

Konstrukcija modularnih alata KDM5A-dCas9 i PAD4-dCas9 u svrhu ciljane manipulacije ekspresije gena

Keršić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:006180>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivana Keršić

**Konstrukcija KDM5A i PAD4 modularnih
alata CRISPR/dCas9 u svrhu ciljane
manipulacije ekspresije gena**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Aleksandra Vojte. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Konstrukcija KDM5A i PAD4 modularnih alata CRISPR/dCas9 u svrhu ciljane manipulacije ekspresije gena

Ivana Keršić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sustav CRISPR/Cas modificiran je uvođenjem deaktivirane endonukleaze Cas9 (dCas9) na koju se mogu vezati katalitičke domene efekorskog proteina, omogućujući ciljanu manipulaciju genoma i epigenoma. Daljnjom modifikacijom, nespecifična nukleaza dCas9 navodi se na više ciljanih područja u genomu pomoću više različitih molekula sgRNA. Fuzija KDM5A s dCas9 omogućuje ciljanu demetilaciju histonske pozicije H3K4 čime dovodi do smanjenja genske ekspresije, a fuzija dCas9 s PAD4 omogućuje ciljanu citrulinaciju histona čime dovodi do povećanja genske ekspresije. Cilj ovog istraživanja bio je konstruirati fuzijske konstrukte KDM5A-dCas9 i PAD4-dCas9 u sklopu modularnog CRISPR/dCas9 sustava s ciljem proučavanja utjecaja na ekspresiju ciljanih gena *TWIST1*, *KLF8*, *SNAI1* i *ZEB1*. Uspješno su dobiveni katalitički aktivni konstrukti za ciljanu manipulaciju ekspresije gena kojima su transfecirane stanice HepG2, kao i kontrolni katalitički inaktivni i *non-target* konstrukti. Izolirana RNA podvrgnuta je qRT-PCR-u, a rezultati pokazuju da nema statistički značajnog smanjenja ekspresije gena *SNAI1* i *ZEB1* u stanicama transfeciranim plazmidnim konstruktima s aktivnim KDM5A, kao niti u kontrolnim uzorcima. Statistički značajno povećanje ekspresije gena *KLF8* u stanicama transfeciranim plazmidnim konstruktima s aktivnim i inaktivnim PAD4 vidljivo je osam dana nakon transfekcije, no ne i 12 dana nakon. Vrijednosti C_t nisu dobivene za gen *TWIST1* stoga njegova ekspresija nije mogla biti analizirana.

Ključne riječi: epigenetika, ciljano modificiranje epigenoma, dCas9, KDM5A, PAD4, ekspresija (77 stranica, 39 slika, 23 tablica, 84 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Aleksandar Vojta

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Aleksandar Vojta
Izv. prof. dr. sc. Anamaria Štambuk
Izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

Rad prihvaćen: 30.6.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Construction of KDM5A and PAD4 modular CRISPR/dCas9 tools for targeted manipulation of gene expression

Ivana Keršić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The CRISPR/Cas system is modified by introducing a deactivated Cas9 endonuclease to which effector protein catalytic domains can be bound, allowing for targeted genome and epigenome manipulation. With further modification, the non-specific nuclease dCas9 can be guided to multiple genome sites using multiple different sgRNA molecules. Fusion of KDM5A with dCas9 allows for targeted demethylation of histone position H3K4 leading to decreased gene expression, while fusion of PAD4 with dCas9 allows for targeted histone citrullination leading to increased gene expression. The aim of this research was to construct fusion constructs KDM5A-dCas9 and PAD4-dCas9 in a modular CRISPR/dCas9 system with the goal of observing the effect on expression of targeted genes *TWIST1*, *KLF8*, *SNAIL1* i *ZEB1*. Catalytically active constructs for targeted manipulation of gene expression were successfully constructed as were inactive and non-target constructs for control purposes, and used to transfect HepG2 cells. Isolated RNA was subjected to qRT-PCR. Results show no significantly lowered expression of *SNAIL1* and *ZEB1* genes in cells transfected with active KDM5A construct nor in control samples. Significantly increased expression of *KLF8* gene is present in cells transfected with active and inactive PAD4 construct 8 days after transfection, but not 12 day after. C_t values for *TWIST1* genes were not obtained therefore its expression could not be analyzed.

Keywords: epigenetics, targeted epigenome editing, dCas9, KDM5A, PAD4, expression
(77 pages, 39 figures, 23 tables, 84 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Aleksandar Vojta

Reviewers:

Izv. prof. dr. sc. Aleksandar Vojta
Izv. prof. dr. sc. Anamaria Štambuk
Izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

Thesis accepted: 30.6.2022.

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

Veliko hvala dr.sc. Goranu Josipoviću na svom trudu, pomoći i savjetima kojima sam stekla neizmjereno znanje i samostalnost u laboratorijskom radu.

Hvala svim mojim prijateljima koji su bili uz mene i obilježili moje studentske dane na najljepši način.

Od srca hvala mojim Keršićima u Splitu i Ljubičićima u Zagrebu, što vjerujete u mene od malih nogu i podržavate sve moje ambicije.

Ivane, hvala ti na svemu.

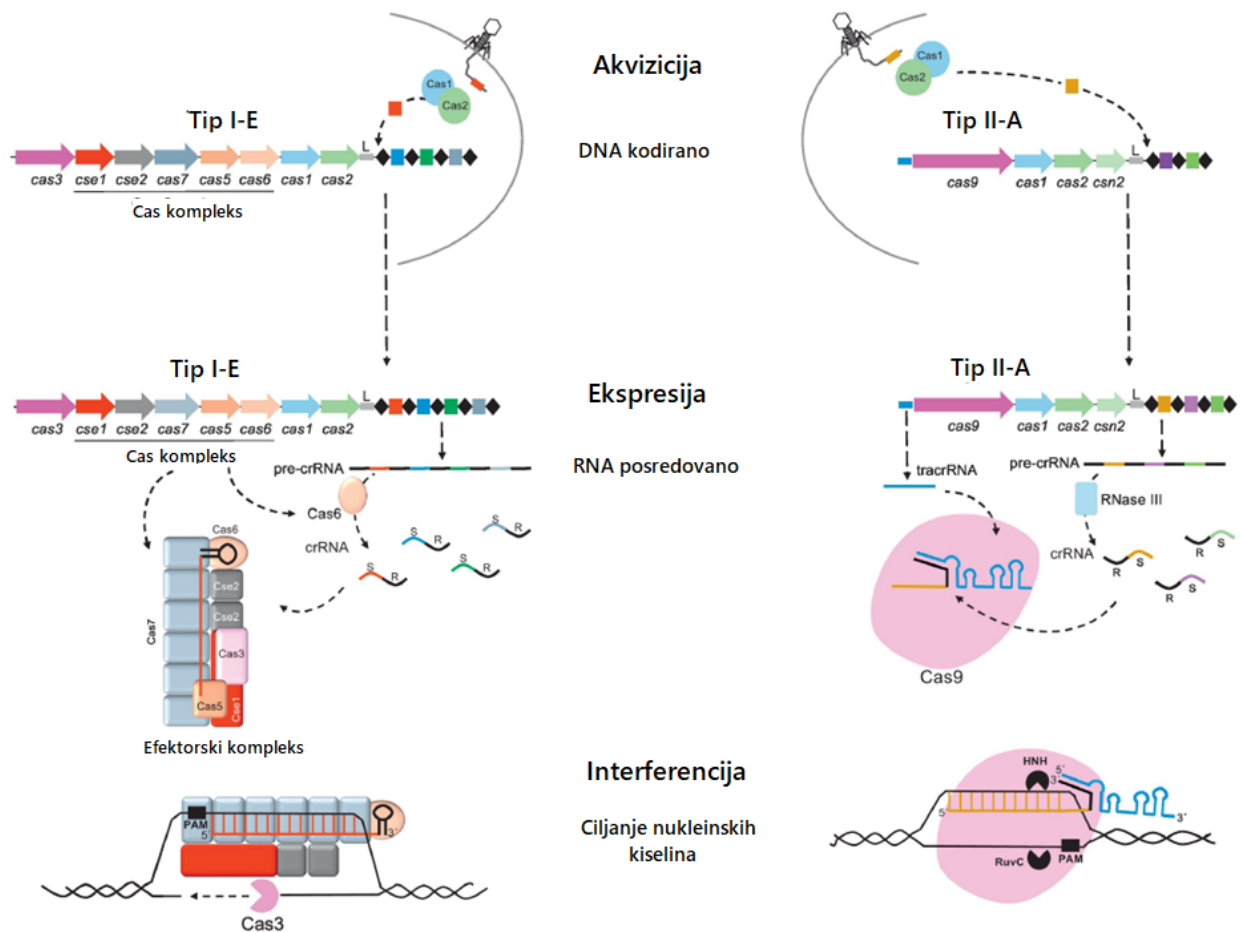
Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Sustav CRISPR/Cas	1
1.2. Epigenom i epigenetičke modifikacije	3
1.3. Histonska demetilaza KDM5A	6
1.4. Peptidil arginin deiminaza 4 (PAD4)	8
1.5. Sustav CRISPR-Cas9 u ciljanjoj manipulaciji ekspresije gena	10
2. Cilj istraživanja	12
3. Materijali i metode	13
3.1. Materijali	13
3.2. Metode	14
3.2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	15
3.2.2. Konstrukcija plazmida N-FD-KDM5A i N-FD-PAD4	18
3.2.3. PCR bakterijskih klonova (engl. <i>Colony PCR</i>)	19
3.2.4. Ciljana mutageneza KDM5A sekvence za izbacivanje BsaI restrikcijskog mjesta	20
3.2.5. Konstrukcija katalitički inaktivnih varijanti PAD4 i KDM5A	21
3.2.6. Odabir molekula gRNA za navođenje konstrukata KDM5A-dCas9 i PAD4-dCas9	22
3.2.7. Kloniranje molekula gRNA	25
3.2.8. Slaganje fuzijskih dCas9 konstrukata	27
3.2.9. Slaganje molekula sgRNA u fuzijske dCas9 konstrukte	30
3.2.10. Kultura stanica HepG2 i transfekcija plazmidnim konstruktima	43
3.2.11. Analiza ekspresije ciljanih genskih lokusa nakon epigenetičke manipulacije	44
4. Rezultati	46
4.1. PCR umnažanje PAD4 i KDM5A iz cDNA	46
4.2. Kloniranje plazmida s epigenetičkim efektorskim domena PAD4 I KDM5A (1-797)	47
4.3. Slaganje fuzijskih PAD4-dCas9 i KDM5A-dCas9 konstrukata	48
4.4. Transfekcija stanica HepG2	53
4.5. Relativna razina ekspresije CRISPR ciljanih gena u transfeciranim stanicama HepG2	56
5. Rasprava	61
6. Zaključak	66
7. Literatura	67
8. Životopis	77

1. Uvod

1.1. Sustav CRISPR/Cas

Sustav CRISPR/Cas (engl. *Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein*) oblik je adaptivne imunosti otkriven u prokariota protiv strane plazmidne DNA i virusa temeljen na komplementarnom sparivanju nukleinskim kiselinama (Wiedenheft i sur. 2012). Komplementarnim sparivanjem zrele crRNA (engl. *CRISPR RNA*) i strane DNA/RNA dolazi do interferencije kojom se ometa umnažanje ili razgradnje stranog genetičkog materijala (Slika 1). Raznolike varijante sustava CRISPR/Cas klasificiraju se u klasu I ili II, koje se dalje dijele na 6 tipova i mnoštvo podtipova (Barrangou 2015). Raznolikost i fleksibilnost sustava CRISPR/Cas se pokazala kao izvrsna podloga za kontinuiran i brz razvoj, a zbog jednostavnosti primjene u laboratoriju naspram prethodno korištenih metoda: programirane nukleaze s domenom cinkovih prstiju (engl. *zinc-finger nucleases*, ZFNs) i programirane nukleaze s modularnom domenom vezanja na DNA (engl. *transcription activator-like effector nucleases*, TALEN) postaje najpopularnija metoda induciranja ciljanih genetičkih promjena (Mengstie i Wondimu 2021).



Slika 1. Pregled i usporedba triju faza djelovanja CRISPR-Cas sustava u klasama I i II. 1) faza adaptacije, tj. akvizicije i ugradnje adekvatnog fragmenta stranog genetičkog materijala kao nove razmaknice (*spacer*) u CRISPR lokusu; 2) prepisivanje CRISPR regije i sazrijevanje crRNA; 3) prepoznavanje strane DNA/RNA komplementarnim sparivanjem nukleinskih kiselina (interferencija). Preuzeto i prilagođeno iz Hidalgo-Cantabrana i sur. 2019.

Sustavi klase II su intenzivno proučavani zbog jasne i jednostavne kompozicije efektorne interferencije, a ponajviše je opisan sustav tipa II: CRISPR-Cas9, koji se sastoji od proteina Cas9, molekule crRNA i tracrRNA (engl. *trans-activating CRISPR RNA*) (Wang i sur. 2020). Ovaj sustav je 2013. prvi iskorišten kao alat za ciljano uređivanje genoma stanica sisavaca. U tu svrhu korištena je varijanta nukleaze Cas9, optimizirana za ljudski kodon s SV40 signalom za unos u jezgru lokaliziran na C-terminalnom kraju, a navođena na određeno mjesto u genomu pomoću kimerne molekule sgRNA (engl. *single guide RNA*), nastale spajanjem molekula crRNA i tracrRNA, čija je ekspresija stavljena pod kontrolu ljudskog U6 promotora RNA polimeraze III (Mali i sur. 2013).

Intenzivno istraživanje sustava CRISPR/Cas9 kao alata za ciljano i precizno uređivanje genoma pruža potencijal ka rješenju brojnih medicinskih, agronomskih, ekoloških i evolucijskih pitanja. Klinička ispitivanja su već provedena za gensku terapiju srpaste anemije i β -talasemije pomoću sustava CRISPR-Cas9 (Frangoul i sur. 2021), a istražuje se i potencijalna primjena kod cistične fibroze (Schwank i sur. 2013) i mišićne distrofije (Mollanoori i sur. 2021).

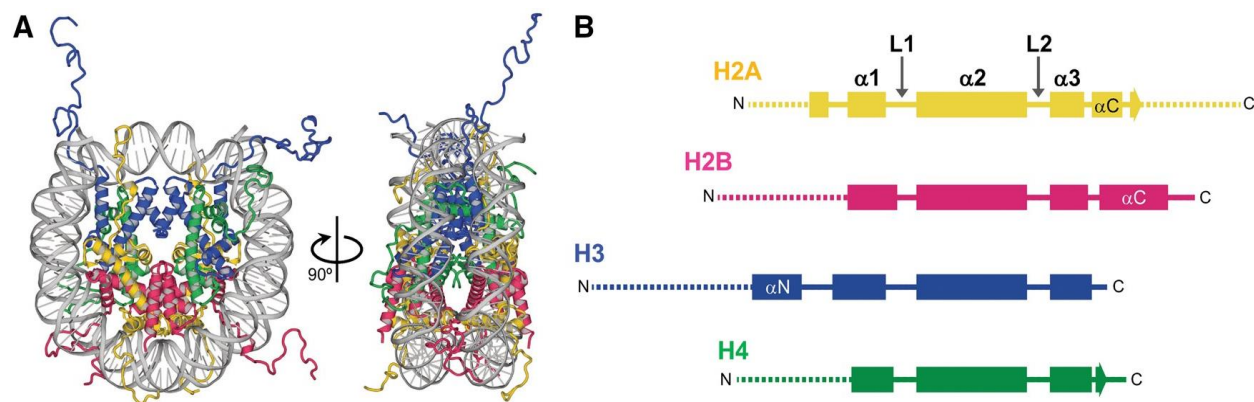
1.2. Epigenom i epigenetičke modifikacije

Epigenom je nasljedna informacija koja nije kodirana od strane molekule DNA, a sastoji se od kompleksne mreže interakcija između nekodirajućih regija DNA i regulatornih elemenata, histonskih post-translacijskih oznaka i pripadajućih regulatora - enzimi koji prepoznaju i/ili modificiraju navedene oznake (Holtzman i Gersbach 2018). Najviše proučavane epigenetičke oznake su metilacija DNA i histonske post-translacijske oznake. Strukturna organizacija kromatina vrlo je kompleksna zbog potrebe za kondenzacijom DNA u jezgri stanice koja može biti više ili manje kondenzirana, ovisno o trenutnoj fazi staničnog ciklusa (Ma i sur. 2015).

Osnovna strukturna jedinica kromatina je nukleosom, a kanonski nukleosom sastoji se od 145-147 parova baza (pb) DNA omotane u lijevu zavojnicu oko oktamerne histonske jezgre sačinjene od dvije kopije svakog od osnovnih histona (H3-H4 tetramer i dva H2A-H2B dimera) (Zhou i sur. 2018). Vezna DNA (engl. *linker DNA*) slobodna je od osnovnih histona, ali u interakciji je sa histonom H1 koji sudjeluje u daljnjoj kompakciji kromatina prema višim stupnjevima strukturne organizacije. Histonski proteini svojom strukturom, osim stabilnosti ostvarene međusobnim interakcijama domena namatanja, pružaju nevjerovatnu dinamičnost kompozicije i konformacije nukleosoma svojim terminalnim repovima (Slika 2). DNA vezana za histone je općenito nedostupna drugim proteinima koji je vežu, čime je ograničena mogućnost transkripcije, replikacije, popravka i rekombinacije, a dinamične promjene pozicije i strukture nukleosoma čine osnovu epigenetičke regulacije ekspresije gena (Koyama i Kurumizaka 2018).

Metilacija DNA najproučavanija je epigenetička modifikacija, a podrazumijeva dodatak metilne skupine na peti atom ugljika u citozinu, kod kralježnjaka riječ je uglavnom o simetričnoj metilaciji citozina u CpG dinukleotidima. Genom sisavaca pokazuje uzorak globalne metilacije, dok regije CpG otoka pokazuju konstitutivno nemetilirano stanje u somatskim stanicama – to su kratke regije (oko 1kbp) bogate CpG mjestima, a najviše su prisutne u promotorskim regijama gena (preko 50%), no nalaze se i u inter- i intragenskim sekvencama (Defossez i Stancheva 2011).

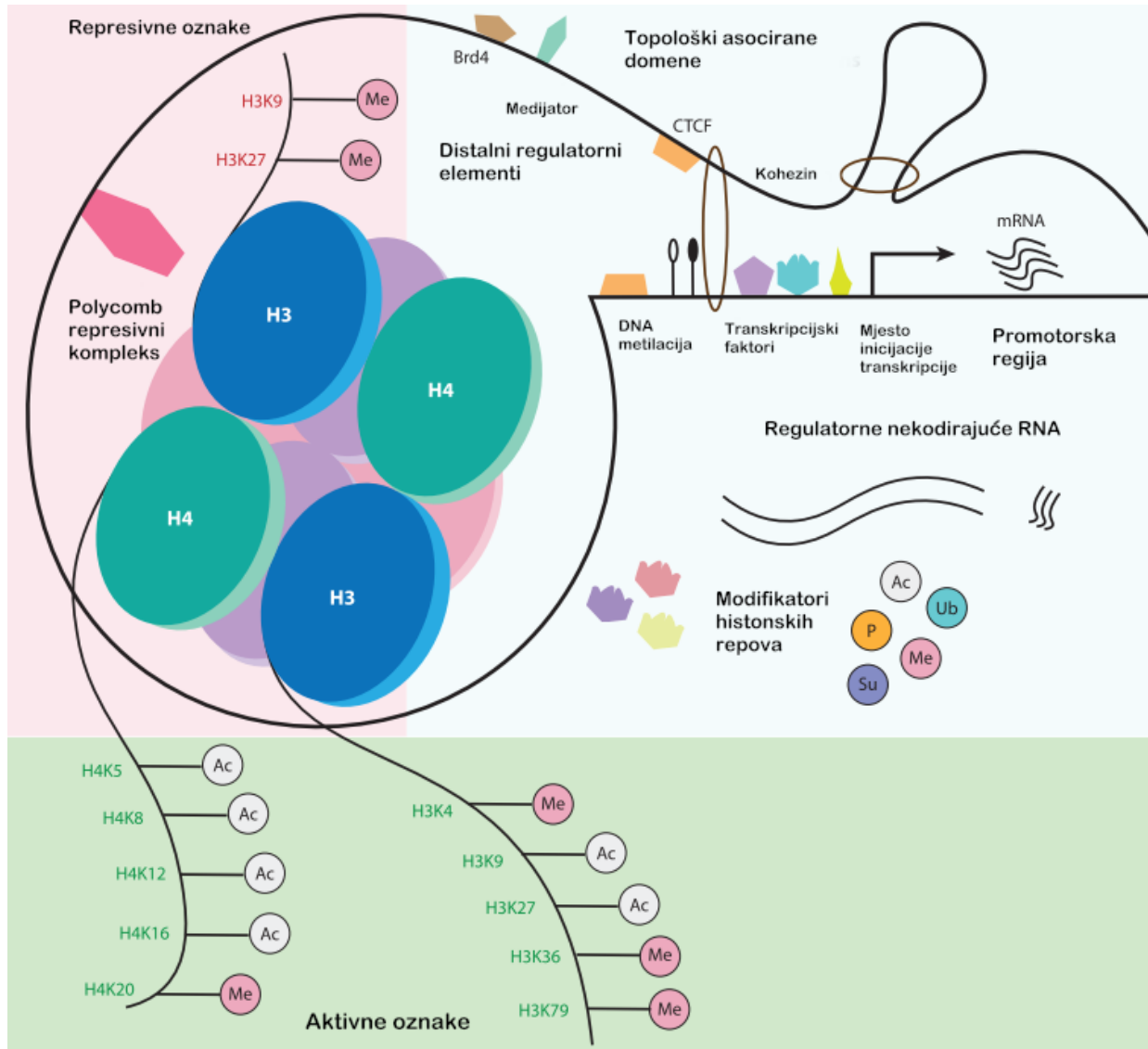
Metilacija DNA može direktno i indirektno doprinijeti smanjenju ekspresije gena. Direktno djeluje putem mjesta prepoznavanja transkripcijskih aktivatora koji takvu metiliranu sekvencu ne mogu prepoznati i vezati, kao u primjerima N-Myc i STAT1 transkripcijskih aktivatora (Bott i sur. 2005; Perini i sur. 2005). Indirektno djeluju u kombinaciji s drugim epigenetičkim faktorima tako što metilirane sekvence prepoznaju i vežu MBP proteini (engl. *methyl-CpG-binding proteins*) koji potom stupaju u interakcije s histonskim deacetilazama, histon metil-transferazama ili proteinima kromatin-remodelirajućih kompleksa (Defossez i Stancheva 2011).



Slika 2. Organizacija nukleosoma. A) Opća struktura nukleosoma. DNA (sivo) omotana oko oktamerne histonske jezgre (žuto, zeleno, plavo, ružičasto). B) Organizacija domena kanonskih histona, kvadrati predstavljaju α -zavojnice (tzv. domene namatanja, engl. *histone fold domains*), pune linije su omče, točkaste linije su terminalni repovi. Preuzeto iz Koyama i Kurumizaka 2018.

N-terminalni repovi histona su intrinzično neuređeni s velikim udjelom aminokiselina lizina i arginina čineći ih, općenito govoreći, bazičnom komponentom histona. Repovi 'izviru' van jezgre nukleosoma te mogu biti u interakciji s DNA u nukleosomu, veznom DNA i kiselim dijelovima susjednih nukleosoma (Iwasaki i sur. 2013). Aminokiselinski ostaci N-terminalnih krajeva su ciljna mjesta djelovanja epigenetičkih 'pisača' (histon-modificirajućih proteina) i 'čitača' (histon-vezujućih proteina). Širok spektar kovalentnih post-translacijskih modifikacija histona je opisan, kao što su: acetilacija, metilacija, fosforilacija, ubikvitinacija, sumoilacija, citrulinacija, ADP-ribozilacija i drugi (Bannister i Kouzarides 2011). Visoki udio bazičnih lizinskih i argininskih ostataka na histonskim repovima u osnovi djeluju tako da promjene na ovim aminokiselinama mijenjaju ukupni pozitivni naboj kromatina čime se mijenja i njegova opća struktura. Primjerice, acetilacija Lys u histonima H3 i H4 smanjuje pozitivan naboj histona, a samim time i interakciju s negativno nabijenom molekulom DNA, čime 'otvara' kromatin

(dekondenzacija kromatina) i čini ga dostupnim transkripcijskoj mašineriji (Barnes i sur. 2005). Osim terminalnih repova, modifikacije se mogu odvijati i na centralnim globularnim domenama histona u samoj jezgri nukleosoma (Slika 3).

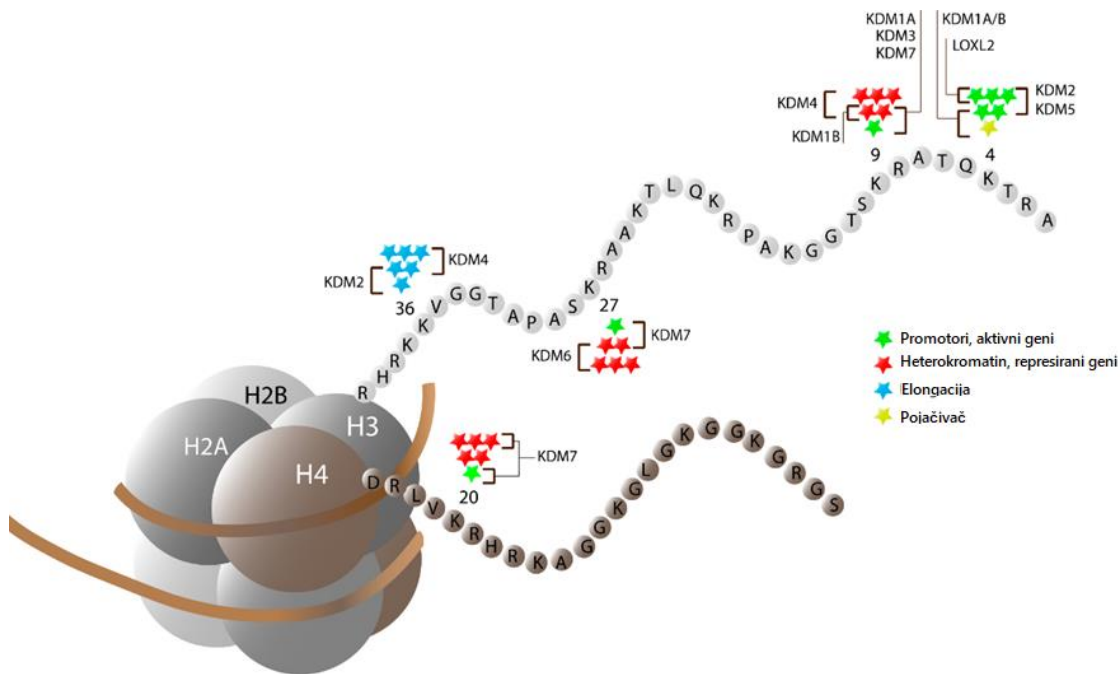


Slika 3. Opći pregled pozicija i funkcija epigenetičkih oznaka. Na zelenom području (aktivne oznake) i rožom području (represivne oznake) prikazana su najčešće pozicije metilacije (Me) i acetilacije (Ac) histona, a moguće su i druge modifikacije: fosforilacija (P), sumoilacija (Su), ubikvitinacija (Ub). Na epigenetičke oznake i gensku ekspresiju još utječu i DNA metilacija, transkripcijski faktori, nekodirajuće RNA, distalni regulatorni elementi, formacija DNA petlji, i dr. Preuzeto i prilagođeno iz Holtzman i Gersbach 2018.

Osim kovalentnih modifikacija histona, promjene u strukturi nukleosoma se odvijaju i zamjenom kanonskih histona sa nekom od histonskih varijanti koje su uključene u regulaciju transkripcije gena (poput histona H3.3 ili H2A.Z) ili pokazuju tkivno-specifičnu i vremensku distribuciju zbog svoje uloge u razvoju (poput varijanti specifičnih za spermalne stanice, npr. H3.4 i H3.5) (Maze i sur. 2014). Svi ovi mehanizmi u konačnici utječu na samu strukturu i organizaciju kromatina te ga čine više ili manje dostupnim različitim proteinima, čime posljedično utječu na prostorno-vremensku regulaciju ekspresije gena.

1.3. Histonska demetilaza KDM5A

KDM5A (lizin demetilaza 5A) je histonska demetilaza iz obitelji KDM5 lizin-specifičnih demetilaza (KDM) koja konvertira di- i trimetilirane Lys4 u histonu H3 (H3K4me₂/me₃) u monometiliran oblik (H3K4me) (Ortiz Torres i sur. 2016). Metilacijski status H3K4 pokazuje jasan uzorak distribucije u genomu ovisno o statusu aktivnosti gena – H3K4me₃ je snažno povezana sa aktivnim stanjem transkripcije, posebice kod mjesta inicijacije transkripcije (engl. *transcription start sites*, TSS), a oznaka H3K4me₂ je prisutna u promotorskim i kodirajućim regijama kao oznaka 'permisivnog' transkripcijskog stanja (permisivni eukromatin) (Santos-Rosa i sur. 2002). Osim metilacije Lys4 u histonu H3, okarakterizirane su metilacije lizina i na drugim pozicijama i histonima: H3K27, H3K36, H3K79 i H4K20 čiji krajnji efekt na strukturu kromatina ovisi o poziciji lizina i broju metilnih skupina. Različite lizin-specifične demetilaze uklanjaju točno određene metilne oznake na specifičnim pozicijama unutar histona (Slika 4). KDM5A jedna je od lizin-specifičnih demetilaza karakterističnih za demetilaciju na poziciji H3K4 što u konačnici dovodi do smanjenja transkripcijske aktivnosti gena (Verde i sur. 2017). Naime, H3K4 pozicija služi kao vezno mjesto različitim enzimima uključenima u proces transkripcije i remodeliranju kromatina. Na primjer, Isw1p, ATPaza ISW1 remodelirajućeg kompleksa, preferencijalno prepoznaje kromatin kada je H3K4 pozicija di- ili trimetilirana te je nužna za pravilnu distribuciju RNA polimeraze II u kodirajućim regijama kvasca (Santos-Rosa i sur. 2002). H3K4me₃ pokazuje direktnu poveznicu s transkripcijom: interakcijom s TAF3 podjedinicom (engl. *transcription initiation factor TFIID subunit 3*) usmjerava globalnu regrutaciju TFIID transkripcijskog aktivatora na mjesta aktivnih gena, ključnu komponentu formacije preinicijacijskog kompleksa RNA polimeraze II (Lauberth i sur. 2013).



Slika 4. Najčešće lizin-specifične metilacije terminalnih repova histona H3 i H4 s prikazom mjesta djelovanja različitih demetilaza. Broj zvjezdica označava broj metilnih grupa. Zelena boja označava oznake povezane uz promotore i aktivne gene, crvena heterokromatin i represirane gene, plava elongaciju, a žuta regije pojačivača (*enhancer*). Preuzeto i prilagođeno iz Verde i sur. 2017.

Demetilaciju lizina unutar histona provode dvije klase enzima podijeljene prema mehanizmu katalize: flavin-adenin dinukleotid ovisne demetilaze LSD1 i LSD2 koje mogu uklanjati mono- i dimetilne oznake te Fe(II) i α -ketoglutarat ovisne podobitelji demetilaza KDM2-6 (poznate i kao demetilaze s domenom Jumonji C) (Punnia-Moorthy i sur. 2021). KDM5 podobitelj demetilaza posebna je zbog atipičnog prekida domene Jumonji u koju su ubačene DNA-vezujuća domena ARID (engl. *AT-rich interaction domain*) i histon-interagirajuća domena PHD1 (engl. *plant homeodomain 1*) čime je podijeljena na domene Jumonji N (JmjN) i Jumonji C (JmjC) (Horton i sur. 2016).

KDM5A je prvotno opisan kao vezni partner retinoblastom proteina (pRb) isprva nazvan RBP2 (engl. *retinoblastoma binding protein 2*) i detektiran u kompleksu sa pRb kao odgovor na signale koji utječu na izlaz iz staničnog ciklusa i diferencijaciju (Klose i sur. 2007). Retinoblastoma (*RB*) gen jedan je od fundamentalnih tumor supresor gena i u mnogim tumorima se uočava direktna mutacija gena *RB*, njegova nepravilna ekspresija ili nepravilna funkcija nekog

regulatora *RB*-a, čime se u konačnici gubi njegova funkcija (Dick i Rubin 2013). Uočeno je da se kod mišjih embrija s defektnom ekspresijom gena *RB* može produžiti preživljenje suprimiranjem funkcije KDM5A, potvrđujući njegov potencijal mete u liječenju tumora i važnosti traženja inhibitora (Lin i sur. 2011). Važna interakcija KDM5A je i ona sa *Polycomb group* (PcG) proteinima, djelujući represivno na ciljne gene u ključnim trenucima embriogeneze i diferencijaciji embrionalnih matičnih stanica (Pasini i sur. 2008). Dosad je zamijećena prekomjerna ekspresija i onkogenetski efekt KDM5A u raznim ljudskim tumorima, kao što su: akutna mijeloidna leukemija, rak dojke, rak prostate, glioblastomi, rak pluća, melanom ili rak gušterače (Yang i sur. 2021).

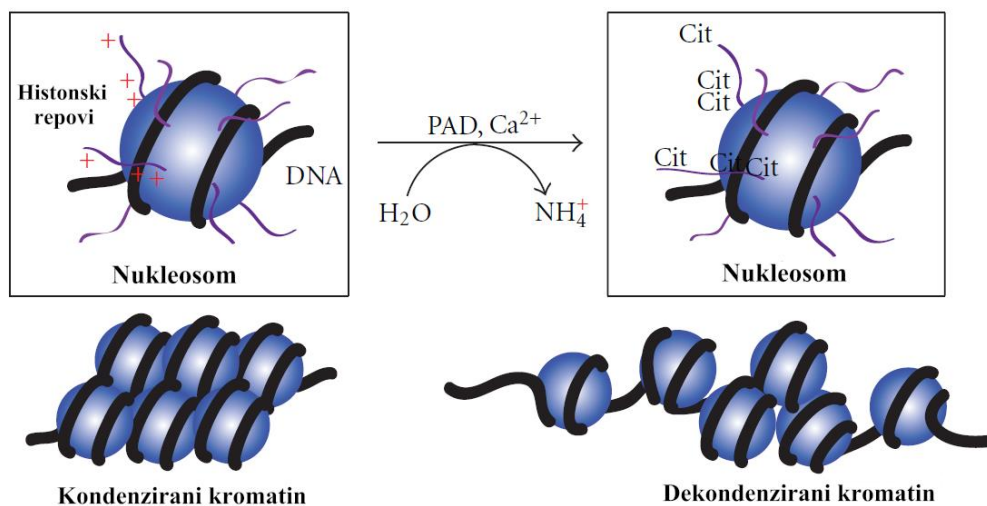
1.4. Peptidil arginin deiminaza 4 (PAD4)

Citrulinacija (ili deiminacija) je post-translacijska modifikacija koju provodi obitelj enzima PAD (engl. *protein arginin deiminase*), a kod čovjeka uključuje 5 izoenzima PAD1-4 i PAD6 (Bicker i Thompson 2013). Ca^{2+} ovisna reakcija citrulinacije hidrolitički ireverzibilno konvertira arginin u citrulin čime pozitivno nabijena i bazična aminokiselina prelazi u neutralni oblik, što može utjecati na inter-/intra- proteinske interakcije promjenom površinskog elektrostatskog potencijala ili dovesti do disfunkcije i razmatanja proteina (Liu i sur. 2021). Ekspresija proteina PAD je tkivno specifična te je prikazana u Tablici 1.

Tablica 1. Pregled distribucije ekspresije enzima PAD i supstrata. Preuzeto iz (Zhu i sur. 2021).

Enzim	Lokalizacija	Supstrat
PAD1	Epiderm, maternica	Keratin, filagrin
PAD2	Mozak, maternica, leđna moždina, slinovnice, makrofagi, hipofiza, znojna žlijezda, gušterača, slezena, koštana srž, oligodendrociti, žumanjčana vrećica (leukociti)	Bazični mijelinski protein, vimentin, aktin, histoni
PAD3	Folikul dlake	Filagrin, trihohijalin, apoptoza-inducirajući faktor, vimentin
PAD4	Eozinofili, neutrofili, granulociti	Histoni, kolagen, inhibitor proteina rasta 4, histon acetiltransferaza p300, nukleofosmin, inhibitor ciklin ovisne kinaze (p21), lamin c, 40S ribosomalni protein S2, DNA (citozin-5)-metiltransferaza 3A
PAD6	Jajna stanica, jajnik, rani embrio	nepoznato

Protein PAD4 je uglavnom eksprimiran u bijelim krvnim stanicama i dosad je zamijećen veliki broj njegovih supstrata (Tablica 1), a prekomjerna ekspresija u hematopoetskim stanicama vodi do apoptoze uglavnom putem zastoja staničnog ciklusa u G1 fazi i mitohondrijski posredovanim putem (Liu i sur. 2006). Katalitička aktivnost proteina PAD4 opada ako je onemogućena homo-dimerizacija, međutim u obliku monomera ne gubi svu aktivnost (Liu i sur. 2011). Citrulinacijom nemođificiranih ili monometiliranih arginina unutar histona dolazi do promjene u strukturi i kondenzaciji kromatina na više načina: potičući dekonđenzaciju kromatina i fragmentaciju DNA, reduciranjem heterokromatina i multilobularnih nuklearnih struktura u HL-60 granulocitima, inhibicijom viših razina kromatinske strukture i stabilizacijom dimera H2A/H2B u nukleosomima (Zhai i sur. 2017). Dosada je otkriveno mnoštvo različitih pozicija arginina koje su meta citrulinacije: H4R3, H2AR3, H3R2, H3R8, H3R17, H3R26, H1R54, H1.2R53, i drugi (Zhu i sur. 2021). Efekt citrulinacije histona se najlakše može usporediti s acetilacijom histona – gubitak pozitivnog naboja vodi dekonđenzaciji strukture kromatina (Slika 5) (Fuhrmann i Thompson 2016). Utjecaj PAD4 uočen je i na veznim histonima H1 kao i na njegovim varijantama prilikom čega citrulinacija na poziciji H1R54 dovodi do slabijeg vezanja veznog histona H1 na molekulu DNA i globalnog smanjenja kondenzacije, u konačnici dovodeći do povećanja ekspresije gena bitnih za održavanje i poticanje pluripotentnog stanja stanice (Christophorou i sur. 2014).



Slika 5. Reakcija citrulinacije nad histonskim argininima dovodi do dekonđenzacije kromatina. Preuzeto i prilagođeno iz Mohanan i sur. 2012.

Protein PAD4 može deiminirati i ne-histonske proteine (Tablica 1) čime citrulinacija igra ulogu u regulaciji različitih staničnih procesa, poput p53-posredovane apoptoze uslijed nastanka

DNA oštećenja (Tanikawa i sur. 2009) ili regulacije ljudskog 40S ribosomalnog proteina RPS2 (ribosomalni protein S2) i slaganja ribosoma pri čemu citrulinacija i metilacija djeluju antagonistički jedna na drugu (Guo i sur. 2011). Prisutnost citrulinacije u regulatornim putevima različitih staničnih procesa implicira na ulogu te modifikacije u patološkim stanjima poput malignih tumora (Zhu i sur. 2021) i autoimune bolesti reumatoidnog artritisa (Suzuki i sur. 2003).

Reumatoidni artritis (RA) kronična je upalna bolest zglobova koja dugoročno može uzrokovati oštećenje hrskavičnog i koštanog tkiva te zahvaća oko 1% populacije (Smolen i sur. 2016). Povišene razine citruliniranih proteina kao i antitijela ACPA (engl. *anti-citrullinated protein antibodies*) služe kao markeri težeg oblika bolesti i oštećenja zglobova (Lundberg i sur. 2005) stoga se citrulinacija povezuje s raznim upalnim procesima (Valesini i sur. 2015). Specifičan primjer je uloga proteina PAD4 u procesu aktivacije neutrofila i formiranja neutrofilne ekstracelularne zamke (engl. *neutrophile extracellular net*, NET). Pokazano je kako dvostruki mutanti neutrofila PAD4^{-/-} ne mogu uopće formirati NET (Li i sur. 2010). Proces formiranja NET-a je oblik nespecifične imunosti protiv mikroorganizama pri kojem aktivirani neutrofilni izbacuju dekonenzirani kromatin i granularne proteine. Započinje homogenizacijom eu- i heterokromatina, potom i drugih staničnih komponenti raspadom jezgre, a raspadom stanične membrane završava ovaj jedinstveni oblik programirane stanične smrti (Fuchs i sur. 2007). Proces ovisi o aktivnosti oksidaze NADPH (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) i formaciji reaktivnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS), dok PAD4 doprinosi dekonenzaciji kromatina citrulinacijom histona H3 (Li i sur. 2010). Citrulinacija je primjećena na kanonskim histonima H2, H3 i H4, ali i na veznim histonima H1 prilikom formiranja NET-a. Točan onkogenetski utjecaj NET-a se intenzivno istražuje kao i biomarkerska uloga u razvoju RA (Zhu i sur. 2021).

1.5. Sustav CRISPR-Cas9 u ciljanoj manipulaciji ekspresije gena

Kompleksnost kauzalnih veza epigenetičkih oznaka i njihovog utjecaja na ekspresiju (posljedično na stanični fenotip i funkciju) otežava istraživanje ako izostaje dovoljna razina specifičnosti i preciznosti djelovanja (Pulecio i sur. 2017). Mjesno-specifično djelovanje se prvotno postizalo kombiniranjem programiranih nukleaza s DNA-vezujućom domenom cinkovih prstiju (ZFN) ili proteina TALE (TALEN). Ove metode, iako temeljne za eksperimentalni razvoj uređivanja genoma, zahtijevaju sklapanje proteina za svaki pojedini lokus, stoga je sustav

CRISPR-Cas9 postao superioran zbog jednostavnosti ciljanja pomoću malenih molekula gRNA (Xu i Qi 2019).

Razvoj i uporaba katalitički inaktivirane nukleaze dCas9 (engl. *dead Cas9*) otvara nove mogućnosti ciljane manipulacije ekspresije gena (Perez-Pinera i sur. 2013; Qi i sur. 2013). Direktno reguliranje ekspresije gena postiže se fuzijom dCas9 s direktnim transkripcijskim represorom poput KRAB-a (engl. *Krüppel-associated box*) (Gilbert i sur. 2013) ili direktnim aktivatorom poput VP64 (tetramer aktivacijske domene VP16 iz virusa iz virusa *Herpes simplex*) (Maeder i sur. 2013). Dosada je napravljen niz fuzija dCas9 s direktnim aktivatorima (VP16, VP48, VP160, p65, VPR - kombinacija VP64, p65 i Rta) i represorima (KRAB, SIN3A, FOG1, Hp1, KRAB-MeCP) (Sgro i Blancafort 2020). Osim direktne regulacije ekspresije gena, na dCas9 su vezane i različite epigenetičke efektorske domene u svrhu ciljane manipulacije epigenetičkih oznaka, sve u svrhu razjašnjavanja njihovog utjecaja na regulaciju ekspresije gena. Uspješno su napravljene i okarakterizirane fuzije s DNA *de novo* metiltransferazom DNMT3A u svrhu ciljane metilacije molekule DNA (Vojta i sur. 2016), TET1 (engl. *Ten-eleven translocation*) u svrhu demetilacije DNA (Choudhury i sur. 2016), histon metiltransferazom G9A u svrhu uvođenja represivne oznake H3K9me2 (O'Geen i sur. 2017), lizin specifičnom demetilazom LSD1 u svrhu uklanjanja mono- i dimetilne oznake na poziciji H3K4 (Kearns i sur. 2015), histon acetiltransferazom p300 (Hilton i sur. 2015), ali i druge. Primjena sustava CRISPR/dCas9 u svrhu ciljane manipulacije ekspresije gena bilo kroz direktnu ili epigenetičku regulaciju kontinuirano se obogaćuje novim domenama s ciljem unapređenja efekta i vremenske stabilnosti induciranih oznaka te interakcija s već postojećim epigenetičkim oznakama (Martella i Fisher 2021). Dosad nisu objavljene direktne fuzije epigenetičkih efektorskih domena KDM5A ili PAD4 s dCas9 u svrhu ciljane manipulacije epigenetičkih oznaka i promatranja utjecaja na ekspresiju ciljanih gena, stoga su uspješno konstruirane i testirane u sklopu ovog diplomskog rada.

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je konstruirati direktne fuzije epigenetičkih efektorskih domena KDM5A i PAD4 s dCas9 (KMD5A-dCas9 i PAD4-dCas9) te provjeriti učinak njihove inducirane epigenetičke promjene na razinu ekspresije ciljanih gena. Fuzijski konstrukt KDM5A-dCas9 bit će ciljan na promotorsku regiju gena *ZEB1* i *SNAI1*, a fuzijski konstrukt PAD4-dCas9 na promotorsku regiju gena *TWIST1* i *KLF8* u modelnim stanicama HepG2.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Komercijalni setovi kemikalija:

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka), *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen), *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), *EmeraldAmp MAX PCR Master Mix* (TaKaRa, Tokio, Japan), *ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research, Irvine, Kalifornija), *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD), *TURBO DNA-free Kit* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), *Power SYBR Green Master Mix* (Thermo Scientific).

Enzimi:

Esp3I (10 U/μL, Thermo Scientific), T4 *DNA Ligase* (350 U/μL; TaKaRa), *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (Agilent), DpnI (10 U/μL, Thermo Scientific), BpiI (10 U/μL, Thermo Scientific), BsaI (10 U/μL, Thermo Scientific), T4 *Polynucleotide Kinase* (10 000 U/mL, New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, SAD), *Exonuclease V* (10 000 U/mL; New England BioLabs), XbaI (10 U/μL, New England BioLabs), SacI (10 U/μL, New England BioLabs), AgeI (10 U/μL, New England BioLabs), Acc65I (10 U/μL, New England BioLabs), EagI (10 U/μL, New England BioLabs), PstI (10 U/μL, New England BioLabs), *PrimeScript Reverse Transcriptase* (200 U/ μL TaKaRa), *Recombinant RNase Inhibitor* (40 U/μL, TaKaRa), *TURBO DNase* (2 U/μL, Thermo Scientific).

Bakterijski sojevi:

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

Puferi:

Tango Buffer (10X, Thermo Scientific), CutSmart Buffer (10X, New England BioLabs), 5X *PrimeScript Buffer* (TaKaRa), NEBuffer 3.1 (New England BioLabs), NEBuffer 1.1 (10 mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 μg/ml Recombinant Albumin, pH 7) (New England BioLabs).

Stanične linije:

HepG2 (ACC 180) (DSMZ, Braunschweig, Njemačka).

Ostalo:

100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis BioDyne, Tartu, Estonija), *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Fremont, Kalifornija, SAD), *Purple Gel Loading Dye* (6X, New England BioLabs), *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific), agarozna (Sigma, -Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), pufer TAE (1X, (1 mM Tris, 1 mM octena kiselina, 1 mM EDTA pH 8.0), DTT (10 mM), Luria-Bertani (LB) tekući medij (10 g/L ekstrakt kvasca, 5 g/L tripton, 10 g/L NaCl), 1% DMSO, T4 (10X) ligacijski pufer, ATP (10 mM), pufer G (10X) (Thermo Scientific), IPTG (100 mM), ampicilin (Sigma-Aldrich), X-Gal (Thermo Scientific), 1X PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4), RPMI-1640 medij (Sigma-Aldrich) + 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) Biosera, (Kansas City, Missouri, SAD), tripsin (*trypsin-EDTA solution*, 0,25%) (Sigma-Aldrich), Polyethylenimine 'Max' (PEI MAX MW 40 000, Polysciences Inc., Warrington, Pennsylvania, SAD), OptiMEM (Gibco, Paisley, Škotska), puromicin 10 mg/mL (Gibco), *random hexamers* (50 μM, Thermo Scientific), dNTP miks (10 mM, Sigma-Aldrich), *Random hexamers* (50 μM, Thermo Scientific).

3.2. Metode

3.2.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Kodirajuće sekvence proteina PAD4 i KDM5A preuzete su s NCBI web stranice (GenBank baza podataka). Početnice su dizajnirane za umnažanje cijelog kodirajućeg slijeda proteina PAD4 dok se za KDM5A umnažala skraćena verzija (aminokiseline 1-797) koja se pokazala u prethodnim istraživanjima katalitički aktivna u SunTag pristupu sustava CRISPR/dCas9 (Guhathakurta i sur. 2021). Početnice (Tablica 2) su dizajnirane na način da sadrže komplementarni dio sa sekvencom CDS, dok se na 5' kraju nalazi nekomplementarni slijed koji sadrži mjesta prepoznavanja za restrikcijski enzim Esp3I potreban za kloniranje u destinacijski plazmid kompatibilan s modularnim CRISPR/dCas9 sustavom (Josipović i sur. 2019). Kao kalup za umnažanje željenih sljedova korištena je cDNA iz stanične linije HepG2. Lančana reakcija polimerazom rađena je pomoću *Herculase II Fusion DNA Polymerase* prema uputama proizvođača (Tablica 3) i popratnom programu (Tablica 4).

Tablica 2. Sekvence početnica korištenih za umnažanje KDM5A (1-797) i PAD4. Početnice 1-4 korištene su za umnažanje željenih fragmenata, dok su početnice 5-8 korištene za provjeru završnih konstrukata metodom sekvenciranja. Crveno označeno predstavlja nekomplementarni slijed, dok je komplementarni slijed sekvenci CDS prikazan crnom bojom. Podcrtani dio predstavlja mjesto prepoznavanja za restrikcijski enzim Esp3I.

Početnica	Sekvenca (5' – 3')	Tm/ °C
Forward_KDM5A	<u>TACGTCTCTGGAGGAGGATCT</u> ATGGCGGGCGTGGGGC	65
Reverse_KDM5A	<u>TACGTCTCACGAATCCGGA</u> CACAGATGCACATGTCTCAGCTTCTTTACAGC	57
Forward_PAD4	<u>TACGTCTCTGGAGGAGGATCT</u> ATGGCCCAGGGACATTGATC	61
Reverse_PAD4	<u>TACGTCTCACGAATCCGGA</u> AGGCACCATGTTCCACCACTTG	60
KDM5A_Seq	CCGAAGAGAACAAGACGTGTGAAG	59
PAD4_Seq	CATACACTGGTGCTCCACGTG	59
pUX21_seqF	GTAAAACGACGGCCAGT	54
pUX21_seqR	AGCGGATAACAATTCACACAGG	58

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za PCR.

Komponenta	Reakcijska smjesa
<i>5X Herculase II reaction buffer</i>	1×
dNTP miks	25 mM
Uzvodna početnica	10 μM
Nizvodna početnica	10 μM
<i>Herculase II fusion DNA polymerase</i>	1 μL
cDNA kalup	40 ng
H ₂ O	Do 50 μL

Tablica 4. PCR program za uređaj *ProFlex PCR System* s kontrolom različitih temperaturnih zona za umnažanje CDS regije PAD4 i KDM5A.

Korak	Temperatura/°C	Trajanje	Broj ciklusa
	95	1 min	1
Denaturacija	95	20 sek	40
Prianjanje početnica	KDM5A 52 / 54 PAD4 56 / 58	20 sek	
Elongacija	68	KDM5A 2 min i 35 sek PAD4 2 min 10 sek	
Završna elongacija	68	3 min	1
	4	∞	

Produkti reakcije pomiješani su s *Purple Gel Loading Dye* te razdvojeni na 1% agaroznom gelu u puferu 1X TAE, potom obojanim s bojom *GelRed Nucleic Acid Gel Stain*. DNA standard korišten kao marker elektroforeze je *100 bp DNA Ladder Ready to Load*. Zbog nespecificčnosti umnažanja PAD4, PCR reakcija ponavljana je s različitim uvjetima poput dodatka 1% DMSO, drugačijih temperatura programa i veće količine cDNA kalupa kako bi se odredili uvjeti koji daju specifičan *band*. U konačnici, dizajnirane su nove početnice smještene izvan CDS regije PAD4 kako bi se zahvatilo šire područje u sekvenci (engl. *nested PCR*) (Tablica 5). Početnice se koriste u sljedećim kombinacijama: PAD4_Fw4 - PAD4_Rev4, PAD4_Fw5 - PAD4_Rev4, PAD4_Fw5 - PAD4_Rev3. S ovim kombinacijama početnica napravljen je PCR koristeći *EmeraldAmp MAX PCR Master Mix* prema uputama proizvođača (Tablice 6 i 7).

Tablica 5. Sekvence početnica korištenih za umnažanje PAD4 metodom *nested PCR*.

Početnica	Sekvenca (5' – 3')	T _m / °C
PAD4_Fw3	AGGGACGAGCTAGCCCCGACG	65
PAD4_Fw4	AGCCAGAGGGACGAGCTAGCCC	65
PAD4_Fw5	CCCGACGATGGCCCAGGG	64
PAD4_Rev3	GAGGACGCCAGGGAAGATGGGC	66
PAD4_Rev4	GCCACACTGCAGAGGACCCAGC	47

Tablica 6. Reakcijska smjesa za PCR umnažanje pomoću *EmeraldAmp MAX PCR Master Mix*.

Komponenta	Reakcijska smjesa
<i>Emerald Master Mix</i> (TaKaRa)	1×
<i>Forward</i> početnica	10 μM
<i>Reverse</i> početnica	10 μM
cDNA kalup	<500 ng
H ₂ O	do 25 μL

Tablica 7. PCR program za kombinacije početnica PAD4_Fw4-PAD4_Rev4, PAD4_Fw5-PAD4_Rev4, PAD4_Fw5-PAD4_Rev3.

Korak	Temperatura/°C	Trajanje	Broj ciklusa
	95	3 min	1
Denaturacija	98	10 sek	30
Prianjanje početnica	59	30 sek	
Elongacija	72	2 min 15 sek	
Završna elongacija	72	10 min	1
	4	∞	

Nakon provedbe PCR reakcija različitih uvjeta kombinacija početnica, ponovila se PCR reakcija s najboljim uvjetima kombinacije početnica koristeći *Herculase II fusion* polimerazom s reakcijskom smjesom kao u Tablici 3, prema programu u Tablici 8.

Tablica 8. PCR program za uređaj *ProFlex PCR System* s kontrolom različitih temperaturnih zona za umnažanje CDS regije PAD4 kombinacijom početnica Fw5-Rev3.

Korak	Temperatura/°C	Trajanje	Broj ciklusa
	95	1 min	1
Denaturacija	95	20 sek	40
Prianjanje početnica	59 / 61 / 63	20 sek	
Elongacija	68	2 min 10 sek	
Završna elongacija	68	3 min	1
	4	∞	

Produkti su provjereni elektroforezom na agaroznom gelu. Produkt reakcije s najspecifičnijim *bandom* izrezan je iz gela i pročišćen pomoću *QIAquick Gel Extraction Kit* prema uputama proizvođača. Pročišćenim produktom provodi se druga PCR reakcija sa početnicama za PAD4 iz Tablice 2, s izmijenjenim programom za testiranje uvjeta reakcija različitih temperatura prianjanja početnica (Tablica 9) te su produkti provjereni agaroznom elektroforezom.

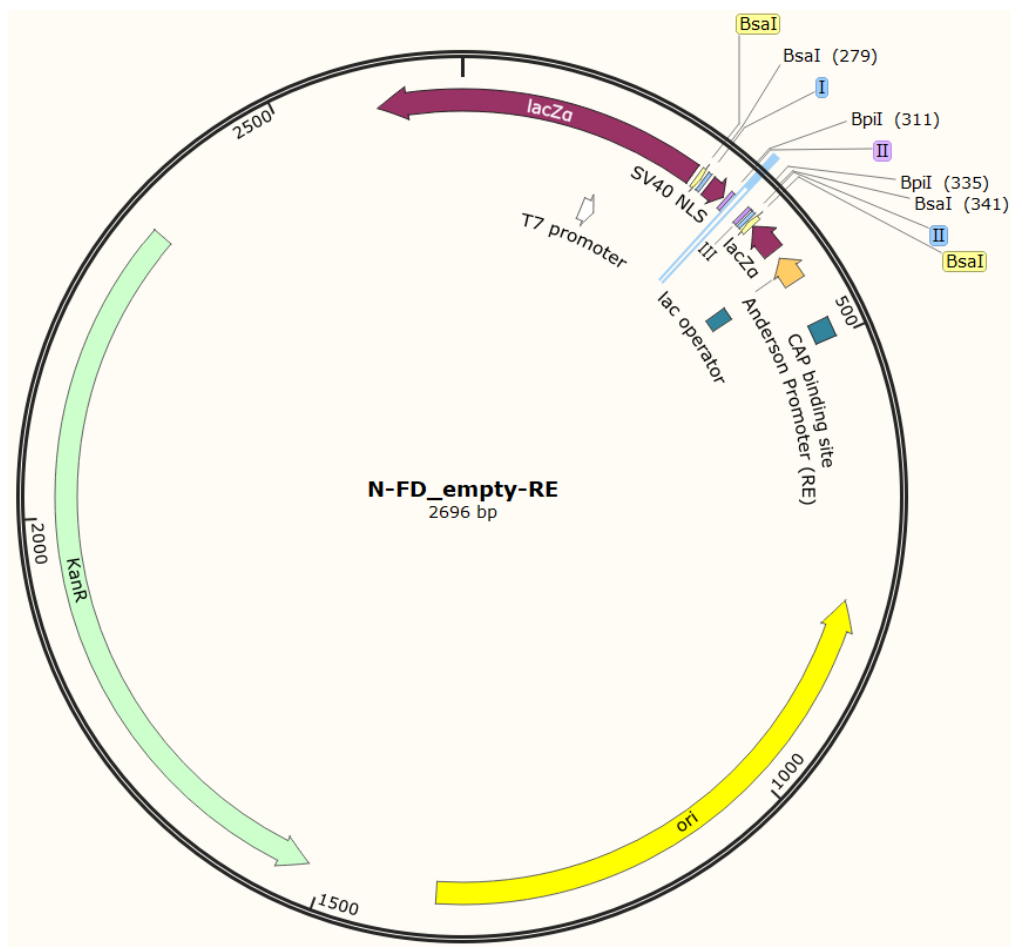
Tablica 9. PCR program za uređaj *ProFlex PCR System* s kontrolom različitih temperaturnih zona, izmijenjeni program za umnažanje PAD4 CDS.

Korak	Temperatura/°C	Trajanje	Broj ciklusa
	95	2 min	1
Denaturacija	95	20 sek	30
Prianjanje početnica	56 / 58 / 60 / 62	20 sek	
Elongacija	68	2 min 15 sek	
Završna elongacija	68	3 min	1
	4	∞	

3.2.2. Konstrukcija plazmida N-FD-KDM5A i N-FD-PAD4

PCR produkti umnoženih KDM5A (aminokiseline 1-797) i PAD4 pročišćeni su iz gela pomoću *QIAquick Gel Extraction Kit* prema uputama proizvođača. U svrhu kloniranja u destinacijski plazmid N-FD_empty-RE bilo je potrebno porezati PCR produkt s restriksijskim enzimom Esp3I, dok je destinacijski plazmid rezan s BpiI (Slika 6). Reakcija prekonoćne restrikcije rađena je prema uputama proizvođača 16 sati na 37 °C nakon čega je slijedila inaktivacija enzima na 65 °C 20 minuta.

Nakon digestije, porezani PCR produkti pročišćeni su pomoću *QIAquick PCR Purification Kit*, prema uputama proizvođača: uzorak je pomiješan s *binding* puferom, vezan na *silica* membranu, ispiran *wash* puferom i eluiran *elution* puferom. Reakcija ligacije provedena je na 16 °C 30 minuta koristeći T4 DNA ligazu, prema uputama proizvođača, u molarnom omjeru inserta i plazmida 3:1. Produkti ligacije potom su ubačeni u kemijski kompetentne bakterije *E.coli* soja XL10-Gold metodom toplinskog šoka. Transformirane bakterije razmazane su na LB ploče s antibiotikom kanamicinom (50 µg/mL) i inkubirane 16 sati na 37 °C.



Slika 6. Plazmid N-FD_empty-RE korišten za kloniranje umnoženih kodirajućih sekvenci proteina KDM5A i PAD4.

3.2.3. PCR bakterijskih klonova (engl. *colony PCR*)

Za identifikaciju pozitivnih klonova s pravilno kloniranim konstruktom nazvanim tNS_pN_FD-KDM5A napravljen je PCR na određenom broju bakterijskih kolonija. Korišten je *EmeraldAmp MAX PCR kit* i popratni protokol (Tablica 10) koristeći početnice za sekvenciranje (Tablica 2, pUX21_seqF i pUX21_seqR), prema uputama proizvođača. Uzeto je 7 klonova za KDM5A vršcima čačkalica i promiješano u epici s reakcijskom smjesom, uz pripremu negativne kontrole (voda pomiješana s reakcijskom smjesom). PAD4 se nije provjeravao pomoću *colony PCR*-a jer je u 2. koraku *nested PCR*-a potvrđeno da je specifično umnožen PAD4 CDS, stoga je ispravnost konstrukata tNS_pN_FD-PAD4 provjerena metodom sekvenciranja.

Tablica 10. Program PCR-a bakterijskih kolonija prema protokolu *EmeraldAmp MAX PCR*.

Korak	Temperatura/°C	Trajanje	Broj ciklusa
	95	3 min	1
Denaturacija	98	10 sek	30
Prianjanje početnica	53	30 sek	
Elongacija	72	2 min	
Završna elongacija	72	10 min	1
	4	∞	

Nakon PCR reakcije, produkti su provjereni agaroznom elektroforezom na 1% agaroznom gelu obojanim *GelRed Nucleic Acid Gel Stain*. Nakon elektroforeze, odabrana su dva klona iz kojih je izolirana plazmidna DNA koristeći *ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit* prema uputama proizvođača za uporabu s mikrocentrifugom. Bakterijske stanice resuspendiraju se u P1 puferu, dodatkom P2 pufera ostvaruje se alkalna liza stanica, a dodatkom P3 pufera vrši se neutralizacija. Supernatant se odvaja i dodaje *binding* pufer, ispiru s dva različita *wash* pufera, a konačna plazmidna DNA eluira se *elution* puferom. Izolirani konstrukti nazvani su tNS_pN_FD-KDM5A i tNS_pN_FD-PAD4. Uzorci eluirane plazmidne DNA poslani su na provjeru sekvenciranjem putem servisa Macrogen.

3.2.4. Ciljana mutageneza KDM5A sekvence za izbacivanje BsaI restrikcijskog mjesta

KDM5A u svojoj CDS sadrži restrikcijsko mjesto BsaI koje je bilo potrebno ukloniti pošto je sklapanje fuzijskog KDM5A-dCas9 konstrukata temeljeno na sklapanju više različitih modula pomoću restrikcijskog enzima BsaI (Josipović i sur. 2019). Ciljana mutageneza napravljena je koristeći *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* prema uputama proizvođača, koristeći početnice prikazane u Tablici 11, prema temperaturnom protokolu u Tablici 12.

Tablica 11. Početnice za ciljanu mutagenezu restrikcijskog mjesta BsaI u sekvenci KDM5A.

Crveno je označen nukleotid koji uvodi mutaciju unutar restrikcijskog mjesta BsaI (podcrtani nukleotidi).

Početnica	Sekvenca (5' – 3')	Tm/ °C
KDM5A_noBsaI_sense	CAGGAAAAGGAACTGGGTCCCTTTTGAAGTCACATTATGA	61
KDM5A_noBsaI_antisense	TCATAATGTGACTTCAAAAAGGACCCAGTTCCTTTTCCTG	64

Tablica 12. Program PCR-a u svrhu ciljane mutageneze restrikcijskog mjesta BsaI iz KDM5A sekvence.

Korak	Temperatura/°C	Trajanje	Broj ciklusa
	95	2 min	1
Denaturacija	95	20 sek	18
Prianjanje početnica	60	10 sek	
Elongacija	68	2 min 24 sek	
Završna elongacija	68	5 min	1
	4	∞	

Po završetku reakcije, dobivenim produktima su transformirane kemijski kompetentne bakterije XL10-Gold postupkom temperaturnog šoka. Transformirane bakterije nasadene su potom na LB ploče s antibiotikom kanamicinom (50 µg/mL) te je idući dan izolirana plazmidna DNA iz određenog broja kolonija. Provjera uvođenja ciljane mutageneze napravljena je metodom sekvenciranja te je mutirani konstrukt nazvan tNS-pN-FD_KDM5A_noBsaI.

3.2.5. Konstrukcija katalitički inaktivnih varijanti PAD4 i KDM5A

Za potrebu kontrola u daljnjem radu na animalnim stanicama, bilo je potrebno konstruirati katalitički inaktivne varijante PAD4 i KDM5A. Ovakvi dCas9 fuzijski konstrukti korišteni su u svrhu provjere CRISPR interferencije na ciljanim genskim lokusima. Ciljana mutageneza u katalitičkom mjestu napravljena je pomoću *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* prema uputama proizvođača. Pregledom ljudskih varijanti proteina (uniprot.org) i prethodno objavljenih znanstvenih radova, dizajniraju se prikladne početnice (Tablica 13) u svrhu dobivanja inaktivne varijante KDM5A uvođenjem mutacije H483A (zamjena histidina na poziciji 483 u alanin) (Liefke i sur. 2010). Za PAD4, odabrana je mutacija C645S (zamjena cisteina na poziciji 645 u serin) (Zhang i sur. 2011). Plazmid tNS_pN_FD-KDM5A_noBsaI korišten je u ciljanoj mutagenezi za dobivanje katalitički inaktivne varijante KDM5A, dok je plazmid tNS_pN_FD-PAD4 korišten za dobivanje katalitički inaktivnog PAD4. PCR program korišten u svrhu ciljane mutageneze prikazan je u Tablici 14.

Tablica 13. Početnice korištene za ciljanu mutagenezu KDM5A i PAD4 u svrhu konstrukcije katalitički inaktivnih varijanti. Crveno označeni nukleotidi uvode mutaciju.

Početnica	Sekvenca (5' – 3')	Tm/ °C
KDM5A_H483A_sense	CTTCTCTTCTTTTGGCTGGGCCATTGAGGATCACTGGAGT	61
KDM5A_H483A_antisense	ACTCCAGTGATCCTCAATGCCCCAGCAAAAAGAAGAGAAG	61
PAD4_C645S_sense	GCATGGGGAGGTGCACTCCGGCACCAA	65
PAD4_C645S_antisense	TTGGTGCCGGAGTGCACCTCCCCATGC	69

Tablica 14. Program PCR-a u svrhu ciljane mutageneze KDM5A i PAD4 u katalitički inaktivne varijante.

Korak	Temperatura/°C	Trajanje	Broj ciklusa
	95	2 min	1
Denaturacija	95	20 sek	18
Prianjanje početnica	60	20 sek	
Elongacija	68	KDM5A 2min 45 sek PAD4 2 min 30 sek	
Završna elongacija	68	5 min	1
	4	∞	

Po završetku programa za ciljanu mutagenezu, transformirane su kemijski kompetentne bakterije XL10-Gold metodom toplinskog šoka. Bakterije su potom razmazane na LB ploče s kanamicinom (50 µg/mL) te je idući dan izolirana plazmidna DNA iz određenog broja kolonija koristeći *ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit*. Katalitički inaktivni konstrukti KDM5A i PAD4 nazvani su tNS-pN-FD_KDM5A_INAKT i tNS-pN-FD_PAD4_INAKT. Provjera uspješnosti mutageneze se vrši metodom sekvenciranja putem servisa Macrogen.

3.2.6. Odabir molekula gRNA za navođenje konstrukata KDM5A-dCas9 i PAD4-dCas9

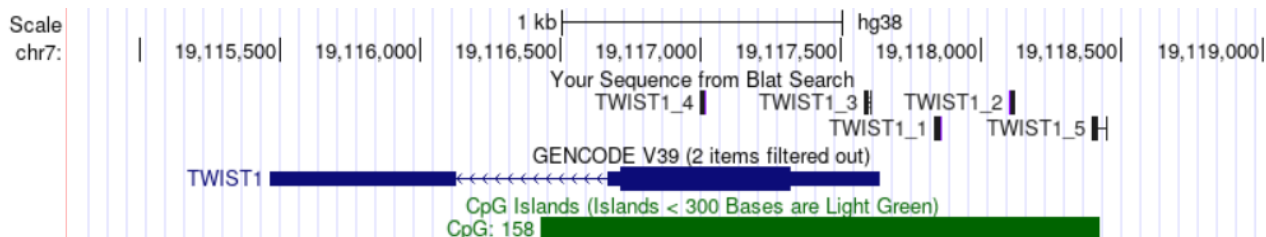
Postupak slaganja fuzijskih dCas9 konstrukata koji će ciljati odabrane gene provodi se prema protokolu objavljenom u radu Josipović i sur., 2019. Prvo je bilo potrebno odabrati odgovarajuće molekule gRNA. Odabrane su sekvence gRNA duljine 20 nt (nukleotida) za navođenje fuzijskog konstrukta KDM5A-dCas9 (ortolog SpCas9) na regije CpG otoka genskih lokusa *ZEB1* i *SNAI1*, dok je fuzijski konstrukt PAD4-dCas9 (ortolog SaCas9) na regije CpG otoka genskih lokusa *KLF8* i *TWIST1* (Tablica 15). Sekvence molekula gRNA za ciljane genske lokuse konstruirane su ručno koristeći pretraživač genoma UCSC i platforme CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), pritom vodeći računa o poziciji sekvence PAM (5' -NGG - 3' za ortolog

SpCas9, 5'-NNGRRT-3' za ortolog SaCas9; pri čemu N označava bilo koji nukleotid, a R označava adenin ili gvanin) koja se mora nalaziti neposredno nizvodno od mjesta vezanja molekule sgRNA na njoj nekomplementarnom lancu, a koja je važna za funkcionalnost proteina Cas9. Uspješna transkripcija molekula sgRNA s promotora U6 zahtijeva nukleotid gvanin kao prvu bazu na 5' kraju stoga je isti dodan u sekvencu gRNA ako nedostaje. Također, na sekvencu molekula gRNA nadodani su ljepljivi krajevi kompatibilni s kloniranjem u module okosnica sgRNA pomoću restrikcijskog enzima BpI. U konačnici sekvenca *sense* treba biti oblika 5'-CACC^GNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN – 3' (crveno označeni G dodaje se po potrebi za spomenuti promotor U6), dok sekvenca *antisense* za molekulu gRNA mora biti oblika 5'-AAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN^C – 3' (crveno označeni C se dodaje po potrebi za transkripciju s promotora U6). Također, treba pripaziti da odabrana molekula gRNA ne sadrži ponavljanja baze timina zbog mogućnosti terminacije transkripcije, pošto su ponavljanja timina zastupljena u sekvenci terminatora U6.

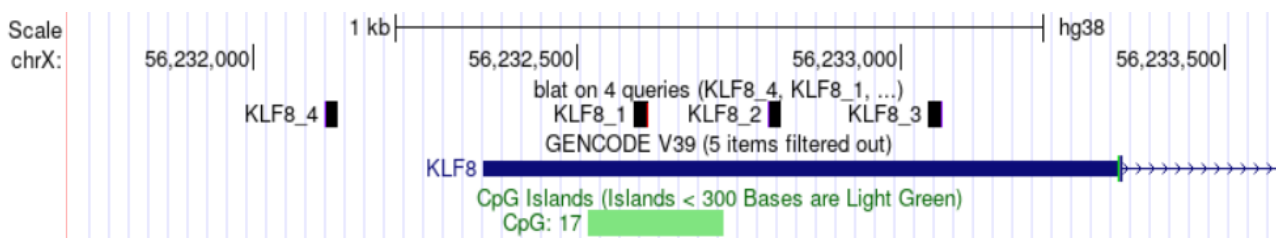
Tablica 15. Odabrane molekule gRNA za ciljanje genskih lokusa *TWIST1*, *KLF8*, *ZEB1*, *SNAI1* i molekula *non-targeting* korištena kao negativna kontrola.

sgRNA	Sekvenca (5' – 3')
TWIST1_1	CCGCCCGGGCCAGGTCGTTT
TWIST1_2	CTAGGTCCGTGGGGCCGATT
TWIST1_3	ACCGTTTCCAGGAGGCCTGG
TWIST1_4	TACGAGGAGCTGCAGACGCA
TWIST1_5	ACCTTCCGAGGCGTAGTCCT
KLF8_1	GAAAAATGGCAGCAACTCGT
KLF8_2	TTATGTTCAAGTAGCGCTTT
KLF8_3	ACCCAAAAATCAGGGGCCGG
KLF8_4	CGTTTCACCACCCTCCCCTG
ZEB1_1	CACTCACCGTTATTGCGCCG
ZEB1_2	TACACGTACATTCGGACCG
ZEB1_3	TCGGCGCCGGCTAACGGTCC
ZEB1_4	CGGCCGGCGGCGGTAAAGTT
ZEB1_5	AGGTACCCACTTAACGCCGC
ZEB1_6	TAGCAGCCCCGCGCTCCGT
SNAI1_1	GCATTCATTGCGCCGCGGCA
SNAI1_2	CTTCGCTCGACGTCCCGCCC
SNAI1_3	ACACCGCACGTGGCTCTCGG
<i>Non-targeting</i>	TAGGCGCGCCGCTCTCTAC

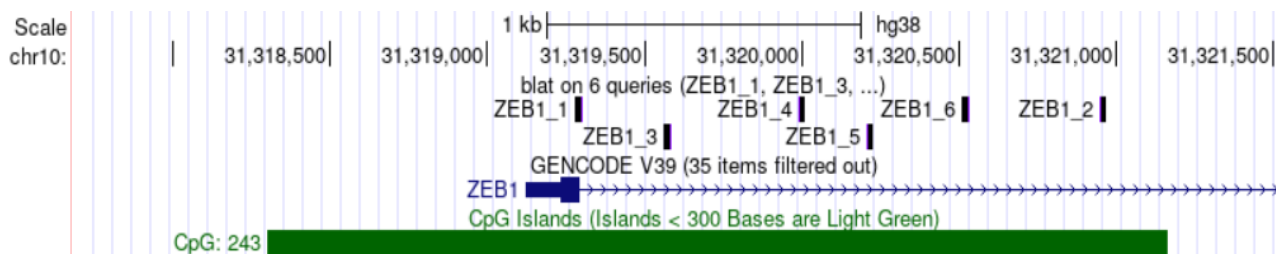
Na slikama 7, 8, 9 i 10 prikazan je položaj molekula gRNA (Tablica 15) za navođenje fuzijskog konstrukta KDM5A-dCas9 i PAD4-dCas9 na regiju CpG otoka odabranih gena. Na prikazima su crnim pravokutnicima naznačeni položaji pojedinih sekvenci gRNA, dok zeleni pravokutnici predstavljaju područje CpG otoka.



Slika 7. Prikaz položaja molekula gRNA za navođenje fuzijskog konstrukta PAD4-dCas9 na CpG otok gena *TWIST1*. Plavim pravokutnikom označena su dva egzona gena *TWIST1*, dok je tankom linijom prikazan intron 1 (strelice upućuju na smjer transkripcije).

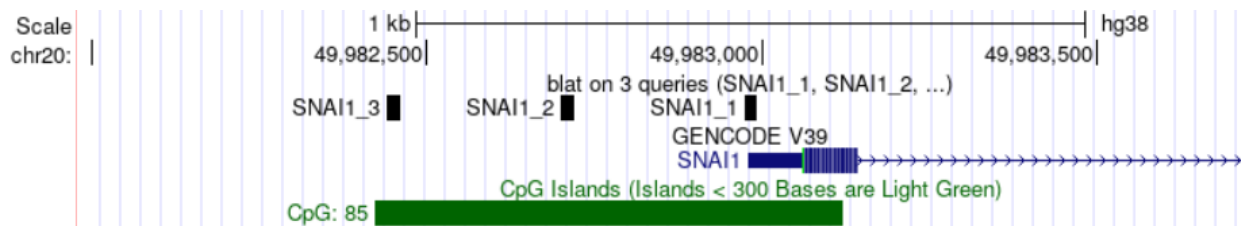


Slika 8. Prikaz položaja molekula gRNA za navođenje fuzijskog konstrukta PAD4-dCas9 na CpG otok gena *KLF8*. Plavim pravokutnikom označen je prvi od šest egzona gena *KLF8*, dok je tankom linijom prikazan prvi od pet introna (strelice upućuju na smjer transkripcije).



Slika 9. Prikaz položaja molekula gRNA za navođenje fuzijskog konstrukta KDM5A-dCas9 na CpG otok gena *ZEB1*. Plavim pravokutnikom označen je prvi od devet egzona gena

ZEB1, dok je tankom linijom prikazan prvi od osam introna (strelice upućuju na smjer transkripcije).



Slika 10. Prikaz položaja molekula gRNA za navođenje fuzijskog konstrukta KDM5A-dCas9 na CpG otok gena *SNAIL1*. Plavim pravokutnikom označen je prvi od tri egzona gena *SNAIL1*, dok je tankom linijom prikazan prvi od dva introna (strelice upućuju na smjer transkripcije).

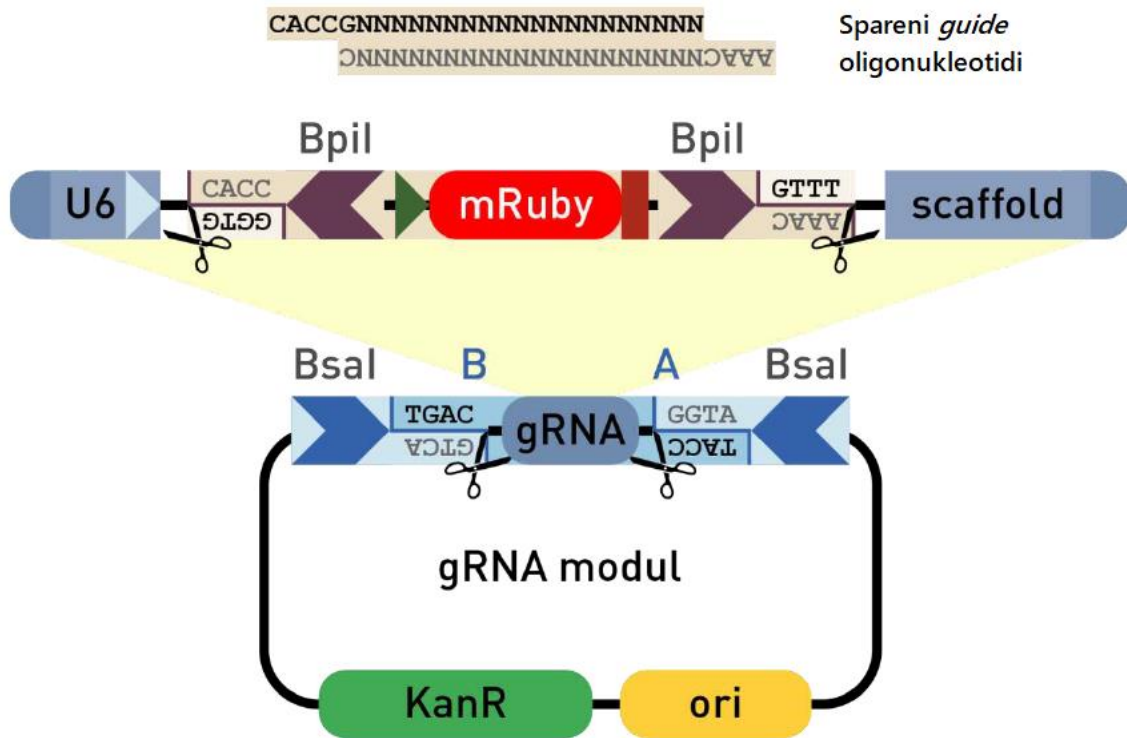
3.2.7. Kloniranje molekula gRNA

Sparivanjem komplementarnih oligonukleotida se stvaraju ljepljivi krajevi kompatibilni s porezanim plazmidima u koje se kloniraju molekule gRNA. Svaki oligonukleotid za molekulu gRNA (*sense* i *antisense*) prvo je fosforiliran na 5' kraju koristeći T4 *Polynucleotide Kinase* prema uputama proizvođača. Reakcija fosforilacije rađena je 30 min na 37 °C, nakon čega slijedi denaturacija 5 min na 95 °C i potom se temperatura postupno snižava (5 °C po minuti) do 25 °C za specifično komplementarno sparivanje.

Sljedeće je slijedila reakcija digestije i ligacije u jednom koraku pomoću *golden gate* enzima BpiI, u molarnom omjeru *gRNA*:plazmid = 5:1 prema protokolu opisanom u Josipović i sur., 2019. Svaka molekula *gRNA* prvo je klonirana u pojedinačni plazmid pSgMX-A ili pSgMX-G (plazmid s oznakom „-A“ predstavlja plazmid s okosnicom sgRNA za ortolog SaCas9, dok plazmid s oznakom „-G“ sadrži okosnicu sgRNA za ortolog SpCas9). Oznaka X u plazmidu označava redoslijed ugradnje pojedine *guide* molekule (pozicija 1-6), tako da se primjerice, prva molekula gRNA za ciljanje gena *TWIST1* ugrađuje u plazmid pSgM1-A, dok se druga ugrađuje u plazmid pSgM2-A, itd. Isti princip vrijedio je i za molekule gRNA koje ciljaju ostale odabrane lokuse pazeći na odgovarajući ortolog proteina Cas9. Shematski prikaz kloniranja molekule gRNA prikazan je na Slici 11. Reakcija digestije i ligacije rađena je prema sljedećem programu: 5 min digestije na 37 °C, nakon čega slijedi ligacija 5 min na 23 °C (oba koraka se provode jedan za drugim u šest ciklusa). Po završetku digestije i ligacije u reakcijske smjese direktno je dodano 5U

egzonukleaze V i 0,5 mM ATP-a u svrhu uklanjanja linearnih molekula DNA molekula 30 min na 37 °C.

Dobivenim plazmidima su potom transformirane kemijski kompetentne bakterije XL10-Gold metodom toplinskog šoka. U svrhu crveno-bijele selekcije bakterijskih kolonija na LB ploče s antibiotikom kanamicinom (50 µg/mL) razmazano je po 50 µL 100 mM IPTG-a. Bakterijske kolonije bijele boje sadrže plazmide s kloniranim molekulama gRNA. Nakon izolacije plazmidne DNA pomoću *ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit*, točnost kloniranja molekula gRNA potvrđena je metodom sekvenciranja putem servisa Macrogen.

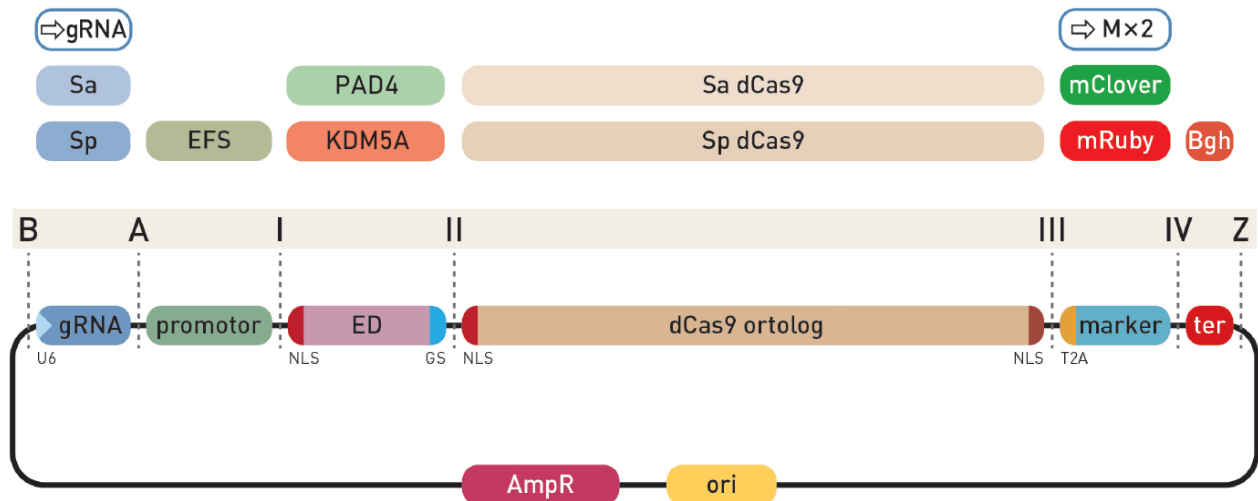


Slika 11. Shematski prikaz kloniranja molekule gRNA. Plazmid s okosnicom sgRNA sadrži promotor U6, okosnicu molekule sgRNA za određeni ortolog proteina Cas9 (SaCas9 ili SpCas9). Između dva restriksijska mjesta BpiI nalazi se fluorescentni biljeg mRuby3 pod promotorom lac operona koji omogućava jednostavnu crveno-bijelu selekciju bakterijskih kolonija, na način da kada dođe do ugradnje molekule gRNA dolazi do izrezivanja biljega mRuby3 pod lac promotorom što bakterijsku koloniju čini bijelom. Preuzeto i prilagođeno iz Josipović i sur. (2019).

3.2.8. Slaganje fuzijskih dCas9 konstrukata

N-terminalne fuzije PAD4-dCas9 i KDM5A-dCas9 i složene su u *backbone* plazmid (Slika 12) reakcijom digestije i ligacije u jednom koraku koristeći *golden gate* enzim BsaI prema postupku opisanom u Josipović i sur. (2019) (Tablica 16). Potrebno je bilo složiti fuzijski konstrukt KDM5A-dCas9 koji će istovremeno biti ciljan na genske lokuse *ZEB1* i *SNAI1* te konstrukt PAD4-dCas9 koji će istovremeno biti ciljan na genske lokuse *KLF8* i *TWIST1*, svaki s ukupno devet različitih molekula sgRNA (Tablica 15). Princip slaganja fuzijskih konstrukata je bio takav da je na prvu poziciju stavljen prazan modul (pozicija B do A, Slika 12) koji može primiti jednu molekulu sgRNA (pSg-x1, koristi se u svrhu *non-target* kontrole) ili šest različitih molekula sgRNA (pSg-x6, u konačnici omogućava kloniranje devet različitih molekula sgRNA) te koji omogućava crveno-bijelu selekciju pozitivnih bakterijskih kolonija. Na sljedeću poziciju (A do I) stavljen je EFS eukariotski promoter RNA polimeraze tipa II. Na poziciju I do II stavljen je efektorska domena (KDM5A ili PAD4), koja sadrži na svom N-terminalnom kraju jezgrin lokalizacijski signal (engl. *Nuclear localization signal*, NLS). Efektorska domena vezana je preko fleksibilnog polipeptidnog lanca (engl. *linker*) sastava Gly4Ser na N-terminalni kraj određenog ortologa proteina dCas9 (dSaCas9 u slučaju efektorske domene PAD4, odnosno dSpCas9 u slučaju efektorske domene KDM5A) koji je stavljen je poziciju II do III. Potom je na poziciju III do IV stavljen selekcijski marker (mRuby3 u slučaju PAD4 ili mClover3 u slučaju KDM5A) vezan na ortolog dCas9 preko samo-cijepajućeg peptida T2A. Konačno, na poziciju IV do Z stavljen je eukariotski transkripcijski terminator. Pomoću modularnog sustava u konačnici su konstruirani katalitički aktivni i inaktivni konstrukti KDM5A-dCas9 i PAD4-dCas9 koji mogu primiti devet različitih molekula sgRNA, kao i kontrolni *non-target* konstrukti.

Dobiveni produkti nakon reakcije digestije i ligacije podvrgnuti su tretmanu egzonukleazom V za uklanjanje linearnih DNA molekula. Nakon tretmana, fuzijskim konstruktima se transformiraju kemijski kompetentne bakterije NEB Stable metodom toplinskog šoka. Transformirane bakterije potom su nasadene na LB ploče s antibiotikom ampicilinom (100 µg/mL) i razmazanih 50 µl X-Gal (20 mg/ml) i 50 µl IPTG-a (100 mM) koji omogućavaju plavo-bijelu selekciju pozitivnih bakterijskih kolonija. Bakterije su ostavljene da rastu preko noći na 37 °C.



Slika 12. Shematski prikaz modularnog sustava CRISPR/dCas9 s praznim modulom (pozicija B do A), EFS eukariotskim promotorom (A do I), efektorskom domenom (I do II), dCas9 ortologom (II do III), fluorescentnim selekcijskim markerom (III do IV) i eukariotskim transkripcijskim terminatorom (IV do Z). N-terminalne fuzije efektorska domena (ED) - dCas9 slažu se u plazmid koristeći enzim BsaI. Preuzeto i prilagođeno iz Josipović i sur. (2019).

Tablica 16. Program restrikcije (BsaI) i ligacije u svrhu dobivanja fuzijskih dCas9 konstrukata.

Temperatura/ °C	Vrijeme	Broj ciklusa
37	5 minuta	30
16	10 minuta	
50	15	1
80	10	1
4	∞	

Plazmidna DNA se izolira i pročišćava iz prekonocnih kultura koristeći *ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit*, prema uputama proizvođača. Ispravnost dobivenih konstrukata provjerena je restrikcijskom analizom pomoću enzima XbaI u puferu *CutSmart* prema uputama proizvođača. Reakcija digestije je prekonocna (17 sati na 37 °C), nakon čega je slijedila inaktivacija enzima 20 minuta na 65 °C. Nakon prekonocne restrikcije produkti rezanja razdvojeni su na agaroznom gelu.

3.2.9. Slaganje molekula sgRNA u fuzijske dCas9 konstrukte

Završni fuzijski konstrukt PAD4-dCas9 i KDM5A-dCas9 imat će po devet različitih molekula sgRNA. Prvo, pet različitih molekula gRNA kloniranih u plazmide pSgMX-A ili pSgMX-G i na zadnjoj poziciji kratki oligonukleotid (*multi-staffer*) složeno je u prazne katalitički aktivne i inaktivne fuzijske konstrukte (KDM5A-dCas9 i PAD4-dCas9) koji sadrže modul pSg-x6 (može primiti šest različitih molekula sgRNA) pomoću restriksijskog enzima Esp3I prema protokolu iz Josipović i sur. (2019) (Tablica 17). U slučaju kontrolnih *non-target* fuzijskih dCas9 konstrukata *non-target* molekula gRNA, uklonirana u plazmid pSgM1-A ili pSgM1-G, klonirana je u prazne fuzijske konstrukte (KDM5A-dCas9 i PAD4-dCas9) koji sadrže modul pSg-x1. Reakcija digestije i ligacije rađena je u molarnom omjeru insert:plazmid 5:1 prema protokolu prikazanom u Tablici 18. Plazmidi dobiveni ovim korakom sadrže pet različitih molekula sgRNA za ciljanje odabranih lokusa i *multi-staffer* na poziciji 6. molekule sgRNA koji sadrži dva restriksijska mjesta BsaI (stvara ljepljive krajeve B do A) potrebna za ubacivanje preostalog broja molekula sgRNA složenih pomoću restriksijskog enzima Esp3I u plazmid pSg-x4. Pristup ka slaganju više od šesti različitih molekula sgRNA pomoću oligonukleotida *multi-staffer* razvijen je u grupi prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš te trenutno nije objavljen.

Tablica 17. Shema ugradnje gRNA kloniranih u pSgMXA ili pSgMXG plazmidima u fuzijske konstrukte.

Plazmid	gRNA ili <i>stuffer</i>	Konstrukt
pSgM1A	TWIST1_1	N-PADI4_dSaCas9_Puro_Ruby_2nd
pSgM2A	TWIST1_2	
pSgM3A	TWIST1_3	
pSgM4A	TWIST1_4	
pSgM5A	TWIST1_5	
	Multi-guide_stuffer_IV_Z	
pSgM1A	KLF8_1	N-PADI4_dSaCas9_Puro_Ruby_2nd+TWIST1-gRNA×5+stuffer
pSgM2A	KLF8_2	
pSgM3A	KLF8_3	
pSgM4A	KLF8_4	
pSgM1A	NT_gRNA	N-PADI4_dSaCas9_Puro_Ruby_2nd
pSgM1G	ZEB1_1	N-KDM5A_dSpCas9_Puro_Clover_2nd
pSgM2G	ZEB1_2	
pSgM3G	ZEB1_3	
pSgM4G	ZEB1_4	
pSGM5G	ZEB1_5	
	Multi-guide_stuffer_IV_Z	
pSgM1G	SNAI1_1	N-KDM5A_dSpCas9_Puro_Clover_2nd+ZEB1-gRNA×5+stuffer
pSgM2G	SNAI1_2	
pSgM3G	SNAI1_3	
pSgM4G	ZEB1_6	
pSgM1G	NT-gRNA	N-KDM5A_dSpCas9_Puro_Clover_2nd

Tablica 18. Program restrikcije (Esp3I) i ligacije potrebnog za slaganje više molekula sgRNA u fuzijske dCas9 konstrukte.

Temperatura/ °C	Vrijeme	Broj ciklusa
37	5 minuta	10
16	10 minuta	
37	15	1
80	10	1
4	∞	

Nakon reakcije digestije i ligacije, dobiveni produkti su podvrgnuti tretmanu egzonukleazom V. Nakon tretmana, složeni konstrukti transformirani su u kemijski kompetentne bakterije NEB Stable metodom toplinskog šoka. Transformirane bakterije razmazane su potom na LB ploče s antibiotikom ampicilinom (100 µg/ml) uz razmazanih 50 µL IPTG-a (100 mM) kako bi se omogućila crveno-bijela selekcija pozitivnih bakterijskih kolonija. Bakterije su ostavljene da rastu preko noći na 37 °C.

Izolirani fuzijski konstrukti (katalitički aktivni i inaktivni) s pet različitih molekula sgRNA i oligonukleotidom *multi-staffer*, pomoću *ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit*, su provjereni restriksijskom digestijom (Tablica 19). Reakcije digestije su prekonoćne: 10 sati na 37 °C nakon čega je slijedila inaktivacija enzima 20 minuta na 65 °C. Produkti restriksijskih reakcija su provjerni agaroznom elektroforezom.

Tablica 19. Restriksijska provjera fuzijskih dCas9 konstrukata.

Konstrukt	Enzim/Pufer za reakciju
N-PAD4_dSaCas9_Puro_Ruby_2nd+TWIST1-gRNA×5+multi_staffer	SacI+AgeI/ NEBuffer 1.1
N-PAD4_INAKT_dSaCas9_Puro_Ruby_2nd+TWIST1-gRNA×5+multi_staffer	SacI+AgeI/ NEBuffer 1.1
N-PAD4_dSaCas9_Puro_Ruby_2nd+NT_gRNA	SacI / NEBuffer 1.1
N-KDM5A_dSpCas9_Puro_Clover_2nd+ZEB1-gRNA×5+multi_staffer	Acc65I/ NEBuffer 3.1
N-KDM5A_INAKT_dSpCas9_Puro_Ruby_2nd+ZEB1-gRNA×5+multi_staffer	SacI/ NEBuffer 3.1
N-KDM5A_dSpCas9_Puro_Clover_2nd+NT_gRNA	EagI/ NEBuffer 3.1

U svrhu dobivanja završnih konstrukata bilo je potrebno složiti preostale molekule sgRNA u katalitički aktivne i inaktivne fuzijske KDM5A-dCas9 i PAD4-dCas9 konstrukte koji sadrže pet različitih molekula sgRNA i oligonukleotid *multi-staffer*. Postupak kloniranja preostalih četiri molekula sgRNA, prethodno složenih pomoću restriksijskog enzima Esp3I u plazmid pSg-x4, proveden je koristeći *golden gate* enzim BsaI prema protokolu u Tablici 16, uz molarni omjer

insert:plazmid 3:1. Nakon reakcije digestije i ligacije, dobiveni produkti su podvrgnuti tretmanu egzonukleazom V i transformirani u kemijski kompetentne bakterije NEB Stable metodom toplinskog šoka. Transformirane bakterije razmazane su potom na LB ploče s antibiotikom ampicilinom (100 µg/ml). Bakterije su ostavljene da rastu preko noći na 37 °C.

Izolirani završni katalitički aktivni i inaktivni KDM5A-dCas9 i PAD4-dCas9 fuzijski konstrukti s devet različitih molekula sgRNA, koristeći *ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit*, provjereni su restriksijskom digestijom. Restrikcija pomoću EagI rađena je za konstrukte KDM5A-dCas9, odnosno PstI za konstrukte PAD4-dCas9. Reakcije restrikcije su bile prekonoćne: 10 sati na 37 °C nakon čega je slijedila inaktivacija enzima 20 minuta na 65 °C. Produkti restrikcije provjereni su agaroznom gel elektroforezom.

3.2.10. Kultura stanica HepG2 i transfekcija plazmidnim konstruktima

Kultura stanica HepG2 održavana je u petrijevka u mediju RPMI-1640 obogaćenim s 10% FBS-om. Rast stanica proveden je na 37 °C uz 5% CO₂ u inkubatoru HeraCell Incubator (Thermo Heraeus) te je praćen invertnim svjetlosnim mikroskopom uz procjenu konfluencije i presađivanje dva puta tjedno.

Dan prije transfekcije, $4,2 \times 10^6$ stanica HepG2 nasadeno je u svaku petrijevku kako bi na dan transfekcije bile oko 60-70% konfluentne. Transfekcija stanica HepG2 rađena je u biološkim triplikatima pri čemu su korišteni katalitički aktivni i inaktivni fuzijski KDM5A-dCas9 i PAD4-dCas9 konstrukti kao i *non-target* konstrukti. Postupak transfekcije proveden je prema protokolu Longo i sur. 2013. Kao transfekcijski reagens korišten je PEI MAX (MW 40 000) u omjeru 3 µL reagens na 1 µg plazmidne DNA (ukupno 8 µg plazmidne DNA po petrijevki). Na dan transfekcije, stanicama je promijenjen medij te je dodano 10 ml svježeg medija RPMI-1640 obogaćenog s 10% FBS-om. Medij OptiMEM, koji ne sadrži serum ni antibiotike, korišten je za stvaranje kompleksa PEI MAX i plazmidna DNA. Nakon inkubacije PEI MAX-a i plazmidne DNA od 30 min, transfekcijska smjesa dodana je u odgovarajuće petrijevke sa stanicama.

24 h nakon transfekcije, uspješnost transfekcije stanica provjerena je promatranjem fluorescencijskog biljega koji se nalazi na fuzijskim dCas9 konstruktima (mRuby3 kod PAD4-dCas9, mClover3 kod KDM5A-dCas9) pod invertnim fluorescencijskim mikroskopom. Protein mRuby3 ima ekscitacijski i emisijski maksimum na valnim duljinama 558 i 592 nm, a mClover3

ima ekscitacijski i emisijski maksimum na valnim duljinama 506 i 518 nm (Bajar i sur. 2016). Budući da je korišten mikroskop koji ima posebne filtere za detekciju crvene i zelene fluorescencije, slikane su zasebne slike na filterima i na svjetlom polju, koje su potom preklopljene. Selekcija transfeciranih stanica, u trajanju od 48 h, napravljena je koristeći antibiotik puromicin u koncentraciji od 3,8 µg/ml uz obnovu selekcije nakon 24 h. Treći dan od transfekcije stanica, prekinuta je selekcija transfeciranih stanica tako što je stanicama uklonjen medij s antibiotikom puromicinom (3,8 µg/ml), stanice su potom isprane PBS-om (1x) te je dodan medij RPMI-1640 obogaćen s 10% FBS-om. Transfecirane stanice potom su skupljane 8. i 12. dan nakon prolazne transfekcije u svrhu analize ekspresije ciljanih genskih lokusa.

3.2.11. Analiza ekspresije ciljanih genskih lokusa nakon epigenetičke manipulacije

Ukupna RNA izolirana je iz transfeciranih stanica HepG2 8. i 12. dan od prolazne transfekcije koristeći *RNeasy Mini Kit* prema uputama proizvođača. Uzorci stanica su tripsinizirani i istaloženi centrifugiranjem 5 min pri 300 g. Stanični talog je liziran u 350 µL pufera RLT i lizat homogeniziran vorteksiranjem. Dodaje se 1 volumen 70%-tnog etanola i lizat je pročišćen na koloni prema uputama proizvođača te RNA eluirana u vodu bez RNAza. Izolirana RNA potom je podvrgnuta tretmanu DNazom pomoću komercijalno dostupnog seta *TURBO DNA-free set* prema uputama proizvođača. U reakciju s DNazom se išlo s 1,5 µg RNA za sve uzorke. Izolirana RNA iz koje je uklonjena sva zaostala genomska DNA, potom je prevedena u cDNA reakcijom reverzne transkripcije koristeći nasumične heksamere i reverznu transkriptazu *PrimeScript Reverse Transcriptase*, prema uputama proizvođača. Ukupno u reakciju reverzne transkripcije išlo se s 400 ng RNA.

Ekspresija gena *TWIST1*, *ZEB1*, *KLF8* i *SNAI1* u stanicama HepG2 nakon transfekcije, analizirana je metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu (qRT-PCR) na uređaju 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Korišten je *Power SYBR Green Master Mix* koji sadrži fluorescencijsku boju *SYBR Green*. U svakom ciklusu reakcije boja se veže na dvolančanu DNA, pojačavajući intenzitet fluorescencije kroz svaki novi ciklus, što se detektira na uređaju i određuje Ct vrijednost. Za endogenu kontrolu ekspresije ciljanih gena korišten je gen *HMBS* (engl. *hydroxymethylbilane synthase*). Za detekciju ekspresije gena *TWIST1*, *ZEB1*, *KLF8* i *SNAI1* korištene su specifične početnice (Tablica 20), a reakcijska smjesa složena je prema uputama proizvođača. Svaka reakcija qRT-PCR-a rađena je u dvije tehničke replike uz

odgovarajuće negativne kontrole (reakcijska smjesa pomiješana samo s vodom), prema programu: 10 min aktivacije enzima na 95 °C, zatim 40 ciklusa denaturacije (15 sekundi na 95 °C) i prijanjanja/ekstenzije (1 min na 60 °C).

Rezultati reakcije qRT-PCR analizirani su metodom $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl 2001) pri čemu su uzorci transfecirani *non-target* fuzijskim dCas9 konstruktima korišteni kao referentan uzorak. $\Delta\Delta C_t$ vrijednosti korištene su potom za izračun faktora promjene ekspresije gena Fc (engl. *fold change*). Napravljena je analiza ΔC_t vrijednosti aktivnih i inaktivnih bioloških skupina stanica u odnosu na ΔC_t vrijednosti non-target skupine uporabom t-testa kako bi se provjerilo dolazi li do statistički značajne promjene ekspresije gena.

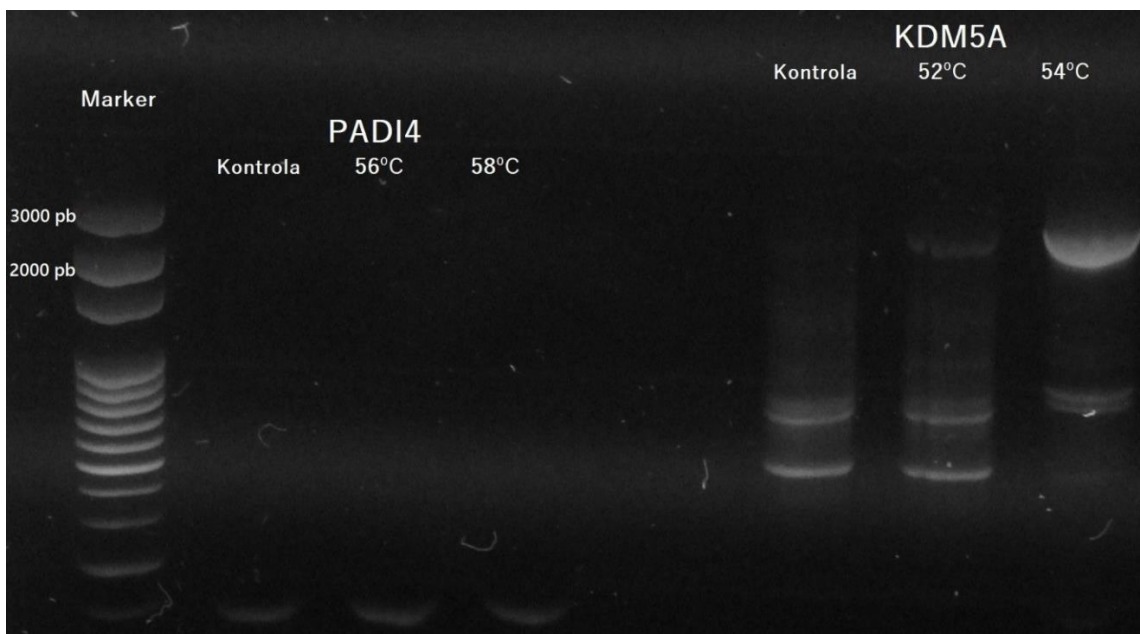
Tablica 20. Početnice korištene za analizu ekspresije ciljanih gena reakcijom qRT-PCR.

Početnica	Sekvenca
ZEB1_qRT-PCR_Fw	GATGATGAATGCGAGTCAGATGC
ZEB1_gRT-PCR_Rev	ACAGCAGTGTCTTGTGTTGT
SNAI1_qRT-PCR_Fw	CGAGTGGTTCTTCTGCGCTA
SNAI1_qRT-PCR_Rev	GGGCTGCTGGAAGGTAAACT
TWIST1_qRT-PCR_Fw	GCCGGAGACCTAGATGTCATT
TWIST1_qRT-PCR_Rev	TTTTAAAAGTGCGCCCCACG
KLF8_qRT-PCR_Fw	TTCGGAACAGAGATCCCCCT
KLF8_qRT-PCR_Rev	TTCTCCATGGGGTTGGCATC
HMBS_qRT-PCR_Fw	AGCTTGCTCGCATAACAGACG
HMBS_qRT-PCR_Rev	AGCTCCTTGGTAAACAGGCTT

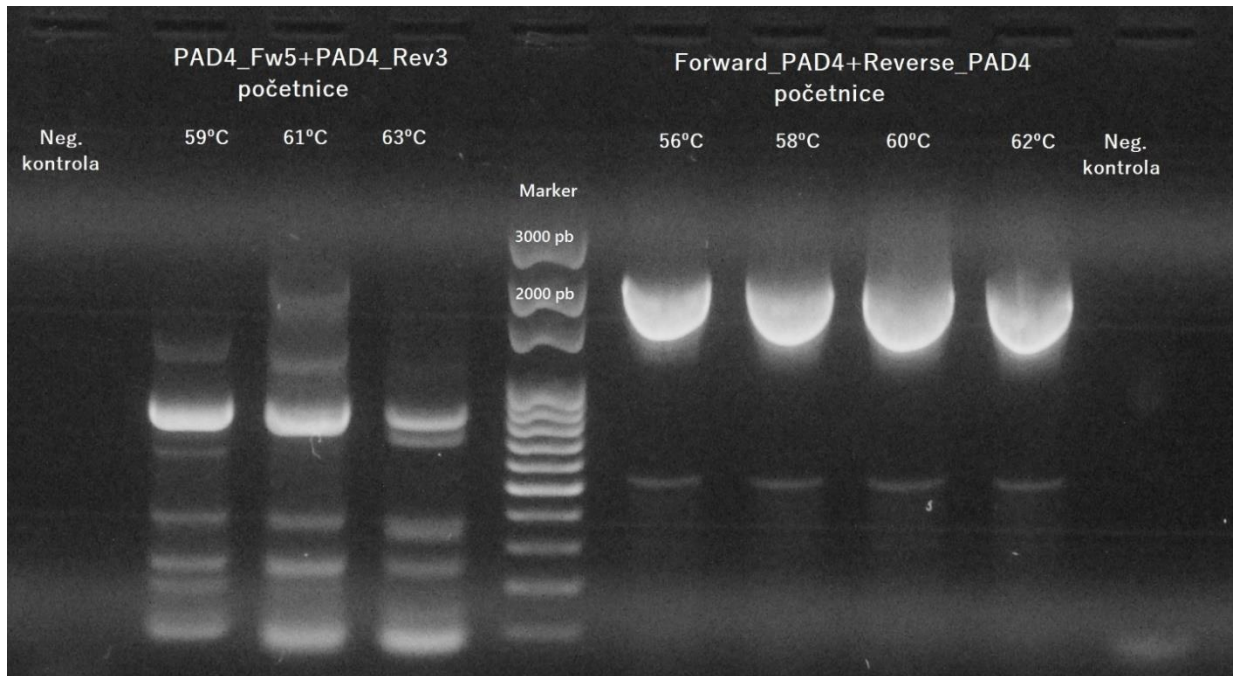
4. Rezultati

4.1. PCR umnažanje PAD4 i KDM5A iz cDNA

Prva provjera umnažanja CDS sekvenci pokazuje uspješno umnažanje KDM5A (1-797) početnicama Forward_KDM5A i Reverse_KDM5A (Tablica 2) na 54 °C. Dobiven je fragment između 2000 i 3000 pb prema markeru, a očekivan je amplicon veličine 2431 pb (Slika 13). CDS sekvenca *PAD4* isprva nije uspješno umnožena s početnicama Forward_PAD4 i Reverse_PAD4, što se može vidjeti na Slici 13. Isprobani su različiti uvjeti reakcije no nije došlo do specifičnog umnažanja *PAD4*. Dizajnirane su nove početnice (Tablica 5) s kojima je prvo napravljen PCR koristeći *EmeraldAmp MAX PCR Master Mix* (Tablica 6 i 7). Kombinacija početnica PAD4_Fw5-PAD4_Rev3 dala je najjasniji *band* oko 2000 pb prema markeru (očekivani amplicon je 2020 pb). Kombinacijom početnica PAD4_Fw5-PAD4_Rev3 (Tablica 5) je potom napravljen PCR koristeći *Herculase II fusion* polimerazu (Tablica 8), a reakcija s temperaturom prijanjanja početnica na 61 °C daje najjasniji fragment oko 2000 pb prema markeru (Slika 14). Drugi PCR je potom napravljen koristeći Forward_PAD4 i Reverse_PAD4 početnice prema programu u Tablici 9 te je na gelu vidljiv fragment oko 2000 pb prema markeru u svim reakcijama (očekivani amplicon je 1992 pb, Slika 14).



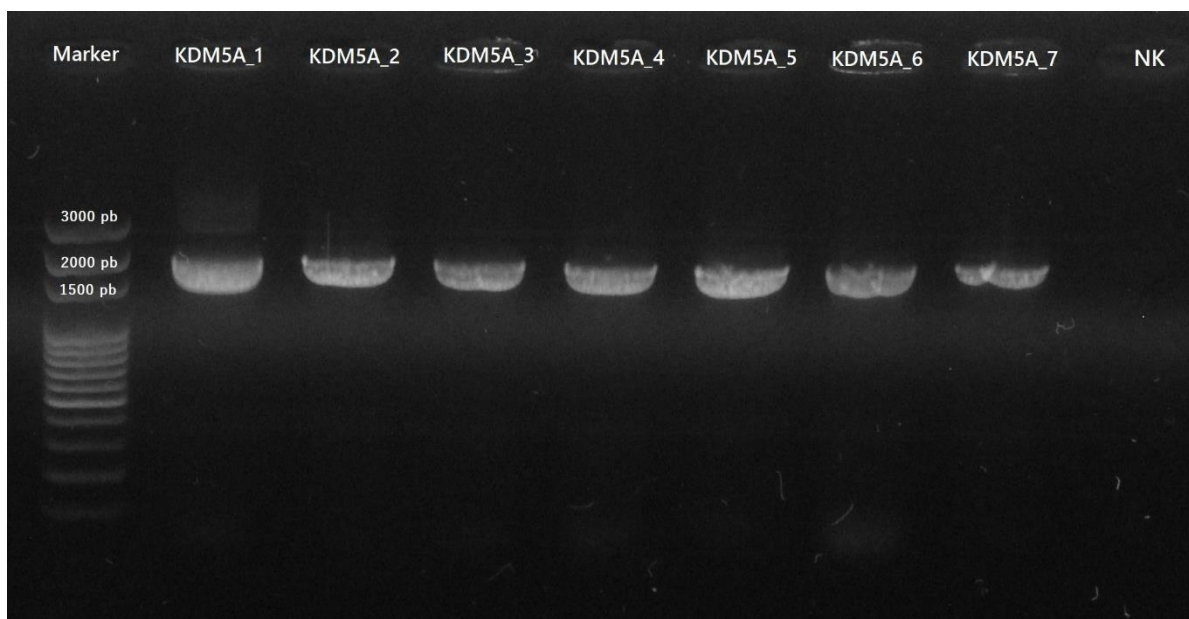
Slika 13. Agarozna elektroforeza produkata PCR umnažanja *PAD4* i *KDM5A*. Reakcija PCR-a za *PAD4* nije rezultirala željenim ampliconom od 2029 pb. Reakcija PCR-a za *KDM5A* (1-797) pokazuje željeni amplicon na 54 °C veličine 2431 pb.



Slika 14. Agarozna elektroforeza produkata PCR reakcija umnažanja PAD4. Prvi PCR (jažice lijevo od markera) napravljen je s početnicama PAD4_Fw5 i PAD4_Rev3 (Tablica 5), a reakcija pokazuje željeni amplikon na temperaturi prijanjanja početnica 61 °C, veličine 2020 pb. Drugi PCR (jažice desno od markera) napravljen je s početnicama Forward_PAD4 i Reverse_PAD4 te reakcija pokazuje željeni amplikon veličine 1992 pb. Ove reakcije predstavljaju postupak nested PCR-a kojim se umnožila protein kodirajuća sekvenca *PAD4*.

4.2. Kloniranje plazmida s epigenetičkim efektorskim domena PAD4 I KDM5A (1-797)

Nakon uspješnog umnažanja PAD4 i KDM5A (1-797) iz cDNA pomoću reakcije PCR-a, cilj je bio klonirati epigenetičke efektorske domene u destinacijski plazmid N-FD_empty-RE te su dobiveni konstrukti: tNS_pN_FD-PAD4 i tNS_pN_FD-KDM5A. Ispravnost konstrukta tNS_pN_FD-KDM5A provjerena je PCR-om bakterijskih kolonija (*EmeraldAmp MAX PCR kit*, Tablica 10) početnicama pUX21_seqF i pUX21_seqR (Tablica 2) i agaroznom elektroforezom (Slika 15). U slučaju kloniranja tNS_pN_FD-PAD4 nije rađen *colony* PCR jer je kroz 2 koraka nested PCR-a sigurno umnožena željena regija.

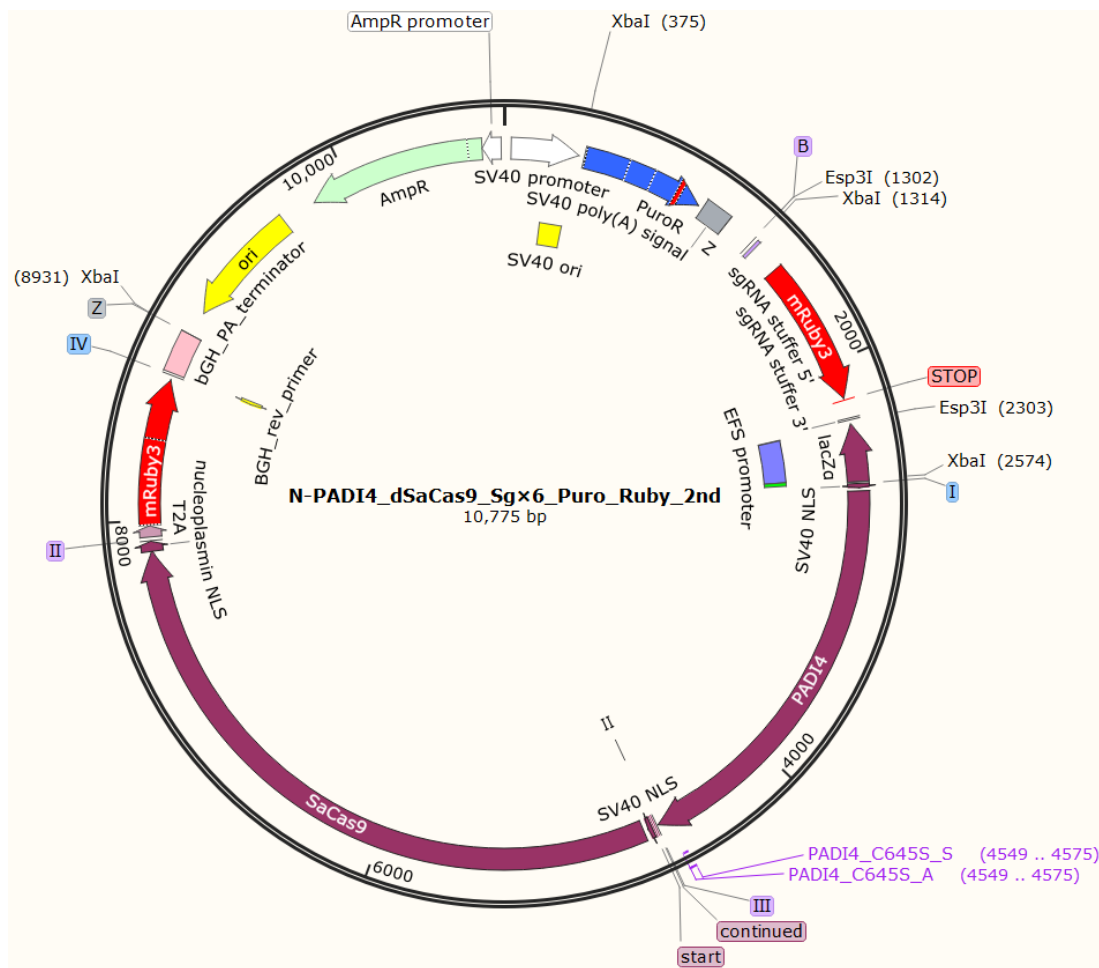


Slika 15. Agarozna elektroforeza produkata *colony* PCR tNS_pN_FD-KDM5A. Reakcija je provedena početnicama pUX21_seqF i pUX21_seqR i pokazuje željeni ampikon veličine 1735 pb u svim uzorcima. Za uzorak negativne kontrole korišten je sami *EmeraldAmp MAX PCR Master Mix*.

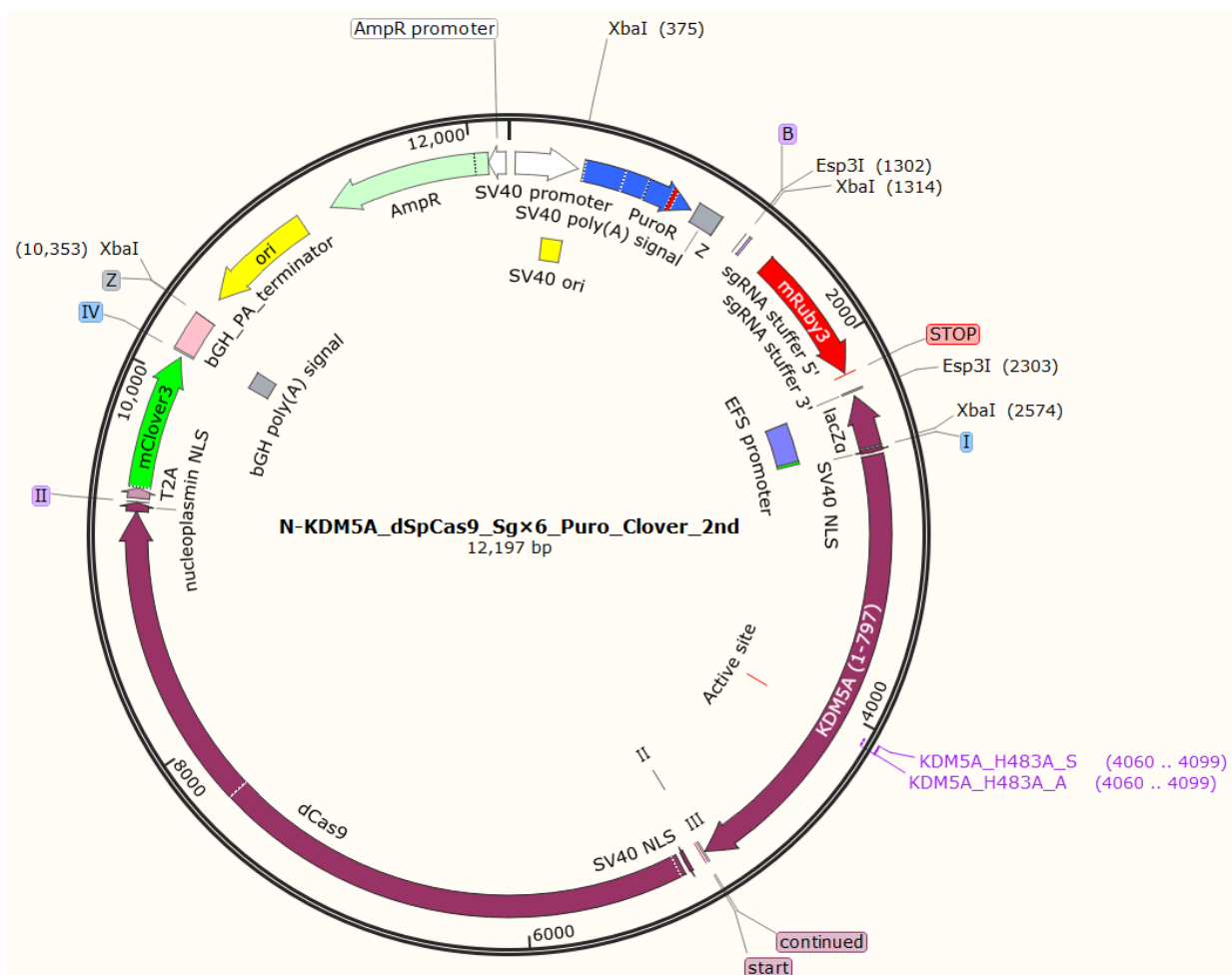
Konstrukti tNS_pN_FD-PAD4 i tNS_pN_FD-KDM5A potom su provjereni sekvenciranjem. Rezultati sekvenciranja pokazuju da je dobiven dobar klon za tNS_pN_FD-KDM5A. Dobiveni su dobri klonovi tNS_pN_FD-PAD4 koji sadrže polimorfizam jednog nukleotida (*single nucleotide polymorphism*, SNP) Gly242 (GGT) -> Ser (AGT) koji predstavlja prethodno poznatu varijaciju rs41265995 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs41265995>).

4.3. Slaganje fuzijskih PAD4-dCas9 i KDM5A-dCas9 konstrukata

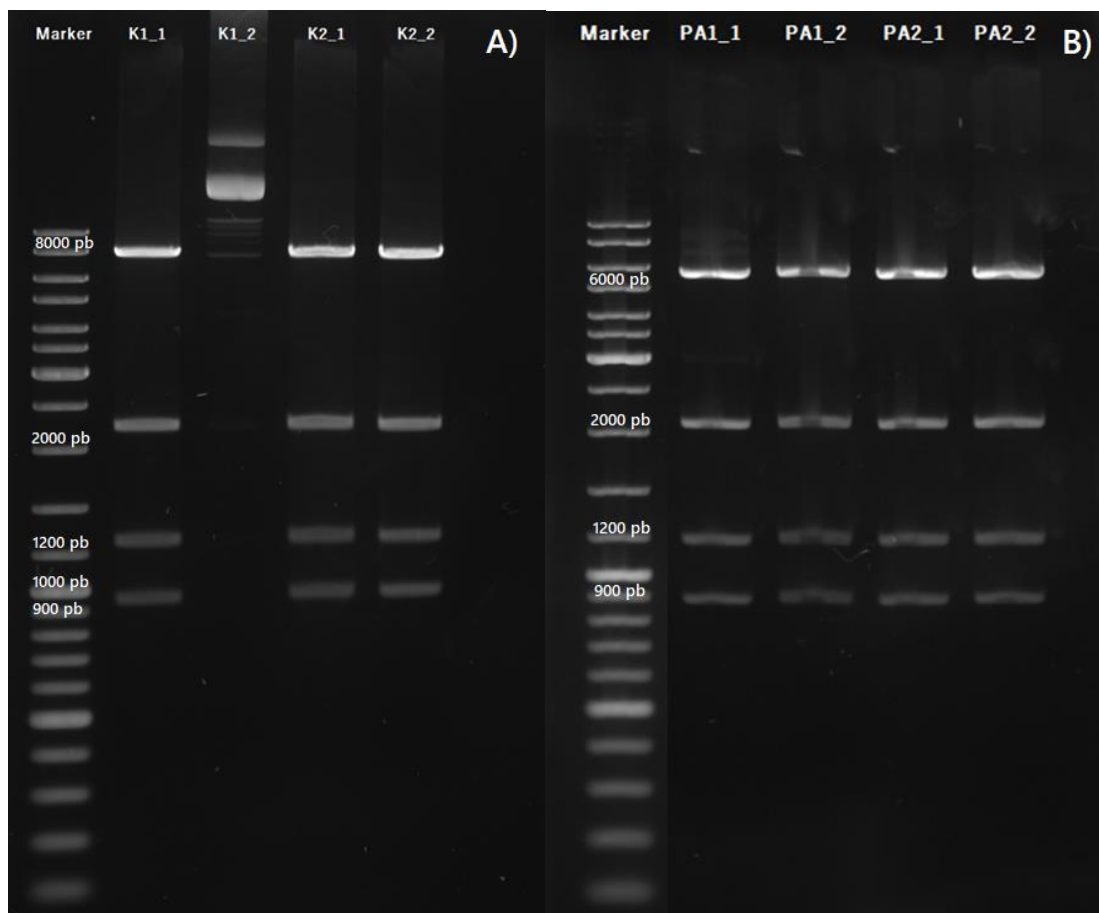
Sljedeći cilj bio je slaganje fuzijskih PAD4-dCas9 i KDM5A-dCas9 konstrukata. Konstrukti tNS_pN_FD-PAD4 i tNS_pN_FD-KDM5A korišteni su za slaganje katalitički aktivnih i inaktivnih konstrukata PAD4-dCas9 i KDM5A-dCas9 (Slika 16 i 17) koristeći BsaI. Konstrukti su restrikcijski provjereni s XbaI, na Slici 18 vide se dobiveni fragmenti konstrukata odgovarajućih veličina (veličina cijelog N-PADI4_dSaCas9_Puro_Ruby_2nd je 10,775 pb, a N-KDM5A_dSpCas9_Puro_Clover_2nd konstrukta 12,197 pb).



Slika 16. Shematski prikaz fuzijskog konstrukta PAD4-dCas9 s praznim modulom (pozicija B do A), EFS eukariotskim promotorom (A do I), efektorskom domenom (I do II), dSaCas9 (II do III), mRuby3 selekcijski marker (III do IV) i eukariotskim transkripcijskim terminatorom (IV do Z). Na slici je posebno naznačena pozicija vezanja početnica PAD4_C645S (*sense/antisense*) na kojoj je provedena ciljane mutageneza u svrhu dobivanja katalitički inaktivne varijante proteina PAD4, mjesta prepoznavanja restriksijskog enzima Esp3I važnog za sljedeći korak kloniranja više molekula sgRNA te mjesto prepoznavanja XbaI za restriksijsku provjeru.

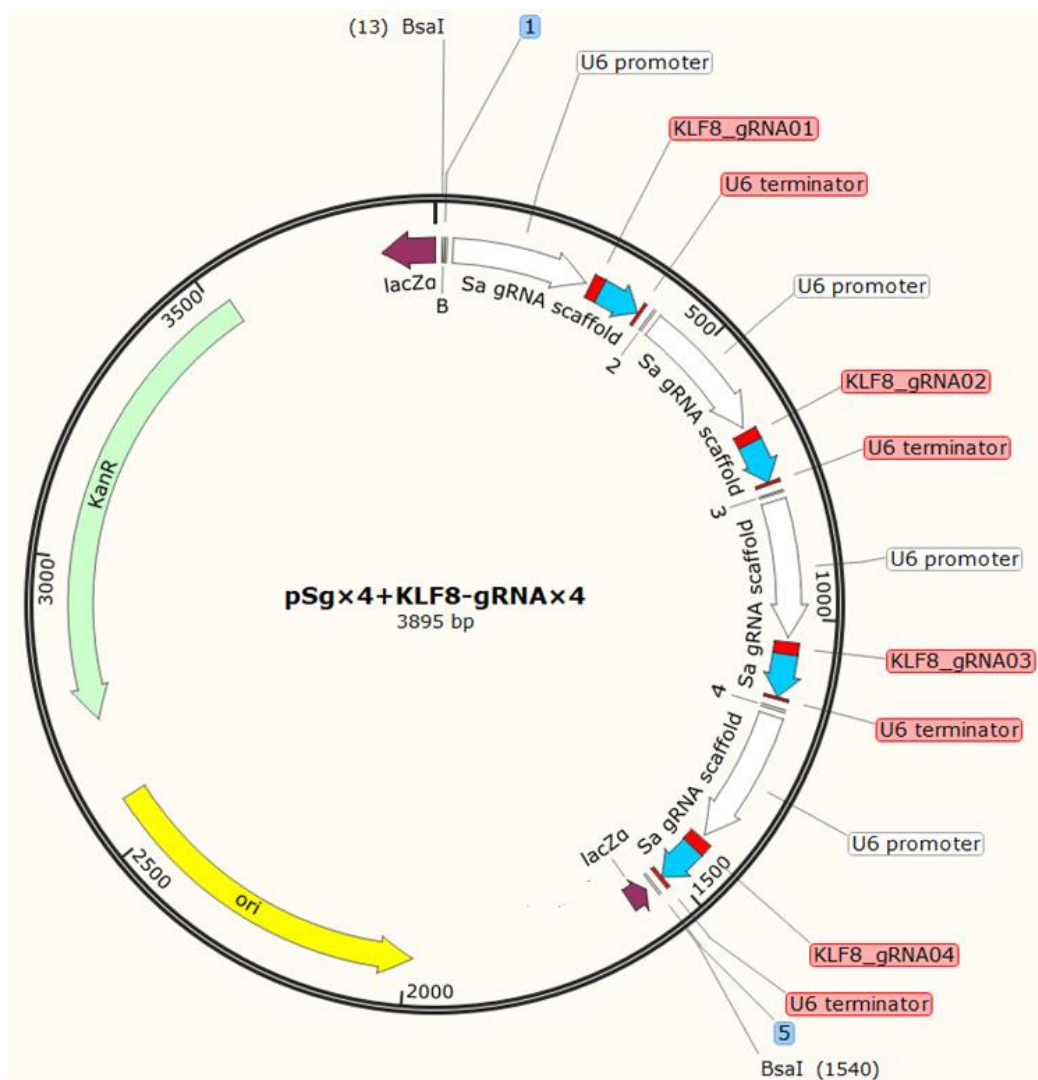


Slika 17. Shematski prikaz fuzijskog konstrukta KDM5A-dCas9 s praznim modulom (pozicija B do A), EFS eukariotskim promotorom (A do I), efektorskom domenom (I do II), dSpCas9 (II do III), mClover3 selekcijski marker (III do IV) i eukariotskim transkripcijskim terminatorom (IV do Z). Posebno je naznačena pozicija vezanja početnica KDM5A_H483A (*sense/antisense*) na kojoj se provodila mutageneza u inaktivni oblik proteina, mjesto prepoznavanja restriksijskog enzima Esp3I važnog za sljedeći korak kloniranja i mjesto prepoznavanja XbaI za restriksijsku provjeru.

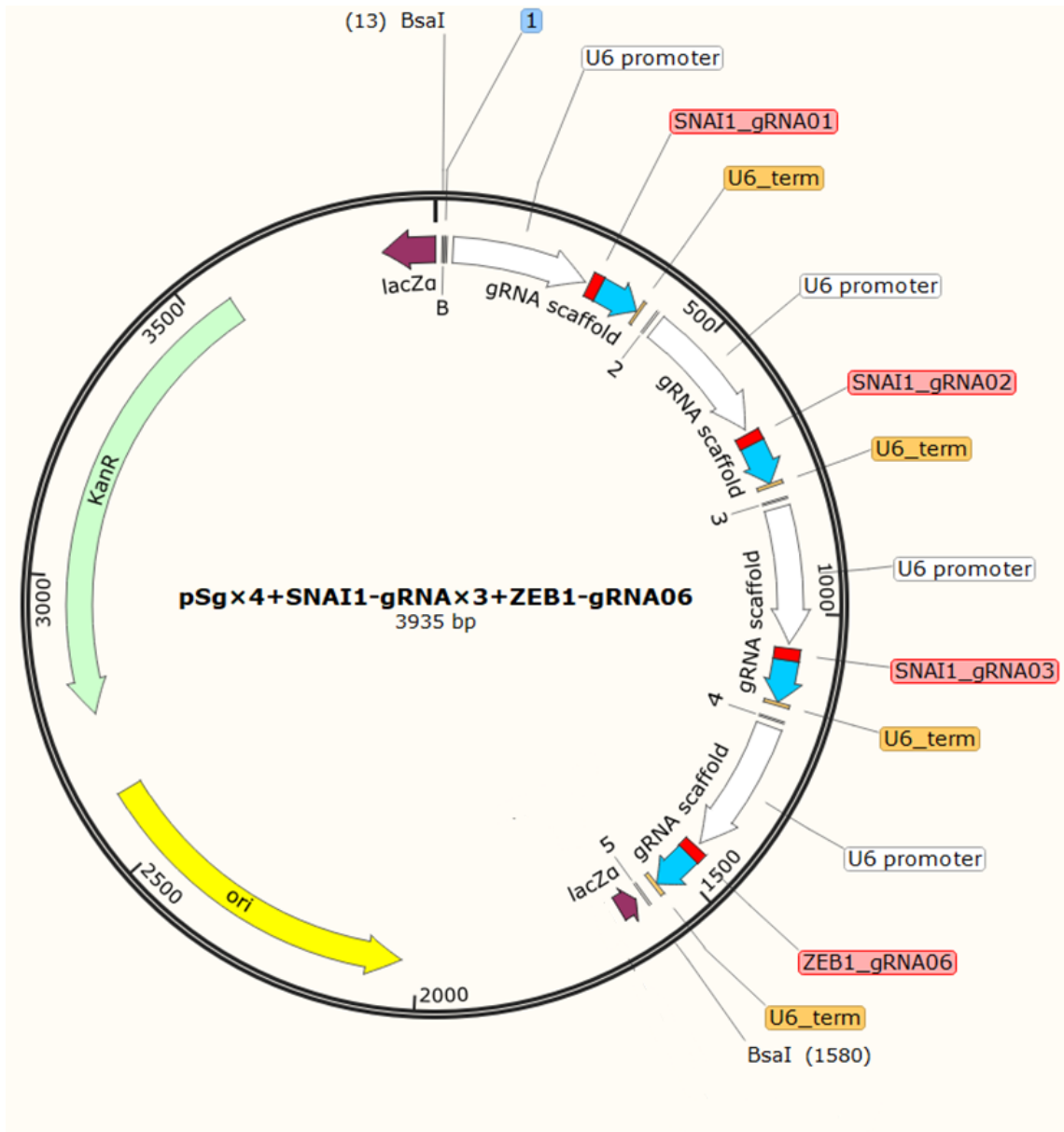


Slika 18. Agarozna elektroforeza produkata XbaI restrikcijske reakcije katalitički aktivnih i inaktivnih fuzijskih konstrukata KDM5A_dCas9 i PADI4_dCas9. A) Katalitički aktivni oblik (uzorci K1_1, K1_2) i inaktivni oblik (uzorci K2_1, K2_2) KDM5A-dCas9 konstrukta. B) Aktivni oblik (uzorci PA1_1, PA1_2) i inaktivni oblik (uzorci PA2_1, PA2_2) PAD4-dCas9 konstrukta. Konstrukti su rezani enzimom XbaI.

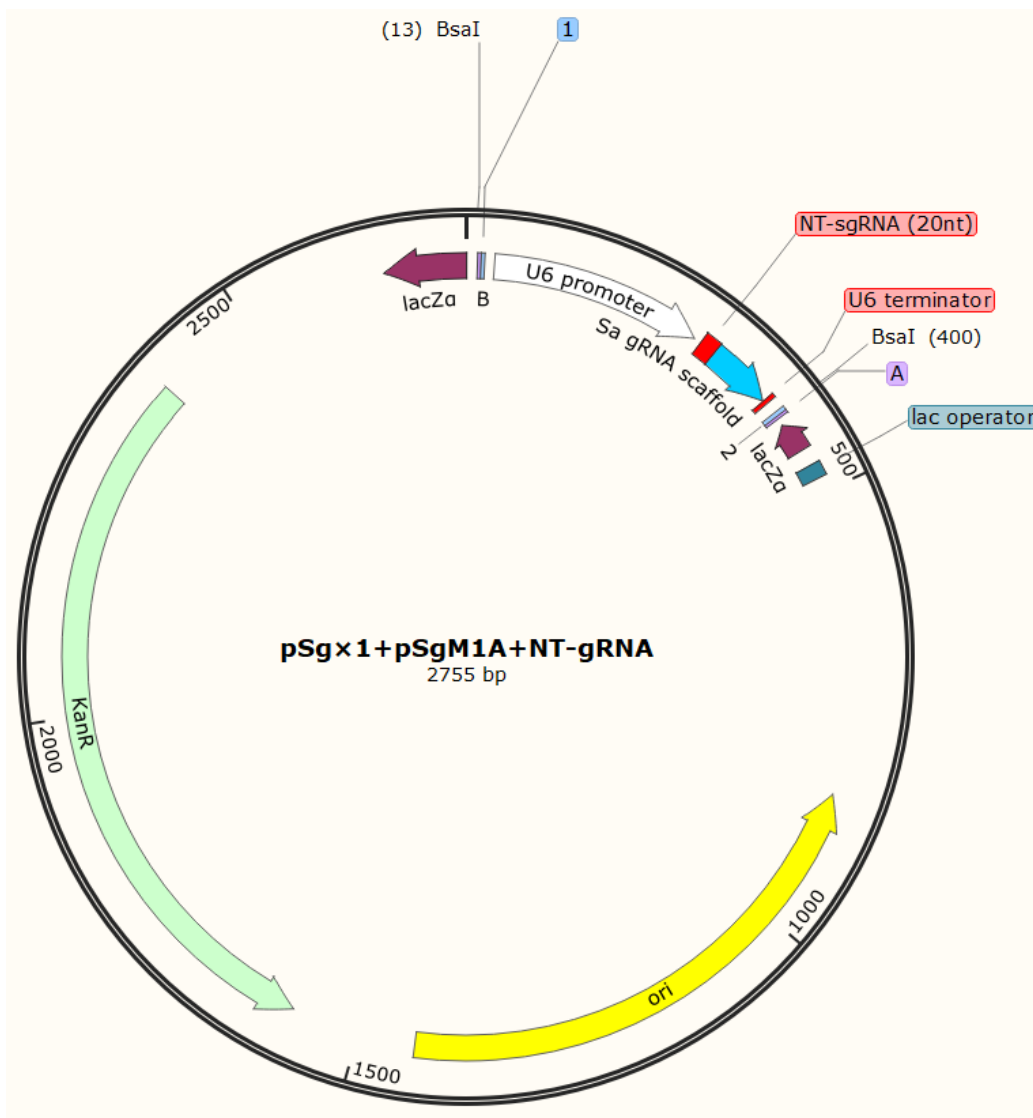
Slijedilo je kloniranje gRNA sekvenci i *stuffer*-a (Slika 19, 20, 21, 22) u fuzijske konstrukte prema Tablici 17 digestijom (Esp3I) i ligacijom (Tablica 18). Dobiveni katalitički aktivni i inaktivni konstrukti (N-PADI4_dSaCas9_Puro_Ruby_2nd+TWIST1-gRNA×5+staffer i N-KDM5A_dSpCas9_Puro_Clover_2nd+ZEB1-gRNA×5+staffer, Slika 23 i 24) restrikcijski su provjereni (Tablica 19). Na Slici 25 mogu se vidjeti fragmenti konstrukata odgovarajućih veličina.



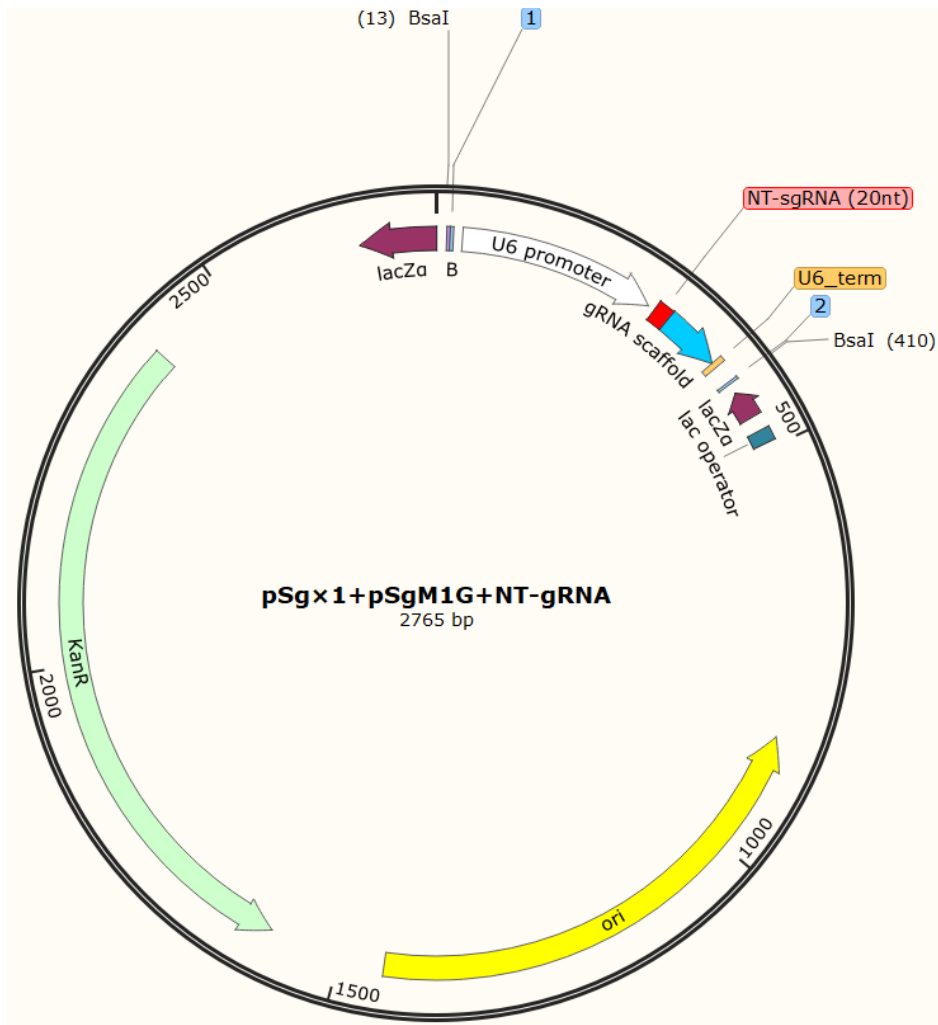
Slika 19. Plazmid pSg-x4 s četiri različite *KLF8*-sgRNA. Svaka molekula gRNA uzvodno sadrži pripadajući U6 promotor (lijevo, bijela strelica), nakon čega slijedi okosnica molekule sgRNA (desno, plava strelica) i U6 terminator (desno, tanji crveni pravokutnik). Naznačena su mjesta prepoznavanja restriktivnog enzima BsaI, koja stvaraju ljepljive krajeve B do A, potrebnog za kloniranje završnog konstrukta PAD4-dCas9 koji sadrži devet različitih molekula sgRNA za istovremeno ciljanje genskih lokusa *TWIST1* i *KLF8*.



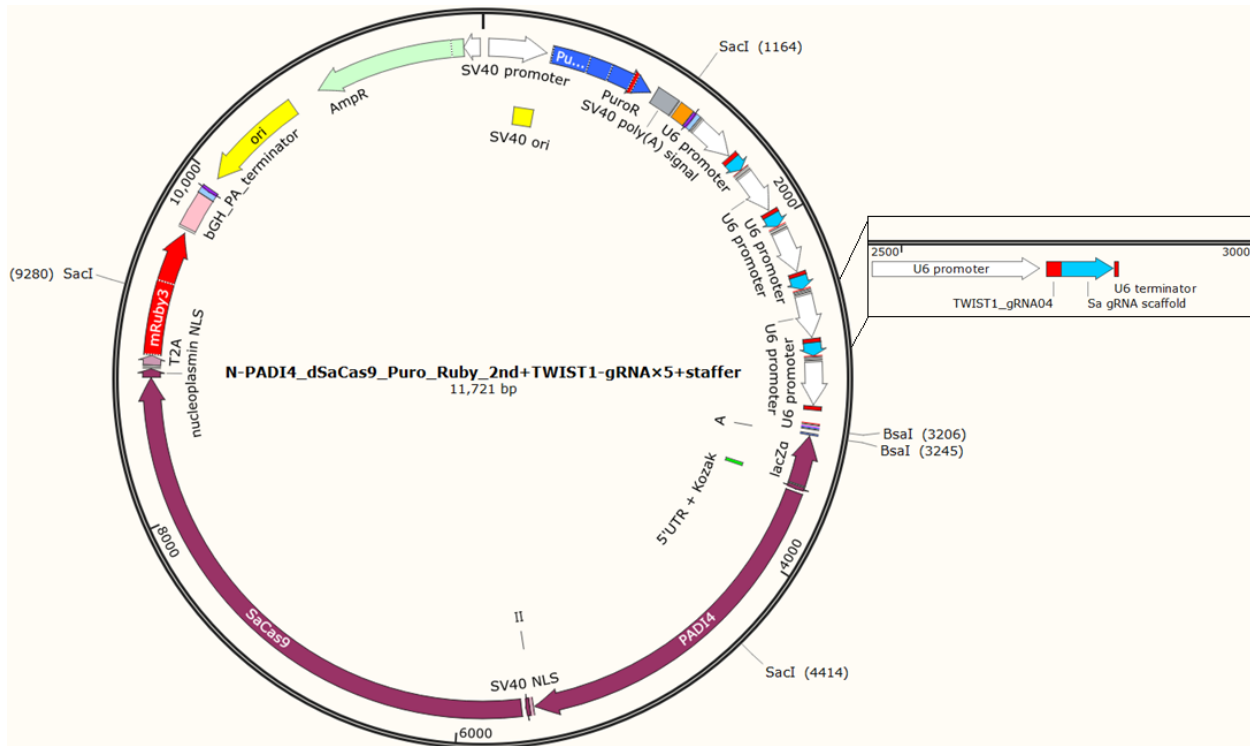
Slika 20. Plazmid pSg-x4 s tri ZEB1-sgRNA i jednom SNAI1-sgRNA. Svaka molekula gRNA uzvodno sadrži pripadajući U6 promotor (lijevo, bijela strelica), nakon čega slijedi okosnica molekule sgRNA (desno, plava strelica) i U6 terminator (desno, tanji crveni pravokutnik). Naznačena su mjesta prepoznavanja restriktorskog enzima BsaI, koja stvaraju ljepljive krajeve B do A, potrebnog za kloniranje završnog konstrukta u finalni fuzijski KDM5A-dCas9 koji sadrži devet različitih molekula sgRNA za istovremeno ciljanje genskih lokusa *SNAI* i *ZEB1*.



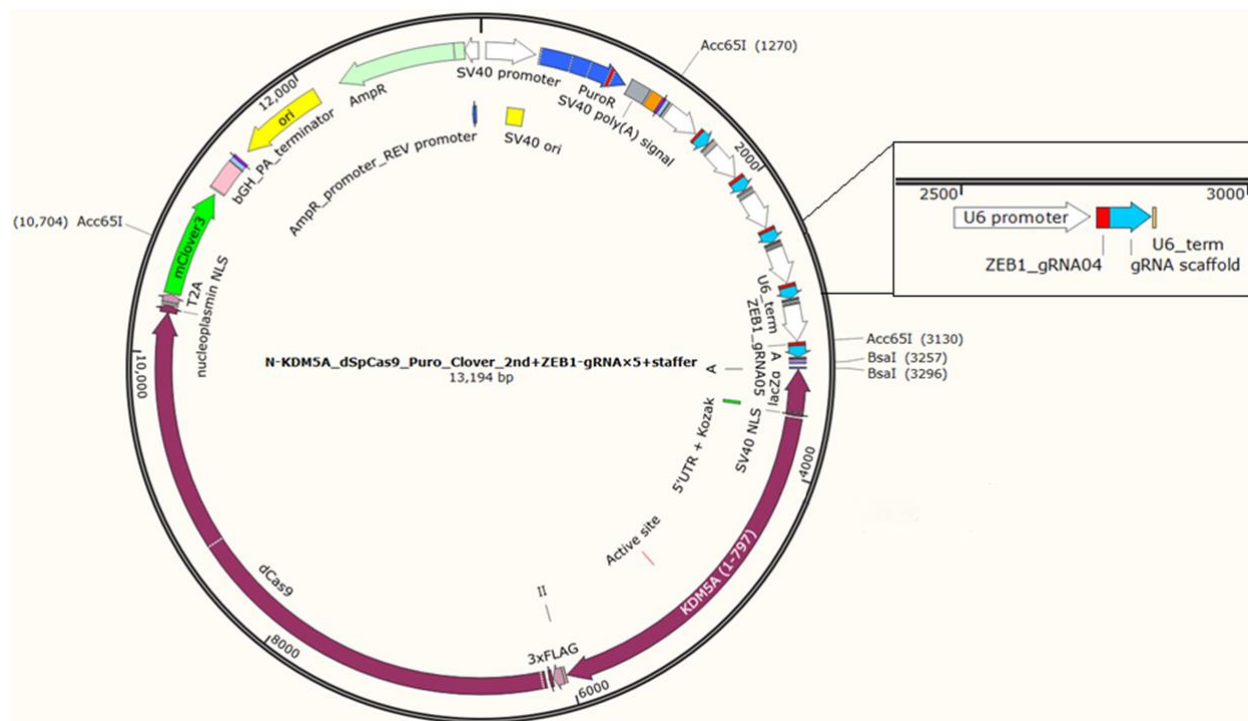
Slika 21. Plazmid pSgx1 s jednom *non-target* gRNA. *Non-target* gRNA (crveni pravokutnik) ima pripadajući U6 promotor (bijela strelica) i U6 terminator (tanji crveni pravokutnik) i Sa gRNA *scaffold* (plava strelica). Naznačena su mjesta prepoznavanja restrikcijskog enzima BsaI, koja stvaraju ljepljive krajeve B do A, potrebnog za kloniranje kontrolnog *non-target* fuzijskog konstrukta PAD4-dCas9.



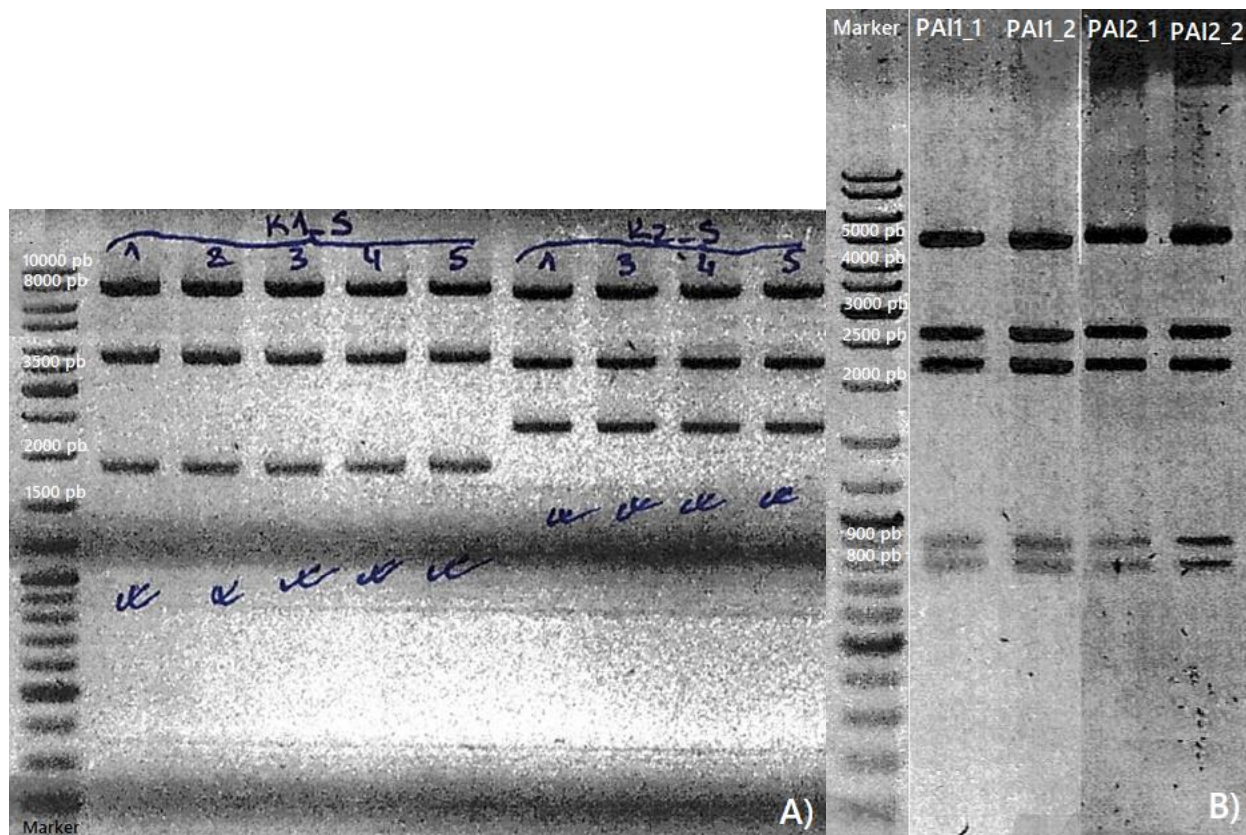
Slika 22. Plazmid pSgx1 s jednom *non-target* gRNA. *Non-target* gRNA (crveni pravokutnik) ima pripadajući U6 promotor (bijela strelica) i U6 terminator (tanji crveni pravokutnik) i Sa gRNA *scaffold* (plava strelica). Naznačena su mjesta prepoznavanja restrikcijskog enzima BsaI, koja stvaraju ljepljive krajeve B do A, potrebnog za kloniranje kontrolnog *non-target* fuzijskog konstrukta KDM5A-dCas9.



Slika 23. Fuzijski konstrukt PAD4-dCas9 s pet različitim molekula *TWIST1*-sgRNA i oligonukleotidom *multi-staffer*. Posebno su naznačena mjesta prepoznavanja restriktivnog enzima SacI pomoću kojeg je rađena restriktivska provjera plazmida te pozicija dva restriktivska mjesta BsaI unutar kojih je u posljednjem koraku klonirano četiri različiti *KLF8*-sgRNA. Svjetloplave strelice predstavljaju okosnicu molekule sgRNA, crveni pravokutnik predstavlja sekvencu molekule gRNA uz pripadajući U6 promotor (bijela strelica lijevo) i U6 terminator (crveni pravokutnik desno) vidljivo na uvećanju regije 2500-3000 pb.

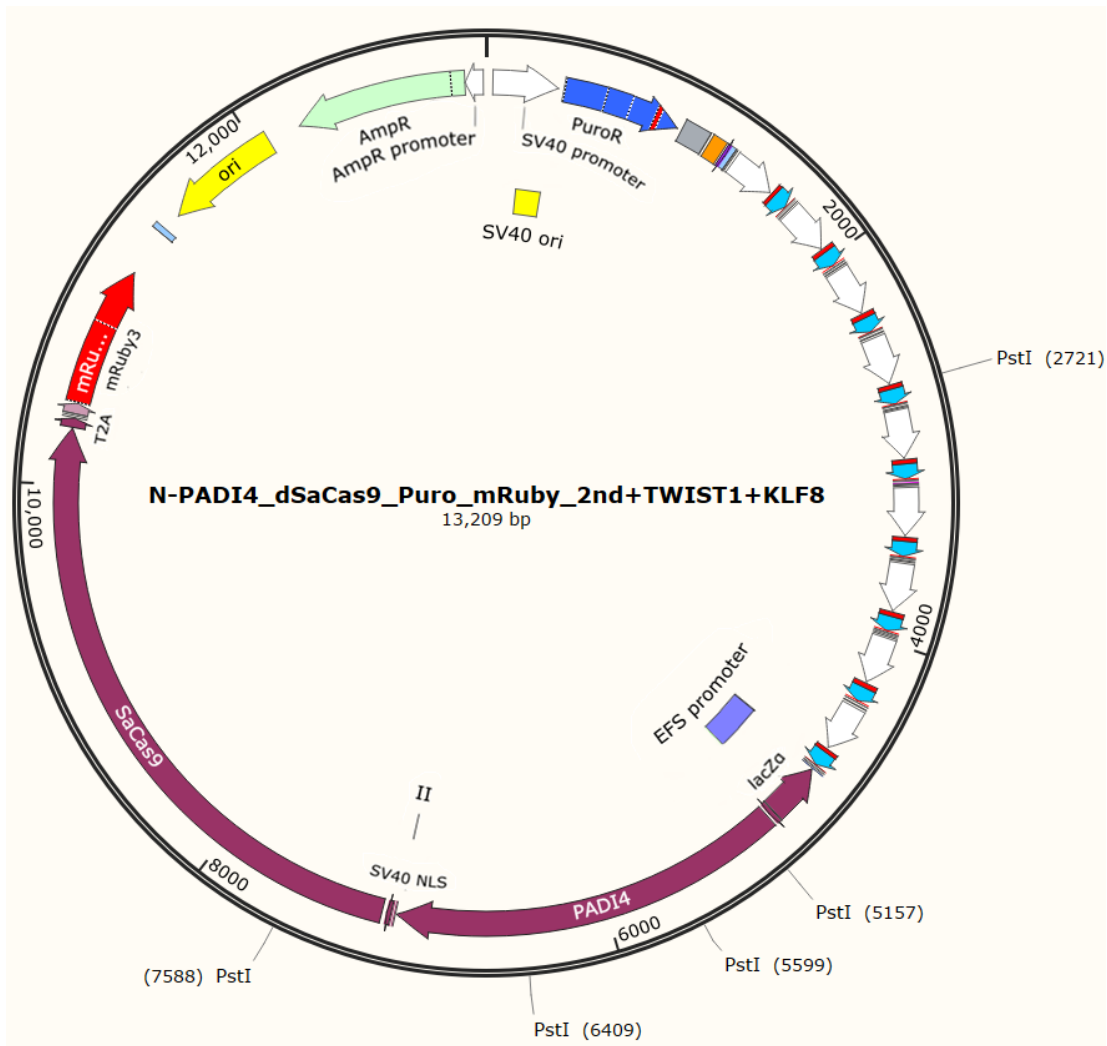


Slika 24. Fuzijski konstrukt KDM5A-dCas9 s pet različitim molekulama ZEB1-sgRNA i oligonukleotidom *multi-staffer*. Posebno su naznačena mjesta prepoznavanja restriktivnog enzima Acc65I pomoću kojeg je rađena restriktivska provjera plazmida te pozicija dva restriktivska mjesta BsaI unutar kojih je u posljednjem koraku klonirano tri *SNAI1* i jedna *ZEB1*-sgRNA. Svijetloplave strelice predstavljaju okosnicu molekule sgRNA, crveni pravokutnik predstavlja sekvencu molekule gRNA uz pripadajući U6 promotor (bijela strelica lijevo) i U6 terminator (crveni pravokutnik desno) vidljivo na uvećanju regije 2500-3000 pb.

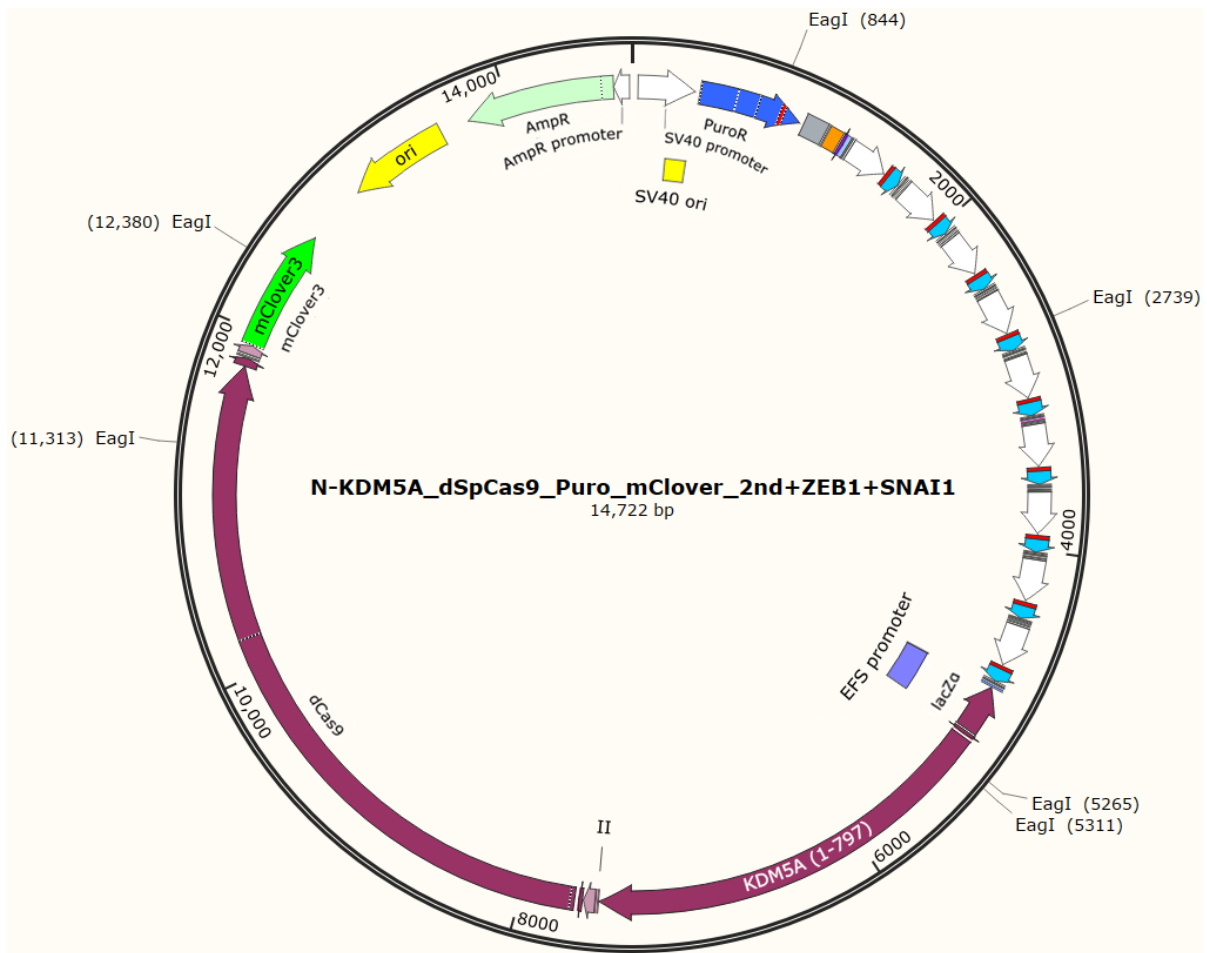


Slika 25. Agarozna elektroforeza produkata restrikcijske reakcije konstrukata **KDM5A_dCas9** i **PADI4_dCas9** s kloniranih pet molekula **gRNA** i oligonukleotid **multi-staffer**. A) **K1_S_1-5** su uzorci klonova katalitički aktivnog **KDM5A_dSpCas9** i rezani **Acc65I** enzimom, a **K2_S** katalitički inaktivnog konstrukta rezani **SacI** enzimom, veličina konstrukata iznosi 13,193 pb. B) **PAI1_1** i **PAI1_2** su katalitički aktivni konstrukti **PADI4_dSaCas9**, **PAI2_1** i **PA2_2** su katalitički inaktivni konstrukti, oba tipa rezani **SacI+AgeI** enzimima, veličina konstrukata iznosi 11,721 pb.

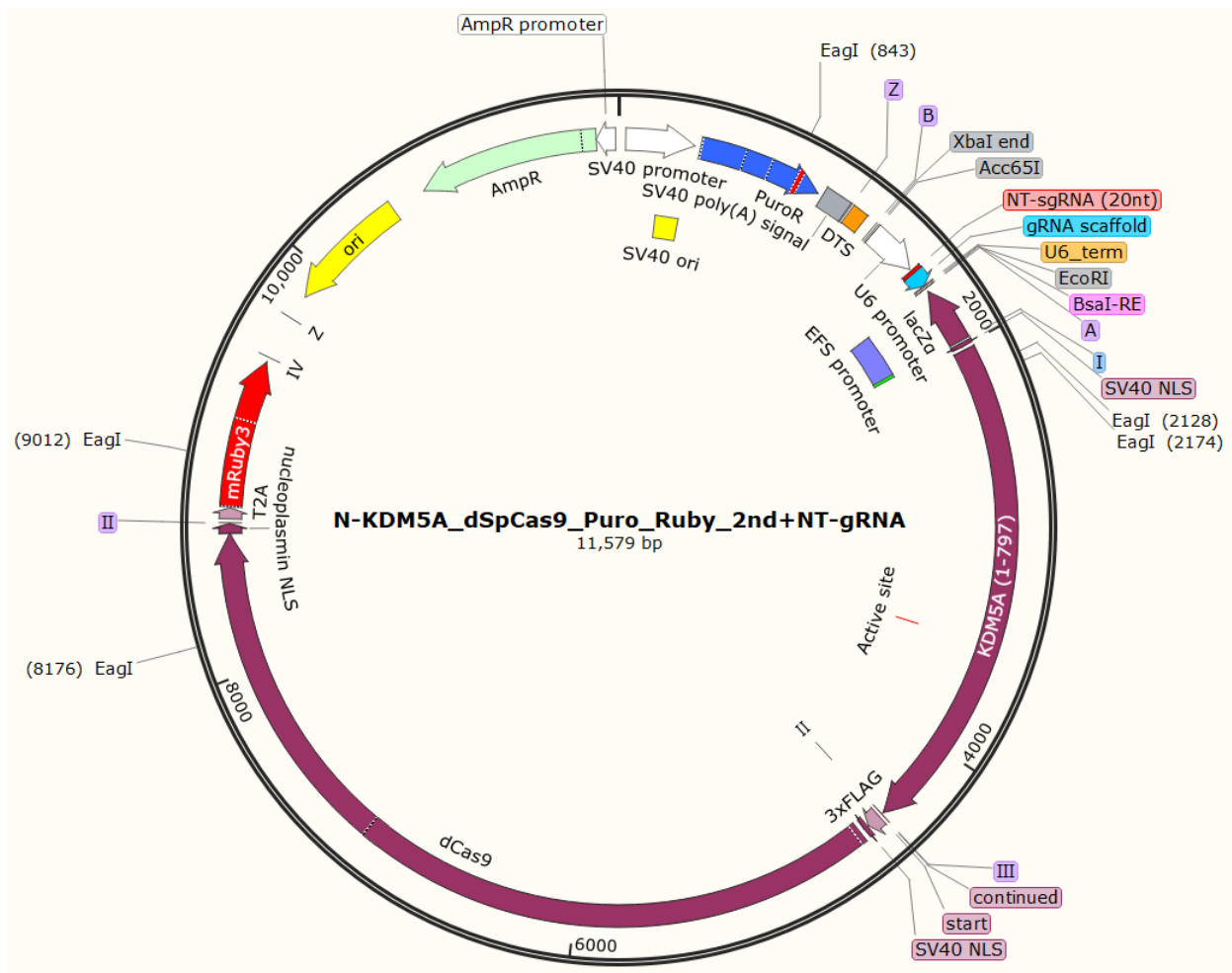
Naposljetku su složeni finalni katalitički aktivni, inaktivni i *non-target* fuzijski konstrukti (Slika 26, 27, 28, 29) digestijom i ligacijom enzimom **BsaI**. Konstrukti su restrikcijski provjereni: **PADI4** **PstI** restrikcijom, **KDM5A** konstrukti **EagI** restrikcijom. Na Slici 30 i 31 mogu se vidjeti fragmenti konstrukata odgovarajućih veličina.



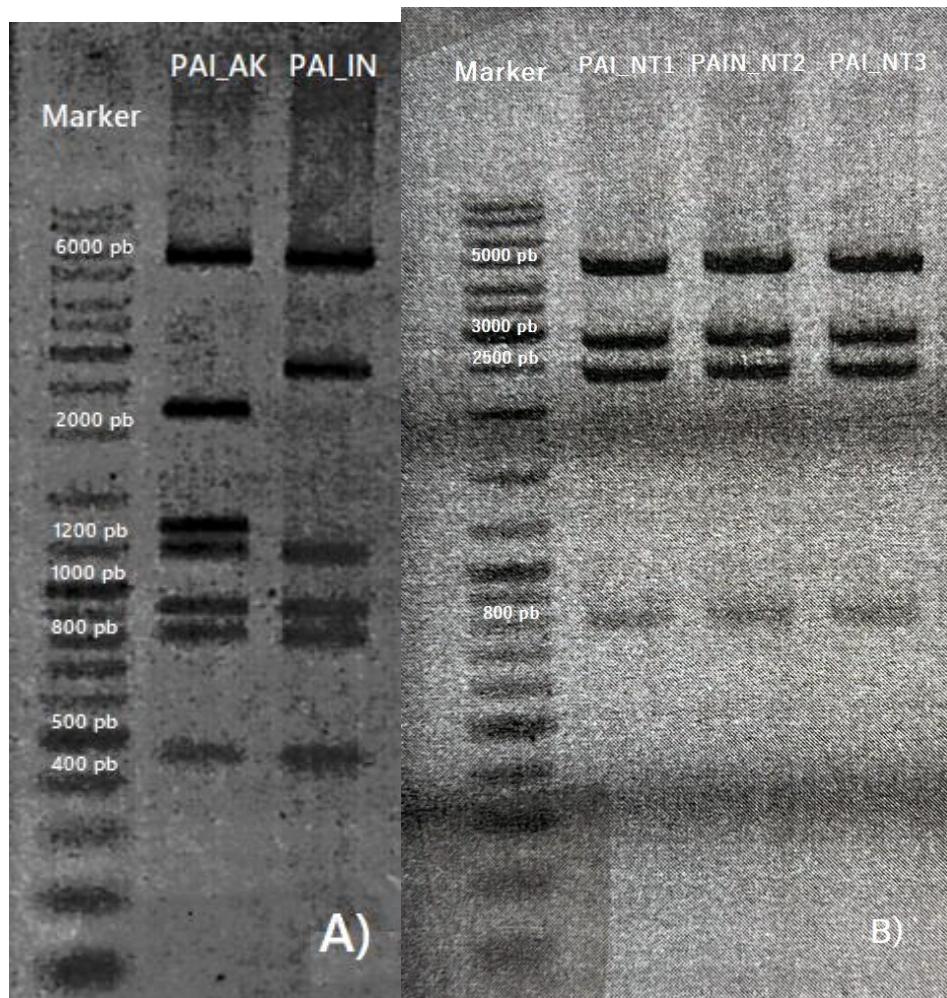
Slika 26. Završni PAD4-dCas9 fuzijski konstrukt s devet različitih molekula sgRNA za istovremeno ciljanje genskih lokusa *TWIST1* i *KLF8*. Naznačena su restrikcijska mjesta PstI korištena za provjeru konstrukta restrikcijskom analizom.



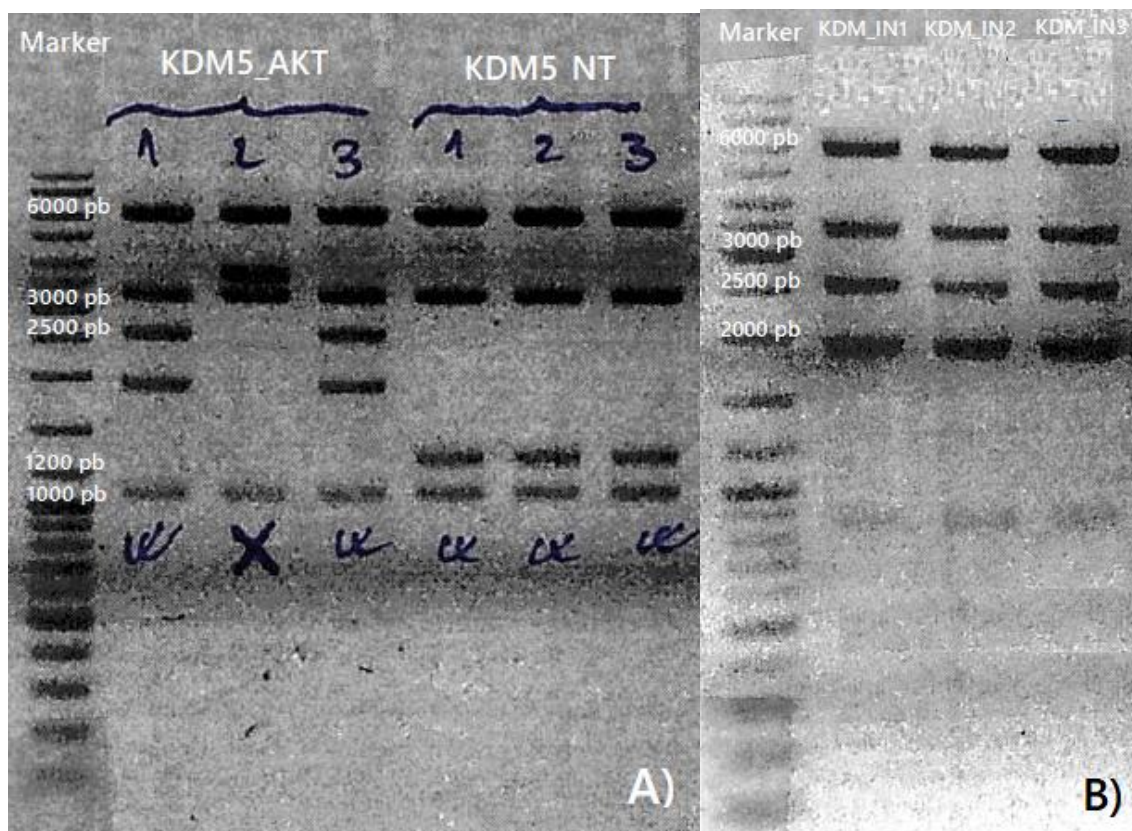
Slika 27. Završni KDM5A-dCas9 fuzijski konstrukt s devet različitim molekulama sgRNA za istovremeno ciljanje genskih lokusa *ZEB1* i *SNAI1*. Naznačena su restrikcijska mjesta EagI korištena za provjeru konstrukta restrikcijskom analizom.



Slika 29. Non-target KDM5A-dCas9 fuzijski konstrukt. Naznačena su restrikcijska mjesta EagI korištena za provjeru konstrukta restrikcijskom analizom.



Slika 30. Agarozna elektroforeza produkata PstI restrikcijske reakcije katalitički aktivnih i inaktivnih PADI4_dCas9 konstrukata s devet molekula gRNA te SacI restrikcijska reakcija *non-target* PADI4_dCas9 konstrukta. A) Uzorak PAI_AK klon je katalitički aktivnog, a PAI_IN katalitički inaktivnog konstrukta, veličina konstrukata iznosi 13,209 pb. B) PAI_NT1, PAI_NT2, PAI_NT3 su uzorci klonova *non-target* konstrukta PAD4-dCas9, veličina konstrukta je 10,153 pb.

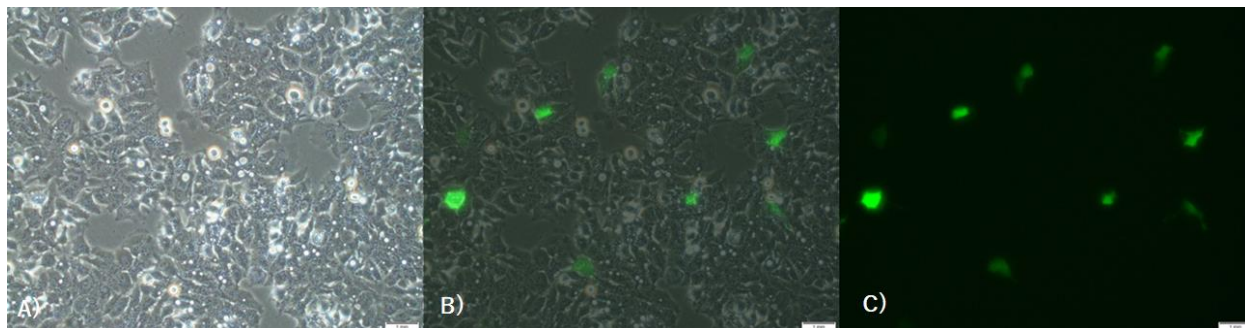


Slika 31. Agarozna elektroforeza produkata EagI restrikcijske reakcije katalitički aktivnih i inaktivnih KDM5A_dCas9 konstrukata s devet molekula gRNA te *non-target* KDM5A_dCas9 konstrukta. A) Uzorak KDM5_AKT klon je katalitički aktivnog(aktivni) konstrukta (veličina 14,722 pb), a KDM5_NT *non-target* konstrukta (veličina 11,579 pb). B) Uzorci KDM_IN1, KDM_IN2, KDM_IN3 klonovi su katalitički inaktivnog konstrukta KDM5A_dSaCas9 (veličina 14,722 pb).

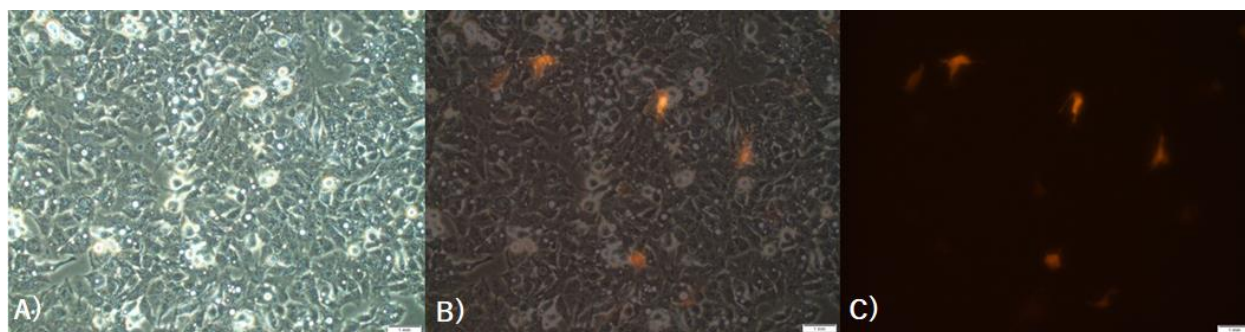
4.4. Transfekcija HepG2 stanica

Stanice HepG2 transfecirane su katalitički aktivnim i inaktivnim fuzijskim konstruktom KDM5A-dCas9 ciljanim na genske lokuse *ZEB1* i *SNAI1* i PAD4-dCas9 ciljanim na genske lokuse *KLF8* i *TWIST1*. U oba slučaja korištena je i kontrola *non-target* čija *non-target* sgRNA ne veže ni jedno mjesto u ljudskom genomu, kao i transfekcija stanica samo s transfekcijskim reagensom bez plazmidne DNA (*Mock* transfekcija). 24 sata nakon transfekcije, stanice su provjerene pod svjetlosnim/fluorescencijskim mikroskopom. Fuzijski konstrukt KDM5A-dCas9 sadržavao je fluorescencijski biljeg mClover3, dok je PAD4-dCas9 sadržavao mRuby3. U oba slučaja fluorescencijski biljezi vezani su na fuzijski dCas9 konstrukt preko samo-cijepajućeg

peptida T2A što omogućava ekvimolarnu translaciju oba proteina. Na fluorescencijskom mikroskopu potvrđena je uspješnost transfekcije stanica HepG2 što možemo vidjeti na Slici 32 i 33.



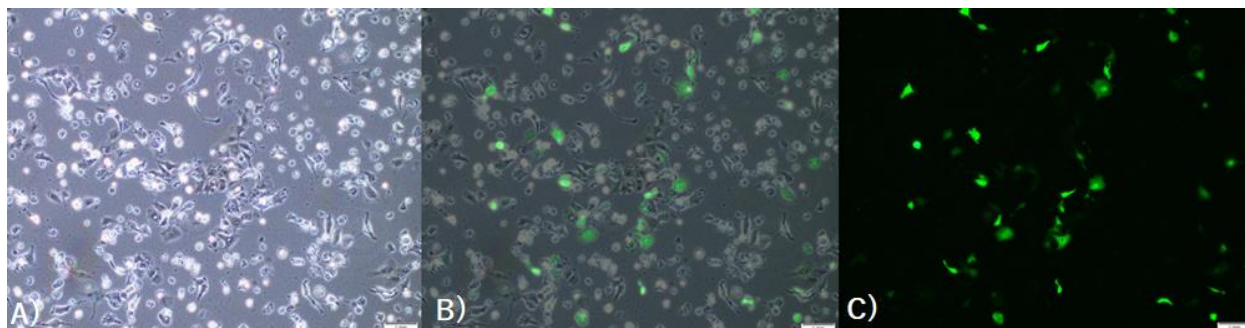
Slika 32. Stanice HepG2 transfecirane plazmidom KDM5A-dCas9. Transfecirane stanice HepG2 promatrane su na fluorescencijskom mikroskopu 24 sata nakon transfekcije plazmidom KDM5A-dCas9 prilikom čega je praćena fluorescencija mClover3 biljega koji se nalazio na fuzijskom konstrukt. A) Slika svijetlog polja. B) Preklopljene slike svijetlog polja i zelenog filtera. C) Slika stanica pod zelenim filterom fluorescencijskog mikroskopa.



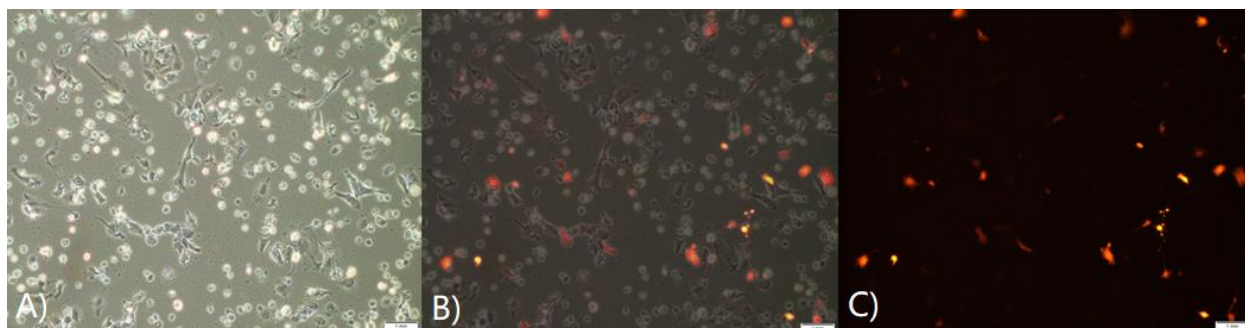
Slika 33. Stanice HepG2 transfecirane plazmidom PAD4-dCas9. Transfecirane stanice HepG2 promatrane su na fluorescencijskom mikroskopu 24 sata nakon transfekcije plazmidom PAD4-dCas9 prilikom čega je praćena fluorescencija mRuby3 biljega koji se nalazio na fuzijskom konstrukt. A) Slika svijetlog polja. B) Preklopljene slike svijetlog polja i crvenog filtera. C) Slika stanica pod crvenim filterom fluorescencijskog mikroskopa.

Transfecirane stanice HepG2 selektirane su antibiotikom puromicinom u trajanju od 48 sati. Nakon prekida selekcije, stanice su također promatrane pod svjetlosnim/fluorescencijskim mikroskopom kako bi se potvrdila vijabilnost transfeciranih stanica. Preživjele stanice pokazuju regularan staničan oblik te je ponovno slikana fluorescencija stanica kako bi se potvrdilo da su sve

preživjele stanice transfecirane i da fluoresciraju. Na Slikama 34 i 35 možemo vidjeti kako su transfecirane stanice uspješno preživjele selekciju. Kontrolne stanice koje nisu primile plazmidni konstrukt (*Mock* transfekcija, Slika 36) nisu preživjele selekciju te pokazuju okruglast oblik i počinju se odljepljivati s površine petrijevke.

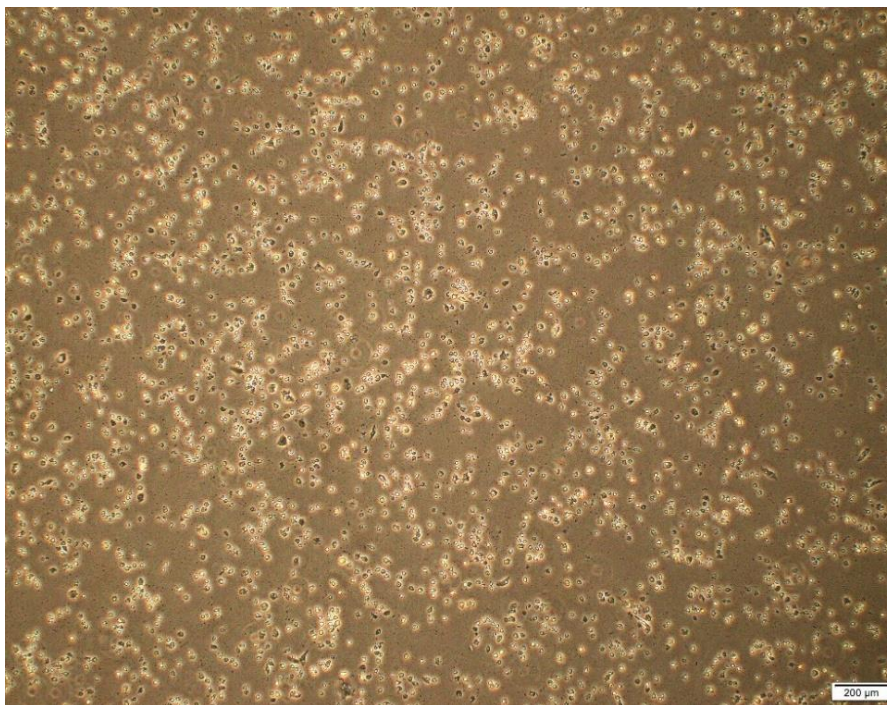


Slika 34. Stanice HepG2 transfecirane plazmidom KDM5A-dCas9. Transfecirane stanice HepG2 promatrane su na fluorescencijskom mikroskopu 48 nakon selekcije puromicinom (treći dan od transfekcije) prilikom čega je praćena fluorescencija mClover3 biljega koji se nalazio na fuzijskom konstrukt. A) Slika svijetlog polja. B) Preklopljene slike svijetlog polja i zelenog filtera. C) Slika stanica pod zelenim filterom fluorescencijskog mikroskopa.



Slika 35. Stanice HepG2 transfecirane plazmidom PAD4-dCas9. Transfecirane stanice HepG2 promatrane su na fluorescencijskom mikroskopu 48 sati nakon selekcije puromicinom (treći dan od transfekcije) prilikom čega je praćena fluorescencija mRuby3 biljega koji se nalazio na fuzijskom konstrukt. A) Slika svijetlog polja. B) Preklopljene slike svijetlog polja i crvenog filtera. C) Slika stanica pod crvenim filterom fluorescencijskog mikroskopa.

Stanice koje nisu primile plazmidni konstrukt (Slika 36) nisu preživjele te pokazuju okruglast oblik koji ukazuje na odjepljivanje sa površine podloge.



Slika 36. Stanice HepG2 iz *mock* transfekcije nakon selekcije antibiotikom puromicinom u trajanju od 48 sati. *Mock* transfecirane stanice nisu preživjele selekciju što ukazuje na to da je selekcija bila potpuna i učinkovita. Stanice su promatrane pod svjetlim vidnim poljem na svjetlosnom mikroskopu treći dan od transfekcije.

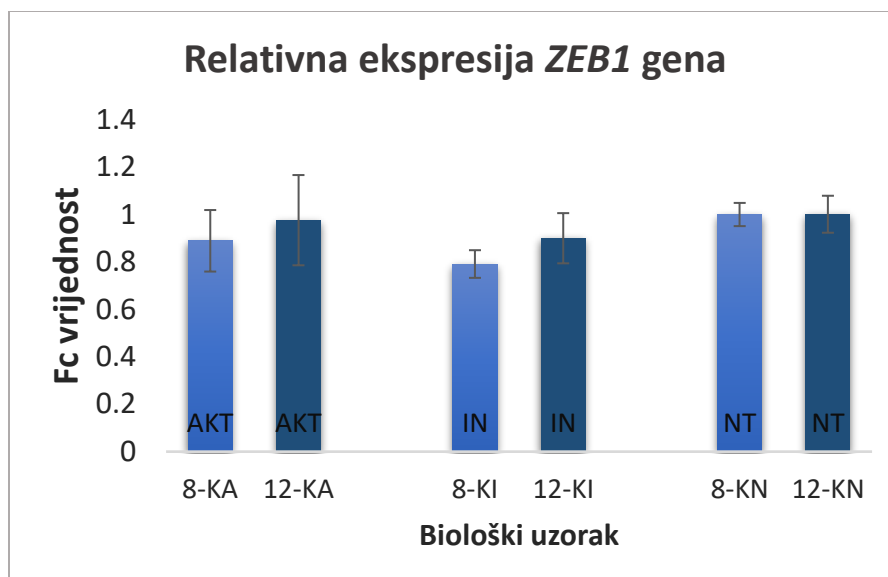
4.5. Relativna razina ekspresije CRISPR ciljanih gena u transfeciranim stanicama HepG2

Fuzijski konstrukt KDM5A-dCas9 ciljan je istovremeno na regije CpG otoka genskih lokusa *ZEB1* i *SNAI1*, dok je PAD4-dCas9 ciljan na regije CpG otoka genskih lokusa *KLF8* i *TWIST1*. Posljedično, nakon epigenetičke manipulacije analizirana je relativna ekspresija ciljanih gena 8. i 12. dan nakon transfekcije stanica. Relativna razina ekspresije analizirana je metodom RT-qPCR pri čemu je gen *HMBS* korišten kao endogena kontrola. Kao referentan uzorak je korištena *non-target* transfekcija (stanice transfecirane plazmidom KDM5A-dCas9 ili PAD4-dCas9 koji sadrži *non-target* molekulu sgRNA) u odnosu na koju su promatrane promjene ekspresije ciljanih gena. U svim uzorcima, C_t vrijednost je uspješno detektirana osim za gen *TWIST1* čija je ekspresija niska (Tablica 21).

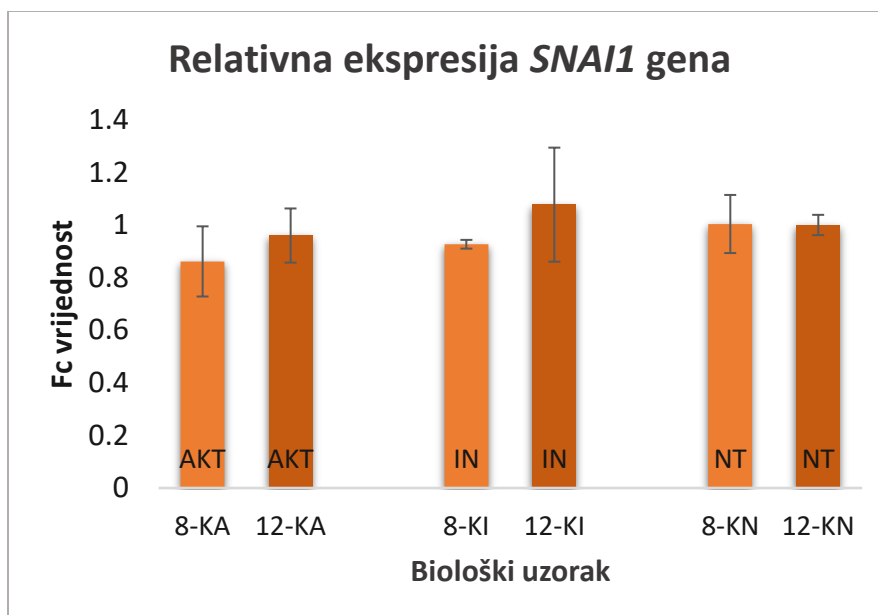
Tablica 21. Srednje vrijednosti C_t triju bioloških replika iz transfekcije fuzijskim konstruktima KDM5A-dCas9 i PAD4-dCas9. 8-AKT i 12-AKT su uzorci transfecirani plazmidnim konstruktima s aktivnim oblikom PAD4 ili KDM5A, 8-IN i 12-IN inaktivnim oblikom, a 8-NT i 12-NT konstruktom s *non-target* sgRNA.

Bioški uzorak	ZEB1 (KDM5A-dCas9)	SNAI1 (KDM5A-dCas9)	KLF8 (PAD4-dCas9)	TWIST1 (PAD4-dCas9)
8-AKT	25,524	25,265	32,659	/
8-IN	25,400	24,864	32,469	/
8-NT	25,126	24,820	34,143	/
12-AKT	25,038	25,431	34,923	/
12-IN	25,245	25,379	34,567	/
12-NT	24,958	25,339	35,589	/

Analizom rezultata dobivenih za ekspresiju gena *ZEB1* i *SNAI1* u stanicama transfeciranim aktivnim konstruktom KDM5A-dCas9 (biološka skupina AKT) u odnosu na stanice transfecirane aktivnim konstruktom s *non-target* sgRNA (biološka skupina NT) nije dobiveno statistički značajno smanjenje ekspresije gena. Do smanjenja ekspresije gena *ZEB1* i *SNAI1* nije došlo ni kod stanica transfeciranim inaktivnim konstruktom (biološka skupina IN) koji sadrži katalitički inaktivni oblik KDM5A. Inaktivni konstrukt je korišten kako bi se provjerilo je li samo vezanje konstrukta utječe na ekspresiju gena, tj. dolazi li do CRISPR interferencije. Na slikama 37 i 38 prikazana je relativna ekspresija gena *ZEB1* i *SNAI1* nakon epigenetičke manipulacije fuzijskim konstruktom KDM5A-dCas9. Analiza $\Delta\Delta C_t$ vrijednosti aktivnih i inaktivnih bioloških skupina stanica za gene *ZEB1* i *SNAI1* u odnosu na $\Delta\Delta C_t$ vrijednosti *non-target* skupine uporabom t-testa pokazuje da nema statistički značajne promjene, p vrijednosti prelaze granicu vrijednost 0,05 (Tablica 22), uz iznimku usporedbe 8-IN I 8-NT uzoraka.



Slika 37. Relativna razina ekspresije gena *ZEB1* u biološkim skupinama AKT, IN i NT 8. i 12. dan od transfekcije fuzijskim *KDM5A-dCas9* konstruktima. Stupci AKT označavaju srednju vrijednost Fc bioloških triplikata stanica transfeciranih aktivnim konstruktom, stupci IN inaktivnim, a stupci NT *non-target* konstruktom. Ispod svakog stupca naznačen je naziv biološke skupine s istaknutim vremenom analize od dana transfekcije, a prikazani su i stupci pogreške (srednja vrijednost Fc ± standardna devijacija).

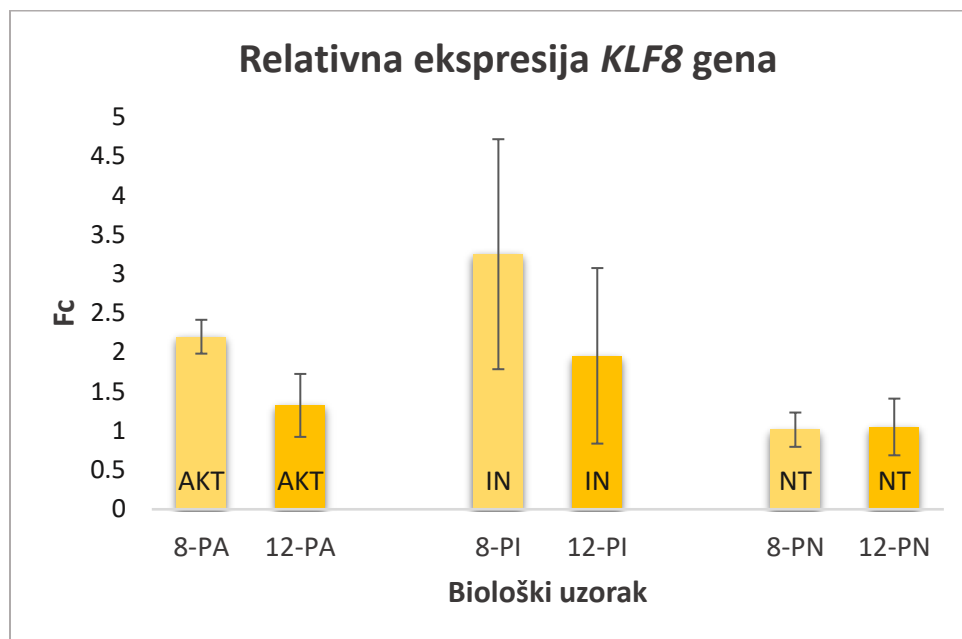


Slika 38. Relativna razina ekspresije gena *SNAIL* u biološkim skupinama AKT, IN i NT 8. i 12. dan od transfekcije fuzijskim KDM5A-dCas9 konstruktima. Stupci AKT označavaju srednju vrijednost Fc vrijednost bioloških triplikata stanica transfeciranih aktivnim konstruktom, stupci IN inaktivnim, a stupci NT *non-target* konstruktom. Ispod svakog stupca naznačen je naziv biološke skupine s istaknutim vremenom analize od dana transfekcije, a prikazani su i stupci pogreške (srednja vrijednost Fc ± standardna devijacija).

Tablica 22. Vrijednosti p dobivene usporedbom srednje vrijednosti ΔC_t iz transfekcije fuzijskim konstruktima KDM5A-dCas9 t-testom.

Analiza	Dani od transfekcije	p-vrijednost (<i>ZEB1</i> uzorci)	p-vrijednost (<i>SNAIL</i> uzorci)
AKT VS NT	8	0,230	0,223
IN VS NT	8	0,010	0,316
AKT VS IN	8	0,298	0,408
AKT VS NT	12	0,777	0,513
IN VS NT	12	0,245	0,614
AKT VS IN	12	0,593	0,445

Analizom rezultata dobivenih za ekspresiju gena *KLF8* u stanicama transfeciranim aktivnim konstruktom PAD4-dCas9 (biološka skupina AKT) u odnosu na stanice transfecirane konstruktom s *non-target* sgRNA (biološka skupina NT) vidljivo je statistički značajno povećanje ekspresije gena samo u uzorcima analiziranim 8 dana od transfekcije. Statistički značajno povećanje ekspresije uočeno je i usporedbom uzoraka stanica transfeciranih inaktivnim konstruktom PAD4-dCas9 (biološka skupina IN) sa uzorcima stanica transfeciranim *non-target* konstruktom. Uspoređujući relativnu ekspresiju gena (Slika 39), povećanje ekspresije gena *KLF8* je jače izraženo u uzorcima inaktivnog konstrukta (IN) naspram *non-target* uzoraka nego u usporedbi uzoraka aktivnog konstrukta (AKT). Između skupina AKT i IN, doduše, nema statistički značajne razlike u ekspresiji gena (Tablica 23). Analiza nije napravljena za gen *TWIST1* jer C_t vrijednosti nisu uspješno izmjerene qPCR postupkom.



Slika 39. Relativna razina ekspresije gena *KLF8* u biološkim skupinama AKT, IN i NT 8. i 12. dan od transfekcije fuzijskim PAD4-dCas9 konstruktom. Stupci AKT označavaju srednju vrijednost Fc bioloških triplikata stanica transfeciranih aktivnim konstruktom, stupci IN inaktivnim, a stupci NT *non-target* konstruktom. Ispod svakog stupca naznačen je naziv biološke skupine s istaknutim vremenom analize od dana transfekcije, a prikazani su i stupci pogreške (srednja vrijednost Fc \pm standardna devijacija).

Tablica 23. Vrijednosti p dobivene usporedbom srednje vrijednosti ΔC_t iz transfekcije fuzijskim konstruktima PAD4-dCas9 t-testom.

Analiza	Dani od transfekcije	p-vrijednost (<i>KLF8</i> uzorci)
AKT VS NT	8	0,004
IN VS NT	8	0,018
AKT VS IN	8	0,295
AKT VS NT	12	0,449
IN VS NT	12	0,210
AKT VS IN	12	0,418

5. Rasprava

Sustav CRISPR-Cas9 u proteklih deset godina se pokazao kao stabilan i fleksibilan alat u ciljanom uređivanju genoma. Primjena sustava proširila se i na ciljano uređivanje epigenoma. U tu svrhu bilo je potrebno dobiti katalitički inaktivnu nukleazu dCas9 uvođenjem mutacija u nukleazne domene RuvC i HNH (D10A i H840A mutacije). Vezanjem heterologne efektorske domene na dCas9 dobiven je rekombinantni protein (Pacheco i sur. 2021) te se ovom strategijom izbjegava stvaranje dvolančanih lomova u molekuli DNA, a omogućuje ciljano, RNA vođeno djelovanje na ekspresiju gena aktivnošću rekombinantnog proteina dCas9-efektor (Brocken i sur. 2018).

Epigenom sačinjavaju kompleksni sustavi interakcija nekodirajućih regija DNA i regulatornih elemenata, kromatinskih post-translacijskih oznaka i pripadajućih regulatornih enzima koji prepoznaju i/ili modificiraju navedene oznake. Najviše istraživane epigenetičke oznake su metilacija DNA i histonske oznake, a KDM5A i PAD4 su primjeri regulatora histonskih oznaka. KDM5A je α -ketoglutarat ovisna lizin-specifična histonska demetilaza koja provodi demetilaciju H3K4me3/me2 u H3K4me1, čime se smanjuje transkripcijska aktivnost gena (Ortiz Torres i sur. 2016). PAD4 je arginin deiminaza koja provodi Ca^{2+} ovisnu reakciju citrulinacije nemodificiranog ili monometiliranog arginina u citrulin na raznim pozicijama u histonima H1-H4, dovodeći do smanjenja pozitivnog naboja i dekondezacije kromatina, čime se povećava transkripcijska aktivnost gena (Liu i sur. 2021). Oba proteina imaju važne regulatorne uloge te poremećaj njihovog rada dovodi do poremećaja epigenetičke regulacije u stanici čime se povećava rizik razvoja tumorskih stanja (Yang i sur. 2021; Zhu i sur. 2021). Također, osim u razvoju tumorskih oboljenja promjene u aktivnosti proteina PAD4 povezane su i s razvojem reumatoidnog artritisa (Zhu i sur. 2021).

Cilj ovog istraživanja bio je konstruirati fuzijske konstrukte KDM5A-dCas9 i PAD4-dCas9 pomoću modularnog sustava CRISPR/dCas9 te provjeriti učinak inducirane epigenetičke promjene na razinu ekspresije ciljanih gena *TWIST1*, *KLF8*, *SNAI1* i *ZEB1*. Fuzijski konstrukt KDM5A-dCas9 ciljan je na genske lokuse *ZEB1* i *SNAI1*, dok je fuzijski konstrukt PAD4-dCas9 ciljan na genske lokuse *KLF8* i *TWIST1*. U oba slučaja korišteno je devet različitih molekula sgRNA. Kao kontrola korišteni su fuzijski konstrukti s katalitički inaktivnom varijantom proteina KDM5A i PAD4 te *non-target* fuzijski konstrukti aktivnih varijanti proteina. Posljedično nakon

epigenetičke manipulacije, ekspresija ciljanih gena analizirana je u dvjema različitim vremenskim točkama, 8. i 12. dan od transfekcije stanica HepG2, koristeći metodu qRT-PCR. Analizom rezultata qRT-PCR-a pomoću $\Delta\Delta C_t$ metode dobivena je relativna razina ekspresije gena, a statistički značaj promjene ekspresije je analiziran pomoću t-testa uspoređujući srednje ΔC_t vrijednosti različitih bioloških skupina. Promjena ekspresije gena *TWIST1* nije uspješno kvantificirana zbog njegove kasne ekspresije i nemogućnosti uređaja da odredi C_t vrijednosti. S obzirom da su u postupku reverzne transkripcije izolirane RNA korišteni nasumični heksameri kao početnice, moguće je da su za analizu ekspresije gena *TWIST1* potrebne specifične početnice kako bi se proizvela potrebna količina cDNA za detekciju metodom qRT-PCR. Također, moguće da bi analiza *TWIST1* uspjela provedbom eksperimenta koristeći neku drugu staničnu liniju za transfekciju u kojoj *TWIST1* nije toliko kasno eksprimiran. Svakako je dobro razmotriti i povećanje broja replika prilikom izvedbe eksperimenta. Za potrebe provođenja ovog istraživanja korišteni su biološki triplikati prilikom transfekcije stanica pojedinim fuzijskim konstruktom, a qRT-PCR je bio proveden u tehničkim duplikatima, što se smatra tipičnim minimumom za provođenje analize ekspresije gena qPCR-om (Rieu i Powers 2009).

Analiza ekspresije gena *ZEB1* i *SNAI1* ne pokazuje statistički značajno smanjenje ekspresije u stanicama transfeciranim aktivnim konstruktom KDM5A-dCas9 (biološka skupina AKT) naspram stanica transfeciranih *non-target* konstruktom. Sam konstrukt provjeren je sekvenciranjem putem serivsa Macrogen te je potvrđeno kako nije došlo do promjena u sekvenci tokom postupaka kloniranja. Kako je aktivni fuzijski konstrukt KDM5A-dCas9 navođen s više molekula sgRNA na regiju CpG otoka gena *ZEB1* i *SNAI1* očekivalo se da će posljedično nakon demetilacije H3K4me3/me2 u H3K4me1 doći do smanjenja ekspresije ciljanih gena. Statistički značajno smanjenje nije uočeno nikod kod inaktivnog oblika KDM5A konstrukta s H483A mutacijom (Liefke i sur. 2010) koji nema katalitičku aktivnost demetilacije. Inaktivni konstrukt korišten je kako bi se provjerila mogućnost interferencije ekspresije samim vezanjem konstrukta, pri čemu bi samo vezanje konstrukta potencijalno blokiralo vezanje transkripcijskog faktora ili RNA polimeraze (Wu i sur. 2014). Iznimka je rezultat kod uzorka *ZEB1* RNA izolata uzetog 8 dana od transfekcije inaktivnim konstruktom gdje je uočena značajna p vrijednost ($<0,05$) pri usporedbi sa uzorkom iz stanica transfeciranih *non-target* konstruktom. Najvjerojatnije je riječ o statističkoj grešci jer bi ovaj rezultat implicirao da samo vezanje konstrukta dovodi do interferencije ekspresije, dok isti fenomen nije uočen kod uzorka stanica transfeciranih aktivnim

ZEB1 konstruktom. Kao što je već spomenuto kod analize *TWIST1*, u ovom slučaju bi također pomoglo povećanje broja bioloških replika prilikom provedbe eksperimenta kako bi se ovakve statističke greške minimizirale.

Izostanak djelovanja na ekspresiju je možda posljedica uzimanja uzoraka 8 i 12 dana od transfekcije. Naime, prema rezultatima Guhathakurta i sur. 2021, postignuto je uspješno smanjenje ekspresije gena *SNCA* ciljanjem H3K4 oznake KDM5A-dCas9 konstruktom koristeći SunTag sustav, gdje je RNA izolirana iz stanica 5 dana od transfekcije. Pad uočljivog efekta na ekspresiju prolaskom vremena primjenom CRISPR sustava se kontinuirano spominje u radovima kao mana (Pacheco i sur. 2021) te se za potrebe dugotrajne promjene ekspresije epigenetičkom regulacijom naglašava važnost istovremenog ciljanja DNA metilacije i histonskih oznaka kombiniranjem različitih CRISPR/dCas9 konstrukata (Amabile i sur. 2016; Mlambo i sur. 2018). Prema svemu ovome, moguće da je KDM5A-dCas9 konstrukt imao uočljiv, ali kratkotrajan efekt na ekspresiju gena *ZEB1* i *SNAI1*, no nije zamijećen zbog dizajna eksperimenta.

Provjera pravilnog vezanja konstrukta na DNA mogla bi se izvršiti ChIP-seq analizom (engl. *chromatin immunoprecipitation*) koja nije napravljena u sklopu ovog istraživanja. Tehnika ChIP vrsta je imunoprecipitacijske metode kojom se provjerava vezanje proteina na specifičnu genomsku regiju ili prisutnost određenih histonskih oznaka na genomskoj regiji koristeći protein-specifična antitijela ili afinitetnu kromatografiju, nakon čega se DNA fragmenti pročišćavaju i potom sekvenciraju ili podvrgavaju qPCR-u (Buck i Lieb 2004). Ovim postupkom moglo bi se validirati uvodi li uistinu KDM5A-dCas9 konstrukt histonske promjene na regijama CpG otoka ciljanih sgRNA molekulama iz Tablice 15. Također, može se provjeriti veže li uopće fuzijski KDM5A-dCas9 konstrukt ciljane regije CpG otoka provedbom analize EMSA (engl. *electrophoretic mobility shift assay*). Metoda predstavlja vrstu afinitetne elektroforeze gdje kompleks protein-nukleinska kiselina putuje sporije kroz gel nego što bi slobodna nukleinska kiselina (Hellman i Fried 2007). Nukleinska kiselina može se označiti radioaktivnim izotopima, fluorescentnim, kemiluminiscentnim ili imunohistokemijskim oznakama, u ovom slučaju to bi bila PCR-om umnožena sekvenca *ZEB1*. Pročišćeni fuzijski konstrukt i nukleinska kiselina podvrgavaju se reakciji vezanja nakon čega se može provesti elektroforeza. Na kraju, detekcija slobodnih nukleinskih kiselina i kompleksa protein-nukleinska kiselina vrši se vizualizacijom označene nukleinske kiseline. U konačnici, iako su rezultati analize ekspresije gena metodom

qRT-PCR pokazali da nema statistički značajne promjene u ekspresiji gena *ZEB1*, takav rezultat se ne može prihvatiti sa sigurnošću, budući da se nije moglo potvrditi je li uopće došlo do histonskih promjena na regijama CpG otoka ciljanih sgRNA molekulama.

Analiza ekspresije gena *KLF8* pokazuje statistički značajno smanjenje ekspresije u stanicama transfeciranim aktivnim konstruktom PAD4-dCas9 (biološka skupina AKT) 8 dana od transfekcije naspram stanica transfeciranih *non-target* konstruktom (p vrijednost < 0,05). Sam konstrukt provjeren je sekvenciranjem putem servisa MacroGen i pokazuje da nije došlo do promjena u sekvenci tokom postupaka kloniranja. Aktivni konstrukt PAD4-dCas9 navođen molekulama sgRNA trebao bi dovesti do deiminacije histonskih arginina u citrulin na mjestima CpG otoka ciljanih gena što bi u konačnici dovelo do povećanja razine ekspresije. Statistički značajno povećanje ekspresije nije zamijećeno na uzorcima prikupljenima 12 dana od transfekcije. Zanimljivo je da je povećanje ekspresije uočeno i kod uzoraka stanica prikupljenih 8 dana od transfekcije inaktivnim konstruktom PAD4-dCas9 koji sadrži mutaciju C645S (Zhang i sur. 2011). Ovo upućuje na mogućnost da je inaktivni PAD4 potencijalno vezao neki od interakcijskih partnera što je u konačnici dovelo do povećanja ekspresije gena. Konačno, ChIP-seq analizom bi se moglo validirati jesu li katalitički aktivni i inaktivni PAD4-dCas9 konstrukt oboje proveli citrulinaciju histona na regijama CpG otoka ciljanih sgRNA molekulama iz Tablice 15.

Pregledom mrežne stranice *Gene Card* za gen *PADI4*, pod kategorijom 'Interacting proteins' nalazi se 123 proteina povučeni iz nekoliko javno dostupnih baza podataka o interakcijama proteina (STRING, MINT, IID, UniProt, itd.) koji su eksperimentalno pokazani da asociraju s PAD4 ili potencijalno asociraju prema rezultatima računalnih predviđanja. Pregledom najviše rangiranih potencijalnih partnera u bazi podataka STRING (Szklarczyk i sur. 2021), ističe se ING4. Protein ING4 (engl. *inhibitor of growth protein 4*) pripada obitelji ING tumor supresor proteina s različitim staničnim funkcijama poput staničnog rasta, diferencijacije, senescencije i apoptoze (Dantas i sur. 2019). Obitelj ING tumor supresora sadrže histon interagirajuću PHD domenu kojom se najčešće vežu za H3K4me3 oznaku aktivnog kromatina i navode histon acetiltransferazne (HAT) ili deacetilazne komplekse (HDAC), ovisno o kojem proteinu ING obitelji se radi. Konkretno, ING4 interagira s MYST-HB01 histon acetiltransferaznim kompleksom koji upravlja acetilacijom raznolikih lizinskih ostataka na histonima i aktivacije drugih transkripcijskih faktora, poput p53 (Palacios i sur. 2010; Wright i sur. 2016). Protein ING4

jedan je od prvih ne-histonskih proteina na kojem je uočeno djelovanje PAD4, citrulinacija ING4 od strane PAD4 rezultirala je sniženom acetilacijom p53, nizvodno represirajući ekspresiju p21 (Guo i Fast 2011). Moguće je da interakcija inaktivnog PAD4 i ING4 (poticanje acetilacije histona) dovela do uočenog povećanja ekspresije KLF8.

Interakcija katalitički inaktivnog konstrukta PAD4-dCas9 s potencijalnim partner proteinom mogla bi se provjeriti zasebnim eksperimentom. Prvo, koristeći imunoprecipitacijsku metodu za izolaciju PAD4 i potencijalnog vezanog partner proteina, zatim provođenjem masene spektrometrije imunoprecipitiranog uzorka. U slučaju PAD4, imunoprecipitacija bi se vršila na uzorku lizata stanica transfeciranih katalitički aktivnim i inaktivnim PAD4-dCas9 konstruktom, prikupljen 8. i 12. dan nakon transfekcije, pomoću antitijela za PAD4 i protein G agaroznih granula koje vežu konstantnu regiju antitijela, koristeći puffer tris-glicin za eluciju (Zhou i sur. 2018). Masena spektrometrija analitička je tehnika mjerenja omjera mase i naboja molekula kojom se mogu identificirati proteini te proučavati njihove post-translacijske modifikacije i funkcionalne interakcije s drugim proteinima ili podjedinicama unutar velikih proteinskih kompleksa (Chait 2011). U radu Zhou i sur. (2018) anti-PAD4 imunoprecipitati pripremljeni su za masenu spektrometriju prema protokolu Wiśniewski i sur. 2009, takozvana FASP metoda (engl. *filter assisted sample preparation*). Proteini u imunoprecipitatu se moraju digestirati i desalinizirati, zatim se osušeni peptidi kovalentno označavaju *tag* reagensima za masenu spektrometriju. Ovakvo pripremljeni uzorci se mogu podvrgnuti LC-MS analizi (engl. *liquid chromatography–mass spectrometry*). Podaci dobiveni masenom spektrometrijom mogu se potom koristiti za usporedbu s bazom podataka ljudskih proteina Uniprot kako bi se otkrilo koji protein je vezao fuzijski protein PAD4.

6. Zaključak

- Uspješno su konstruirane direktne fuzije epigenetičkih efektorskih domena proteina KDM5A i PAD4 s dCas9 (KMD5A-dCas9 i PAD4-dCas9).
- Stanice HepG2 uspješno su transfecirane katalitički aktivnim, inaktivnim i *non-target* fuzijskim konstruktima KMD5A-dCas9 i PAD4-dCas9 za ciljanu manipulaciju ekspresije gena.
- Nema statistički značajnog smanjenja u ekspresiji gena *ZEB1* i *SNAI1* u stanicama transfeciranim fuzijskim konstruktima KMD5A-dCas9.
- Rezultat da nije došlo do statistički značajnog smanjenja ekspresije gena *ZEB1* i *SNAI1* u stanicama transfeciranim aktivnim varijantom konstrukta ne može se sa sigurnošću prihvatiti.
- C_T vrijednosti nisu uspješno detektirane za gen *TWIST1* (postoji više mogućih uzroka) i njegova promjena ekspresije nije analizirana.
- Postoji statistički značajno povećanje ekspresije gena *KLF8* u uzorcima stanica transfeciranim aktivnim i inaktivnim verzijama konstrukata PAD4-dCas9 osam dana nakon transfekcije, no ne i 12 dana od transfekcije.
- Rezultat statistički značajnog povećanja ekspresije gena *KLF8* u uzorcima stanica transfeciranim inaktivnim verzijama konstrukata PAD4-dCas9 upućuje na potrebu za daljnjim provjerama novim eksperimentima.

7. Literatura

- Amabile, A., Migliara, A., Capasso, P., Biffi, M., Cittaro, D. Naldini, L., Lombardo, A. (2016): Inheritable Silencing of Endogenous Genes by Hit-and-Run Targeted Epigenetic Editing. *Cell* 167(1): 219-232.
- Bajar, B. T., Wang, E. S., Lam, A. J., Kim, B. B., Jacobs, C. L., Howe, E. S., Davidson, M. W., Lin, M. Z., Chu, J. (2016): Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting. *Scientific Reports* 6(1): 1–12.
- Bannister, A. J., Kouzarides, T. (2011): Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* 21(3): 381–395.
- Barnes, P. J., Adcock, I. M. and Ito, K. (2005): Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *European Respiratory Journal* 25(3): 552–563.
- Barrangou, R. (2015): Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines. *Genome Biology* 16(1): 1–11.
- Bicker, K. L., Thompson, P. R. (2013): The protein arginine deiminases (PADs): Structure, Function, Inhibition, and Disease. *Biopolymers* 99(2): 155–163.
- Bott, S. R. J., Arya, M., Kirby, R. S., Williamson, M. (2005): p21WAF1/CIP1 gene is inactivated in metastatic prostatic cancer cell lines by promoter methylation. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 8(4): 321–326.
- Brocken, D. J. W., Tark-Dame, M. and Dame, R. T. (2018): dCas9: A Versatile Tool for Epigenome Editing. *Current issues in molecular biology* 26: 15–32.
- Buck, M. J., Lieb, J. D. (2004): ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics* 83(3): 349–360.
- Chait, B. T. (2011): Mass spectrometry in the postgenomic Era. *Annual Review of Biochemistry* 80: 239–246.
- Choudhury, S. R. Cui, Y., Lubecka, K., Stefanska, B., Irudayaraj, J. (2016): CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget*

7(29): 46545–46556.

Christophorou, M. A. Castelo-Branco, G., Halley-Stott, R. P., Oliveira, C. S., Loos, R., Radzishuskaya, A., Mowen, K. A., Bertone, P., Silva, J. C.R., Zernicka-Goetz, M., Nielsen, M. L., Gurdon, J. B., Kouzarides, T. (2014): Citrullination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin. *Nature* 507(7490): 104–108.

Dantas, A. Al Shueili, B., Yang, Y., Nabbi, A., Fink, D., Riabowol, K. (2019): Biological functions of the ING proteins. *Cancers* 11(11): 1817.

Defossez, P. A., Stancheva, I. (2011): Biological functions of methyl-CpG-binding proteins. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 101: 377–398.

Dick, F. A., Rubin, S. M. (2013): Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature reviews Molecular cell biology* 14(5): 297–306.

Frangoul, H., Altshuler, D., Cappellini, M. D., Chen, Y.-S., Domm, J., Eustace, B. K., Foell, J., de la Fuente, J., Grupp, S., Handgretinger, R., Ho, T. W., Kattamis, A., Kernytsky, A., Lekstrom-Himes, J., Li, A. M., Locatelli, F., Mapara, M. Y., de Montalembert, M., Rondelli, D., Sharma, A., Sheth, S., Soni, S., Steinberg, M. H., Wall, D., Yen, A., Corbacioglu, S. (2021): CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *New England Journal of Medicine* 384(3): 252–260.

Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2007): Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* 176(2): 231–241.

Fuhrmann, J., Thompson, P. R. (2016): Protein Arginine Methylation and Citrullination in Epigenetic Regulation. *ACS Chemical Biology* 11(3): 654–668.

Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., Qi, L. S. (2013): CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154(2): 442–451.

Guhathakurta, S., Kim, J., Adams, L., Basu, S., Song, M. K., Adler, E., Je, G., Fiadeiro, M. B., Kim, Y.-S. (2021): Targeted attenuation of elevated histone marks at SNCA alleviates α -

synuclein in Parkinson's disease. *EMBO Molecular Medicine* 13(2): e12188.

Guo, Q., Fast, W. (2011): Citrullination of inhibitor of growth 4 (ING4) by peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) disrupts the interaction between ING4 and p53. *The Journal of biological chemistry* 286(19): 17069–17078.

Guo, Q., Bedford, M. T., Fast, W. (2011): Discovery of peptidylarginine deiminase-4 substrates by protein array: antagonistic citrullination and methylation of human ribosomal protein S2. *Molecular Biosystems* 7(7): 2286–2295.

Hellman, L. M., Fried, M. G. (2007): Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions. *Nature protocols* 2(8): 1849–1861.

Hidalgo-Cantabrana, C., Goh, Y. J. and Barrangou, R. (2019): Characterization and Repurposing of Type I and Type II CRISPR-Cas Systems in Bacteria. *Journal of molecular biology* 431(1): 21–33.

Hilton, I. B., D'Ippolito, A. M., Vockley, C. M., Thakore, P. I., Crawford, G. E., Reddy, T. E., Gersbach, C. A. (2015): Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature biotechnology* 33(5): 510–517.

Holtzman, L., Gersbach, C. A. (2018): Editing the epigenome: Reshaping the genomic landscape. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 19: 43–71.

Horton, J. R., Liu, X., Gale, M., Wu, L., Shanks, J. R., Zhang, X., Webber, P. J., Bell, J. S.K., Kales, S. C., Mott, B. T. Rai, G., Jansen, D. J., Henderson, M. J., Urban, D. J., Hall, M. D., Simeonov, A., Maloney, D. J., Johns, M. A., Fu, H., Jadhav, A., Vertino, P. M., Yan, Q., Cheng, X. (2016): Structural Basis for KDM5A Histone Lysine Demethylase Inhibition by Diverse Compounds. *Cell Chemical Biology* 23(7): 769–781.

Iwasaki, W., Miya, Y., Horikoshi, N., Osakabe, A., Taguchi, H., Tachiwana, H., Shibata, T., Kagawa, W., Kurumizaka, H. (2013): Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. *FEBS Open Bio* 3: 363–369.

Josipović, G., Tadić, V., Klasić, M., Zanki, V., Bečeheli, I., Chung, F., Ghantous, A., Keser, T., Madunić, J., Bošković, M., Lauc, G., Herceg, Z., Vojta, A., Zoldoš, V. (2019): Antagonistic and synergistic epigenetic modulation using orthologous CRISPR/dCas9-based modular system.

Nucleic acids research 47(18): 9637–9657.

Kearns, N. A., Pham, H., Tabak, B., Genga, R. M., Silverstein, N. J., Garber, M., Maehr, R. (2015): Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nature methods* 12(5): 401–403.

Klose, R. J., Yan, Q., Tothova, Z., Yamane, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Gilliland, D. G., Zhang, Y., Kaelin, W. G. (2007): The Retinoblastoma Binding Protein RBP2 Is an H3K4 Demethylase. *Cell* 128(5): 889–900.

Koyama, M., Kurumizaka, H. (2018): Structural diversity of the nucleosome. *The Journal of Biochemistry* 163(2): 85–95.

Lauberth, S. M., Nakayama, T., Wu, X., Ferris, A. L., Tang, Z., Hughes, S. H., Roeder, R. G. (2013): H3K4me3 interactions with TAF3 regulate preinitiation complex assembly and selective gene activation. *Cell* 152(5): 1021–1036.

Li, P., Li, M., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., Xiong, N., Wang, Y. (2010): PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *The Journal of Experimental Medicine* 207(9): 1853–1862.

Liefke, R., Oswald, F., Alvarado, C., Ferres-Marco, D., Mittler, G., Rodriguez, P., Dominguez, M., Borggreffe, T. (2010): Histone demethylase KDM5A is an integral part of the core Notch–RBP-J repressor complex. *Genes and Development* 24(6): 590–601.

Lin, W., Cao, J., Liu, J., Beshiri, M. L., Fujiwara, Y., Francis, J., Cherniack, A. D., Geisen, C., Blair, L. P., Zou, M. R., Shen, X., Kawamori, D., Liu, Z., Grisanzio, C., Watanabe, H., Minamishima, Y. A., Zhang, Q., Kulkarni, R. N., Signoretti, S., Rodig, S. J., Bronson, R. T., Orkin, S. H., Tuck, D. P., Benevolenskaya, E. V., Meyerson, M., Kaelin, W. G., Yan, Q. (2011): Loss of the retinoblastoma binding protein 2 (RBP2) histone demethylase suppresses tumorigenesis in mice lacking Rb1 or Men1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(33): 13379–13386.

Liu, G. Y., Liao, Y. F., Chang, W. H., Liu, C. C., Hsieh, M. C., Hsu, P. C., Tsay, G. J., Hung, H. C. (2006): Overexpression of peptidylarginine deiminase IV features in apoptosis of haematopoietic cells. *Apoptosis* 11(2): 183–196.

Liu, X., Arfman, T., Wichapong, K., Reutelingsperger, C. P.M., Voorberg, J., Nicolaes, G. A.F. (2021): PAD4 takes charge during neutrophil activation: Impact of PAD4 mediated NET formation on immune-mediated disease. *Journal of thrombosis and haemostasis* 19(7): 1607–1617.

Liu, Y. L., Chiang, Y. H., Liu, G. Y., Hung, H. C. (2011): Functional Role of Dimerization of Human Peptidylarginine Deiminase 4 (PAD4). *PLoS One* 6(6): e21314.

Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M.-S., Leahy, D. J. (2013): Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI). *Methods in enzymology* 529: 227–240.

Lundberg, K., Nijenhuis, S., Vossenaar, E. R., Palmblad, K., van Venrooij, W. J., Klareskog, L., Zendman, A. J., Harris, H. E. (2005): Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. *Arthritis research and therapy* 7(3): 458–467.

Ma, Y., Kanakousaki, K., Buttitta, L. (2015): How the cell cycle impacts chromatin architecture and influences cell fate. *Frontiers in Genetics* 6(19).

Maeder, M. L., Linder, S. J., Cascio, V. M., Fu, Y., Ho, Q. H., Joung, J. K. (2013): CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nature methods* 10(10): 977–979.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Church, G. M. (2013): RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339(6121): 823–826.

Martella, A., Fisher, D. I. (2021): Regulation of Gene Expression and the Elucidative Role of CRISPR-Based Epigenetic Modifiers and CRISPR-Induced Chromosome Conformational Changes. *CRISPR Journal* 4(1): 43–57.

Maze, I., Noh, K. M., Soshnev, A. A., Allis, C. D. (2014): Every amino acid matters: Essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nature Reviews Genetics* 15(4): 259–271.

Mengstie, M. A., Wondimu, B. Z. (2021): Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics: Targets and Therapy* 15: 353–361.

Mlambo, T., Nitsch, S., Hildenbeutel, M., Romito, M., Müller, M., Bossen, C., Diederichs, S.,

Cornu, T. I., Cathomen, T., Mussolino, C. (2018): Designer epigenome modifiers enable robust and sustained gene silencing in clinically relevant human cells. *Nucleic Acids Research* 46(9): 4456–4468.

Mohanan, S., Cherrington, B. D., Horibata, S., McElwee, J. L., Thompson, P. R., Coonrod, S. A. (2012): Potential role of peptidylarginine deiminase enzymes and protein citrullination in cancer pathogenesis. *Biochemistry research international* 2012: 895343.

Mollanoori, H., Rahmati, Y., Hassani, B., Havasi Mehr, M., Teimourian, S. (2021): Promising therapeutic approaches using CRISPR/Cas9 genome editing technology in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Genes and Diseases* 8(2): 146–156.

O’Geen, H., Ren, C., Nicolet, C. M., Perez, A. A., Halmai, J., Le, V. M., MacKay, J. P., Farnham, P. J., Segal, D. J. (2017): dCas9-based epigenome editing suggests acquisition of histone methylation is not sufficient for target gene repression. *Nucleic acids research* 45(17): 9901–9916.

Ortiz Torres, I., Kuchenbecker, K. M., Nnadi, C. I., Fletterick, R. J., Kells, M. J.S., Galonić Fujimori, D. (2016): Histone demethylase KDM5A is regulated by its reader domain through a positive-feedback mechanism. *Nature Communications* 176(1): 139–148.

Pacheco, M. B., Camilo, V., Henrique, R., Jerónimo, C. (2021): Epigenetic Editing in Prostate Cancer: Challenges and Opportunities. *Epigenetics* 17(5): 564–588.

Palacios, A., Moreno, A., Oliveira, B. L., Rivera, T., Prieto, J., García, P., Fernández-Fernández, M. R., Bernadó, P., Palmero, I., Blanco, F. J. (2010): The dimeric structure and the bivalent recognition of H3K4me3 by the tumor suppressor ING4 suggests a mechanism for enhanced targeting of the HBO1 complex to chromatin. *Journal of Molecular Biology* 396(4): 1117–1127.

Pasini, D., Hansen, K. H., Christensen, J., Agger, K., Cloos, P. A.C., Helin, K. (2008): Coordinated regulation of transcriptional repression by the RBP2 H3K4 demethylase and Polycomb-Repressive Complex 2. *Genes and Development* 22(10): 1345–1355.

Perez-Pinera, P., Kocak, D. D., Vockley, C. M., Adler, A. F., Kabadi, A. M., Polstein, L. R., Thakore, P. I., Glass, K. A., Ousterout, D. G., Leong, K. W., Guilak, F., Crawford, G. E., Reddy, T. E., Gersbach, C. A. (2013): RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based

transcription factors. *Nature methods* 10(10): 973–976.

Perini, G., Diolaiti, D., Porro, A., Della Valle, G. (2005): In vivo transcriptional regulation of N-Myc target genes is controlled by E-box methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(34): 12117–12122.

Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29(9): e45.

Pulecio, J., Verma, N., Mejía-Ramírez, E., Huangfu, D., Raya, A. (2017): CRISPR/Cas9-Based Engineering of the Epigenome. *Cell Stem Cell* 21(4): 431–447.

Punna-Moorthy, G., Hersey, P., Emran, A. A., Tiffen, J. (2021): Lysine Demethylases: Promising Drug Targets in Melanoma and Other Cancers. *Frontiers in Genetics* 12: 680633.

Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., Lim, W. A. (2013): Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* 152(5): 1173–1183.

Rieu, I., Powers, S. J. (2009): Real-Time Quantitative RT-PCR: Design, Calculations, and Statistics. *The Plant Cell* 21(4): 1031–1033.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C.T., Schreiber, S. L., Mellor, J., Kouzarides, T. (2002): Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419(6905): 407–411.

Schwank, G., Koo, B. K., Sasselli, V., Dekkers, J. F., Heo, I., Demircan, T., Sasaki, N., Boymans, S., Cuppen, E., Van Der Ent, C. K., Nieuwenhuis, E. E. S., Beekman, J. M., Clevers, H. (2013): Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 13(6): 653–658.

Sgro, A., Blancafort, P. (2020): Epigenome engineering: new technologies for precision medicine. *Nucleic acids research* 48(22): 12453–12482.

Smolen, J. S., Aletaha, D., McInnes, I. B. (2016): Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 388(10055): 2023–2038.

Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhira, S., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M.,

Nakayama-Hamada, M., Kawaida, R., Ono, M., Ohtsuki, M., Furukawa, H., Yoshino, S., Yukioka, M., Tohma, S., Matsubara, T., Wakitani, S., Teshima, R., Nishioka, Y., Sekine, A., Iida, A., Takahashi, A., Tsunoda, T., Nakamura, Y., Yamamoto, K. (2003): Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nature genetics* 34(4): 395–402.

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., von Mering, C. (2021): The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research* 49(D1): D605–D612.

Tanikawa, C., Espinosa, M., Suzuki, A., Masuda, K., Yamamoto, K., Tsuchiya, E., Ueda, K., Daigo, Y., Nakamura, Y., Matsuda, K. (2009): Regulation of protein citrullination through p53/PADI4Network in DNA damage response. *Cancer Research* 69(22): 8761–8769.

Valesini, G., Gerardi, M. C., Iannuccelli, C., Pacucci, V. A., Pendolino, M., Shoenfeld, Y. (2015): Citrullination and autoimmunity. *Autoimmunity reviews* 14(6): 490–497.

Verde, G., Querol-Paños, J., Cebrià-Costa, J. P., Pascual-Reguant, L., Serra-Bardenys, G., Iturbide, A., Peiró, S. (2017): Lysine-Specific Histone Demethylases Contribute to Cellular Differentiation and Carcinogenesis. *Epigenomes* 1(1): 4.

Vojta, A., Dobrinić, P., Tadić, V., Bočkor, L., Korać, P., Julg, B., Klasić, M., Zoldoš, V. (2016): Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Research* 44(12): 5615–5628.

Wang, J., Zhang, C., Feng, B. (2020): The rapidly advancing Class 2 CRISPR-Cas technologies: A customizable toolbox for molecular manipulations. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24(6): 3256–3270.

Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., Doudna, J. A. (2012): RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482(7385): 331–338.

Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M. (2009): Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods* 6(5): 359–362.

Wright, D. G., Marchal, C., Hoang, K., Ankney, J. A., Nguyen, S. T., Rushing, A. W.,

Polakowski, N., Miotto, B., Lemasson, I. (2016): Human T-cell leukemia virus type-1-encoded protein HBZ represses p53 function by inhibiting the acetyltransferase activity of p300/CBP and HBO1. *Oncotarget* 7(2): 1687–1706.

Wu, X., Kriz, A. J., Sharp, P. A. (2014): Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quantitative biology* 2(2): 59–70.

Xu, X., Qi, L. S. (2019): A CRISPR-dCas Toolbox for Genetic Engineering and Synthetic Biology. *Journal of Molecular Biology* 431(1): 34–47.

Yang, G. J., Zhu, M. H., Lu, X. J., Liu, Y. J., Lu, J. F., Leung, C. H., Ma, D. L., Chen, J. (2021): The emerging role of KDM5A in human cancer. *Journal of Hematology and Oncology* 14(1): 30.

Zhai, Q., Wang, L., Zhao, P., Li, T. (2017): Role of citrullination modification catalyzed by peptidylarginine deiminase 4 in gene transcriptional regulation. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 49(7): 567–572.

Zhang, X., Gamble, M. J., Stadler, S., Cherrington, B. D., Causey, C. P., Thompson, P. R., Roberson, M. S., Kraus, W. L., Coonrod, S. A. (2011): Genome-Wide Analysis Reveals PADI4 Cooperates with Elk-1 to Activate c-Fos Expression in Breast Cancer Cells. *PLoS Genetics* 7(6): e1002112.

Zhou, K., Gaullier, G., Luger, K. (2018): Nucleosome structure and dynamics are coming of age. *Nature Structural and Molecular Biology* 26(1): 3–13.

Zhou, Y., An, L. L., Chaerkady, R., Mittereder, N., Clarke, L., Cohen, T. S., Chen, B., Hess, S., Sims, G. P., Mustelin, T. (2018): Evidence for a direct link between PAD4-mediated citrullination and the oxidative burst in human neutrophils. *Scientific Reports* 8(1): 15228.

Zhu, D., Zhang, Y., Wang, S. (2021): Histone citrullination: a new target for tumors. *Molecular Cancer* 20(1): 1–17.

8. Životopis

Rođena sam 29.3.1997. u Splitu, gdje sam pohađala Osnovnu školu Bol i potom Prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Akademске godine 2016./2017. upisujem Preddiplomski studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nastavljam dalje na istom fakultetu i 2019. godine upisujem Diplomski studij molekularne biologije. Tijekom studiranja sam nekoliko godina zaredom volontirala na manifestaciji „Dan i noć na PMF-u“ kao voditelj radionica za javnost na različitim zavodima Biološkog odsjeka. Kao član Udruge studenata Biologije (BIUS) 2018. godine zajednički osnivam Grupu za Bioetiku s kolegom sa studija, gdje smo organizirali predavanja za članove grupe te 2019. samostalno organizirali Studentski bioetički simpozij na biološkom odsjeku PMF-a. 2018. godine priključujem se studentskoj organizaciji prvog dana karijera na PMF-u, „Workin' Science – WISE“, gdje nastavljam sudjelovati kao član organizacije do kraja studija, a 2019. smo za taj pothvat nagrađeni Rektorovom nagradom za društveno koristan rad. Tokom studija sam odradila nekoliko stručnih praksi. Na preddiplomskom studiju sam odradila stručnu praksu na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za molekularnu biologiju u Laboratoriju za molekularnu genetiku pod mentorstvom dr.sc. Andreje Mikoč. Na diplomskom studiju sam odradila stručnu praksu na Botaničkom zavodu u Laboratoriju za arheobotaniku i geobotaniku pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Renate Šošarić, gdje kasnije ostajem raditi nekoliko mjeseci preko studentskog ugovora na izolaciji i razvrstavanju arheobotaničkog materijala. Pred sam kraj studija odradila sam stručnu praksu putem Erasmus+ programa na Biološkom odsjeku na Sveučilištu Tor Vergata u Rimu, u Laboratoriju za molekularnu antropologiju drevne DNA.