Ciljana metilacija DNA promotora gena MGAT3 korištenjem alata CRISPR-Cas9

Josipović, Goran

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:473859

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Goran Josipović

Ciljana metilacija DNA promotora gena *MGAT3* korištenjem alata CRISPR-Cas9

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

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

Iskreno hvala mentoru doc. dr. sc. Aleksandru Vojti na ukazanom razumijevanju i strpljenju tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Najiskrenije bih se zahvalio mag. biol. mol. Pauli Dobrinić, uz čiju sam pomoć stekao puno znanja i samostalnost za rad u laboratoriju. Hvala na trudu, stalnoj dostupnosti te savjetima.

Veliko hvala i mag. biol. mol. Mariji Klasić na pomoći i odgovorima na sva moja pitanja.

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Ciljana metilacija DNA promotora gena *MGAT3* korištenjem alata CRISPR-Cas9

Goran Josipović
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sustav CRISPR-Cas9 omogućava ciljanu modifikaciju i manipulaciju bilo kojeg genomskog lokusa u različitim staničnim linijama. Osnovni princip metode temelji se na navođenju nespecifične nukleaze Cas9 na određeno područje u genomu pomoću molekule sgRNA, u kojoj je 20 nukleotida (nt) na 5' kraju ključno u prepoznavanju komplementarnog slijeda. Prednost sustava CRISPR-Cas9 je u njegovoj jednostavnoj manipulaciji te mogućnosti simultanog djelovanja više kompleksa CRISPR-Cas9 vođenih različitim molekulama sgRNA. Modifikacije sustava uključuju fuziju katalitičke domene efektorskog proteina na inaktiviranu nukleazu Cas9 (dCas9), čime je omogućeno ciljano modificiranje genoma i epigenoma bez induciranja dvolančanog loma u molekuli DNA. Modifikacija sustava CRISPR-Cas9 fuzijom sekvence DNA koja kodira za katalitičku domenu DNA metiltransferaze 3A *de novo* (DNMT3A) na sekvencu DNA koja kodira za inaktiviranu nukleazu dCas9 preko fleksibilnog Gly_4Ser linkera omogućila je ciljanu metilaciju DNA u genomu. Cilj ovoga istraživanja bio je konstruirati epigenetički alat CRISPR-Cas9 za ciljanu metilaciju DNA promotora gena *MGAT3* blizu mjesta početka transkripcije (TSS) te utvrditi utjecaj metilacije u ciljanoj regiji na regulaciju ekspresije gena *MGAT3*.

Uspješno su dobiveni konstrukti za ciljanu metilaciju kloniranjem sekvenci molekula sgRNA u plazmide. U svrhu kloniranja plazmidnih konstrukata korišten je bakterijski soj *E. coli* XL10-Gold. Plazmidni konstrukti uspješno su transficirali staničnu liniju BG1. Efikasnost transfekcije bila je niža zbog veličine plazmidnih konstrukata. Nakon izolacije ukupne RNA, reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR), rezultati pokazuju da nema statistički značajnog smanjenja ekspresije gena *MGAT3* u stanicama transfeciranim plazmidnim konstruktima s aktivnom DNMT3A, kao niti u kontrolnim uzorcima. Provjera je li došlo do ciljane metilacije metodom pirosekvenciranja nije provedena zbog nemogućnosti umnažanja bisulfitno konvertirane DNA iz stanica BG1, stoga rezultati qPCR analize ne mogu biti prihvaćeni sa sigurnošću.

(61 stranica, 25 slika, 7 tablica, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: ciljano modificiranje genoma i epigenoma, CpG otok, DNMT3A, dCas9, stanice BG1, ekspresija

Voditelj: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
Neposredni voditelj: mag. biol. mol. Paula Dobrinić
Ocjenitelji: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević
izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković- Cifrek

Rad prihvaćen: 01. rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Targeted DNA methylation of *MGAT3* gene promoter using a CRISPR-Cas9 tool

Goran Josipović
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The CRISPR-Cas9 system allows targeted modifications and manipulation of any genomic loci in different cell lines. The basic principle of the method is based on the directing of non-specific nuclease Cas9 to a specific area in the genome using sgRNA molecule, in which 20 nucleotides (nt) at 5' end is crucial in recognizing the complementary sequence. The advantage of the CRISPR-Cas9 system is in its simple manipulation and simultaneous action of several CRISPR-Cas9 complexes guided by different sgRNA molecules. System modifications include the fusion of catalytic domain of effector protein to the inactive nuclease Cas9 (dCas9), thus enabling editing of the genome and epigenome without inducing double stranded break in the DNA molecule. The modification of CRISPR-Cas9 system, resulted by fusing the DNA sequence encoding the catalytic domain of *de novo* DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) with the DNA sequence encoding the inactive nuclease dCas9 via a flexible Gly_4Ser linker, enables targeted methylation of DNA in the genome. The aim of this study was to construct epigenetic editing CRISPR-Cas9 tool for targeted DNA methylation of *MGAT3* gene promoter close to transcription start site (TSS) and to determine the effect of the target region methylation on the regulation of *MGAT3* gene expression.

Constructs for targeted methylation were successfully assembled by cloning sequences of sgRNA molecules into plasmids. For plasmid constructs cloning the bacterial strain *E. coli* XL10-Gold was used. The plasmid constructs were successfully transfected into the BG1 cell line. After the isolation of total RNA, reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (qPCR), the results show no statistically significant reduction in *MGAT3* gene expression in the cells transfected with plasmid constructs that contained active DNMT3A, nor in the control samples. Pyrosequencing was not done to prove if the targeted DNA methylation was induced due to the inability of multiplying bisulfite converted DNA from BG1 cells, so the results of qPCR analysis cannot be accepted with confidence.

(61 pages, 25 figures, 7 tables, 57 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library
Key words: genome and epigenome editing, CpG island, DNMT3A, dCas9, BG1 cells, expression

Supervisor: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
Assistant Supervisor: mag.biol.mol. Paula Dobrinić
Reviewers: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević
izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković- Cifrek

Thesis accepted: September 01, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 RAZVOJ METODA ZA CILJANU MODIFIKACIJU GENOMA 1

1.2 MEHANIZMI POPRAVKA DVOLANČANOG LOMA INDUCIRANOG KIMERNIM NUKLEAZAMA 2

1.3 KIMERNE NUKLEAZE ZFN, TALEN I SUSTAV CRISPR-Cas9 4

1.3.1 KIMERNA NUKLEAZA ZFN 6

1.3.2 KIMERNA NUKLEAZA TALEN 7

1.3.3 SUSTAV CRISPR-Cas9 8

1.4 METILACIJA MOLEKULE DNA 13

1.5 CILJANO MODIFICIRANJE EPIGENOMA 16

1.6 PRIMJENA MODIFICIRANOG SUSTAVA CRISPR-Cas9 U CILJANOM MODIFICIRANJU EPIGENOMA 17

1.7 GEN *MGAT3* 18

1.8 EKSPRESIJA GENA *MGAT3* U TUMORU JAJNIKA I DOJKE 20

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 21

3. MATERIJAL I METODE 22

3.1 MATERIJAL 22

3.2 METODE 24

3.2.1 KLONIRANJE PLAZMIDNIH VEKTORA ZA CILJANU METILACIJU PROMOTORA GENA *MGAT3* 24

3.2.2 ODRŽAVANJE STANICA BG1 U STANIČNOJ KULTURI 29

3.2.3 OPTIMIZACIJA TRANSFEKCIJE STANICA BG1 29

3.2.4 TRANSFEKCIJA STANICA BG1 PLAZMIDNIM VEKTORIMA ZA CILJANU METILACIJU PROMOTORA GENA *MGAT3* 31

3.2.5 IZOLACIJA RNA IZ TRANSFICIRANIH STANICA BG1 I TRETMAN DNazom 33

3.2.6 REVERZNA TRANSKRIPCIJA 34

3.2.7 LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU (qPCR) 34

3.2.8 RAZVOJ TESTA ZA ANALIZU METILACIJE CILJANE REGIJE PROMOTORA GENA *MGAT3* 35

3.2.9 PIROSEKVENCIRANJE 38

3.2.10 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 39

4. REZULTATI 40

4.1 OSJETLJIVOST STANICA BG1 NA ANTIBIOTIK PUROMICIN 40

4.2 OPTIMIZACIJA TRANSFEKCIJE STANICA BG1 REAGENSOM ViaFect Transfection Reagent 42

4.3 TRANSFEKCIJA STANICA BG1 PLAZMIDNIM VEKTORIMA ZA CILJANU METILACIJU PROMOTORA GENA *MGAT3* 43

4.4 RELATIVNA RAZINA EKSPRESIJE GENA *MGAT3* U TRANSFICIRANIM STANICAMA BG1 45
4.5 PCR BISULFITNO KONVERTIRANE DNA IZ STANICA BG1 47
4.6 PIROSEKVENCIRANJE.....50
5. RASPRAVA 51
6. ZAKLJUČAK.....55
7. LITERATURA.....56
8. ŽIVOTOPIS.....60

1. UVOD

1.1 RAZVOJ METODA ZA CILJANU MODIFIKACIJU GENOMA

Ciljano modificiranje genoma doprinijelo je napretku reverzne genetike te omogućilo bolje razumijevanje živog svijeta određivanjem funkcije gena i povezivanjem promjena u sekvenci gena s fenotipom. Dva su osnovna načina kojima ciljana modifikacija genoma može modificirati funkciju gena. Jedan je promjena genomske sekvence, koja može uključivati delecije, insercije ili rekombinacijom ubačene transgene, dok drugi način uključuje promjenu genske ekspresije djelovanjem RNA interferencije ili modifikacijama epigenetičke informacije. Svrha ciljanog modificiranja genoma je postići stabilnu genetsku promjenu, kako bi se mogao pratiti učinak promjene na fenotip (Chen i sur., 2014). Razumijevanje procesa homologne rekombinacije omogućilo je prvu ciljanu modifikaciju gena koji kodira za hipoksantin-guanin fosforibozil transferazu *(HPRT)* u kulturi stanica sisavaca. Da bi došlo do homologne rekombinacije egzogeno unesen transgen mora sadržavati sljedove homologne ciljanoj regiji, kako bi bio prepoznat od strane proteina uključenih u homolognu rekombinaciju. Prvi pokušaji ciljanog modificiranja genoma pomoću homologne rekombinacije pokazali su se neučinkovitima budući da je efikasnost transfekcije bila izrazito niska (Capecchi, 1989; Capecchi, 2005). Ugradnja gena za rezistenciju na određeni antibiotik u genom omogućila je pozitivnu selekciju transficiranih stanica. Sve se više pokazala potreba za negativnom selekcijom zbog toga što se transgen može nasumično ugraditi u genom nehomolognom rekombinacijom. Razvijen je vektor koji sadrži gen za timidin kinazu iz Herpes virusa izvan regije koja se homolognom rekombinacijom treba ugraditi u genom. Ukoliko dođe do nehomologne rekombinacije u genom će se ugraditi gen za timidin kinazu, što će rezultirati osjetljivošću takvih stanica na selekciju nukleozidnim analogom FIAU (1-(2-deoksi-2-fluoro-beta-D-arabinofuranozil)-5-jodo-uracil) (Mansour i sur., 1988). Utvrđeno je da oko 30-40 % slučajeva utišavanja gena (od engl. *knockout*) u spolnim stanicama rezultira letalnošću prilikom embrionalnog ili perinatalnog razvoja, što onemogućava praćenje učinka na fenotip. Otkriće mjesno specifičnih rekombinaza omogućilo je vremensko i stanično specifično modificiranje genoma. Dva najčešće korištena sustava mjesno specifičnih rekombinaza su Cre-LoxP i Flp-FRT. Rekombinaze Cre i Flp kataliziraju rekombinaciju između dvije sekvence LoxP odnosno FRT. Stanica u kojoj se specifično želi utišati određeni gen mora eksprimirati rekombinazu, dok gen od interesa ili jedan njegov ekson mora biti okružen specifičnim sekvencama (LoxP ili FRT), kako bi bio prepoznat od strane rekombinaze. Vremenski specifično modificiranje genoma može se postići korištenjem

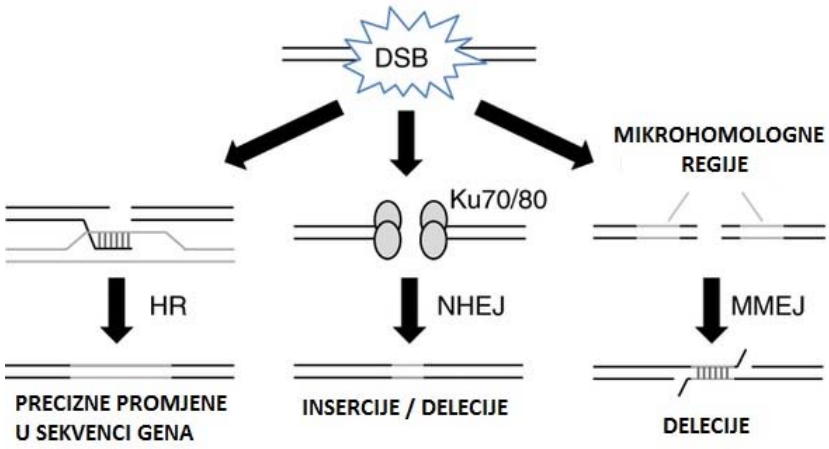
kimernog proteina Cre-ERT2 koji nakon ekspresije ostaje u citoplazmi, čime je onemogućeno djelovanje rekombinaze. Tretman tamoksifenom rezultira translokacijom kimernog proteina u jezgru, nakon čega može doći do mjesno specifične rekombinacije (Rocha-Martins i sur., 2015).

Nove metode ciljanog modificiranja genoma, koje omogućavaju indukciju dvolančanog loma u molekuli DNA na točno određenom mjestu, uključuju kimerne nukleaze ZFN (od engl. *zinc finger nuclease*), TALEN (od engl. *transcription activator-like effector nuclease*) i sustav CRISPR/Cas9 (od engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9*). Osnovna karakteristika kimernih nukleaza je efikasna manipulacija sekvence bilo kojeg gena u genomu različitih staničnih tipova i različitih organizama. Domena koja veže DNA kimernih nukleaza specifično veže određenu ciljanu genomsku sekvencu te navodi nespecifičanu nukleazu koja potom uvodi dvolančani lom u molekulu DNA (Gaj i sur., 2013). U stanici postoji nekoliko mogućih mehanizama popravka dvolančanih lomova, od koji su neki skloni pogreškama te mogu uvesti modifikacije u genomsku sekvencu. Nehomologno sparivanje krajeva (od engl. *non-homologous end joining*, NHEJ), sparivanje krajeva temeljeno na mikrohomologiji (od engl. *microhomology-mediated end joining*, MMEJ) i homologna rekombinacija (od engl. *homologous recombination*, HR) glavna su tri mehanizma popravka dvolančanih lomova u molekuli DNA induciranih kimernim nukleazama (Kawahara i sur., 2016).

Osim modifikacija sekvence gena počeo se razvijati novi pristup manipulacije ekspresije gena, koji se temelji na modificiranju epigenetičke informacije na ciljanom mjestu u genomu bez promjene u sekvenci. Epigenetičke modifikacije poput metilacije molekule DNA, posttranslacijskih modifikacija histona, remodeliranja kromatina značajno utječu na transkripcijski potencijal određenog genomskog područja promjenom kromatinske strukture. Velika je važnost pravilne epigenetičke informacije u regulatornim regijama gena, koji moraju biti aktivni ili inaktivni u određenim staničnim tipovima. Promjena epigenetičke informacije regulatornih regija, kao što su pojačivači (od engl. *enhancer*) i promotori može aktivirati ili utišati gensku ekspresiju, što može doprinijeti razvoju različitih bolesti (Hilton i Gersbach, 2015).

1.2 MEHANIZMI POPRAVKA DVOLANČANOG LOMA INDUCIRANOG KIMERNIM NUKLEAZAMA

Kimerne nukleaze ZFN, TALEN i CRISPR/Cas9 svojom nespecifičnom nukleaznom domenom uvode dvolančani lom na ciljana mjesta u genomu vođena DNA vezujućom domenom. Dvolančani lom potom aktivira stanične mehanizme popravka pomoću kojih je omogućeno uvođenje promjena u genomsku sekvencu i proučavanje funkcije gena (Slika 1).



Slika 1. Različiti mehanizmi popravka dvolančanog loma u molekuli DNA (DSB). Primaran mehanizam popravka u stanici je nehomologno sparivanje krajeva (NHEJ), koji je sklon pogreškama i rezultira insercijama i delecijama, čime se inaktivira gen od interesa. Sparivanje krajeva temeljeno na mikrohomologiji (MMEJ) zahtjeva terminalne mikrohomologne regije (> 5 nukleotida), koje će se nakon dvolančanog loma komplementarno spariti te rezultirati delecijama. Homologna rekombinacija (HR) je najvjerniji mehanizam popravka ograničen na fazu ciklusa S/G2, kojemu je potrebna homologna sekvenca pomoću koje može efikasno popraviti DSB. Ako se u stanicu ubaci transgen koji sadrži homologiju s krajevima zahvaćenima DSB, mogu se uvesti precizne promjene ili insercije u sekvencu gena od interesa. Preuzeto i prilagođeno prema radu Sakuma i sur. (2016).

Primaran mehanizam popravka dvolančanih lomova u stanici je nehomologno sparivanje krajeva (NHEJ). Glavna karakteristika NHEJ popravka je njegovo djelovanje tijekom cijelog staničnog ciklusa bez potrebe za homolognom sekvencom kao kalupom za popravak dvolančanog loma u molekuli DNA. Kada u stanici dođe do dvolančanog loma, na razdvojene krajeve molekule DNA se vežu heterodimerni helikazni kompleksi Ku70 i Ku80, nakon čega dolazi do regrutacije DNA ovisne protein kinaze, 5' i 3' endonukleaze Artemis, polimeraze (μ ili λ) i DNA ligaze IV. Postoje različiti ishodi mehanizma popravka NHEJ, budući da se endonukleaza, polimeraza i ligaza nasumično regrutiraju različitim redoslijedom. Također, polimeraze μ i λ mogu dodavati različiti broj nasumičnih nukleotida na svaki kraj zahvaćen lomom, što rezultira promjena u broju nukleotida na mjestu loma. Biološka posljedica različitih insercija i delecija koje nastaju tijekom popravka NHEJ je gubitak funkcije gena (Lieber, 2008).

U stanici postoji i alternativni mehanizam sparivanja krajeva nazvan MMEJ. Glavna značajka puta popravka MMEJ je prisutnost terminalnih mikrohomolognih regija na mjestu loma dužih od 5 nukleotida (nt). Također, u NHEJ mehanizmu popravka može doći do mikrohomolognog sparivanja, međutim dužina je ograničena na 1-4 nt (Lieber, 2008). MMEJ put popravka je neovisan o helikaznom proteinu Ku i o DNA ligazi IV te potpuni mehanizam još nije poznat, ali dokazana je uključenost kompleksa MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), polimeraze theta (θ) i DNA ligaze III. Pretpostavljeni mehanizam puta popravka MMEJ uključuje pet glavnih koraka: 5'-3' dorada krajeva

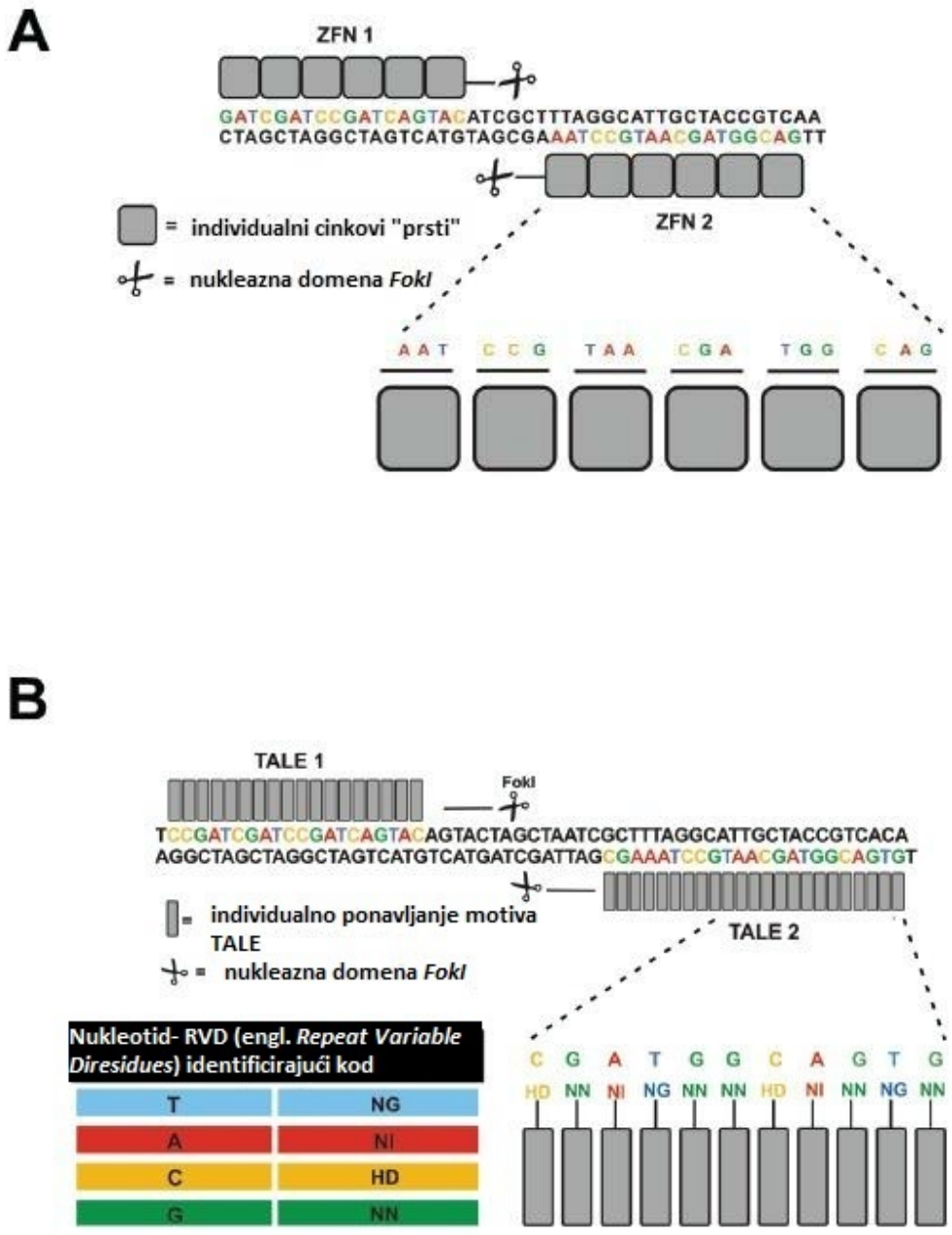
DNA zahvaćenih dvolančanim lomom, komplementarno sparivanje mikrohomolognih regija, uklanjanje nehomolognih „repova“ endonukleaznim cijepanjem pomoću XPF-ERCC1, popunjavanje praznina DNA polimerazom theta i ligacija pomoću DNA ligaze III. Budući da je put popravka MMEJ neprecizan, rezultira većim rearanžmanima i delecijama. Inducirani dvolančani lom kimernim nukleazama na određenom genomskom području može se popraviti putem popravka MMEJ, ako stanici nisu dostupni svi proteini uključeni u put popravka NHEJ, što za posljedicu ima gubitak funkcije gena (Sfeir i Symington, 2015).

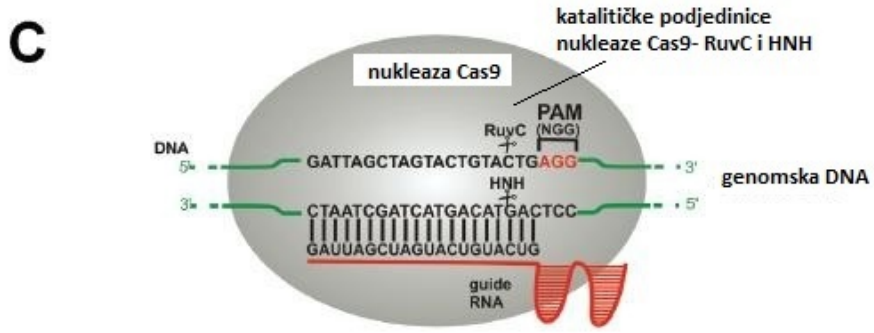
Homologna rekombinacija (HR) je najvjerniji mehanizam popravka dvolančanih lomova koji djeluje tijekom faze staničnog ciklusa S i G2, budući da koristi neoštećenu homolognu sestrinsku kromatidu kao kalup za popravak (Lieber, 2008). Mehanizam homologne rekombinacije započinje vezanjem MRN-CtIP kompleksa na krajeve zahvaćene dvolančanim lomom, nakon čega dolazi do formiranja 3' jednolančane DNA na koju se vežu replikacijski proteini A (RPA). RPA se potom zamjeni s Rad51 uz pomoć proteina Rad52, dok se na granicu dvolančanog i jednolančanog djela veže protein BRCA2. Nastankom jednolančanog 3' nukleoproteinskog filamenta započinje traženje homologne sekvence i formiranje Hollidayeve strukture, stabilizirane proteinom Rad54. Formiranjem Hollidayeve strukture omogućena je sinteza lanca i popunjavanje praznina na temelju kalupa sestrinske kromatide. Po završetku sinteze dolazi do razrješavanja Hollidayeve strukture i ligacije lanaca DNA (San-Filippo i sur., 2008). Ako se u stanicu unese i donorski plazmid, osim kimerne nukleaze, koji sadrži homologne regije specifične za određeni lokus, na kojem će kimerna nukleaza inducirati dvolančani lom, mogu se u genom uvesti precizne promjene, kao što su točkaste mutacije, insercije jednog ili više transgena (Gaj i sur., 2013).

1.3 KIMERNE NUKLEAZE ZFN, TALEN I SUSTAV CRISPR-Cas9

Najnovije metode ciljanog modificiranja genoma obuhvaćaju kimerne nukleaze ZFN, TALEN i sustav CRISPR-Cas9 (Slika 2, Tablica 1), kojima je omogućeno efikasno uvođenje dvolančanog loma na točno određeno mjesto u genomu. Osnovna razlika između metoda je u načinu prepoznavanja i vezanja ciljane sekvence DNA te u indukciji dvolančanog loma. Metode ZFN i TALEN specifično prepoznaju i vežu određenu DNA sekvencu proteinskim modulima, cinkovim „prstima“ kod metode ZFN i TALE proteinskim modulima kod metode TALEN te uvode dvolančani lom nespecifičnom nukleaznom domenom FokI. Razlika između proteinskih modula ZFN i TALEN je u tome što cinkovi „prsti“ specifično vežu triplete nukleotida, dok proteinski modul TALE veže pojedinačne nukleotide. Sustav CRISPR-Cas9 djeluje drugačijim mehanizmom, koji se temelji na ribonukleoproteinskom

kompleksu. Specifično navođenje sustava CRISPR-Cas9 na određenu sekvencu postiže se molekulom sgRNA (od engl. *single guide RNA*), dok se dvolančani lom uvodi nukleazom Cas9, kojoj je za efikasno vezanje potrebna sekvenca PAM (5'-NGG-3') (od engl. *protospacer adjacent motif*), neposredno nizvodno od mjesta vezanja molekule sgRNA, na lancu DNA koji nije komplementaran molekuli sgRNA (Chen i sur., 2014; Rocha-Martins i sur., 2015). Usporedba novih metoda ZFN, TALEN i CRISPR-Cas9 nalazi se u Tablici 1.

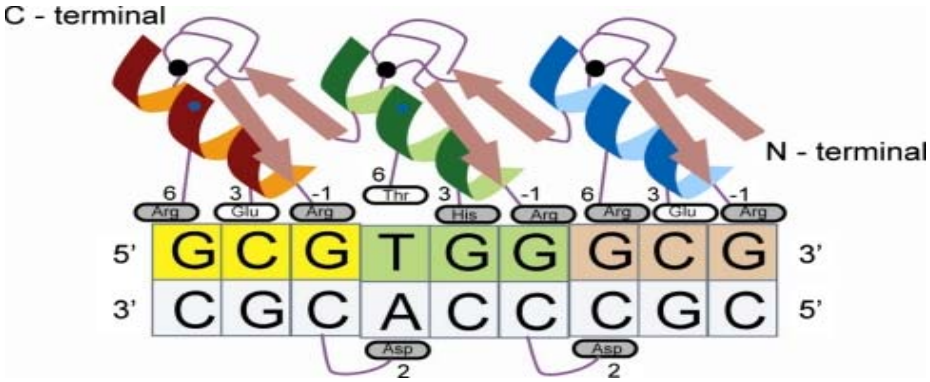




Slika 2. Ciljano modificiranje genoma kimernim nukleazama ZFN, TALEN i sustavom CRISPR-Cas9. (A) Kimerna nukleaza ZFN sastavljena je od cinkovih „prstiju“, koji prepoznaju triplete nukleotida te čine DNA vezujući motiv fuzioniran na nespecifičnu nukleazu FokI. Nukleaza FokI zahtjeva dimerizaciju, kako bi efikasno inducirala dvolančani lom u molekuli DNA, stoga se rade po dva para ZFN (ZFN 1 i ZFN 2) od kojih se svaki zasebno veže na lance suprotne polarnosti. **(B)** Kimerna nukleaza TALEN sadrži DNA vezujući motiv TALE, koji specifično prepoznaje pojedinačne nukleotide i navodi fuzioniranu nespecifičnu nukleazu FokI na određeno mjesto u genomu. Aminokiseline na poziciji 12 i 13 unutar motiva TALE nazvane su RVD (od engl. *repeat variable diresidues*) te su ključne u prepoznavanju nukleotida. Također, TALEN zahtjeva dimerizaciju nukleaze FokI, stoga se dizajnira u paru (TALE 1 i TALE 2). **(C)** Sustav CRISPR-Cas9 sačinjen je od nukleaze Cas9, kojoj je potrebna sekvenca 5'-NGG-3' (sekvenca PAM) za efikasno vezanje na ciljanu sekvencu DNA navođeno molekulom sgRNA. Nukleaza Cas9 sadrži dvije katalitičke domene RuvC i HNH potrebne za uvođenje loma na oba lanca molekule DNA. Preuzeto i prilagođeno prema radu Rocha-Martins i sur. (2015).

1.3.1 KIMERNA NUKLEAZA ZFN

ββα-struktura svakog cinkovog „prsta“ sačinjena je od 30 aminokiselina, od kojih je ogranak Cys_2His_2 stabiliziran ionom cinka (Zn^{2+}). Trinukleotidni motiv je specifično prepoznat od strane cinkovog „prsta“, a aminokiseline zaslužne za specifično prepoznavanje nukleotida su na pozicijama −1, +1, +2, +3, +4. +5 i +6 u odnosu na početak α uzvojnice (Slika 3). Promjene u aminokiselinama na tim pozicijama određuju specifično prepoznavanje trinukleotidnih sljedova. Najčešće se kombiniraju 3-6 uzastopnih cinkovih „prsta“, koji specifično prepoznaju 9-18 nt sekvence. Za ciljanu modifikaciju potrebno je dizajnirati par kimernih nukleaza ZFN (Slika 2A) koje okružuju sekvencu od interesa na suprotnim lancima molekule DNA, zbog toga što nukleaza FokI zahtjeva dimerizaciju za aktivnost (Carlson i sur., 2012; Grover i sur., 2010).



Slika 3. Specifično vezanje proteinskih modula ZFN na trinukleotidne sljedove molekule DNA. Aminokiseline na pozicijama −1, +1, +2, +3, +4. +5 i +6 u odnosu na početak α uzvojnice određuju specifično prepoznavanje pojedinih nukleotida. Preuzeto iz rada Grover i sur. (2010).

1.3.2 KIMERNA NUKLEAZA TALEN

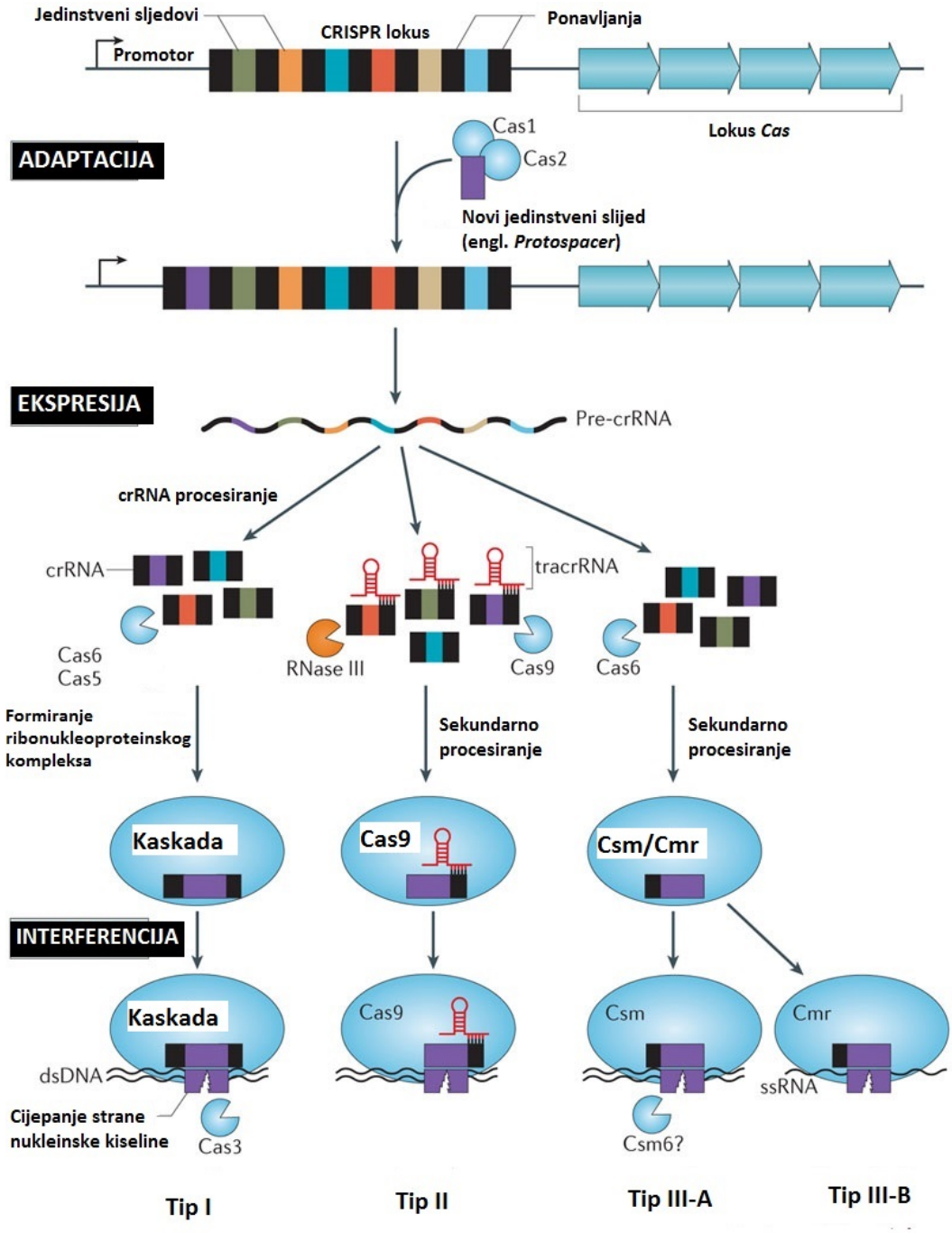
Metoda TALEN (Slika 2B) dijeli sličnosti s metodom ZFN u nukleaznoj domeni FokI, koja uvodi dvolančani lom na određeno mjesto u genomu. Razlika je u motivu koji veže DNA, koji je kod metode TALEN sastavljen od monomera proteina TALE, koji specifično prepoznaju pojedinačne nukleotide u molekuli DNA. Protein TALE otkriven je kao sekretorni protein patogene bakterije *Xanthomonas* u biljaka, koji specifično veže promotore određenih gena i modulira ekspresiju gena te utječe na simptome infekcije. Centralna domena koja veže DNA, jezgrin lokalizacijski signal i transkripcijska aktivacijska domena glavne su komponente proteina TALE. Također, sastavljen je od 34 aminokiseline, od kojih su aminokiseline na pozicijama 12 i 13 nazvane RVD (od engl. *repeat variable diresidues*) i ključne su za specifično prepoznavanje pojedinih nukleotida. RVD-nukleotidni kod je degeneriran, zbog toga što pojedini RVD motivi mogu prepoznati više nukleotida s različitom efikasnosti, stoga se kombinacijom više monomera proteina TALE, od kojih svaki sadrži specifičan RVD motiv, postiže ciljano vezanje kimerne nukleaze TALEN na određeno genomsko područje. Slično kao i kod metode ZFN, potrebno je dizajnirati par nukleaza TALEN (TALE 1 i TALE 2) koje okružuju regiju od interesa te se vežu na suprotne lance molekule DNA (Carlson i sur., 2012; Nemudryi i sur., 2014).

1.3.3 SUSTAV CRISPR-Cas9

Sustav CRISPR-Cas je otkriven u bakterijama te je važan u mehanizmu zaštite bakterija od stranih nukleinskih kiselina (virusa ili plazmida). Lokus CRISPR prvi je puta otkriven u bakteriji *E. coli* i može biti prisutan i u genomu ili na plazmidu. Sastavljen je od ponavljajućih sekvenci odvojenih jedinstvenim sljedovima (od engl. *protospacer*) porijeklom iz virusa ili stranih plazmida, čije prepisivanje je nužno za prepoznavanje stranih nukleinskih kiselina i zaštiti bakterija. U lokus se mogu ugraditi novi jedinstveni sljedovi (26-72 bp), koji omogućavaju prepoznavanje novih virusa ili stranih nukleinskih kiselina. Jedinstveni sljedovi se pravilno ugrađuju u lokus CRISPR i organizirani su u jednom smjeru, što omogućava kronološko praćenje ugradnje novih sljedova.

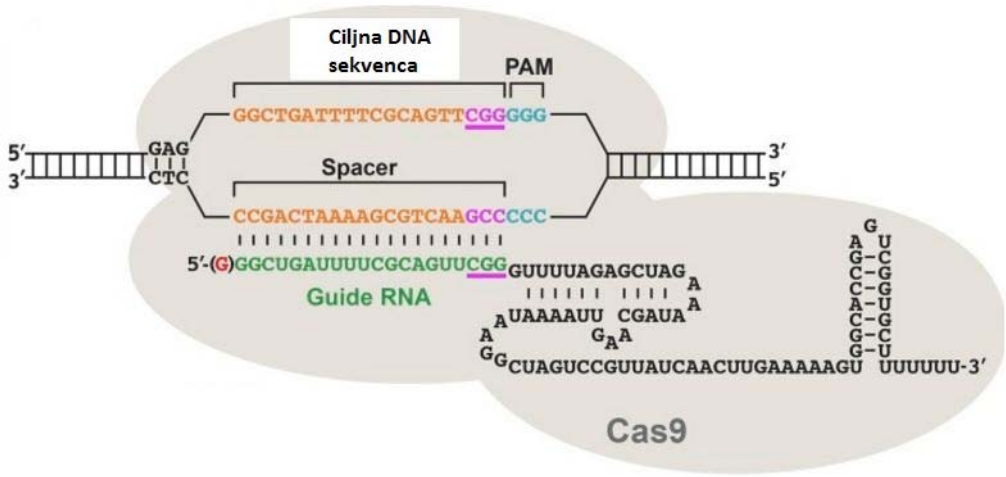
Mehanizam djelovanja sustava CRISPR-Cas može se podijeliti u tri glavne faze (Slika 4). U prvoj fazi, zvanoj adaptacija, bakterija prilikom infekcije ugrađuje novi jedinstveni slijed u lokus CRISPR djelovanjem proteina Cas1 i Cas2. Faza ekspresije bitna je za sintezu pre-crRNA (od engl. *pre-CRISPR RNA*), čijim procesiranjem u ponavljajućim sljedovima pomoću proteina Cas nastanu molekule crRNA, koje sadrže homologiju s ciljanom sekvencom. Treća faza je interferencija u kojoj dolazi do specifičnog prepoznavanja strane nukleinske kiseline od strane crRNA i cijepanja nukleazom, za čije efikasno vezanje je potrebna sekvenca PAM (5'-NGG-3'), koja se nalazi neposredno nizvodno od mjesta komplementarnog sparivanja molekule crRNA, na lancu koji nije komplementaran molekuli crRNA. Cijepanje ciljanog slijeda događa se točno na određenom mjesto, 3 nt uzvodno od sekvence PAM. Zaštita jedinstvenih sljedova porijeklom od stranih nukleinskih kiselina unutar lokusa CRISPR je postignuta upravo nedostatkom sekvenca PAM, čime je onemogućeno njihovo cijepanje.

Postoje tri glavna sustava CRISPR-Cas (I, II i III), a razlikuju se u povezivanju s različitim proteinima Cas, mehanizmu dorade pre-crRNA transkripta te u dužini crRNA nakon procesiranja, koje mogu sadržavati dijelove ponavljajućih sljedova na 3' i/ili 5' kraju (Slika 4). Različiti tipovi sustava CRISPR-Cas mogu postojati u istom organizmu. Lokus Cas, važan za kodiranje proteina uključenih u procesiranje pre-crRNA transkripta i u ugradnju novih jedinstvenih sljedova u lokus CRISPR, nalazi se najčešće blizu lokusa CRISPR, međutim može se nalaziti i drugdje u genomu.



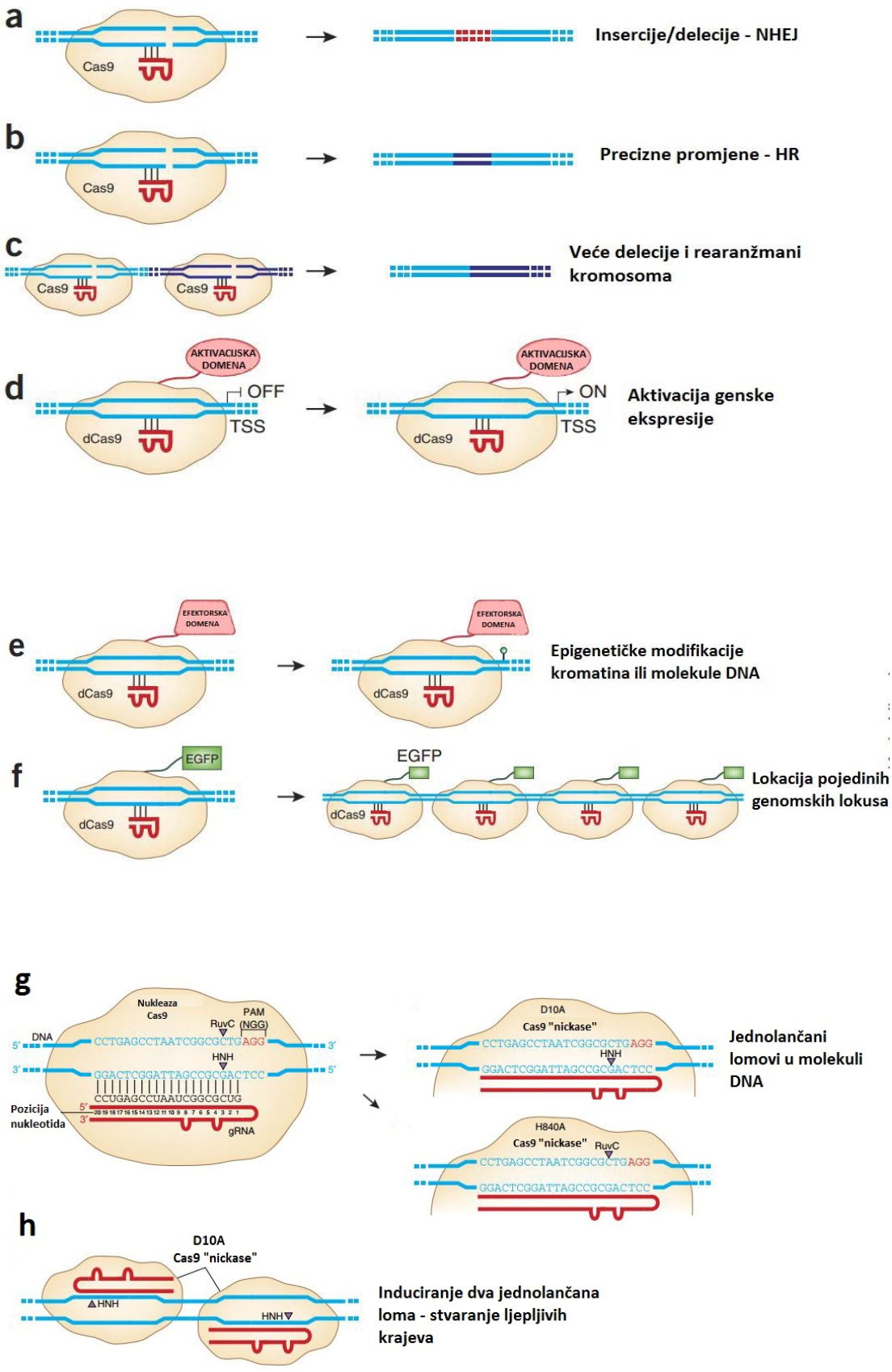
Slika 4. Različiti tipovi sustava CRISPR-Cas. Mehanizam djelovanja CRISPR-Cas može se podijeliti u 3 faze: adaptacija, ekspresija i interferencija. U fazi adaptacije dolazi do ugradnje novih jedinstvenih sljedova u lokus CRISPR između ponavljajućih sljedova pomoću proteina Cas1 i Cas2. U fazi ekspresije dolazi do prepisivanja cijelog lokusa CRISPR u dugačak transkript nazvan pre-crRNA. Potom slijedi procesiranje transkripta, koje se razlikuje u različitim tipovima sustava CRISPR-Cas. Cijepanje pre-crRNA transkripta događa se u područjima ponavljanja te je u tipu I vođeno proteinima Cas6 i Cas5, u tipu II RNazom III i proteinom Cas9, dok je u tipu III zaslužan protein Cas6. Rezultat procesiranja je nastanak molekula crRNA koje sadrže ostatke ponavljajućih sljedova na 3' i/ili 5' kraju. Kod Tipa II i III nakon primarnog procesiranja slijedi i sekundarno procesiranje. Tip II sustav koristi i molekule tracrRNA (od engl. *trans-acting crRNA*), kodirane u blizini lokusa CRISPR, za pravilno procesiranje pre-crRNA transkripta. Treća faza je faza interferencije u kojoj dolazi do slaganja ribonukleoproteinskog kompleksa između molekule crRNA i nukleaze (kaskada/Cas9/Csm) te do specifičnog cijepanja strane nukleinske kiseline, temeljeno na komplementarnom sparivanju s molekulom crRNA. Preuzeto i prilagođeno prema radu Westra i sur. (2014).

Tip II sustav CRISPR-Cas9 iz vrste *Streptococcus pyogenes* je najbolje proučen te postoje njegove modifikacije za primjenu u ciljanom modificiranju genoma i u indukciji dvolančanog loma na određenom mjestu u genomu. U stanicu, u kojoj se želi inducirati dvolančani lom na određenom mjestu u genomu, potrebno je unijeti vektor koji kodira za dvije osnovne komponente sustava CRISPR-Cas9: nukleazu Cas9 i molekulu sgRNA. Sustav tipa II koristi molekule tracrRNA (od engl. *trans-acting crRNA*) za pravilno procesiranje pre-crRNA transkripta. Molekule tracrRNA sadrže komplementarne sljedove ponavljanjima, koja se nalaze unutar pre-crRNA transkripta između jedinstvenih sljedova, čime je omogućeno njihovo vezanje na transkript i sudjelovanje u procesiranju. Također, važne su i u funkciji nukleaze Cas9, budući da je za efikasno uvođenje dvolančanog loma potreban kompleks crRNA-tracrRNA. Molekula sgRNA nastala je fuzijom molekula crRNA i tracrRNA (Slika 5). Na 5' kraju sgRNA 20 nukleotida specifično sudjeluje u prepoznavanju komplementarnog slijeda i navodi nukleazu Cas9 na ciljano mjesto 5' od sekvence PAM. Mijenjanje sekvence 20 nukleotida unutar 5' kraja molekule sgRNA omogućava određivanje mjesta na koje će se vezati konstrukt te gdje će doći do dvolančanog loma. Transkripcija malih interferirajućih RNA, malih molekula RNA s ukosnicama i molekula sgRNA efikasno se postiže s promotora RNA polimeraze III, kao što je U6 promotor. Također, ponekad je potrebno dodati gvanin (G) na 5' kraj sgRNA, ukoliko ga nema, budući da promotor U6 zahtjeva bazu gvanin (G) kao prvu bazu transkripta (Slika 5). Vektor za CRISPR-Cas9 ciljano modificiranje genoma mora stoga sadržavati U6 promotor za transkripciju molekule sgRNA pomoću RNA polimeraze III te zaseban promotor RNA polimeraze II za transkripciju nukleaze Cas9.



Slika 5. Prikaz modificiranog sustava CRISPR-Cas9 korištenog za ciljano modificiranje genoma. Dvije osnovne komponente su nukleaza Cas9 i molekula sgRNA nastala fuzijom molekula crRNA i tracrRNA. Sekvenca PAM (5'-NGG-3') nalazi se neposredno nizvodno od mjesta vezanja sgRNA, na lancu koji nije komplementaran molekuli sgRNA. Mjesto cijepanja ciljane DNA sekvence nalazi se 3 bp uzvodno od PAM sekvence. Crveno označeni gvanin (G) zasebno se dodaje na 5' kraj transkripta, ako ga nema, budući da promotor RNA polimeraze III (promotor U6) preferira bazu gvanin kao prvu bazu transkripta. Preuzeto i prilagođeno prema radu Farboud i Meyer (2015).

Višestruka je primjena sustava CRISPR-Cas9 u ciljanom modificiranju genoma (Slika 6). Induciranje dvolačanog loma na određenom području u genomu može rezultirati manjim insercijama ili delecijama mehanizmom popravka NHEJ. Također, moguće je u genom uvesti precizne promjene temeljene na homolognoj rekombinaciji, ako se u stanicu ubaci transgen koji sadrži homologiju s krajevima zahvaćenima dvolančanim lomom. Sustav CRISPR-Cas9 omogućava paralelno ciljanje i indukciju dvolačanog loma na više mjestu u genomu korištenjem različitih konstrukata sgRNA. Ukoliko se na istom kromosomu uvode dvolančani lomovi na dva udaljena mjesta istovremeno, moguće je dobiti veće kromosomske rearanžmane i delecije. Nukleaza Cas9 sadrži dvije nukleazne domene (RuvC i HNH) zaslužne za cijepanje svakog lanca molekule DNA, prilikom indukcije dvolančanog loma. Inaktivacija nukleazne domene RuvC promjenom aspartata na poziciji 10 u alanin (D10A) ili nukleazne domene HNH promjenom histidina na poziciji 840 u alanin (H840A) rezultira nastankom nukleaze Cas9 koja uvodi jednolančani lom u molekulu DNA (od engl. *nickase*). Nukleaza Cas9, koja uvodi jednolančani lom u molekulu DNA, dobivena mutacijom D10A je puno efikasnija od nukleaze Cas9 koja sadrži mutaciju H840A, stoga se u svrhu uvođenja jednolančanih lomova koristi mutacija D10A. Također je moguće stvaranje ljepljivih krajeva korištenjem sustava s dvije nukleaze Cas9, kojima je inaktivirana nukleazna domena RuvC, na različitim mjestima na istom kromosomu. Modifikacije sustava CRISPR-Cas9 uključuju inaktivaciju obiju nukleaznih domena te fuziju dodatne heterologne efektorske domene na inaktiviranu nukleazu dCas9 (od engl. *dead Cas9*), čime je omogućeno uvođenje epigenetičkih modifikacija bez induciranja dvolančanog loma te na taj način mijenjanje ekspresije gena. Moguće je vizualizirati pojedine lokuse u genomu, fuzijom pojačanog zelenog fluorescentnog proteina EGFP (od engl. *enhanced green fluorescent protein*) na inaktiviranu nukleazu dCas9 (Farboud i Meyer, 2015; Karvelis i sur., 2013; Ma i sur., 2014; Ran i sur., 2013; Rath i sur., 2015; Ren i sur., 2014; Sander i Joung, 2014; Westra i sur., 2014).



Slika 6. Različite primjena sustava CRISPR-Cas9 u ciljanom modificiranju genoma i epigenoma. (a) Popravak induciranog dvolančanog loma sustavom CRISPR-Cas9 pomoću mehanizma popravka sparivanjem nehomolognih krajeva (NHEJ)

rezultira insercijama i delecijama, čime se narušava funkcija gena. **(b)** Precizne promjene u genomu mogu se izvršiti ako se inducirani dvolančani lom popravi mehanizmom homologne rekombinacije (HR) u prisutnosti transgena, koji sadrži homologne regije s krajevima zahvaćenima dvolančanim lomom. **(c)** Ako se koristi par nukleaza CRISPR-Cas9 može se inducirati dvolančani lom na više mjesta istovremeno, što za posljedicu ima veće delecije i kromosomske rearanžmane. **(d)** Modificirani sustav CRISPR-Cas9 s inaktiviranom nukleazom Cas9 (mutacija D10A u nukleaznoj domeni RuvC i mutacija H840A u nukleaznoj domeni HNH) može sadržavati vezanu aktivacijsku domenu i regulirati ekspresiju gena. **(e)** Nova modifikacija sustava CRISPR-Cas9 uključuje inaktiviranu nukleazu dCas9 fuzioniranu s heterolognom efektorskom skupinom, koja može modificirati epigenetičku informaciju molekule DNA ili kromatina i time regulirati ekspresiju gena. **(f)** Sustavom CRISPR-Cas9 može se odrediti lokacija pojedinih lokusa u genomu fuzijom pojačanog zelenog fluorescentnog proteina (EGFP) na inaktiviranu nukleazu Cas9. **(g)** Inaktivacija jedne od nukleaznih domena nukleaze Cas9 (RuvC ili HNH) rezultira stvaranjem jednolančanog loma u molekuli DNA. **(h)** Korištenjem para CRISPR-Cas9 nukleaza koje sadrže inaktiviranu nukleaznu domenu RuvC može se inducirati jednolančani lom na više mjesta istovremeno te formirati jednolančani ljepljivi krajevi. Preuzeto i prilagođeno prema radu Sander i Joung (2014).

Tablica 1. Usporedba novih metoda za ciljano modificiranje genoma: ZFN, TALEN i CRISPR-Cas9. Preuzeto i prilagođeno prema radovima Chen i sur. (2014); Rocha-Martins i sur. (2015).

	ZFN	TALEN	CRISPR-Cas9
NAČIN PREPOZNAVANJE CILJANE SEKVENCE	Protein-DNA	Protein-DNA	RNA-DNA
VELIČINA PREPOZNAVANJA	9-18 bp × 2	10-20 bp × 2	20 bp
TIP NUKLEAZNE DOMENE	FokI	FokI	Cas9
VELIČINA	≈ 1 kb × 2	≈ 3 kb × 2	≈ 4.2 kb (Cas9) + 0.1 kb sgRNA
DOZVOLJENE POGREŠKE PRILIKOM PREPOZNAVANJA CILJANOG SLIJEDA	Nije poznato	1*	3
PARALELNO MODIFICIRANJE GENOMA (od engl. *multiplex targeting*)	Dosta limitirano	Limitirano	Moguće
OSJETLJIVOST NA METILACIJU DNA	Osjetljivo	Osjetljivo**	Nije osjetljivo
NESPECIFIČNO VEZANJE (od engl. *off-target*)	Češće nego kod metode TALEN	Rijetko	Češće nego kod metoda ZFN i TALEN
EFIKASNOST	0-12 %	0-76 %	0-81 %

* Značajno se smanjuje efikasnost cijepanja (Meckler i sur., 2013)

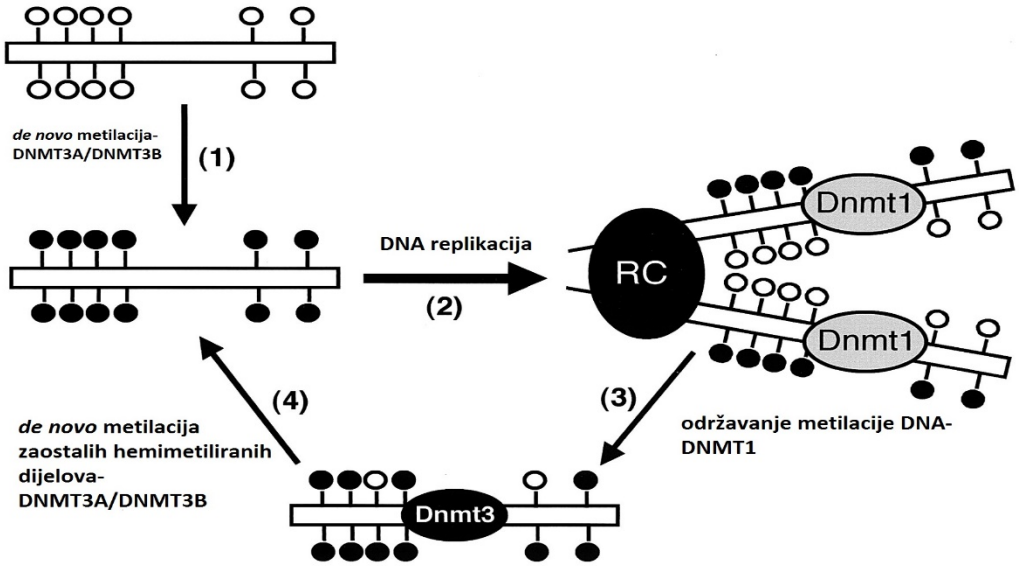
** Modificirani proteinski modul N*, kojemu nedostaje aminokiselina na poziciji 13 unutar motiva RVD, može vezati metilirane citozine (Valton i sur., 2012)

1.4 METILACIJA MOLEKULE DNA

Epigenetički mehanizmi utječu na ekspresiju gena bez promjena u nukleotidnoj sekvenci, što posljedično dovodi do promjene u fenotipu. Metilacija molekule DNA, posttranslacijske modifikacije histonskih proteina, djelovanje nekodirajućih RNA molekula, remodeliranje kromatina, varijante histona (Slika 8B) (Tollervey i Lunyak, 2012) i arhitektura jezgre (Cremer i Cremer, 2001) glavni su epigenetički mehanizmi regulacije ekspresije gena. Različiti epigenetički mehanizmi djeluju

zajedno te su različite epigenetičke promjene prisutne u različitim kombinacijama na određenom djelu u genomu, čime je određen transkripcijski status tog područja (Tollervey i Lunyak, 2012).

Metilacija molekule DNA najviše je proučena epigenetička modifikacija. Uključuje dodatak metilne skupine na peti atom ugljika u citozinu (C) u simetričnim mjestima CpG, CpNpG i nesimetričnim mjestima CpNpN (N može biti adenin (A), timin (T) ili citozin (C)) u genomu biljaka, od kojih je metilacija citozina u mjestima CpNpG i CpNpN specifična za biljke. Za razliku od biljaka metilacija molekule DNA kod animalnih organizama zabilježena je u 98 % slučajeva u dinukleotidima CpG. Enzimi zaslužni za uvođenje metilacije u molekulu DNA su iz obitelji DNA metiltransferaza (od engl. *DNA methyltransferases*, DNMTs). DNMT1 je metiltransferaza održavateljskog tipa, zaslužna za metilaciju hemimetilirane DNA prilikom replikacije molekule DNA (Slika 7) u S fazi staničnog ciklusa. DNMT3A i DNMT3B su metiltransferaze *de novo*, zaslužne za uspostavljanje pravilnog metilacijskog uzorka prilikom embrionalnog razvoja i diferencijacije stanica. Metiltransferaza DNMT3L nema katalitičku C terminalnu domenu, ali pokazuje važnu ulogu u stimuliranju metiltransferaza *de novo*, stvaranjem direktnih interakcija s njima (Jin i sur., 2011; Suetake i sur., 2004).

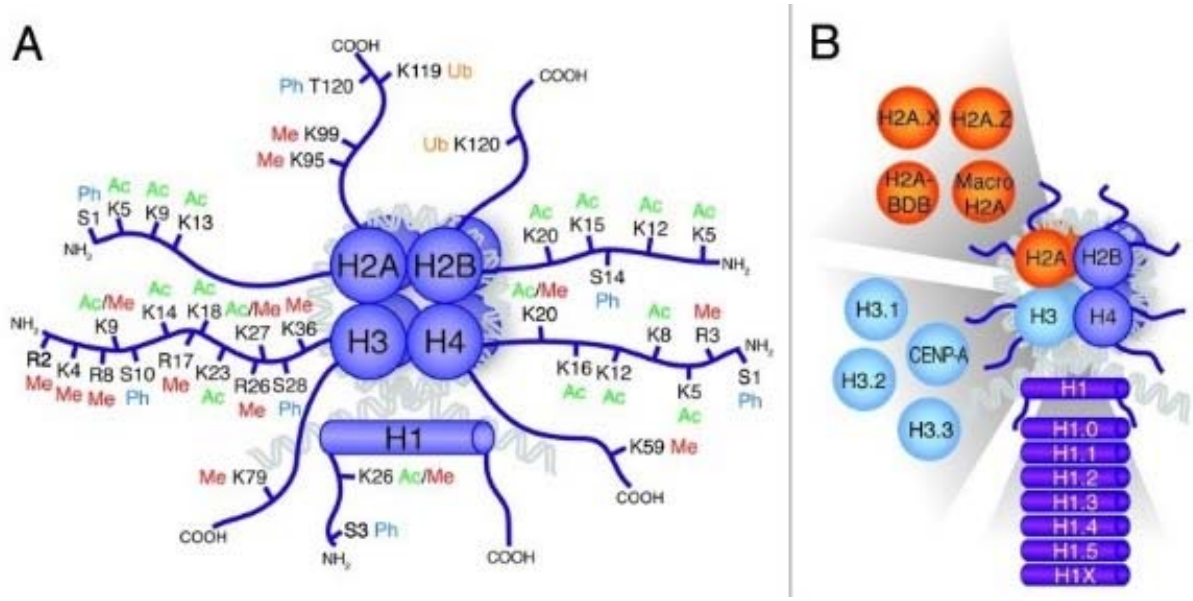


Slika 7. Prikaz uspostavljanja i održavanja pravilnog metilacijskog statusa. Metiltransferaze DNMT3A i DNMT3B uvode metilaciju *de novo* na određeno genomsko područje tijekom razvoja. Tijekom replikacije DNMT1 je vezana za replikacijski fokus (RC) te održava metilaciju na hemimetiliranoj molekuli DNA. Zaostali nemetilirani citozini poprave se nakon replikacije *de novo* metiltransferazama. Preuzeto i prilagođeno prema radu Chen i sur. (2003).

Većina dinukleotida CpG (70 %) nalazi se u metiliranom obliku u genomu sisavaca, u ponavljajućoj DNA, intergenskim razmaknicama, mobilnim elementima te u egzonima gena.

Metilacija DNA najčešće nije zabilježena u CpG otocima, koji su DNA sljedovi dužine oko 1 kb izrazito bogati dinukleotidima CpG, smješteni unutar 5' regija gena blizu mjesta početka transkripcije (TSS), važnih za regulaciju ekspresije gena. Nemetilirani CpG otoci nađeni su u većini „Housekeeping“ gena te u manjem djelu u tkivno specifičnim genima. Mehanizam djelovanja metilacije DNA u regulaciji ekspresije gena uključuje vezanje proteina MBD (od engl. *methyl-binding domain proteins*), koji specifično vežu metilirane citozine i regrutiraju druge proteine koji uvode epigenetičke modifikacije na histonske proteine te održavaju inaktivno stanje ili direktno blokiranje vezanja transkripcijskih faktora na promotorsku regiju gena (Deaton i Bird, 2011; Li i Bird, 2007).

Metilacija DNA nije jedini epigenetički mehanizam te je bitna koordinirana aktivnost i drugih mehanizama u regulaciji ekspresije gena. Istraživanja su pokazala da nisu svi promotori koji sadrže CpG otoke regulirani isključivo metilacijom DNA. Histonske posttranslacijske modifikacije (Slika 8A) su također bitne u regulaciji te je u nekim promotorima detektirana prisutnost aktivnih histonskih oznaka koje dominiraju nad DNA metilacijom i održavaju transkripcijski aktivni status gena. Metilacija DNA unutar CpG otoka nekih promotora ključna je kao regulatoran mehanizam ekspresije gena, međutim kod drugih promotora histonske posttranslacijske modifikacije mogu imati ključnu ulogu (Frauer i sur., 2012; Paulsen i sur., 2008).



Slika 8. Prikaz različitih posttranslacijskih modifikacija histonskih N terminalnih repova te najčešćih varijanta histona H2A, H3 i H1. (A) Različite posttranslacijske modifikacije N terminusa svih četiri različitih histona unutar oktamerne jezgre uključuju acetilaciju (Ac) lizina (K), fosforilaciju (Ph) serina (S) i treonina (T), metilaciju (Me) lizina i arginina (R) te ubikvitinaciju (Ub) lizina. Acetilacija i fosforilacija histona su jednoznačne oznake za transkripciju aktivnost, dok su metilacija i ubikvitinacija dvoznačne oznake i mogu potaknuti transkripcijsku aktivnost ili represiju ovisno o lokaciji oznake. **(B)** Varijante histona H2A, H3 i H1 pokazuju specifičnu ulogu u određenim genomskim područjima te se ubacuju u nukleosome neovisno o replikaciji. Preuzeto i prilagođeno prema radu Tollervey i Lunyak (2012).

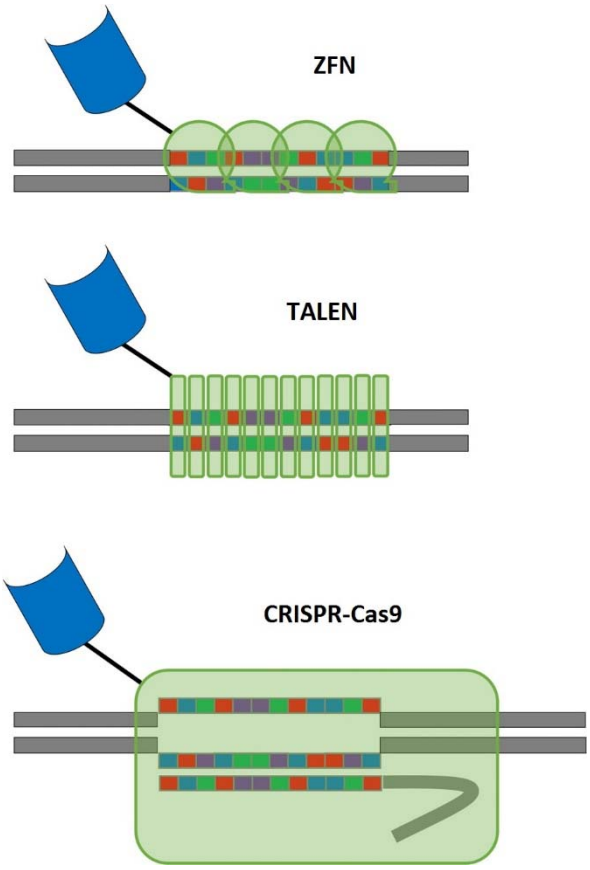
Kao što je pravilno uspostavljanje metilacije DNA nužno za diferencijaciju stanica, demetilacija molekule DNA također je važna za pravilan razvoj. Postoje dva vala epigenetičkog reprogramiranja prilikom kojeg se uklanjaju sve epigenetičke oznake te ponovno uspostavljaju. Prvi val reprogramiranja je nakon fertilizacije u predimplatacijskom embriju, a drugi u primordijalnim spolnim stanicama. Postoje dva osnovna mehanizma uklanjanja metilnih skupina: pasivna i aktivna demetilacija. Pasivna demetilacija može nastati kao rezultat nedostatka enzima DNMT1, što za posljedicu ima gubitak metilnih oznaka tijekom replikacije te je zabilježena u majčinom genomu prilikom fertilizacije. Aktivna demetilacija uključuje enzime TET (od engl. t*en-eleven translocation*), koji mehanizmom oksidacije uklanjaju metilnu skupinu u očevom genomu prilikom fertilizacije te u primordijalnim spolnim stanicama (Li, 2013; Seisenberger i sur., 2013). Također, novija istraživanja pokazuju globalnu hipometilaciju genoma tijekom starenja, koja je uključena u razvoj brojnih bolesti (Jung i Pfeifer, 2015).

1.5 CILJANO MODIFICIRANJE EPIGENOMA

Nova generacija ciljanog modificiranja genoma uključuje modifikacije epigenetičke informacije bez promjene sekvence DNA. Promjenom epigenetičke informacije na histonskim proteinima ili molekuli DNA može se utjecati na ekspresiju gena te posljedično dovesti do promjene fenotipa, čime je omogućeno proučavanje biologije kromatina, reprogramiranje stanice ili terapijsko djelovanje. Ekspresija gena regulirana je dinamičkom epigenetičkom informacijom te je njeno pravilno uspostavljanje nužno za pravilnu funkciju gena, stoga ciljano modificiranje epigenoma omogućava određivanje povezanosti regulacije gena i epigenetičkih modifikacija.

Ciljano modificiranje epigenoma temelji se na fuzioniranju katalitičke domene epigenetičkog efektorskog proteina („pisača“ koji uvodi određenu modifikaciju ili „brisača“ koji uklanja određenu oznaku) na DNA vezujuću domenu ZFN, TALE ili na katalitički inaktivianu nukleazu dCas9 (Slika 9). Budući da epigenetički efektorski proteini ne djeluju sami, već unutar velikih multiproteinskih kompleksa uvode određene epigenetičke modifikacije, ciljano navođenje epigenetičkog efektorskog proteina na određeno područje u genomu će rezultirati regrutacijom ostalih proteina potrebnih za uvođenje željene epigenetičke promjene (Kungulovski i Jeltsch, 2016; Laufer i Singh, 2015).

Problem kod ciljanog modificiranja epigenoma je stabilno održavanje uvedene epigenetičke oznake. Mehanizmi uvođenja i održavanja epigenetičkih oznaka su različiti te se pokazalo da u odsustvu konstrukta za ciljano modificianje epigenoma dolazi do gubitka inducirane epigenetičke oznake s vremenom (Kungulovski i sur., 2015).



Slika 9. Primjena metoda ZFN, TALEN i CRISPR-Cas9 u ciljanom modificiranju epigenoma. Primjena klasičnih metoda ZFN, TALEN i CRISPR-Cas9, korištenih za ciljano modificiranje genoma, može se modificirati fuzijom efektorske domene epigenetičkog „pisača“ ili „brisača“ na DNA vezujuću domenu te tako primijeniti u ciljanom modificiranju epigenoma. Plavo obojeni objekt predstavlja epigenetički efektorski protein. Preuzeto i prilagođeno prema radu Kungulovski i Jeltsch (2016).

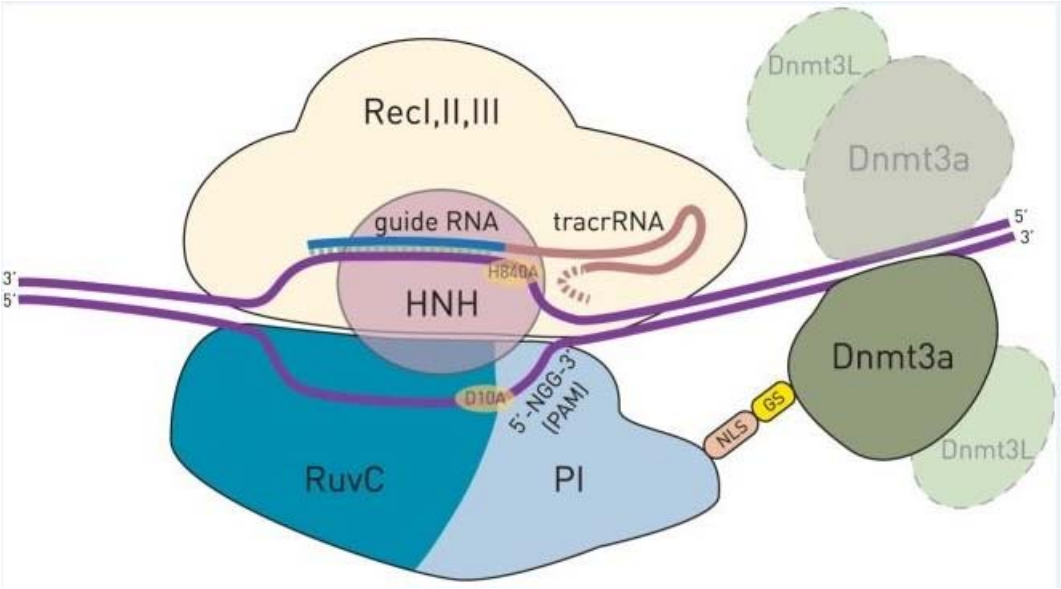
1.6 PRIMJENA MODIFICIRANOG SUSTAVA CRISPR-Cas9 U CILJANOM MODIFICIRANJU EPIGENOMA

Sustav CRISPR-Cas9 može se modificirati fuzijom katalitičke domene efektorskog proteina na inaktiviranu nukleazu dCas9. Promjenom 20 nt na 5' kraju konstrukta sgRNA omogućeno je ciljano vezanje modificiranog sustava CRISPR-Cas9 neposredno uzvodno od sekvence PAM. Također, sustav CRISPR-Cas9 omogućava paralelno vezanje više CRISPR-Cas9 konstrukata vođenih različitim molekulama sgRNA, što olakšava uvođenje modifikacija na šire područje u genomu (Laufer i Singh, 2015).

Dosadašnja primjena sustava CRISPR-Cas9 u regulaciji ekspresije gena uključivala je fuziju transkripcijskog aktivatora (Cheng i sur., 2013; Maeder i sur., 2013) ili represora (Thakore i sur., 2015) na inaktiviranu nukleazu dCas9, koji su regrutirali druge proteine potrebne za promjenu epigenetičke informacije, čime je inducirana ili inhibirana ekspresija gena. Nove modifikacije

sustava CRISPR-Cas9 uključuju fuziju epigenetičkih „pisača“ ili „brisača“ na inaktiviranu nukleazu dCas9. Fuzija histon acetiltransferaze p300 na inaktiviranu nukleazu dCas9 omogućila je induciranje ekspresije ciljanih gena uvođenjem H3K27 acetilacijskih oznaka (Hilton i sur., 2015).

Modifikacija sustava CRISPR-Cas9 nastala fuzijom *de novo* DNA metiltransferaze 3A (DNMT3A) na inaktiviranu nukleazu dCas9 preko fleksibilnog Gly_4Ser linkera (Slika 10) omogućila je ciljanu metilaciju DNA promotora gena *IL6ST* i *BACH2* (Vojta i sur., 2016).



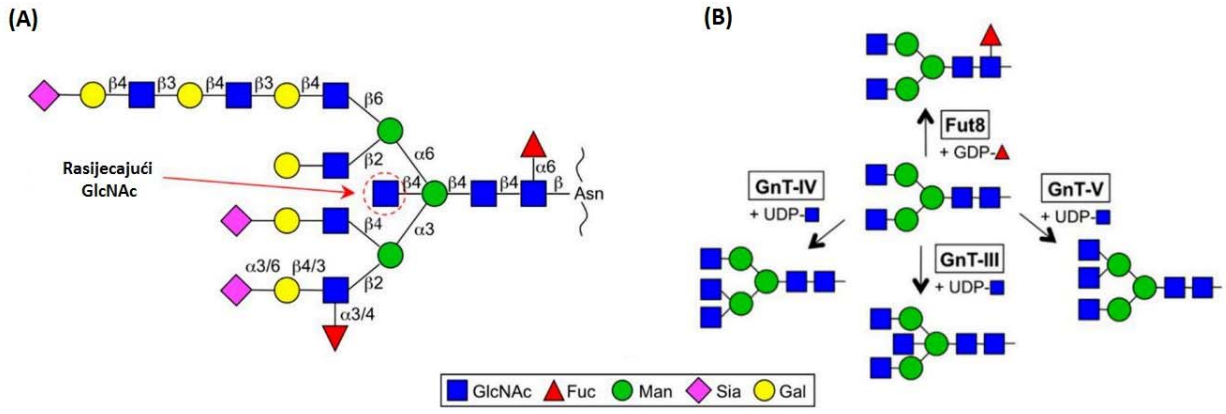
Slika 10. Prikaz modificiranog sustava CRISPR-Cas9 za ciljanu metilaciju DNA. Katalitička domena *de novo* metiltransferaze 3A (DNMT3A) fuzionirana je na C' terminalnu domenu inaktivne nukleaze dCas9 preko fleksibilnog Gly_4Ser linkera (GS). Dovođenjem DNMT3A na određeno mjesto u genomu regrutiraju se ostali proteini potrebni za uvođenje metilacije, kao što je interakcijski partner DNMT3A potreban za dimerizaciju i DNMT3L. Konstrukt sgRNA specifično je prepoznat od strane prepoznavajućih regija nukleaze (RecI, II i III). Katalitičke domene RuvC i HNH specifično su inaktivirane supstitucijama D10A i H840A. Domena PI (od engl. *PAM-interacting*) specifično veže sekvencu PAM i stabilizira vezanje kompleksa. NLS označava jezgrin lokalizacijski signal. Preuzeto i prilagođeno prema radu Vojta i sur. (2016).

1.7 GEN *MGAT3*

Glikozilacija proteina je posttranslacijska modifikacija koja uključuje dodatak šećernih skupina N-vezom na atom dušika bočnog lanca aminokiseline asparagin (Asn) (N-glikozilacija) unutar tri-peptidnih motiva Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr (N može biti bilo koja aminokiselina) ili na atom kisika bočnog lanca aminokiselina serin (Ser) ili treonin (Thr) (O-glikozilacija). Zajednička značajka svih N-glikana je pentasaharidna srž sastavljena od dva N-acetilglukozamina na koja su vezane tri manoze. Razgranatost i kompleksnost glikanskih ogranaka određena je dodatkom različitih šećernih skupina na osnovnu pentasaharidnu srž N-glikana (Berg i sur., 2002). Dodatak glikana utječe na funkciju proteina, interakcijske partnere, signalne puteve, staničnu adheziju te ulazak patogena.

Pravilna glikozilacija proteina nužna je za ispravnu funkciju proteina, stoga su promjene u glikozilaciji proteina povezane s nastankom i progresijom tumora, autoimunih bolesti te upalnih reakcija (Moremen i sur., 2012).

Gen *MGAT3*, lociran na kromosomu 22q13.1, kodira za enzim β1-4 N-acetilglukozaminiltransferazu III (GnT-III) koji dodaje N-acetilglukozamin (GlcNAc) vezom β1-4 na β manozu unutar pentasaharidne srži glikana te stvara rasijecajući GlcNAc (Ihara i sur., 1993). Većina tkiva u organizmu čovjeka pokazuje umjerenu ekspresiju gena *MGAT3*, čiji se proteinski produkt nalazi u citoplazmi. Najveća razina proteina GnT-III detektirana je u crijevima, srčanom i skeletnim mišićima, respiratornom epitelu i dojkama, dok ovariji, masno tkivo i jetra ne pokazuju ekspresiju gena *MGAT3* (The Human Protein Atlas). Nastanak rasijecajućeg GlcNAc rezultira daljnjom supresijom elongacije glikana (Slika 11A), budući da rasijecajući GlcNAc negativno djeluje na ostale glikoziltransferaze, kao što su GnT-IV i GnT-V (Slika 11B) te tako utječe na strukturu i funkciju glikoproteina. Aberantna ekspresija gena *MGAT3* može biti uključena u razvoj bolesti, kao što je razvoj i progresija tumora (Kizuka i Taniguchi, 2016).



Slika 11. Prikaz rasijecajućeg GlcNAc N-glikana te enzima uključenih u elongaciju ogranaka. (A) N-glikani mogu biti razgranate i kompleksne strukture sačinjene od N-acetilglukozamina (GlcNAc), fukoze (Fuc), manoze (Man), sijalinske kiseline (Sia) te galaktoze (Gal). Enzim GnT-III, kodiran od strane gena *MGAT3*, dodaje N-acetilglukozamin vezom β1-4 na β manozu pentasaharidne srži te stvara rasijecajući GlcNAc, čime je onemogućeno daljnje procesiranje N-glikana. **(B)** Specifični enzimi su uključeni u elongaciju ogranaka N-glikana: GnT-IV, GnT-V, GnT-III. Preuzeto i prilagođeno prema radu Kizuka i Taniguchi (2016).

1.8 EKSPRESIJA GENA *MGAT3* U TUMORU JAJNIKA I DOJKE

Promjene u ekspresiji gena za enzime uključene u uspostavljanje pravilnog uzorka glikozilacije utječu na aberantnu strukturu glikana, što može dovesti do nastanka, invazije i metastaziranja tumora (Abbott i sur., 2006; Guo i sur., 2002).

Analiza prisutnosti rasijecajućih GlcNAc pokazala je njihovu zastupljenost u svim testiranim tumorskim stanicama jajnika, za razliku od normalnih stanica, kod kojih nije detektirana ekspresija gena *MGAT3*, niti prisutnost proteinskog produkta GnT-III. Dokazana je uključenost metilacije DNA u mehanizmu regulacije ekspresije gena *MGAT3*. Tretman 5-aza-2'-deoksicitidinom (5-Aza) tumorskih i normalnih stanica jajnika pokazao je značajno povećanje ekspresije gena *MGAT3* u normalnim stanicama jajnika, za razliku od tumorskih stanica u kojima nije došlo do povećanja ekspresije. Dodatan tretman trihostatinom A (od engl. *trichostatin A*), koji je selektivan inhibitor histonskih deacetilaza, isključio je ključnu uključenost histonskih metiltransferaza, koje su regrutirane na kromatin djelovanjem histonskih deacetilaza, u regulaciji ekspresije gena *MGAT3*, budući da nije došlo do promjene ekspresije u normalnim stanicama jajnika. Stoga, u normalnim stanicama jajnika hipermetilacija promotora gena *MGAT3* sprječava njegovu ekspresiju i nastanak proteinskog produkta GnT-III, što rezultira odsustvom rasijecajućih GlcNAc. U tumorskim stanicama jajnika hipometilacija promotora gena *MGAT3* potiče ekspresiju enzima GnT-III te nastanak rasijecajućih GlcNAc na membranskim proteinima. Promjena u regulaciji ekspresije gena *MGAT3* u tumorskim stanicama jajnika povezuje epigenetički mehanizam metilacije DNA, pravilnu glikozilaciju proteina i tumorigenezu (Anugraham i sur., 2014).

Za razliku od tumora jajnika, kod kojeg je povećana ekspresija gena *MGAT3* povezana s nastankom tumora, kod tumora dojke povećana ekspresija gena *MGAT3* pokazuje tumor-supresorski učinak. Povećanje ekspresije gena *MGAT3* te nastanak rasijecajućih GlcNAc sprječava daljnju progresiju tumora dojke. Gubitak ekspresije gena *MGAT3* potiče rast i progresiju tumora dojke te metastaziranje u pluća. U normalnim stanicama dojke detektirana je velika ekspresija gena *MGAT3* i prisutnost rasijecajućih GlcNAc, stoga smanjenje ekspresije gena *MGAT3* pridonosi razvoju tumora dojke (Miwa i sur., 2013).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Opći cilj ovoga istraživanja bio je konstruirati epigenetički CRISPR-Cas9 alat za ciljanu metilaciju DNA promotora gena *MGAT3* blizu mjesta početka transkripcije (TSS) te utvrditi važnost metilacije na ciljanoj regiji u regulaciji ekspresije gena *MGAT3*. Dosadašnja istraživanja nisu uključivala ciljanu metilaciju DNA promotora gena *MGAT3*, već su različitim tretmanima epigenetičkim inhibitorima tumorskih i normalnih stanica pokazali promjenu u metilaciji, stoga bi ovo istraživanje korištenjem modificiranog sustava CRISPR-Cas9 prvi puta ciljano metiliralo regiju unutar promotora gena *MGAT3* i pokazalo važnost inducirane metilacije u regulaciji ekspresije gena *MGAT3*.

Specifični ciljevi su:

- konstrukcija plazmidnih vektora za ciljanu metilaciju promotora gena *MGAT3* kloniranjem sekvenci molekula sgRNA u vektore
- umnažanje plazmidnih vektora u bakterijskom soju *E.coli* XL10 Gold
- optimizacija transfekcije stanica BG1 reagensom ViaFect Transfection Reagent i plazmidom pdCas9-DNMT3A-EGFP
- optimizacija selekcije stanica BG1 antibiotikom puromicinom („Kill curve“)
- transfekcija stanica BG1 plazmidnim konstruktima za ciljanu metilaciju promotora gena *MGAT3*
- Selekcija i oporavak transfeciranih stanica BG1
- Izolacija ukupne RNA i reverzna transkripcija
- Analiza ekspresije gena *MGAT3* metodom qPCR korištenjem gena *HPRT1* kao endogene kontrole
- Određivanje značajne razlike u ekspresiji gena *MGAT3* između različitih bioloških skupina
- Razvoj testa za analizu metilacije ciljane regije promotora gena *MGAT3* metodom pirosekvenciranja

3. MATERIJAL I METODE

3.1 MATERIJAL

Komercijalni setovi kemikalija:

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka); DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen); PCR Mycoplasma Detection Set (TaKaRa, Tokio, Japan); ViaFect Transfection Reagent (Promega, Madison, SAD); PyroMark PCR Kit (Qiagen); EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Irvine, Kalifornija); innuCONVERT Bisulfite Basic Kit (anylytik jena, Jena, Njemačka); EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen); MethylEdge Bisulfite Conversion System (Promega); 20x TaqMan Gene Expression Assay: Hs02379589_s1, Hs01369240_m1, Hs02800695_m1 (Applied biosystems, Foster City, Kalifornija); 2x TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied biosystems); TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); TURBO DNA-free Kit (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents (Qiagen).

Enzimi:

BpiI (10 U/µL; Thermo Scientific); T4 Polynucleotide Kinase (10 000 U/mL; New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, SAD); Exonuclease V (10 000 U/mL; New England BioLabs); T4 DNA Ligase (350 U/µL; TaKaRa); PrimeScript Reverse Transcriptase (200 U/µL; TaKaRa).

Plazmidni vektori:

pdCas9-DNMT3A-PuroR (Addgene plazmid # 71667); pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV) (Addgene plazmid # 71684); pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2 (Addgene plazmid # 74407); pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV)_v2 (Addgene plazmid # 74408); pdCas9-DNMT3A-EGFP (Addgene plazmid # 71666).

Boje i markeri molekulskih masa:

GelPilot DNA Loading Dye 5 × (Qiagen); MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific); 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis Biodyne, Tartu, Estonija), etidij-bromid.

Ostalo:

Luria-Bertani (LB) tekući medij (10 g/L ekstrakt kvasca, 5 g/L tripton, 10 g/L NaCl); ampicilin (Sigma-Aldrich); 50 % glicerol, medij RPMI 1640 s L-glutaminom (Lonza, Basel, Švicarska); temperaturno inaktiviran fetalni goveđi serum (FBS, od engl. *fetal bovine serum*) (Biosera, Kansas City, SAD);

otopina penicilina i streptomicina (10K/10K) (Lonza); otopina tripsin-EDTA 0.25 % (Sigma-Aldrich) puromicin 10 mg/mL (Gibco, Paisley, Škotska); pufer TAE (1 mM Tris, 1 mM octena kiselina, 1 mM EDTA pH 8.0); 1 × PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4, 1.47 mM KH_2PO_4, pH 7.4); OptiMEM (Gibco); medij za održavanje fluorescencije (od engl. *fluorescence Mounting Medium*) (Dako, Glostrup, Danska); boja DAPI (Sigma-Aldrich); 4 % formaldehid; nasumični heksameri (50 µM, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija); Oligo$(dT)_{16}$ početnice (50 µM, Invitrogen); mješavina dNTP-a (10 mM, Sigma-Aldrich); inhibitor ribonukleaza Recombinant RNase Inhibitor (40 U/µL, TaKaRa); ATP (10 mM); DTT (10 mM); kloroform; etanol; sefarozne kuglice obložene streptavidinom Streptavidin Sepharose High Performance beads (GE Healthcare, Little Chalfolt, UK); pufer za ispiranje PyroMark Wash Buffer (Qiagen); pufer za denaturaciju PyroMark Deanturation Buffer (Qiagen).

Bakterijski soj:

E. coli XL10-Gold

Stanična linija:

Ljudska stanična linija tumora jajnika BG1

3.2 METODE

3.2.1 KLONIRANJE PLAZMIDNIH VEKTORA ZA CILJANU METILACIJU PROMOTORA GENA *MGAT3*

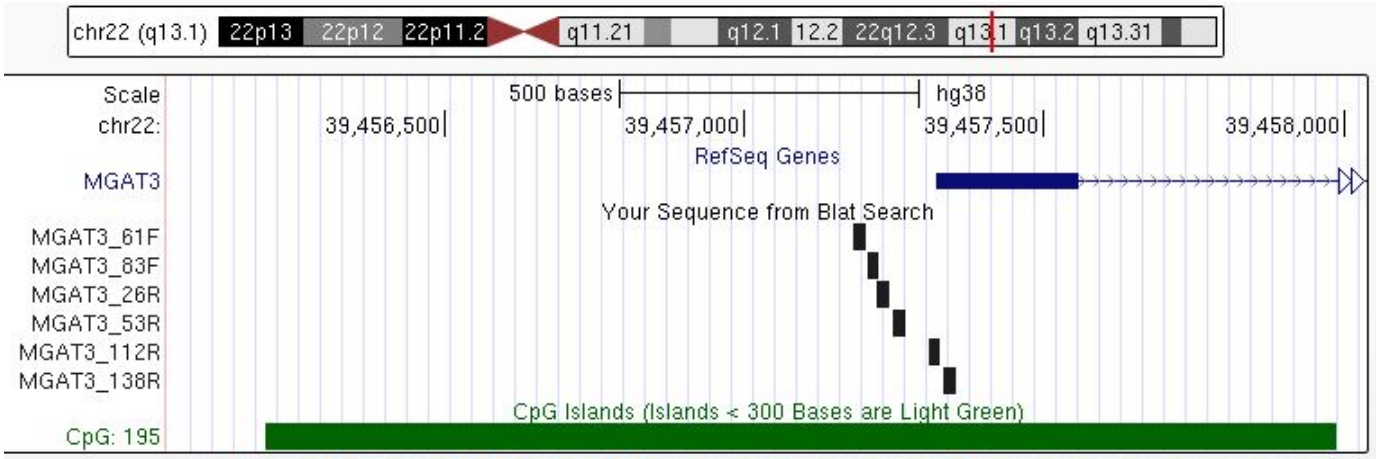
3.2.1.1 ODABIR CILJANIH SEKVENCI

Odabrano je 6 različitih sekvenci molekula sgRNA dugačkih 20 bp (od engl. *base pair*) (Slova N na donjoj shemi označavaju 20 nukleotida komplementarnih ciljanom mjestu) za navođenje modificiranog sustav CRISPR/Cas9-DNMT3A na promotorsku regiju gena *MGAT3* (Tablica 2, Slika 12). Ciljana komplementarna mjesta odabrana su unutar regije chr22:39457170-39457329 referentnog ljudskog genoma GRCh37 (hg19, veljača 2009.). Prilikom odabira sekvenci molekula sgRNA vodilo se računa o poziciji sekvence PAM (5'-NGG-3'), koja se mora nalaziti neposredno nizvodno od mjesta vezanja molekule sgRNA, na lancu molekule DNA koji nije komplementaran molekuli sgRNA. Ako odabrana sekvenca ne sadrži bazu gvanin (G) na 5' kraju, takva baza je dodana u sekvencu oligonukleotida (crveno označeni G), kako bi se postigla efikasna transkripcija molekule sgRNA s U6 promotora. Prema sljedećoj shemi dizajnirani su parovi oligonukleotida koji kodiraju za različite molekule sgRNA, vodeći računa o kloniranju u restrikcijsko mjesto BpiI/BbsI:

5′ – CACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNN – 3′
3′ – CNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAAA – 5′

Tablica 2. Sekvence molekula sgRNA za navođenje fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A unutar promotora gena *MGAT3*.

NAZIV MOLEKULE sgRNA	SEKVENCA MOLEKULE sgRNA (5'-3') UKLJUČUJUĆI SEKVENCU PAM (PODCRTANO)
MGAT3_26R	CGCGGAGGCGAGGCCGAGCGCGG
MGAT3_53R	GAGGGACCGCGGCGGGCGCGCGG
MGAT3_61F	CCGCTTGAGCCGGCGGGAGCGGG
MGAT3_83F	GCACCCCTGCGCGCCGCGCTCGG
MGAT3_112R	GGCCGCTCGGCTGCACCCCGGGG
MGAT3_138R	TCCACCCCGTCCCGGGGACCCGG
„Non-targeting“	GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC



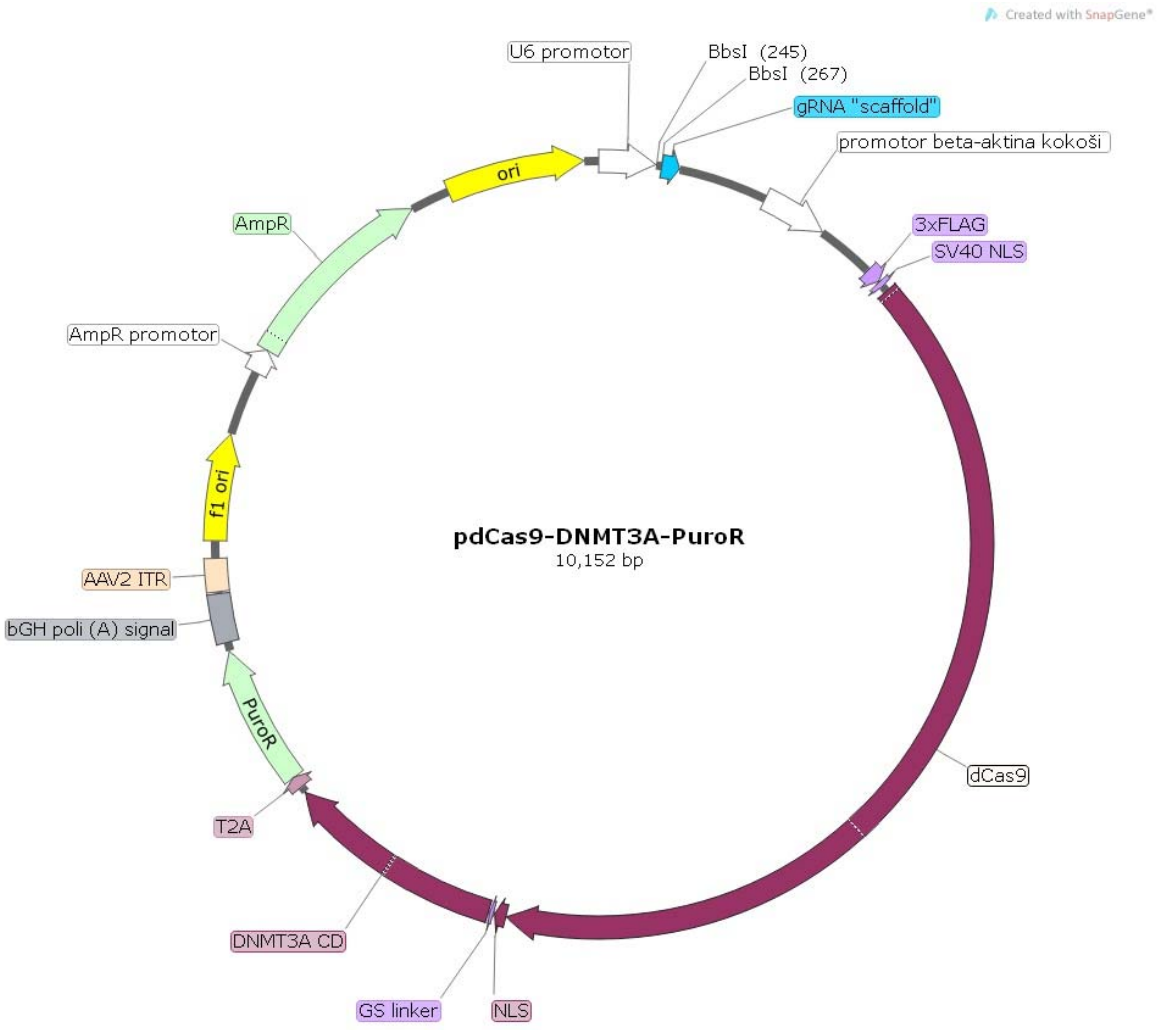
Slika 12. Prikaz položaja pojedinih molekula sgRNA za navođenje fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A na promotor gena *MGAT3*. Plavim pravokutnikom označen je prvi egzon gena *MGAT3*, a tankom linijom početak prvog introna (strelice upućuju na smjer transkripcije). Crnim pravokutnicima naznačen je položaj pojedinih sekvenci sgRNA. Zeleni pravokutnik označava područje CpG otoka.

3.2.1.2 KLONIRANJE SEKVENCI sgRNA U VEKTORE

Za kloniranje svake sekvence sgRNA (Tablica 2) dizajniran je par djelomično komplementarnih oligonukleotida, koji sparivanjem stvaraju ljepljive krajeve kompatibilne pocijepanim vektorima. Sinteza gena molekula sgRNA i njihovo kloniranje u vektore provedeno je prema protokolu s reakcijom digestije i ligacije u jednom koraku, objavljenom u radu Cong i sur. (2013). Postupak uključuje fosforilaciju i sparivanje oligonukleotida pomoću 1 µL svakog oligonukleotida, 0,5 µL T4 polinukleotid kinaze, 1 µL 10 × T4 ligacijskog pufera te 6,5 µL vode. Potom je slijedila reakcija digestije i ligacije u jednom koraku u ukupno 20 µL korištenjem 2 µL 10 × pufera G, 1 µL 10 mM DTT, 1 µL 10 mM ATP, 1 µL T4 DNA ligaze, 1 µL restrikcijskog enzima BbsI, 2 µL fosforiliranih i sparenih oligonukleotida razrijeđenih 250 × te 100 ng vektora. Na kraju se radio tretman egzonukleazom V, kako bi se pocijepale sve linearne molekule DNA. Reakcija je uključivala 7,5 µL produkta ligacijske reakcije, 1 µL pufera 10 × NE Buffer 4, 1 µL 10 mM ATP i 0,5 µL ExoV.

Četiri različita vektora korištena su u svrhu kloniranja svake sekvence sgRNA: pdCas9-DNMT3A-PuroR, pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV), pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2 i pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV)_v2. Ovi vektori kodiraju za inaktiviranu endonukleazu dCas9, mutacijama D10A i H840A u nukleaznim domenama RuvC i HNH, fuzioniranu preko fleksibilnog glicin-serin (Gly_4Ser) linkera na katalitičku domenu (aminokiseline P602-V912) ljudske *de novo* DNA metiltransferaze 3A (DNMT3A). Također, vektori kodiraju za puromicin N-acetiltransferazu potrebnu za rezistenciju na antibiotik puromicin, vezanu preko samo-cijepajućeg peptida 2A iz kapsidnog proteina virusa *Thosea asigna* (T2A) na C' terminus DNMT3A. Inaktivne verzije konstrukata (ANV) (pdCas9-

DNMT3A-PuroR (ANV) i pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV)_v2) razlikuju se od aktivne verzije (pdCas9-DNMT3A-PuroR i pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2) samo jednom supstitucijom u motivu VI u katalitičkoj domeni DNMT3A. Aktivne verzije konstrukata kodiraju za aktivni oblik enzima DNMT3A s konzerviranim tripeptidom ENV (Glu-Asn-Val), koji uvodi metilacijske oznake na ciljana mjesta vođena molekulama sgRNA. Za razliku od aktivnih verzija konstrukata, inaktivni konstrukti sadrže supstituciju E756A (Reither i sur., 2003) unutar katalitičke domene DNMT3A, koja rezultira promjenom glutamata (E) u alanin (A) unutar esencijalnog ENV tripeptida te nastankom ANV tripeptida (Ala-Asn-Val), čime se inaktivira DNMT3A. Svrha korištenja inaktivnih verzija konstrukata je provjera je li samo vezanje konstrukta dCas9-DNMT3A, vođeno molekulom sgRNA bez uvođenja metilacije, utječe na transkripciju gena *MGAT3*. Dvije varijante plazmida (v2) (pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2 i pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV)_v2) razlikuju se od originalnih plazmida u genu za rezistenciju na puromicin. Histidin (H) na poziciji 166 unutar gena za rezistenciju na puromicin u originalnim plazmidima može utjecati na smanjuju efikasnost puromicin N- acetiltransferaze u nekim staničnim linijama, što rezultira gubitkom transfeciranih stanica prilikom selekcije. Stoga, varijante plazmida (v2) sadrže „popravljen“ gen za rezistenciju na puromicin (PuroR) supstitucijom H166R (zamjena histina (H) na poziciji 166 argininom (R)), kako bi se provjerio učinak SNP (od engl. *single-nucleotide polymorphism*) promjene u genu za PuroR na efikasnost selekcije stanica BG1 puromicinom. Kao dodatna kontrola specifičnosti metilacije korištena je „Non-targeting“ molekula sgRNA (Tablica 2) klonirana u aktivne verzije plazmida, koja nema homologiju niti s jednom sekvencom u genomu čovjeka. Negativna kontrola kloniranja u vektore bila je reakcija digestije-ligacije bez inserta. Prikaz korištenog vektora pdCas9-DNMT3A-PuroR te mjesto cijepanja restrikcijskog enzima BbsI/BpiI nalazi se na Slici 13.



Slika 13. Struktura vektora pdCas9-DNMT3A-PuroR korištenog za kloniranje gena sgRNA molekula. U6 promotor: promotor RNA polimeraze III za U6 snRNA čovjeka, **sgRNA „scaffold"**: mjesto koje sadrži restrikcijsko mjesto za ugradnju gena crRNA molekula, **dCas9**: katalitički inaktivna endonukleaza Cas9, **SV40 NLS**: jezgrin lokalizacijski signal velikog T antigena virusa SV40 (od engl. *Simian virus 40*), **3xFLAG**: 3 uzastopna epitopa FLAG nakon kojih slijedi mjesto cijepanja enterokinaze, **GS linker**: pentapeptid Gly_4Ser, **DNMT3A CD**: katalitička domena ljudske DNA metiltransferaze *de novo* 3A, **T2A**: samo-cijepajući peptid 2A iz kapsidnog proteina virusa *Thosea asigna*, **PuroR**: N-acetiltransferaza puromicina, **BGH poly (A) signal**: terminacijska sekvenca gena goveđeg hormona rasta, **AAV ITR**: invertna terminalna ponavljanja virusa AAV2 (od engl. *Adeno-associated virus, serotype 2*), **f1 ORI**: ishodište replikacije bakteriofaga f1, **AmpR**: rezistencija na ampicilin (β-laktamaza). Promotor Cbh: hibridni oblik promotora beta aktina kokoši CBA (od engl. *chicken β-actin*).

3.2.1.3 TRANSFORMACIJA KEMIJSKI KOMPETENTNIH BAKTERIJA METODOM TEMPERATURNOG ŠOKA („HEAT SHOCK“)

Produkti ligacije transformirani su u kemijski kompetentne bakterije soja *E. coli* XL10 Gold. Prilikom transformacije toplinskim šokom bakterije je potrebno držati cijelo vrijeme na ledu do trenutka kada se prenose 30 s na 42°C u termoblok, kako bi pod utjecajem temperaturnog šoka primile plazmide. Za transformaciju je korišteno po 2 µL ligacijske smjese svakog plazmida. Nakon transformacije bakterijama se doda tekući LB medij zagrijan na 37°C te se oporavak bakterija provodi 30 min na 37°C i 350 rpm u termostatskoj tresilici. Nakon oporavka bakterije se nasade na zagrijane krute LB podloge na 37°C, koje sadrže antibiotik ampilicin (Amp) koncentracije 100 µg/mL za selekciju transformiranih bakterija. Ploče se potom inkubiraju 16 h na 37°C, kako bi narasle željene bakterijske kolonije.

Nakon inkubacije odabrane su po dvije kolonije uspješno transformiranih bakterija (A i B) sa svake ploče za pripremu prekonoćnih kultura. Prekonoćne kulture bakterija pripremljene su u 3 mL LB tekućeg medija uz dodatak ampicilina u konačnoj koncentraciji 100 µg/mL, nakon čega je slijedila inkubacija 16 h na 37°C i 350 rpm-a u termostatskoj tresilici.

3.2.1.4 IZOLACIJA REKOMBINANTNIH PLAZMIDA

Izolacija rekombinantnih plazmida radila se iz 2,5 mL prekonoćnih bakterijskih kultura pomoću komercijalno dostupnog seta QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. Nakon izolacije spektrofotometrijski je izmjerena koncentracija rekombinantnih plazmida na uređaju NanoVue (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

Ostatak bakterijskih prekonoćnih kultura (500 µL) spremljen je kao glicerolski „stock“ (prekonoćna kultura : 50 % glicerol= 1:1) na -80°C.

3.2.1.5 SEKVENCIRANJE REKOMBINANTNIH PLAZMIDA SANGEROVOM METODOM

U svrhu sekvenciranja korištena je usluga Macrogene servisa (Nizozemska). Svaki rekombinantni plazmid razrijeđen je elucijskim puferom prema uputama na stranici Macrogene (https://dna.macrogen.com/eng/support/ces/guide/ces_sample_prep.jsp) zajedno s početnicom za sekvenciranje (U6_Fwd početnica: 5'- GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC-3'). Rezultati sekvenciranja obrađeni su u programu Snapgene (GSL Biotech, Chicago, USA) kako bi se potvrdila ispravnost rekombinantnih plazmida.

Nakon sekvenciranja iz svake transformacije odabrana je po jedna kolonija bakterija (A ili B) koja sadrži ispravan rekombinantni plazmid. Rekombinantni plazmidi su dodatno umnoženi za potrebe transfekcije tumorskih stanica BG1.

3.2.2 ODRŽAVANJE STANICA BG1 U STANIČNOJ KULTURI

Za održavanje stanica BG1 u staničnoj kulturi koristio se medij RPMI 1640 upotpunjen s 10 % FBS (od engl. *fetal bovine serum*) te 1 % mješavine antibiotika penicilina (100 U/mL) i streptomicina (100 µg/mL), koja inhibira rast gram pozitivnih i gram negativnih bakterija.

Stanična linija BG1 izvađena je iz tekućeg dušika te se odmah po završetku odleđivanja stanicama doda ohlađeni medij RPMI 1640 (s 10 % FBS i 1 % Pen/Strep), kako bi se razrijedio DMSO (od engl. *dimethyl sulfoxide*) u krioprotektivnom mediju. Nakon centrifugiranja 5 min na 300 g u ohlađenoj centrifugi na + 4°C, ukloni se medij koji sadrži razrijeđeni DMSO. Stanice su potom resuspendirane u novih 10 mL medija RPMI 1640 (s 10 % FBS i 1 % Pen/Strep) te nasađene u petrijevku za uzgoj (100 mm). Inkubacija stanica se provodila na 37°C uz 5 % CO_2 u inkubatoru HeraCell Incubator (Thermo Heraeus).

Rast stanica BG1 pratio se pod invertnim svjetlosnim mikroskopom uz procjenu konfluencije te je stanicama redovito mijenjan medij RPMI 1640 (s 10 % FBS i 1 % Pen/Strep) svaki 3/4 dan. Kada su stanice dosegle 90-100 % konfluencije presađene su u nove petrijevke (100 mm) uz razrjeđenje od 20-30 ×. Prilikom presađivanja stanice su tripsinizirane 10 min na 37°C uz 5 % CO_2 u otopini tripsin-EDTA (koncentracije 0,25 %). Dodatkom medija RPMI 1640 (s 10 % FBS i 1 % Pen/Strep) inaktiviran je tripsin, a stanice su dobro resuspendirane i presađene u određenom volumenu u novu petrijevku (100 mm).

Također, tijekom stanične kulture pratila se eventualna prisutnost kontaminacije mikoplazmama. Postupak PCR detekcije mikoplazmi radio se prema uputama proizvođača komercijalno dostupnog seta PCR Mycoplasma Detection Set (TaKaRa).

3.2.3 OPTIMIZACIJA TRANSFEKCIJE STANICA BG1

3.2.3.1 ODREĐIVANJE OSJETLJIVOSTI STANICA BG1 NA PUROMICIN („KILL CURVE“)

Stanice BG1 nasađene su na dvije pločice s 24 bazenčića u 500 µL medija RPMI 1640 (s 10 % FBS i 1 % Pen/Strep) po bazenčiću. Budući da se stanice tretiraju antibiotikom u eksponencijalnoj

fazi rasta, nasađene su u bazenčiće tako da sutradan budu otprilike 30 % konfluentne. Sutradan su stanice tretirane antibiotikom puromicinom (Puro) u rasponu koncentracija od 0-5 µg/mL (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 i 5 µg/mL). Svaki tretman radio se u duplikatu uz negativnu kontrolu u kojoj stanice BG1 nisu bile tretirane antibiotikom. Učinak puromicina na stanice BG1 pratio se nakon 24 h i 48 h pod invertnim svjetlosnim mikroskopom, kako bi se odredila najniža koncentracija puromicina koja ubije sve stanice.

3.2.3.2 OPTIMIZACIJA TRANSFEKCIJE STANICA BG1 REAGENSOM ViaFect Transfection Reagent

Postupak optimizacije transfekcije reagensom ViaFect Transfection Reagent proveden je prema uputama proizvođača. U svrhu optimizacije koristio se plazmid pdCas9-DNMT3A-EGFP, koji sadrži gen za pojačani zeleni fluorescentni protein (od engl. *enhanced Green Fluorescent Protein*, EGFP) umjesto gena za rezistenciju na puromicin. Također, korišten plazmid omogućava jednostavno praćenje efikasnosti transfekcije uz pomoć fluorescentnog mikroskopa detekcijom zelene fluorescencije u stanicama. Veličina korištenog plazmida (10.266 bp) slična je veličini plazmida za ciljanu metilaciju opisanima u poglavlju 3.2.1, što je činilo ovaj plazmid prikladnim za optimizaciju transfekcije. Radila se optimizacija transfekcije za dvije različite količine plazmidne DNA (0,5 µg i 1 µg) te za omjer reagensa ViaFect Transfection Reagent i plazmidne DNA: 2:1, 3:1, 4:1, 6:1. Svaka kombinacija radila se u duplikatima, a uspješnost transfekcije gledana je nakon 24 h i 48 h. Kao negativna kontrola („Mock“) radila se reakcija s maksimalnom količinom reagensa ViaFect Transfection Reagent korištenom za transfekciju bez plazmidne DNA.

Postupak je uključivao nasađivanje stanica BG1 na pločicu s 24 bazenčića u 500 µL medija RPMI 1640 (s 10 % FBS i 1 % Pen/Strep) po bazenčiću tako da budu oko 35 % konfluentne, budući da je prema uputama proizvođača poželjno da su stanice na dan transfekcije oko 75 % konfluentne. Stanice kod kojih se efikasnost transfekcije gledala nakon 24 h nasađene su na prethodno stavljene lamele u bazenčićima, dok su stanice kod kojih se efikasnost transfekcije gledala nakon 48 h nasađene u bazenčiće bez lamela, na koje su presađene tek sutradan.

Sutradan su stanice bile oko 80 % konfluentne te im je uklonjen medij RPMI 1640 (s 10 % FBS i 1 % Pen/Strep) i nadomješten s 500 µL medija RPMI 1640 (bez 10 % FBS i 1 % Pen/Strep). Prema uputama proizvođača transfekcijskog reagensa preporučuje se korištenje medija bez seruma i antibiotika prilikom transfekcije, budući da serum i antibiotik mogu interferirati s transfekcijskim reagensom, prilikom čega može doći do smanjenja efikasnosti transfekcije. Transfekcijski kompleksi pripremljeni su prema uputama proizvođača, korištenjem definiranog medija bez seruma i antibiotika OptiMEM i reagensa ViaFect. Smjesa transfekcijskih kompleksa je potom inkubirana

15 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je po 50 µL smjese svakog transfekcijskog kompleksa dodano u odgovarajuće bazenčiće sa stanicama. Pločica sa stanicama BG1 potom je stavljena u inkubator na 37°C uz 5 % CO_2.

Nakon 24 h, stanice kod kojih se efikasnost transfekcije gledala nakon 24 h isprane su s 1 × PBS te fiksirane u 4 % formaldehidu. Lamele sa stanicama su potom uklopljene (sa stanicama prema dolje) u 20-30 µL mješavine medija za održavanje fluorescencije (od engl. *antifade*) i boje DAPI. Detekcija efikasnosti transfekcije radila se na fluorescencijskom mikroskopu brojanjem stanica kod kojih je zabilježena ekspresija EGFP na različitim vidnim poljima. Budući da je korišten fluorescencijski mikroskop koji ima posebne filtere za detekciju plave i zelene fluorescencije, slikane su zasebne slike na oba filtera, koje su potom preklopljene. Ukupan broj pozitivnih stanica izbrojan na nasumično odabranim vidnim poljima podijeljen je s ukupnim broja stanica na vidnim poljima, kako bi se dobio postotak efikasnosti transfekcije. Stanice iz negativne kontrole („Mock“) korištene su kao kontrola eventualnog negativnog učinka reagensa ViaFect Transfection Reagent na stanice BG1.

Stanice kod kojih se efikasnost transfekcije promatrala nakon 48 h presađene su uz razrjeđenje 4 × na pločicu s 12 bazenčića, u koje su prethodno stavljene lamele. Za presađivanje stanica BG1 (48 h) koristio se medij RPMI 1640 (s 10 % FBS i 1 % Pen/Strep), kako bi stanicama bili dostupni faktori rasta iz FBS. 24 h nakon presađivanja stanice su fiksirane pomoću 4 % formaldehida te je određena efikasnost transfekcije na fluorescencijskom mikroskopu.

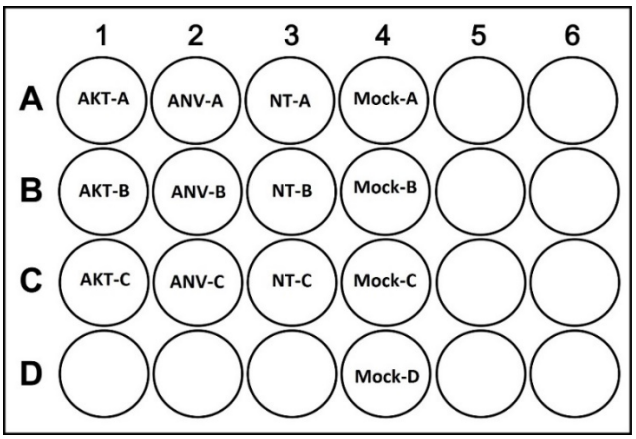
3.2.4 TRANSFEKCIJA STANICA BG1 PLAZMIDNIM VEKTORIMA ZA CILJANU METILACIJU PROMOTORA GENA *MGAT3*

Na temelju optimizacije određeni su uvjeti pri kojima je rađena transfekcija stanica BG1. Za transfekciju stanica BG1 korišteno je 1 µg plazmidne DNA omjera reagensa ViaFect Transfection Reagent i plazmidne DNA 6:1, a za selekciju 0,5 µg/mL puromicina. Transfekcija stanica BG1 radila se s mješavinama plazmida pdCas9-DNMT3A-PuroR, pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV), pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2 i pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV)_v2, kod koje svaki plazmid sadrži različite konstrukte sgRNA (Tablica 2). Pripremljene su četiri zasebne mješavine plazmida ukupne mase 1 µg, kod koje svaki plazmid s različitim konstruktom sgRNA čini 1/6 mase. Cilj nije bio odrediti točno područje unutar promotorske regije ključno za ekspresiju gena *MGAT3*, već je bio odrediti je li metilacija DNA na ciljanoj regiji uključena u regulaciju ekspresiju gena *MGAT3*. Prilikom transfekcije stanica BG1 mješavinom plazmida nije se očekivalo da će u svakoj transfeciranoj stanici

biti svaki plazmid s različitim konstruktom sgRNA, već je dobivena različita populacija stanica kod koje će različite stanice primiti različite plazmide.

Svaka transfekcija stanica BG1 mješavinama plazmida radila se u tri biološke replike. Četiri kontrolne replike („Mock“) tretirane su reagensom ViaFect Transfection Reagent bez plazmidne DNA. Jedna kontrolna replika korištena je kao kontrola selekcije puromicinom, dok su ostale tri kontrolne replike korištene za izolaciju ukupne RNA, koja je služila kao pozitivna kontrola ekspresije gena *MGAT3* prilikom metode lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR).

Postupak je uključivao nasađivanje stanica BG1 na dvije pločice s 24 bazenčića u 500 µL medija RPMI 1640 (s 10 % FBS i 1 % Pen/Strep) po bazenčiću, tako da budu oko 35 % konfluentne (Slika 14). Na jednoj pločici rađena je transfekcija mješavinama plazmida (v2) s „popravljenim“ genom za rezistenciju na puromicin, dok je na drugoj pločici rađena transfekcije s originalnim plazmidima.



Slika 14. Shematski prikaz pločice s 24 bazenčića korištene za transfekciju stanica BG1 plazmidnim vektorima za ciljanu metilaciju promotora gena *MGAT3*. AKT: aktivna verzija konstrukata; ANV: inaktivna verzija konstrukata; **NT:** vektori koji sadrže „Non-targeting“ konstrukt sgRNA; **Mock:** stanice tretirane reagensom ViaFect Transfection Reagent bez plazmidne DNA.

Drugi dan kada su stanice bile oko 70-80 % konfluentne rađena je transfekcija. Pripremljene su smjese transfekcijskih kompleksa, omjera reagensa ViaFect Transfection Reagent i plazmidne DNA 6:1, korištenjem mješavine svakog plazmida, definiranog medija OptiMEM i reagensa ViaFect. Smjesa transfekcijskih kompleksa je potom inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi, te su stanice u odgovarajućim bazenčićima transfecirane s 50 µL pojedine smjese.

Ostaci transfekcijskih kompleksa uklonjeni su dan nakon transfekcije, kada su stanice BG1 presađene na pločice sa 6 bazenčića (5 × veće površine) u ukupno 3 mL medija RPMI 1640 (s 10 % FBS i 1 % Pen/Strep) po bazenčiću. Na pločici sa 6 bazenčića radila se selekcija puromicinom

(0,5 µg/mL) 24 h nakon transfekcije. Nakon 48 h selekcije slijedio je oporavak stanica te je stanicama uklonjen selektivan medij i dodan svježi medij RPMI 1640 (s 10 % FBS i 1 % Pen/Strep), kako bi stanice narasle u dovoljnoj količini za izolaciju ukupne RNA. Samo je jedna biološka replika „Mock" sa svake pločice presađena zajedno s ostalim stanicama na pločice sa 6 bazenčića te je služila kao kontrola efikasnosti selekcije puromicinom. Ostale 3 replike „Mock" sa svake pločice presađene su u petrijevke (100 mm), kako bi stanice narasle u dovoljnoj količini za izolaciju ukupne RNA, koja je korištena kao pozitivna kontrola ekspresije gena *MGAT3* u metodi qPCR.

3.2.5 IZOLACIJA RNA IZ TRANSFICIRANIH STANICA BG1 I TRETMAN DNazom

Za izolaciju ukupne RNA korišten je TRI reagens (Sigma-Aldrich), a postupak je proveden prema uputama proizvođača. Stanicama je uklonjen medij RPMI 1640 te dodan TRI reagens (1 mL). Nakon odvajanja stanica od podloge stanice su prenesene u epice od 2 mL te im je dodano 0,2 mL kloroforma, kako bi došlo do razdvajanja faza uz kratko protresanje. Nakon inkubacije 15 min na sobnoj temperaturi uzorci su centrifugirani 15 min na 12000 g u ohlađenoj centrifugi na + 4°C. Gornja vodena faza u kojoj se nalazi ukupna RNA prenesena je u novu epicu te joj je dodano 0,5 mL izopropanola (100 %), nakon čega je slijedila inkubacija 10 min na sobnoj temperaturi. Potom su uzorci centrifugirani 10 min na 12000 g u ohlađenoj centrifugi na + 4°C. RNA se nalazi u talogu, stoga je uklonjen supernatant, nakon čega je RNA isprana s 1 mL 75 % etanola. Nakon centrifugiranja 5 min na 7500 g u ohlađenoj centrifugi na + 4°C i uklanjanja supernatanta, talog je ostavljen da se osuši, nakon čega je elucija ukupne RNA rađena s 30 µL DEPC-H_2O.

Kako bi se uklonila eventualna kontaminacija s DNA radio se tretman TURBO DNazom (Thermo Scientific) prema uputama proizvođača komercijalno dostupnog seta TURBO DNA-free Kit. Tretman TURBO DNazom u ukupno 50 µL smjese uključuje inkubaciju 30 min na 37°C ukupne RNA u 5 µL pufera 10 × TURBO DNase Buffer i 1 µL TURBO DNaze. Nakon inkubacije slijedio je postupak inaktivacije TURBO DNaze 5 min na sobnoj temperaturi pomoću 5 µL inaktivacijskog reagensa DNase Inactivation Reagent. Centrifugiranjem 2 min na 10000 g istaložila se inaktivirana TUBO DNaza i inaktivacijski reagens, a ukupna RNA oslobođena od DNA se nalazi u supernatantu. Zbog niskih koncentracija RNA izoliranih iz tri biološke replike AKT, ANV i NT u reakciju TURBO DNazom se išlo s ukupno 15,5 µL RNA, kako bi ukupan volumen reakcije na kraju bio 20 µL. Za uzorke „Mock" koncentracije izolirane RNA su visoke, stoga se u reakciju ukupnog volumena 50 µL išlo s 8 µg RNA.

3.2.6 REVERZNA TRANSKRIPCIJA

Postupak reverzne transkripcije proveden je prema modificiranom protokolu proizvođača reverzne transkriptaze PrimeScript (TaKaRa). Ukupan volumen reakcije sveden je na 30 µL te se je u reverznu transkripciju išlo s maksimalnih 12 µL RNA tretirane TURBO DNazom, budući da prema uputama proizvođača seta TURBO DNA-free Kit RNA tretirana TURBO DNazom smije činiti samo 40 % ukupne reakcije reverzne transkripcije. Prva reakcijska smjesa sadržavala je 1,5 µL nasumičnih heksamera (50 µM); 1,5 µL Oligo dT_{16} (50 µM); 1,5 µL mješavine dNTP (10 mM) te 12 µL RNA tretirane TURBO DNazom. Druga reakcijska smjesa sadržavala je 0,75 µL reverzne transkriptaze PrimeScript RTase (200 U/µL); 0,75 µL inhibitora ribonukleaza Recombinant RNase Inhibitor (40 U/µL); 6 µL pufera 5 × PrimeScript Buffer i 6 µL vode. Kao negativna kontrola radila se reakcija („RTminus“) bez reverzne transkriptaze s uzorkom RNA najviše koncentracije te reakcija („RNAminus“) bez dodatka RNA kalupa.

3.2.7 LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU (qPCR)

Za analizu ekspresije gena *MGAT3* korištena je metoda komparativnog qPCR na uređaju 7500 Fast Real-Time PCR System machine (Applied Biosystems), koja omogućava kvantifikaciju DNA, RNA ili cDNA detekcijom PCR produkata u stvarnom vremenu njihovog nastanka. Postoji više varijanti qPCR izvedbe, a u svrhu analize ekspresije gena *MGTA3* korištena je tehnologija „TaqMan“.

Dvije komercijalno dostupne probe i početnice (Hs02379589_s1 i Hs01369240_m1) korištene su za analizu ekspresije gena *MGAT3*, a za endogenu kontrolu korištena je proba i početnice za gen *HPRT1* (Hs02800695_m1), koji kodira za hipoksantin-guanin fosforibozil transferazu. Proba i početnice Hs02379589_s1 se nalaze unutar jednog egzona te detektiraju oba transkripta gena *MGAT3* (kraći i duži), koja se razlikuju u 5' netranslatiranoj regiji (od engl. *untranslated region*, UTR), a potencijalno može detektirati i DNA, ukoliko postoji kontaminacija s DNA. U svrhu isključenja detekcije DNA rađen je tretman DNazom opisan u poglavlju 3.2.5. Početnice i proba Hs01369240_m1 detektiraju samo duži transkript gena *MGAT3*, a zbog toga što se proba veže na granici 2. egzona ne može detektirati DNA.

Postupak pripreme reakcija za qPCR proveden je prema uputama proizvođača TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Za svaku biološku repliku AKT, ANV, NT i „Mock“ rađene su dvije tehničke replike za svaku probu. Smjesa qPCR reakcije uključivala je 10 µL reakcijske smjese s polimerazom (2 × Taqman Gene Expression Master Mix), 1 µL specifičnih proba i početnica (20 × Taqman Gene Expression Assay) i 5 µL vode. Po 16 µL smjese ispipetirano je na pločicu za qPCR s 96 bazenčića, nakon čega je dodano po 4 µL kalupa cDNA. Broj ciklusa reakcije qPCR iznosio

je 45. cDNA iz bioloških replika „Mock“ (A, B i C) razrijeđena je do konačne koncentracije slične ostalim uzorcima. Za svaku probu rađene su tri različite kontrole: RT_minus, RNA_minus (opisane u poglavlju 3.2.6) te PCR_minus reakcija kao kontrola qPCR reakcije bez cDNA kalupa.

Rezultati qPCR analize obrađeni su metodom $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001), pri čemu je biološka skupina „Mock“ korištena kao referentan uzorak. Vrijednosti C_t (od engl. *cycle Treshold*) dobivene za gene *MGAT3* i *HPRT1* prilikom reakcije qPCR označavaju ciklus u kojem reakcija dolazi u eksponencijalnu fazu. Budući da su rađene dvije tehničke replike za svaku biološku repliku, prvo je izračunata srednja vrijednost C_t za svaku biološku repliku. Dobivene srednje vrijednosti C_t za gen *MGAT3* normalizirane su u odnosu na srednju vrijednost C_t gena *HPRT1* odgovarajuće biološke replike, kako bi se dobila vrijednost ΔC_t. Potom je izračunata srednja vrijednost ΔC_t za svaku biološku skupinu, koja je normalizirana u odnosu na srednju vrijednost ΔC_t referentne skupine „Mock“. Dobivene vrijednosti $\Delta\Delta C_t$ korištene su za izračunavanje faktora promjene ekspresije gena FC (od engl. *fold change*).

3.2.8 RAZVOJ TESTA ZA ANALIZU METILACIJE CILJANE REGIJE PROMOTORA GENA *MGAT3*

Izolacija ukupne genomske DNA iz stanica BG1 provedena je prema uputama proizvođača komercijalno dostupnog seta DNeasy Blood & Tissue Kit iz maksimalnog broja stanica koji može ići u izolaciju DNA (5×10^6 stanica). Postupak uključuje lizu stanica u 20 µL proteinaze K i 200 µL pufera za lizu (Buffer AL). Nakon dodatka 200 µL 96 % etanola smjesa se prenese na kolone, na koje će se vezati DNA. Degradirani ostaci stanica uklone se centrifugiranjem 1 min na 6000 g, a DNA se ispire s 500 µL pufera AW1 i AW2. Elucija ukupne DNA radila se s 200 µL elucijskog pufera AE.

Prije postupka pirosekvenciranja potrebno je specifično umnožiti željenu regiju na bisulfitno konvertiranoj DNA. Ciljana regija promotora gena *MGAT3* bogata je ponavljanjima CpG, stoga je zbog ograničenosti mjesta za dizajn početnica na bisulfitno konvertiranoj DNA i veličine fragmenata koji se žele umnožiti korišteno nekoliko različitih komercijalno dostupnih setova za bisulfitnu konverziju (EZ DNA Methylation-GoldTM Kit, innuCONVERT Bisulfite Basic Kit, EpiTect Bisulfite Kit i MethylEdge Bisulfite Conversion System), kako bi se dobila što manje fragmentirana DNA nekim od komercijalnih setova. Postupci bisulfitne konverzije provedeni su prema uputama proizvođača svakog komercijalno dostupnog seta iz ukupno 1 µg genomske DNA. Postupak uključuje bisulfitnu konverziju DNA dodatkom konverzijskog reagensa pri određenim uvjetima reakcije, nakon čega slijedi postupak desulfonacije i pročišćavanja bisulfitno konvertirane DNA. PCR na bisulfitno konvertiranim kalupima DNA proveden je prema protokolu proizvođača komercijalno dostupnog seta PyroMark PCR Kit (Qiagen), optimiziranom za kasniju analizu pirosekvenciranjem. Reakcijska

smjesa sadržavala je 12,5 µL smjese s polimerazom (PyroMark PCR Master Mix); 2,5 µL boje 10 × CoralLoad; 0,5 µL početnica („forward“ i „reverse“), 8 µL vode i 1 µL kalupa DNA. Isprobane su različite kombinacije početnica na različitim kalupima DNA pri različitim temperaturama hibridizacije (od engl. *annealing temperature*, Ta). Prikaz korištenih kombinacija početnica, kalupa bisulfitno konvertirane DNA, temperatura hibridizacije te očekivane duljine fragmenta nalaze se u Tablici 3. Prikaz sekvence genomske i bisulfitno konvertirane DNA promotora gena *MGAT3,* u kojem se nalazi ciljana regija te položaji pojedinih početnica nalaze se na Slici 15 i 16.

Tablica 3. Različite kombinacije početnica, temperatura hibridizacije (Ta) i kalupa DNA korištenih za umnažanje bisulfitno konvertirane DNA (BK-DNA) iz stanica BG1.

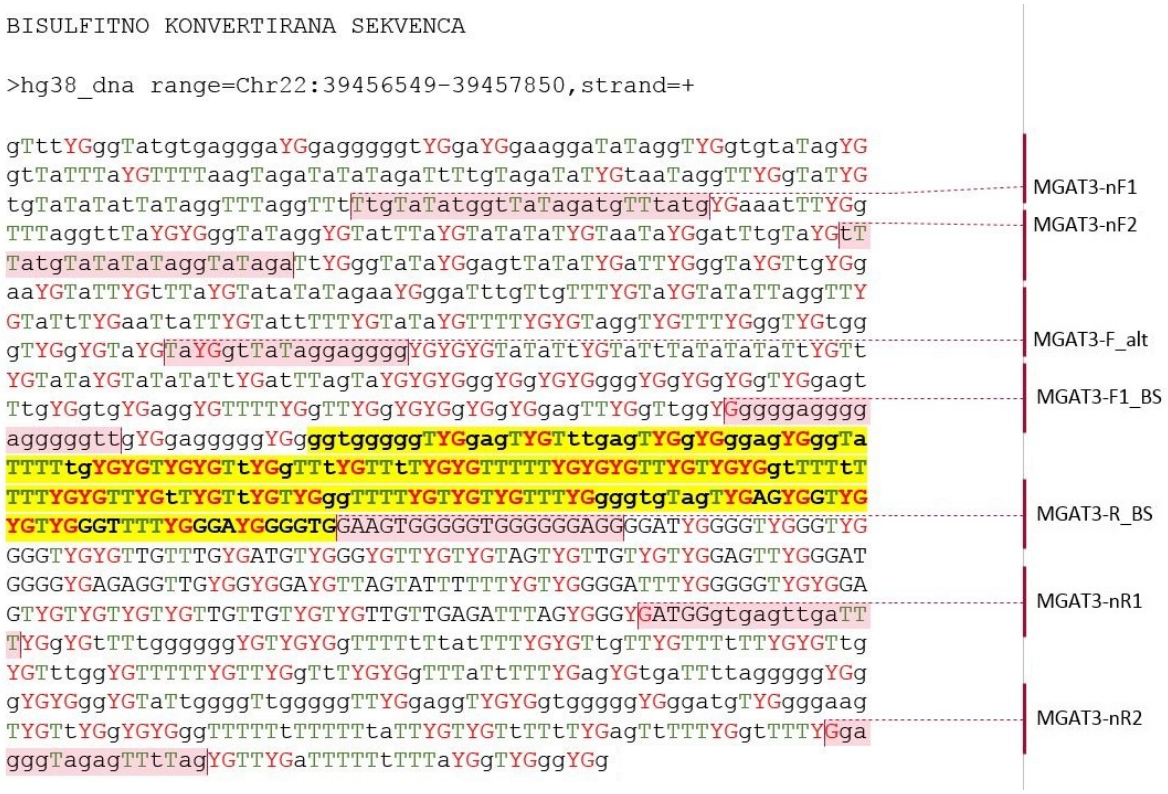
	POČETNICE	SEKVENCA POČETNICA (5'-3')	DULJINA/ nt	Tm/ °C	GC/ %	Ta/ °C	KALUP/ BK-DNA	AMPLIKON/ bp
A	MGAT3-nF1	TTGTATATGGTTATAGATGTTTATG	25	53	24	42/46/48	Zymo Research/ analytik jena/ Qiagen/ Promega	877
	MGAT3-nR1	AAATCAACTCACCCATC	17	51	41			
B	MGAT3-nF2	TTTATGTATATATAGGTATAGA	22	46	18	42/44/46	Zymo Research/ analytik jena/ Qiagen/ Promega	783
	MGAT3-nR1	AAATCAACTCACCCATC	17	51	41			
C	MGAT3-nF1	TTGTATATGGTTATAGATGTTTATG	25	53	24	45/48	Zymo Research	1130
	MGAT3-nR2	CTAAAACTCTACCCTCC	17	50	47			
D	MGAT3-nF2	TTTATGTATATATAGGTATAGA	22	46	18	42/44	Zymo Research	1036
	MGAT3-nR2	CTAAAACTCTACCCTCC	17	50	47			
E	MGAT3-F_alt	TAC/TGGTTATAGGAGGGG	17	54/50	52/47	45	Qiagen/ analytik jena	590
	MGAT3-nR1	AAATCAACTCACCCATC	17	51	41			
F	MGAT3-F_alt	TAC/TGGTTATAGGAGGGG	17	54/50	52/47	45	Qiagen/ analytik jena	843
	MGAT3-nR2	CTAAAACTCTACCCTCC	17	50	47			
G	MGAT3-F_alt	TAC/TGGTTATAGGAGGGG	17	54/50	52/47	45	Qiagen/ analytik jena	392
	MGAT3-R_BS	CCTCCCCCCACCCCCACTTC	20	69	75			
H	MGAT3-F1_BS	GGGGGAGGGGAGGGGGTT	18	68	77	58	Qiagen	233
	MGAT3-R_BS	CCTCCCCCCACCCCCACTTC	20	69	75			

Prilikom odabira početnica za umnažanje bisulfitno konvertirane DNA potrebno je voditi računa o nekoliko pravila. Početnice bi trebale biti dužine od 26-30 nt te ciljana regija koja se umnaža ne bi trebala prelaziti 450 nt. Također, temperature hibridizacije (Ta) između parova početnica ne smiju se razlikovati više od 1-2°C. Poželjno je da početnice sadrže citozine koji bisulfitnom konverzijom prelaze u uracil, a tijekom PCR reakcije u timin, kako bi se potvrdila

efikasnost bisulfitne konverzije. CpG dinukleotidi trebali bi se isključiti iz sekvence početnica, budući da se ne zna je li citozin metiliran ili nije, što može dovesti do manje efikasnog vezanja početnica (Patterson i sur., 2011). Zbog toga što je sekvenca oko ciljane regije unutar promotora gena *MGAT3* izrazito bogata ponavljanima pojedinih nukleotida i dinukleotida CpG otežan je dizajn početnica. Standardna pravila za dizajn početnica nisu se mogla u potpunosti ispuniti te su isprobane sve moguće kombinacije početnica (Slika 15 i 16, Tablica 3) u svrhu umnažanja ciljane regije.



Slika 15. Prikaz djela genomske sekvence promotora gena *MGAT3* te položaja pojedinih početnica. Crveni cg: CpG dinukleotidi, **žuti pravokutnik**: označava ciljani fragment, **crveni pravokutnici:** položaj pojedinih početnica, **mala slova**: sekvenca introna, **velika slova**: sekvenca egzona.



Slika 16. Prikaz djela bisulfitno konvertirane sekvence promotora gena *MGAT3* te položaja pojedinih početnica. Zeleni T: označava citozine bisulfitno konvertirane u timin (T), **crveni YG**: bisulfitno konvertirani CpG dinukleotidi koji mogu ili ne moraju biti metilirani (Y: T/C), **žuti pravokutnik**: ciljani fragment, **crveni pravokutnici**: položaj pojedinih početnica, **mala slova**: sekvenca introna, **velika slova**: sekvenca egzona.

3.2.9 PIROSEKVENCIRANJE

Jedinstven fragment je dobiven prilikom PCR reakcije korištenjem kombinacije početnica H (MGAT3-F1_BS i MGAT3-R_BS), koji odgovara po markeru molekulskih masa željenoj veličini amplikona. Stoga je produkt PCR reakcije analiziran metodom pirosekvenciranja, kako bi se vidjelo je li došlo do umnažanja ciljane regije. Ponovljena je PCR reakcija korištenjem „forward“ početnice MGAT3-F1_BS i biotinilirane „reverse“ početnice MGAT3-R_BS u ukupno 25 µL prema uputama proizvođača komercijalno dostupnog seta PyroMark PCR Kit. Po završetku PCR reakcije 5 µL uzorka provjereno je na gelu, kako bi se potvrdila uspješnost PCR reakcije, a ostalih 20 µL korišteno je u svrhu pirosekvenciranja.

Postupak pirosekvenciranja radio se na uređaju PyroMark Q24 Advanced (Qiagen) prema pripadajućem protokolu. Prvo je potrebno dizajnirati esej pomoću računalnog programa PyroMark Q24 Advanced Software, prema uputama proizvođača. Postupak pripreme uzorka uključuje imobilizaciju PCR produkta na sefarozne kuglice obložene streptavidinom vezanjem biotina, koji se nalazio na „reverse“ početnici. Reakcijska smjesa sadržavala je 3 µL sefaroznih kuglica Streptavidin

Sepharose HP, 37 µL pufera PyroMark Binding Buffer, 20 µL vode i 20 µL PCR produkta. Potom se pripremi razrjeđenje početnice korištene za pirosekvenciranje do konačne koncentracije od 0,375 µM pomoću pufera PyroMark Advanced Annealing Buffer. U svrhu pirosekvenciranja dobivenog amplikona korištena je ista „forward“ početnica, koja je korištena i u PCR reakciji. Nakon što su PCR produkti vezani na kuglice sefaroze slijedio je korak ispiranja i denaturacije lanaca na radnoj jedinici PyroMark Q24 Vacuum Workstation. Nakon denaturacije i ispiranja, kuglice sefaroze s vezanim biotiniliranim kalupom se pomiješaju s početnicom za pirosekvenciranje. Za vrijeme zagrijavanja smjese DNA i početnica na 80°C u trajanju od 2 min, dodaju se određene količine enzima i supstrata u posudicu (od engl. *catridge*) unutar uređaja te se započne postupak pirosekvenciranja.

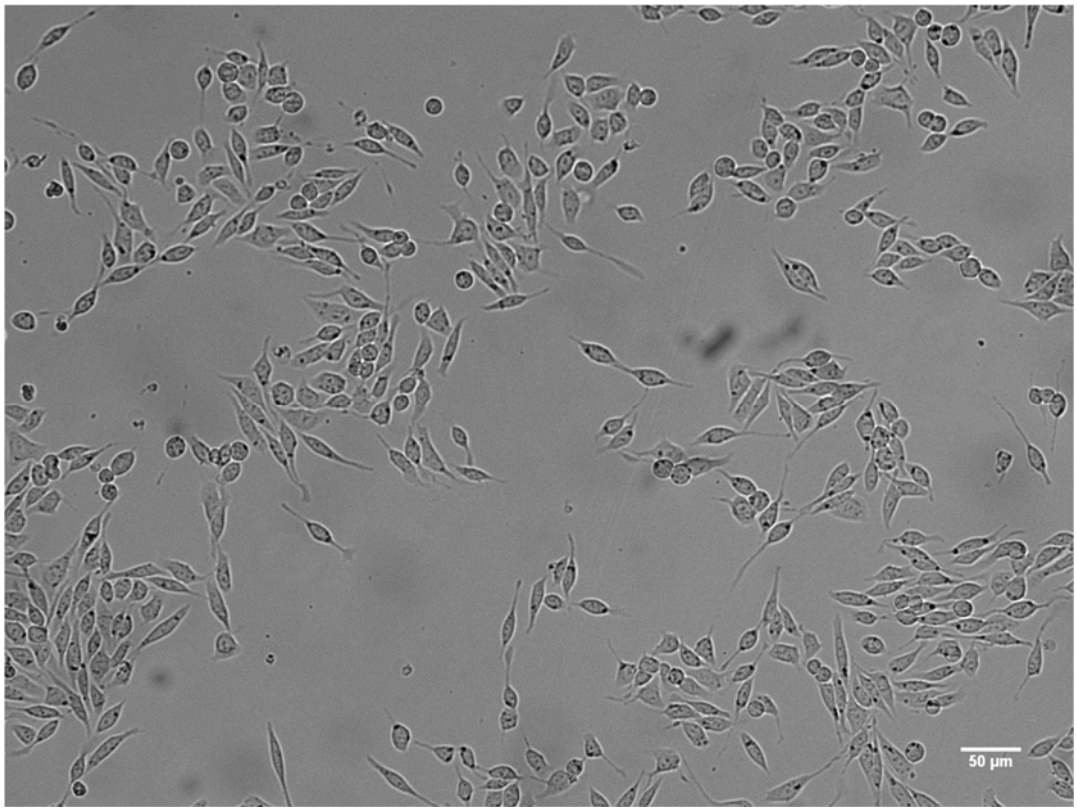
3.2.10 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati qPCR analize ekspresije gena *MGAT3* iz različitih transfekcija mješavinama plazmida pdcas9-DNMT3A-PuroR_v2 i pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV)_v2, od kojih svaki sadrži 6 različitih konstrukata molekula sgRNA, obrađeni su testom ANOVA u programu GraphPad Prism, kako bi se odredilo je li došlo do statistički značajne promjene ekspresije gena *MGAT3* u stanicama BG1 transfeciranima s plazmidima koji sadrže aktivnu DNMT3A.

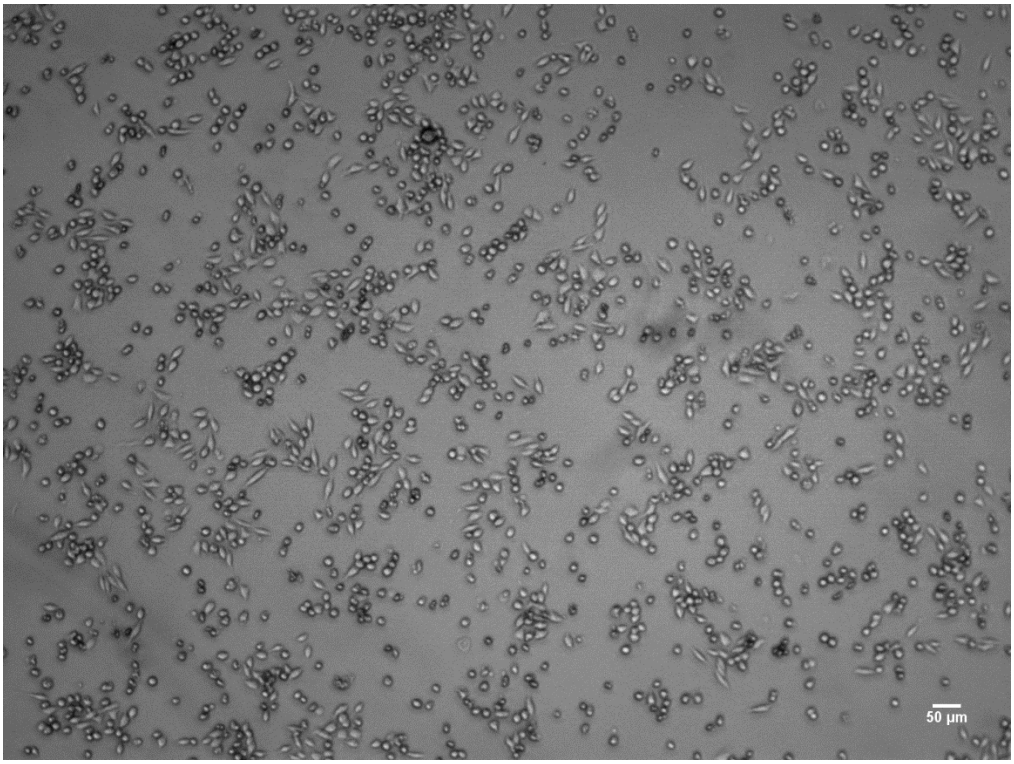
4. REZULTATI

4.1 OSJETLJIVOST STANICA BG1 NA ANTIBIOTIK PUROMICIN

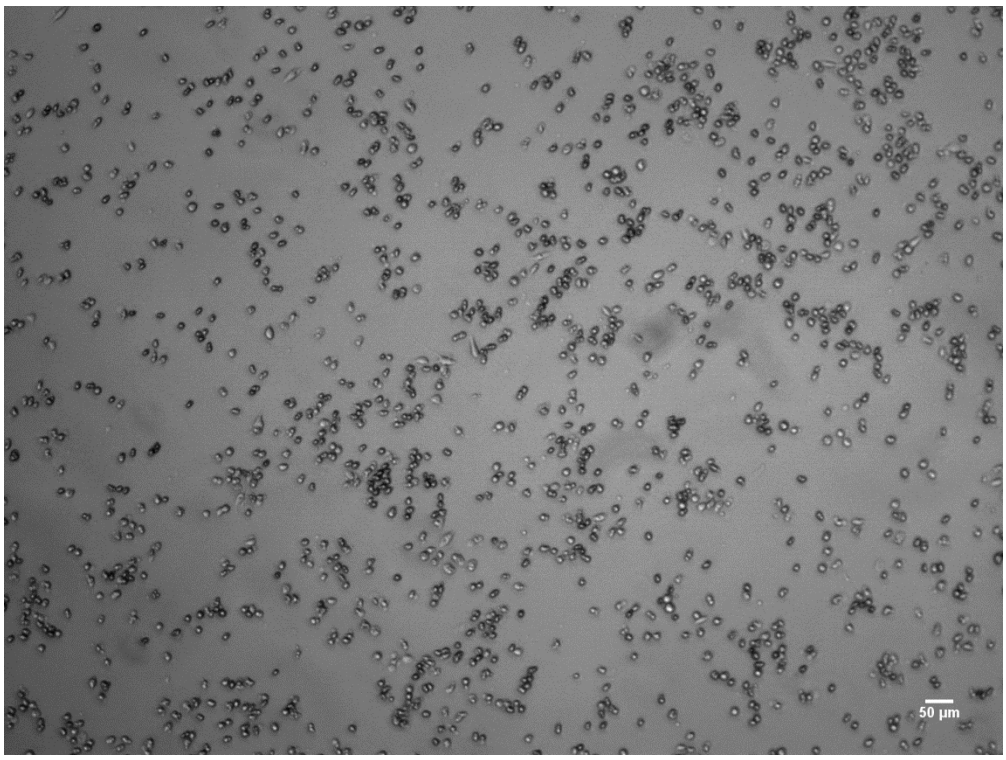
Stanice BG1 tretirane su antibiotikom puromicinom u rasponu koncentracija od 0-5 µg/mL kada su bile 30 % konfluentne. Svrha testa osjetljivosti stanica BG1 na puromicin je određivanje najniže koncentracije antibiotika puromicina koja ubije sve stanice. Pri koncentraciji puromicina od 0,5 µg/mL stotinjak živih stanica se moglo vidjeti nakon 24 h selekcije, dok nakon 48 h nije bilo niti jedne žive stanice. Tretiranje stanica BG1 koncentracijama manjima od 0,5 µg/mL rezultiralo je većim brojem preživjelih stanica nakon 48 h, dok su veće koncentracije ubile gotovo sve tumorske stanice odmah nakon 24 h. Koncentracija 0,5 µg/mL je stoga odabrana kao najniža koncentracija koja ubije sve netransfecirane stanice BG1 nakon 48 h. Na Slici 17 nalazi se prikaz morfologije vijabilnih stanica BG1, dok su na Slikama 18 i 19 prikazane stanice BG1 24 h nakon tretmana puromicinom koncentracije 0,5 µg/mL i 1 µg/mL.



Slika 17. Ljudske stanice BG1 tumora jajnika. Na slici se vidjeti okrugla struktura stanica BG1 s izdancima na suprotnim krajevima.



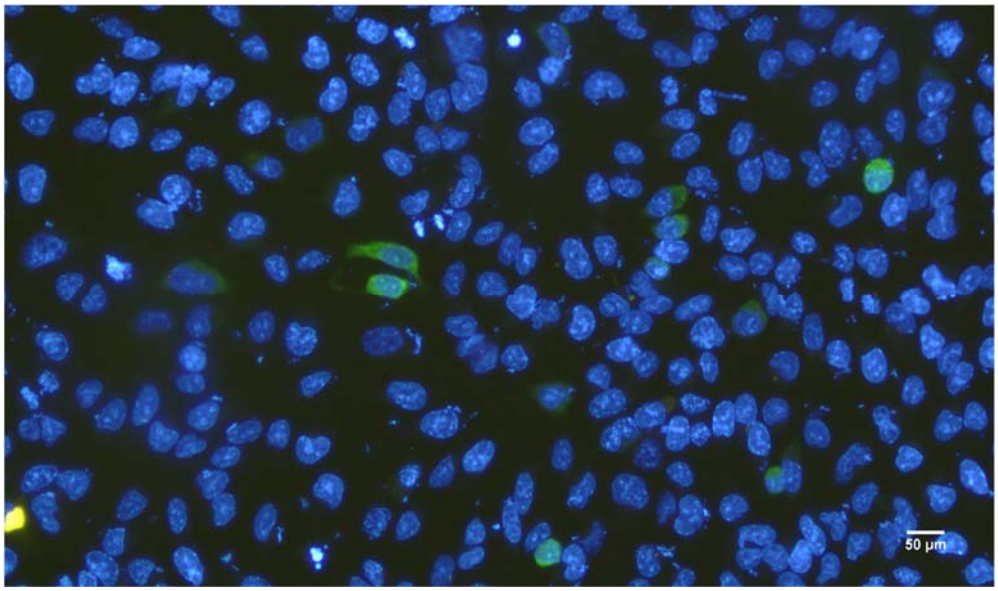
Slika 18. Ljudske stanice BG1 24 h nakon tretmana antibiotikom puromicinom koncentracije 0,5 µg/mL. Okrugle stanice su mrtve, dok su izdužene stanice žive. Živih stanica ima oko stotinjak 24 h nakon tretmana puromicinom koncentracije 0,5 µg/mL.



Slika 19. Ljudske stanice BG1 24 h nakon tretmana antibiotikom puromicinom koncentracije 1 µg/mL. Na slici se vidi mali broj preživjelih stanica 24 h nakon tretmana puromicinom koncentracije 1 µg/mL.

4.2 OPTIMIZACIJA TRANSFEKCIJE STANICA BG1 REAGENSOM ViaFect Transfection Reagent

Optimizacija transfekcije stanica BG1 reagensom ViaFect Transfection Reagent napravljena je s dvije različite količine plazmida pdCas9-DNMT3A-EGFP (0,5 µg i 1 µg) te s omjerom reagensa ViaFect Transfection Reagent i plazmidne DNA: 2:1, 3:1, 4:1, 6:1, a uspješnost transfekcije gledana je nakon 24 h i 48 h. Budući da su plazmidi veličine oko 10 kb dosta veliki, nije se očekivala visoka efikasnost transfekcije. Prilikom optimizacije u svim kombinacijama reagensa ViaFect i plazmidne DNA dobivene su izrazito niske efikasnosti transfekcije (Tablica 4). Najviša efikasnost transfekcije (5,2 %) dobivena je za 1 µg plazmidne DNA kombinacije reagensa ViaFect i plazmidne DNA 6:1, stoga su ti uvjeti korišteni za transfekciju stanica BG1 plazmidima koji sadrže različite konstrukte sgRNA. Za ekspresiju konstrukta na plazmidu pdCas9-DNMT3A-EGFP pokazala su se dovoljnima 24 h. Efikasnost transfekcije izrazito je niska nakon 24 h, stoga je broj pozitivnih stanica koji se mogao vidjeti nakon 48 h također dosta nizak, budući da su stanice presađene uz razrjeđenje 4 ×, što je dovelo do dodatnog smanjenja broja pozitivnih stanica. Prikaz jednog vidnog polja stanica BG1 transfeciranih s 1 µg plazmidne DNA kombinacije ViaFect reagensa i plazmidne DNA 6:1 nalazi se na Slici 20.



Slika 20. Mikroskopska slika stanica BG1, transfeciranih s 1 µg plazmida pdCas9-DNMT3A-EGFP kombinacije reagensa ViaFect i plazmidne DNA 6:1, dobivena fluorescencijskom mikroskopijom. Pozitivan zeleni signal predstavlja protein EGFP u citplazmi transkribiran s plazmida pdCas9-DNMT3A-EGFP. Jezgre stanica BG1 obojane su bojom DAPI.

Tablica 2. Efikasnosti transfekcije stanica BG1 dobivene prilikom optimizacije plazmidom pdCas9-DNMT3A-EGFP.

TRETMAN 24h Reagens ViaFect : DNA (µg)		EFIKASNOST TRANSFEKCIJE/ %	
2:1 (0,5 µg)	2:1 (1 µg)	0,34	0,77
3:1 (0,5 µg)	3:1 (1 µg)	1,11	3,1
4:1 (0,5 µg)	4:1 (1 µg)	2,3	3,9
6:1 (0,5 µg)	6:1 (1 µg)	2	5,2

4.3 TRANSFEKCIJA STANICA BG1 PLAZMIDNIM VEKTORIMA ZA CILJANU METILACIJU PROMOTORA GENA *MGAT3*

Transfekcija stanica BG1 provedena je s mješavinama plazmida ukupne mase 1 µg, kod koje svaki plazmid s različitim konstruktom sgRNA čini 1/6 mase. Nakon selekcije transficiranih stanica slijedio je oporavak u svježem mediju, kako bi stanice narasle u dovoljnoj količini za izolaciju ukupne RNA. Jako je mali broj stanica transficiranih originalnim plazmidima (koji ne sadrže „popravljen“ gen za rezistenciju na puromicin) preživio selekciju puromicinom, a nakon oporavka 4 dana stanica je i dalje bilo premalo za izolaciju ukupne RNA. Originalni plazmidi pdCas9-DNMT3A-PuroR i pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV) sadrže promjenu SNP unutar gena za rezistenciju na puromicin (R166H), koja može utjecati na smanjuju efikasnost puromicin N-acetiltransferaze u nekim staničnim linijama, što rezultira gubitkom transfeciranih stanica prilikom selekcije. Budući da je efikasnost transfekcije mala zbog veličine plazmida, dodatna smanjenja aktivnost puromicin N-acetiltransferaze rezultirala je još manjim brojem preživjelih stanica nakon selekcije. Plazmidi pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2 i pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV)_v2 sadrže „popravljen“ gen za rezistenciju na puromicin supstitucijom H166R. Stanica BG1 transficiranih varijantama plazmida (v2) nakon selekcije puromicinom je bilo više, čime se može potvrditi pozitivan učinak supstitucije H166R na efikasnost puromicin N-acetiltransferaze u stanicama BG1. Izolacija ukupne RNA rađena je stoga samo iz stanica BG1 transfeciranih varijantama plazmida s „popravljen“ genom za rezistenciju na puromicin (v2) 8. dan nakon transfekcije. Biološke replike AKT (AKT-A, AKT-B, AKT-C) transficirane su mješavinom aktivnih verzija konstrukata pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2, dok su biološke replike ANV (ANV-A, ANV-B, ANV-C) transficirane mješavinom inaktivnih verzija konstrukata pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV)_v2. Biološke replike NT (NT-A, NT-B, NT-C) transficirane su plazmidom pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2 koji sadrži „Non-targeting“ konstrukt sgRNA koji nema

homologiju u genomu čovjeka. Kontrolne replike „Mock“ tretirane su samo reagensom ViaFect bez plazmidne DNA.

Izolacija RNA radila se pomoću TRI reagensa, kako bi se smanjili gubici ukupne RNA koji se javljaju prilikom izolacije na kolonama kod komercijalnih setova. Dobivene koncentracije ukupne RNA iz transfeciranih stanica BG1 (AKT, ANV, NT) su niske, dok su koncentracije iz kontrolnih uzoraka „Mock“, koji ne sadrže plazmidne konstrukte, visoke te se nalaze u Tablici 5, zajedno s koncentracijama RNA nakon tretmana TURBO DNazom. Očekivano je došlo do smanjenja koncentracija ukupne RNA nakon tretmana DNazom, zbog uklanjanja DNA kontaminacije. Budući da je u uzorcima AKT-B i AKT-C koncentracija izolirane RNA niska, nakon tretmana DNazom dobivene su više koncentracije, vjerojatno zbog nepreciznosti uređaja prilikom mjerenja niskih koncentracija.

Tablica 3. Koncentracije ukupne RNA izolirane iz stanica BG1 transfeciranih plazmidima pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2 i pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV)_v2 te nakon tretmana TURBO DNazom. Biološke replike AKT-A, AKT-B, AKT-C transficirane su mješavinom aktivnih verzija konstrukata pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2, dok su biološke replike ANV-A, ANV-B i ANV-C transficirane mješavinom inaktivnih verzija konstrukata pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV)_v2. Biološke replike NT-A, NT-B i NT-C transficirane su plazmidom pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2 koji sadrži „Non-targeting“ konstrukt sgRNA. Uzorci „Mock“ tretirani su samo reagensom ViaFect bez plazmidne DNA.

UZORAK	KONCENTRACIJA/ ng/µL	KONCENTRACIJA NAKON TRETMANA DNazom/ ng/µL
AKT-A	23,6	21,6
AKT-B	15,2	18,4
AKT-C	14,8	19,6
ANV-A	47,6	40,0
ANV-B	51,2	47,2
ANV-C	42,0	34,4
NT-A	34,4	29,6
NT-B	32,0	25,2
NT-C	20,8	16,0
„Mock“-A	1640	96,0
„Mock“-B	4985	24,0
„Mock“-C	4969	56,0

4.4 RELATIVNA RAZINA EKSPRESIJE GENA *MGAT3* U TRANSFICIRANIM STANICAMA BG1

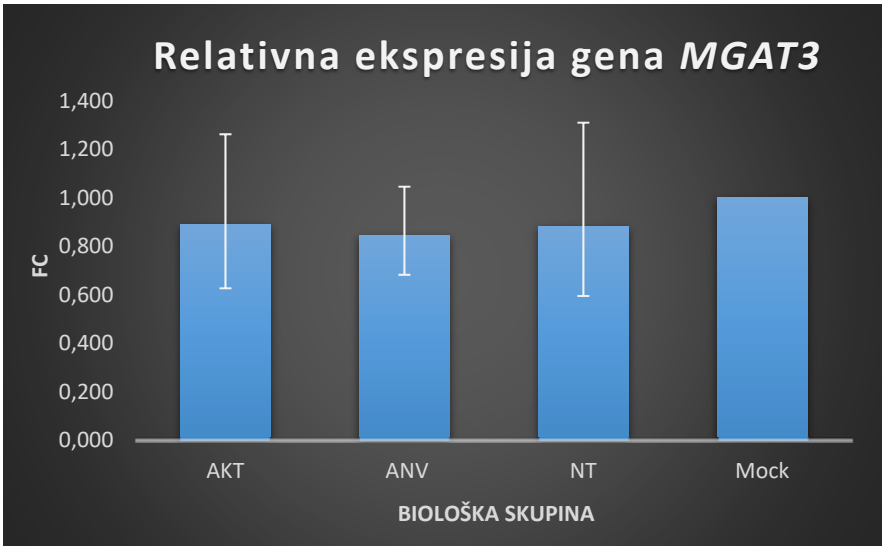
Relativna razina ekspresije gena *MGAT3* u transficiranim stanicama BG1 između različitih bioloških skupina određena je tehnikom qPCR korištenjem tehnologije „TaqMan“, pomoću komercijalno dostupnih početnica i proba (Hs02379589_s1 i Hs01369240_m1). Gen *HPRT1* korišten je kao endogena kontrola u odnosu na kojeg su normalizirane vrijednosti C_t dobivene za svaku biološku repliku u biološkim skupinama. Kao referentan uzorak korištena je biološka skupina „Mock“ u odnosu na koju se gledala promjena ekspresije gena *MGAT3*. Vrijednosti C_t dobivene korištenjem probe Hs01369240_m1 za gen *MGAT3* su izrazito visoke (Tablica 6) i kreću se oko 40. ciklusa u sve 4 različite biološke skupine, stoga ti rezultati nisu uzeti kao mjerodavni. Također, u biološkoj skupini AKT neke vrijednosti C_t nisu dobivene, budući da je količina transkripta *MGAT3* preniska i vrijednost C_t prelazi 45 ciklusa, koliko je korišteno za qPCR. Korištenjem probe Hs02379589_s1 za gen *MGAT3* uspješno su dobivene sve vrijednosti C_t te se kreću oko 28-30 ciklusa. Prikaz srednjih vrijednosti C_t za svaku biološku repliku četiri različitih bioloških skupina prikazane su u Tablici 6.

Tablica 4. Srednje vrijednosti C_t za svaku biološku repliku četiri različitih bioloških skupina dobivenih metodom qPCR korištenjem proba Hs02379589_s1 i Hs01369240_m1 za gen *MGAT3* i probe Hs02800695_m1 za gen *HPRT1*. Biološke replike AKT-A, AKT-B, AKT-C transficirane su mješavinom aktivnih verzija konstrukata pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2, dok su biološke replike ANV-A, ANV-B i ANV-C transficirane mješavinom inaktivnih verzija konstrukata pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV)_v2. Biološke replike NT-A, NT-B i NT-C transficirane su plazmidom pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2 koji sadrži „Non-targeting“ konstrukt sgRNA. Uzorci „Mock“ tretirani su samo reagensom ViaFect bez plazmidne DNA.

UZORAK	PROBA MGAT3 Hs02379589_s1- C_t VRIJEDNOST	PROBA MGAT3 Hs01369240_m1- C_t VRIJEDNOST	PROBA HPRT1 Hs02800695_m1- C_t VRIJEDNOST
AKT-A	28,922	39,436	25,680
AKT-B	32,743	>45	29,765
AKT-C	34,376	>45	31,932
ANV-A	27,870	37,850	24,862
ANV-B	27,320	37,592	24,318
ANV-C	27,578	37,695	24,701
NT-A	29,225	38,269	26,795
NT-B	29,536	38,823	26,666

NT-C	30,287	41,442	26,889
„Mock“-A	28,758	36,839	26,324
„Mock“-B	27,564	38,535	24,534
„Mock“-C	27,575	35,552	24,882

Analizom rezultata dobivenih za ekspresiju gena *MGAT3* korištenjem probe Hs02379589_s1 u odnosu na biološku skupinu „Mock“ nije dobiveno statistički značajno smanjenje ekspresije gena *MGAT3* u biološkoj skupini AKT. Stanice BG1 u biološkoj skupini AKT transfecirane su s aktivnim verzijama konstrukata, koji sadrže aktivnu DNMT3A koja bi trebala uvoditi metilacijske oznake na ciljana mjesta vođena molekulama sgRNA unutar regije za koju se pretpostavlja da je regulatorna. Također, do smanjenja ekspresije gena *MGAT3* nije došlo niti u biološkoj skupini ANV transfeciranoj inaktivnim verzijama konstrukata, koji sadrže inaktivnu DNMT3A koja ne može uvoditi metilacijske oznake. Svrha korištenja plazmida s inaktivnom DNMT3A bila je provjera je li samo vezanje konstrukta Cas9-DNMT3A utječe na ekspresiju gena *MGAT3*. Biološka skupina transficirana plazmidom koji sadrži „Non-targeting“ konstrukt sgRNA očekivano nije pokazala smanjenje ekspresije gena *MGAT3*. Prikazi razina ekspresija gena *MGAT3* u pojedinim biološkim skupinama nalaze se na Slici 21.



Slika 21. Relativna razina ekspresije gena *MGAT3* u biološkim skupinama AKT, ANV, NT i „Mock“. Biološka skupina AKT transficirana je mješavinom aktivnih verzija konstrukata pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2; biološka skupina ANV transficirana je mješavinom inaktivnih verzija konstrukata pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV)_v2; biološka skupina NT transficirana je plazmidom pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2 koji sadrži „Non-targeting“ konstrukt sgRNA; biološka skupina „Mock“ tretirana je samo reagensom ViaFect bez plazmidne DNA te služi kao referentna skupina.

Statistička obrada vrijednosti ΔC_t, dobivenih normalizacijom srednje vrijednosti C_t za gen *MGAT3* svake biološke replike u odnosu na srednje vrijednosti C_t endogene kontrole *HPRT1,* pokazuje da nema statistički značajne promjene ekspresije gena *MGAT3* niti u jednoj biološkoj skupini. Svaka p vrijednost (Tablica 7), dobivena uspoređivanjem bioloških skupina međusobno statističkim testom ANOVA, veća je od granične vrijednosti 0,05.

Tablica 5. P vrijednosti dobivene usporedbom vrijednosti ΔC_t svake biološke skupine testom ANOVA. Biološka skupina AKT transficirana je mješavinom aktivnih verzija konstrukata pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2; biološka skupina ANV transficirana je mješavinom inaktivnih verzija konstrukata pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV)_v2; biološka skupina NT transficirana je plazmidom pdCas9-DNMT3A-PuroR_v2 koji sadrži „Non-targeting" konstrukt sgRNA; biološka skupina „Mock" tretirana je samo reagensom ViaFect bez plazmidne DNA.

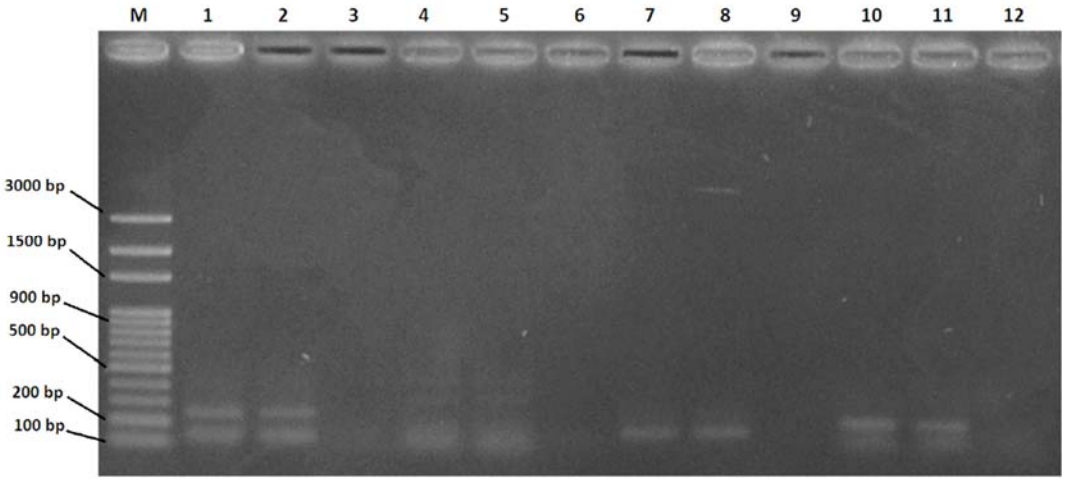
	P VRIJEDNOST
AKT vs. ANV	0,9935
AKT vs. NT	>0,9999
AKT vs. Mock	0,9325
ANV vs. NT	0,9959
ANV vs. Mock	0,8310
NT vs. Mock	0,9205

4.5 PCR BISULFITNO KONVERTIRANE DNA IZ STANICA BG1

U svrhu razvoja testa za analizu metilacije DNA metodom pirosekvenciranja potrebno je umnožiti ciljanu regiju na bisulfitno konvertiranoj DNA. Ciljana regija unutar promotora gena *MGAT3* okružena je s dosta homogenim regijama, koje sadrže brojna nukleotidna ponavljanja. Nakon bisulfitne konverzije svi nemetilirani citozini deaminacijom prelaze u uracil, čime se dodatno smanji kompleksnost sekvence, što ograničava mjesta za dizajn početnica. Isprobano je 8 različitih kombinacija početnica pri različitim temperaturama hibridizacije (Ta) na različitim bisulfitno konvertiranim kalupima. Budući da su željene veličine fragmenata velike (Tablica 3), u svrhu bisulfitne konverzije korišteno je nekoliko različitih komercijalno dostupnih setova, kako bi se s nekim komercijalnim setom dobila što manje fragmentirana bisulfitno konvertirana DNA.

Dobiveni rezultati pokazuju da niti u jednoj kombinaciji početnica i temperatura hibridizacije nije dobiven željeni amplikon odgovarajuće veličine. Na Slici 22 prikazani su rezultati dobiveni korištenjem prve četiri kombinacije početnica (MGAT3-nF1 i MGAT3-nR1; MGAT3-nF2 i

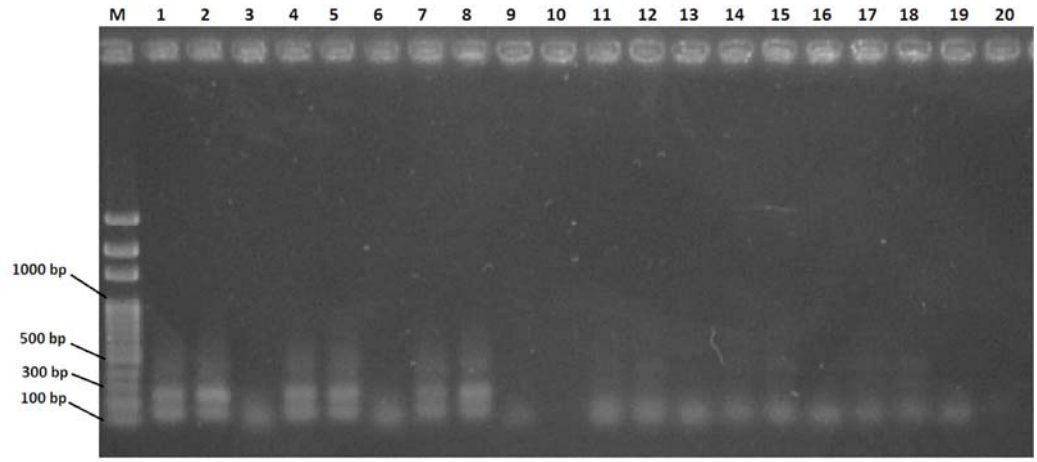
MGAT3-nR1; MGAT3-nF1 i MGAT3-nR2; MGAT3-nF2 i MGAT3-nR2) pri dvije različite temperature hibridizacije na bisulfitno konvertiranoj DNA iz stanica BG1 korištenjem komercijalnog seta Zymo Research za bisulfitnu konverziju. Dobivena su dva nespecifična amplikona, čija veličina ne prelazi 300 bp, što ne odgovara očekivanim veličinama amplikona (kombinacija A- 877 bp, B-783 bp, C-1130 bp, D-1036 bp).



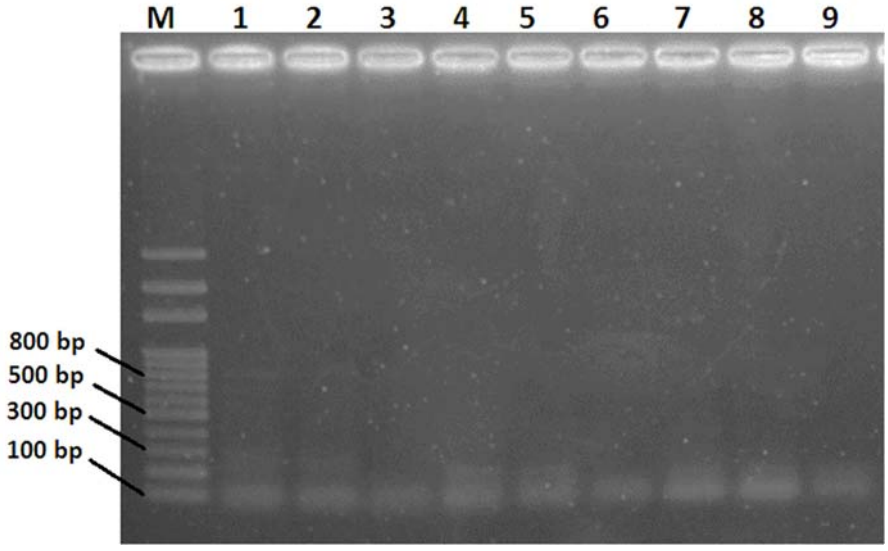
Slika 22. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata umnažanja ciljane regije unutar promotora gena *MGAT3*. M- ljestvičasti uzorak markera 100 bp DNA Ladder Ready to Load; **1,2**- kombinacija početnica (A) MGAT3-nF1 i MGAT3-nR1 pri temperaturama hibridizacije 42°C i 46°C; **4,5**- kombinacija početnica (B) MGAT3-nF2 i MGAT3-nR1 pri temperaturama hibidizacije 42°C i 44°C; **7,8**- kombinacija početnica (C) MGAT3-nF1 i MGAT3-nR2 pri temperaturama hibridizacije 45°C i 48°C; **10,11**- kombinacija početnica (D) MGAT3-nF2 i MGAT3-nR2 pri temperaturama hibridizacije 42°C i 44°C; **3,6,9,12**- negativne kontrole.

Na Slici 23 prikazani su rezultati dobiveni korištenjem prve dvije kombinacije početnica pri sve tri različite temperature hibridizacije na bisulfitno konvertiranoj DNA iz stanica BG1 korištenjem komercijalno dostupnog seta Analytik Jena, Qiagen i Promega za bisulfitnu konverziju. Niti u jednoj kombinaciji nije došlo do specifičnog umnažanja željenog amplikona te su dobiveni nespecifični amplikoni te razmazi (od engl. *smear*). U kombinaciji početnica A može se vidjeti razmaz iznad 500 bp, što ukazuje da je možda došlo do umnažanja željenog amplikona, no njega ima premalo.

Na Slici 24 prikazani su rezultati dobiveni korištenjem kombinacija početnica E (MGAT3-F_alt i MGAT3-nR1), F (MGAT3-F_alt i MGAT3-nR2) i G (MGAT3-F_alt i MGAT3-R-BS) pri temperaturi hibridizacije od 45°C. Korištena je niža temperatura hibridizacije, budući da je cilj bio vidjeti hoće li uopće doći do umnažanja željenog amplikona, nakon čega bi slijedila eventualna optimizacija. Rezultati pokazuju da niti u jednog kombinaciji nije došlo do specifičnog umnažanja.

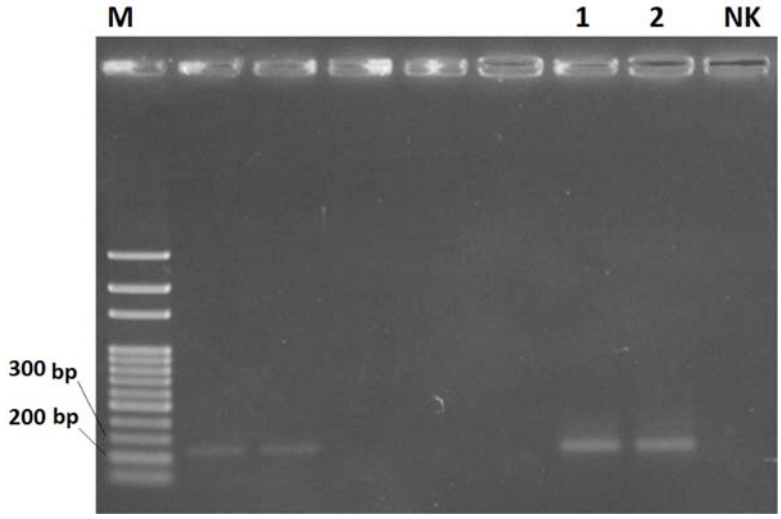


Slika 23. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata umnažanja ciljane regije unutar promotora gena *MGAT3*. M- ljestvičasti uzorak markera 100 bp DNA Ladder Ready to Load; **1,2,3**- kombinacija početnica (A) MGAT3-nF1 i MGAT3-nR1, kalup je bisulfitno konvertirana DNA korištenjem komercijalno dostupnog seta Analytik Jena, Qiagen i Promega, a temperatura hibridizacije je 42°C; **4,5,6**- kombinacija početnica (A) MGAT3-nF1 i MGAT3-nR1, kalup: Jena, Qiagen, Promega, a temperatura hibridizacije je 46°C; **7,8,9**- kombinacija početnica (A) MGAT3-nF1 i MGAT3-nR1, kalup: Jena, Qiagen, Promega, a temperatura hibridizacije je 48°C; **11,12,13**- kombinacija početnica (B) MGAT3-nF2 i MGAT3-nR1, kalup: Jena, Qiagen, Promega, a temperatura hibridizacije je 42°C; **14,15,16**- kombinacija početnica (B) MGAT3-nF2 i MGAT3-nR1, kalup: Jena, Qiagen, Promega, a temperatura hibridizacije je 44°C; **17,18,19**- kombinacija početnica (B) MGAT3-nF2 i MGAT3-nR1, kalup: Jena, Qiagen, Promega, a temperatura hibridizacije je 46°C; **10,20**- negativne kontrole.



Slika 24. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata umnažanja ciljane regije unutar promotora gena *MGAT3*. Sve reakcije rađene su pri temperaturi hibridizacije 45°C. **M**- ljestvičasti uzorak markera 100 bp DNA Ladder Ready to Load; **1,2**- kombinacija početnica (E) MGAT3-F_alt i MGAT3-nR1, kalup je bisufitno konvertirana DNA komercijalnim setovima Qiagen i Analytik Jena; **4,5**- kombinacija početnica (F) MGAT3-F_alt i MGAT3-nR2, kalup: Qiagen, Jena; **7,8**- kombinacija početnica (G) MGAT3-F_alt i MGAT3-R_BS, kalup: Qiagen, Jena; **3,6,9**- negativne kontrole.

Na Slici 25 nalazi se rezultat PCR reakcije dobivene korištenjem kombinacije početnica H (MGAT3-F1_BS, MGAT3-R_BS) pri temperaturi hibridizacije od 58°C. Na gelu se može vidjeti jedan jaki amplikon, koji kada se usporedi s markerom molekulskih masa odgovara veličini iznad 200 bp. Budući da je početnica „reverse“ korištena u ovoj kombinaciji sadržavala biotin na 5' kraju te zbog toga što dobiven amplikon odgovara po veličini željenom amplikonu (233 bp) pirosekvenciran je produkt PCR reakcije dobiven kombinacijom početnica H.



Slika 25. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata umnažanja ciljane regije unutar promotora gena MGAT3. Korištena je kombinacija početnica MGAT3-F1_BS i MGAT3-R_BS. M: ljestvičasti uzorak markera 100 bp DNA Ladder Ready to Load; 1,2: PCR reakcija rađena u duplikatu korištenjem početnica MGAT3-F1_BS i MGAT3-R_BS; NK: negativna kontrola.

4.6 PIROSEKVENCIRANJE

Amplikon dobiven PCR reakcijom korištenjem kombinacije početnica MGAT3-F1_BS i MGAT3-R_BS, odgovarao je veličini željenom PCR produktu. Pirosekvenciranjem je dobiveno potpuno drugačije ugrađivanje nukleotida, čime je utvrđeno da dobiven amplikon ne odgovara željenom fragmentu te da je PCR umnažanjem korištenjem početnica MGAT3-F1_BS i MGAT3-R_BS također došlo do nespecifičnog umnažanja, kao i u svim ostalim kombinacijama.

5. RASPRAVA

Sustav CRISPR-Cas9 pripada novim metodama za ciljano modificiranje genoma te omogućava jednostavnu manipulaciju bilo kojeg genomskog lokusa. Temelji se na prepoznavanju i komplementarnom sparivanju sa specifičnim genomskim područjem pomoću molekule sgRNA, čime se dovodi nukleaza Cas9 na ciljano mjesto u genomu. Razvoj i modifikacije sustava CRISPR-Cas9 dovele su do njegove višestruke primjene u ciljanom modificiranju genoma i epigenoma. Inaktivacija nukleaze Cas9 specifičnim supstitucijama D10A u katalitičkoj domeni RuvC i H840A u katalitičkoj domeni HNH te fuzija s heterolognom efektorskom skupinom omogućava uvođenje specifičnih modifikacija bez induciranja dvolančanog loma na određeno mjesto u genomu vođeno molekulom sgRNA. Primjena sustava CRISPR-Cas9 u ciljanom modificiranju genoma i regulaciji ekspresije gena olakšana je mogućim simultanim djelovanjem na većoj regiji u genomu pomoću različitih molekula sgRNA (Sander i Joung, 2014).

Gen *MGAT3* kodira za enzim N-acetilglukozaminiltransferazu III (GnT-III), koji katalizira dodatak N-acetilglukozamina (GlcNAc) na β-manozu N-glikana te stvara rasijecajući GlcNAc (Ihara i sur., 1993). Promjene u ekspresiji gena uključenih u uspostavljanje pravilnog uzorka glikozilacije mogu biti uključene u nastanak tumora (Abbott i sur., 2006; Guo i sur., 2002). Povećana ekspresija gena *MGAT3* te nastanak rasijecajućih GlcNAc zabilježena je u tumorskim stanicama jajnika (Anugraham i sur., 2014).

Cilj ovoga istraživanja bio je konstruirati epigenetički alat CRISPR-Cas9 za ciljanu metilaciju DNA promotora gena *MGAT3* blizu mjesta početka transkripcije (TSS) te utvrditi važnost metilacije na ciljanoj regiji u regulaciji ekspresije gena *MGAT3*. Dosadašnja istraživanja nisu uključivala ciljanu metilaciju DNA promotora gena *MGAT3*, već su različitim tretmanima epigenetičkim inhibitorima tumorskih i normalnih stanica pokazali promjenu u metilaciji, stoga bi naše istraživanje korištenjem modificiranog sustava CRISPR-Cas9 prvi puta ciljano metiliralo regiju unutar promotora gena *MGAT3* i pokazalo važnost inducirane metilacije na ekspresiju gena *MGAT3*.

Korištene su dvije različite komercijalno dostupne probe i početnice za analizu ekspresije gena *MGAT3* metodom qPCR iz transfeciranih stanica BG1. Proba i početnice Hs02379589_s1 nalaze se unutar jednog egzona te omogućava detekciju dva transkripta gena *MGAT3*, duži (5102 nt) i kraći (4987 nt), koja se razlikuju u 5' netranslatiranoj regiji (UTR), a potencijalno može detektirati i DNA ukoliko postoji kontaminacija s DNA. Početnice i proba Hs01369240_m1 omogućavaju detekciju samo dužeg transkripta gena *MGAT3* te se proba veže na granici 2 egzona. Uspješno su dobivene sve C_t vrijednosti korištenjem probe koja detektira oba transkripta, dok su C_t vrijednosti za probu koja detektira samo duži transkript izrazito visoke, a za neke biološke replike

AKT nisu niti dobivene, što znači da je razina transkripta gena *MGAT3* u tim replikama toliko mala, da vrijednost Ct prelazi 45 ciklusa, koliko je korišteno za qPCR. Rezultati stoga pokazuju da u tumorskim stanicama BG1 postoji više kraćeg transkripta gena *MGAT3*.

Analiza ekspresije gena *MGAT3* dobivena nakon transfekcije stanica BG1 plazmidima za ciljanu metilaciju modificiranim sustavom CRISPR-Cas9 pokazuje da nije došlo do statistički značajnog smanjenja ekspresije gena *MGAT3* u stanicama transfeciranim aktivnim verzijama konstrukata. Aktivne verzije konstrukata sadrže funkcionalnu DNMT3A, koja uvodi metilacijske oznake u molekulu DNA na mjesta vođena molekulama sgRNA. Također, nije došlo do smanjenja ekspresije gena MGAT3 niti u stanicama transfeciranim inaktivnim verzijama konstrukata, koji sadrže DNMT3A inaktiviranu supstitucijom E756A (Reither i sur., 2003), koja ne može uvoditi metilacijske oznake. Svrha korištenja inaktivnih konstrukata je bila provjera interferira li samo vezanje konstrukta Cas9-DNMT3A s transkripcijom gena *MGAT3*. Očekivano nije došlo do smanjenja ekspresije gena *MGAT3* u stanicama transfeciranim plazmidima koji sadrže „Non-targeting“ sgRNA konstrukt. „Non-targeting“ sgRNA ne sadrži homologiju s humanim genomom, stoga se koristila kao kontrola specifičnosti ciljane metilacije. Prema rezultatima iz rada Anugraham i sur. (2014) metilacija DNA je uključena u regulaciju ekspresije gena *MGAT3*. U tumorskim stanicama jajnika potvrdili su da je smanjenje metilacije promotora gena *MGAT3* povezano s povećanjem ekspresije gena i nastankom rasijecajućih glikana. Korištenjem trihostatina A, koji je selektivan inhibitor histonskih deacetilaza isključili su ključan utjecaj metilacije histona u regulaciji ekspresije gena *MGAT3*, a korištenjem inhibitora DNA metiltransferaza 5-aza dokazali su važnost metilacije DNA. Prema najnovijim rezultatima iz rada Kohler i sur. (2016) analiza regije unutar promotora gena *MGAT3* u blizini mjesta početka transkripcije (TSS) pokazala je značajnu hipermetiliranost DNA u normalnim staničnim linijama jajnika, za razliku od hipometiliranosti DNA u tumorskim staničnim linijama, čime su potvrdili ulogu metilacije DNA blizu TSS u regulaciji ekspresije gena *MGAT3*. Također, analizom ekspresije gena *MGAT3* potvrdili su povezanost hipometililiranosti DNA u području TSS s povećanom razinom ekspresije gena *MGAT3* u različitim staničnim linijama tumora jajnika (OVCAR4, BG1). Ovi rezultati ne idu u prilog rezultatima našeg istraživanja, u kojima nije došlo do smanjenja ekspresije gena *MGAT3* nakon ciljane metilacije regije u blizini TSS. Budući da epigenetički efektorski proteini ne djeluju sami, već unutar većih kompleksa (Kungulovski i Jeltsch, 2016), jedno od objašnjenja različitosti u rezultatima je da ciljano navođena DNMT3A sustavom CRISPR-Cas9 nije uspješno regrutirala druge proteine potrebne za efikasnu metilaciju DNA. Također, kao drugo objašnjenje može biti da je zbog transfekcije stanica mješavinom plazmida, koji sadrže različite sgRNA konstrukte, došlo do steričkih smetnji između različitih Cas9-DNMT3A kompleksa. Međutim, zbog toga što se analizirala različita populacija

stanica, kod koje različite stanice sadrže različite sgRNA vođene Cas9-DNMT3A konstrukte, očekivalo se da će se vidjeti učinak metilacije ukoliko postoji, budući da neće svaka stanica biti transfecirana istim kombinacijama plazmida. Prema rezultatima iz rada Vojta i sur. (2016) sustavom CRISPR-Cas9 uspješno je metilirana promotorska regija gena *IL6ST* i *BACH2* s pojedinačnim plazmidnim konstruktima, ali i mješavinom plazmida u stanicama HEK239. Maksimum metilacije zabilježili su 7. dan nakon transfekcije za gen *BACH2*, odnosno 6.dan za gen *IL6ST*, nakon kojeg metilacija opada kroz 10-15 dana. Budući da je u našem istraživanju korišten isti plazmidni sustav, koji se u istraživanju Vojta i sur. (2016) pokazao učinkovitim, očekivalo se da će doći do ciljane metilacije DNA. U našem istraživanju izolacija ukupne RNA rađena je 8. dan nakon transfekcije te se možda maksimum inducirane metilacije DNA vidi ranije u stanicama BG1. Također, postoji mogućnost da stanice BG1 nakon selekcije gube puno brže plazmide budući da su plazmidni konstrukti veličine oko 10 kb. Gubitak plazmida posljedično dovodi do gubitka metilacijskih oznaka, zbog toga što su mehanizmi za uvođenje i održavanje epigenetičkih oznaka različiti (Kungulovski i Jeltsch, 2016).

Također, postoji mogućnost da je došlo do nespecifičnog komplementarnog vezanja molekula sgRNA te posljedično do navođenja alata Cas9-DNMT3A na pogrešno mjesto, budući da sustav CRISPR-Cas9 pokazuje određenu razinu nespecifičnog vezanja („Off-target“) (Ran i sur., 2013), koja je veća od metoda ZFN i TALEN, jer se vezanje temelji samo na 20 nt na 5' kraju sgRNA konstrukta.

Iako je qPCR u našem istraživanju pokazao da nema statistički značajne promjene u ekspresiji gena *MGAT3,* takav rezultat se ne može prihvatiti sa sigurnošću, budući da se nije moglo potvrditi je li uopće došlo do ciljane metilacije DNA. Kao potvrda ciljane metilacije DNA planirala se raditi metoda pirosekvenciranja, nakon bisulfitne konverzije DNA, izolirane iz transfeciranih stanica BG1. Prije pirosekvenciranja potrebno je specifično umnožiti ciljanu regiju metodom PCR. Početnice koje se koriste za umnažanje bisulfitno konvertirane DNA moraju biti dugačke (26-30 nt), kako bi se postiglo specifično vezanje, te bi trebale umnažati kraću regiju (do 450 bp), budući da je DNA nakon bisulfitne konverzije fragmentirana (Patterson i sur., 2011). U našem eksperimentu niti jedna kombinacija početnica nije dala željeni amplikon. Budući da je regija unutar promotora gena *MGAT3* blizu TSS izrazito bogata ponavljanjima i CpG dinukleotidima, teško je dizajnirati početnice koje će se specifično vezati i ispunjavati sva pravila. U gotovo svim kombinacijama dobiveni su nespecifični amplikoni te se takvi produkti PCR reakcije nisu mogli koristiti za analizu metilacije DNA ciljane regije metodom pirosekvenciranja. Jedino je u jednoj kombinaciji početnica, korištenoj i u radu Kohler i sur. (2016) došlo do umnažanja jedinstvenog fragmenta, koji je po veličini odgovarao željenom fragmentu, međutim pirosekvenciranjem je dokazano da to nije željeni fragment te da je

došlo do nespecifičnog umnažanja. Prema radu Kohler i sur. (2016) uspješno je umnožena ciljana regija promotora gena *MGAT3* korištenjem istog para početnica, koji je korišten i u našem istraživanju. Jedno objašnjene za razliku dobivenu prilikom umnažanja istim parom početnica su različiti uvjeti reakcije i različite kemikalije. U svrhu analize je li došlo do specifične metilacije ciljane regije korištenjem sustava CRISPR-Cas9 u našem istraživanju trebalo bi napraviti PCR reakciju za umnažanje bisulfitno konvertirane DNA korištenjem istih uvjeta i reagensa kao iz rada Kohler i sur. (2016) te pirosekvencirati dobiveni amplikon. Nakon analize rezultata pirosekvenciranja moglo bi se zaključiti je li modificiran sustav CRISPR-Cas9 uveo metilaciju u molekulu DNA na ciljanoj regiji te prihvatiti ili odbaciti rezultate qPCR analize u našem istraživanju.

6. ZAKLJUČAK

- Uspješno je konstruiran epigenetički sustav CRISPR-Cas9 za ciljanu metilaciju promotora gena *MGAT3*
- Uspješno je provedena optimizacija transfekcije i selekcije antibiotikom puromicinom stanica BG1
- Efikasnost transfekcije stanica BG1 je niska zbog veličine plazmidnih konstrukata (≈ 10 kb)
- Stanice BG1 su uspješno transfecirane plazmidnim konstruktima za ciljanu metilaciju promotora gena *MGAT3*
- Utvrđen je pozitivan učinak supstitucije H166R u genu za puromicin N-acetiltransferazu na efikasnost selekcije puromicinom
- Nema statistički značajne promjene u ekspresiji gena *MGAT3* u stanicama transfeciranim aktivnim verzijama konstrukata (AKT)
- Do smanjenja ekspresije gena nije došlo niti u kontrolnim uzorcima (ANV, NT, „Mock“)
- Provjera je li došlo do specifične metilacije unutar ciljane regije promotora gena *MGAT3* metodom pirosekvenciranja nije rađena, budući da nije specifično umnožena ciljana regija na bisulfitno konvertiranoj molekuli DNA
- Rezultat da nije došlo do statistički značajnog smanjenja ekspresije gena *MGAT3* u stanicama transfeciranim aktivnim verzijama konstrukata (AKT) ne može se sa sigurnošću prihvatiti

7. LITERATURA

Abbott K.L., Troupe K., Lee I., Pierce M. 2006. Integrin-dependent neuroblastoma cell adhesion and migration on laminin is regulated by expression levels of two enzymes in the O-mannosyl-linked glycosylation pathway, PomGnT1 and GnT-Vb. *Exp Cell Res*. 312, 2837-50.

Anugraham M., Jacob F., Nixdorf S., Everest-Dass A.V., Heinzelmann-Schwarz V., Packer N.H. 2014. Specific glycosylation of membrane proteins in epithelial ovarian cancer cell lines: Glycan structures reflect gene expression and DNA methylation status. *Mol Cell Proteomics*. 13, 2213-2232.

Berg J.M., Tymoczko J.L., Strayer L. 2002. Carbohydrates: Carbohydrates can be attached to proteins to form glycoproteins. U: Biochemistry. New York, W.H. Freeman, str: 316-319.

Capecchi M.R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 244, 1288-1292.

Capecchi M.R. 2005. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*. 6, 507-512.

Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Hackett P.B. 2012. Targeting DNA with fingers and TALENs. Mol Ther Nucleic Acids. 1, e3.

Chen L., Tang L., Xiang H., Jin L., Li Q., Dong Y., Wang W., Zhang G. 2014. Advances in genome editing technology and its promising application in evolutionary and ecological studies. *Gigascience*. 3, 24.

Chen T., Ueda Y., Dodge J.E., Wang Z., Li E. 2003. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol*. 23, 5594-5605.

Cheng A.W., Wang H., Yang H., Shi L., Katz Y., Theunissen T.W., Rangarajan S., Shivalila C.S., Dadon D.B., Jaenisch R. 2013. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*. 23, 1163-1171.

Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 339, 819-823.

Cremer T., Cremer C. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*. 2, 292-301.

Deaton A.M., Bird A. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. Genes Dev. 25, 1010-22.

Farboud B., Meyer B.J. 2015. Dramatic enhancement of genome editing by CRISPR/Cas9 through improved guide RNA design. *Genetics*. 199, 959-971.

Frauer C., Spada F., Leonhardt H. 2012. DNA methylation. U: Rippe K. (ur.). Genome Organization And Function In The Cell Nucleus. Njemačka, Wiley-VCH, str: 30.

Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. 2013. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 31, 397-405.

Grover A., Pande A., Choudhary K., Gupta K., Sundar D. 2010. Re-programming DNA-binding specificity in zinc finger proteins for targeting unique address in a genome. *Syst Synth Biol*. 4, 323-329.

Guo H.B., Lee I., Kamar M., Akiyama S.K., Pierce M. 2002. Aberrant N-glycosylation of beta1 integrin causes reduced alpha5beta1 integrin clustering and stimulates cell migration. *Cancer Res*. 62, 6837-45.

Hilton I.B., D'Ippolito A.M., Vockley C.M., Thakore P.I., Crawford G.E., Reddy T.E., Gersbach C.A. 2015. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol*. 33, 510-517.

Hilton I.B., Gersbach C.A. 2015. Enabling functional genomics with genome engineering. *Genome Res*. 25, 1442-1455.

Ihara Y., Nishikawa A., Tohma T., Soejima H., Niikawa N., Taniguchi N. 1993. cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of human N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III). *J Biochem*. 113, 692-8.

Jin B., Li Y., Robertson K.D. 2011. DNA methylation: Superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer*. 2, 607-617.

Jung M., Pfeifer G.P. 2015. Aging and DNA methylation. *BMC Biol*. 13, 7.

Karvelis T., Gasiunas G., Miksys A., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. 2013. crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. *RNA Biol*. 10, 841-851.

Kawahara A., Hisano Y., Ota S., Taimatsu K. 2016. Site-specific integration of exogenous genes using genome editing technologies in Zebrafish. *Int J Mol Sci*. 17, 727.

Kizuka Y., Taniguchi N. 2016. Enzymes for N-glycan branching and their genetic and nongenetic regulation in cancer. *Biomolecules*. 6.

Kohler R.S., Anugraham M., López M.N., Xiao C., Schoetzau A., Hettich T., Schlotterbeck G., Fedier A., Jacob F., Heinzelmann-Schwarz V. 2016. Epigenetic activation of MGAT3 and corresponding bisecting GlcNAc shortens the survival of cancer patients. *Oncotarget*.

Kungulovski G., Jeltsch A. 2016. Epigenome editing: State of the art, concepts, and perspectives. *Trends Genet*. 32, 101-13.

Kungulovski G., Nunna S., Thomas M., Zanger U.M., Reinhardt R., Jeltsch A. 2015. Targeted epigenome editing of an endogenous locus with chromatin modifiers is not stably maintained. *Epigenetics Chromatin*. 8, 12.

Laufer B.I., Singh S.M. 2015. Strategies for precision modulation of gene expression by epigenome editing: an overview. *Epigenetics Chromatin*. 8, 34.

Li C.J. 2013. DNA demethylation pathways: Recent insights. *Genet Epigenet*. 5, 43-49.

Li E., Bird A. 2007. DNA methylation in mammals. U: Allis C.D., Caparros M.L., Jenuwein T., Reinberg D. (ur.). Epigenetics. New York, Cold Spring Harbor, str: 343-347.

Lieber M.R. 2008. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem*. 283, 1-5.

Ma H., Wu Y., Dang Y., Choi J.G., Zhang J., Wu H. 2014. Pol III promoters to express small RNAs: Delineation of transcription initiation. *Mol Ther Nucleic Acids*. 6; 3:e161.

Maeder M.L., Linder S.J., Cascio V.M., Fu Y., Ho Q.H., Joung J.K. 2013. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*. 10, 977-979.

Mansour S.L., Thomas K.R., Capecchi M.R. 1988. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*. 336, 348-352.

Meckler J.F., Bhakta M.S., Kim M.S., Ovadia R., Habrian C.H., Zykovich A., Yu A., Lockwood S.H., Morbitzer R., Elsäesser J., Lahaye T., Segal D.J., Baldwin E.P. 2013. Quantitative analysis of TALE-DNA interactions suggests polarity effects. *Nucleic Acids Res*. 41, 4118-28.

Miwa H.E., Koba W.R., Fine E.J., Giricz O., Kenny P.A., Stanley P. 2013. Bisected, complex N-glycans and galectins in mouse mammary tumor progression and human breast cancer. *Glycobiology*. 23, 1477-1490.

Moremen K.W., Tiemeyer M., Nairn A.V. 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13,448-62.

Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakian S.M. 2014. TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: Tools of discovery. *Acta Naturae*. 6, 19-40.

Patterson K., Molloy L., Qu W., Clark S. DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. *J Vis Exp*. 56, 3170.

Paulsen M., Tierling S., Walter J. 2008. DNA methylation and the Mammalian Genome. U: Tost J. (ur.). Epigenetics. Velika Britanija, Caister Academic Press, str: 4.

Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29, e45.

Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 8, 2281-2308.

Rath D., Amlinger L., Rath A., Lundgren M. 2015. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*. 117, 119-28.

Reither S., Li F., Gowher H., Jeltsch A. 2003. Catalytic mechanism of DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases revisited: Covalent intermediate formation is not essential for methyl group transfer by the murine Dnmt3a enzyme. *J. Mol. Biol*. 329, 675-684.

Ren X., Yang Z., Mao D., Chang Z., Qiao H.H., Wang X., Sun J., Hu Q., Cui Y., Liu L.P., Ji J.Y., Xu J., Ni J.Q. 2014. Performance of the Cas9 Nickase System in *Drosophila melanogaster.* G3 (Bethesda). 4, 1955-62.

Rocha-Martins M., Cavalheiro G.R., Matos-Rodrigues G.E., Martins R.A. 2015. From gene targeting to genome editing: Transgenic animals applications and beyond. *An Acad Bras Cienc*. 87, 1323-48.

Sakuma T., Nakade S., Sakane Y., Suzuki K.T., Yamamoto T. 2016. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nat Protoc*. 11, 118-33.

Sander J.D., Joung J.K. 2014. CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. *Nat Biotechnol*. 32, 347-355.

San-Filippo J., Sung P., Klein H. 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem*. 77, 229-57.

Seisenberger S., Peat J.R., Hore T.A., Santos F., Dean W., Reik W. 2013. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 368, 20110330.

Sfeir A., Symington L.S. 2015. Microhomology-mediated end joining: A back-up survival mechanism or dedicated pathway? *Trends Biochem Sci*. 40, 701-14.

Suetake I., Shinozaki F., Miyagawa J., Takeshima H., Tajima S. 2004. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem*. 279, 27816-23.

Thakore P.I., D'Ippolito A.M., Song L., Safi A., Shivakumar N.K., Kabadi A.M., Reddy T.E., Crawford G.E., Gersbach C.A. 2015. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat Methods*. 12, 1143-9.

Tollervey J.R. Lunyak V.V. 2012. Epigenetics: Judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics*. 7, 823-840.

Valton J., Dupuy A., Daboussi F., Thomas S., Maréchal A., Macmaster R., Melliand K., Juillerat A., Duchateau P. 2012. Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. *J Biol Chem*. 287, 38427-38432.

Vojta A., Dobrinić P., Tadić V., Bočkor L., Korać P., Julg B., Klasić M., Zoldoš V. 2016. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Res*. 44, 5615-28.

Westra E.R., Buckling A., Fineran P.C. 2014. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat Rev Microbiol*. 12, 317-26.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE

Ime i prezime:	Goran Josipović
Datum i mjesto rođenja:	23.12.1992, Zagreb
Adresa prebivališta:	Zagrebačka 166, 10297 Jakovlje, Hrvatska
Telefon:	+385 99 637 0752
E-mail:	goran.josipovi@gmail.com

OBRAZOVANJE

rujan 2014.- sada	Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Diplomski studij molekularne biologije
rujan 2011.- rujan 2014.	Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Preddiplomski studij molekularne biologije (Sveučilišni prvostupnik molekularne biologije)
rujan 2007.- lipanj 2011.	Gimnazija Lucijana Vranjanina, opći smjer

PROJEKTI

listopad 2015.- srpanj 2016.	Diplomski rad na Zavodu za molekularnu biologiju, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet (Ciljana metilacija DNA promotora gena *MGAT3* korištenjem alata CRISPR-Cas9)
rujan 2014	Seminarski rad na Zavodu za molekularnu biologiju, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet (Genetika autoimunih bolesti i mehanizam preosjetljivosti)

RADNO ISKUSTVO

ožujak 2014.- rujan 2014.	Laboratorijska stručna praksa u Laboratoriju za epigenetiku, Zavoda za molekularnu biologiju, Sveučilišta u Zagrebu, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta

NAGRADE I PRIZNANJA

2014.	Posebna rektorova nagrada za sudjelovanje na manifestaciji Otvoreni dani kemije 2013.

ZNANJA I VJEŠTINE

Molekularne metode:	osnovne molekularne metode (PCR, elektroforeza, izolacija RNA/DNA); metode genetičkog inženjerstva (restrikcijska digestija, ligacija, kloniranje); stanična kultura (uzgoj stanica, transfekcija, selekcija); qPCR; metode za analizu metilacije DNA (bisulfitna konverzija, pirosekvenciranje); metode IHC, ICC, FISH, GISH; metode za analizu proteina (izolacija trizolom, western blot, SDS-PAGE)
Rad na računalu:	korištenje alata MS Office, Adobe za dokumente i multimediju
Strani jezici:	Engleski jezik: B razina Njemački jezik: A razina