

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Glutamiini süntetaasi geeni väljalülitamine hiina hamstri (*Cricetulus griseus*)

munasarja rakuliinis

Bakalaureusetöö

12 EAP

Signe Parts

Juhendajad:

Prof Mart Ustav

Eva-Maria Tombak, PhD

Andres Männik, PhD

TARTU 2020

„Glutamiini süntetaasi geeni väljalülitamine hiina hamstri (*Cricetulus griseus*) munasarja rakuliinis“

Hiina hamstri munasarja (CHO) rakke kasutatakse paljude terapeutiliste valkude tootmises. Tõhusa tootmisprotsessi tagamise suurim väljakutse on super-produktant rakuliinide isoleerimine heterogeensest populatsioonist, kus leidub nii kõrge kui ka madala tootlikkusega rakke. Algne glutamiini süntetaasil baseeruv seleksioon põhineb GS transgeeni kasutamisel seleksioonimarkerina koos GS inhibiitoriga metioniin sulfoksimiin (MSX). Kirjanduse andmetel võivad endogeenset GS-i ekspresseerivad rakud omandada tolerantsuse MSX-i suhtes, mis pärsib seleksioonisüsteemi tõhusust kõrge tootlikkusega rakuliinide saamiseks. Endogeenset GS-i ekspresseeriva geeni väljalülitamine CHO rakuliinis aitab muuta super-produktant rakkude valimise efektiivsemaks, kuna seleksioonis jäävad ellu ainult rakud, milles seleksioonimarker GS koos huvipakkuva järjestusega on integreerunud aktiivselt transkribeeritavasse lookusesse. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on luua välja lülitatud glutamiini süntetaasi geeniga CHO rakuliin, mis oleks sobiv edasiseks stabiilsete super-produktant rakuliinide arendamiseks.

Märksõnad: CHO rakud, glutamiini süntetaas, CRISPR/Cas9, *knockout*

CERCS kood: B210 (Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid), B220 (Geneetika, tsütogeneetika)

“Glutamine synthetase gene knockout in Chinese hamster ovary (*Cricetulus griseus*) cell line”

Chinese hamster ovary (CHO) cells have become more popular for the manufacture of therapeutic recombinant proteins. More efficient selection systems are required to improve CHO cell line based protein production. Glutamine synthetase selection system has been used with GS inhibitor methionine sulfoximine. In previous studies, it has been shown that CHO cells have endogenous GS gene. They can also survive in high MSX concentrations making the selection system inefficient. Adapting to MSX high concentrations makes it possible for cells with lower protein productivity to survive. For more efficient CHO mediated selection system glutamine synthetase knockout cell lines can be used. In this study we developed CHO GS knockout cell line for more efficient way to isolate super-producer cells from cells with lower productivity.

Keywords: CHO cell, glutamine synthetase, CRISPR/Cas9, knockout

CERCS code: B210 (histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture), B220 (Genetics, cytogenetics)

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Rekombinantsete valkude ja ravimite tootmine imetajarakkudes	8
1.2 Hiina hamstri munasarja rakuliinid.....	8
1.3 Selektiooni meetodid rakuliinide arendamisel	11
1.4 Glutamiini süntetaas selektsioonimarkerina	12
1.5 Hiina hamstri munasarja rakkude glutamiini süntetaasi <i>glul</i> geen	14
1.6 Geeni väljalülitamine CRISPR-Cas9 meetodiga	14
1.7 Tootmisrakuliinide arendamise tööetapid.....	18
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	20
2.1 Töö eesmärgid.....	20
2.2 Materjal ja meetodika	21
2.2.1 gRNA disain	21
2.2.2 Rakuliinid ja söötmed.....	21
2.2.3 gRNA/Cas9 ribonukleiinkompleksi moodustamine ja transfektsioon elektroporatsiooni meetodil	22
2.2.4 CHO rakkude lüüsimine <i>Hot Shot</i> meetodil.....	22
2.2.5 T7 endonukleas I analüüs	22
2.2.6 CHO rakkude kloneerimine.....	24
2.2.7 CHO-S GS KO kloonide skriinimine	24
2.2.8 Mutantsete kloonide molekulaarne iseloomustamine.....	24
2.2.9 <i>Western blot</i> (WB) analüüs	25
2.3 Tulemused ja arutelu.....	26
2.3.1 <i>Guide</i> RNA-de valimine.....	26
2.3.2 CRISPR/Cas9 meetodi edukuse hindamine T7 endonukleasse analüüsiga.....	28

2.3.3	Potentsiaalsete CHO GS KO kloonide väljasõelumine.....	31
2.3.4	Kloonide <i>glul</i> geenis toimunud modifikatsioonide kirjeldamine polümeraasi ahelreaktsiooni ja Sangeri sekveneerimise abil.....	32
2.3.5	CHO-S GS KO rakukloonide fenotüübi kirjeldamine.....	35
KOKKUVÕTE		39
SUMMARY		40
TÄNUSÕNAD		41
KIRJANDUSE LOETELU.....		42
KASUTATUD VEEBIAADRESSID		46
LIHTLITSENTS.....		47

KASUTATUD LÜHENDID

Ab – antibiootikum

BER – lämmastikaluste väljalõike reparatsioon (*base excision repair*)

BHK – hamstripoja neerurakud (*baby hamster kidney*)

Cas9 – CRISPR *associated protein 9*

CHO – hiina hamstri munasarja rakud (*Chinese hamster ovary*)

CRISPR – klasterdatud regulaarsete vahedega lühikesed palindroomsed kordused (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*)

CrRNA – CRISPR RNA

DHFR – dihidrofolaaadi reduktaas

DSB – DNA kaheahelaline katke (*double-Strand Break*)

GOI – huvipakkuv geen (*gene of interest*)

gRNA – *guide* RNA

GS – Glutamiini süntetaas

HDR – homoloogiliselt suunatud parandus (*homology-directed repair*)

HRP – mädarõika peroksidaas

IgG – Immuunglobuliin G

KO – Välja lülitatud (*knockout*)

MSX – metioniin sulfoksimiin

MTX – metotreksaat

NHEJ – mittehomoloogne DNA-otste ühendamine (*non-homologous end joining*)

PAM – *protospacer adjacent motif*

ZFN – tsinksõrme nukleas (*zinc-finger nucleases*)

TALEN – transkriptsiooni aktivaatori sarnane efektornukleas (*transcription activator-like effector nuclease*)

TracrRNA – transaktiveeriv RNA

UTR – mittetransleeritav järjestus (*untranslated region*)

Wt – metsiktüüp (*wild-type*)

WB – *Western blot*

T7EI – T7 endonukleas I

NS0 – hiire müeloom

glul – Glutamaadi-ammooniumi ligaas (*Glutamate-Ammonia Ligase*)

SISSEJUHATUS

CHO rakud oma unikaalsete omaduste tõttu on üks põhilisi biofarmaatsiatööstuses kasutatavaid imetaja rakuliine, millega toodetakse suurtes kogustes terapeutilisi rekombinantseid valke (eelkõige monoklonaalsete antikehade, erinevate kasvufaktorite ja ensüümide) tootmiseks. Üks olulisemaid etappe terapeutiliste valkude tootmises ning arenduses on stabiilsete super-produktant rakuliinide loomine. Rekombinantse valgu kõrge tootlikkus on vajalik tagamaks piisaval hulgal materjali nii ravimite tootmiseks, prekliinilisteks kui ka kliinilisteks katsetusteks. Peamine väljakutse super-produktant rakuliinide arenduses on harvaesinevate stabiilsete kõrge valgu tootlikkusega rakukloonide isoleerimine madala ekspressiooni tasemega kloonide hulgast. See viib tihti vajaduseni läbi analüüsida sadu kuni tuhandeid individuaalseid kloonide, et identifitseerida soovitud tootlikkusega super-produktant rakuliine, mis on äärmiselt töömahukas ja aeganõudev protsess. Kõrge produktiivsusega rakukloonide isoleerimise edukus sõltub eelkõige selektsioonitingimuste efektiivsusest. Selektiooniga tuleb tagada, et rekombinantse valgu ekspressiooni konstruktiga transfekteeritud rakukultuurist elimineeritaks lisaks transfekteerumata rakkudele ka madala ekspressioonitasemega rakud. Rekombinantsete CHO rakuliinide arendamisel rakendatakse metaboolset selektsioonisüsteemi, mis põhineb metioniin sulfoksimiini abil glutamiini süntetaasi aktiivsuse inhibeerimisel, põhjustades seeläbi rakkude surma. Seetõttu selektiivsetes tingimustes jäävad ellu ainult need rakud, mis ekspresseerivad piisaval hulgal selektsioonimarkerit ehk glutamiini süntetaasi, mille ekspressioon on omakorda seotud huvipakkuva rekombinantse valgu omaga. Kuna CHO rakkudes on endogeenne GS geen funktsionaalne, siis see võimaldab osadel madala tootlikkusega resistentsematel rakkudel ellu jääda isegi MSX-i juuresolekul (Sanders ja Wilson, 1984). See muudab kõrge tootlikkusega rakukloonide isoleerimise selekteeritud rakukultuurist oluliselt töö- ja ajamahukamaks. Seega geneetiliselt muundatud CHO rakuliiniga, millel puudub glutamiini süntetaasi aktiivsus tänu GS geeni inaktiveerimisele, on GS-põhise selektsiooni efektiivsus suurem ning seetõttu ka super-produktant rakuliinide arendamine oluliselt tõhusam.

Käesolev bakalaureusetöö on valminud biotehnoloogia ettevõttes *Icosagen Cell Factory* OÜ ning selle põhieesmärk oli luua mittefunktsionaalse glutamiini süntetaasi geeniga CHO rakuliin, mis oleks sobiv edasiseks stabiilsete super-produktant rakuliinide arendamiseks. Bakalaurusetöö teoreetilises osas antakse ülevaade terapeutiliste valkude tootmisest imetajate rakuliinides ning CHO rakuliini omadustest. Eksperimentaalses osas kirjeldatakse mittefunktsionaalse glutamiini süntetaasi geeniga CHO-S rakuliini arendusetappe.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Rekombinantsete valkude ja ravimite tootmine imetajarakkudes

Tänapäeval on terapeutilistel valkudel põhinevate preparaatide meditsiiniline rakendamine kasvav trend. Rekombinantsetel valkudel põhinevaid ravimeid on arendatud mitmete haiguste vastaseks võitluseks, sealhulgas kasvajate, autoimmuunhaiguste, nakkushaiguste ja geneetiliste haiguste raviks (Lagassé jt., 2017). Terapeutilistel valkudel on oluline roll meditsiinisüsteemis juba 1880. aastast, kui avastati esimene bakteri *Corynebacterium diphtheriae* vastane antitoksiin Emil von Behringu poolt. Behringu avastatud vereseerum, mida kasutati difteeria ravis, sisaldas antikehi, mis ei tapnud bakterit, kuid neutraliseeris bakteri toodetud toksiini. Antiseerumist edasi vaktsiini väljatöötamisel puutus Behring kokku bioloogiliste ravimite tootmise takistustega, milleks on väike tootmismahd, inimorganismis tekkiv immuunvastus ning preparaadi kvaliteedi kõikumine (Kaufmann, 2017).

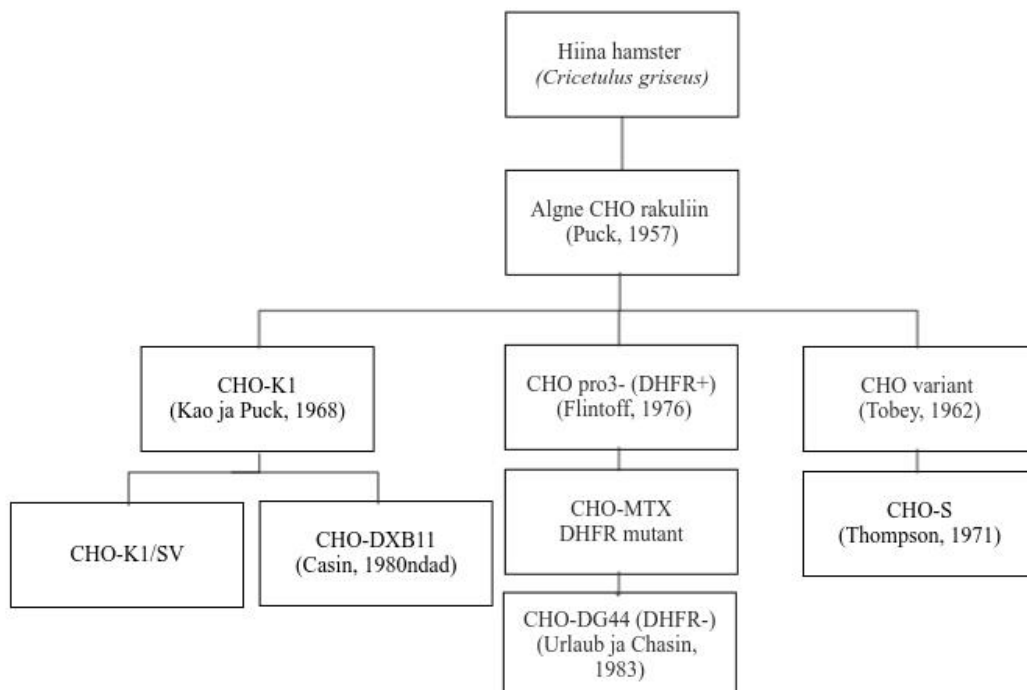
Ka tänapäeval on bioloogiliste ravimitööstuse üheks suurimaks väljakutseks tõhusa tootmisprotsessi tagamine. Tõhususe tagamiseks on vaja kõrge tootlikkusega ekspressioonisüsteeme, mis sobivad kokku toodetavate molekulidega. Tootmiseks kasutatakse erinevaid mudeleid alates bakteritest ja pärmidest lõpetades taime ning imetaja rakkudega. Mikroorganismid on odavad ning kiire kasvuga, kuid vajadus imetajarakkude järele on püsinud. Imetajarakkude eeliseks on post-translatsioonilised modifikatsioonid ning valkude pakkimine, mis teevad toodetud biomolekulid inimorganismile vastuvõetavamateks ning tagavad nende efektiivsuse haiguste vastases võitluses (Fan jt., 2013).

1.2 Hiina hamstri munasarja rakuliinid

Hiina hamstri (*Cricetulus griseus*) munasarja rakke (CHO) kasutatakse mudelorganismina meditsiinilistes ja bioloogilistes katsetustes ning terapeutiliste valkude tootmises. Imetajate rakke kasutatakse stabiilsete ning inimorganismile sobiva konformatsiooniga valkude saamiseks, mida saab rakendada haiguste vastase ravi eesmärgil.

CHO rakuliin arendati 1957. aastal Dr. Theodore Pucki laboris. Rakuliin saavutati 0,1 grammist hiina hamstri munasarja koest (Wurm, 2013), kuid sellest ajast alates on CHO rakuliini pidevalt edasi arendatud (joonis 1). Rakuliini arenduses võib eristada kolme peamist haru: CHO-K1, CHO DHFR (dihüdrofolaadi reduktaas) mutandid ning CHO-S vedelkultuur (joonis 1). Üks esimestest mutatsioonianalüüsi läbinud alamliinist, CHO-K1, arendati algsetest Pucki

kloneeritud CHO rakkudest (Wurm, 2013). CHO-K1 rakuliinil puudub kromosoom, kus asub glütsiini biosünteesiks oluline geen. See oli ka üks esimesi samme selektsioonimetoodika edendamiseks CHO rakuliinis.



Joonis 1. CHO rakuliinide arendamise põhisuunad. Hiina hamstri munasarja rakkudest arendas Puck algse CHO rakuliini. CHO rakuliini on edasi arendatud kolmes suunas: 1) CHO-K1 (puudub glütsiini biosünteesiks oluline geen), millest on edasi arendatud CHO-K1/SV, CHO-K1 (rakud suudavad kasvada loomsete komponentide vabas söötmes) ning CHO-DXB11 (defektne DHFR geen). 2) CHO pro3- (vajab kasvusöötmes proliini), millest on edasi arendatud DHFR-puudulikud mutandid. 3) CHO variant, millest on arendatud CHO-S vedelkultuur. Sulgudes on märgitud rakuliini arendaja ning aasta. Joonis on kohandatud Lewis jt. (2013) järgi.

Juba 1971. aastal arendati CHO-S rakuliin, mis on suuteline kasvama vedelkultuurina. CHO-S rakuliin võimaldab rakke kasvatada suurtes mahtudes ning sellega saadi tootmine viia bioreaktoritesse (Lewis jt., 2013)

Selektsiooni meetodikate arengu märkimisväärseks näiteks on 1980ndatel CHO-K1st arendatud CHO-DXB11, mis oli esimene laialdasema biotehnoloogilise rakenduse leidnud CHO rakuliin. Selles rakuliinis oli deleteerunud DHFRi lookus ning teises lookuses oli toimunud missense mutatsioon (Wurm, 2013). DHFR kodeerib ensüümi

dehüdrofolaatreduktaas ning DHFR-puudulik rakuliin ei ole suuteline tetrahüdrofolaati konverteerima dihüdrofolaadiks, mis on oluline nukleiinhapete sünteesis ning raku elutegevuseks hädavajalik (Jedrzejczak-Silicka, 2017). DHFR-puudulikud kultuurid ei ole suutelised kasvama tümidiini puudumisel, kui rakkudesse ei viida funktsionaalset DHFR geeni. Transfekteerides DHFR geen koos huvipakkuva geeniga (*gene of interest* – GOI) on tõenäoline, et ellujäänud rakkudes on lisaks DHFR-ile ka GOI genoomi sisenenud ning ekspresseerub raku (Wurm, 2013). CHO-DXB11 suurimaks puuduseks on juhuslikud muutused genoomis, mis võisid taastada DHFR aktiivsuse. Selle tulemusel ei ole selektsioonisüsteem optimaalne.

1983. aastal arendati CHO-DG44 rakuliin, mille eellaseks on CHO-pro3. CHO-pro3 näol on tegemist kasvusöötmes proliini olemasolust sõltuva rakuliiniga. CHO-DG44 rakuliinis on mõlemad DHFR lookused deleteerunud (Molecular Devices). See muudab rakuliini stabiilsemaks ning selektsioonisüsteemi efektiivsust ei mõjuta genoomis toimuvad juhuslikud mutatsioonid, mis DHFR aktiivsuse taastada võiksid. Tänu sellele leidis CHO-DG44 laialdast kasutust biotööstustes. CHO DHFR ekspressioonisüsteem on üks laialdasemalt kasutatud imetajate rakuliin suuremahuliseks rekombinantsete valkude tootmiseks (Chusainow, 2009).

Vajadus uute selektsioonisüsteemide järele viis CHO-K1SV rakuliini arendamiseni. CHO-K1SV rakuliini arendati ettevõtte Lonza Biologics poolt ning tegemist on vedelkultuuriga, mille puhul kasutatakse glutamiini süntetaasi (GS) põhiselektiooni. Nendes rakkudes ekspresseerub ka endogeenne GS ning endogeense GS inhibeerimiseks kasutatakse söötmes GS inhibiitorit metioniin sulfoksimiin (MSX). Transgeenina sisseviidud GS ekspressioon, lisaks endogeensele GS aktiivsusele, tagab raku ellujäämise MSX juuresolekul, kuna ensüümi ekspresseeritakse piisavas koguses, et ületada MSX inhibeeriv mõju (Edmonds jt., 2006).

Lisaks arendati CHO-K1-st ekspressioonisüsteem, mille puhul saab rakke kasvatada keemiliselt määratletud loomsete komponentide vabas söötmes. See aitab optimeerida tootmistingimusi, et suurendada rakuliini tootlikkust ja lihtsustada rekombinantsete saaduste puhastamist (Crossley jt., 2010).

Hiina hamstri munasarja rakkudel on mitmeid eeliseid teiste tootmissüsteemide ees. Järgnevad omadused on peamised põhjused, miks kasutatakse CHO rakke terapeutiliste valkude tootmises ning omadused 1 kuni 4 on CHO suurimad eelised bakteri- ja pärmikultuuride ees (Kim jt., 2012):

- 1) need on suutelised kasvama suspensioon-vedelkultuurina, mis on ideaalne suuremahuliseks tootmiseks;

- 2) CHO rakkudega on madal risk potentsiaalsete patogeenide, näiteks viiruste, ülekandumiseks inimesele. Viiruste mitte levimise tagab piisav erinevus peremeesorganismide vahel;
- 3) CHO rakke saab kasvatada seerumvabas ja kindla keemilise koostisega söötmes. See aitab tagada ohutu ja standardiseeritud tootmisprotsessi;
- 4) imetaja rakuliinides esineb posttranslatsiooniline modifitseerimine, mis suurendab tõenäosust, et toodetud rekombinantsed valgud säilitavad oma aktiivsuse ka inimorganismis. Eriti oluliseks posttranslatsiooniliseks modifikatsiooniks on glükoproteiinide glükosüülimine, mis teeb CHO toodetud valgud inimestele sarnasemaks kui seda on bakterites ja pärmides toodetud valgud;
- 5) CHO on suhteliselt kõrge tootlikkusega, mida saab mõjutada rakuliini geneetiliste modifikatsioonidega ning tootmistingimuste optimeerimisega;
- 6) Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Raviamet (*Food and Drug Administration FDA*) on andnud loa CHO rakuliinide kasutamiseks terapeutiliste valkude tootmiseks. CHO rakuliine on kasutatud pea 50 bioloogilise ravimi tootmiseks, mille kasutamiseks on väljastatud luba nii Ameerika Ühendriikides kui ka Euroopas (Pohl, 2020).

Esimene terapeutiline valk, rekombinantne koe-tüüpi plasminogeeni aktivaator tPA toodeti 1986. aastal immortaliseeritud hiina hamstri munasarja rakkudes (Wurm, 2004). CHO kultuure kasutatakse paljude farmatseutiliste valkude tootmiseks, mille hulgas on näiteks Epogen (erütropoetiin), ENBREL (tuumor nekroosifaktori- α inhibiitor, TNF inhibiitor) ja HERCEPTIN (rinnavähi ravis kasutatav antikeha) (Jedrzejczak-Silicka, 2017).

1.3 Selektiooni meetodid rakuliinide arendamisel

Üheks oluliseks eelduseks super-produktants rakuliinide saamiseks on edukas selektsioon, mille käigus eraldatakse valku tootvad rakud mittetootvatest. Selektiooniga määratakse genoomi modifitseerimise edukus (Mortensen ja Kingston, 2009). Imetaja rakuliinide ekspressiooni vektorid võivad sisaldada selektsioonimarkereid, mille valik on väga lai. Suurt kasutust on leidnud nii metaboolne kui ka antibiootikumidel (ab) põhinev selektsioon (Strohl ja Strohl, 2012).

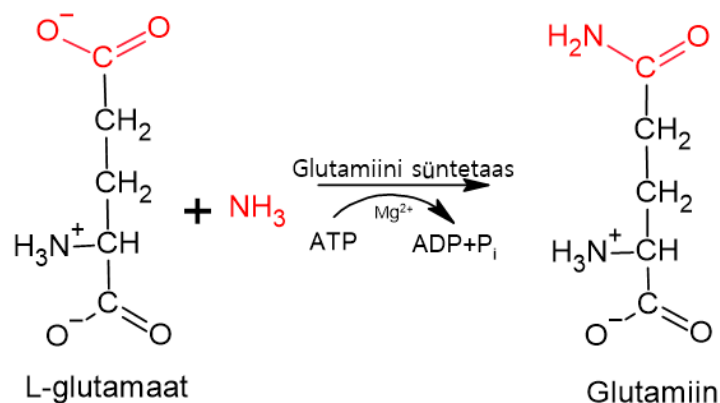
Ab selektsioon toimib, kui huvialuse geeniga viiakse genoomi ka antibiootikumi resistentsust tagav marker. Transfekteritud rakud, kuhu on resistentsust tagav geen (ja sellega koos eeldatavalt ka lingitud huvipakkuvat valku ekspresseeriv geen (GOI)) genoomi integreerunud,

jäävad ellu söötmes, mis sisaldab antibiootikumi, kuid rakud, milles antibiootikumi resistentsusgeen ei ole, hukuvad. Antibiootikumidel põhineval selektsioonil on mitmeid puuduseid. Üheks miinuseks on selektsiooniprotsessile kuluv aeg, mis võib ulatuda kuude pikkuseks (Mortensen ja Kingston, 2009). Veelgi olulisem on, et enamusel antibiootikumide põhistel selektsioonimarkeritel puudub heakskiit kasutamiseks terapeutiliste valkude tootmiseks. Põhjuseks on võimalik horisontaalne geeniülekanne mikroobidele, mille tulemusena võib suurened ravimresistentsete patogeenide levik (Mignon, jt., 2015).

Metaboolseks selektsiooniks kasutatakse rakule eluliselt olulisi metaboolseid radu. CHO rakuliinides enim kasutatavad metaboolsed markerid on DHFR ja GS. Nende ensüümide inhibeerimiseks kasutatakse spetsiaalseid kemikaale metotreksaat (MTX), mis inhibeerib DHFRi ja MSX (GS inhibeerimiseks) (Lai jt., 2013).

1.4 Glutamiini süntetaas selektsioonimarkerina

GS on mitokondriaalne ensüüm (Blanco ja Blanco, 2017), mis katalüüsib L-glutamaadi ja ammooniumi konverteerimist glutamiiniks (Eelen, 2018). Glutamiini süntetaas kiirendab peptiidside tekkimist ammooniumi ja glutamaadi vahele sidudes L-glutamaadi karboksüülrühma ja ammooniumi aminorühma (joonis 2). Reaktsiooni toimimiseks on vaja aktivaatoriks divalentseid metalli ioone. *In vivo* on reaktsiooni aktivaatoriteks Mn^{2+} või Mg^{2+} . GS biokeemiline rada on ATP (adenosiintrifosfaadi) sõltuv ehk reaktsioonienergia saadakse ATP hüdrolyüsist (Weatherburn jt., 2003).



Joonis 2. Glutamiini süntetaasi biokeemiline rada. Joonisel on näidatud punasega L-glutamaadi karboksüülrühm, ammoonium (NH_3) ning glutamiini süntetaasi katalüüsitud glutamiini peptiidsideme teke. Ensüümi GS aktivaatoriks on divalentne metalli ioon (Mg^{2+}) ning reaktsioonienergia saadakse adenosiintrifosfaadi (ATP) hüdrolyüsist.

Glutamiini süntetaas on leidnud laialdast kasutust kui metaboolse selektsioonimarker paremate tootmisliinide saamiseks. Algselt kasutati glutamiini süntetaasil baseeruvat selektsiooni rakuliinides, mille GS aktiivsus oli puudulik. NS0 (hiire müeloomi) rakuliini, kus ei ekspresseerunud GS, viidi koos huvialuse geeniga ka glutamiini süntetaasi selektiivne markergeen. Selle tulemusel sai isoleerida transgeeni ekspresseerivad rakud glutamiinivaba söötmega.

GS põhinevat metaboolset selektsiooni kasutatakse ka rakuliinides, kus on aktiivne GS geen olemas. Sellised rakuliinid on näiteks CHO ja BHK (hamstripoja neerurakud). Varasemalt kasutati GS geeni üleekspresseerivaid rakuliine ning selektsiooniks rakendati GS inhibiitorit MSX, mis on glutamaadi analoog ning see toimib GS-i pärssivalt kinnitades ensüümi glutamaadi seondumise saiti (Fan jt., 2013). Geeni lisakopia suurendab GS aktiivsust, mille tulemusena ei avalda MSX pärssiv toime nii suurt mõju rakule kuna GS ekspresseeritakse suuremas hulgas. Ainult endogeense GS-ga rakud hukuvad, sest nende valgu ekspressioon ei ole nii kõrge, et vastu pidada MSX inhibitsioonile. MSX inhibitsioon on pöördumatu protsess, mille käigus blokeerib MSX glutamaadi sisenemise ensüümi aktiivtsentri (Ronzio ja Meister, 1968). MSX-il põhinev GS selektsioon on võrdlemisi ebatõhus, kuna ka madala tootlikkusega rakud võivad ellu jääda kõrgete MSX kontsentratsioonide juures (Sanders ja Wilson, 1984).

Glutamiini süntetaasil baseeruvat selektsiooni aitab tõhusamaks muuta endogeense GS väljalülitamine (Fan jt., 2013). Geeni välja lülitamiseks on arendatud mitmeid meetodeid, kus

kasutatakse erinevaid nukleaase, näiteks tsinksõrme nukleaase (ZFN-e), transkriptsiooni aktivaatori sarnaseid efektornukleaase (TALEN-e) või CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas9 (CRISPR associated protein) süsteemi (Fan jt., 2013).

1.5 Hiina hamstri munasarja rakkude glutamiini süntetaasi *glul* geen

Glul (Glutamaadi-ammooniumi ligaas) geen on oluline, et organismis toota ensüümi nimega glutamiini süntetaas. Hiina hamstri munasarja rakkude *glul* (UNIPROT ID: P04773) geen asub 5. kromosoomis, on umbes 7500 aluspaari pikk ning selles on 7 eksonit (UNIPROT). Valku kodeeriv järjestus algab 2. eksonis, mis kodeerib β -grasp domeeni, mis on oluline substraadi seostumisel ensüümiga (Burroughs jt., 2007). Katalüütilise domeeni kodeeriv järjestus on 4. eksonis.

1.6 Geeni väljalülitamine CRISPR-Cas9 meetodiga

CHO-S rakkude modifitseerimisel kasutasime CRISPR/Cas9 süsteemi. CRISPR on bakterite ja arhede immuunsüsteemi mehhanism, mis on kohandatud eukarüootide geenide töötlemiseks (Thurtle-Schmidt ja Lo, 2018).

CRISPR on ingliskeelne lühend, mis tuleb väljendist *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ehk klasterdatud regulaarsete vahedega lühikesed palindroomsed kordused. CRISPRit kasutavad bakterid ja arhed kaitsemehhanismina sissetungiva võõr-DNA eest. CRISPR süsteem on prokariootides adaptiivne immuunsus ehk organism omandab faagi spacer regioonid elutsükli jooksul. Organismidel kokkupuutes patogeense DNA-ga jääb meelde, kes teda ründas ja kuidas võõras DNA edukalt hävitada nii, et organismil suureneks ellujäämise võimalus (Barrangou, 2015).

2007. aastal näitas Barrangou rühm, et *Streptococcus Thermophilus* suudab tõrjuda bakteriofaage ehk bakterite viiruseid integreerides CRISPR lookusesse ründava viiruse genoomi fragmendi. Tänu sellele aktiveerub bakteris mehhanism, kus lookused transkribeeritakse ning genereeritakse väikesed crRNAd (CRISPR RNA). CrRNAsid saab kasutada endonukleaside suunamiseks sissetunginud DNA vastu. Eksonukleasid tunnevad võõra DNA ära tänu järjestuse komplementaarsusele (Reis jt., 2014). Tundes ära DNA

korduseid ja järjestuses esinevaid mustreid suudab bakterite primitiivne immuunsussüsteem meeles pidada viirusliku DNA järjestusi (Fernandez, 2018).

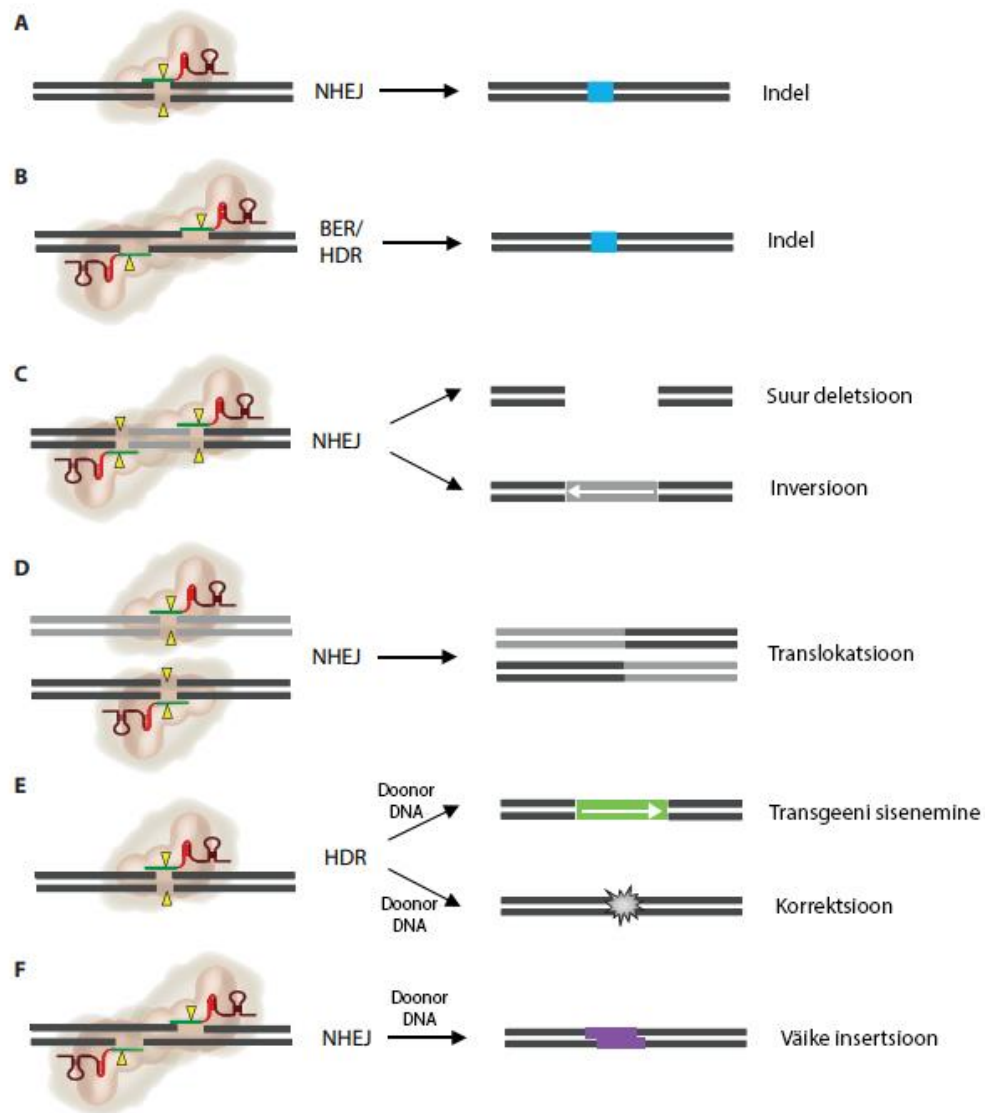
Laboratoorselt on CRISPR süsteem laialdast kasutust leidnud selle suunatavuse, paindlikkuse, suhtelise lihtsuse ja kiiruse pärast. Cas9 endonukleas tekitab DNA-sse kaheaheelalisi katkeid (*double stranded break* - DSB), mida rakus parandatakse mittehomooloogse DNA-otste ühendamise (*non-homologous end joining* – NHEJ). NHEJ on veaohalik ehk teeb palju vigu ligeerimise käigus, mis põhjustab sihtmärkjärjestuses insertioone ja deletsioone (indel mutatsioone) (joonis 3A) (Lee jt., 2015). Indel mutatsioonid võivad põhjustada kodeeriva järjestuse raaminihkeid, mis häirivad normaalset translatsiooni ning muudavad geeni mitte funktsionaalseks (Lee jt., 2015). Tegemist on toimiva meetodiga geenide suunatud inaktiveerimiseks.

Lisaks tavapärasele kaheaheelalistele katketele saab Cas9-ga tekitada ka üheaheelalisi katkeid. Sellistel Cas9 nukleasidel on ainult üks aktiivne domään, mis saab lõigata DNA ühte ahelat. Üheaheelalisi katkeid parandatakse homoloogiliselt suunatud parandustega (HDR) või lämmastikaluste väljalõike reparatsiooniga (BER). HDR ja BER teevad vähem vigu kui NHEJ ning tekitavad väiksema tõenäosusega mutatsioone sihtmärkjärjestuses (Lee jt., 2015). Indel mutatsioonide tekkimiseks tuleb eraldi mõlemale ahelale tekitada sälk. Parandades kahte üheaheelalist katket võib esineda vigu, mis viivad mutatsioonide tekkimiseni (joonis 3B).

Suuremaid deletsioone ja inversioone tekitavad kaks samaaegset kaheaheelalist katket genoomis, mis on parandatud NHEJ kaudu (joonis 3C). Translokatsiooni ehk ümberpaigutumise esile kutsumiseks tuleb tekitada DNA kaheaheelalisi katkeid erinevatesse kromosoomidesse, mis on samuti parandatud NHEJ kaudu (joonis 3D) (Lee jt., 2015).

DNA kaheaheelalist katket saab parandada ka doonor DNA abil, kuhu on viidud transgeen. Rakendades täpsemat DNA parandamise viisi HDR, saab doonor DNA transgeeni sisse viia või korrigeerida genoomi kasutades doonor DNA järjestust (joonis 3E). Genoomi korrigeerimiseks peab doonor DNA järjestus erineva genoomist, mida töödeldakse (Lee jt., 2015).

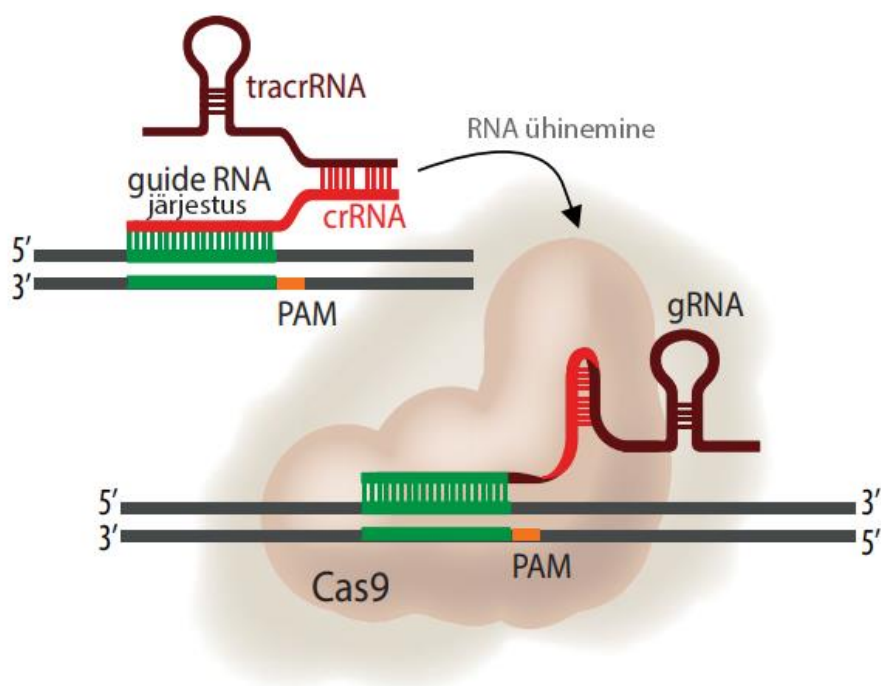
Üheaheelaliste katkete parandamisel saab lühikesi insertioone esile kutsuda kui kasutada doonor DNAd, mis liidetakse NHEJ meetodil (joonis 3F). Katkete parandamine NHEJ meetodil on paindlik. Samuti ei ole NHEJ meetod piiratud S ja G2 rakutsükli faasidega nagu seda on HDR (Huertas, 2010).



Joonis 3. CRISPR/Cas9 rakendamine genoomi modifitseerimisel. Joonisel on näidatud, kuidas mittehomoogse DNA-otste ühendamise (NHEJ) saavad geenid tekkida insertioonid või deletsioonid (indel mutatsioonid) (A), suured deletsioonid ning inversioonid (C) ning translokatsioonid (D). Homoloogiliselt suunatud parandustega (HDR) või lämmastikaluste väljalõikereparatsiooniga (BER) võib tekkida samuti indel mutatsioone (B). Koos doonor DNA järjestusega saab HDR mehhanismiga integreerida transgeeni või korrigeerida genoomi (E). NHEJ parandus koos doonor DNA järjestusega võib tekitada väikeseid insertioone (F). Joonis on kohandatud Lee, jt (2015) järgi.

Seega saab CRISPR meetodit kasutada geeni kodeeriva järjestuse muutmiseks. Kodeeriva järjestuse modifikatsioonidega võivad tekkida mutatsioonid, mille tulemusena ei suuda rakk soovitud valku ekspresseerida ning geen kaotab oma funktsionaalsuse ehk lülitub välja. Iga geenile tuleb disainida spetsiifilised crispr RNA (crRNA) molekulid, mis on 17 kuni 20 nukleotiidi pikkused (Wu jt., 2014). Eelistatud on suure spetsiifilisusega crRNA järjestused.

Molekulide spetsiifilisust aitab hinnata genoomis esinevate mittespetsiifiliste sihtmärkide (*off-target*) arv, et vähendada soovimatut mõju teistele geenidele. Mittespetsiifilised sihtmärgid on genoomis asuvad ning soovitud sihtmärgile sarnased DNA järjestused, kuhu gRNA (guide RNA) võib samuti seonduda, mille tulemusel löikab nukleas ka soovimatust genoomi piirkonnast. Cas9 on ainus valk, mida on vaja sihtmärkjärjestuses DNA kaksikahelasse katkete tegemiseks (Lee jt., 2015). Selleks, et Cas9 tunneks ära oma sihtmärk järjestuse on vaja märklauaga komplementaarset järjestust crRNA-d ja PAM- (*protospacer adjacent motif*) järjestust, mis asub sihtmärk-DNA järjestuses crRNA seondumiskoha juures. PAMid on lühikesed, spetsiifilisi motiive sisaldavad (antud töös 3 nukleotiidi pikkused) järjestused, mis asuvad 3 – 4 nukleotiidi kaugusel lõikekohast allavoolu suunal (Shah jt., 2013). TracrRNA (transaktiveeriv RNA) koos crRNA moodustavad gRNA kompleksi, mis suunab Cas9 nukleasi sihtmärk DNA juurde (joonis 4).



Joonis 4. Genoomi modifitseerimine CRISPR/Cas9 mehhanismiga. Joonisel on tähistatud pruuniga transaktiveeriv RNA (tracrRNA) ja punasega CRISPR RNA (crRNA), mille ühinedes moodustub guide RNA (gRNA) kompleks. Rohelisega on näidatud *guide* RNA järjestus, mis on komplementaarne DNA sihtmärkjärjestusega. Sihtmärkjärjestusega seostunud gRNA on indikaator Cas9 endonukleasile sihtmärkjärjestusse DNA kaheahelaliste katkete tekitamiseks. PAM-regioon, mis asub 3-4 nukleotiidi allavoolu nukleasi lõikekohast, on näidatud oranžiga. Joonis on kohandatud Lee jt. (2015) järgi.

Tekitatud katked parandatakse vealdiste mitte homoloogiliste otste liitmisega (NHEJ) või vea vaba homoloogilise otsese parandamise (HDR) abil. NHEJ korral võib tekitada indel kohti ehk insertiooni- või deletsioonimutatsioone. Indel kohad tekivad ligeerimise käigus, kui DNA ahelad on üksteisest eraldunud. Antud muutused järjestuses võivad tekitada raaminihkemutatsioone, mis põhjustavad kodeeriva valgujärjestuse ulatuslike muutusi ja geeni funktsiooni täielikku kõrvaldamist. HDR-i ja homoloogsete külgnevate järjestuste abil saab läbi viia täpset geenide modifitseerimist (Lee jt., 2015).

1.7 Tootmisrakuliinide arendamise tööetapid

Imetajatest pärinevate rakkude, näiteks CHO-põhise, tootmisliini arendamise põhietapid on (joonis 5):

- **Transfektsioon** (Rekombinantne DNA viiakse rakkudesse)

Rakku viiakse ekspressioonivektor, mis sisaldab huvipakkuvat valku, mida soovitakse toota, ekspresserivat geeni ning selektsioonimarkerit. Eeldatav transfektsiooni tulemus on järjestuse stabiilne integratsioon peremeesraku genoomi. Transfektsiooniks kasutatakse bioloogilisi (viirusvektorid), keemilisi (positiivselt laetud osake kinnitub negatiivse raku membraaniga) või füüsikalisi meetodeid (näiteks elektrivälja rakendamisega DNA rakku sisestamist) (Kim ja Eberwine, 2010).

- **Selektsioon** (Valitakse stabiilsed ja sihtmärkvalku tootvad rakud)

Isoleeritakse rakud, kuhu on integreerunud ja milles ekspresseerub selektsioonimarker ja sellega koos eeldatavalt ka huvipakkuva valgu geen (Kirjanduse ülevaade peatükk 1.3).

- **Kloneerimine ja selektsioon** (Valitakse kõrge valgu ekspressiooniga rakud)

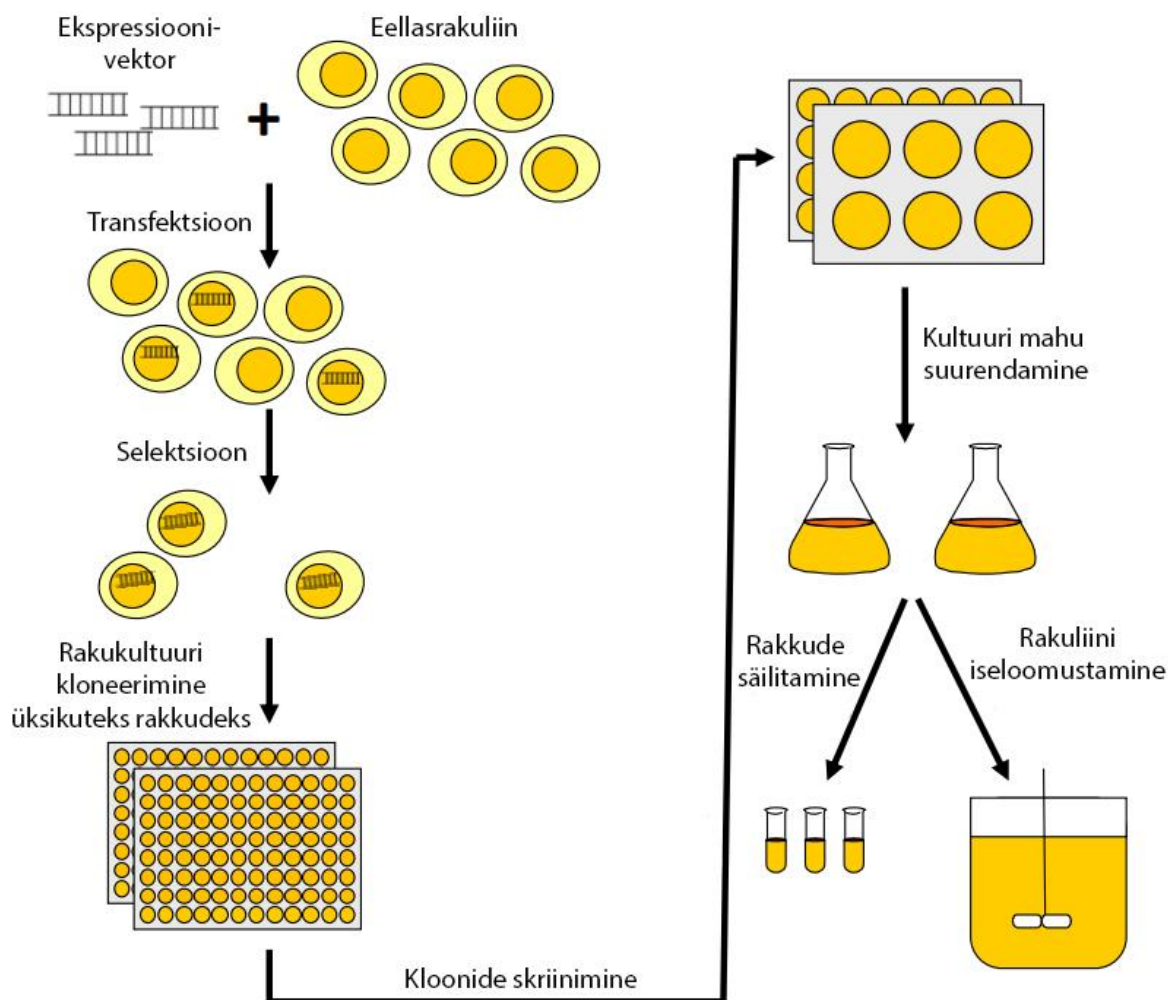
Rakukultuuri lahjendus või üksiku raku kloneerimine on vajalik kuna rakukultuuris võivad olla erineva tootlikkusega rakud. Super-produktentide selekteerimiseks on vajalik hinnata iga klooni eraldi (Lai jt., 2013).

- **Rakuliini iseloomustamine** (Kirjeldatakse iga klooni stabiilsust ja tootlikkust)

Rakuliini iseloomustamisel saab kirjeldada rakukultuuri geneetilist stabiilsust ja valkude ekspressiooni ehk tootlikkust.

- **Rakkude säilitamine, täiendavad katsed**

Rakke säilitatakse pikaajaliselt biopankades lämmastiku keskkonnas $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Täiendavalt teostatakse rakkudega katseid, et hinnata kloonide tootlikkust ning toodetud rekombinantsete valkude kvaliteeti (Lai jt., 2013).



Joonis 5. Imetajarakkudel põhineva tootmisliini arendamise peamised etapid. Esimene etapp on transfektiooniga ekspressioonivektori sisestamine eellasrakuliini. Sellele järgneb seleksioon, millega valitakse sihtmärkvalku ekspresseerivad rakud. Üsikkloonide analüüsiks selektsiooni läbinud rakud kloonitakse (näiteks piirlahendusmeetodiga), et isoleerida ühest rakust pärinevad, e sihtmärkvalku kõrgel tasemel ekspresseerivad kloonid. Valitud kloonidest paljundatud kultuurie paljundatakse. Järgmiseks iseloomustatakse rakuliine nende geneetilise stabiilsuse ja valgu tootlikkuse järgi. Viimase etapina säilitatakse rakuliin biopangas või teostatakse täiendavaid katseid. Joonis on kohandatud Lai jt. (2013) järgi.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

CHO rakud on laialdast kasutust leidnud terapeutiliste rekombinantsete valkude tootmises ning jätkuvalt on püsiv vajadus stabiilsete super-produktant rakuliinide järele. Üheks suurimaks väljakutseks biomolekulide tootmises ja arendamises on kõrge tootlikkusega kloonide eraldamine madalama valgu tootlikkusega rakkudest. Super-produktant arendamine on aeganõudev ja töömahukas protsess, kuna kõrge tootlikkusega rakukloonide isoleerimiseks tuleb analüüsida mitmeid tuhandeid kloonide.

Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärk oli luua mittefunktsionaalse glutamiini süntetaasi geeniga CHO GS KO (*knockout*) rakuliin, mis muudaks stabiilsete super-produktant rakuliinide arendamise oluliselt efektiivsemaks. Selle saavutamiseks keskenduti järgnevatele punktidele:

- sihtmärkjärjestus spetsiifilist gRNA-de disainimine,
- väljalülitatud *glul* geeniga kloonide eraldamine metsiktüüpi rakkudest ja monoklonaalsete rakuliinide saamine,
- väljalülitatud *glul* geeniga monoklonaalsete kloonide genotüübi ja fenotüübi iseloomustamine.

CHO GS geeni vigastamiseks kasutati CRISPR/Cas9 süsteemi ning enne rakkude kloneerimist kontrolliti gRNA/Cas9 valgu indutseeritud mutatsioonide esinemist sihtmärk järjestustes, rakendades T7 endonukleas I põhise mutatsioonide detekteerimise analüüsi. KO rakuliinide monoklonaalsuse saavutamiseks kasutati piirlahjendusmeetodit. Väljalülitatud CHO GS KO kloonide genotüübi kirjeldamiseks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) ja Sangeri sekveneerimist ning fenotüübi iseloomustamiseks *Western blot* meetodit.

2.2 Materjal ja meetoodika

2.2.1 gRNA disain

Väljalülitatud glutamiini süntetaasiga ehk *knockout* rakuliin saadi CRISPR/Cas9 mehhanismiga. gRNA-de disainimiseks kasutati NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) andmebaasi hiina hamstri glutamiini süntetaasi (*glul*) geenijärjestust (Gene ID: 100764163) (NCBI). Kasutades Tefor Crispor (Crispor) ja Synthego CRISPR *Design Tool* (CRISPR *design tool*) veebiprogramme disainiti 20 aluspaari pikkused gRNA järjestused, mille sobivust hinnati kasutades Synthego *Verify Guide* tööriista (*Verify design guide tool*). gRNA-de disainimisel jälgiti järjestuse paiknemist genoomis (sihtmärkjärjestus peab olema kodeerivas alas), PAM regioonide asukohta ja gRNA võimalikke ebaspetsiifilisusest tulenevaid kõrvalekaldeid sihtmärkjärjestuses, mis võivad mõjutada raku elutegevuseks olulisi gene (*off-targetid*). Lõputöös kasutati tabelis 1 välja toodud gRNA-sid.

Tabel 1. Töös kasutatud *guide* RNAd (gRNA). Tabelis on näidatud glutamiini süntetaasi väljalülitamiseks kasutatud gRNA-de sihtmärk järjestused, ekson, milles gRNA sihtmärk asub ning PAM-regioon.

Guide RNA	Sihtmärk järjestus	Ekson	PAM regioon
KO 1	AATGTA CTTGTGCCTGCCCC	2. ekson	AGG
KO 2	UAUAUCUGGGUUGAUGGUAC	2. ekson	CGG
KO 9	GAACAGGAGUAUACUCUGAU	4. ekson	GGG
KO 10	GCACTCGTGTAACGGATAA	4. ekson	TGG

2.2.2 Rakuliinid ja söötmed

Töös kasutati suspensioonikultuuris kasvavat hiina hamstri munasarja rakuliini CHO-S (Invitrogen). Rakke kasvatati 293 SFM II (Gibco) ja CD CHO Medium (Gibco) söötmete segus 1:1 (QMix sööde). Söötmele lisati *GlutaMax*'i (Gibco) lõppkontsentratsiooniga 8 mM, kui ei ole töös välja toodud teisiti. Iga 2 – 3 päeva järel määrati hemotsütomeetri abil rakukultuuri tihedus ja elumus ning lahjendati rakke tiheduseni $3-5 \times 10^5$ elusat rakku milliliitris. Elusate ja surnud rakkude eristamiseks värviti rakke 0,4%-lise trüpaansinisega (Gibco). Rakke kasvatati Kühneri orbitaaloksutil 110 rpm 37°C ja 8% CO₂ sisalduse juures.

2.2.3 gRNA/Cas9 ribonukleiinkompleksi moodustamine ja transfektsioon elektroporatsiooni meetodil

Ribonukleiinkompleksi moodustamiseks lahustati rehüdreeritud gRNAd nukleasivabas vees ning moodustati gRNA/Cas9 kompleks suhtega 9:1. Cas9 lahjendati 0,7 μM 'ni ning gRNA segu 6 μM 'ni DMEM (Gibco) söötmes. Kompleksi moodustamiseks inkubeeriti proove 10 minutit toatemperatuuril.

Eelmisel päeval eksponentsiaalses kasvufaasis olevatesse CHO-S rakkudesse elektroporeetiti moodustatud ribonukleoproteiinkompleks. Üheks transfektsiooniks kasutati 3×10^6 rakku, mis tsentrifugeeriti põhja 5 minutit 200g 20 °C juures ning suspendeeriti 146 μl DMEM söötmes. Elektroporatsiooni küvetti pipeteeriti 250 μl rakususpensiooni koos gRNA/Cas9 kompleksiga. Transfektsiooniks kasutati *BioRad Gene Pulser II* elektroporaatorit pingega 230 V ning mahutavusega 975 μF . Transfekteeritud rakud suspendeeriti värskes söötmes, kanti üle tsentrifugeeritud tuubi ning tsentrifugeeriti 200 g 20 °C 5 minutit. Põhja tsentrifugeeritud rakkudele aspireeriti sööde, rakusade suspendeeriti värskes QMix söötmes ning rakud külvatihedusega 1×10^6 rakku milliliitris lõppruumalaga 3 ml 6-süvendiga koekultuuri plaadile.

2.2.4 CHO rakkude lüüsimine *Hot Shot* meetodil

48 tundi peale transfektsiooni koguti $3,5 \times 10^5$ rakku tsentrifugeeritud 5 minutit 200 g 20 °C põhja. Rakkudele lisati 75 μl värsket aluselist lüüsipuhvrit (10 M NaOH, 0,5 M EDTA pH 8, dH₂O) ning proove inkubeeriti PCR masinas (*Mastercycler Nexus*, Eppendorf) 30 minutit 95 °C juures ning seejärel 15 minutit 4 °C. Proovid eemaldati PCR masinast koheselt peale programmi lõppu ning proovidele lisati 75 μl neutralisatsiooni puhvrit (40 mM Tris-HCl) ning segati ettevaatlikult pipeteerides (Truett jt., 2000).

2.2.5 T7 endonukleas I analüüs

CRISPR/Cas9 süsteemi indutseeritud mutatsioonide esinemist hinnati transfekteeritud rakukultuuri analüüsimisel T7 endonukleas I meetodi abil (Guschin jt., 2010). T7 endonukleasiks analüüsiks võeti 2 μl rakulüüsaati, mis valmistati *Hot Shot* meetodiga (materjal ja meetodika, peatükk 2.2.4) rakkudest 48 tundi pärast transfektsiooni. Kasutades PCR-reaktsiooni, amplifitseeriti gRNA-de sihtmärkjärjestusi sisaldavad DNA piirkonnad,

kasutades selleks tabelis 2 välja toodud PCR praimerite järjestusi ning *Phusion High-Fidelity* PCR komplekti (Thermo Scientific) ning PCR reaktsioonisegu valmistamisel ja reaktsiooni läbiviimisel järgiti tootja poolt soovitatud tööprotokolli. PCR-saaduseid analüüsiti, kasutades agaros-geelelektroforeesi. Saadused puhastati, kasutades komplekti *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit'i* (Zymo Research). Etiidiumbromiidiga värvitud PCR-saadus lõigati geelist välja ning tõsteti 1,5 ml tsentrifuugi tuubi. Lisati 3 mahtu agarosoi lahustavat reagenti ning inkubeeriti 55 °C juures 5-10 minutit; seejärel kanti lahustunud DNA-d kolonni, mis oli asetatud kogumistuubi. Kolonni tsentrifuugiti 60 s 14 000 x g juures. kolonnist läbi tulnud vedelik eemaldati ning kolonni seondunud DNA-d pesti pesemispuhvriga, tsentrifuugides kolonni 30 s, 14 000 x g. Pärast pesemispuhvri jääkide eemaldamist lisati DNA elueerimispuhver ning kolonni tsentrifuugiti 60 s, 14 000 x g. Puhastatud DNA kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriliselt neeldumise järgi 260 nm juures, kasutades seadet *NanoDrop One* (Thermo Fisher).

T7 endonukleas I analüüs teostati 20 µl-s ning ühe reaktsiooni kohta kasutati 200 ng puhastatud PCR produkti, 2 µl 10x NEBuffer 2 puhvrit ning 10 U T7 endonukleas I (New England Biolabs). Enne T7 endonukleas I lisamist reaktsioonisegusse denatureeriti PCR fragmendid ning seejärel „taassulatati“ (inglise keeles *reannealing*) need, kasutades selleks järgnevat termotsükleri (*Mastercycler Nexus*, Eppendorf) programmi: 95 °C 5 min, jahtub -2 °C/s 85 °C'ni, jahtub -0.1 °C/s 25 °C'ni ja seejärel jahutati proovid kiiresti 4 °C'ni. Koheselt lisati reaktsioonisegusse T7 endonukleas I ja inkubeeriti 37 °C juures 15 minutit. Pärast seda pandi proovid jääle ning reaktsioon peatati 2 µl 0,25 M EDTA lisamisega. Proove analüüsiti 1,8% agarosgeelil.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid. Tabelis on välja toodud töös kasutatud praimerite nimetused, järjestused, kas tegemist on pärisuunalise (*forward* - F) või pöördsuunalise (*reverse* - R) praimeriga ning nende seondumiskoht *glul* geenil. Metsiktüüpi geenil amplifitseeritava PCR-produkti suurused on näidatud aluspaarides (bp).

Nimetus	Järjestus		Produkti suurus	Seondumiskoht
cGS_EX2_R2	5' GGGTTGGCTAGGTTAGCAATACTC 3'	R	705 bp	Ekson 2
cGS_EX2_F2	5' AGCTACACAGAAACCGTGTCTC 3'	F		
cGS_EX4_R2	5' AGGAGGCTAGGTCTTTCCTCTTTG 3'	R	714 bp	Ekson 4
cGS_EX4_F2	5' GCGTGCAGATAGGATGAACACTTG 3'	F		

2.2.6 CHO rakkude klonereimine

Klonereimise eesmärk oli saada monoklonaalne CHO-S GS KO. Selleks külvati väljavaliitud gRNA/Cas9 ribonukleiinkompleksiga transfekteeritud rakukultuur 48 tunni möödudes 96-süvendilisele koekultuuri plaatidele piirlahjenduse meetodil (ühe süvendi kohta umbes 1 rakk). Klonereimiseks kasutati 80% värsket QMix söödet ning 20% konditsioneeritud QMix söödet. Konditsioneeritud sööde saadi CHO-S rakuliini kasvatamisel tiheduseni 4×10^6 rakku/ml, mis seejärel tseentrifuugiti 1000 g 16°C juures 30 minutit ning koguti rakukultuuri supernatant. Kloone kasvatati termostaatkapis 37°C ja 8% CO_2 sisalduse juures kuni rakukultuurid olid saavutanud 80-100% konfluentsuse.

2.2.7 CHO-S GS KO kloonide skriinimine

Kui rakukloonid olid saavutanud 80-100% konfluentsuse 96-süvendilistele koekultuuri plaatidel, jagati rakud kaheks – neid kasvatati 48-süvendilistele koekultuuri plaatidel paralleelselt 8 mM GlutaMax'i (Gibco) sisaldavas söötmes või GlutaMaxita QMix söötmes kasvatusruumalas 300 μl . Rakke kasvatati Kühneri loksutil 110 rpm 37°C 8% CO_2 juures seitse päeva ning kloonid, mis ei kasvanud või mille kasv oli pärssitud glutamiini juuresolekuta, tõsteti 6-süvendilistele plaatidele (kasvatusruumalani 2 ml). Rakukloone kasvatati viis päeva ning seejärel viidi läbi teine skriining, kus rakukultuur jagati kaheks ning kasvatati paralleelselt glutamiiniga ja glutamiinita QMix söötmes. Rakukultuurid, mis seitsme päeva pärast glutamiini juuresolekuta ei kasvanud, valiti välja edasiseks iseloomustamiseks.

2.2.8 Mutantsete kloonide molekulaarne iseloomustamine

Valitud kloonide genoomne DNA eraldati *Hot Shot* meetodil (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.4) ning kasutades PCR meetodil amplifitseeriti ekson 2 ja 4 gRNA-de sihtmärkjärjestusi sisaldavad DNA piirkonnad, kasutades tabelis 2 väljatoodud PCR praimereid. PCR'il kasutati *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific) ning programmi ja reaktsioonisegu valmistamisel järgiti tootja poolset protokollit (ThermoScientific, 2020). PCR produktid klonereeriti tömpide otstega klonereimisvektorisse pJET1 kasutades CloneJET klonereimiskomplekti (Thermo Scientific). Klonereimisel järgiti tootja poolset protokollit (Thermo Sientific, 2019). Mutatsioonide kirjeldamiseks sekveeriti iga rakuklooni kohta kuus

kuni neliteist sõltumatut bakteriklooni, kasutades Tartu Ülikooli Eesti Biokeskuse tuumiklabori sekveneermisteenust.

2.2.9 *Western blot* (WB) analüüs

Glutamiini süntetaasi valgu ekspressiooni hindamiseks kasutati *Western blot* meetodit. Et analüüsitavad proovid sisaldaksid ligikaudselt võrdset kogust totaalset valku, loeti enne valguanalüüsi hemotsütomeetri abil rakud. Võrdne kogus rakke tsentrifugeeriti põhja 200 g juures 5 minutit ning rakud lüüsi 2x *Laemmli* puhvris (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% broomfenoolsinine, 20% glütserool). Lüsate inkubeeriti 100°C juures 10 minutit ning tsentrifugeeriti 11 000 g 10 minutit. 70 000 raku lüsate lahutati geelelektroforeesil 10% SDS-poliakrüülamiidgeelis. Geelis olevad valgud kanti 0,45 µm poori läbimõõduga PVDF filtrile *Immobilon* (Millipore) *SemiDry* puhvris (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% etanool) poolkuivas ülekande aparaadis (BIO-RAD Trans-blot SD) pingel 15 V 25 minuti jooksul. Filtrit blokeeriti 5% lõssipulbri ja 0,1% Tween20 PBS-lahuses üks tund. Seejärel inkubeeriti filtrit tunda aega 2% lõssipulbri ja 0,1% Tween20 PBS-lahuses spetsiifilise glutamiini süntetaasi vastase antikeha (lahjendus 1:5000) (ab49873) juuresolekul. Järgmisena pesti filtrit 3x15 minutit pesulahusega (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20), millele järgnes filtri inkubeerimine peroksüdaasiga konjugeeritud küüliku IgG-vastase antikehaga (lahjendus 1:6000) (abcam) 2% w/v lõssipulbri ja 0,1% Tween20 PBS-lahuses 1 tunni jooksul. Filtrit pesti 3x5 minutit pesulahuses (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20) ning signaali detekteerimiseks kasutati TMB lahust (TMB Solution I, Biopanda Diagnostics)

2.3 Tulemused ja arutelu

Kõrge tootlikkusega produtsentrakuliinide isoleerimise edukus sõltub eelkõige selektsioonitingimuste efektiivsusest, mis tagavad ainult kõrge produktsioonivõimega rakkude ellujäämise. Rekombinantsete CHO rakuliinide arendamisel rakendatakse laialdaselt metaboolset GS selektsioonisüsteemi. Metsiktüüpi CHO-S rakuliin suudab endogeense glutamiini sünteesivõime abil kasvada ka glutamiinita söötmes. Endogeense GS mõju vähendamiseks kasutatakse rakkudes GS aktiivsust inhibeerivat ühendit MSX, muutes seeläbi rakkude ellujäämise eksogeensest glutamiini süntetaasist sõltuvaks. Endogeense GS ekspressiooni tõttu jäävad kirjeldatud selektsioonitingimuste juures ellu ka madala tootlikkusega rakud ning lisaks mõjutab see rekombinantse rakuliini stabiilsust. Kirjanduse põhjal võib väita, et mõningad resistentsemad CHO rakud on võimelised ellu jääma isegi kuni 5 mM MSX-i juuresolekul (Sanders ja Wilson, 1984). Osadel juhtudel on ka täheldatud, et rakkude selektsioonil negatiivse kontrollina (plasmiidse DNA-ta transfekteeritud rakud) kaasatud kultuur on võimeline pikema aja möödudes adapteeruma rutiinselt kasutatava MSX-i kontsentratsiooni (50 μ M) juures (Fan jt., 2011) (Fan jt., 2013). MSX tolerantsuse vähendamiseks ei ole sobiv lahendus lihtsalt MSX kontsentratsiooni suurendamine selektsiooniefektiivsuse parandamiseks, kuna see mõjub negatiivselt rakkude kasvule.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli GS põhise selektsioonisüsteemi efektiivsuse parandamine lülitades välja CRISPR/Cas9 tehnoloogia abil metsiktüüpi CHO-S rakuliini GS geen. Glutamiini suhtes auksotroofne GS KO rakuliin muudab kõrge tootlikkusega rekombinantsete rakuliinide arendusprotsessi märgatavalt tõhusamaks. Tugevama selektsioonisurve tõttu jäävad teoreetiliselt ellu ainult kõrge GS ekspressioonitasemega rakud, kus eksogeenne GS geen koos huvipakkuva rekombinantse valgu DNA-järjestusega on integreerunud CHO genoomi transkriptsiooniliselt aktiivsesse piirkonda.

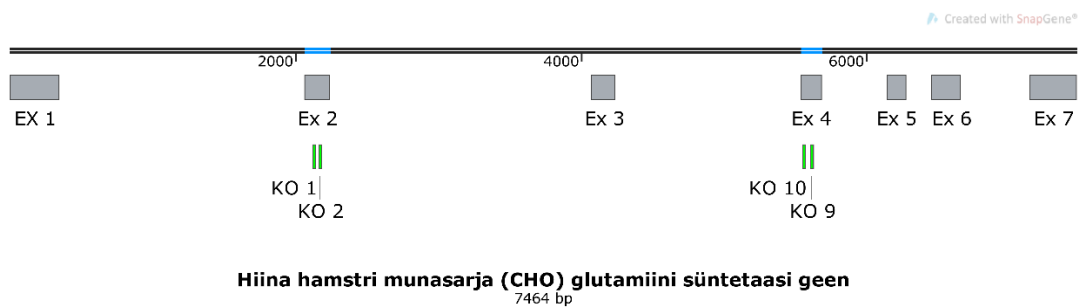
2.3.1 Guide RNA-de valimine

CRISPR/Cas9 süsteem on laialdaselt kasutatud tööriist genoomi muutmiseks. See süsteem hõlmab RNA-suunatud endonukleaasi Cas9 ja sihtmärgi suhtes spetsiifilise järjestusega *guide* RNA-d (gRNA). Endonukleaasi aktiivsuse avaldamiseks on vajalik ka, et sihtmärkjärjestusele järgneks lühike, kanooniline 3 – 6 nt pikkune protospeseriga külgnev motiiv (*protospacer adjacent motif* – PAM). Esmalt seondub gRNA Cas9-ga ning, gRNA ja sihtmärgi spetsiifilise paardumise kaudu, suunab gRNA järjestus kompleksi sihtmärkjärjestusele genoomis. Seejärel

teostab Cas9 katkestuse sihtmärkjärjestuses. Täpselt suunatud muutuste tegemiseks peab kasutama sihtmärkjärjestusele spetsiifilist *guide* RNA järjestust, millel on minimaalselt potentsiaalseid (mittespetsiifilisi) seondumiskohti väljaspool seda, et vältida soovimatuid (lisa)muutusi. Geeni väljalülitamiseks peab sihtmärkjärjestus asuma valku kodeerivas piirkonnas ning eelistatavalt pigem selle alguses.

Antud töös oli eesmärk CRISPR/Cas9 süsteemi abil teostada CHO-S rakkude *glul* geenis, mis kodeerib ensüümi glutamiini süntetaas, sellised muutused, mis lülitavad geeni välja ehk kõrvaldavad rakkudes GS-i aktiivsuse. Selle saab teostada, viies näiteks kodeerivasse järjestusse sisse raaminihke, deletsiooni, insertsiooni. CHO *glul* geen on 7.5 kb pikkune, mis paineb 5. kromosoomis ning sellel on seitse eksonit (Kirjanduse ülevaade, peatükk 1.5). Kasutades avalikult kättesaadavaid veebiprogramme Tefor Crispor (Crispor) ja *Synthego CRISPR Design* tööriista (*CRISPR design tool*) kaardistati eeldatavalt kõrge edukusega ja PAM-järjestusega gRNA-d, millel on minimaalselt mittespetsiifilisi seondumiskohti väljaspool *glul* geeni ning tuvastati võimalikud ebaspetsiifilisteks sihtmärkideks olevad geenid. Esmalt kaardistati 10 kõrgeima skooriga kandidaat-gRNAd, mille järjestused on välja toodud tabelis 1 (Materjalid ja meetodika, peatükk 2.2.1).

Lõpliku gRNA valiku aluseks oli sihtmärkjärjestuste paiknemine kodeerivas alas ning võimalike mittespetsiifiliste seondumiskohtade arv ja olemus. Esmalt jäeti välja valgu C-terminust kodeeriva 7. eksoni spetsiifilised gRNA-d KO6 ja KO7, kuna muutused valgu väga C-terminaalses piirkonnas ei pruugi tagada GS ensümaatilise aktiivsuse täielikku kadumist. Lõpuks valiti sünteesimiseks välja neli gRNA-d, mille sihtmärgid on 2. eksonis, mis ühtlasi on esimene valku kodeeriv ekson (KO1 ja KO2), ning 4. eksonis (KO9 ja KO10) (joonis 6). Tuginedes teadaolevale valgujärjestusele ja homoloogsete valkude struktuurianalüüsile, võis eeldada, et järjestuse rikkumine (näiteks raaminihe) nendes alades tagab, et translatsioonisaadusel puudub glutamiini süntetaasi aktiivsus.



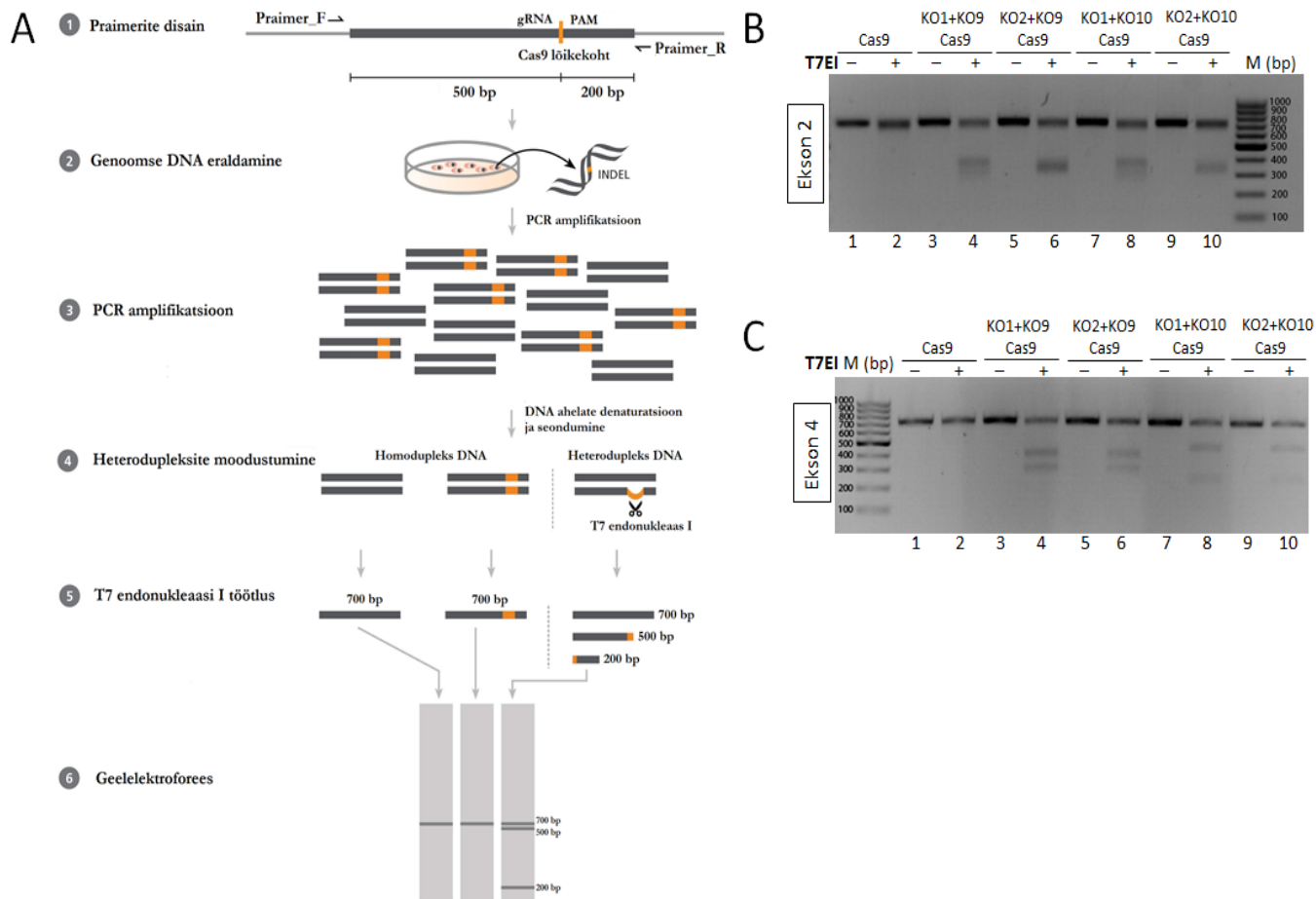
Joonis 6. CHO glutamiini süntetaasi geen (umbes 7,5 kb). CHO GS geenis on seitse eksonit (Ex). Töös kasutatavad glutamiini süntetaasi (*glul*) geeni vigastamiseks valitud gRNA-de KO1 ja KO2 sihtmärkjärjestused asuvad teises eksonis (EX2) ning KO9 ja KO10 sihtmärkjärjestused asuvad neljandas eksonis (EX4). Teise ja neljanda eksoni asukoht on järjestusel märgitud sinisega.

2.3.2 CRISPR/Cas9 meetodi edukuse hindamine T7 endonukleasse analüüsiga

Glutamiini süntetaasi geeni vigastamiseks viidi CHO-S rakkudesse elektroporatsiooni meetodil Cas9 valgumolekulide ja erinevate gRNA-de vahel moodustunud ribonukleiinkompleksid (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.3). GS geeni vigastamise tõenäosuse suurendamiseks kasutati ühe transfektsiooni korral kahte, nii 2. kui ka 4. eksoniga seonduvat gRNA-d. Võimalikke transfekteritavaid kombinatsioone oli kokku neli: KO1 ja KO9, KO1 ja KO10, KO2 ja KO9 ning KO2 ja KO10. Enne rakukultuuri üksikuteks rakkudeks kloneerimist kontrolliti disainitud gRNA-de funktsionaalsust T7 endonukleas I (T7EI) analüüsi abil. Ühest rakust alguse saanud (monoklonaalne) GS-defektsete rakukloonide isoleerimine ning iseloomustamine on äärmiselt aja- ja töömahukas protsess ning antud analüüs võimaldab hinnata CRISPR-Cas9 süsteemi indutseeritud mutatsioonide esinemist sihtmärk-DNA järjestuses. T7EI omab aktiivsust tekitada üheaahelalisi DNA katkeid mittepaardunud alas (kaks või enam aluspaari (Vouillot jt., 2015)). Seega, kui funktsionaalse gRNA-Cas9 kompleksiga transfekteritud heterogeensest rakukultuurist eraldatud genoomselt DNA-lt sihtmärkjärjestust sisaldav regioon PCR meetodil üles amplifitseerida ning saadud fragmendid denatureerida ja seejärel „kokku sulatada“, on tulemuseks juhuslikult tekkinud kaheaahelised DNA homo- ja heterodupleksid. Metsiktüüpi (wt, *wild type*) ja muteerunud DNA ahelate paardumisel tekkinud kaheaahelistes heterodupleksides jääb modifikatsioonide sisaldav ala paardumata, mis on T7EI substraadiks (vt joonis 7A) (Mashal jt., 1995)

T7EI analüüsi läbiviimiseks lüüsi 48 tunni möödudes transfektsioonist rakud (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.4). gRNA-de sihtmärkjärjestusi sisaldava DNA piirkonna üles

amplifitseerimiseks disainiti PCR praimerid (PCR praimerite järjestused on välja toodud „Materjal ja meetodika“ peatükis tabelis 2) selliselt, et GS geeni 2. eksoni spetsiifiline 705 bp pikkune PCR fragment lõigatakse gRNA-de sihtmärkjärjestuste alas mutatsioonide esinemisel gRNA KO1 korral ligikaudu 380 ja 320 bp ning KO2 puhul peaaegu võrdse (u 340 ja 360bp) pikkusega DNA fragmentideks; 4. eksoni korral on ennustatavate DNA fragmentide suuruseks umbes 300 ja 400bp (KO9) ning 200 ja 500bp (KO10). T7EI töötuse saaduste analüüsimisel agarosgeelil ilmned täielikult paardumata heteroduplekside lõikamisele viitavad DNA fragmendid (joonis 7 B ja C, rajad 4, 6, 8 ja 10). Seevastu analüüsitavates proovides, mille korral reaktsioonisegusse T7EI ei lisatud (joonis 7 B ja C, rajad 3, 5, 7 ja 9) või gRNA-sid ei transfekteeritud (joonis 7 B ja C, rajad 1 ja 2) vastavaid DNA fragmente ei esine. Seega katsetulemuste põhjal võib järeldada, et kõik antud eksperimendis kasutatud gRNA-d on funktsionaalsed. Kuigi T7EI meetod on pigem kvalitatiivne ning ei võimalda analüüsida ühe nukleotiidseid mittepaardumisi (Vouillot jt., 2015), valiti signaalide suhteliste tugevuste põhjal analüüsitud gRNA kombinatsioonide seast välja KO1+KO9. Kui arvestada nii ekson 2 kui ka ekson 4 T7EI töötusele resistentse signaali tugevust (joonis 7B ja C, vastavalt 705 ja 714 bp pikkune DNA fragment) ning võrreldes seda lõikamissaaduste signaali intensiivsusega, on erinevus KO1+KO9 korral suurem kui teiste gRNA kombinatsioonide puhul (joonis 7B ja C, rajad 4, 6, 8 ja 10). Antud tulemused võiks kaudselt viidata kõrgemale modifikatsioonide esinemissagedusele selles rakupopulatsioonid ning see omakorda muudaks modifitseeritud GS geeniga rakuklooni isoleerimise efektiivsemaks.



Joonis 7. T7EI analüüs disainitud gRNA-de funktsionaalsuse hindamiseks. Joonise (A) osas on välja toodud T7EI meetodi lihtsustatud põhimõte. Skeemil on näidatud 1) päri (F)- ja pöörd-suunalise (R) praimerite disain, mis on gRNA seondumiskohast eemal vastavalt umbes 500 bp ja 200 bp; 2) pärast CRISPR-Cas9 töötlust eraldatakse rakkudest genoomne DNA; 3) sihtmärkjärjestust sisaldav piirkond amplifitseeritakse kasutades PCR-i; 4) CRISPR-Cas9-ga indutseeritud mutatsioonide esinemisel moodustub PCR produktide denaturatsiooni ja uuesti anniilimise tulemusel lisaks homodupleksitele ka heteroduplekse (nt üks ahel mutatsiooniga ja teine wt); 5) kaheaahelalistes heterodupleksides jääb modifikatsioone sisaldav ala paardumata, mis on T7EI substraadiks 6) Heteroduplekside lõikamisel T7EI-ga tekkivad fragmendid on tuvastatavad geelelektroforeesil. Joonis on kohandatud STEMCELL Technologies, 2008 järgi. Joonise B ja C paneelidel on näidatud GS geeni 2. eksoni (B) ja 4. eksoni (C) vastu suunatud gRNA-de funktsionaalsuse hindamine. CHO-S rakkudesse transfekeeriti elektroporatsiooni meetodil Cas9 valgu gRNA ribonukleiinkompleksid, kasutades nelja erinevat gRNA kombinatsiooni: KO1+KO9, KO1+KO10, KO2+KO9, KO2+KO10 gRNA-de KO1 ja KO2 sihtmärkjärjestus asub 2. eksonis 2 ning KO9 ja KO10 4. eksonis. Lisaks kasutati negatiivse kontrollina CHO-S rakke, mida transfekeeriti ainult Cas9 valgumolekulidega. 48 tunni möödudes transfeksioonist lüüsi rakud *Hot shot* meetodiga ning seejärel teostati PCR reaktsioon, kasutades 2. eksoni spetsiifilisi primereid cGS_EX2_R2 ja cGS_EX2_F2 (paneel B, wt genoomi PCR produkti suurus 705 bp) ning 4. eksoni spetsiifilisi primereid cGS_EX4_R2 ja cGS_EX4_F2 (Paneel C, wt genoomi PCR produkti

suurus 714 bp). T7EI töötles kasutati 200 ng puhastatud PCR-reaktsiooni saadust ning T7EI-ga töödeldud DNA fragmendid lahutati agaros-geelelektroforeesi meetodil. Mutatsioonide esinemisel gRNA sihtmärkjärjestuses lõigatakse GS geeni 2. eksoni spetsiifiline 705 bp pikkune PCR fragment T7EI analüüsi käigus KO1 korral ligikaudu 380 ja 320 bp ning KO2 puhul peaaegu võrdse (u 340 ja 360 bp) pikkusega DNA fragmentideks; 4. eksoni puhul on DNA fragmentide ennustatavad suurused umbes 300 ja 400bp (KO9) ning 200 ja 500bp (KO10). +/- tähistab T7EI olemasolu reaktsiooniseigus või mitte. DNA suurusmarkerina on kasutatud *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Thermo Scientific) ning DNA fragmentide pikkused on välja toodud aluspaarides (bp).

2.3.3 Potentsiaalsete CHO GS KO kloonide väljasõelumine

Transfekteeritud rakukultuur on heterogeenne populatsioon, milles leidub lisaks soovitud defektse GS geeniga rakkudele ka näiteks transfekteerumata rakke või mille korral CRISPR/Cas9 modifitseerimine ei olnud edukas. Mittefunktsionaalse GS geeniga rakkude esmane välja sõelumine toimus fenotüübi alusel, mis põhines rakkude kasvu hindamisel glutamiinivabas söötmes. Glutamiin on rakkude elutegevuseks hädavajalik aminohape ning mittefunktsionaalse *glul* geeniga rakud hukuvad glutamiini vabas söötmes. Seevastu rakukloonid, mille *glul* geen on vigastamata, on võimelised glutamiinivabas söötmes jagunema.

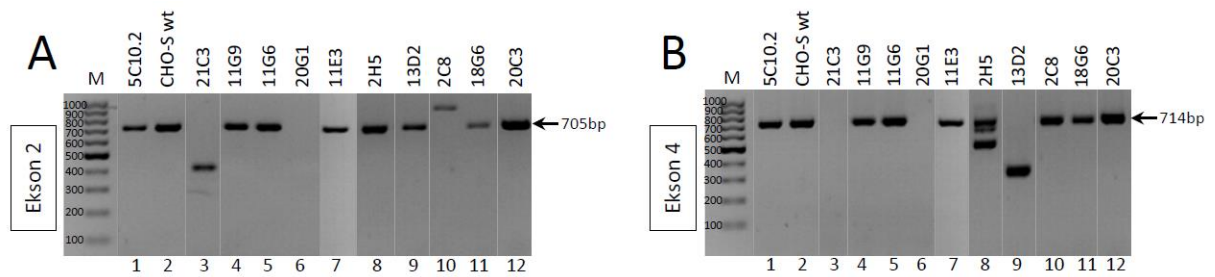
Transfekteeritud rakukultuurist defektse GS geeniga rakkude isoleerimiseks, teostati esmalt rakkude kloneerimine üksikuteks rakkudeks. Selleks külvati väljavalitud KO1 ja KO9 gRNA kombinatsiooniga transfekteeritud rakukultuur 48 tundi pärast elektroporatsiooni piirlahjendusmeetodil üksikuteks rakukloonideks 96-süvendilistele koekultuuri plaatidele (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.7). Kui rakukloonid oli saavutanud umbes 80-100% konfluentsuse, jagati rakukultuur pooleks 24-süvendilise koekultuuri plaadi kahe süvendi vahel, kus kasvatati rakke paralleelselt glutamiiniga ja glutamiinivabas söötmes. Rakukloonid, mis ei olnud võimelised kasvama glutamiinivabas söötmes, kuid glutamiini juuresolekul seda olid, viidi edasi kasvama 6-süvendilistele koekultuuri plaatidele. Esmase skriiningu põhjal valiti välja 138 rakuklooni 234-st. Kuigi CHO-S wt rakud kasvavad edukalt ka glutamiinita söötmes endogeense glutamiini sünteesivõime tõttu, on siiski rakkude kasv mõnevõrra aeglasem, võrreldes glutamiiniga söötmes. See muudab glutamiinist sõltuva kasvu hindamise keerulisemaks. Lisaks ei ole 24-süvendilised plaadid optimaalsed suspensioonikultuuri kasvatamiseks. Välja valitud kloonide glutamiinisõltuva fenotüübi kinnitamiseks viidi läbi sarnane skriining ka 6-süvendilistel plaatidel, mille põhjal selekteeriti välja 95 rakuklooni. Valitud kloonide kasv glutamiinita söötmes oli tugevalt pärsitud ning morfoloogia oluliselt

muutunud. Detailsemaks iseloomustamiseks valiti juhuslikkuse alusel välja 11 potentsiaalset GS KO rakuklooni.

2.3.4 Kloonte *glul* geenis toimunud modifikatsioonide kirjeldamine polümeraasi ahelreaktsiooni ja Sangeri sekveneerimise abil

Esmane fenotüübi alusel rakukloonide skriining aitab efektiivselt elimineerida GS valgu funktsiooni säilitava modifikatsiooniga või metsiktüüpi GS geeniga kloonid. Esmane skriining fenotüübi alusel ei ole sobiv viis kõrvaldamaks ainult ühe mutantse alleeliga kloone, mis võivad omada glutamiinisõltuvat fenotüüpi (Fan jt., 2011) (Lin jt., 2019). Sellised rakukloonid ei ole eelistatud GS põhise selektsioonisüsteemi väljaarendamisel, kuna üks GS alleelidest omab wt järjestus. Selektioonisurve tõttu võivad teoreetiliselt mutantne ja metsiktüüpi alleel rekombineeruda, mille tulemusena võib kaduda ka raku glutamiinisõltuvus ning GS põhineva selektsioonimarkeri tõhusus. Seega GS KO rakuliini väljavalimisel on oluline kindlaks määrata aset leidnud modifikatsioonid gRNA-de sihtmärk-DNA piirkonnas. Väljavalitud üheteistkümne potentsiaalsete GS KO rakukloonide (#5C10.2, #21C3, #11G9, #11G6, #20G1, #11E3, #2H5, #13D2, #2C8, #18G6 ja #20C3) GS geeni edasiseks molekulaarseks kirjeldamiseks amplifitseeriti rakkude lüsaadist (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.4) GS geeni 2. ja 4. eksoni piirkond, kasutades ning tabelis 2 väljatoodud GS praimereid (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.5).

PCR produktide analüüsimiseks lahutati need agarosgeelis. Klooni #20G1 korral ei olnud võimalik PCR produkti tuvastada kummagi eksoni korral (joonis 8A ja B, rada 6), mis võib olla tingitud suurtest kromosomaalsetest ümberkorraldustest, mille käigus on PCR praimerite seondumisala(sid) sisaldav DNA piirkond translokeerunud või deleteerunud. Klooni 2H5 ekson 4 korral oli võimalik detekteerida kolme eristava suurusega DNA fragmente (joonis 8B, rada 8), mis võib viidata sellele, et tegemist ei ole monoklonaalse rakukultuuriga ning seega iseloomustamisega ei jätkatud. Agaros-geelelektroforees võimaldab tuvastada ainult suuremaid deletsioone või insertioone nagu on see kloonide 21C3 (joonis 8A, rada 3), 2C8 (joonis 8A, rada 10) ja 13D2 puhul (joonis 8B, rada 9), kuid ülejäänud kloonide korral liiguvad PCR fragmendid agarosgeelis sarnaselt metsiktüüpi CHO-S rakuliini DNA-ga (joonis 8A ja B). Kuna vastusena CRISPR/Cas9 süsteemi indutseeritud DNA ahelate katketele aktiveeruvad rakus erinevad reparatsioonirajad ning CHO rakkudes on kõige aktiivsemalt kasutusel vigaderohke NHEJ (Grav jt., 2017), võib tegemist olla ühe või mõne aluspaari pikkuste modifikatsioonidega, mis ei ole agarosgeelis tuvastatavad.



Joonis 8. Joonis 9. CHO-S GS KO rakukloonide GS geeni sihtmärk-eksonites tekkinud modifikatsioonide kirjeldamine. Et kirjeldada 2. (A) ja 4. eksonis (B) esinevaid mutatsioone, amplifitseeriti PCR meetodi abil gRNA-de sihtmärkjärjestusi sisaldavad DNA piirkonnad. Selleks lüüsi rakud *Hot shot* meetodil ning teostati PCR reaktsioon, kasutades tabelis 2 väljatoodud 2. eksoni cGS_EX2_R2 ja cGS_EX2_F2 (wt PCR produkti suurus 705 bp) ja 4. eksoni spetsiifilisi praimereid cGS_EX4_R2 ja cGS_EX4_F2 (wt PCR produkti suurus 714 bp). PCR-i reaktsiooni produktide analüüsimiseks kasutati agaros-geelelektroforeesi meetodit. DNA suurusmarkerina on kasutatud *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Thermo Scientific). DNA fragmentide pikkused on välja toodud aluspaarides (bp).

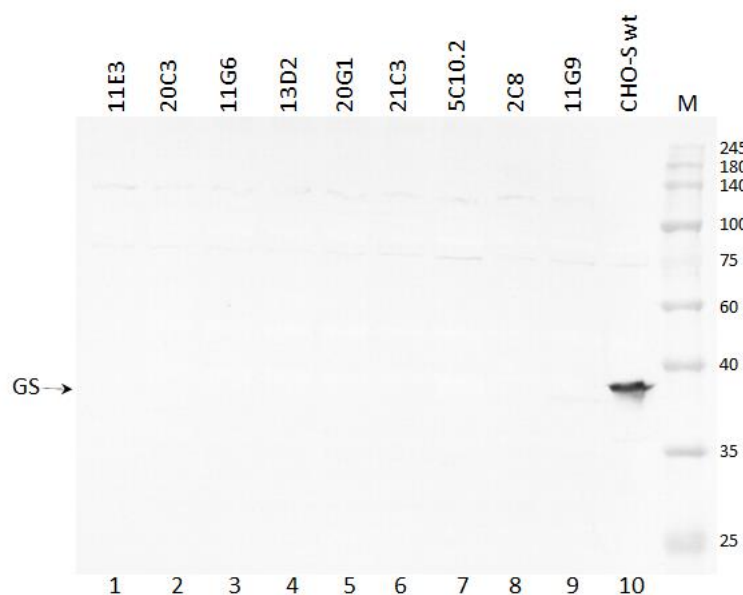
Huvipakkuvate DNA piirkondade sekveneerimisel saab määrata isegi ühe nukleotiidsid modifikatsioone ning nende asukoha genoomis. GS geenis toimunud modifikatsioonide kirjeldamiseks kloneeriti PCR fragmendid pJET1.2 vektorisse (Thermo Scientific), mis transformeeriti *Escherichia coli* tüve DH5 α rakkudesse ning bakterikloonidest sekveneeriti huvipakkuv DNA piirkond. Sekveneeritud DNAd võrreldi wt *glul* geeni järjestusega ning toimunud mutatsioonid kaardistati (tabel 3). Kolmel kloonil 20C3, 11E3, 11G6 identifitseeriti GS geeni teises eksonis 1-11 aluspaari pikkused raaminihke teket põhjustavad deletsioonid mõlemas alleelis. 18G4 korral oli mutantne ainult üks GS alleel (16 aluspaari pikkune deletsioon), teises alleelis modifikatsioone ei olnud tekkinud, mistõttu antud klooni edasisel kirjeldamisel ei kaasatud. Rakukloonide 11G9, 5C10.2, 21C3, 2C8, 13D2 puhul tuvastati ainult üks unikaalne modifikatsioon, mis näiteks võib olla tingitud, kui mõlemas alleelis on tekkinud identne mutatsioon või kromosomaalsete ümberkorralduste tõttu on PCR praimeri(te) seondumisala(sid) sisaldav DNA piirkond translokeerunud või deleteerunud. Samuti on kirjanduses eelnevalt sarnast tulemust tõlgendatud kui potentsiaalselt haploidse GS alleeliga rakuklooni ning on viidatud CHO rakuliini heterogeensusele (Fan jt., 2011). Seega genotüübi alusel on CHO GS KO kandidaatliinideks eelistatult kloonid 20C3, 11E3, 11G6, 11G9, 5C10.2, 21C3, 2C8 ja 13D2. Lisaks jätkati rakuklooni 20G1 kirjeldamist, mille korral ei olnud ekson 2 ja 4 spetsiifiliste praimeripaaridega võimalik PCR produkti tuvastada.

Tabel 3. CHO-S GS KO rakukloonide GS geeni modifikatsioonid. Tabelis on näidatud üheksas rakukloonis leitud mutatsioonid ning nende asukoht 2. või 4. eksonis.

Rakukloon	Modifikatsioon	Ekson
20C3	1bp del / 11bp del	2
11G9	1bp del	2
11E3	1bp del / 2bp del	2
5C10.2	5bp del	2
11G6	1bp del / 11bp del,	2
18G4	16bp del / wt	2
21C3	313bp del	2
13D2	348bp del	4
2C8	204 ins	2

Wt – metsiktüüpi järjestus, del – deletsioon, ins – insertioon, bp - aluspaari

GS geenis suuri deletsioone/insertioone või raaminihet tekitavate modifikatsioonid peaks põhjustama GS primaarjärjestuse (nt enneaegne translatsiooni terminatsioon) ning seega ka struktuuri olulisi muutusi, mille tulemusel translatsioonisaadusel puudub ensümaatilise aktiivsuse ning valesti pakitud valk suunatakse lagundamisele. Kinnitamaks, et väljavalitud kloonidel puudub rakkudes wt GS suurusele vastav valk, viidi läbi *Western blot* analüüs. Kõigi üheksa rakuklooni korral ei olnud võimalik GS valku rakkudes tuvastada (joonis 9, rajad 1-9), samas kui CHO-S wt puhul oli eeldatava molekulmassiga (ligikaudu 42 kDa) signaal detekteeritav (joonis 9, rada 10), viidates sellele, et GS geenis indutseeritud mutatsioonid on olnud tõhusad.



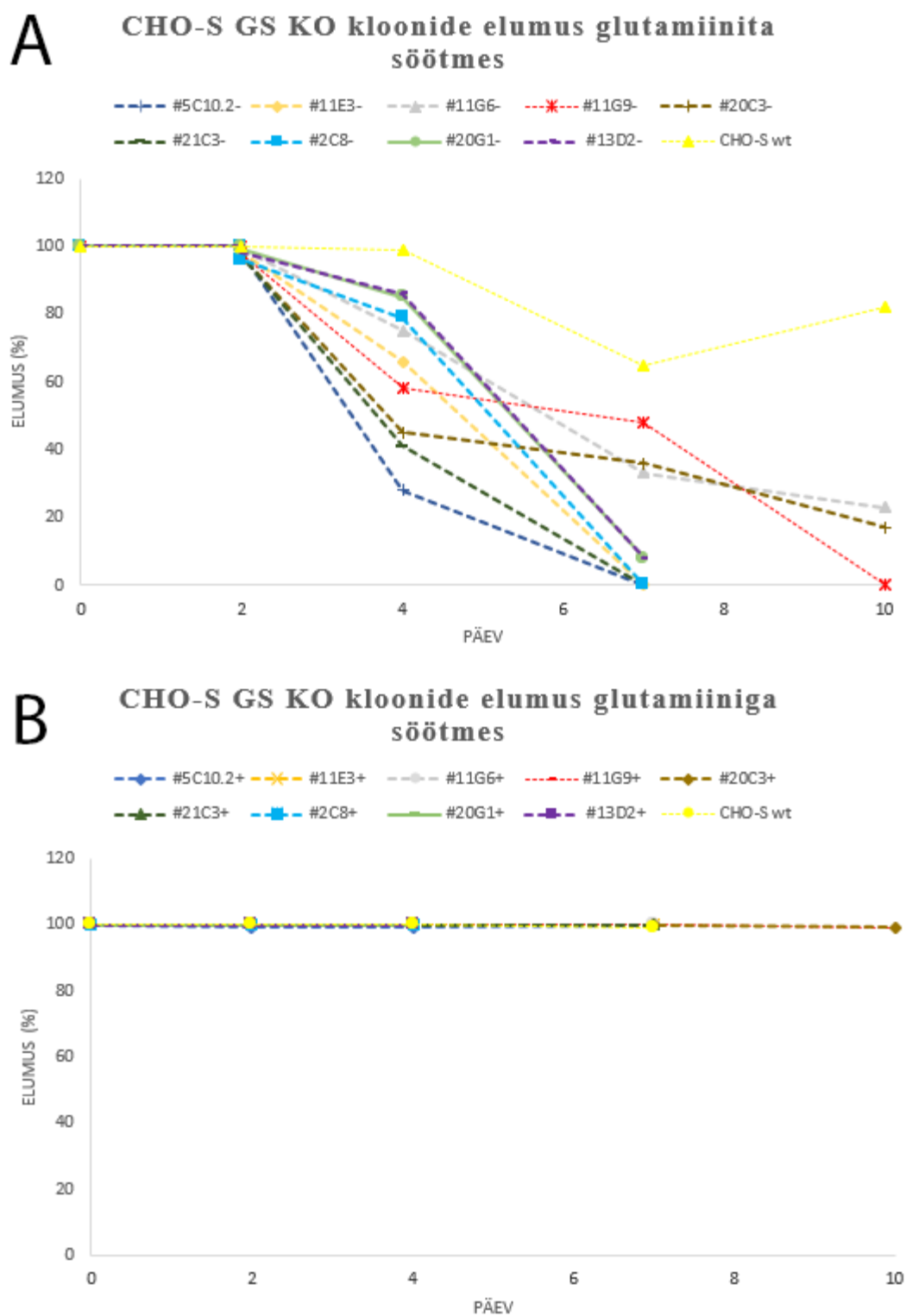
Joonis 10. CHO-S GS KO rakukloonide glutamiini süntetaasi ekspressiooni analüüs. CHO-S GS KO kloonide endogeense GS-i ekspressiooni detekteerimiseks rakulüsaatidest kasutati *Western blot* meetodit. Radadele kanti võrdsest kogusest rakkudest (70 000 raku) lüüsitud totaalset valku. Glutamiini süntetaasi detekteerimiseks kasutati GS-i vastast antikeha (Abcam ab49873). Noolega on tähistatud GS valgu asukoht geelis. Valkude molekulmassi markerina (kilodaltonites) kasutati *ExcelBand 3-color High Range Protein Marker* (9-245 kDa) (SMOBIO Technology).

2.3.5 CHO-S GS KO rakukloonide fenotüübi kirjeldamine

Et kinnitada antud CHO-S GS KO rakukloonide elumuse sõltuvust glutamiinist, mis on lõpliku väljavalitud rakuliini oluline omadus GS põhise selektsioonisüsteemi rakendamisel (transfekteerumata rakud surevad eksogeense glutamiini puudumisel), kasvatati rakukloone suspensioonikultuuride korral rutiinselt kasutatavates 125 ml loksutuskolbides. Samuti võib leida kirjandusest andmeid, kus esmane glutamiinisõltuval fenotüübil põhinev skriining viidi läbi samuti 6-süvendilise plaadi formaadis, kuid hiljem loksutuskolbides kultiveerides osade rakukloonide puhul glutamiinist sõltuvat kasvu enam ei täheldatud (Fan jt., 2011). Seega on oluline veenduda antud rakukloonide glutamiinisõltuvas fenotüübis.

Väljavalitud üheksa GS KO kloonide kasvu ja elumust jälgiti glutamiini sisaldavas ja glutamiinivabas söötmes, kasvatades neid rutiinselt kasutatavates 125 ml loksutuskolbides. Kloonide kasvu jälgiti kuni nende hukkumiseni. Iga 2 – 3 päeva järel määrati rakukultuuride elumus (elusate rakkude suhe rakkude üldarvu), kasutades Brükleri hemotsütomeetrit ning rakukultuurid lahjendati tiheduseni $3 - 5 \times 10^5$ elusat raku milliliitris. Jooniselt 10A võib näha, et kõigi CHO-S GS KO rakukloonide elumus hakkas järsult langema pärast 2. päeva, rakud ei

jagunenud enam ning samuti oli märgatavalt vähenenud rakkude suurus. 7. – 10. päevaks oli elumus langenud ligikaudu 0%-ni ehk rakud olid surnud. Seevastu funktsionaalse GS geeniga metsiktüüpi CHO-S rakuliin kasvas edukalt ka glutamiinivabas söötmes. Kui söötmesse oli lisatud glutamiini, püsis GS KO rakukloonide elumus ligikaudu 100% juures (joonis 10B), viidates tugevale glutamiini auksotroofsusele.



Joonis 11. CHO-S GS KO rakukloonide elumuse sõltuvust eksogeenselt glutamiinist. Näidatud on valitud rakukloonide elumus kasvatamisel ilma eksogeense glutamiiniga (A) ja 8 mM glutamiiniga (B) söötmes 125 ml loksutuskolvis (Corning). Kümne päeva vältel määrati iga 2 – 3 päeva järel hemotsütomeetri abil rakukultuuri tihedus ja elumus (elusate rakkude suhe rakkude üldarvu x 100%) ning aktiivse kasvufaasi säilitamiseks vajadusel kultuure lahjendatitiheduseni $3 - 5 \times 10^5$ elusat rakku milliliitris. Elusate ja surnud rakkude eristamiseks värviti surnud rakud 0,4% trüpaansinise lahusega (Gibco). CHO-S wt tähistab funktsionaalse GS geeniga metsiktüüpi CHO-S rakuliini.

Seega kokkuvõtvalt isoleeriti ja iseloomustati antud bakalaureusetöö raames üheksa CHO-S GS KO rakuliini, millest kaheksa korral (20C3, 11E3, 11G6, 11G9, 5C10.2, 21C3, 2C8 ja 13D2) oli võimalik GS geeni 2. või 4. eksonis tuvastada CRISPR/Cas9 süsteemi poolt indutseeritud raaminihet tekitavaid modifikatsioone, mis rikuvad GS valgu ekspressiooni ning seetõttu ei ole rakud võimelised glutamiinivabas söötmes kasvama. Kuigi rakuliini 20G1 korral GS valgu ekspressiooni ei olnud võimalik detekteerida WB meetodiga ning rakkude kasv oli tugevalt glutamiinisõltuv, lõputöös kasutatud praimeripaaridega PCR produkti ei tekkinud ning antud rakukloon vajab GS KO genotüübi osas verifitseerimist. Kuigi GS põhise selektsioonisüsteemi rakendamisel on rakkude glutamiini auksotroofsus esmatähtis kriteerium, sest see võimaldab kasutada eksogeenset GS geeni selektsioonimarkerina, on praktilises valkude tootmises olulised ka rakuliini muud omadused. Näiteks võib välja tuua sekreteeritavate rekombinantsete valkude (näiteks antikehade) üldise produktsioonivõimekuse, mis oleneb paljudest faktoritest nagu näiteks rakkude sekretsioonivõimest (rekombinantne valk sekreteeritakse rakust välja söötmesse), mis tuleneb tsütoplasmaorganellide omadustest; rakkude energiavarustusest, mis sõltub nt mitokondrite massist; rakukultuuri maksimum tihedusest, mille juures rakud suudavad kasvada (st mida rohkem on rakke, seda suurem on rekombinantse valgu üldine tootlikkus) jne. Ehkki kõik isoleeritud GS KO rakukloonid pärinevad samast CHO-S eellasliinist, võivad need erineda üksteisest oluliselt eelnimetatud tegurite osas, kuna CHO rakuliini muutlikkus ja heterogeensus on märkimisväärne (Pilbrough jt., 2009) (Pichler jt., 2010). Seega lõpliku valiku tegemisel oleks järgmiseks etapiks võrrelda CHO-S GS KO rakuliinide erinevate rekombinantsete valkude produktsioonivõimekust. Selleks transfekteeritakse rakke ekspressioonivektoritega, milles on lisaks GS selektsioonimarkerile ka huvipakkuva rekombinantse valgu ekspressioonikassett. Seega eeldatavalt ekspresseerivad selektsioonimarkeri omandanud ja GS selektsioonis ellujäänud rakud lisaks selektsioonimarkerile ka huvipakkuvat rekombinantset valku. Huvipakkuva valgu tootlikkuse ja saaduse kvaliteedi iseloomustamise põhjal on võimalik välja selekteerida enim eelistatud CHO-S GS KO rakuliinid edasiseks produktsentrakuliinide arendamiseks.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli arendada mittefunktsionaalse glutamiini süntetaasi geeniga CHO-s rakuliin tõhusamaks super-produktent rakuliinide arendamiseks. Kirjanduse ülevaates tutvustati imetaja rakuliinide rolli terapeutiliste valkude tootmises ning laialdast kasutust leidnud CHO rakuliini eeliseid.

Bakalaureusetöö eksperimentaalses osas keskenduti hiina hamstri munasarja rakkude glutamiini süntetaasi *knockout* (KO) rakuliini arendusele. Lõputöös kasutati *glul* geeni väljalülitamiseks CRISPR/Cas9 süsteemi. Selleks disainiti geeni *glul* eksonites asuvate sihtmärkjärjestuse spetsiifilised gRNAd, mis kompleksis Cas9 valguga transfekteeriti CHO rakkudesse elektroporatsiooni meetodiga. Seejärel isoleeriti CHO-S GS KO rakukloonid, mis ei suutnud kasvada, kui söötmesse ei lisatud glutamiini. Väljavalitud rakukloonides kirjeldati toimunud mutatsioonid ning hinnati nende sobivust GS põhise selektsioonisüsteemi rakendamiseks. Bakalaureusetöö eksperimentaalses osas jõuti järgmistele järeldustele:

- disainitud gRNAd olid *glul* geeni spetsiifilised ja funktsionaalsed, indutseerides mutatsioonide teket. Seda kinnitas T7 endonukleas I analüüs, mis näitas kõigi valitud gRNA kombinatsioonide sihtmärkjärjestuse spetsiifilisust ning Cas9 võimet tekitada katkeid sihtmärk-DNA järjestuses;
- antud bakalaureusetöö raames isoleeriti fenotüübi põhjal 90 potentsiaalset CHO-S GS KO rakuklooni. Edasiseks iseloomustamiseks valiti välja üheksa kloon, millest kaheksa puhul (20C3, 11E3, 11G6, 11G9, 5C10.2, 21C3, 2C8 ja 13D2) oli võimalik sekveneerimise meetodil tuvastada GS geeni 2. või 4. eksonis raaminihet tekitavaid modifikatsioone;
- kirjeldatud rakukloonid ei olnud võimelised kasvama eksogeenset glutamiini mittesisaldavas söötmes, kinnitades nende sobivust GS põhise selektsioonisüsteemi rakendamiseks.

Glutamine synthetase gene knockout in Chinese hamster ovary (*Cricetulus griseus*) cell line

Signe Parts

Summary

Chinese hamster ovary (CHO) cells have become more popular for the manufacture of therapeutic recombinant proteins. To develop highly efficient producer cell lines, efficient selection systems are required. Glutamine synthetase (GS) selection system is one commonly used in combination with GS inhibitor methionine sulfoximine (MSX).

Glutamine is one of the essential amino acids for cultivated CHO cells and the cells express endogenous GS. Genes which make selection systems based on GS inhibitor MSX. In previous studies, it has been shown that adaptation of the endogenous GS expressing cells in the presence of MSX results also survival of the cells with lower protein productivity. Thus, the CHO cell lines with GS knockout can improve such metabolic selection and makes the isolation of high level producing cell clones more effective.

In this study we disrupted glutamine synthetase gene (*glul*) with CRISPR/Cas9 in CHO-S cell line as the first step in development of stable super-producer cell lines. To make GS gene inactive we transfected CHO-S cells by electroporation with Cas9 complexed with *glul* specific gRNAs. Specific activity of Cas9/gRNA complex to *glul* was confirmed with T7 endonuclease I assay. To isolate cells with defective GS gene from the ones with functional GS, single cell derived clones were analyzed for exogenous glutamine dependent growth. Next, the selected clones were analyzed for CRISPR/Cas9 mediated genome mutagenesis. For further description of the GS-knockout clones we observed their glutamine-dependent growth in 125 ml flasks and absence of GS protein expression was also confirmed with Western blot analysis.

Tänuõnad

Soovin tänada oma juhendajat Eva-Maria Tombakut suurepärase juhendamise eest katsete läbiviimisel ja heade nõuannete eest nii laboris kui ka lõputöö kirjutamisel. Samuti soovin tänada juhendajat Andres Männikut, kes oli suureks abiks lõputöö valmimisel ning juhendajat Mart Ustavit, kes andis mulle imelise võimaluse teha bakalaureusetöö *Icosagen Cell Factory* OÜ's. Tänan ka *Icosageni* meeskonda meeldiva koostöö ning abivalmiduse eest.

KIRJANDUSE LOETELU

- Barrangou, R. (2015). The roles of CRISPR–Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Current Opinion in Immunology*, 32, lk 36-41. doi: 10.1016/j.coi.2014.12.008
- Blanco, A. ja Blanco, G. (2017). Amino Acid Metabolism. rmt: *Medical Biochemistry* (lk 367-399). Elsevier Inc.
- Burroughs, A. M., Balaji, S. ja Iyer, L. M. jt. (2007). Small but versatile: the extraordinary functional and structural diversity of the β -grasp fold. *Biol Direct*, 2(18). doi:10.1186/1745-6150-2-18
- Chusainow, J. Y. (2009). A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: What makes a stable high producer? *Biotechnology and Bioengineering*, 102(4), lk 1182-1196. doi:10.1002/bit.22158
- Crossley, K. K., Albee, A., Fuhr, B. ja Caple, M. (2010). New Advanced Protein-Free, Animal Component-Free Medium for Recombinant Protein Expression in Adherent CHO Cell Cultures. rmt: E. Lindner-Olsson, N. Chatzissavidou ja E. Lüllau, *Animal Cell Technology: From Target to Market* (Kd. 1, lk 189-192). Springer, Dordrecht. doi: 10.1007/978-94-010-0369-8_41
- Edmonds, M. C., Tellers, M., Chan, C., Salmon, P., Robinson, D. K. ja Markusen, J. (2006). Development of Transfection and High-Producer Screening Protocols for the CHOK1SV Cell System. *Molecular Biotechnology*, 34, lk 179-190. doi:10.1385/mb:34:2:179
- Eelen, G. D. (2018). Role of glutamine synthetase in angiogenesis beyond glutamine synthesis. *Nature*, 561, lk 63-69. doi: 10.1038/s41586-018-0466-7
- Fan, L., Frye, C. C. ja Rachel, A. J. (2013). The use of glutamine synthetase as a selection marker: recent advances in Chinese hamster ovary cell line generation processes. *Pharm. Bioprocess*, 1(5), lk 487–502.
- Fan, L., Kadura, I., Krebs, L. E., Hatfield, C. C., Shaw, M. M. ja Frye, C. C. (2011). Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knockout cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(4). doi: 10.1002/bit.24365

- Fernandez, C. R. (2018). *CRISPR-Cas9: How this Gene Editing Tool is Changing the World*. Kasutamise kuupäev: 23. oktoober 2019. a., allikas Laboitech.eu: <https://www.labiotech.eu/features/crispr-cas9-review-gene-editing-tool/>
- Grav, L. M., Karotki, K. J., Lee, J. S. ja Kildegaard, H. F. (2017). Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing to Improve Recombinant Protein Production in CHO Cells. rmt: P. Meleady (Toim.), *Heterologous Protein Production in CHO Cells* (lk 101-118). Humana Press, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4939-6972-2_7
- Guschin D. Y., Waite A. J, Katibah G. E., Miller J. C., Holmes M. C. ja Rebar E. J. (2010). A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification. *Methods Mol Biol*, 649, 247-256. doi:10.1007/978-1-60761-753-2_15.
- Heinaru, A. (2014). *Geneetika*. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus. Allikas: <http://geneetika.ee/wp-content/uploads/2014/09/Geneetika-XX-osa-A.-Heinaru.pdf>
- Huertas, P. (2010.). DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(1), lk 11-16. doi:10.1038/nsmb.1710
- Jedrzejczak-Silicka, M. (2017). History of Cell Culture. rmt: S. J. Gowde, *New Insights into Cell Culture Technology*. IntechOpen. doi:10.5772/66905
- Kaufmann, S. H. (2017). Remembering Emil von Behring: from Tetanus Treatment to Antibody Cooperation with Phagocytes. *mBio*, 8(1). Allikas: <https://doi.org/10.1128/>
- Kim, J., Kim, Y. ja Lee, G. M. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93, lk 917-930. DOI: 10.1007/s00253-011-3758-5
- Kim, T. K. ja Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, lk 3173–3178. doi:10.1007/s00216-010-3821-6
- L. Vouillot, A.Thélie ja N. Pollet (2015). Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 (Bethesda)*, 5(3), 407-415. doi:10.1534/g3.114.015834
- Lagassé, H. A., Alexaki, A., Simhadri, V. L., Katagiri, N. H., Jankowski, W., Sauna, Z. E. ja Kimchi-Sarfaty, C. (2017). Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000 Research*, 6(113). doi:10.12688/f1000research.9970.1

- Lai, T., Yang, Y. ja Ng, S. (2013). Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production. *Pharmaceuticals*, 6(5), lk 579–603. doi:10.3390/ph6050579
- Lee, J. S., Grav, L. M., Lewis, N. E. ja Kildegaard, H. F. (2015). CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of CHO cell. *Biotechnology Journal*, 979-994. doi:10.1002/biot.201500082
- Lewis, N., Liu, X. ja Li, Y. (2013). Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nature Biotechnology*, 21, 759-765. doi:<https://doi.org/10.1038/nbt.2624>
- Fan L., Frye C. C. ja Racher A. J. (2013). The use of glutamine synthetase as a selection marker: recent advances in Chinese hamster ovary cell line generation processes. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 1(5), 487-502. doi:10.4155/PBP.13.56
- Lin, P. C., Chan K. F., Kiess I. A., Tan J., Shahreel W., Wong S. Y. ja Song Z. (2019). Attenuated glutamine synthetase as a selection marker in CHO cells to efficiently isolate highly productive stable cells for the production of antibodies and other biologics. *mAbs*, 11(5), 965-976. doi:10.1080/19420862.2019.1612690
- Mashal R. D., Koontz J. ja Sklar J. (1995). Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases. *Nat Genet*, 9(2), 177-183. doi:10.1038/ng0295-177
- Mignon, C., Sodoyer, R. ja Werle, B. (2015). Antibiotic-Free Selection in Biotherapeutics: Now and Forever. *Pathogens*, 4(2), lk 157-181. doi:10.3390/pathogens4020157
- Molecular Devices. The evolution of CHO cells' role. Kasutamise kuupäev: 18. mai 2020. a., allikas <https://www.moleculardevices.com/sites/default/files/en/assets/infographics/bpd/evolution-of-cho-cells-role-in-cell-line-development.pdf>
- Mortensen, R. M. ja Kingston, R. E. (2009). Selection of Transfected Mammalian Cells. *Molecular Biology*. doi:10.1002/0471142727.mb0905s62
- Pichler, J., Galosy, S. ja Borth, J. M. (2010). Selection of CHO host cell subclones with increased specific antibody production rates by repeated cycles of transient transfection and cell sorting. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(2). doi:<https://doi.org/10.1002/bit.22946>

- Pilbrough, W., Munro, T. P. ja Gray, P. (2009). Intracloonal Protein Expression Heterogeneity in Recombinant CHO Cells. *PLoS One*, 4(12). doi:10.1371/journal.pone.0008432
- Pohl, H. (2020). What are the Advantages of Using Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells? *Enzo Life Sciences*. Allikas: [https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2020/march/what-are-the-advantages-of-using-chinese-hamster-ovary-\(cho\)-cells?/](https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2020/march/what-are-the-advantages-of-using-chinese-hamster-ovary-(cho)-cells?/)
- Rainey P. B., Heithoff D. M. ja Mahan M. J. (1997). Single-step conjugative cloning of bacterial gene fusion involved in microbe-host interaction. *Mol. Gen. Genet*, 256 (1), 84-87. doi: 10.1007/s004380050548.
- Reis, A., Hornblower, B., Robb, B. ja Tzertzinis, G. (2014). CRISPR/Cas9 & Targeted Genome Editing: New Era in Molecular Biology. *NEB expressions Issue I*, 3-5. Kasutamise kuupäev: 28. oktoober 2019. a., allikas New England Biolabs: https://international.neb.com/-/media/nebus/files/brochures/expressions_issuei_2014.pdf?rev=8d032f71892b40ea874b675352e1ab6e
- Ronzio, R. A. ja Meister, A. (1968). Phosphorylation of methionine sulfoximine by glutamine synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 59(1), lk 164–170. doi:10.1073/pnas.59.1.164
- Sanders, P. ja Wilson, R. (1984). Amplification and cloning of the Chinese hamster glutamine synthetase gene. *EMBO J*, 3(1), 65-71.
- Shah, S. A., Erdmann, S., Mojica, F. J. ja Garrett, R. A. (2013). Protospacer recognition motifs: Mixed identities and functional diversity. *RNA Biology*, 10(5), lk 891-899. Allikas: How To Use CRISPR: Your Guide to Successful Genome Engineering: <https://www.synthego.com/guide/how-to-use-crispr/design-grna-crispr>
- STEMCELL Technologies. (2008). Evaluation of Genome Editing. *TECHNICAL BULLETIN*. Kasutamise kuupäev: 1. juuni 2020. a., allikas <https://www.stemcell.com/evaluation-of-genome-editing.html>
- Strohl, W. R. ja Strohl, L. M. (2012). Cell line development. rmt: W. R. Strohl ja L. M. Strohl, *Therapeutic Antibody Engineering* (lk 421-595). Woodhead Publishing.

- Thurtle-Schmidt, D. M. ja Lo, T.-W. (2018). Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 46(2). doi:10.1002/bmb.21108
- Truett G. E, Heeger P., Mynatt R. L., Truett A. A., Walker J. A. ja Warman M. L. (2000). Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*, 29(1), 52-54. doi:10.2144/00291bm09
- Weatherburn, D. C., Mandal, S., S.Mukhopadhyay, Bhaduri, S. ja Lindoy, L. F. (2003). Amino Acid Metabolism. rmt: *Comprehensive Coordination Chemistry II* (5, lk 1-125). Elsevier Science.
- Wu, X., Kriz, A. J. ja Sharp, P. A. (2014). Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quantitative Biology*, 2, lk 59-70.
- Wurm, F. (2013). CHO Quasispecies—Implications for Manufacturing Processes. *Processes*, 1(3), lk 296–311. doi:10.3390/pr1030296
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1393–1398. doi:10.1038/nbt1026
- Xu, J., Rehmann, M. S., Xu, M., Zheng, S., Hill, C., He, Q., . . . Li, Z. J. (2020). Development of an intensified fed-batch production platform with doubled titers using N-1 perfusion seed for cell culture manufacturing. *Bioresources and Bioprocessing*, 11(5).

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. UNIPROT <https://www.uniprot.org/uniprot/P04773> (kasutatud 7.06.2020)
2. CRISPOR tööriist <http://crispor.tefor.net/> (kasutatud 7.06.2020)
3. CRISPR Design Tool <https://design.synthego.com/> (kasutatud 7.06.2020)
4. Verify Guide Design Tool <https://design.synthego.com/#/validate> (kasutatud 7.06.2020)
5. NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100764163> (Kasutatud 7.06.2020)

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Signe Parts

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose „Glutamiini süntetaasi geeni väljalülitamine hiina hamstri (*Cricetulus griseus*) munasarja rakuliinis“, mille juhendajad on Mart Ustav, Eva-Maria Tombak ja Andres Männik, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Signe Parts

07.06.2020