana i sur. 2012; Ochiai i Yamamoto 2015).

### **1.7.3 Konstrukcija restriksijskim endonukleazama i ligacijom (REAL)**

Metoda konstrukcije restriksijskim endonukleazama i ligacijom (engl. *restriction endonuclease and ligation – REAL*) temelji se na cijepanju pomoću različitih restriksijskih endonukleaza tipa II. Nakon prve reakcije ligirana su dva TALE modula. Nakon druge reakcije set od dva TALE modula se ligira u set od četiri modula i tako dalje (Slika 10. C). Metoda REAL je najjednostavnija metoda za konstrukciju TALEN-a, ali zbog višestrukih koraka kloniranja zahtijeva mnogo više vremena od drugih metoda (Sander i sur. 2011). Objavljena je poboljšana verzija ove metode, nazvana REAL-Fast metoda. Konstrukcija kreće od plazmida s dva ili četiri modula zbog čega je vrijeme konstrukcije znatno smanjeno, ali je zato povećan broj početnih plazmida s različitim kombinacijama modula. Za pomoć u kreiranju TALEN konstrukta REAL i REAL-Fast metodom dostupan je besplatan on-line program „ZiFiT Targeter“ (Ochiai i Yamamoto 2015).

### **1.7.4 Konstrukcija automatiziranim sustavom brze ligacije na čvrstoj fazi visoke propusnosti (FLASH)**

Kod metode konstrukcije automatiziranim sustavom brze ligacije na čvrstoj fazi visoke propusnosti (engl. *Fast Ligation-Based Automated Solid-Phase High-Troughput – FLASH*) koriste se isti početni TALE monomeri kao i kod REAL-Fast metode. Ključna razlika je da se TALE moduli kod FLASH sustava konstrukcije povezuju na magnetnim kuglicama (Slika 10. D). Na raspolaganju je 376 različitih kombinacija modul ponavljanja, od jednog do četiri modula u nizu. U prvom koraku prvi modul se ligira sa sljedeća četiri TALE modula. Takav niz pomoću biotinske oznake na N terminalnom dijelu prvog TALE modula veže se na streptavidinom presvučenu magnetnu kuglicu. Na takav niz modula dodaju se tetrameri TALE modula do željene dužine i zatim restriksijskom digestijom odvajaju od kuglica. Ovim procesom moguće je sintetizirati do 96 TALE ponavljanja u jednom danu (Reyon i sur. 2012; Ochiai i Yamamoto 2015).



Slika 10. Metode konstrukcije TALEN-a. Pravokutnici žute, crvene, zelene i plave boje predstavljaju TALE module koji prepoznaju četiri različita nukleotida, a brojke unutar njih predstavljaju tipove TALE modula s ne-RVD ponavljanjima. Slova na slici A i B predstavljaju jedinstvene ljepljive krajeve nastale djelovanjem endonukleaza tipa II (Ochiai i Yamamoto 2015).



## 1.8 Gen HNF1A

Gen HNF1 homeoboks A (engl. *hepatocyte nuclear factor 1 alpha – HNF1A*) smješten je na dužem kraku 12. kromosoma unutar lokusa 24.31. On kodira za transkripcijski faktor HNF-1 $\alpha$  koji se sastoji od tri funkcionalne domene, a to su: N terminalna dimerizacijska domena, DNA vezni motiv koji čine POU specifična i POU homeodomena i treća C terminalna transaktivacijska domena. Protein HNF-1 $\alpha$  je aktivan u obliku homodimera ili heterodimera sa strukturno povezanim HNF-1b. U homodimernom obliku veže palindromsku sekvencu 5'-GTTAATNATTAAC-3' (Yamagata i sur. 1996; Chi i sur. 2002). HNF-1 $\alpha$  se eksprimira specifično u jetri i gušterači. Uključen je u regulaciju velikog broja gena u jetri, uključujući gene za albumin, a-1 antitripsin, a i b fibrinogen, faktor zgrušavanja, apolipoproteine i druge (Pontoglio i sur. 1997). Također, HNF1A je uključen u regulaciju gena za fukozil transferaze 3, 6 i 8 te N-acetil-glukozamin transferaze 4a koji su uključeni u glikozilaciju proteina (Zoldoš i sur. 2012).

Monoalelna mutacija gena HNF1A rezultira autosomalno dominantnim efektom i uzrok je MODY3 (engl. *maturity onset diabetes of the young – MODY*) dijabetesa koji je jedan od podtipova dijabetesa tipa 2. Fenotip MODY3 dijabetesa nastaje uslijed promjene ekspresije gena u  $\beta$  stanicama Langerhansovih otočića u gušterači što dovodi do smanjene sinteze i sekrecije inzulina i uzrokuje abnormalni razvoj  $\beta$  stanica. Posebno su zahvaćeni geni koji kodiraju za inzulin, Glut2 transporter, transportere neutralnih i bazičnih aminokiselina i mitohondrijskih enzima poput piruvat dehidrogenaze (Shih i sur. 2001; Chi i sur. 2002). Bluteau i sur. (2002) detektirali su bialelnu inaktivaciju gena HNF1A u 50% uzoraka benignih adenoma jetre te je za tu skupinu adenoma kasnije utvrđen manji rizik za malignu transformaciju u HCC (engl. *hepatocellular carcinoma – HCC*) (Chen 2006). Utvrđeno je da epigenetička regulacija ima važnu ulogu u održavanju funkcije gena HNF1A. Zoldoš i sur. (2012) utvrdili su da epigenetičko utišavanje CpG metilacijom promotora gena HNF1A uzrokuje promjene u grananju N-glikana na glikoproteinima krvne plazme koje su utvrđene i kod oboljelih od MODY3 dijabetesa. Za proučavanje gena HNF1A *in vitro* pogodne su stanice jetre u kulturi te je u ovom radu korištena HepG2 stanična linija kao model za transfekciju TALEN-a. HepG2 stanice u kulturi su adherentne epitelne stanice hepatocelularnog karcinoma jetre.

## 2 Cilj rada

Inaktivacija gena u stanici može se provesti različitim metodama mutageneze pomoću rekombinaza, integraza i transpozaza. Ipak, takve metode nedovoljno su specifične u prepoznavanju ciljnog mjesta u genomu te često uzrokuju negativne efekte u stanici inaktivacijom tumor supresor gena ili aktivacijom onkogeno. Za povećanje efikasnosti i selektivnosti mutageneze razvijene su fuzije DNA vezujućih proteina i različitih nukleaza. TALEN je fuzija TALE proteina i FokI nukleaze koja omogućava ciljano uvođenje dvolančanog loma. Popravak takvog loma NHEJ mehanizmom vrlo često rezultira inaktivacijom ciljanog gena.

Zasad nije provedena inaktivacija gena HNF1A u HepG2 staničnoj liniji pomoću TALEN-a. Stoga je cilj ovog rada konstrukcija TALEN-a specifičnih za ciljno mjesto unutar humanog gena HNF1A i njegova transfekcija u HepG2 stanice što bi značajno ubrzalo postupak dobivanja stanične linije s inaktiviranim genom HNF1A i olakšalo istraživanja njegove složene funkcije.

Za ostvarenje tog cilja u prvom koraku konstruiran je TALEN par metodom Golden Gate kloniranja. U drugom koraku provedene su dvije serije transfekcije HepG2 stanica destinacijskim vektorima s TALEN konstruktima i vektorom pcDNA-EGFP. Aktivnost TALEN-a u transfeciranim HepG2 stanicama analizirana je T7E1 testom na izolatima genomske DNA. Efikasnost transfekcije HepG2 stanica određena je detekcijom eksprimiranog fluorescentnog proteina EGFP.

## 3 Materijali i metode

### 3.1 Materijali

#### **Komercijalni setovi:**

Golden Gate TALEN und TAL effector kit 2.0 (Cat. No. 1000000024, Addgene, Cambridge, SAD); QIAprep Mini Prep Kit (Cat. No. 27106 Qiagen, Hilden, Njemačka); Lipofectamine® 3000 Reagent (Cat.No. L3000-001; Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD); DNeasy Blood and Tissue Kit (Cat. No. 69504, Qiagen); High Pure PCR Cleanup Micro kit (Cat. No. 04 983 955 001, Roche Applied Science, Mannheim, Njemačka).

#### **Plazmidi izvan setova:**

pcDNA-EGFP (Addgene)

#### **Enzimi i pridruženi puferi:**

BsaI (New England Biolabs, Ipswich, SAD); T4 DNA ligaza i T4 DNA pufera (New England Biolabs); Plasmid Safe nuclease (Illumina, Eindhoven, Nizozemska); Esp3I (Thermo Fisher Scientific); JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka); Herculase II Fusion DNA Polymerase i 5x Herculase II Reaction Buffer (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD); T7E1 (New England Biolabs), NEBuffer 2 (New England Biolabs).

#### **Boje i DNA standardi:**

6x Loading Dye (Thermo Fisher Scientific); EtBr; MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific).

#### **Ostale kemikalije, mediji i puferi:**

LB medij (10 g/L ekstrakt kvasca, 5 g/L triptozni pepton, 10 g/L NaCl); 100% glicerol; TAE pufer (1 mM Tris, 1 mM octena kiselina, 1 mM EDTA pH 8.0); 1x fosfatni pufer (PBS); DMEM medij (Lonza, Basel, Switzerland); Gibco® FBS (Thermo Fischer Scientific); penicilin/streptomycin (Lonza); L-glutamin (Lonza); tripsin (Sigma-Aldrich).

Korišteni su bakterijski soj *E. coli* XL10-Gold i stanična linija HepG2.

### Početnice:

pCR_F1	ttgatgcctggcagttccct
pCR_F2	cgaaccgaacaggcttatgt
TAL_F1	ttggcgtcggcaaacagtgg
TAL_R2	ggcgacgaggtggtcgttgg
HNF1A_T7E1_FW	ccctcacagagccagcactg
HNF1A_T7E1_RE	gccctcctcttctgccaag

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Konstrukcija TALEN-a metodom Golden Gate kloniranja

Konstrukcija TALEN heterodimernog para provedena je prema radu Cermak i sur. (2011) i pomoću seta Golden Gate TALEN und TAL effector kit 2.0. Prema protokolu konstrukcija TALEN-a traje pet dana. U Golden Gate reakcijama koriste se BsaI i Esp3I, restriksijske endonukleaze tipa II koje omogućuju spajanje više TALE modula u točno određenom redosljedju. Proces konstrukcije uključuje dva koraka: 1) spajanje ponavljajućih modula s specifičnim RVD-om u intermedijarne vektore (pFUS) i 2) povezivanje intermedijarnih konstrukta u destinacijski vektor što rezultira TALEN konstruktom s konačnim brojem od 16 modula.

**1. dan:** Dizajn TALEN modula za ciljno mjesto unutar HNF1A i prva Golden Gate reakcija

Odabrana je TALEN ciljna sekvenca u programu Mojo Hand (Neff i sur. 2013) i konstruirana je shema modul plazmida za prvu Golden Gate reakciju (Tablica 1. i Tablica 2.). Pomoću modula NI, NG, NN, HD koji pokazuju najjači afinitet vezanja baza A, T, G, C dizajniran je niz od 16 TALE modula koji odgovara odabranoj sekvenci za lijevi i za desni TALEN. TALEN konstrukt koji prepoznaje sekvencu na DNA lancu kalupu u smjeru 5'→3', tj. uzvodno od mjesta ureza FokI nukleaze, nazvan je lijevi TALEN. TALEN konstrukt koji se veže na DNA sekvencu u smjeru 5'→3' na reverznom komplementu nazvan je desni TALEN. Za TALEN dužine 16 modula s 16 RVD ponavljanja potrebna su dva intermedijarna vektora: pFUS\_A2A i pFUS\_B6. Modul ponavljanje za prvu bazu T nije uključeno u konstrukcijski niz RVD modula već je uključeno u destinacijske plazmide finalnog konstrukta (Cermak i sur. 2011).

**Tablica 1.** Redosljed intermedijarnih i modul vektora lijevog TALEN-a za prvu Golden Gate reakciju (dvije reakcije za lijevi TALEN).

**Modul vektori**

Intermedijarni vektor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pFUS_A2A	pNN1	pNN2	pHD3	pHD4	pHD5	pNG6	pNN7	pNG8	pNN9	pNN10
pFUS_B6	pHD1	pNI2	pNN3	pHD4	pHD5	+pLR(NN)				

**Tablica 2.** Redosljed intermedijarnih i modul vektora desnog TALEN-a za prvu Golden Gate reakciju (dvije reakcije za desni TALEN).

**Modul vektori**

Intermedijarni vektor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pFUS_A2A	pHD1	pNG2	pNN3	pHD4	pNI5	pNN6	pHD7	pNG8	pNN9	pNN10
pFUS_B6	pHD1	pNG2	pHD3	pNI4	pNN5	+ pLR(NG)				

Postavljena je zasebna reakcija za svaki intermedijarni vektor i njemu pripadajuće modul vektore. U jednu Golden Gate reakciju dodano je 75 ng intermedijarnog vektora (pFUS), 75 ng svakog modul vektora, 0,5  $\mu$ L BsaI, 0,5  $\mu$ L T4 DNA ligaze i 1  $\mu$ L T4 DNA ligaznog pufera u 10  $\mu$ L ukupnog volumena reakcije. Reakcija je inkubirana kroz 10 ciklusa 5 min na 37°C i 10 min na 16°C, zatim 5 min na 50°C i 5 min na 80°C. Nakon digestije i ligacije u svaku Golden Gate reakciju dodano je 0,5  $\mu$ L 10 mM ATP i 0,5  $\mu$ L Plasmid Safe nukleaze. Smjesa je inkubirana 60 min na 37°C, bez koraka inaktivacije enzima. Sve reakcijske smjese inkubirane su u uređaju Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Dobivenom smjesom prve Golden Gate reakcije transformirane su kemijski kompetentne bakterije (XL10-Gold), pobliže opisano u poglavlju 3.2.1.1. Bakterije su nasadene na agarozne ploče s antibiotikom spektinomycinom konačne koncentracije 50  $\mu$ L/mL (Spec<sup>50</sup>). Nasadene ploče su inkubirane na 37°C.

**2. dan:** PCR na bakterijskim kolonijama, elektroforeza i postavljanje bakterijske prekončne kulture pozitivnih klonova s intermedijarnim konstruktom

Sa svake ploče na kojoj su bakterije porasle preko noći nasumično su odabrane tri bakterijske kolonije. Za provjeru intermedijarnog konstrukta metodom PCR na bakterijskim

kolonijama uzeto je pola bakterijske kolonije za svaki bakterijski klon te je otopljeno u PCR reakcijskoj smjesi. U ukupnom volumenu od 25  $\mu$ L PCR reakcije sadržano je 12,5  $\mu$ L JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix te 1  $\mu$ L svake početnice: pCR8-F1 i pCR8-R1. Reakcija je inkubirana 2 min i 30 s na 95°C, zatim kroz 35 ciklusa 30 s na 94°C, 30 s na 55°C i 1 min i 15 s na 72°C te u završnom koraku 5 min na 72°C. Tijekom PCR provjere bakterijske ploče vraćene su u inkubator na 37°C. Na 1% agarozni gel nanoseno je 5  $\mu$ L markera MassRuler DNA Ladder Mix s 1  $\mu$ L 6x pufera za nanošenje uzoraka na gel (6x Loading Dye) i 10  $\mu$ L svake PCR reakcije. Prema rezultatima gel elektroforeze odabrani su pozitivni bakterijski klonovi i nasadene su bakterijske prekončne kulture sa spektinomycinom konačne koncentracije 50  $\mu$ g/mL (poglavlje 3.2.1.1). Bakterijske prekončne kulture su inkubirane u termostatskoj tresilicu na 37°C i 900 rpm.

### **3. dan:** Izolacija plazmidne DNA i druga Golden Gate reakcija

Iz prekončne bakterijske kulture uzeto je 2 mL i provedena je izolacija plazmidne DNA pomoću seta QIAprep Mini Prep Kit prema protokolu proizvođača. Koncentracija DNA izmjerena je u alikvotu od 2  $\mu$ L uređajem NanoVue (GE Healthcare Bio-Science AB).

Sljedeći korak bio je povezivanje intermedijarnih konstrukata zajedno sa zadnjim ponavljanjem u destinacijski plazmidni vektor. Pripremljene su reakcijske smjese druge Golden Gate reakcije zasebno za lijevi i desni TALEN. U reakcijsku smjesu ukupnog volumena od 20  $\mu$ L dodano je: 150 ng svakog vektora s intermedijarnim konstruktom za lijevi ili desni TALEN, 150 ng odgovarajućeg plazmidnog vektora za zadnje modul ponavljanje lijevog (pLR(NG)) i desnog TALEN-a (pLR(NN)), 75 ng destinacijskog vektora pCAG-T7-TALEN(Sangamo)FokI-KKR za desni TALEN ili pCAG-T7-TALEN(Sangamo)FokI-ELD za lijevi TALEN, 1  $\mu$ L Esp3I, 1  $\mu$ L T4 DNA ligaze i 2  $\mu$ L T4 DNA ligaznog pufera (**Tablica 3.**). Reakcija je inkubirana kroz 10 ciklusa 10 min na 37°C i 15 min na 16°C, zatim 15 min na 37°C i 5 min na 80°C. Kemijski kompetentne bakterije transformirane su kao i prvog dana (poglavlje 3.2.1.1) i nasadene na agarozne ploče s ampicilinom konačne koncentracije 100  $\mu$ L/mL (Amp<sup>100</sup>). Nasadene ploče su inkubirane na 37°C.

**4. dan:** PCR na bakterijskim kolonijama, elektroforeza i postavljanje bakterijske prekončne kulture pozitivnih klonova s konačnim TALEN konstruktom

Provjera pozitivnih klonova koji sadrže destinacijski vektor s finalnim TALEN konstruktom napravljena je metodom PCR na bakterijskim kolonijama, kao i drugog dana. U 25  $\mu\text{L}$  ukupnog volumena dodano je 12,5  $\mu\text{L}$  JumpStart<sup>TM</sup> REDTaq® ReadyMix<sup>TM</sup> Reaction Mix i 1  $\mu\text{L}$  svake početnice: TAL\_F1 i TAL\_R2. Reakcija je inkubirana 2 min i 30 s na 95°C, zatim kroz 32 ciklusa 30 s na 94°C, 30 s na 55°C i 3 min na 72°C te u završnom koraku 5 min na 72°C. Elektroforeza u 1% agaroznom gelu provedena je kao i drugog dana. Od pozitivnih klonova nasadene su prekonoćne kulture s ampicilinom konačne koncentracije 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (poglavlje 3.2.1.1). Nasadene prekonoćne kulture su inkubirane u termostatskoj tresilicu na 37°C i 900 rpm.

#### **5. dan: Izolacija plazmidne DNA**

Plazmidna DNA je izolirana komercijalno dostupnim setom QIAprep Mini Prep Kit, kao i trećeg dana. Izmjerena je koncentracija izoliranog destinacijskih plazmida s TALEN konstruktom. Pripremljen je glicerolski „stock“ prema postupku u poglavlju 3.2.1.2.

#### **3.2.1.1 Transformacija kemijski kompetentnih bakterija (XL10-Gold) „heat shock“ postupkom**

Iz dubokog zamrzavanja na -80°C izvađena je suspenzija bakterija i otopljena na ledu. Transformacija se provodi u bakterijskom kabinetu uz plamenik. U 50  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije dodano je 5  $\mu\text{L}$  prve Golden Gate reakcije te je inkubirana na ledu 15 min. Nakon toga proveden je „heat shock“ postupak. Bakterije su prebačene 30 s na 42°C, zatim ponovo 1 minutu na led. Slijedi brzo razrjeđivanje s 500  $\mu\text{L}$  LB medija prethodno zagrijanog na 37°C te oporavak bakterija u termostatskoj tresilici kroz 60 min na 37°C i 900 rpm. Nakon inkubacije nasadeno je 50  $\mu\text{L}$  i 200  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije na 37°C zagrijane agarozne ploče s odgovarajućim antibiotikom što ovisi o koraku Golden Gate kloniranja. Nasadene ploče su inkubirane na 37°C preko noći.

### **3.2.1.2 Priprava bakterijske prekonočne kulture i pohrana u obliku glicerolskog „stock“-a**

Prije postupka nasadivanja LB medij je zagrijan na 37°C. Postupak pripreve prekonočne kulture provodi se u bakterijskom kabinetu uz plamenik. U sterilne epruvete dodano je 3 mL LB medija i odgovarajući antibiotik u omjeru 1:1000. U prekonočnu kulturu drugog dana dodano je 3 µL „stock“ otopine 50 mg/mL spektinomicina, a četvrtog dana 3 µL 100 mg/mL ampicilina. Sterilnom čačalicom uzet je uzorak bakterijske kolonije odabranih pozitivnih klonova i ubačen u epruvetu. Za inkubaciju prekonočnih kultura korištena je termostatska tresilica Controlled Environment Incubator Shaker Series 25 (New Brunswick Scientific). Epruvete su inkubirane na 37°C i 900 rpm preko noći (12-16 h). Nakon izolacije plazmidne DNA petog dana, ostatak bakterijske kulture iskorišten je za pripravu glicerolskog „stocka“. Od preostalog volumena uzeto je 500 µL bakterijske suspenzije i razrijeđeno s 500 µL 100% glicerola. Epruvete su zatim uronjene u tekući dušik na -196°C i pospremljene u zamrzivač na -80°C.

## **3.2.2 Priprema HepG2 stanične kulture za transfekciju**

### **3.2.2.1 Odmrzavanje HepG2 stanica**

Tubica s otopinom stanica i medija s DMSO izvađena je sa -80°C na led. Svi koraci pripreme HepG2 stanične kulture za transfekciju provedeni su u kabinetu za sterilni rad. Postupak odmrzavanja provodio se na ledu i prethodno ohlađenoj centrifugi na 4°C. Za održavanje HepG2 stanica korišten je DMEM medij (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM*) suplementiran s 10% fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum – FBS*), 1,2% antibiotika penicilina (100 U/ml) (Pen) i streptomocina (100 µg/mL) (Strep) i 2% L-glutamina (L-Glu). FBS je supernatant zaostao nakon koagulacije proteina krvi te sadrži hormone, faktore rasta, šećere, aminokiseline i lipide potrebne za rast i metabolizam stanica. L-glutamin potiče brži rast stanica, a u medij se dodaje naknadno zbog svoje nestabilnosti pri fiziološkoj pH vrijednosti. Kad je otopina stanica i medija bila blizu potpunog odmrzavanja prebačena je u prethodno ohlađenu tubicu. Nakon potpunog odmrzavanja otopine stanica i medija dodaje se kap po kap 10 mL DMEM medija (s FBS, Pen/Strep i L-Glu) ohlađenog na ledu. Stanice su centrifugirane 5 min na 300 x g. Nakon centrifugiranja uklonjen je



supernatant, a stanice su resuspendirane u 10 mL DMEM medija (s FBS, Pen/Strep, L-Glu) zagrijanog na sobnu temperaturu. Otopina stanica i medija prebačena je u veliku bočicu za uzgoj stanica (T-175). U bočicu je dodano još 20 mL DMEM medija (s FBS, Pen/Strep, L-Glu) zagrijanog na sobnu temperaturu. Za sve korake inkubacije HepG2 stanica korišten je inkubator HeraCell Incubator (Thermo Heraeus). Stanice su inkubirane na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2.2 Presađivanje i održavanje HepG2 stanica

Prije svakog presađivanja procijenjena je konfluentnost HepG2 stanica pod invertnim svjetlosnim mikroskopom. Ukupan broj stanica izračunat je prema procijenjenoj konfluentnosti i podacima iz tablice (Invitrogen) o prosječnom broju stanica, površini i volumenu za određeno laboratorijsko posuđe za staničnu kulturu.

Za presađivanje i održavanja HepG2 stanica pripravljeni su: DMEM medija (s FBS, Pen/Strep, L-Glu), otopina 1x fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffered saline* – *PBS*) i otopina tripsina, zagrijani na sobnu temperaturu. Kad su stanice nasađene u bočici dostigle konfluentnost od 100% provedeno je prvo presađivanje u petrijevke (R=100 mm). Nasađeno je  $2,2 \times 10^6$  stanica, razrjeđenja 8,9x. Uklonjen je medij sa stanica i stanice su dvaput isprane s 5 mL 1x PBS. Nakon uklanjanja 1x PBS dodano je 5 mL tripsina, te su stanice inkubirane 5 min na 37°C u atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>. Nakon inkubacije flask je protresen laganim bočnim udarcima sve dok se stanice nisu odvojile od podloge. Dodano je 5 mL DMEM medija (s FBS, Pen/Strep, L-Glu) i otopina je dobro resuspendirana pipetom. Dodano je 1,1 mL resuspendirane otopine stanica u 8,9 mL medija. Petrijevka sa stanicama pospremljena je u inkubator na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>.

Kad su HepG2 stanice nasađene u petrijevku (R=100 mm) dostigle konfluentnost 80-100% presađene su u petrijevke (R=100 mm). U nove petrijevke nasađeno je  $0,99 \times 10^6$  stanica, razrjeđenja 8x. Uklonjen je medij sa stanica i stanice su dvaput isprane s 3 mL 1x PBS. Nakon uklanjanja 1x PBS dodano je 3 mL tripsina, te su stanice inkubirane 5 min na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>. Nakon inkubacije dodano je 2 mL DMEM medija (s FBS, Pen/Strep, L-Glu) i dobro resuspendirano. Dodano je 0,6 mL resuspendirane otopine stanica u 9,4 mL medija. Petrijevka sa stanicama pospremljena je u inkubator na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>.

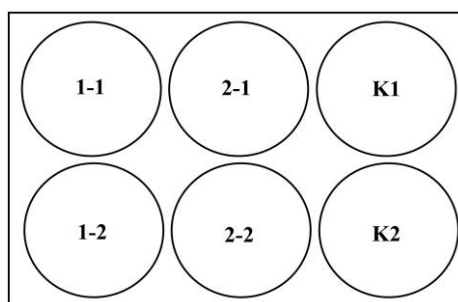
### 3.2.2.3 Nasađivanje HepG2 stanica za transfekciju

Nakon potpunog oporavka HepG2 stanica od zamrzavanja i ustaljivanja vremena inkubacije potrebnog za dostizanje potpune konfluentnosti nasađene su HepG2 stanice za transfekciju. Za potrebe transfekcije stanice su presađene iz petrijevki (R=100 mm) na pločice sa šest bazenčića. Postupak ispiranja i tripsinizacije stanica isti je kao i kod presađivanja iz petrijevke u petrijevku. Na pločice je nasađeno  $0,128 \times 10^6$  stanica u 2 mL medija po bazenčiću. Nasađivanje HepG2 stanica za potrebe dvije transfekcije provedeno je s istim brojem nasađenih stanica.

### 3.2.3 Transfekcije HepG2 stanica

Prva i druga serija transfekcije provedene su prema sažetim uputama Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 Reagent Protocol dostupnim uz set Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 Reagent Transfection Reagent.

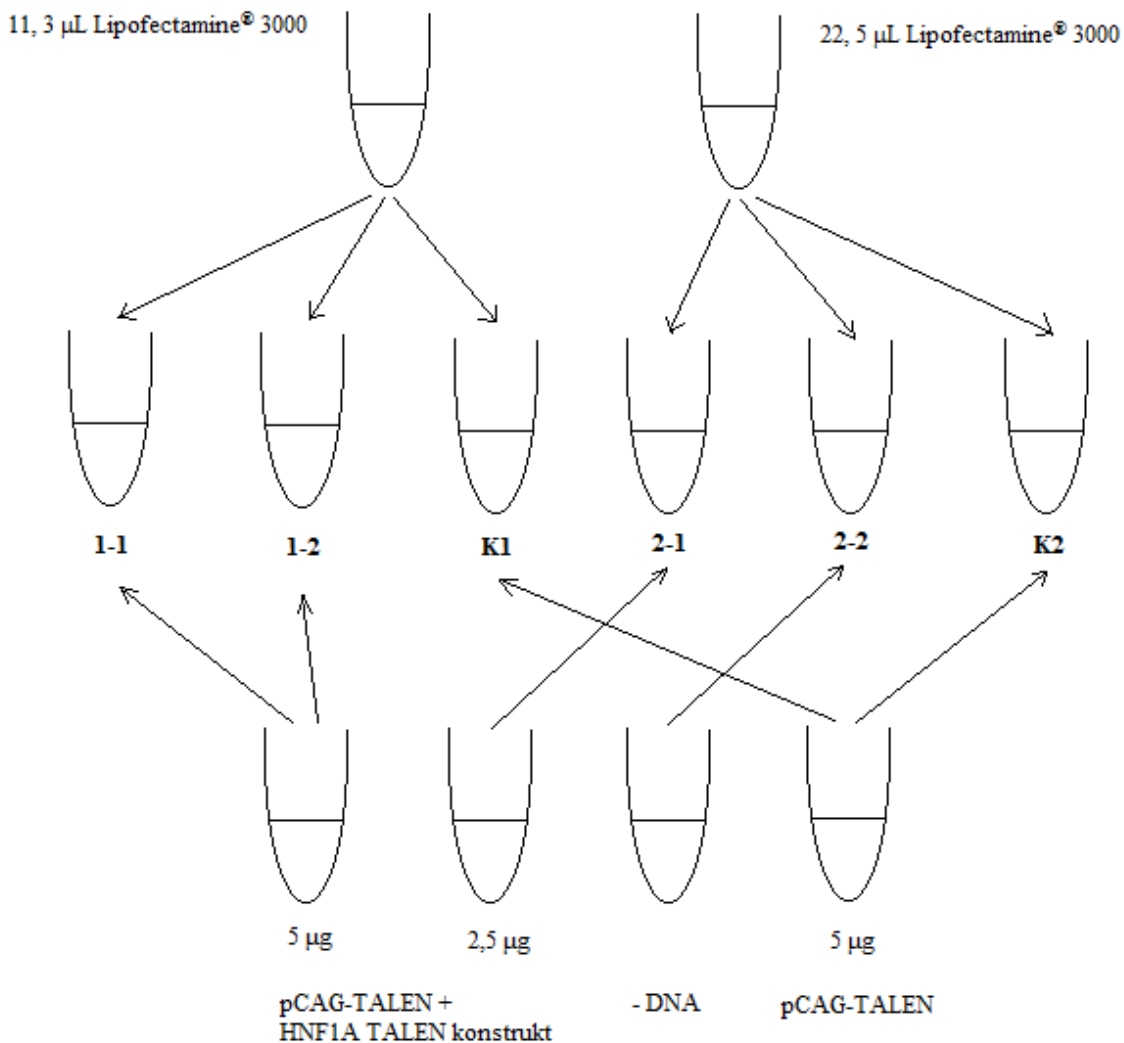
U oba slučaja transfekciji HepG2 stanica pristupilo se kad su stanice u bazenčićima dostigle preporučenu konfluentnost od oko 80%. Za obje transfekcije konstruirana je shema prema kojoj se transfekcija stanica provodi s dva različita volumena lipofektamina. Prva transfekcija provedena je s 2,5 µg DNA TALEN konstrukta i 2,5 µg praznog destinacijskog plazmida po bazenčiću. Zbog organizacije prostora na pločici svakom bazenčiću je pripisana oznaka s obzirom na volumen Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 (oznaka 1- ili 2-) i red na ploči kojem pripada bazenčić (1 ili 2), znači: 1-1, 1-2, 2-1, 2-2 (Slika 11.). Dva bazenčića označena su K1 i K2 jer je pozitivna kontrola transfekcije također provedena s dva volumena Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa. U drugoj transfekciji transfecirano je 2,5 µg pcDNA-EGFP plazmidne DNA. Oznake bazenčića na položici pripisane su kao i kod prve transfekcije (Slika 11.).



**Slika 11. Ploča s šest bazenčića i pripadajućim oznakama: 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, K1, K2.**

### 3.2.3.1 Prva transfekcija HepG2 stanica

Nakon konstrukcije sheme transfekcije pristupila sam pripremi transfekcijske reakcije. Svi koraci pripreme transfekcijske reakcije provedeni su na ledu u kabinetu za sterilni rad. Za potrebe transfekcije pripravljen je DMEM medij suplementiran s 2% L-Glu. Prvi korak bio je razrjeđenje Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa prema preporučenim volumenima. Pripremljene su dvije tubice s 11,3  $\mu\text{L}$  i 22,5  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa razrijeđenog s 375  $\mu\text{L}$  DMEM medija (s L-Glu). Drugi korak bio je priprema DNA razrjeđenja. DNA smjese od 5  $\mu\text{g}$  plazmida s lijevim i desnim TALEN konstruktom za HNF1A i 5  $\mu\text{g}$  pCAG-TALEN(Sangamo)FokI-ELD i KKR razrijeđene su prema protokolu s 250  $\mu\text{L}$  DMEM medija (s L-Glu) i 2  $\mu\text{L}/\mu\text{g}$  DNA P3000<sup>™</sup> reagensa. U istim omjerima razrjeđenja pripravljene su još dvije smjese: jedna s 2,5  $\mu\text{g}$  plazmida s lijevim i desnim TALEN konstruktom za HNF1A i druga smjesa medija i 2  $\mu\text{L}/\mu\text{g}$  DNA P3000<sup>™</sup> reagensa bez DNA. Treći korak je formiranje DNA/lipidnog kompleksa u reakcijskoj smjesi za transfekciju. Dodano je po 125  $\mu\text{L}$  razrijeđenog Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa u šest tubica te pomiješano s odgovarajućom razrijeđenom DNA u omjeru 1:1. Reakcijska smjesa za transfekciju je inkubirana pri sobnoj temperaturi 5 minuta. Postupak pripreme reakcijske smjese za transfekciju pojašnjen je na slici (Slika 12.).



**Slika 12. Shematski prikaz pripreme reakcijske smjese za transfekciju. U prvom koraku (1) razrjeđuju se dva volumena (11,3 i 22,5 µL) Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa. U drugom koraku (2) priprema se razrjeđenje DNA u tri kombinacije: pCAG-TALEN(Sangamo)FokI s HNF1A TALEN konstruktom, pCAG-TALEN(Sangamo)FokI bez konstrukta i smjesa bez DNA. Treći korak je dodavanje razrijeđenog Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa i razrijeđene DNA u omjeru 1:1. Redoslijed reakcijskih smjesi za transfekciju odgovara oznakama bazenčića na ploči.**

Iz bazenčića s HepG2 stanicama isisan je medij. Stanice su isprane s 2 mL PBS-a, te je potom dodano po 2 mL DMEM medija (s L-Glu). U svaki bazenčić dodano je ukupno 250 µL odgovarajuće reakcijske smjese za transfekciju dobivene nakon trećeg koraka pripreme.

Ukupan volumen od 3,75  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa dodan je u bazenčiče 1-1, 1-2, K1 te 7,5  $\mu\text{L}$  u bazenčiče 2-1, 2-2, K2. Na HepG stanice u bazenčičima 1-1, 1-2, 2-1 dodano je po 2,5  $\mu\text{L}$  DNA destinacijskog plazmida s HNF1A TALEN konstruktom, u K1 i K2 bazenčiče 2,5  $\mu\text{L}$  destinacijskog plazmida pCAG-TALEN(Sangamo)FokI-ELD bez konstrukta, a u bazenčić 2-2 nije dodana DNA. Nakon transfekcije stanica ploča s bazenčičima pospremljena je u inkubator na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.2.3.2 Izolacija genomske DNA iz HepG2 stanica prve transfekcije**

Treći dan nakon transfekcije provedena je izolacija ukupne genomske DNA HepG2 stanica pomoću seta DNeasy Blood and Tissue Kit i protokola DNeasy Blood and Tissue Handbook za izolaciju DNA iz stanica u kulturi. Izolacija je provedena u sterilnim uvjetima u laminarnu stanične kulture. Uklonjen je medij iz bazenčića i stanice su dva puta isprane s 4 mL 1x PBS. Dodano je 0,5 mL tripsina i stanice su inkubirane 5 min na 37°C. Dodano je 0,5 mL DMEM medija (s FBS, Pen/Strep, L-Glu) za inaktivaciju tripsina. Ukupna smjesa stanica i medija prebačena je u tubice od 1,5 mL i centrifugirana na 5 min pri 300 x g. Nakon centrifugiranja uklonjen je supernatant i od ovog koraka postupak izolacije DNA proveden je prema uputama u gore navedenom protokolu. Nakon izolacije izmjerena je koncentracija svih uzoraka i pospremljeni su na -20 °C.

### **3.2.3.3 Druga transfekcija HepG2 stanica**

Svi koraci pripreme transfekcijske reakcije provedeni su na ledu u kabinetu za sterilni rad. Priprema transfekcijske reakcije provedena je u tri koraka kao i kod prve transfekcije, uz male izmjene drugog i trećeg koraka pripreme. Prvi korak razrjeđenja Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa proveden je kao i kod prve transfekcije. Drugi korak bio je priprema DNA razrjeđenja. Pripremljene su dvije tubice sa smjesom 5  $\mu\text{g}$  pcDNA-EGFP plazmida razrijeđenog s 250  $\mu\text{L}$  DMEM medija (s L-Glu) i 2  $\mu\text{L}/\mu\text{g}$  DNA P3000<sup>TM</sup> reagensa. Treća smjesa pripremljena je u istim omjerima bez plazmidne DNA i služila je kao negativna kontrola transfekcije. Treći korak je formiranje DNA/lipidnog kompleksa. Dodano je po 125  $\mu\text{L}$  razrijeđenog Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa u šest tubica te pomiješano s razrijeđenom DNA u omjeru 1:1. Reakcijska smjesa za transfekciju inkubirana je pri sobnoj temperaturi 5

minuta. Postupak pripreme reakcijske smjese za transfekciju shematski je pojašnjen na slici (Slika 12).

Ispiranje HepG2 stanica i promjena medija provedena je kao i kod prve transfekcije. U svaki bazenčić dodano je 250  $\mu$ L reakcijske smjese za transfekciju. Nakon transfekcije stanice su inkubirane na 37°C u atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>. Ukupan volumen od 3,75  $\mu$ L Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa dodan je u bazenčiće 1-1, 1-2, K1 te 7,5  $\mu$ L u bazenčiće 2-1, 2-2, K2. Na HepG2 stanice u bazenčićima 1-1, 1-2, 2-1, 2-2 dodano je po 2,5  $\mu$ L plazmida, dok su K1 i K2 bazenčići negativna kontrola transfekcije.

#### **3.2.3.4 Fluorescencijsko mikroskopiranje HepG2 stanica nakon druge transfekcije**

Prvi dan nakon druge transfekcije provedeno je kontrolno mikroskopiranje transfeciranih HepG2 stanica pod invertnim fluorescencijskim mikroskopom Axiovert 40 CFL (Zeiss) sa živinom lampom HBO 50 (Zeiss). Mikroskopiran je samo prvi red na pločici, to su bazenčići 1-1, 2-1, K1. Bazenčić po bazenčić pretražen je svjetlosnom pa zatim fluorescencijskom mikroskopijom. Kod fluorescencijske mikroskopije UV svjetlo živine lampe prolazi kroz ekscitacijski filter koji propušta valne duljine od 450 do 490 nm te obuhvaća područje ekscitacijskog maksimuma proteina EGFP oko 488 nm (plavo). Fluorescencija proteina EGFP je detektirana kroz filter koji propušta samo valne duljine iznad 515 nm što obuhvaća područje desno od emisijskog maksimuma proteina EGFP koji je na 509 nm (zeleno). Monokromatskom kamerom AxioCam MRm (Zeiss) su zabilježene slike reprezentativnih područja u bazenčiću sa stanicama u kojima je detektiran zeleni fluorescencijski produkt EGFP.

Treći dan, do 72 h nakon druge transfekcije HepG2 stanica pod fluorescencijskim mikroskopom pretraženi su svi bazenčići na pločici. Monokromatskom kamerom su zabilježene slike u tri različita vidna polja za svaki bazenčić tijekom svjetlosne te fluorescencijske mikroskopije HepG2 stanica.

### 3.2.4 T7E1 test

T7E1 test je proveden prema radu Xu i sur. (2013). Protokol sam podijelila na dva koraka koje je potrebno zasebno optimizirati. U prvom koraku T7E1 testa provedena je optimizacija PCR-a genomske DNA, elektroforeza i pročišćavanje PCR produkta ciljne sekvence gena HNF1A. U drugom koraku pročišćena DNA je denaturirana i nakon toga ponovno sparena u uvjetima sporog hlađenja. Zatim je provedena digestija s T7 endonukleazom 1 i elektroforeza uzoraka nakon digestije.

#### 3.2.4.1 Umnažanje, elektroforeza i pročišćavanje PCR produkta ciljne sekvence gena HNF1A

PCR smjesa pripravljena je prema protokolu proizvođača uz polimerazu Herculase II Fusion DNA Polymerase. Iz uzoraka genomske DNA koji su dobiveni nakon postupka opisanog u poglavlju 3.2.3.2, pripravljeno je razrjeđenje koncentracije 200 ng/uL. U PCR reakciju ukupnog volumena 50  $\mu$ L dodano je 200 ng genomske DNA, 1  $\mu$ L polimeraze Herculase II Fusion DNA Polymerase, 10  $\mu$ L pufera 5x Herculase II Reaction Buffer, zatim 1,25  $\mu$ L svake početnice (HNF1A\_T7E1\_FW i HNF1A\_T7E1\_RE) i 2,5 mM dNTP mixa. Reakcija je inkubirana prema sljedećem PCR programu: 95°C/ 2 min, 30 ciklusa (denaturacija na 95°C/ 20 s, vezanje početnica na 67°C/20 s, elongacija na 72 °C/ 1 min 55 s), zatim na 72°C/2 min i 4°C/ $\infty$ . Nakon inkubacije provedena je kontrolna elektroforeza dobivenog PCR produkta. Po 5  $\mu$ L PCR uzorka pomiješano je s 1  $\mu$ L 6x Loading Dye i nanoseno je na 1,5% agarozni gel s etidijevim bromidom (EtBr) konačne koncentracije 0,5  $\mu$ g/mL. Elektroforeza je provedena u TAE puferu na prvih 10 min 4 V/cm i oko 30 min na 8 V/cm sve dok boja za praćenje (bromfenol plavo) ne prođe dvije trećine agaroznog gela. Vrpce DNA vizualizirane su fluorescencijom pod UV svjetlom.

Ostatak od 45  $\mu$ L PCR produkta pročišćen je pomoću seta High Pure PCR Cleanup Micro kit. Postupak je proveden prema priloženom protokolu bez izmjena. U zadnjem koraku pročišćavanja uzorak je eluiran u volumenu od 20  $\mu$ L. Izmjerena je koncentracija uzoraka na spektrofotometru NanoVue (GE Healthcare Bio-Science AB).

### 3.2.4.2 Digestija T7 endonukleazom 1

Pripremljena je reakcijska smjesa od 18  $\mu\text{L}$  pročišćenog PCR produkta i 2  $\mu\text{L}$  10x NEBuffer 2. Smjesa je denaturirana 10 min na 95°C i zatim podvrgnuta programu sporog hlađenja kroz 90 ciklusa (od 95°C do 59°C sa smanjenjem 0,4°C svakih 20 s), 90 ciklusa (od 59°C do 32°C sa smanjenjem 0,3°C svakih 20 s), zatim 20 ciklusa (od 32°C do 26°C sa smanjenjem 0,3°C svakih 20 s), te završni korak na 4°C  $\infty$ . Nakon inkubacije reakcijskoj smjesi je dodano 5U T7E1. Reakcija digestije je inkubirana na 45 min pri 37°C. Zatim je nanoseno 6  $\mu\text{L}$  smjese uzorka i 1  $\mu\text{L}$  6x Loading Dye na 2% agarozni gel s EtBr konačne koncentracije 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Elektroforeza je provedena u TAE puferu prvih 10 minuta na 4 V/cm i oko 30 min na 8 V/cm. Vrpce DNA vizualizirane su fluorescencijom pod UV svjetlom.



## 4 Rezultati

### 4.1. Konstrukcija TALEN-a za ciljno mjesto u genu HNF1A

Za konstrukciju TALEN para odabrano je ciljno mjesto unutar egzona 1, gena HNF1A (NCBI ID: 6927) smještenog na dužem kraku 12. kromosoma unutar lokusa 24.31. Pomoću programa Mojo Hand (Neff i sur. 2013) odabrana je sekvenca ciljnog mjesta tako da lijevi i desni TALEN prepoznaju sekvencu minimalne dužine 15 nt i ne dužu od 17 nt i da razmak između njih bude minimalno 15 nt i ne veći od 16 nt (Slika 13). Iz dizajniranog niza modula izuzeta je prva baza T jer ju prepoznaje ponavljanje TALEN-a uključeno u finalni destinacijski vektor pCAG-T7-TALEN(Sangamo)-FokI-ELD i pCAG-T7-TALEN(Sangamo)-FokI-KKR.

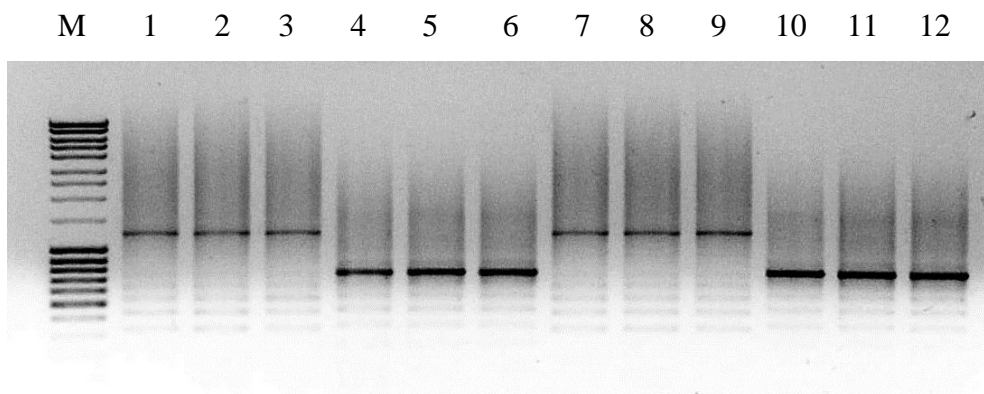
Lijevi TALEN		MJESTO UREZA		Desni TALEN	
NNHHHNNNHNHHN NDDDDGNGNNDINDDN					
5'-T	GGCCCTGTGGCAGCCG	AGCCATGGTTTCTAA		ACTGAGCCAGCTGCAGA-3'	
3'-ACCGGGACACCGTCGGC		TCGGTACCAAAGATT		TGACTCGGTCGACGTC-5'	
				NNNHNHNNHNHNNH GNIDGDNNGDNINDGD	

NI→A; NG→T; NN→G; HD→C

Slika 13. Odabrano ciljno mjesto unutar gena HNF1A za lijevi i desni TALEN. Sekvenca na lancu kalupu (lijevi stupac) je mjesto vezanja lijevog TALEN-a i iznad nje je niz od 16 modul ponavljanja koji ju prepoznaje u smjeru 5'→3'. Sekvenca reverznog komplementa (desni stupac) je mjesto vezanja desnog TALEN-a i ispod nje je niz od 16 modul ponavljanja koji ju prepoznaje u smjeru 5'→3'. Na središnjem dijelu (srednji stupac) FokI podjedinice (ELD i KKR) dimeriziraju i stvaraju urez.

Nakon povezivanja odgovarajućih modula u intermedijarne vektore u prvoj Golden Gate reakciji dobivena su četiri konstrukta. Dva intermedijarna konstrukta sadrže deset i pet modula za lijevi TALEN, a također isti broj modula sadrže konstrukti za desni TALEN. Nakon transformacije bakterija produktom prve Golden Gate reakcije provedena je PCR reakcija s početnicama pCR8-F1 i pCR8-R1 za regiju s konstruktom monomernih

ponavljanja. Očekivana dužina konstrukata nakon prve Golden Gate reakcije potvrđena je elektroforezom PCR produkta u 1% agaroznom gelu i usporedbom s rezultatima grupe Cermak i sur. (2011) (Slika 14.). Na agaroznom gelu u stupcu s oznakom M vidljiv je ljestvičast uzorak DNA markera (Prilog 1.) prema kojemu možemo procijeniti veličinu umnoženog DNA fragmenta i usporediti ju s očekivanom veličinom konstrukta s modulima. U stupcima 1-3 i 7-9 identificirana je jače vidljiva DNA linija s deset modul ponavljanja veličine oko 1200 pb. U stupcima 4-6 i 10-12 identificirana je DNA linija s pet modul ponavljanja veličine oko 700 pb. U svim stupcima iznad glavne linije DNA konstrukta prisutan je razmazani uzorak i ispod glavne linije karakterističan ljestvičast uzorak DNA koji nastaje zbog prisutnosti manjih neispravnih konstrukata koji brže putuju u gelu.

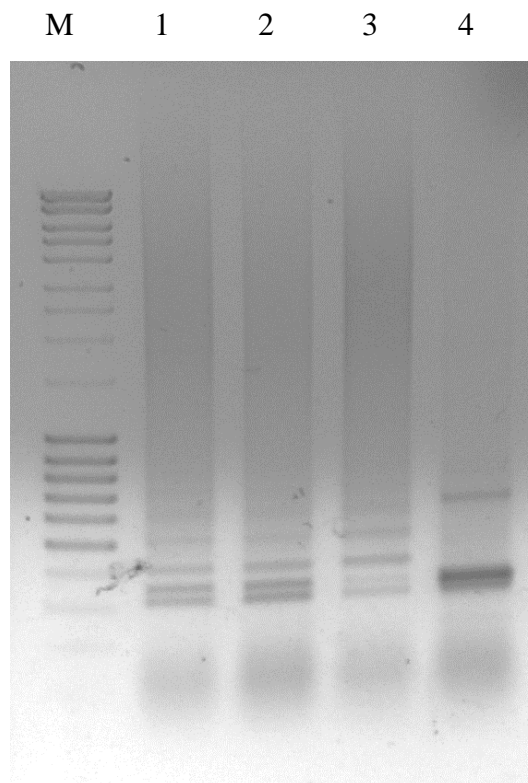


**Slika 14. Elektroforeza PCR produkata bakterijskih kolonija nakon prve Golden Gate reakcije u 1% agaroznom gelu. Na gelu je identificirana glavna DNA linija s ispravnim brojem monomera za sve bakterijske klonove DNA, razmazan uzorak i karakterističan ljestvičast uzorak. Bakterijski klonovi s ispravnim konstruktima za 10 monomernih ponavljanja nalaze se u stupcima 1, 2, 3, 7, 8, 9, a za 5 monomernih ponavljanja u stupcima 4, 5, 6, 10, 11, 12.**

Rezultati elektroforeze u 1% agaroznom gelu nakon prve Golden Gate reakcije pokazali su ispravan broj monomera u PCR produktima za sve bakterijske klonove, stoga je za prekonocnu kulturu odabran po jedan bakterijski klon za svaki konstrukta. Odabrani su bakterijski klonovi iz stupaca: 1, 4, 7 i 10.

Nakon druge Golden Gate reakcije i transformacija bakterija, četvrti dan provedena je PCR reakcija s početnicama za regiju s finalnim TALEN konstruktom ugrađenim u destinacijske vektore pCAG-T7-TALEN(Sangamo)FokI-KKR i destinacijske vektore pCAG-T7-TALEN(Sangamo)FokI-ELD. Destinacijski plazmid s finalnim konstruktom očekivane je

veličine od 2000 pb. Usporedbom elektroforeze PCR produkta s rezultatima prema radu Cermak i sur. (2011) i u protokolu proizvođača potvrđena je konstrukcija finalnog TALEN konstrukta za lijevi i desni TALEN. Na agaroznom gelu u stupcima 1, 2 i 3 vidljiv je karakterističan razmazani uzorak od 1500 pb prema gore. Oko 2000 pb izostala je očekivana linija, ali zbog prisutnosti intenzivnog razmazanog uzorka u tom području ispravnosti ovih bakterijskih klonova je potvrđena. U stupcu 4 izostao je razmazani i ljestvičast uzorak što pokazuje da ovaj bakterijski klon nije ispravan.



**Slika 15. Elektroforeza PCR produkata bakterijskih kolonija nakon prve Golden Gate reakcije u 1% agaroznom gelu. Na gelu je identificiran izrazit razmazani uzorak u području od 1500 pb prema gore i karakterističan ljestvičast uzorak od 600-300 pb. Bakterijski klonovi s ispravnim konstruktom za 16 monomernih ponavljanja u stupcima 1, 2, 3 i bakterijski klon s neispravnim konstruktom u stupcu 4.**

Rezultati elektroforeze u 1% agaroznom gelu nakon druge Golden Gate reakcije potvrdili su ispravan broj monomera u PCR produktima za 3 bakterijska klona, stoga su za prekonocnu kulturu odabrana dva bakterijska klona. Finalni konstrukt za lijevi i desni TALEN dobiven je peti dan izolacijom iz bakterijskih prekonocnih kultura. Dobivene su sljedeće

koncentracije:  $c(L\_TALEN) = 397,8 \text{ ng}/\mu\text{L}$  i  $c(R\_TALEN) = 358.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . Finalni konstrukt za lijevi i desni TALEN potvrđeni su sekvenciranjem (Prilog 2.).

## 4.2. Transfekcija HepG2 stanica

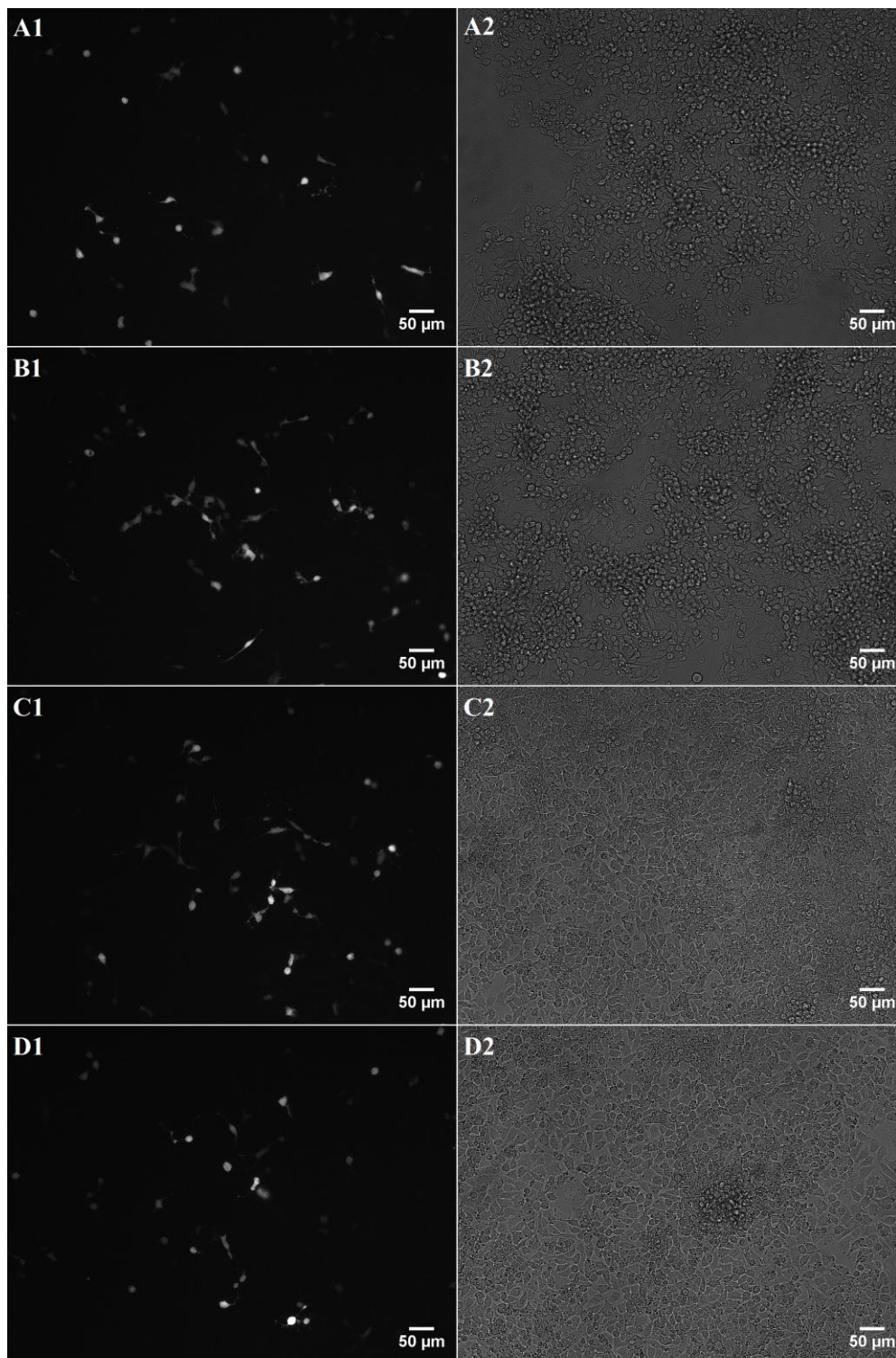
Treći dan nakon prve transfekcije, provedene s destinacijskim plazmidom pCAG-TALEN(Sangamo)FokI-ELD i KKR koji sadrže konstrukt za TALEN-e, HepG2 stanice su postigle konfluentnost od 100%. Uspješno je izolirana genomska DNA iz svakog bazenčića što potvrđuju srednje vrijednosti izmjerenih koncentracija (Tablica 3.).

**Tablica 3. Srednje vrijednosti koncentracije (ng/ $\mu$ L) genomske DNA izolirane nakon prve transfekcije HepG2 stanica.**

DNA	c (ng/ $\mu$ L)
1-1	335,3
1-2	334,8
2-1	447,0
2-2	380,0
K1	383,0
K2	382,0

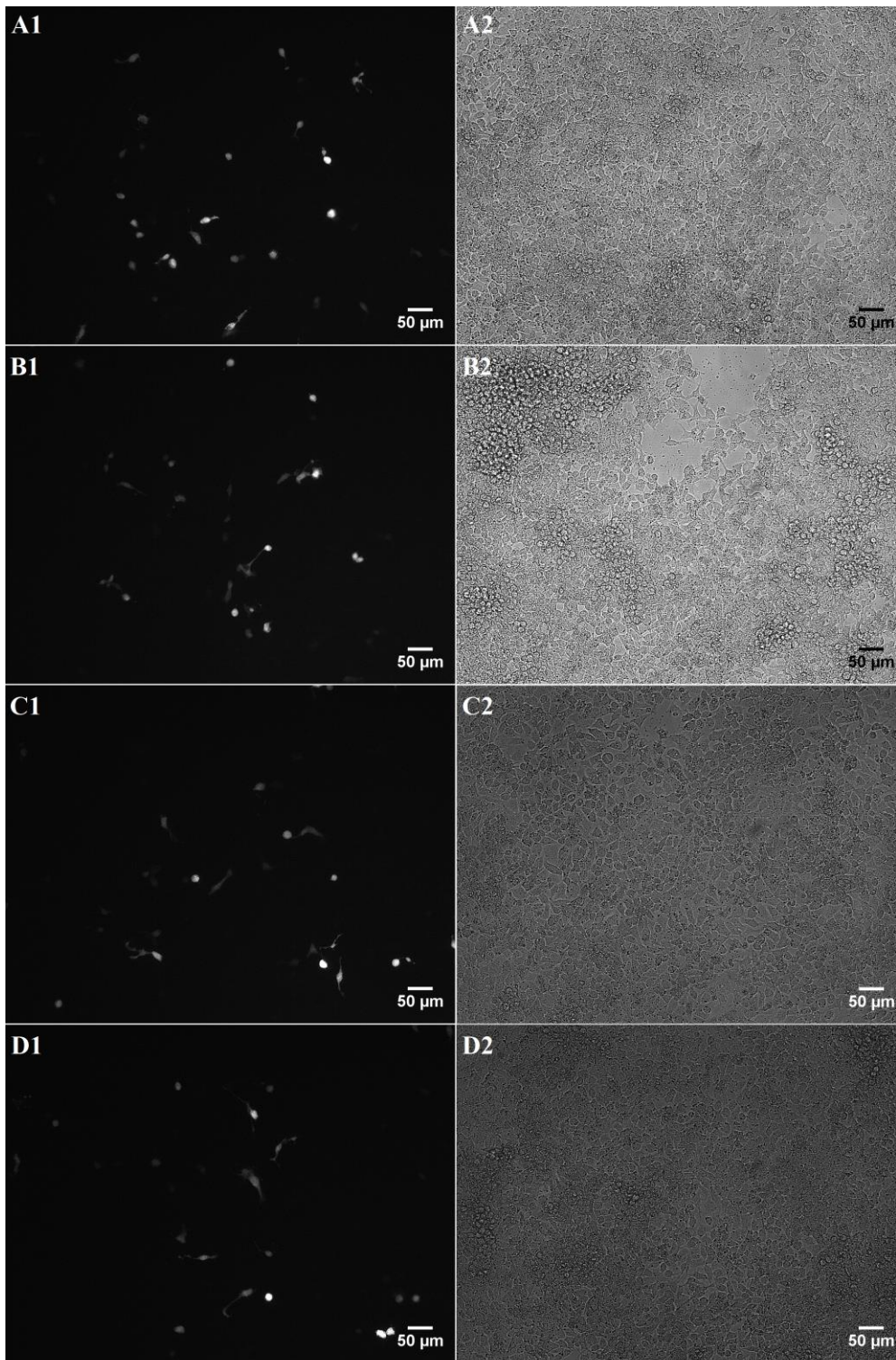
Prvi dan nakon druge transfekcije, provedene s plazmidom pcDNA-EGFP, HepG2 stanice su neznatno više konfluentne nego na dan transfekcije. Kontrolnim fluorescencijskim mikroskopiranjem samo stanica u bazenčićima 1-1, 1-2 i K1 utvrđeno je da neke stanice u bazenčićima 1-1 i 2-1 pokazuju vrlo mali intenzitet fluorescencije.

Treći dan nakon druge transfekcije provedeno je svjetlosno i fluorescencijsko mikroskopiranje HepG2 stanica u svim bazenčićima. Treći dan stanice su dostigle konfluentnost od 90-100%. Uočen je veći broj područja u bazenčićima gdje su stanice porasle u malim nakupinama i u više slojeva, ali je uočeno i nekoliko područja u bazenčićima s manjim brojem stanica i konfluentnošću oko 90%. Fluorescencijskim mikroskopiranjem utvrđeno je da neke stanice u bazenčićima 1-1, 1-2 (Slika 16. A1, B1, C1, D1) i 2-1, 2-2 (Slika 17. A1, B1, C1, D1) pokazuju srednji do jak intenzitet fluorescencije.



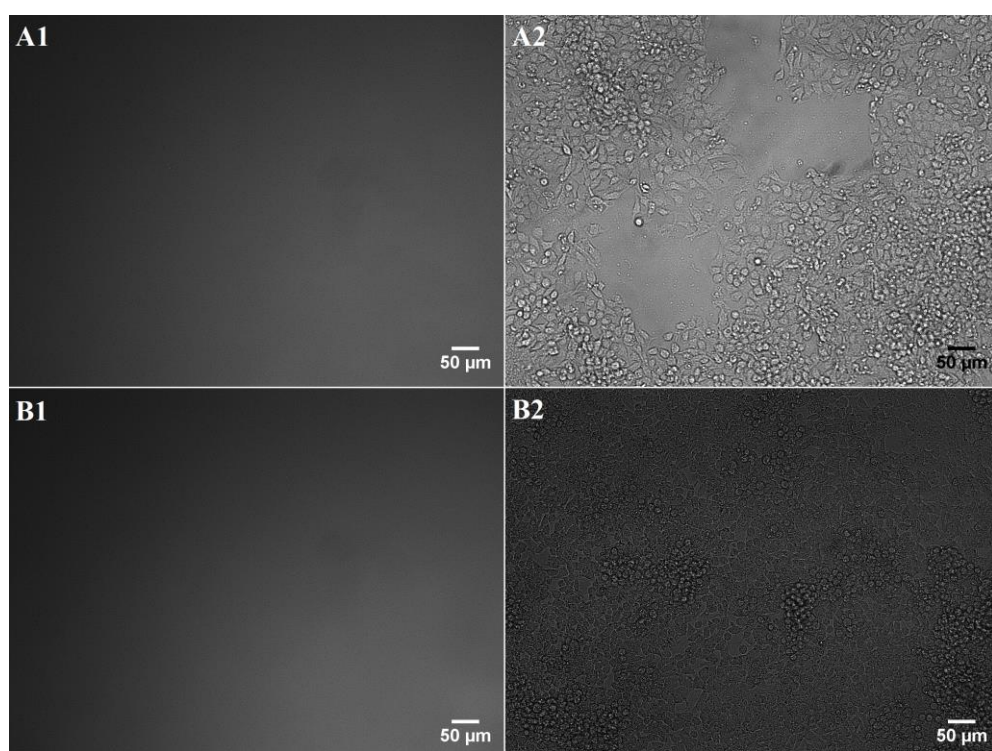
**Slika 16. Mikroskopske slike HepG2 stanica, transfeciranih s pcDNA-EGFP i 3,75 µL Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensu po bazečiću, dobivene fluorescencijskom (1) i svjetlosnom (2) mikroskopijom istog vidnog polja (povećanje 100x). Slike A(1,2) i B(1,2) prikazuju HepG2 stanice u bazečiću 1-1, a slike C(1,2) i D(1,2) u bazečiću 1-2.**





**Slika 17. Mikroskopske slike HepG2 stanica, transfeciranih s pcDNA-EGFP i 7,5 µL Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa po bazenčiću, dobivene fluorescencijskom (1) i svjetlosnom (2) mikroskopijom istog vidnog polja (povećanje 100x). Slike A (1, 2) i B (1, 2) prikazuju HepG2 stanice u bazenčiću 2-1, a slike C (1, 2) i D (1, 2) u bazenčiću 2-2.**

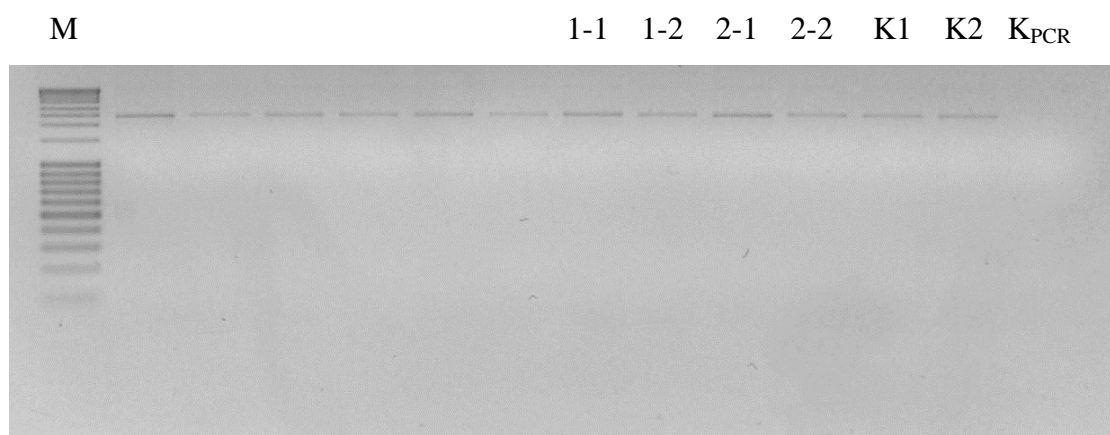
Usporedbom fluorescencijskog i svjetlosnog mikroskopiranja istog vidnog polja utvrđeno je da se veći broj stanica koje fluoresciraju nalazi u područjima s manjom konfluentnošću (Slika 16. i Slika 17.). Uočena je razlika u fluorescenciji između stanica koji su transfecirane s 3,75  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa u bazenčićima 1-1 i 1-2 od stanica transfeciranih s većim volumenom Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa u bazenčićima 2-1 i 2-2. U bazenčićima 1-1 (Slika 16. A1, B1) i 1-2 (Slika 16. C1, D1) utvrđen je veći broj fluorescentnih stanica nego u bazenčićima 2-1 (Slika 17. A1, B1) i 2-2 (Slika 16. C1, D1). U bazenčićima K1 i K2 koji su služili kao negativna kontrola (Slika 18. A1, B1) nije opažena fluorescencija.



**Slika 18. Mikroskopske slike HepG2 stanica, transfeciranih bez DNA s 3.75  $\mu\text{L}$  A (1 i 2) i 7,5  $\mu\text{L}$  B (1 i 2) Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa po bazenčiću, dobivene fluorescencijskom (1) i svjetlosnom (2) mikroskopijom istog vidnog polja (povećanje 100x).**

### 4.3. T7E1 test

Za provjeru aktivnosti TALEN-a u HepG2 stanicama proveden je T7E1 test. Nakon optimizacije uvjeta proveden je PCR genomske DNA s početnicama za regiju gena HNF1A, koja obuhvaća ciljno mjesto TALEN-a. PCR je proveden s posebnom polimerazom, Herculase II Fusion DNA Polymerase visoke procesivnosti kako bi se male delecije ili insercije nastale NHEJ popravkom vjerno prepisale. Očekivan rezultat nakon PCR-a je smjesa različitih DNA homodupleksa umnoženog fragmenta gena HNF1A. Provedena je elektroforeza PCR produkta u 1,5% agaroznom gelu kojom je potvrđeno uspješno umnažanje samo jednog DNA fragmenta očekivane veličine 2440 pb. Na agaroznom gelu u stupcima 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, K1 i K2 identificirana je linija skoro u ravnini linije markera veličine 2500 pb, što odgovara veličini očekivanog DNA fragmenta gena HNF1A. Negativna kontrola PCR-a je negativna.



**Slika 19. Elektroforeza PCR produkata genomske DNA za T7E1 test u 1,5% agaroznom gelu. U stupcima 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, K1 i K2 je identificirana glavna DNA linija očekivane veličine oko 2500 pb.**

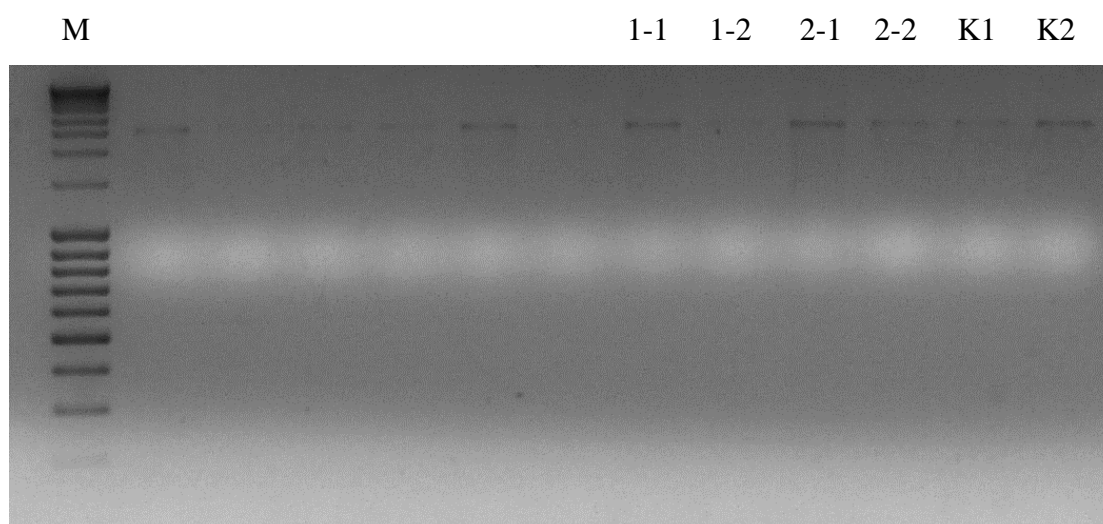
Nakon pročišćavanja PCR produkta izmjerene su vrijednosti koncentracije (Tablica 4.). Iz dobivenih srednjih vrijednosti koncentracije vidljivo je da je prinos DNA nakon PCR-a i pročišćavanja vrlo mali, stoga je za daljnje korake uzet maksimalan volumen svih pročišćenih PCR produkata.



**Tablica 4. Vrijednosti koncentracije (ng/ $\mu$ L) pročišćenih PCR produkata genomske DNA za T7E1 test**

DNA	c (ng/ $\mu$ L)
1-1	7,0
1-2	6,2
2-1	10,1
2-2	4,8
K1	7,6
K2	14,5

Pročišćeni PCR produkt podvrgnut je nagloj denaturaciji i sporom hlađenju. U takvim uvjetima renaturacije DNA spajaju se i nespecifični lanci, te je očekivan rezultat tog procesa nastajanje DNA heterodupleksa i homodupleksa. Kad se takva smjesa podvrgne digestiji s T7 endonukleazom 1 u smjesi nastaju manji porezani fragmenti DNA, jer ova endonukleaza prepoznaje nesparena mjesta u dvolančanoj DNA i stvara urez u oba lanca DNA heterodupleksa. Elektroforezom DNA produkta digestije T7endonukleazom 1 u 2% agaroznom gelu nije potvrđeno postojanje heterodupleksa (Slika 19.). Na agaroznom gelu (Slika 19.) u stupcima 1-1, 2-1, i K2 je identificirana jasna linija oko 2500 pb. Slaba linija iste veličine identificirana je u stupcima 2-2 i K1, dok se u stupcu 1-2 oko 2500 pb nazire vrlo slaba linija. Nakon digestije očekivan je fragment oko 2500 pb i jedan ili nekoliko fragmenata manje veličine što su rezultati elektroforeze samo djelomično potvrdili.



**Slika 20. Elektroforeza DNA produkta digestije T7 endonukleazom 1 u 2% agaroznom gelu. U stupcima 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, K1 i K2 je identificirana glavna DNA linija očekivane veličine oko 2500 pb.**

## 5 Rasprava

Prije razvitka TALEN metode za ciljanu inaktivacije gena bile su dostupne različite metode mutageneze pomoću rekombinaza, integraza, transpozona i homologne rekombinacije (Poglavlje 1.3.). Veliko ograničenje u korištenju ovih metoda jest nedovoljna specifičnost u prepoznavanju ciljnog mjesta u genomu domaćina, što rezultira nespecifičnom integracijom transgena. Za povećanje efikasnosti i selektivnosti mutageneze razvijene su fuzije DNA vezujućih proteina i različitih nukleaza poput TALEN-a, fuzije TALE proteina i FokI nukleaze. U ovom radu metoda TALEN odabrana je za uvođenje ciljane inaktivacije gena HNF1A kako bi takav mutantni fenotip poslužio kao model za bolje razumijevanje puteva regulacije transkripcije kojima upravlja HNF1A i bolesti koje uzrokuje.

### 5.1 Konstrukcija TALEN-a za ciljno mjesto u genu HNF1A

Prvi zahtjev za ostvarenje cilja ovog rad bio je konstrukcija TALEN-a specifičnih za ciljno mjesto u genu HNF1A. Prije same konstrukcije odabrana je ciljna sekvenca u egzonu 1 gena HNF1A. Sekvenca je odabrana s obzirom na mjesto u genu i predikciju nastanka delecija koji će rezultirati promjenom okvira čitanja. Prilikom odabira ciljne sekvence pomoću programa Mojo Hand (Heff i sur. 2013), izračun predikcije za nastanak delecija koje će rezultirati pomakom okvira čitanja bio je čak 72%, veći od preporučenog (Bae i sur. 2014). To značajno povećava mogućnost za inaktivaciju gena HNF1A pomoću TALEN-a koji će se vezati na ovo ciljno mjesto. Zbog jednostavnosti i brzine konstrukcije TALEN-a odabrana je metoda Golden Gate kloniranjem prema radu grupe Cermak i sur. (2011).

Rezultati dobiveni elektroforezom nakon prve i druge Golden Gate reakcije interpretirani su usporedbom s rezultatima objavljenim u radu Cermak i sur. (2011). Iste rezultate potvrdili su i Sakuma i sur. (2013a), unatoč malim izmijenjenama u metodi konstrukcije Golden Gate kloniranjem. U svim slučajevima konstrukti s konačnim brojem modula na agaroznom gelu pokazuju isti obrazac. Taj obrazac čini karakterističan razmazan signal oko linije konstrukta i znatno iznad nje. Također, ispod linije PCR produkta finalnog konstrukta na gelu vidljiv je ljestvičasti uzorak koji nastaje kao posljedica umnažanja repetitivnih sekvenci PCR-om. Hommelsheim i suradnici (2014) prvi su predložili molekularni mehanizam nastanka ovakvih artefakta. Tijekom reakcije ligacije osim ispravnih konstrukata nastaju i konstrukti s manjim brojem modula. Oni se tijekom PCR reakcije mogu vezati na lanac kalup i formirati ukosnice

koje dovode do oslobađanja DNA polimeraze što rezultira nastankom djelomičnog jednolačanog produkta. Takav produkt se u sljedećim ciklusima PCR reakcije veže na lanac kalup kao velika početnica ili sam postaje kalup. Još jedan uzrok nastanka različitih amplificiranih produkata s duplikacijama i rearanžmanima je zamjena DNA lanaca kalupa između dvije polimeraze kad se one nađu u neposrednoj blizini tijekom elongacije u PCR reakciji. To je čest događaj tijekom PCR umnažanja DNA s ponavljajućim (repetitivnim) sekvencama (Odelberg i sur. 1995). Za povećanje efikasnosti umnažanja repetitivnih sekvenci poput TALE modula preporuča se odabrati početnice koje se vežu dalje od mjesta s repetitivnim sekvencama, odabir PCR smjese s polimerazi pridruženim proteinima ili umnažanje fragmenata izotermalnom reakcijom zamjene DNA lanaca (Homelsheim i sur. 2014). Zbog toga je uz potvrdu ispravnosti konstrukta potrebno provesti i sekvenciranje ispravnih klonova nakon druge Golden Gate reakcije. Prema rezultatima sekvenciranja potvrđena je konstrukcija TALEN-a za ciljno mjesto u genu HNF1A (Prilog 2).

Jednostavnost i brzina konstrukcije TALEN-a ovom metodom ovisi o uspješnosti svakog koraka konstrukcije. U slučaju da se produkt prve Golden Gate reakcije trećeg dana konstrukcije pokaže neispravan ponovno se provodi PCR na bakterijskim kolonijama i elektroforeza na agaroznom gelu. Ako na agaroznom gelu nije identificiran ispravan bakterijski klon mogu se ponoviti svi koraci od transfekcije do gel elektroforeze ili se Golden Gate reakcija ponavlja. Isti protokol se ponavlja ako nije identificiran ispravan konstrukt nakon druge Golden Gate reakcije što je čest slučaj. Tijekom konstrukcije trebalo je ponoviti dva puta korak PCR-a na bakterijskim kolonijama nakon druge Golden Gate reakcije jer u prekonoćnoj kulturi nisu porasle bakterije. Uzrok tome su lažno pozitivni klonovi zbog krive interpretacije rezultata dobivenih na gelu. To je često u slučajevima kad na gelu izostaje nespecifičan signal iznad očekivane linije, a prisutne su neke linije oko očekivane veličine DNA fragmenta. Zbog ovih čimbenika vrijeme konstrukcije se može produžiti na mnogo duži period od pet dana.

## **5.2 Provjera aktivnosti TALEN-a u transfeciranim HepG2 stanicama T7E1 testom**

Sljedeći cilj bio je provesti inaktivaciju gena HNF1A s dobivenim TALEN konstruktom. Provedena je transfekcija HepG2 stanica s destinacijskim plazmidom pCAG-T7-TALEN(Sangamo)FokI-KKR koji sadrži lijevi i pCAG-T7-TALEN(Sangamo)FokI-KKR

koji sadrži desni TALEN konstrukt i dva različita volumena Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa. Ovaj reagens vrlo je povoljan za transfekciju TALEN-a i CRISPR-a (Li i Hotta 2015).

Do sad je objavljeno nekoliko značajnih radova u kojima je provedena transfekcija TALEN-a za inaktivaciju gena na staničnim linijama u kulturi (Cermak i sur. 2011., Miller i sur. 2011., Musolino i sur. 2012., Reyon i sur. 2012., Kim i sur. 2013). Frekvencije modifikacija nastalih djelovanjem TALEN-a razlikuje se u različitim staničnim linijama zbog razlika u staničnom ciklusu, metabolizmu stanica, efikasnost transfekcije i aktivnosti popravka DNA (Kolb i sur. 2005). Nakon transfekcije uneseni TALEN konstrukt se prepisuje u stanici, ulazi u jezgu, veže se na ciljno mjestu u genu HNF1A i djelovanjem FokI nukleaze uzrokuje dvolančani lom. On se najčešće popravljiva NHEJ mehanizmom koji može uzrokovati različite mutacije. Za detekciju malih delecija i insercija u stanici koje nastaju NHEJ popravkom može se koristiti CEL-I (Daimon 2015), Surveyor (Sanjana i sur. 2012), T7E1 test (Cermak i sur. 2011, Reyon i sur. 2012, Kim i sur. 2013) ili drugi testovi koji koriste endonukleaze koje prepoznaju i režu male nesporene dijelove DNA.

Rezultati dobiveni gel elektroforezom (Slika 18.) upućuju na umnažanje fragmenta regije gena HNF1A od 2440 pb, a jačina dobivenih linija na gelu ukazuje na njihovu nejednoliku koncentraciju. Nakon pročišćavanja DNA vrijednosti izmjerene koncentracije upućuju na vrlo mali prinos DNA koji je mogao utjecati na efikasnost digestije. Usporedbom rezultata dobivenih gel elektroforezom (Slika 19.) nakon digestije s T7 endonukleazom 1 i rezultata drugih grupa (Kim i sur. 2013, Reyon i sur. 2012) može se zaključiti da samo jedna linija ukazuje na postojanje divljeg (nemutiranog) tipa gena u transfeciranim stanicama. Zbog male razlučivosti linija, koja je posljedica male koncentracije DNA, teško je sa sigurnošću potvrditi postoji li još koja linija ispod 2500 pb koja bi upućivala na postojanje mutantnog tipa gena HNF1A. Postoji mogućnost da zbog male efikasnosti transfekcije nalazimo vrlo mali broj stanica s mutiranim genom HNF1A koji dodatno zbog male koncentracije nije mogao biti razlučen na gelu. U stupcu 2-1 nazire se vrlo slab signal ispod linije veličine oko 2500 pb. To može ukazivati na postojanje manjih fragmenata koji su putovali brže na gelu, ali je njihova koncentracija premala da bi vidjeli jasnu liniju. Rezultati T7E1 testa ne potvrđuju postojanje mutacija u genu HNF1A, stoga ne potvrđuju inaktivaciju gena HNF1A pomoću TALENA-a u transfeciranim HepG2 stanicama. T7E1 testom ne može se potvrditi prisutnost manje od 1% modificiranih sekvenci genomske DNA analiziranih elektroforezom (Kim i sur. 2009). Rezultati Xu i sur. (2013) potvrđuju nedovoljnu specifičnost T7E1 testa za utvrđivanje aktivnosti TALEN-a u stanicama bez prethodne selekcije. Dobiveni rezultati T7E1 testa samo na jednoj seriji transfekcije HepG2 stanica sa TALEN konstruktima nisu dovoljni za

odbacivanje pretpostavke kako konstruirani TALEN-i mogu uzrokovati inaktivaciju gena HNF1A, već je potrebno provesti daljnje eksperimente.

U daljnjim eksperimentima trebalo bi povećati efikasnost transfeciranih stanica. Za dobivanje stanične linije sa stabilnom inaktivacijom gena HNF1A treba provesti selekciju transfeciranih stanica. Ovisno o vrsti eksperimenta za koji će poslužiti selektirana stanična linija može se uzgojiti selektirana stanična linija dobivena od jedne stanice ili od više različitih. Zbog genetičke uniformnosti stanica uzgoj stanične linije od pojedinačne stanice bio bi bolji odabir za istraživanje funkcije gena HNF1A. Selekcija i dobivanje takve stanične linije zahtijeva još puno posla. Potrebno je nasaditi stanice u velikom rasponu razrjeđenja i izolirati kolonije porasle od pojedinačnih stanica. Zatim transfecirati takve stanične linije vektorima koji osim TALEN-a nose gen za rezistenciju na određeni antibiotik. Vektori mogu nositi gen za neomicin fosfotransferazu kao rezistenciju na neomicin, gen za puromicin N-acetil transferazu kao rezistenciju na puromicin ili neku drugu vrstu rezistencije. Stanice koje su transfecirane preživljavaju u prisutnosti određenog antibiotika te ih se može izolirati (Grimm 2004). Sekvenciranjem PCR regije za gen HNF1A potrebno je potvrditi inaktivaciju gena HNF1A u dobivenoj staničnoj liniji. Rezultati dobiveni u ovom radu pokazuju da je TALEN uspješno konstruiran i dostavljen u HepG2 stanice, ali proces dobivanja stanične linije s inaktiviranim genom HNF1A iziskuje još mnogo posla.

Za buduća istraživanja trebalo bi konstruirati i provesti transfekciju s više TALEN-a za ciljno mjesto u genu HNF1A, kako bi se dobiveni rezultati aktivnosti konstruiranih TALEN-a u HepG2 stanicama mogli međusobno usporediti.

### **5.3 Provjera efikasnosti transfekcije HepG2 stanica fluorescencijskim mikroskopiranjem**

Kako bi se povjerila uspješnost transfekcije provedena je transfekcija HepG2 stanica plazmidom pcDNA-EGFP i dva različita volumena Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa. Rezultati svjetlosne i fluorescencijske mikroskopije stanica nakon trećeg dana transfekcije pokazuju da je dio stanica uspješno transfeciran. Detektirane su stanice s fluorescentnim produktom EGFP, ali je detektiran i velik broj stanica koje ne pokazuju fluorescenciju. Niža efikasnost transfekcije potvrđuje rezultate dobivene T7E1 testa koji nije dovoljno osjetljiv za dokaz mutanata gena HNF1A u ovako malom broju transfeciranih stanica. Za dobivanje stanične linije nije potrebna velika efikasnost transfekcije jer se selekcijom iz malog broja transfeciranih

stanica može proizvesti stanična linija s inaktiviranim genom. Najbolju efikasnost transfekcije pokazale su stanice (Slika 16.) transfecirane s najmanjim preporučenim volumenom od 3,75  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa po bazečiću. Prema rezultatima dostupnim od proizvođača Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 reagensa, efikasnost transfekcije HepG2 stanica je znatno poboljšana u odnosu na transfekciju s Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 reagensom. Najbolji rezultat transfekcije dobiven fluorescencijskom mikroskopijom u ovom radu još uvijek ne potvrđuje rezultate dobivene nakon transfekcije HepG2 od proizvođača. Bitno je naglasiti da je konfluentnost stanica prilikom mikroskopiranja bila vrlo visoka (90-100%), stoga za buduće eksperimente predlažem transfekciju na HepG2 stanicama konfluentnosti niže od 80%.

## 6 Zaključak

- (1) Uspješno je konstruiran par TALEN-a metodom Golden Gate kloniranja za ciljno mjesto u genu HNF1A.
- (2) Uspješno su transfecirane stanice HepG2 stanica, umjerene efikasnosti, što je utvrđeno fluorescencijom proteina EGFP.
- (3) T7E1 test je nedovoljno osjetljiv za provjeru aktivnosti TALEN-a za utvrđenu umjerenu efikasnost transfekcije HepG2 stanica.
- (4) Selekcijom transfeciranih HepG2 stanica dobivenih iz staničnih kolonija poraslih od pojedinačnih HepG2 stanica mogla bi se dobiti stanična linija sa stabilnom inaktivacijom HNF1A, što predstavlja izazov za daljnja istraživanja i razvoj pogodnog modela HepG2 stanične linije s inaktiviranim genom HNF1A.

## 7 Literatura

Abremski K., Hoess R., Sternberg N. (1983): Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* **32**: 1301–1311.

Barrangou R., Marraffini L. A. (2014): CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell* **54**: 234–244.

Bluteau O., Jeannot E., Bioulac-Sage P., Margues J. M., Blanc J.-F., Bui H., Beaudoin J.-C., Franco D., Balabaud C., Laurent-Puig P., Zucman-Rossi J. (2002): Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nature Genetics* **32**: 312-315.

Boch J., Bonas U. (2010): Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 419-136.

Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. (2009): Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**: 1509-1512.

Bogdanove A. J., Schornack S., Lahaye T. (2010): TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 394-401.

Bogdanove A. J., Voytas D. F. (2011): TAL effectors: Customizable proteins for DNA targeting. *Science* **333**: 1843-1846.

Cermak T., Doyle E. L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J. A., Nikonj V. S., Bogdanove A. J., Voytas D. F. (2011): Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acid Research* **39**: 1-11.

Chen P. J. (2006): Genetic mutation in hepatic adenoma: Seeing is believing. *Journal of Hepatology* **45**: 767-769.



Chen S., Oikonomou G., Chiu C. N., Niles B. J., Liu J., Lee D. A., Antoshechin I., Prober D. A. (2013): A large-scale *in vivo* analysis reveals that TALENs are significantly more mutagenic than ZFNs generated using context-dependent assembly. *Nucleic Acids Research* **41**: 2769–2778.

Chi Y.-I., Frantz J. D., Oh B. C., Hansen L., Dhe-Paganon S., Shoelson S. E. (2002): Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1A. *Molecular Cell* **10**: 1129-1137.

Christian M. L., Demorest Z. L., Starker C. G. Osborn M. J., Nyquist M. D., Zhang Y., Carlson D. F., Bradley P., Bogdanove A. J., Voytas D. F. (2012): Targeting G with TAL effectors: a comparison of activities of TALENs constructed with NN and NK repeat variable di-residues. *PLoS One*. [On line] Preuzeto sa: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0045383> [28. 01. 2016.]

Coates C. J., Kaminski J. M., Summers J. B., Segal D. J., Miller A. D., Kolb A. F. (2005): Site-directed genome modification: derivatives of DNA-modifying enzymes as targeting tools. *Trends in Biotechnology* **23**: 407-419.

Cohen S. N., Chang A. C. Y., Boyer H. V., Helling R. B. (1973): Construction of biologically functional bacterial plasmid *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **70**: 3240-3244.

Colosimo A., Goncz K. K., Holmes A. R., Kunzelmann K., Novelli G., Malone R. W., Bennett M. J., Gruenert D. C. (2000): Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques* **29**: 314-331.

Delić V. (2004): Trideset godina genetičkog inženjerstva: Kako je došlo do otkrića mogućnosti rekombiniranja DNA molekula *in vitro*. *Priroda* **94**: 42-47.

Deng D., Yan C., Pan X, Mahfouz M., Wang J., Zhu J.-K., Shi Y., Yan N. (2012): Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science* **335**:

720-723.

Ding Q., Lee Y-K., Schaefer E. A. K., Peters D. T., Veres A., Kim K., Kuperwasser N., Motola D. L., Meissner T. B., Hendriks W. T., Trevisan M., Gupta R. M., Banks E., Friesen M., Schinzel R. T., Xia F., Tang A., Xia Y., Figueroa E., Wann A., Ahfeldt T., Daheron L., Zhang F., Rubin L. L., Peng L. F., Chung R. T., Musunuru K., Cowan C. A. (2013): A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell* **12**: 238–251.

Doyon Y., Vo T. D., Mendel M. C., Greenberg S. G., Wang J., Xia D. F., Miller J. C., Urnov F. D., Gregory P. D., Holmes M. C. (2010): Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nature Methods* **8**: 74–79.

Dutheil N., Shi F., Dupressoir T., Linden R. M. (2000): Adeno-associated virus site-specifically integrates into a muscled-specific DNA region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **97**: 4862–4866.

Esvelt K. M., Wang H. H. (2013): Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Molecular Systems Biology* **9**. [On line]. Preuzeto sa: <http://msb.embopress.org/content/9/1/641.short> [28. 01. 2016].

Xu L., Zhao P., Mariano A., Han R. (2013): Targeted miostatin gene editing in multiple mammalian species directed by a single pair of TALE nucleases. *Molecular Therapy Nucleic Acids* **2**. [On line]. Preuzeto s: <http://www.nature.com/mtna/journal/v2/n7/full/mtna201339a.html> [28. 01. 2016.]

Gaj T., Gersbach C. A., Barbas C. F. (2013): ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genom engineering. *Trends in Biotechnology* **31**: 397-405.

Gersbach C. A. (2014): Genome engineering: the next genomic revolution. *Nature Methods* **11**: 1009-1011.

Grimm S. (2004): The art and design of genetics screens: mammalin culture cells.

Nature Reviews **5**: 179-189.

Groth A. C., Calos M. P. (2004): Phage integrases: biology and applications. *Journal of Molecular Biology* **335**: 667-678.

Guilinger J. P., Pattanayak V., Reyon D., Tsai S. Q., Sander J. D., Joung J. K., Liu D. R. (2014): Broad specificity profiling of TALENs result in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity. *Nature Methods* **11**: 429-435.

Guo J., Gaj T., Barbas C. F. (2010): Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. *Journal of Molecular Biology* **400**: 96-107.

Hommelsheim C. M., Frantzeskakis L., Huang M., Ulker B. (2014): PCR amplification of repetitive DNA: a limitation to genom editing technologies and many other applications. *Scientific Reports* **4**. [On line]. Preuzeto sa: <http://www.nature.com/articles/srep05052> [28. 01. 2016.]

Ivics Z., Li M. A., Mates L., Boeke J. D., Bradley A., Izsvak Z. (2009): Transposon-mediated genome manipulations in vertebrates. *Nature Methods* **6**: 415-422.

Jackson D. A., Symons R. H., Berg P. (1972): Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **69**: 2902-2909.

Joung J. K., Sanders J. D. (2013): TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews* **14**: 49-55.

Kim Y., Kweon J., Kim A., Chon J. K., Yoo J. Y., Kim H. J., Kim S., Lee C., Jeong E., Nhung E., Kim D., Lee M. S., Go E. M., Song H. J., Kim H., Cho N., Bang D., Kim S., Kim J. S. (2013): A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nature Biotechnology* **31**: 251-258.

Kolb A. F., Coates C. J., Kaminski J. M., Summers J. M., Miller A. D., Segal D. J. (2005): Site-directed genome modification: nucleic acid and protein modules for targeted integration and gene correction. *Trends in Biotechnology* **23**: 399-406.

Kolb A. F. (2002): Genomic engineering using site-specific recombinases. *Cloning and Stem Cells* **4**: 59-74.

Labant M. (2013): Transfection Method Evolving. *Genetic Engineering and Biotechnology News*. [On line] Preuzeto s: <http://www.genengnews.com/gen-articles/transfection-methods-evolving/4974/> [28. 01. 2016.]

Li L., Wu L. P., Chandrasegaran S. (1992): Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **89**: 4275-4279.

Li T., Huang S., Jiang W. Z., Wright D., Spalding M. H., Weeks D. P., Yang B. (2011): TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Research* **39**: 359-372.

Li L. H., Hotta A. (2015): Editing cultured human cells: from cell lines to iPS cells. U: Yamamoto, T. (ur.) *Targeted genome editing using site-specific nuclease*. Tokyo, Springer Japan, str. 45-69.

Lieber M. R. (2008): The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 1-5.

Lieber M. R. (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end joining pathway. *Annual Review Biochemistry* **79**: 181-211.

Liu Q., Segal D. J., Ghiara J. B., Barbas C. F. (1997): Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **94**: 5525-5530.

Mahfouz M. M., Li L., Shamimuzzaman M., Wibowo A., Fang X., Zhu J. K. (2011): De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* **108**: 2623-2628.

Mak A. N., Bradley P., Cernadas R. A., Bogdanove A. J., Stoddard B. L. (2012): The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* **335**: 716-719.

Miller J. C., Tan S., Qiao G., Barlow K. A., Wang J., Xia D. F., Meng X., Paschon D. E., Leung E, Hinkley S. J., Dulay G. P., Hua K. L., Ankoudinova I, Cost G. J., Urnov F. D., Zhang H. S., Holmes M. C., Zhang L., Gregory P. D., Rebar E. J. (2011): A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology* **29**: 143-148.

Miller J. C., Zhang L., Xia D. F., Campo J. J., Ankoudinova I. V., Guschin D. Y., Babiarz J. E., Meng X., Hinkley S. J., Lam S. C., Paschon D. E., Vincent A. I., Dulay G. P., Barlow K. A., Shivak D. A., Leung E., Kim J. D., Amora R., Urnov F. D., Gregory P. D., Rebar E. J (2015): Improved specificity of TALE-based genome editing using an expanded RVD repertoire. *Nature Methods* **12**: 465-471.

Moscou M. J., Bogdanove A. J. (2009): A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* **326**: 1501-1501.

Nagy A. (2000): Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* **26**: 99-109.

Neff K. L., Argue D. P., Ma A. C., Lee H. B., Clark C. K., Ekker S. C. (2013): Mojo Hand, a TALEN design tool for genome editing applications. *BioMed Central Bioinformatics* **14**. [Online]. Preprints: <http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-14-1> [28. 01. 2016.]

Ochiai H., Yamamoto T. (2015): Genome Editing Using Zinc-Finger Nucleases

(ZFNs) and Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs). U: Yamamoto, T. (ur.) Targeted genome editing using site-specific nuclease. Tokyo, Springer Japan, str. 3-24.

Odelberg S. J., Weiss R. B., Hata A., White R. (1995): Template-switching during DNA synthesis by *Thermus aquaticus* DNA Polymerase I. *Nucleic Acids Research* **23**: 2049-2057.

Pannell D., Ellis J. (2001): Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors. *Reviews in Medical Virology* **11**: 205-217.

Pernstich C., Halford S. E. (2012): Illuminating the reaction pathway of the FokI restriction endonuclease by fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Research* **40**: 1203–1213.

Pontoglio M., Sreenan S., Roe M., Pugh W., Ostrega D., Doyen A., Pick A. J., Baldwin A, Velho G., Froguel P., Levisetti M., Bonner-Weir S., Bell G. I., Yaniv M., Polonsky K. S. (1997): Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1a- deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* **101**: 2215-2222.

Reed S. H., Watters R. (2003): DNA Repair. U: Cooper, D. N. (ur.) *Nature encyclopedia of Human Genom.* London, New York, Tokyo, Nature Publishing Group, str. 148-152.

Reyon D., Tsai S. Q., Khayter C., Foden J. A., Sander J. D., Joung K. (2012): FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature Biotechnology* **30**: 460-465.

Romer P., Hahn S., Jordan T., Strauß T., Bonas U., Lahaye T. (2007): Plant-pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* **318**: 645-648.

Sakuma T., Hosoi S., Woltjen K. Suzuki K., Kashiwagi K., Wada H., Ochiai H., Myamoto T., Kawai N., Sasakura Y., Matsuura S., Okada Y., Kawahara A., Hayashi S.,

Yamamoto T. (2013a): Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells* **18**: 315–326.

Sakuma T., Ochiai H., Kaneko T., Mashimo T., Tokumasu D., Sakane Y., Suzuki K., Miyamoto T., Sakamoto N., Matsuura S., Yamamoto T. (2013b): Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Scientific Reports* **3**. [On line] Preuzeto s: <http://www.nature.com/articles/srep03379> [28. 01. 2016.]

Sanjana N. E., Cong L., Zhou Y., Cunniff M. M., Feng G., Zhang F. (2012): A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nature Protocols* **7**. [On line]. Preuzeto s: <http://www.nature.com/nprot/journal/v7/n1/full/nprot.2011.431.html> [28. 01. 2016.]

Shih D. Q., Screenan S., Munoz K. N., Philipson L., Pontoglio M., Yaniv M., Polonsky K. S., Stoffel M. (2001): Loss of HNF-1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes* **50**: 2472-2480.

Sorrel D. A., Kolb A. F. (2005): Targeted modification of mammalian genomes. *Biotechnology Advances* **23**: 431-469.

Takeda S., Yamazoe M. (2003): DNA recombination. U: Cooper, D. N. (ur.) *Nature encyclopedia of Human Genom.* London, New York, Tokyo, Nature Publishing Group, str. 142-145.

Tan W., Carlson D. F., Walton M. W., Fahrenkrug S. C., Hackett P. B. (2012): Precision Editing of Large Animal Genomes. *Advances in Genetics* **80**: 37-97.

Valton J., Dupuy A., Daboussi F., Thomas S., Marechal A., Macmaster R., Melliand K., Juillierat A., Duchateau P. (2012): Overcoming TALE DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. *The Journal of Biological Chemistry* **287**: 38427–38432.

Wei C., Liu J., Yu Z., Zhang B., Gao G., Jiao R. (2013): TALEN or Cas9- rapid,

efficient and specific choice for genome modifications. *Journal of Genetics and Genomics* **40**: 281-289.

Westra E. R., Buckling A., Fineran P. C. (2014): CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nature Reviews Microbiology* **12**: 317–326.

Wu P. Y., Frit P., Meesala S., Dauvillier S., Modesti M., Andres S. N., Huang Y., Sekiguchi J., Calsou P., Salles B., Junop M. S. (2009): Structural and functional interaction between the human DNA repair proteins DNA ligase IV and XRCC4. *Molecular and Cellular Biology* **29**: 3163-3173.

Wyman C., Ristic D., Kanaar R. (2004): Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair* **3**: 827-833.

Yamagata K., Oda N., Kaisaki P. J., Menzel S., Furuta H., Vaxelaire M., Southam L., Cox R. D., Lathrop G. M., Boriraj V. V., Chen X., Cox N. J., Oda Y., Yano H., Le Beau M. M., Yamada S., Nishigori H., Takeda J., Fajans S. S., Hattersley A. T., Iwasaki N., Hansen T., Pedersen O., Polonsky K. S., Turner R. C., Velho G., Chevre J.-C., Froguel P., Bell G. I. (1996): Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* **384**: 455-458.

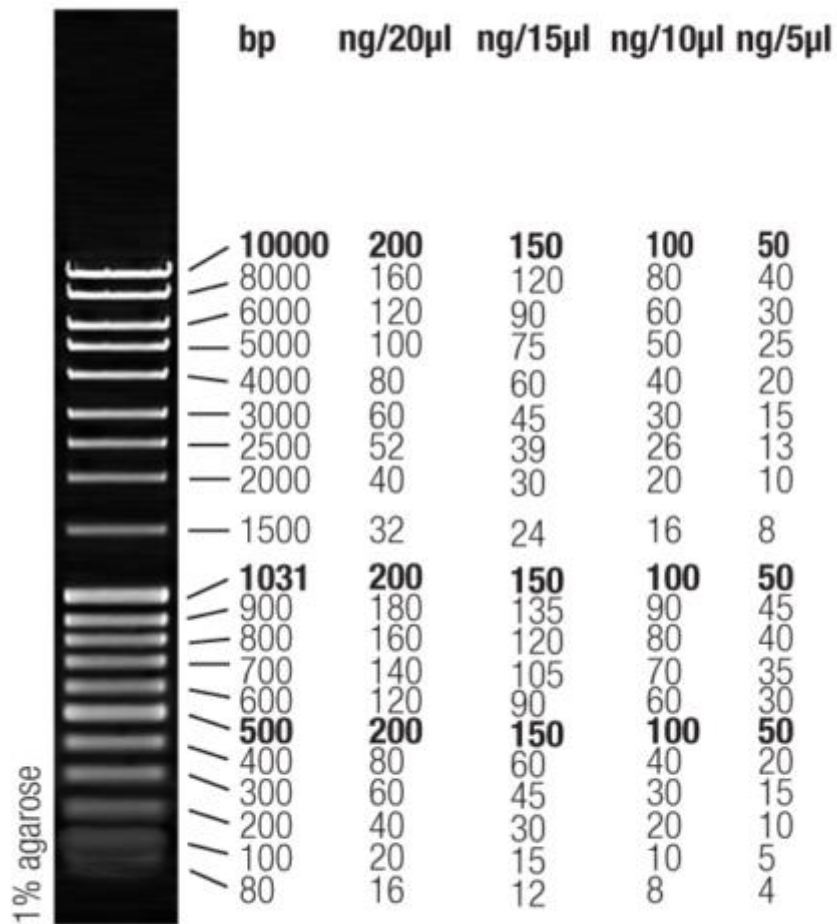
Zoldoš V., Horvat T., Novokmet M., Cuenin C., Mužinić A., Pučić M., Huffman J. E., Goernik O., Polašek O., Campbell H., Hayeard C., Wright A. F., Rudan I., Owen K., McCarthy M. I., Herceg Z., Lauc G. (2012): Epigenetic silencing of HNF1A associates with changes in the composition of the human plasma N-glycome. *Epigenetics* **2**: 164-172.



## 8 Prilog

### Prilog 1.

#### MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use



10 µl/lane, 8 cm length gel,  
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

## Prilog 2. Rezultati sekvenciranja

### Lijevi TALEN (1519 pb)

CGGGCCCCCATGGAAAGCTTGCTCCGGATGCGGGGGAGTTGAGAGGTCCG  
CCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTGTGAAGATTGCAAAAACGTGGCGG  
CGTGACCGCAATGGAGGCAGTGTCATGCATCGCGCAATGCACTGACGGGTG  
CCCCCTGAACCTGACCCCGGACCAAGTGGTGGCTATCGCCAGCAACAAT  
GGCGGCAAGCAAGCGCTCGAAACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTG  
CCAGGACCATGGCCTGACCCCGGACCAAGTGGTGGCTATCGCCAGCAACA  
ATGGCGGCAAGCAAGCGCTCGAAACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTG  
TGCCAGGACCATGGCCTGACTCCGGACCAAGTGGTGGCTATCGCCAGCCA  
CGATGGCGGCAAGCAAGCGCTCGAAACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGC  
TGTGCCAGGACCATGGCCTGACTCCGGACCAAGTGGTGGCTATCGCCAGC  
CACGATGGCGGCAAGCAAGCGCTCGAAACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGT  
GCTGTGCCAGGACCATGGCCTGACTCCGGACCAAGTGGTGGCTATCGCCA  
GCCACGATGGCGGCAAGCAAGCGCTCGAAACGGTGCAGCGGCTGTTGCCG  
GTGCTGTGCCAGGACCATGGCCTGACCCCGGACCAAGTGGTGGCTATCGC  
CAGCAACGGTGGCGGCAAGCAAGCGCTCGAAACGGTGCAGCGGCTGTTGC  
CGGTGCTGTGCCAGGACCATGGCCTGACCCCGGACCAAGTGGTGGCTATC  
GCCAGCAACAATGGCGGCAAGCAAGCGCTCGAAACGGTGCAGCGGCTGTT  
GCCGGTGCTGTGCCAGGACCATGGCCTGACCCCGGACCAAGTGGTGGCTA  
TCGCCAGCAACGGTGGCGGCAAGCAAGCGCTCGAAACGGTGCAGCGGCTG  
TTGCCGGTGCTGTGCCAGGACCATGGCCTGACCCCGGACCAAGTGGTGGC  
TATCGCCAGCAACAATGGCGGCAAGCAAGCGCTCGAAACGGTGC AACGGC  
TGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGACCATGGCCTGACCCCGGACCAAGTGGTG  
GCTATCGCCAGCAACAATGGCGGCAAGCAACGCTCCAACAGTGCACCGCT  
GTTTCCCGTGCTGTGCCAGAACATGGCTGACCCCGAACAAATGTGGGTAT  
TCCAACCACAAAGGGGGAAAAAACGCTCAAACAGTGAACGCTGTTTTTCGG  
GGTGTGTCAGGACAAGGCTGACCCCGACAAAAGGTGGGTATCCTCCCACA  
TATGGGGAAGAAACCTCCAAAAGGAACAGCGTTGTCCGGCTTTGTCCGAC  
ATAGCGGACCCACCACATGGTGTTTTCCACAAAAGGGAAAAGCTCACAT  
AGAAGGGTTTGTGGTGTGGAAAAGCTTCTCACCAAAGGTTTCTCTTAG  
GAGAGAACAAAAAAAAGAGTGGGTGGTGTCCCGCCAGGCGTGATTTTA  
TTCAAACAAAAAAAATT

NAME = L\_CAG\_HETERO\_TAL\_F1

**Desni TALEN (1543 pb)**

GGGCCCCCCTTGGGAGCCTTGCTCCGGATGCGGGGGAGTTGAGAGGTCCGCCGTT  
ACAGTTGGACACAGGCCAACTTGTGAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGC  
AATGGAGGCAGTGCATGCATCGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCCTGAACCTG  
ACCCCGGACCAAGTGGTGGCTATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAAGCGCTC  
GAAACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGACCATGGCCTGACCCCGG  
ACCAAGTGGTGGCTATCGCCAGCAACGGTGGCGGCAAGCAAGCGCTCGAAACGG  
TGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGACCATGGCCTGACCCCGGACCAAGT  
GGTGGCTATCGCCAGCAACAATGGCGGCAAGCAAGCGCTCGAAACGGTGCAGCG  
GCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGACCATGGCCTGACTCCGGACCAAGTGGTGGCT  
ATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAAGCGCTCGAAACGGTGCAGCGGCTGTTG  
CCGGTGTGTGCCAGGACCATGGCCTGACCCCGGACCAAGTGGTGGCTATCGCCA  
GCAACATTGGCGGCAAGCAAGCGCTCGAAACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGC  
TGTGCCAGGACCATGGCCTGACCCCGGACCAAGTGGTGGCTATCGCCAGCAACA  
ATGGCGGCAAGCAAGCGCTCGAAACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCC  
AGGACCATGGCCTGACTCCGGACCAAGTGGTGGCTATCGCCAGCCACGATGGCG  
GCAAGCAAGCGCTCGAAACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGACC  
ATGGCCTGACCCCGGACCAAGTGGTGGCTATCGCCAGCAACGGTGGCGGCAAGC  
AAGCGCTCGAAACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGACCATGGCCT  
GACCCCGGACCAAGTGGTGGCTATCGCCAGCAACAATGGCGGCAAGCAAGCGCT  
CGAAACGGTGCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGACCATGGCCTGACCCCG  
GACCAAATGGTGGCTATCGCCAGCAACAATGGCGGCAAGCAACGCTCGAAACGT  
GCAACGGCTGTTGCCGGGGTGTGCCAGAACATGGCCTGACCCCGAACAAAGGTGG  
GTATCTCAGACCAATGGGGGAAGAAACCTCTAAAAGTGAACGGCTTTTGC  
GTTTGCCAGAAGTACCTGACCCCGACAAATGTGGGTATTCCCCACAGTGGGGA  
ACAACCTCAACATTGAAACGTTTTTCTGGTTTGTGACAAGCTGTCCCGCACAAG  
GGGTTTCCCCAATTGGGAAAACCTCAAATAAAAGGTTTTGGTTGGTTTAGATGG  
CCCACCAGGGGGTATCCTTATGGACAACCCAAAAAAGAGTGTGGGGTGGTGCGT  
GCCTCCGGAACGTAGTCCATAACAACCACCAAAAAAAGAAGGTGTGGCTGTTG  
TAGGTGTGAGGCCGGTAGGG

NAME = R\_CAG\_HETERO\_TAL\_F1

## Životopis

Rođena sam 31. 01. 1991. u Koprivnici. Do 2005. godine pohađala sam osnovnu školu Sveti Petar Orehovec. Nakon završene opće gimnazije Ivana Zakmardija Dijankovečkog i srednje glazbene škole Alberta Štrige u Križevcima, 2009. godine upisala sam Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Biološki odsjek, smjer molekularna biologija.

Tijekom studija od 2009. do 2012. godine aktivno sam sudjelovala u organizaciji i pripremi radionice Kukci tijekom manifestacije „Noć biologije“, kada je svim sudionicima akademske godine 2011./2012. dodijeljena posebna Rektorova nagrada za sudjelovanje u manifestaciji „Noć biologije“. Također, akademske godine 2010./2011. sudjelovala sam u nastavi kolegija Biologija stanice kao demonstrator.

Aktivno se služim engleskim i njemačkim jezikom.