

Korištenje CRISPR/Cas9 metode za inaktivaciju tirozil-DNA fosfodiesteraze 1 (TDP1) u zebrici (*Danio rerio*)

Dubović, Arijana

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:680098>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Biotehnologija

Arijana Dubović

7709/BT

**Korištenje CRISPR/Cas9 metode za
inaktivaciju tirozil-DNA fosfodiesteraze 1
(Tdp1) u zebrici (*Danio rerio*)**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija 1

Mentor: Doc. dr. sc. Igor Stuparević

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Korištenje CRISPR/Cas9 metode za inaktivaciju tirozil-DNA fosfodiesteraze 1 (TDP1) u zebrici (*Danio rerio*)

Arijana Dubović 0058213873

Sažetak: Tirozil-DNA fosfodiesteraza 1 (Tdp1) enzim je čija je *in vivo* uloga slabo istražena. Do sada je potvrđeno da Tdp1 *in vivo* sudjeluje u popravku kovalentno vezanih DNA-topoizomeraza 1 (Top1cc) oštećenja. Međutim, potrebno je prikupiti više informacija o regulaciji, međudjelovanju s drugim putevima popravka te postojanju dodatnih supstrata za Tdp1. Top1cc oštećenje za stanicu je često letalno i danas se intenzivno istražuju citostatici koji, inducirajući nakupljanje Top1cc sprječavaju širenje tumorskih stanica. Za uspješan razvoj ovih lijekova bitno je razumjeti način djelovanja Tdp1 enzima kako bi se mogao minimizirati efekt popravka induciranih oštećenja. Razumijevanje funkcije Tdp1 enzima bio bi veliki korak i za liječenje SCAN1 poremećaja uzrokovanog mutacijama u genu za Tdp1. Cilj ovog rada omogućiti je daljnja istraživanja Tdp1 enzima *in vivo* u čiju je svrhu sintetizirana RNA vodilja koja će se koristiti za inaktivaciju Tdp1 CRISPR/Cas9 metodom u zebrici (*Danio rerio*).

Ključne riječi: CRISPR/Cas9, *Danio rerio*, DPC, Top1cc, Tdp1

Rad sadrži: 35 stranica, 10 slika, 7 tablica, 61 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Doc. dr. sc. Igor Stuparević

Pomoć pri izradi: dr. sc. Marta Popović

Datum obrane: 10. srpnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Using CRISPR/Cas9 method for Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inactivation in zebrafish (*Danio rerio*)

Arijana Dubović 0058213873

Abstract: Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1) is an enzyme whose function in vivo is poorly understood. It's proven that Tdp1 plays a role in DNA-topoisomerase1 (Top1cc) crosslink repair in vivo. Yet more information is needed on regulation, interplay with other repair pathways and identification of additional substrate. Top1cc occurrence is often deadly for cells, and intensive research is done nowadays to develop cytostatic medications which induce this type of damage to fight cancer cells. For a successful drug development, Tdp1 function should be well understood to minimise the repair of deliberately induced Top1ccs. In addition, understanding the Tdp1 function would make a big step forward in treating SCAN1 disorder which is caused by mutations in tdp1 gene. This bachelor thesis has a purpose to enable further research on Tdp1 by creating a single guide RNA which will be used for a tdp1 gene knock-out using CRISPR/Cas9 method in zebrafish (*Danio rerio*).

Keywords: CRISPR/Cas9, *Danio rerio*, DPC, Tdp1, TOP1cc

Thesis contains: 35 pages, 10 figures, 7 tables, 61 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Doc. dr. sc. Igor Stuparević

Technical support and assistance: dr. sc. Marta Popović

Defence date: July 10th 2020

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1 Oštećenje DNA	2
2.2 Unakrsno vezanje DNA-protein (eng. <i>DNA-protein crosslink</i> ; DPC)	4
2.3 Putevi popravka DNA-protein unakrsnih vezanja (eng. <i>DNA-protein crosslinks</i> , DPCs)	5
2.4 Uloga tirozil-DNA fosfodiesteraze 1 (Tdp1) u popravku DNA-protein unakrsnih vezanja (eng. <i>DNA-protein crosslinks</i> , DPCs)	8
2.5 Zebrica (<i>Danio rerio</i>) kao modelni organizam	13
2.6 CRISPR/Cas9 sustav u modifikaciji genoma	14
3. Materijali i metode	17
3.1 Materijali	17
3.1.1 Kemikalije i enzimi	17
3.1.2 Otopine	18
3.1.3 Plazmid	18
3.1.4 Oligonukleotidi	18
3.2 Metode	19
3.2.1 <i>In silico</i> dizajn RNA vodilje (sgRNA) i početnica	19
3.2.2 Sinteza DNA kalupa	21
3.2.3 Pročišćavanje DNA	22
3.2.4 Provjera kvalitete i integriteta DNA i RNA (elektroforeza)	22
3.2.5 <i>In vitro</i> transkripcija	23
3.2.6 Pročišćavanje RNA	24
4. Rezultati i rasprava	25
5. Zaključak	31
6. Popis literature	32

1.Uvod

DNA-protein unakrsna vezanja (eng. *DPC-protein crosslinks*, DPCs) su DNA oštećenja, koja uzrokovana endogenim (reaktivni međuproducti metabolizma) i egzogenim (ionizirajuće UV zračenje i lijekovi) čimbenicima, narušavaju helikalnu strukturu dvostruke uzvojnice. Narušavanjem DNA strukture, DPC-i ometaju prirodne DNA procese uključujući transkripciju, replikaciju, interakciju sa regulatornim proteinima, formiranje kromatina i puteve DNA popravka (1). Ukoliko stanica ne uspije razriješiti ovo oštećenje moguće su pojave mutacija ili smrt stanice što nadalje vodi prema razvoju različitih bolesti ili tumora (1). Iz tog razloga ciljano izazivanje stanične smrti nakupljanjem DPC-a razmatra se kao efikasan način u borbi protiv tumorskih stanica. Na tržištu su već može naći kamptotecin, citostatik koji koristi spomenuti mehanizam u borbi protiv raka (2). Kako bi lijekovi bili što efikasniji potrebno je u isto vrijeme potaknuti nakupljanje DPC-ova i inaktivirati puteve popravka istog. Putevi popravka ovog oštećenja trenutno se intenzivno istražuju. Za sada je poznato da se oštećenje najčešće procesira u 2 koraka. Prvi korak tzv. *upstream processing* uvijek je isti i uključuje djelovanje proteaza koje degradiraju proteinsku jedinicu kako bi se omogućilo provođenje drugog koraka. Do sada otkrivene proteaze su SPRTN u višestaničnim organizmima i Wss1 u kvascu. Novootkrivena proteaza za čiju se ulogu još očekuje potvrda je ACRC ili GCNA (eng. *Acidic Repeat-Containing Protein* ili *Germ Cell Nuclear Acidic Peptidase*) u višim eukariotima. U drugom koraku tzv. *downstream processing* sudjeluju enzimi Tirozil-DNA fosfodiesteraze 1 i 2 (Tdp1 i Tdp2) (2–4). Tdp1 može hidrolizirati kovalentnu vezu između unakrsno vezanih Topoizomeraza1 enzima i DNA (eng. *Topoisomerase1-DNA cleavage complex*, Top1cc), Topoizomeraza2-DNA (eng. *Topoisomerase2-DNA cleavage complex*, Top2cc) i 3' fosfoglikolata ireverzibilno vezanih za DNA, dok Tdp2 može hidrolizirati kovalentnu vezu u Topcc2 i Topcc1. Međutim, potrebno je saznati još puno više o potencijalnim drugim supstratima za Tdp1 i Tdp2 enzime te o njihovoj konkretnoj ulozi *in vivo*. Poznata su još dva puta popravka DPC-ova, međutim nije potvrđeno djeluju li putevi popravka samostalno ili u kombinaciji sa SPRTN proteazom kao enzimi *downstream processinga*. Mre11 nukleaza (eng. *Meiotic recombination 11*) enzim je prvog puta popravka. *In vitro* je dokazano da može razrješavati DPC-ove izrezujući sekvencu DNA obuhvaćenu oštećenjem (5–7). Nukleotidni ekscizijski popravak (NER) drugi je otkriveni put popravka za koji je dokazano da može uklanjati manje DPC-ove gdje je proteinska sekvencu veličine oko 8-16 kDa (1,8,9).

U nabrojanim procesima popravka postoji još puno nepoznanica koje se trenutno istražuju. Neka od glavnih pitanja su način izbora puta popravka, mehanizam prepoznavanja DPC-a od strane SPRTN proteaze, raznovrsnost supstrata za pojedine enzime i načini regulacije pojedinih čimbenika u putu popravka (2,10). Razumijevanje puteva popravaka DPC-a doprinijeti će u borbi protiv različitih bolesti i tumora. Cilj ovog rada pobliže je opisati dosadašnja otkrića o DPC-ovima i putevima popravka istog s naglaskom na Tdp1 te provesti eksperimente koji omogućuje daljnja proučavanja funkcije Tdp1 u zebri kao modelnom organizmu koristeći CRISPR/Cas9 metodu.

2. Teorijski dio

2.1 Oštećenje DNA

Pod pojmom oštećenje DNA podrazumijeva se bilo kakvo odstupanje od uobičajene strukture DNA molekule. Svakodnevno nastaje više stotina tisuća oštećenja koja, ukoliko ostanu nepopravljena, mogu uzrokovati brojne tipove mutacija. Iako mutacije ponekad mogu biti uzrok pozitivnih promjena kao što su adaptacija, razvitak života i evolucija, one uzrokuju i negativne promjene koje dovode do različitih bolesti (11). Ovisno o tipu stanice, stadiju razvoja i diferencijacije, lokaciji i ranije nakupljenim oštećenjima, stanica na mutaciju može reagirati na tri načina. Ukoliko mutacija uzrokuje inaktivaciju tumor-supresora ili onkogeni, stanica će započeti sa nekontroliranim dijeljenjem odnosno razvojem tumora. Ishod mutacije koja uzrokuje inhibiciju osnovnih staničnih procesa, kao što su replikacija i transkripcija, najčešće je apoptoza. Obzirom da većina mutacija sama po sebi nije letalna, stanica ih može nakupljati te na taj način stari i s vremenom razvija različite bolesti (12).

Prema podrijetlu, DNA oštećenja svrstavaju se u dvije veće grupe: egzogena i endogena (Slika 1). Egzogena oštećenja su ona uzrokovana vanjskim čimbenicima poput ionizirajućih zračenja, UV zračenja, pesticida, farmaceutika i sl., dok su endogena oštećenja rezultat spontanijih događaja u stanici (11). Naime, prilikom uobičajenih metaboličkih reakcija nastaju različiti kemijski spojevi, koji ukoliko se nađu u blizini DNA, mogu sa istom na različite načine interferirati. Primjeri takvih spojeva su reaktivni kisik, reaktivni dušikovi spojevi, produkti lipidne oksidacije i sl. (12). Iako različitog podrijetla, nastala oštećenja uglavnom su slična te najčešće uključuju: jednolančane i dvolančane lomove, apurinska mjesta, kemijske modifikacije baza i deoksiriboze, intra i

interlančano povezivanje DNA te DNA-protein unakrsna vezanja (eng. *DNA-protein crosslinks*, DPCs) (13).

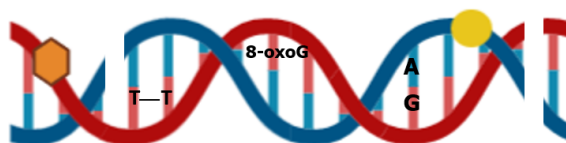
Kako bi opstala, unatoč brojnim oštećenjima, stanica je razvila različite mehanizme popravka kojima prepoznaje, signalizira i provodi popravak oštećenja. Najbolje proučeni mehanizmi popravka oštećenja, koji mogu djelovati samostalno ili u kombinaciji, su homologna rekombinacija, nehomologno sparivanje krajeva, bazni i nukleotidni ekscizijski popravak te popravak krivo sparenih baza (11) (Slika 1).

Nepravilnim radom i poteškoćama u djelovanju mehanizama popravka DNA nastaju brojna oštećenja i mutacije koje u konačnici dovode do različitih bolesti. Iz tog razloga vrlo je bitno razumjeti procese nastajanja i razrješavanja DNA oštećenja.

OŠTEĆENJA

ENDOGENA
stanični metabolizam
greške u replikaciji

EGZOGENA
UV/ionizirajuća
zračenja
kemijski agensi



Nukleotidni/bazni ekscizijski popravak
Homologna rekombinacija
Popravak DNA-protein unakrsnih vezanja
Popravak krivo sparenih baza

PUTEVI POPRAVKA OŠTEĆENJA

Slika 1. Shematski prikaz tipova oštećenja DNA i puteva popravka DNA oštećenja

(narančasta i žuta boja na DNA – DPC, T-T – primidinski dimer, 8-oxoG – 8-oksogvanin, m – alkilirana DNA, AG – pogrešno sparivanje baza, praznine na lancu - DNA lomovi) (Izrađeno u Biorender.com).

2.2 Unakrsno vezanje DNA-protein (eng. *DNA-protein crosslink; DPC*)

Budući da se proteini ubrajaju u najzastupljenije molekule u stanici, DNA-protein unakrsna vezanja (eng. DNA-protein crosslinks, DPCs) predstavljaju jedno od najčešćih i najopasnijih DNA oštećenja (14). Stimulirani različitim zračenjima, kemikalijama koje generiraju slobodne radikale, metalima i metalnim kompleksima te reaktivnim produktima staničnog metabolizma, različiti proteini mogu reagirati s DNA stvarajući DPC-ove. Zabilježeno je da netretirana stanica u ekspanzijskom rastu sadrži oko 6000 ovakvih oštećenja induciranih reaktivnim intermedijerima staničnog metabolizma (15,16). Ukoliko oštećenje opstane, zbog svoje glomaznosti predstavlja veliku prepreku za normalno provođenje replikacije i transkripcije te za stanicu može biti letalno ili uzrokovati teške poremećaje poput mutacija i drugih staničnih promjena koje u konačnici mogu dovesti do razvoja bolesti i tumora (17). DPC-i nastaju kao rezultat ireverzibilnog kovalentnog povezivanja DNA i raznih proteina, a proteini koji ulaze u kompleks obično su oni koji prirodno reagiraju s DNA odnosno proteini koji sudjeluju u formiranju i procesiranju kromatina, transkripciji, replikaciji, DNA popravku i sl. (1).

DPC-i se mogu podijeliti u dvije skupine: (1) enzimski i (2) opći ili tzv. ne-enzimski DPC-i. Enzimski DPC-i nastaju kada u toku uobičajenih reakcija dođe do nepravilnosti te enzim ostane ireverzibilno kovalentno vezan za DNA. Pojava nepravilnosti stimulirana je najčešće nekim drugim DNA oštećenjem koje se nalazi u blizini kao npr. apurinsko mjesto ili DNA adukt. Enzimi koji obično ulaze u kompleks uključuju topoizomerase, AP ligaze, DNA glikozilaze i sl. (18). Ne-enzimski DPC-i najčešće nastaju vezanjem nukleosomalnih proteina, prvenstveno histona, za vrijeme aktivne transkripcije kada je kromatin opušten, a DNA dostupnija (16). Iako DPC-ove uglavnom čine proteini usko vezani za procese na DNA, utjecajem slobodnih radikala može se aktivirati bilo koja molekula u neposrednoj blizini DNA. Tako su Guo i sur. 2018. godine pod utjecajem reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva na otopinu DNA i proteina detektirali nastajanje DNA-albumin kompleksa.

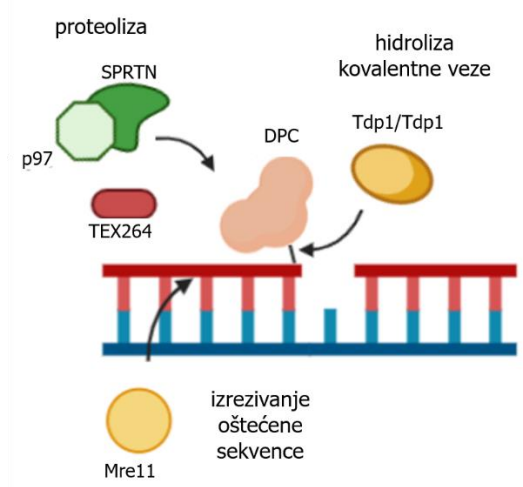
Zbog svoje raznovrsnosti i potencijalne opasnosti za ljudski organizam, DPC-ovi predstavljaju područje koje zahtijeva intenzivna istraživanja, a otkrićem različitih molekula koje promoviraju, ovo za stanicu najčešće letalno oštećenje, također predstavljaju i obećavajući mehanizam u borbi protiv tumora. Određeni lijekovi poput kamptotecina već su prisutni na tržištu i koriste se ovim

mehanizmom u borbi protiv različitih tumora (14). Kampotecin indukcijom Top1cc-a potiče apoptozu brzorastućih stanica tumora. Može se koristiti u liječenju različitih vrsta tumora, a u praksi se najčešće koristi za liječenje tumora u kolorektalnom području (2).

2.3 Putevi popravka DNA-protein unakrsnih vezanja (eng. *DNA-protein crosslinks, DPCs*)

DNA-protein unakrsna vezanja (eng. *DNA-protein crosslinks, DPCs*) predstavljaju najraznovrsnija DNA oštećenja. U stanici je prisutna velika količina raznih proteina koji mogu se vezati na DNA i rezultirati oštećenjima različitih veličina te ovisno o aminokiselinskim ostacima, različitim vrstama ireverzibilne kovalentne veze sa DNA (2). Također, proteini se mogu vezati samo na jedan lanac DNA ili na oba pri čemu mogu ostvariti jednu ili više istih ili različitih kovalentnih veza (9). Ove činjenice navode na zaključak da je za razrješenje DPC oštećenja stanica razvila više puteva popravaka. Vjeruje se da se spomenuta oštećenja najčešće procesiraju u dva koraka. U prvom koraku, tzv. *upstream processing*, djeluju enzimi proteaze koji, ukoliko je potrebno, degradiraju proteinsku komponentu DPC-a kako bi se omogućilo procesiranje oštećenja kasnije u drugoj fazi popravka (tzv. *downstream processing*). Do sada su otkrivene proteaze SPRTN u višestaničnim organizmima i Wss1 u kvascu te ACRC ili GCNA (eng. *Acidic Repeat-Containing Protein* ili *Germ Cell Nuclear Acidic Peptidase*) proteaza u višim eukariotima, međutim konkretnu ulogu ACRC proteaze potrebno je eksperimentalno potvrditi. Downstream processing sačinjavaju enzimi tirozil-DNA fosfodiesteraze 1 i 2 koji razrješavaju DPC hidrolizirajući ireverzibilnu kovalentnu vezu između proteina i DNA čime nastaju jednolačani ili dvolančani lomovi koji se zatim procesiraju kanonskim putevima popravaka odnosno ligacijom jednolančanog loma ili homolognom rekombinacijom ili nehomolognim sparivanjem krajeva (3). Poznata su još dva puta popravka kojima se DPC-ovi mogu razriješiti, no potrebno je istražiti djeluju li samostalno ili u kombinaciji sa protezama. Mali DPC-ovi, pri čemu je protein manji od 8-16 kDa, mogu se procesirati nukleotidnim ekscizijskim popravkom (NER) (1,8,9). Moguće je da NER djeluje nizvodno od SPRTN proteaze, te uklanja peptidne ostatke iz ukosnice (8,19). Drugi put popravka uključuje Mre11 nukleazu koja (eng. *Meiotic recombination 11*) razrješava DPC *in vitro* tako da izrezuje sekvencu DNA obuhvaćenu oštećenjem te ostavlja dvolančani lom koji se zatim popravljiva homolognom rekombinacijom ili nehomolognim sparivanjem krajeva (5–7) (Slika 2). Može li

Mre11 nukleaza razrješiti DPC-eve *in vivo*, pod kojim uvjetima, te djeluje li ovisno ili neovisno o SPRTN proteazi nije poznato(2).



Slika 2. Shematski prikaz enzima koji sudjeluju u popravku DPC oštećenja (izrađeno u Biorender.com).

Jedno od najzastupljenijih DPC oštećenja je unakrsno povezivanje topoizomeraza i DNA (eng. *Topoisomerase cleavage complex, Topcc*). Iz tog razloga stanica je za ovaj tip oštećenja formirala specifičan put popravka enzimima Tdp 1 i 2, ovisno o tipu topoizomeraze. Spomenuti put popravka do sad je najspecijaliziraniji otkriveni put za razrješavanje DPC oštećenja te delecija gena koji kodiraju za ove enzime uzrokuje za stanicu velike štete nakupljajući specifično DNA-topoizomeraza ireverzibilna vezanja (4). Topoizomeraze su skupina enzima koja prilikom odmatanja DNA otpušta napetost u lancu. Napetost otpuštaju uzrokujući lomove na DNA prilikom kojih nastaje intermedijer topoizmeraza-DNA. Ukoliko, uslijed endogenih (npr. lokalna promjena strukture DNA heliksa/*DNA helix alteration*) ili egzogenih DPC inducera (kemoterapeutici kamptotecin i etopozid) enzim ostane trajno, ireverzibilno vezan za DNA, nastaje DPC (18). Spomenuti enzimi specifično hidroliziraju vezu između DNA i tirozinskog aminokiselinskog ostatka, a najčešći supstrat im je upravo spomenuto oštećenje. Tdp1 enzim primarno djeluje na DNA-topoizomeraza1 (Top1cc) unakrsna vezanja te ostavlja jednolančane lomove koji se zatim popravljaju procesom ligacije jednolančanog loma (4). Tdp2 enzim primarno rješava DNA-topoizomeraza2 (Top2cc) unakrsna vezanja ostavljajući pritom dvolančani lom koji se popravljaju homolognom rekombinacijom ili nehomolognim sparivanjem krajeva (20).

Mre11 nukleaza izrezuje cjelokupna oštećenja djelujući izravno na DNA. Nukleaza ovisno o oštećenju uvodi jednolančane ili dvolančane lomove koje procesira u 3'-5' smjeru, a koji se zatim popravljaju klasičnim putevima DNA popravka. Do sada je pokazano da Mre11 može razrješiti Top2cc i umjetno stvoreni streptavidin-DNA *crosslink in vitro* i u stanicama, dok *in vivo* studije ne postoje (5–7).

Glavni proteolitički enzim, koji je prisutan u svim mnogostaničnim organizmima je SPRTN. Spomenuti Wss1 enzim, SPRTNov je funkcionalni ortolog prisutan u kvascu (8). SPRTN je metaloproteaza koja svojim aktivnim mjestom može raspoznati i razgraditi brojne proteine unutar DPC oštećenja (20). Iz tog razloga, potrebna je stroga kontrola enzima kako ne bi razgradio proteinske komponente koje nisu rezultat oštećenja i time ugrozio funkcioniranje stanice. Takva stroga regulacija ostvaruje se na četiri razine: 1. staničnom kontrolom količine enzima, 2. DNA ovisnom aktivacijom enzimske aktivnosti, 3. načinom razrješavanja DPC oštećenja i 4. posttranslacijskim modifikacijama (16). Najveća razina SPRTN-a zabilježena je u G2 i S fazama staničnog ciklusa odnosno u fazama pripreme za replikaciju i tokom same replikacije. U tim fazama DPC oštećenja za stanicu predstavljaju veliku prijetnju jer potencijalno ometaju replikaciju te je njihovo uklanjanje od velike važnosti (20). U ostalim fazama staničnog ciklusa pretpostavlja se da je razina enzima manja kako bi se spriječile neželjene proteolize, međutim hipotezu je potrebno eksperimentalno dokazati. Drugu razinu regulacije predstavlja aktivacija enzima nakon vezanja za DNA. Dosadašnja istraživanja ukazuju da je aktivno mjesto SPRTN proteaze niskospecifično te se pretpostavlja se da je prisutnost DNA potrebna kako bi maksimalno približila protein aktivnom mjestu enzima (2). Treća razina regulacije odnosi se na razrješavanje samog DPC oštećenja prilikom kojeg se sa DPC-a otpuštaju C-terminalni dijelovi enzima dok proteazna domena ostaje nepromijenjena (19). Pretpostavlja se da na taj način stanica reciklira enzim, štedi energiju i osigurava da je određena količina enzima uvijek prisutna. Četvrta razina odnosi se na posttranslacijske preinake. Enzim je aktivan tek kada je deubikvitiran (21). Poznato je da se proteini koje je potrebno razgraditi, u stanici označavaju ubikvitinom. Na taj način osigurava se da je enzim aktivan tek kada je u stanici prisutno dovoljno ubikvitiniranih proteina spremnih za razgradnju te se time smanjuje potencijalna nespecifična razgradnja (2). 2020. Fielden i sur. dokazali su da su za procesiranje Top1cc oštećenja uz SPRTN usko vezani i TEX264 i p97 proteini u humanim stanicama. TEX264 prilikom replikacije prepoznaje Top1cc oštećenja i regrutira p97 i SPRTN. Pretpostavlja se da p97 modificira proteinski dio Top1cc kako bi SPRTN mogao pristupiti proteolizi (22).

Inaktivacijom bilo kojeg od opisanih puteva popravaka mogu nastupiti ozbiljne bolesti. Mutacijama u genu za Tdp1 nastupa spinocerebralna ataksija koja uzrokuje živčane smetnje, imunodeficijenciju te povećava predispozicije za rak (20). Mutacijama u genu za Mre11 nukleazu razvija se ATLD1 (*ataxia telangiectasia-like disorder 1*) koja uzrokuje propadanje živčanog sustava i razvoj drugih ozbiljnih bolesti poput ataksije, apraksije i dizartrije (20). Mutacije u SPRTN proteazi uzrokuju Rujis-Aalfseov sindrom (RJLAS) gdje uslijed nakupljanja DPC-ova i dvolančanih DNA lomova nastupa preuranjeno starenje i rana pojava raka jetre (sa 12-13. god) (23).

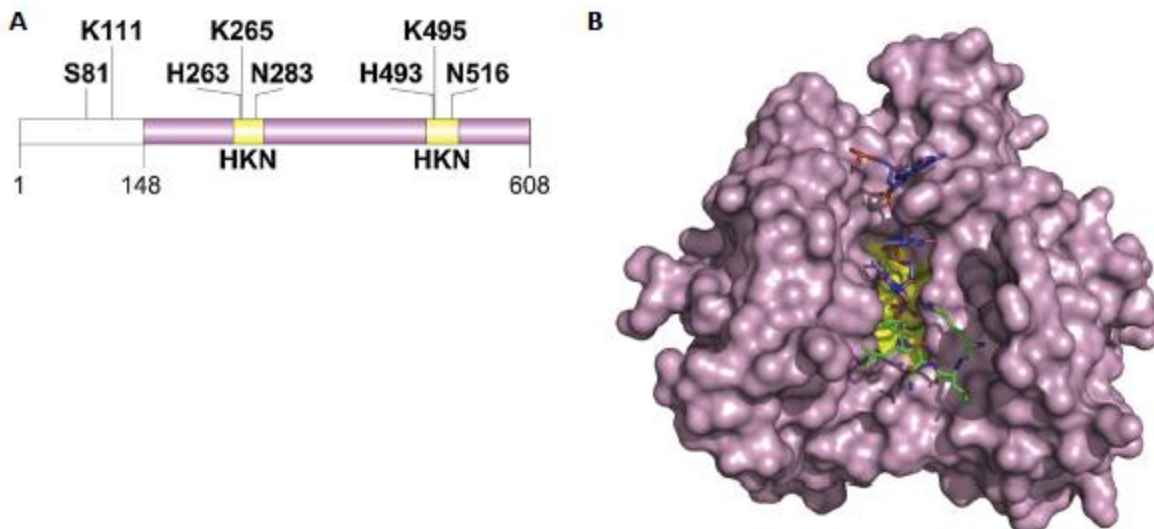
Unutar opisanih i spomenutih puteva popravka DPC oštećenja, postoje brojna nerazjašnjena pitanja poput načina regulacije svih opisanih procesa, nepoznatih uloga proteina koji sudjeluju zajedno s opisanim putevima popravka i izbora puta popravaka za pojedino oštećenje (20). Kao što je i djelomično spomenuto u prethodnom potpoglavlju, intenzivno se istražuju i lijekovi s antitumorskim djelovanjem pri čemu je mehanizam djelovanja uzrokovanje DNA-protein unakrsnih vezanja. Pri tome stepenicu više predstavljaju lijekovi koji će osim induciranja ovog teškog oštećenja djelovati inhibitorno i na puteve popravka istog (24). Kako bi se to ostvarilo potrebno je nastaviti sa istraživanjima te prikupiti detaljne podatke o ovim raznolikim putevima popravka, njihovoj regulaciji i međudjelovanju (4).

2.4 Uloga tirozil-DNA fosfodiesteraze 1 (Tdp1) u popravku DNA-protein unakrsnih vezanja (eng. *DNA-protein crosslinks, DPCs*)

Tirozil-DNA fosfodiesteraza 1 (Tdp1) enzim je koji sudjeluje u popravku DNA razrješavajući primarno DNA-Topozomeraza1 unakrsna vezanja (eng. *Topoisomerase1-DNA cleavage complex, Top1cc*) (25). Tdp1 su prvi puta detektirali Nash i sur. 1999. godine u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* (26). Glavna funkcija ovog enzima hidroliza je fosfodiesterske veze između pretežito 3', ali i 5' DNA fosfata i tirozinskog ostatka adukta ili peptida čime se ostvaruje otpuštanje istog sa DNA. Tdp1 posjeduje i nešto slabiju egzonukleaznu aktivnost (27). Prema navedenim funkcijama supstrati ovog enzima mogu se podijeliti u dvije grupe. U prvu grupu ubrajaju se kovalentno vezani DNA proteini ili adukti poput Top1cc. U drugu grupu spadaju oštećeni i modificirani DNA ili RNA nukleotidi (26). U skladu s napomenutom slabom egzonukleaznom aktivnošću Tdp1 odjednom može odcijepiti samo jedan oštećeni nukleotid sa krajeva DNA. Enzim

može vezati i jednolančanu i dvolančanu DNA, no pretežito veže jednolančanu DNA (27). Aktivnost Tdp1 detektirana je u nukleusu i mitohondriju (25).

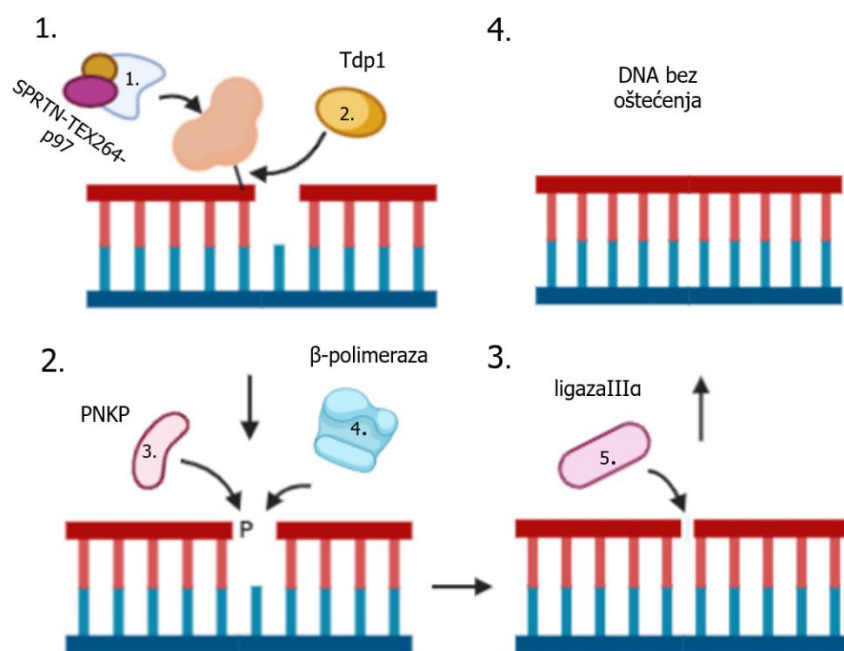
Tdp1 enzim je molekulske mase od 68 kDa i sastoji se od 608 aminokiselina (27). Svrstava se u porodicu fosfolipaza D enzima (*Phospholipase D (PLD) superfamily*). PLD je raznovrsna skupina enzima zastupljena u svim domenama života. Neki enzimi karakteristični za ovu porodicu uključuju enzime fosfolipidnog metabolizma, bakterijski toksin i bakterijsku nukleazu (Nuc) (28). Ono što povezuje sve enzime u skupini su struktura i mehanizam djelovanja aktivnog mjesta i konzervirani HDK motivi (histidin-aspartat-lizin). Iznimno, kod Tdp1 u HDK motivima je umjesto aspartata prisutan asparagin (HNK umjesto HDK) (27). Tdp1 je monomer podijeljen na dvije domene, N-terminalnu domenu i C-terminalnu domenu (Slika 3A), između kojih je smješteno aktivno mjesto. N-terminalna domena ima ulogu u regulaciji aktivnosti enzima i nije ključna za katalitičku aktivnost enzima. Douglas i sur. su 2002. godine u svom eksperimentu uklonili 148 aminokiselina N-terminalne domene bez utjecaja na katalitičku aktivnost (29). Zbog kompleksnosti samog sustava regulacije i podložnosti N-terminalne domene proteolizi prilikom pročišćavanja, ova domena zahtijeva dodatna i brojna istraživanja kako bi mogla biti opisana u cijelosti (26). Za razliku od N domene, C domena je veća i predstavlja izrazito očuvanu regiju (Slika 3A). Obzirom da se na strani C domene nalaze dva očuvana HNK motiva (Slika 3A), koja sudjeluju u provođenju enzimske reakcije, C domena važna je za katalitičku aktivnost enzima. Aktivno mjesto enzima nalazi se između dvije domene te se sastoji od dva dijela. Jedan dio aktivnog mjesta predstavlja usku udubinu bogatu pozitivno nabijenim aminokiselinskim ostacima. Taj dio stabilizira DNA pri čemu najčešće veže jednolančanu uzvojniciu. Sekvenca DNA stabilizira se polarnim i nepolarnim interakcijama sa aminokiselinskim ostacima aktivnog mjesta preko DNA okosnice. Na taj način omogućeno je nespecifično vezanje DNA neovisno o slijedu nukleotida. Drugi dio aktivnog mjesta je širi i otvoreniji, a naboj je neutralnije raspoređen. Taj dio aktivnog mjesta stabilizira vezani protein ili adukt (27,29) (Slika 3B).



Slika 3. (A) Prikaz topologije Tdp1 (aminokiseline od 1-148 predstavljaju N-terminalnu domenu, aminokiseline 148-608 predstavljaju C-terminalnu domenu sa dva konzervirana HKN motiva prikazana žuto); **(B) Prikaz strukture Tdp1** (N-domena nije prikazana, C-domena je prikazana ljubičasto, žuta boja predstavlja katalitičku jedinicu, plavom bojom je prikazna DNA, zelenom peptidni supstrat). Slika je preuzeta i adaptirana iz (27).

Tdp1 provodi hidrolizu fosfodieterske veze u dva koordinirana S_N2 nukleofilna napada. U prvom koraku aminokiselinski ostatak His263 nukleofilno napada fosfodietersku vezu prilikom čega se otpušta adukt, peptid ili nukleotid sa DNA i formira se Tdp1-DNA međuprodukt. U drugom koraku provodi se kiselobazna reakcija hidrolize u kojoj His493 kao baza aktivira vodu koja zatim nukleofilno napada i hidrolizira Tdp1 sa DNA (30). Interthal i sur. su 2011. godine provodili eksperiment u kojem su varirali duljinu sekvence DNA obuhvaćene oštećenjem i veličinu kovalentno vezanog proteina. Rezultati su pokazali da Tdp1 razrješava komplekse tim uspješnije što je dulja sekvenca DNA. Uzevši u obzir tu činjenicu, pretpostavili su da se DNA omata oko proteina i na taj način omogućava stabilnost i blizinu kontakta supstrata i enzima. Pozitivan naboj raspoređen po enzimu također upućuje na isti zaključak. Variranje veličine proteina dovelo je do zaključka da Tdp1 samostalno može razriješiti DPC oštećenja koja sadrže protein veličine do cca. 108 aminokiselina (31). Obzirom da upravo najčešći supstrat ovog enzima Top1cc sadrži protein puno veći od 108 aminokiselina, Tdp1 ne može samostalno razriješiti ovaj kompleks. Upravo zato, uz funkciju Tdp1 usko su vezani enzimi SPRTN u višestaničnim organizmima i Wss1, SPRTNov

ortolog u kvascu te novootkriveni TEX264 i p97 proteini u humanim stanicama (Slika 4.). TEX264 protein u toku replikacije veže Top1cc oštećenja i na taj način regrutira p97 i SPRTN enzime. Za p97 se vjeruje da preoblikuje proteinski dio TOP1cc kako bi olakšao SPRTN posredovanu proteolizu (22). SPRTN metaloproteaza razgrađuje protein u kompleksu kako bi omogućio pristupanje Tdp1 fosfodieterskoj vezi za hidrolizu (20, 22). Nakon hidrolize, zaostaje jednolančani lom sa 3' fosfatnim krajem koji se prije ligacije mora procesirati. Tu modifikaciju provodi enzim polinukleotid kinaza 3' fosfataza (PNKP) koji hidrolizira fosfat s 3' kraja te ga simultano premješta na 5' kraj. Zatim pristupaju enzim β -polimeraza koja može sintetizirati nukleotide ukoliko nedostaju i enzim ligaza IIIa koja zatim ligira krajeve DNA (32) (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz puta popravka TOP1cc oštećenja (PNKP- polinukleotid kinaza 3' fosfataza) (izrađeno u Biorender.com)

U sažetku, za sada otkriveni proteini koji sa Tdp1 izravno sudjeluju u razrješavanju DNA-protein unakrsnih vezanja kod višestaničnih organizama su TEX264, p97, metaloproteaza SPRTN, PNKP, β -polimeraza i ligaza IIIa (22,32). No kako bi Tdp1 uspješno prepoznala mjesto i vrstu oštećenja (DPC ili modificirani nukleotid), potrebna je i određena količina proteina koji neizravno sudjeluju u razrješavanju kompleksa, odnosno regulatornih proteina. Do sada otkriveni regulatorni proteini djeluju na N-terminalnu domenu enzima i svrstavaju se u 3 skupine prema načinu djelovanja. U

prvu skupinu ubrajaju se enzimi koji fosforiliraju Tdp1 te tu spadaju enzimi poput serin/treonin kinaze (ATM enzimi, eng. *Ataxia-Telangiectasia Mutated*) i DNA ovisne protein kinaze (DNA-PK). U drugu skupinu spadaju enzimi koji SUMOiliraju Tdp1 kao što je SUMO-konjugirajući enzim (eng. *ubiquitin conjugating enzyme 9*, Ubc9), a u treću skupinu svrstava se poli ADP-riboza polimeraza enzim (eng. *Poly [ADP-ribose] polymerase 1*, PARP1) (27). Interferiranjem sa replikacijskim ili transkripcijskim procesiranjem, jednolančani DNA lomovi, koji nastaju kao rezultat Top1cc oštećenja, mogu se prevesti u dvolančane lomove (33). Takvi dvolančani lomovi potiču fosforilaciju S81 serinskog ostatka Tdp1 te se na taj način enzim stabilizira, lokalizira u blizini oštećenja i potiče na reakciju sa XRCC1 proteinom (eng. *X-ray repair cross-complementing protein 1*). XRCC1 je protein za koji se pretpostavlja da ima važnu ulogu u signalizaciji i promociji popravka dvolančanih lomova (30). Enzimi druge skupine SUMOiliraju Lys111 te na taj način stabiliziraju protein i promoviraju popravak jednolančanih lomova nastalih zbog Top1cc. PARP1 enzim djeluje na dva načina, tako da se direktno veže svojom C-domenom na N-terminalnu domenu Tdp1 i tako da veže poli ADP-ribozu na Tdp1. Kao i preostale dvije modifikacije fosforilacije S81 serinskog ostatka i SUMOilacije Lys111 lizinskog ostatka, vezanje poli ADP-riboze stabilizira protein i navodi ga na mjesto oštećenja. Pretpostavlja se da je PARP1 u fiziološkim uvjetima vezan za DNA te prilikom detekcije oštećenja veže poli ADP-ribozu na DNA i sa iste se otpušta. Zatim u stanici aktivira ostale enzime koji lokaliziraju i popravljaju oštećenje (33).

Funkcija Tdp1 enzima *in vivo* vrlo je slabo istražena. Postoji mali broj eksperimenata gdje je Tdp1 enzim inaktiviran u miševima. Međutim, na miševima nije bilo očekivanih fenotipskih promjena koje se pojavljuju kod ljudi s nefunkcionalnim Tdp1 enzimom odnosno nije bilo simptoma spinocerebralne ataksije sa aksonalnom neuropatijom (SCAN1) (34,35). Sukladno tome potrebno je provesti eksperimente s drugim modelnim organizmima kako bi se prikupili podaci i pokušao rastumačiti točan razlog pojave SCAN1 poremećaja, a potom i liječenje istog. Za sada se zna da poremećaj nastupa u ljudi koji sadrže nefunkcionalan Tdp1 enzim, ali se ne zna što točno enzim čini nefunkcionalnim (35). Kod eksperimenata s miševima dokazano je da se nedostatkom Tdp1 enzima, a uz izlaganje dodatnim stresovima poput tretmana topotekanom koji inducira nakupljanje Topcc1, u stanicama nakupljaju jednolančani DNA lomovi. Ovakav rezultat u skladu je s pretpostavkom da Tdp1 ima ulogu u razrješavanju TOP1cc oštećenja koje ostavlja jednolančane lomove. To što jednolančani lomovi zaostaju tek nakon izlaganja organizma dodatnim stresovima upućuje na to da za razrješavanje TOP1cc u stanicama postoje i drugi putevi popravka osim Tdp1 (34,35). Preostaje provesti još eksperimenata kako bi se Tdp1 enzim

smjestio u kontekst sa ostalim putevima popravka te odgovorilo na pitanja u kojoj fazi nastupa Tdp1 i koji je put popravka Top1cc-a najefikasniji. Nadalje, postoje *in vitro* eksperimenti koji potvrđuju da Tdp1 može procesirati umjetno stvoreni 3' biotin i 3' fosfoglikolat vezan na DNA. Rezultati upućuju na mogućnost Tdp1 enzima u razrješavanju 3' vezanih DNA adukata, međutim tezu je potrebno dokazati *in vivo* (36).

Iz gore navedenih razloga jasno je da konkretna uloga Tdp1 enzima u organizmu nije još razjašnjena. Cilj ovog rada je omogućiti daljnja *in vivo* istraživanja Tdp1, u novom modelnom organizmu zebrici, koja bi trebala pružiti uvid u utjecaj Tdp1 enzima kako na razini cjelokupnog organizma tako i na razini samih DPC oštećenja.

2.5 Zebrica (*Danio rerio*) kao modelni organizam

Modelni organizmi su neljudske vrste koje se koriste za istraživanje i razumijevanje staničnih procesa te na taj način pružaju uvid u funkcioniranje kako korištenih modelnih organizama tako i u širok spektar sličnih mu organizama (37).

Zebrica, *Danio rerio*, predstavlja modelni organizam kralježnjaka za kojim u zadnjih 30ak godina potražnja intenzivno raste (38). Zebrica se ubraja u skupinu koštunjača i pripada obitelji *Cyprinidae*, razredu *Actinopterygii*. U rod *Danio* skupa sa *Danio rerio* ubraja se još oko 40ak različitih vrsta riba. Prirodno stanište zebrice su tropska slatkovodna područja himalajskog dijela južne Azije, prevladavajuće rijeka Ganges. Začetnikom i promotorom zebrice, kao modelnog organizma, smatra se George Streisinger sa Sveučilišta u Oregonu (SAD). Streisinger je 1970. godine umjesto miša upotrijebio zebricu kao modelni organizam radi jednostavnije manipulacije prilikom proučavanja živčanog sustava. Nadalje su Streisinger i suradnici na zebrici proučavali različite procese poput formacije embrija, razvoja mišića, regulacije ekspresije gena. Na taj način utrli su put za daljnja istraživanja zebrice kao potencijalnog, perspektivnog modelnog organizma. Od 70ih godina pa do danas, utvrđeno je puno pozitivnih obilježja koji zebricu čine traženim modelnim organizmom (37). Veliku prednost predstavlja vanjska oplodnja i proziran embrio koji omogućava vizualizaciju željenog procesa od samog početka. Razvoj organizma vrlo je brz, četiri dana nakon oplodnje zebrica je mala verzija odrasle ribe, dok kod miša takav razvoj traje oko dvadesetak dana (38,39). Zbog male veličine organizma i potrebe za umjerenom klimom, nema potrebe za velikim prostorima i ekstremnim uvjetima koji bi zahtijevali kompliciranu opremu i veća

ekonomska ulaganja. Zebrica se može uzgajati u manjem akvariju s temperaturom vode oko 28 °C i neutralnim pH. Održavajući optimalne uvjete, zebrica može imati i do 2000 jajašaca tjedno. Najbitnije, zebrica dijeli oko 70% sličnosti sa humanim genomom te se u njoj mogu proučavati brojne ljudske bolesti (37). Mnogi putevi koji kontroliraju rast kralježnjaka očuvani su u čovjeku i zebrici, a i biologija razvoja tumora također je vrlo slična (37).

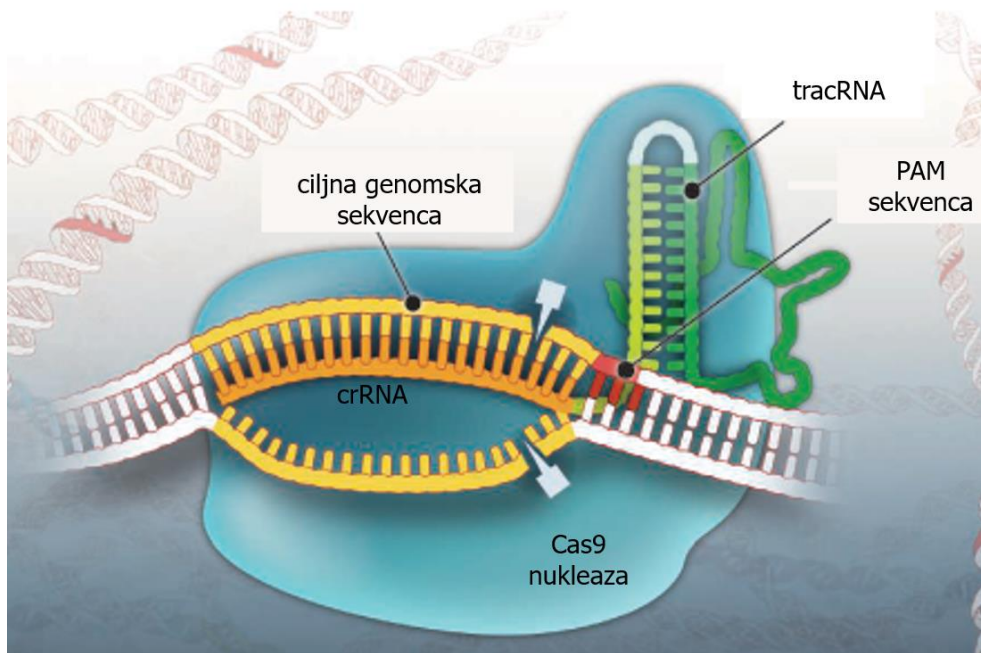
2.6 CRISPR/Cas9 sustav u modifikaciji genoma

CRISPR/Cas sustav za modifikaciju genoma inicijalno je otkriven u bakterijama, a danas je poznato da ga koristi oko 50% bakterija i 90% arheobakterija u svrhu obrane od virusa ili potencijalno opasnih plazmida (40). Glavna značajka ovog sustava je cijepanje stranog genoma koristeći molekulu RNA kao vodilju i nukleazne proteine za uvođenje dvolančanog loma. Sustav za obranu odvija se u tri koraka. U prvom koraku, prilikom infekcije, bakterija prepoznaje strani genom te ga fragmentira i ugrađuje u vlastiti genom. Nakon toga bakterija eksprimira ugrađeni fragment u obliku RNA. Ekspimirana RNA zatim ulazi u kompleks s nukleaznim proteinima te prilikom ponovnog napada sličnog virusa nastupa treća faza odnosno uvođenje dvolančanih lomova kojima se degradira strani genom. Potonje se danas primjenjuje u modifikaciji genoma različitih organizama. Uvođenjem dvolančanih lomova na ciljane mjesta u genomu moguće je mijenjati i inaktivirati gene od interesa te na taj način analizirati funkcije pojedinih gena, potencijalno ispravljati genetičke mutacije i poboljšati karakteristike modelnih organizama (štakora, miševa) (41). Također, ukoliko se onemogućiti nukleazno cijepanje Cas9 proteinom, moguće je stvoriti nerazrješiv kompleks koji se uz fluorescentni GFP protein može koristiti za praćenje ili obilježavanje ciljnih sekvenci genoma (40).

S obzirom na raznovrsne okolišne uvjete niša koje bakterije nastanjuju i konstantne mutacije virusa s ciljem izbjegavanja ovog obrambenog mehanizma, razvijene su raznovrsne inačice CRISPR/Cas sustava. Do sada otkrivene varijante sustava svrstavaju se u 2 razreda koji su zatim podijeljeni na 6 tipova koji su nadalje podijeljeni na preko 30 podtipova sustava. U prvi razred spadaju sustavi koji za cijepanje stranog genoma koriste kompleks proteina koji se sastoji od 4 do 7 proteina. U drugom razredu za isto se koristi samo jedan protein pa se, zbog jednostavnosti, za genetičke manipulacije istražuju većinom sustavi drugog razreda. Druge podjele ostvaruju se na temelju izbora i sličnosti u sekvencijama Cas gena te strukturi CRISPR/Cas lokusa (42,43).

Trenutno najistraženiji i najkorišteniji je CRISPR/Cas9 sustav koji spada u drugi tip drugog razreda. 2012. godine američki znanstvenici Doudna i sur. proučavali su spomenuti sustav u patogenoj bakteriji *Streptococcus pyogenes*. Uočili su da se kompleks za uvođenje dvolančanog loma sastoji od 3 komponente: crRNA (crRNA), trans-aktivirajuće RNA (tracrRNA) te Cas9 proteina. CrRNA jednolačna je RNA molekula koja na temelju komplementarnog sparivanja detektira ciljnu DNA sekvencu. TracrRNA dvolančana je molekula koja stvara petlju kojom se veže na Cas9 protein te na taj način stabilizira cjelokupni kompleks. Cas9 veliki je multifunkcionalni enzim koji se sastoji od dvije nukleazne domene čija je nukleazna aktivnost stimulirana konformacijskim promjenama enzima (Slika 5). Konformacijske promjene uzrokovane su komplementarnim sparivanjem crRNA s ciljnom sekvencom DNA. Dvije helikazne domene enzima su HNH i RuvC, od kojih svaka uzrokuje jednolančani lom na pojedinom lancu DNA. HNH domena zarezuje komplementarni lanac, a RuvC nekomplementarni lanac. Mjesto induciranog dvolančanog loma nalazi se oko 3 pb uzvodno od PAM sekvence (44) (Slika 5). PAM sekvenca predstavlja svojevrstni marker kojim bakterija raspoznaje strani genom od vlastitoga i na taj način sprječava autodestrukciju. Sekvenca je prisutna u stranom genomu, no ne postoji u CRISPR/Cas operonu bakterije (45). Za ovaj tip CRISPR/Cas sustava slijed PAM sekvence je NGG (gdje je N bilo koji nukleotid) te će strani genom biti cijepan jedino u blizini ovakvih sekvenci.

Fuzijom crRNA i tracrRNA dobivena je jedna vodeća RNA molekula čiji 5' kraj ima funkciju crRNA odnosno prepoznavanja ciljne DNA sekvence, a 3' funkciju tracrRNA odnosno stabilizacije kompleksa. Na taj način Doudna i sur. pojednostavili su i olakšali upotrebu CRISPR/Cas9 kompleksa s ciljem modifikacije različitih genoma. Ovako dobiveni dvokomponentni sustav sastoji se od Cas9 proteina i jedne sintetički stvorene RNA molekule, koja ovisno o svojoj sekvenci, u stanici pronalazi komplementarnu ciljnu molekulu DNA. Sparivanjem sa ciljnom DNA uzrokuje konformacijske promjene u Cas9 nukleaznom proteinu koji zatim uvodi ravni, dvolančani lom 3 pb uzvodno od PAM sekvence (44). Nastali ravni dvolančani lom zatim se popravljiva nehomolognim sparivanjem krajeva ili homolognom rekombinacijom. Ukoliko se popravak vrši nehomolognim sparivanjem krajeva najčešće dolazi do mutacija pomaka okvira čitanja koje u konačnici inaktiviraju gen od interesa tzv. *knock out*. Homologna rekombinacija je rjeđa, a potaknuta je velikim brojem sličnih sekvencija u blizini dvolančanog loma. Popravak homolognom rekombinacijom rezultira umetanjem nove sekvence tzv. *knock in* (46).



Slika 5. **Shematski prikaz strukture CRISPR/Cas9 kompleksa** (preuzeto i adaptirano iz 41).

Potencijalne poteškoće u korištenju ovog sustava uključuju poteškoće u dovođenju kompleksa do ciljnih stanica bez toksičnih nuspojava, postizanje željene efektivnosti i djelovanje kompleksa na sekvence koje nisu ciljne što u konačnici za stanicu može biti letalno (tzv. *off-target effect*) (47). Varijabilnost CRISPR/Cas sustava omogućava konstantno proučavanje i otkrivanje novih prednosti, te su tako već sada poznati potencijalni sustavi koji bi mogli upotpuniti djelovanje CRISPR/Cas9 sustava. Veliki potencijal trenutno predstavljaju CRISPR/Cas12 i CRISPR/Cas13 sustavi. Cas12b protein puno je manji u odnosu na dosad poznati Cas9 protein. Budući da manji protein može lakše pristupiti ciljanoj DNA sekvenci, korištenjem Cas12b proteina mogla bi se poboljšati efikasnost procesa (43). CRISPR/Cas13 sustav koristi vodeću RNA sekvencu čija je regija za komplementarno sparivanje dugačka 28-30 nukleotida, za razliku od CRISPR/Cas9 sustava gdje je duljina iste sekvence 20 nukleotida. Zbog spomenute razlike, CRISPR/Cas13 sustav potencijalno je više specifičan te je moguće umanjiti tzv. *off-target* učinak (43). Daljnje proučavanje postojećih i otkrivanje novih inačica sustava predstavlja širok spektar potencijalnih poboljšanja za korištenje istih u metodama genetičkog inženjerstva što u konačnici bitno olakšava

analiziranje genoma, otkrivanje funkcije neistraženih proteina te može omogućiti razvoj novih metoda u liječenju bolesti.

3. Materijali i metode

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije i enzimi

- *Phusion PCR*: mješavina deoksinukleotida (ATP, GTP, TTP, CTP) (10mM), 5x *Phusion High Fidelity* (PHF) pufer, *Phusion High Fidelity* (PHF) enzim (2 U/ μ L) – Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
- *MEGAscript T7* kit za *in vitro* transkripciju: 10x T7 otopine ribonukleotida GTP, CTP, UTP, ATP, 10x T7 reakcijski pufer, T7 miks enzima, TURBO DNaza (2 U/ μ L) – Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD
- Kit za pročišćavanje DNA: DNA *cleanup* vezujući pufer, DNA *cleanup* pufer za ispiranje, DNA *cleanup* pufer za eluciju DNA, etanol ($\geq 95\%$) - New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD
- RNA kit za pročišćavanje: RNA *cleanup* vezujući pufer, RNA *cleanup* pufer za ispiranje, etanol ($\geq 95\%$)- New England Biolabs Ipswich, Massachusetts, SAD
- Voda iz koje su uklonjene RNaze (*super clean nuclease free H2O*) (*in vitro* transkripcija, pročišćavanje) – Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, SAD
- Sredstvo za inaktivaciju RNaza – Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Agaroz (elektroforeza) - Sigma, St. Louis, Missouri, SAD
- Gel star boja za DNA/RNA (elektroforeza) – Lonza, Basel, Švicarska
- migracijsko bojilo (elektroforeza) – New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD
- standard za DNA/RNA elektroforezu 0.1-10 kb DNA ladder - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD

3.1.2 Otopine

50x TAE pufer, koristi se za pripremu gela za elektroforezu. Priprema se 500 mL 1x pufera tako da se pomiješa 10 mL pufera sa 490 mL deionizirane vode. Sastav 50x TAE pufera – EDTA (50 Mm), Tris (2 M), octena kiselina (1 M).

3.1.3 Plazmid

Koristi se plazmid pKHR5 (dsDNA, 4986 pb, ID: #74593) kao kontrola aktivnosti DNazeI u *in vitro* transkripciji.

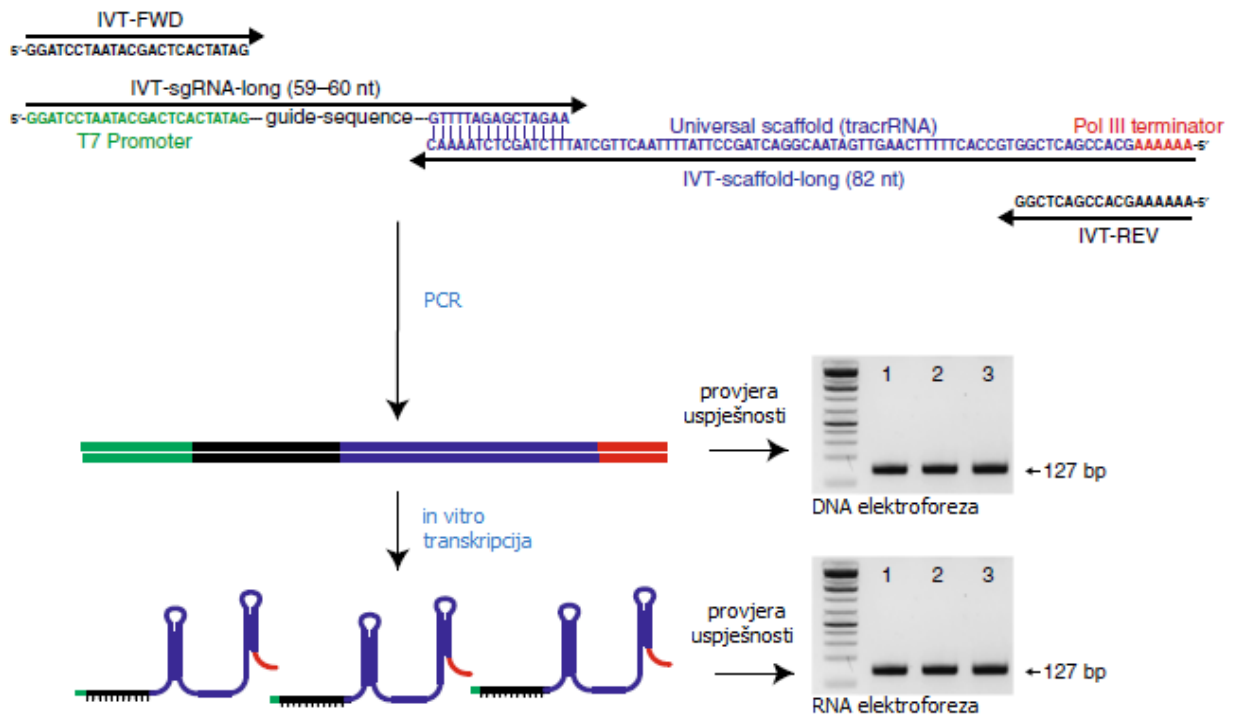
3.1.4 Oligonukleotidi

Oligonukleotidi u tablici 1. korišteni su za provedbu PCR-a (eng. *Polymerase Chain reaction*) za izradu DNA kalupa. (METODE, poglavlje 3.2.2.)

Tablica 1. Popis korištenih oligonukleotida

	OLIGONUKLEOTID	SEKVENCA (5'-3')
početnica 5'-3'	IVT-FWD (1 μM)	GGATCCTAATACGACTCACTATAG
početnica 5'-3'	IVT-REV (1 μM)	AAAAAAGCACCGACTCGG
dio sgRNA koji sadrži ciljnu sekvencu	IVT-sgRNA-LONG oligo (100 μM)	<p style="text-align: center;">T7 PROMOTOR CILJNA SEKVENCA</p> <p style="text-align: center;">GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGGGTTCAATTTCTTGGAG</p> <p style="text-align: center;">tracRNA</p> <p style="text-align: center;">CGTTTTAGAGCTAGAA</p>
tracRNA	IVT-SCAFFOLF- LONF oligo (100 μM)	<p style="text-align: center;">tracRNA</p> <p style="text-align: center;">CAAATCTCCATCTTATCGTTCAATTTTATTCCGATCAGGCAAT</p> <p style="text-align: center;">AGTTGAACTTTTTACCGTGGCTCAGCCACGAAAAA pol III</p> <p style="text-align: center;">terminator</p>

3.2 Metode



Slika 6. Shematski prikaz sinteze RNA vodilje (preuzeto i adaptirano iz (48).

3.2.1 *In silico* dizajn RNA vodilje (sgRNA) i početnica

Prvi korak u konstrukciji CRISPR/Cas9 sustava za modifikaciju genoma je dizajniranje sekvence vodilje pomoću *CRISPRscan* programa (49). Ujedno se dizajniraju i početnice za genotipizaciju inducirane genske promjene pomoću HRMA (eng. *High Resolution Melting Analysis*) metode (50). Za modifikaciju gena *tdp1* u zebri (*Danio rerio*) potrebno je prvo odrediti sekvencu vodilju za rezanje gena u ciljanom području. Prvo se prihvati sekvenca cijelog gena uključujući egzone i introne iz baze genoma Ensembl (51). Sekvence se otvore i spremne u Bioedit program (52). Mjesto rezanja treba se nalaziti u kodirajućoj regiji gena, tako da uvedena modifikacija uzrokuje preuranjenu pojavu stop kodon (cca u prvih 15-30 % proteina). S obzirom na to, odabire se target egzon te unosi u CRISPRscan program koji zatim ponudi moguće PAM sekvence (NGG) unutar zadanog egzona. Cas9 enzim cijepati će dsDNA 3 pb uzvodno od PAM sekvence (NGG) (53). Kada se lociraju mjesta rezanja izabiru se potencijalne sekvence vodilje, neovisno o lancu, koje ne uključuju PAM sekvencu, a neposredno su uz nju (Slika 5.) i dugačke su oko 20 nukleotida.

CRISPRscan program uz sekvence vodilje, predviđa i vjerojatnost cijepanja kao i *off target score* i CFD (*cutting frequency determination*) (54) (tablica 2). Odabire se sgRNA koja ima najviši *score* i najmanju CFD vrijednost.

Za genotipizaciju promjene potrebno je dizajnirati početnice za HRMA metodu. Prvi korak je koristeći *Bioedit* program poravnati izabranu sekvencu vodilju sa sekvencom gena. Uzima se sekvenca gena dugačka otprilike 80-110 nukleotida koja sadrži mjesto rezanja 50ak nukleotida uzvodno od PAM sekvence. Pomoću *NCBI primer blast* programa (55) izabiru se početnice koje će 'povlačiti zadanu regiju'. Za izabiranje što efikasnijih početnica potrebno je obratiti pažnju na određene karakteristike sažete u tablici 3. Uz navedena obilježja, potrebno je provjeriti i vjerojatnost stvaranja sekundarnih struktura koje mogu utjecati na efikasnost HRMA metode. Strukture koje treba provjeriti su stvaranje dimera između istih početnica, *forward-forward* ili *reverse-reverse (primer self dimer)*, stvaranje dimera između različitih početnica, *forward-reverse (primer cross dimer)* i stvaranje sekundarne strukture ukosnice za pojedinu početnicu (*hairpin*). Stvaranje struktura provjerava se u *DNASTAR lasergene Primer select* programu (56). Kako bi efikasnost HRMA metode bila što veća potrebno je imati što manju vjerojatnost stvaranja gore spomenutih struktura.

Tablica 2. Objašnjenje pojmova *score* i CFD

SVOJSTVO	ZNAČENJE	PREPORUČENA VRIJEDNOST
score	vjerojatnost rezanja specifične sekvence	➤ 40
CFD	vjerojatnost rezanja nespecifične sekvence	što manja (<10)

Tablica 3. Uvjeti izrade početnica

POŽELJNE KARAKTERISTIKE POČETNICA
duljina 15-20 nt
GC% oko 40-60%
3' kraj bi trebao završavati sa G/C
izbjegavati ponavljajuće sekvence (npr. AAAAA)
razlika u Tm početnica manja od od 5°C

3.2.2 Sinteza DNA kalupa

Kako bi sintetizirali sgRNA potrebno je prvo stvoriti DNA kalup i umnožiti ga PCR (eng. *Polymerase chain reaction*) metodom (57) (Slika 6.). Uređaj korišten za provedbu rekacije je *Gradient PCR* tvrtke Biorad. Za stvaranje kalupa i provedbu PCR-a dodaju se komponente redosljedom navedenim u tablici 4. i podešavaju se uvjeti PCR-a navedeni u tablici 5.

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za provođenje PCR-a

KOMPONENTA	VOLUMEN (μL)
ddH ₂ O	17.75
5x PHF pufer	5.00
dNTP (10 μM)	0.50
FWD početnica (1 μM)	0.50
REV početnica (1 μM)	0.50
IVT-SG-RNA-LONG oligo (100 μM)	0.25
IVT-SCAFFOLD-LONG oligo (100 μM)	0.25
PHF enzim (2 U/μL)	0.25
ukupni volumen	25.00

Tablica 5. Uvjeti reakcije za provođenje PCR-a

KORAK REKACIJE	TEMPERATURA °C	TRAJANJE REAKCIJE	BROJ PONAVLJANJA
početna denaturacija	95	2min	1
denaturacija	95	10s	30
sparivanje početnica	57	10s	30
produljenje lanca	72	10s	30
konačno produljenje	72	2min	1

3.2.3 Pročišćavanje DNA

Nakon provjere uspješnosti i integriteta stvorenog DNA kalupa potrebno je isti pročitati prije *in vitro* transkripcije. DNA se pročišćava prema uputama *Monarch RNA cleanup kita* (NEB). Ukratko, prvo se pripremi kolonica za vezanje i ispiranje DNA kalupa tako što se ista umetne u plastičnu tubicu od 1.5 mL. Uzorak DNA otopi se u DNA vezujućem puferu u omjeru 5:1, 5 volumena vezujućeg pufera na volumen uzorka. Tako pripremljeni uzorak prebacuje se u kolonicu u plastičnoj tubici i centrifugira 1 minutu na 16 000 g. DNA kalup je sada vezan na kolonici, a ostatak uzorka iz tubice se baca. Zatim se dva puta provodi ispiranje vezanog kalupa tako da se kolona vrati u već korištenu tubicu, doda se 200 µL DNA pufera za ispiranje i centrifugira 1 minutu na 16 000g. Pufer koji zaostane u plastičnoj tubici nakon centrifugiranja se baca i isti se postupak provodi još jednom. Kada je DNA kalup pročišćen potrebno ga je eluirati. Uzima se nova tubica u koju se umeće kolonica s DNA kalupom, dodaje se 10 µL DNA pufera za eluciju i centrifugira 1 minutu na 16 000g. Nakon centrifugiranja, kolonica se baca jer se DNA kalup nalazi u plastičnoj tubici. Uspješnost pročišćavanja provjerava se spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije na *Nanodrop* uređaju.

3.2.4 Provjera kvalitete i integriteta DNA i RNA (elektroforeza)

Za provjeru uspješnosti sinteze i pročišćavanja DNA kalupa provodi se horizontalna DNA elektroforeza (Slika 6.). Priprema se 500 mL TAE pufera tako da se u menzuri pomiješa 10 mL 50x koncentriranog TAE pufera sa 490 mL demineralizirane vode. Iz pripremljene otopine uzima se 100 mL za pripremu 1.6 % agaroznog gela. Odvaži se 1.6 mg agaroze i zagrijavanjem otopi u 100 mL pripremljene otopine. Nakon što se otopina djelomično ohladi dodaje se 0.5 µL *Gel Star*

boje (fluorescentna boja, ekscitacija na 300 nm, interkalira u lanac DNA) za vizualizaciju DNA i otopina se izljevaju u pripremljenu kadnicu za elektroforezu. U otopinu se postavi češljik sa jažicama te se vrhom špatule uklone eventualni mjehurići koji bi mogli interferirati sa putanjom DNA. Nakon što se gel skrutne kadice se puni preostalim puferom te se u jažice redom unosi DNA standard (1 μ L) pa uzorak DNA (100 ng) pomiješan sa migracijskim bojilom *Loading dye* pri čemu je migracijsko bojilo potrebno razrijediti šest puta. Elektroforeza se provodi 30-45 minuta na 120 V. Nakon provedene elektroforeze DNA se vizualizira pomoću *ChemiDoc* uređaja (*Biorad*) koji nakon pobude na 302 nm valne duljine mjeri emisiju na 535-645 nm za *Gel Star* (58).

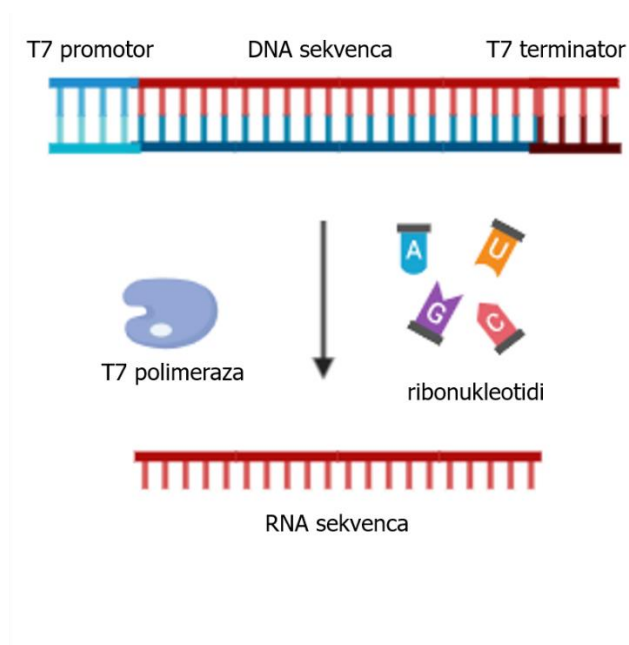
Za provjeru kvalitete i integriteta RNA, koja se provodi nakon pročišćavanja RNA, uvjeti pripreme i provođenja elektroforeze identični su DNA elektroforezi uz uvjet da se posuđe prije upotrebe dodatno prebriše sredstvom za inaktivaciju RNaza. U jažice se redom unose DNA standard (1 μ L), uzorak RNA (100 ng) i kontrola (otopina plazmidai DNazaI, 10 ng) (Slika 6). Uzorak i kontrola se, kao i kod DNA elektroforeze, prije nanošenja na gel miješaju sa migracijskim bojilom.. Po završetku elektroforeze, RNA se vizualizira uz pomoć *ChemiDoc* uređaja (*Biorad*).

3.2.5 *In vitro* transkripcija

In vitro transkripcijom DNA kalup prevodi se u RNA vodilju (Slike 6. i 7.). Reakcija se provodi u dvije faze u PCR uređaju. Za prvu fazu dodaju se, nabrojanim redoslijedom, komponente prema tablici 6. T7 polimeraza preko DNA kalupa sintetizira RNA vodilju (6h, 37°C). U drugoj fazi reakcije u mikrokivetu se dodaje 1 μ L DNazeI koja razgrađuje nepotreban DNA kalup i time završava reakciju *in vitro* transkripcije (1h, 37°C). Uz pripremljenu standardnu reakcijsku smjesu, kako bi se potvrdila ispravnost DNazeI, priprema se kontrolna otopina odnosno dodaje se 100 ng *pKHR5* plazmida u 20 μ L vode.

Tablica 6. Sastav reakcijske smjese za provođenje *in vitro* transkripcije (r, ribonukleotidi; *finalna koncentracija DNA kalupa u reakcijskoj smjesi iznosi 100 nM)

KOMPONENTA	VOLUMEN (μL)
H ₂ O uklonjenih RNaza	6.38
10x T7 pufer	2.00
10x *rATP	2.00
10x rGTP	2.00
10x rUTP	2.00
10x rCTP	2.00
T7 miks enzima	1.80
DNA kalup	1.82*
ukupni volumen	20.00



Slika 7. Shematski prikaz *in vitro* transkripcije

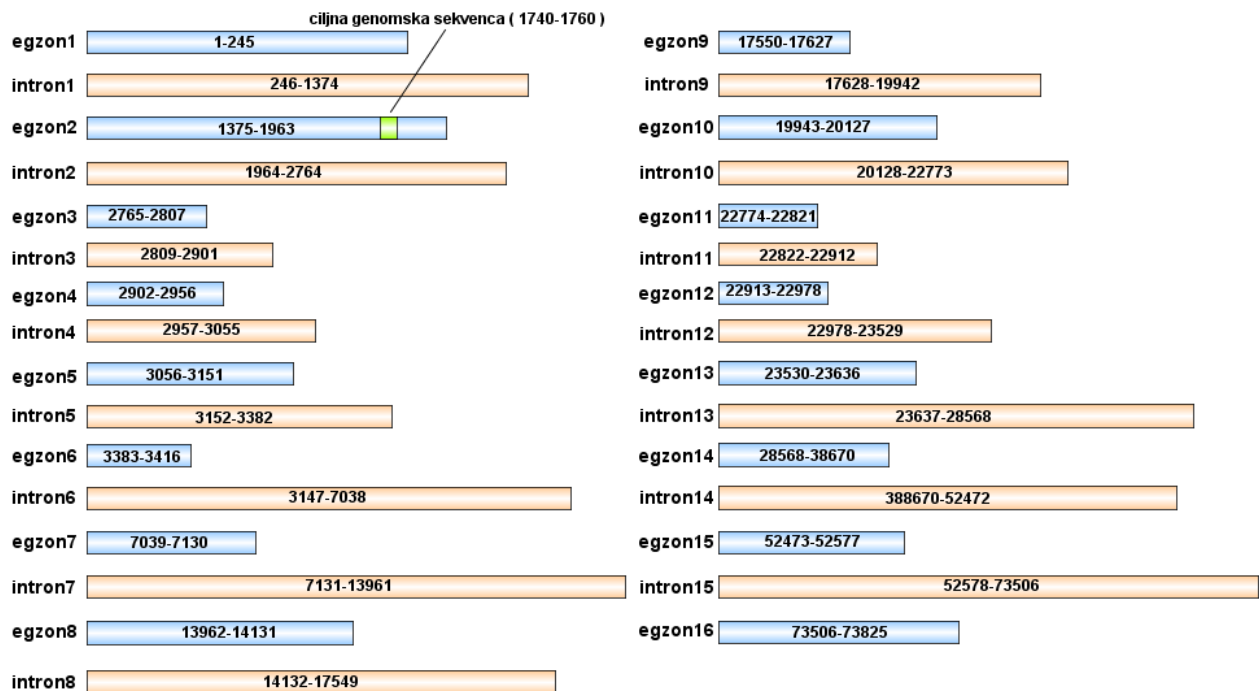
3.2.6 Pročišćavanje RNA

Nakon sinteze RNA vodilje potrebno je odrediti koncentraciju na *Nanodrop* uređaju kako bi se provjerila uspješnost *in vitro* transkripcije. Zatim se provodi pročišćavanje RNA koristeći *Monarch*

RNA cleanup kit (NEB). Ukratko, slično kao i kod DNA pročišćavanja, prvo se pripremi kolonica za vezanje i ispiranje RNA kalupa tako što se ista umetne u plastičnu tubicu od 1.5 mL. Uzorak RNA otopi se u RNA vezujućem puferu u omjeru 2:1, 2 volumena vezujućeg pufera na volumen uzorka. Zatim se dodaje 1 volumen etanola (npr. na 150 μ L otopljene RNA u vezujućem puferu dodaje se 150 μ L etanola). Tako pripremljeni uzorak prebacuje se u kolonicu u tubici i centrifugira 1 minutu na 16 000g. RNA je sada vezana na kolonici, a ostatak uzorka iz tubice se baca. Zatim se dva puta provodi ispiranje vezane RNA tako da se kolona vrati u već korištenu plastičnu tubicu, doda se 500 μ L RNA pufera za ispiranje i centrifugira 1 minutu na 16 000g. Pufer koji zaostane u tubici nakon centrifugiranja se baca i isti se postupak provodi još jednom. Kada je RNA pročišćena potrebno ju je eluirati. Uzima se nova plastična tubica u koju se umeće kolonica s vezanom RNA, dodaje se 50 μ L RNA pufera za eluciju i centrifugira 1 minutu na 16 000g. Nakon centrifugiranja, kolonica se baca jer se RNA nalazi u tubici. Uspješnost pročišćavanja provjerava se spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije na *Nanodrop* uređaju. Zbog osjetljivosti RNA i velike zastupljenosti RNaza u prirodnom okolišu, pri radu je potrebno korištenje sredstva za inaktivaciju RNaza (*Sigma Aldrich*). Na kraju pročišćavanja dio RNA uzorka odvaja se za provjeru integriteta RNA elektroforezom, a ostatak se alikvotizira i čuva na $- 80$ °C do daljnjih eksperimenata.

4. Rezultati i rasprava

Cilj završnog rada bio je stvoriti RNA vodilju za inaktivaciju *tdp1* gena (Slika 8.) u ribi zebrici (*Danio rerio*) kako bi znanstvenici Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu kasnijim eksperimentima mogli pobliže opisati funkciju Tdp1 u popravku DPC-a *in vivo*.



Slika 8. Shema Tdp1 gena zebrice (*Danio rerio*) (izrađeno s IBS programskim paketom).

Kako bi se uspješno provela inaktivacija gena (eng. *Knock-out*) potrebno je sintetizirati RNA vodilju (eng. sgRNA, *single guide RNA*) koja ulazi u kompleks s Cas9 nukleaznim proteinom. RNA vodilja jednolančana je RNA sekvenca koja se sastoji od dva dijela: crRNA (*CRISPR RNA*) i tracrRNA (*trans-activating RNA*). TracrRNA molekula povezuje se sa Cas9 nukleaznim proteinom stvarajući CRISPR/Cas9 kompleks. CrRNA je kratka sekvenca (20 - 22 nt) komplementarna dijelu gena od interesa (Slika 6.) koja navodi CRISPR/Cas9 kompleks na uvođenje dvolančanog loma u ciljani gen. Nakon uvođenja dvolančanog loma DNA se najčešće popravlja putem nehomolognog sparivanja krajeva (NHEJ). NHEJ često rezultira pomakom okvira čitanja koje uzrokuju preuranjenu pojavu STOP kodona ili mutacije što u konačnici onemogućava potpunu provedbu translacije i sintezu proteina.

Kako bi stvorili RNA vodilju za inaktivaciju Tdp1 proteina *in silico* je dizajnirana kratka crRNA sekvenca, koja će se komplementarno sparivati sa dijelom ciljanog gena (Slika 8.), pomoću *CRISPRscan* programa (Slika 9.) (49). Odabrana je sekvenca u egzonu 2 koji se proteže od 1374. do 1963. nukleotida, dok je sama sekvenca dugačka 20 nukleotida i proteže se od 1740. do 1760. nukleotida (Slike 8. i 9.). Iako se sekvenca označena crvenim pravokutnikom na Slici 9. prema *score* i CFD vrijednostima čini kao bolji izbor, ista se nalazi u egzonu broj 8 što ne zadovoljava

kriterij uvođenja preuranjenog STOP kodona koji će prekinuti translaciju unutar prvih 15-30% proteinske sekvence.

Paralelno uz dizajn RNA sekvence, pomoću *NCBI primer blast* programa (55), dizajnira se i par početnica. Početnice se koriste za genotipizaciju inducirane genske promjene putem HRMA metode (eng. *High Resolution Melting analysis*) (50) kako bi se provjerila efikasnost genske promjene. Dizajnirana crRNA sekvenca prikazana je na slici 9. dok je dizajnirani par početnica naveden u tablici 7.

CRISPRscan score	Locus	Oligo	Off-targets		
			All	Seed	CFD
72	17:16408646-16408669 (-)	taatacgactcactataGGGCTGCCGCAGGGGAAGTCCgtttagagctagaa	0	0	5.21
78	17:16408650-16408673 (+)	taatacgactcactataGGCTTCCCTGCGGCAGCCTGgttttagagctagaa	0	0	2.67
56	17:16419249-16419272 (+)	taatacgactcactataGGCAAATGCAATGTCCAGTTgttttagagctagaa	0	0	9.53
65	17:16419711-16419734 (+)	taatacgactcactataGGTACTGCTCCACCATCCATgtttagagctagaa	0	0	2.54
60	17:16420894-16420917 (+)	taatacgactcactataGGGGTTTCATTTCTTGAGCgttttagagctagaa	0	0	3.20

Slika 9. Prikaz sekvenci vodilje za inaktivaciju Tdp1 proteina u zebri. Zelenim pravokutnikom označena je odabrana sekvenca na temelju kriterija opisanih u potpoglavlju 3.2.1.

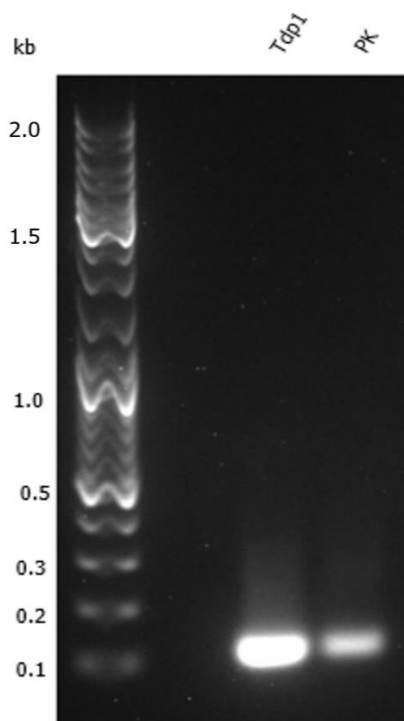
Tablica 7. Izabrane početnice za provođenje genotipizacije HRMA metodom

Tdp1	sekvenca početnice 5'-3'	duljina (nt)	GC%	Tm (°C)
<i>forward</i>	CTGCTCCAAGAAATGAACCCC	21	52	59
<i>reverse</i>	CAGTCTTCTTCTTCCTTTTGGACT	25	40	59

U prvom koraku sinteze RNA vodilje sljepljuju se sintetizirane DNA sekvence (Slika 6.) te se provodi lančana reakcija polimerazom (PCR) (57) u kojoj se specifičnim početnicama (IVT-REV i IVT-FWD, Slika 6.) umnaža DNA kalup koji služi kao osnova za dobivanje RNA vodilje. Za uspješno stvaranje i umnažanje DNA kalupa napravljena/pomješana je reakcija sa slijedećim komponentama: crDNA sekvenca, tracDNA sekvenca, par specifičnih početnica, otopina deoksiribonukleotida, *phusion high fidelity* (Pfx) polimeraza i *Phusion High Fidelity* (PHF) pufer. crDNA sekvenca sastoji se od (1) promotorske sekvence za viralnu T7 polimerazu koji je potreban

kako bi se *in vitro* transkripcijom DNA kalup mogao prevesti u RNA vodilju; (2) ciljne sekvence dugačke 20 nukleotida koja se komplementarno veže uzvodno od PAM regije (NGG) u području egzona broj 2 *tdp1* gena zebrice (crRNA) i (3) sekvence od 15 nt-a koja će se komplementarno vezati na tracDNA (Slika 6.). TracDNA sekvenca na kraju uključuje i terminatorsku sekvencu za T7 polimerazu (Slika 6.). Nakon sljepljivanja crDNA (IVT-sgRNA-long) i tracRNA (IVT-scaffold-long) (slika 6.), ovaj kalup se umnaža PCR reakcijom pomoću specifičnih početnica (IVT-FWD, IVT-REV), koje se sljepljuju sa T7 promotorskom i T7 terminatorskom sekvencom (Slika 6.). Specifične početnice imaju ulogu klice za Pfx polimerazu kako bi mogla sintetizirati komplementarne lance koristeći dodane deoksiribonukleotide. Pfx polimeraza izrazito je precizna te ima 3'-5' lektorirajuću egzonukleaznu aktivnost. Korištenjem ove polimeraze minimiziraju se moguće greške u redosljedu nukleotida koje su nepoželjne jer smanjuju efikasnost inaktivacije ciljanog proteina povećavajući nespecifično (eng. *off target*) sparivanje RNA vodilje s genomskom DNA. PHF pufer koristi se kako bi se postigli optimalni uvjeti za rad Pfx polimeraze te sadrži Mg²⁺ ione koji polimerazi služe kao kofaktor. Uz nabrojane komponente provodi se sinteza i umnažanje DNA kalupa prema opisanom napatku u potpoglavlju 3.2.2. Rezultat eksperimenta bio je umnožena dvolančana DNA molekula dugačka 125 parova baza. Rezultat je provjeren spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije DNA kalupa pomoću *Nanodrop* uređaja i provođenjem DNA elektroforeze. Izmjerena koncentracija iznosila je 1138.97 ng/μL što potvrđuje prisutnost DNA kalupa. Na priloženoj slici provedene gel elektroforeze (slika 9.), u trećoj jažici u kojoj se nalazi *tdp1* DNA kalup, vidljiva je jedna specifična vrpca dugačka otprilike 125 pb što također potvrđuje uspješnu sintezu i umnažanje DNA kalupa. Pozitivna kontrola (PK) u četvrtoj jažici sadrži već provjereni drACRCg1 DNA kalup čija prisutnost u obliku jedne specifične vrpce potvrđuje ispravnost provođenja DNA gel elektroforeze. Prije provedbe DNA elektroforeze provedeno je pročišćavanje DNA kalupa koristeći *Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (NEB)* prema napatku potopglavlja 3.2.6. te provjera uspješnosti pročišćavanja spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije pomoću *Nanodrop* uređaja. Izmjerena koncentracija DNA kalupa iznosila je 113.16 ng/μL što upućuje na uspješno provedeno DNA pročišćavanje. Smanjenje količine DNA kalupa sa 28.47 μg prije pročišćavanja na 1.11 μg nakon pročišćavanja rezultat je uklanjanja zaostalih deoksiribonukleotida iz PCR reakcije (nema prividnog povećanja koncentracije kod spektrofotometrijskog mjerenja radi upijanja dNTP-ova) i gubicima pri izvođenju pročišćavanja. Kolona korištena za pročišćavanje ima kapacitet vezanja 5 μg DNA pri čemu prisutnost drugih molekula poput nukleotida i proteina može umanjiti efikasnost vezanja DNA. Također, efikasnost

procesa smanjuje se u svakom koraku pročišćavanja zbog nesavršenog dizajna kolona i kita te se uspješnost pročišćavanja sveukupno kreće između 70-90% (59).



Slika 9. Prikaz DNA gel elektroforeze nakon umnažanja Tdp1 DNA kalupa PCR-om

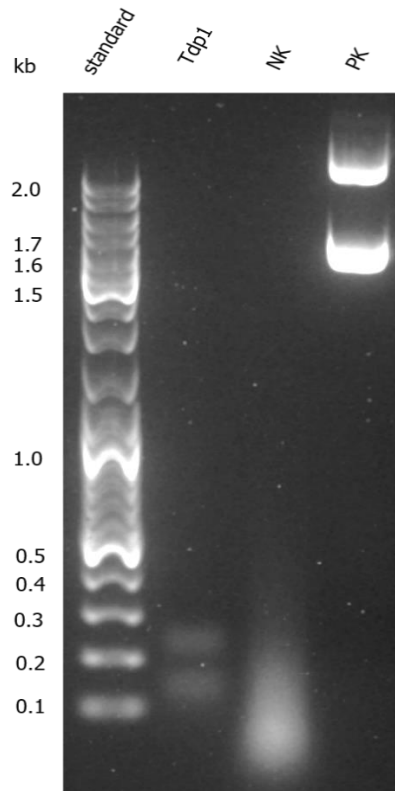
(Gustoća agaroznog gela iznosila je 1.2% , napon 120 V , trajanje elektroforeze bilo je 30 minuta. U prvoj jažici nalazi se standard – 0.1-10kb *DNA ladder Thermo* (1 μ L), u drugoj Tdp1 – DNA kalup- 100 ng, a u trećoj PK – pozitivna kontrola, drACRCg1- 100 ng).

Konačan korak u stvaranju RNA vodilje predstavlja provođenje *in vitro* transkripcije (IVTR) kojom se DNA kalup pomoću T7 RNA polimeraze prevodi u RNA vodilju (Slike 6. i 7.). T7 polimeraza sjeda na promotorsku sekvencu DNA kalupa te koristeći dodane ribonukleotide sintetizira jednolančanu RNA vodilju (Slika 7.). U smjesu se dodaje T7 reakcijski pufer kojim se postižu optimalni uvjeti za djelovanje T7 polimeraze, a sadrži Mg^{2+} ione koji T7 polimerazi služe kao kofaktor. Budući da je RNA molekula podložna degradaciji nukleazama u eksperimentu se koristila voda iz koje su uklonjene RNA nukleaze (Invitrogen), te su sve površine i pipete prethodno očišćene *RNAse away* otopinom koja inaktivira postojeće RNaze u okolišu. Nakon 6 sati IVTR reakcije, u smjesu je dodana DNazaI kako bi razgradila DNA kalup. Jedinica DNazaI razgrađuje 10 μ g DNA u 10 min pri 37 °C. Radi provjere aktivnosti DNazaI paralelno sa pripremanjem smjese

za IVTR priprema se i kontrolna smjesa. Kontrolna smjesa sastoji se od pKHR5 plazmida otopljenog u vodi pri čemu je količina DNA plazmida jednaka količini DNA kalupa u reakcijskoj smjesi (1.13 µg). Prilikom dodavanja DNazeI u reakcijsku smjesu, istovremeno se jednaka količina DNazeI (2 U) dodaje i u kontrolu gdje se očekuje degradacija plazmida. Nakon završetka razgradnje kalupa DNazomI, koncentracija RNA vodilje provjerava se spektrofotometrijski na *Nanodrop* uređaju, dok se integritet RNA vodilje provjerio pomoću RNA elektroforeze kako bi utvrdili uspješnost eksperimenta. Produkt IVTR-a trebala bi biti jednolačana RNA molekula dugačka 95 nukleotida. Koncentracija izmjerena *Nanodrop* uređajem iznosila je 2010 ng/µL što je potvrda prisutnosti RNA vodilje. Prinos IVTR reakcije izrazito je velik (40 µL u 20 µL smjese). Na priloženoj slici RNA elektroforeze (slika 9.), u jažici 2 nalazi se Tdp1 RNA vodilja, vidljiva je jedna slaba vrpca duljine oko 95 nukleotida koja pripada RNA vodilji i jedna slaba vrpca duljine oko 200 parova baza što upućuje na stvaranje RNA dimera (2 x 95 nt = 190 nt). Prisutnost ovih vrpca potvrđuje uspješnu sintezu RNA vodilje. U trećoj jažici u kojoj se nalazi negativna kontrola (NK), koja sadrži plazmid pKHR5 i DNazuI, vidljiv je razmaz koji upućuje na uspješnu degradaciju DNA plazmida DNazomI odnosno potvrđuje ispravnost enzima. U četvrtoj jažici nalazi se pozitivna kontrola (PK) koja sadrži plazmid pKHR5 i na gelu su vidljive dvije vrpce. Intenzivnija vrpca pripada lineariziranom obliku plazmida, a slabija vrpca kružnom obliku plazmida koji zbog svoje konformacije putuje sporije u odnosu na linearizirani oblik i zaostaje u gelu. Vidljive vrpce u četvrtoj jažici potvrđuju prisutnost plazmida korištenog za negativnu kontrolu. Prije provođenja RNA elektroforeze pristupa se pročišćavanju RNA vodilje koristeći *RNA cleanup kit (NEB)* kako je opisano u potpoglavlju 3.2.6. Kako bi se provjerila uspješnost pročišćavanja RNA, koncentracija je izmjerena spektrofotometrijski. Izmjerena koncentracija iznosi 1934 ng/µL što potvrđuje prisutnost RNA vodilje, odnosno uspješno pročišćavanje. Smanjenje koncentracije u odnosu na početnu koncentraciju RNA nakon IVTR reakcije i dodatka DNazeI, rezultat je uklanjanja ribonukleotida iz reakcijske smjese (koji se kao i RNA očitavaju na 260 nm valne duljine) (60) i gubitaka prilikom pročišćavanja. Kapacitet vezanja kolone kita za pročišćavanje iznosi 50 µg prilikom čega RNA molekuli za vezanje mogu konkurirati proteini i ribonukleotidi iz uzorka i time smanjiti izvornu efikasnost vezanja. Također, zbog nesavršenosti samog kita u svakom koraku pročišćavanja prisutni su određeni gubici te krajnji prinos može iznositi 70-100% početne količine uzorka (61).

Eksperiment je uspješno proveden: iz 1.1 µg DNA kalupa dobiveno je 38.68 µg RNA vodilje što je 35 puta više RNA vodilje u odnosu na početnu količinu DNA kalupa. RNA vodilja se na kraju

eksperimenta alikvotizirala i pohranila na -80 °C. Pripremljeno je 5 alikvota po 10 µL. Budući da je RNA molekula podložna raspadanju prilikom učestalog odmrzavanja i zamrzavanja, pri korištenju alikvota potrebno je isto izbjegavati.



Slika 10. Prikaz RNA gel elektroforeze nakon provedene *in vitro* transkripcije (Gustoća agaroznog gela iznosila je 1.2%, napon 120 V, trajanje elektroforeze bilo je 30 minuta. U prvoj jažici nalazi se standard: 0.1-10kb *DNA ladder Thermo* (1 µL), u drugoj Tdp1- RNA vodilja - 100 ng, u trećoj NK- negativna kontrola, plazmid pKHR5 + DNazaI i u četvrtojPK- pozitivna kontrola pKHR5 - 10 ng).

5. Zaključak

Provedenim eksperimentima uspješno je sintetizirana RNA vodilja za inaktivaciju *tdp1* gena u zebri *Danio rerio*. RNA vodilja dobivena je u izrazito visokom prinosu i kvaliteti. Koristeći sintetiziranu RNA vodilju za inaktivaciju *tdp1* gena u zebri, znanstvenici Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu steći će uvid u posljedice delecije Tdp1 na popravak DPC-a i posljedično na cijeli organizam zebre. Dobiveni rezultati

produbiti će razumijevanje funkcije Tdp1 *in vivo*. Time će se doprinijeti bržem razvoju strategija u borbi protiv bolesti uzrokovanih mutacijama u genu za Tdp1 i kreiranju antitumorskih lijekova koji inaktivacijom Tdp1 i srodnih proteina uzrokuju apoptozu invazivnih stanica raka.

6. Popis literature

1. Ming, X., Groehler IV, A., Michaelson-Richie, E. D., Villalta, P. W., Campbell, C., & Tretyakova, N. Y. (2017). Mass spectrometry based proteomics study of cisplatin-Induced DNA–protein cross-linking in human fibrosarcoma (HT1080) cells. *Chemical research in toxicology*, **30(4)**, 980-995.
2. Fielden, J., Ruggiano, A., Popović, M., & Ramadan, K. (2018). DNA protein crosslink proteolysis repair: From yeast to premature ageing and cancer in humans. *DNA repair*, **71**, 198-204.
3. Sun, Y., Saha, S., Wang, W., Saha, L. K., Huang, S. Y. N., & Pommier, Y. (2020). Excision repair of topoisomerase DNA-protein crosslinks (TOP-DPC). *DNA repair*
4. Stingele J, Jentsch S. (2015) DNA-protein crosslink repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet] **16(8)**:455–60.
5. Aparicio, T., Baer, R., Gottesman, M., & Gautier, J. (2016). MRN, CtIP, and BRCA1 mediate repair of topoisomerase II–DNA adducts. *Journal of Cell Biology*, **212(4)**, 399-408.
6. Hoa, N. N., Shimizu, T., Zhou, Z. W., Wang, Z. Q., Deshpande, R. A., Paull, T. T., ... & Takeda, S. (2016). Mre11 is essential for the removal of lethal topoisomerase 2 covalent cleavage complexes. *Molecular cell*, **64(3)**, 580-592.
7. Deshpande, R. A., Lee, J. H., Arora, S., & Paull, T. T. (2016). Nbs1 converts the human Mre11/Rad50 nuclease complex into an endo/exonuclease machine specific for protein-DNA adducts. *Molecular cell*, **64(3)**, 593-606.
8. Vaz, B., Popovic, M., & Ramadan, K. (2017). DNA–protein crosslink proteolysis repair. *Trends in biochemical sciences*, **42(6)**, 483-495.
9. Baker, D. J., Wuenschell, G., Xia, L., Termini, J., Bates, S. E., Riggs, A. D., & O'Connor, T. R. (2007). Nucleotide excision repair eliminates unique DNA-protein cross-links from mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, **282(31)**, 22592-22604.
10. Paull, T. T. (2018). 20 years of Mre11 biology: no end in sight. *Molecular cell*, **71(3)**, 419-427.
11. Moura M De, Houten B Van. (2010) Review Article. *Environ Mol Mutagen* [Internet] **405**(April):391–405.
12. Hoeijmakers, J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *New England Journal of Medicine*, **361(15)**, 1475-1485.
13. De Bont, R., & Van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, **19(3)**, 169-185.
14. Guo, L., Zhao, Y., Liu, D., Liu, Z., Chen, C., Xu, R., ... & Kong, M. G. (2018). Cold atmospheric-pressure plasma induces DNA–protein crosslinks through protein oxidation. *Free Radical Research*, **52(7)**, 783-798.

15. Stingele, J., Schwarz, M. S., Bloemeke, N., Wolf, P. G., & Jentsch, S. (2014). A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair. *Cell*, **158**(2), 327-338.
16. Oleinick, N. L., Chiu, S. M., Ramakrishnan, N., & Xue, L. Y. (1987). The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *The British journal of cancer. Supplement*, **8**, 135.
17. Ming, X., Michaelson-Richie, E. D., Groehler IV, A. S., Villalta, P. W., Campbell, C., & Tretyakova, N. Y. (2020). Cross-linking of the DNA repair protein O6-alkylguanine DNA alkyltransferase to DNA in the presence of cisplatin. *DNA repair*
18. Prasad, R., Horton, J. K., Dai, D. P., & Wilson, S. H. (2019). Repair pathway for PARP-1 DNA-protein crosslinks. *DNA repair*, **73**, 71-77.
19. Vaz, B., Popovic, M., Newman, J. A., Fielden, J., Aitkenhead, H., Halder, S., ... & Drobnitzky, N. (2016). Metalloprotease SPRTN/DVC1 orchestrates replication-coupled DNA-protein crosslink repair. *Molecular cell*, **64**(4), 704-719.
20. Stingele, J., Bellelli, R., & Boulton, S. J. (2017). Mechanisms of DNA-protein crosslink repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **18**(9), 563-573.
21. Stingele, J., Bellelli, R., Alte, F., Hewitt, G., Sarek, G., Maslen, S. L., ... & Skehel, J. M. (2016). Mechanism and regulation of DNA-protein crosslink repair by the DNA-dependent metalloprotease SPRTN. *Molecular cell*, **64**(4), 688-703.
22. Fielden, J., Wiseman, K., Torrecilla, I., Li, S., Hume, S., Chiang, S. C., ... & Domingo, E. (2020). TEX264 coordinates p97-and SPRTN-mediated resolution of topoisomerase 1-DNA adducts. *Nature communications*, **11**(1), 1-16.
23. Lessel, D., Vaz, B., Halder, S., Lockhart, P. J., Marinovic-Terzic, I., Lopez-Mosqueda, J., ... & Cabrera, E. (2014). Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features. *Nature genetics*, **46**(11), 1239-1244.
24. Pouliot, J. J., Yao, K. C., Robertson, C. A., & Nash, H. A. (1999). Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. *Science*, **286**(5439), 552-555.
25. Brettrager, E. J., & van Waardenburg, R. C. (2019). Targeting Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I to enhance toxicity of phosphodiester linked DNA-adducts. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, **2**, 1153.
26. Brettrager, E. J., Segura, I. A., & van Waardenburg, R. C. (2019). Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase I N-Terminal Domain Modifications and Interactions Regulate Cellular Function. *Genes*, **10**(11), 897.
27. Pommier, Y., Shar-yin, N. H., Gao, R., Das, B. B., Murai, J., & Marchand, C. (2014). Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (tdp1 and tdp2). *DNA repair*, **19**, 114-129.
28. Interthal, H., Pouliot, J. J., & Champoux, J. J. (2001). The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(21), 12009-12014.
29. Davies, D. R., Interthal, H., Champoux, J. J., & Hol, W. G. (2002). The crystal structure of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase, Tdp1. *Structure*, **10**(2), 237-248.
30. Das, B. B., Antony, S., Gupta, S., Dexheimer, T. S., Redon, C. E., Garfield, S., ... & Pommier, Y. (2009). Optimal function of the DNA repair enzyme TDP1 requires its phosphorylation by ATM and/or DNA-PK. *The EMBO journal*, **28**(23), 3667-3680.
31. Interthal, H., & Champoux, J. J. (2011). Effects of DNA and protein size on substrate cleavage by human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *Biochemical Journal*, **436**(3), 559-566.

32. Pommier, Y., Barcelo, J. M., Rao, V. A., Sordet, O., Jobson, A. G., Thibaut, L., ... & Agama, K. (2006). Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, **81**, 179-229.
33. Das, B. B., Huang, S. Y. N., Murai, J., Rehman, I., Ame, J. C., Sengupta, S., ... & Majumder, H. K. (2014). PARP1–TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I–induced DNA damage. *Nucleic acids research*, **42(7)**, 4435-4449.
34. Katyal, S., El-Khamisy, S. F., Russell, H. R., Li, Y., Ju, L., Caldecott, K. W., & McKinnon, P. J. (2007). TDP1 facilitates chromosomal single-strand break repair in neurons and is neuroprotective in vivo. *The EMBO journal*, **26(22)**, 4720-4731.
35. Hawkins, A. J., Subler, M. A., Akopiants, K., Wiley, J. L., Taylor, S. M., Rice, A. C., ... & Povirk, L. F. (2009). In vitro complementation of Tdp1 deficiency indicates a stabilized enzyme-DNA adduct from tyrosyl but not glycolate lesions as a consequence of the SCAN1 mutation. *DNA repair*, **8(5)**, 654-663.
36. Interthal, H., Chen, H. J., & Champoux, J. J. (2005). Human Tdp1 cleaves a broad spectrum of substrates, including phosphoamide linkages. *Journal of Biological Chemistry*, **280(43)**, 36518-36528.
37. Willemsen, R., van't Padje, S., van Swieten, J. C., & Oostra, B. A. (2011). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for dementia. In *Animal Models of Dementia* (pp. 255-269). Humana Press.
38. Meyers, J. R. (2018). Zebrafish: development of a vertebrate model organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, **16(1)**, e19.
39. Canales, C. P., & Walz, K. (2019). The mouse, a model organism for biomedical research. In *Cellular and Animal Models in Human Genomics Research*. Academic Press (pp. 119-140).
40. Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of bacteriology*, **200(7)**.
41. Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, **346(6213)**.
42. Mohanraju, P., Makarova, K. S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E. V., & Van der Oost, J. (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*, **353(6299)**.
43. Yan, F., Wang, W., & Zhang, J. (2019). CRISPR-Cas12 and Cas13: the lesser known siblings of CRISPR-Cas9. *Cell Biol Toxicol* **35(6)**:489–92
44. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, **337(6096)**, 816-821.
45. Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., & Charpentier, E. (2018). The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. *Cell*, **172(6)**, 1239-1259.
46. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013;**8(11)**:2281–308.
47. Redman M, King A, Watson C, King D. (2016) What is CRISPR/Cas9? Vol. **101**, Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition p. 213–5.
48. Modzelewski, A. J., Chen, S., Willis, B. J., Lloyd, K. K., Wood, J. A., & He, L. (2018). Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology. *Nature protocols*, **13(6)**, 1253-1274.

49. Moreno-Mateos, M. A., Vejnar, C. E., Beaudoin, J. D., Fernandez, J. P., Mis, E. K., Khokha, M. K., & Giraldez, A. J. (2015). CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nature methods*, **12**(10), 982-988.
50. Taylor S, Scott R, Kurtz R, Fisher C, Patel V. (2009) A practical guide to High Resolution Melt Analysis genotyping. Bio-Rad Lab Tech Note [Internet].
51. Hunt SE, McLaren W, Gil L, Thormann A, Schuilenburg H, Sheppard D, et al. (2018) Ensembl variation resources. Database (Oxford) **2018**(8):1–12.
52. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. **41**, No. **41**, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000..
53. Zhu, X., Clarke, R., Puppala, A. K., Chittori, S., Merk, A., Merrill, B. J., ... & Subramaniam, S. (2019). Cryo-EM structures reveal coordinated domain motions that govern DNA cleavage by Cas9. *Nature structural & molecular biology*, **26**(8), 679-685.
54. Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., ... & Root, D. E. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nature biotechnology*, **32**(12), 1262-1267.
55. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, **13**(1), 134.
56. PrimerSelect®. Version7. DNASTAR. Madison, WI.pdf.
57. Hill, P. J., & Stewart, G. S. (1992). The polymerase chain reaction in molecular and microbiology. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, **10**(1), 343-378.
58. Bio-Rad. (2016) ChemiDoc and ChemiDoc MP Imaging Systems with Image Lab Touch Software. Bio-Rad Manuals
59. New England Biolabs. - Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg) <<https://www.neb.uk.com/>>pristupljeno 28. lipnja 2020.
60. Yashchuk, V. M., Kudrya, V. Y., Levchenko, S. M., Tkachuk, Z. Y., Hovorun, D. M., Mel'nik, V. I., ... & Klishevich, G. V. (2011). Optical response of the polynucleotides-proteins interaction. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, **535**(1), 93-110.
61. New England Biolabs. (2019). Monarch Nucleic Acid Purification Make the right choice and migrate to Monarch. NEB Manuals

ZAHVALNICA

Ovim putem želim se zahvaliti mentoru doc. dr. sc. Igoru Stupareviću i svim suradnicima Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu na pomoći pri izradi završnog rada, posebno dr.sc. Marti Popović, mag. Ivanu Antičeviću, mag. Christine Supini i Luki Jukiću

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Arijana Dubović

