

Konstrukcija epigenetičkoga CRISPR/Cas9 sustava za ciljanu metilaciju specifičnih CpG mjesta

Dobrinić, Paula

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:149384>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-02**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Paula Dobrinić

**KONSTRUKCIJA EPIGENETIČKOGA
CRISPR/Cas9 SUSTAVA ZA CILJANU
METILACIJU SPECIFIČNIH CpG MJESTA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Paula Dobrinić

**KONSTRUKCIJA EPIGENETIČKOGA
CRISPR/Cas9 SUSTAVA ZA CILJANU
METILACIJU SPECIFIČNIH CpG MJESTA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
izv. prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Paula Dobrinić

**DEVELOPMENT OF EPIGENETIC
CRISPR/Cas9 SYSTEM FOR TARGETED
METHYLATION AT SPECIFIC CpG SITES**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Prof. Vlatka Zoldoš, PhD

Zagreb, 2016

Ovaj je doktorski rad izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju, pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALE

Hvala mentorici, izv. prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš na pruženoj prilici te na potpori i svim savjetima danima prilikom izrade ovog doktorata.

Zahvaljujem kolegama iz grupe, kao i ostalim članovima ZMB-a koji su bili spremni priskočiti u pomoć kad god je trebalo.

Hvala Tomislavu i Chloe što su me s puno strpljenja i volje naučili kako dobro raditi u labosu.

Dora, Vanja i Melanija, hvala na kolegijalnosti, dobrom društvu i veselju.

Posebno hvala Mariji na svim riješenim dilemama i problemima i na svakodnevnoj nesebičnoj pomoći. Bolju kolegicu ne bih mogla zamisliti.

Petra, hvala na nebrojenim savjetima, kvalitetnim diskusijama i optimističnim planovima.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci i ljubavi.

Ovaj doktorski rad posvećen je mojoj baki.

KONSTRUKCIJA EPIGENETIČKOGA CRISPR/Cas9 SUSTAVA ZA CILJANU METILACIJU SPECIFIČNIH CpG MJESTA

PAULA DOBRINIĆ

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Metilacija DNA važan je epigenetički mehanizam uključen u regulaciju aktivnosti genoma i normalan razvoj sisavaca. Metilacija CpG mjesta unutar regulatornih regija gena najčešće se povezuje s njihovim utišavanjem, no mehanizmi iza utvrđene korelacije nisu u potpunosti razjašnjeni. Precizne funkcionalne studije ograničene su nedostatkom metoda za ciljanu promjenu metilacijskih oznaka. U tu sam svrhu razvila fleksibilni molekularni alat za ciljanu metilaciju CpG mjesta unutar genomskog područja od interesa, temeljen na sustavu CRISPR/Cas9. Konstruirala sam fuzijski protein koji kombinira sposobnost vezanja specifične sekvence DNA s metiltransferaznom aktivnošću enzima DNMT3A. Konstruirani alat je u ljudskim stanicama u kulturi inducirao značajnu hipermetilaciju ciljanih CpG mjesta unutar promotora kandidat gena što je rezultiralo utišavanjem transkripcije istih. Uspostavljeni uzorak metilacije ovisi o mjestu vezanja i orijentaciji pridružene molekule RNA komplementarne ciljanom lokusu. Opisana metoda ima veliki potencijal u rasvjetljavanju uzročno-posljedične veze između metilacije DNA i regulacije ekspresije gena.

(81 stranica, 19 slika, 3 tablice, 146 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: metilacija DNA, epigenetička regulacija, sustav CRISPR/Cas9, epigenetički inženjering, utišavanje gena

Mentor: izv. prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
izv. prof. dr. sc. Maja Matulić
prof. dr. sc. Srećko Gajović

DEVELOPMENT OF EPIGENETIC CRISPR/Cas9 SYSTEM FOR TARGETED METHYLATION AT SPECIFIC CpG SITES

PAULA DOBRINIĆ

Faculty of Science, University of Zagreb

DNA methylation is an important epigenetic mechanism involved in genome regulation and normal development in mammals. CpG methylation of regulatory regions is usually associated with gene silencing, but exact mechanisms underlying this correlation are still unknown. Precise functional studies have been limited due to the lack of methods for targeted manipulation of methylation marks. To that end, I developed a flexible CRISPR/Cas9-based tool for targeted methylation of specific CpG sites. The programmable DNA binding module and DNA methyltransferase activity of DNMT3A were combined into a single fusion protein. Significant hypermethylation of targeted CpG sites at promoters of candidate genes was induced in human cultured cells, which resulted in gene transcriptional silencing. The established methylation profile was dependent on the associated complementary guide RNA. The described epigenetic tool could be very useful for precise interrogation of the causal relationship between DNA methylation and gene regulation.

(81 pages, 19 figures, 3 tables, 146 references, original in croatian)

Keywords: DNA methylation, epigenetic regulation, CRISPR/Cas9 system, epigenetic editing, gene silencing

Supervisor: Vlatka Zoldoš, PhD, Associate Professor

Reviewers: Aleksandar Vojta, PhD, Assistant Professor

Maja Matulić, PhD, Associate Professor

Srećko Gajović, PhD, Professor

Sadržaj

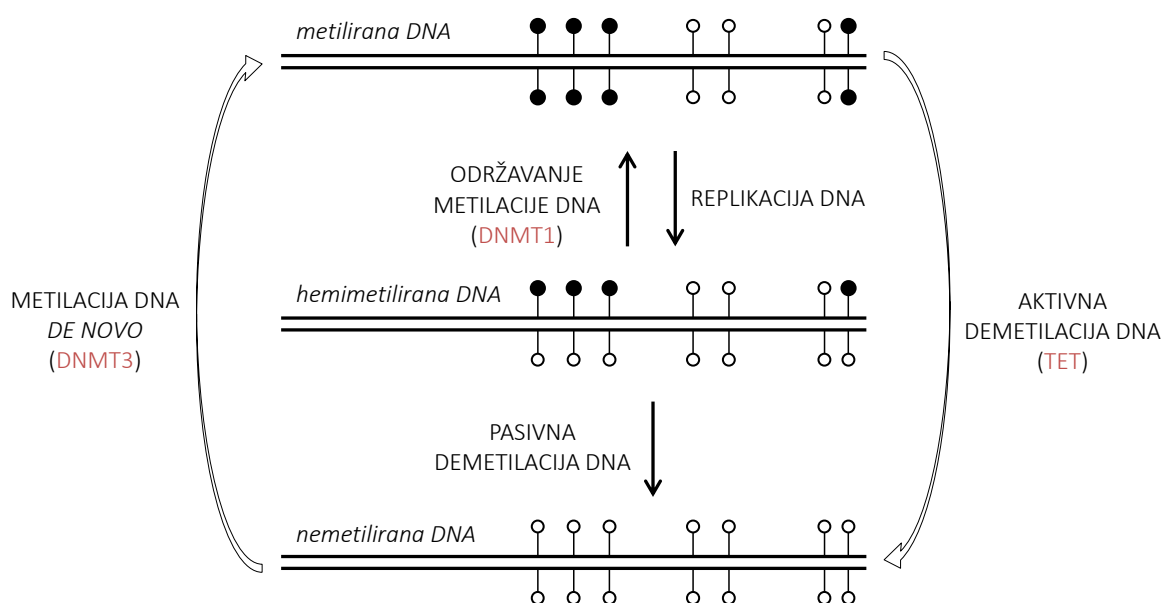
1	UVOD	1
2	LITERATURNI PREGLED	5
2.1	Metilacija DNA u sisavaca	5
2.2	DNA metiltransferaze	7
2.3	Uloga metilacije DNA u regulaciji ekspresije gena	9
2.4	Alati za ciljanu modifikaciju genoma.....	13
2.4.1	Sustav CRISPR/Cas9	15
2.5	Prenamjena alata za ciljanu modifikaciju genoma u svrhu epigenetičkog inženjeringa 17	
2.6	Epigenetička regulacija glikozilacije imunoglobulina G.....	19
3	MATERIJALI I METODE	22
3.1	Konstrukcija plazmidnih vektora za ekspresiju fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A 22	
3.2	Vektori za ciljanu CpG metilaciju regulatornih regija	26
3.2.1	Odabir ciljanih sekvenci	26
3.2.2	Kloniranje sekvenci sgRNA u vektore	28
3.3	Održavanje stanica u kulturi	29
3.4	Transfekcija i selekcija stanica	29
3.4.1	Određivanje optimalne količine vektora za transfekciju	30
3.5	Izolacija DNA i analiza metilacije CpG mjesta.....	31
3.5.1	Testovi za analizu metilacije DNA	31
3.6	Izolacija RNA i analiza ekspresije gena	32
3.7	Analiza djelovanja kimerne metiltransferaze dCas9-DNMT3A kroz vrijeme	33
3.7.1	Relativna kvantifikacija plazmidne DNA pomoću kvantitativnog qPCR-a.....	33
3.8	Statistička obrada podataka	34
4	REZULTATI.....	35
4.1	Konstrukcija sustava za ciljanu metilaciju DNA.....	35

4.1.1	Ciljana metilacija promotora gena <i>BACH2</i> i <i>IL6ST</i>	38
4.1.2	Metilacija ciljanih lokusa pomoću kombinacije sgRNA.....	42
4.1.3	Razina globalne metilacije DNA.....	44
4.2	Analiza ekspresije gena <i>BACH2</i> i <i>IL6ST</i>	46
4.3	Analiza djelovanja dCas9-DNMT3A tijekom vremena	48
4.3.1	Relativna kvantifikacija plazmidne DNA pomoću kvantitativnog qPCR-a.....	50
5	RASPRAVA.....	51
6	ZAKLJUČAK	59
7	LITERATURA.....	60
8	POPIS KRATICA	74
9	PRILOG 1. Mape konstruiranih plazmidnih vektora	77
	PRILOG 2. Polipeptidna sekvenca konstruiranih fuzijskih proteina	79
10	ŽIVOTOPIS	81

1 UVOD

Metilacija DNA važan je epigenetički mehanizam uključen u regulaciju transkripcijske aktivnosti genoma. U sisavaca, metilna skupina uglavnom se dodaje na citozin u kontekstu CpG dinukleotida djelovanjem enzima DNA metiltransferaze (DNMT). Globalni uzorak metilacije uspostavlja se rano u embrionalnom razvoju aktivnošću DNA metiltransferaza *de novo*, DNMT3 i održava se kroz replikaciju DNA i diobu stanica zahvaljujući simetričnoj prirodi palindromske sekvence CpG dinukleotida i djelovanju enzima DNMT održavateljskog tipa, DNMT1 (1). Do gubitka metilacijske oznake može doći pasivnim putem tijekom replikacije DNA ili aktivnom demetilacijom DNA djelovanjem enzima iz obitelji TET (od engl. *ten-eleven translocation*) (Slika 1) (2). Regulirana uspostava i održavanje uzorka metilacije genoma nužni su za normalan razvoj sisavaca. Lokalne promjene metilacije DNA događaju se tijekom stanične diferencijacije i očituju se diferencijalnim uzorkom metilacije CpG dinukleotida u različitim tkivima, a često su povezane s tkivno-specifičnom ekspresijom gena. Do dodatnih promjena metilacije DNA dolazi tijekom starenja, pod utjecajem okolišnih čimbenika i načina prehrane te kod raznih tipova bolesti (3,4).

Metilacija CpG dinukleotida smještenih unutar regulatornih elemenata genoma, kao što su promotori i pojačivači, najčešće se povezuje s utišavanjem gena. Osim toga, metilacija DNA nužna je za uspostavu genomskog utiska, inaktivaciju kromosoma X i održavanje stabilnosti genoma utišavanjem ponavljajućih sekvenci (5). Nakon nekoliko desetljeća istraživanja, metilacija DNA vjerojatno je najbolje opisan epigenetički mehanizam. Razvoj tehnologije sekvenciranja nove generacije omogućio je analizu cijelog metiloma na razini pojedinačnih baza DNA u različitim fazama diferencijacije stanica, te u različitim normalnim i patološkim stanjima. Na temelju cjelogenomskih i drugih eksperimentalnih podataka utvrđeno je postojanje korelacije između dijela prisutnih metilacijskih oznaka i transkripcijske aktivnosti gena. Korelacija ovisi o genomskom kontekstu modificiranog CpG dinukleotida, pa je tako metilacija regija bogatih CpG dinukleotidima u promotorima gena najčešće povezana s represijom genske aktivnosti. S druge strane, metilacija intragenskih citozina može biti pozitivno korelirana s aktivnošću gena. Mehanizmi uspostave i održavanja metilacijskog uzorka nisu do kraja razjašnjeni, kao ni složena interakcija metilacije DNA i drugih epigenetičkih mehanizama i regulatornih faktora, koja u konačnici definira transkripcijsku aktivnost gena (6).



Slika 1. Dinamika metilacije DNA u sisavaca. Uspostavljeni uzorak metilacije simetričnih CpG dinukleotida (štapići s kružićima) održava se kroz replikaciju DNA, no može biti izgubljen pasivnom ili aktivnom demetilacijom. Metilacijski uzorak može biti ponovno uspostavljen kroz proces metilacije *de novo*. Zacrtnjeni kružići predstavljaju metilirane CpG dinukleotide, a prazni nemetilirane. Preuzeto i prilagođeno iz Jeltsch i Jurkowska (7).

Točna funkcija metilacije DNA, kao i histonskih modifikacija, u regulaciji transkripcijske aktivnosti gena dugo nije mogla biti u potpunosti razjašnjena zbog nedostatka metoda za ciljanu manipulaciju epigenetičkih oznaka unutar specifične genomske regije. Gotovo paralelno s razvojem novih tehnologija za ciljanu modifikaciju genoma temeljenih na programiranim nukleazama došlo je do razvoja tzv. epigenetičkog inženjeringa, odnosno metoda za ciljanu modifikaciju epigenetičkih oznaka na točno određenom mjestu u genomu. Molekularni alati za epigenetički inženjering temelje se na povezivanju domene koja specifično prepoznaje i veže određenu sekvencu DNA i enzima koji katalizira dodavanje ili uklanjanje epigenetičke oznake (8,9). Funkciju specifičnog prepoznavanja sekvence DNA mogu nositi modularni proteini kao što su proteini s domenama cinkovih prstiju (engl. *zinc finger*, ZF) (10) ili efektori slični aktivatorima transkripcije (engl. *transcription activator-like effector*, TALE) (11). U oba slučaja potrebno je dizajnirati i konstruirati novi polipeptid za svaku pojedinu sekvencu DNA od interesa. S druge strane, upotreba sustava CRISPR/Cas9 (od engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) bitno ubrzava i pojednostavljuje ciljanu modifikaciju genoma jer navođenje nukleazne aktivnosti enzima

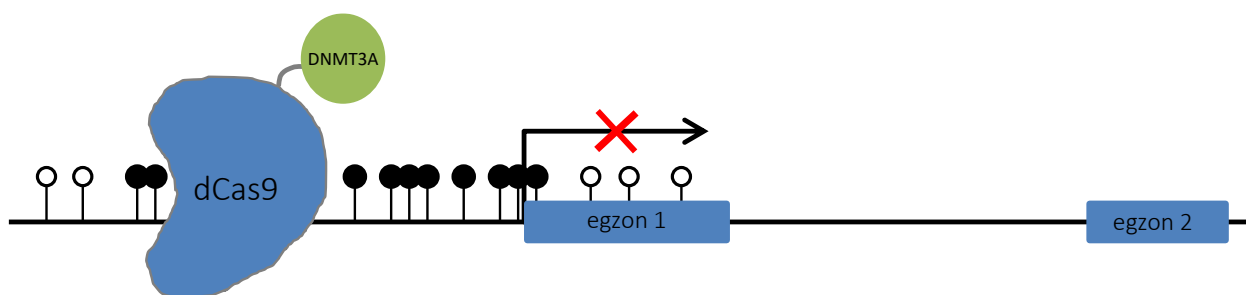
Cas9 na specifično mjesto u genomu zahtijeva samo sintezu kratke komplementarne molekule RNA (12,13). Sva tri sustava s mogućnošću programiranog prepoznavanja specifične sekvence DNA iskorištena su za ciljanu modifikaciju epigenetičkih oznaka (8,14,15). Sustav CRISPR/Cas9 dosad je iskorišten za ciljanu acetilaciju i demetilaciju histona (16,17), no nije još prenamijenjen za potrebe modifikacije metilacijskih oznaka na molekuli DNA.

Ovaj doktorski rad polazi od hipoteze da je moguće izazvati ciljanu metilaciju citozina u određenoj regiji genoma korištenjem prenamijenjenog sustava CRISPR/Cas9. Metilacija određenih citozina koji imaju regulatornu funkciju mogla bi rezultirati utišavanjem gena (Slika 2). Metodu sam razvila radi primjene u istraživanju funkcije metilacije DNA u regulaciji transkripcije gena.

Opći cilj istraživanja bio je razvoj fleksibilnog molekularnog alata za ciljanu metilaciju citozina unutar regulatorne regije gena od interesa kombiniranjem sustava CRISPR/Cas9 i katalitičke domene DNA metiltransferaze 3A (DNMT3A).

Specifični ciljevi istraživanja bili su:

- i. konstrukcija plazmidnog vektora za ekspresiju katalitički inaktivne nukleaze Cas9 (dCas9, od engl. *deactivated Cas9*) s vezanom katalitičkom domenom DNA metiltransferaze DNMT3A,
- ii. odabir nisko metilirane regulatorne regije gena od interesa, pogodne za ciljanu metilaciju citozina,
- iii. unos vektora u staničnu liniju embrionalnog bubrega čovjeka HEK293 (od engl. *human embryonic kidney*),
- iv. određivanje stupnja metilacije ciljane regije pomoću testova za analizu metilacije na razini pojedinačnih CpG mjesta.



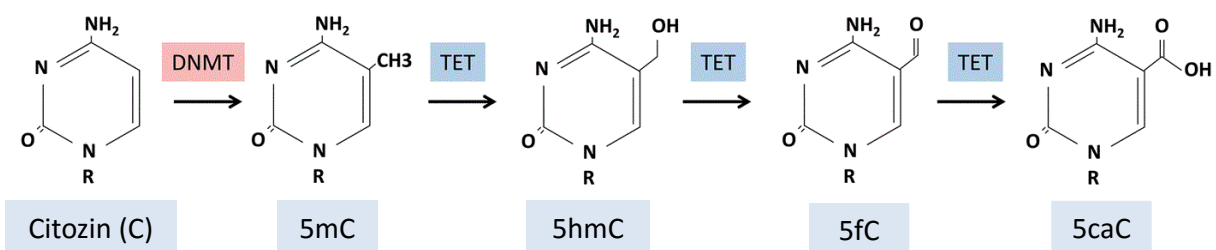
Slika 2. Shematski prikaz ciljne metilacije DNA pomoću fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A.

Koristeći metode molekularnog kloniranja konstruirala sam plazmidne vektore za ekspresiju fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A u animalnim stanicama u kulturi. Djelovanje fuzijskog proteina sastavljenog od inaktivirane nukleaze Cas9 i domene s DNA metiltransferaznom aktivnošću testirala sam u staničnoj liniji embrionalnog bubrega čovjeka HEK293, koja se redovito koristi u bazičnim i primijenjenim istraživanjima zbog jednostavnog održavanja u kulturi i učinkovitog unosa strane DNA. Bisulfitnim pirosekvenciranjem ciljanih genomskih fragmenata analizirala sam aktivnost kimerne metiltransferaze navođene na izvorno nemetilirane promotore gena *BACH2* i *IL6ST*. Bisulfitno pirosekvenciranje omogućava preciznu kvantifikaciju razine metilacije pojedinačnih CpG mjesta unutar sekvence DNA duljine do 100 pb (18). Istu metodu koristila sam i za analizu metilacije raspršenih ponavljajućih elemenata LINE-1 (od engl. *long interspersed nucleotide element 1*), što se koristi kao mjera globalne metilacije genoma (19). Analizirala sam djelovanje fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A tijekom vremena, odnosno dinamiku uspostave i održavanja metilacije ciljanih lokusa. Budući da se hipermetilacija promotora gena povezuje s njegovim utišavanjem, provjerila sam utječe li ciljana metilacija promotora na transkripciju gena *BACH2* i *IL6ST*, koristeći metodu kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu (qPCR).

2 LITERATURNI PREGLED

2.1 Metilacija DNA u sisavaca

Metilacija DNA u stanicama sisavaca uglavnom se odnosi na kovalentnu modifikaciju citozina u kontekstu simetričnih CpG dinukleotida. Citozin je kemijski modificiran dodatkom metilne skupine (CH₃) na atom 5C pirimidinskog prstena (Slika 3). Metilirani oblik citozina, 5-metilcitozin (5mC), zadržava svojstvo komplementarnog sparivanja s gvaninom, odnosno ne mijenja samu sekvencu DNA (20). Jednaka svojstva sparivanja zadržava i 5-hidroksimetilcitozin (5hmC), oblik citozina koji je dosad otkriven u relativno malim količinama, u samo nekim tipova stanica, kao što su Purkinjeove stanice u mozgu i embrionalne matične stanice miša (21,22). Dodatni oblici citozina, kao što su 5-formilcitozin (5fC) i 5-karboksilcitozin (5caC), smatraju se nestabilnim međuproduktima oksidativne demetilacije 5mC (23). Nedavno je u genomu sisavaca prepoznata dodatna modifikacija DNA, a to je metilacija adenina na 6. poziciji purinskog prstena, tzv. N6-metiladenin (N6-mA). Modificirani oblik adenina, karakterističan za prokariotski genom, zasad je pronađen u embrionalnim matičnim stanicama miša, gdje je povezan s utišavanjem evolucijski mlađih elemenata LINE-1 tijekom stanične diferencijacije (24).



Slika 3. Oblici citozina modificirani metilacijom i oksidacijom. Enzim DNA metiltransferaza (DNMT) katalizira dodatak metilne skupine CH₃ na atom 5C citozina, čime nastaje 5-metilcitozin (5mC). Enzimi porodice TET (od engl. *ten-eleven translocation*) oksidiraju 5mC u nekoliko koraka. Oksidativna demetilacija ide preko 5-hidroksimetilcitozina (5hmC), 5-formilcitozina (5fC) i 5-karboksilcitozina (5caC). Preuzeto i prilagođeno iz Nightingale (25).

Osim u kontekstu CpG dinukleotida, metilna skupina može biti vezana na citozin iza kojeg ne slijedi gvanin, CpH (H=A/C/T). Ovaj tip metilacije citozina, inače učestao u biljnim genomima, u sisavaca je detektiran u embrionalnim matičnim stanicama (26) te u neuronima mišjeg i ljudskog mozga, gdje se pretpostavlja da ima regulatornu ulogu (27). Nedavno je prisutnost metilacije CpH otkrivena detaljnim mapiranjem metiloma u gotovo svim analiziranim tkivima čovjeka te je utvrđena povezanost s tkivno-specifičnim funkcijama (28). Iako su mehanizmi uspostave i funkcionalna uloga još nedovoljno razjašnjeni, zanimljivo je da je uočena pozitivna korelacija između metilacije CpH i transkripcije gena u embrionalnim matičnim stanicama (26), a negativna korelacija u neuronima (27).

Simetrična metilacija citozina u kontekstu jednostavne palindromske sekvence CpG omogućava nasljeđivanje metilacijske oznake kroz replikaciju genoma i diobu stanice. Budući da oba roditeljska lanca DNA tijekom replikacije nose metilacijsku oznaku na citozinu, informacija se može prenijeti na oba novosintetizirana nemetilirana lanca. Na razini cijelog genoma, učestalost CpG mjesta puno je manja od očekivane, odnosno CpG dinukleotidi javljaju se 5-10 puta rjeđe od ostalih dinukleotida. Osim toga, distribucija CpG mjesta u genomu sisavaca nije nasumična. Vjeruje se da je kroz evoluciju genoma došlo do postepene deplecije CpG mjesta zbog sklonosti 5mC spontanoj deaminaciji, pri čemu nastaje timin koji se ne popravlja učinkovito, već se prenosi kroz replikaciju (29). Iznimka od relativno rijetke distribucije CpG mjesta u genomu su tzv. CpG otoci, genomska područja izuzetno bogata CpG dinukleotidima. CpG otoci definirani su kao područja dulja od 200 parova baza (pb), s udjelom CpG dinukleotida višim od 50% te omjerom opaženih naspram očekivanih CpG dinukleotida većim od 60% (30). CpG otoci nalaze se u otprilike 60-70% anotiranih promotora ljudskih gena (31), gdje su uglavnom u nemetiliranom stanju neovisno o tipu stanica i tkiva. S druge strane, postoje brojni CpG otoci koji nisu ko-lokalizirani s anotiranim promotorskim regijama, te koji uglavnom tijekom razvoja i diferencijacije poprimaju metilirano stanje (32).

Metilacija DNA vjerojatno je najbolje istražena epigenetička modifikacija, uključena u niz ključnih staničnih procesa, kao što su regulacija transkripcije, inaktivacija kromosoma X, uspostava genomskog utiska, utišavanje transpozona i retrovirusa, održavanje stabilnosti genoma te odgovor na promjene okoliša (4,5). Uzorak metilacije DNA, koji se smatra neophodnim za uspostavu staničnog identiteta, strogo je reguliran tijekom razvoja i diferencijacije stanica. Većina CpG mjesta u ljudskom genomu, koja nisu dio CpG otoka, uglavnom su stabilno metilirana u svim tkivima i fazama razvoja. Izuzetak su stanice

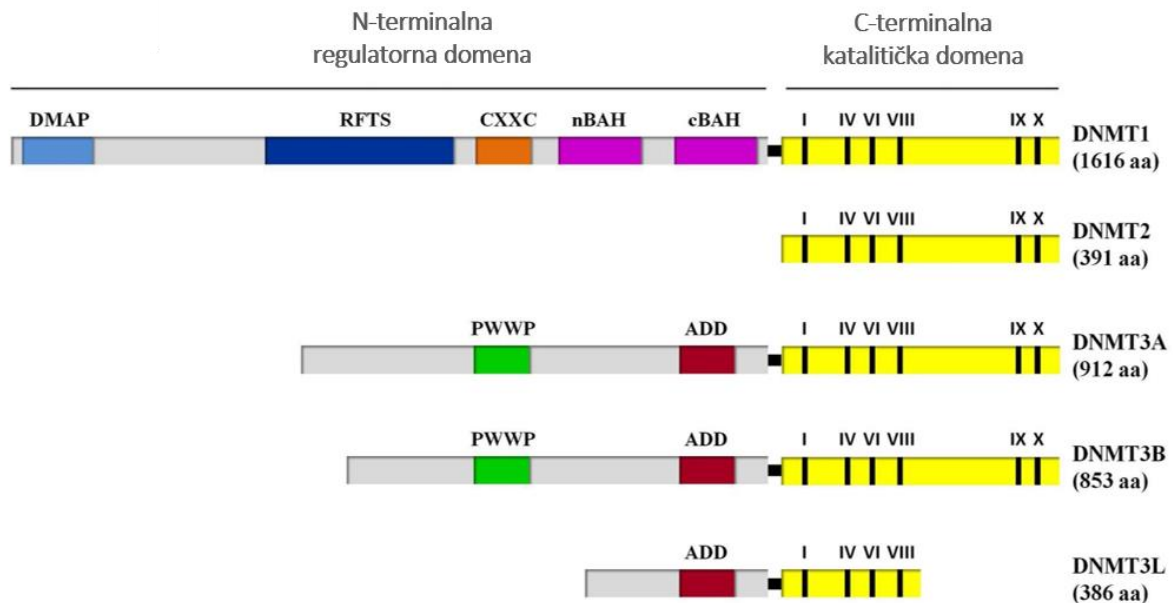
germinativne linije i rani stadiji embrionalnog razvoja, koje karakterizira vrlo dinamična promjena metilacije DNA. Većina metilacijskih oznaka briše se s citozina u molekuli DNA tijekom ranog embrionalnog razvoja, a zatim se ponovno uspostavlja kroz složene interakcije faktora koji djeluju *in cis* i *in trans*, a koje usmjeravaju metilaciju DNA *de novo* (3,4). Analizom metilacije različitih tipova ljudskih stanica i tkiva pokazano je da promjena metilacije zahvaća tek oko 20% autosomalnih CpG mjesta. Dinamično regulirana CpG mjesta nalaze se u regulatornim regijama, posebice pojačivačima i veznim mjestima za transkripcijske faktore. Diferencijalna metilacija CpG mjesta među različitim tkivima korelirana je s tkivno-specifičnim funkcijama (28,33).

Normalan uzorak metilacije DNA narušen je u brojnim bolestima, uključujući maligne tumore (3). Primjerice, mutacije gena za DNA metiltransferazu 3B (*DNMT3B*) uzrokuju sindrom imunodeficijencije, centromerne nestabilnosti i anomalija lica (engl. *immunodeficiency, centromeric region instability and facial anomalies syndrome*, ICF). Mutacije u genima koji kodiraju za enzime odgovorne za metilaciju ili demetilaciju DNA često su povezane s dereguliranom metilacijom DNA u tumorima. Međutim, promjena originalnog uzorka metilacije genoma još je češće uzrokovana pasivnom demetilacijom (tijekom replikacije) te aktivnom demetilacijom (Slika 1) ili hipermetilacijom CpG mjesta kao odgovor na različite okolišne faktore (34,35). Tumore uglavnom karakterizira globalna hipometilacija genoma i ograničena hipermetilacija određenih manjih regija (36). Hipermetilacija promotora tumor-supresorskih gena rezultira njihovim utišavanjem i može biti značajan faktor u tumorigenezi i progresiji tumora (37,38).

2.2 DNA metiltransferaze

Za uspostavu i održavanje metilacije DNA u sisavaca potrebno je koordinirano djelovanje triju DNA metiltransferaza, DNMT1, DNMT3A i DNMT3B (homolozi su Dnmt1, Dnmt3a i Dnmt3b kod miša) (39). DNA metiltransferaze kataliziraju metilaciju citozina, odnosno prijenos metilne skupine s donorske molekule S-adenozil-L-metionin (AdoMet ili SAM) na C5 atom citozina. Pritom se citozinski ostatak potpuno izokreće iz zavojnice DNA i umeće duboko u aktivno mjesto enzima (40). Razlikuju se dva osnovna dijela enzima DNMT: N-terminalna regulatorna domena, sastavljena od više kraćih domena ili motiva, te C-terminalna katalitička domena (Slika 4). N-terminalni dio zaslužan je za lokalizaciju proteina u jezgri stanice te interakciju s drugim proteinima i kromatinom. Kraća C-terminalna katalitička domena, homologna prokariotskim metiltransferazama, sadrži deset kraćih

peptidnih motiva karakterističnih za sve DNA metiltransferaze koje kataliziraju metilaciju citozina na atomu C5 (41,42). Dok je N-terminalna domena proteina Dnmt1 neophodna za metiltransferazno djelovanje, izolirane C-terminalne domene enzima Dnmt3a i Dnmt3b zadržavaju katalitičku aktivnost (43).



Slika 4. Shematski prikaz strukture ljudskih DNA metiltransferaza (DNMT). Bojama su označene različite domene karakteristične za pojedine proteine ili očuvane među više pripadnika obitelji proteina DNMT. Rimskim brojevima označeni su očuvani motivi DNA metiltransferaza koje kataliziraju metilaciju citozina na atomu C5. Brojevi u zagradama odnose se na duljinu svakog proteina (aa, od engl. *aminoacid*). DMAP, *DNA methyltransferase associated protein*; RFTS, *replication foci targeting sequence*; CXXC, domena bogata cisteinom koja veže ione Zn^{2+} ; nBAH/cBAH, *bromo-adjacent homology*; PWWP, konzervirani motiv Pro-Trp-Trp-Pro; ADD, ATRX–Dnmt3–Dnmt3L. Preuzeto iz Maresca i sur. (44).

Za održavanje uzorka metilacije DNA tijekom replikacije zaslužna je DNA metiltransferaza održavateljskog tipa DNMT1, koja prepoznaje hemimetiliranu DNA i veže je visokim afinitetom te katalizira simetričnu metilaciju novosintetiziranog lanca. S druge strane, DNA metiltransferaze *de novo* DNMT3A i DNMT3B imaju jednak afinitet prema hemimetiliranoj i nemetiliranoj DNA (45). Dvije DNA metiltransferaze *de novo* imaju

nepreklapajuću funkciju u uspostavi metilacije. Očuvana aktivnost oba enzima neophodna je prilikom re-metilacije genoma u ranoj embriogenezi, nakon faze globalne demetilacije genoma zigote. Potpuna inaktivacija gena koji kodiraju za enzime Dnmt3a i Dnmt3b ima letalne posljedice u miša (39). Osim metilacije CpG mjesta *de novo*, enzimi DNMT3 neophodni su za održavanje metilacije CpH mjesta, što je pokazano na modelu ljudskih embrionalnih matičnih stanica (46). Jednostavni model uspostave i održavanja metilacije DNA nedavno je modificiran zbog novih saznanja o preklapajućim funkcijama DNA metiltransferaza *de novo* i DNA metiltransferaze održavateljskog tipa (47). Naime, dokazano je da su funkcionalni enzimi Dnmt3a i/ili -3b potrebni za održavanje metilacije ponavljajućih sekvenci DNA u genomu miša (48). S druge strane, metiltransferaza održavateljskog tipa Dnmt1 doprinosi uspostavi metilacije *de novo* (49). Sva tri enzima eksprimirana su u većini normalnih somatskih tkiva, no u znatno manjoj količini nego u embrionalnom tkivu (50).

Protein nalik DNA metiltransferazi 3, DNMT3L (od engl. *DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like*) homologan je enzimima DNMT3A i DNMT3B, no ne posjeduje katalitičku aktivnost zbog mutacije ključnih aminokiselinskih ostataka. Ipak, DNMT3L sudjeluje u uspostavljanju metilacije DNA kroz izravnu interakciju s enzimima DNMT3A i -3B. Eksperimentima *in vitro* dokazano je da se C-terminalna domena proteina DNMT3L veže na katalitičku domenu aktivnih enzima DNMT3 te povećava njihovu metiltransferaznu aktivnost 15-ak puta (51). Osim toga, protein DNMT3L interagira s deacetilazom histona HDAC1 preko domene ADD (ATRX–Dnmt3–Dnmt3L), poznate i pod nazivom PHD (od engl. *plant homeodomain*), te na taj način posreduje u represiji transkripcije (52).

Uz tri opisane aktivne DNA metiltransferaze u ljudi i miša nalazimo još jednog člana obitelji proteina DNMT čija uloga u metilaciji DNA još uvijek nije razjašnjena. Protein DNMT2 posjeduje metiltransferaznu katalitičku aktivnost te katalizira metilaciju citozinskih ostataka u molekuli tRNA, no nije utvrđena znatna aktivnost na supstratu DNA (53,54).

2.3 Uloga metilacije DNA u regulaciji ekspresije gena

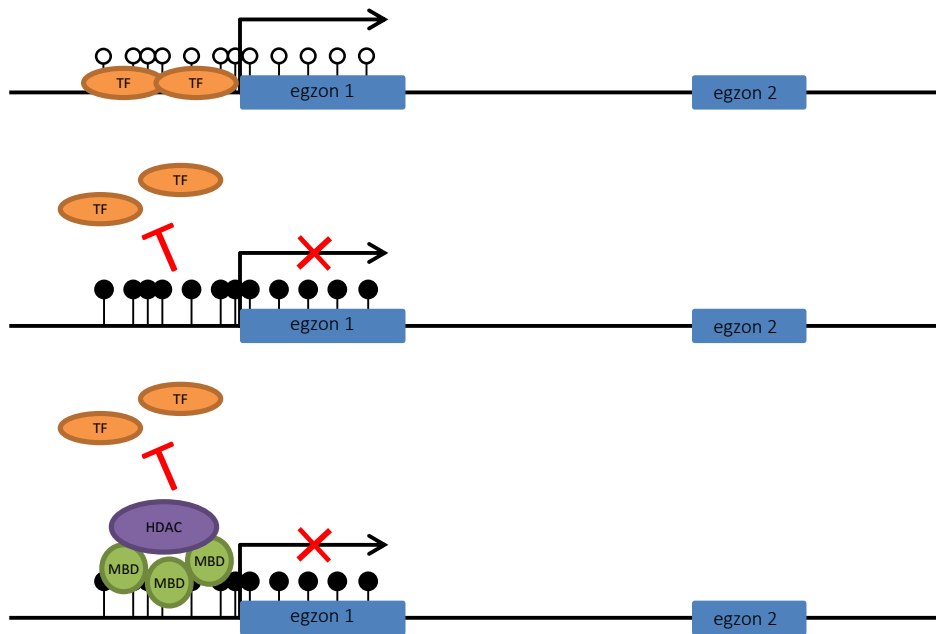
Regulatorna uloga metilacije DNA ovisi o genomskom kontekstu modificiranog CpG dinukleotida. Tako je metilacija CpG otoka u promotorima gena, odnosno u blizini mjesta početka transkripcije (engl. *transcription start site*, TSS), najčešće povezana s represijom aktivnosti gena. Pretpostavlja se da 5mC djeluje represivno mijenjajući interakciju između molekule DNA i transkripcijskih faktora. Postojanje metilne skupine na citozinu izravno onemogućava vezanje transkripcijskog faktora osjetljivog na metilaciju na područje

promotora (55). Neizravna represija može biti posredovana proteinima s domenom koja prepoznaje i veže 5mC (engl. *methyl-CpG-binding domain*, MBD). Nakon vezanja na metiliranu DNA, članovi obitelji proteina MBD regrutiraju deacetilaze i metilaze histona te komplekse za remodeliranje kromatina, što rezultira stvaranjem kompaktnog, inaktivnog kromatina te utišavanjem gena (Slika 5A) (56,57). Međutim, otkriveno je da neki aktivatori transkripcije preferencijalno vežu metilirane motive DNA, primjerice heterodimeri c-Jun/c-Fos iz obitelji transaktivatora AP-1 (od engl. *activator protein 1*), koji reguliraju proliferaciju, apoptozu, transformaciju i tumorigenezu (58). Sustavna analiza otkrila je veći broj transkripcijskih faktora u čovjeka čije djelovanje ovisi o vezanju na metiliranu sekvencu DNA (59).

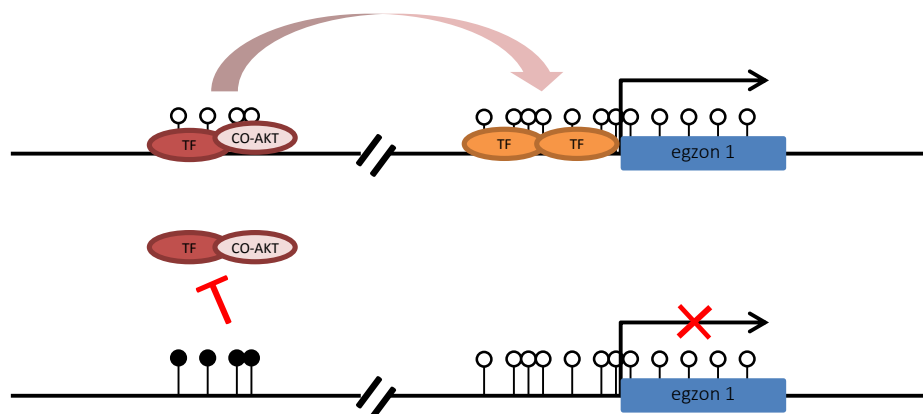
Pojačivači su regulatorni elementi koji su najčešće dosta udaljeni od gena čiju ekspresiju kontroliraju. Njihova aktivnost također može biti regulirana metilacijom citozina (60,61). Metilacija pojačivača bitno je promijenjena u tumorski transformiranim stanicama i blisko povezana s ekspresijom gena, čak i više nego metilacija promotora. Hipometilirani pojačivači povezani su s aktivacijom onkogeni, a hipermetilirani s represijom tumor-supresor gena. Metilacija pojačivača uglavnom je stupnjevita među različitim tipovima stanica, odnosno pojačivači su rijetko u potpuno metiliranom ili nemetiliranom stanju, što može biti mehanizam suptilnije tkivno-specifične regulacije ekspresije. Prema jednom predloženom modelu, metilacija pojačivača može biti glavna odrednica razine transkripcije gena dok god je promotor u nemetiliranom, permisivnom stanju (Slika 5B) (62).

Nasuprot promotorskih regija, intragenske sekvence (engl. *gene body*) često su u metiliranom stanju. Funkcija intragenske metilacije DNA još uvijek nije jasno definirana. Ipak, sve više istraživanja upućuje na postojanje pozitivne korelacije između intragenske metilacije i transkripcijske aktivnosti (63–66). Različita funkcija metilacije DNA u promotorskim ili intragenskim regijama nastojala se objasniti represijom transkripcije s alternativnih intragenskih promotora, što pozitivno djeluje na elongaciju transkripcije započete na uzvodnom, glavnom promotoru (Slika 5C) (67). Primarnu ulogu u uspostavi intragenske metilacije kod aktivno transkribiranih gena ima enzim DNMT3B, čije vezanje ovisi o prisustvu trimetilacije lizina na poziciji 36 histona 3, H3K36me3 (68).

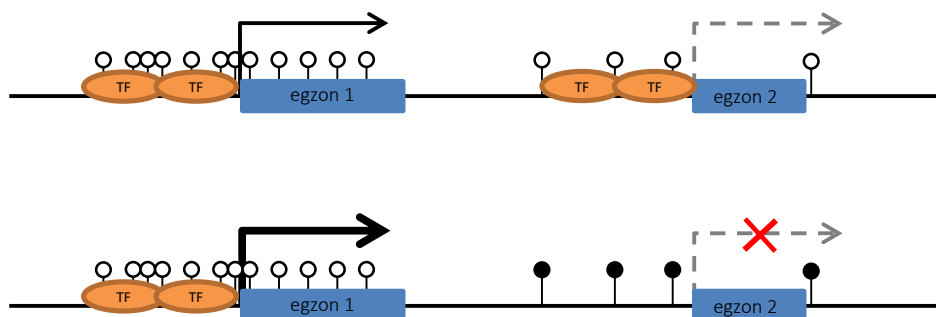
A Metilacija promotora (CpG otoka)



B Metilacija pojačivača (distalnih regulatornih elemenata)



C Metilacija intragenskih područja



Slika 5. Opis slike na sljedećoj stranici.

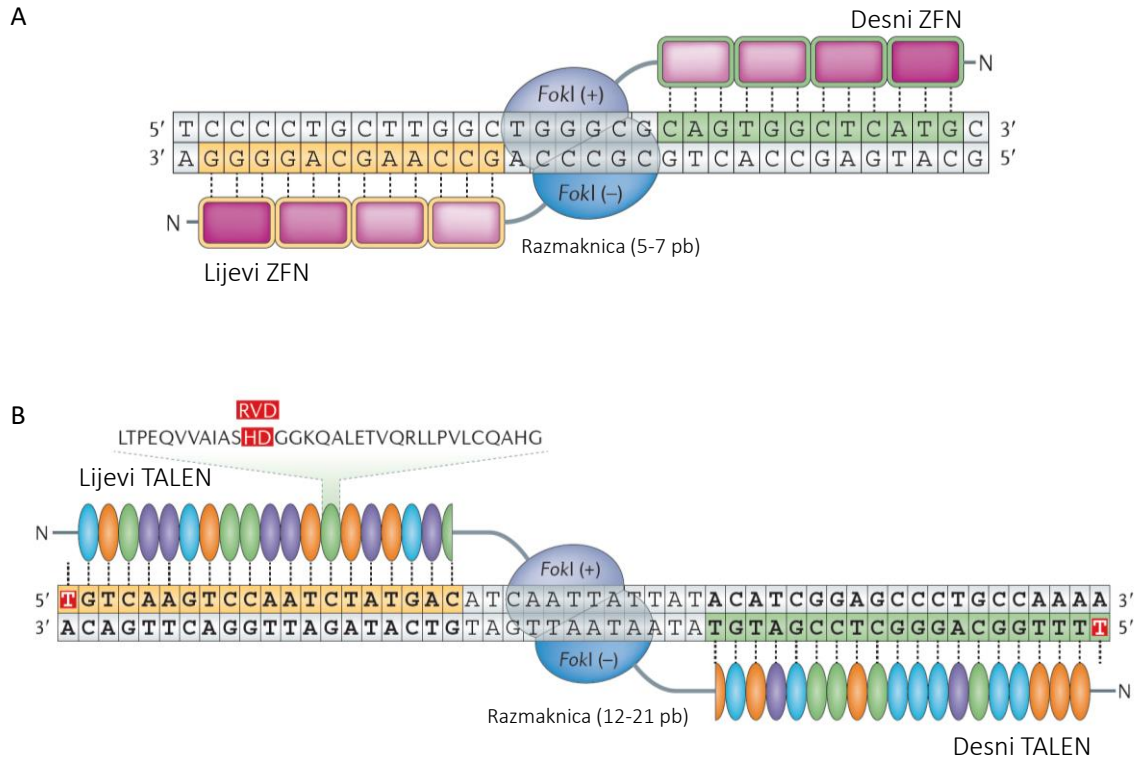
Slika 5. Uloge metilacije DNA u regulaciji ekspresije gena. **(A)** Nemetilirano stanje CpG otoka u promotoru gena dozvoljava vezanje transkripcijskih faktora (TF) i inicijaciju transkripcije. Metilacija CpG mjesta rezultira utišavanjem gena, bilo neposredno blokiranjem vezanja transkripcijskih faktora osjetljivih na metilaciju, ili posredno pomoću proteina koji vežu 5mC (MBD) i regrutiraju deacetilaze histona (HDAC) i ostale ko-represore transkripcije. **(B)** Na nemetilirane distalne regulatorne elemente mogu se vezati transkripcijski faktori i ko-aktivatori transkripcije (CO-AKT), koji dolaze u neposredni kontakt s promotorskom regijom i potiču transkripciju gena. Metilacija pojačivača može onemogućiti stvaranje takvog aktivacijskog kompleksa. **(C)** Metilacija CpG mjesta unutar tijela gena (engl. *gene body*) pospješuje transkripciju s uzvodnog, glavnog promotora jer utišava alternativne intragenske promotore.

2.4 Alati za ciljanu modifikaciju genoma

Molekularni alati koji omogućavaju ciljane promjene u genomu imaju nezamjenjivu ulogu u istraživanju bioloških procesa. Danas je moguće relativno jednostavno ukloniti, precizno promijeniti, aktivirati ili utišati elemente genoma za koje se sumnja da imaju učinak na fenotip, bilo da se radi o genima ili nekodirajućim elementima. Metode za ciljanu modifikaciju endogenih gena i ugradnju transgena na ciljano mjesto u genomu (engl. *gene targeting*) do nedavno su se temeljile na homolognoj rekombinaciji. Zbog njihove slabe učinkovitosti, rutinska primjena bila je ograničena samo na pojedine eksperimentalne sustave i modelne organizme kao što su kvasci i miševi (69). Bitan korak u daljnjem razvoju tehnologije bilo je otkriće da se učinkovitost homologne rekombinacije može povećati stvaranjem dvostrukog loma u molekuli DNA (engl. *double-stranded break*, DSB) (70). Naime, prisustvo dvostrukog loma stimulira endogenu staničnu mašineriju za popravak DNA, bilo homolognom rekombinacijom ili nehomolognim sparivanjem krajeva (engl. *nonhomologous end-joining*, NHEJ). Drugi proces je najčešće mutagen te se koristi u svrhu potpune inaktivacije gena (engl. *gene knockout*). Primjenom programiranih nukleaza koje stvaraju lom na točno određenom mjestu u genomu moguće je ciljano promijeniti gotovo bilo koju sekvencu od interesa (engl. *gene editing*) (71).

Najprije su razvijene i primjenjivane programirane nukleaze s domenom cinkovih prstiju (engl. *zinc-finger nucleases*, ZFNs). Restriksijska domena endonukleaze FokI, koja nespecifično cijepa molekulu DNA, fuzionirana je na domenu s motivima cinkovih prstiju (Cys_2His_2), koju je moguće mutagenezom modificirati tako da specifično prepozna i veže određenu nukleotidnu sekvencu. Svaki motiv cinkovih prstiju prepoznaje niz od 3 pb, a kombinacijom više motiva u nizu dobiva se podjedinica koja veže sekvencu DNA duljine 9-18 pb. Budući da nukleazna domena FokI mora dimerizirati da bi bila aktivna, potrebna su dva različita monomera ZFN, koja se vežu jedan blizu drugoga, s kratkom razmaknicom od nekoliko parova baza između mjesta vezanja (Slika 6A) (72). Sličnu strukturu imaju kimerne nukleaze s modularnom domenom vezanja na DNA, poznate pod nazivom TALEN (od engl. *transcription activator-like effector nucleases*). Domena TALE sastavljena je od niza ponavljanja duljine 33-35 aminokiselina, gdje svako ponavljanje prepoznaje jednu bazu DNA. Nukleotidna specifičnost određena je dvjema aminokiselinama unutar svakog ponavljanja, koje se nazivaju RVD (od engl. *repeat variable diresidues*) (Slika 6B). Takva specifičnost „jedan-na-jedan“ predstavlja bitnu prednost u odnosu na domene s motivima cinkovih prstiju.

Domenu TALE može se iskoristiti za navođenje nukleazne aktivnosti na gotovo bilo koju sekvencu DNA, što je bitna prednost u odnosu na ostale programirane nukleaze (73).



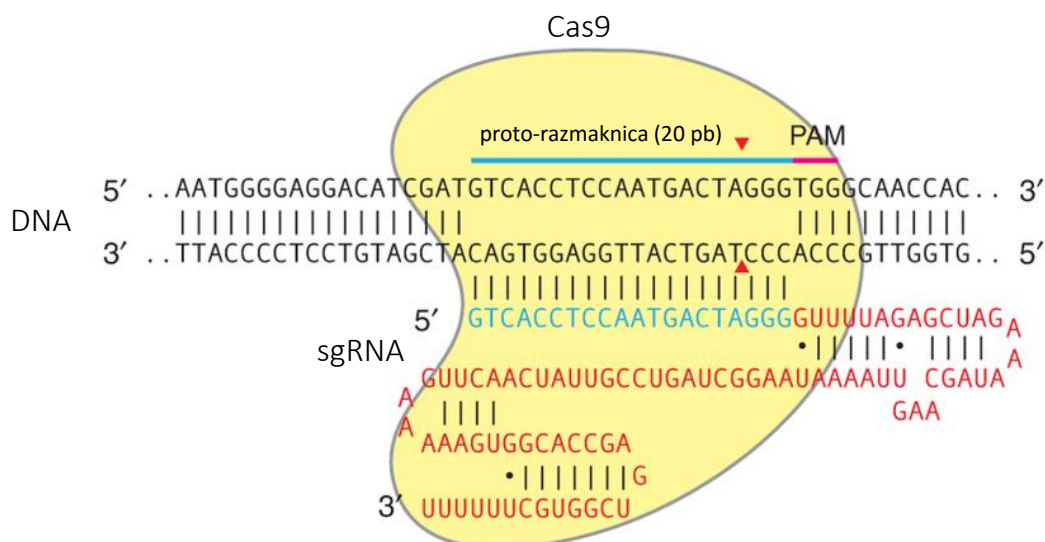
Slika 6. Shematski prikaz programiranih nukleaza s proteinskim domenama vezanja DNA. Nukleaze djeluju kao dimeri koji se vežu na suprotne lance DNA. Svaki monomer sastoji se od programirane N-terminalne domene vezanja DNA i C-terminalne nukleazne domene FokI. Nukleazne domene FokI dimeriziraju i stvaraju dvostruki lom u molekuli DNA između mjesta vezanja dva susjedna monomera, na području tzv. razmaknice. **(A)** Nukleaze s domenom cinkovih prstiju (ZFN) vežu molekulu DNA pomoću niza motiva cinkovih prstiju, od kojih svaki specifično prepoznaje sekvencu dužine 3 pb. **(B)** Kod nukleaza s domenom TALE (TALEN) u polipeptidni lanac složena su ponavljanja od 33-35 aminokiselina (prikazano uvećano za jedno ponavljanje). Svako ponavljanje specifično prepoznaje jednu bazu DNA, ovisno o dvije aminokiseline na pozicijama 12 i 13, koje se nazivaju RVD (istaknuto crvenom bojom). Preuzeto i prilagođeno iz Kim i Kim (71).

Otkriće programiranih nukleaza navođenih pomoću molekula RNA (engl. *RNA-guided engineered nucleases, RGENs*), umjesto proteinskih domena, dodatno je ubrzalo razvoj tehnologije za ciljanu modifikaciju genoma. Iako sva tri tipa nukleaza (ZFN, TALEN, RGEN)

djeluju na sličan način, odnosno stvaraju lom u molekuli DNA i induciraju popravak DNA na određenom mjestu u genomu, svaki od njih ima svoje prednosti i mane. Prilikom odabira alata za ciljanu modifikaciju genoma uzima se u obzir njegova specifičnosti, učinkovitosti, jednostavnost primjene, veličina, citotoksičnost, imunogenost itd. (71).

2.4.1 Sustav CRISPR/Cas9

Otkriće mehanizma djelovanja adaptivnog imunološkog sustava koji bakterijama služi za obranu od strane DNA omogućilo je razvoj novih molekularnih alata za ciljanu modifikaciju genoma. DNA endonukleaza ovisna o RNA Cas9 (od engl. *CRISPR-associated protein 9*), dio sustava CRISPR tipa II, navođena je pomoću pridružene molekule RNA, koja hibidizira s 20 pb dugom komplementarnom sekvencom DNA (proto-razmaknicom), što rezultira nastankom dvolančanog loma na tom mjestu (Slika 7) (12). Sustav otkriven u bakterijama sastoji se od dvije neophodne RNA-komponente: zrele CRISPR-RNA (crRNA) koja je odgovorna za prepoznavanje komplementarne molekule DNA te nevarijabilne komponente nužne za aktivnost nukleaze Cas9, nazvane RNA koja djeluje *in trans* (engl. *trans-activating crRNA*, tracrRNA). Funkciju tih dviju komponentni moguće je objediniti u jedinstvenoj kimernoj molekuli RNA (sgRNA, od engl. *single guide RNA*), što bitno pojednostavljuje eksperimentalnu primjenu (12). Protein Cas9 i njegovi ortolozi imaju ulogu u prepoznavanju ciljane sekvence jer vežu kratak niz koji slijedi odmah nizvodno od proto-razmaknice, tzv. *protospacer adjacent motif* (PAM). Najčešće korišteni ortolog Cas9, porijeklom iz bakterije *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), prepoznaje sekvencu PAM sastava 5'-NGG-3', gdje N predstavlja bilo koju od četiri dušične baze (A, C, G ili T). Sekvenca 5'-NGG-3' pojavljuje se u genomu čovjeka u prosjeku jednom u svakih 8 pb, što predstavlja jedino ograničenje u izboru ciljane sekvence. Protein Cas9 najprije prepoznaje sekvencu PAM, a zatim dolazi do komplementarnog sparivanja između molekula crRNA i DNA (74). Sustav CRISPR/Cas9 uspješno je primijenjen za ciljanu modifikaciju genoma u različitim organizmima i tipovima stanica (13,75).



Slika 7. Shematski prikaz sustava CRISPR/Cas9. Endonukleaza Cas9 iz bakterije *S. pyogenes*, SpCas9 (žuto) navođena je na ciljenu sekvencu DNA pomoću pridružene kimerne molekule sgRNA. Nevarijabilna komponenta na 3' kraju molekule sgRNA (crveni nukleotidi) nužna je za aktivnost nukleaze Cas9, dok je varijabilni 5' kraj molekule sgRNA (plavi nukleotidi) određuje mjesto vezanja DNA. Varijabilnih 20 nt komplementarno je proto-razmaknici koja se nalazi odmah uzvodno od sekvence PAM (5'-NGG-3'). Nakon vezanja na ciljenu sekvencu nukleaza Cas9 stvara dvolančani lom u molekuli DNA 3 pb uzvodno od sekvence PAM (crveni trokutići). Preuzeto i prilagođeno iz (76).

Različite sekvence sgRNA mogu se bitno razlikovati u učinkovitosti djelovanja na ciljanoj lokusu (engl. *on-target activity*) te učestalosti nespecifičnog djelovanja na lokuse koji nisu potpuno komplementarni (engl. *off-target activity*). Naime, nukleaza Cas9 može katalizirati stvaranje dvostrukog loma u molekuli DNA i u slučaju nepotpunog sparivanja između molekule sgRNA i genomske DNA, naročito ako su nespareni nukleotidi udaljeni od sekvence PAM, tj. ako se nalaze na 5' kraju proto-razmaknice (12,77). Na temelju analize *in silico* i eksperimentalne provjere brojnih sekvenci sgRNA definirana su pravila za odabir optimalnih sekvenci sgRNA, kako bi se postiglo što preciznije i učinkovitije djelovanje na ciljane lokuse (78).

Eventualni nedostaci originalnog sustava CRISPR/Cas9 nastoje se izbjeći dizajnom proteina Cas9 s poboljšanim karakteristikama. Proteinskim inženjeringom stvorene su varijante proteina SpCas9 kod kojih je smanjena učestalost nespecifičnog djelovanja, bez smanjenja aktivnosti na ciljanoj lokusu (79,80). Na sličan način dobivene su varijante SpCas9 koje prepoznaju drugačije sekvence PAM, čime je povećan broj mjesta u genomu

koje je moguće ciljati (81). Osim toga, identificirani su manji ortolozi proteina SpCas9, s drugačijim sekvencama PAM, porijeklom iz bakterija *Streptococcus thermophilus* (St1Cas9), *Staphylococcus aureus* (SaCas9) (81) te *Neisseria meningitides* (NmCas9) (82), kao i alternativni tipovi sustava CRISPR, kao što su Cpf1 (83) i C2c (84). Sustav CRISPR/Cpf1 jednostavniji je od nukleaza Cas9 jer mu za aktivnost nije potrebna molekula tracrRNA, već koristi samo jednu molekulu RNA (engl. *guide RNA*) duljine ~ 42 nt. Osim toga, protein Cpf1 manji je od proteina SpCas9 (83). Nedavno je otkrivena nukleaza koja može specifično i učinkovito modificirati genom ljudskih stanica u kulturi, a za navođenje koristi molekulu DNA umjesto RNA. Radi se o proteinu iz obitelji Argonaute otkrivenom u bakteriji *Natronobacterium gregoryi*. Endonukleaza NgAgo navođena je na ciljani lokus pomoću jednolančane molekule DNA duljine oko 24 nukleotida te ne zahtijeva postojanje sekvence PAM u blizini veznog mjesta (85).

Katalitički inaktivan enzim Cas9 (dCas9, od engl. *deactivated Cas9*), kod kojeg su mutirana dva ključna aktivna mjesta (D10A i H840A), zadržava sposobnost vezanja komplementarne molekule DNA ovisnog o RNA, što omogućava primjenu u funkcionalnim studijama koje ne podrazumijevaju trajnu promjenu genetičke sekvence. Modificirani sustav CRISPR/dCas9 može vezati ciljanu sekvencu DNA i time reverzibilno blokirati inicijaciju ili elongaciju transkripcije, što se naziva CRISPR-interferencijom (CRISPRi) (86). Fuzijom dodatne efektorske domene na protein dCas9 može se postići aktivacija (CRISPRa) ili represija jednog ili skupine gena (87–89), promijeniti određene epigenetičke oznake (16,17,90) ili vizualizirati i pratiti dinamiku specifičnih genomskih lokusa u živim stanicama (91). Osim toga, molekulu sgRNA moguće je iskoristiti za regrutaciju efektorskih domena dodatkom veznih mjesta za proteine koji vežu RNA na 3' kraj. Ko-ekspresija efektorskih domena fuzioniranih s različitim, specifičnim proteinima koji vežu RNA omogućava istovremenu aktivaciju i represiju više različitih gena (92).

2.5 Prenamjena alata za ciljanu modifikaciju genoma u svrhu epigenetičkog inženjeringa

U sklopu velikih projekata kao što su ENCODE (93) i Roadmap Epigenomics Project (94) provedeno je precizno mapiranje brojnih epigenetičkih oznaka, uz istovremenu kvantifikaciju transkripcijske aktivnosti na razini cijelog genoma. Na temelju tih i drugih podataka nastojalo se otkriti kako i koje epigenetičke oznake reguliraju aktivnost gena u raznim tipovima stanica i tkiva. Utvrđene korelacije imale su važan doprinos razumijevanju

epigenetičke regulacije, no nisu mogle pružiti jasan uvid u uzročno-posljedične veze između epigenetičkih modifikacija i transkripcijske aktivnosti. Eksperimentalna manipulacija epigenetičkih oznaka dugo je bila ograničena na farmakološku ili genetičku inhibiciju enzima koji modificiraju kromatin, kao što su deacetilaze histona ili DNA metiltransferaze. Međutim, takav pristup dovodi do nespecifičnih, globalnih promjena epigenoma i/ili transkriptoma. Epigenetički inženjering (engl. *epigenetic engineering* ili *epigenetic editing*), proces koji podrazumijeva ciljanu promjenu epigenetičkih oznaka na specifičnim genomskim lokusima, omogućen je ubrzanom razvojem tehnologija za ciljanu modifikaciju genoma (9).

Promjena epigenetičkih oznaka unutar ciljanog lokusa moguća je kombiniranjem domene koja specifično prepoznaje i veže određenu sekvencu DNA i enzima koji katalizira dodavanje ili uklanjanje epigenetičke modifikacije (8). Ciljana metilacija DNA prvi put je postignuta pomoću katalitičkih domena mišjih DNA metiltransferaza Dnmt3a i Dnmt3b fuzioniranih na domenu vezanja DNA transkripcijskog faktora GAL4 i dizajniranog proteina ZF. Uspješno su metilirane ciljane promotorske regije nekoliko gena, što je rezultiralo utišavanjem ekspresije te smanjenjem produkcije virusa HSV-1 (engl. *herpes simplex virus type 1*) u stanicama u kulturi (95). Ciljana metilacija promotora gena *SOX2*, *Maspin* (96) i *EpCAM* (97) pomoću katalitičke domene ljudskog enzima DNMT3A fuzionirane na proteine ZF rezultirala je utišavanjem ekspresije i promjenom fenotipa tumorskih stanica. Promjena ekspresije gena postignuta je i s fuzijskim proteinima kod kojih je domena ZF ili TALE vezana s katalitičkim domenama drugih enzima koji modificiraju kromatin, kao što su demetilaza DNA TET1 (98), histonska metiltransferaza G9a (99), demetilaza histona LSD1 (100) i deacetilaze histona (101).

Nedavno je sustav CRISPR/Cas9 prenamijenjen za ciljanu acetilaciju histona unutar regije od interesa. Na dCas9 vezana je katalitička domena acetiltransferaze p300, čime je dobiven fuzijski protein koji katalizira acetilaciju lizina na poziciji 27 histona H3, H3K27ac. Ciljani promotori i pojačivači obogaćeni su oznakom H3K27ac, što je dovelo do specifične aktivacije samo onih gena koji su pod utjecajem tih regulatornih regija (16). S obzirom na prednosti sustava CRISPR/Cas9 u odnosu na proteine ZF i TALE, postoji veliki potencijal za njegovu primjenu u epigenetičkom inženjeringu. Naime, ciljana genomski sekvencu definirana je kratkom molekulom RNA, a ne polipeptidom kojeg je potrebno uvijek iznova dizajnirati i konstruirati. Zbog toga je moguće relativno jednostavno, brzo i učinkovito usmjeriti djelovanje efektorske domene na veći broj genomskih lokusa, bilo zasebno (u

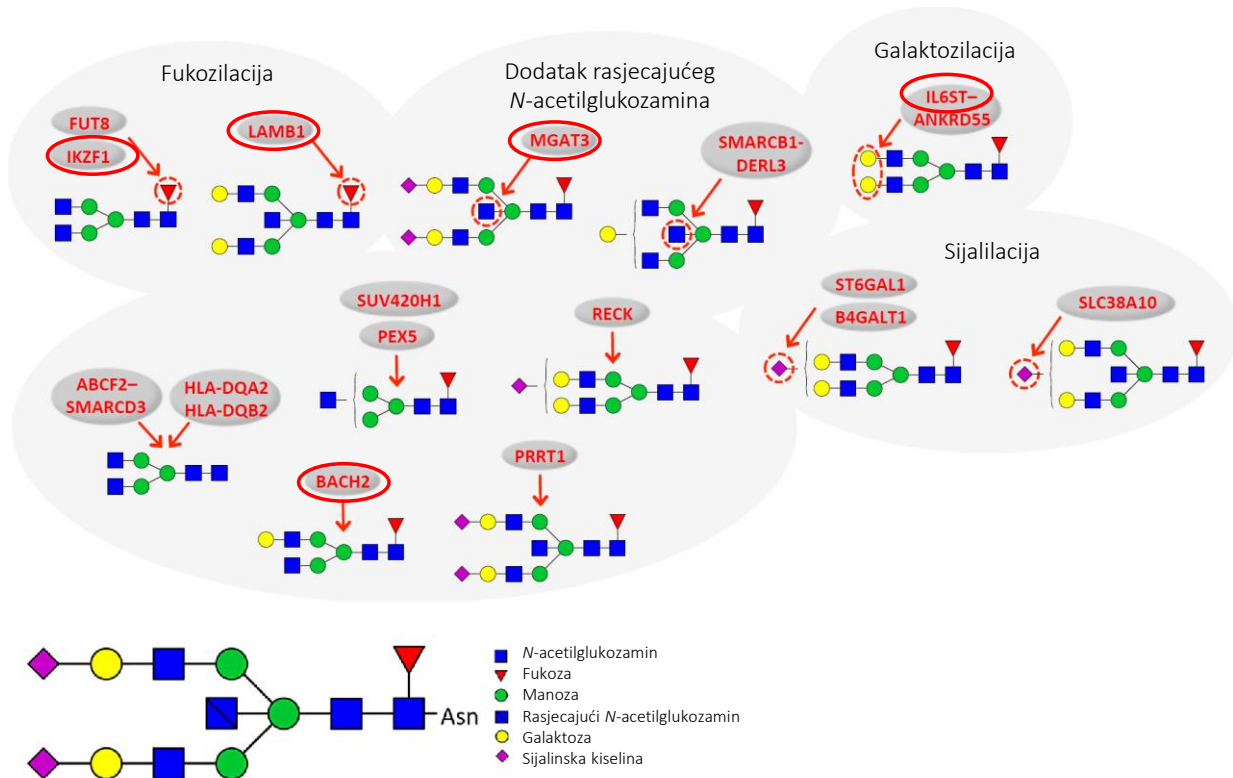
različitim stanicama) ili istovremeno u jednoj stanici. Takav pristup može bitno olakšati daljnje otkriće i detaljnu analizu regulatornih elemenata (14).

2.6 Epigenetička regulacija glikozilacije imunoglobulina G

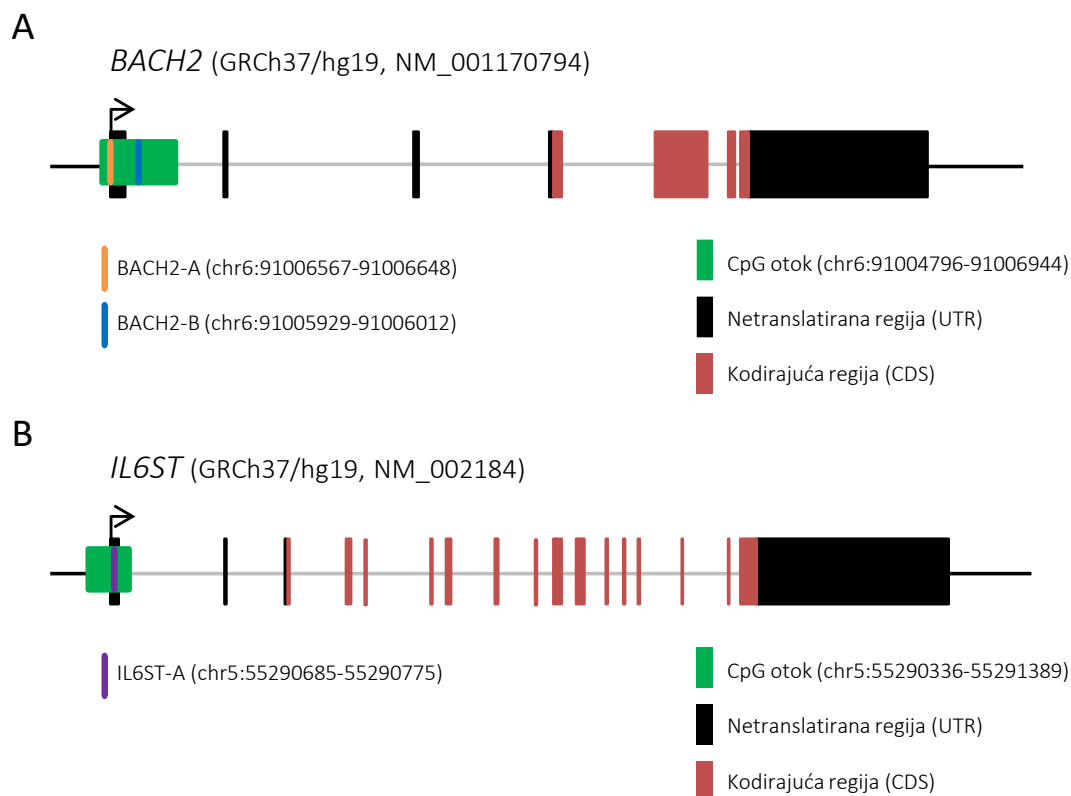
Posttranslacijske modifikacije proteina bitno utječu na njihovu strukturu i funkciju (102). Mnogi eukariotski proteini modificirani su vezanjem oligosaharida na atom dušika asparaginskog ostatka kroz proces koji se naziva *N*-glikozilacijom. Smatra se da u regulaciji tog procesa sudjeluju epigenetički mehanizmi, koji stanici omogućavaju prilagodbu na signale iz okoliša (103). Jedan od dobro istraženih primjera učinka glikozilacije na funkciju proteina je *N*-glikozilacija imunoglobulina G (IgG) (104). Vrlo male promjene u strukturi glikana vezanog na regiju Fc molekule IgG-a mijenjaju funkciju ovog antitijela. Primjerice, dodatkom jedne galaktoze i/ili jedne sijalinske kiseline na N-acetilglukozamin antitijelo poprima protuupalnu funkciju, dok uklanjanjem galaktoze i sijalinske kiseline s N-acetilglukozamina antitijelo poprima upalnu funkciju. Također je poznata uloga dodatka fukoze na srž glikanske strukture u staničnoj citotoksičnosti ovisnoj o antitijelima (engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) (105). Promjene glikozilacije IgG-a uočene su u mnogim upalim i autoimunim bolestima (106,107).

Cjelogenomskom studijom povezanosti (GWAS, od engl. *genome-wide association study*) identificirani su geni povezani s vrstom glikanskih struktura vezanih na regiju Fc ljudskog imunoglobulina G (108). Studija provedena na 2500 ljudi otkrila je 16 lokusa kandidata uključenih u glikozilaciju IgG-a, a pet od njih (Slika 8) pokazuje pleiotropiju s upalnim bolestima crijeva (IBD, od engl. *inflammatory bowel disease*) (109). Kako se u istraživačkoj grupi koje sam dio bavimo otkrivanjem uloge epigenetičke regulacije glikozilacije IgG-a u ovoj bolesti, za ciljanu metilaciju CpG mjesta pomoću konstrukta dCas9-DNMT3A odabrala sam promotore gena *BACH2* (od engl. *BTB and CNC homolog 2*) koji kodira za transkripcijski faktor ključan za diferencijaciju B limfocita u plazma-stanice (110), te gena *IL6ST* (od engl. *interleukin 6 signal transducer*), koji kodira za ko-receptorsku molekulu uključenu u prijenos signala citokina iz obitelji interleukina 6 (IL-6). Promotori ovih gena sadrže CpG otoke, stoga je moguće da je njihova ekspresija regulirana metilacijom DNA. Iako dosadašnjim istraživanjima nije utvrđena uloga metilacije promotora gena *BACH2* i *IL6ST* u regulaciji njihove transkripcijske aktivnosti, odabrala sam nekoliko fragmenata unutar njihovih promotora (Slika 9; testovi za analizu metilacije) za ciljanu metilaciju. Dosadašnja istraživanja provedena u grupi (neobjavljeni rezultati) otkrila su diferencijalnu

metilaciju CpG mjesta unutar promotora gena *BACH2* između pacijenata s upalnim bolestima crijeva i zdravih ljudi. Genomski fragmenti pokriveni testovima za analizu metilacije nalaze se u blizini mjesta početka transkripcije (TSS) (Slika 9). CpG mjesta na ovoj lokaciji potencijalno bi mogla biti uključena u regulaciju transkripcije ovih gena.



Slika 8. Promjene N-glikana vezanih na regiju Fc ljudskog imunoglobulina G (IgG) i 16 povezanih lokusa identificiranih cjelogenomskom studijom povezanosti. Pet gena koji pokazuju pleiotropiju s upalnim bolestima crijeva zaokruženo je crvenim. Preuzeto i prilagođeno iz Lauc i sur. (2013.).



Slika 9. Shematski prikaz strukture gena *BACH2* (A) i *IL6ST* (B) te lokacija fragmenata ciljanih konstruktom dCas9-DNMT3A. Oba gena na svom 5' kraju sadrže CpG otok (zeleni pravokutnik), unutar kojeg su naznačeni fragmenti pokriveni testovima za analizu metilacije DNA bisulfitnim pirosekvenciranjem (narančasta, plava i ljubičasta linija). Unutar gena naznačeni su introni (siva vodoravna linija) i egzoni (pravokutnici ili okomite linije). Strelica označava mjesto početka transkripcije (TSS).

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Konstrukcija plazmidnih vektora za ekspresiju fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A

Plazmid pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462; Addgene br. 48141) (76) iskorišten je kao ishodišni vektor za konstrukciju modificiranog sustava CRISPR/Cas9. Plazmid PX462 služi kao okosnica za kloniranje sekvence *single guide* RNA (sgRNA) te istovremeno kodira za nukleazu Cas9n (supstitucija D10A) i biljeg za rezistenciju na puromicin *PuroR*, koji se prevode s jednog bicistranskog transkripta. Uvođenjem mutacije u drugo aktivno mjesto enzima Cas9, unutar domene HNH, u potpunosti je ukinuta njegova nukleazna aktivnost. Supstitucija H840A uvedena je ciljanom mutagenезom pomoću komercijalnog seta kemikalija QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) i para mutagenih oligonukleotida prema uputama proizvođača. Mutageni oligonukleotidi dizajnirani su pomoću programa PrimerX (<http://www.bioinformatics.org/primerx/>). Plazmidna DNA izolirana je iz transformanata pomoću komercijalnog seta kemikalija QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Uspješnost mutagenезe provjerena je sekvenciranjem klonova plazmida nazvanog pdCas9.

Mutirani vektor pdCas9 pocijepan je restrikcijskim enzimima EcoRI (20 U; Fermentas) i FseI (4 U; NEB) u reakciji dvostruke digestije. Dva mikrograma plazmidne DNA inkubirano je 16 sati na 37°C u puferu NEBuffer 1 (NEB), nakon čega su enzimi inaktivirani 20 min na 65°C. Odgovarajući vektorski fragment (8486 pb) izrezan je iz agaroznog gela i pročišćen pomoću komercijalnog seta kemikalija GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich) te koncentriran pomoću DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research). Dizajnirana su dva para komplementarnih oligonukleotida ukupne duljine oko 70 pb, koji sparivanjem stvaraju ljepljive krajeve kompatibilne krajevima vektora. Oligonukleotidi kodiraju za kratak peptidni linker Gly₄Ser te sadrže jedinstvena restrikcijska mjesta za enzime BamHI i FseI. Komplementarni oligonukleotidi (10 μM svaki) spareni su i fosforilirani u puferu 1x Quick Ligation Buffer (NEB) s dodatkom 5 U enzima T4 Polynucleotide Kinase (PNK; NEB). 5' fosforilacija se odvijala na 37°C u trajanju od 30 min, zatim su reakcije zagrijane 5 min na 95°C i postupno ohlađene na 25°C stopom od 5°C/min. Za ligaciju je korišten enzim T4 DNA Ligase (350 U; Takara) u konačnom volumenu 10 μl, s dodatkom pocijepanog vektora (50 ng) i sparenih oligonukleotida (oba 5 nM). Ligacija se odvijala na 16°C u trajanju od 30 min, nakon čega je ligaza inaktivirana zagrijavanjem na 65°C u trajanju od 10 min. Izolirani

plazmidni klonovi najprije su testirani na prisustvo inserta restrikcijском analizom pomoću endonukleaza XhoI i BamHI-HF (NEB), koje cijepaju unutar umetnutog fragmenta DNA. Ispravnost sekvence rekombinantnog vektora pdCas9-GS dodatno je provjerena sekvenciranjem.

Plazmidni vektor pcDNA3/Myc-DNMT3A (Addgene br. 3552) (111) korišten je kao izvor sekvence katalitičke domene ljudskog gena *DNMT3A*. Prije umnažanja katalitičke domene bilo je potrebno ukloniti suvišno restrikcijско mjesto za enzim BbsI/BpiI, koje se nalazi unutar željene sekvence, a interferira s kasnijim procesom kloniranja. Ciljana mutacija uvedena je pomoću para mutagenih oligonukleotida i komercijalnog seta kemikalija QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies), kao što je opisano ranije, bez mijenjanja primarne proteinske sekvence. Uspješnost mutageneze provjerena je restrikcijском analizom izoliranih klonova, a pozitivni klonovi su dodatno provjereni sekvenciranjem.

Katalitički inaktivna verzija enzima DNMT3A stvorena je mutacijom glutamata na poziciji 756 (E756A), unutar konzerviranog aktivnog motiva ENV (112). Ciljana mutageneza provedena je kao što je opisano ranije. Uspješnost mutageneze provjerena je sekvenciranjem klonova plazmida nazvanog pcDNA3/Myc-DNMT3A (ANV).

Metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) s plazmida su umnoženi i aktivni i inaktivni oblik C-terminalne katalitičke domene DNMT3A (aminokiseline P602-V912). Korištena je polimeraza visoke preciznosti Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies) i par početnica koje sadrže restrikcijско mjesto za enzime BamHI (*Forward* početnica) ili FseI (*Reverse* početnica). PCR se odvijao pri sljedećim uvjetima: 2 min početne denaturacije na 95°C; 30 ciklusa od 20 s denaturacije na 95°C, 20 s prijanjanja početnica na 50°C, 40 s elongacije na 72°C; 10 min završne elongacije na 72°C. Jedinstveni PCR-produkti pročišćeni su iz reakcijske smjese pomoću komercijalnog seta kemikalija High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche). PCR-produkti i vektor pdCas9-GS podvrgnuti su dvostrukoj digestiji restrikcijским enzimima FseI i BamHI-HF (NEB). Nakon digestije, fragmenti su pročišćeni pomoću komercijalnog seta kemikalija High Pure PCR Cleanup Micro Kit. Sekvenca katalitičke domene enzima DNMT3A umetnuta je C-terminalno od peptidnog linkera Gly₄Ser pomoću komercijalnog seta kemikalija Quick Ligation Kit (NEB), na način da ne dođe do pomaka u okviru čitanja. Ligacija je napravljena prema uputama proizvođača, uz molarni omjer inserta i vektora 3:1. Transformanti su provjereni na prisutnost inserta

upotrebom PCR metode izravno na bakterijskim kolonijama (engl. *colony PCR*). Za umnažanje ciljanog fragmenta korišten je JumpStart REDTaq ReadyMix (Sigma) te početnice GS-linker_seq i DNMT3A_in-Rev (Tablica 1). PCR se odvijao pri sljedećim uvjetima: 2.5 min početne denaturacije na 95°C; 35 ciklusa od 30 s denaturacije na 94°C, 30 s prijanjanja početnica na 55°C, 1.5 min elongacije na 72°C; 5 min završne elongacije na 72°C. Plazmidi su izolirani iz pozitivnih klonova i provjereni sekvenciranjem.

Radi mogućnosti selekcije i/ili detekcije uspješno transficiranih stanica koje eksprimiraju fuzijski protein dCas9-DNMT3A, konstruirani su vektori s dva alternativna biljega. Biljezi *PuroR* ili *EGFP* umetnuti su u istom okviru čitanja C-terminalno od proteina dCas9-DNMT3A, zajedno sa sekvencom samo-cijepajućeg peptida T2A, koji omogućava ekvimolarno prevođenje dvaju polipeptida s bicistranskog transkripta. Biljeg T2A-PuroR izrezan je iz plazmida pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462), a biljeg T2A-EGFP iz pSpCas9n(BB)-2A-GFP (PX461) (Addgene br. 48140) (76). Dva mikrograma svakog plazmida inkubirano je s enzimom EcoRI (20 U) preko noći na 37°C. Nakon razdvajanja na agaroznom komercijalnog kompleta kemikalija GenElute Gel Extraction Kit. Vektori pdCas9-DNMT3A i pdCas9-DNMT3A (ANV) linearizirani su restrikcijom pomoću EcoRI te odmah potom defosforilirani (bez pročišćavanja) dodatkom temperaturno-osjetljive alkalne fosfataze FastAP (Thermo Scientific) prema uputama proizvođača. Defosforilacija je napravljena kako bi se umanjila mogućnost intramolekularne ligacije samog vektora. EcoRI-fragmenti biljega T2A-PuroR, odnosno biljega T2A-EGFP, umetnuti su u oba linearizirana vektora pomoću enzima T4 DNA Ligase (350 U; Takara). Ligacijske smjese inkubirane su na 16°C u trajanju od 30 min, uz inaktivaciju ligaze na 65°C, 10 min. Transformanti su provjereni metodom *colony PCR* na prisutnost inserta u ispravnoj orijentaciji. Ispravnost sekvence vektora pdCas9-DNMT3A-PuroR, pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV), pdCas9-DNMT3A-EGFP i pdCas9-DNMT3A-EGFP (ANV) potvrđena je sekvenciranjem inserta s 5' i 3' kraja. Mape konstruiranih plazmidnih vektora prikazane su u Prilogu 1.

Sekvence svih oligonukleotida korištenih tijekom kloniranja navedene su u Tablici 1. Svi su oligonukleotidi komercijalno sintetizirani uz pročišćavanje metodom izoljavanja (Sigma ili MacroGen).

Tablica 1. Oligonukleotidi korišteni prilikom konstrukcije vektora

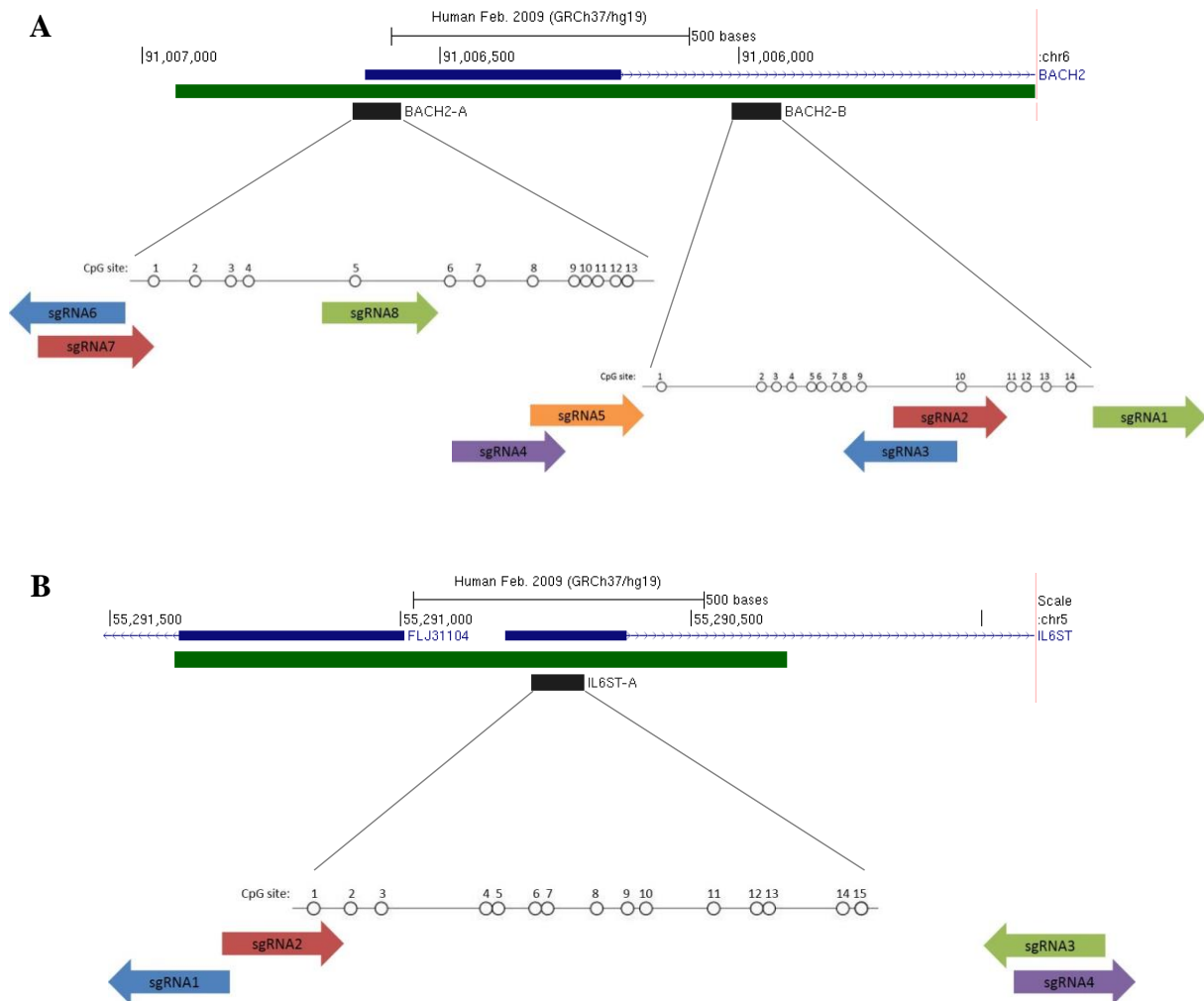
Naziv	Sekvenca (5' - 3')
pXXX_H840A-S	CTGTCCGACTACGATGTGGACGCTATCGTGCCTCAGAGCTTTC
pXXX_H840A-A	GAAAGCTCTGAGGCACGATAGCGTCCACATCGTAGTCGGACAG
Primjena: Ciljana mutageneza (H840A) gena <i>Cas9n</i> ; mutirani parovi baza su osjenčani	
pXXX_H840A-seq	GCAGCCAGATCCTGAAAGAAC
Primjena: Potvrda mutiranog pdCas9 sekvenciranjem	
GS-linker_top1	ACAGGCCAAAAAGAAAAAGCTCGAGGGCGGAGGCG
GS-linker_top2	GGAGCGGATCCGGCAGCGGCCGGCCCGAATTC
GS-linker_bottom1	CGCCCTCGAGCTTTTTCTTTTTGGCCTGTCCGG
GS-linker_bottom2	AATTGAATTCGGGCCGGCCGCTGCCGGATCCGCTCCCGCCTC
Primjena: Kloniranje linkera Gly ₄ Ser (podebljano) i dodatnih restrikcijskih mjesta za BamHI i FseI (podcrtano)	
GS-linker_seq	GAAGAGGTACACCAGCACCAAAG
Primjena: Potvrda pdCas9-GS sekvenciranjem	
DNMT3A-noBbsI-S	GACCAGCATTTTCTGTGTTTCATGAATGAGAAAGAG
DNMT3A-noBbsI-A	CTCTTTCTCATTCATGAACACAGGAAAATGCTGGTC
Primjena: Ciljana mutageneza restrikcijskog mjesta BpiI/BbsI unutar katalitičke domene DNMT3A; mutirani par baza je osjenčan	
DNMT3A_ANV-S	CTTCTTCTGGCTCTTTGCGAATGTGGTGGCCATGG
DNMT3A_ANV-A	CCATGGCCACCACATTCGCAAAGAGCCAGAAGAAG
Primjena: Ciljana mutageneza (E756A) aktivnog mjesta DNMT3A; mutirani par baza je osjenčan	
DNMT3A_ANV-seq	ATCGTCAACCCTGCTCGC
Primjena: Potvrda mutiranog pcDNA3/Myc-DNMT3A (ANV) sekvenciranjem	
DNMT3a_CD-For	TATAATGGATCCCCCTCCCGGCTCCAGATG
DNMT3a_CD-Rev	ATATAGGCCGGCCGGACACACACGCAAATACTC
Primjena: Umnažanje i restrikcijsko kloniranje katalitičke domene DNMT3A; podcrtana su restrikcijska mjesta za BamHI (For) i FseI (Rev)	
GS-linker_seq	GAAGAGGTACACCAGCACCAAAG
DNMT3A_in-Rev	CAGGGTTGACGATGGAGAGG
Primjena: Provjera transformanata na prisutnost inserta DNMT3A metodom <i>colony</i> PCR	
T2A_in-For	CAAAGTGAGGACCATTACTACGA
PuroR_in-Rev	CGTGAGGAAGAGTTCTTGCAG
EGFP_in-Rev	TGGTGCAGATGAACTTCAGG
Primjena: Provjera transformanata na prisutnost inserta T2A-PuroR ili T2A-EGFP metodom <i>colony</i> PCR	

3.2 Vektori za ciljanu CpG metilaciju regulatornih regija

Kako bi se potvrdilo metiltransferazno djelovanje fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A, konstruirani su vektori za njegovo specifično navođenje na promotore gena *BACH2* i *IL6ST*, koji su nemetilirani u staničnoj liniji embrionalnog bubrega čovjeka, HEK293 (engl. *human embryonic kidney*). Odabrano je osam različitih veznih mjesta za sgRNA unutar promotora gena *BACH2* te četiri mjesta unutar promotora *IL6ST*. Za ciljanje svakog lokusa napravljen je aktivan i inaktivan konstrukt, odnosno ista sekvenca sgRNA umetnuta je u vektore pdCas9-DNMT3A-PuroR i pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV). *BACH2*-sgRNA8 dodatno je umetnuta u aktivan i inaktivan oblik vektora koji ko-ekspirira biljeg EGFP umjesto PuroR, te u vektor pX462-dCas9.

3.2.1 Odabir ciljanih sekvenci

Sekvence za navođenje proteina dCas9-DNMT3A na ciljna mjesta u genomu stanica HEK293 odabrane su na temelju referentnog ljudskog genoma GRCh37 (hg19, veljača 2009.). Ciljne sekvence odabrane su tako da odgovaraju sljedećim kriterijima: (i) duljine su 20 nt, (ii) nizvodno (na 3' kraju) slijedi PAM-sekvenca NGG, (iii) jedinstvene su u genomu. Specifičnost odabranih sekvenci dodatno je provjerena pomoću programa GT-Scan (<http://gt-scan.braembl.org.au/gt-scan/>) (113). Vezna mjesta za sgRNA nalaze se unutar ili u neposrednoj blizini segmenata promotora *BACH2* i *IL6ST* za koje postoje testovi za analizu metilacije DNA bisulfitnim pirosekvenciranjem (Slika 10). Sekvence za tzv. *non-targeting* (NT) sgRNA, koje nemaju potpuno komplementarno vezno mjesto unutar ljudskog genoma preuzete su iz popisa sekvenci sgRNA lentiviralne biblioteke Human GeCKOv2 Library (114).



Slika 10. Navođenje fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A na promotore gena *BACH2* i *IL6ST*. Shematski su prikazane su 5' regije ljudskih gena *BACH2* (**A**) i *IL6ST* (**B**), s položajem egzona označenim plavim pravokutnicima i intronima označenim tankim plavim linijama (strelice prikazuju smjer transkripcije gena). Zeleni pravokutnici označavaju položaj CpG otoka. Crni pravokutnici predstavljaju sekvencu DNA pokrivenu testovima za analizu metilacije bisulfitnim pirosekvenciranjem DNA. Uvećani umetak prikazuje pojedinačna CpG mjesta obuhvaćena pojedinim testom za analizu metilacije DNA. U odnosu na ta CpG mjesta, strelicama su prikazana 20 pb-duga vezna mjesta za molekule sgRNA (označene brojevima). Vrh strelice usmjeren je prema sekvenci PAM.

3.2.2 Kloniranje sekvenci sgRNA u vektore

Za svaku sgRNA dizajniran je par oligonukleotida koji sparivanjem stvaraju 5' ljepljive krajeve kompatibilne krajevima vektora pocijepanog enzimom BbsI. Oligonukleotidi sadrže ciljnu sekvencu od 20 nt, kojoj je prema potrebi pridodana jedna baza G na 5' kraj (ako sama ciljna sekvenca ne počinje s G) radi učinkovite transkripcije sgRNA s promotora U6. Provjereno je da oligonukleotidi ne sadrže restriksijsko mjesto enzima BbsI (5' GAAGAC 3' ili 5' GTCTTC 3'), kako bi se omogućilo jednostavnije i učinkovitije kloniranje u jednom koraku, uz istovremenu digestiju vektora i ligaciju inserta.

Sve sgRNA (Tablica 2) umetnute su u konstruirane ekspresijske vektore prema protokolu razvijenom za ishodišni plazmid (115), uz manje preinake. Oligonukleotidi su spareni i fosforilirani u puferu 1x T4 DNA Ligase Buffer (Takara), uz dodatak 5 U enzima T4 PNK (NEB). Digestije i ligacija odvijale su se istovremeno u puferu 1x Buffer G (Thermo Scientific), uz dodatak enzima BpiI/BbsI (10 U; Thermo Scientific) i ligaze T4 DNA Ligase (350 U; Takara). Reakcije su zatim tretirane egzonukleazom Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase (10 U; Epicentre) ili Exonuclease V – RecBCD (5 U; NEB). Ispravnost umetnute sekvence sgRNA provjerena je sekvenciranjem pomoću početnice U6-For (5' GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC 3').

Radi potrebe za analizom potencijalnog učinka vezanja samog kompleksa sgRNA-dCas9 na metilaciju DNA, jedna sekvenca sgRNA (BACH2-sgRNA8) umetnuta je u vektor pX462-dCas9, koji eksprimira dCas9 bez vezane katalitičke domene DNMT3A te istovremeno omogućava selekciju stanica puromicinom.

Tablica 2. Sekvence sgRNA za navođenje fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A

Naziv	Ciljani lokus	Sekvenca ciljnog mjesta uključujući sekvencu PAM (podcrtano)
BACH2-sgRNA1	<i>BACH2</i> , intron 1	TGTATTTT <u>GCTGGCGTCGAAGGG</u>
BACH2-sgRNA2	<i>BACH2</i> , intron 1	CTCTCCCTCCCGGCTGTTT <u>ACGG</u>
BACH2-sgRNA3	<i>BACH2</i> , intron 1	GGGAGAGCACACATTCGGCG <u>C</u> GG
BACH2-sgRNA4	<i>BACH2</i> , intron 1	CCGCGCCCTGCCCGCTTTTAT <u>TGG</u>
BACH2-sgRNA5	<i>BACH2</i> , intron 1	CCGCTTTTATGGCATTCTTCT <u>AGG</u>
BACH2-sgRNA6	<i>BACH2</i> , promotor	CCCATTCAACAATAACTTTAC <u>GGG</u>
BACH2-sgRNA7	<i>BACH2</i> , promotor	AGTTATTGTGAATGGGGAGC <u>GGG</u>
BACH2-sgRNA8	<i>BACH2</i> , egzon 1	AATGTAGCGATTGAGAGTGTGGG
IL6ST-sgRNA1	<i>IL6ST</i> , promotor/egzon 1	GCCACCCCAGTCCCGCGGCG <u>GGG</u>
IL6ST-sgRNA2	<i>IL6ST</i> , egzon 1	ATCTGACAGTGTTCGGAGC <u>CGG</u>
IL6ST-sgRNA3	<i>IL6ST</i> , egzon 1	CGCACGAACCCCTTGCGCC <u>AGG</u>
IL6ST-sgRNA4	<i>IL6ST</i> , egzon 1	GCCAAGGGGTTCGTGCGCTGT <u>TGG</u>
Non-targeting 1	Nema ga	ACGGAGGCTAAGCGTCGCAA
Non-targeting 2	Nema ga	GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC

3.3 Održavanje stanica u kulturi

Kultura stanica HEK293 održavana je u hranjivom mediju DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*; Lonza) s dodatkom 10% goveđeg fetalnog seruma (FBS, od engl. *fetal bovine serum*; Biosera), 4 mM L-glutamina (Lonza) te 100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina (Lonza). Stanice su uzgajane na 37°C u inkubatoru s 5%-tnim udjelom CO₂. Stanična kultura redovito je testirana na prisutnost mikoplazmi u mediju metodom temeljenom na PCR-u s komercijalnim setom početnica PCR Mycoplasma Detection Set (Takara).

3.4 Transfekcija i selekcija stanica

Stanice HEK293 nasađene su u ploče sa 6 ili 24 jažice te transficirane sljedeći dan, pri konfluentnosti od 70 od 90%, pomoću kationskog lipidnog reagensa Lipofectamine 3000 (Invitrogen) prema uputama proizvođača. Na temelju procjene učinkovitosti transfekcije

vektora pdCas9-DNMT3A-EGFP korištenjem fluorescencijske mikroskopije, utvrđena je optimalna količina reagensa za transfekciju. Ukratko, u mediju OptiMEM (Gibco) pripremljeni su kompleksi plazmidne DNA (500 ng za ploče sa 6 jažica, 100 ng za ploče s 24 jažice), reagensa P3000 i reagensa Lipofectamine 3000 (7.5 μ l za ploče sa 6 jažica, 1.5 μ l za ploče s 24 jažice) te su nakon 5 min inkubacije na sobnoj temperaturi dodani adheriranim stanicama u punom hranjivom mediju.

Stanice su transficirane u triplicatu, bilo s jednim vektorom (jednom sgRNA) ili s kombinacijom svih vektora (svih molekula sgRNA za pojedini lokus) jednog tipa (aktivnog ili inaktivnog), koji navode fuzijski protein dCas9-DNMT3A na istu promotorsku regiju. Sve su transfekcije napravljene s jednakom ukupnom količinom plazmidne DNA. Svaki zasebni eksperiment obuhvaćao je odgovarajuće kontrole: stanice transficirane vektorom za ko-ekspresiju aktivnog fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A i *non-targeting* sgRNA te stanice kojima je dodan samo transfekcijski reagens, bez plazmidne DNA (tzv. *mock*-transfekcija, nazivana tako kroz ostatak teksta).

Dan nakon transfekcije, stanice su tretirane otopinom tripsina (0.25%) i EDTA (Sigma) i presađene u petrijevke veće površine (otprilike 1:5 razrjeđenje), kako bi bile u fazi aktivnog rasta prilikom dodatka antibiotika. Točno 24 sata nakon transfekcije, započeta je selekcija puromicinom u trajanju od 48 sati, radi obogaćenja populacije uspješno transficiranih stanica. Za selekciju je korišten puromicin (Life Technologies) u konačnoj koncentraciji 1.5 μ g/ml, što je minimalna koncentracija antibiotika koja ubija sve netransficirane stanice HEK293. Preživjele stanice isprane su u puferu 1x PBS (engl. *phosphate buffered saline*; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄) te dalje održavane u neselektivnom punom mediju do trenutka izolacije DNA i RNA.

3.4.1 Određivanje optimalne količine vektora za transfekciju

Kako bi se utvrdila optimalna količina vektora za ekspresiju fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A, stanice su transficirane različitim količinama plazmidne DNA (500, 250, 100 i 25 ng) u ploči s 24 jažice, kao što je opisano ranije. Transficirani su aktivan i inaktivan oblik vektora koji ko-ekspirira sekvencu BACH2-sgRNA3 te aktivni vektor pdCas9-DNMT3A s dvije različite *non-targeting* sgRNA. Osam dana nakon transfekcije, analizirana je metilacija DNA ciljane sekvence pomoću testa za analizu metilacije BACH2-B, kao što je opisano u nastavku.

3.5 Izolacija DNA i analiza metilacije CpG mjesta

Osam dana nakon transfekcije, DNA je izolirana iz stanica koje su preživjele selekciju puromicinom. Stanice su prikupljene pomoću tripsina te isprane u puferu 1x PBS. Stanični talog resuspendiran je u puferu za lizu stanica (50mM Tris pH 8.5, 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20) uz dodatak 400 µg/ml proteinaze K (Thermo Fischer Scientific). Lizat je inkubiran preko noći na 37°C, uz potresanje (300 rpm). Proteinaza K je inaktivirana sljedeći dan zagrijavanjem lizata na 95°C, 8 min.

DNA iz nepročišćenog staničnog lizata bisulfitno je konvertirana i pročišćena pomoću komercijalnog seta kemikalija EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research), prema uputama proizvođača. Po 1 µl konvertirane DNA korišten je u PCR-reakcijama sa specifičnim početnicama za pirosekvenciranje pojedinih segmenata DNA.

3.5.1 Testovi za analizu metilacije DNA

Pirosekvenciranje bisulfitno-konvertirane DNA omogućuje određivanje stupnja metilacije citozina na razini pojedinačnih CpG mjesta unutar kraćeg segmenta genomske DNA (do 200 pb). Da bi se analizirao učinak konstrukta dCas9-DNMT3A na metilaciju citozina unutar regulatorne regije gena, razvijeni su testovi specifični za fragmente unutar ciljanih genomskih lokusa.

Bisulfitno-konvertirana DNA (1 µl) umnožena je pomoću komercijalnog kompleta kemikalija PyroMark PCR Kit (Qiagen), prema uputama proizvođača. Za umnažanje svakog genomskog fragmenta korišten je par početnica specifičnih za bisulfitno-konvertiranu sekvencu, pri čemu je početnica *Reverse* bila biotinilirana na 5' kraju. PCR se odvijao pri sljedećim uvjetima: 15 min početne denaturacije na 95°C; 50 ciklusa od 30 s denaturacije na 95°C, 30 s prijanjanja početnica na temperaturi T_a (od engl. *annealing temperature*) (Tablica 3), 30 s elongacije na 72°C; 10 min završne elongacije na 72°C. Jedinstveni produkti dobiveni umnožavanjem metodom PCR-a sekvencirani su pomoću sustava za pirosekvenciranje PyroMark Q24 Advanced (Qiagen), prema uputama proizvođača. Za sekvenciranje je korištena ili PCR-početnica *Forward* ili početnica dodatno dizajnirana u tu svrhu. Sekvence svih početnica i pripadajuće temperature prijanjanja T_a navedene su u Tablici 3. Test za analizu metilacija DNA ponavljajućih elemenata LINE-1 preuzet je od Zoldoš i sur. (116).

Tablica 3. Sekvence početnica za umnažanje i pirosekvenciranje bisulfitno konvertirane DNA

Naziv testa	Naziv početnice	Sekvenca (5' - 3')	Ta (°C)
IL6ST-A	IL6ST-For	GAGAAGGATTTGATAGTGT	52
	IL6ST-Rev_Btn	CCTCCTCACCTCAAAC	
	IL6ST-PyroSeq	AAGGATTTGATAGTGTTT	
BACH2-A	BACH2-ForA	TTATTGTGAATGGGGA	48
	BACH2-RevA_Btn	ACTACTACTACTAAAAC	
BACH2-B	BACH2-ForB	GTTTTTATGGTATTTTTTAGG	48
	BACH2-RevB_Btn	TCCCTCTACTATTCCAAAA	
LINE-1	LINE1-For_Btn	TAGGGAGTGTTAGATAGTGG	64
	LINE1-Rev	AACTCCCTAACCCCTTAC	
	LINE1-PyroSeq	CAAATAAAACAATACCTC	

3.6 Izolacija RNA i analiza ekspresije gena

RNA je izolirana iz stanica transficiranih s kombinacijom sgRNA za pojedini lokus, koje su eksprimirane s vektora pdCas9-DNMT3A-PuroR ili pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV), iz stanica transficiranih s *non-targeting* sgRNA te iz *mock*-transficiranih stanica. Ukupna RNA izolirana je u isto vrijeme kada i DNA (osam dana nakon transfekcije) pomoću komercijalnog kompleta kemikalija RNeasy Mini Kit (Qiagen), prema uputama proizvođača. Ukratko, stanice su prikupljene pomoću tripsina i istaložene centrifugiranjem 5 min pri 300 g. Stanični talog je liziran u 350 µl pufera RLT, a lizat je homogeniziran vorteksiranjem. Nakon dodatka 1 volumena 70%-tnog etanola, lizat je pročišćen na koloni. RNA je eluirana u 25 µl vode slobodne od RNaza.

Jedan mikrogram RNA upotrijebljen je za sintezu komplementarne DNA (cDNA, od engl. *complementary DNA*). Reverzna transkripcija provedena je pomoću enzima PrimeScript RTase (100 u; Takara) i nasumičnih početnica Random Hexamers (Invitrogen) u konačnoj koncentraciji 2.5 mM, uz dodatak inhibitora ribonukleaza Recombinant RNase Inhibitor (20 U; Takara). Ekspresija gena analizirana je upotrebom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu (qPCR), uz pomoć komercijalno dostupnih Taqman testova na uređaju 7500 Fast

Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Korištena je smjesa reagensa TaqMan Gene Expression Master Mix te sljedeći TaqMan testovi za analizu ekspresije gena: Hs00174360 m1 (*IL6ST*), Hs00222364 m1 (*BACH2*) i Hs02800695 m1 (*HPRT1*) (Applied Biosystems). Sve su reakcije pripremljene u tehničkim triplikatima. Razina ekspresije gena *BACH2* i *IL6ST* normalizirana je u odnosu na endogeni kontrolni gen *HPRT1* i analizirana komparativnom C_T metodom (117).

3.7 Analiza djelovanja kimerne metiltransferaze dCas9-DNMT3A kroz vrijeme

Stanice HEK293 transficirane su s 500 ng vektora u pločama sa 6 jažica, kao što je opisano ranije. U triplikatima su transficirani aktivni i inaktivni oblik vektora koji ko-eksprimiraju *BACH2*-sgRNA8 ili *IL6ST*-sgRNA3. Dan nakon transfekcije stanice su prikupljene pomoću tripsina te je dio odvojen za analizu, dok je ostatak stanica ponovno nasaden u ploče sa 6 jažica u razrjeđenju 1:5. Stanice su podvrgnute selekciji kao što je opisano ranije. Uzorci stanica prikupljeni su nakon transfekcije svakodnevno do 9. dana, a zatim u većim vremenskim razmacima do 42. dana. Nepročišćeni stanični lizati pripremljeni su prema ranije opisanom protokolu te iskorišteni za analizu metilacije DNA te za detekciju plazmidne DNA upotrebom metode kvantitativnog qPCR-a. Metilacija CpG mjesta unutar ciljanih fragmenata *BACH2*-A i *IL6ST*-A analizira je bisulfitnim pirosekvenciranjem kao što je opisano ranije.

3.7.1 Relativna kvantifikacija plazmidne DNA pomoću kvantitativnog qPCR-a

Količina plazmidne DNA izmjerena je u stanicama transficiranim aktivnim ili inaktivnim oblikom vektora pdCas9-DNMT3A koji ko-eksprimira *BACH2*-sgRNA8. Analizirani su uzorci prikupljeni prvi, drugi, treći, četvrti, sedmi, deveti i šesnaesti dan nakon transfekcije. Plazmidna DNA umnožena je parom početnica specifičnim za sekvencu gena *Cas9*: Cas9-qPCR_For (5' TGCCCCAAGTGAATATCGTG 3') i Cas9-qPCR_Rev (5' GACTTGCCCTTTTCCACTTTG 3'), te kvantificirana u odnosu na ljudsku genomsku sekvencu *RAG1*, umnoženu parom početnica RAG1-qPCR_For (5' TGTTGACTCGATCCACCCCA 3') i RAG1-qPCR_Rev (5' TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA 3') (118). Korištena je smjesa reagensa Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) i specifične početnice u konačnoj koncentraciji 50 nM. Učinkovitost početnica procijenjena je na temelju standardne krivulje umnažanja poznatih količina lineariziranog vektora pdCas9-DNMT3A-PuroR, odnosno genomske DNA izolirane iz stanica HEK293. Sve su reakcije pripremljene u tehničkim duplikatima i analizirane na uređaju 7500 Fast Real-Time PCR System, pri

sljedećim uvjetima: 10 min početne denaturacije na 95°C; 40 ciklusa od 15 s denaturacije na 95°C i 1 min istovremenog prijanjanja početnica i elongacije na 62°C; uz završnu analizu krivulje taljenja (engl. *melt curve analysis*), prema ustaljenom protokolu. Relativna količina plazmidne DNA izračunata je kao što je ranije opisano (119).

3.8 Statistička obrada podataka

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina triju ili šest bioloških replika. Odstupanje od aritmetičke sredine izraženo je u obliku standardne devijacije. Statistička analiza podataka napravljena je pomoću računalnog programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.). Međusobna usporedba različitih bioloških grupa provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA) i *post-hoc* Tukey testa višestrukih usporedbi. Vrijednosti s $P \leq 0.05$ smatrane su statistički značajnima.

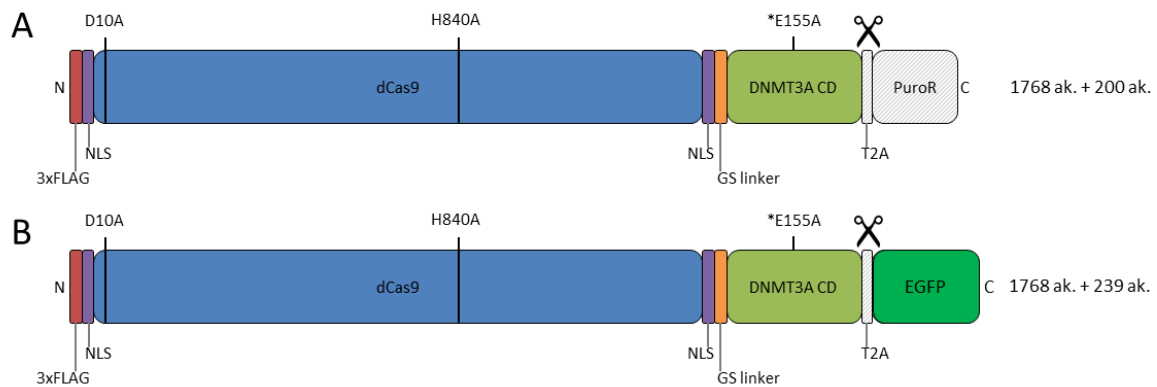
4 REZULTATI

4.1 Konstrukcija sustava za ciljanu metilaciju DNA

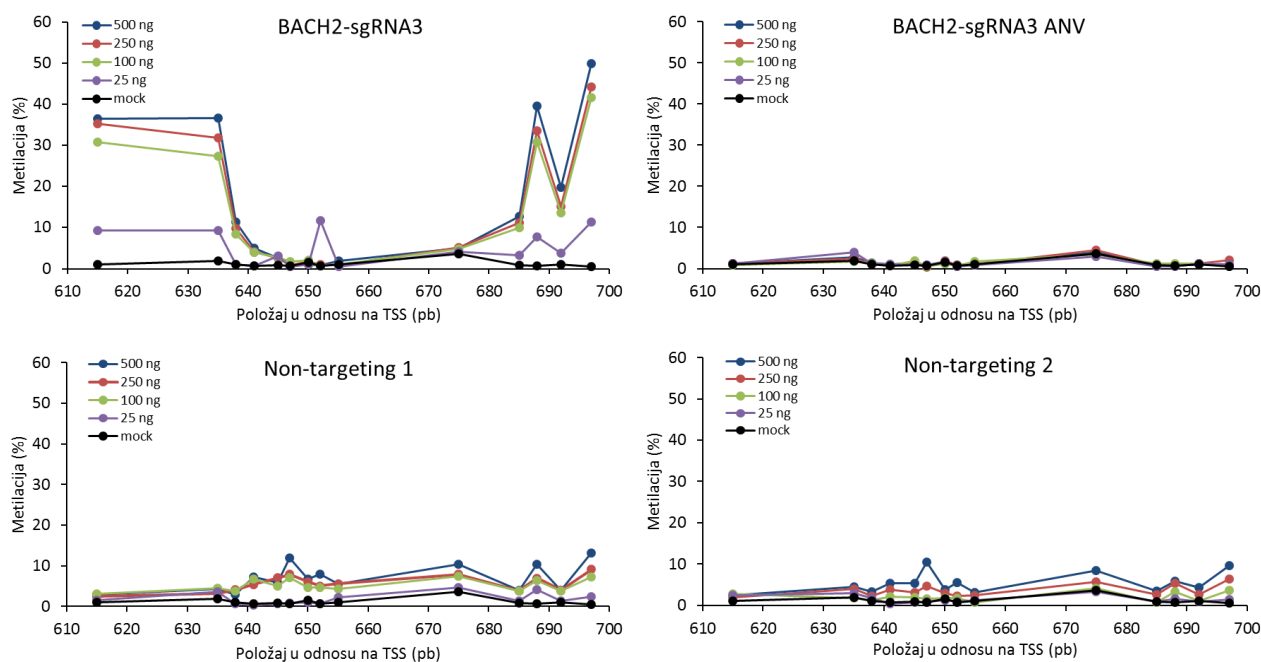
Sustav CRISPR-Cas9, originalno razvijen kao alat za ciljanu modifikaciju sekvence DNA u stanicama sisavaca (76), prenamijenjen je za potrebe ciljane metilacije DNA. Mutagenезom je ukinuta nukleazna aktivnost proteina Cas9, kako bi se iskoristila samo njegova sposobnost navođenja pridodane efektorske domene na specifičnu lokaciju u genomu, određenu komplementarnošću s molekulom sgRNA. Na C-kraj inaktiviranog dCas9 (veličine 1367 ak.) dodana je C-terminalna katalitička domena ljudske DNMT3A (311 ak.), koja u izolaciji od ostatka proteina zadržava svoju metiltransferaznu aktivnost (43). To svojstvo iskorišteno je kako bi se ograničila veličina ionako velikog fuzijskog proteina, odnosno vektora koji ga kodira. DNA-vežuća i efektorska domena međusobno su povezane kratkim fleksibilnim peptidom sekvence Gly-Gly-Gly-Gly-Ser. Kratki linker sastavljeni od malih nepolarnih (npr. Gly) i polarnih aminokiselina (npr. Ser) omogućavaju fleksibilnost i pokretljivost povezanih domena. Jedan od najčešće korištenih fleksibilnih linkera ima sekvencu (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n, gdje je moguće mijenjati broj ponavljanja n kako bi se postiglo optimalno razdvajanje funkcionalnih domena i odgovarajuće interakcije među domenama (120). Dodatno je konstruirana verzija dCas9-DNMT3A sa supstitucijom E155A u ENV-motivu DNMT3A, nužnom za enzimsku aktivnost (112). Ko-ekspresija specifične sgRNA i inaktivnog dCas9-DNMT3A (ANV) služila je kao kontrola u svim eksperimentima, kako bi se potvrdilo da je porast stupnja metilacije citozina uvjetovan netaknutom metiltransferaznom aktivnošću fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A. Na C-kraj konstrukta dodana je sekvenca T2A-PuroR (Slika 11A) ili T2A-EGFP (Slika 11B), radi mogućnosti selekcije stanica ili praćenja učinkovitosti transfekcije. Kodirajuće sekvence fuzijskih proteina navedene su u Prilogu 2.

S obzirom na to da sama prekomjerna ekspresija egzogene metiltransferaze može rezultirati nespecifičnim porastom metilacije na globalnoj razini, najprije je utvrđena optimalna količina dCas9-DNMT3A-kodirajućeg vektora za transfekciju stanica HEK293. Na temelju inicijalnih eksperimenata (podaci nisu prikazani), BACH2-sgRNA3 odabrana je za navođenje aktivnog i inaktivnog dCas9-DNMT3A (Slika 12, gornji red) na promotorsku regiju *BACH2*. Njeno djelovanje uspoređeno je s dvije različite *non-targeting* sgRNA, za koje ne postoji potpuno komplementarno vezno mjesto u sekvenci referentnog ljudskog genoma

(Slika 12, donji red). Uzimajući u obzir pojavu zasićenja metilacijske aktivnosti navođenog konstrukta (*on-target*) i minimalnu aktivnost *non-targeting* konstrukta, u svim narednim eksperimentima korišteno je 100 ng plazmida za tranfekciju stanica u pločama s 24 jažice, odnosno 500 ng za ploče sa 6 jažica.



Slika 11. Shematski prikaz domena fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A. dCas9 sadrži dvije supstitucije (D10A i H840A) koje ukidaju nukleaznu aktivnost. Pomoću kratkog peptida Gly₄Ser (GS) na C-kraj dCas9 fuzionirana je katalitička domena ljudske DNA metiltransferaze 3A (DNMT3A CD). dCas9-DNMT3A se prepisuje kao bicistronska mRNA, s koje se u ekvimolarnom omjeru prevodi gen za rezistenciju na puromicin (PuroR) (A), ili EGFP (B). Inaktivni dCas9-DNMT3A (ANV) sadrži dodatnu supstituciju E155A u motivu ENV, odgovornom za metiltransferaznu aktivnost. 3xFLAG, epitopska oznaka; NLS, signal za lokalizaciju u jezgri (od engl. *nuclear localisation signal*); T2A, samo-cijepajući peptid.

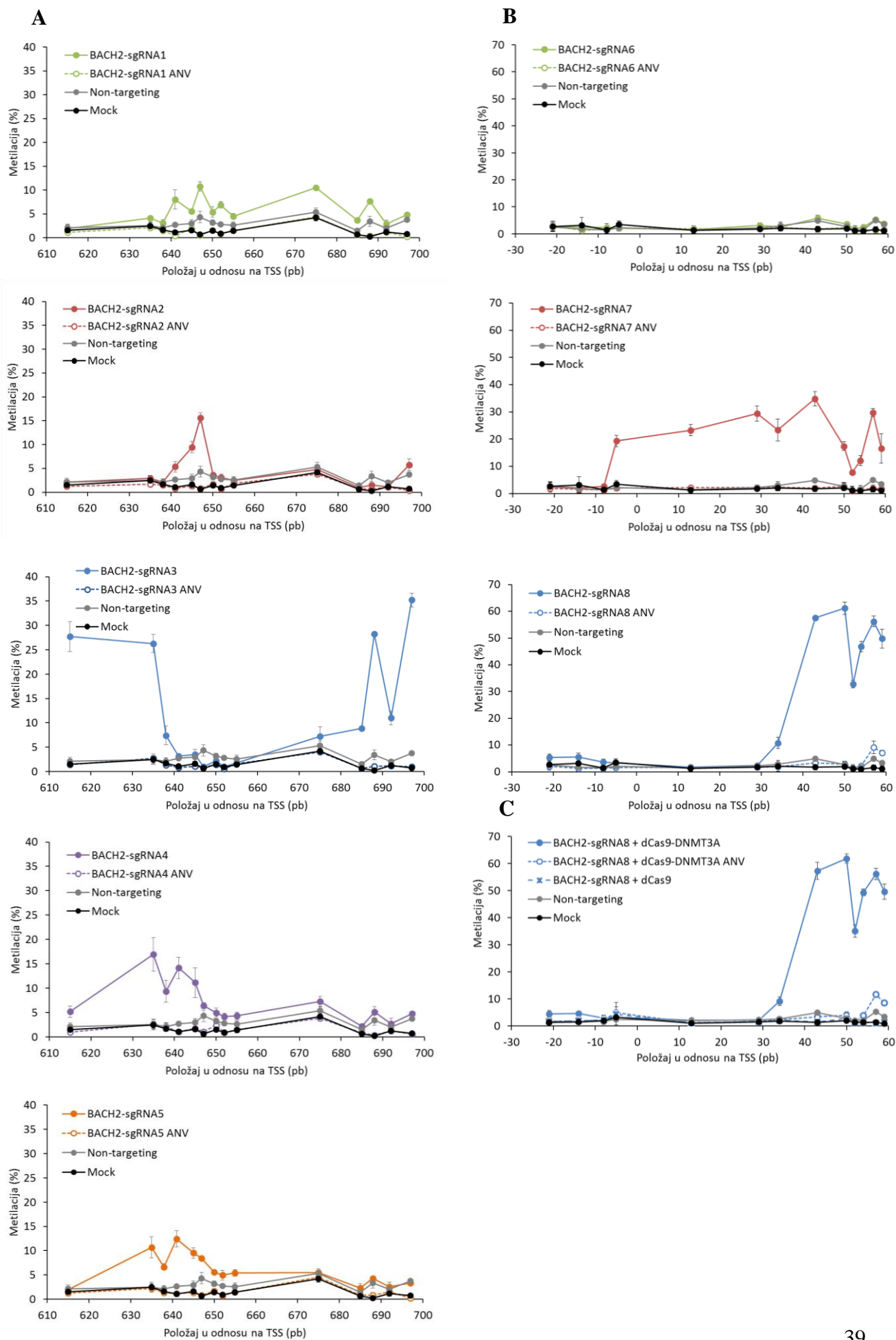


Slika 12. Određivanje optimalne količine vektora za transfekciju. Metilacijska aktivnost dCas9-DNMT3A u odnosu na količinu plazmida korištenog za transfekciju. Stanice su transficirane specifično navođenim (BACH2-sgRNA3) aktivnim ili inaktivnim dCas9-DNMT3A ili aktivnim dCas9-DNMT3A s dvije različite *non-targeting* sgRNA. Stupanj metilacije 14 CpG mjesta unutar fragmenta BACH2-B utvrđen je bisulfitnim pirosekvenciranjem. Na x-osi naznačen je položaj CpG mjesta u odnosu na mjesto početka transkripcije gena (TSS, od engl. *transcription start site*). Iste vrijednosti *mock*-transfekcije prikazane su na svakom grafu radi lakše usporedbe.

4.1.1 Ciljana metilacija promotora gena *BACH2* i *IL6ST*

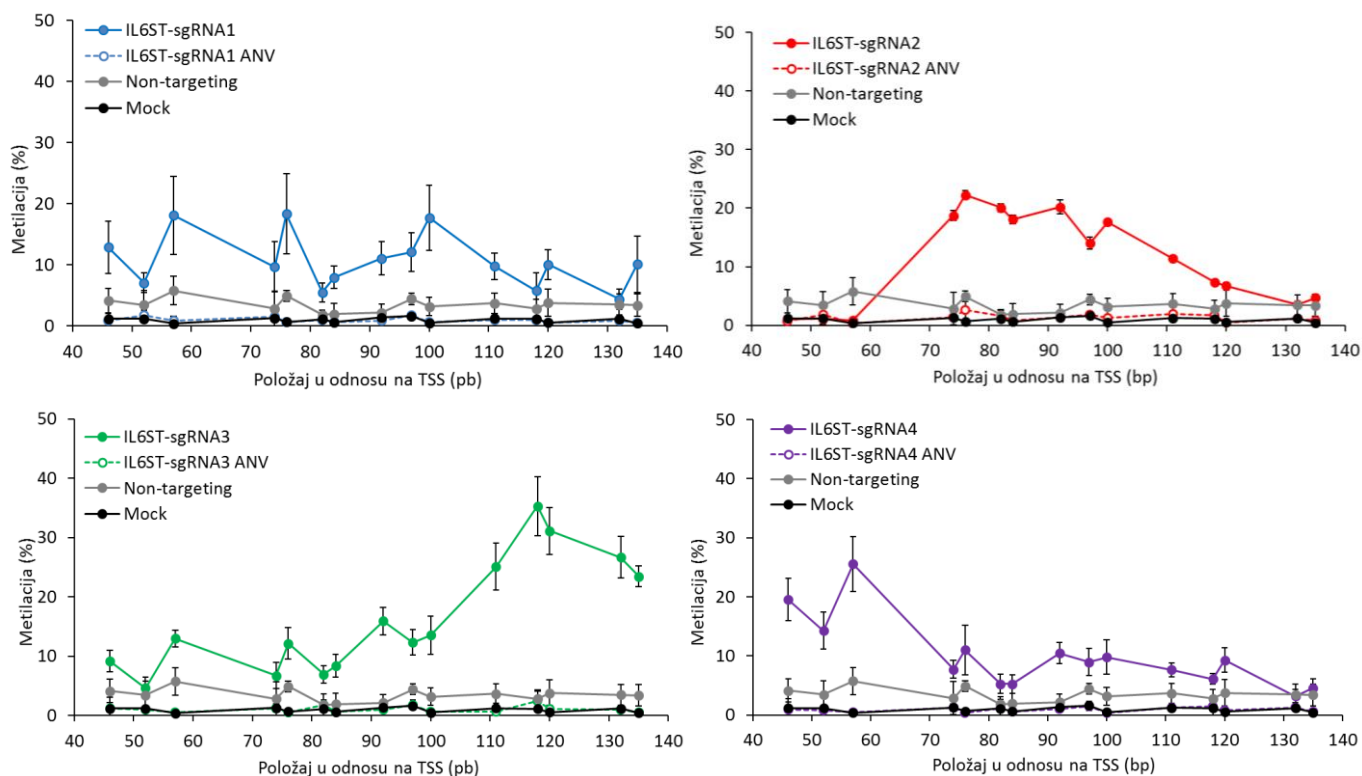
Dva fragmenta unutar nemetiliranog promotora gena *BACH2* ciljana su u stanicama HEK293 s više pojedinačnih molekula sgRNA (Slika 10A), koje se vežu u različitoj orijentaciji i na različitim pozicijama u odnosu na CpG mjesta pokrivena testovima za analizu metilacije *BACH2*-A i *BACH2*-B. Navođenje dCas9-DNMT3A na intronski fragment *BACH2*-B rezultiralo je porastom metilacije citozina u odnosu na *mock*-transficirane stanice (Slika 13A). Svaka sgRNA inducirala je metilaciju određenih CpG mjesta unutar analiziranog fragmenta, ovisno o mjestu vezanja. Među pet sgRNA, najveća aktivnost (do 34%) postignuta je sa sgRNA3, koja je inducirala porast metilacije CpG mjesta uzvodno i nizvodno od mjesta vezanja. Dvije od tri sgRNA korištene za navođenje dCas9-DNMT3A na uzvodniji fragment *BACH2*-A inducirale su sličan ili veći porast stupnja metilacije citozina, dok jedna nije izazvala nikakvu promjenu unutar analiziranog fragmenta (Slika 13B). Metilacija CpG mjesta nizvodno od mjesta vezanja sgRNA porasla je do 33% (sgRNA7), odnosno do 59% (sgRNA8). Susjedna CpG mjesta, međusobno razmaknuta nekoliko pb, nisu nužno jednako učinkovito metilirana. Primjerice, unutar fragmenta *BACH2*-B, sgRNA3 rezultira metilacijom mjesta CpG13 (+692 pb u odnosu na TSS) koja je za gotovo 17%, odnosno 25% niža od susjednih CpG12 (+688) i CpG14 (+697). Slično je primijećeno i unutar fragmenta *BACH2*-A, gdje je pod utjecajem sgRNA8 mjesto CpG10 (+52) za gotovo 30%, odnosno 15% niže metilirano od susjednih CpG9 (+50) i CpG11 (+54). Analizirana CpG mjesta koja se nalaze unutar sekvence DNA na koju se veže sgRNA ostala su nemetilirana. U stanicama u kojima dCas9-DNMT3A nije specifično navođen (*non-targeting*) ili nema očuvanu metiltransferaznu aktivnost (ANV verzija), nije došlo do značajnog porasta metilacije analiziranih CpG mjesta, osim u jednom slučaju. Transfekcija inaktivnog konstrukta navođenog na fragment *BACH2*-A pomoću sgRNA8 rezultirala je blago povišenom metilacijom (do ~10%) CpG12 i CpG13 mjesta. Kada je ista sgRNA korištena za navođenje samog dCas9, bez fuzionirane domene DNMT3A, nije došlo do sličnog porasta metilacije (Slika 13C).

Treći fragment ciljano metiliran pomoću dCas9-DNMT3A nalazi se u promotoru gena *IL6ST*, koji je nemetiliran u stanicama HEK293. Navođenje dCas9-DNMT3A na fragment *IL6ST*-A pomoću četiri različite pojedinačne sgRNA (Slika 10B) rezultiralo je porastom metilacije određenih CpG mjesta u odnosu na *mock*-transficirane stanice, ovisno o mjestu vezanja sgRNA (Slika 14). Unutar analiziranog fragmenta, stupanj metilacije pojedinih CpG mjesta porastao je do 35% (sgRNA3). Inaktivni specifično navođeni konstrukti nisu izazvali porast metilacije analiziranih CpG mjesta, kao ni *non-targeting* konstrukt.



Slika 13. Opis slike na sljedećoj stranici.

Slika 13. Ciljana metilacija CpG mjesta u promotora gena *BACH2*. Metilacijska aktivnost fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A (aktivni ili inaktivni ANV oblik), navođenog pomoću pojedinačnih sgRNA na fragmente BACH2-B (**A**) ili BACH2-A (**B**) unutar promotora BACH2, uspoređena je s *non-targeting* i *mock*-transficiranim stanicama. Stupanj metilacije pojedinačnih CpG mjesta utvrđen je bisulfitnim pirosekvenciranjem. Na x-osi naznačen je položaj CpG mjesta u odnosu na mjesto početka transkripcije gena (TSS). Svaka točka predstavlja aritmetičku sredinu triju bioloških replika, s naznačenom standardnom devijacijom. Iste vrijednosti *non-targeting* i *mock* kontrole dane su na svakom grafu radi jednostavnije usporedbe, a u istu su svrhu linijama povezane točke koje predstavljaju prosječan postotak metilacije pojedinačnih CpG mjesta. (**C**) Metilacija CpG mjesta unutar fragmenta BACH2-A ciljanog pomoću molekule BACH2-sgRNA8 ko-ekspimirane s aktivnom ili inaktivnom verzijom dCas9-DNMT3A ili sa samim dCas9 (bez domene DNMT3A). Svi podaci su iz eksperimenta nezavisnog od onog prikazanog u B (BACH2-sgRNA8). Podaci su prikazani na jednak način kao u A i B.



Slika 14. Ciljana metilacija CpG mjesta unutar fragmenta IL6ST-A. Metilacijska aktivnost fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A (aktivni ili inaktivni ANV oblik), navođenog pomoću četiri različite pojedinačne sgRNA na fragment IL6ST-A unutar promotora *IL6ST*, uspoređena je s *non-targeting* i *mock* kontrolom. Stupanj metilacije 15 CpG mjesta u nizu utvrđen je bisulfitnim pirosekvenciranjem. Na x-osi naznačen je položaj CpG mjesta u odnosu na mjesto početka transkripcije gena (TSS). Svaka točka predstavlja aritmetičku sredinu šest bioloških replika (tri u slučaju IL6ST-sgRNA2), s naznačenom standardnom devijacijom. Iste vrijednosti *non-targeting* i *mock* uzoraka dane su na svakom grafu radi jednostavnije usporedbe, a u istu su svrhu linijama povezane točke koje predstavljaju prosječan stupanj metilacije pojedinačnih CpG mjesta.

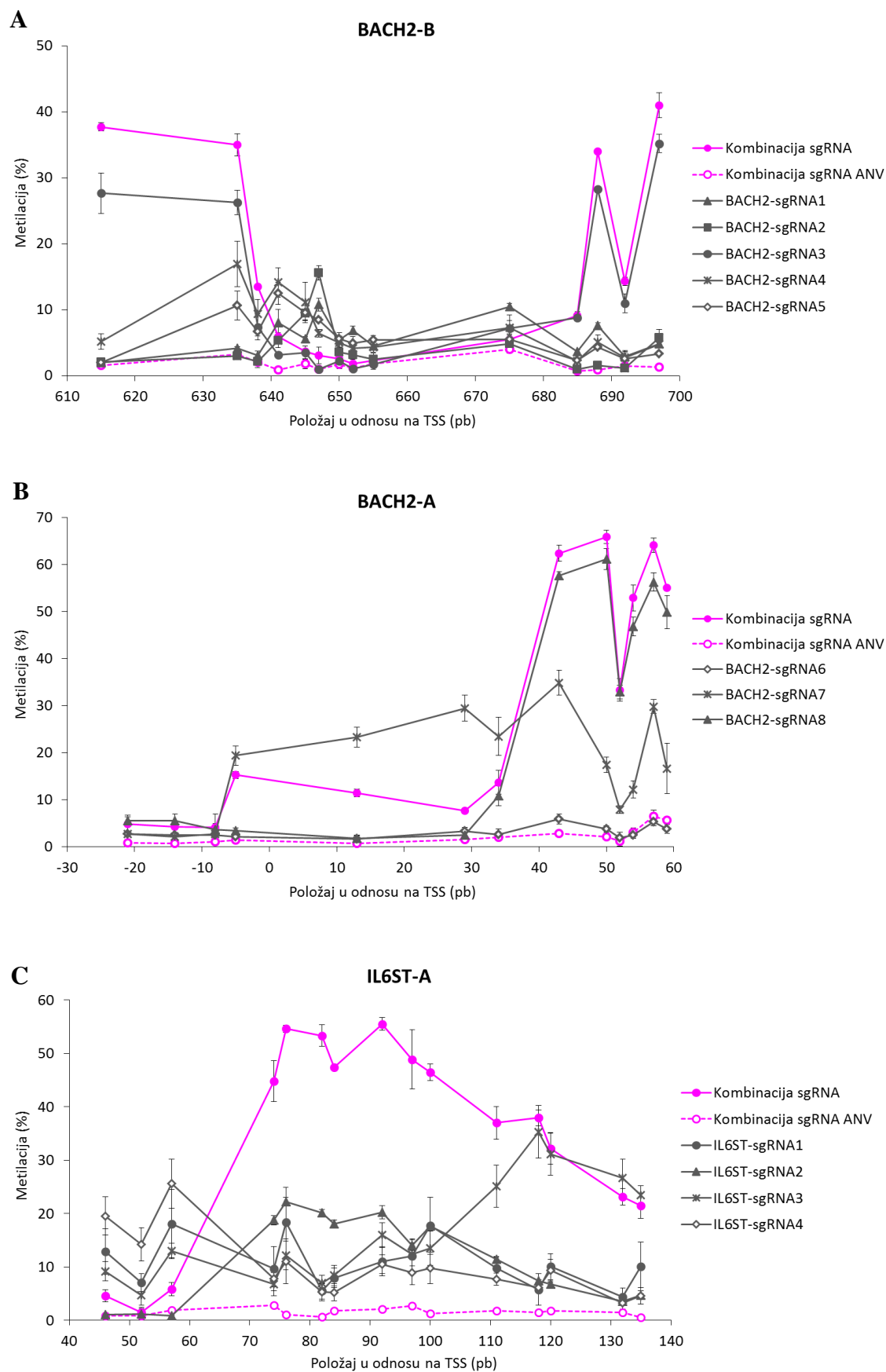
4.1.2 Metilacija ciljanih lokusa pomoću kombinacije sgRNA

S obzirom na to da su pojedinačne sgRNA inducirale metilaciju samo dijela CpG mjesta unutar ciljanih fragmenata, istraženo je može li istovremena ekvimolarna ekspresija više različitih sgRNA za isti lokus imati drugačiji učinak. Takav pristup već je uspješno korišten za potrebe ciljane aktivacije gena pomoću kimernog transkripcijskog aktivatora dCas9-VP64 (86) te pomoću histonske acetiltransferaze dCas9-p300 (16). Stanice HEK293 ko-transficirane su kombinacijom svih vektora (sgRNA) jednog tipa (aktivnog ili inaktivnog) za pojedini lokus, u ukupnoj količini jednakoj kao u pojedinačnim transfekcijama.

Navođenje dCas9-DNMT3A na promotor *BACH2* ko-ekspresijom osam različitih sgRNA rezultiralo je nešto drugačijim profilom metilacije fragmenata BACH2-B (Slika 15A) i BACH2-A (Slika 15B) u odnosu na profile dobivene s pojedinačnim sgRNA. Dobiveni profil metilacije fragmenta BACH2-B, u blizini kojeg se vežu BACH2-sgRNA1-5, najviše nalikuje profilu same BACH2-sgRNA3, uz dodatni porast metilacije zahvaćenih CpG mjesta (na pozicijama +615, +635, +638, +688, +692, +697) od 5-10%. CpG mjesta na pozicijama +641, +645 i +647, metilirana pod utjecajem pojedinačnih BACH2-sgRNA1, -2, -4 i -5, nisu bila metilirana pod utjecajem kombinacije sgRNA, moguće zbog steričkih smetnji uzrokovanih kompetitivnim vezanjem BACH2-sgRNA3 odmah nizvodno od tih mjesta. Profil metilacije fragmenta BACH2-A, u blizini kojeg se vežu BACH2-sgRNA6-8, vjerojatno je posljedica djelovanja BACH2-sgRNA7 (pozicije -5, +13 i +29) i -sgRNA8 (od pozicije +34 do +59). Metilacija CpG mjesta na pozicijama -5, +13 i +29 nije porasla do razine dosegnute sa samom BACH2-sgRNA7, što bi se moglo objasniti vezanjem BACH2-sgRNA8 na tom području.

Ko-transfekcija četiri različite sgRNA za navođenje dCas9-DNMT3A na promotor *IL6ST* rezultirala je znatno povećanom metilacijom većine CpG mjesta unutar fragmenta IL6ST-A (Slika 15C). Stupanj metilacije pojedinih CpG mjesta porastao je do 55%, u odnosu na maksimalnih 35% postignutih s pojedinačnom sgRNA (IL6ST-sgRNA3). Prva tri CpG mjesta nisu metilirana kao pod utjecajem pojedinačnih IL6ST-sgRNA1, -3 i -4, moguće zbog steričkih smetnji uzrokovanih kompetitivnim vezanjem IL6ST-sgRNA2 na tom području.

Ko-transfekcija kombinacije inaktivnih konstrukata nije rezultirala metilacijom analiziranih fragmenata, odnosno nije došlo do promjene u odnosu na *mock* i *non-targeting* uzorke (podaci nisu prikazani, istovjetni su onima prikazanim na Slikama 13 i 14).

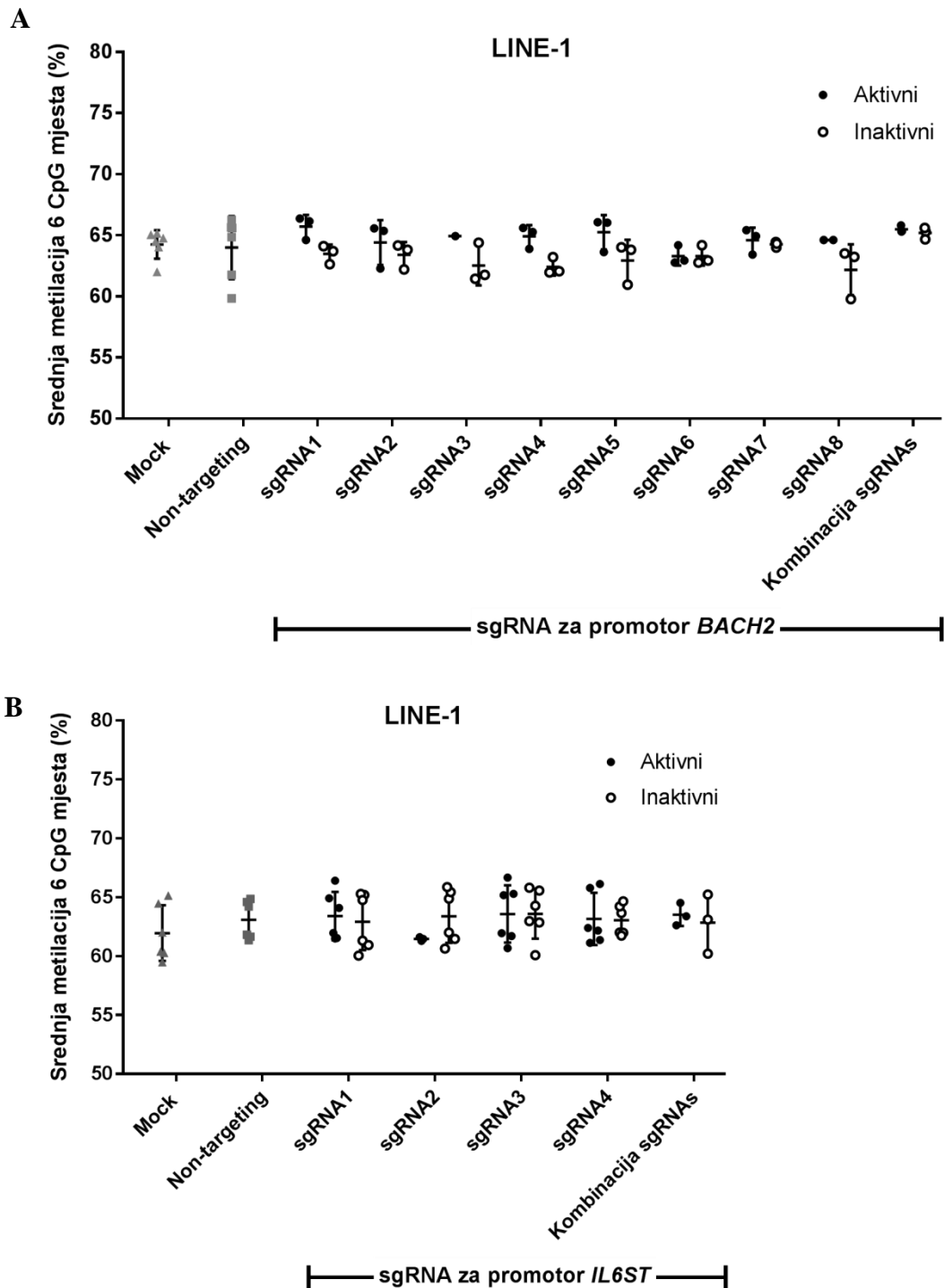


Slika 15. Opis slike na sljedećoj stranici.

Slika 15. Ciljana metilacija CpG mjesta pomoću kombinacije sgRNA za pojedini lokus. Metilacijska aktivnost fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A (aktivni ili inaktivni ANV oblik), navođenog pomoću kombinacije BACH2-sgRNA1-8 na fragmente BACH2-B (**A**) i BACH2-A (**B**), ili kombinacije IL6ST-sgRNA1-4 na fragment IL6ST-A (**C**). Stupanj metilacije pojedinačnih CpG mjesta utvrđen je bisulfitnim pirosekvenciranjem. Na x-osi naznačen je položaj CpG mjesta u odnosu na mjesto početka transkripcije gena (TSS). Svaka točka predstavlja aritmetičku sredinu triju bioloških replika (šest u slučaju IL6ST-sgRNA1, -3 i -4), s naznačenom standardnom devijacijom. Vrijednosti metilacije postignute s pojedinačnim sgRNA (sivo) istovjetne su onima prikazanim na Slikama 3 i 4. Vrijednosti *non-targeting* i *mock* uzoraka izostavljene su s grafova, a jednake su onima prikazanim na Slikama 13 i 14 (metilacija pojedinih CpG mjesta $\leq 5\%$).

4.1.3 Razina globalne metilacije DNA

Osim ciljanih genomskih lokusa, na koje je navođen dCas9-DNMT3A pomoću specifičnih sgRNA, kvantificirana je metilacija raspršenih ponavljajućih elemenata LINE-1, koja služi kao mjera globalne metilacije genoma (19,121). Bisulfitnim pirosekvenciranjem utvrđen je stupanj metilacije šest CpG mjesta unutar sekvence LINE-1. Prosječna metilacija tih mjesta nije se značajno promijenila u stanicama u kojima je prekomjerno eksprimirana DNA metiltransferaza u obliku aktivnog dCas9-DNMT3A, u odnosu na stanice transficirane inaktivnim konstruktima i *mock*-transficirane HEK293 stanice (Slika 16).



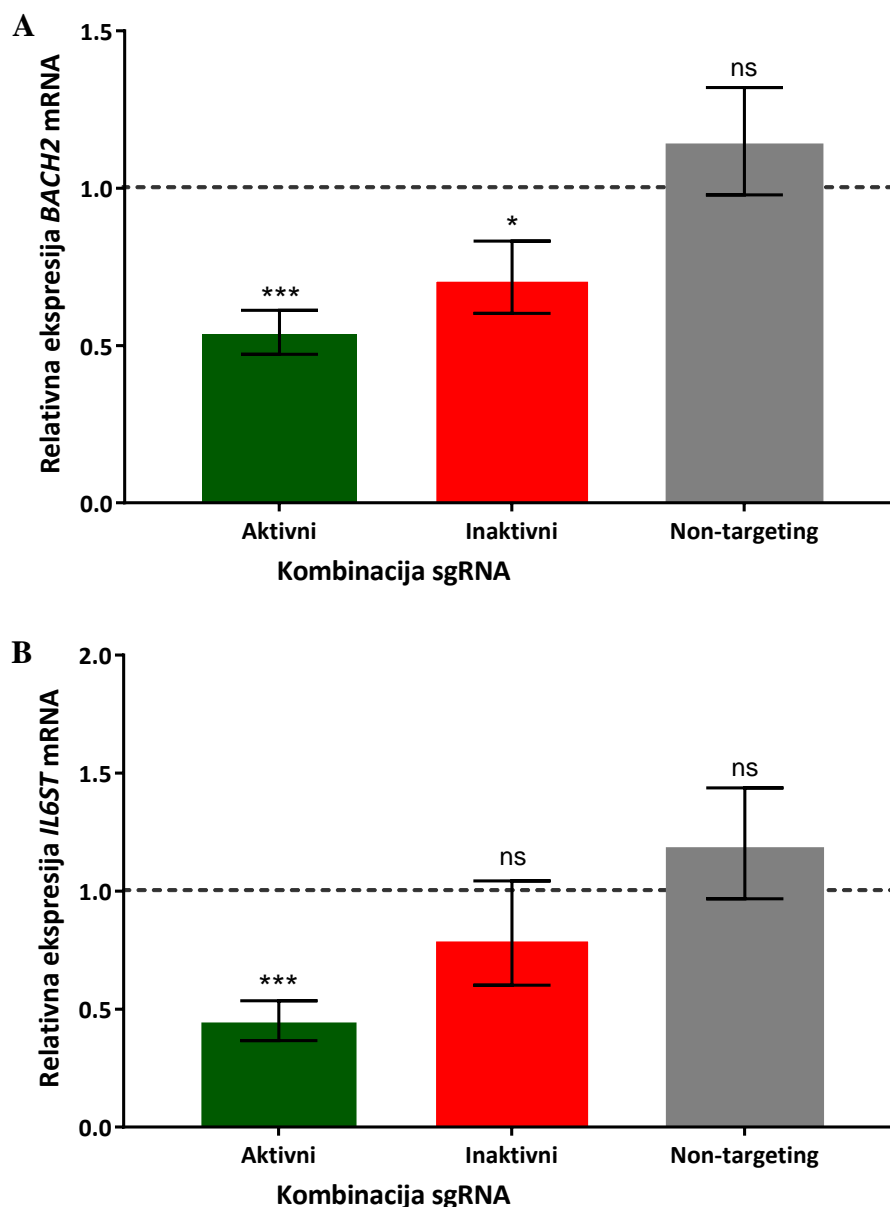
Slika 16. Razina metilacije LINE-1 kao mjera globalne metilacije genoma. Bisulfitnim pirosekvenciranjem kvantificirana je metilacija šest CpG mjesta unutar sekvence LINE-1 nakon transfekcije stanica aktivnim ili inaktivnim oblikom dCas9-DNMT3A navođenim na promotor *BACH2* (A) ili *IL6ST* (B). Prikazane su prosječne vrijednosti metilacije za svaku biološku repliku (3 ili 6 unutar grupe). Naznačena je srednja vrijednost i standardna devijacija svake biološke grupe.

4.2 Analiza ekspresije gena *BACH2* i *IL6ST*

Budući da se hipermetilacija CpG otkoja koji se nalazi u promotoru gena povezuje s utišavanjem njegove ekspresije (31), provjeren je učinak ciljane metilacije DNA, inducirane pomoću dCas9-DNMT3A, na transkripciju gena *BACH2* i *IL6ST*. RNA je izolirana osmog dana nakon transfekcije, kada i DNA, iz stanica ko-transficiranih kombinacijom sgRNA s katalitički aktivnim ili inaktivnim dCas9-DNMT3A, te i iz kontrolnih *non-targeting* i *mock*-transfekcija. Količina transkripta gena *BACH2* ili *IL6ST* utvrđena je kvantitativnim PCR-om i normalizirana u odnosu na endogeni kontrolni gen *HPRT1*. Promjena ekspresije iskazana je u odnosu na ekspresiju gena u kontrolnim *mock*-transficiranim stanicama.

Ko-transfekcija kombinacije osam sgRNA za promotor *BACH2* u kombinaciji s aktivnim konstruktom rezultirala je statistički značajnim ($P=0.0002$) smanjenjem količine mRNA za otprilike 50% (Slika 17A). Međutim, i konstrukt bez metiltransferazne aktivnosti, navođen na isti lokus, uzrokovao je smanjenje transkripcije za otprilike 30% ($P=0.0101$). Transfekcija nenavođenog aktivnog dCas9-DNMT3A (*non-targeting*) nije izazvala statistički značajnu promjenu ekspresije *BACH2* ($P=0.4168$).

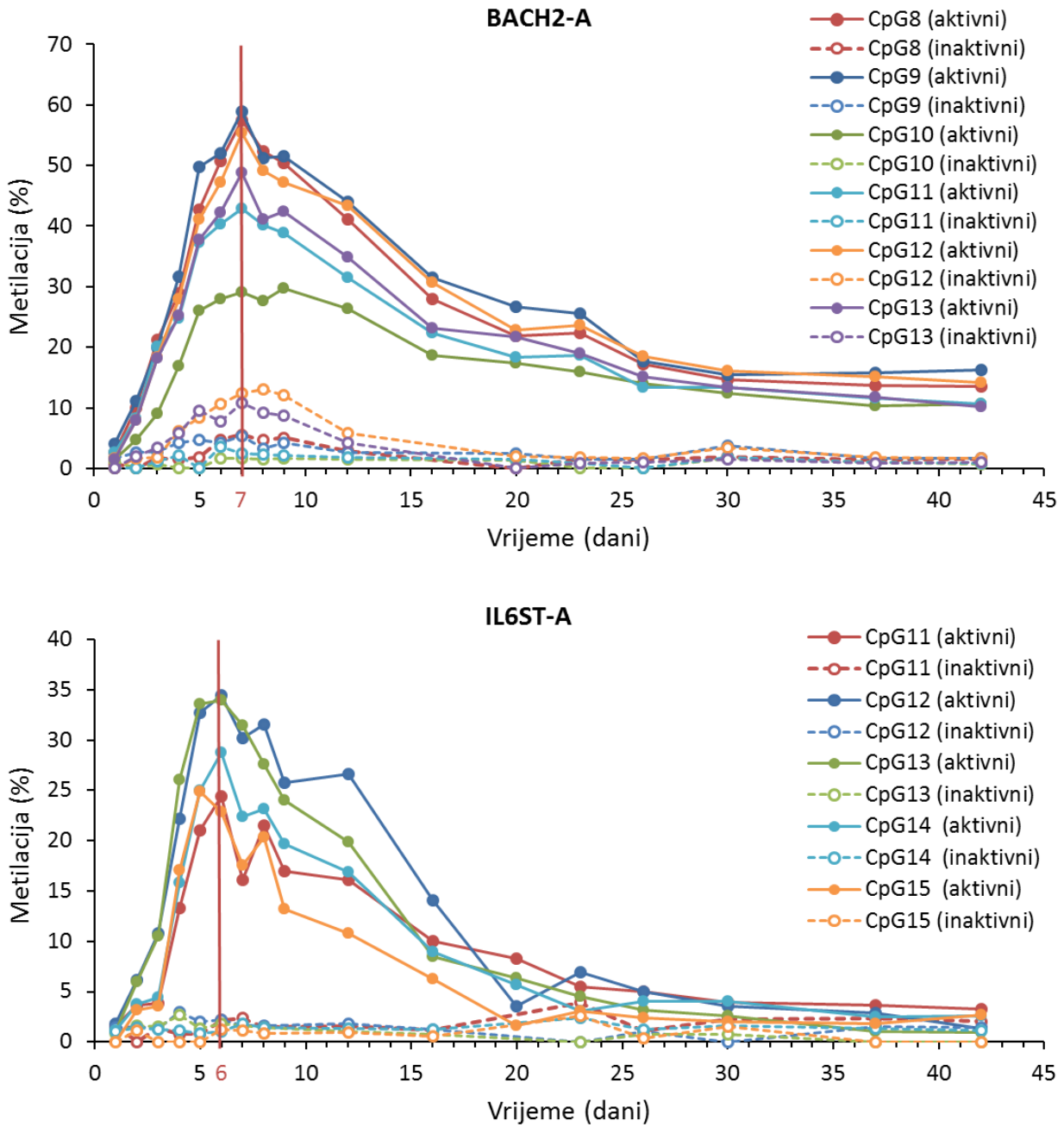
U stanicama u kojima su ko-eksprimirane četiri sgRNA za promotor *IL6ST* (Slika 17B) zajedno s aktivnim dCas9-DNMT3A, došlo je do značajnog smanjenja količine transkripta za otprilike 50% ($P=0.0006$). Istovremeno, transfekcija inaktivnog navođenog konstrukta ili *non-targeting* aktivnog konstrukta nije uzrokovala značajnu promjenu ekspresije *IL6ST* ($P=0.2833$, odnosno $P=0.542$).



Slika 17. Ekspresija gena *BACH2* (A) i *IL6ST* (B) nakon ciljane metilacije promotora pomoću dCas9-DNMT3A. Količina transkripta utvrđena je qPCR-om i normalizirana u odnosu na *HPRT1*. Promjena ekspresije (engl. *fold change*, FC) iskazana je u odnosu na *mock*-transficirane stanice. Prikazane su srednje vrijednosti triju bioloških replika, te njihove standardne devijacije. Biološke grupe međusobno su uspoređene ANOVA testom, uz *post-hoc* Tukey test višestrukih usporedbi (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; ns = nije značajno).

4.3 Analiza djelovanja dCas9-DNMT3A tijekom vremena

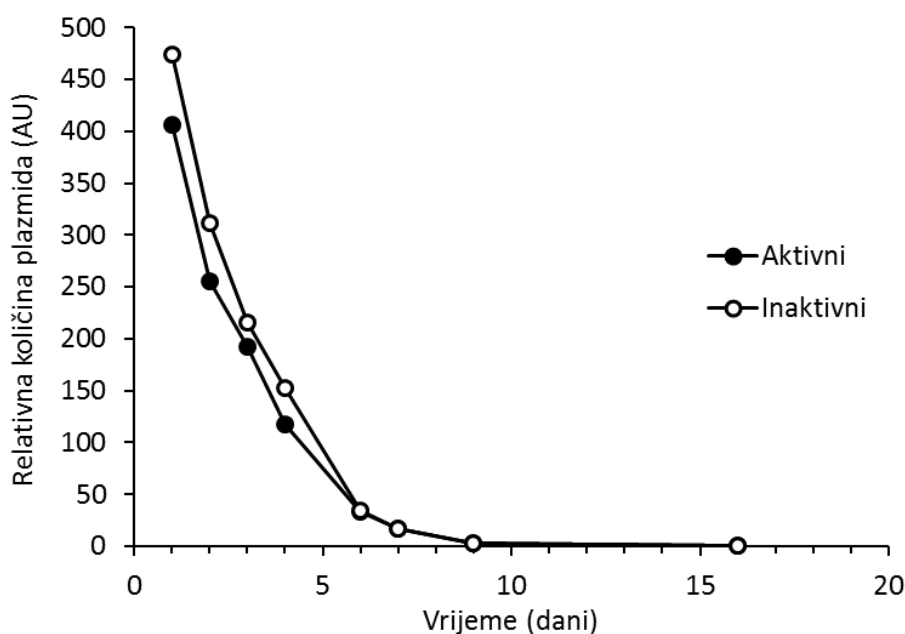
Razina metilacije citozina praćena je kroz dulji vremenski period nakon transfekcije stanica, kako bi se utvrdila dinamika uspostave i održavanja metilacije ciljanih lokusa pod utjecajem dCas9-DNMT3A. Stanice su transficirane aktivnom ili inaktivnom verzijom vektora koji su se prethodno pokazali najučinkovitijima u metilaciji promotora gena *BACH2* (*BACH2*-sgRNA8) i *IL6ST* (*IL6ST*-sgRNA3). Metilacija je analizirana u kraćim vremenskim periodima (svaka 24 h) do 9. dana nakon transfekcije te zatim svakih nekoliko dana, do 42. dana nakon transfekcije. U stanicama koje se aktivno dijele (vrijeme diobe stanica HEK293 je otprilike 24 sata), ciljana metilacija CpG mjesta dosegla je maksimum sedmog (*BACH2*; Slika 18A), odnosno šestog (*IL6ST*; Slika 18B) dana nakon transfekcije. Porast metilacije postao je uočljiv 3-4 dana nakon transfekcije, kada je kultura obogaćena uspješno transficiranim stanicama, s obzirom da selekcija traje do trećeg dana. Nakon dosegnutog maksimuma, metilacija je postepeno opadala narednih 10-15 dana. U slučaju fragmenta *BACH2*-A, od 20. do 25. dana uspostavljena je stabilna povišena razina metilacije (15-20%), koja se održala do kraja praćenja. S druge strane, metilacija fragmenta *IL6ST*-A spustila se na osnovnu razinu (do 5%) do 30. dana nakon transfekcije. Opisana dinamika primijećena je na svim hipermetiliranim CpG mjestima unutar pojedinog fragmenta, što je prikazano na Slici 18. Blagi porast metilacije mjesta CpG12 i CpG13 (*BACH2*-A) pod utjecajem inaktivnog dCas9-DNMT3A u kompleksu s *BACH2*-sgRNA8, zamijećen i ranije (Slika 13B), donekle je slijedio dinamiku aktivne metilacije (Slika 18A).



Slika 18. Stabilnost ciljne metilacije tijekom vremena. Stanice su transficirane aktivnom ili inaktivnom verzijom dCas9-DNMT3A, navođenog na fragment BACH2-A pomoću BACH2-sgRNA8 (A) ili na fragment IL6ST-A pomoću IL6ST-sgRNA3 (B). Metilacija je kvantificirana u različitim vremenskim periodima nakon transfekcije. Prikazane su vrijednosti metilacije odabranih CpG mjesta, koja su znatno metilirana u stanicama transficiranim aktivnim konstruktima. Crvenom vertikalnom linijom naznačen je dan kada je postignuta maksimalna razina metilacije s pojedinom sgRNA.

4.3.1 Relativna kvantifikacija plazmidne DNA pomoću kvantitativnog qPCR-a

Prolazna transfekcija vektorima koji se ne ugrađuju učinkovito u genomsku DNA, niti imaju sposobnost autonomne replikacije u eukariotskim stanicama, vodi do postepenog razrjeđivanja i konačnog gubitka plazmida kroz stanične diobe. Sukladno tome, gubi se ekspresija i aktivnost transgena. Kako bi se potvrdio postepeni gubitak dCas9-DNMT3A-kodirajućeg vektora iz stanica, qPCR-om je kvantificirana plazmidna DNA u staničnim lizatima prikupljenima do 16. dana nakon transfekcije. Količina plazmida normalizirana je u odnosu na jedinstvenu sekvencu staničnog genoma (Slika 19). Broj molekula plazmida po stanici naglo opada do sedmoga dana nakon transfekcije, da bi se do devetoga dana spustio gotovo na nulu. Takvi rezultati upućuju na gubitak ekspresije transgena s metiltransferaznom aktivnošću, što može biti uzrok djelomičnog ili potpunog gubitka uspostavljene hipermetilacije.



Slika 19. Relativna količina plazmida pdCas9-DNMT3A u stanicama nakon transfekcije. Količina plazmidne DNA u stanicama kvantificirana je qPCR-om u određenim vremenskim periodima nakon transfekcije aktivnim ili inaktivnim oblikom vektora pdCas9-DNMT3A koji ko-ekspirira BACH2-sgRNA8. Iskazana je relativna količina molekula plazmida u odnosu na stanični genom.

5 RASPRAVA

Prenamjenom sustava CRISPR/Cas9 razvila sam molekularni alat za ciljanu metilaciju citozina u genomu stanica sisavaca. Jednostavnost navođenja fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A na ciljanu sekvencu DNA pomoću kratke komplementarne molekule RNA predstavlja značajnu prednost u odnosu na slične kimerne DNA metiltransferaze. Naime, primjena alata za ciljanu metilaciju DNA koji se temelje na prepoznavanju sekvence pomoću dizajniranih modularnih proteina s motivima cinkovih prstiju (96) ili TALE-proteina (122) zahtijeva konstrukciju novog polipeptida za svaki ciljani lokus. Dodatna prednost sustava CRISPR/Cas9 je mogućnost istovremenog navođenja na dvije ili više genomskih sekvenci (engl. *multiplexing*) ko-ekspresijom različitih molekula sgRNA (115), što se može iskoristiti za ciljanje više gena ili različitih pozicija unutar jedne regulatorne regije. S obzirom na to da se sekvencija PAM (NGG) u ljudskom genomu nalazi jednom svakih 8 pb u prosjeku (115), konstrukt SpCas9-DNMT3A može se navesti na gotovo svaku sekvencu od interesa. Jedan od nedostataka sustava CRISPR/Cas9 u odnosu na modularne proteine koji vežu DNA je veličina proteina SpCas9 (~160 kDa), koji s pridodanom katalitičkom domenom DNMT3A (~35 kDa) zahtijeva veliki ekspresijski vektor (~10 kb), što potencijalno ograničava učinkovitost i način unosa transgena u stanice (123). Jedno od mogućih rješenja je upotreba manjih ortologa proteina SpCas9, primjerice iz vrsta *Neisseria meningitidis* (~130 kDa) i *Staphylococcus aureus* (~115 kDa).

Pokazala sam da C-terminalnom fuzijom katalitičke domene DNMT3A na protein dCas9 nastaje aktivni kimerni enzim koji može katalizirati metilaciju citozina s obje strane veznog mjesta određenog pridruženom molekulom sgRNA. Dvije različite proteinske i funkcionalne domene (domenu vezanja na DNA i DNA metiltransferaznu domenu) povezala sam kratkim fleksibilnim peptidnim linkerom sastava Gly₄Ser (Slika 11), kako bi bilo moguće pravilno namatanje i neovisno djelovanje individualnih polipeptida (120). Navođenje konstrukta dCas9-DNMT3A na nemetilirane promotorske regije (razina metilacije <5%) u stanicama HEK293 rezultiralo je porastom razine metilacije citozina do otprilike 60% unutar ciljanog područja, što je usporedivo s učinkovitošću kimernih metiltransferaza ZF-DNMT3A (96), ZF-DNMT3A-3L (124) i TALE-DNMT3A-3L (122). Za te fuzijske proteine također je pokazano da induciraju metilaciju citozina u neposrednoj blizini i s obje strane mjesta vezanja na molekulu DNA. Iako se za fuzijski protein ZF-DNMT3A pokazalo da učinkovito katalizira hipermetilaciju ciljanih CpG mjesta bez obzira na redoslijed domena u polipeptidnom lancu (96), u sklopu ovog istraživanja testirala sam samo fuzijski protein s domenom DNMT3A

vezanom na C-kraj proteina dCas9. Moguće da bi fuzijski protein s obrnutim redosljedom domena bio jednako aktivan, s obzirom na to da su opisane funkcionalne fuzije raznih efektorskih domena na oba kraja proteina dCas9 (125–127).

Za navođenje konstrukta dCas9-DNMT3A na promotorske regije gena *BACH2* i *IL6ST* dizajnirala sam po nekoliko različitih sekvenci sgRNA. Velika učestalost sekvence PAM (NGG) omogućava navođenje na gotovo bilo koje područje u genomu, no primijećeno je da se učinkovitost različitih molekula sgRNA može znatno razlikovati (128,129). Pretpostavlja se da učinkovitost ovisi o nukleotidnom sastavu samog veznog mjesta i/ili okolne sekvence, stanju kromatina na tom području i prisutnosti transkripcijskih faktora (130). Iako su razvijeni algoritmi za odabir optimalnih sekvenci sgRNA (78,129), preporuča se testirati nekoliko različitih sekvenci kako bi se identificirala barem jedna funkcionalna (131). Na primjeru lokusa *BACH2* pokazala sam da učinkovitost ciljane metilacije pomoću konstrukta dCas9-DNMT3A može uvelike ovisiti o pridruženoj molekuli sgRNA (Slika 13).

Porast metilacije pojedinačnih CpG mjesta unutar ciljanih promotorskih regija ovisio je o mjestu vezanja i orijentaciji molekule sgRNA korištene za navođenje konstrukta dCas9-DNMT3A. Naime, svaka molekula sgRNA reproducibilno je rezultirala drugačijim, jedinstvenim profilom metilacije. Razina metilacije CpG mjesta smještenih unutar ili vrlo blizu veznog mjesta nije porasla, što upućuje na stabilno vezanje fuzijskog proteina na sekvencu DNA komplementarnu pridruženoj molekuli sgRNA. U skladu s time, vezana DNA bila je nedostupna metiltransferaznoj aktivnosti konstrukta dCas9-DNMT3A. Zanimljivo je da neka od susjednih CpG mjesta, međusobno udaljenih samo nekoliko nukleotida, nisu bila jednako učinkovito metilirana. Sličan nejednolik profil metilacije susjednih CpG mjesta dobiven je i prilikom ciljane metilacije CpG otoka pomoću kimerne metiltransferaze TALE-DNMT3A-3L (122). Uspostavljeni profil metilacije DNA mogao bi ovisiti o udaljenosti pojedinih CpG mjesta od mjesta vezanja konstrukta dCas9-DNMT3A, o lokalnom djelovanju endogenih faktora (prisutnost transkripcijskih faktora, položaj nukleosoma i sl.) te o pokretljivosti i procesivnosti katalitičke domene DNMT3A. DNA metiltransferaze kataliziraju dodatak metilne skupine na citozin na procesivan ili na distributivan način. Procesivna kataliza podrazumijeva metilaciju više CpG mjesta u nizu tijekom jednog događaja vezanja, dok u distributivnoj reakciji enzim disocira s molekule DNA nakon dodatka jedne metilne skupine. Na temelju analize *in vitro* zaključeno je da mišji enzim Dnmt3a djeluje na distributivan način (132). Suprotno tome kasnije je utvrđeno da ljudski oblik enzima DNMT3A djeluje procesivno na promotorima, pri čemu topologija DNA i interakcije s

drugim proteinima, primjerice DNMT3L, utječu na procesivnost metilacije *de novo* (133). Predloženo je da je upravo tetramerizacija proteina DNMT3A i DNMT3L potrebna za procesivnu katalizu metilacije CpG mjesta u nizu (134). Detaljnije analize mehanizama uspostave ciljane metilacije DNA nadilaze opseg ovog istraživanja, no moguće je zaključiti da uspješno eksperimentalno navođenje metilacije na određenu regiju DNA ili definirano manje područje koje obuhvaća samo nekoliko CpG mjesta zahtijeva testiranje više različitih molekula sgRNA s veznim mjestima u blizini ciljane sekvence.

Ko-transfekcijom više različitih molekula sgRNA moguće je navesti efektorsku domenu na nekoliko genomskih sekvenci istovremeno, bilo da se radi o različitim lokusima ili različitim bliskim pozicijama unutar jednog lokusa. U nekoliko je navrata utvrđeno da učinkovita aktivacija gena pomoću sustava CRISPR/dCas9 zahtijeva ko-ekspresiju više različitih molekula sgRNA koje se vežu uzduž jednog lokusa te djeluju sinergistički (86,88,135). S druge strane, učinkovita aktivacija gena postignuta je ciljanom acetilacijom promotora ili pojačivača pomoću histonske acetiltransferaze dCas9-p300 bez obzira na to jesu li za navođenje korištene pojedinačne molekule sgRNA ili njihova kombinacija. Ipak, na pojedinim lokusima ko-transfekcijom više različitih molekula sgRNA postignut je aditivan aktivacijski učinak (16). Pokazala sam da navođenje konstrukta dCas9-DNMT3A pomoću kombinacije sgRNA rezultira nešto drugačijim profilom metilacije ciljanih lokusa u odnosu na pojedinačne sgRNA (Slika 15). Molekule sgRNA koje su samostalno pokazivale najveću aktivnost najviše su doprinijele ukupnom profilu metilacije. Primjerice, profil metilacije fragmenta BACH2-B najviše je nalikovao onom dobivenom s pojedinačnom molekulom BACH2-sgRNA3 (Slika 15A). Razina metilacije nekih CpG mjesta dodatno je porasla, dok je na lokusu *IL6ST* primjena kombinacije sgRNA imala aditivan učinak na pojedina CpG mjesta (Slika 15C). Važno je napomenuti da sam koristila jednaku ukupnu količinu plazmidne DNA u svim eksperimentima, što znači da je količina transgena koji kodira za fuzijski protein dCas9-DNMT3A ostala nepromijenjena, dok su pojedinačni geni za sgRNA bili prisutni u razmjerno manjoj količini (8 puta za lokus *BACH2*, 4 puta za lokus *IL6ST*). S obzirom na to da su se vezna mjesta pojedinih sgRNA međusobno preklapala ili su pokrivala dio ciljanih CpG mjesta (Slika 10), dobiveni su profili metilacije koji ukazuju na moguću steričku interferenciju među konstruktima koji se vežu u neposrednoj blizini. Za ciljanu metilaciju šireg područja bilo bi potrebno odabrati vezna mjesta koja neće međusobno interferirati.

U stanicama u kojima je s aktivnim oblikom metiltransferaze dCas9-DNMT3A ko-ekspimirana *non-targeting* sgRNA razina metilacije ciljanih lokusa ostala je niska (do 5%),

što dokazuje da ciljana metilacija citozina ovisi o specifičnom navođenju pomoću pridružene komplementarne molekule sgRNA, a nije izazvana samom prekomjernom ekspresijom proteina s metiltransferaznom aktivnošću. Osim toga, ciljana metilacija izostala je i u stanicama sa specifično navođenim, no inaktivnim oblikom proteina dCas9-DNMT3A, što potvrđuje da hipermetilacija ciljanog lokusa iziskuje netaknutu katalitičku aktivnost DNA metiltransferaze. Blagi porast metilacije ciljanog fragmenta u stanicama s inaktivnim fuzijskim proteinom dogodio se u samo jednom slučaju (Slika 13C). S obzirom na to da ko-transfekcija iste molekule sgRNA i proteina dCas9 bez vezane domene DNMT3A nije izazivala porast razine metilacije DNA, može se zaključiti da rezidualna aktivnost proizlazi iz prisutnosti katalitičke domene DNMT3A. Moguće objašnjenje porasta metilacije u nekim slučajevima gdje su stanice bile transficirane inaktivnim fuzijskim proteinom je da je inaktivna domena zadržala sposobnost regrutacije endogenih aktivnih monomera DNMT3A, što je primijećeno i od strane drugih autora (136). Naime, od prije je poznato da se dva monomera DNMT3A vežu na DNA i zajedno s dva monomera proteina DNMT3L djeluju kao heterotetramer. Stvaranje takvih tetramernih kompleksa zaslužno je za povećanu DNA metiltransferaznu aktivnost (137).

Osim što sam pokazala da sama prekomjerna ekspresija egzogene DNA metiltransferaze nije izazvala porast razine metilacije ciljanih lokusa, analizom ponavljajućih elemenata LINE-1 utvrdila sam da nije došlo do značajne promjene u globalnoj metilaciji genoma (Slika 16). Analiza metilacije sekvence LINE-1, prisutne u ljudskom genomu u velikom broju kopija, često se koristi za procjenu globalne metilacije genoma (19,121), iako ne pruža informaciju o eventualnoj promjeni metilacije jedinstvenih sekvenci u genomu. Kako bi se isključila mogućnost bilo kakvog nespecifičnog djelovanja proteina dCas9-DNMT3A, bilo bi potrebno provesti cjelogenomsko bisulfitno sekvenciranje (engl. *whole genome bisulphite sequencing*, WGBS). Alternativa cjelogenomskom sekvenciranju je ciljana analiza potencijalnih regulatornih regija bisulfitnim sekvenciranjem CpG-bogatog dijela genoma (engl. *reduced representation bisulfite sequencing*, RRBS) (138) ili upotreba posebnih hibridizacijskih mikročipova za analizu metilacije (139).

Za kimerne metiltransferaze ZF-DNMT3A i TALE-DNMT3A-3L utvrđeno je da uzrokuju hipermetilaciju CpG mjesta udaljenih čak nekoliko stotina parova baza od ciljanog veznog mjesta (96,124,122). U sklopu ovog istraživanja kvantificirala sam djelovanje konstrukta dCas9-DNMT3A na pojedinačna CpG mjesta u neposrednoj blizini veznog mjesta, no zbog ograničenja korištene metode za analizu metilacije DNA (postojeća tehnologija

omogućava pirosekvenciranje fragmenata duljine do ~100 pb) nisu analizirani nešto udaljeniji dijelovi molekule DNA. Postoji mogućnost da specifično navođeni konstrukt dCas9-DNMT3A uzrokuje metilaciju CpG mjesta koja su u primarnoj strukturi molekule DNA udaljena od veznog mjesta, ali dolaze u fizičku blizinu zbog interakcija višeg reda u trodimenzionalnoj strukturi kromatina.

Metilacija CpG mjesta unutar promotorske regije, odnosno u okolini TSS-a i 5' kraja gena, negativno je korelirana s transkripcijskom aktivnošću gena (140). Pokazala sam da je u stanicama u kojima je ciljano hipermetiliran dio promotora gena *BACH2* ili *IL6ST* došlo do smanjenja njihove transkripcije. Ekspresija oba gena smanjila se za otprilike 50% nakon ko-transfekcije stanica kombinacijom više različitih molekula sgRNA za pojedini lokus (Slika 17). Slično smanjenje transkripcije gena *p16* (*CDKN2A*) nedavno je postignuto pomoću kimerne metiltransferaze TALE-DNMT3A-3L (122). Zanimljivo je da je gen *BACH2* statistički značajno utišan za otprilike 30% i u stanicama koje su transficirane specifično navođenim inaktivnim oblikom fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A, bez istovremene hipermetilacije ciljane sekvence (Slika 15A i B, Slika 17A). Utišavanje ekspresije neovisno o metilacijskoj aktivnosti moglo bi se objasniti fenomenom CRISPRi, odnosno zaustavljanjem transkripcijske mašinerije zbog steričkih smetnji uzrokovanih vezanjem navođenog fuzijskog proteina na molekulu DNA u području promotora (87). Iako je ekspresija ciljanih gena analizirana osmog dana nakon transfekcije, kada je bitno smanjena količina vektora u stanicama (Slika 19), a vjerojatno time i fuzijskog proteina kojeg kodira, moguće da je mala količina navođenog konstrukta vezanog na ciljani lokus dovoljna za interferenciju transkripcije. Osim toga, moguće je da fuzijski protein dCas9-DNMT3A ima intrinzičnu represivnu funkciju neovisnu o metiltransferaznoj aktivnosti. Naime, dokazano je da proteini iz obitelji DNMT regrutiraju histonske deacetilaze i komplekse za remodeliranje kromatina, što ima represivan učinak na ekspresiju, neovisno o metilaciji DNA (141,52).

Polazeći od pretpostavke o stabilnom održavanju metilacije DNA kroz stanične diobe, cilj eksperimentalnog pristupa bilo je kratkotrajno djelovanje na ciljani lokus prolaznom transfekcijom konstrukta dCas9-DNMT3A. Očekivano, ekspresijski vektor se izgubio iz stanica nakon određenog vremena (Slika 19), najvjerojatnije zbog „razrjeđivanja“ molekula plazmida kroz stanične diobe. Vektorski konstrukti nisu sadržavali elemente potrebne za održavanje u episomalnom obliku u jezgri transficirane stanice. Kratkotrajna selekcija antibiotikom provedena je samo radi obogaćenja populacije transficiranih stanica, a ne radi uspostave stabilno transficiranih staničnih linija. Detaljnim praćenjem dinamike uspostavljene

hipermetilacije u stanicama koje se aktivno dijele ustanovila sam da razina metilacije ciljanih CpG mjesta dostiže maksimum otprilike tjedan dana nakon transfekcije, te zatim postepeno opada gotovo do osnovne, nisko metilirane razine. Zanimljivo je da su sva hipermetilirana CpG mjesta unutar pojedinog ciljanog fragmenta, bilo da se radilo o BACH2-A ili IL6ST-A, podjednakim tempom dobila i izgubila metilacijsku oznaku (Slika 18). Takva sinkroniziranost daje naslutiti da na čitavom ciljanom području djeluju jednaki mehanizmi metilacije i demetilacije DNA. Slična nestabilnost uspostavljenih epigenetičkih oznaka i reaktivacija gena uočena je i kod metiltransferaza navođenih proteinima ZF, paralelno s gubitkom ekspresije kimerne metiltransferaze (142). Nasuprot tome, Rivenbark i sur. postigli su stabilnu metilaciju i utišavanje tumor-supresorskog lokusa *Maspin* (96). Razlike u stabilnosti uspostavljenih epigenetičkih promjena mogu proizlaziti iz drugačijeg eksperimentalnog pristupa. Naime, Rivenbark i sur. su uspostavili stabilne stanične linije, s metiltransferaznim transgenom ugrađenim u stanični genom. Iako je ekspresija transgena drastično smanjena u stabilnim linijama, ne može se isključiti bazalna ekspresija kimerne metiltransferaze u količini dovoljnoj za održavanje hipermetiliranog i utišanog stanja. Osim toga, moguće je da stabilnost uspostavljene epigenetičke modifikacije ovisi o kromatinskom kontekstu, odnosno intrinzičnim svojstvima svakog pojedinog lokusa (14). U sklopu ovog istraživanja ciljano sam modificirala samo dva različita promotora te na njima pratila dinamiku uspostavljenih metilacijskih oznaka. U određenom kontekstu možda je moguće postići trajnu metilaciju i utišavanje nekih gena.

Na temelju jednostavnog modela uspostave djelovanjem DNA metiltransferaza *de novo* i održavanja pomoću enzima DNMT1 (Slika 1), metilacija DNA dugo je smatrana stabilnom epigenetičkom oznakom. Novi eksperimentalni dokazi upućuju na složenu i dinamičnu prirodu metilacije DNA na svakom pojedinom lokusu, gdje postojanje metilacijskih oznaka ovisi o lokalnoj aktivnosti DNA metiltransferaza, demetilaza DNA, ali i drugih kromatinskih faktora. Postojanje metilacijske oznake stoga je rezultat regrutacije i regulacije brojnih faktora (7). Upravo bi fleksibilan molekularni alat za ciljanu metilaciju citozina opisan u ovom radu mogao pridonijeti rasvjetljavanju dinamične prirode metilacije DNA i njene interakcije s drugim endogenim faktorima.

Opisani sustav za ciljanu metilaciju DNA omogućava preciznu eksperimentalnu provjeru funkcije potencijalnih regulatornih regija ili čak pojedinih CpG mjesta u kontroli ekspresije gena. Naime, nije u potpunosti razjašnjeno ovisi li aktivnost gena o stanju metilacije šire genomske regije, kao što su cijeli CpG otoci veličine nekoliko kilobaza (kb) ili dijelovi

kromosoma veličine megabaza (Mb), ili je regulatorna uloga ograničena na kraću sekvencu DNA, koja obuhvaća nekoliko ili pak samo jedno CpG mjesto. Vjerojatno oba mehanizma djeluju na različitim lokusima u genomu. Primjerice, ustanovljeno je da u stanicama kolorektalnog karcinoma heterokromatinizacija čitave kromosomske pruge (2q.14.2) duljine 4 Mb posredovana hipermetilacijom DNA i metilacijom histona H3 na lizin 9 (H3K9me) uzrokuje utišavanje gena na cijelom tom području (143). U akutnoj leukemiji, gubitak ekspresije inhibitora ciklin-ovisne kinaze CDKN2B, kodiranog genom *p15^{INK4B}*, koreliran je s ukupnom gustoćom metilacije CpG otoka unutar promotora gena, a ne s metilacijom specifičnih CpG mjesta (144). S druge strane, poznati su slučajevi kada metilacija jednog ili samo nekoliko CpG mjesta može imati ključnu ulogu u regulaciji transkripcije. Primjerice, otkriveno je da su dva CpG mjesta u promotoru mišjeg gena *Oxtr* ključna za ukupni represivni utjecaj metilacije promotora na ekspresiju oksitocinskog receptora (*Oxtr*). Budući da se ta CpG mjesta nalaze unutar veznih mjesta za transkripcijski faktor Sp1 te za estrogenski receptor, pretpostavljeno je da njihova metilacija onemogućava vezanje aktivatora transkripcije (145).

Ciljano lokalno djelovanje na elemente epigenoma omogućava izravno istraživanje mehanizama regulacije ekspresije gena. Tako je moguće istražiti međuovisnost različitih epigenetičkih oznaka, redoslijed njihove uspostave, dinamiku metilacije DNA te vezu između metilacijskih oznaka na molekuli DNA i regrutacije transkripcijskih faktora ili kompleksa za remodeliranje kromatina. Razvoj molekularnih alata za ciljanu modifikaciju DNA i histona otvara mogućnost istraživanja epigenetičke regulacije složenih staničnih procesa, kao što je primjerice glikozilacija proteina. Glikozilacija imunoglobulina G složen je proces koji utječe na funkciju samog antitijela u imunološkom odgovoru čovjeka. Pretpostavlja se da je ovaj proces djelomično reguliran epigenetičkim mehanizmima (146). Potencijalna uloga metilacije citozina u regulaciji gena povezanih s glikozilacijom IgG-a, kao što su *BACH2* i *IL6ST* (108), može biti istražena korištenjem ovdje opisanog molekularnog alata za ciljanu metilaciju regije od interesa. Naime, ustanovili smo da postoje značajne razlike u razini CpG metilacije dijela promotora gena *BACH2* u stanicama krvi pacijenata koji boluju od upalnih bolesti crijeva u odnosu na zdrave osobe (neobjavljeni rezultati). U istoj kohorti pacijenata otkrivene su značajne razlike u IgG glikomu krvne plazme (106). Ciljanom metilacijom promotora gena *BACH2* u biološki relevantnom staničnom modelu, kao što su primarni B-limfociti ili limfoblastoidne stanične linije koje izlučuju IgG, moglo bi se ustanoviti utječe li represija endogenog transkripcijskog faktora *BACH2* na glikom izlučenog IgG-a.

Osim primjene u istraživanju epigenetičkih mehanizama, epigenetičko utišavanje gena ciljanom metilacijom poznatih regulatornih CpG mjesta ili regija ima primjenu u analizi funkcije gena, kao alternativa utišavanju interferencijom RNA (RNAi). U tom kontekstu i uz ispunjenje uvjeta specifične uspostave i stabilnog održavanja metilacije DNA, konstrukt dCas9-DNMT3A mogao bi imati terapijsku primjenu, primjerice za ciljano utišavanje ekspresije onkogenih gena u stanicama tumora.

6 ZAKLJUČAK

- Primjena prenamijenjenog sustava CRISPR/Cas9 s vezanom katalitičkom domenom ljudske DNA metiltransferaze DNMT3A omogućava ciljanu metilaciju DNA unutar regije od interesa.
- Bitne prednosti fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A u odnosu na slične kimerne DNA metiltransferaze su jednostavnost navođenja na ciljani lokus te mogućnost istovremenog navođenja na dvije ili više genomskih sekvenci.
- Navođenje fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A pomoću kratke komplementarne molekule RNA (sgRNA) rezultira povećanjem metilacije CpG mjesta koja se nalaze u blizini veznog mjesta, bilo uzvodno ili nizvodno.
- Ciljana metilacija DNA ovisi o očuvanosti metiltransferazne aktivnosti katalitičke domene DNMT3A te o navođenju posredovanom molekulom sgRNA koja je komplementarna ciljanom lokusu.
- Unutar ciljanog fragmenta DNA učinkovitost metilacije pojedinih CpG mjesta može se značajno razlikovati te ovisiti o mjestu vezanja i orijentaciji molekule sgRNA upotrijebljene za navođenje.
- Ko-transfekcija stanica kombinacijom više različitih molekula sgRNA za pojedini lokus može rezultirati dodatnim povećanjem razine inducirane metilacije DNA.
- Hipermetilacija fragmenata unutar promotora ciljanih gena *IL6ST* i *BACH2* u stanicama HEK293 popraćena je smanjenjem transkripcijske aktivnosti.
- Uspostavljena hipermetilacija ciljanih regija specifičnih gena ne održava se stabilno kroz diobe, već određeno vrijeme nakon transfekcije opada gotovo do osnovne razine.
- Opisana metoda može bitno doprinijeti rasvjetljavanju uzročno-posljedične veze između metilacije DNA i regulacije ekspresije gena.

7 LITERATURA

1. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem*. 2011 Jan 24;12(2):206–222.
2. Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell*. 2014 Jan 16;156(1-2):45–68.
3. Bergman Y, Cedar H. DNA methylation dynamics in health and disease. *Nat Struct Mol Biol*. 2013 Mar;20(3):274–281.
4. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2013 Mar;14(3):204–220.
5. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*. 2006 Feb;31(2):89–97.
6. Pelizzola M, Ecker JR. The DNA methylome. *FEBS Lett*. 2011 Jul 7;585(13):1994–2000.
7. Jeltsch A, Jurkowska RZ. New concepts in DNA methylation. *Trends Biochem Sci*. 2014 Jul;39(7):310–318.
8. De Groot ML, Verschure PJ, Rots MG. Epigenetic Editing: targeted rewriting of epigenetic marks to modulate expression of selected target genes. *Nucleic Acids Res*. 2012 Nov;40(21):10596–10613.
9. Köeferle A, Stricker SH, Beck S. Brave new epigenomes: the dawn of epigenetic engineering. *Genome Med*. 2015 Jun 19;7(1):59.
10. Wolfe SA, Nekudova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2000;29:183–212.
11. Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, Cunniff MM, Feng G, Zhang F. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc*. 2012 Jan 5;7(1):171–192.
12. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816–821.

13. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014 Jun 5;157(6):1262–1278.
14. Jurkowski TP, Ravichandran M, Stepper P. Synthetic epigenetics-towards intelligent control of epigenetic states and cell identity. *Clin Epigenetics*. 2015 Mar 4;7(1):18.
15. Thakore PI, Black JB, Hilton IB, Gersbach CA. Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nat Methods*. 2016 Feb;13(2):127–137.
16. Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol*. 2015 May;33(5):510–517.
17. Kearns NA, Pham H, Tabak B, Genga RM, Silverstein NJ, Garber M, et al. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nat Methods*. 2015 May;12(5):401–403.
18. Mikeska T, Felsberg J, Hewitt CA, Dobrovic A. Analysing DNA methylation using bisulphite pyrosequencing. *Methods Mol Biol*. 2011;791:33–53.
19. Yang AS, Estéicio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res*. 2004 Feb 18;32(3):e38.
20. Bird A. The dinucleotide CG as a genomic signalling module. *J Mol Biol*. 2011 May 27;409(1):47–53.
21. Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*. 2009 May 15;324(5929):929–930.
22. Wu H, D'Alessio AC, Ito S, Wang Z, Cui K, Zhao K, et al. Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev*. 2011 Apr 1;25(7):679–684.
23. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*. 2013 Oct 24;502(7472):472–479.

24. Wu TP, Wang T, Seetin MG, Lai Y, Zhu S, Lin K, et al. DNA methylation on N(6)-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature*. 2016 Apr 21;532(7599):329–333.
25. Nightingale KP. CHAPTER 1. Epigenetics - What it is and Why it Matters. In: Carey N, editor. *Epigenetics for Drug Discovery*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2015. p. 1–19.
26. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 2009 Nov 19;462(7271):315–322.
27. Guo JU, Su Y, Shin JH, Shin J, Li H, Xie B, et al. Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci*. 2014 Feb;17(2):215–222.
28. Schultz MD, He Y, Whitaker JW, Hariharan M, Mukamel EA, Leung D, et al. Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. *Nature*. 2015 Jul 9;523(7559):212–216.
29. Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res*. 1980 Apr 11;8(7):1499–1504.
30. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 1987 Jul 20;196(2):261–282.
31. Illingworth RS, Bird AP. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett*. 2009 Jun 5;583(11):1713–1720.
32. Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ, et al. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet*. 2010 Sep 23;6(9):e1001134.
33. Ziller MJ, Gu H, Müller F, Donaghey J, Tsai LT, Kohlbacher O, et al. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*. 2013 Aug 22;500(7463):477–481.
34. Herceg Z. Epigenetic Mechanisms as an Interface Between the Environment and Genome. *Adv Exp Med Biol*. 2016;903:3–15.

35. Ambatipudi S, Cuenin C, Hernandez-Vargas H, Ghantous A, Le Calvez-Kelm F, Kaaks R, et al. Tobacco smoking-associated genome-wide DNA methylation changes in the EPIC study. *Epigenomics*. 2016 May;8(5):599–618.
36. Hansen KD, Timp W, Bravo HC, Sabunciyan S, Langmead B, McDonald OG, et al. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet*. 2011 Aug;43(8):768–775.
37. Baylin S, Bestor TH. Altered methylation patterns in cancer cell genomes: cause or consequence? *Cancer Cell*. 2002 May;1(4):299–305.
38. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):683–692.
39. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999 Oct 29;99(3):247–257.
40. Klimasauskas S, Kumar S, Roberts RJ, Cheng X. HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell*. 1994 Jan;76(2):357–369.
41. Cheng X. Structure and function of DNA methyltransferases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1995;24:293–318.
42. Kumar S, Cheng X, Klimasauskas S, Mi S, Posfai J, Roberts RJ, et al. The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res*. 1994 Jan 11;22(1):1–10.
43. Gowher H, Jeltsch A. Molecular enzymology of the catalytic domains of the Dnmt3a and Dnmt3b DNA methyltransferases. *J Biol Chem*. 2002 Jun 7;277(23):20409–20414.
44. Maresca A, Zaffagnini M, Caporali L, Carelli V, Zanna C. DNA methyltransferase 1 mutations and mitochondrial pathology: is mtDNA methylated? *Front Genet*. 2015 Mar 12;6:90.
45. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*. 1998 Jul;19(3):219–220.

46. Liao J, Karnik R, Gu H, Ziller MJ, Clement K, Tsankov AM, et al. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nat Genet.* 2015 May;47(5):469–478.
47. Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet.* 2009 Nov;10(11):805–811.
48. Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, et al. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol.* 2002 Jan;22(2):480–491.
49. Arand J, Spieler D, Karius T, Branco MR, Meilinger D, Meissner A, et al. In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLoS Genet.* 2012 Jun 28;8(6):e1002750.
50. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 1999 Jun 1;27(11):2291–2298.
51. Gowher H, Liebert K, Hermann A, Xu G, Jeltsch A. Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J Biol Chem.* 2005 Apr 8;280(14):13341–13348.
52. Deplus R, Brenner C, Burgers WA, Putmans P, Kouzarides T, de Launoit Y, et al. Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res.* 2002 Sep 1;30(17):3831–3838.
53. Schaefer M, Lyko F. Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma.* 2010 Feb;119(1):35–40.
54. Jeltsch A, Ehrenhofer-Murray A, Jurkowski T, Lyko F, Reuter G, Ankri S, et al. Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation. *RNA Biol.* 2016 May 27;0.
55. Iguchi-Arigo SM, Schaffner W. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev.* 1989 May;3(5):612–619.

56. Bogdanović O, Veenstra GJ. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*. 2009 Oct;118(5):549–565.
57. Prokhortchouk E, Defossez PA. The cell biology of DNA methylation in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Nov;1783(11):2167–2173.
58. Gustems M, Woellmer A, Rothbauer U, Eck SH, Wieland T, Lutter D, et al. c-Jun/c-Fos heterodimers regulate cellular genes via a newly identified class of methylated DNA sequence motifs. *Nucleic Acids Res*. 2014 Mar;42(5):3059–3072.
59. Hu S, Wan J, Su Y, Song Q, Zeng Y, Nguyen HN, et al. DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors. *elife*. 2013 Sep 3;2:e00726.
60. Schmidl C, Klug M, Boeld TJ, Andreesen R, Hoffmann P, Edinger M, et al. Lineage-specific DNA methylation in T cells correlates with histone methylation and enhancer activity. *Genome Res*. 2009 Jul;19(7):1165–1174.
61. Wiench M, John S, Baek S, Johnson TA, Sung MH, Escobar T, et al. DNA methylation status predicts cell type-specific enhancer activity. *EMBO J*. 2011 Aug 3;30(15):3028–3039.
62. Aran D, Sabato S, Hellman A. DNA methylation of distal regulatory sites characterizes dysregulation of cancer genes. *Genome Biol*. 2013 Mar 12;14(3):R21.
63. Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet*. 1999 Jan;15(1):34–37.
64. Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsiganos A, Ong CT, et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res*. 2010 Mar;20(3):320–331.
65. Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell*. 2014 Oct 13;26(4):577–590.
66. Lou S, Lee HM, Qin H, Li JW, Gao Z, Liu X, et al. Whole-genome bisulfite sequencing of multiple individuals reveals complementary roles of promoter and gene body methylation in transcriptional regulation. *Genome Biol*. 2014 Jul 30;15(7):408.
67. Jjingo D, Conley AB, Yi SV, Lunyak VV, Jordan IK. On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget*. 2012 Apr;3(4):462–474.

68. Baubec T, Colombo DF, Wirbelauer C, Schmidt J, Burger L, Krebs AR, et al. Genomic profiling of DNA methyltransferases reveals a role for DNMT3B in genic methylation. *Nature*. 2015 Apr 9;520(7546):243–247.
69. McMahon MA, Rahdar M, Porteus M. Gene editing: not just for translation anymore. *Nat Methods*. 2012 Jan;9(1):28–31.
70. Jasin M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet*. 1996 Jun;12(6):224–228.
71. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet*. 2014 May;15(5):321–334.
72. Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2002 Jul;161(3):1169–1175.
73. Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*. 2011 Feb;29(2):143–148.
74. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014 Mar 6;507(7490):62–67.
75. Harrison MM, Jenkins BV, O'Connor-Giles KM, Wildonger J. A CRISPR view of development. *Genes Dev*. 2014 Sep 1;28(17):1859–1872.
76. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013 Nov;8(11):2281–2308.
77. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 2013 Sep;31(9):827–832.
78. Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*. 2016 Feb;34(2):184–191.

79. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 2016 Jan 28;529(7587):490–495.
80. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016 Jan 1;351(6268):84–88.
81. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*. 2015 Jul 23;523(7561):481–485.
82. Hou Z, Zhang Y, Propson NE, Howden SE, Chu LF, Sontheimer EJ, et al. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Sep 24;110(39):15644–15649.
83. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015 Oct 22;163(3):759–771.
84. Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, et al. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell*. 2015 Nov 5;60(3):385–397.
85. Gao F, Shen XZ, Jiang F, Wu Y, Han C. DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Nat Biotechnol*. 2016 Jul;34(7):768–773.
86. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013 Feb 28;152(5):1173–1183.
87. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 2013 Jul 18;154(2):442–451.
88. Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*. 2013 Oct;23(10):1163–1171.

89. Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods*. 2013 Oct;10(10):973–976.
90. Thakore PI, D’Ippolito AM, Song L, Safi A, Shivakumar NK, Kabadi AM, et al. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat Methods*. 2015 Dec;12(12):1143–1149.
91. Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li GW, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*. 2013 Dec 19;155(7):1479–1491.
92. Zalatan JG, Lee ME, Almeida R, Gilbert LA, Whitehead EH, La Russa M, et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell*. 2015 Jan 15;160(1-2):339–350.
93. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012 Sep 6;489(7414):57–74.
94. Roadmap Epigenomics Consortium, Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*. 2015 Feb 19;518(7539):317–330.
95. Li F, Papworth M, Minczuk M, Rohde C, Zhang Y, Ragozin S, et al. Chimeric DNA methyltransferases target DNA methylation to specific DNA sequences and repress expression of target genes. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(1):100–112.
96. Rivenbark AG, Stolzenburg S, Beltran AS, Yuan X, Rots MG, Strahl BD, et al. Epigenetic reprogramming of cancer cells via targeted DNA methylation. *Epigenetics*. 2012 Apr 1;7(4):350–360.
97. Nunna S, Reinhardt R, Ragozin S, Jeltsch A. Targeted methylation of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) promoter to silence its expression in ovarian cancer cells. *PLoS ONE*. 2014 Jan 29;9(1):e87703.
98. Maeder ML, Angstman JF, Richardson ME, Linder SJ, Cascio VM, Tsai SQ, et al. Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nat Biotechnol*. 2013 Dec;31(12):1137–1142.

99. Falahi F, Huisman C, Kazemier HG, van der Vlies P, Kok K, Hospers GA, et al. Towards sustained silencing of HER2/neu in cancer by epigenetic editing. *Mol Cancer Res.* 2013 Sep;11(9):1029–1039.
100. Mendenhall EM, Williamson KE, Reyon D, Zou JY, Ram O, Joung JK, et al. Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers. *Nat Biotechnol.* 2013 Dec;31(12):1133–1136.
101. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Hsu PD, Heidenreich M, Cong L, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature.* 2013 Aug 22;500(7463):472–476.
102. Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Oct 21;
103. Lauc G, Vojta A, Zoldoš V. Epigenetic regulation of glycosylation is the quantum mechanics of biology. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jan;1840(1):65–70.
104. Kobata A. The N-linked sugar chains of human immunoglobulin G: their unique pattern, and their functional roles. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Mar;1780(3):472–478.
105. Masuda K, Kubota T, Kaneko E, Iida S, Wakitani M, Kobayashi-Natsume Y, et al. Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mol Immunol.* 2007 May;44(12):3122–3131.
106. Trbojević Akmačić I, Ventham NT, Theodoratou E, Vučković F, Kennedy NA, Krištić J, et al. Inflammatory bowel disease associates with proinflammatory potential of the immunoglobulin G glycome. *Inflamm Bowel Dis.* 2015 Jun;21(6):1237–1247.
107. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers.* 2008;25(4-5):267–278.
108. Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adamczyk B, Mužinić A, et al. Loci associated with N-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers. *PLoS Genet.* 2013 Jan 31;9(1):e1003225.

109. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012 Nov 1;491(7422):119–124.
110. Igarashi K, Ochiai K, Itoh-Nakadai A, Muto A. Orchestration of plasma cell differentiation by Bach2 and its gene regulatory network. *Immunol Rev*. 2014 Sep;261(1):116–125.
111. Chen ZX, Mann JR, Hsieh CL, Riggs AD, Chédin F. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J Cell Biochem*. 2005 Aug 1;95(5):902–917.
112. Gowher H, Loutchanwoot P, Vorobjeva O, Handa V, Jurkowska RZ, Jurkowski TP, et al. Mutational analysis of the catalytic domain of the murine Dnmt3a DNA-(cytosine C5)-methyltransferase. *J Mol Biol*. 2006 Mar 31;357(3):928–941.
113. O’Brien A, Bailey TL. GT-Scan: identifying unique genomic targets. *Bioinformatics*. 2014 Sep 15;30(18):2673–2675.
114. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*. 2014 Aug;11(8):783–784.
115. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):819–823.
116. Zoldoš V, Horvat T, Novokmet M, Cuenin C, Mužinić A, Pučić M, et al. Epigenetic silencing of HNF1A associates with changes in the composition of the human plasma N-glycome. *Epigenetics*. 2012 Feb;7(2):164–172.
117. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101–1108.
118. Van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2257–2317.

119. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.
120. Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Oct;65(10):1357–1369.
121. Lisanti S, Omar WA, Tomaszewski B, De Prins S, Jacobs G, Koppen G, et al. Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. *PLoS ONE.* 2013 Nov 18;8(11):e79044.
122. Bernstein DL, Le Lay JE, Ruano EG, Kaestner KH. TALE-mediated epigenetic suppression of CDKN2A increases replication in human fibroblasts. *J Clin Invest.* 2015 May;125(5):1998–2006.
123. Gupta RM, Musunuru K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J Clin Invest.* 2014 Oct 1;124(10):4154–4161.
124. Siddique AN, Nunna S, Rajavelu A, Zhang Y, Jurkowska RZ, Reinhardt R, et al. Targeted methylation and gene silencing of VEGF-A in human cells by using a designed Dnmt3a-Dnmt3L single-chain fusion protein with increased DNA methylation activity. *J Mol Biol.* 2013 Feb 8;425(3):479–491.
125. Chakraborty S, Ji H, Kabadi AM, Gersbach CA, Christoforou N, Leong KW. A CRISPR/Cas9-based system for reprogramming cell lineage specification. *Stem Cell Reports.* 2014 Dec 9;3(6):940–947.
126. Malina A, Mills JR, Cencic R, Yan Y, Fraser J, Schippers LM, et al. Repurposing CRISPR/Cas9 for in situ functional assays. *Genes Dev.* 2013 Dec 1;27(23):2602–2614.
127. Gao X, Tsang JC, Gaba F, Wu D, Lu L, Liu P. Comparison of TALE designer transcription factors and the CRISPR/dCas9 in regulation of gene expression by targeting enhancers. *Nucleic Acids Res.* 2014 Nov 10;42(20):e155.
128. Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science.* 2014 Jan 3;343(6166):80–84.

129. Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol.* 2014 Dec;32(12):1262–1267.
130. Xu H, Xiao T, Chen CH, Li W, Meyer CA, Wu Q, et al. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. *Genome Res.* 2015 Aug;25(8):1147–1157.
131. Barrangou R, Birmingham A, Wiemann S, Beijersbergen RL, Hornung V, Smith AV. Advances in CRISPR-Cas9 genome engineering: lessons learned from RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 2015 Apr 20;43(7):3407–3419.
132. Gowher H, Jeltsch A. Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG [correction of non-CpA] sites. *J Mol Biol.* 2001 Jun 22;309(5):1201–1208.
133. Holz-Schietinger C, Reich NO. The inherent processivity of the human de novo methyltransferase 3A (DNMT3A) is enhanced by DNMT3L. *J Biol Chem.* 2010 Sep 17;285(38):29091–29100.
134. Holz-Schietinger C, Matje DM, Harrison MF, Reich NO. Oligomerization of DNMT3A controls the mechanism of de novo DNA methylation. *J Biol Chem.* 2011 Dec 2;286(48):41479–41488.
135. Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, Fu Y, Ho QH, Joung JK. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods.* 2013 Oct;10(10):977–979.
136. Van Emburgh BO, Robertson KD. Modulation of Dnmt3b function in vitro by interactions with Dnmt3L, Dnmt3a and Dnmt3b splice variants. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jul;39(12):4984–5002.
137. Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature.* 2007 Sep 13;449(7159):248–251.
138. Meissner A, Gnirke A, Bell GW, Ramsahoye B, Lander ES, Jaenisch R. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 2005 Oct 13;33(18):5868–5877.

139. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 2011 Oct;98(4):288–295.
140. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012 Jul;13(7):484–492.
141. Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M, Kouzarides T. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J*. 2001 May 15;20(10):2536–2544.
142. Kungulovski G, Nunna S, Thomas M, Zanger UM, Reinhardt R, Jeltsch A. Targeted epigenome editing of an endogenous locus with chromatin modifiers is not stably maintained. *Epigenetics Chromatin*. 2015 Mar 18;8:12.
143. Frigola J, Song J, Stirzaker C, Hinshelwood RA, Peinado MA, Clark SJ. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet*. 2006 May;38(5):540–549.
144. Cameron EE, Baylin SB, Herman JG. p15(INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood*. 1999 Oct 1;94(7):2445–2451.
145. Mamrut S, Harony H, Sood R, Shahar-Gold H, Gainer H, Shi YJ, et al. DNA methylation of specific CpG sites in the promoter region regulates the transcription of the mouse oxytocin receptor. *PLoS ONE*. 2013 Feb 18;8(2):e56869.
146. Menni C, Keser T, Mangino M, Bell JT, Erte I, Akmačić I, et al. Glycosylation of immunoglobulin g: role of genetic and epigenetic influences. *PLoS ONE*. 2013 Dec 6;8(12):e82558.

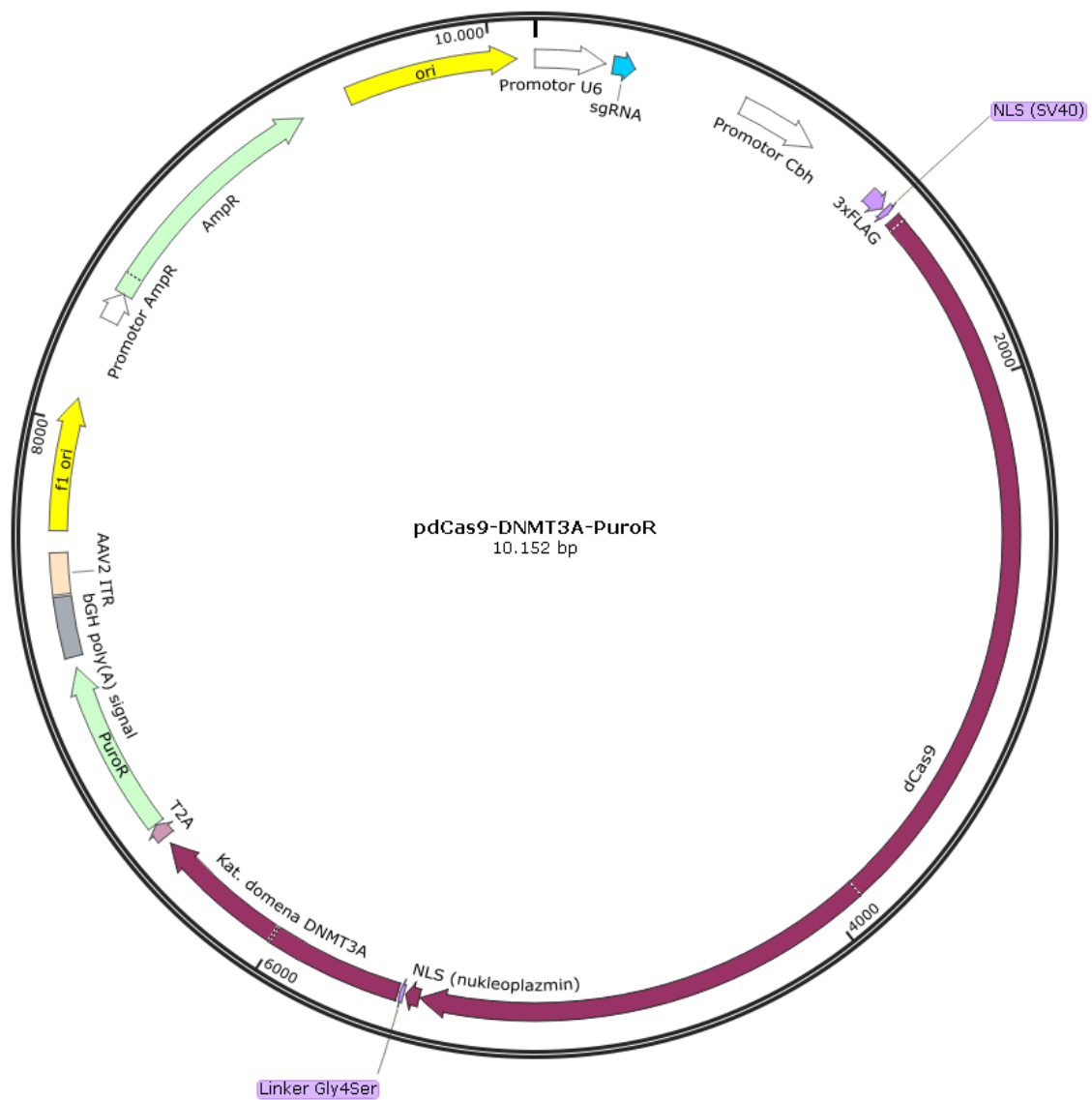
8 POPIS KRATICA

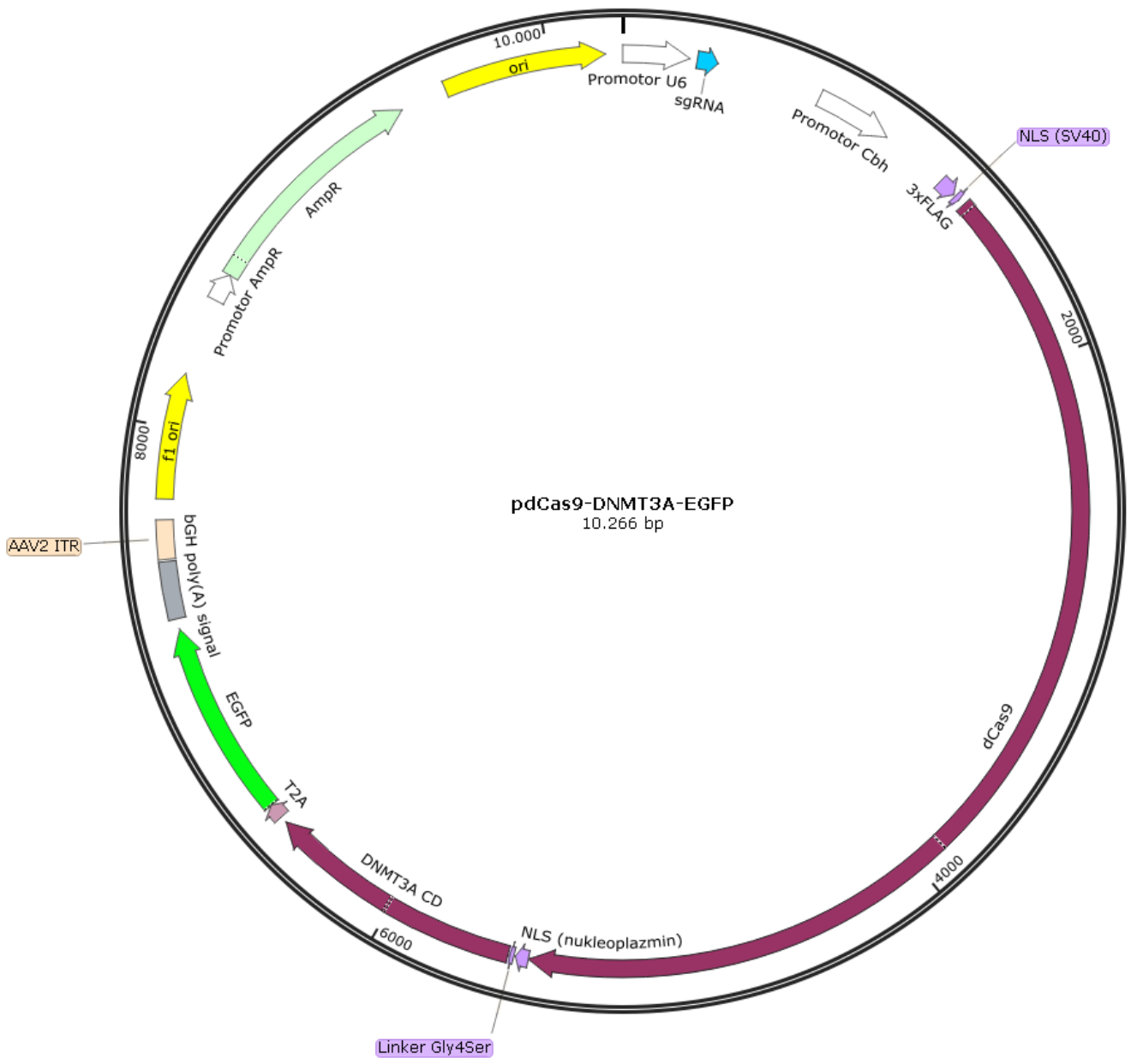
5caC	5-karboksilcitozin
5fC	5-formilcitozin
5hmC	5-hidroksimetilcitozin
5mC	5-metilcitozin
aa	aminokiselina, od engl. <i>aminoacid</i>
ADCC	stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima (od engl. <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
ADD	ATRX–Dnmt3–Dnmt3L
AdoMet	S-adenozil-L-metionin
ANOVA	analiza varijance, od engl. <i>analysis of variance</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
BACH2	<i>BTB And CNC Homolog 2</i>
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
Cas9n	<i>Cas9 nickase</i>
Cbh	hibridni oblik promotora CBA (od engl. <i>chicken β-actin</i>)
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CRISPRa	<i>CRISPR activation</i>
CRISPRi	<i>CRISPR interference</i>
crRNA	CRISPR-RNA
dCas9	inaktivna nukleaza Cas9, od engl. <i>deactivated Cas9</i>
DMAP	<i>DNA methyltransferase associated protein</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNMT	DNA metiltransferaza
DSB	dvostruki lom u molekuli DNA, od engl. <i>double-stranded break</i>
EGFP	poboljšani zeleni fluorescentni protein, od engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>
FBS	goveđi fetalni serum, od engl. <i>fetal bovine serum</i>
GWAS	cjelogenomska studija povezanosti, od engl. <i>genome-wide association study</i>
H3K27ac	acetilaciju lizina na poziciji 27 histona H3
H3K36me3	trimetilacija lizina na poziciji 36 histona H3
H3K9me	metilacija lizina na poziciji 9 histona H3
HDAC	deacetilaza histona, od engl. <i>histone deacetylase</i>

HEK293	stanična linija embrionalnog bubrega čovjeka, od engl. <i>human embryonic kidney</i>
HSV-1	<i>herpes simplex virus type 1</i>
IBD	upalna bolest crijeva, od engl. <i>inflammatory bowel disease</i>
ICF	sindrom imunodeficijencije, centromerne nestabilnosti i anomalija lica, od engl. <i>immunodeficiency, centromeric region instability and facial anomalies syndrome</i>
IgG	imunoglobulin G
IL-6	interleukin 6
IL6ST	<i>interleukin 6 signal transducer</i>
LINE-1	<i>long interspersed nucleotide element 1</i>
MBD	<i>methyl-CpG-binding domain</i>
N6-mA	N6-metiladenin
NHEJ	sparivanje nehomolognih krajeva, od engl. <i>nonhomologous end-joining</i>
NmCas9	nukleaza Cas9 iz bakterije <i>Neisseria meningitides</i>
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
pb	parova baza
PBS	fosfatni pufer, od engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	lančana reakcija polimerazom (od engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PHD	<i>plant homeodomain</i> ; isto što i ADD
qPCR	kvantitativni PCR u stvarnom vremenu
RFTS	<i>replication foci targeting sequence</i>
RGEN	<i>RNA-guided engineered nuclease</i>
RNAi	interferencija RNA
RRBS	<i>reduced representation bisulphite sequencing</i>
RVD	<i>repeat variable diresidues</i>
SaCas9	nukleaza Cas9 iz bakterije <i>Staphylococcus aureus</i>
SAM	S-adenozil-L-metionin
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
SpCas9	nukleaza Cas9 iz bakterije <i>Streptococcus pyogenes</i>
St1Cas9	nukleaza Cas9 iz bakterije <i>Streptococcus thermophilus</i>
TALEN	<i>transcription activator-like effector nuclease</i>
TET	5mC dioksigenaza, od engl. <i>ten-eleven translocation</i>

TF	transkripcijski faktor
tracrRNA	<i>trans-activating crRNA</i>
TSS	mjesto početka transkripcije, od engl. <i>transcription start site</i>
WGBS	cjelogenomsko bisulfitno sekvenciranje, od engl. <i>whole genome bisulphite sequencing</i>
ZFN	nukleaza s motivom cinkovih prstiju, od engl. <i>zinc-finger nuclease</i>

9 PRILOG 1. Mape konstruiranih plazmidnih vektora





PRILOG 2. Polipeptidna sekvenca konstruiranih fuzijskih proteina

Sekvenca konstrukta dCas9-DNMT3A-PuroR:

DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKKVGIHGVPAAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSK
FKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEFSNEMAKVDDSFHRLLES
FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVSTDKADLRLLYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPD
NSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTP
NFKSNFDLAEDAKLQLSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKAPLSAMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNR
EDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR
KSEETITPWNFEVVDKGASQAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPA
FLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN
EDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKS
DGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRH
KPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYV
DQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGSNDNPSEEVVKKMKNYWRQLNAKLITQ
RKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFR
KDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSESEQEIGKATAYFF
YSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESI
LPKRNSDKLIARKKDWDPKKGFFSPTVAYSVLVAKVEKGSKLLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLE
AKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLAHYEKLKGSPEDEQK
QLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFYFDT
TIDRKRYTSTKEVLDTLHQHSITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKAGQAKKKKLEGGGSGSPRLQMFF
ANNHDQEFDPKVPVPAEKRPVLSLFDGIATGLLVKDLGIQVDRIASEVCEDSITVGMVRHQGKI
MYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPF
FWLFE^ENVAMGVSDKRDISRFLSNPVMIDAKEVSAHRARYFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQECL
EHGRIAKFSKVRTITRSNSIKQGDQHFVFMNEKEDILWCTEMERVFVGFVHYTDVSNMSRLARQLL
GRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACVSGRPEFGSGEGRGSLLTCGDVEENPGP^{MTEYKPTVRLATRDDVPRAV}
RTLAAAFADYPATRHRTVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVWVADDGAAVAVWTTPESEAGAVFA
EIGPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHRPKPAWFLATVGVSPDHQKGLGSAVVLPGVEAAERAGVP
AFLETSAPHNLFPYERLGFTVTADVEVPEGPRTWCMTTRKPGA

Legenda:

Epitopska oznaka 3xFLAG; signal za lokalizaciju u jezgri NLS (SV40); domena dCas9;
signal za lokalizaciju u jezgri NLS (nukleoplazmin); linker Gly₄Ser; katalitička domena
DNMT3A; samo-cijepajući peptid T2A; protein EGFP

(Drugi cistron je podcrtan; žutom bojom istaknut je Glu (E) mutiran u Ala (A) u inaktivnom
obliku konstrukta dCas9-DNMT3A-ANV)

Sekvenca konstrukta dCas9-DNMT3A-EGFP:

DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKKVGIHGVPAAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKK
FKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLES
FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPD
NSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSGLTP
NFKSNFDLAEDAKLQLSKDYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKAPLSASMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNR
EDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFPFLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR
KSEETITPWNFEVVDKASQAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPA
FLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEEN
EDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKS
DGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRH
KPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYV
DQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ
RKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFR
KDFQFYKREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFF
YSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESI
LPKRNSDKLIARKKDWDPKKGFFSPTVAVSVLVVAKVEKGSKKLKSVKELGITIMERSSEKFNPIDFLE
AKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYLASHYEKLGSPEDNEQK
QLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDT
TIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKAGQAKKKLEGGGSGSPRLQMF
ANNHDQEFDPKVPVPAEKRPVLSLFDGIATGLLVKDLGIQVDRYIASEVCEDSITVGMVRHQGKI
MYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPF
FWLFE NVVAMGVSDKRDISRFLSNPVMIDAKEVSAHRARYFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQECL
EHGRIAKFSKVRTITRSNSIKQGDQHFPVFMNEKEDILWCTEMERVFVGFVHYTDVSNMSRLARQLL
GRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACVSGRPEFGSGEGRGSLTCGDVEENPGPVSKGEELFTGVVPILVELDGD
VNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPE
GYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGI
KVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITL
GMDELYK

Legenda:

Epitopska oznaka 3xFLAG; signal za lokalizaciju u jezgri NLS (SV40); domena dCas9;
signal za lokalizaciju u jezgri NLS (nukleoplazmin); linker Gly₄Ser; katalitička domena
DNMT3A; samo-cijepajući peptid T2A; protein EGFP

(Drugi cistron je podcrtan; žutom bojom istaknut je Glu (E) mutiran u Ala (A) u inaktivnom
obliku konstrukta dCas9-DNMT3A-ANV)

10 ŽIVOTOPIS

Paula Dobrinić, znanstvena novakinja - asistentica, rođena je 19. rujna 1987. godine. Završila je diplomski studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2011. godine s radom na temu "*Postoje li signalne kaskade Hanks-kinaza kod bakterija?*". Doktorski studij biologije na Biološkom odsjeku PMF-a upisala je 2013. godine.

Od studenog 2012. godine zaposlena je kao znanstvena novakinja - asistentica na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te radi na FP7-projektu IBD-BIOM u grupi izv. prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš. Znanstveno se usavršavala na Institutu za genetiku i molekularnu medicinu Sveučilišta u Edinburghu, Ujedinjeno Kraljevstvo, u razdoblju od kolovoza do studenog 2013. te od siječnja do lipnja 2014.

Koautorica je dva znanstvena rada objavljena u časopisima s međunarodnom recenzijom, od kojih je jedan indeksiran u CC-u. Sudjelovala je na nekoliko međunarodnih znanstvenih skupova s usmenim i posterskim izlaganjima.

Od ak. god. 2013./2014. sudjeluje u izvođenju nastave na Zavodu za molekularnu biologiju PMF-a. Drži praktikumsku nastavu iz kolegija Medicinska genetika na diplomskom studiju molekularne biologije te vodi studente koji odrađuju laboratorijsku stručnu praksu ili izrađuju diplomski rad.