

Primjena molekularnih alata CRISPR/TET1-dSaCas9 i CRISPR/VPR-dSpCas9 u reaktivaciji gena HNF1A

Vujić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:706758>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ana Vujić

Primjena molekularnih alata CRISPR/TET1-dSaCas9 i CRISPR/VPR-
dSpCas9 u reaktivaciji gena *HNF1A*

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Marije Klasić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš na podršci koju mi je pružila tijekom izrade ovog rada kao i na ukazanom povjerenju da budem dio istraživačke grupe Laboratorija za epigenetiku. Hvala na razumijevanju, strpljenju, na svim korisnim savjetima i izdvojenom vremenu.

Veliko hvala dr. sc. Mariji Klasić uz koju sam stekla znanja i vještine potrebne za samostalan rad u laboratoriju. Hvala na svim nezamjenjivim savjetima i velikom doprinosu u izradi ovog diplomskog rada, na strpljivom odgovaranju na sva moja pitanja i nedoumice, na pristupačnosti i razumijevanju.

Hvala mag. biol. mol. Goranu Josipoviću, mag. biol. mol. Aniki Mijakovac te mag. biol. mol. Samiri Smajlović koji su uvijek bili spremni pomoći s korisnim savjetima i odgovorima na moja pitanja.

Od srca se zahvaljujem svim mojim prijateljima koji su sa mnom proživljavali najljepše trenutke i tješili me u onim najtežim. Hvala na svim prekrasnim uspomenama i što ste mi uljepšali studentske dane.

Posebno hvala mojim roditeljima Zorici i Grgi te mojoj sestri Sofiji. Hvala na beskompromisnoj podršci i bezuvjetnoj ljubavi. Hvala što ste uvijek bili uz mene, kako u dobrim tako i u lošim trenucima i što ste vjerovali u mene čak i onda kada ja nisam. Hvala za sve što ste žrtvovali kako bi mi omogućili da budem tu gdje jesam, a da pritom ništa niste tražili zauzvrat.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek
Diplomski rad

Primjena molekularnih alata CRISPR/TET1-dSaCas9 i CRISPR/VPR-dSpCas9 u reaktivaciji gena *HNFI1A*
Ana Vujić
Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Modifikacija sustava CRISPR-Cas9 uvođenjem deaktivirane endonukleaze Cas9 (dCas9), te vezanjem za nju katalitičkih domena epigenetičkih modifikatora i/ili transkripcijskih represora i aktivatora, omogućila je ciljanu manipulaciju epigenoma i ekspresije gena. Upotreba ortologa dCas9 te više sgRNA omogućava istovremenu manipulaciju više različitih gena i/ili epigenetičkih oznaka. Fuzija katalitičke domene enzima TET1 (od eng. *Ten-eleven translocation*) s dCas9 omogućava ciljanu demetilaciju DNA što rezultira povećanjem u ekspresiji gena dok fuzija transkripcijskog aktivatora VPR s dCas9 direktno utječe na aktivaciju gena. Cilj ovog istraživanja bio je izraditi testove za analizu metilacije DNA metodom bisulfitnog pirosekvenciranja kojima će se analizirati metilacija u CpG mjestima smještenim uzvodno i nizvodno od regulatorne regije gena *HNFI1A* ciljane s fuzioniranim proteinima TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9 u stanicama HEK293. Pokazala sam da dolazi do smanjenja stupnja metilacije u CpG mjestima smještenim uzvodno i nizvodno od ciljane regije nakon transfekcije stanica fuzijom TET1-dSaCas9 te dvostruke transfekcije stanica fuzijama TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9. Metodom kvantitativnog PCR-a utvrdila sam da su TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9 uzrokovali povećanje transkripcijske aktivnosti gena *HNFI1A*, a njihovo zajedničko djelovanje inducira dugotrajniji efekt na transkripcijsku aktivnost.

(67 stranica, 20 slika, 2 tablice, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: CRISPR/dCas9, gen *HNFI1A*, TET1, VPR, CpG demetilacija

Voditelj: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš
Neposredni voditelj: dr. sc. Marija Klasić
Ocjenitelji: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš
izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević
prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

Rad prihvaćen: 31. listopada 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology
Graduation Thesis

Application of CRISPR/TET1-dSaCas9 and CRISPR/VPR-dSpCas9 molecular tools for reactivation of *HNF1A* gene

Ana Vujić

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Modification of the CRISPR-Cas9 system by introducing deactivated Cas9 endonuclease (dCas9) and binding the catalytic domains of epigenetic modifiers and/or transcriptional repressors and activators to it, enabled targeted manipulation of the epigenome and gene expression. The use of the dCas9 orthologs and multiple sgRNAs allows simultaneous manipulation of multiple different genes and/or epigenetic marks. The fusion of the catalytic domain of the TET1 (Ten-eleven translocation) enzyme with dCas9 allows targeted DNA demethylation resulting in an increase in gene expression, while the fusion of the VPR transcriptional activator with dCas9 directly affects gene activation. The aim of this study was to design assays for DNA methylation analysis by bisulfite pyrosequencing that would analyze methylation at CpG sites located upstream and downstream of the regulatory region of the *HNF1A* gene targeted by TET1-dSaCas9 and VPR-dSpCas9 fusion proteins in HEK293 cells. I have shown that there is a decrease in the degree of methylation in CpG sites located upstream and downstream of the target region after the transfection of cells with TET1-dSaCas9 fusion and double transfection with TET1-dSaCas9 and VPR-dSpCas9 fusions. By using a quantitative PCR method, I have found that TET1-dSaCas9 and VPR-dSpCas9 caused an increase in the transcriptional activity of the *HNF1A* gene and their joint action induced a long-lasting effect on transcriptional activity.

(67 pages, 20 figures, 2 tables, 46 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: CRISPR/dCas9, *HNF1A* gene, TET1, VPR, CpG demethylation

Supervisor: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Assistant supervisor: dr. sc. Marija Klasić

Reviewers: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević

prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

Thesis accepted: October 31st, 2019

Sadržaj

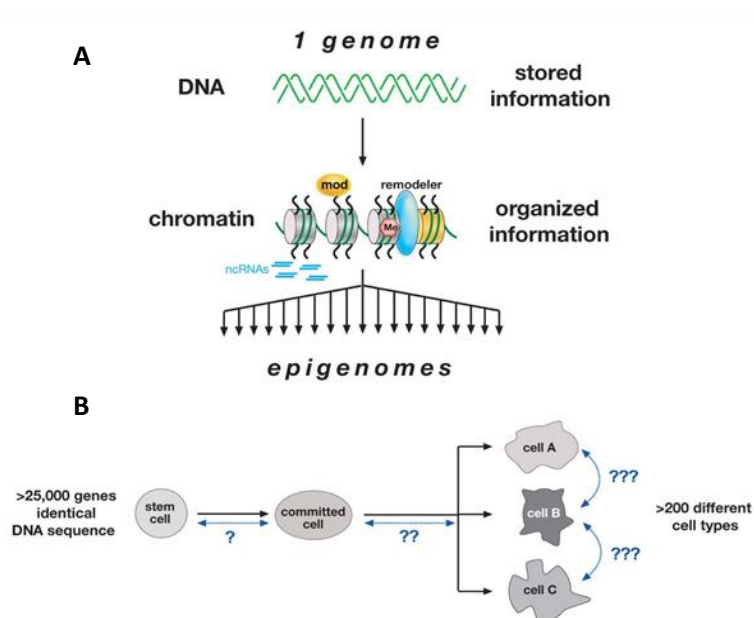
| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Epigenetički mehanizmi | 1 |
| 1.1.1. Metilacija DNA | 5 |
| 1.2. Sustav CRISPR/Cas9 u regulaciji genoma i uređivanju epigenoma | 9 |
| 1.2.1. Sustav CRISPR/dCas9 u utišavanju (CRISPRi) i aktivaciji (CRISPRa) gena | 12 |
| 1.2.2. Sustav CRISPR/dCas9 u modifikaciji epigenoma..... | 13 |
| 1.3. Gen <i>HNF1A</i> | 15 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA..... | 18 |
| 3. MATERIJAL I METODE..... | 19 |
| 3.1. Materijal | 19 |
| 3.2. Metode..... | 20 |
| 3.2.1. Transfekcija stanica HEK293 i održavanje stanica u kulturi..... | 20 |
| 3.2.2. Izrada testova za bisulfitno pirosekvenciranje i određivanje stupnja CpG metilacije metodom bisulfitnog pirosekvenciranja | 24 |
| 3.2.2.1. Izolacija ukupne genomske DNA iz transficiranih stanica HEK293 | 24 |
| 3.2.2.2. Bisulfitna konverzija ukupne genomske DNA izolirane iz transficiranih stanica HEK293 | 25 |
| 3.2.2.3. Dizajn početnica | 25 |
| 3.2.2.4. Provjera početnica i optimizacija uvjeta reakcije PCR | 26 |
| 3.2.2.5. Izrada testova za pirosekvenciranje i optimizacija uvjeta reakcije bisulfitnog pirosekvenciranja..... | 27 |
| 3.2.2.6. Analiza metilacije CpG mjesta smještenih uzvodno i nizvodno od 4 regulatorna CpG mjesta gena <i>HNF1A</i> u transficiranim stanicama HEK293 | 29 |
| 3.2.3. Izolacija ukupne RNA iz transficiranih stanica HEK293..... | 30 |
| 3.2.4. Reverzna transkripcija RNA izolirane iz transficiranih stanica HEK293 | 31 |
| 3.2.5. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR)..... | 31 |
| 4. REZULTATI..... | 33 |
| 4.1. Transfekcija stanica HEK293..... | 33 |
| 4.2. Dizajn testova za bisulfitno pirosekvenciranje i određivanje stupnja CpG metilacije metodom bisulfitnog pirosekvenciranja | 33 |
| 4.2.1. Dizajn početnica i optimizacija uvjeta reakcije PCR | 33 |
| 4.2.2. Izrada testova za pirosekvenciranje i optimizacija uvjeta reakcije bisulfitnog pirosekvenciranja..... | 35 |

| | |
|--|----|
| 4.2.3. Stupanj metilacije u CpG mjestima smještenim uzvodno i nizvodno od 4 regulatorna CpG mjesta gena <i>HNF1A</i> | 38 |
| 4.3. Analiza ekspresije gena <i>HNF1A</i> metodom qPCR | 54 |
| 5. RASPRAVA..... | 57 |
| 6. ZAKLJUČAK | 61 |
| 7. LITERATURA..... | 62 |
| 8. ŽIVOTOPIS | 67 |

1. UVOD

1.1. Epigenetički mehanizmi

Pojam epigenetike se odnosi na mitotski i mejotski nasljedne promjene u funkciji gena bez promjene u sekvenci DNA. Prema molekularno-mehanističkoj definiciji, epigenetika objašnjava ukupni skup promjena kromatinskog kalupa koje zajedno ostvaruju i propagiraju različiti uzorak ekspresije i utišavanja gena unutar istog genoma. Glavni epigenetički mehanizmi prisutni unutar stanice su: posttranslacijske modifikacije histona, zamjena kanonskih histona histonskim varijantama, metilacija DNA, remodeliranje kromatina, djelovanje malih nekodirajućih RNA i arhitektura jezgre. Uspostavljanje specifičnih epigenetičkih mehanizama u stanici zahtijeva koordinirano djelovanje brojnih enzima odgovornih za uvođenje (tzv. „pisači“), uklanjanje (tzv. „brisači“) i prepoznavanje (tzv. „čitači“) epigenetičkih modifikacija. Epigenetičke modifikacije uspostavljaju se u embrionalno doba te određuju epigenome različitih tipova stanica koji se nasljeđuju mitozom. Takvo epigenetičko „programiranje“ rezultira time da od oplođene jajne stanice s jednim genomom nastaje više od 200 tipova stanica s različitim epigenomima. Iako se mitotski nasljeđuju, u odrasloj dobi jedinke epigenetičke modifikacije postaju sklone reverzibilnim promjenama uslijed odgovora na vanjske i unutarnje okolišne uvjete (Slika 1.) (Allis i sur. 2015, Tollervey i Lunyak 2012).



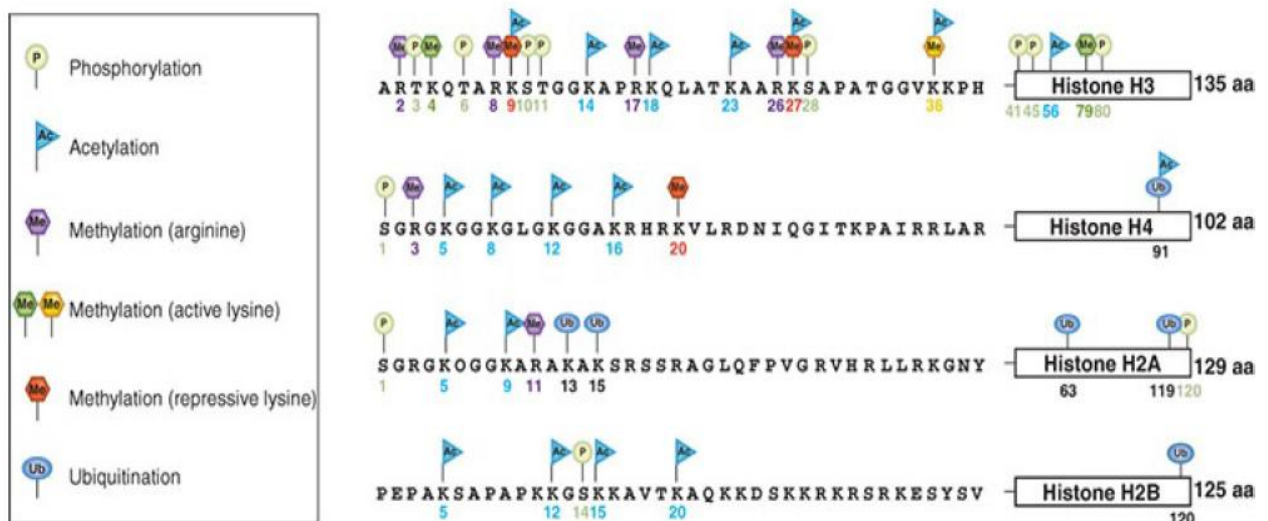
Slika 1. Epigenetičke modifikacije kroz razvoj jedinke. (A) Genom – identična sekvenca DNA svih stanica jedne jedinke. Epigenom – ukupna kompozicija kromatinskih modifikacija koja označava genom određenog tipa stanice. Mijenja se s obzirom na stanični tip i kao odgovor na vanjske i unutarnje okolišne uvjete.

(B) Različiti epigenomi uspostavljaju se tijekom razvoja u višestaničnom organizmu kako diferencijacija napreduje iz jedne matične stanice (od eng. *stem cell*) u predeterminiranu stanicu (na slici – *committed cell*). Reverzija diferencijacije ili promjena identiteta staničnog tipa (plave linije) zahtijeva reprogramiranje epigenoma određene stanice. (Preuzeto i prilagođeno prema Allis i sur. 2015)

Kromatin je dinamični polimer i njegovo stanje određuje aktivnost nekog genomskog područja. Tako heterokromatin predstavlja visoko kompaktan i kondenziran tip kromatina koji je povezan s transkripcijski represivnim stanjem dok se eukromatin, dekonenziran i otvoren tip kromatina, povezuje s transkripcijski aktivnim stanjem određenog genomskog područja. Glavna jedinica kromatina je nukleosom. Nukleosom čini 147 pb DNA omotane oko oktamerne jezgre histonskih proteina. Histonski proteini su mali bazični proteini visoko konzervirani u animalnim stanicama. Oktamerna jezgra sastoji se od tetramera histona H3 i H4 te od dva dimera histona H2A i H2B. Histonski protein H1 povezuje dva nukleosoma i uključen je u organizaciju viših stupnjeva kromatina. Svi histonski proteini imaju C-globularnu domenu i nestrukturirane N-terminalne krajeve koji izlaze iz nukleosomne strukture i mjesta su posttranslacijskih histonskih modifikacija (Allis i sur. 2015, Kim i sur. 2008).

Do danas su otkrivene i okarakterizirane mnoge histonske modifikacije: acetilacija, fosforilacija, metilacija, ADP-ribozilacija, O-GlcNaclizacija, ubikvitinizacija, sumoilacija (Slika 2.). Transkripcijski status nekog kromatinskog područja određen je uzorkom kombinacije posttranslacijskih modifikacija koje kontroliraju jedna drugu i čine histonski kod u određenom genomskom području (Allis i sur. 2015, Tollervey i Lunyak 2012). Acetilacija lizina u histonima H3 i H4 te fosforilacija serina u histonu H3, mijenja ukupan pozitivan naboj histonskih repova i na taj način mijenja strukturu kromatina i dostupnost transkripcijskoj mašineriji. Dodatak acetilne skupine na N-terminalne krajeve histona kataliziraju različite histonske acetiltransferaze (HAT) dok enzimi iz porodice kinaza kataliziraju dodatak fosfatne skupine. Suprotno njima, histonske deacetilaze (HDAC) uklanjaju acetilnu skupinu s nukleosoma, a fosfataze uklanjaju fosfatnu skupinu. Acetilacija i fosforilacija su histonske modifikacije povezane s otvorenim stanjem kromatina. S druge strane, metilacija na lizinima i argininima na histonima H3 i H4, ovisno o poziciji i broju metilnih skupina na N-terminalnim krajevima, može biti povezana ili s transkripcijski aktivnim ili utišanim stanjem kromatina. Do danas su otkriveni brojni enzimi koji dodaju metilnu skupinu na nukleosome, a pripadaju porodici histonskih metiltransferaza kao npr. histon lizin metiltransferaza (HKMT) i protein arginin metiltransferaza (PRMT). Razne

demetilaze su pak uključene u uklanjanje metilnih skupina te im pripadaju lizin specifična demetilaza (LSD1) i Juomnji histon demetilaza (JHMD1). Karakteristične posttranslacijske modifikacije histona povezane s otvorenim i transkripcijski aktivnim eukromatinom su: H3K4me3, H3K9ac, H3K36me, a modifikacije povezane s utišanim i zatvorenim heterokromatinom su H3K9me3 i H3K27me3. Osim kroz promjenu naboja i fizikalnih svojstava kromatina, histonske modifikacije mijenjaju transkripcijsko stanje kromatina kroz regrutaciju proteina „čitača“ koji sadrže domene za prepoznavanje specifičnih histonskih modifikacija. Proteini koji sadrže bromodomenu prepoznaju acetilnu skupinu, a proteini s kromodomenom prepoznaju metilnu skupinu. Kompleksi koji su uključeni u remodeliranje kromatina često sadrže bromo- ili kromodomena (Allis i sur. 2015, Goldberg i sur. 2007, Tollervey i Lunayk 2012).



Slika 2. Mjesta posttranslacijskih modifikacija N-terminalnih krajeva histona. Dio modifikacija se odvija i u globularnim domena, dok se najviše modifikacija odvija na N-terminusima histona. Aktivne histonske oznake uključuju acetilaciju (Ac, plava zastavica), metilaciju arginina (Me, ljubičasti heksagon) i nekih lizina kao H3K4 (Me, zeleni heksagon) i H3K36 (Me, žuti heksagon). Represivne oznake uključuju metilaciju na H3K9, H3K27 i H4K20 (Me, crveni heksagon). (Preuzeto i prilagođeno prema Allis i sur. 2015)

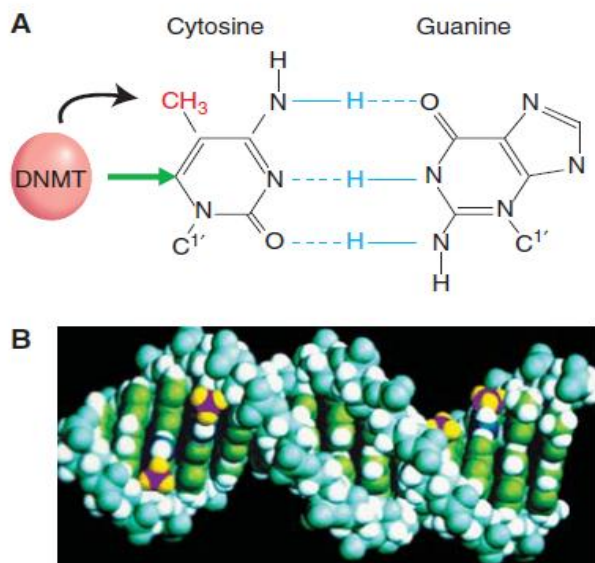
Kromatinski remodelirajući kompleksi koriste energiju nastalu hidrolizom ATP-a za promjenu strukture i kompozicije kromatina. Prema ATPaznoj jedinici, kompleksi koji remodeliraju kromatin dijele se u tri porodice: SWI/SNF2, ISWI i Mi2/NuRD. Mijenjaju strukturu kromatina kroz mobilizaciju nukleosoma ili kroz zamjenu kanonskih histona s histonskim varijantama. (Allis i sur. 2015, Kim i sur. 2008). Postoji nekoliko histonskih varijanti za sve kanonske histone osim za histon H4. CENP-A je histonska varijanta histona H3 lokalizirana u centromernom području te je nužna za formiranje kinetohora i ispravnu

segregaciju kromosoma. Osim CENP-A, postoje varijante histona H3 kao što je H3.3. koji je prisutan u transkripcijski aktivnim genima. Varijante histona H2 su H2A.Z povezana s aktivnim stanjem gena, te macroH2A, zastupljen u područjima inaktivnog kromosoma X ženki sisavaca, te H2A-X koji se ugrađuje na mjesta u kojima je došlo do dvolančanog loma u molekuli DNA (Allis i sur. 2015).

Razne klase nekodirajućih molekula RNA, od raznih klasa malih do velikih nekodirajućih RNA (lncRNA, od eng. *long non-coding RNA*), pokazale su se kao ključni regulator ekspresije gena i genomske stabilnosti. Male nekodirajuće siRNA (od eng. *small-interfering RNA*) modificiraju kromatinsku strukturu i utišavaju transkripciju usmjeravanjem kompleksa koji sadrži proteine Argonaut na komplementarne nascentne transkripte RNA i zatim posreduju regrutaciju histonskih metiltransferaza i DNA metiltransferaza te mijenjaju ekspresiju gena putem procesa RNA interferencije (RNAi). Vrlo često proces RNAi posreduje u metilaciji DNA i metilaciji histona. U biljne vrste *Arabidopsis thaliana*, siRNA velike 24 nukleotida usmjeravaju metilaciju *de novo* i održavanje uzorka metilacije DNA u asimetričnim mjestima CpNpN na način koji je ovisan o dvije polimeraze karakteristične za biljke, RNA polimeraze IV i RNA polimeraze V. Ovaj put metilacije DNA se naziva metilacija usmjerena molekulama RNA (RdDm, od eng. *RNA-directed DNA methylation*). No, molekule RNA mogu utjecati na ekspresiju gena i putem koji se razlikuje od puta RNA interferencije. Neke molekule lncRNA, pa čak i mRNA sadrže signale koji regrutiraju kromatinske remodelirajuće komplekse neovisno od puta siRNA. U ženki sisavaca male Xist RNA oblažu čitav kromosom X i sudjeluju u njegovoj inaktivaciji (Holoach i Moazed, 2015). Pozicija gena u trodimenzionalnoj strukturi jezgre također predstavlja jednu razinu epigenetičke regulacije. Tako je aktivacija gena povezana sa stvaranjem omći koje izlaze iz kromosomskih u interkromosomska područja. Genomska područja koja se prepisuju kolokaliziraju s jezgrinim domenama bogatim RNA polimerazom II. Sama pozicija gena pokazuje da su aktivni geni lokalizirani više u unutrašnjosti jezgre u odnosu na inaktivne gene koji se preferentno pozicioniraju na periferiji jezgre (Luco i sur. 2008).

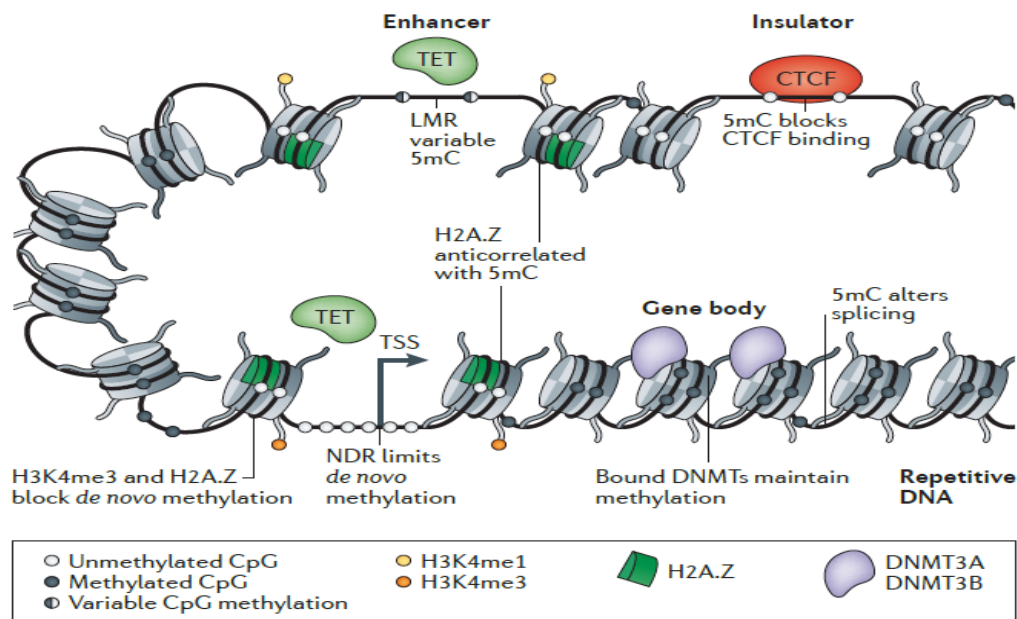
1.1.1. Metilacija DNA

Metilacija DNA je najbolje okarakterizirana epigenetička modifikacija uključena u brojne procese kao što su utišavanje transpozona, regulacija ekspresije gena, genomski imprinting, inaktivacija kromosoma X. Odnosi se na kovalentno vezanje metilne skupine na peti atom citozina u molekuli DNA i označava se kao 5mC (Slika 3.). Metilacija se u sisavaca uglavnom odvija unutar CpG dinukleotida, a u biljaka se odvija i u mjestima CpNpG i asimetričnim mjestima CpNpN (Li i Zhang 2014, Du i sur. 2015). U somatskim stanicama sisavaca, metilirano je 70% do 80% svih CpG mjesta u genomu, stoga se smatra da je genom sisavaca hipermetiliran. Studije mapiranja su pokazale da hipermetilirane sekvence uključuju satelitnu DNA, ponavljajuće elemente, neponavljajuću intergensku DNA i egzone gena. Uzorak metilacije se u sisavaca uspostavlja tijekom embrionalnog razvoja metilacijom *de novo* i kataliziraju je enzimi iz porodice DNA metiltransferaza DNMT3A i DNMT3B. Metilacija citozina je oznaka koja se stabilno nasljeđuje kroz stanične diobe, te se tijekom sinteze DNA održava prema pravilima semikonzervativne replikacije. Replikacija DNA rezultira dvjema hemimetiliranim molekulama DNA koje su supstrat za DNA metiltransferazu održavateljskog tipa (DNMT1) koja je odgovorna za održavanje pravilnog uzorka metilacije kroz stanične diobe (Li i Zhang 2014). Metilacija DNA pozitivno korelira s utišanim stanjem gena, a taj se efekt očituje ili interferencijom metilne oznake s transkripcijskim faktorima što onemogućava njihovo vezanje ili kroz regrutaciju „čitača“ koji sadrže domenu MBD (od eng. *methyl-CpG-binding domain*) koja specifično prepoznaje metilnu oznaku na CpG dinukleotidima. Proteini s domenom MBD, kao što su MBD2, MBD3, MBD4, MeCP2 (od eng. *Methyl-CpG binding protein 2*), regrutiraju represorske komplekse na metilirane promotorske regije (Allis i sur. 2015, Li i Zhang 2014).



Slika 3. Metilacija citozina u molekuli DNA. (A) Dodatak metilne skupine CH_3 na peti atom ugljika u pirimidinskom prstenu citozina (crna strelica) ne interferira sa sparivanjem GC parova baza (plave linije). DNA metiltransferaza (DNMT) kovalentno se veže na šesti atom ugljika (zelena strelica) tijekom prijenosa metilne skupine. (B) Model B forme metilirane DNA u citozinima u dvije samokomplementarne CpG sekvence. Sparene metilne skupine (ljubičasta i žuta) leže u velikom utoru molekule DNA. (Preuzeto i prilagođeno prema Li i Zhang 2014)

Više od 50% gena u genomu kralješnjaka sadrži regije koje su bogate CpG dinukleotidima i nazivaju se CpG otoci. CpG otoci su regije velike oko 1 kb i uglavnom su nemetilirane u germinativnim stanicama, stanicama embrija i većini somatskih stanica (Li i Zhang 2014, Jones 2012). Aktivni geni koji sadrže CpG otoke u mjestima inicijacije transkripcije (TIS, od eng. *transcription initiation site*) imaju promotorske regije koje su oslobođene nukleosomne strukture, a u nukleosomima koji okružuju ove regije varijanta histona H2A je zamijenjena s varijantom H2A.Z i karakterizira ih trimetilacija H3 u lizinu 4. Metilacija CpG otoka u TIS je povezana s dugoročnim utišavanjem gena kao što su geni na inaktivnom kromosomu X, utisnuti geni, geni koji su predominantno eksprimirani u germinativnim stanicama i neki tkivno specifični geni. Za razliku od TIS, tijelo gena je uglavnom siromašno CpG otocima, ali u odnosu na TIS, dinukleotidi CpG koji se nalaze u tijelu gena su često metilirani. Pretpostavlja se da metilacija citozina ovdje služi kao mehanizam utišavanja repetitivnih elemenata i alternativnih promotora te da ima ulogu u prekrajanju. Metilacija dinukleotida CpG u pojačivačima i u drugim mjestima u genomu koji nisu CpG otoci je dinamična i tkivno specifična (Slika 4.) (Jones 2012).



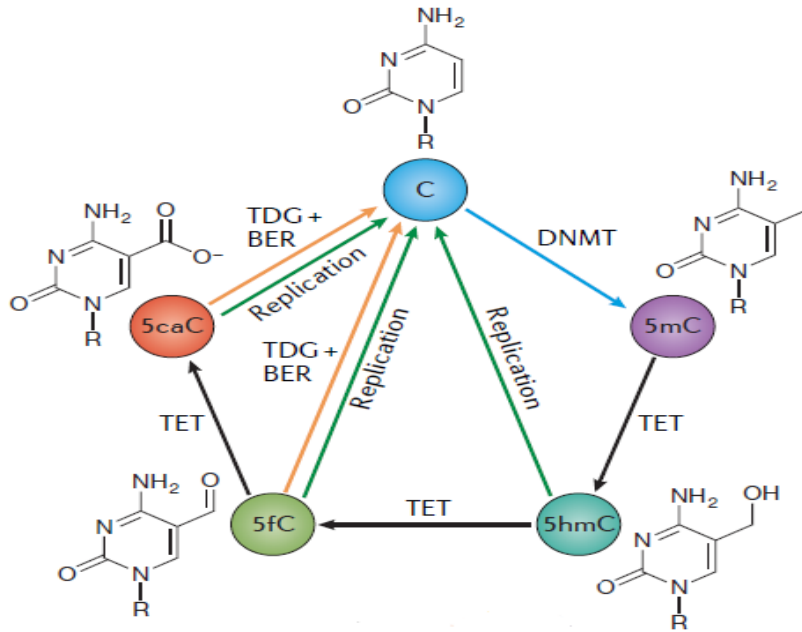
Slika 4. Molekularna anatomija područja inicijacije transkripcije u kromatinu. CpG otoci (CGI, od eng. *CpG island*) u promotoru aktivnih gena imaju područja oslobođena od nukleosoma (NDRs, od eng. *nucleosome - depleted regions*). Nukleosomi oko TSS (od eng. *transcription start site*) bogati su oznakom H3K4me3 koja je povezana s aktivnom transkripcijom i varijantom H2A.Z. Nizvodno od TSS, DNA je uglavnom siromašna CpG dinukleotidima i predominantno je metilirana u ponavljajućim sekvencama i tijelima gena. CpG otoci koji su ponekad prisutni u tijelima gena znaju biti metilirani na tkivno-specifičan način. Metilacija DNA se održava pomoću metiltransferaza DNMT1 i ponekad s DNMT3A i/ili DNMT3B koje su vezane za nukleosome koji sadrže metiliranu DNA. Pojačivači su uglavnom siromašni CpG otocima i pokazuju dinamičan proces metilacije i demetilacije vjerojatno zbog prisutnosti enzima TET (od eng. *Ten – eleven translocation*) u tim genomskim područjima. Pojačivači također imaju NDRs i susjedne nukleosome bogate oznakom H3K4me1 i zamijenjene histone H2A s varijantom H2A.Z. Vezanje proteina CTCF (od eng. *CCCTC – binding factor*) na izolatore može biti blokirano metilacijom citozina. Genomska područja u blizini CTCF-a su oslobođena nukleosomne strukture. LMR (od eng. *low methylated region*). (Preuzeto i prilagođeno prema Jones 2012)

Brojne studije su pokazale da postoji interakcija između metilacije DNA i histonskih modifikacija što igra bitnu ulogu u regulaciji dinamike kromatina i brojnih bioloških procesa (Tamaru i Selker 2001, Stroud i sur. 2013). To se jako dobro očituje u biljkama kod kojih dva različita puta održavanja metilacije DNA, koje kataliziraju DNA metiltransferaze CMT2 (od eng. *chromomethylase*) i CMT3, ovise o metilaciji lizina na 9. poziciji histona H3 (Stroud i sur. 2013). U sisavaca, metiltransferaze DNMT3A i DNMT3B su regrutirane na DNA putem interakcije s proteinom DNMT3L koji specifično prepoznaje nemetilirani H3K4. Vezanje DNMT3L za nukleosomno vlakno je snažno inhibirano metilacijom u H3K4. Također, DNMT1 prepoznaje hemimetiliranu DNA preko funkcionalnog partnera UHRF1 (od eng.

ubiquitin-like PHD and RING finger domain-containing 1) koji stabilizira DNMT1 vezanjem na metilirani H3K9 (Du i sur. 2015, Li i Zhang 2014, Wu i Zhang 2017).

Iako se uzorak metilacije DNA nasljeđuje staničnom diobom, tijekom života dešavaju se dinamične promjene u uzorku metilacije koje su rezultat odgovora na vanjske i unutarnje okolišne faktore kao i patoloških procesa kao što su starenje i rak. Glavni nedostatak metilacije DNA je visoka mutabilnost same baze 5mC. Naime, deaminacija 5mC dovodi do tranzicije u timin koji se prirodno pojavljuje u molekuli DNA te ga stoga mehanizmi popravka DNA ne prepoznaju efikasno. Točkasta mutacija C u T je najčešća u sisavca i čini 1/3 svih točkastih mutacija u genomu. Nestabilnost modifikacije 5mC dovela je do smanjenja gustoće CpG dinukleotida u genomu sisavaca. Poremećaji u metilaciji DNA povezuju se s rakom i mnogim drugim bolestima. Inaktivacija tumor-supresor gena metilacijom je najčešći epigenetički mehanizam koji doprinosi nastanku raka. (Li i Zhang 2014). Također ekspanzija mikrosatelitnog ponavljanja CGG u 5' regiji gena *FMRI* rezultira metilacijom *de novo* promotora tog gena i dovodi do njegovog utišavanja. Ovakva aberantna metilacija gena *FMRI* uzrok je sindroma fragilnog X kromosoma (Peprah 2011).

Tijekom razvoja postoje dva vala reprogramiranja epigenetičke informacije u kojima dolazi do globalne demetilacije genoma i uklanjanja svih epigenetičkih oznaka te ponovnog uspostavljanja istih. Prvi val reprogramiranja se događa u ranoj embriogenezi odmah nakon fertilizacije, a drugi val reprogramiranja se događa tijekom uspostavljanja primordijalnih germinativnih stanica (Li i Zhang 2014, Seisenberger i sur. 2013). Gubitak metilne oznake na citiozinu se odvija pasivnim i aktivnim putem. Pasivna metilacija rezultat je gubitka metilacije kroz diobe kao posljedice nedostatka ili inhibicije metiltransferaze DNMT1. Aktivna demetilacija odvija se enzimatskim putem. Tri porodice proteina uključene u aktivni put demetilacije su: proteini iz porodice TET (od eng. *Ten-eleven translocation*), AID (od eng. *Activation-induced cytidine deaminase*) i APOBEC (od eng. *Apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptides*). Proteini porodice TET su dioksidaze ovisne o kompleksu željezo/ α -ketoglutarat, te ovi proteini oksidiraju 5mC do 5-hidroksimetilcitozina (5hmC) te dalje do 5-formilcitozina (5fC) i 5-karboksilcitozina (5caC). Tako oksidirane forme se potom uklanjaju ili pasivno gubitkom kroz replikaciju ili se konvertiraju nazad u nemodificirani citozin putem enzima timin-DNA glikozilaze (TDG) koja prepoznaje i izrezuje 5fC i 5caC iz genoma. Nakon ekscizije nastaje abazično mjesto na koje se putem popravka DNA izrezivanjem nukleotida (BER, od eng. *Base excision repair*) ponovno ugrađuje nemodificirani citozin (Slika 5.) (Wu i Zhang 2017).



Slika 5. Ciklus aktivne demetilacije DNA. Metiltransferaze DNMT-e konvertiraju nemodificirani citozin do 5mC koji se dalje može konvertirati nazad do nemodificiranog citozina oksidacijom posredovanom enzimom TET do 5hmC, 5fC i 5caC te posljedičnim izrezivanjem 5fC i 5caC pomoću enzima TDG poveznog s putem BER ili pak pasivnim razrjeđivanjem oksidiranih baza putem replikacije. (Preuzeto i prilagođeno prema Wu i Zhang 2017)

1.2. Sustav CRISPR/Cas9 u regulaciji genoma i uređivanju epigenoma

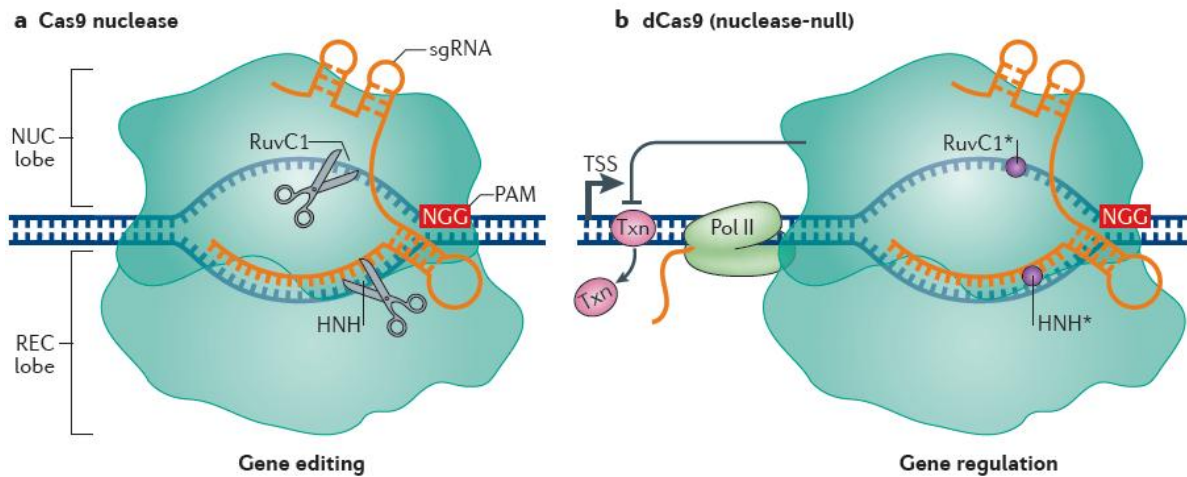
Sustav CRISPR-Cas (od eng. *Clusterd regulary interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated proteins*) adaptivni je imunosni sustav u bakterijama i arhejama gdje predstavlja zaštitu od stranih genetičkih elemenata kao što su plazmidi i fagi. Trenutno se dijeli na dva velika razreda i pet tipova od kojih se sustav CRISPR-Cas tipa II najčešće koristi u genetičkom inženjerstvu. Uz lokus CRISPR koji predstavlja genetičku memoriju, sustav CRISPR-Cas tipa II kodira za proteine Cas1, Cas2 i za endonukleazu Cas9. Lokus CRISPR sastoji se od ponavljajućih sekvenci koje su odvojene varijabilnim sekvencama (tzv. razmaknicama) koje su nastale od sekvenci DNA stranih genetičkih elemenata (tzv. protorazmaknica). Na 5' kraju lokusa CRISPR nalazi se konzervirana vodeća sekvenca. Transkripti s lokusa CRISPR se procesiraju u CRISPR RNA (crRNA) koje se sastoje od jedne ponavljajuće sekvence i jedne razmaknice. Molekula crRNA hibridizira s transaktivirajućom RNA (tracrRNA, od eng. *trans-activating crRNA*) i ulazi u kompleks s endonukleazom Cas9.

Ispravno komplementarno sparivanje između crRNA i protorazmaknice na stranoj DNA, aktivira nukleaznu aktivnost proteina Cas9 koji potom uvodi dvolančane lomove u stranoj DNA. Uz kompleks crRNA-tracrRNA, za funkcionalnost endonukleaze Cas9 nužna je prisutnost sekvence PAM (od eng. *Protospacer adjacent motif*) smještene odmah nizvodno od protorazmaknice. Sekvenca PAM nije prisutna u samom lokusu CRISPR već samo na stranoj DNA što štiti genom domaćina od samorazgradnje (Dominguez i sur. 2016, Rath i sur. 2015).

Sustav CRISPR-Cas tipa II prilagođen je za potrebe genetičkog inženjerstva u svrhu ciljanog uređivanja genoma. Kako bi se ovaj sustav uspješno koristio u eukariotskim stanicama, potrebne su tri komponente: endonukleaza Cas9 te molekule crRNA i tracrRNA koje zajedno navode protein Cas9 na ciljano mjesto u genomu. Sustav je pojednostavljen kombinirajući molekule crRNA i tracrRNA u jednu kimernu molekulu sgRNA (od eng. *single-guide RNA*). Aktivnost nukleaze Cas9 može se usmjeriti na bilo koju sekvencu DNA dizajnirajući samo novu sgRNA koja je komplementarna ciljanoj DNA. Jedini uvjet jest prisutnost sekvence PAM odmah nizvodno od mjesta ciljanja. Princip uređivanja genoma temelji se na uvođenju dvolančanih lomova u ciljanoj sekvenci koji se potom mogu popraviti dvama različitim mehanizmima: nehomologno spajanje krajeva (NHEJ, od eng. *non-homologous end joining*) i popravljnje homolognom rekombinacijom (HDR, od eng. *homology-directed repair*). NHEJ je mehanizam popravka koji je sklon pogreškama i najčešće uvodi delecije ili insercije koje, ako se dogode unutar kodirajuće sekvence, uzrokuju mutacije pomaka okvira čitanja. Put popravka HDR je precizniji i zahtijeva uvođenje kalupa na temelju kojeg će se popraviti uvedeni dvolančani lom, a kalupi se mogu uvesti u obliku dvolančane plazmidne DNA ili jednolančanih oligonukleotida (Sander i Joung 2014, Tadić i sur. 2019).

Molekularni alati temeljeni na sustavu CRISPR/Cas9, osim za precizno uređivanje genoma, mogu se koristiti i za ciljanu modifikaciju epigenoma i manipulaciju ekspresije gena. Uobičajeno se takvi molekularni alati sastoje od domene koja specifično veže određenu sekvencu u genomu fuzioniranu na efektorsku domenu epigenetičkih modifikatora ili transkripcijskih aktivatora i represora (Dominguez i sur. 2016). U tu svrhu dizajniran je protein dCas9 (od eng. *deactivated/dead Cas9*) kojem su obje nukleazne domene inaktivirane. Inaktivacija je postignuta uvođenjem točkaste mutacije H840A u nukleaznoj domeni HNH, te D10A u nukleaznoj domeni RuvC endonukleaze Cas9 (Slika 6.) (Qi i sur. 2013). Protein dCas9 zadržava sposobnost vezanja molekule sgRNA i ciljne DNA. U bakterijskim stanicama, protein dCas9 sam može efikasno inhibirati transkripciju ciljanih gena putem

steričkih smetnji koje onemogućavaju vezanje transkripcijske mašinerije. U eukariotskim stanicama, efikasna regulacija se može postići samo fuzijama proteina dCas9 s efektorskim domenama uključenih u regulaciju genoma i epigenoma (Wang i sur. 2016).



Slika 6. Korištenje proteina Cas9 i dCas9 iz vrste *Streptococcus pyogenes* u svrhu uređivanja gena te u svrhu regulacije gena. (a) Endonukleaza Cas9 iz vrste *S.pyogenes* (SpCas9) se sastoji od nukleaznog (NUC od eng. *nuclease*) režnja i režnja za prepoznavanje (REC, od eng. *recognition*). SpCas9 je usmjeren na određenu sekvencu DNA komplementarnim sparivanjem molekule sgRNA s ciljnom sekvencom DNA. Ovo sparivanje ovisi o prisutnosti sekvence PAM nizvodno od ciljane sekvence, a u Cas9 iz vrste *S.pyogenes* ona glasi 5'-NGG-3'. Sparivanje aktivira cijepanje DNA putem dvije nukleazne domene RuvC1 i HNH. (b) Endonukleaza dSpCas9 sadrži točkaste mutacije u RuvC1 (D10A) i HNH (H841A) domenama što inaktivira njegovu nukleaznu funkciju (ljubičasti kružići). Endonukleaza dCas9 zadržava svojstvo vezanja ciljane sekvence putem sgRNA i prisutnosti sekvence PAM. Vezanje proteina dCas9 nizvodno od TSS (od eng. *Transcription start site*) može blokirati elongaciju transkripcije blokiranjem RNA polimeraze II ili vezanjem ključnog transkripcijskog faktora (Txn). (Preuzeto i prilagođeno prema Dominguez i sur. 2016)

Glavna prepreka za korištenje sustava CRISPR/Cas9 predstavlja nespecifično vezanje proteina Cas9 unutar genoma što dovodi do cijepanja, aktivacije/represije ili uvođenja epigenetičke modifikacije na mjesta koja u odnosu na ciljano područje nisu u potpunosti komplementarne s molekulama sgRNA. U odnosu na direktno uređivanje gena, nespecifični efekt (od eng. *off-target effect*) manje utječe na ciljanu aktivaciju, represiju i epigenetičko uređivanje sustavom CRISPR/dCas9. Unos manje količine plazmida prilikom transfekcije kao i uvođenje sgRNA u manjoj količini na odvojenim plazmidima neki su od mogućih rješenja za smanjenje nespecifičnog efekta (Tadić i sur. 2019). Sama duljina sgRNA također utječe na razinu nespecifičnog efekta. Minimalna veličina za efikasno ciljanje zahtjeva sgRNA dugačku 17 parova baza, a dodatak gvanina na 5' kraj sgRNA smanjuje stopu nespecifičnih vezanja (Fu i sur. 2014, Tycko i sur. 2016).

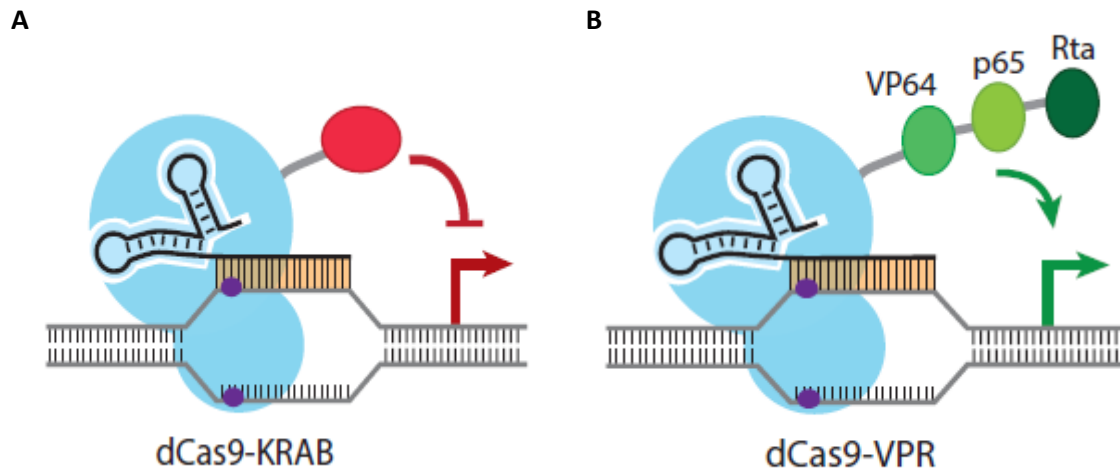
Protein Cas9 ima brojne ortologe u bakterijskim vrstama. U genetičkom inženjerstvu se najčešće koristi Cas9 iz vrste *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) koji prepoznaje PAM sekvencu 5'-NGG-3'. Korištenje ortologa Cas9 koji prepoznaju kompleksnije sekvence PAM isto predstavlja rješenje za smanjenje nespecifičnog efekta. Jedan od takvih ortologa je Cas9 iz bakterije *Staphylococcus aureus* (SaCas9) koji prepoznaje sekvencu PAM 5'-NNGRRT-3'. Osim što pokazuje smanjenju stopu nespecifičnog efekta, SaCas9 je među najmanjim ortolozima Cas9 što omogućuje njegovo pakiranje u čestice adeno asociranih virusa (AAV) za potencijalnu dostavu *in vivo* (Pulecio i sur. 2017). Također, korištenje više ortologa dCas9 endonukleaza fuzioniranih na različite efektorske domene usmjerene putem različitih sgRNA u istoj stanici, omogućuje simultanu manipulaciju više gena i epigenetičkih oznaka istovremeno (Gao i sur. 2016).

1.2.1. Sustav CRISPR/dCas9 u utišavanju (CRISPRi) i aktivaciji (CRISPRa) gena

CRISPRi se u eukariotskim stanicama postiže fuzijom proteina dCas9 s transkripcijskim represorima kao što su npr. KRAB (od eng. *Krüppel-associated box*) i SID4X koji se sastoji od 4 spojene mSIN3 interakcijske domene (Slika 7A). Pokazano je da fuzije ovih domena s dCas9, postižu utišavanje gena u stanicama sisavaca (Dominguez i sur. 2016). Domena KRAB, osim što djeluje kao transkripcijski represor, promovira regrutaciju histonskih metiltransferaza te povećava razine oznake H3K9me3 što rezultira kompaktnijim stanjem kromatina u ciljanom području. Ciljanje pojačivača HS2 uključenog u regulaciju globinskih gena fuzijama dCas9-KRAB dovelo je do visoke indukcije trimetilacije H3K9 i smanjilo je dostupnost kromatina u području i pojačivača i promotora. Ovako ciljana epigenetička modifikacija rezultirala je utišavanjem ekspresije brojnih globinskih gena u čiju je regulaciju uključen pojačivač HS2 (Pulecio i sur. 2017, Thakore i sur. 2015).

Domene koje se koriste za aktivaciju gena u CRISPRa alatima moraju biti modularne i imati sposobnost da zadrže svoju funkciju u fuzijama s dCas9. Dosad je već nekoliko poznatih aktivatora korišteno u fuziji s proteinom dCas9 u svrhu aktivacije željenog gena. Prvi i najjednostavniji od njih je VP16 (od eng. *Virion Protein 16*), protein iz virusa herpes simpleks 1 koji se pokazao uspješnim u stanicama sisavaca. Kao jači transkripcijski aktivator od njega, pokazao se VP64. VP64 je tetramer u kojem su četiri proteina VP16 povezana s poveznicom Gly-Ser. Drugi učestalo korišteni aktivatori su još podjedinica p65 transkripcijskog faktora

NF-kappa B te domena Rta koju kodira adenovirus povezan s Kapošijevim sarkomom (Dominguez i sur. 2016). Međutim, za još snažniju aktivaciju gena, razvijen je VPR, tripartitni aktivator koji je nastao kombinacijom domena VP64, p65 i Rta (Slika 7B). Nekoliko domena korištenih zajedno, ostvaruje jak sinergistički efekt na aktivaciju gena (Chavez i sur. 2015).



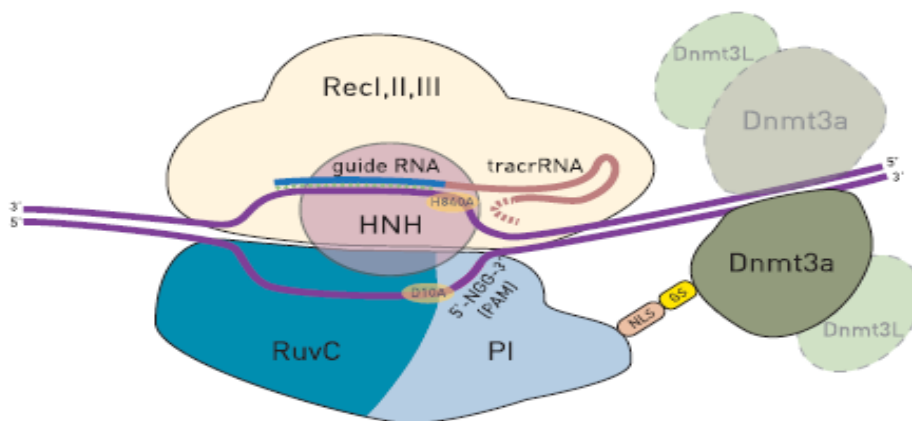
Slika 7. Shematski prikaz regulacije ekspresije gena sustavom CRISPR/dCas9. (A) Utišavanje gena fuzijom proteina dCas9 s transkripcijskim represorom KRAB. (B) Aktivacija gena fuzijom proteina dCas9 sa sustavom VPR (VP64-p65-Rta) (Preuzeto i prilagođeno prema Wang i sur. 2016)

1.2.2. Sustav CRISPR/dCas9 u modifikaciji epigenoma

Kao i kod CRISPRi i CRISPRa, modifikacija epigenoma omogućena je fuzijom efektorskih domena epigenetičkih faktora s proteinom dCas9. Dosadašnje epigenetičke studije su bile korelativne prirode, a uređivanjem epigenoma omogućene su direktne studije funkcije i značenja funkcije određene epigenetičke modifikacije. Fuzije dCas9 su tako uspješno korištene u embrionalnim matičnim stanicama (ESC, od eng. *Embryonic stem cells*) i staničnim linijama karcinoma za ciljanje histonskih modifikacija koristeći efektorske domene enzima uključenih u dodavanje ili uklanjanje kovalentnih skupina s N-terminalnih krajeva histona kao što su: histonska demetilaza LSD1 (histon lizin demetilaza 1), transkripcijski koaktivator i histonska acetiltransferaza p300 te histonska metiltransferaza SMYD3 (od eng. *SET and MYND domain-containing protein 3*) (Pulecio i sur. 2017). Ciljanjem promotora gena *ILIRN*, *MYOD1*, *POU5F1/OCT4* s dCas9 fuzioniranim s katalitičkom srži acetiltransferaze p300, postignuta je značajna aktivacija navedenih gena. Također, studija je

pokazala kako je fuzija sa samom katalitičkom srži proteina u odnosu na korištenje cijelog proteina puno efikasnija u aktivaciji gena (Hilton i sur. 2015). Koristeći fuzije dCas9-SunTag-Vp46 te dCas9-SunTag-p300, direktno su ciljani i remodelirani lokusi gena *Sox2* i *Oct4* što je dovelo do aktivacije drugih pluripotentnih gena i u oba slučaja omogućilo uspostavljanje autentične pluripotentne stanične linije (P. Liu i sur. 2018). Sustav SunTag je dizajniran s ciljem amplifikacije efekta molekularnih alata baziranih na sustavu CRISPR/dCas9. Ovaj sustav koristi mnoštvo peptidnih epitopa GCN4 odvojenih poveznicom i vezanih na dCas9. Jednolančano antitijelo scFv (od eng. *single chain antibody*) prepoznaje te peptidne epitope. scFv se stoga fuzionira sa željenom efektorskom domenom te se brojne scFv-efektor fuzije regrutiraju na dCas9-GCN4 (Pulecio i sur. 2017).

Metilacija DNA je, za razliku od histonskih modifikacija, stabilnija epigenetička oznaka i kao takva ima potencijal za dugoročne efekte na ekspresiju gena što ju čini privlačnom modifikacijom u uređivanju epigenoma kako u funkcionalnim studijama tako i u terapijske svrhe. Nekoliko istraživačkih grupa je dizajniralo dCas9 fuzioniran s katalitičkom domenom različitih DNA metiltransferaza za metilaciju CpG otoka, CTCF (od eng. *CTCC – binding factor*) veznih mjesta, promotorskih regija i pojačivača u različitim staničnim linijama (Vojta i sur. 2016, Liu i sur. 2016, Stepper i sur. 2016). Većina molekularnih alata u ovim studijama koristi poveznicu sastavljenu od aminokiselina između proteina dCas9 i efektorske domene. Katalitička domena DNMT3A fuzionirana na dCas9 putem poveznice Gly₄Ser je uspješno dovela do povećanja metilacije gena *IL6ST* i *BACH2* (Slika 8.). Također, korištenjem više molekula sgRNA, omogućena je metilacija veće promotorske regije gena *IL6ST* i *BACH2* što je dovelo do znatnog smanjenja ekspresije navedenih gena. Korištena poveznica Gly₄Ser osigurava metilaciju sekvence DNA susjedno od sgRNA. Naime, na samom mjestu vezanja sgRNA, ne dolazi do metilacije budući da je ta DNA nedostupna katalitičkoj domeni DNMT3A (Vojta i sur. 2016).



Slika 8. Shema fuzije dCas9-DNMT3A u kompleksu sa sgRNA i ciljnom sekvencom DNA. sgRNA (guideRNA i tracrRNA) se veže u udubinu između režnjeva prepoznavanja (RecI, RecII i RecIII) i nukleaznog režnja (HNH, RuvC i PI (od eng. *PAM-interacting*) domena) proteina Cas9. Katalitička domena DNMT3A regrutira svoje dimerizacijske partnere i DNMT3L protein *in vivo* (prikazano isprekidanim crticama). NLS – jezgrin lokalizacijski signal. GS - peptidna poveznica Gly₄Ser. (Preuzeto i prilagođeno prema Vojta i sur. 2016)

Mnoge grupe su također dizajnirale i dCas9 fuzioniran s katalitičkom domenom enzima TET1 u svrhu ciljane demetilacije DNA. Ovaj sustav se pokazao uspješnim u ciljanoj demetilaciji promotorske regije tumor-supresor gena *BRCA1*, što je rezultiralo ne samo značajnim smanjenjem metilacije, već je dovelo i do reaktivacije gena *BRCA1* u karcinomu cerviksa i dojke (Choudhury i sur. 2016). Da molekularni alati za ciljano uređivanje epigenoma imaju potencijalnu terapijsku svrhu, pokazala je i grupa koja je fuzijom dCas9-TET1 ciljala ekspanziju CGG u promotoru gena *FMRI* koja dovodi do nastanka sindroma fragilnog X kromosoma. Naime, ciljane demetilacije ove regije dovela je do reaktivacije gena *FMRI* u iPCS (od eng. *induced pluripotent stem cells*) stanicama, a neuroni nastali od ovih stanica nisu pokazivali elektrofiziološke abnormalnosti inače povezane s ovim sindromom. Normalna ekspresija gena *FMRI* se nastavila i *in vivo* nakon što su modificirani neuroni ugrađeni u mozak miša (X.S. Liu i sur. 2018).

1.3. Gen *HNF1A*

Gen *HNF1A* (od eng. *Hepatocyte Nuclear Factor 1 Homeobox A*) kodira za nuklearni hepatocitni faktor 1A koji regulira ekspresiju drugih tkivno-specifičnih gena u jetri i gušterači uključenih u procese zgrušavanja krvi, urođene imunosti, transport i metabolizam lipida i glukoze te u staničnu detoksifikaciju. Nalazi se na dugom kraku 12. kromosoma na poziciji

24.1. te sadrži 10 egzona koji obuhvaćaju regiju od 23 kb (Ellard i Colclough 2006, Reiner i sur. 2009). Funkcionalni transkripcijski faktor HNF1A je dimer koji postoji kao homodimer ili može heterodimerizirati s HNF1B. Ima tri funkcionalne domene uključujući amino-terminalnu dimerizacijsku domenu, karboski-terminalnu transaktivacijsku domenu te DNA-veznu domenu s POU-nalik i homeodomeni nalik motivima. Zajedno s HNF1B i HNF4A, čini dio mreže transkripcijskih faktora koji zajedno kontroliraju ekspresiju gena tijekom embrionalnog razvoja i odraslog života u tkivima u kojima su koeksprimirani. U β -stanicama gušterače, reguliraju ekspresiju gena za inzulin kao i ekspresiju gena koji su uključeni u metabolizam i transport glukoze i u metabolizam mitohondrija. HNF1A aktivira transkripciju gena *HNF4A* u gušterači vezanjem na P2 promotor. HNF4A zauzvrat aktivira transkripciju gena *HNF1A* što stvara pozitivnu povratnu petlju koja djeluje kao bistabilna sklopka (Ellard i Colclough 2006, Steck i Winter 2011).

Mutacije u genu *HNF1A* uzrok su dijabetesa subtipa MODY (od eng. *Maturity Onset Diabetes of the Young*). MODY je monogenska forma dijabetesa koju karakterizira neovisnost o inzulinu, autosomalno dominantan način nasljeđivanja, rana dob ispoljavanja (prije 25. godine života) i disfunkcija β -stanica gušterače. MODY se u većine pacijenata uspješno liječi uvođenjem oralnih hipoglikemijskih agensa baziranih na sulfonilureama. Do danas je opisano 193 mutacije u genu *HNF1A* povezane s ovim tipom dijabetesa, a obuhvaćaju *missense* i *nonsense* mutacije, insercije i duplikacije, mutacije promotorske regije i mutacije u mjestima prekrajanja. Najčešća mutacija je Pro291fs u policistinskom traktu egzona 4. Također, dijabetes MODY je otkriven i do 10 godina ranije u pacijenata koji imaju *missense* mutacije u dimerizacijskoj i DNA veznoj domeni nego kod onih koji imaju mutacije u transaktivacijskoj domeni. Pretpostavlja se da mutacije u dimerizacijskoj domeni i DNA veznoj domeni imaju ozbiljnije funkcionalne posljedice s obzirom na to da utječu na stabilnost proteina i njegovo vezanje na molekulu DNA (Bellanne-Chantelot i sur. 2008, Ellard i Colclough 2006, Steck i Winter 2011).

Uz dijabetes tipa MODY pokazalo se da su česti polimorfizmi u jednom nukleotidu (SNP, od eng. *single nucleotide polymorphism*) gena *HNF1A* povezani i s razinama C-reaktivnog proteina (CRP) i apolipoproteina A1 u plazmi, LDL-kolesterolom i gama-glutamil transferazom, s koronarnim bolestima srca i ulcerativnim kolitisom (Lauc i sur. 2010). Promotor gena za CRP sadrži dva vezna mjesta za HNF1A. CRP je protein akutne faze u upalnom odgovoru. Uz CRP, vezno mjesto za HNF1A prisutno je i u pojačivačima i promotorima strukturnih gena uključenih u sintezu i drugih plazma proteina u jetri kao što su

fibrinogen i apolipoprotein B (Armendariz i Krauss 2009, Reiner i sur. 2009). HNF1A ima centralnu ulogu u regulatornoj mreži transkripcijskih faktora uključenih u endokrini i egzokrini razvoj i održavanje homeostaze gušterače kao i u njenoj regeneraciji. U dvjema odvojenim studijama pokazala se moguća uloga gena *HNF1A* kao tumor-supresora u tumoru gušterače. Naime, u adenokarcinomu gušterače detektirana je redukcija u HNF1A i na razini mRNA i na razini proteina. Inaktivacija gena *HNF1A* u stanicama raka gušterače dovodi do stanične proliferacije i reducirane apoptoze kao i aktivacije signalnog puta Akt/mTOR za kojeg je poznato da ima aberantno djelovanje u tumoru gušterače (Hoskins i sur. 2014, Luo i sur. 2015). Zanimljivo je da nedostatak gena *HNF1A* u jetri i gušterači utječe i na poziciju gena koje regulira u jezgri kao i na strukturu kromatina u njihovom području. Tako je pokazano da njegove endogene mete inaktivirane odsustvom gena *HNF1A* imaju povećanu ratu trimetilacije H3K27 i reduciranu metilaciju H3K4 dok su u jezgri pozicionirani u perifernim subnuklearnim domenama, za razliku od divljeg tipa stanica gdje je gen *HNF1A* aktivan i gdje su njegove endogene mete pozicionirane više u centralnim domenama jezgre i bogate su oznakama H3K4me i vezanom RNA polimerazom II (Luco i sur. 2008).

Cjelogenomska studija povezanosti (GWAS, od eng. *genome wide association study*) ljudskog N-glikoma identificirala je novu ulogu HNF1A kao glavnog transkripcijskog regulatora nekoliko stadija u procesu fukozilacije proteina. Glikani koji sadrže fukoze imaju bitnu ulogu u reakcijama na transfuziju krvi, na adheziju leukocita i endotelija posredovanu selektinima, a koja potiče upalni odgovor, ulogu u interakcijama domaćina i mikroba te u brojnim onkogenim događajima. Promjene u razini fukoziliranih glikana povezane su s nekoliko bitnih patoloških procesa uključujući rak. HNF1A aktivira ekspresiju fukokinaze i GDP-manoza-4,6-dehidrataze koje su uključene u sintezu fukoze putem *de novo* i putem spašavanja. Također, regulira i nekoliko fukoziltransferaza (FUT) aktivirajući one koje su uključene u antenarnu fukozilaciju (Lauca i sur. 2010). Uz uobičajene polimorfizme koji utječu na razinu ekspresije gena *HNF1A*, analizama korelacije CpG metilacije i ekspresije u gena *HNF1A* u različitim staničnim linijama, otkrivena su 4 CpG mjesta u regiji prvog egzona ovoga gena koja bi mogla imati regulatornu ulogu u njegovoj transkripciji (Zoldoš i sur. 2012). Upotrebom alata CRISPR/dCas9-TET1 i CRISPR/dCas9-DNMT3A nedvojbeno je dokazana ova pretpostavka ciljanjem upravo ta 4 CpG mjesta koja se protežu u sekvenci od 12 nukleotida (Josipović i sur. 2019).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Opći cilj ovog istraživanja je utvrditi mijenja li se uzorak metilacije DNA u regijama smještenim uzvodno i nizvodno od mjesta ciljanja fuzija CRISPR/dCas9+efektorska domena, uz pomoć specifičnih molekula sgRNA, na 4 regulatorna CpG mjesta u genu *HNF1A*. Regija koja sadrži 4 regulatorna CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A* ciljati će se fuzioniranim proteinima TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9 u stanicama HEK293 gdje je ovaj gen prirodno utišan. Cilj je izrada testova za analizu CpG metilacije metodom pirosekvenciranja, a čime će se omogućiti analiza stupnja metilacije u regijama smještenim uzvodno i nizvodno od navedena 4 regulatorna CpG mjesta. Također, cilj je utvrditi hoće li ciljana CpG demetilacija upotrebom TET1-dSaCas9, odnosno direktno vezanje transkripcijskog aktivatora VPR (VPR-dSpCas9), imati posljedično efekt na transkripcijsku aktivnost gena *HNF1A*. Testovi za pirosekvenciranje, koje će dizajnirati u ovom diplomskom radu, moći će se primjenjivati u svrhu analize metilacije navedenih regija te određivanja efekta ciljane demetilacije DNA i u istraživanjima na drugim staničnim linijama.

Specifični ciljevi istraživanja su:

- Transfekcija stanica HEK293 s plazmidnim konstruktima koji sadrže fuzionirane sekvence TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9
- Izolacija ukupne genomske DNA i bisulfitna konverzija DNA iz transficiranih stanica HEK293
- Dizajn početnica komplementarnih bisulfitno konvertiranoj DNA koje obuhvaćaju regije smještene uzvodno i nizvodno od regije ciljanja plazmidnim konstruktima
- Provjera početnica i optimizacija uvjeta reakcije PCR
- Izrada testova za analizu metilacije pirosekvenciranjem i optimizacija uvjeta pirosekvenciranja
- Upotreba odabranih početnica za reakciju PCR i testova za pirosekvenciranje za analizu statusa metilacije u transficiranim stanicama HEK293
- Izolacija ukupne RNA iz transficiranih stanica HEK293 i reverzna transkripcija
- Analiza ekspresije gena *HNF1A* metodom qPCR korištenjem proba Taqman

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Komercijalni setovi kemikalija:

Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD); *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka); *EZ DNA Methylation-Gold Kit* (Zymo Research, Irvine, Kalifornija); *PyroMark PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka); *PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents* (Qiagen, Hilden, Njemačka); *Rneasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka); *20x TaqMan Gene Expression Assay: Hs00167041_m1, Hs02800695_m1* (Applied biosystems, Foster City, Kalifornija); *2x TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied biosystems, Foster City, Kalifornija); *PrimeScript Reverse Transcriptase* (200 U/μL; Takara, Tokio, Japan)

Ostalo:

medij DMEM (od eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); otopina penicilina (10 000 U/mL) i streptomicina (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); L-glutamin (200 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); Fetalni goveđi serum (FBS, od eng. *Fetal Bovine Serum*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); Fosfatni pufer PBS (od eng. *Phosphate-buffered saline*) (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄; pH 7,4); tripsin (*Trypsin-EDTA solution*, 0,25%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); medij Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD); Puromicin (10 mg/ml) (Gibco, Waltham, Massachusetts, SAD); boja *GelRed* (Biotium, Fremont, Kalifornija, SAD); marker molekulaskih masa *100 bp DNA Ladder Ready to Load* (Solis Biodyne, Tartu, Estonija); sefarozne kuglice obložene streptavidinom *Streptavidin Sepharose High Performance* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK); *PyroMark Denaturation Solution* (Qiagen, Hilden, Njemačka); *PyroMark Wash Buffer* (Qiagen, Hilden, Njemačka); nasumični heksameri (od eng. *Random Hexamers*) (50 μM) (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija); inhibitor RNaza *Recombinant RNase Inhibitor* (40 U/μl) (Takara, Tokio, Japan)

Uredaji:

Mini centrifuga *Combi-Spin FVL-2400N* (BioSan, Riga, Latvija); spektrofotometar *NanoDrop 8000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD); uređaj za PCR *Veriti 96 Well*

Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, SAD); uređaj za PCR *ProFlex PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, SAD); uređaj za pirosekvenciranje *PyroMark Q24 Advanced* (Qiagen, Hilden, Njemačka); *PyroMark Q24 Vacuum Workstation* (Qiagen, Hilden, Njemačka); uređaj za qPCR *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied biosystems, Foster City, Kalifornija).

Plazmidni konstrukti:

N-TET1-SaCas9-Puro-Clover+HNF1A-sg03,04;

N-VPR-SpCas9-Puro-Ruby+HNF1A-sg03;

N-TET1-SaCas9-Puro-Clover+NT-sgRNA;

N-VPR-SpCas9-Puro-Ruby+NT-sgRNA

Stanična linija:

Ljudska stanična linija bubrega embrija HEK293 (od eng. *human embryonic kidney*) (ATCC, Manassas, Virginia, SAD)

3.2. Metode

3.2.1. Transfekcija stanica HEK293 i održavanje stanica u kulturi

Za transfekciju i održavanje stanica HEK293 u kulturi korišten je puni medij DMEM (od eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) sa 100 jedinica/mL antibiotika penicilina i 10 µg/mL streptomicina, s L-glutaminom (4 mM) te 10%-tnim FBS-om (od eng. *Fetal Bovine Serum*). Takav puni medij DMEM koristio se u svim idućim koracima. Stanice HEK293, čuvane u tekućem dušiku, odmrznute su prema sljedećem protokolu. Na njih je dodan medij DMEM prethodno ugrijan na 37 °C. Stanice su centrifugirane 5 min na 300 g nakon čega im je uklonjen supernatant. Potom su resuspendirane u 10 mL medija DMEM te izbrojane u Bürker komorici pomoću epifluorescencijskog mikroskopa. U veliku petrijevku (10 cm) nasadeno je 300 000 stanica. Stanice su inkubirane na 37 °C pri 5%-tnom CO₂. Rast stanica se pratio upotrebom invertnog svjetlosnog mikroskopa, te je stanicama svaka 2-3 dana promijenjen medij.

Kada su stanice dosegle 90-100% konfluencije, presađene se u nove velike petrijevke. DMEM medij i fosfatni pufer PBS (od eng. *Phosphate-buffered saline*) ugrijani su na 37 °C. Sa stanica je uklonjen medij te su isprane s puferom PBS. Stanice su tripsinizirane s 2 mL

tripsina (*Trypsin-EDTA solution*) 3 min na 37 °C pri 5%-tnom CO₂. U svrhu inaktivacije tripsina, dodano je 3 mL medija DMEM. U novu veliku petrijevku presađeno je 300 000 stanica. Stanice su inkubirane na 37 °C pri 5%-tnom CO₂. Svako sljedeće presađivanje stanica rađeno je prema istom postupku. Postupak presađivanja se ponavljao do 4. pasaže. Za potrebe transfekcije, stanice su nakon 4. pasaže presađene u 6 pločica sa 6 jažica (od eng. *6-well plate*) pri čemu je u svaku jažicu nasađeno 500 000 stanica u mediju DMEM tako da konačni volumen u jažici iznosi 2, 75 mL. Stanice su nasađene za potrebe sakupljanja stanica u tri različite vremenske točke nakon transfekcije: 5, 8. i 11. dan. Idući dan je provedena transfekcija stanica željenim dCas9 konstruktima.

Plazmidni konstrukti korišteni za transfekciju su: N-TET1-SaCas9-Puro-Clover+HNF1A-sg03,04 za ciljanu demetilaciju 4 regulatorna CpG mjesta u prvom egzonu gena *HNF1A*; N-VPR-SpCas9-Puro-Ruby+HNF1A-sg03 za ciljanu aktivaciju gena *HNF1A* te plazmidni konstrukti N-TET1-SaCas9-Puro-Clover+NT-sgRNA i N-VPR-SpCas9-Puro-Ruby+NT-sgRNA koji sadrže sgRNA koje nisu komplementarne ni jednoj regiji u ljudskom genomu. Plazmidni konstrukti su prethodno dizajnirani u laboratoriju. Mape plazmida nalaze se na slikama 9. i 10. Na sami dan transfekcije, stanice su bile 50% konfluentne. Za transfekciju je korišten transfekcijski reagens *Lipofectamine 3000*. Transfekcija je rađena prema protokolu proizvođača (Thermo Fisher Scientific). Ukratko, postupak transfekcije stanica u jažicama je tekao na način kako je opisano. Prvo je 7,5 µl *Lipofectamine 3000* reagensa razrijeđeno u 125 µl Opti-MEM medija. Otopina je kratko vorteksirana i spuštена kratkim centrifugiranjem na mini centrifugi *Combi-Spin FVL-2400N*. Potom je 5 µl *P3000* reagensa razrijeđeno u 125 µl medija Opti-MEM te je u takvu otopinu dodana plazmidna DNA konačne količine 1 µg ako su plazmidi dodani zasebno odnosno do konačne količine 500 ng svakog plazmida ako su plazmidi dodani u kombinaciji. Otopina je također kratko vorteksirana i spuštена kratkim centrifugiranjem te je u nju dodana razrijeđena otopina *Lipofectamine 3000* reagensa. Takva transfekcijska smjesa je promiješana vorteksiranjem i spuštена kratkim centrifugiranjem te je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. U odgovarajuću jažicu, dodano je 250 µl transfekcijske smjese. Za svaku transfekciju rađene su dvije biološke replike. Ukupno je napravljeno 5 različitih transfekcija stanica HEK293:

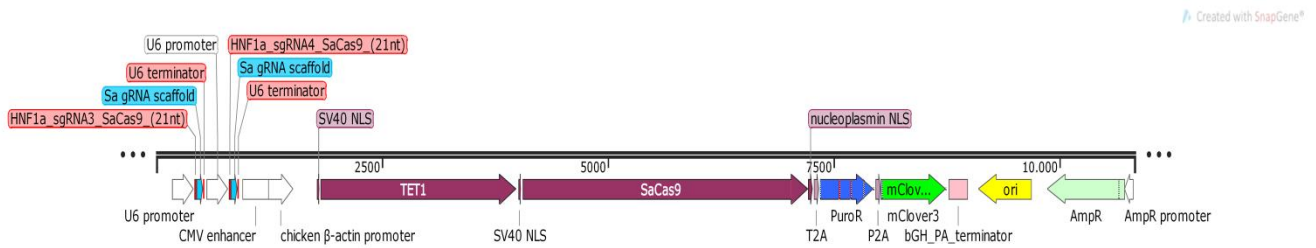
1. Stanice ko-transficirane plazmidnim konstruktima N-TET1-SaCas9-Puro-Clover+HNF1A-sg03,04 i N-VPR-SpCas9-Puro-Ruby+HNF1A-sg03 (TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9)

2. Stanice transficirane plazmidnim konstruktom N-TET1-SaCas9-Puro-Clover+ HNF1A-sg03,04 (TET1-dSaCas9)
3. Stanice transficirane plazmidnim konstruktom N-VPR-SpCas9-Puro-Ruby+ HNF1A-sg03 (VPR-dSpCas9)
4. Stanice ko-transficirane plazmidnim konstruktima N-TET1-SaCas9-Puro-Clover+ NT-sgRNA i N-VPR-SpCas9-Puro-Ruby+NT-sgRNA koje služe kao kontrola (NT, od eng. *Non-Target*).
5. Stanice u koje je dodan samo transfekcijski reagens bez dodavanja DNA plazmida i koje služe kao negativna kontrola (od eng. *Mock*)

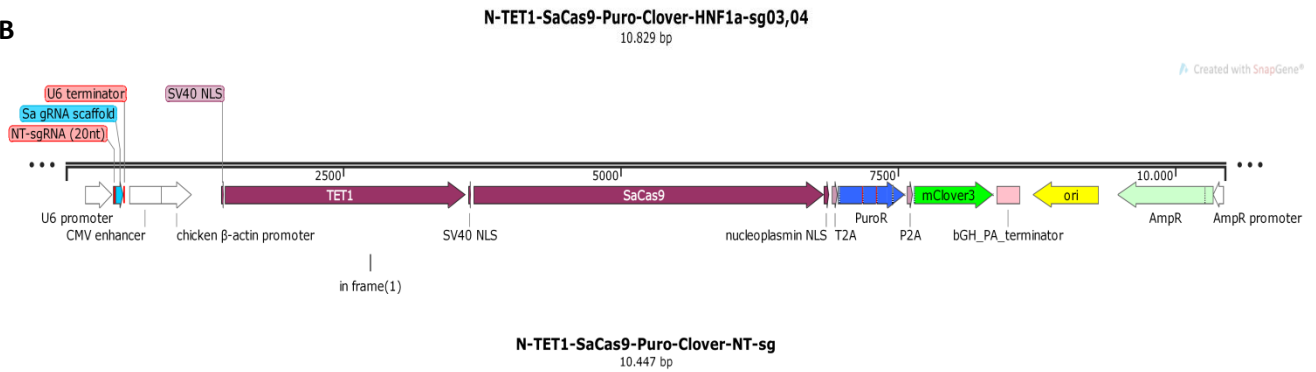
Idući dan provedena je selekcija svih stanica, osim negativne kontrole *Mock*, dodavanjem 2,1 μ l puromicina konačne koncentracije 7 μ g/ml. Selekcija je prekinuta nakon 48 sati uklanjanjem medija s antibiotikom i dodavanjem novog medija DMEM. Naime, svi korišteni plazmidni konstrukti nose rezistenciju na puromicin.

Stanice su sakupljane 5., 8., 11., 20 i 30. dan nakon transfekcije prema idućem postupku. Stanice su tripsinizirane 3 min na 37 °C pri 5% CO₂ te im je dodan medij DMEM. Suspenzija stanice je centrifugirana 5 min na 500 g, uklonjen je supernatant te je talog ispran s puferom PBS. Stanice su ponovno centrifugirane 5 min na 500 g, uklonjen je supernatant, a dobiveni talog stanica je spremljen na -80 °C do upotrebe za izolaciju DNA i RNA. Stanice za 11. dan su do sakupljanja jednom presađene, a dio stanica je iskorišten za ponovno nasadivanje na medij u svrhu rasta stanica za sakupljanje 20. dan nakon transfekcije. Prilikom sakupljanja stanica za 20. dan, dio stanica je iskorišten za ponovno nasadivanje na medij u svrhu rasta stanica za sakupljanje 30. dan nakon transfekcije.

A

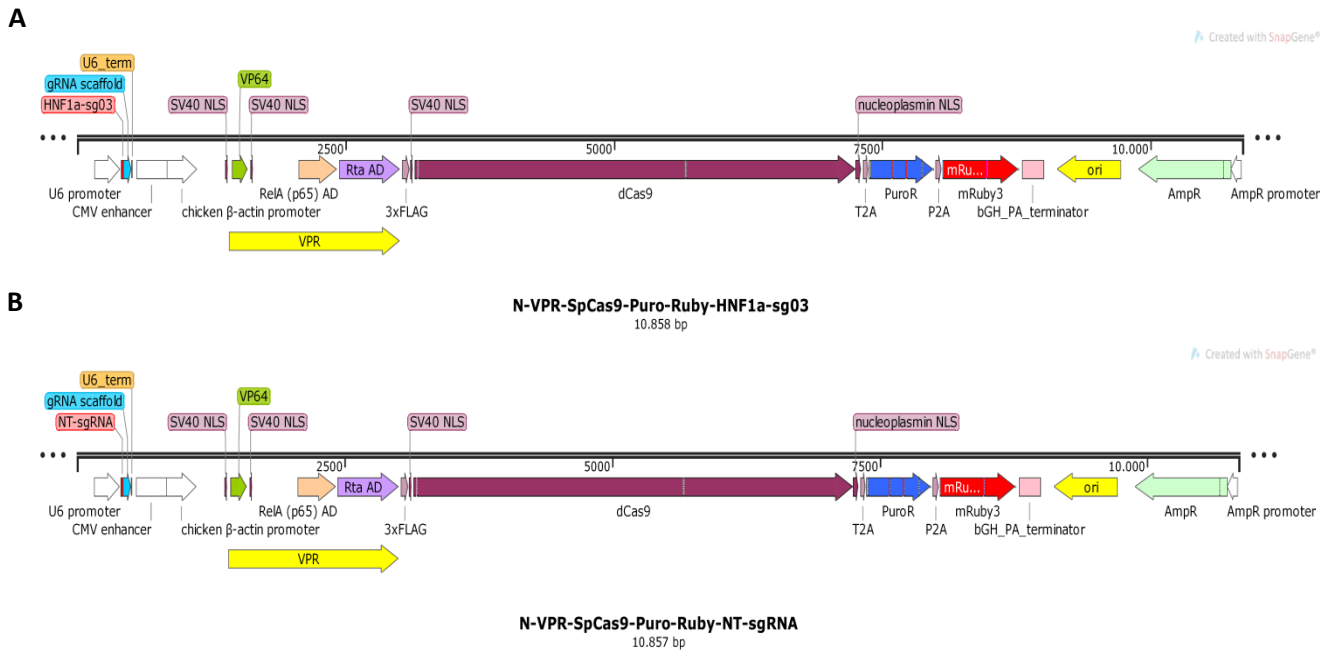


B



Slika 9. Linearne mape plazmidnih konstrukata s fuzioniranom sekvencom N-TET1-dSaCas9 za ciljanu demetilaciju.

(A) Plazmidni konstrukt N-TET1-SaCas9-Puro-Clover+HNF1A-sg03,04 s odgovarajućim molekulama sgRNA (HNF1A_sgRNA3_SaCas9 i HNF1A_sgRNA4_SaCa9) koje navode fuziju TET1-dSaCas9 na ciljano mjesto u genu *HNF1A*. (B) Plazmidni konstrukt N-TET1-SaCas9-Puro-Clover+NT-sgRNA s odgovarajućom sgRNA (NT-sgRNA) koja ne cilja ni jedno mjesto u ljudskom genomu. U6 promotor - promotor RNA polimeraze III za U6 snRNA čovjeka, U6 terminator – terminacijska sekvenca U6 snRNA čovjeka, Sa gRNA *scaffold* - mjesto koje sadrži restriksijsko mjesto za ugradnju gena crRNA molekula, *CMV enhancer* – pojačivač iz ljudskog citomegalovirusa, SV40 NLS - jezgrin lokalizacijski signal velikog T antigena virusa SV40 (od engl. *Simian virus 40*), *chicken β -actin* - hibridni oblik promotora beta aktina kokoši CBA, SaCas9 - katalitički inaktivna endonukleaza SaCas9, TET1 - katalitička domena ljudskog enzima TET1, T2A - samo-cijepajući peptid 2A iz virusa *Thosea asigna*, P2A - samo-cijepajući peptid 2A iz virusa *Porcine teschovirus*, *nucleoplamin NLS* – bipartitni jezgrin lokalizacijski signal iz nukleoplazmina, PuroR - N-acetiltransferaza puromicina, mClover3 – monomerna varijanta zeleno-žutog fluorescentnog proteina bGH_PA_terminator - terminacijska sekvenca gena goveđeg hormona rasta, ORI - ishodište replikacije, AmpR – gen za β -laktamazu koja daje otpornost na antibiotik ampicilin.



Slika 10. Mape plazmidnih konstrukata s fuzioniranom sekvencom N-VPR-dSpCas9 za ciljanu aktivaciju. (A) Plazmidni konstrukt N-VPR-SpCas9-Puro-Ruby+HNF1A-sg03 s odgovarajućom molekulom sgRNA (HNF1a-sg03) koja navodi fuziju VPR-dSpCas9 na ciljano mjesto u genu *HNF1A*. (B) Plazmidni konstrukt N-VPR-SpCas9-Puro-Ruby+NT-sgRNA s odgovarajućom molekulom sgRNA (NT-sgRNA) koja ne cilja ni jedno mjesto u ljudskom genomu. U6 promotor - promotor RNA polimeraze III za U6 snRNA čovjeka, U6 terminator – terminacijska sekvenca U6 snRNA čovjeka, gRNA „scaffold“ - mjesto koje sadrži restriksijsko mjesto za ugradnju gena crRNA molekula, *CMV enhancer* – pojačivač iz ljudskog citomegalovirusa, SV40 NLS - jezgrin lokalizacijski signal velikog T antigena virusa SV40 (od engl. *Simian virus 40*), *chicken β-actin* - hibridni oblik promotora beta aktina kokoši CBA, VPR – fuzijski protein sastavljen od 3 aktivacijske domene – VP64, RelA (p65) AD, Rta Ad, 3xFLAG - 3 uzastopna epitopa, dCas9 - katalitički inaktivna endonukleaza SpCas9, T2A - samo-cijepajući peptid 2A iz virusa *Thosaea asigna*, P2A - samo-cijepajući peptid 2A iz virusa *Porcine teschovirus*, *nucleoplasmin NLS* – bipartitni jezgrin lokalizacijski signal iz nukleoplazmina, PuroR - N-acetiltransferaza puromicina, mRuby3 – monomerna varijanta crvenog fluorescentnog proteina, bGH_PA_terminator - terminacijska sekvenca gena goveđeg hormona rasta, ORI - ishodište replikacije, AmpR – gen za β-laktamazu koja daje otpornost na antibiotik ampicilin.

3.2.2. Izrada testova za bisulfitno pirosekvenciranje i određivanje stupnja CpG metilacije metodom bisulfitnog pirosekvenciranja

3.2.2.1. Izolacija ukupne genomske DNA iz transficiranih stanica HEK293

DNA je izolirana koristeći komercijalni kit *DNeasy Blood & Tissue Kit*. Izolacija se provodila prema uputama proizvođača. Postupak uključuje sljedeće korake. Stanice su centrifugirane 5 min na 300 g te je talog resuspendiran u 200 μl pufera PBS. Dodano je 20 μl proteinaze K i 200 μl pufera za lizu AL te je provedena inkubacija 10 min na 56 °C. Nakon

dodavanja 200 µl 96%-tnog etanola, smjesa je prenesena na kolone koje vežu DNA, a ostaci stanica su uklonjeni centrifugiranjem 1 min na 6000 g. Vezana DNA je isprana s puferima AW1 i AW2. Za eluciju DNA s kolone, korišteno je 200 µl elucijskog pufera AE. Svaki dodatak pufera za ispiranje te dodatak elucijskog pufera uključuje centrifugiranje 1 min na 6000 g. Koncentracije izolirane DNA izmjerene su na spektrofotometru *NanoDrop 8000*.

3.2.2.2. Bisulfitna konverzija ukupne genomske DNA izolirane iz transficiranih stanica HEK293

Za potrebe analize metilacije DNA pirosekvenciranjem, DNA se mora bisulfitno konvertirati. Bisulfitna konverzija uključuje tretiranje DNA s natrijevim bisulfitom prilikom čega se nemetilirani citozini deaminiraju do uracila. Metilirani citozini ostaju nepromijenjeni tijekom tretmana. Tijekom lančane reakcije polimerazom (PCR, od eng. *Polymerase Chain Reaction*) uracil prelazi u timin, a metilirani citozin ostaje u formi citozina. Ta promjena u DNA sekvenci može se detektirati sekvenciranjem.

Za bisulfitnu konverziju korišten je komercijalno dostupan komplet *EZ DNA Methylation-Gold Kit* te se postupak bisulfitne konverzije provodio prema uputama proizvođača (Zymo Research). Prema protokolu, 130 µL konverzijskog reagensa CT dodano je u 20 µl DNA mase 100 ng te je tubica sa smjesom postavljena u uređaj za PCR *Veriti 96 Well Thermal Cycler*. Uvjeti reakcije u uređaju su bili sljedeći: denaturacija na 98°C na 10 min; inkubacija na 64°C na 2 h i 30 min. Reakcijska smjesa je dodana na kolonu sa 600 µl pufera za vezanje (*M-Binding Buffer*). DNA je isprana s 200 µl pufera *M-Wash Buffer* nakon čega je desulfonacija provedena dodavanjem 200 µl pufera *M-Desulphonation Buffer*. Nakon toga su uslijedila još dva ispiranja puferom *M-Wash Buffer*, a DNA je u konačnici eluirana s 10 µl elucijskog pufera *M-Elution Buffer*. Svi koraci na koloni uključuju 30 sekundi centrifugiranja na 12000 g. Bisulfitna konverzija je provedena za sve biološke replike uspostavljenih transfekcija za sve vremenske točke sakupljanja stanica. Također, za sve vremenske točke sakupljanja napravljena je i negativna kontrola bisulfitne konverzije u kojoj su provedeni svi koraci protokola, ali u reakcijsku smjesu nije dodana DNA.

3.2.2.3. Dizajn početnica

Analiza metilacije metodom pirosekvenciranja zahtjeva umnožavanje željenih regija na bisulfitno konvertiranoj DNA, stoga su prvo dizajnirane početnice koje obuhvaćaju regije smještene uzvodno i nizvodno od 4 regulatorna CpG mjesta ciljanih plazmidnim konstruktom za ciljanu demetilaciju. Početnice su odabrane unutar regije chr12:121415486-121417817

referentnog ljudskog genoma GRCh37 (hg19, veljača 2019). Navedena regija je kopirana u program *Microsoft Word* gdje je ručno „konvertirana“ tj. citozini u kontekstu CpG mjesta su zamijenjeni slovom Y, a ostali citozini su zamijenjeni slovom T. Početnice su ručno odabrane na konvertiranoj sekvenci. Prilikom odabira pazilo se da početnice ispunjavaju sljedeće uvjete: dužine početnica bi trebale biti u rangu od 20 do 35 nukleotida (nt), veličina PCR produkta bi idealno trebala biti manja od 200 pb, temperatura taljenja (T_m , od eng. *melting temperature*) između parova početnica ne bi se smjela razlikovati za više od 2 °C, početnice bi trebale sadržavati timine koji prilikom bisulfitne konverzije prelaze u uracil kako bi se spriječilo umnožavanje nepotpuno konvertirane DNA, poželjno je da početnice ne sadrže CpG mjesta, ali ako se to ne može izbjeći onda se ona moraju nalaziti na 5' kraju početnice, *Forward* (F) ili *Reverse* (R) početnica mora sadržavati biotin na 5' kraju, početnice ne bi smjele stvarati dimere. Nakon bisulfitne konverzije, sekvenca DNA je manje kompleksna i sadrži puno ponavljanja adenina i timina, stoga je izabrano više početnica prilikom čega nisu sve uspjele zadovoljiti gore navedene uvjete. Temperature taljenja i da li početnice stvaraju dimere, provjereno je u softveru *PerlPrimer* (Marshall 2004). Sve početnice su se naručivale od tvrtke *Macrogen* (Seul, Južna Koreja). Odabrani setovi početnica nalaze se u Tablici 1.

3.2.2.4. Provjera početnica i optimizacija uvjeta reakcije PCR

Za potrebe provjere početnica i optimizacije uvjeta reakcije PCR, kao kalup DNA korištena je bisulfitno konvertirana DNA izolirana iz stanica koje predstavljaju kontrolu *Mock*. PCR na bisulfitno konvertiranoj DNA rađen je prema protokolu proizvođača komercijalno dostupnog kompleta *Pyro Mark PCR Kit*. Reakcijska smjesa je, po uzorku, sadržavala: 12,5 μ l *PyroMark PCR Master Mix-a*, 2,5 μ l boje *CoralLoad* (10x), 0,5 μ l početnice *Forward* (10 μ M) i 0,5 μ l početnice *Reverse* (10 μ M), 8 μ l vode te 1 μ l kalupa DNA. Početnice su isprobane na različitim temperaturama hibridizacije (T_a , od eng. *annealing temperature*) sa 0,5 μ l magnezijevog klorida ($MgCl_2$) konačne koncentracije 2 mM ili bez dodatka $MgCl_2$. Za svaki set početnica uvijek je napravljena i negativna kontrola reakcije PCR koja sadrži reakcijsku smjesu, ali bez dodanog kalupa DNA. Odabrane T_a za odgovarajući set početnica nalaze se u Tablici 1. Reakcije PCR su provedene na uređaju *ProFlex PCR System*. Uvjeti reakcije bili su sljedeći: 1 ciklus aktivacije *HotStarTaq* polimeraze 15 min na 95 °C; 45 ciklusa: denaturacije DNA 30 sek na 95 °C, hibridizacije početnica 30 sek pri odgovarajućim temperaturama za svaki set početnica i elongacije 30 sek na 72 °C; 1 ciklus završne elongacije 10 min na 72 °C. Uspješnost reakcije PCR provjeravala se elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu s bojom *GelRed* koja služi za vizualizaciju

PCR produkata u gelu. Kao marker molekulskih masa korišten je *100 bp DNA Ladder Ready to Load*.

Tablica 1. Početnice i temperature hibridizacije (Ta, od eng. *annealing temperature*) za umnožavanje regija bisulfitno konvertirane DNA iz transficiranih stanica HEK293. F u prvom stupcu tablice označava *Forward* početnicu, a R označava odgovarajuću *Reverse* početnicu. Btn (biotin) označava na 5' kraju koje početnice se nalazi vezani biotin. Za svaki set početnica dana je duljina produkta reakcije PCR kao i odgovarajuće ime fragmenta. F1 i R1 početnice su prethodno dizajnirane i umnožavaju 4 regulatorna CpG mjesta ciljana fuzijom TET1-dSaCas9.

| Početnice | Sekvence početnica (5' - 3') | Ta (°C) | Duljina PCR produkta (pb) | Fragment |
|----------------|------------------------------|---------|---------------------------|----------|
| HNF1A_F1 | GGATAAGGGGGAGTTTTG | 60 | 67 | F1 |
| HNF1A_R1 (Btn) | CTCCCCAACCATTAAA | | | |
| HNF1A_F2 | GGAGTTTGGTTTGTGTTTGT | 50 | 133 | F2 |
| HNF1A_R2 (Btn) | CTACAATACTCAATTTAAAACCATAA | | | |
| HNF1A_F3 (Btn) | GGAGTTGGTTGAGTTGT | 56 | 177 | F3 |
| HNF1A_R3 | AACAAAACCTCTTACTACAAA | | | |
| HNF1A_F4 | GGAGAATTTTAGTTTTG | 50 | 163 | F4 |
| HNF1A_R4 (Btn) | AACTAAAATCATAAAAAC | | | |
| HNF1A_F5 | GTTAGGGAAGTTTAGGT | 51 | 238 | F5 |
| HNF1A_R5 (Btn) | ACACATAAATAATTAATAACTA | | | |

3.2.2.5. Izrada testova za pirosekvenciranje i optimizacija uvjeta reakcije bisulfitnog pirosekvenciranja

Za potrebe optimizacije uvjeta pirosekvenciranja, također se koristila bisulfitno konvertirana DNA iz kontrole *Mock*. Za umnožavanje regije za analizu metilacije korištene su početnice (osim F1 i R1) i uvjeti reakcije PCR prikazane u Tablici 1. Testovi za pirosekvenciranje izrađeni su u računalnom programu *PyroMark Q24 Advanced Softwer* (Qiagen) prema uputama proizvođača. Dizajn testa zahtjeva unos konvertirane sekvence za analizu i njoj pripadajuće nekonvertirane sekvence. Analizirana sekvenca ne uključuje dio produkta reakcije PCR na koji sjeda početnica za pirosekvenciranje. Prilikom dizajna početnica, za određene amplikone je naručena i odgovarajuća početnica za pirosekvenciranje dok se za ostale amplikone kao početnica za pirosekvenciranje koristila *Forward* početnica. Prilikom optimizacije samih testova, mijenjala se duljina analiziranih amplikona, lanac koji se sekvencira – kodirajući ili nekodirajući lanac, početnice za pirosekvenciranje kao i početnica

za PCR koja na 5' kraju ima vezani biotin. Reakcija pirosekvenciranja odvijala se na uređaju *PyroMark Q24 Advanced* te je reakcija postavljena prema protokolu proizvođača (Qiagen). Produkti reakcije PCR su imobilizirani na sefrozne kuglice obložene streptavidinom vezanjem biotina koji se nalazi na odgovarajućem lancu DNA. Reakcijska smjesa za mobilizaciju produkata reakcije PCR, po uzorku, sadržavala je: 3 μ l sefroznih kuglica *Streptavidin Sepharose High Performance*, 37 μ l pufera za vezanje *PyroMark Binding Buffer*, 20 μ l vode i 20 μ l produkta reakcije PCR. Prilikom optimizacije uvjeta, mijenjala se količina dodanog produkta reakcije PCR. Pripremljena reakcijska smjesa inkubirala se 10 min na tresilici. Razrjeđena početnica za pirosekvenciranje pripremljena su dodavanjem 0,375 μ l početnice za pirosekvenciranje u 19, 25 μ l pufera za hibridizaciju *PyroMark Advanced Annealing Buffer*. Nakon mobilizacije produkata reakcije PCR na sefrozne kuglice, koristeći *PyroMark Q24 Vacuum Workstation*, sefrozne kuglice s vezanim produktom reakcije PCR su pročišćavane redom kroz otopine 70%-tnog etanola, pufera za denaturaciju *PyroMark Denaturation Solution*, pufera za ispiranje *PyroMark Wash Buffer* i u konačnici su pomiješane s 20 μ l razrijeđene otopine početnica. Smjesa je inkubirana 4 min na 80 °C. U spremnik (od eng. *cartridge*) su dodane odgovarajuće količine smjese enzima koja sadrži DNA polimerazu, ATP sulfurilazu, luciferazu i apirazu, smjese supstrata koja sadrži adenozin-5-fosfosulfat (APS) i luciferin te smjese deoksiribonukleotida uključujući dTTP, dCTP, dGTP i dATP α S (deoksiadenozin-alfa-tio-trifosfat). Spremnik je zajedno s uzorcima postavljen u uređaj za pirosekvenciranje. Odabrani testovi za pirosekvenciranje s pripadajućim početnicama i uvjetima prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Testovi s odgovarajućim početnicama za analizu metilacije CpG mjesta u transficiranim stanicama HEK293 metodom bisulfitnog pirosekvenciranja. Tablica prikazuje imena testova pridružena odgovarajućem fragmentu, početnice koje su korištene za pirosekvenciranje, analiziranu bisulfitnu sekvencu te sekvencu analizirane regije prije tretmana bisulfitom, broj CpG mjesta koji se analizira određenim testom kao i lanac DNA koji se sekvencirao tijekom analize. HNF1A_1 i njemu pripadajuća početnica su dizajnirani prethodno i služe za analizu metilacije 4 regulatorna CpG mjesta ciljana fuzijom TET1-dSaCas9.

| Fragment | Test | Početnica | Sekvenca početnice (5' - 3') | Analizirana konvertirana sekvencu (5' - 3') | Nekonvertirana sekvencu (5' - 3') | Broj analiziranih CpG mjesta | Sekvencirani lanac DNA |
|----------|---------|--------------|------------------------------|--|---|------------------------------|------------------------|
| F1 | HNF1A_1 | HNF1A_SEQ | AAGGGGG AGTTT | TGYGGYGGYG GTYGAGG | TGCGGCGGCGGT CGAGG | 4 | kodirajući |
| F2 | HNF1A_2 | HNF1A_F2 | GGAGTTT GGTTTGT GTTTGT | YGGTYGGTAG GTAAAYGTAA TTTAYGYGGT GGGGGAGGY GGTTAGYGTG GTGGATT | CGGCCGCGCAGGC AAACGCAACCCAC GCGGTGGGGGAG GCGGCTAGCGTG GTGGACC | 7 | kodirajući |
| F3 | HNF1A_3 | HNF1A_R3_SEQ | TAAAATCT TCCCCATC | RTCRTCCRTCT CRTCCTCRAA ACCCRAATC | GTCGTCCGTCTCG TCCTCGGAGCCCC GAGTC | 6 | nekodirajući |
| F4 | HNF1A_4 | HNF1A_F4_SEQ | TTAGTTTT GAGGAGG | YGGTTTATTA GAAAGTYGTG G | CGGCCACCAGA AAGCCGTGG | 2 | kodirajući |
| F5 | HNF1A_5 | HNF1A_F5_SEQ | TTTTATTT TATTAGTA GG | YGTTATTAGA GGTTGTTYGT TTTATATTTT ATT | CGCCATTAGAGGC TGCCCCGTTCTACA TCCCCATC | 2 | kodirajući |

3.2.2.6. Analiza metilacije CpG mjesta smještenih uzvodno i nizvodno od 4 regulatorna CpG mjesta gena *HNF1A* u transficiranim stanicama HEK293

Analiza metilacije CpG mjesta smještenih u regijama uzvodno i nizvodno od mjesta ciljane demetilacije gena *HNF1A* provedena je na bisulfitno konvertiranoj DNA izoliranoj iz transficiranih stanica HEK293. Metilacija je analizirana u svim biološkim replikama transficiranih stanica (TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9, TET1-dSaCas9, VPR-dSpCas9, NT i *Mock*) za sve vremenske točke sakupljanja (5., 8, 11., 20. i 30. dan). Konačno su odabrana 4 različita seta početnica koje umnožavaju 4 različita fragmenta (F2, F3, F4 i F5) na bisulfitno konvertiranoj DNA. Za svaki set početnica odabrana je i odgovarajuća Ta. Odabrane početnice i njihove sekvence kao i pripadajuće Ta prikazane su u Tablici 1. Za umnožavanje navedenih regija na bisulfitno konvertiranoj DNA korišten je *Pyro Mark PCR Kit*, bez

odatka $MgCl_2$. Za 5., 8. i 11. dan za F4 je u reakcijsku smjesu za PCR dodano 2 μl umjesto jednog 1 μl DNA kao za sve ostale uzorke. Uz uzorke iz transficiranih stanica HEK293, za svaki dan sakupljanja za sve setove početnica napravljena je negativna kontrola reakcije PCR te negativna kontrola bisulfitne konverzije gdje je u reakcijsku smjesu za PCR dodana negativna kontrola bisulfitne konverzije.

Umnoženi produkti reakcije PCR te sve negativne kontrole, pirosekvencirani su na uređaju *PyroMark Q24 Advanced*. Za sve fragmente osim za F4, u reakciju za pirosekvenciranje je dodano 10 μl produkta reakcije PCR dok je za F4 dodano 20 μl produkta reakcije PCR. Za analizu metilacije u dobivenim produktima reakcije PCR, odabrana su 4 odgovarajuća testa i njima pripadajuće početnice za pirosekvenciranje (Tablica 2.). Rezultati pirosekvenciranja su analizirani u *PyroMark Q24 Advanced Softwer*-u u kojem je razina metilacije u svakom analiziranom CpG mjestu izražena kao postotak. Uz navedene uzorke, metilacija se analizirala i u 4 regulatorna CpG mjesta koja su ciljana plazmidnim konstruktom za ciljanu demetilaciju. Početnice za PCR i pirosekvenciranje, kao i test korišten za analizu metilacije navedene regije, također su prikazani u Tablicama 1 i 2 pod nazivom fragmenta F1. Za postotak metilacije u svakom analiziranom CpG mjestu za svaku biološku skupinu (TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9, TET1-dSaCas9, VPR-dSpCas9, NT i *Mock*) i za sve vremenske točke sakupljanja nakon transfekcije, napravljena je deskriptivna statistika za utvrđivanje srednje vrijednosti i standardne devijacije u programu *GraphPad Prism*.

3.2.3. Izolacija ukupne RNA iz transficiranih stanica HEK293

Ukupna RNA iz transficiranih stanica HEK293 izolirana je koristeći komercijalno dostupan komplet *Rneasy Mini Kit*. Postupak izolacije provodio se prema protokolu proizvođača (Qiagen). Postupak je uključivao lizu stanica putem pufera RLT te homogenizaciju dobivenog lizata, dodavanje 70%-tnog etanola i centrifugiranje u koloni *Rneasy spin* 15 sek na 8000 g. Nakon toga uslijedilo je ispiranje sa 700 μl pufera RW1 te dva koraka ispiranja s 500 μl pufera RPE. Prva dva koraka ispiranja uključuju 15 sek centrifugiranja, a treći korak ispiranja 2 min centrifugiranja na 8000g. Konačno, RNA je eluirana koristeći vodu slobodnu od RNaza (od eng. *RNase-free water*) i centrifugiranjem 1 min na 8000g.

3.2.4. Reverzna transkripcija RNA izolirane iz transficiranih stanica HEK293

Reverzna transkripcija provedena je upotrebom reverzne transkriptaze *PrimeScript*. Prvo je pripremljena reakcijska smjesa koja sadrži 1 μ l nasumičnih heksamera, 1 μ l mješavine dNTP-ova, 1 μ g izolirane RNA te vodu slobodnu od RNaza tako da konačni volumen reakcijske smjese iznosi 10 μ l. Reakcijska smjesa je stavljena u uređaj za PCR *ProFlex PCR System* na 5 min na 65 °C te je nakon toga prebačena na led na najmanje 5 min. Druga reakcijska smjesa, koja sadrži 5,5 μ l vode slobodne od RNaza, 4 μ l pufera *PrimeScript Buffer*, 0,5 μ l inhibitora RNaza *Recombinant RNase Inhibitor* te 0,5 μ l reverzne transkriptaze *PrimeScript*, dodana je u prvu reakcijsku smjesu i stavljena je u *ProFlex PCR System* na 42 °C na 60 min te na 70 °C na 15 min. cDNA je pohranjena na -20 °C do daljnje upotrebe.

3.2.5. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR)

Ekspresija gena *HNF1A* u stanicama HEK293 nakon transfekcije, analizirana je metodom kvantitativnog PCR-a (qPCR) na uređaju *7500 Fast Real-Time PCR System*. U svrhu analize ekspresije korištena je metoda qPCR koja omogućava kvantifikaciju umnažanja specifičnih molekula nukleinskih kiselina detekcijom nastalih produkata reakcije PCR u stvarnom vremenu. Analiza ekspresije gena *HNF1A* napravljena je uz upotrebu proba *TaqMan*, a kao endogena kontrola služio je gen *HPRT1*. Korištene su dvije komercijalno dostupne probe *TaqMan*: proba Hs00167041_m1 za gen *HNF1A* te proba Hs02800695_m1 za gen *HPRT1*. Obje probe obuhvaćaju granice egzona u navedenim genima što sprječava umnožavanje genomske DNA. Naime, ukoliko je nakon izolacije RNA zaostalo ili je došlo do kontaminacije genomskom DNA, ta DNA se neće umnožiti korištenim probama. Za pripremu reakcijske smjese korištena je komercijalno dostupna mješavina *TaqMan Gene Expression Master Mix* koja sadrži sve potrebne komponente, osim probe i kalupa, za kvantifikaciju qPCR-om. Reakcijska smjesa za jednu reakciju je, stoga, pripremljena dodavanjem 10 μ l navedene otopine, 1 μ l odgovarajuće *TaqMan* probe, 1 μ l kalupa cDNA te 8 μ l vode. Ekspresija je analizirana u transficiranim stanicama HEK293 za svaku vremensku točku sakupljanja (8., 5., 11., 20. i 30. dan.). Za svaku biološku repliku provedenih transfekcija (TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9, TET1-dSaCas9, VPR-dSpCas9, NT i *Mock*) rađene su dvije tehničke replike za obje probe. Također, za svaku probu napravljena je negativna kontrola koja sadrži reakcijsku smjesu bez dodanog kalupa cDNA. Reakcije su postavljene u qPCR uređaj te je reakcija pokrenuta pomoću *7500 Real-Time PCR Software*-a (Applied Biosystems).

Dobiveni rezultati analize obrađeni su metodom relativne kvantifikacije $\Delta\Delta C_t$ (Schmittgen i Livak 2008) pri čemu je C_t broj ciklusa potreban da reakcija uđe u eksponencijalnu fazu tj. da fluorescencijski signal postane jači od pozadinskog signala. Kao referentni uzorak korištena je kontrola *Mock*. Nakon analize, dobivene su vrijednosti C_t koje bilježi sam uređaj. Prvo su izračunate srednje vrijednosti C_t za gen *HNF1A* i *HPRT1* za svaku biološku repliku. Srednje vrijednosti C_t za gen *HNF1A* su potom normalizirane u odnosu na srednje vrijednosti C_t za *HPRT1* čime je dobivena ΔC_t vrijednost za svaku odgovarajuću biološku repliku. Iz ΔC_t vrijednosti dviju bioloških replika *Mock*, izračunata je srednja vrijednost ΔC_t . Vrijednosti ΔC_t bioloških replika normalizirane su na srednju vrijednost ΔC_t referentnog uzorka *Mock* čime je dobivena vrijednost $\Delta\Delta C_t$ koja je korištena za izračunavanje faktora promjene ekspresije gena (FC, od eng. *fold change*). FC govori koliko je puta različita razina ekspresije gena *HNF1A* u određenoj biološkoj skupini u odnosu na razinu ekspresije navedenog gena u referentnoj skupini *Mock*. Za vrijednosti FC za svaku biološku skupinu (TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9, TET1-dSaCas9, VPR-dSpCas9, NT i *Mock*), uključujući sve vremenske točke sakupljanja nakon transfekcije, napravljena je deskriptivna statistika za utvrđivanje srednje vrijednosti i standardne devijacije u programu *GraphPad Prism*.

4. REZULTATI

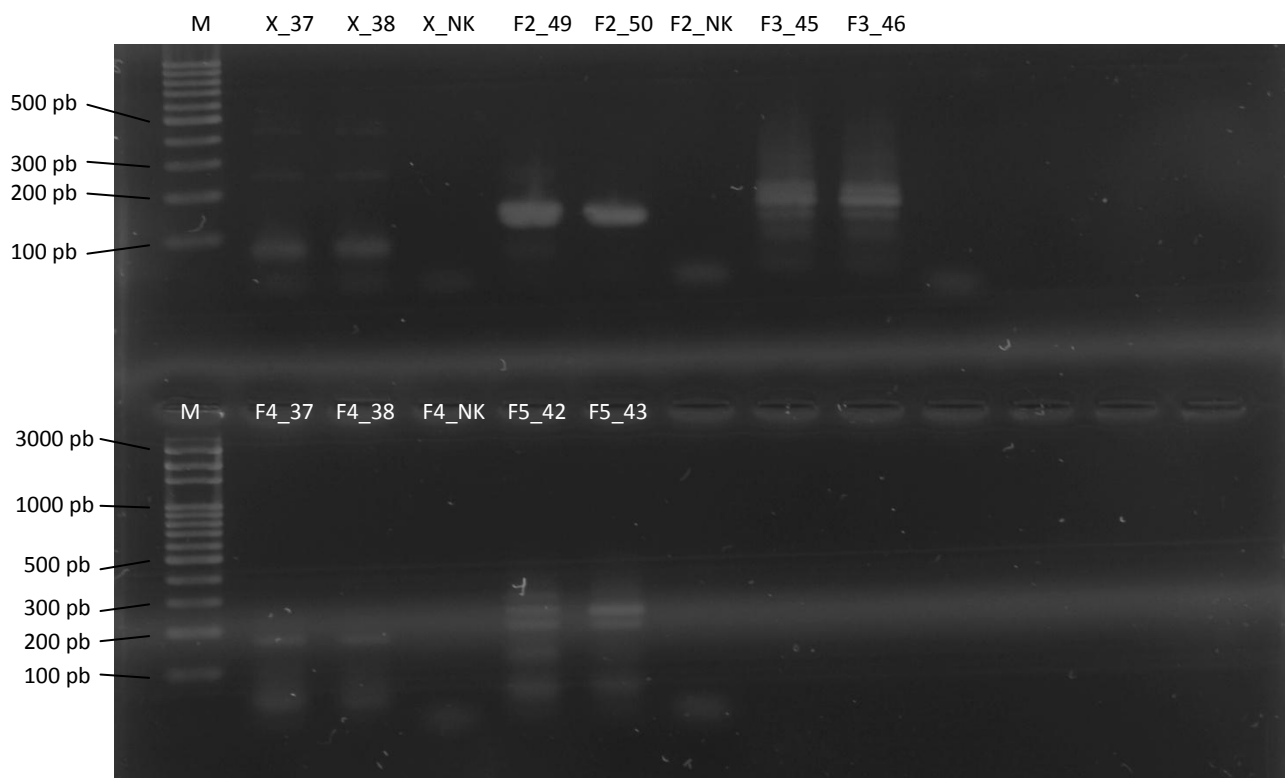
4.1. Transfekcija stanica HEK293

Stanice HEK293 transficirane su pojedinačnim plazmidima koji sadrže fuzionirane sekvence TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9, odnosno simultano su ko-transficirane s oba plazmidna konstrukta koji sadrže sgRNA komplementarne regulatornoj regiji gena *HNF1A*. Također, stanice HEK293 su ko-transficirane s oba plazmidna konstrukta koji sadrže molekulu sgRNA koja ne cilja ni jedno mjesto u ljudskom genomu (kontrola *Non-Target*) (NT), te su transficirane samo s transfekcijskim reagensom bez plazmida (kontrola *Mock*). Stanice su selektirane s antibiotikom puromicinom. One stanice koje nisu primile plazmidni konstrukt su uginule prilikom čega su se zaokružile i odlijepile od podloge petrijevke te su uklonjene zajedno s medijem s antibiotikom. Stanice koje su primile plazmidni konstrukt su preživjele i ostale zalijepljene za podlogu petrijevke te im je dodan svježi medij bez antibiotika. Preživjele stanice su korištene za daljnje eksperimente. Ukupna genomska DNA te ukupna RNA su uspješno izolirane iz sakupljenih stanica.

4.2. Dizajn testova za bisulfitno pirosekvenciranje i određivanje stupnja CpG metilacije metodom bisulfitnog pirosekvenciranja

4.2.1. Dizajn početnica i optimizacija uvjeta reakcije PCR

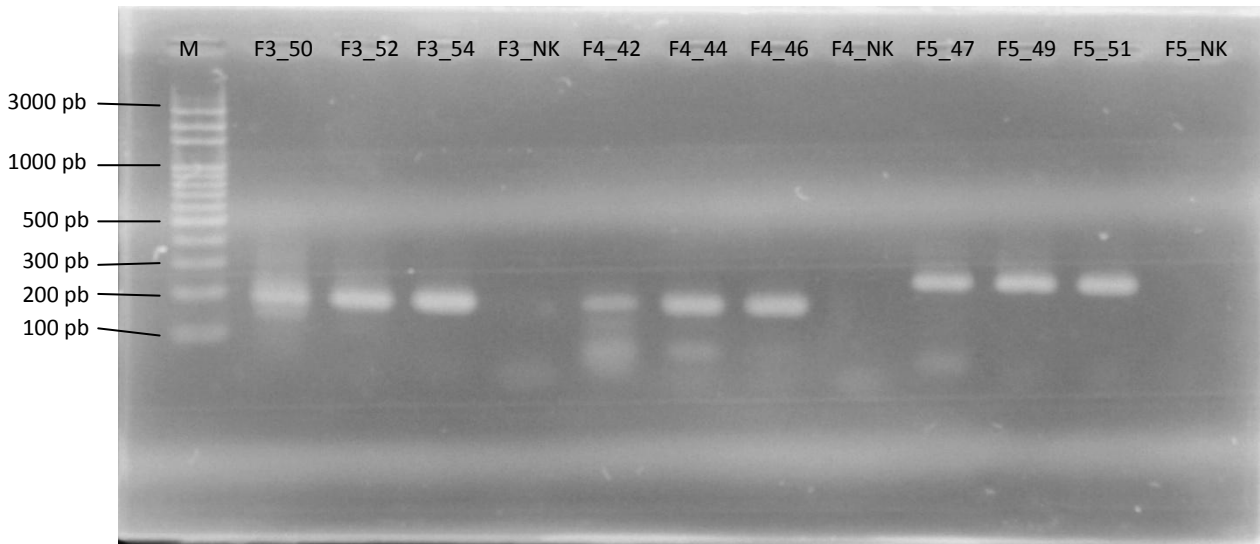
Početnice za umnožavanje bisulfitno konvertirane DNA su dizajnirane tako da obuhvaćaju regije smještene uzvodno i nizvodno od 4 regulatorna CpG mjesta u prvom egzonu gena *HNF1A* koja su ciljana plazmidnim konstruktom za ciljanu demetilaciju. Ukupno je dizajnirano 5 različitih setova početnica. Prilikom optimizacije reakcije PCR, mijenjale su se temperatura hibridizacije početnica i dodavanje MgCl₂. Cilj optimizacija je bio dobiti zadovoljavajući prinos željenog produkta reakcije PCR, a da pritom ne dolazi do nespecifičnih umnažanja nekih drugih regija. Nakon provedene optimizacije, konačno su odabrana 4 različita seta početnica s odgovarajućom temperaturom hibridizacije. Set početnica HNF1A_F2 i HNF1A_R2 je već u prvoj reakciji PCR pri temperaturi hibridizacije jednakoj 50 °C pokazao zadovoljavajuće rezultate (Slika 11.). Slabi signali prisutni u negativnim kontrolama reakcije PCR predstavljaju dimere početnica koji se stvaraju zbog odsutnosti kalupa DNA u reakciji. Ostali setovi početnica, zahtijevali su dodatne optimizacije zbog prisutnosti nespecifičnih umnažanja i slabog prinosa amplicona očekivane veličine.



Slika 11. Elektroforeza produkata reakcije PCR umnoženih s dizajniranim setovima početnica na bisulfitno konvertiranoj DNA. Elektroforeza je napravljena u 2%-tnom agaroznom gelu. M – marker molekulske masa 100 bp DNA Ladder Ready to Load. X – set početnica koji je odbačen nakon daljnjih optimizacija. F2 – set početnica HNF1A_F2 i HNF1A_R2. Na mjestu ovog seta početnica, pri temperaturi hibridizacije od 50 °C, vidi se samo jedan jaki signal čija veličina odgovara očekivanoj veličini amplikona dok je pri temperaturi hibridizacije od 49 °C prisutan slabi signal nespecifično umnoženog amplikona. F3- set početnica HNF1A_F3 i HNF1A_R3. F4 – set početnica HNF1A_F4 i HNF1A_R4. F5 – set početnica HNF1A_F5 i HNF1A_R5. Brojevi navedeni pored svakog seta početnica označavaju korištenu temperaturu hibridizacije za određenu reakciju PCR. NK –označava negativnu kontrolu reakcije PCR.

Dodatkom $MgCl_2$, povećao se prinos željenih produkata reakcije PCR za preostala 4 seta početnica, ali je pritom bilo prisutno i više nespecifičnih umnažanja. Daljnje optimizacije su, stoga, uključivale samo promjenu temperature hibridizacije. Prvi set početnica (X) je odbačen zato što se daljnjim optimizacijama nije uspio dobiti željeni produkt reakcije PCR i smanjiti razina nespecifičnih umnažanja. Za preostala tri seta početnica HNF1A_F3 i HNF1A_R3; HNF1A_F4 i HNF1A_R4 te HNF1A_F5 i HNF1A_R5, korištenjem viših temperatura hibridizacije, bez dodatka $MgCl_2$ u reakcijsku smjesu, dobiveni su zadovoljavajući prinosi odgovarajućih produkata reakcije PCR bez prisutnosti nespecifično umnoženih amplikona. Usporedba rezultata reakcija PCR pri nižim i višim temperaturama hibridizacije za sva tri navedena seta početnica prikazana je na slici 12. Pri najvišim temperaturama hibridizacije dobiven je samo jedan jaki signal čija veličina odgovara

očekivanim veličinama amplikona za sva tri seta početnica. Slabi signali prisutni u negativnim kontrolama reakcije PCR predstavljaju dimere početnica. Za sve odabrane setove početnica, očekivana veličina produkata reakcije PCR navedena je u Tablici 1.



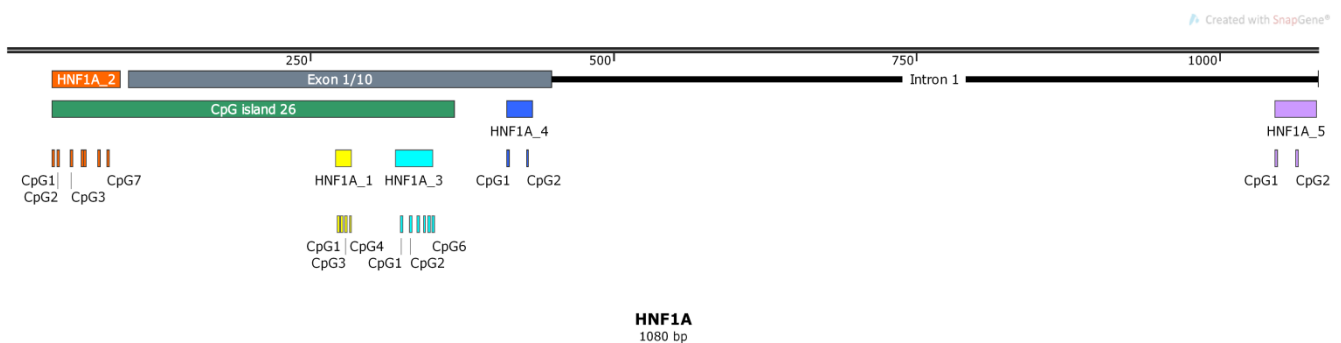
Slika 12. Elektroforeza produkata reakcije PCR umnoženih s odabranim setovima početnica na bisulfitno konvertiranoj DNA nakon optimizacije reakcije PCR. Elektroforeza je napravljena u 2%-tnom agaroznom gelu. M – marker molekulskih masa *100 bp DNA Ladder Ready to Load*. F3- set početnica HNF1A_F3 i HNF1A_R3. F4 – set početnica HNF1A_F4 i HNF1A_R4. F5 – set početnica HNF1A_F5 i HNF1A_R5. Brojevi navedeni pored svakog seta početnica označavaju korištenu temperaturu hibridizacije za određenu reakciju PCR. NK –označava negativnu kontrolu reakcije PCR.

4.2.2. Izrada testova za pirosekvenciranje i optimizacija uvjeta reakcije bisulfitnog pirosekvenciranja

Odabrani setovi početnica, korišteni su za umnožavanje bisulfitno konvertirane DNA te su se dobiveni produkti reakcije PCR koristili dalje za izradu testova i optimizacije uvjeta reakcije bisulfitnog pirosekvenciranja. Tijekom optimizacije uvjeta, isprobane su različite duljine sekvence i samim time i broj CpG mjesta koji će se analizirati, početnica koja će se koristiti za pirosekvenciranje, lanac DNA s kojim se ide u analizu – kodirajući ili nekodirajući, količina produkta reakcije PCR u reakcijskoj smjesi za pirosekvenciranje, a u samom procesu optimizacije mijenjali su se i uvjeti reakcije PCR koja prethodi pirosekvenciranju. Set početnica HNF1A_F2 i HNF1A_R2 umnožava regiju koja obuhvaća 11 CpG mjesta. Kao početnica za pirosekvenciranje koristila se HNF1A_F2. Odabrana sekvenca za analizu je bila predugačka da bi uređaj mogao dati ispravne rezultate za sva CpG

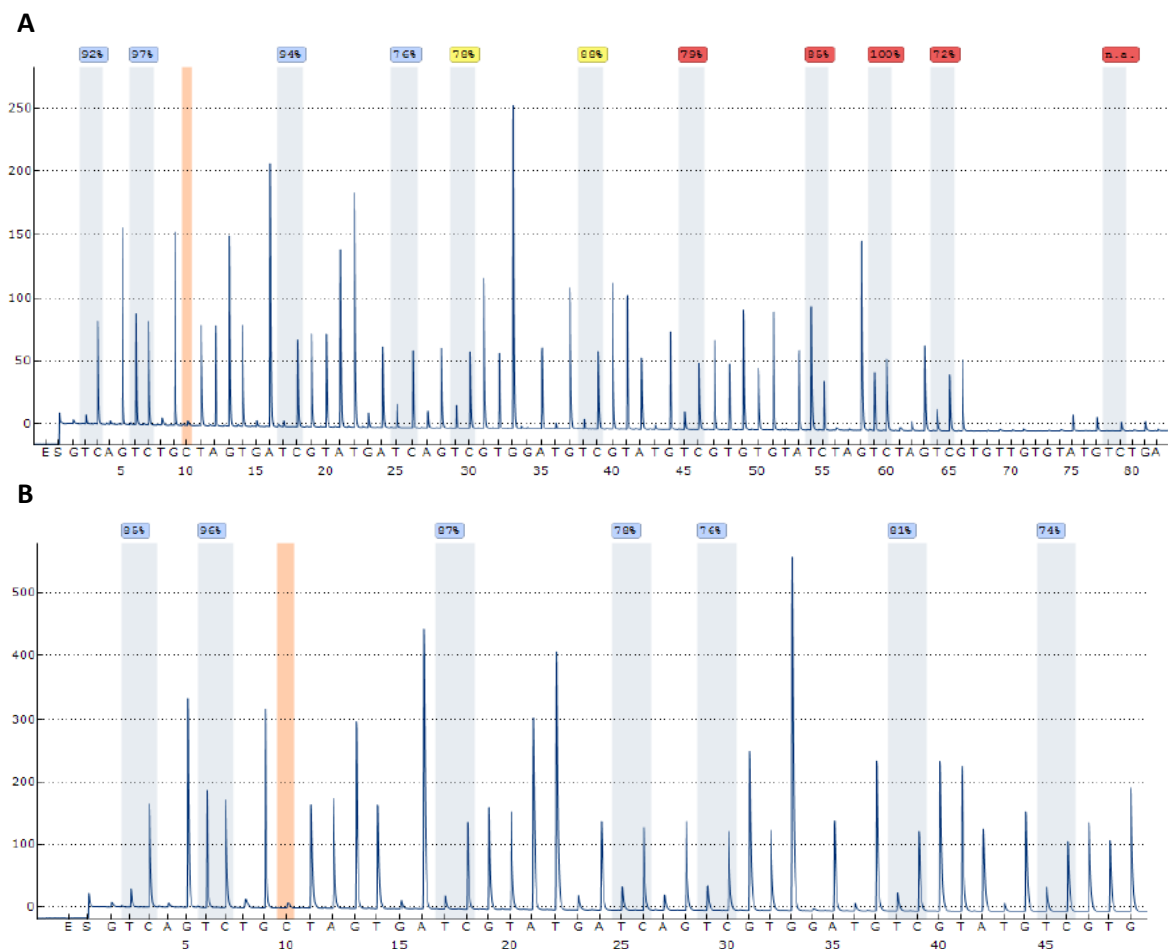
mjesta, stoga je sekvenca za analizu skraćena tako da obuhvaća 7 CpG mjesta. Ovaj test nije zahtijevao daljnje optimizacije te je korišten za daljnje analize. Test izrađen za analizu amplikona koji je umnožen setom početnica HNF1A_F3 i HNF1A_R3 zahtijevao je više optimizacija. Za ovaj amplikon prilikom dizajna početnica, dizajnirana je i odvojena početnica za pirosekvenciranje koja se veže za amplikon neposredno iza mjesta vezanja *Forward* početnice. Prva sekvenca za analizu sadržavala je 7 CpG mjesta. Naime, pirosekvenciranjem ove sekvence nisu dobiveni pouzdani rezultati niti za jedno CpG mjesto. Također, prilikom ugrađivanja nukleotida, došlo je do ugradnje nukleotida koji ne odgovaraju sekvenci za analizu. Pod pretpostavkom da je prilikom PCR-a došlo do nespecifičnih umnažanja koji se nisu detektirali na gelu, temperatura hibridizacije je povišena za dva stupnja, no to nije poboljšalo ishod pirosekvenciranja. Naime, sekvenca za analizu sadržavala je puno ponavljanja nukleotida gvanina koji daju visoke signale i smetaju uređaju pri analizi, stoga je dizajniran novi test u kojem se analizira sekvenca na nekodirajućem lancu molekule DNA te koja obuhvaća 6 CpG mjesta. Dizajnirana je nova početnica za pirosekvenciranje komplementarna nekodirajućem lancu DNA, a reakcija PCR se provodila na temperaturi hibridizacije jednakoj 56 °C. Ovim testom su uspješno dobiveni relevantni rezultati za svih 6 CpG mjesta te je test odabran za daljnje analize. Iako početnice HNF1A_F4 i HNF1A_R4 umnažaju regiju koja sadrži samo 2 CpG mjesta te je samim time sekvenca za analizu kratka, prvi izrađen test nije doveo do uspješne analize pirosekvenciranjem. Kao početnica za pirosekvenciranje korištena je HNF1A_F4. Prevelika količina produkta reakcije PCR koja se uzima za analizu također može negativno utjecati na ishod pirosekvenciranja što dovodi do nepouzdanih rezultata, stoga je količina koja se dodaje u reakciju smanjena s 20 µl na 10 µl, ali ni to nije dovelo do uspješnog pirosekvenciranja. Također, prilikom pirosekvenciranja došlo je i do ugrađivanja nekih nukleotida koji ne odgovaraju sekvenci za analizu. Iz tog razloga, izrađen je novi test u kojem je sekvenca za analizu skraćena te je dizajnirana nova početnica za pirosekvenciranje koja se veže odmah uzvodno od prvog analiziranog CpG mjesta. Zbog nespecifične ugradnje nukleotida, u reakciji PCR je također povišena temperatura hibridizacije s 46 °C na 50 °C. Ove optimizacije su dovele do uspješne analize pirosekvenciranjem, stoga se ovaj test koristio u daljnjim eksperimentima. Zbog veličine regije umnožene setom početnica HNF1A_F5 i HNF1A_R5, za navedeni amplikon dizajnirana je odvojena početnica za pirosekvenciranje koja se veže odmah uzvodno od prvog CpG mjesta. Prva sekvenca za analizu, obuhvaćala je 6 CpG mjesta, no uređaj nije uspješno mogao analizirati sva navedena mjesta. Sekvenca za analizu je prilikom optimizacije skraćivana nekoliko puta, a također je smanjena i količina uzorka za analizu pa je tako u

reakciju za pirosekvenciranje dodano 10 µl produkta reakcije PCR. Manja količina dodanog produkta reakcije PCR te duljina sekvence za analizu koja obuhvaća samo 2 CpG mjesta je konačno dovela do valjanih rezultata te je odabrana za daljnje analize u transficiranim stanicama HEK293. Odabrani testovi s odgovarajućim početnicama i analiziranim sekvencama prikazani su u Tablici 2. Slika 13. sadrži shematski prikaz regije gena *HNF1A* unutar koje se nalaze sekvence analizirane odabranim testovima.



Slika 13. Mapa regije gena *HNF1A* unutar koje su smještene sekvence analizirane odabranim testovima. Mapa prikazuje odabrane testove (HNF1A_2, HNF1A_3, HNF1A_4, HNF1A_5) uključujući već postojeći test HNF1A_1 za analizu 4 regulatorna CpG mjesta gena *HNF1A*. Testovi HNF1A_1, HNF1A_2 HNF1A_3 obuhvaćaju sekvence koje se nalaze unutar CpG otoka (od eng. *CpG island*) gena *HNF1A*. HNF1A_4 obuhvaća sekvencu smještenu unutar prvog egzona, ali izvan CpG otoka gena *HNF1A*. HNF1A_5 obuhvaća sekvencu smještenu u prvom intronu gena *HNF1A*. Za svaki test prikazan je broj odgovarajućih CpG mjesta.

Slika 14. prikazuje primjer rezultata pirosekvenciranja tj. pirogram za fragment 2 (F2) prije i nakon provedenih optimizacija. Rezultati pirosekvenciranja prikazuju se u obliku pirograma gdje se na x-osi nalazi poredak kojim se nukleotidi ugrađuju u sekvencu, a y-os prikazuje maksimume (od eng. *peak*) ugrađenih nukleotida. Visina maksimuma proporcionalna je broju ugrađenih nukleotida. Stupanj metilacije prikazuje se u obliku postotka u kvadratiću iznad maksimuma koji predstavlja Y mjesto, odnosno mjesto na koje se, ovisno o statusu metilacije, ugrađuje timin ili citozin. Kvadratići mogu biti obojani plavo, žuto ili crveno, a navedene boje služe kao kontrola kvalitete odnosno pouzdanosti rezultata gdje plava boja označava da su rezultati pouzdani, žuta boja označava da dobivenu sekvencu treba ručno provjeriti dok crvena znači da rezultati nisu pouzdani i da analizu treba ponoviti.

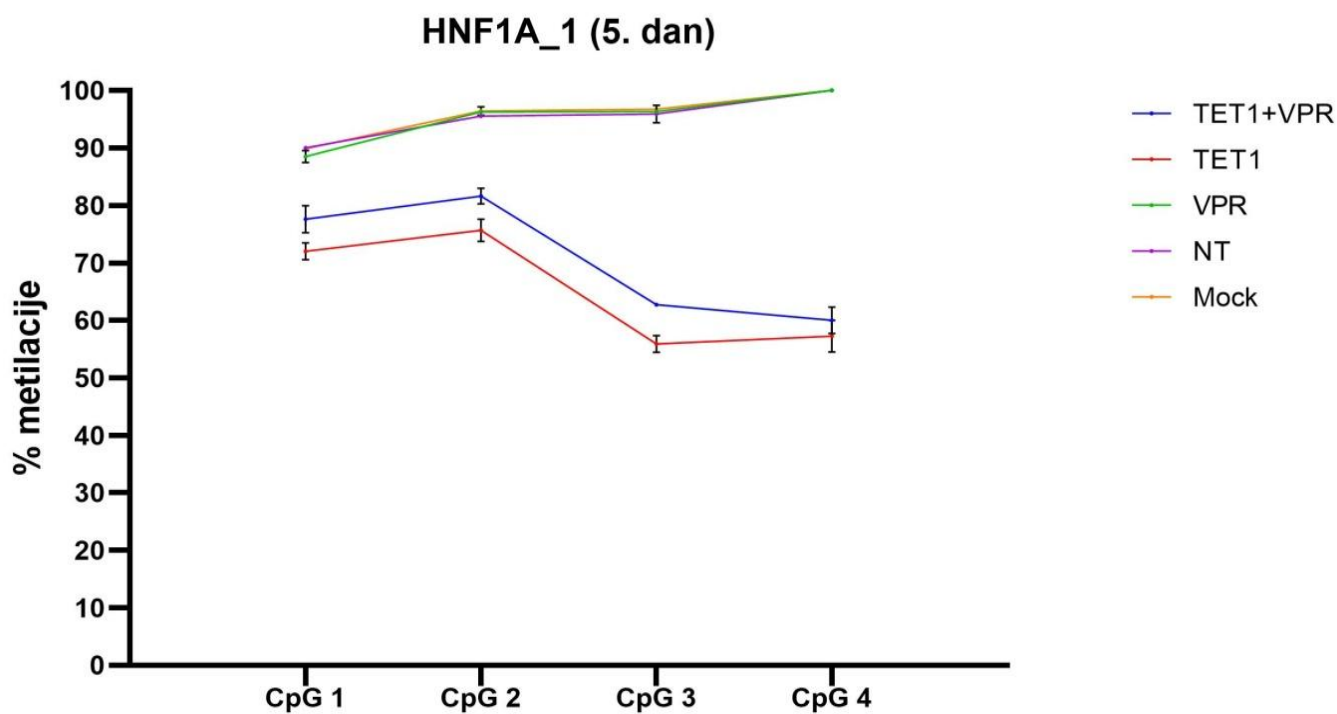


Slika 14. Pirogrami za amplikon umnožen početnicama HNF1A_F2 i HNF1A_R2 dobiveni nakon analize pirosekvenciranjem. (A) Rezultati dobiveni nakon analize amplikona koristeći prvi dizajnirani test. Postoci u crvenom kvadratiću govore da su rezultati nepouzdana, a postoci u žutom kvadratiću da ih treba ručno provjeriti. Postoci u plavom kvadratiću su pouzdani. (B) Rezultati dobiveni nakon analize amplikona drugim dizajniranim testom. Odbačena su zadnja 4 CpG mjesta iz prvog testa čime se povećala kvaliteta analize pirosekvenciranjem. Svi kvadratići su plavi što znači da su dobiveni rezultati postotka metilacije pouzdani u svih 7 analiziranih CpG mjesta.

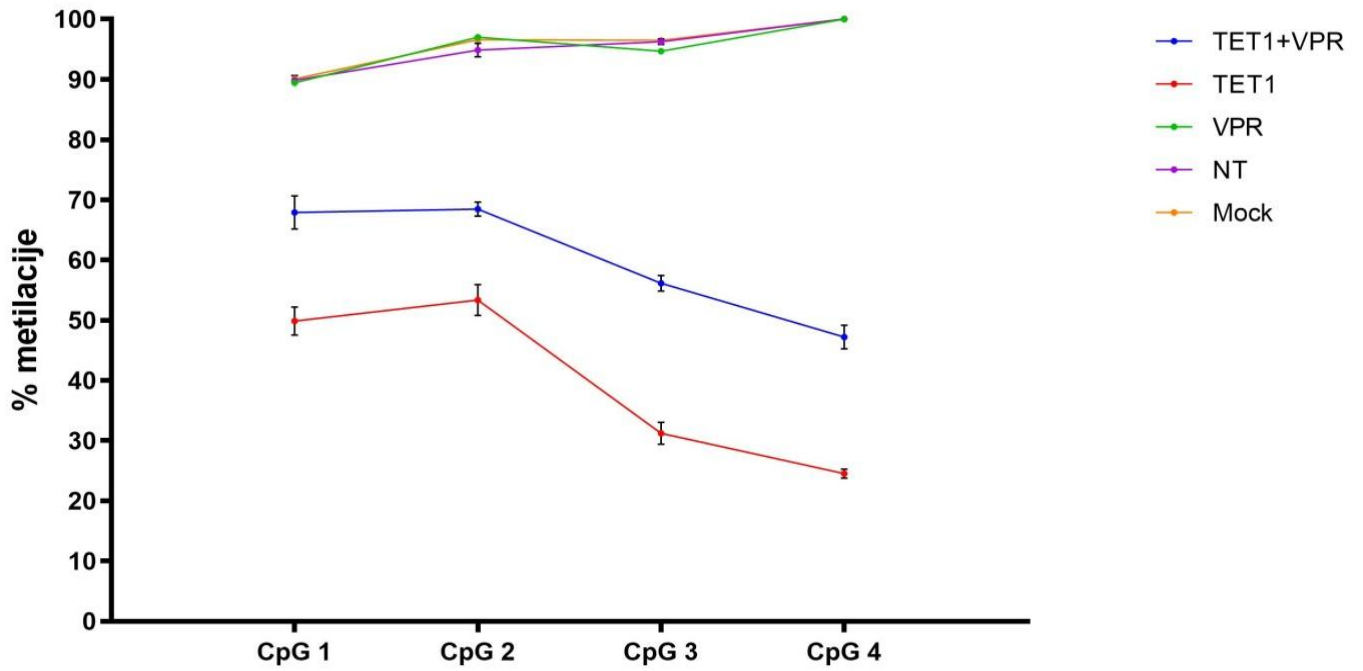
4.2.3. Stupanj metilacije u CpG mjestima smještenim uzvodno i nizvodno od 4 regulatorna CpG mjesta gena *HNF1A*

Odabrani setovi početnica i izrađeni testovi za pirosekvenciranje korišteni su za analizu metilacije u transficiranim stanicama uključujući sve vremenske točke sakupljanja. Slike 15., 16., 17., 18., i 19. prikazuju srednje vrijednosti postotka metilacije dobivene analizama s odabranim testovima za pirosekvenciranje u svim transficiranim stanicama HEK293 po vremenskim točkama sakupljanja nakon transfekcije, uključujući test HNF1A_1 koji analizira regiju s 4 regulatorna CpG mjesta ciljana plazmidnim konstruktom za ciljanu demetilaciju (TET1-dSaCas9). Za analizu navedene regije korišteni su već postojeći set

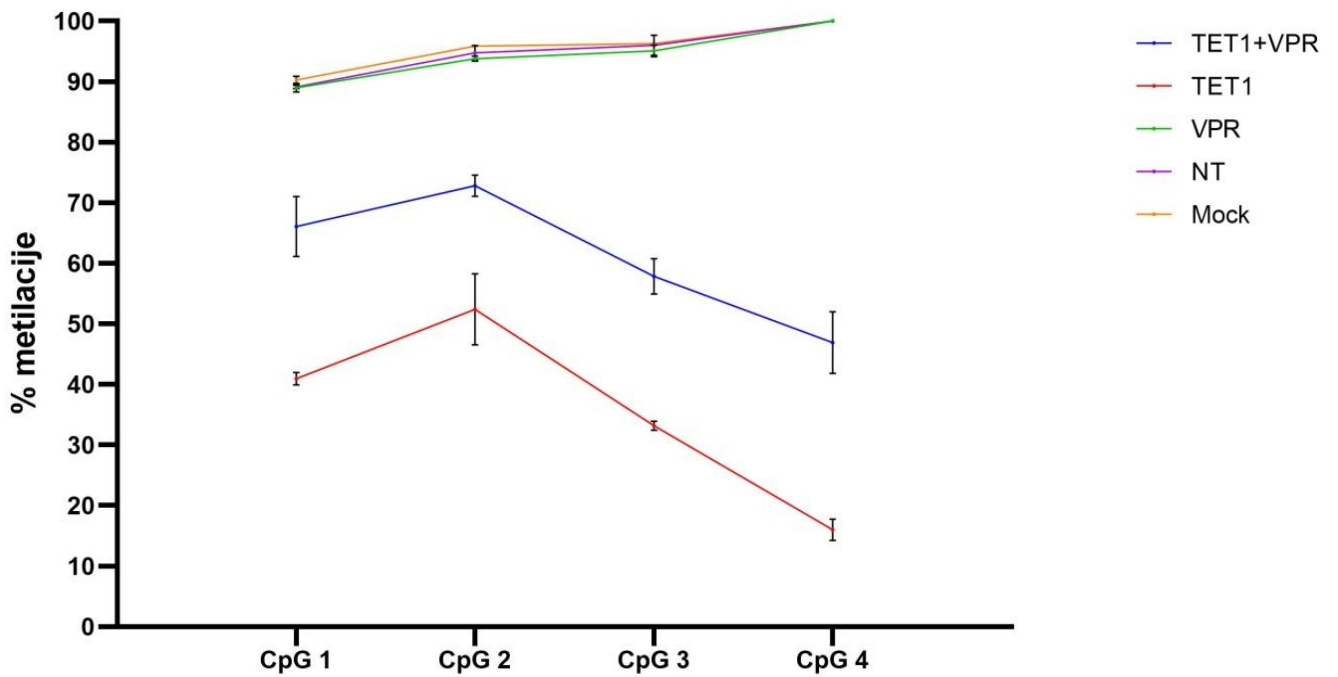
početnica i test za pirosekvenciranje. Grafovi prikazuju srednje vrijednosti postotka metilacije bioloških replika s odgovarajućom standardnom devijacijom u svim CpG mjestima za sve provedene transfekcije. Slika 15. prikazuje srednje vrijednosti postotka metilacije u regiji 1 (HNF1A_1). Pad metilacije vidljiv je u sva 4 CpG mjesta već 5. dan nakon transfekcije u biološkim skupinama TET1-dSaCas9 i TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9 i pada sve do 11. dana kada je efekt demetilacije najveći. Najveći pad stupnja metilacije detektiran je u zadnjem CpG mjestu. Efekt demetilacije zadržava se i do 30. dana nakon transfekcije gdje je stupanj metilacije u 4. CpG mjestu u biološkoj skupini TET1-dSaCas9 smanjen 50% u odnosu na kontrolu *Mock*. U biološkim skupinama *Mock*, NT i VPR-dSpCas9 ne dolazi do promjene u stupnju metilacije u 4 CpG mjesta niti u jednoj vremenskoj točki, a vrijednosti stupnja metilacije su u svim navedenim CpG mjestima više od 90%. Ciljanje s TET1-dSaCas9, u odnosu na simultano ciljanje s TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9, ima veći efekt na stupanj metilacije CpG mjesta pa se tako u zadnjem CpG mjestu na 11. dan transfekcije bilježi pad od gotovo 85% u biološkoj skupini TET1-dSaCas9 u odnosu na kontrolu *Mock* dok se u biološkoj skupini TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9 bilježi pad od oko 50% u odnosu na kontrolu *Mock*.

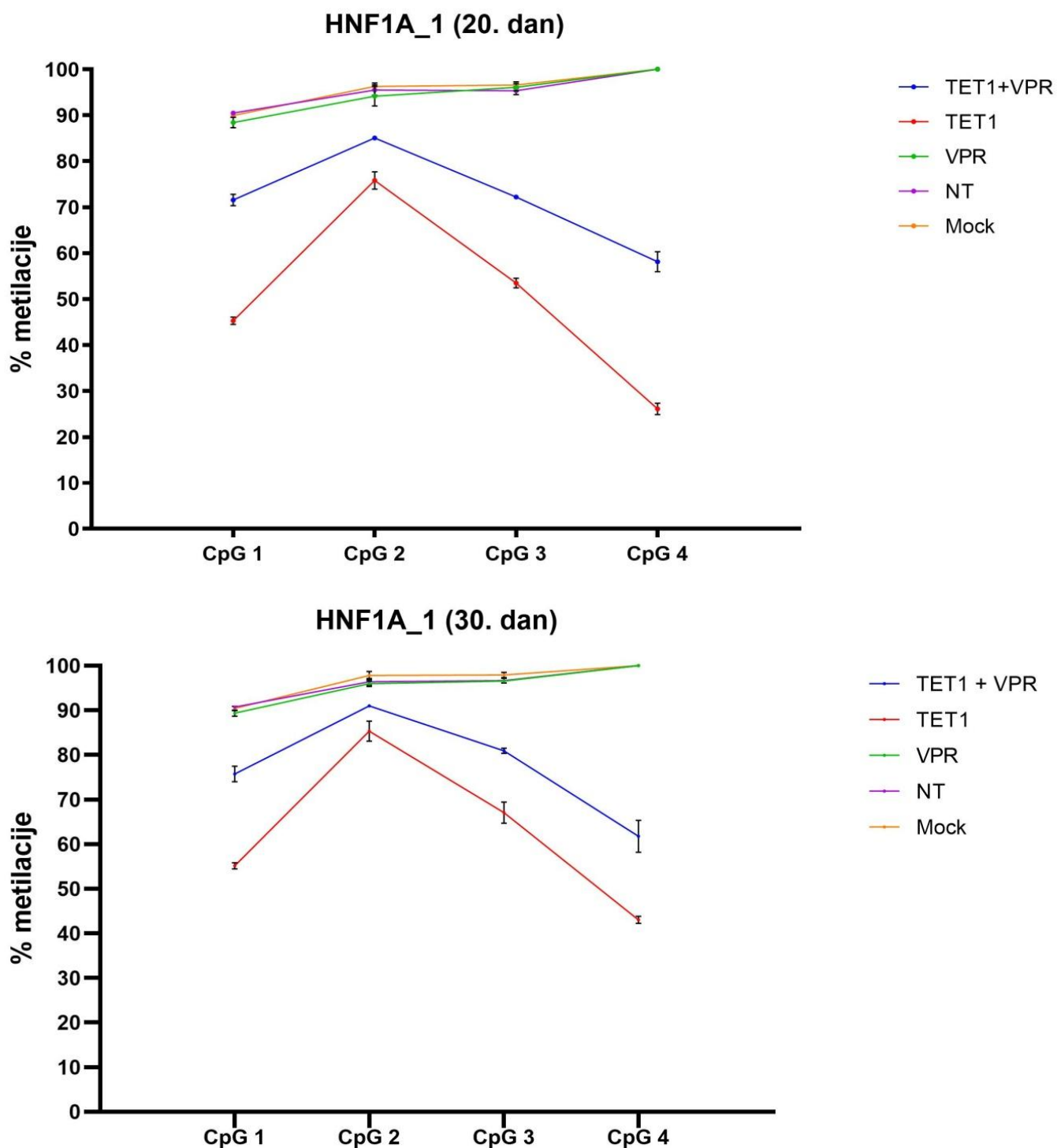


HNF1A_1 (8. dan)



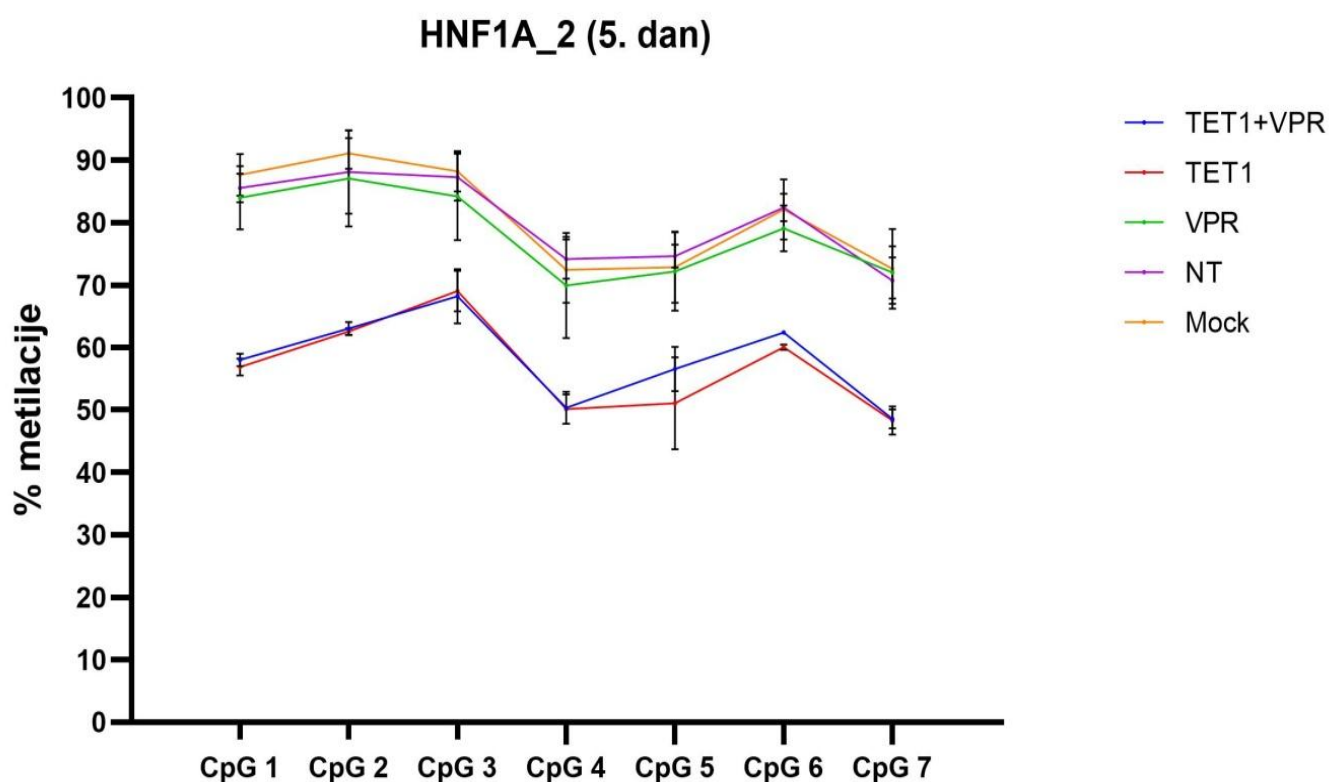
HNF1A_1 (11.dan)



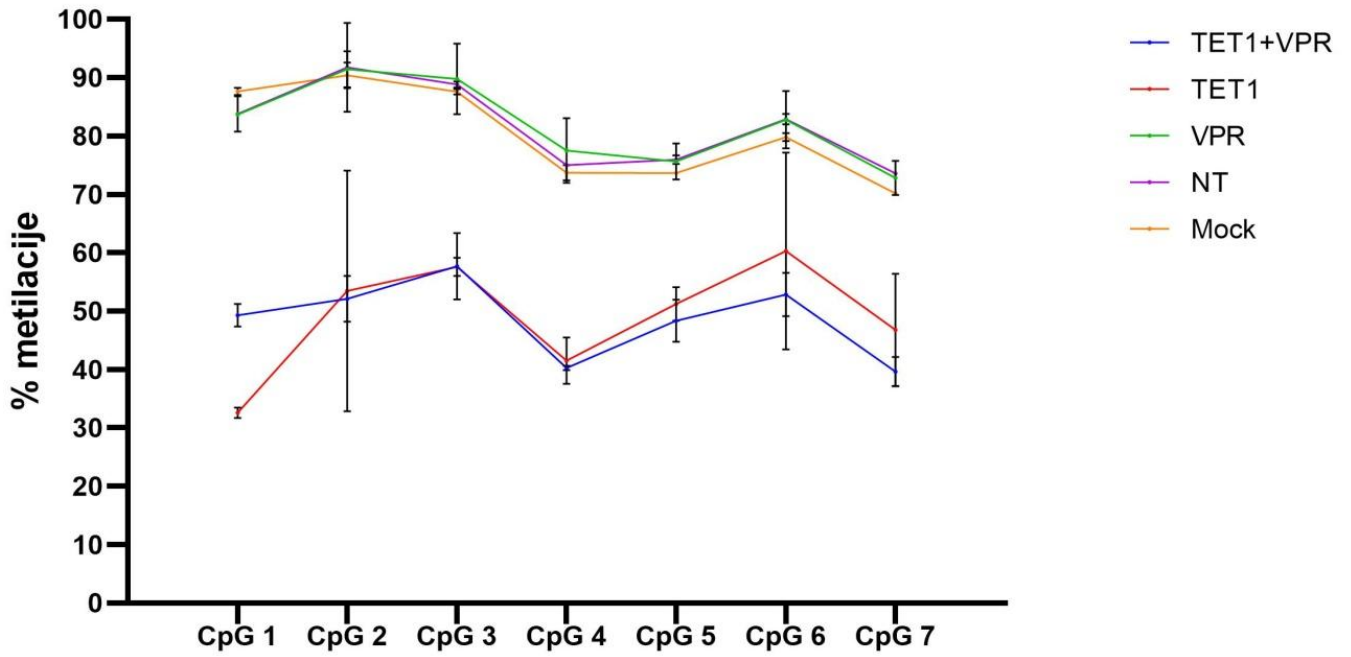


Slika 15. Postoci stupnja metilacije u 4 CpG mjesta obuhvaćena testom HNF1A_1 za sve vremenske točke sakupljanja nakon transfekcije. Prikazan je postotak metilacije DNA u svim transficiranim stanicama HEK293. TET1 + VPR – stanice ko-transficirane fuzijama TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9. TET1 – stanice transficirane fuzijom TET1-dSaCas9. VPR – stanice transficirane fuzijom VPR-dSpCas9. NT – kontrola *Non-Target*. Mock – kontrola *Mock*. Raspon pogreške (od eng. *error bar*) prikazuje standardnu devijaciju.

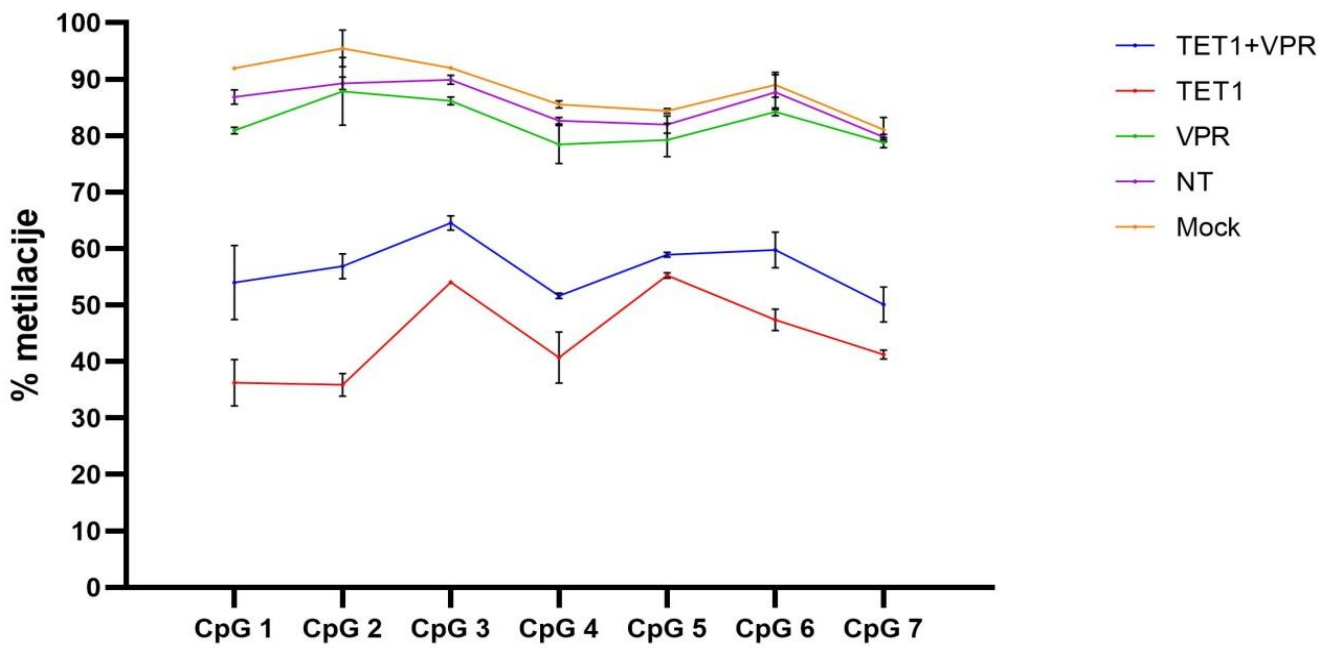
Slika 16. prikazuje stupanj metilacije u regiji 2 (HNF1A_2), iako manji u odnosu na regiju 1, i ovdje se bilježi pad u metilaciji u biološkim skupinama TET1-dSaCas9 i TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9 vidljiv već 5. dan nakon transfekcije, te se efekt demetilacije također zadržava sve do 30. dana nakon transfekcije. Za razliku od regije 1, ciljanje samo s fuzijom TET1-dSaCas9 i simultano ciljanje s fuzijama TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9, ne pokazuje tako velike razlike u efektu demetilacije na CpG mjesta. Međutim, vrijednost standardne devijacije je iznimno visoka za 2. i 6. CpG mjesto u biološkoj skupini TET1-dSaCas9 za 8. dan, stoga se ne može zaključiti kolika je realna razlika između ove dvije grupe. Kontrole *Mock* i NT imaju slične postotke metilacija koji se ne mijenjaju značajno kroz vremenske točke sakupljanja. Biološka skupina VPR-dSpCas9 također ne pokazuje promjene u metilaciji u svim danima, osim 20. dan kada se bilježi pad metilacije u odnosu na kontrolu *Mock* i NT, ali također biološka skupina VPR-dSpCas9 pokazuje visoke vrijednosti standardne devijacije u većini CpG mjesta za ovaj dan, stoga se ne može zaključiti da li je pad metilacije stvarno prisutan ili je rezultat pogreške prilikom analize.

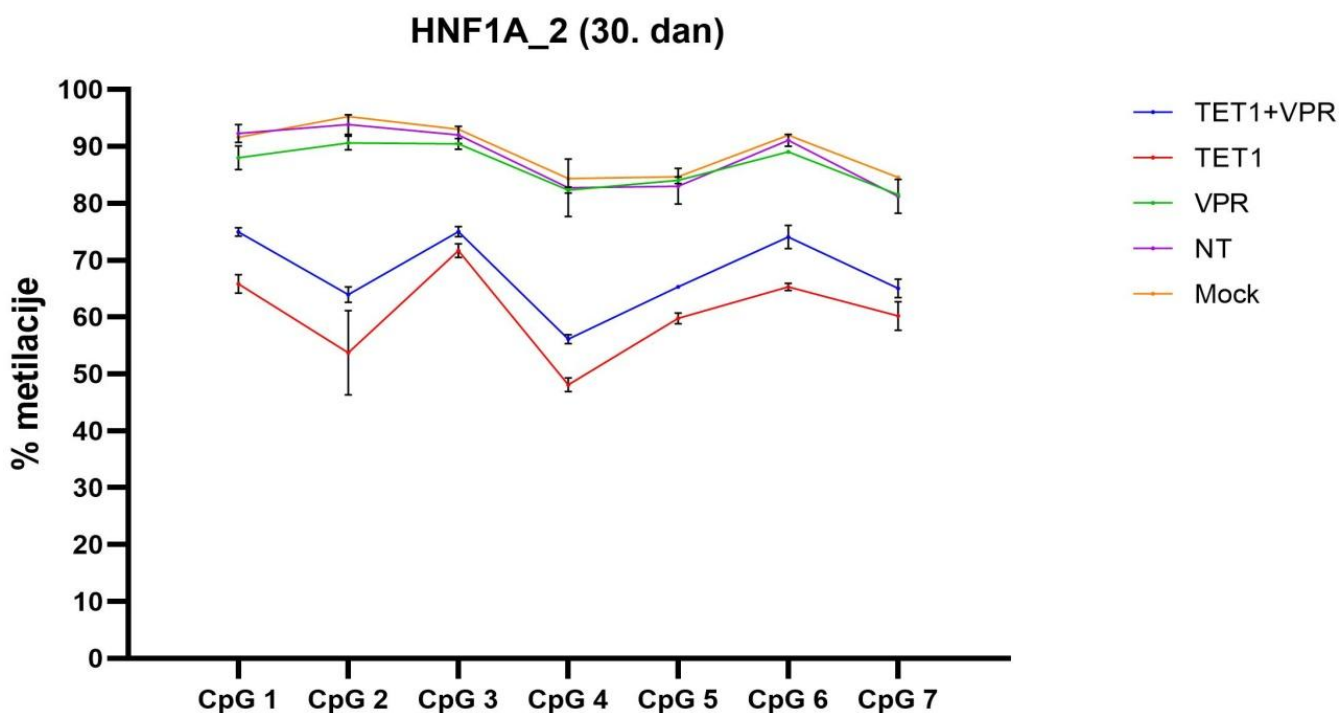
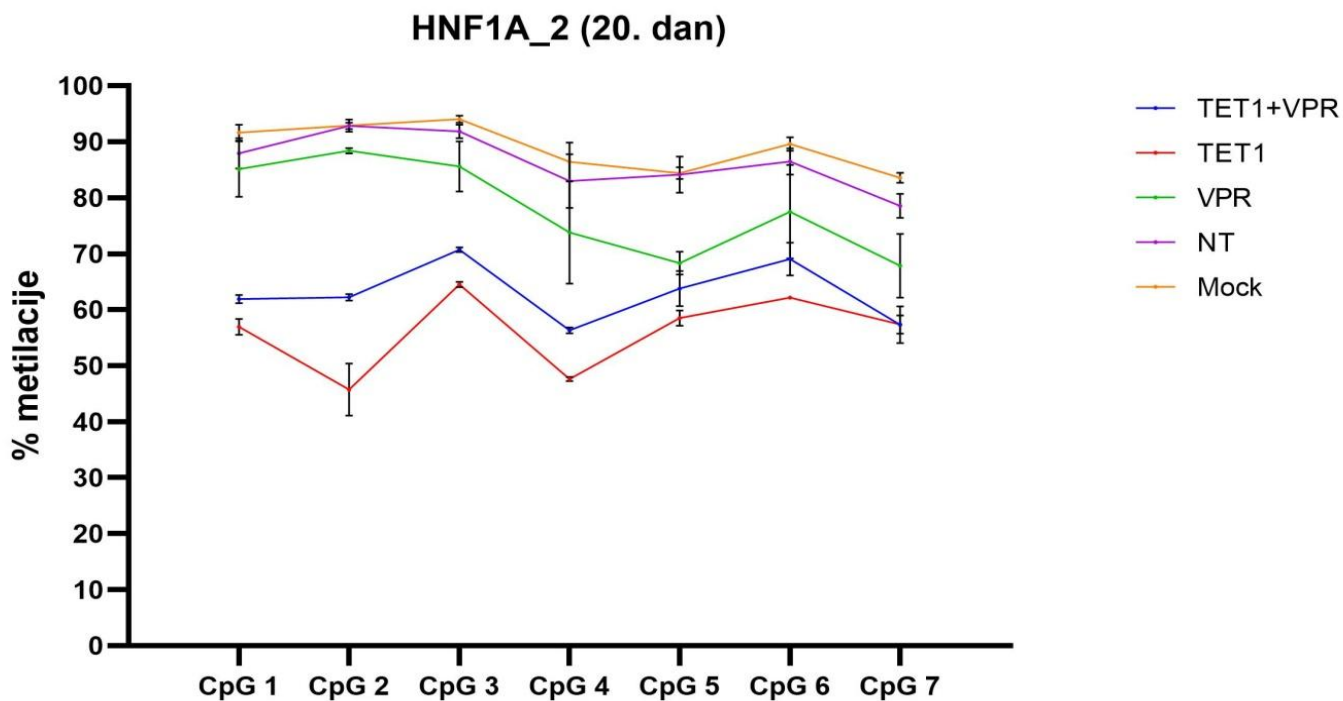


HNF1A_2 (8. dan)



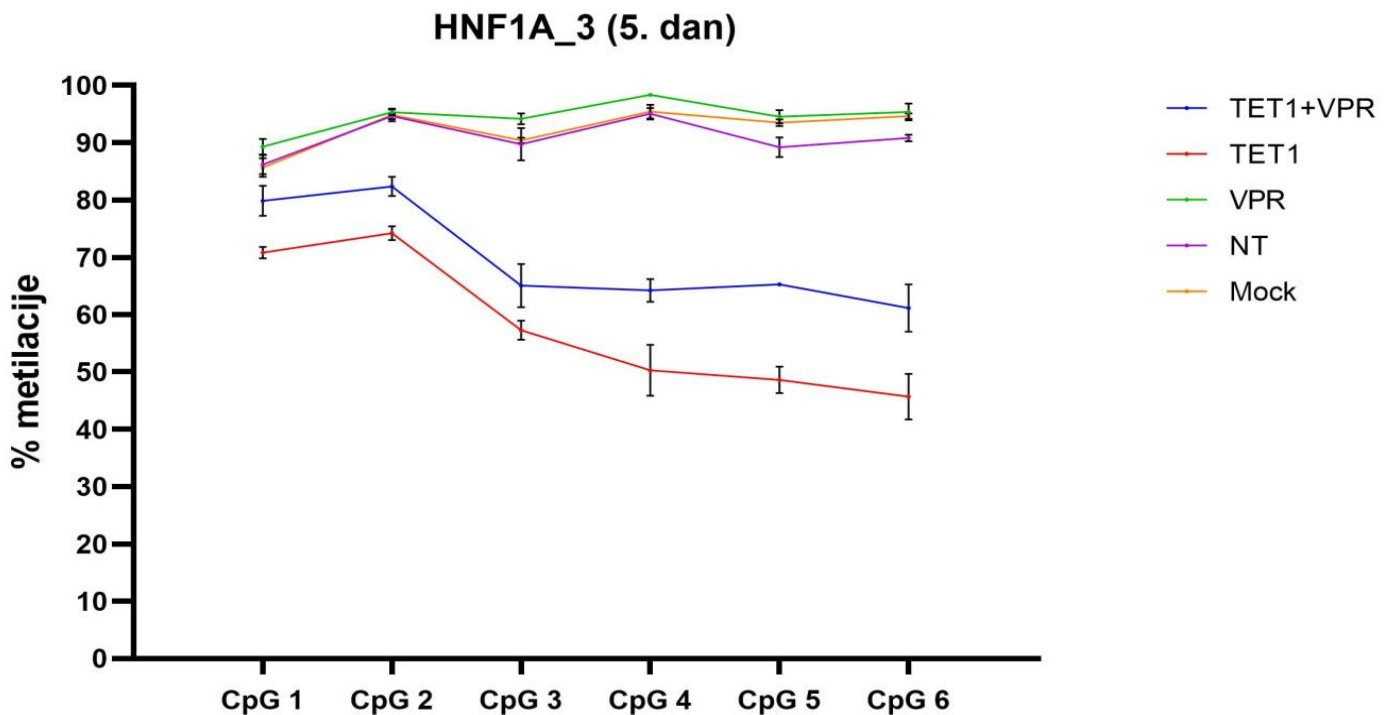
HNF1A_2 (11. dan)



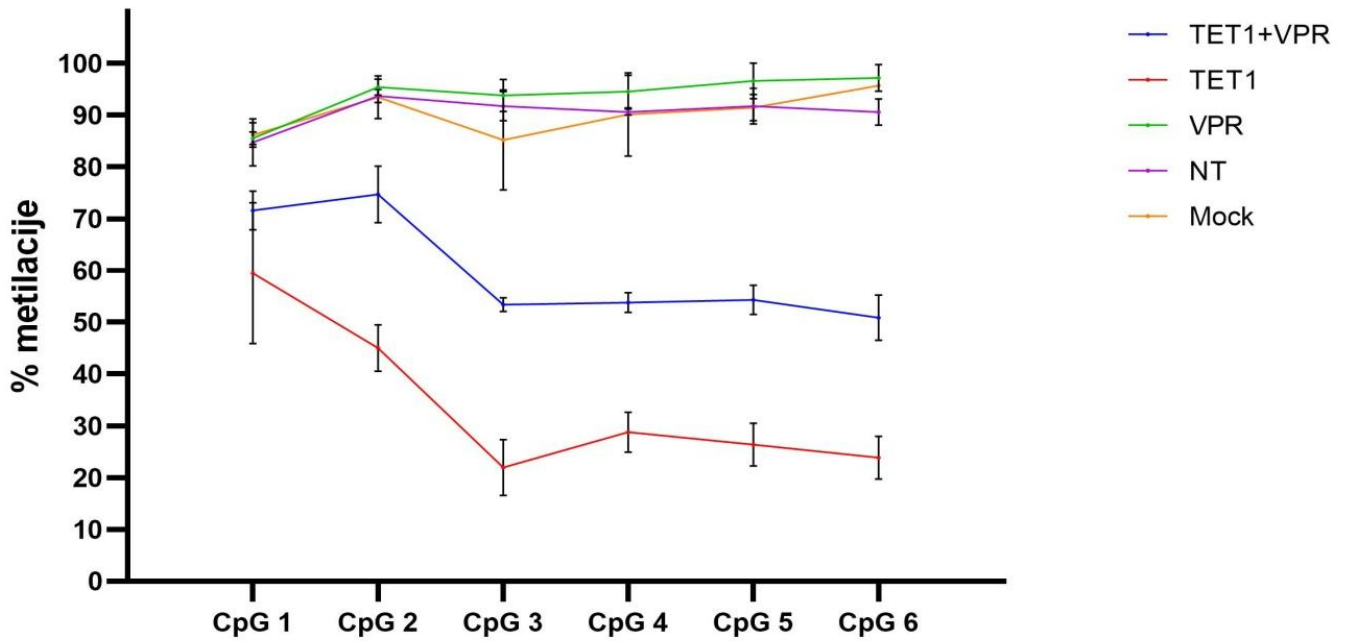


Slika 16. Postoci stupnja metilacije u 7 CpG mjesta obuhvaćena testom HNF1A_2 za sve vremenske točke sakupljanja nakon transfekcije. Prikazan je postotak metilacije DNA u svim transficiranim stanicama HEK293. TET1 + VPR – stanice ko-transficirane fuzijama TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9. TET1 – stanice transficirane fuzijom TET1-dSaCas9. VPR – stanice transficirane fuzijom VPR-dSpCas9. NT – kontrola *Non-Target*. Mock – kontrola *Mock*. Raspon pogreške (od eng. *error bar*) prikazuje standardnu devijaciju.

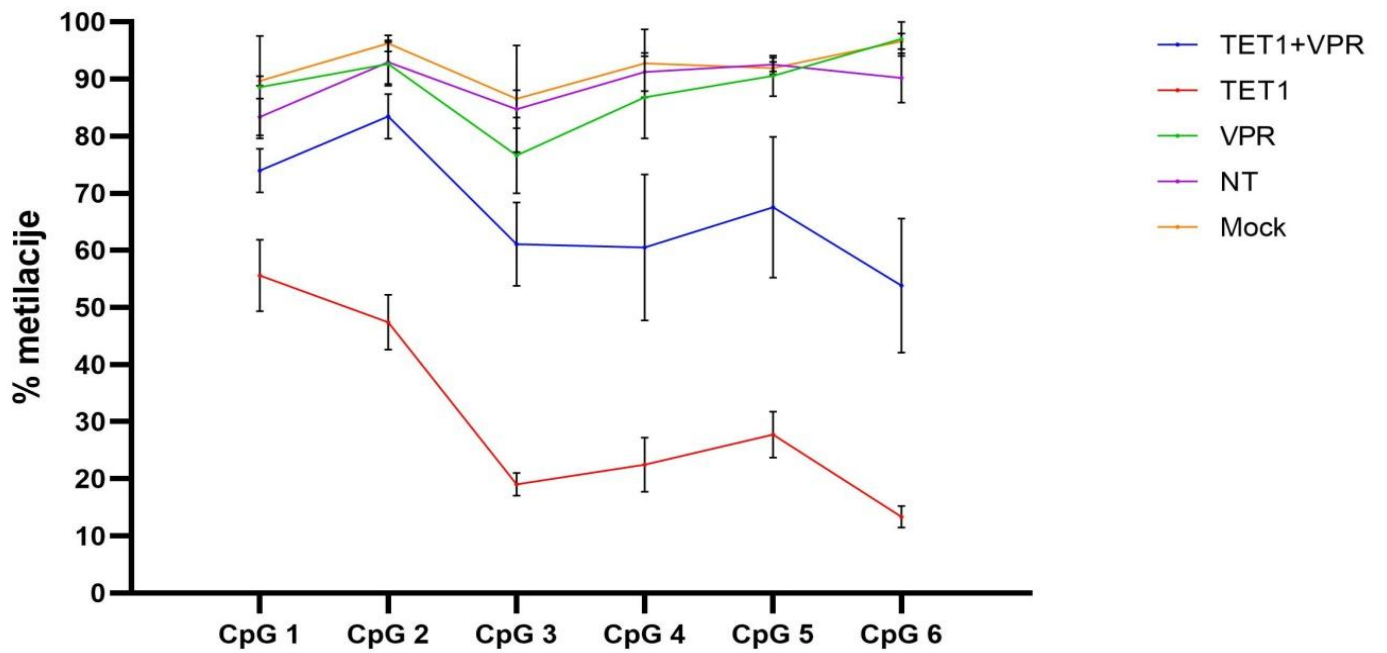
Slika 17. prikazuje postotke metilacije u regiji 3. Kao i za prva dvije regije, već se 5. dan nakon transfekcije uočava pad metilacije u biološkim skupinama TET1-dSaCas9 i TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9 koji se zadržava do 30. dana nakon transfekcije. U biološkim skupinama *Mock*, NT i VPR-dSpCas9 stupanj metilacije ima slične vrijednosti kroz sve vremenske točke te u većini CpG mjesta nisu manje od 80%. Fuzija TET1-dSaCas9 sama producira jači efekt demetilacije nego simultano djelovanje TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9 zajedno, pogotovo 8. i 11. dan nakon transfekcije. Naime, 11. dan nakon transfekcije metilacija u biološkoj skupini TET1-dSaCas9 opada do vrijednosti od čak 13% u zadnjem CpG mjestu dok u biološkoj skupini TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9 za isto CpG mjesto postotak metilacije iznosi oko 50%. Ali, skupina TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9 u navedenom danu pokazuje i visoke vrijednosti standardne devijacije što isto utječe na stvarnu razliku između ove dvije skupine. Naime, iako CpG mjesta u regiji 3 nisu primarno ciljana s TET1-dSaCas9, efekt demetilacije je gotovo isti, a u nekim CpG mjestima i jači u odnosu na ciljanu regiju 1. Prva dva CpG mjesta u regiji 3 pokazuju manji efekt demetilacije u odnosu na zadnja 4 CpG mjesta. To se može objasniti time što se sgRNA04, prisutna u plazmidnom konstrukturu veže za regiju koja sadrži ova dva CpG mjesta i time blokira njihovu dostupnost enzimu TET1.

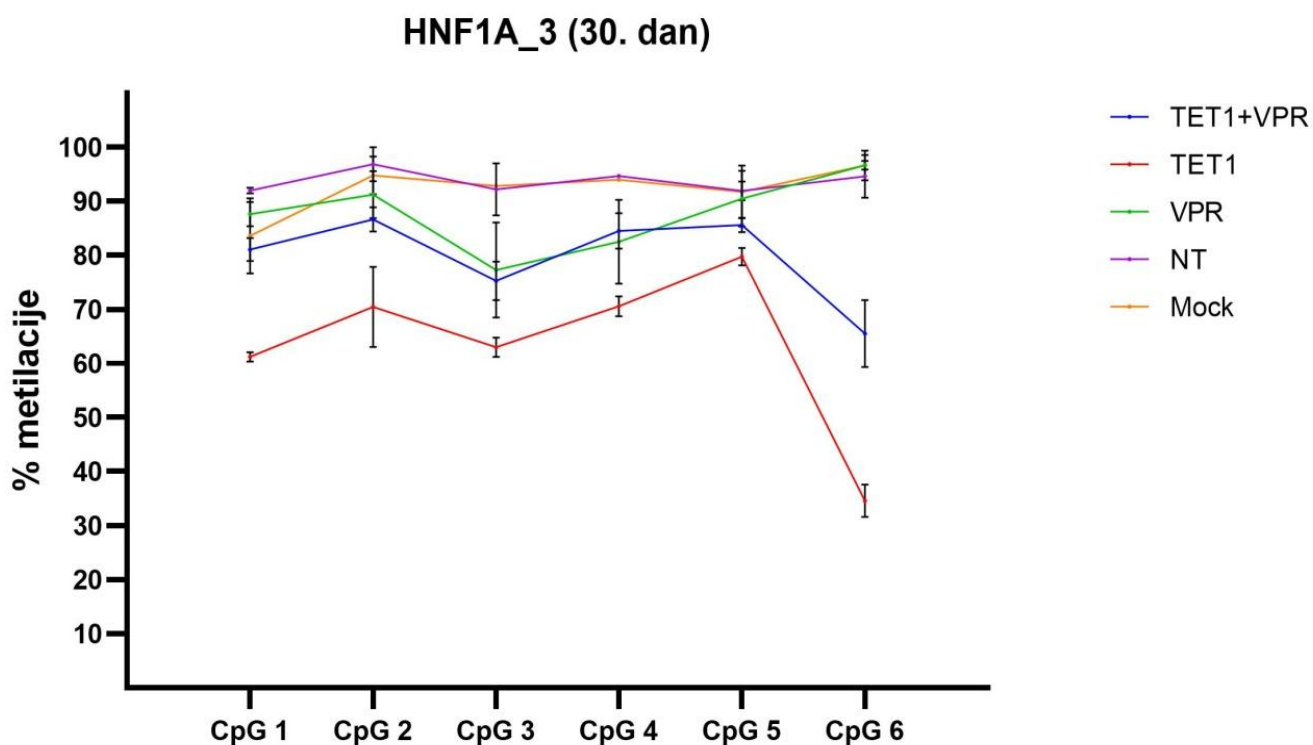
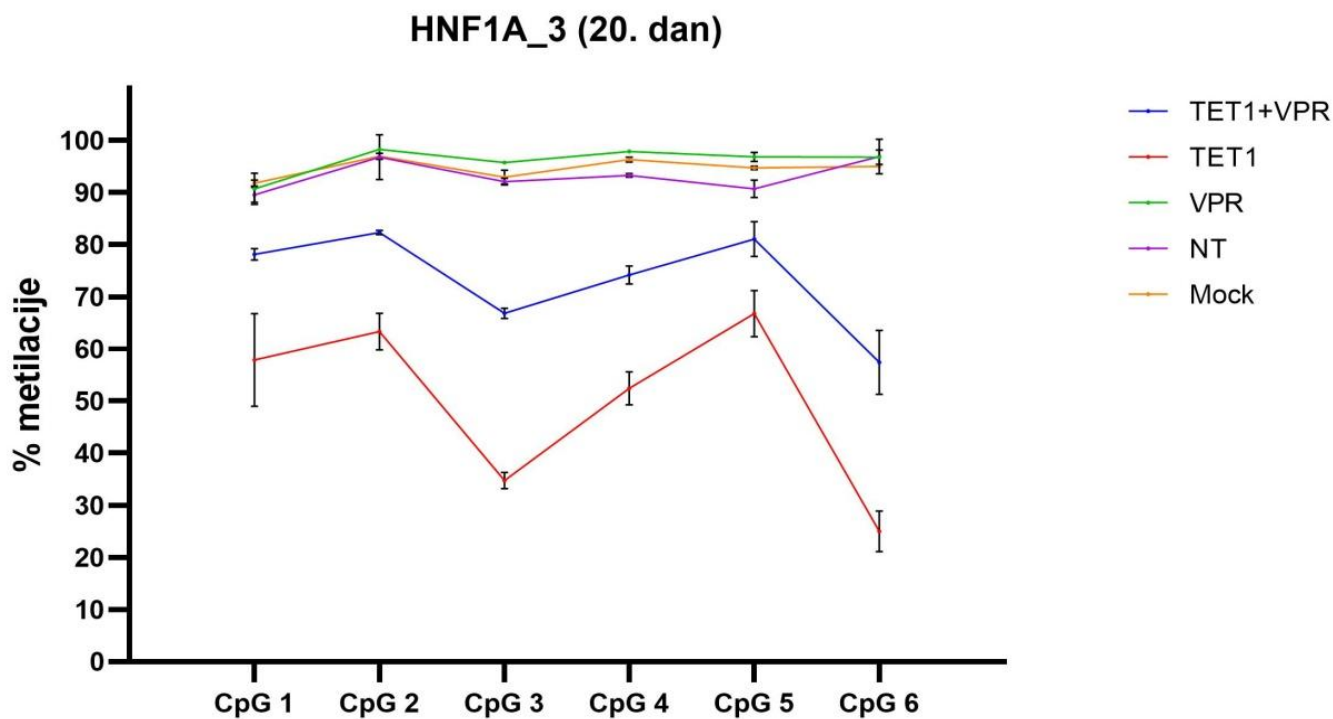


HNF1A_3 (8. dan)



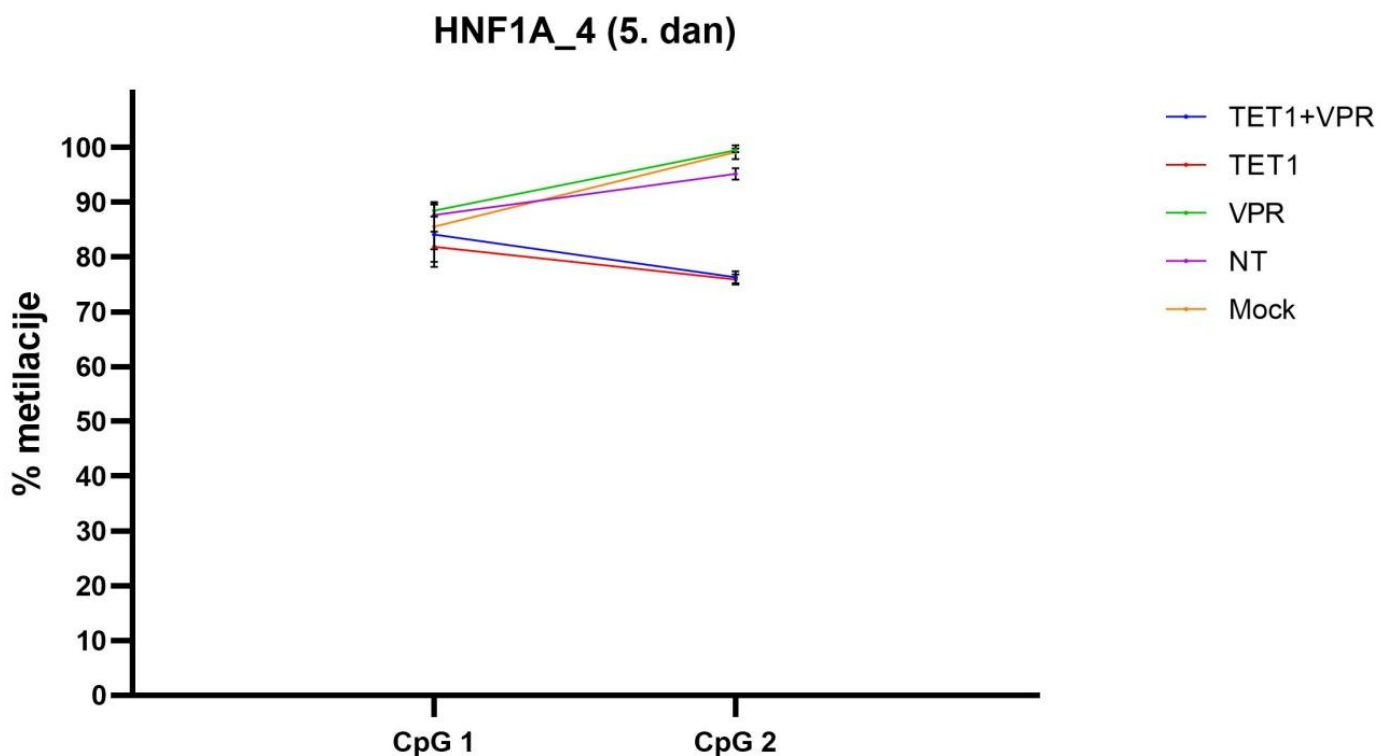
HNF1A_3 (11. dan)



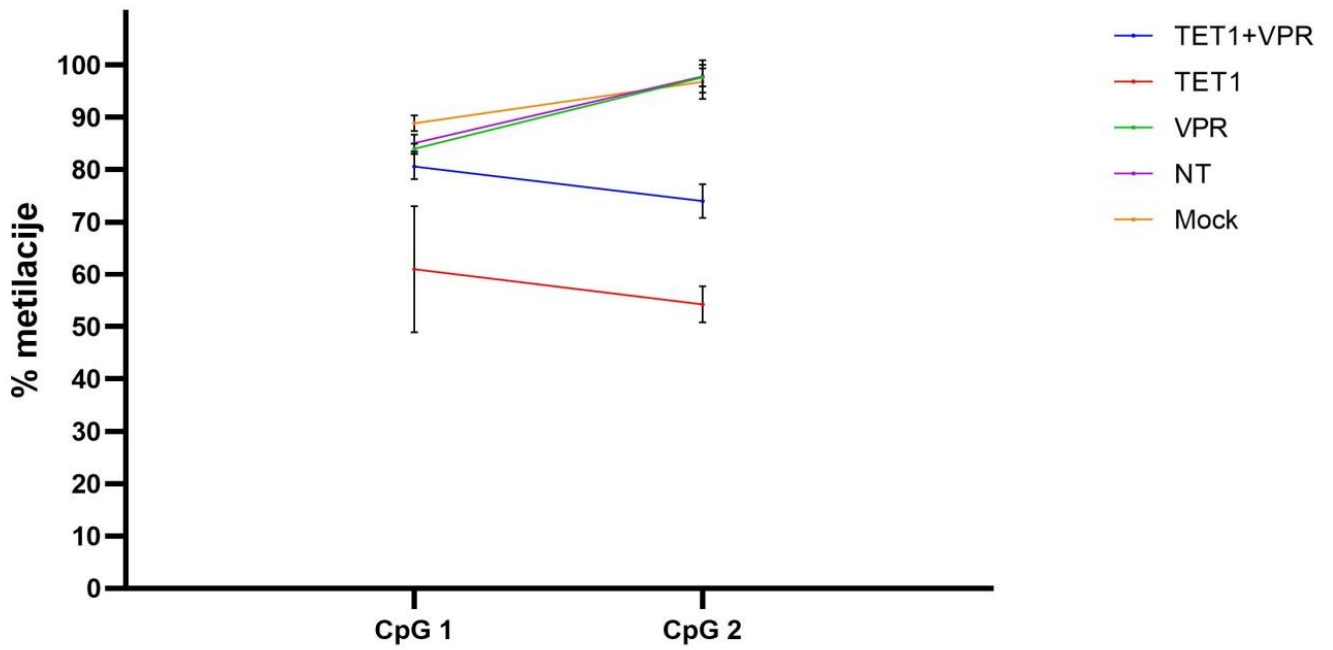


Slika 17. Postoci stupnja metilacije u 6 CpG mjesta obuhvaćena testom HNF1A_3 za sve vremenske točke sakupljanja nakon transfekcije. Prikazan je postotak metilacije DNA u svim transficiranim stanicama HEK293. TET1 + VPR – stanice ko-transficirane fuzijama TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9. TET1 – stanice transficirane fuzijom TET1-dSaCas9. VPR – stanice transficirane fuzijom VPR-dSpCas9. NT – kontrola *Non – Target*. Mock – kontrola *Mock*. Raspon pogreške (engl. *error bar*) prikazuje standardnu devijaciju.

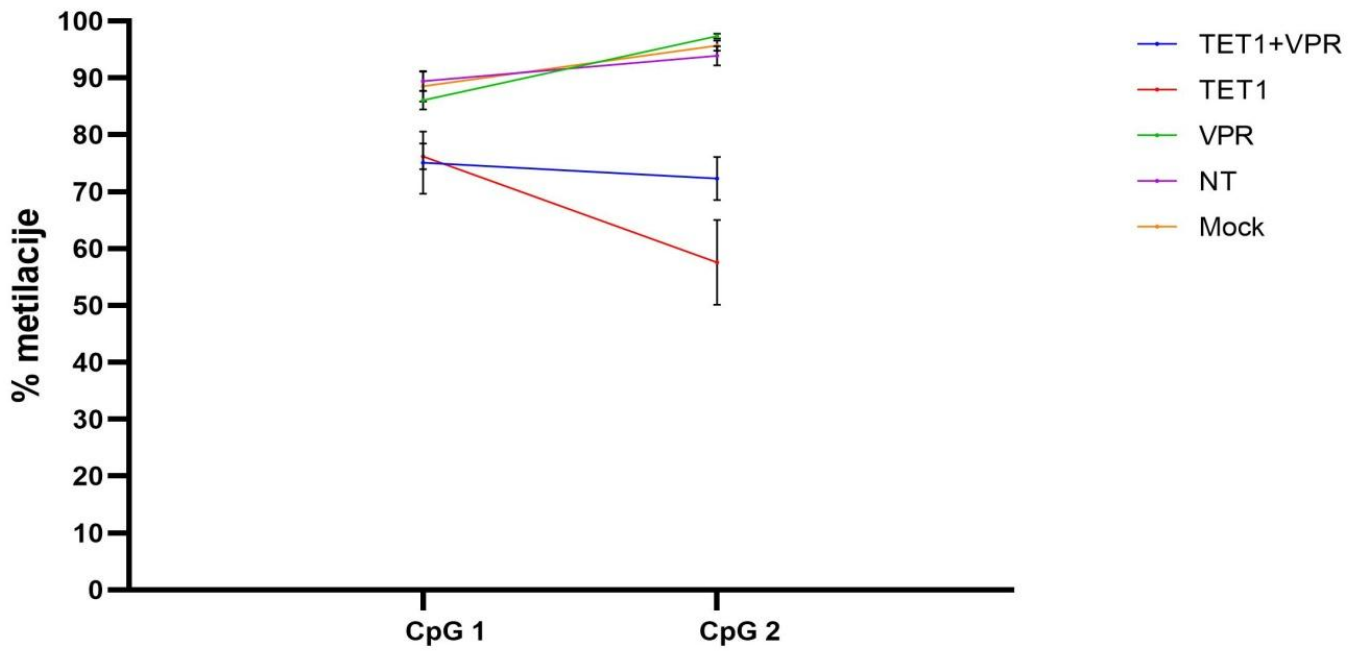
Slika 18. pokazuje rezultate analize za regiju 4 (HNF1A_4). Pad metilacije je prisutan od 5. dana nakon transfekcije u biološkim skupinama TET1-dSaCas9 i TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9 u odnosu na kontrolu *Mock* te se, iako nizak, efekt demetilacije zadržava i kroz 8. i 11. dan i to uglavnom samo u 2. CpG mjestu. Također, biološka skupina TET1-dSaCas9 pokazuje visoke vrijednosti standardne devijacije u 1. CpG mjestu 8. dan nakon transfekcije, stoga se ne može zaključiti koji je stvarni postotak te da li je stvarno prisutan pad metilacije u ovom CpG mjestu. U odnosu na regije 1 i 3, efekt demetilacije u regiji 4 je znatno manji te niti u jednom danu ne pada ispod vrijednosti manjih od 50%. 30. dan nakon transfekcije, metilacija je već u porastu te TET1-dSaCas9 i TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9 pokazuju vrijednosti metilacije slične biološkim skupinama *Mock*, NT i VPR. Također, kontrole *Mock* i NT te biološka skupina VPR-dSpCas9 ne pokazuju promjene u statusu metilacije ni u jednoj vremenskoj točki.

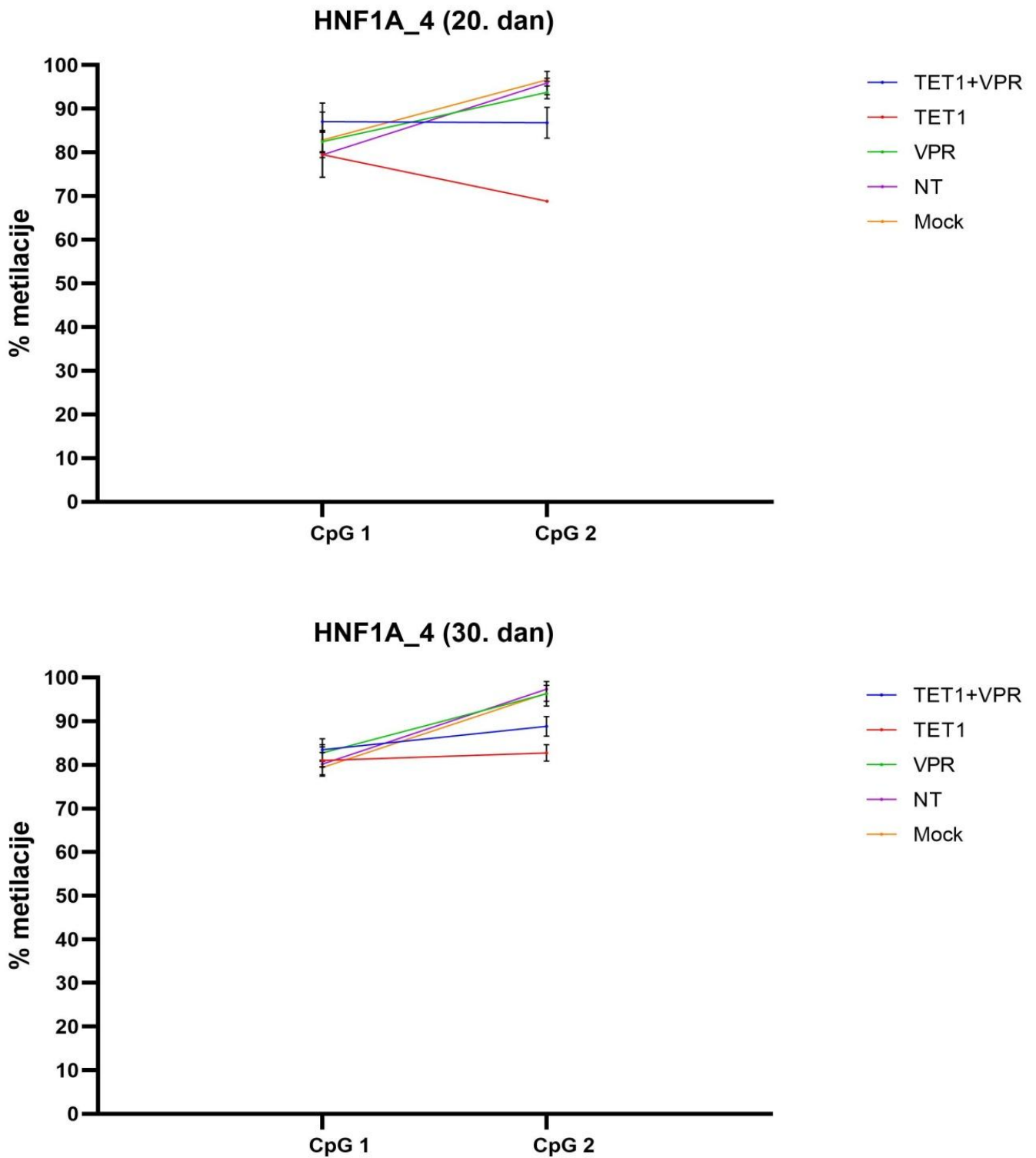


HNF1A_4 (8. dan)



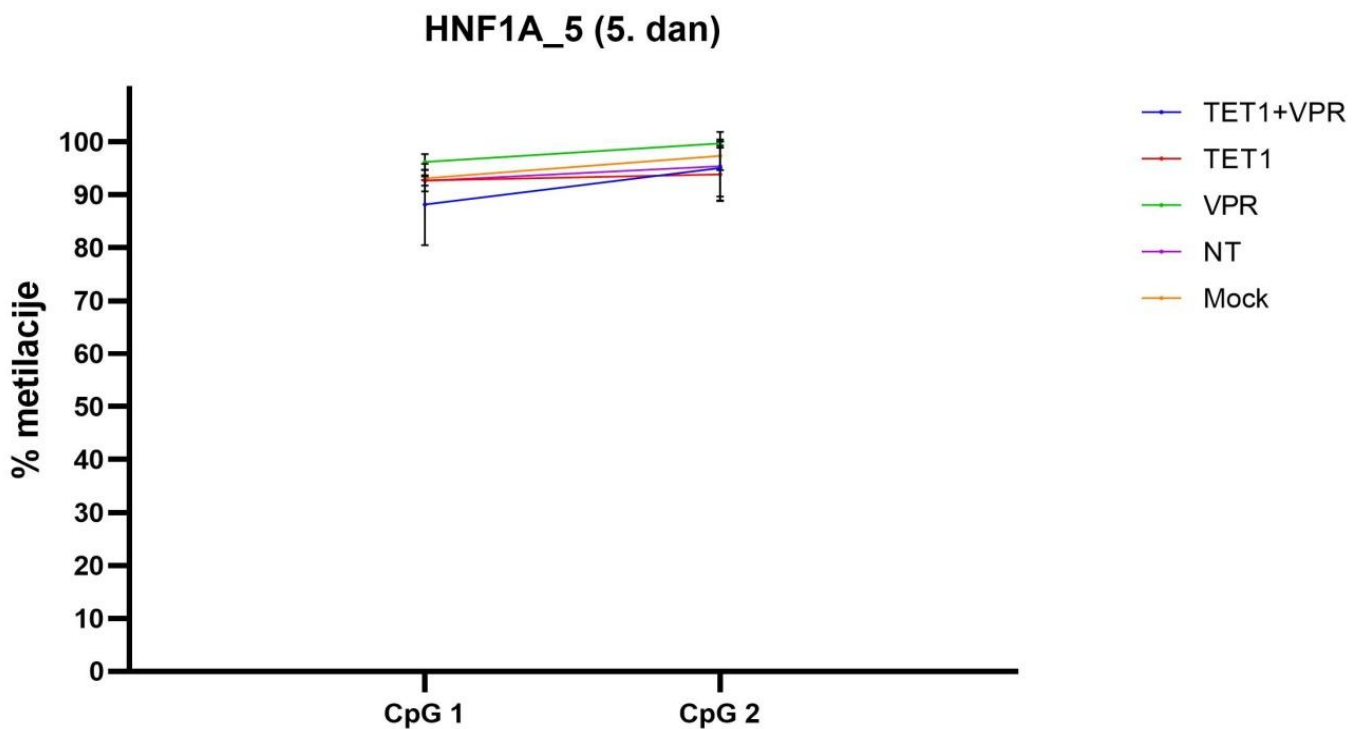
HNF1A_4 (11. dan)



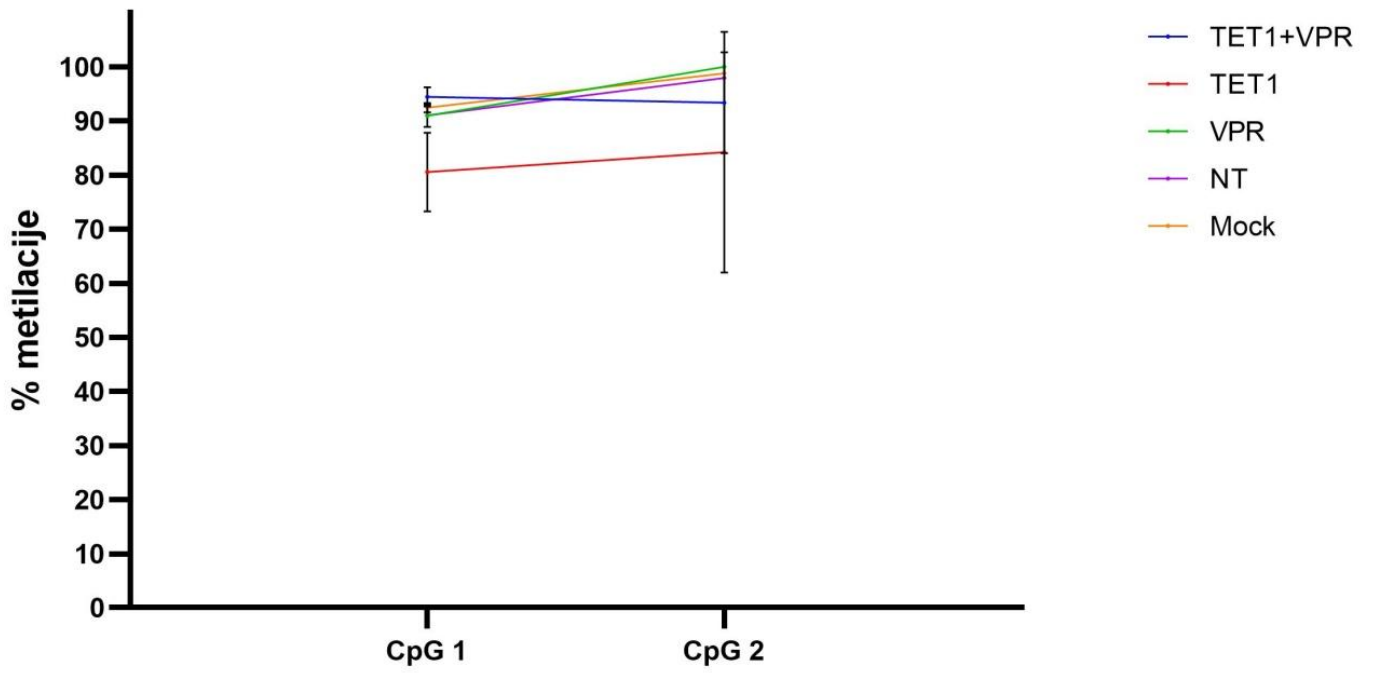


Slika 18. Postoci stupnja metilacije u 2 CpG mjesta obuhvaćena testom HNF1A_4 za sve vremenske točke sakupljanja nakon transfekcije. Prikazan je postotak metilacije DNA u svim transfeciranim stanicama HEK293. TET1 + VPR – stanice ko-transfecirane fuzijama TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9. TET1 – stanice transfecirane fuzijom TET1-dSaCas9. VPR – stanice transfecirane fuzijom VPR-dSpCas9. NT – kontrola *Non -Target*. Mock – kontrola *Mock*. Raspon pogreške (engl. *error bar*) prikazuje standardnu devijaciju.

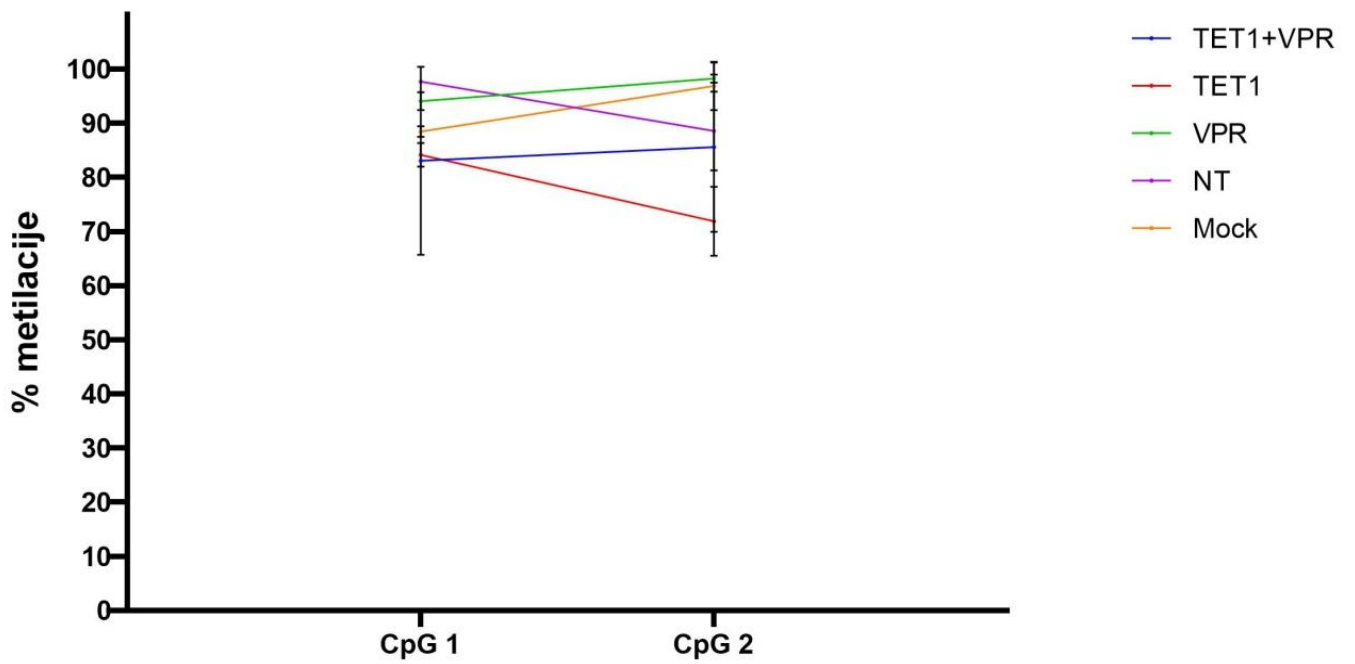
Slika 19. prikazuje rezultate pirosekvenciranja za regiju 5 (HNF1A_5). Za razliku od ostalih regija, u biološkim skupinama TET1-dSaCas9 i TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9 ne dolazi do značajnije promjene u metilaciji CpG mjesta u odnosu na kontrolu *Mock*, NT i biološku skupinu VPR-dSpCas9 te u većini slučajeva vrijednosti postotka metilacije ne padaju ispod 80%. Naime, u biološkoj skupini TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9, u 2. CpG mjestu, 11. dan nakon transfekcije zabilježen je stupanj metilacije od oko 70%. Međutim, vrijednosti standardne devijacije su iznimno visoke u skupinama TET1-dSaCas9 za 8. dan te TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9 za 11. dan, stoga se ne može zaključiti koliki je stvarni pad u metilaciji te da li uopće dolazi do smanjenja.

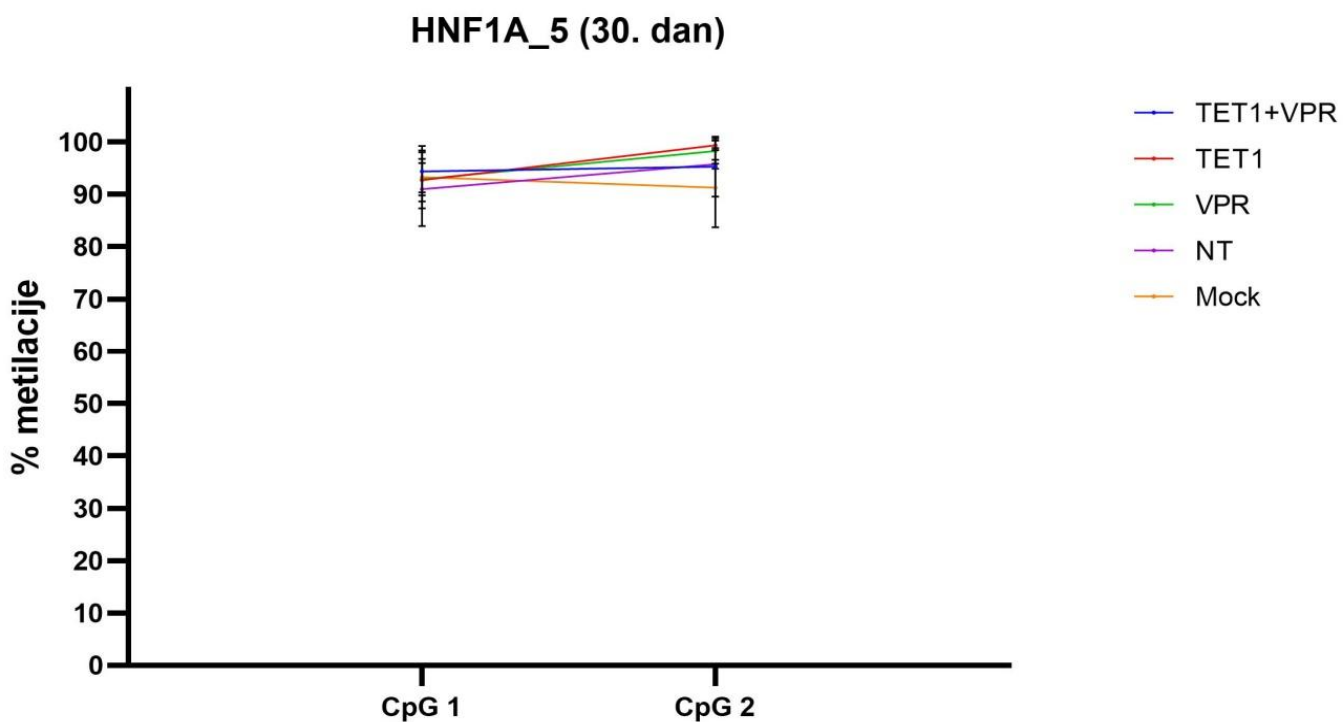
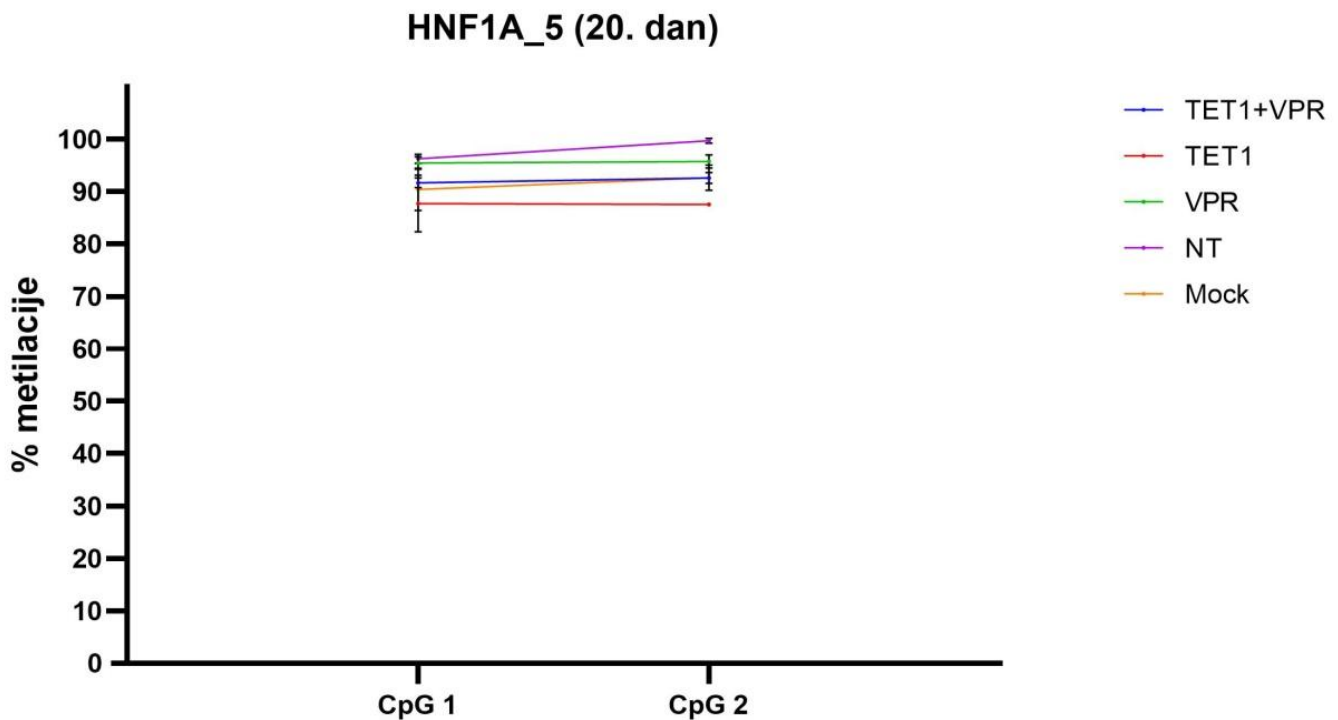


HNF1A_5 (8. dan)



HNF1A_5 (11. dan)





Slika 19. Postoci stupnja metilacije u 2 CpG mjesta obuhvaćena testom HNF1A_5 za sve vremenske točke sakupljanja nakon transfekcije. Prikazan je postotak metilacije DNA u svim transficiranim stanicama HEK293. TET1 + VPR – stanice ko-transficirane fuzijama TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9. TET1 – stanice transficirane fuzijom TET1-dSaCas9. VPR – stanice transficirane fuzijom VPR-dSpCas9. NT – kontrola *Non – Target*. Mock – kontrola *Mock*. Raspon pogreške (od eng. *error bar*) prikazuje standardnu devijaciju.

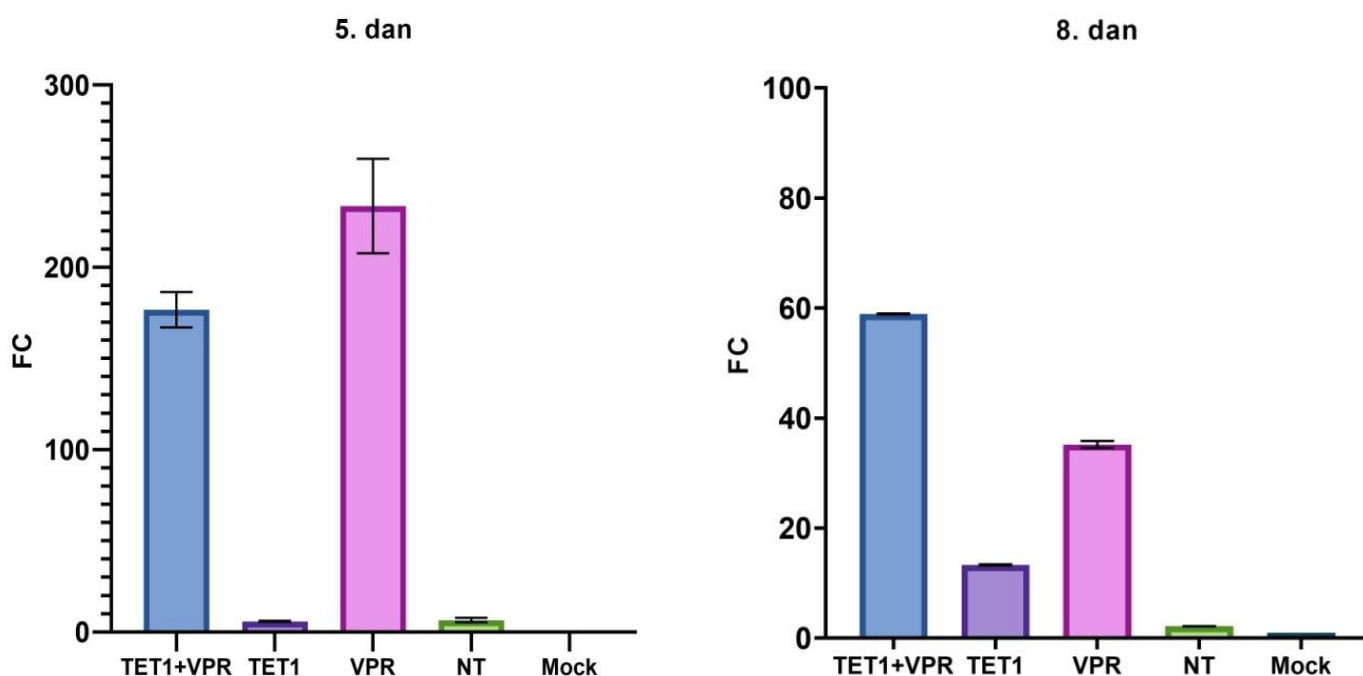
U svim regijama u kojima se bilježi pad metilacije (1, 2, 3 i 4) nakon ciljanja zasebno fuzijom TET1-dSaCas9 te simultano s fuzijama TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9, efekt demetilacije je vidljiv već 5. dan nakon transfekcije, dok je 11. dan efekt demetilacije najveći. U svim analiziranim regijama, metilacija se ne mijenja značajno ni u jednoj vremenskoj točki za stanice ciljane samo s VPR-dSpCas9 te u kontrolama *Mock* i NT. Stanice *Mock* su tretirane samo s transfekcijskim reagensom bez plazmida te je njihov uzorak metilacije jednak prirodnom uzorku metilacije stanica HEK293 gdje je ovaj gen prirodno visoko metiliran. Nadalje, kontrola NT je ciljana plazmidnim konstruktima koji sadrže sgrRNA koje ne ciljaju ni jedno mjesto u ljudskom genomu i samim time je spriječeno vezanje dCas9 fuzija i uvođenje ciljanih promjena u određeno genomsko područje u stanicama HEK293.

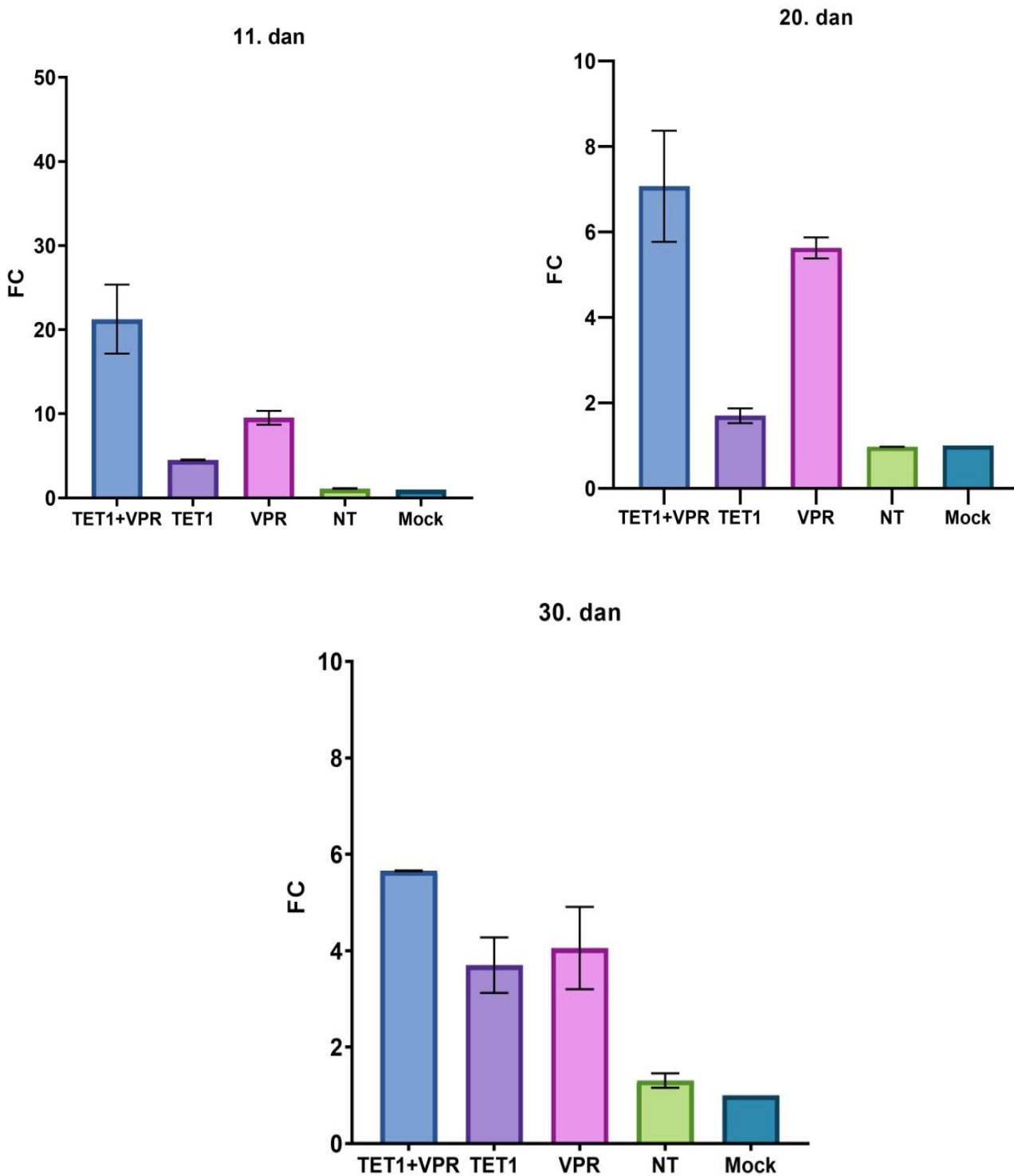
4.3. Analiza ekspresije gena *HNF1A* metodom qPCR

Ekspresija gena *HNF1A* analizirana je u svim stanicama HEK293, transficiranim fuzijama TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9, uključujući sve vremenske točke sakupljanja. Za analizu ekspresije gena upotrijebljena je metoda qPCR. Dobiveni rezultati obrađeni su metodom relativne kvantifikacije $\Delta\Delta C_t$ gdje se gen *HPRT1* koristio kao endogena kontrola, a kao referentan uzorak korištene su stanice *Mock* u odnosu na koje se analizira promjena ekspresije gena *HNF1A*. Obradom rezultata metodom $\Delta\Delta C_t$ dobiven je faktor promjene ekspresije gena (FC) koji govori koliko je puta ekspresija gena *HNF1A* u transficiranim stanicama različita u odnosu na razinu ekspresije gena *HNF1A* u skupini *Mock*. Podsjetimo, skupina *Mock* su stanice HEK293 tretirane samo s transfekcijskim reagensom bez plazmida, stoga je u njima ekspresija gena *HNF1A* jednaka prirodnoj razini ekspresije ovoga gena u navedenim stanicama. Slika 20. prikazuje faktor promjene ekspresije gena *HNF1A* u transficiranim stanicama HEK293 po vremenskim točkama sakupljanja stanica nakon transfekcije.

Peti dan nakon transfekcije, fuzija VPR-dSpCas9 sama ima veći utjecaj na povećanje ekspresije gena *HNF1A* u odnosu na zajedničko djelovanje fuzija TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9. Ciljanje fuzijom VPR-dSpCas9 peti dan nakon transfekcije, rezultira povećanjem ekspresije gena *HNF1A* većim od 200x u odnosu na kontrolu *Mock* dok simultano ciljanje s TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9 inducira 170x veću ekspresiju u odnosu na kontrolu *Mock*. Međutim, već osmi dan nakon transfekcije, efekt same fuzije VPR-dSpCas9 na transkripcijsku aktivnost gena *HNF1A* pada u odnosu na simultano djelovanje fuzija TET1-

dSaCas9 i VPR-dSpCas9 koje zajedno induciraju dugotrajniji efekt na transkripcijsku aktivnost gena *HNF1A*. Tako je vrijednost faktora promjene ekspresije gena 11. dan nakon transfekcije, za VPR-dSpCas9 oko 10, dok je u stanicama koje sadrže obje fuzije oko 20. S druge strane, efekt transfekcije samom fuzijom TET1-dSaCas9 ne inducira tako velike promjene u ekspresiji gena *HNF1A* kao prethodno navedene fuzije, ali u odnosu na kontrolu *Mock* prisutno je povećanje u ekspresiji gena *HNF1A*. Najveće povećanje detektirano je 8. dan nakon transfekcije gdje je ekspresija gena *HNF1A* 13x veća u odnosu na ekspresiju u kontroli *Mock*. U drugim vremenskim točkama vrijednost faktora promjene ekspresije gena ne prelazi vrijednosti veće od 6. Također, promjena ekspresije ne pokazuje pravilan pad ili porast te dosta varira kroz vremenske točke pa je tako 20. dan detektirano povećanje u ekspresiji od 1x, dok je 30. dan detektirano povećanje u vrijednosti od 3x u odnosu na *Mock*. Peti dan nakon transfekcije kontrola NT također pokazuje povećanje u ekspresiji u odnosu na *Mock* kada faktor promjene ekspresije gena iznosi oko 6. Iako u ovoj kontroli ne očekujemo promjenu ekspresije gena moguće je da je navedeno povećanje rezultat stresa kojem su stanice bile izložene prilikom transfekcije, ili zbog nespecifičnog vezanja sgRNA. Također, broj replika je bio premalen za dobru statistiku.





Slika 20. Relativna ekspresija gena *HNF1A* nakon transfekcije stanica HEK293 fuzijama TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9 u svim vremenskim točkama. FC (od eng. *fold change*) – faktor promjene ekspresije gena. TET1 + VPR – stanice ko-transfikirane fuzijama TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9. TET1 – stanice transficirane fuzijom TET1-dSaCas9. VPR – stanice transficirane fuzijom VPR-dSpCas9. NT – kontrola *Non – Target*. Mock – kontrola *Mock*. Raspon pogreške (od eng. *error bar*) prikazuje standardnu devijaciju.

5. RASPRAVA

Sustav CRISPR-Cas9 u posljednjih nekoliko godina se pokazao kao postojan i svestran alat u ciljanom uređivanju genoma. Nedavno, sustav CRISPR-Cas9 je prenamijenjen za uređivanje epigenoma i regulaciju ekspresije gena uvođenjem mutacija u katalitičke domene RuvC i HNH nukleaze Cas9 koje deaktiviraju ovaj enzim. Navedene mutacije generiraju deaktiviranu endonukleazu dCas9 koja više ne cijepa molekulu DNA, ali zadržava funkciju vezanja na istu (Qi i sur. 2013). Fuzijom dCas9 s efektorskim domenama transkripcijskih modulatora ili epigenetičkih modifikatora, omogućena je njihova regrutacija na bilo koje mjesto u genomu, što je dovelo do novih spoznaja o funkciji epigenetičkih oznaka u ekspresiji gena (Thakore i sur. 2015). Korištenje ortolognih proteina dCas9 omogućava simultanu epigenetičku regulaciju te direktnu aktivaciju i represiju različitih gena u istoj stanici (Gao i sur. 2016).

Gen *HNF1A* kodira za tkivno-specifični transkripcijski faktor ekspimiran u stanicama jetre i gušterače gdje regulira ekspresiju drugih tkivno-specifičnih gena. Mutacije u genu *HNF1A* uzrokuju dijabetes subtipa MODY, a česti polimorfizmi ovoga gena povezani su i s razinama C-reaktivnog proteina kao i LDL-kolesterola te apolipoproteina A i B (Armendariz i Krauss 2009, Reiner i sur. 2009, Steck i Winter 2011). Studije su pokazale njegovu ulogu i kao tumor-supresor gena u tumoru gušterače (Hoskins i sur. 2014, Luo i sur. 2015), a nedavno je otkrivena nova uloga gena *HNF1A* kao glavnog transkripcijskog faktora u procesu fukozilacije proteina (Lauc i sur. 2012).

Cilj ovog istraživanja bio je izraditi testove za pirosekvenciranje kojima će se analizirati promjena metilacije u CpG mjestima smještenim uzvodno i nizvodno od regije koja sadrži 4 regulatorna CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A*, a koja je ciljana fuzioniranim proteinima TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9. Također, cilj je bio utvrditi kakav utjecaj imaju ciljana demetilacija putem TET1-dSaCas9 te direktno vezanje transkripcijskog aktivatora VPR (VPR-dSpCas9) na transkripcijsku aktivnost gena *HNF1A*. Metilacija i ekspresija su mjerene kroz vrijeme, u 5 različitih točaka - peti, osmi, jedanaesti, dvadeseti i trideseti dan nakon transfekcije stanica. Izrađena su 4 testa (*HNF1A_2*, *HNF1A_3*, *HNF1A_4*, *HNF1A_5*) za analizu metilacije u 4 različite regije, a metilacija je analizirana i u 4 regulatorna CpG mjesta već postojećim testom *HNF1A_1*. Zoldoš i sur. (2012.) su pokazali da stanične linije koje imaju visoku razinu metilacije u ova 4 regulatorna CpG mjesta pokazuju nisku razinu ekspresije gena *HNF1A* dok stanične linije u kojima je gen *HNF1A* manje metiliran pokazuju puno veću razinu

ekspresije navedenog gena, što ukazuje na to da navedena CpG mjesta ili direktno utječu na ekspresiju gena *HNF1A* ili su odraz statusa metilacije nekog od susjednih CpG mjesta potencijalno uključenih u regulaciju ekspresije gena *HNF1A*. Nadalje, Josipović i sur. (2019.) su upotrebom alata CRISPR/dCas9-TET1, pokazali da ciljana demetilacija gena *HNF1A* doista značajno snižava metilaciju u navedena 4 CpG mjesta u stanicama HEK293 gdje je ovaj gen prirodno visoko metiliran.

U ovom istraživanju, ciljana regija (HNF1A_1) također pokazuje značajan pad stupnja metilacije kroz sve vremenske točke sakupljanja u biološkim skupinama TET1-dSaCas9 i TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9, ali gotovo isti efekt na stupanj metilacije, a u nekim CpG mjestima i jači, pokazan je u regiji 3 (HNF1A_3) koja nije primarno ciljana molekularnim alatima CRISPR/TET1-dSaCas9 i CRISPR/VPR-dSpCas9. Profil aktivnosti fuzije TET1-dSaCas9 pokazuje maksimum demetilacije 30 pb nizvodno od veznog mjesta sgRNA te dodatne peak-ove 180-200 pb uzvodno ili nizvodno od veznog mjesta sgRNA (Josipović i sur. 2019). Za navođenje fuzije TET1-dSaCas9, u ovom istraživanju korištene su dvije sgRNA – sgRNA03 i sgRNA04. Naime, u regiji 3 veliki pad u metilaciji zabilježen je u zadnja 4 CpG mjesta smještena 70 pb nizvodno od vezanja sgRNA03. Prva dva CpG mjesta, iako se nalaze bliže navedene sgRNA, ne pokazuju tako veliki pad stupnja metilacije, ali ona se također nalaze unutar veznog mjesta korištene sgRNA04 koja vezanjem blokira dostupnost enzimu TET1. Veliki pad stupnja metilacije zabilježen je i u regiji 2 (HNF1A_2) u kojima su analizirana CpG mjesta smještena 158-201 pb od sgRNA03 što je unutar navedenog profila aktivnosti TET1-dSaCas9. Iako su 2 CpG mjesta analizirana testom HNF1A_4 smještena 144 pb od sgRNA03 i 65 pb od sgRNA04, u njima nije zabilježen tako velik pad stupnja metilacije kao u prethodno navedenim regijama. Također, regija 5 (HNF1A_5) u kojem su analizirana 2 CpG mjesta smještena 777 pb od veznog mjesta sgRNA03 i 698 pb od sgRNA04, očekivano ne pokazuje promjenu u metilaciji ni u jednoj vremenskoj točki. U regijama 1 i 3 TET1-dSaCas9 sam dovodi do većeg smanjenja u metilaciji u odnosu na djelovanje fuzija TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9 zajedno. Razlog tomu može biti potencijalna interferencija između ove dvije efektorske domene. Nadalje, prilikom ko-transfekcije stanica s oba plazmidna konstrukta, moguće je da su neke stanice primile samo jedan od korištenih plazmidnih konstrukta, a rezultati pokazuju da u stanicama transficiranim samo s fuzijom VPR-dSpCas9 ne dolazi do promjene u stupnju metilacije niti u jednoj regiji. Fuzija katalitički inaktivnog proteina dCas9 s katalitičkom domenom TET1 se pokazala uspješnom u demetilaciji i drugih visoko metiliranih gena (*RANKL*, *MMP2* i *MAGEB3*) u stanicama HEK293 (Xu i sur. 2016).

Ekspresija gena *HNF1A* analizirana je metodom qPCR koristeći tehnologiju *TaqMan*. Iako VPR-dSpCas9 sam inducira veće povećanje u ekspresiji gena *HNF1A* peti dan nakon transfekcije u odnosu na simultano ciljanje fuzijama TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9, pokazano je da sinergistička aktivacija s obje fuzije inducira dugotrajniji efekt na ekspresiju gena (Josipović i sur. 2019). To je rezultiralo time da simultano ciljanje s obje fuzije, pokazuje 10x veću ekspresiju 8. i 11. dan nakon transfekcije odnosno gotovo 2x veću ekspresiju 20. i 30. dan nakon transfekcije u odnosu na sam VPR-dSpCas9. Fuzije različitih katalitičkih domena na ortologe dCas9 mogu neovisno regulirati ekspresiju dva gena u istoj stanici navođeni različitim molekulama sgRNA. U stanicama HEK293 je direktna fuzija VPR-dSpCas9 aktivirala ekspresiju *CD95* dok je u istim stanicama fuzija VPR-dSaCas9 istovremeno aktivirala ekspresiju *CXCR4* (Gao i sur. 2016). Ovim istraživanjem je potvrđeno da se ortolozi dCas9, osim za istovremenu aktivaciju dva različita gena, mogu koristiti i za sinergističku aktivaciju istog gena u istim stanicama. Iako fuzija TET1-dSaCas9 sama ne dovodi do tako velikog povećanja u ekspresiji gena *HNF1A*, i dalje je došlo do značajne aktivacije ovoga gena koja je 8. dan gotovo 13x veća u odnosu na kontrolu *Mock* čime je pokazano da ciljana demetilacija pozitivno utječe na ekspresiju gena *HNF1A*. S obzirom na to da je promjena u metilaciji pokazana, ne samo u prethodno identificirana 4 regulatorna CpG mjesta već i u CpG mjestima smještenim uzvodno i nizvodno, postoji mogućnost da su i ta mjesta uključena u regulaciju gena *HNF1A*. Pokazano je da ciljanje s fuzijom dCas9-DNMT3A koristeći istovremeno više sgRNA omogućuje metilaciju veće promotorske regije te dovodi do smanjene ekspresije gena *IL6ST* i *BACH2* (Vojta i sur. 2016). Gen *HNF1A* je u ovom istraživanju ciljan fuzijom TET1-dSaCas9 koristeći dvije različite sgRNA. Ukoliko bi se pokazalo da su i ostala analizirana CpG mjesta, koja pokazuju promjene u metilaciji, uključena u regulaciju gena *HNF1A*, simultano ciljanje navedenih CpG mjesta s više sgRNA bi potencijalno induciralo i veće povećanje u ekspresiji toga gena. Fuzija dCas9-TET1 se dosad već pokazala uspješnom u reaktivaciji drugih gena u različitim studijama (Choudhury i sur. 2016, X.S. Liu i sur. 2018).

Iako je ovo istraživanje pokazalo da u stanicama transficiranim fuzijom TET1-dSaCas9 i u stanicama simultano ko-transficiranim s fuzijama TET1-dSaCas9 i VPR-dSpCas9 dolazi do promjene u metilaciji CpG mjesta smještenih uzvodno i nizvodno od mjesta ciljanja te da navedne fuzije pojedinačno i u kombinaciji dovode do povećanja u ekspresiji gena *HNF1A*, zbog korištenja malog broja replika nije se mogao primijeniti odgovarajući statistički test kojim bi se izmjerila točna statistička značajnost pokazanih promjena. Iz tog razloga, prije donošenja

konačnih zaključaka, eksperiment bi trebalo ponoviti koristeći više bioloških replika i odgovarajućih tehničkih replika.

6. ZAKLJUČAK

- Stanice HEK293 su uspješno transficirane plazmidnim konstruktima N-TET1-SaCas9-Puro-Clover+HNF1A-sg03,04 za ciljanu demetilaciju te N-VPR-SpCas9-Puro-Ruby+HNF1A-sg03 za direktnu aktivaciju gena *HNF1A*.
- Uspješno su dizajnirane početnice za umnožavanje regija smještenih uzvodno i nizvodno od regije ciljane korištenim plazmidnim konstruktima.
- Uspješno je provedena provjera početnica te optimizacija reakcije PCR te su odabrana 4 različita seta početnica.
- Uspješno su dizajnirana 4 testa za analizu metilacije metodom bisulfitnog pirosekvenciranja u CpG mjestima smještenim u regijama nizvodno i uzvodno od 4 regulatorna CpG mjesta u genu *HNF1A*.
- Analiza metilacije pokazala je da do smanjenja metilacije dolazi u biološkim skupinama TET1-dSaCas9 i TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9 u CpG mjestima ciljanim plazmidnim konstruktima ali i u CpG mjestima koja nisu direktno ciljana. Ipak, najveće promjene u stupnju metilacije zabilježene su u ciljanim CpG mjestima (HNF1A_1) te u CpG mjestima analiziranim testom HNF1A_3.
- U ciljanoj regiji (HNF1A_1) te u regijama 2 (HNF1A_2) i 3 (HNF1A_3) efekt demetilacije se zadržava do 30. dana nakon transfekcije.
- Ciljanje gena *HNF1A* zasebno fuzijom VPR-dSpCas9 i simultano ciljanje fuzijama TET1-dSaCas9+VPR-dSpCas9 dovodi do velikog povećanja u ekspresiji gena *HNF1A*. Ciljanje s obje fuzije inducira dugotrajniji efekt na ekspresiju gena *HNF1A* u odnosu na zasebno ciljanje s VPR-dSpCas9.
- Ciljana demetilacija gena *HNF1A* fuzijom TET1-dSaCas9 rezultira povećanjem u ekspresiji gena *HNF1A*.

7. LITERATURA

- Allis C. D., Caparros, M. L., Jenuwein, T., Lachner, M. and Reinberg D. (2015): Overview and Concepts U: Allis, C., Caparros, M., Jenuwein, T., Reinberg, D. and Lachner, M. (ur.) Epigenetics. Cold Spring Harbor, N.Y, Cold Spring Harbor Laboratory Press, str. 47-115.
- Armendariz, A. and Krauss, R. (2009). Hepatic nuclear factor 1- α : inflammation, genetics, and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 20(2), 106-111.
- Bellanne-Chantelot, C., Carette, C., Riveline, J., Valero, R., Gautier, J., Larger, E., Reznik, Y., Ducluzeau, P., Sola, A., Hartemann-Heurtier, A., Lecomte, P., Chaillous, L., Laloi-Michelin, M., Wilhem, J., Cuny, P., Duron, F., Guerci, B., Jeandidier, N., Mosnier-Pudar, H., Assayag, M., Dubois-Laforgue, D., Velho, G. and Timsit, J. (2008). The Type and the Position of HNF1A Mutation Modulate Age at Diagnosis of Diabetes in Patients with Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY)-3. *Diabetes*, 57(2), 503-508.
- Chavez, A., Scheiman, J., Vora, S., Pruitt, B., Tuttle, M., P R Iyer, E., Lin, S., Kiani, S., Guzman, C., Wiegand, D., Ter-Ovanesyan, D., Braff, J., Davidsohn, N., Housden, B., Perrimon, N., Weiss, R., Aach, J., Collins, J. and Church, G. (2015). Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nature Methods*, 12(4), 326-328.
- Choudhury, S., Cui, Y., Lubecka, K., Stefanska, B. and Irudayaraj, J. (2016). CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget*, 7(29).
- Dominguez, A., Lim, W. and Qi, L. (2016). Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(1), 5-15.
- Du, J., Johnson, L., Jacobsen, S. and Patel, D. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(9), 519-532.
- Ellard, S. and Colclough, K. (2006). Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) and 4 alpha (HNF4A) in maturity-onset diabetes of the young. *Human Mutation*, 27(9), 854-869.

- Fu, Y., Sander, J., Reyon, D., Cascio, V. and Joung, J. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology*, 32(3), 279-284.
- Gao, Y., Xiong, X., Wong, S., Charles, E., Lim, W. and Qi, L. (2016). Complex transcriptional modulation with orthogonal and inducible dCas9 regulators. *Nature Methods*, 13(12), 1043-1049.
- Goldberg, A., Allis, C. and Bernstein, E. (2007). Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*, 128(4), 635-638.
- Hilton, I., D'Ippolito, A., Vockley, C., Thakore, P., Crawford, G., Reddy, T. and Gersbach, C. (2015). Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology*, 33(5), 510-517.
- Holoch, D. and Moazed, D. (2015). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 16(2), 71-84.
- Hoskins, J., Jia, J., Flandez, M., Parikh, H., Xiao, W., Collins, I., Emmanuel, M., Ibrahim, A., Powell, J., Zhang, L., Malats, N., Bamlet, W., Petersen, G., Real, F. and Amundadottir, L. (2014). Transcriptome analysis of pancreatic cancer reveals a tumor suppressor function for HNF1A. *Carcinogenesis*, 35(12), 2670-2678.
- Jones, P. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484-492.
- Josipović, G., Tadić, V., Klasić, M., Zanki, V., Bečeheli, I., Chung, F., Ghantous, A., Keser, T., Madunić, J., Bošković, M., Lauc, G., Herceg, Z., Vojta, A. and Zoldoš, V. (2019). Antagonistic and synergistic epigenetic modulation using orthologous CRISPR/dCas9-based modular system. *Nucleic Acids Research*, 47(18), 9637-9657.
- Kim, J., Samaranyake, M. and Pradhan, S. (2008). Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(4), 596-612.
- Lauc, G., Essafi, A., Huffman, J., Hayward, C., Knežević, A., Kattla, J., Polašek, O., Gornik, O., Vitart, V., Abrahams, J., Pučić, M., Novokmet, M., Redžić, I., Campbell, S., Wild, S., Borovečki, F., Wang, W., Kolčić, I., Zgaga, L., Gyllensten, U., Wilson, J., Wright, A., Hastie, N., Campbell, H., Rudd, P. and Rudan, I. (2010). Genomics Meets Glycomics—

- The First GWAS Study of Human N-Glycome Identifies HNF1 α as a Master Regulator of Plasma Protein Fucosylation. *PLoS Genetics*, 6(12), e1001256.
- Li, E. and Zhang, Y. (2014). DNA Methylation in Mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5), a019133-a019133.
- Liu, P., Chen, M., Liu, Y., Qi, L. and Ding, S. (2018). CRISPR-Based Chromatin Remodeling of the Endogenous Oct4 or Sox2 Locus Enables Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 22(2), 252-261.e4.
- Liu, X., Wu, H., Krzisch, M., Wu, X., Graef, J., Muffat, J., Hnisz, D., Li, C., Yuan, B., Xu, C., Li, Y., Vershkov, D., Cacace, A., Young, R. and Jaenisch, R. (2018). Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene. *Cell*, 172(5), 979-992.e6.
- Liu, X., Wu, H., Ji, X., Stelzer, Y., Wu, X., Czauderna, S., Shu, J., Dadon, D., Young, R. and Jaenisch, R. (2016). Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell*, 167(1), 233-247.e17.
- Luco, R., Maestro, M., Sadoni, N., Zink, D. and Ferrer, J. (2008). Targeted Deficiency of the Transcriptional Activator Hnfl α Alters Subnuclear Positioning of Its Genomic Targets. *PLoS Genetics*, 4(5), e1000079.
- Luo, Z., Li, Y., Wang, H., Fleming, J., Li, M., Kang, Y., Zhang, R. and Li, D. (2015). Hepatocyte Nuclear Factor 1A (HNF1A) as a Possible Tumor Suppressor in Pancreatic Cancer. *PLOS ONE*, 10(3), e0121082.
- Marshall, O. (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*, 20(15), 2471-2472.
- Peprah, E. (2011). Fragile X Syndrome: The FMR1 CGG Repeat Distribution Among World Populations. *Annals of Human Genetics*, 76(2), 178-191.
- Pulecio, J., Verma, N., Mejía-Ramírez, E., Huangfu, D. and Raya, A. (2017). CRISPR/Cas9-Based Engineering of the Epigenome. *Cell Stem Cell*, 21(4), 431-447.

- Qi, L., Larson, M., Gilbert, L., Doudna, J., Weissman, J., Arkin, A. and Lim, W. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, 152(5), 1173-1183.
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A. and Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119-128.
- Reiner, A., Gross, M., Carlson, C., Bielinski, S., Lange, L., Fornage, M., Jenny, N., Walston, J., Tracy, R., Williams, O., Jacobs, D. and Nickerson, D. (2009). Common Coding Variants of the HNF1A Gene Are Associated With Multiple Cardiovascular Risk Phenotypes in Community-Based Samples of Younger and Older European-American Adults. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2(3), 244-254.
- Sander, J. and Joung, J. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 32(4), 347-355.
- Schmittgen, T. and Livak, K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Seisenberger, S., Peat, J., Hore, T., Santos, F., Dean, W. and Reik, W. (2013). Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1609), 20110330.
- Steck, A. and Winter, W. (2011). Review on monogenic diabetes. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 18(4), 252-258.
- Stepper, P., Kungulovski, G., Jurkowska, R., Chandra, T., Krueger, F., Reinhardt, R., Reik, W., Jeltsch, A. and Jurkowski, T. (2016). Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9–Dnmt3a–Dnmt3L methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 45(4), 1703-1713.
- Stroud, H., Do, T., Du, J., Zhong, X., Feng, S., Johnson, L., Patel, D. and Jacobsen, S. (2013). Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in Arabidopsis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(1), 64-72.

- Tadić, V., Josipović, G., Zoldoš, V. and Vojta, A. (2019). CRISPR/Cas9-based epigenome editing: An overview of dCas9-based tools with special emphasis on off-target activity. *Methods*, 164-165, 109-119.
- Tamaru, H. and Selker, E. (2001). A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, 414(6861), 277-283.
- Thakore, P., D'Ippolito, A., Song, L., Safi, A., Shivakumar, N., Kabadi, A., Reddy, T., Crawford, G. and Gersbach, C. (2015). Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nature Methods*, 12(12), 1143-1149.
- Tollervey, J. and Lunyak, V. (2012). Epigenetics. *Epigenetics*, 7(8), 823-840.
- Tycko, J., Myer, V. and Hsu, P. (2016). Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Molecular Cell*, 63(3), 355-370.
- Vojta, A., Dobrinić, P., Tadić, V., Bočkor, L., Korać, P., Julg, B., Klasić, M. and Zoldoš, V. (2016). Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 44(12), 5615-5628.
- Wang, H., La Russa, M. and Qi, L. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 227-264.
- Wu, X. and Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 18(9), 517-534.
- Xu, X., Tao, Y., Gao, X., Zhang, L., Li, X., Zou, W., Ruan, K., Wang, F., Xu, G. and Hu, R. (2016). A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation. *Cell Discovery*, 2(1).
- Zoldoš, V., Horvat, T., Novokmet, M., Cuenin, C., Mužinić, A., Pučić, M., Huffman, J., Gornik, O., Polašek, O., Campbell, H., Hayward, C., Wright, A., Rudan, I., Owen, K., McCarthy, M., Herceg, Z. and Lauc, G. (2012). Epigenetic silencing of HNF1A associates with changes in the composition of the human plasma N-glycome. *Epigenetics*, 7(2), 164-172.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 18. 10. 1995. godine u Subotici u Republici Srbiji, ali od svoje 5. godine živim na Rabu u Republici Hrvatskoj gdje sam nakon završetka osnovne škole upisala smjer opća gimnazija u Srednjoj školi Markantuna de Dominisa. Preddiplomski studij biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2014. godine te sam 2017. godine stekla zvanje sveučilišnog prvostupnika biologije. Iste godine sam upisala Diplomski studij molekularne biologije. Tijekom studija sam odradila dvije laboratorijske stručne prakse, jednu na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, a drugu praksu sam odradila u Laboratoriju za staničnu biologiju i prienos signala na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Kroz navedene prakse i vježbe na studiju, savladala sam osnovne molekularne metode i stekla znanja i vještine potrebne za samostalan rad u laboratoriju. Kroz srednju školu i studij radila sam brojne studentske poslove od kojih bi istaknula posljednje radno mjesto u laboratoriju AnimaLabs tvrtke InovaGen d.o.o. koji je usredotočen na usluge DNA testiranja nasljednih bolesti i osobina kućnih ljubimaca te domaćih životinja. Volontirala sam na znanstveno-popularizacijskom događaju Noć Biologije 2016. i 2017. godine, a bila sam i član udruge studenata biologije BIUS uključena u Sekciju za mikrobiologiju i Sekciju za genetiku. Također bi istaknula i sudjelovanje na praktičnoj radionici “Uvod u bio-procesno inženjerstvo” održanoj 2017. godine u BIOcentru u Zagrebu.