



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Angela DONEVA

**MOŽNOSTI REPROGRAMIRANJA IN
TRANSDIFERENCIJACIJE CELIC Z UPORABO
AKTIVATORJEV CRISPR**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Angela DONEVA

**MOŽNOSTI REPROGRAMIRANJA IN TRANSDIFERENCIJACIJA
CELIC Z UPORABO AKTIVATORJEV CRISPR**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**CELL REPROGRAMMING AND TRANSDIFFERENTIATION WITH
THE USE OF CRISPR ACTVATORS**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2019

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programa prve stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. Jernej Ogorevc.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. Jernej OGOROVC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predstavitve: 12. 09. 2019

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 602.641:602.9:611.018 (043.2)
KG	CRISPR sistem, dCas9, CRISPRa, matične celice, iPSC-inducirane matične celice, reprogramiranje celic, transdiferenciacija
AV	DONEVA, Angela
SA	OGOREVC, Jernej (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2019
IN	MOŽNOSTI REPROGRAMIRANJA IN TRANSDIFERENCIJACIJA CELIC Z UPORABO AKTIVATORJEV CRISPR
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VIII, 18 str., 1 pregl., 12 sl., 37 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Reprogramiranje celic in transdiferenciacija pomenita spreminjanje identitete in funkcije celic. V diplomski nalogi sva pregledala literaturo in preučila možnosti za reprogramiranje in transdiferenciacijo celic z uporabo aktivatorjev vezanih na encim Cas, ki je del CRISPR/Cas ribonukleoproteinskega kompleksa. Sistem CRISPR/Cas je zelo popularno orodje za urejanje genoma, uporaben pa je tudi za uravnavanje izražanja različnih genov. Temelji na vzpostavitvi kompleksa vodilne RNA (sgRNA – single guide RNA), ki določa tarčno regijo, in proteina Cas. Ob določenih modifikacijah je sistem uporaben tudi za drugačno aplikativno rabo. Ena od takšnih modifikacij je zamenjava proteina Cas9 z mutirano obliko, ki nima endonukleazne aktivnosti (»dead« Cas9-dCas9). Dokazano je bilo, da fuzija transaktivacijskih domen na dCas9, ob vezavi na tarčna mesta v genomu, inducira izražanje tarčnih genov, s čimer lahko dosežemo reprogramiranje celic v pluripotentno stanje oziroma jih diferenciramo v želeni celični tip. V literaturi smo poiskali primere, kjer je bila tehnologija že uspešno uporabljena v ta namen in poskušali bomo ovrednotiti prednosti in slabosti regulacije genov, ki temelji na CRISPR/dCas9

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1

DC UDC 602.641:602.9:611.018 (043.2)

CX CRISPR system, dCas9, CRISPRa, stem cells, iPSC-induced stem cells, cell reprogramming, transdifferentiation

AU DONEVA, Angela

AA OGOREVC, Jernej (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology

PY 2019

TI CELL REPROGRAMMING AND TRANSDIFERENTIATION WITH THE USE OF CRISPR ACTVATORS

DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)

NO VIII, 18 p., 1 tab., 12 fig., 37 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Cell reprogramming and transdifferentiation mean changing the identity and function of cells. In the thesis we reviewed the literature and examined the possibilities for reprogramming and transdifferentiation of cells using activators bound to the Cas enzyme that is part of the CRISPR / Cas ribonucleoprotein complex. The CRISPR / Cas system is a very popular tool for gene editing. It is based on the establishment of ribonucleoprotein complex, consisting of RNA (sgRNA) which determines the target region, and the Cas protein. With certain modifications, the system can also be used for different applicative uses. One such modification is replacement of a Cas9 protein with a mutated form that lacks endonuclease activity ("dead" Cas9-dCas9). It has been shown that fusion of transactivation domains to dCas9, upon binding to target sites in the genome, induces the expression of target genes, which may be used for cell reprogramming or cell the aim of achieving reprogramming of cells in a pluripotent state or differentiation into the desired cell type. Literature mining revealed that the technology has been successfully used fort his purpose and could be useful in future regenerative medicine and biotechnology applications.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN POVOD DELA	1
2 MATIČNE CELICE	1
2.1 ZNAČILNOSTI MATIČNIH CELIC	1
2.2 RAZVRSTITEV MATIČNIH CELIC GLEDE NA DIFERENCIACIJSKI POTENCIAL	2
2.3 INDUCIRANE PLURIPOTENTNE MATIČNE CELICE iPSCs	2
2.4 REPROGRAMIRANJE CELIC	3
2.4.1 Transdiferenciacija	4
3 SISTEM CRISPR/ Cas 9	5
3.1 MEHANIZEM DELOVANJA CRISPR-Cas9	6
3.1.1 Regulacija genov z uporabo CRISPR/dCas	7
3.1.2 Primeri uspešne uporabe metode CRISPRa pri reprogramiranja celic	8
3.1.2.1 Transdiferenciacije celic z uporabo transaktivacijskih proteinov pripojenih na dCas9	12
3.1.2.2 Primer transdiferenciacije celic s CRISPR/dCas sistemom	13
3.1.3 Pomankljivosti sistema CRISPR	15
4 ZAKLJUČEK	15
5 VIRI	15
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Primer študij na področju reprogramiranje in transdiferenciacije celic s CRISPRa.	14

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Shema pridobivanja iPSC, za nadaljno uporabo pri celični terapiji (Rossbach in sod., 2011)	4
Slika 2: Shematski prikaz delovanja CRISPR/Cas 9 sistema pri bakteriji <i>Streptococcus pyogenes</i> (Doetschman in Georgieva, 2017)	5
Slika 3: Ključne faze, pridobivanja odpornosti, proti tuji DNA pri bakterije (Rath in sod., 2015)	7
Slika 4: Osnovni princip regulacije prepisovanja genov z aktivatorjem CRISPR (Weltner in sod., 2017)	8
Slika 5: Prikaz konstrukta, uporabljenega za reprogramiranje NSC (Weltner in sod., 2017).	9
Slika 6: Kvantifikacija iPSCs kolonij, pozitivnih na alkalno fosfatazo, pridobljene iz NSC (Weltner in sod., 2017)	9
Slika 7: Shematski prikaz reprogramiranja kožnih fibroblastov z aktivatorji dCas9 (Weltner in sod., 2017)	10
Slika 8: Prikaz vpliva domena VP192 in VPH ter ciljanje na motiva EAA, na HFF celic s CRISPRa (Weltner in sod., 2017)	11
Slika 9: Shematski prikaz reprogramiranja fibroblastov v iPSCs, z aktivacijo Oct4 in Sox2, s SunTag aktivacijskega sistema (Liu in sod., 2018)	12
Slika 10: Endogeno prepisovanje Oct4 in Sox2 tekom 12 dni (Liu in sod., 2018)	13
Slika 11: Ilustracija, ki prikazuje transdiferenciacije MEF v SkM, z lentivirusno transdukcijo MEF z gRNA, povratni tetraciklinski aktivator (M2rtTA) in doksiciklin, inducirani VdC9BV (Chakraborty in sod., 2014).	14
Slika 12: Reprogramiranje celic C3H10T1 / 2 s VdC9BV opaženo je značilno znatno višji nivoji mRNA Myod1 in Myog s qRT-PCR detekcijo 18. dne po transdukciji (Chakraborty in sod., 2014).	15

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

TF

Transkripcijski faktor je protein, ki je potreben za pričetek transkripcije (prepisovanja), vendar ni del polimeraznega kompleksa. Veže razpoznavni element DNK. Preko protein-protein interakcij sodeluje z drugimi transkripcijskimi faktorji

MC

Matična celica je nediferencirana celica, ki ima dve ključni lastnosti: prva je samoobnavljanje in druga je lastnost pluripotentnosti.

iPSC

Inducirane pluripotentne matične celice pridobimo iz somatskih celic. Imajo podobne lastnosti kot pluripotentne matične celice in se lako uporabljajo v različne namene.

MEF

Mišji embrionalni fibroblasti so vrsta fibroblastov, pripravljenih iz mišjega zarodka. Ko se gojijo in vitro, kažejo vretenasto obliko.

TTF

Fibroblasti pridobljeni iz mišjega repa.

CPP

Kratki peptidi, ki olajšajo celični vnos / prevzem različnih molekul v jedra celic.

EEA motiv

EGA enriched Alu motiv (EEA). Torej Ohranjen Alu motiv, ki je obogaten v promotorjih zgodnjih embrionalnih genov (EGA) . S posredovanim delovanjem na tem motivu se izboljšuje aktivacijo genov za transkripcijo povezanih s reprogramiranja

TMP

Trímetoprim je sintetični antibiotik, ki zavira prehod dihidrofolne kisline v tetrahidrofolno kislino in se uporablja zlasti za zdravljenje nezapletenih okužb sečil. Za namen študije je bil uporabljen kot dCas9 aktivator.

DOX

Doksiciklin je antibiotik, ki sodi v skupini tetraciklinov. Lahko se uporablja pri "tet-on" (gensko izražanje aktivirano z doksiciklinom) in "tet-off" (utišanje genskega izražanja), s nadzorovani aktivaciji prepisovanja.

1 UVOD

Reprogramiranje celic in transdiferenciacija pomenita spreminjanje identitete in funkcije že končno diferenciranih celic, kar je bilo v preteklosti nepojmljivo, saj je veljala dogma, da je diferenciacija celic enosmerna pot (Takahashi, 2014). Reprogramiranje somatskih celic lahko dosežemo z uporabo metod, kot sta jedrni prenos v oocite ali s fuzijo somatskih in embrionalnih celic (Wilmot in sod., 1997). V genomu celic so identificirali zapise za različne transkripcijske faktorje (TF), kot so SOX2, OCT4, KLF4 in c-MYC, ki imajo vlogo v vzdrževanju in induciranju pluripotentnosti v somatskih celicah, kar je pripeljalo do razvoja različnih tehnoloških metod kot so uporaba virusnih vektorjev za vnos eksogenih TF (Takahashi in Yamanka, 2006) ali pa uporaba aktivatorjev vezanih na Cas encim, ki je del CRISPR/Cas ribonukleoproteinskega kompleksa (Kearns in sod., 2014). CRISPR/Cas9 tehnologija izvira iz bakterijskega CRISPR/Cas sistema tipa II, ki bakterijam zagotavlja zaščito pred virusi in plazmidi. Cas9 endonukleaza se veže z RNA zaporedjem sestavljenim iz tracrRNA in crRNA, pri čemer, se crRNA ob ustrezni homologiji z DNA, veže na tarčno DNA zaporedje, kar omogoči, da Cas9 endonukleaza reže tarčno zaporedje (Doudna in Charpentier, 2014). Za druge aplikativne namene, kot je na primer reprogramiranje celic, je bila razvita modifikacija sistema in sicer zamenjava proteina Cas9 z mutirano obliko, ki nima endonukleazne aktivnosti (»dead« Cas9-dCas9).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je pregled literature in preučitev možnosti uporabe tehnologije CRISPR aktivacije za namene reprogramiranja celic ali njihove transdiferenciacije. Predstavila bom primere, kjer je bila tehnologija že uspešno uporabljena za reprogramiranje ali transdiferenciacije celic in poskušala ovrednotiti prednosti in slabosti omenjene tehnologije, v primerjavi z drugimi metodami reprogramiranja.

2 MATIČNE CELICE

2.1 ZNAČILNOSTI MATIČNIH CELIC

Pojem matične celice opisuje različne tipe celic, za katere velja, da imajo sposobnost tvoriti različna tkiva v človeškem telesu. Pluripotentne Matične celice morajo zadostiti dvema pogojema: imeti morajo možnost neomejenega samoobnavljanja in pri tem obdržati popolnoma enake lastnosti kot izvorna celica (simetrične delitve) ter imeti morajo potencial za diferenciacijo v specifičen tip celic (asimetrične delitve), ki tvorijo določeno tkivo (Biehl in Russell, 2009).

2.2 RAZVRSTITEV MATIČNIH CELIC GLEDE NA DIFERENCIACIJSKI POTENCIAL

Matične celice lahko glede na njihov diferenciacijski potencial delimo na:

Totipotentne matične celice

Totipotentne matične celice imajo sposobnosti samoobnavljanja in razvoj v tri primarne zarodne plasti zgodnjega zarodka in tudi v ekstraembrionalna tkiva. (Sobhani in sod., 2017).

Pluripotentne matične celice (PMC)

Pluripotentne MC izvirajo iz zarodkov, natančneje iz znotrajcelične mase blastociste (ICM) v začetni fazi embrionalnega razvoja. Pridobivanje takšnih celic pri človeku je omejeno zaradi etičnih razlogov. Ta omejitev je bila odpravljena s pomočjo razvoja tehnologije induciranih matičnih celic iPSCs, ki imajo podobne morfološke lastnosti, gensko izražanje ter sposobnost proliferacije kot PMC (Biehl in Russell, 2009). Celice iPSCs se pridobivajo iz somatskih celic z vnosom transkripcijskih faktorjev, ki se visoko izražajo v pluripotentnih embrionalnih matičnih celicah (Rožman in Jež, 2010).

Multipotentne matične celice

Te celice imajo manjšo plastičnost in sposobnost za diferenciacijo, lahko tvorijo le celice ene zarodne plasti za razliko od PMC, ki tvorijo celice vseh treh zarodnih plasti (Rožman in Jež, 2010). Najdemo jih v zarodku med gastrulacijo.

Unipotentne matične celice

To so celice, ki imajo sposobnost da se razvijejo le v en celični tip in imajo možnost samoobnavljanja (Zhang in sod., 2009)

2.3 INDUCIRANE PLURIPOTENTNE MATIČNE CELICE iPSCs

iPSCs pridobimo z metodo reprogramiranja somatskih celic. Reprogramiranje celic je metoda, ki temelji na vsiljenem izražanju transkripcijskih faktorjev (npr. OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC), ki povzročijo epigenetske spremembe in povečano izražanje nekaterih genov (Andargie in sod., 2016). Za reprogramiranje se najpogosteje uporabljajo celice fibroblastov, ker jih je lahko gojiti, lahko pa se uporablja tudi druge tipe celic. Pri reprogramiranju, se dogajajo različne spremembe. Transkripcijski faktorji, ki se jim izražanje poveča, imajo vlogo pri DNA podvojevanju in proliferaciji celic, medtem ko so geni, ki jih regulirajo, povezani z adhezijo in medcelično komunikacijo (Polo in sod., 2012). C-MYC je verjetno glavni primarni dejavnik, ki posreduje prvi val aktivacije prepisovanja in povzroči hitre spremembe v celični proliferaciji, s spodbujanjem aktivacije genov, ki

regulirajo celični cikel. OSK imajo za tarčo jedrno DNA, ki je navita okoli histonov, daleč od mesta začetka prepisovanja, c-MYC pa se veže na odvito DNA v bližini mesta, kjer se začne prepisovanje (Soufi in sod., 2012).

2.4 REPROGRAMIRANJE CELIC

Odkritje, da lahko somatske celice reprogramiramo v pluripotentno stanje je močno spremenilo področje celične biologije, predvsem v smislu uvajanja novih metod ter razvoja orodij za doseganje pluripotence. Pionirsko metodo za reprogramiranja mišjih fibroblastov je predstavil Yamanaka, pri čemer je uporabil retrovirusno transdukcijo OCT4, SOX2, KLF4 in c-MYC v mišje embrionalne fibroblaste (MEF).

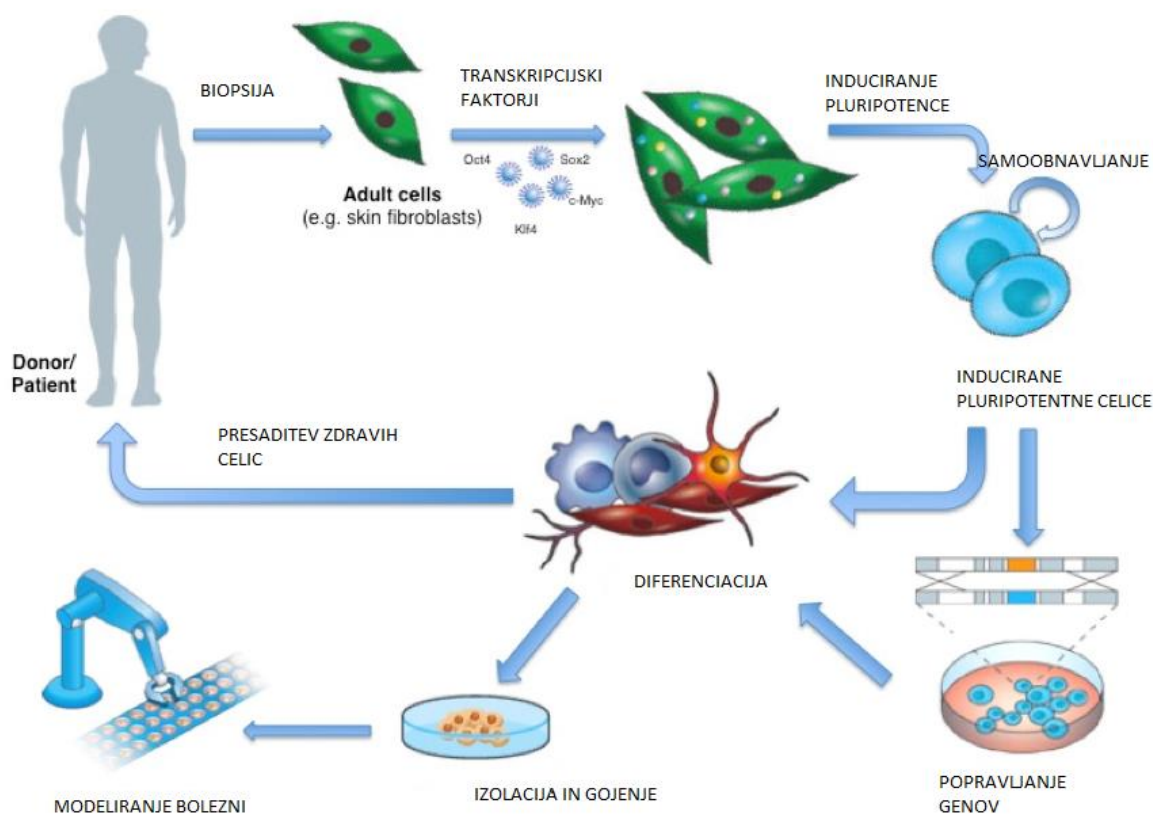
Metoda uporabe retroviralnega vektorja, je ena izmed najbolj pogosto uporabljenih pri reprogramiranju somatskih celic. Metode lahko na splošno delimo v dve glavni skupini: integrativne in neintegrativne metode. Integrativne metode so veljale za učinkovitejše od neintegrativnih metod, vendar so manj varne. Glavna slabost reprogramiranja z integrativnimi metodami je naključno vključevanje tuje DNA v gostiteljski genom in s tem možnost za nastanek motenj pri prepisovanju genov, nestabilnost genoma in maligne transformacije (Nakagawa in sod., 2008)

Danes obstajajo različni pristopi, ki omogočajo reprogramiranje brez genomskih sprememb kot na primer:

Direktna dostava štirih ključnih rekombinantnih proteinov, pomembnih za reprogramiranje celic, spojenih s proteinskimi transdukcijskimi domenami, ki omogočajo vstop skozi celično membrano – tako imenovani CPP-peptidi. To so kratki peptidi, ki omogočijo celični vnos / prevzem različnih molekul (nano delci, kemične molekule in velik fragmenti DNA) (Kim in sod., 2009).

RNA transfekcija oziroma uporaba in vitro sintetizirane RNA, narejene s pomočjo cDNA knjižnic znanih ključnih transkripcijskih dejavnikov (Yakubov in sod., 2010).

CRISPR / Cas 9 aktivatorjev, ki temeljijo na uporabi katalitsko inaktivirane Cas 9 nukleaze. Dejstvo, da se efektorji dCas9 lahko uporabljajo za nadziranje prepisovanja ciljanih endogenih lokusov, je koristno za namene celičnega reprogramiranja, kar zahteva utišanje in aktiviranje genov, za pravilno pretvorbo celic v različne tipe (Weltner in sod., 2018).



Slika 1 : Shema pridobivanja iPSC in urejanja genomov, za namene celične terapije (Rossbach in sod., 2011).

2.4.1 Transdiferenciacija

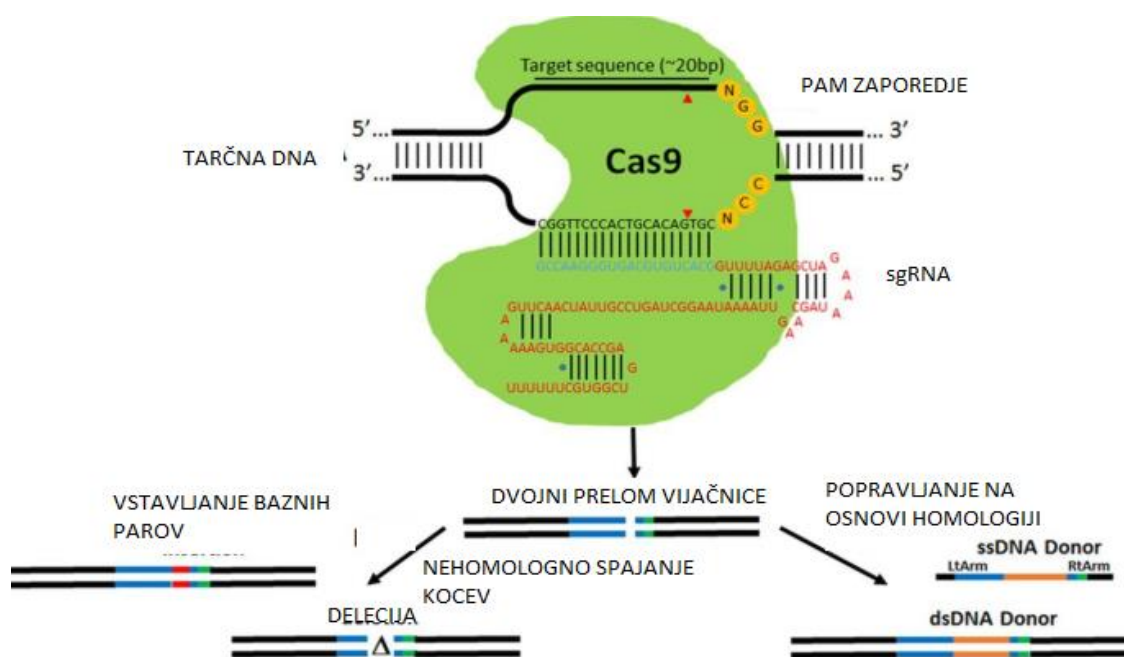
Je proces pri katerem končno diferenciran celični tip, neposredno pretvorimo v drugega brez prehoda skozi inducirano pluripotentno stanje. Pri celičnem reprogramiranju se celice najprej pretvorijo v stanje inducirane pluripotentne matične celice (iPSC) in se nato diferencirajo v želena celična stanja, s ciljem da nastane velika količina diferenciranih celic. Transdiferenciacija se naravno pojavlja v primerih regeneracije tkiva in je podskupina splošnejšega sklopa medsebojne pretvorbe celic, imenovane metaplazija, v kateri je lahko začetni tip celice bodisi diferenciran bodisi nediferenciran. Metaplazije so dobro znane pri človeških patologijah. Na primer, črevesna metaplazija želodca vključuje nastanek obličev črevesnega epitelija znotraj želodčnega epitelija. Mehanizem metaplazije vključuje, aktiviranje ali utišanje posebnih transkripcijskih dejavnikov ki nadzorujejo identiteto tkivnega tipa. V nekaterih primerih so preklopi transkripcijskih faktorjev povezani s pojavom specifičnih metaplazij. Pri miših lahko transkripcijski faktor Cdx2, ki je običajno potreben za razvoj črevesja, povzroči pojav črevesne metaplazije, če je nepravilno izražen v želodcu (Shen in sod., 2004).

Transdiferenciacijo lahko dosežemo na različne načine. V celice se lahko vnesejo transgeni, ki prekomerno izražajo ključne transkripcijske dejavnike. Drugi način je

regulacija endogenih genov, ki so ključni za postopek transdiferenciacije in jih lahko uravnavamo z uporabo metod, ki se osredotočajo na neposredno manipulacijo DNA ali epigenetskega okolja, kot je CRISPR / Cas9. Poti transdiferenciacije pa lahko usmerjamo tudi s farmakološkimi sredstvi, ki lahko povzročijo imunološki odziv v celicah, kar povzroči kaskado, ki sproži epigenetsko preoblikovanje ali neposredno spremeni epigenetsko okolje. Uporaba virusnih vektorjev za vnašanje eksogenih transgenov v celice je trenutno najbolj uporabljana metoda za indukcijo transdiferenciacije, vendar se je ta metoda izkazala za razmeroma neučinkovito. Po drugi strani regulacija endogenih genov povzroči veliko večjo učinkovitost pretvorbe od ostalih metod (Grath in Dai, 2019).

3 SISTEM CRISPR/ Cas 9

Urejanje genomov s pomočjo nukleaz, kot so nukleaze cinkovih prstov (ZFN), nukleaze TAL-efektorjev (TALEN) in Cas9 (s CRISPR povezani protein 9) predstavljajo revolucijo v genetskem inženiringu. Za razliko od ZFN in TALEN tehnologija CRISPR / Cas9 ne vključuje izdelave ciljno specifičnih proteinov in zahteva le prilagajanje kratkega območja enoverižne RNA (sgRNA). Cas9 nukleaza lahko na določenem genomskem mestu povzroči prelom dvojne verige DNA (Double Strand Break), ki ga je mogoče popraviti po dveh mehanizmih; 1) nehomologno spajanje koncev (NHEJ ima za posledico majhne insercije ali delecije (indel), če ni homologne predloge za neposredno popravilo ,ter 2) popravljanje na osnovi homologij (HDR). Ta tehnologija je uporabna za ustvarjanje celičnih linij s spremenjenim genomom, za raziskave, testiranje zdravil in potencialne terapevtske namene oziroma modeliranje bolezni (Doetschman in Georgieva, 2017) .



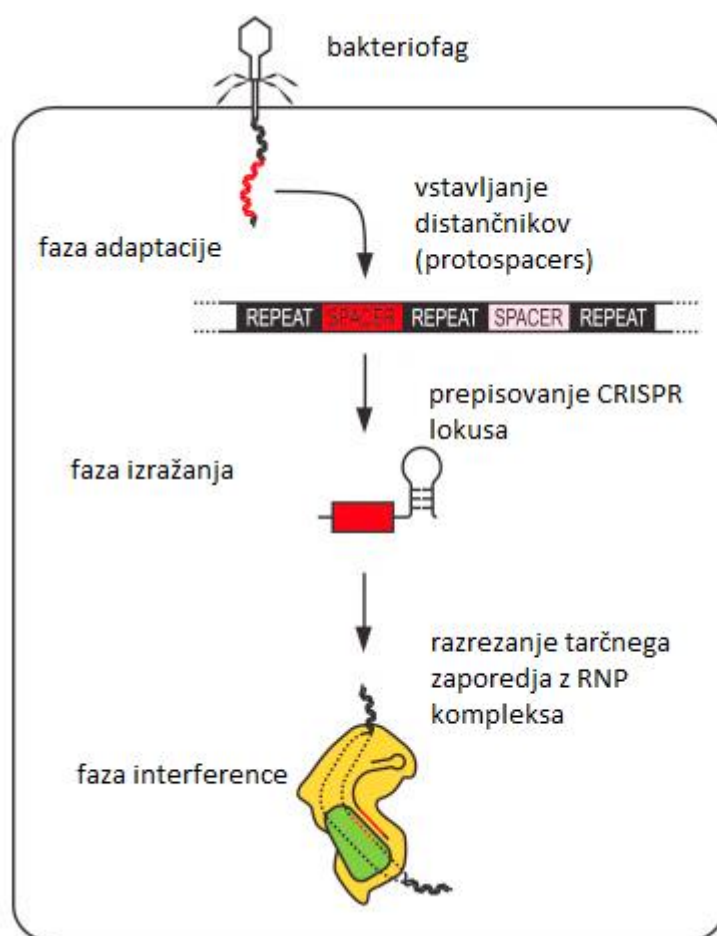
Slika 2: Shematski prikaz delovanja CRISPR/Cas9 sistema pri bakteriji *Streptococcus pyogenes* (Doetschman in Georgieva, 2017).

3.1 MEHANIZEM DELOVANJA CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 tehnologija izvira iz sistemov CRISPR-Cas tipa II, ki bakterijam omogoča odpornost pred virusi (bakteriofagi) in plazmidi. S CRISPR povezani protein Cas9 je endonukleaza, ki uporablja vodilno RNA zaporedje (sgRNA) za rezanje tarčne dvoverižne DNA. Za lažjo uporabo v biotehnologiji so sistem spremenili tako, da so molekuli crRNA in tracrRNA spojili v eno samo molekulo (sgRNA) (Jinek in sod., 2014). Vodilna RNA je sestavljena iz kratkega zaporedja (okvirno 20 bp), ki usmerja nastali kompleks do tarčnega specifičnega genskega lokusa. CrRNA se pari s transaktivacijsko crRNA (tracrRNA). CrRNA in tracrRNA tvorita strukturo, ki veže Cas9 nukleazo. Vezava Cas9 proteina se zgodi če se v bližini tarčne DNA verige nahaja tudi zaporedje sosednjih palindromskih motivov (PAM). PAMs so zelo kratke sekvence od 3 do 7 nukleotidov. Najbolj razširjen sistem Cas9 (iz bakterije rodu *Streptococcus pyogenes*) prepoznava zaporedje *NGG* za svoje PAM zaporedje. V primeru kadar se zaporedji sgRNA in DNA ujemata nastane dvojni prelom na DNA (Doudna in Charpentier, 2014) .

Proces pridobivanja odpornosti bakterij s CRISPR /Cas9 mehanizmom se deli v tri faze (Rath in sod., 2015).

- Prva faza, imenovana adaptacija, zajema insercijo novih distančnikov (protospacer) – kratka zaporedja tuje DNA, ki se procesirajo s pomočjo Cas encimov in vgradijo v lokus CRISPR.
- Druga faza –Faza izražanja, v njej prihaja do prepisovanja CRISPR lokusa in procesiranja RNA. To pomeni, da se pre-crRNA spremeni v zrelo crRNA.
- Faza interference, pride do prepoznave ter rezanja tarčnega zaporedja z delovanjem ribonukleoproteinskega (RNP) kompleksa.

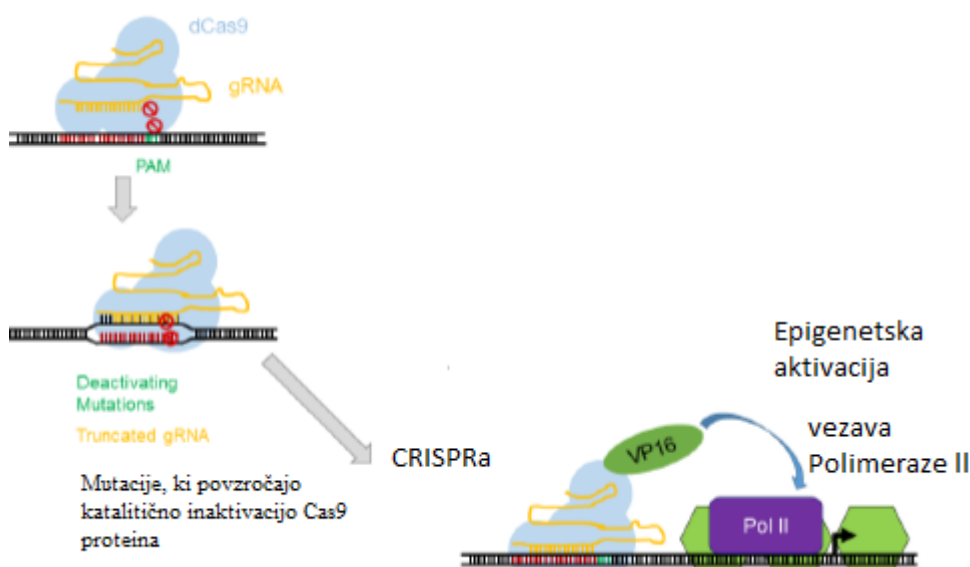


Slika 3 : Ključne faze pridobivanja odpornosti proti tuji DNA pri bakterije (Rath in sod., 2015)

3.1.1 Regulacija genov z uporabo CRISPR/dCas

V raziskavah so ugotovili, da lahko z dCas9 efektorji uravnavajo izražanje razvojno pomembnih genov, kar lahko vpliva na status diferenciacije celic. Ta sistem ponuja platformo za raziskovanje osnovnih regulatorjev, ki urejajo pomembne dogodke pri diferenciaciji (Kearns in sod., 2014).

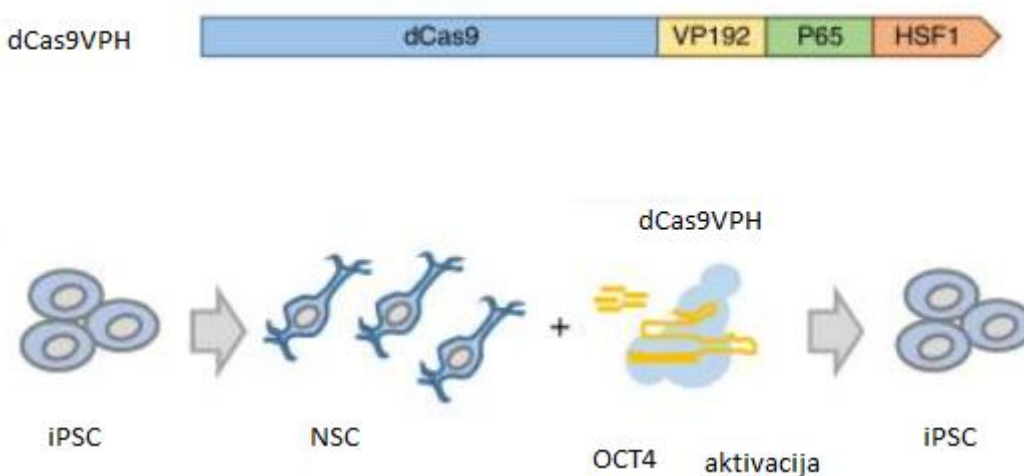
dCas9 protein deluje specifično in omogoča regulacijo več genov hkrati, z uporabo več različnih sgRNA. Za razliko od trajnih genetskih sprememb, ki jih povzroča nukleaza Cas9, je utišanje ali aktivacija genov z uporabo CRISPR/dCas9 reverzibilna (Dominguez in sod., 2016). Protein Cas9 vsebuje dve nukleazni domeni, HNH in RuvC in vsaka povzroča prelom na eni od dveh DNA verig, s čimer nastane dvojni prelom. S povzročitvijo točkovnih mutacij v obeh katalitičnih domenah proteina Cas9 dosežemo preoblikovanje Cas9 proteina v neaktivno obliko (dCas9). Fuzijo dCas9 s transaktivacijskimi domenami se lahko uporabi bodisi za epigenetske modifikacije ciljne regije bodisi za regulacijo delovanja RNA polimeraze II in aktivacijo ali supresijo prepisovanja.



Slika 4: Osnovni princip regulacije preprisovanja genov z aktivatorjem CRISPR (Weltner in sod., 2017).

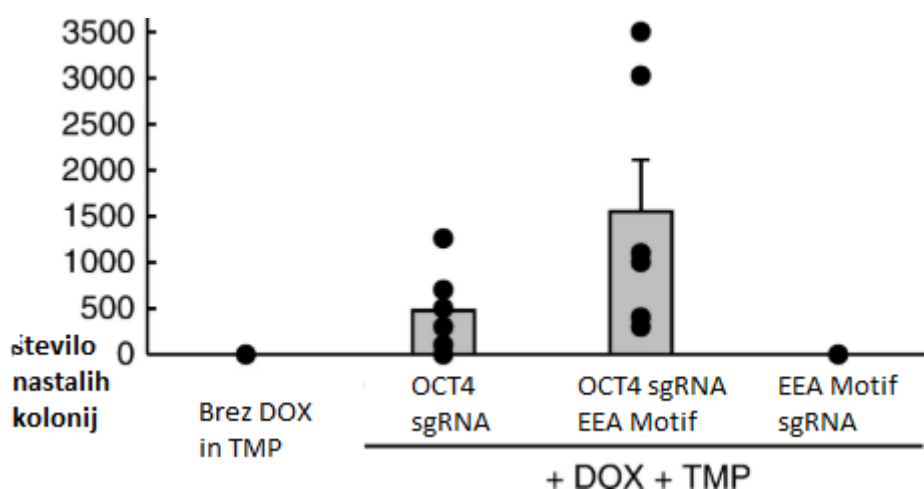
3.1.2 Primeri uspešne uporabe metode CRISPRa pri reprogramiranja celic

Reprogramiranje jedra somatskih celic so izvedli Weltner in sod., s ciljanjem na OCT4 in SOX2 promotorja ter hkratnim delovanjem na EEA (Enriched Alu-Motif) motiv s CRISPRa. EEA motiv je nameščen v ohranjenem levem kraku elementa Alu. Alu elementi so med najpogostejšimi človeškimi zaporedji t.i SINE(short interspersed nuclear elements), z več kot milijon kopij v človeškem genomu. Na EEA motiv so delovali, ker so Alu elementi pogosto vključeni v različne oblike regulacije izražanja zgodnih embionalnih genov, vključno z alternativnim spajanjem, urejanjem RNA in nadzorom prevajanja. S CRISPRa so uspeli uspešno aktivirati POU5F1 znan tudi kot OCT4 (ki naj bi imel ključno vlogo pri samoobnavljanju nediferenciranih embrionalnih matičnih celic in se kot takšen pogosto uporablja kot označevalec za nediferencirane celice) (Weltner in sod., 2017).



Slika 5 : Prikaz konstrukta , uporabljenega za reprogramiranje NSC (Weltner in sod., 2017).

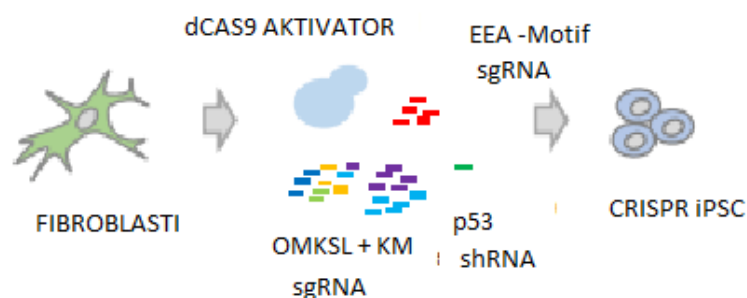
Da bi dobili večjo kontrolo nad reprogramiranjem s CRISPRa so uporabili inducibilni sistem. Cas9 protein so vstavili pod promotor, ki se inducira z doksiciklinom (DOX) in trimetoprimom (TMP). Plazmid dCas9 (DDdCas9), je imel pripojene jedrne domene VP192, P65-HSF1 in P300 aktivatorske domena23 (DDdCas9VPH). Da bi ugotovili, če ciljanje na EEA – motiva pripomore k izboljšanju reprogramiranja NSC (Neural stem cells) celic s CRISPRa, so oblikovali set iz petih sgRNA, ki prepoznava tarčo na konsenzus zaporedju EEA, dolgem 36 bp. Rezultati prikazani na sliki 6, kažejo da so z delovanjem na EEA motiv in OCT4 promotor uspeli reprogramirati veliko večje število celic kot samo z aktivacijo OCT4.



Slika 6: Kvantifikacija iPSCs kolonij, pozitivnih na alkalno fosfatazo, pridobljenih iz NSC (We1tner in sod., 2017).

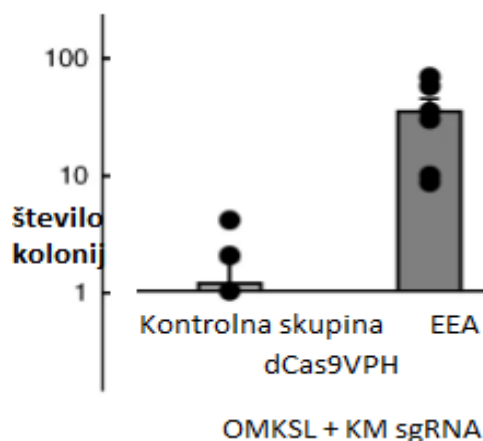
Za izdelavo in optimizacijo sistema za reprogramiranje fibroblastov in HEK celic, ki temelji izključno na CRISPRa, so preizkusili različne sgRNA, ki ciljajo regulatorne regije na OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC in LIN28A (OMKSL). Različne sgRNA so vstavili v en sam plazmid in testirali v HEK293 celični liniji in človeških fibroblastih (HFF-Human Foreskin Fibroblasts). Zaznana je bila močna aktivacija vseh tarčnih genov v HEK293, medtem ko je bila pri HFF opažena močna aktivacija OCT4 in SOX2, pri ostalih tarčnih transkripcijskih faktorjev pa ne, kar kaže na potrebo po uporabi alternativnih zaporedij sgRNA za aktivacijo KLF4, LIN28A in MYC (We1tner in sod., 2017).

Metodologija je temeljila na elektroporaciji celic z episomalnim replicirajočim plazmidom dCas9VPH, v kombinaciji z različnimi elementi prikazani na sliki 8, s čimer so dosegli nastanek iPSC-podobnih kolonij. Nastale kolonije se lahko razvijejo v iPSC linije, ki izražajo značilne označevalce pluripotencnosti in se diferencirajo v tri zarodne plasti *in vitro* in *in vivo*. Te iPSC linije, pridobljene s CRISPRa, imajo normalen kariotip, ter nespremenjen genom (We1tner in sod., 2017).



Slika 7 : Shematski prikaz reprogramiranja kožnih fibroblastov z aktivatorji dCas9 (Weitner in sod., 2017).

V raziskavo so ugotovili da s ciljanjem na EEA motiv verjetno učinkujemo na razvijanje lokalnega kromatina, kar spodbuja aktivacijo faktorjev pluripotentnosti. Možno je tudi, da se dCas9 direktno veže na EEA motiva in tako moti stranske represorske dejavnike pri vezavi in s tem ovira njihovo funkcijo. Iz slike 9 je razvidno, da je število nastalih kolonij večje v primeru, kjer so ciljali tudi na EEA motiva za razliko od kontrolne skupine, kjer niso (Weitner in sod., 2017).

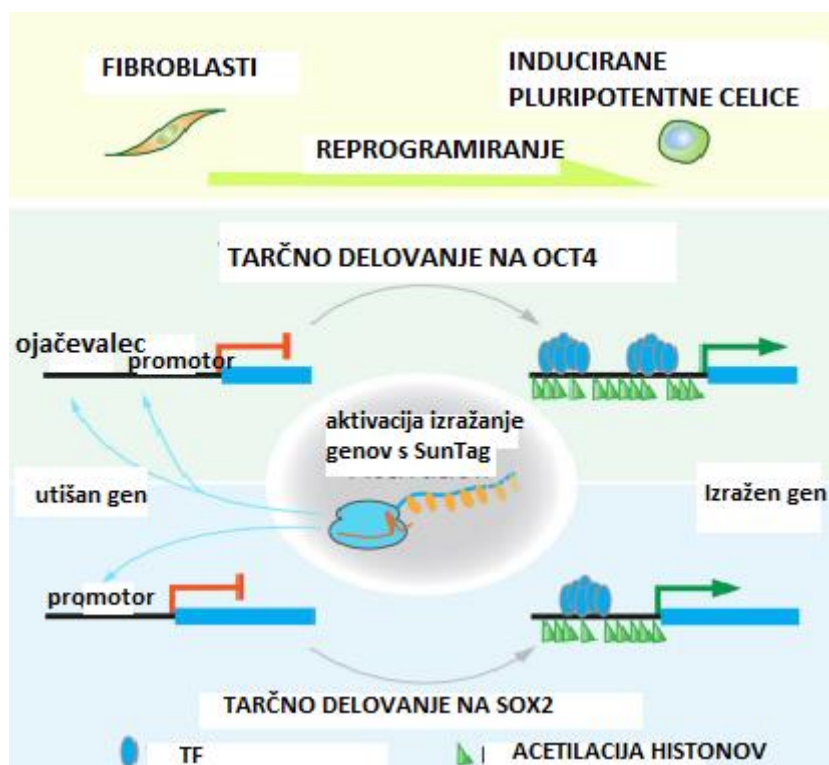


Slika 8: Prikaz vpliva domen VP192 in VPH ter ciljanja motiva EAA na HFF celic s CRISPRa (Weitner in sod., 2017).

Tudi Liu in sodelavci so pokazali da se lahko pluripotenca inducira izključno z aktivacijo endogenih genov OCT4 ali SOX2, na način da s CRISPR aktivatorji epigenetsko preoblikujejo promotor. Posledično so v fibroblastih dosegli aktivacijo OCT4 in SOX2 iz latentnega stanja, in pridobili pluripotentne celice (Liu in sod., 2018).

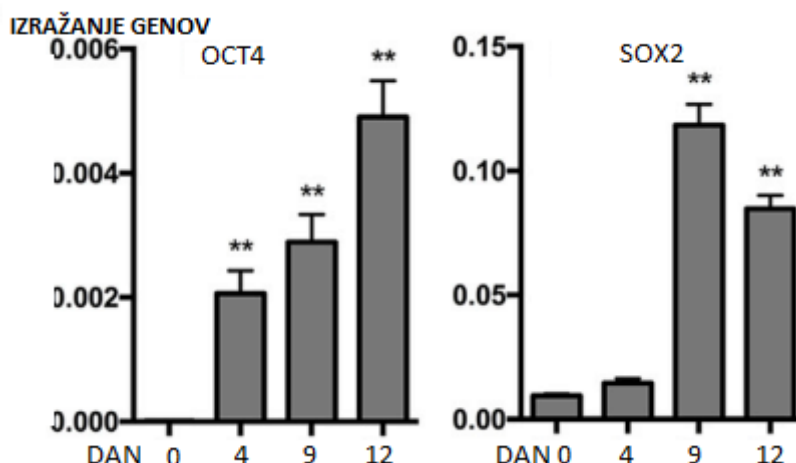
Za namen te študije so uporabili sistem imenovan »SunTag« z inducibilnim (Tet-ON) promotorjem. SunTag sistem je bil prvotno razvit za ojačitev signala v fluorescenčni mikroskopiji. Gre za polipeptidno mrežo pripojeno na dCas9, na katero lahko vežemo različne efektorske molekule, spojene s protitelesi, ki se vežejo na polipeptidno verigo. Ker se je sistem izkazal kot učinkovit je našel uporabo tudi kot sistem za aktiviranje prepisovanja na katerega lahko vežemo več faktorjev potrebnih za prepisovanje genov. Za usmerjanje proteina dCas9 do svojega ciljnega gena sistem dCas9 SunTag uporablja sgRNA. (Tanenbaum in sod., 2014)

Uporabli so različne sgRNA, ki so ciljale na različna mesta regulatornih regij OCT4 in SOX2. Po 4 dnevni, indukciji dCas9 proteina z doksiciklinom, so zaznali približno 100-kratno povečanje prepisovanja OCT4 gena. Ciljanje ojačevalca je povzročilo nizko aktivacijo, zadostno za povečanje učinkovitosti pri indukciji pluripotence. Za SOX2 promotor, je bilo zaznano približno 15-kratno povečanje izražanja. To kaže, da s specifičnimi sgRNA in dCas9-SunTag-VP64 sistemom lahko aktiviramo utišana endogena OCT4 in SOX2 v MEF(Mišji embrionalni fibroblasti) (Liu in sod., 2018).



Slika 9 : Shematski prikaz reprogramiranja fibroblastov v iPSCs, z aktivacijo Oct4 in Sox2, s SunTag aktivacijskega sistema (Liu in sod., 2018).

Da bi ugotovili ali lahko reprogramiranje celic dosežemo z aktivacijo več različnih genov kot so KLF4, c-MYC, NR5A2, GLIS1 in CEBPA, so skonstruirali več različnih sgRNA za vsakega od promotorjev in po transdukciji z dCas9-sunTag-VP64 in mešanico sgRNA, opazili zeleno fluorescenco reporterskega fluorescenčnega proteina (eGFP –molekula uporabljena kot označevalec, ki oddaja fluorescenčno zeleno svetlobo pod mikroskopom. Pritrjena je tik za promotorjem za OCT4 in se izraža kadar je tarčni gen aktiven) signal, ki kaže na visoko stopnjo prepisovanja endogenega OCT4, medtem ko za ostale TF niso opazili značilnega povečanja izražanja. EGFP pozitivne kolonije so uporabili za razvoj CRISPR iPSC linij, ki so formirale značilne mišje embrionalne celice. Ti podatki kažejo da sta OCT4 in SOX2 glavna dejavnika reprogramiranja in natančno remodeliranje teh genskih lokusov je ključno za reprogramiranje celic (Liu in sod., 2018)



Slika 10: Endogena transkripcija OCT4 in SOX2 tekem 12 dni (Liu in sod., 2018).

3.1.2.1 Transdiferenciacije celic z uporabo transaktivacijskih proteinov pripojenih na dCas9

dCas9 lahko s pomočjo pripojenih transaktivacijskih proteinov regulira povečano izražanje naravno utišanih genov, na tak način da pripojeni efektorski proteini pripomorejo k odvijanju kompleksne kromatinske strukture in vežejo transkripcijske komplekse pomembne za začetek prepisovanja (Perez-Pinera in sod., 2013). Chakraborty in sodelovci (2014) so uporabili dCas9, spojen z transaktivacijskim proteinom VP64, za povečano izražanje gena *Myod1* v fibroblastih za pretvorbo v skeletne miocite. Znano je, da *Myod1* sproži postopek transdiferenciacije, ki povzroči diferenciacijo fibroblastov v skeletne miocite in ne povzroči, regulacije drugih označevalcev za skeletne miocite (Chakraborty in sod., 2014).

Transaktivacijski proteini imajo DNA-vezavno domeno in aktivacijsko domeno. Aktivacijska domena lahko veže splošne transkripcijske dejavnike ali RNA polimerazo (Jun, 2011). Običajno so na dCas9 pripojeni proteini ali kombinacije različnih proteinov, kot so VP64-p65-Rta (VPR), histonske acetiltransferaze (HAT), sinergistični aktivacijski mediatorji (SAMs)- VP64

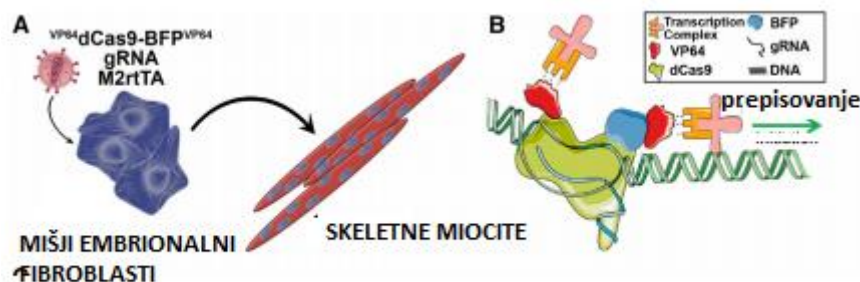
- HAT, kot so p300 in CREB-vezani proteini, so encimi, ki lahko acetilirajo ostanke lizina na histonih. Pri acetilaciji se odstrani pozitiven naboj na histonih, s čimer se zniža interakcija med N terminalnim delom histonov in negativno nabitimi fosfatnimi skupinami na DNA, zaradi tega se DNA, ovita okoli histonov, zrahlja. Fuzija med dCas9 in HAT povzroča odvitje DNA, povečanje acetilacije histonov in omogoči vezavo TF na promotorske regije kar poveča izražanje gena (Hilton in sod., 2015).
- V fuzijskem proteinu dCas9-VPR, je protein VP64 (to je transaktivacijska domena, ki veže transkripcijske dejavnike in tako pomaga kompleksu dCas9 regulirati izražanje tarčnega gena) vezan na C koncu dCas9 nukleaze. Dodatna fuzija p65 in

Rta na C koncu Vp64 proteina poveča izražanje ciljnih genov (Zhang in sod., 2015).

- CRISPR / Cas9 sinergistični aktivacijski posrednik (SAM) je proteinski kompleks za transkripcijsko aktivacijo endogenih genov. Sestavljen je iz treh komponent:
 1. Cas9-VP64
 2. sgRNA, ki vsebuje dva aptamerja (oligonukleotidne ali peptidne molekule, ki se vežejo na določeno ciljno molekulo) MS2 RNA
 3. Pomožni proteini za aktiviranje MS2-P65-HSF1, ki vežejo široko paleto transkripcijskih faktorjev. Vpleteni transkripcijski faktorji delujejo sinergistično pri aktivaciji tarčnega gena (Koneremann in sod., 2015).

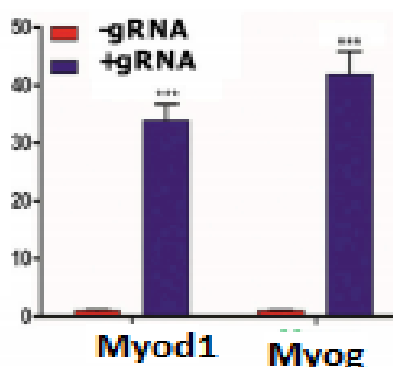
3.1.2.2 Primer transdiferenciacije celic s CRISPR/dCas sistemom.

Chakraborty in sodelovci so v svoji študiji uporabili dCas9 transaktivatorje v kombinaciji z lentivirusnim sistemom za dostavo transkripcijskih faktorjev. Testirali so učinkovitost dCas9-VP64(VP64dCas9-BFPVP64) fuzijskega proteina za aktivacijo izražanja endogenega gena Myod1, ki bi omogočilo transdiferenciacijo mišjih embrionalnih fibroblastov(MEF) v skeletne miocite (SkM) (Chakraborty in sod., 2014).



Slika 11 : Ilustracija, ki prikazuje transdiferenciacije MEF v SkM, z lentivirusno transdukcijo MEF z gRNA, povratni tetraciklinski aktivator (M2rtTA) in doksiciklin, induciran VdC9BV (Chakraborty in sod.,2014).

V študiji so oblikovali tri različne sgRNA, ki imajo za tarčo različne pozicije v bližini mesta, začetka prepisovanja Myod1 gena. Opazili so, da je aktivacija endogenega gena Myod1 v C3H10T1 / 2 celični liniji zadoščala za transdiferenciacijo v SkM, kar je bilo potrjeno z analizo genskega izražanja, faznim kontrastnim slikanjem in imunocitokemijo. Miotubuli (razvojna stopnja mišičnega vlakna, sestavljena iz sincicija, ki se tvori z fuzijo mioblastov) so bili vidni že štiri do pet dni po transdukciji in so bili pozitivni na značilne skeletne označevalce (TF, MYOD1 in MYOG ter sarkomerne proteine aktinin, desmin, težka veriga miozina in titina). Ta študija je eden prvih primerov, ki kaže, da je s CRISPR / Cas9 možno povečati izražanje genov pomebnih pri transdiferenciaciji (Chakraborty in sod., 2014).



Slika 12 : Reprogramiranje celic C3H10T1 / 2 s VdC9BV opaženo je značilno znatno višji nivoji mRNA Myod1 in Myog s qRT-PCR detekcijo 18. dne po transdukciji (Chakraborty in sod.,2014).

V literaturi smo našli tudi druge primere uspešne transdiferenciacije celic, z uporabo sistema CRISPR/dCas9 (Preglednica1).

Preglednica 1 : Primeri študij na področju reprogramiranja in transdiferenciacije celic s CRISPRa.

Način vnosa (ekspresijski sistemi)	Tarčni gen(i)	Začetni celični tip	Končni celični tip	Uporabljen sistem za reprogramiranje/transdiferenciacije	Referenca
Lentivirusni vektor	Brn2, Ascl1 in Myt11 (BAM dejavniki)	Primarni mišji embrionalni fibroblasti	Inducirane nevrnske celice	transaktivator z N-terminalnim in C-terminalom VP64 transaktivacijske domene (VP64dCas9VP64)	Black in sod., 2016
Lentivirusni vektor	NR5A1, GATA4 in DMRT1	Primarni človeški fibroblasti (Human Foreskin Fibroblasts)	Inducirane Lajdigove celice	dCas9-VP64 in sinergistični aktivacijski posrednik (SAM)	Huang in sod., 2019
Lentivirusni vektor	Ektodisplasin (EDA)-rastni dejavnik pomemben za razvoj znojnih žlez	Mezenhimske matične celice iz kostnega mozga (BM- MSC)	Inducirane celice znojnih žlez	dCas9 –E sestavljen iz: dCas9 pripojena na VP16 tetramerno aktivacijsko domeno; (VP64) pod nadzorom doksiciklina (Dox)	Sun in sod., 2018
Lentivirusni vektor	MIAT, NEUROD1, ASCL1 in RHOXF2	Ipsc	Inducirane nevrnske celice	VP64-p65-Rta (VPR) pripet na dCas9	Chavez in sod., 2015

3.1.3 Pomankljivosti sistema CRISPR

Čeprav se domneva, da je specifičnost ciljanja Cas9 natančno nadzorovana z 20-nt vodilnim zaporedjem sgRNA in prisotnostjo PAM-a, ki se mora nahajati v bližini tarčne sekvence v genomu, se pri uporabi metode vseeno lahko pojavljajo izven-tarčni učinki («off-target effects»). Izven-tarčni učinki predstavljajo enega največjih izzivov (Roy in sod., 2018) pri uporabi tehnologije CRISPR/Cas. Težave, ki se pojavljajo pri regulaciji genov s Cas9, v primeru dCas9, niso povezane z nastankom dvojnih prelomov na ne-tarčnih mestih, ampak z indukcijo aktivacije oziroma utišanjem ne-tarčnih genov.

Največja težava, pri reprogramiranju celic, je da še vedno ni jasno kateri dogodki pri remodeliranju kromatina vodijo k dediferenciaciji celic in pluripotenci. Zaenkrat še ni jasno ali je za uspešen potek reprogramiranja potrebno sočasno preoblikovanje velikega števila lokusov povezanih s pluripotenco, ali je remodeliranje enega samega lokusa zadostno za induciranje iPSC (Soufi in sod., 2012). Eepigenetsko preoblikovanje je osrednji mehanizem celičnega reprogramiranja (Smith in sod., 2016), vendar ni bilo ugotovljeno, ali indukcijo iPSC lahko sprožimo z epigenetsko manipulacijo samo s dosedanjimi definiranimi TF. Zaradi tega znanstveniki v CRISPRa sistemu vidijo močno orodje za raziskave utišanih kromatinskih lokusov ter spodbujanje ali zaviranje regulacijskih elementov (Polstein in Gerbach, 2015).

4 ZAKLJUČEK

CRISPR aktivatorski pristopi imajo velik potencial za nadzor izražanja genov v celicah. Visoka specifičnost sistema omogoča hkratno ciljanje velikega števila kontrolnih elementov v tarčnih endogenih genih, s prilagajanjem kratkih vodilnih RNA molekul. Ta vrsta pristopa, omogoča vpliv na genske regulatorne mreže za nadzor celične usode. Sistem, ki ne spreminja genoma celic, lahko pripomore k širši uporabnosti iPSCs ali transdiferenciranih celic. To bo v prihodnosti povečalo možnosti za odkrivanje vzročnih mehanizmov nastanka bolezni in uporabo celic za namene regenerativne medicine, s čimer bi dosegli hitrejši znanstveni napredek ter, v primeru učinkovite uporabe celic za namene regenerativne medicine, izboljšanje kvalitete življenja.

5 VIRI

- Andargie A., Tadesse F., Shibbiru T. 2016. Review on cell reprogramming: methods and applications. *Journal of Medicine, Physiology and Biophysics*, 25: 83-91
- Biehl J.K., Russell B. 2009. Introduction to stem cell therapy. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 24, 2: 98–105
- Black J.B., Adler A.F., Wang H.G., D'Ippolito A. M., Hutchinson H. A., Reddy T. E., Pitt G.S., Leong W.K., Gersbach C.A. 2016. Targeted Epigenetic Remodeling of

- Endogenous Loci by CRISPR/Cas9-Based Transcriptional Activators Directly Converts Fibroblasts to Neuronal Cells. *Cell Stem Cell*, 19, 3: 406–414
- Chakraborty S., Ji H., Kabadi A.M., Gersbach C.A., Christoforou N., Leong K.W. 2014. A CRISPR/Cas9-based system for reprogramming cell lineage specification. *Stem Cell Reports*, 3, 6: 940–947
- Chavez A., Scheiman J., Vora S., Pruitt B.W., Tuttle M., Iyer E, Lin S., Kiani S., Guzman C.D, Wiegand D.J., Ter-Ovanesyan D., Braff J.L., Davidsohn N., Housden B.E., Perrimon N., Weiss R., Aach J., Collins J.J., Church G.M., 2015. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nature Methods*, 12, 4: 326-8
- Doudna, J. A., Charpentier E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, 6213: 1258096–1258096
- Doetschman T., Georgieva T. 2017. Gene Editing With CRISPR/Cas9 RNA-Directed Nuclease. *Circulation Research*, 3, 120, 5:876-894
- Dominguez A., Lim W., Qi L. 2016. Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17: 5–15
- Grath A, Dai G. 2019. Direct cell reprogramming for tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Biological Engineering*, 13, 14, doi:10.1186/s13036-019-0144-9: 15 str.
- 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
- Huang H., Zou X., Zhong L., Hou Y., Zhou J., Zhang Z., Xing X., Sun J. J. 2019 CRISPR/dCas9-mediated activation of multiple endogenous target genes directly converts human foreskin fibroblasts into Leydig-like cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23, 9: 6072-6084
- Jinek M., Jiang F., Taylor D.W., Sternberg S.H., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A.T., Charpentier E., Nogales E., Doudna J.A. 2014. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343, 6176: 1247997
- Jun M. 2011. Transcriptional activators and activation mechanisms. *Protein Cell*, 2, 11: 879–888
- Kearns N., Genga R., Enuameh M. , Garber M. , Wolfe S. , Maehr R. 2014. Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells *The Company of Biologists*, 141: 219-223
- Kim D, Kim C.H., Moon J.I., Chung Y.G., Chang M.Y., Han B.S., Ko S., Yang E., Cha K,Y., Lanza R., Kim K.S. 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 4,6: 472–476
- Liu P., Chen M., Liu Y., Qi L. S., Ding S. 2018. CRISPR-Based Chromatin Remodeling of the Endogenous Oct4 or Sox2 Locus Enables Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 22: 252–261

- Malik N., Rao M.S. 2013. A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods in Molecular Biology*, 997: 23–33
- Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochiduki Y., Takizawa N., Yamanaka S. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology*, 26: 101–106
- 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
- Polstein L.R., Gersbach C.A. 2015. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nature Chemical Biology*, 11, 3: 198–200
- Polo J. M., Anderssen E., Walsh R.M., Schwarz B.A., Nefzger C.M., Lim S.M., Borkent M., Apostolou E., Alaei S., Cloutier J., Bar-Nur O., Cheloufi S., Stadtfeld M., Figueroa M.E., Robinton D., Natesan S., Melnick A., Zhu J., Ramaswamy S., Hochedlinger K. 2012. A Molecular Roadmap of Reprogramming Somatic Cells into iPS Cells. *Cell*, 151: 1617–1632
- Rath D., Amlinger L., Rath A., Lundgren M. 2015. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117: 119-128
- Roy B., Zhao J., Yang C., Luo W., Xiong T., Li Y., Fang X., Gao G., Singh C.O., Zhou Y., Kristiansen K., Madsen L. 2018. CRISPR/Cascade 9-Mediated Genome Editing- Challenges and Opportunities. *Frontiers in Genetics*, 9: 240
- Rosbach M., Hadenfeld M., Brüstle O. 2011. Industrial applications of stem cells. V: Translational stem cell research. stem cell biology and regenerative medicine. Hug K., Hermerén G. (ur.). Totowa, The Humana Press.
- Rožman P., Jež M. 2010. Matične celice in napredno zdravljenje (napredno zdravljenje s celicami, genska terapija in tkivno inženirstvo) – Pojmovnik. Ljubljana, DCTIS – Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije.
http://www.dctis.si/wpcontent/uploads/2014/02/SC_slovarcek_SLO20.pdf (04.09.2017)
- Shen C.N., Burke Z.D., Toshi D. 2004. Transdifferentiation, metaplasia and tissue regeneration. *Organogenesis*, 1, 2: 36–44
- Sobhani A., Khanlarkhani N., Baazm M., Mohammadzadeh F., Najafi A., Mehdinejadi S., Sargolzaei A. F. 2017. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Medica Iranica*, 55, 1: 6-23
- Soufi A., Donahue G., Zaret K.S. 2012. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell*, 151, 5: 994–1004
- Smith Z. D., Sindhu C., Meissner A. 2016. Molecular features of cellular reprogramming and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 3: 139–154
- Sun S., Xiao J., Huo J., Geng Z., Ma K., Sun X., Fu X. 2018. Targeting ectodysplasin promoter by CRISPR/dCas9-effector effectively induces the reprogramming of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into sweat gland-like cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 9, 1: 8, doi: 10.1186/s13287-017-0758-0: 10 str.

- Takahashi K. 2014. Cellular reprogramming. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 6, 2: a018606, doi:10.1101/cshperspect.a018606: 2 str.
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of Pluripotent Stem cells from Mouse Embryonic and adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell, 126, 4: 663-76
- Tanenbaum M.E., Gilbert L.A., Qi L., Weissman J.S., Vale R.D. 2014. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. Cell, 59, 3: 635–646
- Wilmot I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 385, 6619: 810-3
- Weltner J., Balboa D., Katayama S., Bernal M., Krjutškov K., Jouhilahti E. M., Trokovic R., Kere J., Otonkoski T. 2018. Human pluripotent reprogramming with CRISPR activators. Nature Communications, 9, 1: 2643
- Yakubov E., Rechavi G., Rozenblatt Sh., Givol D. 2010. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. Elsevier, 26, 394: 189-93
- Zhang Y., Yin C., Zhang T., Li F., Yang W., Kaminski R., Fagan P.R., Putatunda R., Young W.B., Khalili K., Hu W. 2015. CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. Scientific Reports, 5: 16277, doi: 10.1038/srep16277: 14 str.

ZAHVALA

Najprej se želim zahvaliti svoji družini, staršem in sestri ter vsem prijateljem za njihovo podporo in potrpežljivost v času študija in tekom izdelave diplomske naloge.
Zahvala tudi mentorju doc.Jernej Ogorevc za pomoč in navodila tekom izdelave naloge.