

Konstrukcija modularnog sustava višestrukih sgRNA za istovremeno ciljanje nekoliko lokusa tehnologijom CRISPR-Cas9

Jukić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:234520>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lucija Jukić

Konstrukcija modularnog sustava višestrukih sgRNA za istovremeno
ciljanje nekoliko lokusa tehnologijom CRISPR-Cas9

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Aleksandra Vojte. 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.

Posebno se zahvaljujem mag. biol. mol. Goranu Josipoviću na velikoj pomoći prilikom izrade i pisanja ovog rada. Hvala na strpljenju, stalnoj dostupnosti te svakom savjetu.

Zahvaljujem svim ostalim članovima Laboratorija za epigenetiku na pomoći kad god je trebalo.

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

Hvala najdražim kolegama Ani, Anji, Adriani, Karlu, Lei, Mariji, Martini, Pauli i Viktoriji na svim savjetima i neizmjerne podršci tijekom izrade ovog rada i kroz cijeli diplomski studij.

Od srca hvala mami, tati, bratu, strini, stricu, ujni, Ivi i ostalim članovima obitelji na neizmjerne ljubavi i vjeri u moj uspjeh.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Konstrukcija modularnog sustava višestrukih sgRNA za istovremeno ciljanje nekoliko lokusa tehnologijom CRISPR-Cas9

Lucija Jukić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sustav CRISPR-Cas9 sastoji se od dvije osnovne komponente, proteina Cas9 i molekule *single guide* RNA (sgRNA). Protein Cas9 je endonukleaza koja stvara dvolančani lom u molekuli DNA na temelju komplementarnosti ciljane sekvence s molekulom sgRNA. Fuzijom inaktiviranog proteina Cas9 (dCas9) na katalitičku domenu efekorskog proteina omogućeno je ciljano modificiranje epigenoma bez da nastaje dvolančani lom u molekuli DNA. Istovremenom ekspresijom većeg broja sgRNA i proteina Cas9 u eukariotskoj stanici moguće je ciljati veći broj lokusa odjednom. Plazmidni vektor za ekspresiju proteina dCas9 i više molekula sgRNA različite specifičnosti može se sintetizirati u tehnički jednostavnoj reakciji kloniranjem *Golden Gate* metodom, koja se temelji na restrikcijskim enzimima tipa IIS koji cijepaju sekvencu izvan mjesta prepoznavanja što omogućava vrlo precizno spajanje većeg broja odsječaka DNA. Cilj ovog istraživanja bio je proširiti sustav CRISPR-Cas9 molekularnim alatima za povezivanje više molekula sgRNA u jedan vektor koristeći enzime *Golden Gate* sustava te provjeriti njihovo slaganje u *Golden Gate* sustavu.

Uspješno su konstruirani plazmidni vektori s kompatibilnim kohezivnim krajevima dobivenim cijepanjem enzimima *Golden Gate* sustava, kao i odgovarajući vektori za ugradnju do šest modula sgRNA u okosnicu za transfekciju i koekspresiju fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A. Pravilno sklapanje molekularnog alata provjereno je restrikcijskom analizom i/ili lančanom reakcijom polimeraze. Izrada takvog fleksibilnog sustava olakšava modificiranje genoma ili epigenoma proširivanjem postojećeg skupa molekularnih alata s mogućnošću ciljanja do šest lokusa istovremeno.

(68 stranica, 34 slike, 7 tablica, 33 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: metoda *Golden Gate*, DNMT3A, plazmidni vektor, sgRNA

Voditelj: dr. sc. Aleksandar Vojta, doc.

Ocjenitelji: dr. sc. Aleksandar Vojta, doc.

dr. sc. Zlatko Liber, prof.

dr. sc. Marin Ježić, doc.

Rad prihvaćen: 14. veljače 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

Construction of a modular system of multiple sgRNA for simultaneous targeting of several loci using the CRISPR-Cas9 technology

Lucija Jukić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

CRISPR-Cas9 system is comprised of two main components, Cas9 protein and single guide RNA (sgRNA). The Cas9 protein is an endonuclease that catalyzes site-specific cleavage of double stranded DNA and is guided by an sgRNA molecule that is complementary to the DNA target site. Inactivated protein Cas9 (dCas9) fused to a catalytic domain of an effector protein enables epigenome editing without inducing double strand break. Several genomic loci can be targeted simultaneously by co-expression of protein Cas9 and multiple sgRNA molecules in eukaryotic cells. Plasmid vector for co-expression of protein Cas9 and multiple sgRNA molecules can be constructed using Type IIS restriction enzymes of the Golden Gate system, which cleave outside of their recognition sequence and thereby enable precise assembly of multiple DNA fragments. The aim of this study was to expand the CRISPR-Cas9 system with molecular tools for multiple sgRNA cloning using the Golden Gate enzymes and to confirm their successful assembly in the Golden Gate system.

Specific plasmid vectors with compatible cohesive ends created by Golden gate enzymes were successfully assembled, and so were the corresponding vectors for incorporation of six sgRNA modules in plasmid for transfection and co-expression of fusion protein dCas9-DNMT3A. Plasmid constructs were verified by two methods: restriction enzyme analysis and polymerase chain reaction (PCR). Construction of this flexible system facilitates genome and epigenome editing by expansion of the existing set of molecular tools with the possibility of simultaneously targeting up to six loci.

(68 pages, 34 figures, 7 tables, 33 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: Golden Gate method, DNMT3A, plasmid vector, sgRNA

Supervisor: PhD Aleksandar Vojta, Assistant professor

Reviewers: PhD Aleksandar Vojta, Assistant professor

PhD Zlatko Liber, Professor

PhD Marin Ježić, Assistant professor

Thesis accepted: February 14, 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Početak epigenetičkog inženjerstva	1
1.2 Alati za ciljanu modifikaciju genoma	2
1.3 Sustav CRISPR-Cas	4
1.3.1 Faze imunskog odgovora putem sustava CRISPR-Cas.....	5
1.3.2 Sustav CRISPR-Cas9 (tip II sustava CRISPR-Cas)	6
1.3.3 Protein Cas9.....	8
1.3.3.1 Ortolozi proteina Cas9	9
1.4 Prenamjena sustava CRISPR-Cas9 za ciljanu modifikaciju epigenoma.....	10
1.5 Ciljana metilacija molekule DNA.....	11
1.5.1 Višestruka ciljana metilacija molekule DNA	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	15
3.1 Materijal.....	16
3.1.1 Komercijalni setovi kemikalija	16
3.1.2 Enzimi	16
3.1.3 Plazmidni vektori	16
3.1.4 Boje i markeri molekulskih masa.....	17
3.1.5 Bakterijski soj	17
3.1.6 Ostalo.....	17
3.2 Metode.....	18
3.2.1 Konstrukcija plazmida s rezistencijom na spektinomycin (pUS21gg)	18
3.2.1.1 Ciljana mutageneza.....	18
3.2.1.2 Transformacija kemijski kompetentnih bakterija i priprema prekonoćnih kultura	19
3.2.1.3 Izolacija rekombinantnih plazmida	19
3.2.1.4 Restriksijska analiza	20
3.2.1.5 Elektroforeza DNA u agaroznom gelu	20
3.2.1.6 Ligacija vektora i inserta.....	20
3.2.2 Konstrukcija plazmida pSgMX-A i pSgMX-G (X=1-6).....	22
3.2.2.1 PCR na bakterijskim kolonijama (Colony PCR).....	27
3.2.2.2 Sekvenciranje rekombinantnih plazmida Sangerovom metodom	28
3.2.3 Konstrukcija plazmida s rezistencijom na kanamicin (pUK21gg)	28
3.2.3.1 Konstrukcija plazmida pUK21gg-Esp3I.....	29
3.2.3.2 Ciljana mutageneza pUK21gg-Esp3I	30

3.2.4	Konstrukcija plazmida pSg-xN (N= 1-6)	31
3.2.5	Slaganje više modula u jedan plazmid (<i>Golden Gate Assembly</i>)	37
3.2.5.1	Kloniranje molekula sgRNA u plazmide pSgMX-G (X= 1-6)	39
3.2.5.2	Slaganje šest različitih molekula sgRNA u okosnicu plazmida pSg-x6 (<i>Assembly 1</i>)	40
3.2.5.3	Slaganje modula funkcionalnih elemenata i modula šest različitih sekvenci za sgRNA u okosnicu plazmida pUC19BB (<i>Assembly 2 i 3</i>)	42
3.2.5.4	Slaganje modula funkcionalnih elemenata i praznog modula za sgRNA u okosnicu plazmida pUC19BB (<i>Assembly 4 i 5</i>)	43
3.2.5.5	Slaganje šest različitih sekvenci za sgRNA u produkte <i>Assembly</i> -a 4 i 5 (<i>Assembly 6 i 7</i>)	43
4.	REZULTATI	44
4.1	Plazmid s rezistencijom na spektinomycin (pUS21gg)	44
4.2	Plazmidi pSgMX-A i pSgMX-G (X=1-6)	46
4.3	Plazmid s rezistencijom na kanamicin (pUK21gg)	48
4.4	Plazmidi pSg-xN (N = 1-6)	49
4.5	Slaganje više modula u jedan plazmid (<i>Golden Gate Assembly</i>)	50
5.	RASPRAVA	60
6.	ZAKLJUČAK	63
7.	LITERATURA	64
8.	ŽIVOTOPIS	67

1. UVOD

1.1 Početak epigenetičkog inženjerstva

Selektivni uzgoj, genetika i modificiranje genoma (engl. *genome engineering*) uvelike su doprinijeli razumijevanju utjecaja gena na fenotip organizma. S druge strane, na staničnoj razini, razlike u fenotipu uglavnom su određene epigenetičkim procesima. Uz metilaciju DNA, pronađene su brojne modifikacije histona duž cijelog ljudskog genoma u različitim tkivima i različitim tipovima stanica, ali tek u posljednjih nekoliko godina su okarakterizirani epigenetički procesi koji doprinose kontroli i nasljeđivanju aktivnosti gena (Köferle i sur., 2015).

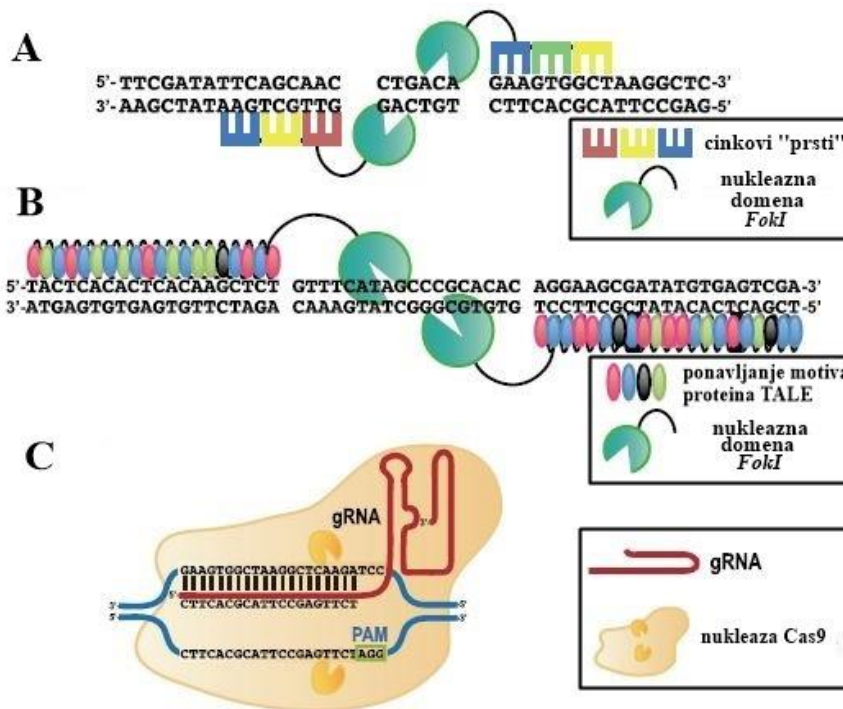
Epigenom predstavlja sve modifikacije DNA koje ne uključuju promjenu same sekvence DNA te ima ključnu ulogu u regulaciji strukture i funkcije genoma uključujući vrijeme kada dolazi do ekspresije gena i jačinu ekspresije. Posebno je važan tijekom ranog razvoja organizma za uspostavljanje obrazaca ekspresije gena odgovornih za nastanak velikog broja različitih vrsta stanica iz jedne zigote. Također, postoji mnogo dokaza koji upućuju na to da je epigenom specifično promijenjen kod mnogih ljudskih bolesti, posebno tumora pa se zato istraživanju epigenoma predaje sve veća pozornost (Park i sur., 2016).

Dugo vremena epigenetička istraživanja bila su ograničena nedostatkom eksperimentalnih metoda koje bi omogućile ciljanu metilaciju DNA i manipulaciju kromatinskih oznaka u živim stanicama, dok je uvođenje mutacija i djelovanje farmakološkim agensima mijenjalo epigenetičke oznake globalno i nespecifično. Epigenetičko inženjerstvo je omogućilo modificiranje pojedinih epigenetičkih oznaka na točno određenim mjestima, a ciljana modifikacija je omogućena prenamjenom alata za modificiranje genoma u alat za modificiranje epigenoma koji se temelji na povezivanju efektor (enzim koji katalizira modifikaciju epigenetičkih oznaka, odnosno njegova katalitička domena) i domene koja specifično veže određenu sekvencu DNA. DNA vezujuće domene mogu biti proteini s domenama cinkovih „prstiju“ ZF (engl. *Zinc finger*) ili efektori slični aktivatorima transkripcije (engl. *transcription activator-like, TALE*). Kod novije metode, sustava CRISPR-Cas9, kromatinski modifikator je fuzioniran na katalitički inaktivni protein Cas9 (dCas9; engl. *catalytically-dead Cas9*) koji nema endonukleaznu aktivnost, a na specifičnu sekvencu DNA ga navodi molekula RNA koja se naziva sgRNA (engl. *single guide RNA*) (Köferle i sur., 2015).

1.2 Alati za ciljanu modifikaciju genoma

Tri sustava kojima se na relativno jeftin i efikasan način može modificirati genom su kimerne nukleaze ZFN (engl. *zinc finger nuclease*), TALEN (engl. *transcription activator–like effector nuclease*) i sustav CRISPR-Cas9 (engl. *clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9*) (Slika 1). U odnosu na prijašnje metode modificiranja genoma (RNA interferencija i nespecifični lijekovi), ovi sustavi omogućuju uvođenje mutacija na točno određenom mjestu u genomu, a mogu se dizajnirati u svega nekoliko dana metodama kloniranja, komercijalnim setovima kemikalija ili pak komercijalnim uslugama (Chen i sur., 2014).

Sve tri tehnologije funkcioniraju na sličan način, tako što nukleaze stvaraju dvolančani lom u željenom dijelu genoma koji se zatim popravlja endogenim mehanizmima popravka DNA, a to su nehomologno sparivanje krajeva (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ) i homologna rekombinacija (engl. *homologous recombination*, HR) (Ota i sur., 2014). Razlikuju se u načinu na koji prepoznaju ciljanu DNA. Sustavi ZFN i TALEN imaju proteinske domene koje specifično vežu DNA, a sustav CRISPR-Cas9 ribonukleinsku kiselinu sgRNA koja je jednim svojim dijelom komplementarna ciljanom slijedu DNA te se na njega specifično veže. Sustavi ZFN i TALEN za nukleaznu aktivnost imaju katalitičku domenu (dimer proteina FokI), dok je protein Cas9 sustava CRISPR-Cas9 endonukleaza sam po sebi (Rocha-Martins i sur., 2015).



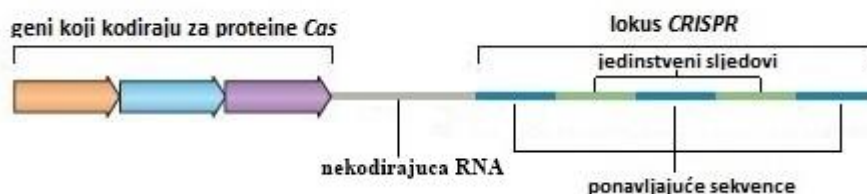
Slika 1. Sustavi za ciljano modificiranje genoma. (A) Kod sustava ZFN (engl. *zinc finger nuclease*) domene cinkovi prsti (na slici tri cinkova prsta) specifično prepoznaju i vežu sekvencu DNA, a nukleaza FokI stvara dvostrani lom. (B) Sustav TALEN (engl. *transcription activator-like effector nuclease*) se sastoji od dva monomera od kojih svaki sadrži domenu koja veže DNA (TALE ponavljajući motivi) i nukleaznu domenu FokI. Kao i kod sustava ZFN, FokI funkcionira kao dimer te stvara dvostrani lom u ciljanoj molekuli DNA. (C) Sustav CRISPR-Cas (engl. *clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9*) navodi se na ciljanoj sekvenci molekulom gRNA (engl. *guide RNA*), a protein Cas 9 specifično cijepa DNA tri baze uzvodno od sekvence PAM (engl. *Protospacer adjacent motif*). Preuzeto i prilagođeno prema radu Osakabe i Osakabe, 2015.

Kod sustava ZFN (Slika 1A) proteinski strukturni motivi "cinkovi prsti" sastoje se od grupa aminokiselina (najčešće Cys₂His₂) čiju strukturu stabilizira jedan ili više iona cinka i čija se specifičnost za DNA temelji na aminokiselinama u domeni prepoznavanja (engl. *recognition domain*) alfa uzvojnice koja se veže na veliki utor DNA. Takav cinkov prst fuzioniran je na nukleazu (FokI) koja funkcionira kao dimer. Svaki cinkov prst prepoznaje triplete nukleotida ciljane sekvence, a u sustavu ZFN s nukleazom FokI obično je fuzionirano tri do šest cinkovih prstiju. Sustav TALEN se također sastoji od dvije komponente (Slika 1B), nukleaze FokI kao kod sustava ZFN te od proteina efektor nalik transkripcijskim aktivatorima (TALE; engl. *transcription activator-like protein*) koji služi za prepoznavanje ciljane DNA i to uz pomoć domene sastavljene od 33–35 aminokiselina koja ima dva varijabilna mjesta na mjestu 12. i 13. aminokiseline koji se nazivaju RVD (engl. *repeat variable di-residues*). Različite kombinacije aminokiselina RDV omogućuju prepoznavanje pojedinačnih baza što omogućava veću modularnost nego kod sustava ZFN koji prepoznaje nekoliko baza zajedno (Rocha-Martins i sur., 2015; Laufer i Singh, 2015).

Danas se od tri spomenute metode najviše koristi sustav CRISPR-Cas9 (Slika 1C) upravo zbog toga što se prepoznavanje ciljane sekvence temelji na njezinoj komplementarnosti s molekulom RNA koju je lakše i brže konstruirati za ciljanu sekvencu nego u slučaju ZFN i TALEN gdje je potrebno konstruirati aminokiselinsku sekvencu, odnosno fuzijski protein (Gaj i sur., 2014). Također, CRISPR-Cas9 naspram ostale dvije metode omogućuje veću specifičnost ciljanja DNA te istovremeno ciljanje više lokusa u genomu odjednom (Ran i sur., 2013.).

1.3 Sustav CRISPR-Cas

Sustav CRISPR-Cas predstavlja mehanizam obrane bakterija i arheja od strane DNA (virusi ili plazmidi) pomoću nukleaze navođene molekulom RNA. Otkriven je 1980-ih u bakteriji *Esheria coli*, a danas su poznata tri tipa (I, II, III) ovog sustava. Sva tri tipa sadrže lokus CRISPR-Cas (Slika 2) kojeg čine nakupine gena *Cas* (engl. *CRISPR-associated*), evolucijski očuvana vodeća sekvenca (nekodirajuća RNA) te različiti uzorci ponavljajućih sljedova dugih od 21-48 bp (engl. *base pair*) u koje se mogu ugraditi jedinstveni sljedovi – razmaknice (engl. *spacers*) porijeklom od strane DNA u kojoj se nazivaju proto-razmaknicama (engl. *protospacers*), a čija veličina varira od 26-72 bp.



Slika 2. Organizacija lokusa CRISPR-Cas bakterijskom genomu. Broj, redoslijedi i identitet gena *cas* varira između različitih CRISPR-Cas podtipova. Novi jedinstveni slijed (razmaknica) se ugrađuje na mjestu između nekodirajuće RNA i prvog ponavljanja lokusa CRISPR. Preuzeto i prilagođeno prema radu Amitai i Sorek, 2016.

Vodeća sekvenca je duga sekvenca bogata parovima baza AT koja sadrži promotor za ekspresiju molekule CRISPR RNA (*crRNA*) i vezna mjesta za regulatorne proteine, a nalazi se uzvodno od ponavljajućih sljedova lokusa CRISPR. Dio između nekodirajuće RNA i prvog ponavljanja lokusa CRISPR je mjesto ugradnje novog jedinstvenog slijeda (razmaknice). Budući da su razmaknice organizirane u jednom smjeru, moguće je kronološki pratiti njihovu ugradnju. Za samo prepoznavanje strane DNA od strane sustava CRISPR-Cas ključno je postojanje sekvence PAM (engl.

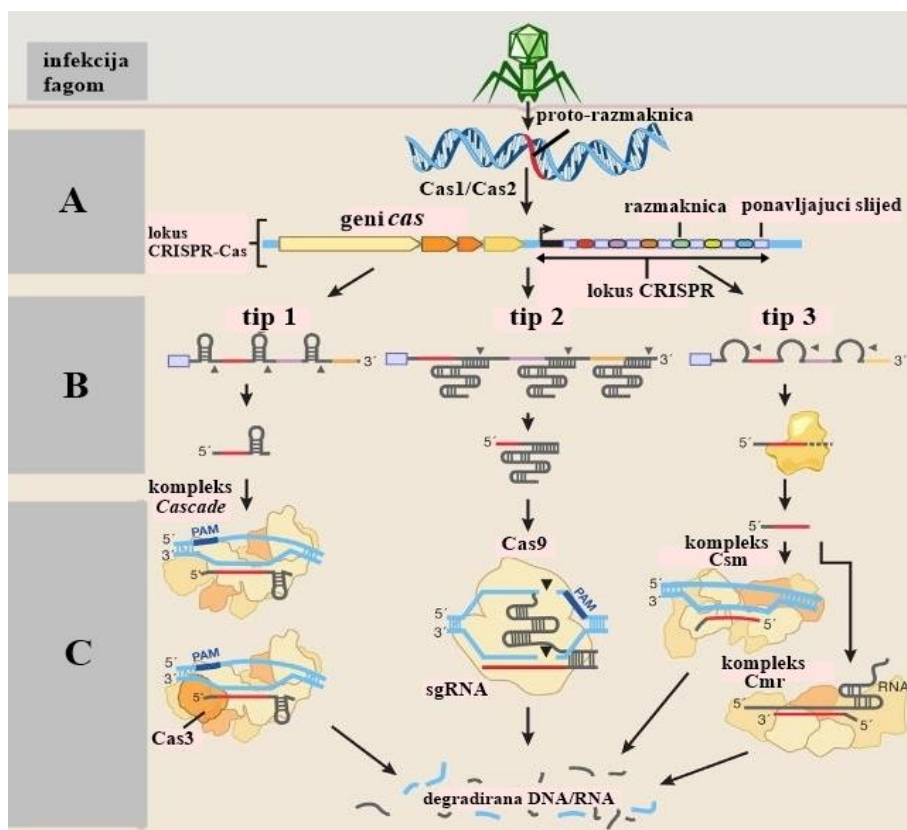
protospacer adjacent motif) nizvodno od proto-razmaknice u ciljanoj sekvenci. Ona se razlikuje između sva tri tipa sustava i svaki ortolog proteina Cas9 ima jedinstvenu sekvencu PAM (Ran i sur., 2013; Amitai i Sorek, 2016, Rath i sur., 2015).

1.3.1 Faze imunskog odgovora putem sustava CRISPR-Cas

Imunosni odgovor bakterija na stranu DNA putem sustava CRISPR-Cas odvija se u tri faze. Prva faza je **adaptacija** gdje dolazi do ugradnje dijela strane DNA (proto-razmaknice) u lokus CRISPR genoma domaćina uz pomoć proteina Cas1 i Cas2 (Slika 3A). Proteini Cas1 i Cas2 su ključni u fazi adaptacije kod sva tri tipa sustava i obično su dio istog operona. Oni formiraju strukturno stabilni kompleks proteina koji se sastoji od dva dimera proteina Cas1 s funkcijom endonukleaze i jednog dimera proteina Cas2 koji također cijepa molekulu DNA (Karvelis i sur., 2013; Amitai i Sorek, 2016).

U sljedećoj fazi, **fazi ekspresije i sazrijevanja** (Slika 3B), dolazi do ekspresije gena *cas*, a lokus CRISPR se transkribira u dugi primarni transkript nazvan *pre-crRNA* (engl. *precursor crRNA*) koji se zatim uz pomoć endogenog enzima RNaze III dalje procesira u skupinu kratkih zrelih CRISPR-RNA (crRNA) od kojih svaka sadrži po jedan jedinstveni slijed okružen ponavljajućim sekvencama. Ova faza se razlikuje između tri tipa sustava CRISPR-Cas pa tako kod CRISPR-Cas sustava tipa I i III dolazi do cijepanja *pre-crRNA* unutar ponavljajućih slijedova pomoću endonukleaze Cas6, a kod tipa II sazrijevanje crRNA uključuje i dodatnu molekulu *tracrRNA* (engl. *trans-activating CRISPR RNA*) koja je važna za procesiranje crRNA i stvaranje kompleksa s Cas9 (Gaj i sur., 2014; Mali i sur., 2013).

Posljednja faza imunskog odgovora je **faza interferencije** u kojoj crRNA zajedno s proteinima Cas formira efektorski kompleks koji prepoznaje ciljane sekvence strane DNA na temelju komplementarnosti i inducira njezino cijepanje na točno određenom mjestu. Struktura i funkcija efektorskog kompleksa ribonukleoproteina (RNP) uključenog u utišavanje strane DNA razlikuje se ovisno o tipu sustava CRISPR-Cas. Kod sustava CRISPR-Cas tipa I (npr. *E. coli*) crRNA se veže za multiproteinski kompleks nazvan *Cascade* (engl. *CRISPR-associated complex for antiviral defense*) koji se zatim veže za ciljane DNA i pokreće njenu razgradnju pomoću proteina Cas3. Kod sustava tipa III RNP kompleks proteina Cas, RAMP (Cmr) i crRNA prepoznaju ciljane DNA, a u sustavu tipa II (npr. *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus thermophilus*) umjesto kompleksa proteina *Cascade* ili Cmr postoji samo jedan protein, protein Cas9 koji funkcionira kao endonukleaza (Slika 3C). Sustav tipa II je poseban i po tome što uz crRNA sadrži nevarijabilnu komponentu nazvanu "RNA koja djeluje *in trans*" (*tracrRNA*). Karvelis i sur. su eksperimentalno dokazali da je *tracrRNA* nužna za fazu interferencije posredovanu proteinom Cas9 i *in vivo* i *in vitro* (Karvelis i sur., 2013; Amitai i Sorek, 2016; Mali i sur., 2013).



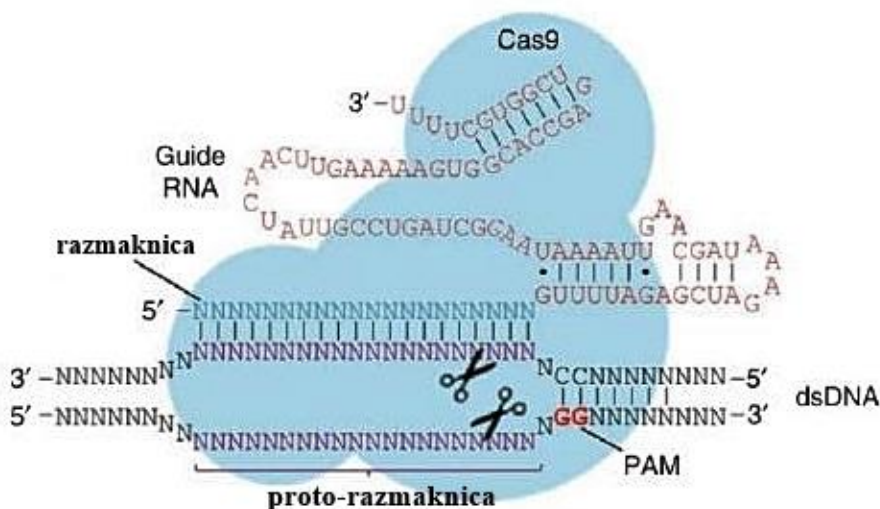
Slika 3. Tri faze imunskog odgovora bakterija na virusnu DNA. (A) Prva faza je **faza adaptacije** u kojoj uz pomoć kompleksa proteina Cas1–Cas2 dolazi do ugradnje proto-razmaknice iz strane DNA u lokus CRISPR gdje se naziva razmaknicom. Razmaknice se nalaze između ponavljajućih sljedova i omogućuju sustavu CRISPR razlikovanje strane od vlastite sekvence. (B) U fazi **ekspresije i sazrijevanja** lokus CRISPR se transkribira u dugi primarni transkript pre-crRNA koji sazrijeva na različite načine ovisno o kojem se tipu sustava CRISPR-Cas radi. Kod sustava tipa I i III dolazi do cijepanja unutar ponavljajućih sljedova pomoću endonukleaze Cas6 te nastaje više malih molekula crRNA (CRISPR-RNA), a u sustavu tipa II, tracrRNA (engl. *trans-activating* CRISPR-RNA) hibridizira s ponavljajućim sljedovima pre-crRNA te se taj kompleks dalje procesira uz pomoć enzima RNaza III. (C) U **fazi interferencije** molekule crRNA stvaraju kompleks s proteinima iz obitelji Cas koji se razlikuju kod različitih tipova sustava, a uključuju kompleks proteina *Cascade* (tip I), protein Cas9 (tip II), proteine Csm (tip III-A) i proteine Cmr (tip III-B). Takvi ribonukleoproteinski kompleksi prepoznaju ciljane molekule DNA na temelju njezine komplementarnosti s molekulom gRNA i postojanja sekvence PAM te ju razgrađuju pomoću nukleaznih proteina ili njihovih domena. Preuzeto i prilagođeno prema radu Patrick i sur., 2014.

1.3.2 Sustav CRISPR-Cas9 (tip II sustava CRISPR-Cas)

Prije nego je otkrivena prava uloga sustava CRISPR-Cas u bakterijama, sekvenca CRISPR je korištena u druge svrhe nevezane uz modificiranje genoma. Jedna od primjena je bila u genotipizaciji bolesti. Primijećeno je da je sekvenca CRISPR heterogena između različitih organizama pa su se tako mogli razlikovati inače izogeni izolati bakterije *Mycobacterium tuberculosis* čime je omogućeno precizno

određivanje dijagnoze i epidemiologije bolesti tuberkuloze. Tipizacija na temelju CRISPR-a je također razvijena i kod organizama *Yersinia pestis*, *Salmonella* i *Corynebacterium diphtheriae* (Rath i sur., 2015).

Ipak, najznačajnija primjena sustava CRISPR-Cas je došla razvojem sustava tipa II (CRISPR-Cas9) u moćan genetički alat za manipulaciju genoma eukariotskih stanica. Ključan korak je bilo sklapanje molekula crRNA i tracrRNA u jedinstvenu kimernu molekulu nazvanu sgRNA čime je omogućena jednostavnija eksperimentalna primjena. Molekula sgRNA svojim 20 nukleotida (nt) dugim dijelom koji je komplementaran ciljanoj DNA navodi protein Cas9 na točno određeno mjesto koje se nalazi uzvodno od sekvence PAM (Slika 4). Za razliku od proteina Cas3 koji sadrži i helikaznu i nukleaznu domenu te degradira ciljanu sekvencu, protein Cas9 stvara dvolančani lom u molekuli DNA na točno određenom mjestu, 3 bp uzvodno od sekvence PAM što je važna karakteristika alata za uređivanje genoma. Sama potreba za postojanjem motiva PAM nizvodno od ciljane sekvence duge 20 nt smatra se i glavnim nedostatkom ove metode, no to ipak ne ograničava njezinu čestu primjenu budući da se takvo mjesto nalazi prosječno svakih 8–12 bp u ljudskom genomu (Cong i sur., 2013). Drugo moguće ograničenje jesu nespecifične mutageneze koje se pak se mogu smanjiti upotrebom boljih prirodnih ortologa proteina Cas9, smanjenjem afiniteta i povećanjem kooperativnosti između molekule sgRNA i proteina Cas9, uspostavom kompeticije između aktivne i neaktivne forme, uspostavom unaprijeđenih varijanti proteina Cas9 te pažljivim odabirom molekula sgRNA za ciljanje genoma (Gaj i sur., 2014; Cong i sur., 2013; Ran i sur., 2013; Mali i sur., 2013).

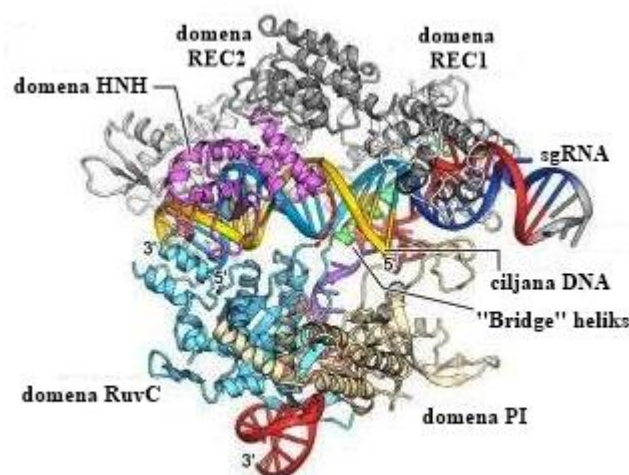


Slika 4. Osnovni Cas9-sgRNA kompleks (iz bakterije *S. pyogenes*) za ciljanu modifikaciju genoma.

Za prepoznavanje i cijepanje ciljane sekvence potrebna je proto-razmaknica komplementarna razmaknici i sekvenca PAM (5' NGG 3') na 3' kraju proto-razmaknice. Protein Cas9 stvara dvolančani lom 3 bp uzvodno od sekvence PAM. Preuzeto i prilagođeno prema radu Mali i sur., 2013.

1.3.3 Protein Cas9

Protein Cas9 je endonukleaza sustava CRISPR-Cas9 koja stvara dvolančani lom unutar molekule DNA na temelju komplementarnosti ciljane sekvence s molekulom *guide* RNA (Ran i sur., 2013). Kristalna struktura proteina Cas9 je pokazala da se sastoji od dva reznja, nukleaznog (NUC) i reznja za prepoznavanje DNA (REC). Režanj za prepoznavanje DNA se dijeli u tri regije, dugi α -heliks (tzv. "*Bridge helix*"), domenu REC1 i domenu REC2, dok se nukleazni režanj sastoji od dvije nukleazne domene, RuvC i HNH te od domene PI (engl. PAM-*interacting*). Negativno nabijeni heterodupleks sgRNA-DNA smješta se u pozitivno nabijen utor između REC i NUC reznjeva (Slika 4) (Ran i sur., 2015). Ključne domene za nukleaznu aktivnost Cas9 su HNH nukleazna domena koja cijepa lanac komplementaran molekuli sgRNA i RuvC nukleazna domena koja cijepa lanac koji sadrži sekvencu PAM. Ako se jedna od ove dvije domena inaktivira, Cas9 funkcionira kao endonukleaza koja stvara jednolančani lom u molekuli DNA (engl. nickase) (Mali i sur., 2013). Za postizanje željenog dvolančanog loma u molekuli DNA umjesto nukleaze Cas9 s funkcionalnim nukleaznim domenama mogu se koristiti dvije nukleaze Cas9 kojima je inaktivirana nukleazna domena RuvC na različitim mjestima u istom kromosomu. Tako nastaje dvolančani lom s određenim ljepljivim krajevima za razliku od tupih krajeva koji nastaju cijepanjem Cas9 s funkcionalnim nukleaznim domenama (Mali i sur., 2013).



Slika 5. Shematski prikaz kompleksa Cas9-sgRNA-DNA. Negativno nabijeni heterodupleks sgRNA-DNA se smješta u pozitivno nabijen utor između reznjeva proteina Cas9 (REC i NUC). Preuzeto i prilagođeno prema radu Nishimasu i sur., 2014.

1.3.3.1 Ortolozi proteina Cas9

Identificirano je nekoliko ortologa proteina Cas9. Najbolje opisan je onaj iz bakterije *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), a uz njega su u čestoj upotrebi i proteini Cas9 iz vrsta *Staphylococcus aureus* (SaCas9), *Streptococcus thermophilus* (StCas9) te *Neisseria meningitidis* (NmCas9). Svi proteini Cas9 se međusobno razlikuju u veličini, sekvenci PAM te u efikasnosti cijepanja DNA (Friedland i sur., 2015). U genetičkom inženjerstvu je u najširoj upotrebi protein Cas9 iz bakterije *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) budući da je sekvenca PAM koju prepoznaje dosta kratka – 5' NGG 3' (N predstavlja bilo koji nukleotid) što omogućava ciljanje raznih mjesta u genomu (Chen i sur., 2016). No, kod modificiranja genoma u postnatalnom somatskom tkivu životinja postoji problem unošenja takvog proteina Cas9 *in vivo* zbog njegove veličine. Za unos raznih sekvenci u stanice sve se više koriste virusni vektori AAV (engl. adeno-associated virus) koji imaju slab imunogeni potencijal, ne nose velik rizik od onkogenog ugrađivanja u genom domaćina te imaju veliki niz serotipskih specifičnosti. Smanjena veličina koju virusni vektor može prenijeti, oko 4,5 kbp (engl. kilo-base pair) predstavlja prepreku za pakiranje sekvence proteina SpCas9 (4,2 kbp) i pripadajuće molekule sgRNA u jedan vektor. Iako tehnički izvedivo, ovo ostavlja malo mjesta za ekspresijske i kontrolne elemente. U potrazi za manjim ortolozima Cas9 za efikasno unošenje u stanice *in vivo* pomoću virusnih vektora otkriveni su kraći ortolozi proteina Cas9 kao što je onaj iz bakterije *Staphylococcus aureus* (SaCas9) koji naspram 1368 aminokiselina (ak) velikog proteina SpCas9 sadrži 1053 ak (Ran i sur., 2015). Njegova sekvenca PAM jest 5' NNGRRT 3' (gdje R predstavlja baze A ili G) koja iako dosta duga, nije toliko ograničavajuća zbog raznolikosti mogućih kombinacija nukleotida (Chen i sur., 2016). Razlika između ova dva ortologa jest i u njihovim pripadajućim molekulama sgRNA. Protein SaCas9 ima najveću efikasnost dorađivanja genoma u životinjskim stanicama navođen molekulama sgRNA čija veličina varira između 21 i 23 nukleotida, dok je njihova veličina za protein SpCas9 nešto manja, od 17 do 20 nt. Molekule sgRNA proteina SpCas9 je specifična samo za taj protein i samo njega može aktivirati dok na druge ortologe (protein SaCas9) nema utjecaja. Isto vrijedi i za molekulu sgRNA proteina SaCas9 (Ran i sur., 2015.).

1.4 Prenamjena sustava CRISPR-Cas9 za ciljanu modifikaciju epigenoma

Alatima za modificiranje genoma može se ciljano promijeniti kodirajuća sekvenca te na taj način otkriti funkcija određenog gena. Također, može se mijenjati i sekvenca regulatorne regije čime se postiže transkripcijska kontrola (De Groote i sur., 2012). Transkripcijska kontrola može se postići i bez mijenjanja same sekvence DNA pomoću prilagođene verzije alata za ciljanu modifikaciju genoma. Izbacivanjem ili inaktivacijom nukleazne aktivnosti te fuzioniranjem sustava za ciljanje DNA na određenu efektorsku domenu alati za ciljano modificiranje genoma postaju alati za modificiranje epigenoma (Laufer i Singh, 2015).

Proteinu SpCas9 se točkastim mutacijama (D10A u domeni RuvC i H840A u domeni HNH) mogu inaktivirati obje nukleazne domene istovremeno te se takav protein naziva dCas9 (engl. *nuclease dead Cas9*). On u potpunosti zadržava DNA vezujuću aktivnost, ali ne cijepa DNA. To svojstvo omogućava široku primjenu sustava u regulaciji ekspresije (De Groote i sur., 2012) ili vizualizaciji kromatina (Marraffini, 2016) budući da se na njega mogu vezati razni epigenetički efektori (Chen i sur., 2016). Npr. vezanjem dCas9 s transkripcijskim aktivatorom ili represorom na promotorsku sekvencu može se mijenjati ekspresija gena u ljudskim stanicama, a vezanjem enzima koji modificiraju kromatin mogu se uvesti histonske modifikacije za utišavanje ili aktivaciju određenih kromosomskih regija. Također, fuzija proteina dCas9 i GFP može se iskoristiti za označavanje raznih lokusa (Marraffini, 2016). Efektorska domena može biti bilo koji veliki kromatin-remodelirajući kompleks, uključujući razne histonske acetilaze i deacetilaze, metilaze i demetilaze, kinaze i fosfataze, metilaze i demetilaze DNA, a neki od njih su prikazani u tablici 1 (Mali i sur., 2013).

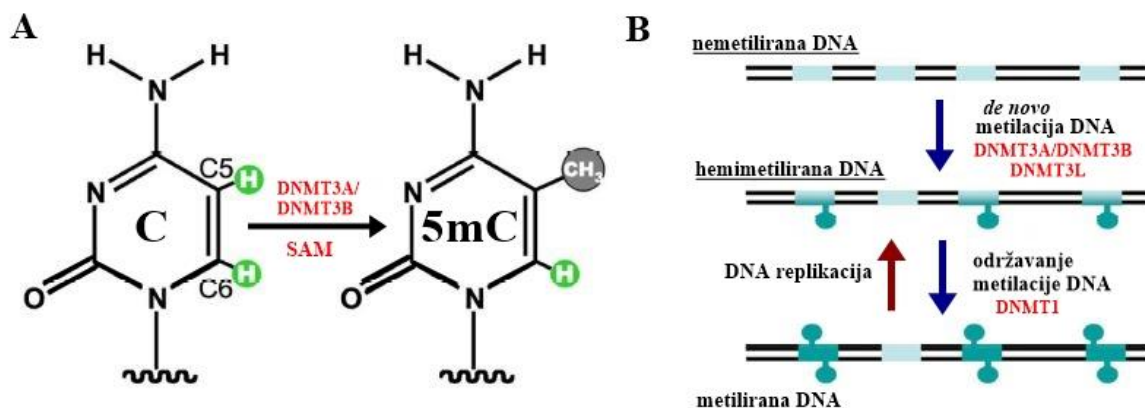
Tablica 1. Primjeri efektorskih domena za ciljanu modifikaciju epigenoma i njihov utjecaj na transkripciju.
Preuzeto i prilagođeno iz rada Laufer i Singh, 2015.

Efekt	Efektorska domena	Posljedica djelovanja efektorske domene
Aktivacija	VP64, VP16, p65, SAM, VPR	Vežanjem transkripcijskog kompleksa što vodi do aktivacije transkripcije. Mogu potaknuti acetilaciju histona kao posljedicu indukcije transkripcije.
Represija	KRAB, SID, Tbx3-RD	Sprječavanje formiranja transkripcijskog kompleksa što vodi do represije transkripcije
Metilacija DNA	DNMT3A , DNMT3B M.EcoHK31I, M.HhaI, M.SssI DNMT3A-3L	Represija transkripcije
Demetilacija DNA	TDG, TET1, TET2	Aktivacija transkripcije
Vizualizacija stanice	GFP, Cherry, BFP	/
Metilacija H3K9	G9a (EHMT), Suvar, KYP GLP	Represija transkripcije
Demetilacija H3K9	JMJD2B	Aktivacija transkripcije
Deacetilacija H3K9	Sin3a	Represija transkripcije
Demetilacija H3K4me2 i H3K27	LSD1	Represija transkripcije

1.5 Ciljana metilacija molekule DNA

Metilacija DNA je prva otkrivena epigenetička modifikacija (1983. godine u ljudskim tumorskim stanicama) i ima ključnu ulogu u mnogim biološkim procesima uključujući uspostavu genomske utiske, utišavanje transpozona i retrovirusa, organizaciju strukture kromatina i regulaciju ekspresije gena (Handy i sur., 2011; Liu i sur., 2016). Za uspostavu i održavanje metilacije potrebne su tri DNA metiltransferaze (DNMT3A, DNMT3B, DNMT1). DNA metiltransferaze 3A i 3B kataliziraju *de novo* metilaciju DNA prijenosom metilne skupine (CH₃) s donorske molekule S-adenozil-L-metionin (AdoMet ili SAM) na peti atom ugljika u citozinu simetričnih mjesta CpG (Slika 6). Metiltransferaznu aktivnost enzima DNMT3A i DNMT3B povećava njima homologan protein DNMT3L (engl. DNMT3-like) koji ne posjeduje katalitičku aktivnost. Za održavanje metilacije odgovorna je DNA metiltransferaza održavateljskog tipa, DNMT1 koja prepoznaje hemimetiliranu DNA te dodaje metilne skupine na lanac kćer stvoren tijekom replikacije. Na taj način uzorak metiliranosti DNA može biti prenesen sa stanice na stanicu, a time i razina ekspresije određenih gena. Zato se za DNA metilaciju

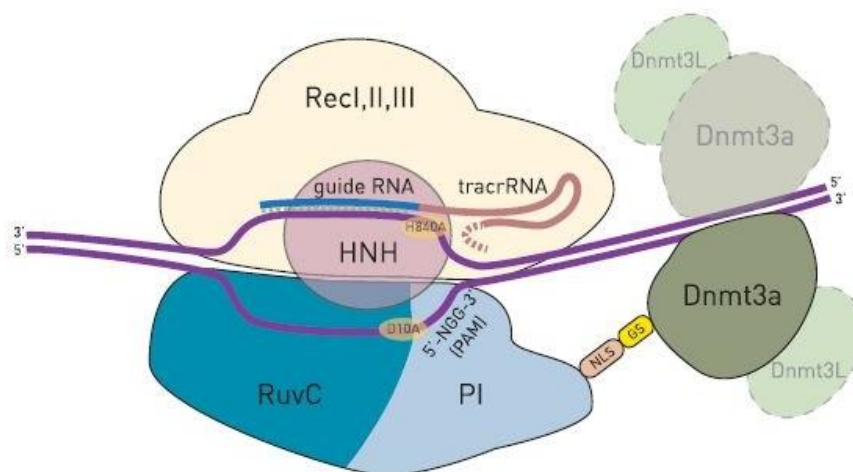
može reći da je dugoročna, relativno stabilna epigenetička oznaka koja doprinosi održavanju staničnog fenotipa (Handy i sur., 2011).



Slika 6. Metilacija molekule DNA. (A) Enzimi DNMT3A/3B (*de novo* metiltransferaze 3A/3B) kataliziraju prijenos metilne skupine (CH₃) s donorske molekule S-adenozil-L-metionin (AdoMet ili SAM) na peti atom ugljika u citozinu i nastaje 5-metilcitozin. (B) Svijetlo plavom bojom su označeni CpG dinukleotidi, a tirkizni oblici predstavljaju metilne skupine na citozinima. Nakon replikacije samo jedan lanac DNA je metiliran, a za metilaciju drugog lanca, u istom uzorku, odgovoran je enzim DNMT1. Preuzeto i prilagođeno prema radu Cheng i Blumenthal, 2008.

U životinjskim stanicama je većina citozina unutar CpG dinukleotida metilirana, osim unutar promotorskih regija bogatih CpG dinukleotidima gdje je metilacija povezana s represijom transkripcije (Jin i sur., 2011). Metilirani mogu biti i citozini koji nisu dio CpG dinukleotida, a takva metilacija je pronađena u nediferenciranim matičnim stanicama i ključna je za regulaciju ekspresije gena u embrionskim matičnim stanicama (Handy i sur., 2011).

Sustav CRISPR-Cas9 je prvotno razvijen kao alat za ciljanu modifikaciju sekvence DNA (Ran i sur., 2013), a zatim je prenamijenjen za regulaciju ekspresije raznim transkripcijskim aktivatorima (Hilton i sur., 2015) i represorima (Thakore i sur., 2016) tako što su efektori, tj. njihove katalitičke domene (Tablica 1) fuzionirani na inaktivirani protein dCas9. Vojta i sur. (2016) su na inaktivnu nukleazu dCas9 preko fleksibilnog linkera Gly₄Ser fuzionirali katalitičku domenu *de novo* DNA metiltransferaze 3A (DNMT3A) te je takav fuzionirani protein navođen molekulama sgRNA na regiju promotora gena *IL6ST* i *BACH2*. Korišteno je više pojedinačnih molekula sgRNA što je omogućilo navođenje kompleksa Cas9-DNMT3A na više mjesta unutar promotora. To je za posljedicu imalo metilaciju većeg dijela tih promotora, a time i smanjenu ekspresiju gena *IL6ST* i *BACH2*.



Slika 7. Prikaz prenamijenjenog sustava CRISPR-Cas9 za ciljanu metilaciju DNA. Nukleaza dCas9 (inaktivirana točkastim mutacijama H840A u domeni HNH i D10A u domeni RuvC) je fuzionirana s katalitičkom domenom *de novo* metiltransferaze 3A (DNMT3A) preko fleksibilnog Gly₄Ser linkera (GS). Kada sgRNA molekula dovede ovaj kompleks na ciljano mjesto u genomu dolazi do regrutacije ostalih proteina potrebnih za uvođenje metilacije (interakcijski partner DNMT3A potreban za dimerizaciju i DNMT3L). Domena PI (engl. *PAM-interacting*) specifično veže sekvencu PAM i stabilizira vezanje kompleksa. NLS označava lokalizacijski signal za unos u jezgru. Preuzeto i prilagođeno prema radu Vojta i sur., 2016.

1.5.1 Višestruka ciljana metilacija molekule DNA

Budući da je za efikasno vezanje proteina Cas9 na ciljano sekvencu u genomu jedino potrebno postojanje sekvence PAM (svakih 8-12 bp u ljudskom genomu), sustav CRISPR-Cas9 se može koristiti za ciljano modificiranje nekoliko lokusa u genomu istovremeno. U početku se u tu svrhu radila kotransfekcija stanica u kulturi s više odvojenih plazmida koji kodiraju za protein Cas9 i molekule sgRNA (Wang i sur., 2013), no kotransfekcija s više plazmida ima nekoliko nedostataka. Prvi problem je u tome što razina ekspresije u pojedinim stanicama može biti različita ovisno o broju kopija plazmida. Zatim, učinak na ekspresiju gena koji slijedi nakon transfekcije je promjenjiv zbog toga što se s vremenom povećava razrijeđenost plazmidne DNA u stanicama, a transfekcija svih stanica nije jednako efikasna pa takva promjenjiva ekspresija gena nije dovoljna za postizanje željenog efekta (Kabadi i sur., 2014). Sakuma i sur. (2015) su konstruirali CRISPR-Cas9 vektor za ekspresiju proteina Cas9 te više sgRNA istovremeno koji se pokazao efikasan u stanicama u kulturi. Nekoliko modula sgRNA je klonirano u plazmidni vektor, a svaki modul sgRNA sastoji se od molekule sgRNA te promotora i terminatora RNA polimeraze III koji omogućavaju ekspresiju pojedine molekule sgRNA (Xie i sur., 2015).

Slaganje većeg broja modula u jedan plazmid je omogućeno enzimima *Golden Gate* sustava. *Golden Gate* sustav se zasniva na restrikcijskim enzimima IIS (*BpiI*, *Esp3I*, *BsaI* i drugi) koji cijepaju DNA izvan mjesta prepoznavanja enzima ostavljajući tako ljepljive krajeve od nekoliko nt. Pravilnim dizajniranjem restrikcijskih mjesta nastaju nepalindromski ljepljivi krajevi što omogućava visoku specifičnost, budući da nakon slaganja pocijepanih fragmenata krajnji konstrukt više ne sadrži restrikcijska mjesta enzima. Time je omogućeno i da se inače dva koraka (cijepanje fragmenata restrikcijskim enzimima i ligacija) naprave u jednoj reakciji. Tako se može dizajnirati konstrukt za višestruko ciljanje u genomu u jednom koraku i s gotovo stopostotnom efikasnošću unosa željenog DNA fragmenta u ekspresijski plazmid (Engler i sur., 2008). Po tom principu je u ovom istraživanju konstruiran ekspresijski plazmid za višestruku ciljanu metilaciju DNA na više lokusa u genomu te je u tu svrhu korišten fuzijski protein dCas9-DNMT3A (Vojta i sur., 2016) i šest sgRNA koje navode fuzijski protein na ciljane lokuse u genomu.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Opći cilj ovog istraživanja bio je proširiti sustav molekularnih alata CRISPR-Cas9 modulima za ekspresiju više sgRNA istovremeno koristeći spajanje *Golden Gate* metodom te provjeriti ispravno slaganje do šest modula sgRNA u *Golden Gate* sustavu.

Specifični ciljevi su:

- Konstrukcija plazmidnih vektora (pSgMX) za kloniranje pojedinačnih sgRNA dvaju ortologa proteina Cas9 (Cas9 bakterije *Streptococcus pyogenes*, SpCas9 i Cas9 bakterije *Staphylococcus aureus*, SaCas9) iz ishodišnog plazmida s rezistencijom na spektinomycin
- Konstrukcija plazmidnih vektora (pSg-xN) za kloniranje više molekula sgRNA (najviše šest) iz ishodišnog plazmida s rezistencijom na kanamicin
- Umnažanje konstruiranih plazmidnih vektora u bakterijskom soju *E. coli* XL10 Gold
- *Golden Gate* sklapanje konstrukta koji sadrži module svih funkcionalnih elemenata za ciljanu metilaciju molekule DNA na više različitih pozicija unutar promotora gena *BACH2* i *IL6ST* istovremeno temeljenu na sustavu CRISPR-Cas9
- Umnažanje *Golden Gate* konstrukta u bakterijskom soju NEB Stable Competent *E. coli*
- Provjera uspješnosti konstrukcije plazmida svakog od navedenih koraka i sklapanja *Golden Gate* konstrukta restriksijskom analizom, PCR-om na bakterijskim kolonijama (*Colony PCR*) i/ili sekvenciranjem Sangerovom metodom

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Materijal

3.1.1 Komercijalni setovi kemikalija

Pyromark PCR Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka); QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, California, SAD); QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen); Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega, Madison, SAD); QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen); QIAquick Gel Purification Kit (Qiagen); EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (Takara, Tokio, Japan); Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies); Quick Ligation Kit (New England BioLabs, Massachusetts, USA)

3.1.2 Enzimi

SapI (10 U/μL; New England BioLabs), *XhoI* (20 U/μL; New England BioLabs); *NgoMIV* (10 U/μL; New England BioLabs); *XbaI* (20 U/μL; New England BioLabs); *KasI* (5 U/μL; New England BioLabs); T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μL; New England BioLabs); T4 DNA Ligase (5 U/μL; Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA); *XbaI* (20 U/μL; New England BioLabs); *NcoI* (10 U/μL; New England BioLabs); *BsaI* (10 U/μL; New England BioLabs); *AatII* (20 U/μL; New England BioLabs); *EcoRI* (20 U/μL; New England BioLabs); *Esp3I* (10 U/μL; Thermo Fisher Scientific); *BpiI* (10 U/μL; Thermo Fischer Scientific); Exonuclease V/RecBCD (10 U/μL; New England BioLabs); FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/μL; Thermo Fischer Scientific)

3.1.3 Plazmidni vektori

pUK21 (Addgene #49788); pFUS_A (Addgene #31028)

3.1.4 Boje i markeri molekulskih masa

MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific); 100 bp DNA Ladder Ready To Load (Solis Biodye, Tartu, Estonija); Gel Loading Dye Purple 6× (New England BioLabs); etidij-bromid (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka)

3.1.5 Bakterijski soj

E. coli XL10-Gold (Agilent); NEB Stable Competent *E. coli* (New England BioLabs)

3.1.6 Ostalo

10× NEBuffer 3.1 (New England BioLabs); 10× CutSmart (New England BioLabs); T4 Ligation Buffer (TaKaRa, Tokio, Japan); 10× Buffer G (Thermo Fisher Scientific); 10× FastAP Buffer (Thermo Fisher Scientific); 10× Egzonuclease V Buffer (New England BioLabs); 10x Buffer Tango (Thermo Fischer Scientific); Lysogeny broth (LB) tekući medij (10 g/L ekstrat kvasca, 5 g/L BactoTrypton, 10 g/L NaCl); Lysogeny broth (LB) kruti medij (5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L BactoTryptone, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar); antibiotik ampicilin (100 mg/mL, AppliChem, Darmstadt, Njemačka); antibiotik kanamicin (50 mg/mL, Thermo Fisher Scientific); antibiotik spektinomycin (50 mg/mL, AppliChem); pufer TAE (40mM Tris-acetat, 1 mM EDTA pH 8.0); SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific); etanol; IPTG (Thermo Fisher Scientific); X-Gal (Thermo Fisher Scientific); destilirana voda; agaroza (Sigma Aldrich, Missouri, SAD); ATP (10 mM, New England BioLabs); DTT (ditiotritol; 10 mM, Thermo Fisher Scientific); Oligo Početnice (100 μM) (Macrogen, Amsterdam, Nizozemska);

3.2 Metode

3.2.1 Konstrukcija plazmida s rezistencijom na spektinomycin (pUS21gg)

Plazmid s rezistencijom na spektinomycin (pUS21gg) korišten je kao ishodišni plazmid za konstrukciju plazmida pSgMX (X=1-6) potrebnog za kloniranje pojedinačnih molekula sgRNA (Poglavlje 3.2.2). Plazmid pUS21gg je konstruiran iz komercijalno dostupnih plazmida pFUS_A (Addgene #31028) i pUK21 (Addgene #49788). U plazmid pFUS_A je uvedeno višestruko mjesto za kloniranje (engl. *multiple cloning site*, MCS) plazmida pUK21 koje sadrži sva potrebna restrikcijska mjesta za buduća kloniranja te je pogodnije od višestrukog mjesta za kloniranje plazmida pFUS_A (Poglavlje 3.2.1.5). U tu svrhu bilo je potrebno iz plazmida pFUS_A ukloniti postojeće restrikcijsko mjesto *NgoMIV* te ga uvesti na novu poziciju nizvodno od višestrukog mjesta za kloniranje. Također je bilo potrebno ukloniti i restrikcijsko mjesto *XhoI* pošto se isto nalazi u novom višestrukome mjestu za kloniranje uzetom iz plazmida pUK21 (Poglavlje 3.2.1.1).

3.2.1.1 Ciljana mutageneza

Restrikcijska mjesta za enzime *XhoI* i *NgoMIV* plazmida pFUS_A promijenjena su pomoću tri zasebne ciljane mutageneze prema prilagođenom protokolu seta *QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit*. Ukupan volumen reakcijske smjese skaliran je na 25 μ L. Korišteno je 50 ng DNA kalupa (plazmida) te 125 ng svake početnice za ciljanu mutagenezu (pFus_noXhoI_S i pFus_noXhoI_A u slučaju uklanjanja restrikcijskog mjesta *XhoI*; pFUS-noNgoMIV_S i pFUS_noNgoMIV_A u slučaju uklanjanja restrikcijskog mjesta *NgoMIV* te pFUS-newNgoMIV_S i pFUS-newNgoMIV_A u slučaju uvođenja restrikcijskog mjesta *NgoMIV* na novu poziciju). PCR program je bio sljedeći: 2 min na 95 °C; 18 ciklusa od 95 °C 20 s, 60 °C 10 s i 68 °C 30 s; te završni korak elongacije 68 °C 5 min. Sekvence svih početnica korištenih u reakcijama ciljane mutageneze prikazane su u Tablici 2, a dobiveni plazmid je nazvan pFUS_A_mutx3.

Tablica 2. Početnice korištene za ciljanu mutagenezu pojedinačnih restrikcijskih mjesta unutar plazmida pFus_A. Pomoću ciljane mutagenezu uklonjena su postojeća restrikcijska mjesta *NgoMIV* i *XhoI* te je uvedeno novo restrikcijsko mjesto *NgoMIV* nizvodno od višestrukog mjesta za kloniranje.

	Naziv	Sekvenca (5' - 3')
1.	pFUS-noXhoI-A	GGTCATGGGTGGCTCTAGGGTTATTTGCCGA
2.	pFUS-noXhoI-S	TCGGCAAATAACCCTAGAGCCACCCATGACC
3.	pFUS-newNgoMIV-A	GTCGAGGCATTTCTGTGCCGGCTGGTCTAGACGTC
4.	pFUS-newNgoMIV-S	GACGTCTAGACCAGCCGGCACAGAAATGCCTCGAC
5.	pFUS-noNgoMIV-A	CTGATACTGGGCTGGCAGGCGCTCC
6.	pFUS-noNgoMIV-S	GGAGCGCCTGCCAGCCCAGTATCAG

3.2.1.2 Transformacija kemijski kompetentnih bakterija i priprema prekonoćnih kultura

Svaki produkt ciljane mutageneze transformiran je u kemijski kompetentne bakterije *E. coli* soja XL-10 Gold metodom temperaturnog šoka. U svrhu transformacije korišteno je 4 µL reakcijske smjese. Temperaturni šok potreban za ulazak plazmida u bakterijske stanice trajao je 30 s na 42 °C. Oporavak bakterija u tekućem LB mediju nakon temperaturnog šoka trajao je 60 min na 37 °C u termostatskoj tresilici *Controlled Environment Incubator Shaker Series 25 (New Brunswick Scientific)* na 350 rpm, nakon čega je 50 µL bakterijske suspenzije nasađeno na LB ploče koje sadrže 50 µg/mL antibiotika spektinomocina. Ploče s nasađenim bakterijama su inkubirane na 37 °C 16 h kako bi narasle kolonije.

Idući dan je odabrano nekoliko bakterijskih kolonija za pripremu prekonoćnih kultura. Pripremljeno je 5 mL prekonoćnih kultura s antibiotikom spektinomocinom konačne koncentracije 50 µg/mL. Prekonoćne kulture su inkubirane oko 16 h na 37 °C i 350 rpm.

3.2.1.3 Izolacija rekombinantnih plazmida

Rekombinantni plazmidi su izolirani iz 5 mL prekonoćnih bakterijskih kultura komercijalno dostupnim setom reagensa *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)* prema uputama proizvođača. Nakon izolacije plazmida koncentracija DNA je izmjerena spektrofotometrijski pomoću uređaja *NanoVue (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)*.

3.2.1.4 Restriksijska analiza

Uspješnost uklanjanja restriksijskih mjesta enzima *XhoI* i *NgoMIV* te uvođenje restriksijskog mjesta *NgoMIV* na novu poziciju provjereno je dvjema restriksijskim analizama. Prvo je 500 ng plazmida porezano enzimima *NgoMIV* (10 U) i *SapI* (10 U) u puferu *CutSmart* prema protokolu proizvođača (3h na 37 °C), kako bi se potvrdilo uklanjanje restriksijskog mjesta *NgoMIV* s početne pozicije i uvođenje istog na novu poziciju. Zatim je 500 ng plazmida nakon ciljane mutageneze restriksijskog mjesta *XhoI* porezano enzimima *SapI* (10 U) i *XhoI* (10 U) u puferu *CutSmart* prema protokolu proizvođača kako bi se provjerila uspješnost uklanjanja tog mjesta. U svrhu zaustavljanja digestije u reakcijske smjese je dodana boja za nanošenje na agarozni gel koja sadrži deterdžent SDS, *Gel Loading Dye, Purple* (6×; *New England BioLabs*). Rezultati digestije su potom analizirani elektroforezom DNA u agaroznom gelu.

3.2.1.5 Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

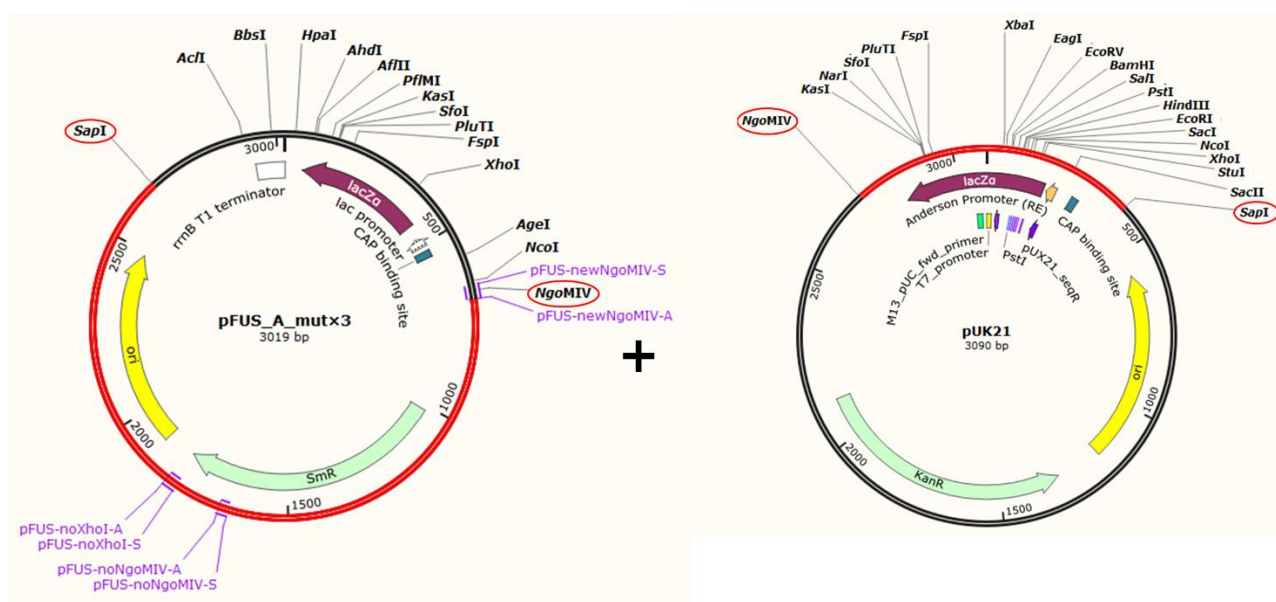
Produkti restriksijske analize (za provjeru uspješnosti tri ciljane mutageneze plazmida pFUS_A) analizirani su horizontalnom elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu, obojanog s 5 µL etidij bromida po 100 ml agaroznog gela. Nakon što je gel polimerizirao nanoseni su uzorci, kao i 5 µL molekularnog biljega/DNA standarda prema kojemu je određena veličina odsječaka DNA. Elektroforeza se odvijala pri stalnom naponu 120 V / 35 min u komercijalnom sustavu za elektroforezu (Biorad). Dobiveni fragmenti na gelu su vizualizirani na uređaju Uvitec (Uvitec Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo).

3.2.1.6 Ligacija vektora i inserta

Finalni konstrukt pUS21gg sadrži komponente dva plazmida (pFUS_A_mutx3 i pUK21). Iz plazmida pFUS_A_mutx3 uzeta je okosnica sačinjena od ishodišta replikacije (engl. *origin of replication*, ori) i gena za rezistenciju na antibiotik spektinomycin (aminoglikozid adenilil transferaza), dok je iz plazmida pUK21 uzeto višestruko mjesto za kloniranje (Slika 8). Oba plazmida (2 µg) su podvrgnuta prekonočnoj dvostrukoj digestiji s enzimima *NgoMIV* (10 U) i *SapI* (10 U) u puferu *CutSmart* prema protokolu proizvođača. Željeni fragmenti (fragment veličine 1995 bp za vektor iz plazmida pFUS_A_mutx3 i 770 bp za insert iz plazmida pUK21) izrezani su iz 1%-tnog agaroznog gela u koji je dodana boja SYBR Safe kako bi se mogli vizualizirati na transiluminatoru s plavom LED svjetlošću. Izrezani fragmenti potom su pročišćeni pomoću komercijalno dostupnog seta reagensa *QIAQuick Gel*

Extraction Kit prema uputama proizvođača. Sljedeći korak je bila defosforilacija vektora (izrezani dio plazmida pFus_A_mutx3) pomoću enzima *Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase*. Defosforilirano je 200 ng plazmidne DNA pomoću 1 U enzima u trajanju od 15 min na 37 °C, nakon čega je slijedila inaktivacija enzima 5 min na 75 °C. Defosforilirani vektor i insert (izrezani dio plazmida pUK21) su potom povezani pomoću enzima *Quick Ligase* prema uputama proizvođača. U tu svrhu korišteno je 50 ng porezane i defosforilirane plazmidne DNA, dok je količina inserta uzeta u molarnom omjeru inserta i vektora 5:1. Ligacija vektora i inserta trajala je ukupno 10 min na sobnoj temperaturi.

Za transformaciju bakterija XL-10 Gold korišteno je 4 µL ligacijske smjese te je idući dan inokulirana prekončna kultura iz nekoliko naraslih bakterijskih kolonija. Uspješnost konstrukcije je provjerena restriksijskom analizom na izoliranim plazmidnim DNA pomoću enzima *SapI* (10 U) i *XbaI* (10 U) u puferu *Cut Smart* u ukupnom trajanju od 3 sata na 37 °C. Produkti restrikcije razdvojeni su agaroznom gel elektroforezom prema već navedenim uvjetima te je na temelju veličina dobivenih fragmenata u gelu potvrđena ispravnost klonova. Dobiven plazmid je nazvan pUS21gg.



Slika 8. Ligacija vektora (pFus_A_mutx3) i inserta (pUK21). Plazmidi su pocijepani enzimima *NgoMIV* i *SapI*. Iz plazmida pFUS_A_mutx3 uzeta je okosnica koja sadrži ishodište replikacije (engl. *origin of replication*, ori) i gen za rezistenciju na antibiotik spektinomycin (aminoglikozid adenilil transferaza, SmR), dok je iz plazmida pUK21 uzeto višestruko mjesto za kloniranje (dijelovi plazmida označeni crvenom bojom). Ljubičastim slovima su prikazane početnice korištene za ciljanu mutagenezu plazmida pFUS_A (Tablica 2).

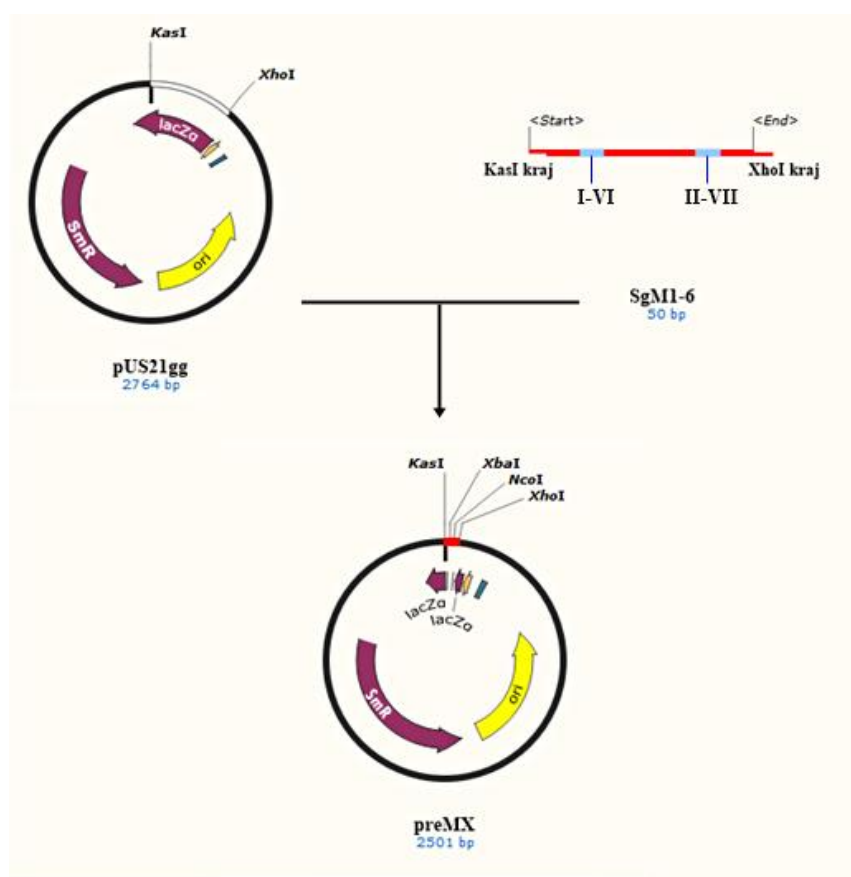
3.2.2 Konstrukcija plazmida pSgMX-A i pSgMX-G (X=1-6)

Cilj ovog koraka bio je omogućiti jednostavnu konstrukciju plazmida za kloniranje pojedinačnih sgRNA. Kao ishodišni plazmid korišten je plazmid pUS21gg, a kako se radi o šest različitih sgRNA za protein SpCas9 (protein Cas9 iz vrste *Streptococcus pyogenes*) i šest različitih sgRNA za protein SaCas9 (protein Cas9 iz vrste *Staphylococcus aureus*) bilo je potrebno konstruirati ukupno dvanaest različitih plazmida koji su nazvani pSgMX-G i pSgMX-A (X=1-6) u koje je kasnije klonirano šest različitih sgRNA (Poglavlje 3.2.5.1). Plazmidi s oznakom pSgMX-G označavaju plazmide s okosnicom molekule sgRNA proteina SpCas9, dok plazmidi s oznakom pSgMX-A sadrže okosnicu molekule sgRNA proteina SaCas9. Zajednička karakteristika ove dvije vrste plazmida jest to što sadrže U6 promotor s kojeg RNA polimeraza III u eukariotskim stanicama započinje transkripciju sgRNA te U6 terminator koji se nalazi na kraju okosnice sgRNA pomoću kojeg se zaustavlja transkripcija. Glavna razlika između svakog od šest različitih plazmida pSgMX (X=1-6) su drugačiji ljepljivi krajevi koji nastaju nakon cijepanja restriksijskim enzimom *Esp3I* pomoću kojeg se oslobađa modul koji sadrži U6 promotor, okosnicu molekule sgRNA (okruženu s restriksijskim mjestima enzima *BpiI*) i U6 terminator. Takvi ljepljivi krajevi u konačnici omogućavaju povezivanje najviše šest različitih sgRNA u jedan konstrukt.

Konstrukcija se sastoji iz tri koraka:

1. U prvom koraku (Slika 9) bilo je potrebno uvesti šest različitih parova oligonukleotida (sgM1-6; različiti za svaku od šest sgRNA; Tablica 3) u ishodišni vektor pUS21gg. Svaki od šest parova oligonukleotida nakon digestije s enzimom *Esp3I* ostavlja različite ljepljive krajeve (I-II; II-III; III-IV; IV-V; V-VI; VI-VII) koji će kasnije omogućiti spajanje različitog broja modula sgRNA (najviše šest) u jedan konstrukt. Taj par oligonukleotida sadrži krajeve komplementarne krajevima plazmida pUS21gg nastalima nakon cijepanja s enzimima *KasI* i *XhoI* čime je omogućeno njihovo uvođenje u konstrukt pUS21gg. Komplementarni oligonukleotidi (100 μ M) spareni su i fosforilirani u jednom koraku koristeći 1 μ L svakog oligonukleotida, 5 U enzima *T4 Polynucleotide Kinase* te pufer 10 \times *T4 Ligation Buffer* (TaKaRa) u ukupnom volumenu od 10 μ L. Program korišten za sparivanje i fosforilaciju oligonukleotida započet je s 30 min fosforilacije 5' krajeva DNA oligonukleotida, zatim su reakcijske smjese zagrijane na 95 °C 5 min i postepeno ohlađene do 25 °C (5 °C po minuti) kako bi došlo do specifičnog sparivanja oligonukleotida. Plazmidni vektor pUS21gg (2 μ g) je porezan enzimima *XhoI* (10 U) i *KasI* (5 U) u puferu *CutSmart* prema protokolu proizvođača pri temperaturi od 37 °C u

trajanju od 2h. Nakon gel elektroforeze pocijepanog plazmidnog vektora i bojanja gela bojom *SYBR Safe* fragmenti su vizualizirani na transiluminatoru s plavom LED svjetlošću. Iz gela je izrezan željeni fragment od 2,4 kbp te je pročišćen pomoću komercijalnog seta reagensa *QIAQuick Gel Extraction Kit*. Ligacija inserta (spareni i fosforilirani parovi oligonukleotida) i pocijepanog plazmidnog vektora pUS21gg napravljena je pomoću T4 DNA ligaze u molarnom omjeru 5:1 na 22 °C u trajanju od 40 min. Bakterije su transformirane s 3 µl ligacijske smjese te su nasadene na LB ploče koje sadrže 50 µg/mL antibiotika spektinomocina. Dobiveni plazmidi nazvani su preMX (X = 1-6).



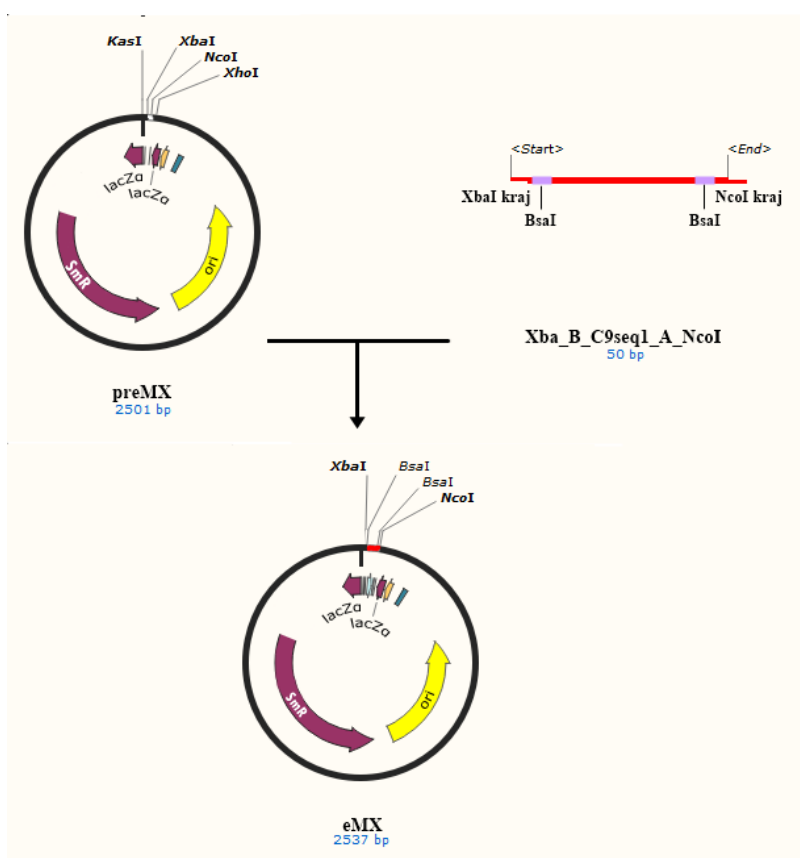
Slika 9. Shematski prikaz prvog koraka u konstrukciji plazmida pSgMX-G i pSgMX-A. Spareni i fosforilirani par oligonukleotida pSgM1-6 je uveden u plazmidni vektor pUS21gg pocijepan enzimima *KasI* i *XhoI*. Plavi dijelovi unutar SgM1-6 označavaju mjesta koja se razlikuju u svih šest različitih parova oligonukleotida i predstavljaju različite ljepljive krajeve koji nastaju nakon cijepanja enzimom *Esp3I* (I-II; II-III; III-IV; IV-V; V-VI; VI-VII). Produkt prvog koraka konstrukcije je plazmid preMX. **SmR** – rezistencija na spektinomocin, **ori** – ishodište replikacije (engl. *origin of replication*)

Tablica 3. Oligonukleotidi korišteni prilikom sklapanja konstrukata pSgMX-G i pSgMX-A (X=1-6).

	Naziv	Sekvenca (5' - 3')
1.	sgM1-S	GCGCCCGTCTCATGACTTCTAGATGACACATCCATGGAGGTATGAGACGC
2.	sgM1-A	TCGAGCGTCTCATACTCCATGGATGTGTCATCTAGAAGTCATGAGACGG
3.	sgM2-S	GCGCCCGTCTCAGGTATTCTAGATGACACATCCATGGACCATTGAGACGC
4.	sgM2-A	TCGAGCGTCTCAATGGTCCATGGATGTGTCATCTAGAATACCTGAGACGG
5.	sgM3-S	GCGCCCGTCTCACCATTTCTAGATGACACATCCATGGAGGAGTGAGACGC
6.	sgM3-A	TCGAGCGTCTCACTCCTCCATGGATGTGTCATCTAGAAA7GGTGAGACGG
7.	sgM4-S	GCGCCCGTCTCAGGAGTTCTAGATGACACATCCATGGATTCGTGAGACGC
8.	sgM4-A	TCGAGCGTCTCACGAATCCATGGATGTGTCATCTAGAACTCCTGAGACGG
9.	sgM5-S	GCGCCCGTCTCATTTCGTTCTAGATGACACATCCATGGACGCTTGAGACGC
10.	sgM5-A	TCGAGCGTCTCAAGCGTCCATGGATGTGTCATCTAGAACGAATGAGACGG
11.	sgM6-S	GCGCCCGTCTCACGCTTTCTAGATGACACATCCATGGAAGGTTGAGACGC
12.	sgM6-A	TCGAGCGTCTCAACCTTCCATGGATGTGTCATCTAGAAAAGCGTGAGACGG
	<u>Primjena:</u> Oligonukleotidi za sklapanje konstrukata preMX (X = 1-6) – prvi korak u konstrukciji plazmida pSgMX-G i pSgMX-A	
13.	pFUS-noXhoI-S	TCGGCAAATAACCCTAGAGCCACCCATGACC
	<u>Primjena:</u> Početnica za <i>colony</i> PCR provjeru konstrukata preMX zajedno u kombinaciji sa <i>sense</i> lancem oligonukleotida SgMX-S (sgM1-S/sgM2-S/sgM3-S/sgM4-S/sgM5-S/sgM6-S)	
14.	Xba_B_C9seq1_A_NcoI-S	CTAGATGACTGAGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGGTCTCTGGTACGC
15.	Xba_B_C9seq1_A_NcoI-A	CATGGCGTACCAGAGACCGTCGCTGTTGTCTGGGGTTCAGGTCTCAGTCAT
	<u>Primjena:</u> Oligonukleotidi za sklapanje konstrukata eMX (X=1-6) – drugi korak u konstrukciji plazmida pSgMX-G i pSgMX-A	
16.	pFus-noNgoMIV-S	GGAGCGCCTGCCAGCCCAGTATCAG
17.	C9seq1	TGAACCCCGACAACAGCGAC
	<u>Primjena:</u> Početnice za <i>Colony</i> PCR provjeru konstrukata eMX	
18.	Ruby_G414A_A	CCAATGGTCCCGTGATGCAGAAAAAGACCAAGGGT
19.	pFUS-noNgoMIV-A	CTGATACTGGGCTGGCAGGCGCTCC
	<u>Primjena:</u> Početnice za <i>Colony</i> PCR provjeru konstrukata pSgMX-G i pSgMX-A	
20.	Ruby_seqF	CCGACATCCCTGATTTCTTTAAACAG
21.	Ruby_seqR	CGAGCTCGCCATCCTCAA
	<u>Primjena:</u> Početnice za sekvenciranje konstrukata pSgMX-G, pSgMX-A i pSg-xN (N=1-6)	

2. U drugom koraku konstrukcije (Slika 10) je u svaki od šest različitih plazmida preMX uveden par oligonukleotida koji sadrži dva restrikcijska mjesta za enzim *BsaI* koja su važna za uvođenje modula sgRNA u sljedećem koraku konstrukcije. Modul sgRNA sadrži U6 promotor, praznu okosnicu sgRNA s dva restrikcijska mjesta *BpiI* za uvođenje pojedinačnih sgRNA i U6 terminator. Sekvence oligonukleotida *Xba_B_C9seq1_A_NcoI-S* i *Xba_B_C9seq1_A_NcoI-A* nalaze se u Tablici 3. Oligonukleotidi su sparni i fosforilirani na način opisan u prvom koraku, a ljepljivi krajevi koji nastaju nakon sparivanja para oligonukleotida komplementarni su krajevima plazmida preMX nastalima nakon digestije s

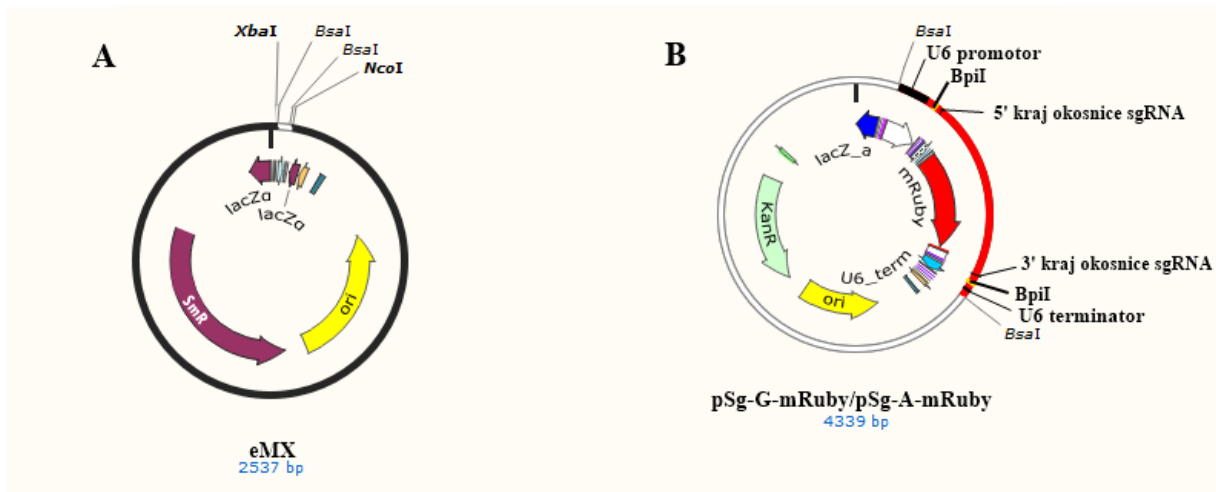
enzimima *XbaI* i *NcoI*. Reakcijska smjesa je sadržavala 1 μg plazmidne DNA (preM1-6) te 5 U svakog enzima. Porezani plazmidi preMX su nakon digestije pročišćeni uz pomoć komercijalnog seta reagensa *QIAQuick PCR Purification Kit* prema uputama proizvođača. Ligacija sparenog para oligonukleotida i porezanih te pročišćenih plazmida preMX je napravljena u molarnom omjeru inserta i vektora 5:1 pomoću enzima *Quick Ligase* u trajanju od 10 min na sobnoj temperaturi. Bakterije su transformirane s 4 μL ligacijske smjese te su izolirani produkti ligacije (plazmidi) nazvani eMX (X=1-6).



Slika 10. Drugi korak u konstrukciji plazmida pSgMX-G i pSgMX-A. U plazmidni vektor preMX konstruiran u prvom koraku konstrukcije uveden je par oligonukleotida *Xba_B_C9seq1_A_NcoI* (označen crvenom bojom) s ljepljivim krajevima koji odgovaraju krajevima vektora preMX pocijepanog enzimima *XbaI* i *NcoI*. Unutar para oligonukleotida ljubičastom bojom su označena restrikcijska mjesta enzima *BsaI* važna za uvođenje modula sgRNA u sljedećem koraku. Dobiveni plazmidi su nazvani eMX.

3. Posljednji korak konstrukcije uključuje uvođenje modula sgRNA unutar restrikcijskih mjesta *BsaI* plazmida eMX (Slika 11A). Modul sgRNA za protein SpCas9 uzet je iz plazmida pSg-G-mRuby (konstruiran u laboratoriju profesorice V. Zoldoš u sklopu metode koja se trenutno razvija; neobjavljeni podaci), dok je modul sgRNA za protein SaCas9 uzet iz plazmida pSg-A-mRuby (konstruiran u laboratoriju profesorice V. Zoldoš u sklopu metode koja se

trenutno razvija; neobjavljeni podaci). Svaki modul sgRNA sadrži U6 promotor, praznu okosnicu sgRNA (za molekulu sgRNA koju prepoznaje SpCas9 ili SaCas9) te U6 terminator (Slika 11B). Također, unutar okosnice sgRNA nalazi se reporterski gen za fluorescencijski protein mRuby okružen s dva restrikcijska mjesta *BpiI* što omogućava crveno-bijelu selekciju. Oba plazmida (pSg-G-mRuby i pSg-A-mRuby) (2 µg) su porezana enzimom *BsaI* (10 U) u ukupnom volumenu od 20 µL te njihovi porezani fragmenti (1304 bp iz plazmida pSg-G-mRuby te 1294 bp iz plazmida pSg-A-mRuby) služe kao insert. Također, porezano je i 1 µg svakog plazmida eMX (eM1, eM2, eM3, eM4, eM5 i eM6) enzimom *BsaI* (5 U) u trajanju od 3 h na 37 °C. Porezani fragmenti veličine 2495 bp svakog plazmida eMX korišteni su kao vektorska DNA u reakciji spajanja vektora i inserta. Postupci izrezivanja i pročišćavanja fragmenata iz gela jednaki su prethodno opisanom postupku izolacije željenog fragmenta iz gela (koraci 1 i 2). Pošto je modul sgRNA za protein SpCas9 i protein SaCas9 trebalo uvesti u svaki porezani vektor eMX ukupno je napravljeno 12 različitih spajanja inserta (fragment izoliran iz plazmida pSg-G-mRuby / pSg-A-mRuby) i vektora u molarnom omjeru 5:1 pomoću 2,5 U enzima T4 DNA ligaze u trajanju od 60 min na 22 °C. Bacterije su transformirane s 4 µL ligacijske smjese te je na LB ploče nasadeno 50 µL bakterijske suspenzije. Na LB ploče koje sadrže 50 µg/mL antibiotika spektinomocina prethodno je razmazano 40 µL IPTG-a (10 mM) kako bi se inducirala ekspresija reporterskog gena za fluorescencijski protein mRuby koji je pod kontrolom Lac promotora. Idući dan je pripremljeno nekoliko prekonocnih kultura iz crvenih kolonija. Crveni pigment kolonija upućuje na to da je u plazmid eMX uspješno uveden modul sgRNA s genom za fluorescencijski protein mRuby čiji se apsorpcijski spektar razlikuje od bakterijskog (što omogućava vidljivo crveno obojenje bakterija). Dobiveni plazmidi su nazvani pSgMX-G (X=1-6) i pSgMX-A (X=1-6).



Slika 11. Treći korak u konstrukciji plazmida pSgMX-G i pSgMX-A. U plazmidni vektor eMX (A) dobiven u drugom koraku konstrukcije uveden je insert (B), dio plazmida pSg-G-mRuby/pSg-A-mRuby koji sadrži modul sgRNA (U6 promotor, okosnica sgRNA s restrikcijskim mjestima *BpiI* unutar kojih je gen za protein mRuby, U6 terminator) okružen restrikcijskim mjestima *BsaI*. Ligacija plazmidnog vektora i inserta je omogućena cijepanjem oba plazmida enzimom *BsaI*.

3.2.2.1 PCR na bakterijskim kolonijama (*Colony PCR*)

Na kraju svakog korak konstrukcije analizirano je po 5-10 bakterijskih kolonija *Colony PCR*-om u svrhu pronalaska onih koje sadrže željeni plazmid.

Za provjeru prvog koraka konstrukcije plazmida preMX korišten je komercijalno dostupan set *Emerald Amp HS PCR Master Mix* te je PCR reakcija napravljena prema uputama proizvođača nakon čega je u svaku mikroeprevetu sterilnim nastavkom dodana pojedinačna bakterijska kolonija. Početnice korištene za PCR reakciju su pFUS-noXhoI-S (veže se unutar vektora) i *sense* lanac oligonukleotida (sgM1-S/sgM2-S/sgM3-S/sgM4-S/sgM5-S/sgM6-S) koji predstavlja insert. PCR program je bio sljedeći: 10 min na 95 °C; 40 ciklusa od 98 °C 10 s, 60 °C 30 s i 72 °C 1 min i 25 s; te završni korak elongacije 72 °C 7 min.

Provjera drugog koraka konstrukcije plazmida eMX je napravljena pomoću seta reagensa *PyroMark PCR Kit* prema uputama proizvođača. Početnice korištene za PCR reakciju su C9seq1 i pFUS_noNgoMIV-S. PCR program je bio sljedeći: 15 min na 95 °C; 40 ciklusa od 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min i 30 s; te završni korak elongacije 72 °C 10 min.

Provjera trećeg koraka konstrukcije plazmida pSgMX-G i pSgMX-A rađena je pomoću seta reagensa *Emerald Amp HS PCR Master Mix*-a. PCR reakcija napravljena je prema uputama proizvođača, a početnice korištene u reakciji su Ruby_G414A_S i pFUS_noNgoMIV-A. PCR protokol je bio sljedeći: 10 min na 95 °C; 30 ciklusa od 98 °C 10 s, 61 °C 30 s, 72 °C 2 min i 10 s; te završni

korak elongacije 72 °C 10 min. Sekvence svih početnica korištenih za *Colony* PCR prikazane su u tablici 3.

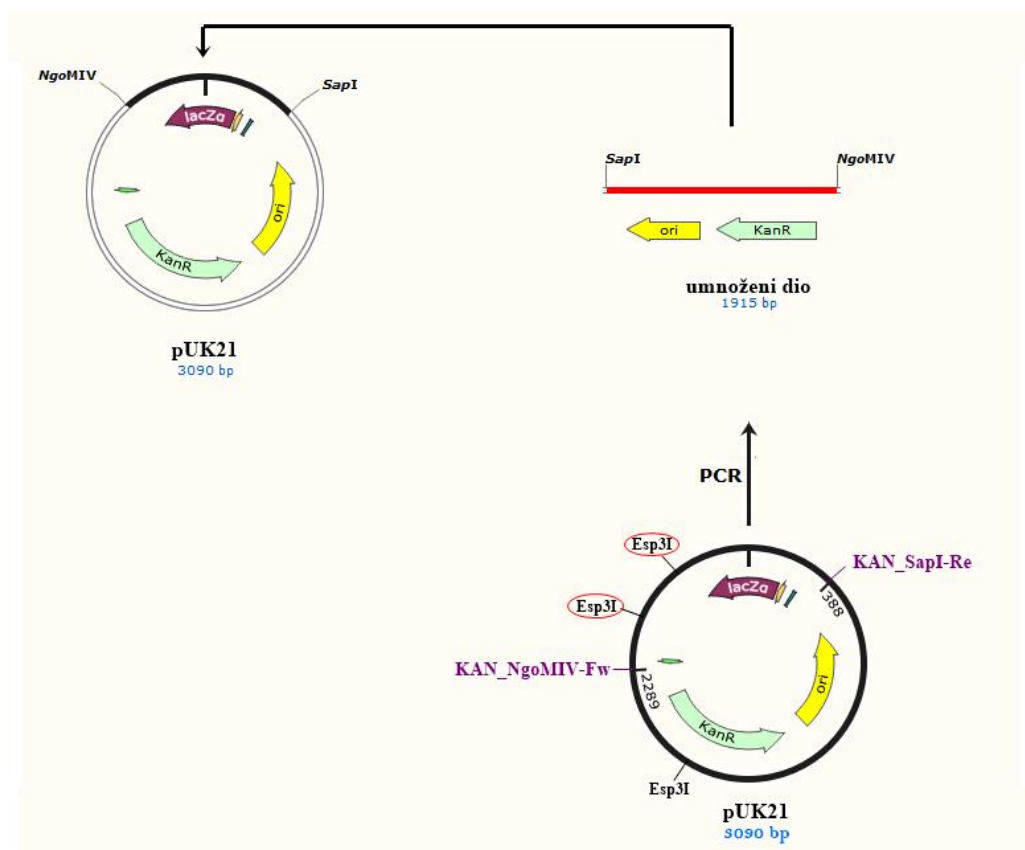
3.2.2.2 Sekvenciranje rekombinantnih plazmida Sangerovom metodom

Finalni konstrukti pSgMX-G i pSgMX-A su uz *Colony* PCR dodatno provjereni i sekvenciranjem Sangerovom metodom. Korištena je usluga *Macrogen* servisa (Nizozemska) te je svaki konstrukt sekvenciran početnicama Ruby_seqF i Ruby_seqR (Tablica 3). Rezultati sekvenciranja obrađeni su u program *Snapgene* (GLS Biotech, Chicago, USA) kako bi se provjerila ispravnost rekombinantnih plazmida.

3.2.3 Konstrukcija plazmida s rezistencijom na kanamicin (pUK21gg)

Plazmidni vektor s rezistencijom na kanamicin (pUK21gg) korišten je kao ishodišni plazmid za konstrukciju plazmida pSg-xN koji služi kloniranju više molekula sgRNA istovremeno. Plazmid pUK21gg je bilo potrebno konstruirati iz komercijalno dostupnog plazmida pUK21 (Addgene #49788). Kako plazmid pUK21 sadrži tri restrikcijska mjesta za enzim *Esp3I* koji interferiraju s kasnijim procesom *Golden Gate* kloniranja bilo ih je potrebno ukloniti. Dva restrikcijska mjesta za enzim *Esp3I* nalaze se u dijelu plazmida pUK21 između višestrukog mjesta za kloniranje i rezistencije na antibiotik kanamicin, dok se zadnje restrikcijsko mjesto za enzim *Esp3I* nalazi unutar gena za rezistenciju na antibiotik kanamicin (Slika 12). Umjesto tri zasebne reakcije ciljane mutageneze napravljeno je PCR umnažanje dijela plazmida koje sadrži ishodište replikacije i rezistenciju na antibiotik kanamicin kako bi se izbacila dva restrikcijska mjesta *Esp3I* iz dijela plazmida pUK21 između višestrukog mjesta za kloniranje i rezistencije na antibiotik kanamicin. Početnice korištene u PCR reakciji sadrže restrikcijska mjesta za enzime *NgoMIV* odnosno *SapI* na svojim 5' krajevima. Nakon digestije PCR produkta enzimima *NgoMIV* i *SapI* nastaje linearna molekula koja na jednom kraju ima ljepljivi kraj za enzim *NgoMIV*, a na drugom ljepljivi kraj za enzim *SapI*. Budući da je ovim umnažanjem izostavljeno višestruko mjesto za kloniranje plazmida pUK21, isto je ponovno spojeno s porezanim PCR produktom, nakon njegove izolacije iz početnog plazmida pUK21 pomoću restrikcijskih enzima *NgoMIV* i *SapI* (Slika 12). Nakon što su PCR umnažanjem i spajanjem višestrukog mjesta za kloniranje uklonjena dva restrikcijska mjesta za enzim *Esp3I*, dobiven je konstrukt koji je nazvan pUK21gg-Esp3I (Poglavlje 3.2.3.1). Treće i zadnje preostalo restrikcijsko

mjesto enzima *Esp3I* uklonjeno je iz plazmida pUK21gg-*Esp3I* ciljanom mutagenezom te je finalni konstrukt nazvan pUK21gg (Poglavlje 3.2.3.2).



Slika 12. Konstrukcija plazmida pUK21gg-*Esp3I*. Plazmid pUK21 sadri tri restrikcijska mjesta *Esp3I* koja je bilo potrebno izbaciti. Dva restrikcijska mjesta *Esp3I* zaokružena crveno koja se nalaze u između višestrukog mjesta za kloniranje (unutar kojeg je lacZα) i rezistencije na antibiotik kanamicin uklonjena su umnažanjem dijela plazmida početnicama prikazanim u ljubičastoj boji (KAN_NgoMIV-Fw i KAN_SapI-Re) te je nastala linearna molekula (prikazana kao crvena linija) s ljepljivim krajevima koji odgovaraju krajevima plazmida pUK21 nakon cijepanja enzimima *NgoMIV* i *SapI*. Kako PCR umnažanjem izostavljeno i višestruko mjesto za kloniranje, ono je izrezano iz plazmida pUK21 enzimima *NgoMIV* i *SapI* (dio plazmida pUK21 gore lijevo označen crnom bojom) te je spojeno s umnoženim dijelom plazmida pUK21.

3.2.3.1 Konstrukcija plazmida pUK21gg-*Esp3I*

Za PCR reakciju umnažanja dijela plazmida pUK21 korišten je komercijalno dostupan set *Herculase II Fusion DNA Polymerase*. PCR reakcija napravljena je prema protokolu proizvođača te je korišteno je 25 ng plazmida pUK21 (kalup) uz početnice KAN_NgoMIV_Re i KAN_SapI_Fw (Tablica 4). Uvjeti PCR reakcije su bili sljedeći: 3 min na 98 °C; 35 ciklusa od 20 s na 98 °C, 20 s na 60 °C i 70 s na 72 °C; 3 min završne elongacije na 72 °C. PCR-produkti su pročišćeni iz reakcijske smjese pomoću komercijalno dostupnog seta reagensa *QIAquick PCR Purification Kit*.

Potom je 1 µg pročišćenog PCR produkta i 500 ng plazmida pUK21 podvrgnuto dvostrukoj digestiji restrikcijskim enzimima *NgoMIV* (5 U) i *SapI* (5 U) u puferu *CutSmart* prema uputama proizvođača pri temperaturi od 37 °C u trajanju od 2 h. Nakon digestije, porezani PCR produkt je pročišćen pomoću komercijalnog seta reagensa *QIAquick PCR Purification Kit*, kako bi se uklonili kraći porezani fragmenti te restrikcijski enzimi. Porezani plazmid pUK21 je razdvojen elektroforezom u gelu agaroze te je gel obojan bojom *SYBR Safe* za vizualizaciju na transiluminatoru s plavom LED svjetlošću, nakon čega je iz gela izoliran fragment (insert; višestruko mjesto za kloniranje) od 770 bp pomoću seta reagensa *QIA Quick Gel Extraction Kit*.

Spajanje porezanog i pročišćenog PCR produkta i inserta izoliranog iz plazmida pUK21 je napravljeno pomoću komercijalnog seta reagensa *Quick Ligation Kit* prema uputama proizvođača, uz molarni omjer inserta i vektora 5:1. Bakterije XL-10 Gold su transformirane s 5 µL ligacijske smjese, a izoliran DNA plazmid nazvan je pUK21gg-Esp3I.

Tablica 4. Početnice korištene prilikom konstrukcije plazmida pUK21gg (PCR umnažanje i mutageneza Esp3I mjesta.

	Naziv	Sekvenca (5' - 3')
1.	KAN_NgoMIV-Re	ATATTGCCGGCTTCGAAAGGGCCTCGTGATACGC
2.	KAN_SapI-Fw	CGTATTGGGCGCTCTTCCG
3.	KanR_noEsp3I-A	GATCGCGTATTTCCGGCTCGCTCAGGCGCA
4.	KanR_noEsp3I-S	TGCGCCTGAGCGAGCCGAAATACGCGATC

3.2.3.2 Ciljana mutageneza pUK21gg-Esp3I

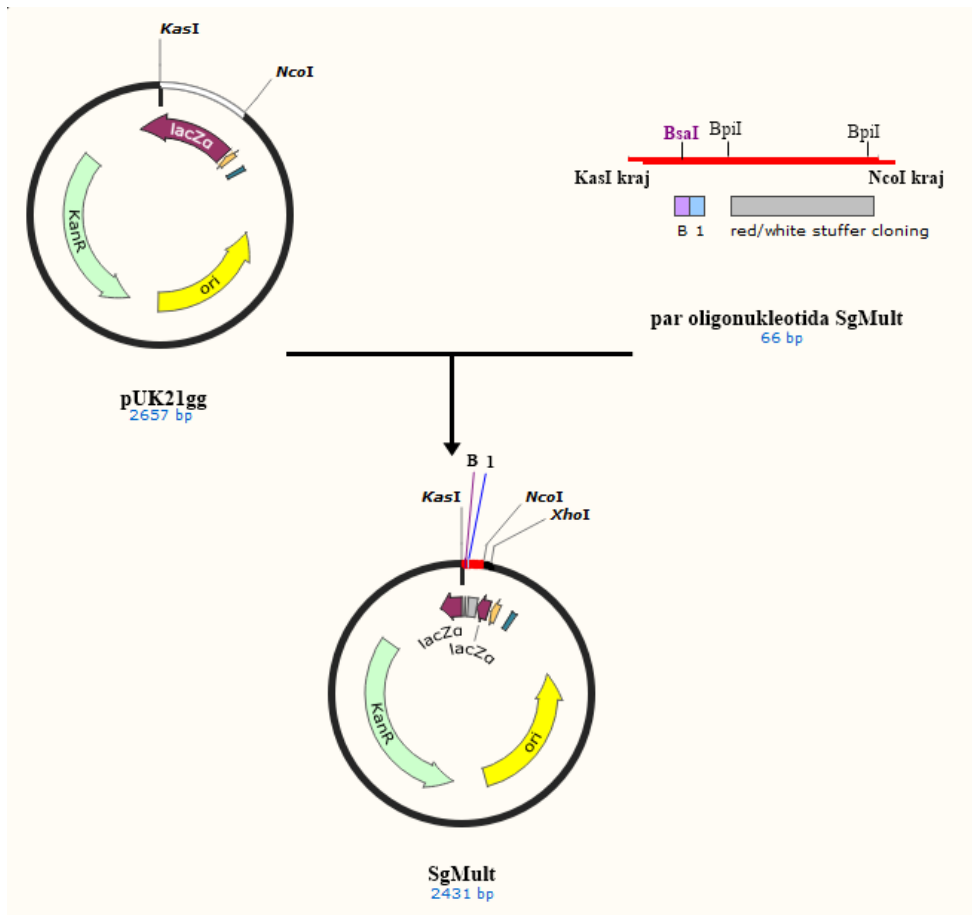
Reakcijom ciljane mutageneze uklonjeno je i posljednje restrikcijsko mjesto Esp3I koje se nalazi unutar gena za rezistenciju na antibiotik kanamicin. Korišten je komercijalno dostupan set reagensa *QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* te je reakcija ciljane mutageneze napravljena na već prije opisan način (Poglavlje 3.2.1.1) uz korištenje 50 ng plazmida pUK21gg-Esp3I i početnica Kan_noEsp3I-A i Kan_noEsp3I-S, čije su sekvence prikazane u Tablici 4. PCR program je bio sljedeći: 2 min na 95 °C; 18 ciklusa od 95 °C 20 s, 60 °C 10 s i 68 °C 1 min i 30 s; te završni korak elongacije 68 °C 5 min. Finalni konstrukt (pUK21gg; 500 ng) dobiven nakon ciljane mutageneze provjeren je restrikcijskom analizom u puferu 3.1 s enzimima *EcoRI* (5 U) i *Esp3I* (5 U) te su produkti restrikcije analizirani elektroforezom DNA u agaroznom gelu.

3.2.4 Konstrukcija plazmida pSg-xN (N= 1-6)

U poglavlju 3.2.2 opisan je postupak konstrukcije plazmida koji će omogućiti kloniranje molekula sgRNA pojedinačno, a u ovom koraku cilj je bio konstruirati plazmide pSg \times N (N=1-6) u kojima će se moći složiti jedan ili više modula sgRNA (najmanje jedna, a najviše šest). Pošto je riječ o šest različitih kombinacija modula sgRNA (za kloniranje molekula sgRNA) bilo je potrebno konstruirati šest različitih plazmida pSg-xN, koji se razlikuju po mogućnosti primanja različitog broja modula sgRNA. Zajednička karakteristika svih šest plazmida je ljepljivi kraj „1“ koji nastaje nakon digestije enzimom *Esp3I*, dok se drugi ljepljivi kraj "E" razlikuje (E = „2/3/4/5/6/7“) te određuje kapacitet primanja više od jednog modula sgRNA. Tako će se npr. jedan modul sgRNA ugraditi u plazmid koji stvara ljepljive krajeve „1“ i „2“ nakon digestije enzimom *Esp3I*, dok će se šest modula sgRNA ugraditi u plazmid koji nakon digestije enzimom *Esp3I* ostavlja ljepljive krajeve „1“ i „7“.

Plazmid pUK21gg je korišten kao ishodišni plazmid za konstrukciju modularnog sustava za slaganje većeg broja modula sgRNA, a konstrukcija se sastojala iz tri koraka (sve navedene metode su detaljnije opisane u poglavlju 3.2.2):

1. U prvom koraku (Slika 13) je bilo potrebno u ishodišni vektor pUK21gg uvesti jedan par oligonukleotida (SgMult; Tablica 5) koji daje ljepljivi kraj „1“ nakon cijepanja restriksijskim enzimom *Esp3I*, što je važno za kasnije slaganje modula sgRNA. Također, sadrži i dva restriksijska mjesta za enzim *BpiI* potrebna za uvođenje okosnice sgRNA s genom za fluorescencijski protein mRuby u posljednjem koraku konstrukcije. Inert (par oligonukleotida) sadrži krajeve kompatibilne krajevima plazmida pUK21gg nastalima nakon cijepanja s enzimima *KasI* i *NcoI*. Oligonukleotidi (100 μ M svaki) su sparni i fosforilirani na već opisan način. Ishodišni plazmid (1 μ g) je porezan s enzimima *KasI* (5 U) i *NcoI* (10 U), nakon čega je slijedila gel elektroforeza kako bi se izolirao željeni fragmenta veličine 2365 bp te njegovo pročišćavanje iz gela (*QIAQuick Gel Extraction Kit*). Ligacija inserta (sparni i fosforilirani par oligonukleotida) i porezanog plazmida pUK21gg je napravljena u molarnom omjeru 5:1 pomoću komercijalnog seta reagensa *Quick Ligation Kit* prema uputama proizvođača. Bacterije XL10-Gold su transformirane s 3 μ L reakcijske smjese te su nasadene na LB-ploče koje sadrže 50 μ g/mL antibiotika kanamicina. Dobiveni plazmid je nazvan SgMult te je njegova ispravnost provjerena restriksijskom analizom. 500 ng plazmida SgMult porezano je s enzimom *BpiI* (10 U) u puferu 3.1 prema uputama proizvođača te analizirano na agaroznom gelu.



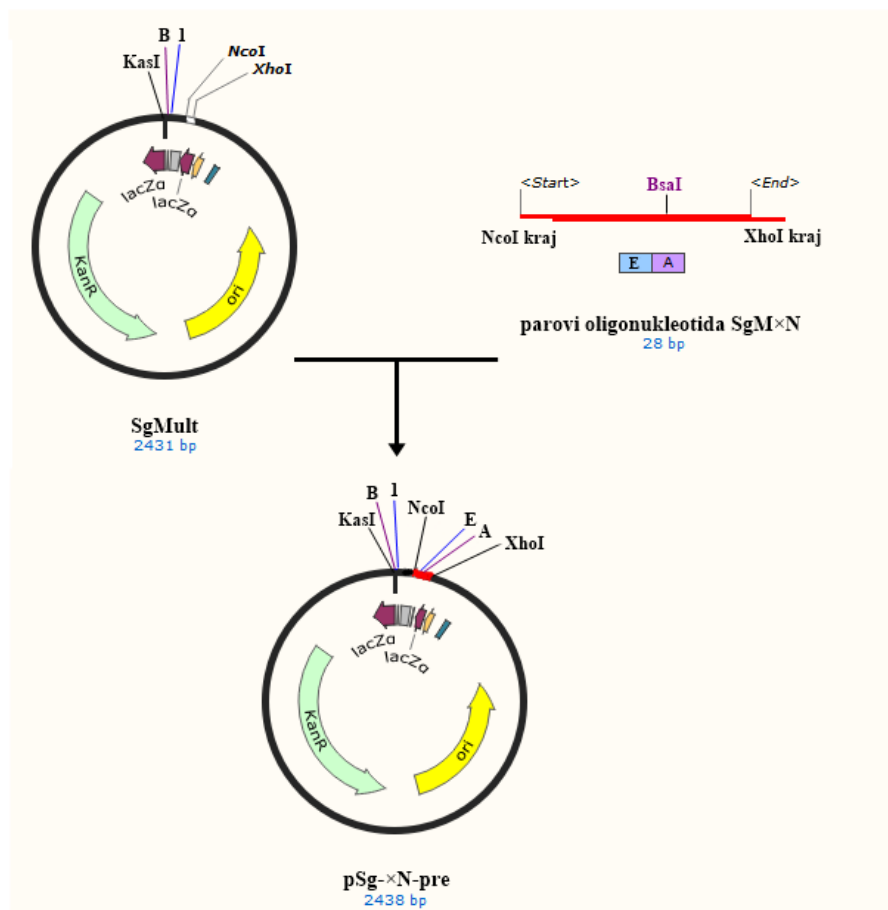
Slika 13. Prvi korak u konstrukciji plazmida pSg-xN. U plazmidni vektor pUK21gg uveden je par oligonukleotida SgMult označen crvenom bojom koji sadrži krajeve kompatibilne krajevima plazmida pUK21gg nakon cijepanja enzimima *KasI* i *NcoI*. Taj par oligonukleotida sadrži ljepljivi kraj "1" (plavi kvadrat) koji se dobije cijepanjem s enzimom *Esp3I* (važno za slaganje modula sgRNA), restrikcijsko mjesto enzima *BsaI* "B" (ljubičasti kvadrat) važno za sklapanje finalnog konstrukta *Golden Gate* sustava te restrikcijska mjesta za enzim *BpiI* potrebna za uvođenje okosnice sgRNA s genom za protein mRuby u sljedećem koraku. Produkt prvog koraka je plazmid SgMult.

Tablica 5. Oligonukleotidi korišteni prilikom slaganja konstrukata pSg-xN (N=1-6).

	Naziv	Sekvenca (5' - 3')
1.	SgMult-S	GCGCCGGTCTCATGACTGACTGAGACGTCTAGACACCAGGTCTTCTGA CACATGAAGACCTGTTTC
2.	SgMult-A	CATGGAAACAGGTCTTCATGTGTCAGAAGACCTGGTGTCTAGACGTCT CAGTCAGTCATGAGACCG
<u>Primjena:</u> Oligonukleotidi korišteni u prvom koraku konstrukcije plazmida SgMult		
3.	SgM×1-S	CATGGCGTCTCAGGTAGGTATGAGACCC
4.	SgM×1-A	TCGAGGGTCTCATACTACCTGAGACGC
5.	SgM×2-S	CATGGCGTCTCACCATTGGTATGAGACCC
6.	SgM×2-A	TCGAGGGTCTCATAACCAATGGTGAGACGC
7.	SgM×3-S	CATGGCGTCTCAGGAGGGTATGAGACCC
8.	SgM×3-A	TCGAGGGTCTCATAACCCTCCTGAGACGC
9.	SgM×4-S	CATGGCGTCTCATTTCGGGTATGAGACCC
10.	SgM×4-A	TCGAGGGTCTCATAACCGAATGAGACGC
11.	SgM×5-S	CATGGCGTCTCACGCTGGTATGAGACCC
12.	SgM×5-A	TCGAGGGTCTCATAACAGCGTGAGACGC
13.	SgM×6-S	CATGGCGTCTCAAGGTGGTATGAGACCC
14.	SgM×6-A	TCGAGGGTCTCATAACACCTTGAGACGC
<u>Primjena:</u> Oligonukleotidi korišteni u drugom koraku konstrukcije plazmida pSg-xN-pre (N=1-6)		
15.	KanR_noEsp3I-S	TGCGCCTGAGCGAGCCGAAATACGCGATC
<u>Primjena:</u> Početnica za <i>Colony</i> PCR provjeru konstrukata pSg-xN-pre (N=1-6) zajedno sa <i>antisense</i> lancem pojedinog oligonukleotida SgM×N-A (N=1-6)		

2. U plazmid SgMult potom je uvedeno šest različitih parova oligonukleotida (SgM×1/SgM×2/SgM×3/SgM×4/SgM×5/SgM×6; Tablica 5) kako bi se dobio krajnji konstrukt koji sadrži i drugi željeni ljepljivi kraj „E“ („2/3/4/5/6/7“) nakon rezanja enzimom *Esp3I* potreban za sklapanje više modula sgRNA. Još jedna karakteristika krajnjeg konstrukta su dva restrikcijska mjesta za enzim *BsaI* koja okružuju restrikcijska mjesta za enzim *Esp3I*. Jedno restrikcijsko mjesto za enzim *BsaI* uvedeno je pomoću prvog para oligonukleotida korištenog u prvom koraku konstrukcije (prethodno opisanom; slika 13), dok je drugo uvedeno u ovom koraku konstrukcije (Slika 14). Svrha restrikcijskih mjesta za enzim *BsaI* je za kasnije *Golden Gate* sklapanje modula svih funkcionalnih elemenata u jedan konstrukt (šest različitih modula sgRNA, promotor, protein Cas9, efektorska domena za DNA metiltransferazu 3A (DNMT3A),

gen za rezistenciju na antibiotik puromicin i terminator; Poglavlje 3.2.5). Svaki par oligonukleotida (insert) nakon specifičnog spajanja i fosforilacije sadrži krajeve kompatibilne plazmidu SgMult nakon cijepanja s enzimima *NcoI* i *XhoI*. Plazmid SgMult (1 µg) porezan je enzimima *NcoI* (10 U) i *XhoI* (20 U) u puferu *CutSmart* u trajanju od 3 h na 37 °C. Porezani plazmid je pročišćen pomoću komercijalnog seta reagensa *QIAquick PCR Purification Kit*, nakon čega je slijedilo spajanje vektora i šest različitih inserata u molarnom omjeru 5:1 pomoću 2,5 U enzima T4 DNA ligaze prema uputama proizvođača. Bakterije XL10-Gold su transformirane s 3 µL reakcijske smjese te su nasadene na LB-ploče koje sadrže 50 µg/mL antibiotika kanamicina. Ispravnost pojedinih bakterijskih kolonija dobivenih idući dan je provjerena metodom *Colony PCR* pomoću komercijalno dostupnog seta reagensa *Emerald Amp HS PCR Master Mix*. Kao početnice korišten je *antisense* lanac pojedinog para oligonukleotida (SgM×1-A/SgM×2-A/SgM×3-A/SgM×4-A/SgM×5-a/SgM×6-A) i KanR_noEsp3I-S (Tablica 5). Uvjeti PCR reakcije su bili sljedeći: 10 min na 95 °C; 30 ciklusa od 10 s na 98 °C, 30 s na 60 °C i 1 min na 72 °C; 5 min završne elongacije na 72 °C. Iz nekoliko bakterijskih kolonija pripremljene su prekonoćne kulture te su izolirani plazmidi pomoću komercijalno dostupnog seta reagensa *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)* prema uputama proizvođača. Plazmidi su nazvani pSg-xN-pre (N = 1-6).



Slika 14. Drugi korak u konstrukciji plazmida pSg-xN. U plazmidni vektor SgMult konstruiran u prethodnom koraku uveden je par oligonukleotida SgM \times N (N=1-6) označen crvenom bojom koji sadrži krajeve kompatibilne krajevima plazmida pUK21gg nakon cijepanja s enzimima *NcoI* i *XhoI*. Uvedeni par oligonukleotida sadrži i restriksijsko mjesto enzima *Esp3I* (plavi kvadrat, E=2/3/4/5/6/7) važno za slaganje više modula sgRNA u krajnji konstrukt te restriksijsko mjesto *BsaI* (ljubičasti kvadrat, "A") važno za slaganje svih modula funkcionalnih elemenata u konstrukt *Golden Gate* sustava. Dobiveni plazmidi su nazvani pSg-xN-pre (N=1-6).

- U posljednjem koraku konstrukcije (Slika 15) uvedena je okosnica molekule sgRNA s genom za fluorescencijski protein mRuby između dva restriksijska mjesta za enzim *BpiI* unutar svakog plazmida pSg-xN-pre, kako bi se omogućila crveno-bijela selekcija te odabir željenih bakterijskih kolonija. Nakon slaganja različitog broja modula sgRNA pomoću enzima *Esp3I* (koji okružuje *BpiI* mjesta) u finalne konstrukte pSg-xN reporterski gen za fluorescencijski protein se izrezuje te nastaje konstrukt koji sadrži više modula sgRNA, ali ne i gen za fluorescencijski protein mRuby, što rezultira bakterijskim kolonijama koje nisu obojane crveno. Treći korak konstrukcije uključivao je digestiju (1 μ g) plazmida pSg-xN-pre (produkti drugog koraka) koji su služili kao vektor i (2 μ g) plazmida pSg-G-mRuby (konstruiran u laboratoriju profesorice V. Zoldoš u sklopu metode koja se trenutno razvija; neobjavljeni podaci) iz kojeg je izoliran insert (gen za fluorescencijski protein mRuby) pomoću enzima *BpiI* (10 U) u puferu 2.1 prema uputama proizvođača. Željeni fragmenti svakog plazmida (insert – 967 bp iz

plazmida pSg-G-mRuby; vektor – 2410 bp iz plazmida pSg-xN-pre) su pročišćeni iz gela na prethodno opisan način te spojeni u molarnom omjeru inserta i vektora 5:1 pomoću 2,5 U enzima T4 DNA ligaze. Bakterije su transformirane s 4 μ L reakcijske smjese i nasađene na LB ploče koje sadrže 50 μ g/mL antibiotika kanamicina i 40 μ L IPTG-a (100 μ M). IPTG je potreban za indukciju fluorescencijskog proteina mRuby koji je pod Lac promotorom. Na temelju crveno - bijele selekcije odabrane su crvene bakterijske kolonije (crveno obojenje upućuje na to da je došlo do insercije gena za fluorescencijski protein mRuby u pSg-xN-pre). Plazmidi su izolirani pomoću komercijalno dostupnog seta reagensa *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)* prema uputama proizvođača. Dobiveni plazmidi su nazvani pSg-xN (N=1-6) te su poslani na sekvenciranje Sangerovom metodom pomoću početnica Ruby_seqF i Ruby_seqR (Tablica 3) kako bi se provjerila njihova ispravnost.

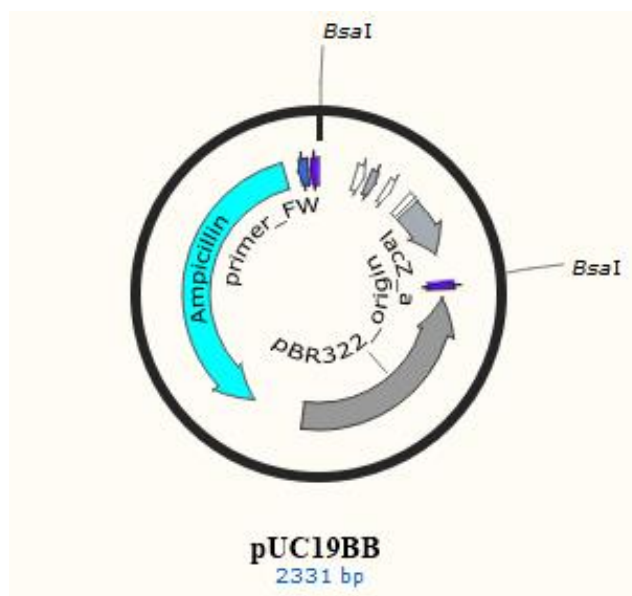


Slika 15. Treći korak u konstrukciji plazmida pSg-xN. U plazmid dobiven u prethodnom koraku, pSg-xN-pre (N=1-6) uvedena je okosnica sgRNA (unutar koje je gen za protein mRuby) iz plazmida pSg-G-mRuby (označeno crvenom bojom). Oba plazmida su pocijepana enzimom *BpiI*.

3.2.5 Slaganje više modula u jedan plazmid (*Golden Gate Assembly*)

Metoda kloniranja "*Golden Gate*" zasniva se na restrikcijskim enzimima tipa IIS (*BpiI*, *BsaI*, *Esp3I*, *SapI* i drugi) koji režu molekulu DNA izvan svog restrikcijskog mjesta, stvarajući tako ljepljive krajeve od nekoliko baza (različito za svaki *Golden Gate* enzim). Kako ti krajevi nisu dio restrikcijskog mjesta, moguće ih je različito dizajnirati za specifično spajanje više od dva fragmenata DNA dobivenih nakon digestije jednim *Golden Gate* enzimom.

Iako je konstruirano sveukupno šest plazmida pSg-xN (Poglavlje 3.2.4) u koje se može klonirati različit broj sgRNA (minimalno jedna, a maksimalno šest), odabran je plazmid pSg-x6 koji može primiti šest različitih sgRNA, kako bi se provjerilo hoće li biti uspješna konstrukcija plazmida s maksimalnim predviđenim brojem ugrađenih sgRNA. U tu svrhu napravljena je provjera slaganja konačnog konstrukta s plazmidom pUC19BB kao okosnicom (Slika 16), koji bi sadržavao šest modula sgRNA te ostale funkcionalne elemente potrebne za ciljanu metilaciju DNA, a koje su detaljno opisane u Tablici 6. Svi plazmidi iz kojih su izrezani funkcionalni moduli konstruirani su u sklopu istraživanja laboratorija profesorice V.Zoldoš (neobjavljeni podaci), a oko svakog modula su restrikcijska mjesta enzima *BsaI* što omogućava njihovo izrezivanje i specifično slaganje u krajnji konstrukt *Golden Gate* sustava. Također, provjera slaganja konačnog konstrukta rađena je samo za protein Cas9 (SpCas9) iz vrste *Streptococcus pyogenes*. U skladu s time za kloniranje pojedinačnih molekula sgRNA su korišteni konstrukti pSgMX-G (X=1-6) koji sadrže okosnicu molekule sgRNA proteina SpCas9.



Slika 16. Plazmid pUC19BB. Okosnica za slaganje svih modula funkcionalnih elemenata za ciljanu metilaciju DNA na više mjesta u genomu. Sadrži gen za rezistenciju na ampicilin i dva restrikcijska mjesta za *Golden Gate* enzim *BsaI*.

Tablica 6. Moduli koji su uz modul sgRNA potrebni za ciljanu metilaciju molekule DNA sustavom CRISPR-Cas9.

Modul	Opis	Plazmid iz kojeg je modul izrezan
Promotor Cbh	Hibridni oblik promotora beta aktina kokoši CBA (engl. <i>chicken β-actin</i>)	tNS-pPro-CBh
Protein dCas9	Katalitički inaktivna endonukleaza Cas9 bakterije <i>Streptococcus pyogenes</i>	tNS-pCas-N
Protein DNMT3A	Katalitička domena ljudske DNA metiltransferaze <i>de novo</i> 3A	tNS-pED- DNMT3A
Puromicin N-acetiltransferaza	Rezistencija na antibiotik puromicin	tNS-pMK-P
Terminator bGH	Zaustavljanje transkripcije	tNS-pTer-H

Završno slaganje svih modula funkcionalnih elemenata za ciljanu metilaciju molekule DNA za šest različitih pozicija u genomu, temeljenu na sustavu CRISPR-Cas9, isprobano je na dva načina:

1. Prvi način je uključivao slaganje šest različitih sgRNA pomoću *Golden gate* enzima *Esp3I* u okosnicu plazmida pSg-x6 (*Assembly* 1). Potom je taj konstrukt korišten u drugoj reakciji slaganja pomoću *Golden gate* enzima *BsaI* u okosnicu plazmida pUC19BB zajedno sa ostalim modulima funkcionalnih elemenata potrebnih za ciljanu metilaciju sustavom CRISPR-Cas9 (promotor Cbh, protein dCas9, protein DNMT3A, puromicin N-acetiltransferaza, terminator bGH) (*Assembly* 2 i 3).

2. Drugi način uključivao je slaganje modula svih funkcionalnih elemenata te praznog modula sgRNA (bez molekula sgRNA) iz plazmida pSg-x6 u okosnicu plazmida pUC19BB pomoću *Golden Gate* enzima *BsaI* (*Assembly* 4 i 5). Potom je u taj konstrukt uvedeno šest različitih molekula sgRNA iz plazmida pSgMX-G pomoću *Golden Gate* enzima *Esp3I* (*Assembly* 6 i 7).

3.2.5.1 Kloniranje molekula sgRNA u plazmide pSgMX-G (X= 1-6)

U oba slučaja završnog slaganja modula prvo je bilo potrebno uvesti pojedinačne sgRNA u plazmide pSgMX-G (X=1-6) koji mogu primiti svaki po jednu sgRNA. Odabrano je šest različitih sekvenci za sgRNA (konstruiranih u laboratoriju profesorice V.Zoldoš u sklopu metode koja se trenutno razvija, neobjavljeni podaci; Tablica 7) koje ciljaju različita mjesta unutar CpG otoka promotora gena *IL6ST* i *BACH2*. Sve sgRNA su naručene kao par oligonukleotida koji nakon sparivanja i fosforilacije stvara ljepljive krajeve kompatibilne plazmidima pSgMX-G porezanima enzimom *BpiI*. Nakon sparivanja i fosforilacije svakog para oligonukleotida napravljena je reakcija digestije i spajanja u jednom koraku objavljena u radu Cong i sur. (2013). Za ukupan volumenu reakcijske smjese od 20 μ L korišteno je 2 μ L 10 \times pufera G, 1 μ L 10 mM DTT-a, 1 μ L 10 mM ATP-a, 0,5 μ L T4 DNA ligaze, 0,5 μ L restriksijskog enzima *BpiI*, 1 μ L fosforiliranih i sparenih oligonukleotida razrijeđenih 35 \times te 100 ng svakog plazmida pSgMX-G (X = 1-6).

Reakcije su zatim tretirane enzimom Egzonukleaza V (*ExoV*) 30 min na 37 $^{\circ}$ C kako bi se porezale sve linearne molekule DNA i povećala uspješnost transformacije kemijski kompetentnih bakterija. Reakcija je uključivala 7,5 μ L produkta ligacijske reakcije, 1 μ L pufera 10 \times NE Buffer 4, 1 μ L 10 mM ATP i 0,5 μ L enzima *ExoV*. Kompetentne bakterije soja XL10-Gold su transformirane s 3 μ L reakcijske smjese te su nasađene na LB ploče koje sadrže 50 μ g/mL antibiotika spektinomicina i 40 μ L 100 μ M IPTG-a. Kako se sekvence molekula sgRNA ugrađuju u plazmid između dva restriksijska mjesta za enzim *BpiI* koja okružuju gen za fluorescencijski protein mRuby, doći će do njegovog izrezivanja te bakterijske kolonije neće biti crvenog obojenja ukoliko sadrže ugrađenu molekulu sgRNA u konstrukt. Na temelju toga je odabrano nekoliko bijelih bakterijskih kolonija te je napravljen *Colony PCR* pomoću komercijalno dostupanog seta *Emerald Amp HS PCR Master Mix*. PCR reakcija je napravljena prema uputama proizvođača. Korištene su početnice pFus_noNgoMIV_S (Tablica 2) i *sense* lanac svake molekule sgRNA (Tablica 7). U Tablici 7 su prikazane odabrane sgRNA za ciljanje lokusa unutar promotora gena *BACH2* i *IL6ST* te plazmida pSgMX-G u koje su klonirane pojedine sgRNA.

Tablica 7. Sekvence za sgRNA i pripadajući plazmidni vektori pSgMX-G za kloniranje pojedinačnih molekula sgRNA.

	Plazmidni vektor	sgRNA	Sekvenca za sgRNA
1.	pSgM1-G	BACH2_sgRNA8	<pre> 5' CACCGAATGTAGCGATTGAGAGTGT 3' ----- 3' CTTACATCGCTAACTCTCACACAAA 5' </pre>
2.	pSgM2-G	BACH2_sgRNA3	<pre> 5' CACCGGGAGAGCACACATTCGGCG 3' ----- 3' CCCTCTCGTGTGTAAGCCGCCAAA 5' </pre>
3.	pSgM3-G	IL6ST_sgRNA2	<pre> 5' CACCGATCTGACAGTGTTCGGGAGC 3' ----- 3' CTAGACTGTCACAAGGCCTCGCAAA 5' </pre>
4.	pSgM4-G	IL6ST_sgRNA3	<pre> 5' CACCGCGCACGAACCCCTTGCGGCC 3' ----- 3' CGCGTGCTTGGGGAACCGCGGCCAAA 5' </pre>
5.	pSgM5-G	BACH2_sgRNA7	<pre> 5' CACCGAGTTATTGTGAATGGGGAGC 3' ----- 3' CTCAATAACACTTACCCTCGCAAA 5' </pre>
6.	pSgM6-G	BACH2_sgRNA4	<pre> 5' CACCGCCGCGCCCTGCCCGCTTTTA 3' ----- 3' CGGCGCGGGACGGGCGAAAATCAAA 5' </pre>

3.2.5.2 Slaganje šest različitih molekula sgRNA u okosnicu plazmida pSg-x6 (Assembly 1)

Za prvi način slaganja finalnog konstrukta za ciljanu metilaciju molekule DNA na šest različitih pozicija unutar genoma bio je potreban jedan plazmid koji već u sebi sadrži šest različitih sgRNA. U tu svrhu napravljeno je slaganje šest različitih modula sgRNA (koji sadrže svaki svoju sekvencu za sgRNA) unutar okosnice plazmida pSg-x6. Ovo sklapanje (*assembly*) je napravljeno pomoću plazmida pSgMX-G s kloniranim pojedinačnim modulima za sgRNA (opisanima u Poglavlju 3.2.5.1.) koji su okruženi restrikcijskim mjestom enzima *Esp31* (uvedeni u prvom koraku konstrukcije plazmida pSgMX-G; Poglavlje 3.2.2) i 50 ng plazmidne okosnice pSg-x6 u molarnom omjeru inserta i vektora 2:1. Količine inserta (moduli sgRNA dobiveni nakon cijepanja svakog plazmida pSgMX-G s modulom sgRNA pomoću enzima *Esp31*) dodane u reakciju su određene skaliranjem koncentracije inserta po formuli $f(x) = [\text{duljina inserta}(\text{bp}) / \text{duljina vektora}(\text{bp})] \times \text{koncentracija cijelog plazmida}(\text{ng}/\mu\text{L})$.

Reakcija digestije i ligacije napravljena je u jednom koraku koristeći 50 ng plazmida pSg-x6, plazmide pSgMX-G+sgRNA (pSgM1-G+BACH2_sg8, pSgM2-G+BACH2_sg3, pSgM3-G+IL6ST_sg2, pSgM4-G+IL6ST_sg3, pSgM5-G+BACH2_sg7, pSgM6-G+BACH2_sg4) u dvostruko većem molarnom omjeru, 10× pufer Tango, 2 µL DTT-a (10 mM), 2 µL ATP-a (10 mM), 1 µL enzima *Esp3I*, 1 µL T4 DNA ligaze i vodu do ukupnog volumena od 20 µl. Reakcija se odvijala prema sljedećim uvjetima: 10 ciklusa od 10 min na 37°C i 10 min na 16°C; zatim inkubacija 5 min na 50°C, te inkubacija od 10 min na 80°C. 37°C potreban je za maksimalnu aktivnost restrikcijskog enzima *Esp3I*, dok se na 16°C odvija spajanje. Po završetku ligacije, u reakciju je dodano 1 µL egzonukleaze V i 1 µL ATP-a (10 mM) te je reakcija postavljena 30 min na 37°C kako bi se porezala preostala linerarna DNA koja nije uspješno povezana. U svrhu transformacije korišten je novi soj bakterije *E. coli* – NEB *Stable Competent*. Te bakterije ne sadrže funkcionalan put popravka zasnovan na rekombinaciji pa je pogodan za umnažanje nestabilnih konstrukata kao što je ovaj *assembly* (sadrži šest ponavljanja modula sgRNA). Plazmid pSg-x6 sadrži gen za rezistenciju na antibiotik kanamicin pa su bakterije nakon transformacije nasadene na LB ploče koje sadrže 50 µg/mL antibiotika kanamicina i 40 µL IPTG-a (100 µM) kako bi se na temelju crveno-bijele selekcije odabrale bijele kolonije koje sadrže konstrukt *assembly*-a 1.

Uspješnost konstrukcije *assembly*-ja 1 je provjerena restrikcijskom analizom s 500 ng kalupa i enzimima *BsaI* (5 U) i *BspEI* (5 U) u puferu 3.1 te PCR-om na izoliranim plazmidima. Reakciju PCR-a je bilo potrebno optimizirati i kao najbolji se pokazao protokol koristeći komercijalno dostupnu polimerazu *KOD Extreme Hot Start DNA Polymerase*. Reakcijska smjesa napravljena je prema protokolu proizvođača te je uključivala 1 µL enzima *KOD Extreme Hot Start DNA Polymerase*, 25 µL 2× *Xtreme Buffer*, 10 µL dNTP (2 mM), 1,5 µL 10 µM početnica U6_Fw (5' GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC 3') i Sg-mult-Re (5' CGGAAGAGCGCCCAATACG 3') te 15 ng DNA *assembly*-ja 1 u ukupnom volumenu od 50 µL. Reakcija se odvijala pri sljedećim uvjetima: 94 °C 2 min, 30 ciklusa: 98 °C 10 s, 55 °C 30 s i 68 °C 2 min i 45 s; 68 °C 10 min.

3.2.5.3 Slaganje modula funkcionalnih elemenata i modula šest različitih sekvenci za sgRNA u okosnicu plazmida pUC19BB (Assembly 2 i 3)

Assembly 2 i *3* uključuju spajanje svih modula funkcionalnih elemenata sustava CRISPR-Cas9 (Tablica 6) i šest modula sgRNA iz plazmida pSg×6 (*Assembly 1*) u plazmidnu okosnicu pUC19BB. Napravljene su dvije varijante ovog konstrukta od kojih jedan sadrži modul za aktivni protein DNMT3A (*Assembly 2*), a drugi za neaktivni protein DNMT3A (*Assembly 3*).

Napravljena je reakcija digestije i spajanja u jednom koraku pomoću 50 ng plazmidne okosnice pUC19BB koja sadrži gen za otpornost na antibiotik ampicilin, svakog inserta u $3 \times$ molarnom omjeru: plazmid pSg×6 sa šest modula sgRNA (*Assembly 1*), plazmid koji sadrži modul s promotorom CBh (tNS-pPro-CBh), plazmid koji sadrži modul s terminatorom (tNS-pTer-H), plazmid koji sadrži modul s inaktiviranim proteinom dCas9 (tNS-pCas9-N), plazmid koji sadrži modul s aktivnom/neaktivnom katalitičkom domenom DNMT3A (tNS-pED-DNMT3A), plazmid koji sadrži modul s puromicin N-acetiltransferazom (tNS-pMK-Puro), pufer $10\times$ *Cut Smart*, 2 μ L ATP-a (10 mM), 1 μ L enzima *BsaI*, 1 μ L T4 DNA Ligaze i voda u ukupnom volumenu od 20 μ L. Reakcija se odvijala prema sljedećim uvjetima: 10 ciklusa od 10 min na 37°C i 10 min na 16°C; zatim inkubacija 5 min na 50°C, te inkubacija od 10 min na 80°C. Po završetku reakcije, u reakciju dodano 1 μ L egzonukleaze V i 1 μ L ATP-a (10 mM) u svrhu rezanja preostale linearne DNA. Bakterije NEB *Stable Competent* su transformirane s reakcijskom smjesom, a nakon oporavka su nasadene na LB ploče koje sadrže 100 μ g/mL antibiotika ampicilina, 40 μ L IPTG-a (100 μ M) i 120 μ L X-Gal-a (20 mg/mL). Plazmidna okosnica pUC19BB sadrži gen lacZ koji kodira za β -galaktozidazu koja u prisustvu analoga laktoze IPTG-a i kromogenog supstrata X Gal daje plavo obojenje kolonija. Pošto se gen lacZ nalazi između dva restrikcijska mjesta enzima *BsaI*, ugradnjom navedenih modula dolazi do izrezivanja gena lacZ pa su kolonije s finalnim konstruktom bijele. Ispravnost dobivenih konstrukata provjerena je restrikcijskom analizom s 500 ng kalupa i enzimima *EagI* (5U) i *EcoRV* (5U) u puferu 3.1. Dodatna provjera je napravljena i PCR-om. Korišten je komercijalno dostupna polimeraza *KOD Hot Start DNA Polymerase*. Reakcijska smjesa napravljena je prema protokolu proizvođača te je uključivala 0,5 μ L enzima *KOD Hot Start DNA Polymerase*, 2,5 μ L $10\times$ *Buffer*, 2,5 μ L dNTP (2 mM), 15 ng DNA *assembly-ja 2 i 3* u ukupnom volumenu od 25 μ L te 0,75 μ L 10 μ M početnica tNS_Sg_G_XbaI-Fw (5' TAATCTCTAGAGGTCTCATGACGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTC 3') i BACH2_sgRNA4_A (Tablica 7) te. Reakcija se odvijala pri uvjetima: 95 °C 2 min, 35 ciklusa: 95 °C 10 s, 61 °C 30 s i 70 °C 1 min; 70 °C 10 min.

3.2.5.4 Slaganje modula funkcionalnih elemenata i praznog modula za sgRNA u okosnicu plazmida pUC19BB (Assembly 4 i 5)

Drugi način slaganja finalnog konstrukta za ciljano uvođenje metilacije molekule DNA na šest različitih pozicija unutar genoma uključuje sklapanje svih funkcionalnih modula sustava CRISPR-Cas9 (Tablica 6) i plazmida pSg \times 6 s praznim modulom sgRNA (bez sgRNA) u plazmidnu okosnicu pUC19BB, nakon čega se uvodi šest različitih sgRNA iz plazmida pSgMX-G. Napravljene su dvije varijante ovog sustava od kojih jedna sadrži modul za aktivni protein DNMT3A (*Assembly 4*), a druga za neaktivni protein DNMT3A (*Assembly 5*).

Protokol slaganja je isti kao i kod *assembly-ja 2 i 3* (Poglavlje 3.2.5.3.). Jedina razlika je što je umjesto plazmida pSg-xN sa šest modula sgRNA (*Assembly 1*) korišteni prazan modul sgRNA uzet iz plazmida pSg- \times 6 (koji ne sadrži molekule sgRNA). Nakon reakcije digestije i spajanja u jednom koraku (opisano u prethodnom Poglavlju) reakcijska smjesa je uvedena u bakterije XL10 Gold zbog toga što *assembly-ji 4 i 5* ne sadrže repetitivne sekvence pa nije potreban bakterijski soj *NEB Stable Competent*. Uspješnost konstrukcije *assembly-ja 4 i 5* je provjerena restrikcijskom analizom s 500 ng kalupa i enzimom *EagI* (5 U) u puferu 3.1. i ukupnom volumenu od 20 μ L.

3.2.5.5 Slaganje šest različitih sekvenci za sgRNA u produkte Assembly-a 4 i 5 (Assembly 6 i 7)

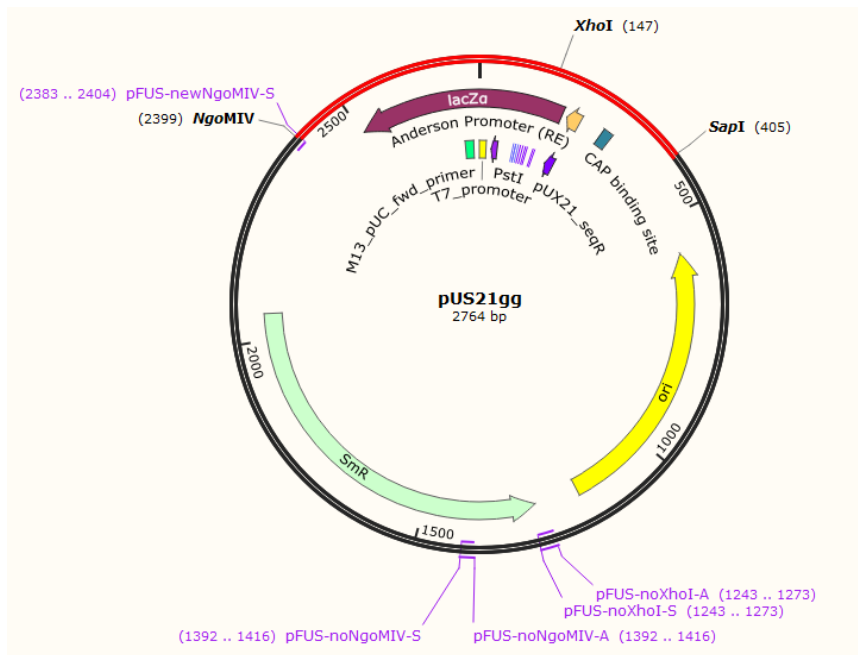
Vektori za ove *assembly-je* su bili produkti *assembly-ja 4 i 5*, a inserti su šest različitih sekvenci sgRNA uzetih iz plazmida pSgMX-G (Poglavlje 3.2.5.1.). Protokol je isti kao u *assembly-u 1* (Poglavlje 3.2.5.2.), a jedina razlika je što su kao plazmidne okosnice u koje se ugrađuje šest različitih molekula sgRNA uzeti produkti *assembly-ja 4 i 5* (plazmidna okosnica pUC19BB sa svim funkcionalnim modulima i praznim modulom sgRNA), a ne plazmid pSg-x6. Nakon reakcije digestije i slaganja u jednom koraku, reakcijska smjesa je transformirana u bakterije *E. coli* soja *NEB Stable Competent* zbog ponavljajućih regija (šest modula sgRNA), a nakon oporavka su bakterije razmazane na LB ploče koje sadrže 100 μ g/mL antibiotika ampilicina, 40 μ L IPTG-a (100 μ M) i 120 μ L X-Gal-a (20 mg/mL) kako bi se plavo-bijelom selekcijom odabrali dobri klonovi. Za provjeru konstrukata *assembly-ja 6 i 7* je napravljena restrikcijska analiza s enzimima *Eag* i *EcoRV* te umnažanje dijela plazmida PCR-om prema protokolima opisanim u Poglavlju 3.2.5.3, za *assembly-je 2 i 3* budući da su produkti tih *assembly-ja* jednaki produktima *assembly-ja 6 i 7*.

4. REZULTATI

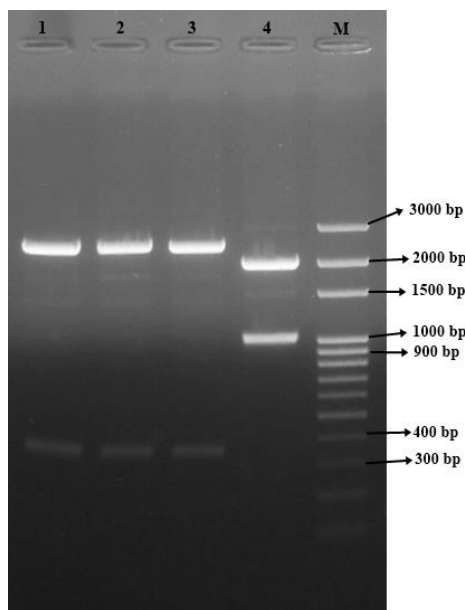
4.1 Plazmid s rezistencijom na spektinomicin (pUS21gg)

Plazmid s rezistencijom na spektinomicin (pUS21gg) konstruiran je iz plazmida pFUS_A_mutx3 u koji je uvedeno višestruko mjesto za kloniranje plazmida pUK21 budući da ono sadrži sva restrikcijska mjesta potrebna u daljnjim koracima. Plazmid pFUS_A_mutx3 je dobiven iz plazmida pFUS_A kojemu je ciljanom mutagenезom uklonjeno postojeće restrikcijsko mjesto *NgoMIV* te je novo uvedeno nizvodno od višestrukog mjesta za kloniranje. Također mu je uklonjeno i restrikcijsko mjesto enzima *XhoI* budući da se jedno nalazi i u višestrukom mjestu za kloniranje plazmida pUK21. Plazmidi pFUS_A_mutx3 i pUK21 su porezani enzimima *NgoMIV* i *SapI* te je nakon ligacije željenih fragmenata dobiven plazmid pUS21gg (Slika 17) koji sadrži gen za rezistenciju na spektinomicin i ishodište replikacije iz plazmida pFUS_A_mutx3, a višestruko mjesto za kloniranje iz plazmida pUK21.

Za provjeru konstrukcije plazmida pUS21gg restrikcijskom analizom odabrani su enzimi *SapI* i *XbaI* te su pomoću programa Snapgene utvrđeni očekivani fragmenti na 1%-tnom agaroznom gelu. Kao negativna kontrola ligacije vektora pFUS_A_mutx3 i inserta (višestruko mjesto za kloniranje plazmida pUK21) korišten je plazmid pFUS_A_mutx3. Cijepanjem tri klona plazmida pUS21gg (2764 bp) s enzimima *SapI* i *XbaI* na gelu su trebali biti vidljivi fragmenti 2404 bp i 360 bp, a u slučaju cijepanja plazmida pFUS_A_mutx3 (3019 bp) fragmenti od 2004 bp i 1015 bp (Slika 10). Prisutnost svih navedenih fragmenata na gelu (Slika 18) je potvrdila uspješnost konstrukcije plazmida pUS21gg. Odabran je klon pUS21gg najviše koncentracije (klon 2) te je korišten kao ishodišni plazmid u konstrukciji plazmidnog vektora pSgMX (X=1-6) za kloniranje pojedinačnih molekula sgRNA.



Slika 17. Plazmid s rezistencijom na spektinomycin (pUS21gg). Crnom bojom je označen dio plazmida pUS21gg s rezistencijom na spektinomycin i ishodištem replikacije koji potječe iz plazmida pFUS_A_mutx3, a crvenom je označeno višestruko mjesto za kloniranje koje potječe iz plazmida pUK21. Unutar višestrukog mjesta za kloniranje je prikazano restrikcijsko mjesto *XhoI* zbog kojeg je bilo potrebno ukloniti restrikcijsko mjesto *XhoI* iz plazmida pFUS_A budući da je ono važno za konstrukciju plazmida za kloniranje pojedinačnih molekula sgRNA (pSgMX). Ljubičastim slovima su označene početnice korištene u ciljanoj mutagenezi (za izbacivanje restrikcijskog mjesta *NgoMIV* i *XhoI* te uvođenja novog restrikcijskog mjesta *NgoMIV* nizvodno od višestrukog mjesta za kloniranje). **SmR** – rezistencija na spektinomycin; **ori** – ishodište replikacije

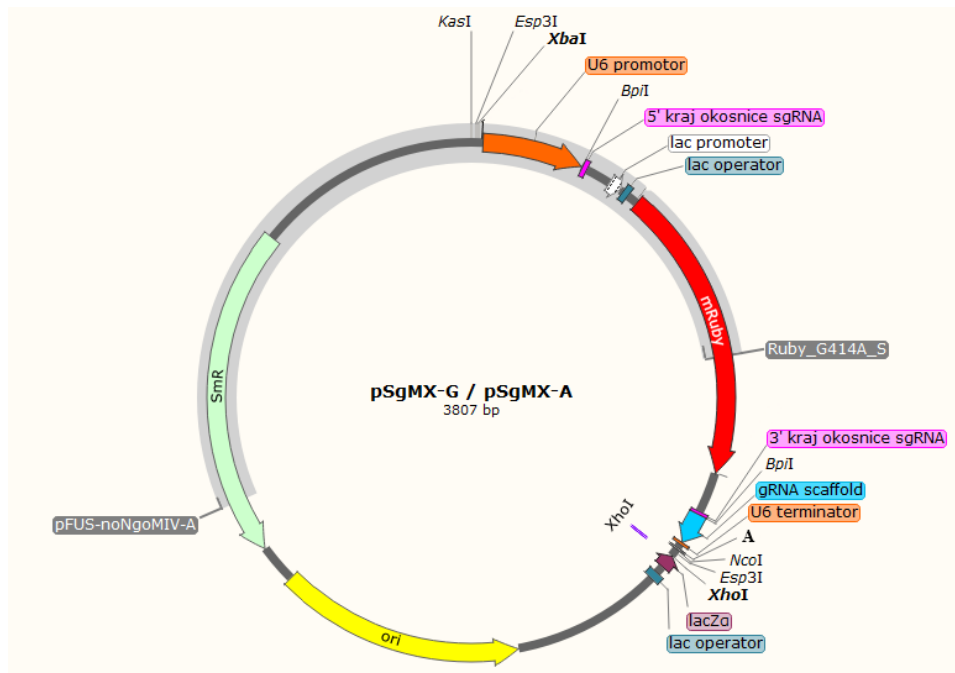


Slika 18. Agarozna gel elektroforeza produkata cijepanja plazmida pUS21gg i pFUS_A_mutx3 s restrikcijskim enzimima *SapI* i *XbaI*. M – ljestvičasti uzorak markera 100 bp DNA Ladder Ready to Load; 1, 2 i 3 – klonovi plazmida pUS21gg; 4 – plazmid pFUS_A_mutx3 kao negativna kontrola ligacije vektora i inserta.

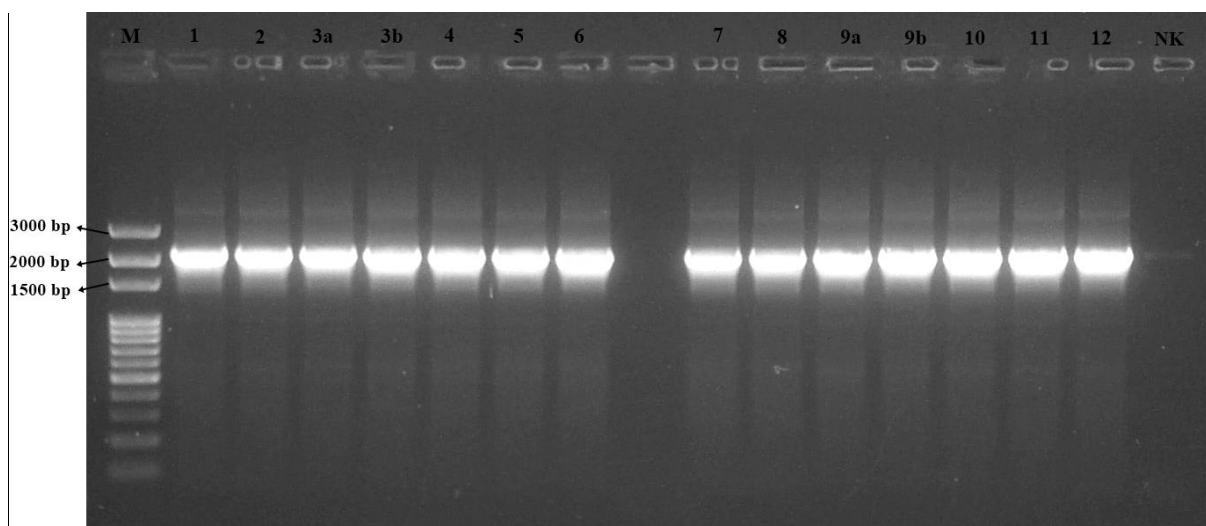
4.2 Plazmidi pSgMX-A i pSgMX-G (X=1-6)

Kako bi se pojedinačne sgRNA mogle klonirati u plazmid s rezistencijom na spektinomycin (pUS21gg) bilo je potrebno unutar ovog plazmida uvesti modul sgRNA (U6 promotor, okosnica sgRNA i U6 terminator) te restrikcijska mjesta enzima *Golden Gate* sustava koja omogućavaju slaganje većeg broja molekula sgRNA zajedno s ostalim funkcionalnim modulima u krajnji konstrukt za ciljanu metilaciju DNA. Modul sgRNA za protein SpCas9 izoliran je iz plazmida pSg-G-mRuby, a modul sgRNA za protein SaCas9 iz plazmida pSg-A-mRuby. Unutar okosnice sgRNA nalazi se reporterski gen za fluorescencijski protein mRuby okružen s dva restrikcijska mjesta *BpiI*, što omogućava crveno-bijelu selekciju. Konstruirano je šest različitih plazmida pSgMX (X=1-6) za kloniranje molekula sgRNA proteina SpCas9 (pSgMX-G) i šest različitih plazmida pSgMX za umnažanje molekula sgRNA proteina SaCas9 (pSgMX-A) (Slika 19).

U prvom koraku konstrukcije u plazmid pUS21gg su uvedeni parovi oligonukleotida koji se razlikuju za svaku molekulu sgRNA po tome što nakon digestije s *Golden Gate* enzimom *Esp3I* ostavljaju različite ljepljive krajeve (I-II; II-III; III-IV; IV-V; V-VI; VI-VII) koji omogućavaju spajanje različitog broja modula sgRNA u željenom rasporedu u jedan konstrukt (maksimalno šest). U sljedećem koraku je uveden par oligonukleotida jedinstven za sve molekule sgRNA koji sadrži restrikcijska mjesta za drugi enzim *Golden Gate* sustava, *BsaI*, važan za slaganje modula sgRNA u krajnji *Golden Gate* konstrukt s ostalim modulima funkcionalnih elemenata sustava CRISPR-Cas9. Restrikcijska mjesta *BsaI* uvedena u drugom koraku, omogućila su i uvođenje modula sgRNA iz plazmida pSg-G-mRuby i pSg-A-mRuby pocijepanih enzimom *BsaI* u posljednjem koraku konstrukcije. Po jedan klon svakog od šest konstruiranih plazmida pSgMX-G i šest plazmida pSgMX-A je provjeren metodom *Colony PCR* (za plazmide pSgM3-G i pSgM3-A su uzeta dva klona za provjeru budući da je kod njih bilo najslabije crveno obojenje). Kod konstrukata pSgMX-G i pSgMX-A očekivan je fragment veličine 2058 bp, a prisutnost tog fragmenta na gelu (Slika 20) u svim klonovima potvrdila je uspješnu konstrukciju plazmida pSgMX-A i pSgMX-G. Dodatna provjera je napravljena i sekvenciranjem Sangerovom metodom. Ovi plazmidi su korišteni za kloniranje pojedinačnih sgRNA prilikom sklapanja glavnog *Golden Gate* konstrukta za ciljanu metilaciju više mjesta u genomu.



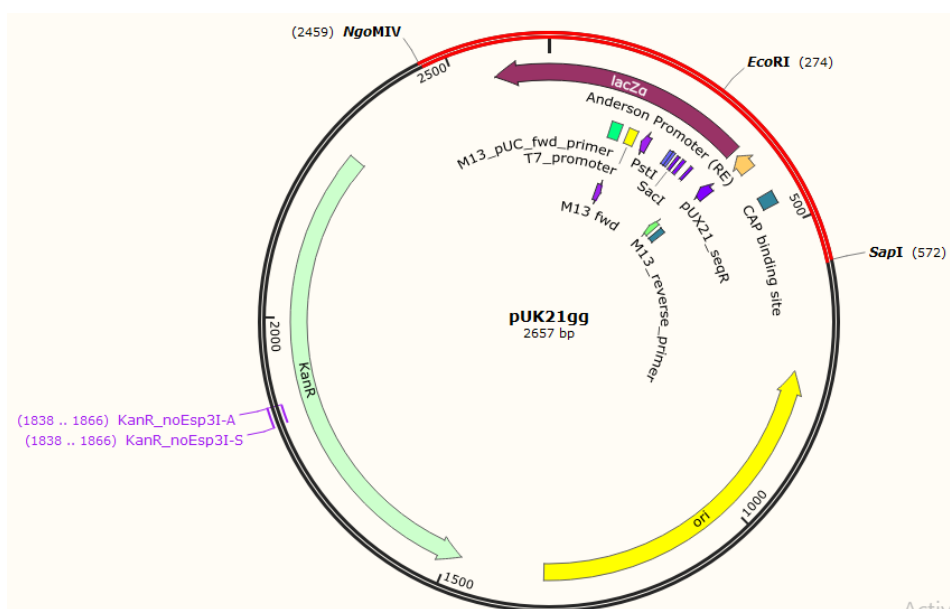
Slika 19. Shematski prikaz konstrukta pSgMX-G i pSgMX-A (X=1-6). SmR - rezistencija na antibiotik spektinomycin; ori – ishodište replikacije; crvena strelica (mRuby) – gen za fluorescencijski protein Ruby; U6 promotor – promotor RNA polimeraze III; lac operator – lac represor se veže za lac operator i sprječava transkripciju, a dodatak IPTG-a sprječava vezanje represora i time potiče transkripciju gena, u ovom slučaju gena za protein Ruby; U6 terminator – zaustavlja transkripciju gena za protein Ruby; sivom bojom je označen dio plazmida umnožen Colony PCR-om s početnicama pFUS-noNgoMIV-A i Ruby_G414A_S. Označena su i restrikcijska mjesta enzima Esp3I koji ostavlja ljepljive krajeve specifične za svaki od šest plazmida pSgMX-G i pSgMX-A.



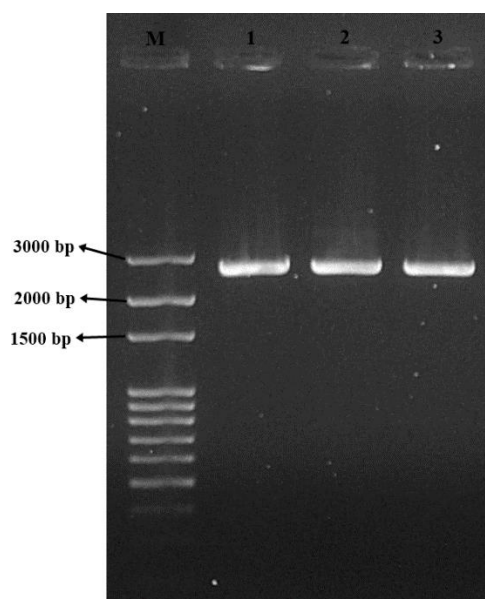
Slika 20. Agarozna gel elektroforeza Colony PCR produkata umnažanja željene regije plazmida pSg-MX-A i pSgMX-G. Korištena je kombinacija početnica pFus_noNgoMIV_A i Ruby_G414A_S. M: ljestvičavi uzorak markera 100 bp DNA Ladder Ready to Load; 1–6: plazmidi pSgMX-A gdje je X=1-6 (3a i 3b – dva klon plazmida pSgM3-A); 7–12: plazmidi pSgMX-G (9a i 9b – dva klon plazmida pSGM3-G); NK – negativna kontrola. Očekivan je fragment veličine 2058 bp.

4.3 Plazmid s rezistencijom na kanamicin (pUK21gg)

Plazmid pUK21gg s rezistencijom na kanamicin korišten je kao ishodišni plazmid u konstrukciji plazmidnih vektora pSg-xN (N=1-6) za slaganje različitog broja modula sgRNA zajedno (najmanje jedan, najviše šest modula sgRNA). Konstruiran je iz plazmida pUK21 iz kojeg su u tu svrhu uklonjena tri restrikcijska mjesta *Esp3I* budući da interferiraju s kasnijim procesima kloniranja. Uspješnost konstrukcije plazmida pUK21gg (Slika 21) je provjerena restrikcijskom analizom s enzimima *EcoRI* i *Esp3I*. Budući da plazmid pUK21gg sadrži jedno restrikcijsko mjesto za enzim *EcoRI* očekivan je jedan fragment (lineariziran plazmid pUK21gg; 2657 bp) na gelu ukoliko su uklonjena sva restrikcijska mjesta *Esp3I*. Dobiven je jedan fragment veličine 2657 bp čime je potvrđena uspješnost uklanjanja svih restrikcijskih mjesta *Esp3I* (Slika 22). Za daljnje korake odabran je klon 2.



Slika 21. Plazmid s rezistencijom na kanamicin (pUK21gg). Crnom bojom je označen dio plazmida pUK21gg s rezistencijom na kanamicin i ishodištem replikacije koji potječe iz PCR-om umnoženog dijela pUK21, a crvenom je označeno višestruko mjesto za kloniranje koje je izrezano iz plazmida pUK21 enzimima *NgoMIV* i *SapI* i ligirano s umnoženim dijelom pUK21. Za restrikcijsku analizu je korišten enzim *EcoRI*. Ljubičastim slovima su označene početnice korištene u ciljanoj mutagenezi (za uklanjanje restrikcijskog mjesta *Esp3I* koje nije uklonjeno reakcijom PCR-a).

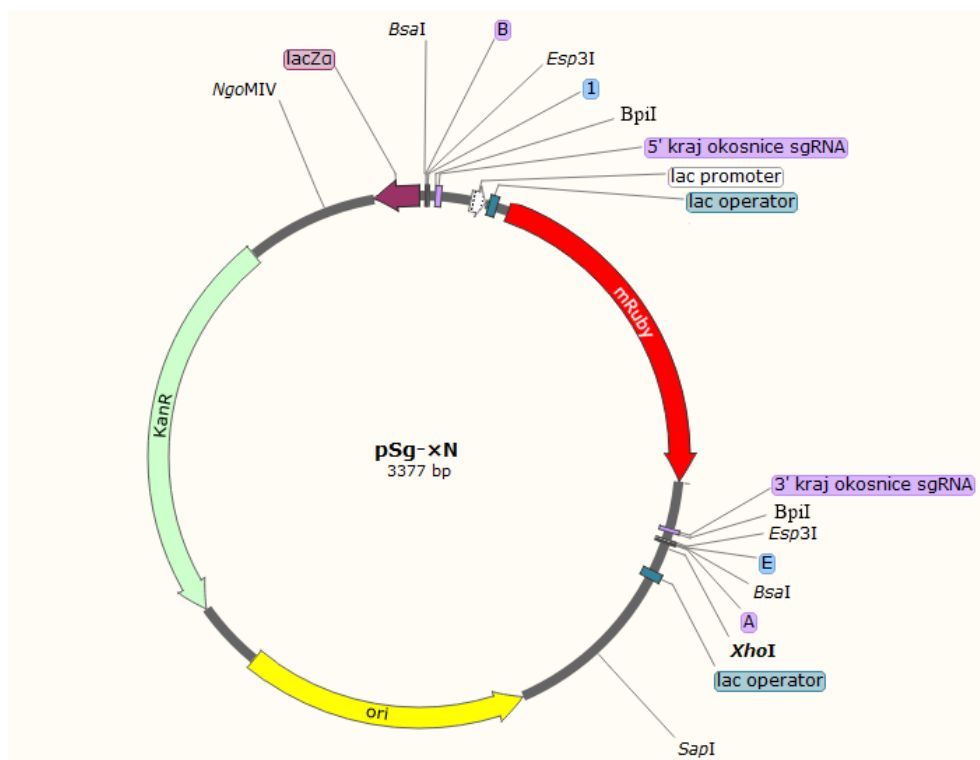


Slika 22. Agarozna gel elektroforeza produkta restrikcijske analize plazmida pUK21gg s enzimom *EcoRI*. M – ljestvičasti uzorak markera 100 bp DNA Ladder Ready to Load; 1, 2 i 3 – klonovi plazmida pUK21gg. Očekivan je fragment veličine 2657 bp.

4.4 Plazmidi pSg-xN (N = 1-6)

Iz plazmida pUK21gg su konstruirani plazmidi pSg-xN (N=1-6) (Slika 23) koji služe za slaganje više modula sgRNA (najmanje jedan, a najviše šest modula sgRNA) u jedan plazmid. Pošto je riječ o šest različitih kombinacija slaganja modula sgRNA konstruirano je šest različitih plazmida pSg×N, koji se razlikuju po mogućnosti primanja različitog broja modula sgRNA. U prvom koraku konstrukcije u plazmid pUK21gg je uveden par oligonukleotida koji sadrži ljepljivi kraj „1“ koji nastaje nakon cijepanja s enzimom *Esp3I*, a u drugom koraku je uveden i drugi ljepljivi kraj nazvan E („2/3/4/5/6/7“) koji određuje količinu modula sgRNA koju pojedini plazmid može primiti. U ova dva koraka uvedena su i restrikcijska mjesta za enzim *BsaI* koja okružuju restrikcijska mjesta za enzim *Esp3I*, a svrha restrikcijskih mjesta za enzim *BsaI* je za kasnije *Golden Gate* sklapanje svih modula funkcionalnih elemenata potrebnih za višestruku ciljanu metilaciju sustavom CRISPR-Cas9 u jedan *Golden Gate* konstrukt. U posljednjem koraku konstrukcije je cijepanjem enzimima *BpiI* (njihova restrikcijska mjesta su uvedena u prvom koraku konstrukcije) iz plazmida pSg-G-mRuby izrezana okosnica sgRNA s genom za fluorescencijski protein mRuby te je uvedena unutar svakog plazmida prethodnog koraka, kako bi se omogućila crveno-bijela selekcija te odabir željenih bakterijskih kolonija. Produkti prva dva koraka su provjerena metodom *Colony PCR* (nije prikazano), a produkti trećeg koraka su provjereni sekvenciranjem Sangerovom metodom. Odabrano je nekoliko bakterijskih kolonija crvene boje,

budući da crvena boja kolonija upućuje na to da je došlo do uvođenja gena za fluorescencijski protein mRuby u plazmid, a time i okosnice sgRNA.



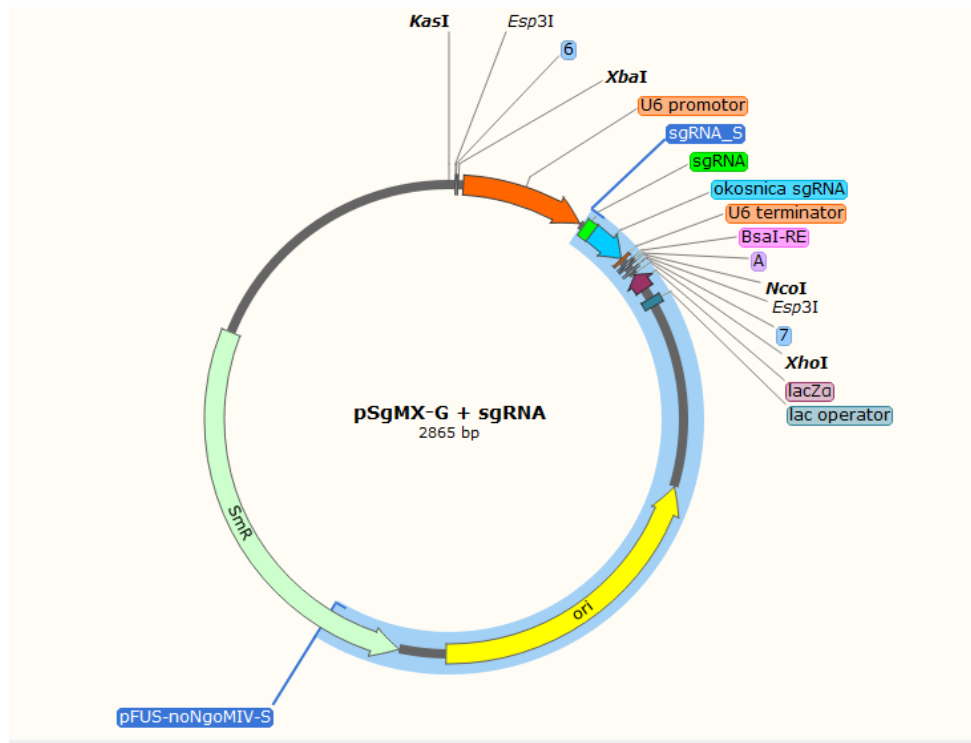
Slika 23. Shematski prikaz konstrukta pSg-xN (N=1-6). KanR – rezistencija na antibiotik kanamicin; ori – ishodište replikacije; mRuby – gen za protein Ruby; B i A – restriksijska mjesta enzima BsaI; 1 – ljepljivi kraj koji nastaje cijepanjem s enzimom Esp3I univerzalan za sve plazmide pSg-xN; E (2/3/4/5/6/7) – drugi ljepljivi kraj koji nastaje cijepanjem s enzimom Esp3I, a razlikuje se između svih šest plazmida pSg-xN (npr. Cijepanjem plazmida pSg-x1 s enzimom EspI nastaju ljepljivi krajevi 1-2 koji omogućavaju uvođenje jednog modula sgRNA, plazmida pSg-x2 nastaju ljepljivi krajevi 1-3 koji omogućavaju uvođenje dva modula sgRNA, itd)

4.5 Slaganje više modula u jedan plazmid (Golden Gate Assembly)

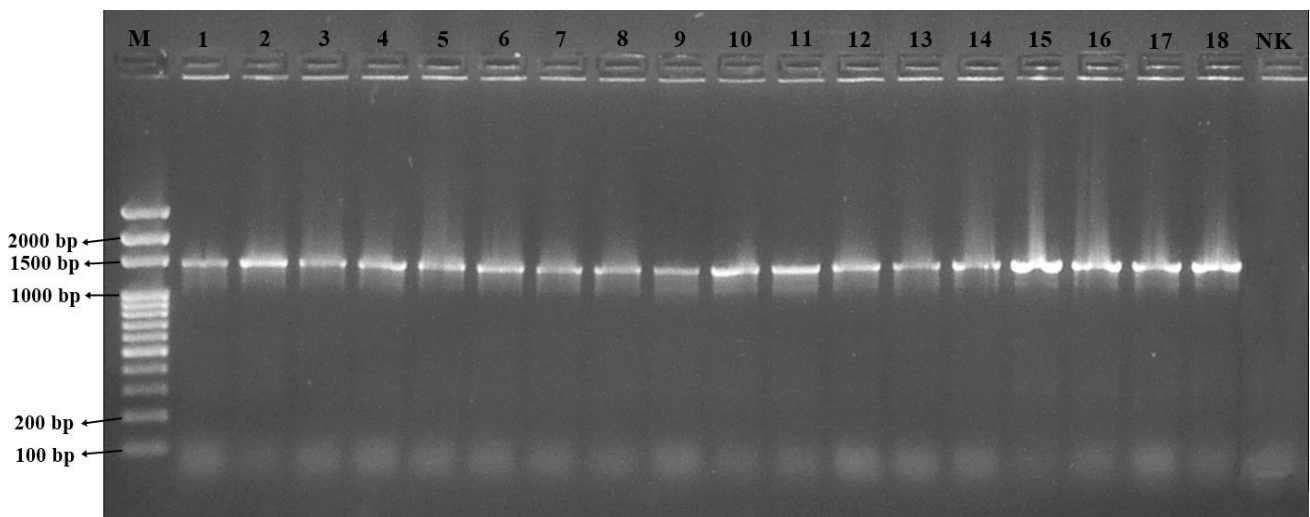
Konačni cilj ovog istraživanja bio je konstrukcija plazmida koji sadrži sve module funkcionalnih elemenata za ciljanu metilaciju DNA sustavom CRISPR-Cas9 (promotor, terminator, otpornost na puromicin, protein dCas9, protein DNMT3A; Tablica 6), uključujući više modula sgRNA s molekulama sgRNA koje omogućavaju navođenje fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A na više lokusa unutar promotora gena *BACH2* i *IL6ST* istovremeno. Kao okosnica u koju su se slagali navedeni moduli korišten je plazmid pUC19BB (konstruiran u laboratoriju profesorice V. Zoldoš u sklopu metode koja se trenutno razvija; neobjavljeni podaci). Sadrži gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin, reporterski gen *LacZ* pod Lac promotorom (plavo-bijela selekcija) te dva restriksijska mjesta za enzim *BsaI* koja omogućavaju uvođenje svih modula. Provjera slaganja konačnog konstrukta napravljena je s maksimalnim brojem molekula sgRNA (njih šest) proteina SpCas9 vrste

Streptococcus pyogenes što znači da su korišteni konstrukti pSgMX-G za umnažanje pojedinačnih molekula sgRNA i plazmid pSg-x6 u koji se može uvesti šest modula sgRNA. Slaganje svih modula za višestruku ciljanu metilaciju sustavom CRISPR-Cas9 u okosnicu plazmida pUC19BB je napravljeno na dva načina. Prvi način je uključivao slaganje šest različitih modula sgRNA pomoću *Golden gate* enzima *Esp3I* u okosnicu plazmida pSg-x6 (*Assembly 1*). Potom je konstrukt *assembly-a 1* zajedno s ostalim plazmidima funkcionalnih modula (Tablica 6) porezan enzimom *BsaI* te su svi moduli uvedeni u okosnicu plazmida pUC19BB (*Assembly 2 i 3*). Drugi način slaganja je uključivao uvođenje modula svih funkcionalnih elemenata i praznih modula sgRNA plazmida pSg-x6 (U6 promotor, prazna okosnica sgRNA, U6 terminator) izreznih iz odgovarajućih plazmida enzimom *BsaI* u okosnicu plazmida pUC19BB (*Assembly 4 i 5*) nakon čega su uvedene i molekule sgRNA izrezane pojedinačno iz plazmida pSgMX-G pocijepanih enzimom *Esp3I* (*Assembly 6 i 7*).

Za oba načina završnog slaganja prvo je bilo potrebno uvesti pojedinačne sekvence za sgRNA u plazmide pSgMX-G (Slika 24). Korišteno je šest različitih sgRNA koje ciljaju različita mjesta unutar promotora gena *BACH2* i *IL6ST*. Kako se sekvence molekula sgRNA ugrađuju između dva restrikcijska mjesta *BpiI* koja okružuju gen za protein Ruby, u slučaju da je došlo do uspješne ugradnje molekule sgRNA, gen za protein Ruby se izrezuje te bakterije transformirane s takvim plazmidima nisu crvenog obojenja. Na temelju toga odabrane su po tri bijele kolonije svih šest plazmida pSgMX-G s uvedenim pojedinačnim sgRNA te je napravljen *Colony PCR*. Na slici 25 prikazani su rezultati gel elektroforeze produkata *Colony PCR*-a te je u sva tri klona svih šest plazmida pSgMX-G s uvedenim molekulama sgRNA prisutan očekivani fragment (1411 bp) koji potvrđuje uspješnu konstrukciju. Od svakog plazmida je odabran klon 2 s kojim se išlo u sljedeći korake konstrukcije.

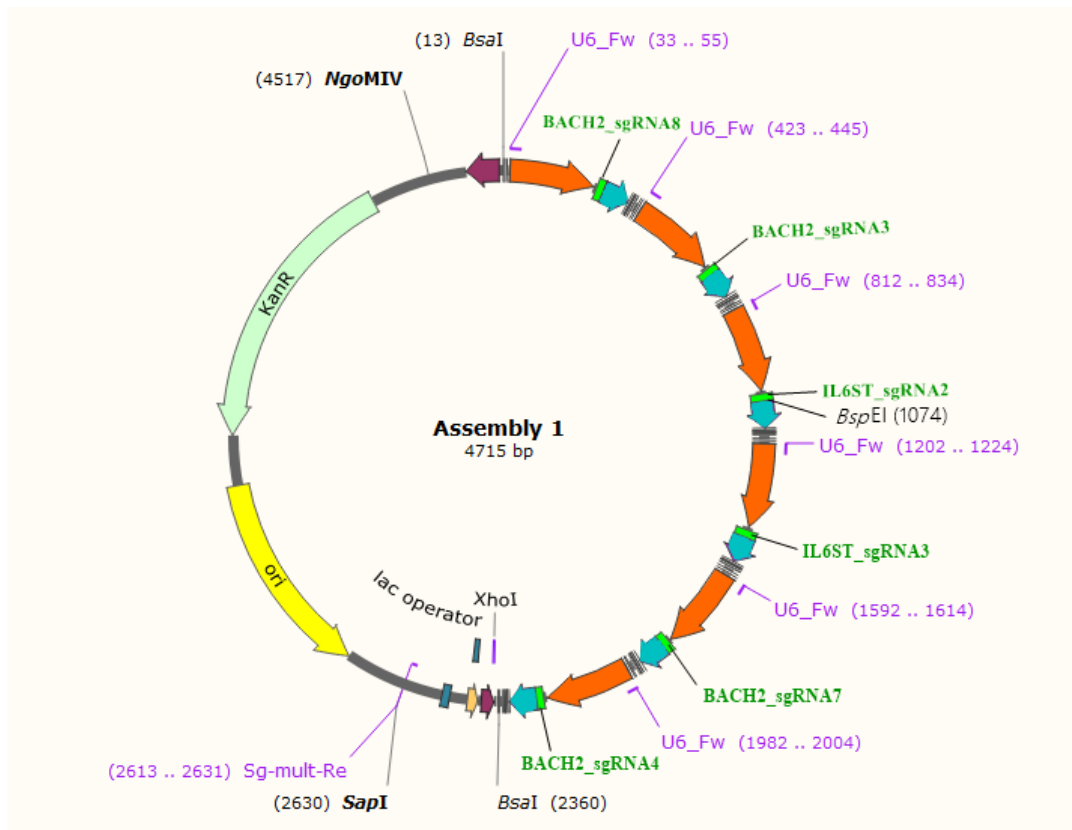


Slika 24. Shematski prikaz plazmida pSgMX-G sa sgRNA. Kombinacije plazmida pSgMX-G i odgovarajućih molekula sgRNA (zeleno) su prikazane u Tablici 6. **SmR** - rezistencija na kanamicin; **ori** – ishodište replikacije; **U6 promotor** – promotor RNA polimeraze III, početak transkripcije molekule sgRNA; **U6 terminator** – zaustavlja transkripciju molekule sgRNA; **A** – restrikcijsko mjesto enzima *BsaI*; plavom bojom je označen dio plazmida umnožen *Colony PCR*-om s početnicama pFUS-noNgoMIV-A i *sense* lancem molekule sgRNA (ovisno o tome o kojoj se sgRNA radi).

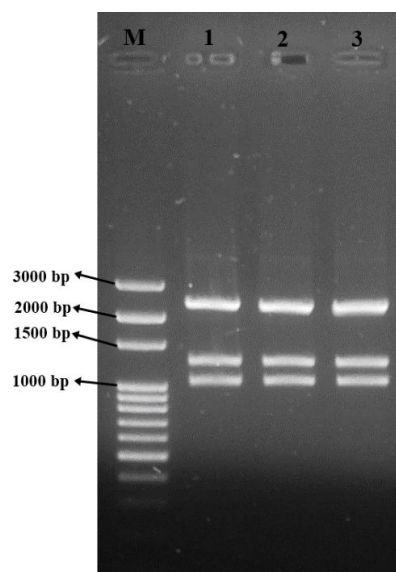


Slika 25. Agarozna gel elektroforeza produkata Colony-PCR-a plazmida pSgMX-G s uvedenim molekulama sgRNA. **M** – ljestvičasti uzorak markera 100 bp DNA Ladder Ready to Load; **1,2,3** – tri klona pSgM1-G + BACH2_sg8; **4,5,6** – tri klona pSgM2-G + BACH2_sg3; **7,8,9** – tri klona pSgM3-G + IL6ST_sg2; **10,11,12** – tri klona pSgM4-G + IL6ST_sg3; **13,14,15** – tri klona pSgM5-G + BACH2_sg7; **16,17,18** – tri klona pSgM6-G + BACH2_sg4; **NK** – negativna kontrola; očekivan je fragment veličine 1411 bp

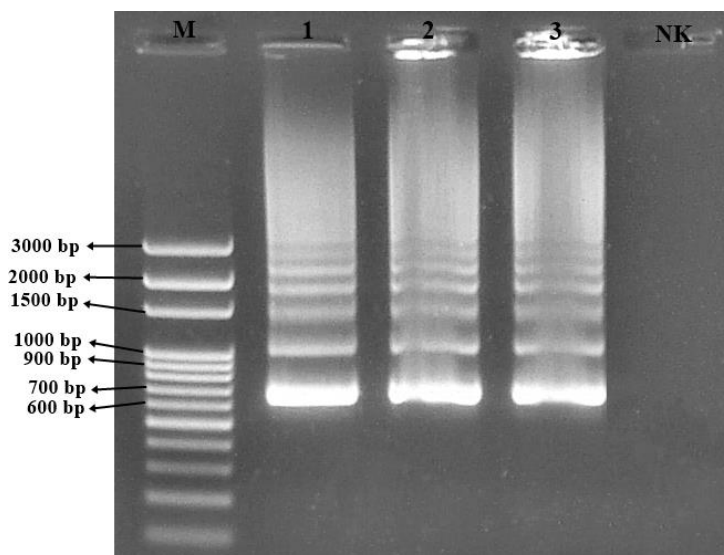
Prvi način slaganja modula u plazmid pUC21BB uključivao je *assembly*-je 1, 2 i 3. Prvo su molekule sgRNA iz svih šest plazmida pSgMX-G uvedene u jedan plazmid (pSg-x6) u točno određenom redosljedju što je omogućeno cijepanjem navedenih plazmida enzimom *Esp3I* (*Assembly* 1, Slika 26). Budući da se moduli sgRNA ugrađuju između restrikcijskih mjesta *Esp3I* plazmida pSg-x6 unutar kojih je i gen za fluorescencijski protein Ruby, dolazi do njegova izrezivanja pa bakterije transformirane s konstruktima s uvedenim modulima sgRNA nisu crvenog obojenja. Iz tri bijele bakterijske kolonije izoliran je konstrukt *assembly*-ja 1 (okosnica plazmida pSg-x6 sa šest modula sgRNA). Uspješnost konstrukcije je provjerena restrikcijskom analizom s enzimima *BsaI* i *BspEI*. Kako plazmid *assembly*-ja 1 sadrži dva restrikcijska mjesta *BsaI* i jedno restrikcijsko mjesto *BspEI* očekivana su tri fragmenta na gelu veličine 2368 bp, 1286 bp i 1061 bp. Na slici 27 su prikazani rezultati gel elektroforeze produkata restrikcijske analize konstrukta *assembly*-ja 1 i veličine fragmenata odgovaraju očekivanima. Dodatna provjera napravljena je PCR-om uz korištenje početnice Sg-mult-Re koja se veže unutar okosnice plazmida pSg-x6 i početnice U6_Fw koja se veže unutar svakog modula sgRNA kao što je prikazano na slici 26. U skladu s time očekivano je šest fragmenata na gelu veličine 2599 bp, 2209 bp, 1820 bp, 1430 bp, 1040 bp i 650 bp. Na slici 28 su vidljivi svi navedeni fragmenti. Fragment veličine 2599 bp je najmanje vidljiv budući da se veći fragmenti umnažaju s puno manjom efikasnošću od manjih fragmenata. Šest modula sgRNA konstrukta *assembly*-ja 1 je okruženo s dva restrikcijska mjesta enzima *BsaI* (Slika 26) što omogućava izrezivanje svih šest modula zajedno i uvođenje u krajnji konstrukt (*Assembly* 2 i 3). Klon 1 je odabran za sklapanje konstrukta *assembly*-ja 2 i 3.



Slika 26. Shematski prikaz konstrukta Assembly-ja 1. Plazmid pSg-x6 s uvedenim molekulama sgRNA (zeleno). **KanR** - rezistencija na kanamicin; **ori** – ishodište replikacije; **narančasta strelica** – U6 promotor (promotor RNA polimeraze III, početak transkripcije molekule sgRNA); ljubičastim slovima su označene početnice korištene za PCR provjeru uspješnosti konstrukcije *assembly*-ja 1. Početnica **U6-Fw** se veže na šest mjesta u plazmidu (unutar svakog modula sgRNA) zbog čega gel elektroforezom produkata PCR-a nastaje šest fragmenata na gelu. Prikazana su restrikcijska mjesta *BsaI* koja omogućavaju izrezivanje svih šest modula sgRNA zajedno te njihovo slaganje u plazmid pUC19BB (*assembly* 2 i 3)

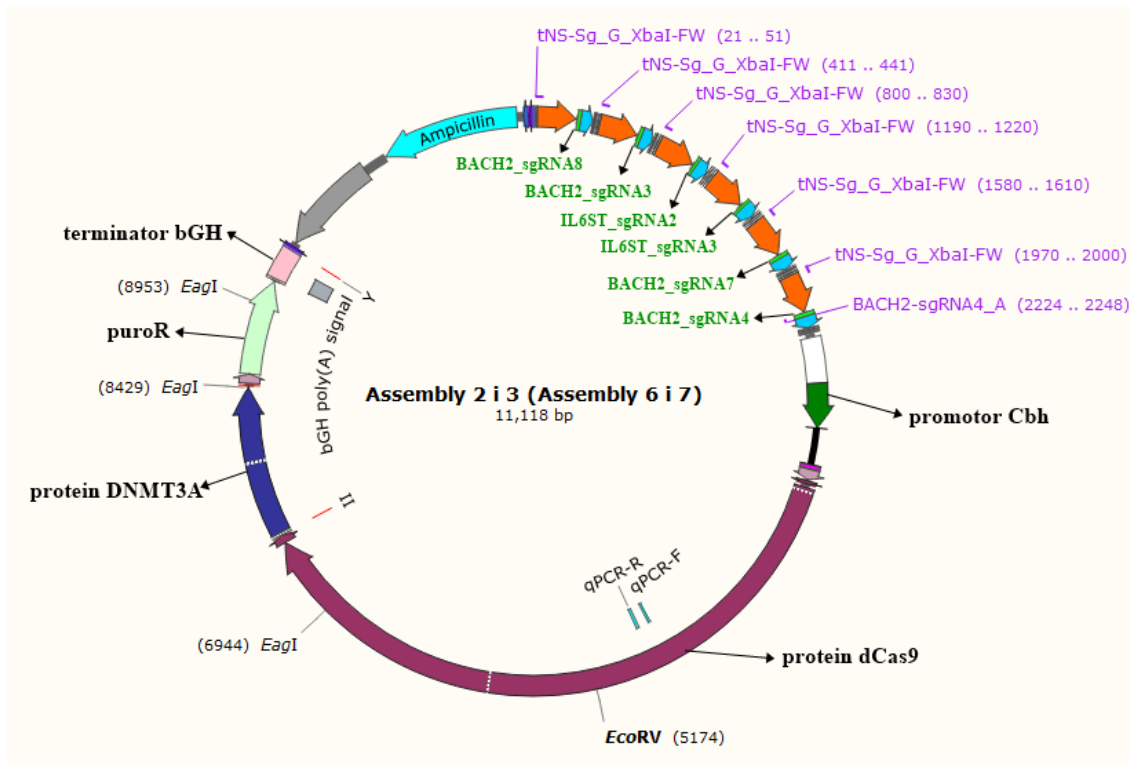


Slika 27. Agarozna gel elektroforeza produkata restrikcijske analize plazmida Assembly-ja 1 s enzimima *BsaI* i *BspEI*. M – ljestvičasti uzorak markera 100 bp DNA Ladder Ready to Load; 1, 2 i 3 – klonovi plazmida *assembly*-ja 1. Očekivane veličine fragmenata na gelu su: 2368 bp, 1286 bp i 1061 bp.

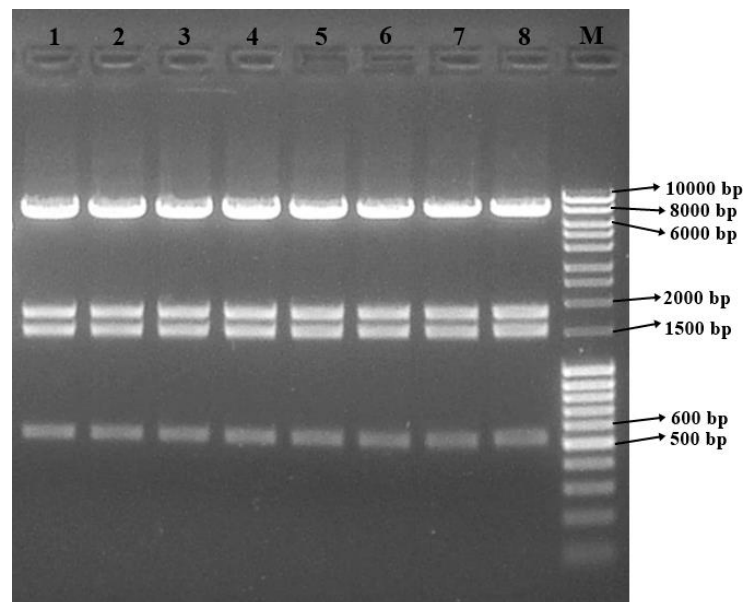


Slika 28. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata umnažanja dijela konstrukta *assembly-a 1*. M – ljestvičavi uzorak markera 100 bp DNA Ladder Ready to Load; **1,2,3** – tri klonova plazmidnog produkta *assembly-a 1*; **NK** – negativna kontrola. Jedna od korištenih početnica se veže unutar svakog od šest modula sgRNA te je zato očekivano šest fragmenata na gelu: 2599 bp, 2209 bp, 1820 bp, 1430 bp, 1040 bp i 650 bp. Klon 1 je odabran za korištenje u *assembly-u 2 i 3*.

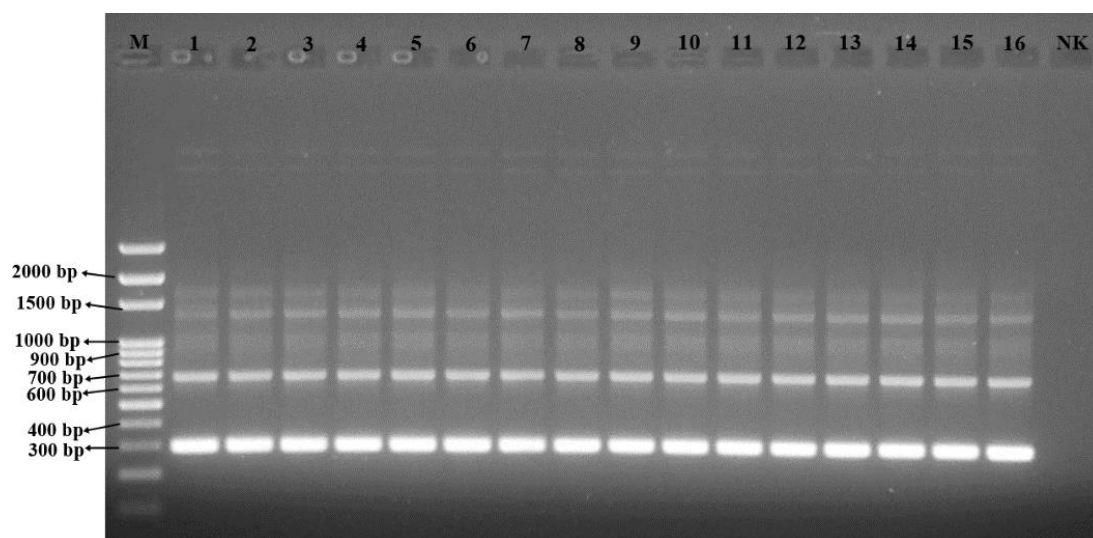
Nakon što je svih šest modula sgRNA uvedeno u plazmid pSg-x6 (*Assembly 1*) bilo ih je potrebno spojiti s ostalim funkcionalnim modulima sustava CRISPR-Cas9 u plazmid pUC19BB (*Assembly 2 i 3*; Slika 29). *Assembly 2 i 3* se razlikuju u modulu za protein DNMT3A. Konstrukt *assembly*-ja 2 sadrži modul aktivnog proteina DNMT3A, a plazmid *assembly*-ja 3 modul neaktivnog proteina DNMT3A koji služi kao kontrola u funkcionalnoj validaciji sustava za ciljanu metilaciju u životinjskim stanicama koja nije napravljena unutar vremena izrade ovog rada. Spajanje svih šest modula sgRNA i ostalih funkcionalnih modula (modul s promotorom CBh, modul s inaktiviranim proteinom dCas9, modul s aktivnom/neaktivnom katalitičkom domenom DNMT3A i modul s puromicin N-acetiltransferazom) u plazmid pUC19BB je omogućeno izrezivanjem modula iz pripadajućih enzima s enzimom *Golden Gate* sustava *BsaI*. Na temelju plavo-bijele selekcije su odabrane četiri bijele bakterijske kolonije te je izolirana plazmidna DNA konstrukta *assembly*-ja 2 i 3. Provjera konstrukta je napravljena restriksijskom analizom s enzimima *EagI* i *BglIII*. Očekivani su fragmenti veličina 7339 bp, 1770 bp, 1485 bp, 524 bp. Na slici 30 su prikazani rezultati agarozne gel elektroforeze produkata restriksijske analize te je potvrđena prisutnost svih navedenih fragmenata. Dodatna provjera je napravljena umnažanjem dijela konstrukta reakcijom PCR-a te su očekivani fragmenti: 2228 bp, 1838 bp, 1449 bp, 1059 bp, 669 bp i 279 bp (Slika 31). Najveći fragment je slabo vidljiv zbog preferencijalnog umnažanja manjih fragmenata tijekom PCR-a plazmidne DNA s ponavljajućim slijedovima (šest modula sgRNA).



Slika 29. Shematski prikaz finalnog Golden Gate konstrukta (Assembly 2 i 3 / Assembly 6 i 7). Označeni su dijelovi konstrukta potrebni za višestruku ciljanu metilaciju promotora gena BACH2 i IL6ST – promotor Cbh, terminator bGH, puroR (rezistencija na puromicin), protein DNMT3A, protein dCas9 i šest molekula sgRNA (BACH2_sgRNA8, BACH2_sgRNA3, IL6ST_sgRNA2, IL6ST_sgRNA3, BACH2_sgRNA7, BACH2_sgRNA4). Ljubičastom bojom su označene početnice korištene u PCR reakciji provjere konstrukta. Označena je i pozicija enzima korištenih za restriksijsku analizu konstrukta (*EagI*, *EcoRV*).

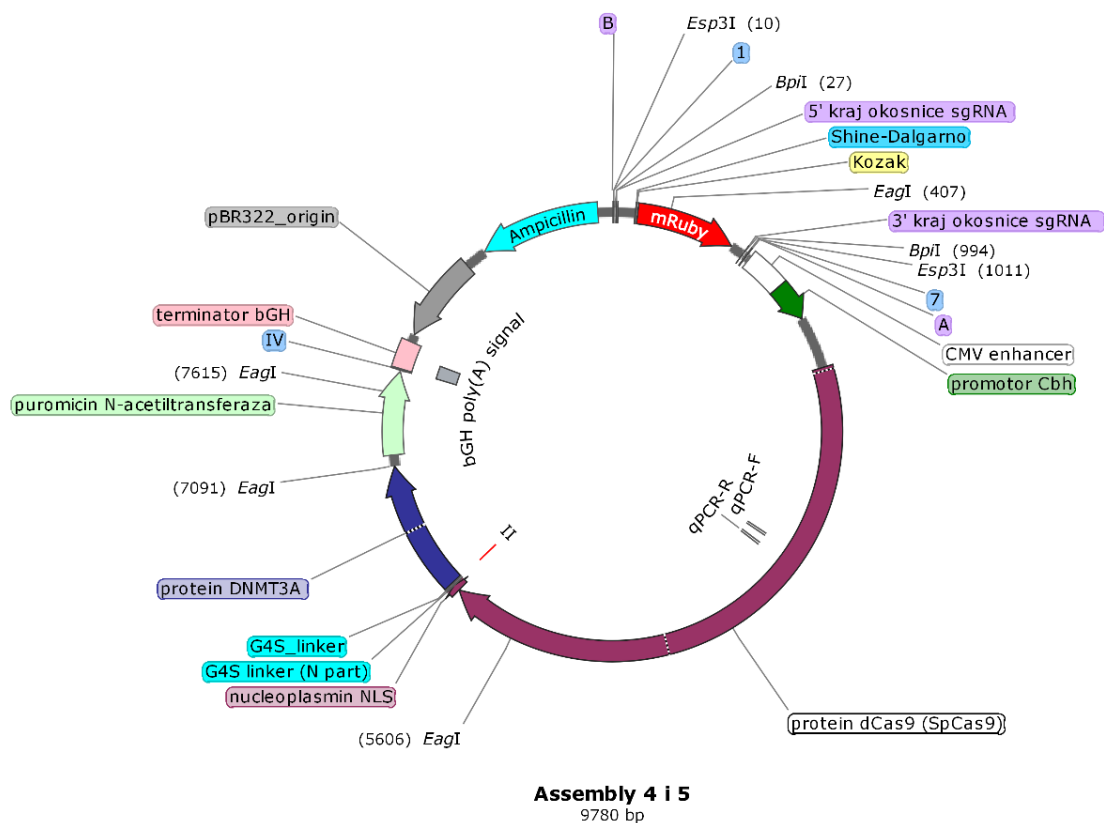


Slika 30. Agarozna gel elektroforeza restriksijske analize konstrukata assembly-ja 2 i 3 s enzimima *EagI* i *EcoRV*. M – ljestvičavi uzorak markera MassRuler DNA Ladder Mix; 1-4 – četiri klona konstrukta assembly-ja 2; 5-8 – četiri klona konstrukta assembly-ja 3. Očekivani su fragmenti veličine: 7339 bp, 1770 bp, 1485 bp, 524 bp.

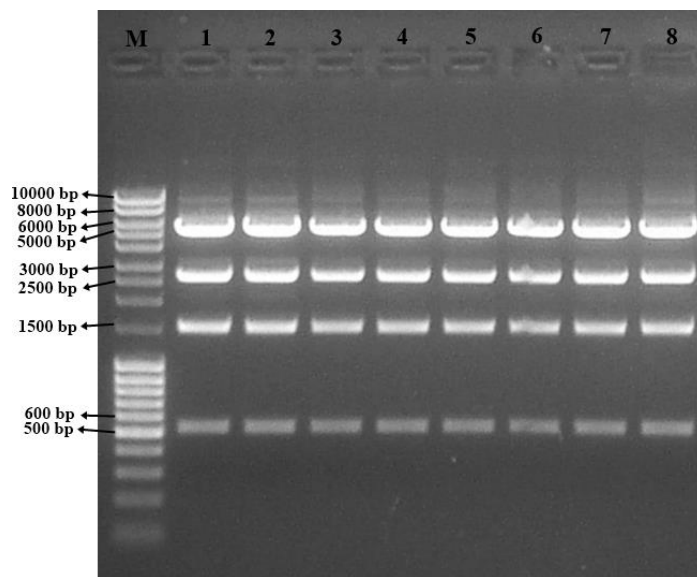


Slika 31. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata umnažanja dijela konstrukta *assembly*-ja 2 i 3 i *assembly*-ja 6 i 7. **M** – ljestvičavi uzorak markera 100 bp DNA Ladder Ready to Load; **1,2,3,4** – četiri klona konstrukta *assembly*-ja 2; **5,6,7,8** – četiri klona konstrukta *assembly*-ja 3; **9,10,11,12** – četiri klona konstrukta *assembly*-a 6; 13,14,15,16 – četiri klona *assembly*-ja 7; **NK** – negativna kontrola. Jedna od korištenih početnica se veže unutar svakog od šest modula sgRNA te je zato očekivano šest fragmenata na gelu: 2228 bp, 1838 bp, 1449 bp, 1059 bp, 669 bp i 279 bp. Klon 1 je odabran za korištenje u *Assembly*-u 2 i 3.

Drugi način slaganja svih modula u plazmid pUC21BB za ciljano uvođenje metilacije molekule DNA na šest različitih pozicija unutar genoma uključuje *assembly*-je 4, 5, 6 i 7. Prvo su sklopljeni svi funkcionalni moduli sustava CRISPR-Cas9 i prazni modul sgRNA (bez molekula sgRNA) plazmida pSg-x6 u plazmidnu okosnicu pUC19BB što je omogućeno cijepanjem svih plazmida koji nose željene module s enzimom *BsaI*. Napravljene su dvije varijante ovog sustava od kojih jedna sadrži modul za aktivni protein DNMT3A (*Assembly* 4), a druga za neaktivni protein DNMT3A (*Assembly* 5). Na slici 32 je prikazan konstrukt s uvedenim modulima. Uspješnost konstrukcije plazmida *assembly*-ja 4 i 5 su provjerene restrikcijском analizom s enzimom *EagI*, a budući da se u konstrukt nalaze četiri restrikcijска mjesta ovog plazmida (Slika 32) očekivana su četiri fragmenta veličine 5199 bp, 2572 bp, 1485 bp i 524 bp. Na slici 33 su prikazani rezultati gel elektroforeze produkata ove analize te su u sva četiri klona *assembly*-ja 4 i 5 prisutni navedeni fragmenti što potvrđuje uspješnost konstrukcije plazmida.

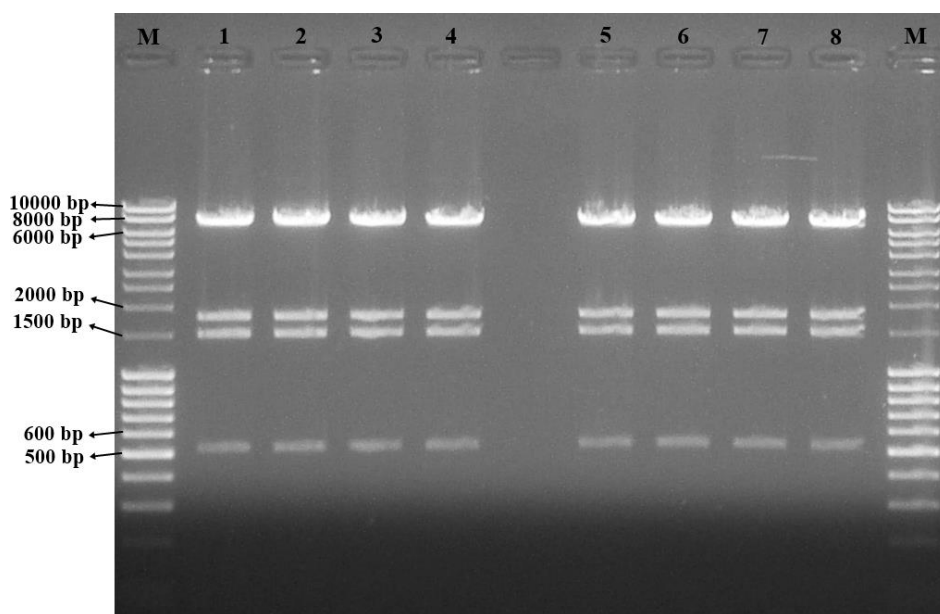


Slika 32. Shematski prikaz konstrukta *assembly*-a 4 i 5. Prikazani su moduli potrebni za višestruku ciljanu metilaciju DNA sustavom CRISPR-Cas9 – promotor Cbh, protein dCas9, protein DNMT3A, puromicin N-acetiltransferata, terminator bGH. Između restrikcijskih mjesta *Esp3I* se nalazi prazan modul sgRNA plazmida pSg-x6 s genom za protein Ruby. Cijepanjem s enzimom *Esp3I* nastaju ljepljivi krajevi 1-7 koji omogućavaju kloniranje šest molekula sgRNA zajedno (*Assembly* 6 i 7).



Slika 33. Agarozna gel elektroforeza produkata restrikcijske analize konstrukta *assembly*-a 4 i 5 s enzimom *EagI*. M – ljestvičavi uzorak markera MassRuler DNA Ladder Mix; 1-4 – četiri klona konstrukta *Assembly*-a 4; 5-8 – četiri klona konstrukta *assembly*-a 5. Očekivani su fragmenti veličine: 5199 bp, 2572 bp, 1485 bp i 524 bp.

Zatim su u konstrukt *assembly*-a 4 i 5 uvedeni moduli sgRNA iz šest plazmida pSgMX-G (od kojih svaki sadrži po jednu sgRNA) zahvaljujući cijepanju navedenih plazmida enzimom *Esp3I*. Dobiveni su *assembly*-ji 6 i 7 koji se razlikuju u modulu DNMT3A, a istovjetni su konstruktima *assembly*-ja 2 i 3, budući da se radi o istom konstrukt koji je dobiven na dva različita načina (Slika 29). Konstrukti *assembly*-ja 6 i 7 su provjereni na isti način kao konstrukti *assembly*-ja 2 i 3, restriksijskom analizom s enzimima *EagI* i *EcoRV* (Slika 34), te reakcijom PCR-a s odgovarajućim početnicama (Slika 31).



Slika 34. Agarozna gel elektroforeza restriksijske analize konstrukata *assembly*-ja 6 i 7 s enzimima *EagI* i *EcoRV*. **M** – ljestvičavi uzorak markera MassRuler DNA Ladder Mix; **1-4** – četiri klona konstrukta *assembly*-ja 6; **5-8** – četiri klona konstrukta *assembly*-ja 7. Očekivani su fragmenti veličine: 7339 bp, 1770 bp, 1485 bp, 524 bp. Rezultati su jednaki rezultatima cijepanja konstrukta *assembly*-ja 2 i 3 s navedenim enzimima (Slika 30).

5. RASPRAVA

Razvojem sustava CRISPR-Cas9 došlo je do njegove višestruke primjene u ciljanom modificiranju genoma i epigenoma. Inaktivacijom proteina Cas9 (točkaste mutacije – D10A u domeni RuvC i H840A u domeni HNH) kojom ovaj protein gubi nukleaznu aktivnost (dCas9) te fuzijom s različitim efektorskim domenama (enzim koji katalizira modifikaciju kromatina ili njegova katalitička domena) omogućeno je modificiranje epigenoma bez stvaranja dvolančanog loma u molekuli DNA (Laufer i Singh, 2015). Vojta i sur. (2016) su razvili molekularni alat za ciljanu metilaciju DNA u genomu sisavaca koji se sastoji od fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A koji je na ciljanu sekvencu navođen molekulama sgRNA. Koristili su više pojedinačnih sgRNA eksprimiranih s različitim plazmidnih vektora te su dokazali da se razina metilacije u promotorima ciljanih gena (*BACH2* i *IL6ST*) povećala i da je to utjecalo na smanjenje aktivnosti transkripcije pripadajućih gena. No, kod kotransfekcije životinjskih stanica s više plazmida istovremeno može se očekivati nejednolika učinkovitost transfekcije, a time i smanjen željeni efekt (u ovom slučaju povećanje stupnja metiliranosti promotora gena) (Sakuma i sur., 2015).

U ovom istraživanju razvijen je modularni ekspresijski sustav za ciljanu metilaciju do šest lokusa u genomu istovremeno sastavljen od okosnice plazmida pUC19BB u koju je uvedeno šest modula sgRNA (sgRNA sa svojim U6 promotorom i U6 terminatorom). Uz module sgRNA u ovaj plazmid su uvedeni i moduli funkcionalnih elemenata potrebni za transfekciju stanica u kulturi i funkcionalnost sustava CRISPR-Cas9 za metilaciju DNA u do šest lokusa unutar promotora gena *BACH2* i *IL6ST*. Spomenuti funkcionalni elementi su promotor Cbh, terminator bGH, rezistencija na puromicin te katalitički inaktivni protein Cas9 (dCas9) povezan preko fleksibilnog linkera na efektorsku domenu – katalitičku domenu proteina DNMT3A. Za slaganje svih navedenih modula u okosnicu plazmida pUC19BB korišteni su enzimi *BpiI*, *BsaI* i *Esp3I* koji pripadaju restriksijskim enzimima IIS *Golden Gate* sustava te omogućavaju sklapanje konstrukta u jednom koraku digestije i ligacije nakon čega se u finalnom konstrukt ne pojavljuju restriksijska mjesta navedenih enzima što omogućava vrlo precizno slaganje više modula u jedan konstrukt (Engler i sur., 2008).

Slaganje krajnjeg konstrukta za višestruku ciljanu metilaciju se temeljilo na tri razine modularnosti. Prvu razinu predstavlja ugradnja šest pojedinačnih sgRNA u plazmide pSgMX-G (X=1-6) koji sadrže modul sgRNA proteina Cas9 bakterije *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) i pSgMX-A (X=1-6) koji sadrže modul sgRNA proteina Cas9 bakterije *Staphylococcus aureus* (SaCas9). Takva ugradnja je omogućena cijepanjem spomenutih vektora unutar modula sgRNA enzimom *BpiI* čije je restriksijsko mjesto dizajnirano tako da odgovara krajevima sekvenci pojedinih

sgRNA. Ovime je sustav proširen mogućnošću upotrebe ne samo jedne, već dvije vrste sgRNA od koji svaka navodi svoj ortolog proteina Cas9 na ciljanu sekvencu. Važno je napomenuti da je za vezanje proteina SpCas9 i SaCas9 na ciljanu sekvencu potrebno postojanje sekvence PAM koja je različita za svaki ortolog čime je povećan broj mogućih mjesta u genomu koji se mogu ciljati. Budući da su tijekom konstrukcije plazmida za umnažanje pojedinačnih sgRNA izvan *BpiI* mjesta umetnuta restrikcijska mjesta enzima *Esp3I* (okružuju modul sgRNA) omogućena je i sljedeća razina modularnosti. Naime, svih šest različitih modula sgRNA je iz pojedinačnih plazmida uvedeno u jedan plazmid (plazmid pSg-x6), a to je omogućeno cijepanjem tih plazmida enzimom *Esp3I* koji ostavlja ljepljive krajeve dizajnirane tako da omoguće slaganje modula sgRNA u točno određenom redoslijedu. Takav konstrukt omogućava istovremeno ciljanje više lokusa u genomu ili susjedna mjesta unutar jednog lokusa. Iako je u ovom istraživanju napravljen konstrukt sa šest modula sgRNA, postupak konstrukcije sustava s manjim brojem modula sgRNA je isti, samo što bi se umjesto plazmida pSg-x6 koristio neki drugi plazmid pSg-xN (N=1-6), ovisno o tome o koliko se modula sgRNA radi. Tako bi se npr. za ciljanje četiri umjesto šest lokusa u genomu koristile četiri sgRNA, a sukladno tome i plazmid pSg-x4 umjesto plazmida pSg-x6. Konačno, treća razina modularnosti je određena enzimom *BsaI* čije je restrikcijsko mjesto unutar plazmida pSg-x6 uvedeno tako da okružuje mjesta enzima *Esp3I*. To omogućava izrezivanje svih šest modula sgRNA zajedno te njihovo uvođenje u ekspresijski plazmid (pUC19BB) skupa s modulima funkcionalnih elemenata (koji su u svojim pripadajućim plazmidima također bili okruženi restrikcijskim mjestima enzima *BsaI*). U ovom istraživanju je konstruiran ekspresijski plazmid s funkcionalnim elementima za višestruku ciljanu metilaciju, no umjesto modula DNMT3A se može upotrijebiti modul bilo kojeg drugog efektor (npr. katalitička domena proteina TET1, KRAB, VP64,...) što za posljedicu ima različite učinke na aktivnost transkripcije ciljanih gena ovisno o tome koji efektor se koristi. Također, umjesto modula za rezistenciju na puromicin može se upotrijebiti modul za rezistenciju na neki drugi antibiotik, ali i fluorescentni protein (npr. EGFP) za vizualizaciju mjesta na kojima su unesene promjene u genomu ovim sustavom. Modularni sustav je napravljen po uzoru na Sakuma i sur. (2015), no za razliku od njihovog, ovaj omogućava korištenje dva umjesto jednog ortologa proteina Cas9 te sadrži tri razine modularnosti u odnosu na njihove dvije razine (njihov sustav ne uključuje slaganje modula funkcionalnih domena s modulima sgRNA u jedan konstrukt).

Ekspresijski plazmid pUC19BB sa svim modulima je konstruiran na dva različita načina te su se oba pokazala uspješnima, odnosno dala su jednak krajnji konstrukt (*Assembly 2 i 3/Assembly 6 i 7*). Jedan od načina je već opisan, uključuje kloniranje pojedinačnih modula sgRNA u plazmide (pSgMX) iz kojih su zatim svi moduli sgRNA zajedno uvedeni u plazmid pSg-x6, a nakon toga u plazmidnu okosnicu pUC19BB s ostalim funkcionalnim modulima. Drugi način konstrukcije se razlikovao u tome

što je preskočen korak sklapanja svih šest modula sgRNA zajedno u jedan plazmid prije uvođenja u plazmid pUC19BB. Umjesto toga, svi funkcionalni moduli zajedno s praznim modulom sgRNA plazmida pSg-x6 su uvedeni u pUC19BB (cijepanje enzimom *BsaI*) nakon čega su cijepanjem ovog plazmida i pojedinačnih pSgMX plazmida (s kloniranim sgRNA) enzimom *Esp3I* uvedeni i moduli sgRNA. Svrha ovog načina sklapanja konstrukta bila je provjeriti može li se u već složen veliki konstrukt (pUC19BB s modulima funkcionalnih elemenata i praznim modulom sgRNA) jednim *Golden Gate* enzimom (*BsaI*) uvesti dodatni moduli (šest sgRNA) pomoću drugog *Golden Gate* enzima (*Esp3I*).

Kako je ovo istraživanje uključivalo samo konstrukciju modularnog sustava za ciljanje do šest mjesta unutar promotora gena *BACH2* i *IL6ST*, u budućim istraživanjima je potrebno napraviti funkcionalnu validaciju ovog sustava, tj. transfekciju stanica u kulturi krajnjim *Golden Gate* konstruktom, izolaciju DNA iz stanica, PCR reakciju za umnažanje bisulfitno konvertirane DNA te pirosekvenciranje dobivenog fragmenta. Nakon analize rezultata pirosekvenciranja moglo bi se zaključiti je li konstrukt ovog modularnog sustava utjecao na stupanj metiliranosti unutar lokusa promotora gena *BACH2* i *IL6ST*. Važno je napomenuti da je ovaj konstrukt napravljen u dva oblika od kojih jedan sadrži aktivni oblik proteina DNMT3A (*Assembly 2/Assembly 6*), a drugi neaktivni oblik proteina DNMT3A dobiven supstitucijom E756A (*Assembly 3/Assembly 7*). Konstrukt s neaktivnim oblikom proteina DNMT3A bi služio kao kontrola za provjeru utjecaja samog vezanja konstrukta dCas9-DNMT3A na ekspresiju gena *BACH2* i *IL6ST*.

6. ZAKLJUČAK

- Uspješno su konstruirani plazmidi pSgMX-G i pSgMX-A za kloniranje pojedinačnih sgRNA dva ortologa proteina Cas9 (Cas9 bakterije *Streptococcus pyogenes* i Cas9 bakterije *Staphylococcus aureus*)
- Uspješno su konstruirani plazmidi pSg-xN za kloniranje različitog broja sgRNA zajedno (najmanje jedna, najviše šest sgRNA)
- Metodom *Golden Gate* je uspješno konstruiran sustav za ekspresiju do šest sgRNA zajedno sa svim modulima funkcionalnih elemenata za ciljanu metilaciju do šest lokusa unutar promotora gena *BACH2* i *IL6ST* (promotor Cbh, terminator bGH, fuzijskim protein dCas9-DNMT3A, otpornost na puromicin) temeljen na sustavu CRISPR-Cas9
- Ovakav sustav olakšava istovremeno višestruko ciljanje od jednog do šest različitih lokusa u genomu, ovisno o potrebama istraživanja te korištenje čak dvije vrste sgRNA (za navođenje proteina Cas9 bakterije *Streptococcus pyogenes* i proteina Cas9 bakterije *Staphylococcus aureus*)
- U budućim istraživanjima je potrebno napraviti funkcionalnu validaciju ovog sustava, odnosno finalnim ekspresijskim konstruktom transfecirati stanice u kulturi te provjeriti njegov utjecaj na stupanj metilacije promotora gena *BACH2* i *IL6ST* unutar ciljanih lokusa

7. LITERATURA

- Amitai G, Sorek R (2016). CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nat Rev Microbiol* **14**: 67–76.
- Chen B, Hu J, Almeida R, Liu H, Balakrishnan S, Covill-Cooke C, i sur. (2016). Expanding the CRISPR imaging toolset with *Staphylococcus aureus* Cas9 for simultaneous imaging of multiple genomic loci. *Nucleic Acids Res* **44**: e75.
- Chen L, Tang L, Xiang H, Jin L, Li Q, Dong Y, i sur. (2014). Advances in genome editing technology and its promising application in evolutionary and ecological studies. *Gigascience* **3**: 24.
- Cheng X, Blumenthal RM (2008). Mammalian DNA Methyltransferases: A Structural Perspective. *Science (80-)* **16**: 341–350.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Hsu PD, i sur. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/VCas Systems. *Science (80-)* **339**: 819–823.
- Engler C, Kandzia R, Marillonnet S (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* **3**: 11.
- Friedland AE, Baral R, Singhal P, Loveluck K, Shen S, Sanchez M, i sur. (2015). Characterization of *Staphylococcus aureus* Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. *Genome Biol* **16**: 257.
- Gaj T, Gersbach CA., Barbas CF (2014). ZFN, TALEN and CRISPR/Cas based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* **31**: 397–405.
- Groote ML De, Verschure PJ, Rots MG (2012). Epigenetic Editing: Targeted rewriting of epigenetic marks to modulate expression of selected target genes. *Nucleic Acids Res* **40**: 10596–10613.
- Handy D, Castro R, Loscalzo J (2011). Epigenetic Modifications Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. *Circulation* **123**: 2145–2156.
- Hilton IB, Vockley CM, Pratiksha I, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach C a, i sur. (2015). Activates Genes From Promoters and Enhancers. *Nat Biotechnol* **33**: 510–517.
- Jin B, Li Y, Robertson KD (2011). DNA methylation: Superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes and Cancer* **2**: 607–617.
- Kabadi AM, Ousterout DG, Hilton IB, Gersbach CA (2014). Multiplex CRISPR/Cas9-based genome

- engineering from a single lentiviral vector. *Nucleic Acids Res* **42**: 1–11.
- 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.
- Köferle A, Stricker SH, Beck S (2015). Brave new epigenomes: the dawn of epigenetic engineering. *Genome Med* **7**: 59.
- Laufer BI, Singh SM (2015). Strategies for precision modulation of gene expression by epigenome editing: an overview. *Epigenetics Chromatin* **8**: 34.
- Liu XS, Wu H, Ji X, Stelzer Y, Wu X, Czauderna S, et al. (2016). Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell* **167**: 233–247.e17.
- Mali P, Esvelt KM, Church GM (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* **10**: 957–963.
- Marraffini LA (2016). The CRISPR-Cas system of *Streptococcus pyogenes*: function and applications. *Streptococcus pyogenes Basic Biol to Clin Manifestations* 1–13at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27077169>>.
- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, et al. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* **156**: 935–949.
- Osakabe Y, Osakabe K (2015). Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant Cell Physiol* **56**: 389–400.
- Ota S, Hisano Y, Ikawa Y, Kawahara A (2014). Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Genes to Cells* **19**: 555–564.
- Park M, Keung AJ, Khalil AS (2016). The epigenome: the next substrate for engineering. *Genome Biol* **17**: 183.
- Patrick HD, Eric LS, Zhang F (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering Patrick. *Cell* **157**: 1262–1278.
- Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, et al. (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* **520**: 186–191.
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, 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**: 119–128.
- Rocha-Martins M, Cavalheiro GR, Matos-Rodrigues GE, Martins RAP (2015). From gene targeting to genome editing: Transgenic animals applications and beyond. *An Acad Bras Cienc* **87**: 1323–1348.
- Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K, Yamamoto T (2015). Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Sci Rep* **4**: 5400.
- Thakore PI, Song L, Safi A, Shivakumar K, Kabadi AM, Reddy TE, i sur. (2016). Highly Specific Epigenome Editing by CRISPR/Cas9 Repressors for Silencing of Distal Regulatory Elements. *Nat Methods* **12**: 1143–1149.
- Vojta A, Dobrinic P, Tadic V, Bockor L, Korac P, Julg B, i sur. (2016). Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Res* **44**: 5615–5628.
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, i sur. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell* **153**: 910–918.
- Xie K, Minkenberg B, Yang Y (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 3570–3575.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Ime i prezime: Lucija Jukić
Datum i mjesto rođenja: 01.03.1994., Zadar
Adresa prebivališta: dr.Franje Tuđmana 26, Seline 23244, Hrvatska

OBRAZOVANJE

rujan 2015.- sada Diplomski studij molekularne biologije, Sveučilište u Zagrebu,
Prirodoslovno-Matematički fakultet, Biološki odsjek

rujan 2012.- rujan 2015. Preddiplomski studij molekularne biologije, Sveučilište u
Zagrebu, Prirodoslovno-Matematički fakultet, Biološki odsjek
(Sveučilišni prvostupnik molekularne biologije)

rujan 2008. – srpanj 2012. Gimnazija Vladimira Nazora, opći smjer; Zadar

PROJEKTI

ožujak 2017. – sada Diplomski rad na Zavodu za molekularnu biologiju,
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-Matematički fakultet, Biološki
odsjek (Konstrukcija modularnog sustava višestrukih sgRNA za
istovremeno ciljanje nekoliko lokusa tehnologijom CRISPR–Cas9)

rujan 2015. Završni rad na Zavodu za molekularnu biologiju,
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-Matematički fakultet, Biološki
Odsjek (Forenzička analiza kostiju i zubi)

RADNO ISKUSTVO

- ožujak 2017. - travanj 2017. Laboratorijska stručna praksa (Citogenetski laboratorij –
Klinika za ginekologiju i porodništvo, Klinička bolnica „Sveti
Duh“, Zagreb; Voditelj: Izv.prof.dr.sc. F. Stipoljev)
- ožujak 2015. – lipanj 2015. Laboratorijska stručna praksa (Laboratorij za epigenetiku –
Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb;
voditelj: Prof.dr.sc. V. Zoldoš)

PROJEKTI I OSTALO

- Rujan 2016. Popularno-znanstvena manifestacija „5. Znanstveni piknik“ (Zagreb)
- Aktivno sudjelovanje (volonter)
- Lipanj 2016. Popularno-znanstvena manifestacija „Dan za znanost“ (Koprivnica)
- Aktivno sudjelovanje (prezentiranje u sklopu radionice)
- Travanj 2016. Popularno-znanstvena manifestacija „9. Noć Biologije“ (Zagreb)
- Aktivno sudjelovanje (organizacija i izrada radionice)
- Studeni 2015. Smotra Sveučilišta (Zagreb)
- Aktivno sudjelovanje
- Lipanj 2015. 9. Međunarodna Konferencija ISABS
(International Society for Applied Biological Science; Bol na Braču)
- Suorganizator
- Svibanj 2015. Prvi Simpozij studenata bioloških usmjerenja (Zagreb)
- Suorganizator

