

Korištenje CRISPR/Cas9 metode za inaktivaciju puta DNA popravka izrezivanjem nukleotida (engl. Nucleotide Excision Repair) u zebrici (Danio Rerio)

Mance, Lucija

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:159:809703>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Lucija Mance

7703/BT

**Korištenje CRISPR/Cas9 metode za inaktivaciju puta
DNA popravka izrezivanjem nukleotida (engl.
Nucleotide Excision Repair) 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 puta DNA popravka izrezivanjem nukleotida (engl. *Nucleotide Excision Repair*) u zebrici (*Danio Rerio*)

Lucija Mance, 0058213735

Sažetak: Cilj ovog rada bio je konstruirati RNA vodilju (engl. *single guide RNA, sgRNA*) za CRISPR/Cas9 inaktivaciju *xpa* gena u ribi zebrici (lat. *Danio rerio*), sa svrhom inaktivacije puta DNA popravka izrezivanjem nukleotida (engl. *Nucleotide Excision Repair, NER*), kako bi se utvrdila uloga NER puta popravka u DPC popravku (engl. *DNA-protein crosslink repair, DPC repair*) *in vivo* u modelnom organizmu. Dizajniran je DNA kalup za sintezu sgRNA za *xpa in silico* te *in vitro* sljepljivanjem DNA proba. Kalup je umnožen lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) te vizualiziran DNA elektroforezom u agaroznom gelu. PCR amplikon služio je kao kalup za sintezu sgRNA *in vitro* transkripcijom. Kao provjera *in vitro* transkripcije provedena je RNA elektroforeza u agaroznom gelu. Sintetizirana sgRNA visoke je kvalitete i koncentracije. Uspješnost djelovanja sgRNA dalje se provjerava konstrukcijom Cas9/sgRNA kompleksa, mikroinjektiranjem embrija zebrice i praćenjem uvedenih promjena genotipizacijom pomoću HRMA metode (engl. *High Resolution Melting Analysis*).

Ključne riječi: CRISPR/Cas9, DPC, NER, *xpa*, zebrica

Rad sadrži: 35 stranica, 11 slika, 7 tablica, 64 literaturna navoda, 0 priloga

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, Institut Ruđer Bošković

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

**Use of CRISPR/Cas9 method for inactivation of DNA repair with Nucleotide
Excision Repair in zebrafish (*Danio rerio*)**

Lucija Mance, 0058213735

Abstract: The aim of this paper was to create single guide RNA (sgRNA) for CRISPR/Cas9 *xpa* gene inactivation in zebrafish (lat. *Danio rerio*) and consequently Nucleotide Excision Repair (NER) inactivation. The purpose of inactivation is to investigate the role of NER in DNA-protein crosslink repair (DPC repair). Firstly, DNA template for *xpa* sgRNA was designed *in silico*. DNA template synthesis *in vitro* included linking of DNA probes and amplification of the template by polymerase chain reaction (PCR) and its visualisation using DNA electrophoresis in agarose gel. PCR amplicon was used as a template for sgRNA synthesis using *in vitro* transcription. Presence of RNA was confirmed by RNA electrophoresis in agarose gel. Synthesized sgRNA was of high quality and concentration. Subsequently, efficiency of sgRNA synthesis will be checked after Cas9/sgRNA complex construction and microinjection in zebrafish embryos followed by genotyping using HRMA method.

Keywords: CRISPR/Cas9, DPC, NER, *xpa*, zebrafish

Thesis contains: 35 pages, 11 figures, 7 tables, 64 references, 0 supplements

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, Institute Ruđer Bošković

Defence date: July 10th 2020

Zahvaljujem se mentoru doc.dr.sc. Igoru Stupareviću te svim suradnicima Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, posebice dr.sc. Marti Popović, mag. Christine Supini, mag. Ivanu Antičeviću i Luki Jukiću na strpljenju, izdvojenom vremenu, nesebičnim savjetima i podijeljenom znanju.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Zebrica (lat. <i>Danio rerio</i>) kao modelni organizam.....	2
2.2. Oštećenja DNA	2
2.3. Unakrsno vezanje DNA-protein (engl. <i>DNA-protein crosslinks</i>)	5
2.4. DNA-protein <i>crosslink</i> popravak.....	6
2.5. Uloga proteaza u DPC popravku	8
2.6. Nukleotidni ekscizijski popravak (engl. <i>Nucleotide Excision Repair</i> , NER)	10
2.7. Uloga nukleotidnog ekscizijskog popravka u popravku DPC-a (engl. <i>DNA-protein crosslink</i>)	12
2.8. CRISPR/Cas9 editiranje genoma.....	14
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Materijali	17
3.1.1. Plazmidi.....	17
3.1.2. Oligonukleotidi	18
3.1.3. Otopine i puferi	18
3.1.4. Kemikalije i enzimi	19
3.2. Metode	20
3.2.1. <i>In silico</i> dizajn i sinteza RNA vodilje (engl. <i>single guide RNA</i> , <i>sgRNA</i>) i početnica	20
3.2.2. Lančana reakcija polimeraze.....	20
3.2.3. Agarozna gel elektroforeza	21
3.2.4. Pročišćavanje DNA nakon PCR-a i mjerenje koncentracije DNA.....	22
3.2.5. <i>In vitro</i> transkripcija	23
3.2.6. Pročišćavanje RNA vodilje (engl. <i>single guide RNA</i> , <i>sgRNA</i>) nakon <i>in vitro</i> transkripcije i mjerenje koncentracije RNA.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. <i>In silico</i> odabir sekvence RNA vodilje (engl. <i>single guide RNA</i> , <i>sgRNA</i>) i početnica za genotipizaciju	24
4.2. Izrada RNA vodilje (engl. <i>single guide RNA</i> , <i>sgRNA</i>) za inaktivaciju <i>xpa</i> gena zebrice (lat. <i>Danio rerio</i>).....	27
4.3. <i>In vitro</i> transkripcija i sinteza RNA vodilje (engl. <i>single guide RNA</i> , <i>sgRNA</i>).....	30
5. ZAKLJUČAK	32
6. LITERATURA	32

1. UVOD

Genetski materijal u stanici neprekidno je izložen negativnom djelovanju endogenih i egzogenih čimbenika. Kao posljedica izloženosti takvim čimbenicima nastaje velik broj različitih oštećenja DNA poput abazičnih mjesta, pogrešnog sparivanja baza, jednolančanih i dvolančanih lomova. Jedno od najtežih oštećenja genetskog materijala u stanici čine unakrsno povezani DNA i proteini (engl. *DNA-protein crosslink, DPC*). Postoje dvije velike grupe DPC-a, a to su enzimski i neenzimski DPC-i. Enzimski DPC-i nastaju ireverzibilnim vezanjem enzima koji djeluju u sklopu DNA replikacije, transkripcije ili popravka DNA. Druga skupina, neenzimski DPC-i nastaju ako se djelovanjem kemijskih ili fizikalnih čimbenika bilo koji protein ireverzibilno kovalentno veže na DNA. DPC-i u stanicama uzrokuju mutacije, kromosomske aberacije i steričke smetnje fizioloških procesa. Ako ostanu nepopravljeni javljaju se različite bolesti ili smrt organizma (1, 2).

DPC popravak (engl. *DNA-protein crosslink repair*) ključan je za očuvanje integriteta stanica. Put popravka DPC-a vrši Sprtn metaloproteaza koja proteolizom reducira veličinu proteina unutar DPC-a. Umanjeni peptidi zaostali nakon djelovanja Sprtn-a uklanjaju se nekim od narednih puteva DPC popravka (engl. *downstream*). Ako proteinsku komponentu DPC-a čine topoizomeraza 1 i 2, DPC popravak provest će se enzimima tirozil-DNA fosfodiesterazom 1 i 2 (Tdp1/2). Nakon uklanjanja DPC-a, DNA ostaje sa dvolančanim ili jednolančanim lomovima. Dvolančani lomovi popravljaju se homolognom rekombinacijom (engl. *Homologous Recombination, HR*) i nehomolognim sparivanjem krajeva (engl. *Non-Homologous End Joining, NHEJ*). Jednolančani lomovi popravljaju se ligacijom jednolančanog loma pomoću DNA ligaze, baznim ekscizijskim popravkom (engl. *Base Excision Repair, BER*) te nukleotidnim ekscizijskim popravkom (engl. *Nucleotide excision Repair, NER*) (1, 2).

S obzirom da u procesima BER-a i NER-a sudjeluje velik broj različitih proteina, još nije točno utvrđena uloga svakog od tih proteina u DPC popravku. Cilj ovog rada bio je konstruirati RNA vodilju (engl. *single guide RNA, sgRNA*) za CRISPR/Cas9 kompleks čijom će se primjenom *in vivo* u ribi zebri (lat. *Danio rerio*) pokušati otkriti uloga NER puta popravka u popravku DPC-a inaktivacijom *xpa* gena, koji je centralni dio NER-a, pomoću Cas9 endonukleaze. DNA kalup za sintezu RNA vodilje za *xpa* gen dizajniran je *in silico* te je izrađen u laboratoriju *in vitro* sljepljivanjem DNA proba i umnažanjem DNA kalupa lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*). PCR amplikon koristio se kao kalup za sintezu RNA vodilje *in vitro* transkripcijom. Kao provjera *in vitro* transkripcije provedena je elektroforeza u agaroznom gelu. Sintetizirana RNA koristit će se u sklopu projekta u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju na Institutu Ruđer Bošković, gdje će se provjeriti uspješnost djelovanja sgRNA/Cas9 kompleksa u embrijima zebre (lat. *Danio rerio*).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Zebrica (lat. *Danio rerio*) kao modelni organizam

Riba zebrica (lat. *Danio rerio*) posljednjih se godina sve više koristi u genetičkom inženjerstvu. Njezin potencijal kao organizam s kojim je lako manipulirati otkriven je 1980-ih godina (3). Zebrica (engl. *zebrafish*) pripada nadredu pravih koštunjača (lat. *Teleostei*) unutar razreda zrakoperki (lat. *Actinopterygii*). Smatra se da se nadred *Teleostei* razvio prije približno 340 milijuna godina nakon evolucijske podjele u dvije skupine: *Actinopterygii* i *Sarcopterygii*. Uslijedila je duplikacija cijelog genoma (engl. *Whole Genome Duplication, WGD*) te za koštunjače specifična duplikacija genoma (engl. *Teleost-Specific genome Duplication, TSD*) (3). Geni nastali kao produkti WGD nazivaju se ortolozi (engl. *orthologues*). Zebrica sadrži više od 26 000 protein-kodirajućih regija, egzona, a pretpostavlja se da je tako velik broj egzona posljedica WGD događaja (3, 4).

Sekvenciranjem ljudskog genoma i genoma zebrice te usporedbom protein-kodirajućih regija, zaključeno je da ova dva organizma dijele velik postotak sličnosti genoma. Saznalo se da 71,4% ljudskog genoma sadrži minimalno jedan ortolog gena zebrice, dok 69% gena zebrice sadrži minimalno jedan ljudski ortolog. Osim visokog postotka sličnosti sa ljudskim genomom, poželjna karakteristika zebrice kao animalnog modela su vanjska oplodnja, brz embrionalni razvoj, prozirnost embrija, visok fekunditet i brz razvoj do spolne zrelosti (2,5 mjeseca) (3). Prozirnost embrija omogućuje vizualizaciju tkiva i praćenje nastalih promjena u stvarnom vremenu. Zbog navedenih poželjnih svojstava, zebrica se često koristi za otkrivanje i analizu funkcija gena kralježnjaka te istraživanje genetskih bolesti kod ljudi (3,4).

2.2. Oštećenja DNA

Oštećenja DNA su odstupanja od uobičajene strukture DNA, koja se javljaju kao posljedica djelovanja različitih čimbenika. Stanice s nastalim oštećenjem pokazuju tendenciju uklanjanja ili toleriranja oštećenja s ciljem preživljavanja i neometanog obavljanja svojih funkcija. Oštećenja DNA se s obzirom na podrijetlo dijele u dvije skupine: endogena i egzogena (1). Endogena oštećenja najčešće nastaju reakcijama oksidacije, hidrolize, alkilacije te pogrešnim sparivanjem baza uslijed oksidacijskog stresa, djelovanjem aldehida te lokalnog povećanja koncentracije reaktivnih kisikovih radikala (engl. *Reactive Oxygen Species, ROS*) ili dušikovog oksida (engl. *nitric oxide, NO*) (5, 6). Uzrok endogenih oštećenja može biti i aberantno djelovanje enzima koji sudjeluju u procesima DNA replikacije i transkripcije, poput topoizomeraza, DNA polimeraza i slično (7).

Ukoliko se u replikaciji ili popravku DNA koriste polimeraze s niskom vjernošću replikacije, koje nemaju 3'-5' lektorirajuću aktivnost, može doći do insercije jednog ili više pogrešnih nukleotida,

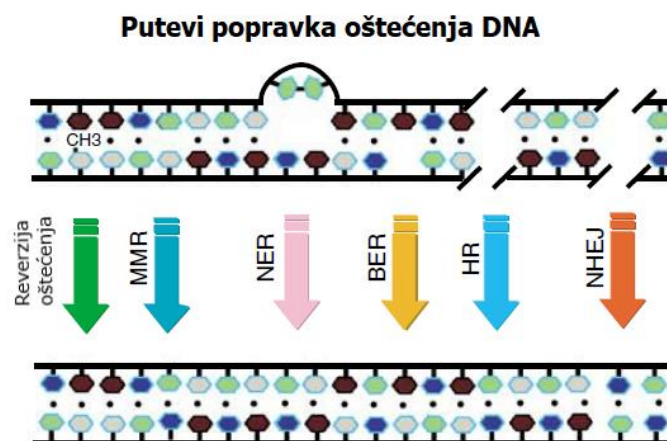
delecije ili supstitucije, što može rezultirati pomakom okvira čitanja, a posljedično i promijenjenim proteinima. Učestalost ove pojave je između 10^{-6} i 10^{-8} po stanici u jednoj generaciji. Također, takve DNA polimeraze mogu ugrađivati uracil umjesto timina u DNA lanac, imaju ograničenu homologiju s DNA i ostvaruju manji broj kontakata s DNA. Oštećenja nastala djelovanjem navedenih polimeraza mogu se fiksirati kao mutacije kroz sljedeće stanične diobe (1, 7).

Enzimi topoizomeraze imaju ključnu ulogu u transkripciji i replikaciji jer odmotavaju DNA uzvojnici uvodeći negativne superzavoje (8). Međutim, ukoliko se topoizomeraze ireverzibilno vežu za DNA kovalentnom vezom, nastaju oštećenja koja onemogućavaju odvijanje transkripcije i replikacije, *DNA-protein crosslinks (DPCs)* te mogu dovesti do pojave jednolančanih i dvolančanih lomova. Pojave poput deaminacije baza, nastanka abazičnih mjesta, metilacije DNA i oksidativnih oštećenja uzrokuju pogrešno sparivanje baza. Reaktivni kisikovi radikali (oksidi, peroksidi, superoksidi) nastaju tijekom stanične respiracije te služe kao signalne molekule u aerobnim organizmima (4, 5). No, iznad fiziološke koncentracije djeluju negativno na DNA, uzrokujući modifikacije baza te jednolančane i dvolančane lomove DNA. Stanični mehanizam zaštite od djelovanja reaktivnih kisikovih radikala jest povezivanje DNA sa histonima i djelovanje antioksidacijskih enzima (6).

S druge strane, egzogeno oštećenje DNA nastaje djelovanjem fizikalnih čimbenika poput ionizirajućeg i UV (engl. *ultraviolet*) zračenja, kemijskih agensa i farmaceutika kao što su npr. alkilirajući agensi, psoraleni i analozi baza te okolišnih utjecaja poput hipoksije i ekstremnih temperaturnih uvjeta. Ionizirajuće zračenje (*alfa, beta, gama, X*) uzrokuje oštećenje DNA direktnim i indirektnim putem (9). Indirektno, dolazi do radiolize vode te nastanka reaktivnih kisikovih radikala, abazičnih mjesta i oštećenja deoksiriboze. Direktno, djelovanjem ionizirajućeg zračenja pucaju kemijske veze, nastaju jednolančani i dvolančani lomovi te se ioniziraju baze i deoksiriboza. UV zračenje, od kojih je za DNA molekulu najriscantnije UV-C (190-290 nm), budući da je maksimum apsorpcije DNA pri 260 nm, pospješuje stvaranje kovalentne veze između dvaju pirimidinskih baza istog lanca. Nastali produkti, pirimidin-pirimidon ili ciklobutanski prsten ometaju komplementarno sparivanje i vezanje proteina na DNA. Kemijski agensi poput alkilirajućih agensa pokazuju afinitet za nukleofilne centre dušičnih baza u DNA molekuli te onemogućuju komplementarno sparivanje baza dvaju lanaca DNA (9). Ovisno o jačini oštećenja i genetičkom lokusu na kojem je nastalo oštećenje, različit je stanični odgovor na oštećenje (10). Odgovor na oštećenje DNA (engl. *DNA damage response, DDR*) uključuje djelovanje različitih signalnih proteina koji iniciraju specifične mehanizme popravka oštećenja (11).

Najteža oštećenja DNA, dvolančani lomovi, popravljaju se mehanizmom homologne rekombinacije (engl. *Homologous Recombination, HR*), nehomolognim sparivanjem krajeva (engl. *Non-Homologous End Joining, NHEJ*), mikrohomologne rekombinacije (engl. *microhomology-mediated end joining, MMEJ*) i alternativnim putevima popravka (engl. *alternative end joining, a-EJ*) (12, 13, 14) (Slika 1).

Manja oštećenja poput onih induciranih UV zračenjem ili alkilirajućim agensima popravljaju se reverzijom oštećenja djelovanjem enzima (alkiltransferaze), fotoreaktivacijom ili ligacijom jednolančanih lomova. Popravak DNA izrezivanjem baza (engl. *Base Excision Repair, BER*) aktivira se ako je oštećenje zahvatilo samo jednu bazu, što je slučaj kod oksidacije, deaminacije ili nastanka abazičnih mjesta. U BER je uključeno nekoliko enzima poput DNA-glikozidaze, AP-endonukleaze te DNA-ligaze. Mehanizam DNA popravka izrezivanjem nukleotida (engl. *Nucleotide Excision Repair, NER*) popravlja oštećenja nastala UV zračenjem. Ukoliko je djelovanjem različitih agensa došlo do nastanka kovalentne veze između dviju baza istog lanca (engl. *intrastrand crosslink, ICL*), djelovanjem proteina uključenih u Fanconi anemia (FA) put razrješavaju se nastali ICL. Aktivacija FA puta ovisna je o fazi staničnog ciklusa (1) (Slika 1). Osim popravkom, stanica djeluje na oštećenje DNA reverzijom i tolerancijom oštećenja. Tolerancija oštećenja uključuje translezijsku sintezu djelovanjem translezijskih polimeraza (REV 1, POL ζ, POL θ) koje vrše replikaciju DNA prolazeći preko DNA oštećenja. Učestalost pogrešaka ovakvih polimeraza ovisi o njihovim biokemijskim karakteristikama. Ukoliko oštećenje nije uklonjeno putevima popravka ili zaobiđeno translezijskom sintezom, nastaju brojne mutacije u stanicama, koje prerastaju u različita oboljenja te posljedično dovode do apoptoze (1) (Slika 1).



Slika 1. Putevi popravka DNA oštećenja u stanici: MMR – *mismatch repair* (popravak pogrešno sparenih baza), NER – *Nucleotide Excision Repair* (nukleotidni ekscizijski popravak), BER – *Base Excision Repair* (bazni ekscizijski popravak), HR – *Homologous*

Recombination (homologna rekombinacija), NHEJ – *Non-Homologous End Joining*
(nehomologno sparivanje krajeva) (prilagođeno iz 7).

2.3. Unakrsno vezanje DNA-protein (engl. *DNA-protein crosslinks*)

Za uobičajeno odvijanje staničnih funkcija zaslužne su interakcije DNA sa brojnim proteinima u stanici. Interakcije DNA-protein uspostavljaju se tijekom organizacije genetičkog materijala u stanici, kako bi došlo do kondenzacije i pakiranja DNA u jezgri, pomoću bazičnih histonskih oktamera. Također, brojni enzimi sudjeluju u višestupanjskim reakcijama replikacije, transkripcije i popravka DNA. U tim slučajevima, veze koje se uspostavljaju između DNA i enzima su prolazne (15).

Međutim, djelovanjem endogenih čimbenika, okolišnih čimbenika ili farmaceutika, može doći do nastanka ireverzibilnih kovalentnih veza proteina sa DNA bazama, šećerima ili popucalim fosfodiesterskim vezama. Takvi kompleksi nazivaju se DNA-protein umrežavanja (engl. *DNA-protein crosslinks, DPC*) (16, 17).

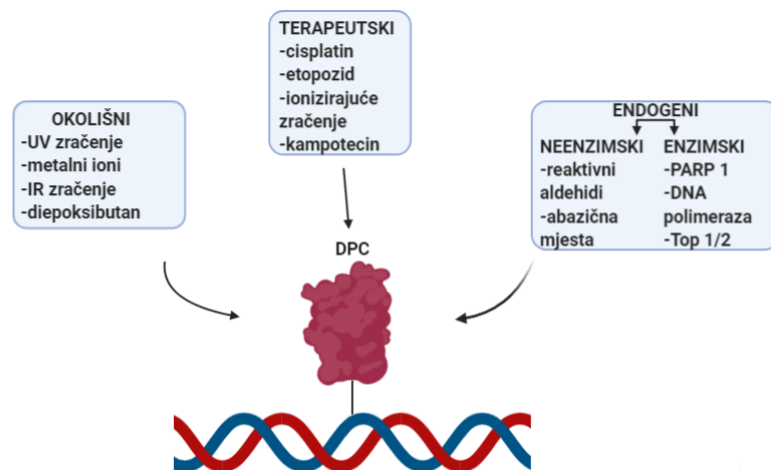
Prema mehanizmu nastanka, DPC se dijele na one nastale kemijskim umrežavanjem, ionizirajućim zračenjem te neuspjelim reakcijama između DNA i enzima koji dolaze u kontakt s DNA (18). Kemijsko umrežavanje inducirano je kemijskim spojevima koji se koriste tijekom liječenja tumora (cisplatin), štetnim spojevima iz okoliša (alkilirajući agensi) ili spojevima koji se generiraju u stanici kao intermedijeri metaboličkih procesa (aldehidi) (Slika 2). Kemijski agensi tvore monoadukte interakcijom s DNA te potom reagiraju s proteinima vezanim na DNA, tvoreći DPC (19).

Ionizirajuće zračenje, poput *gamma* i *X* zraka te kemoterapijskog zračenja, inducira tvorbu slobodnih radikala u stanici. Slobodni radikali stupaju u interakcije s proteinom vezanim na DNA ili u blizini DNA te nastaje DPC. U prosjeku, jedna zraka ionizirajućeg zračenja može producirati oko 150 DPC-a po stanici (16).

Tijekom reakcija sinteze DNA nastaju intermedijeri povezani prolaznom kovalentnom vezom. No, uslijed djelovanja aldehida, reaktivnih kisikovih radikala (engl. *Reactive Oxygen Species, ROS*), dušikovog oksida (engl. *nitric oxide, NO*) te promjena DNA uzvojnice, nastaju distorzije DNA koje onemogućavaju završetak enzimskih reakcija te se kovalentni intermedijeri stabiliziraju i postaju DPC (19).

Prema tipu proteina unutar DPC-a, isti se dijele na neenzimske i enzimске DPC-e. Neenzimski DPC-i nastaju uslijed djelovanja kemijskih tvari poput reaktivnih aldehida (formaldehid, acetaldehid). Aldehidi su lokalno prisutni u jezgri uslijed fizioloških procesa kao što je npr. demetilacija histona (2, 15). Elektrofili karbonylni ugljik aldehida privlači nukleofilne centre dušičnih baza DNA. Slijedom reakcija nastaje Schiffova baza, koja može reagirati s bazama

susjednog DNA lanca ili pozitivno nabijenim aminokiselinskim ostacima proteina formirajući DPC. Druga skupina, enzimski DPC-i nastaju kada enzim koji se kovalentno veže na DNA kako bi izvršio svoju funkciju (sinteza, popravak, razmotavanje) postane ireverzibilno vezan uslijed djelovanja endogenih promjena DNA uzvojnice ili djelovanja farmaceutika. Enzimski DPC može npr. biti poli(ADP-riboza)polimeraza 1 (Parp1), koja se kovalentno veže za 5' ili 3' krajeve jednolančanih lomova DNA te topoizomerase, koje odmataju DNA uzvojnica te se vežu za 3' kraj jednolančanog loma preko tirozinil-fosfodieterske veze (topoizomeraza 1) ili za 5' kraj dvolančanog loma također tirozinil-fosfodieterskom vezom (topoizomeraza 2) (18) (Slika 2).



Slika 2. Uzroci unakrsnog vezanja DNA-protein (engl. *DNA-protein crosslink, DPC*) (UV-ultravioletno, IR – *Infrared* (infracrveno), Parp1 - poli(ADP-riboza)polimeraza 1, Top1/2 – topoizomeraza 1/2) (20).

2.4. DNA-protein *crosslink* popravak

DPC-i predstavljaju steričke blokade koje onemogućavaju odvijanje replikacije, transkripcije i DNA popravka. Posljedično, ako ostanu nepopravljeni, dolazi do nestabilnosti genoma, kromosomskih aberacija, lomova kromatida i mutacija. Česte posljedice za organizam su karcinomi, genetske bolesti ili smrt (2, 17, 21).

DPC popravak velik je izazov budući da su DPC-i iznimno raznoliki te uključuju širok raspon staničnih proteina koji se razlikuju u svojim fizikalno-kemijskim karakteristikama (npr. veličina, naboj, struktura), i mehanizmu vezanja ovisno o induktoru DPC-a (npr. aldehyd, etopozid). Osim toga, popravak DPC-a predstavlja problem zbog toga što im je često teško fizički pristupiti (16). Centralni čimbenik DPC popravka je Sprtn proteaza koja smanjuje proteinski dio DPC-a, ostavljajući peptidni ostatak u DNA uzvojnici. Peptidni ostatak dalje uklanja nukleotidni ekscizijski put popravka (engl. *Nucleotide Excision Repair, NER*) ili specifično enzimi tirozil-DNA fosfodiesteraze 1 i 2 (Tdp1/2) u slučaju enzimskih Top1/Top2 DPC-eva. Trenutno je nepoznato

jesu li i drugi stanični proteini uključeni u DPC popravak te je ova tema predmet intenzivnog istraživanja u razdoblju od 2016. godine kada je otkrivena uloga Sprtn proteaze u DPC popravku (21).

Popravak enzimskih DPC-a, posebice Topoizomeraza 1 i 2 (Top1/2) specifično je vezan uz djelovanje enzima tirozil-DNA fosfodiesteraze 1 i 2. Topoizomeraza DPC-i u stanici mogu nastati endogeno, uslijed poremećaja normalnih enzimskih ciklusa, ukoliko enzim naiđe na promjene u DNA uzvojnici. Egzogeno se ovaj tip DPC-a javlja uslijed djelovanja kemoterapeutika - kampotecina i etopozida koji kovalentnu vezu Top-DNA čine ireverzibilnom (engl. *crosslink*). Topoizomeraze su enzimi koji otpuštaju superzavoje u DNA uzvojnici koji nastaju tijekom replikacije i transkripcije. Topoizomeraza 1 (Top1) uvodi jednonančani lom u jedan od DNA lanaca. Pocijepani lanac vezan je za Top1, dok drugi lanac sa slobodnom 5' hidroksilnom (OH) skupinom rotira oko intaktne DNA te smanjuje torzijsku napetost. Na kraju dolazi do religacije jednonančanog loma. U aktivnom mjestu topoizomeraze 1 nalazi se tirozinski aminokiselinski ostatak koji vrši nukleofilni napad na fosfodiestersku vezu, što rezultira vezanjem Top1 na 3' kraj jednonančanog loma (engl. *Top1 cleavage complex, Top1cc*). Veza koja nastaje naziva se tirozinil-fosfodiesterska veza. Djelovanjem toksina ili inhibitora Top1, poput kampotecina, sprječava se religacija jednonančanog loma i stabilizira se kovalentni intermedijer Top1-DNA koji se naziva Top1-DPC. U popravku Top1-DPC-a prvi ključni korak je Sprtn proteaza koja proteolitičkim cijepanjem smanjuje Top1 dio umreženja, nakon čega enzim tirozil-DNA fosfodiesteraza (Tdp1) hidrolizira tirozinil-fosfodiestersku vezu između DNA i Top1 (21, 22).

Mehanizam djelovanja topoizomeraza 2 (Top2) nešto je drugačiji. Top2 uvodi dvolančani lom u DNA lanac kako bi razriješila superzavoje. Tirozinski aminokiselinski ostatak iz aktivnog mjesta Top2 nukleofilno napada fosfodiestersku vezu, pri čemu se Top2 veže za 5' krajeve fosfatnih skupina na mjestu nastanka dvolančanog loma (engl. *Top2 cleavage complex, Top2cc*). Kemoterapeutik etopozid veže se za Top2-DNA kompleks te onemogućuje odvajanje Top2 od DNA, nakon što Top2 izvrši svoju funkciju relaksacije superzavoja te nastaje Top2-DPC. Za popravak Top2-DNA DPC-a postoje tri mehanizma. Djelovanjem Sprtn proteaze proteolitički se cijepa Top2 unutar DPC-a, dok peptidni ostatak uklanja Tdp2 (21, 22). S druge strane, Ttrap protein razmata Top2-DPC i time omogućava pristup za Tdp2. Top2-DPC može se ukloniti djelovanjem Mre11 nukleaze koja cijepa DNA 15-20 nukleotida nizvodno od Top2-DPC-a, čime se razješava DPC, a DNA oštećenje popravljiva se homolognom rekombinacijom (23, 24). Nakon uklanjanja DPC-a, dvolančani lomovi popravljaju se putevima kanonskih popravaka dvolančanog loma, homolognom rekombinacijom i nehomolognim sparivanjem krajeva. Ukoliko su uklanjanjem DPC-a nastali jednonančani lomovi, popravak se nastavlja

ligacijom jednolančanog loma pomoću DNA ligaze. Moguća je aktivacija specifičnog puta popravka jednolančanog loma (engl. *single strand break repair*) koji uključuje proteine poput poli(ADP-riboza)polimeraze 1 (PARP1) (16, 18, 19, 21, 25).

2.5. Uloga proteaza u DPC popravku

Centralnu ulogu u DPC popravku (engl. *DNA-protein crosslink repair*) imaju Wss1 proteaza kod kvasaca i njezin funkcionalni ortolog, Sprtn proteaza kod eukariota. Wss1 je kvaščeva metaloproteaza koja degradira DPC - vezane proteine. Wss1 djeluje na enzimske i na neenzimske DPC-e koje čine proteini poput histona (H1, H2A, H2B, H3 i H4) (19, 22). Eksperimentalno je dokazano da su stanice kvasaca s delecijom *wss1* gena osjetljivije na djelovanje aldehida od onih sa intaktnim genom *wss1*. Stanice s delecijom *wss1* su vijabilne (21). Wss1 je DNA ovisna proteaza tj. za njezinu proteolitičku aktivnost potrebna je prisutnost DNA. Wss1 veže DNA pomoću DNA-veznog motiva. Također, aktivnost joj raste s povećanjem količine DNA. DNA služi kao poveznica između enzima i supstrata (engl. *scaffold*). S obzirom na velik broj različitih supstrata, specifičnost ovog enzima povećana je ciljanjem DNA oštećenja putem posttranslacijskih modifikacija. Wss1 je posttranslacijski modificiran s dva Sumo proteina, strukturno slična ubikvitinu (engl. *small ubiquitin like modifier, SUMO*), koja usmjeravaju protein na mjesto djelovanja. U prilog tome ide činjenica da su Top1-cc (engl. *Top1 cleavage complex*) također obilježeni SUMO posttranslacijskom modifikacijom (engl. *SUMOylation*). Budući da je aktivno mjesto enzima usmjereno prema otapalu u kojem se odvija reakcija tj. otvorene je strukture, može vezati velik broj različitih supstrata. S druge strane, afinitet enzima prema supstratu vrlo je nizak te iz tog razloga mora biti induciran vezanjem DNA (25) (Slika 3).

Sisavci imaju protein Sprtn, funkcionalni homolog Wss1. *Sprtn* je esencijalni gen, tj. delecija istoga smrtonosna je za stanicu i organizam. Sprtn učinkovito uklanja DPC nastale vezanjem topoizomeraza, histona te one inducirane endogenim agensima poput aldehida (21). Sprtn cijepa umrežene topoizomeraze na manje fragmente koji se nadalje uklanjaju tirozil-DNA fosfodiesterazama. Sprtn sadrži ubikvitin-veznu domenu (engl. *ubiquitin interaction domain, UBZ*) i peptidni intermedijer (engl. *PCNA ili PIP box, SprT*) koji mu omogućuje vezanje na kromatinska oštećenja. UBZ i PIP domene usmjeravaju Sprtn na mjesta DNA oštećenja (26). Vezanje Sprtn-a na kromatin kontrolira se ubikvitinacijom. Monoubikvitinirani Sprtn ne veže kromatin, dok u prisutnosti DPC-a dolazi do deubikvitinacije čime je omogućeno vezanje na oštećena mjesta na kromatinu. Također, aktivnost Sprtn-a ovisi o dodatku metalnih iona i prisutnosti DNA. No, DNA koja aktivira Sprtn za degradaciju DPC-a mora biti jednolančana. Inače, dolazi do autoproteolize. Specifičnost za supstrate mu je niska i može cijepati različite

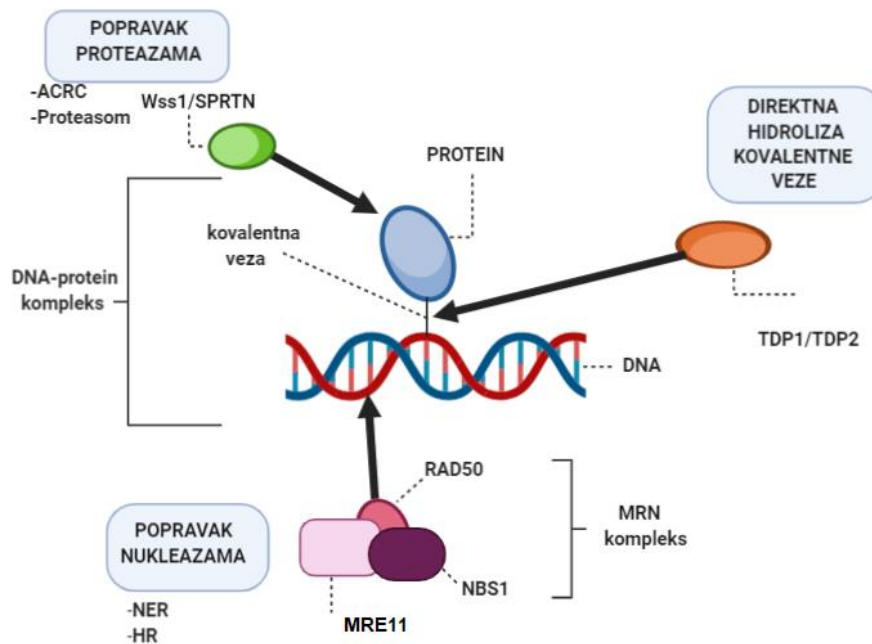
DPC-e (21). S druge strane, nema afinitet za neumrežene proteine, čime se stanica štiti od neželjene proteolize. Mutacije u *sprtn* genu rezultiraju pojavom Ruijs-Aalfs sindroma, dok su stanice s nedostatkom *sprtn*-a osjetljive na DPC-inducirajuće agense (19).

Proteolizom DPC-a sa Wss1 i Sprtn, DPC se ne uklanja potpuno sa DNA lanca. Reducira im se veličina, a zaostali peptidi uklanjaju se drugim putevima popravka kao što su Tdp enzimi i nukleotidni ekscizijski popravak (engl. *Nucleotide Excision Repair, NER*) (17, 22, 25, 26) (Slika 3).

Nedavno je otkrivena i druga potencijalna metaloproteaza, Gcna (engl. *germ cell nuclear acidic peptidase*) ili Acrc (engl. *acidic repeat containing protein*) u sisavaca (2, 27, 28, 29). Sadrži C-terminalnu katalitičku domenu koju čine dvije alfa-uzvojnice sa zinkovim ionima i glutamat (HEXXH motiv) (SprT domena) te N-terminalnu domenu (engl. *Intrinsically Disordered Region, IDR*) (2) Gcna prepoznaje DPC proteine vezanjem poliSUMO lanca pomoću SprT domene. SUMO posttranslacijska modifikacija služi i za prepoznavanje ostalih proteina koju sudjeluju u uklanjanju DPC-a u stanicama, poput Tdp2 i Mre11 nukleaze (27). Aktivnost Gcna-e najveća je u reproduktivnim stanicama (engl. *germ cells*), stanicama u rastu (engl. *proliferating cells*) tj. ranom embrionalnom razvoju, a manja je u postmitotičkim tkivima (2, 27, 28, 29) (Slika 3).

In vitro eksperimentima provedenim na obliću *Caenorhabditis elegans* pokazano je da Gcna sudjeluje u Top2-DPC popravku. *Gcna* mutanti tretirani su s toksinom topoizomeraza 1 (Top1), kaptopotecinom te toksinom topoizomeraza 2 (Top2), etopozidom. Pokazalo se da su *Gcna* mutanti osjetljivi na Top2 toksin, iz čega se indirektno zaključuje da je Gcna jedan od faktora koji uklanjaju Top2-DPC. Osim toga, stanice s mutiranim genom za proteaznu SprT domenu senzitivne su na formaldehid, induktor DPC-a u stanicama (27, 28, 29).

Postoji indikacija na osnovu eksperimenata u staničnim linijama da Gcna i Sprtn paralelno sudjeluju u uklanjanju Top2-DPC-a (29). Sprtn je primarno aktivan tijekom DNA replikacije, a Gcna tijekom mitoze, stoga se pretpostavlja da ove dvije proteaze sinkronizirano djeluju protiv DPC-a s ciljem očuvanja stanica i normalnog završetka staničnog ciklusa. Neuspjeh u uklanjanju DPC-a dovodi do pojave mutacija (27).



Slika 3. Tipovi DPC popravka (engl. *DNA-protein crosslink repair*) (Acrc - *Acidic repeat containing protein*, NER – *Nucleotide Excision Repair* (nukleotidni ekscizijski popravak), HR – *Homologous Recombination* (homologna rekombinacija), Tdp1/2 – tirozil-DNA fosfodiesteraza 1/2, MRN kompleks – Mre 11, Nbs1, Rad50) (20).

2.6. Nukleotidni ekscizijski popravak (engl. *Nucleotide Excision Repair*, NER)

Popravak DNA izrezivanjem nukleotida (engl. *Nucleotide Excision Repair*, NER) je mehanizam za uklanjanje DNA oštećenja. NER je esencijalan za uklanjanje oštećenja induciranih UV zračenjem, no uklanja i oštećenja nastala djelovanjem kemoterapeutskih agensa. Nedostatak NER-a u organizmu dovodi do razvoja sindroma Xeroderma Pigmentosum (XP) i predispozicije za nastanak tumora (30). Osnovni koraci NER-a uključuju prepoznavanje oštećenja na DNA, cijepanje lanca lijevo i desno od oštećenja (dvostruko cijepanje), uklanjanje oligonukleotida sa lezijom, popunjavanje praznine i ligaciju. S obzirom na velik broj različitih supstrata, NER mehanizam ne prepoznaje specifične kemijske grupe u oštećenju, već različite konformacije fosfodiesterskih veza koje su nastale oštećenjem (30). Prepoznavanje DNA oštećenja niske je specifičnosti i odvija se bez utroška ATP-a, dok odmatanje DNA te vezanje NER proteinskih faktora zahtijeva hidrolizu ATP-a. Dvostruko cijepanje kataliziraju dvije nukleaze. U prokariota se nukleazama izrezuje oligonukleotid duljine 12-13 nukleotida (nt), a kod eukariota duljine 24-32 nt. U NER-u kod sisavaca sudjeluje više od 30 različitih proteina, dok su kod prokariota dovoljna samo tri (UvrA, UvrB, UvrC). Proteini prokariota i eukariota međusobno nemaju evolucijske sličnosti (7, 31).

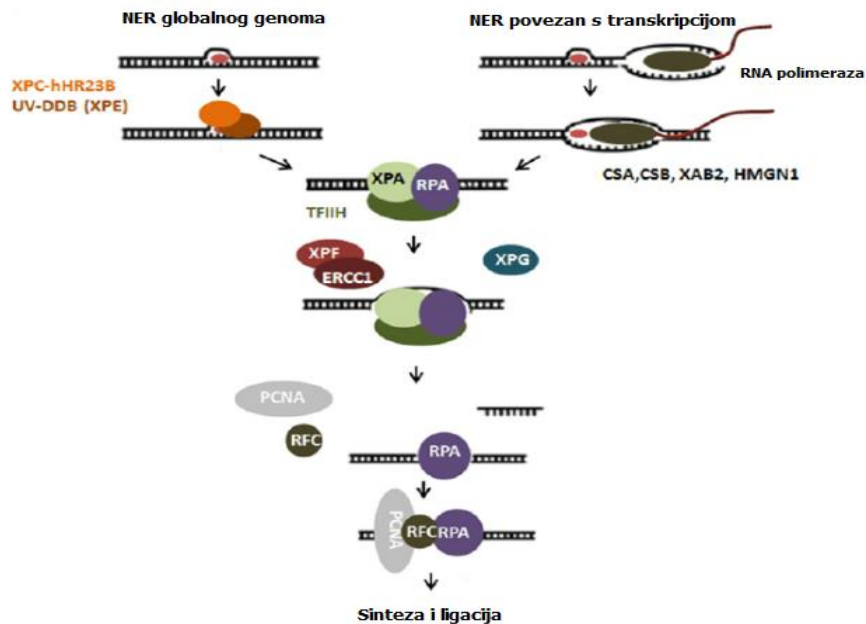
Kod ljudi, u popravku sudjeluje šest različitih proteinskih faktora: Rpa, Xpa, Xpc, Tfiif, Xpg i Xpf-Ercc1. Eukariotski proteinski faktori, osim sudjelovanja u NER-u, imaju ulogu u ostalim staničnim mehanizmima poput replikacije (Rpa), transkripcije (Tfiif) i rekombinacije (Xpf-Ercc1). Kako bi se s lakoćom prepoznalo oštećenje DNA, u stanicama sisavaca postoje dva mehanizma zaslužna za to: kooperativno vezanje (engl. *cooperative binding*) i kinetička korekcija (engl. *kinetic proofreading*). Vezanjem nekoliko međusobno povezanih proteina na mjesta nasuprot oštećenja, povećava se lokalna koncentracija ostalih proteina jer rastu protein-protein interakcije (kooperacija). To dovodi to interakcije proteina sa oštećenjem. Proteinski faktor Tfiif ima helikaznu aktivnost koja odmotava DNA lanac. Rezanje započinje vezanjem Xpf-Ercc1 proteina. Kondenzirana kromatinska struktura inhibira NER te zato kromatinski faktori pregradnje (engl. *chromatin remodeling factors*) i modifikatori histona svojim djelovanjem umanjuju tu inhibiciju (30) (Slika 4).

Dva su tipa NER-a: NER globalnog genoma (engl. *Global Genome NER, GG-NER*) i NER povezan s transkripcijom (engl. *Transcription-Coupled NER, TC-NER*), koji popravlja aktivno transkribirane gene. Za uspješno djelovanje NER-a, svi proteini koji sudjeluju u popravku moraju biti međusobno povezani (32).

U GG-NER-u, proteini Xpc te Rad23 sa Cetn2 tvore Xpc-Rad23-Cetn2 heterotrimer te služe kao senzori oštećenja DNA. Ovi proteini prepoznaju jednolančane lomove ili oštećenja nastala pogrešnim sparivanjem nukleotida. Xpc protein ispituje je li lanac DNA intaktan tzv. 1D difuzijskim mehanizmom i ako nije, veže se za krivo sparane baze. Vezanjem za krivo sparane baze, Xpc inducira dvostruko cijepanje kod oštećenja. Ipak, do dvostrukog cijepanja doći će samo ako se Xpc veže za 5' kraj oštećenja. Thiif se sastoji od dvije podjedinice sa ATP-aznom i helikaznom aktivnošću; Xpb i Xpd. Xpd helikaza veže se za suprotni DNA lanac od oštećenja i odmotava lanac u 5'-3' smjeru. Xpa protein poboljšava helikaznu aktivnost Xpd, stimulira vezanje na oštećenja DNA i smješta nukleaze u pravilan položaj za eksciziju. Specifične endonukleaze Xpf-Ercc1 i Ercc5 zasijecaju oštećeni lanac i uklanjaju leziju. U sljedećem koraku sudjeluju replikacijski proteini, poput PcnA, DNA polimeraza (POL δ , POL ϵ , POL κ) i DNA ligaze (LIG1), koji popunjavaju prazninu nastalu izrezivanjem nukleotida, vrše sintezu DNA prema komplementarnom lancu te ligaciju (30) (Slika 4).

TC-NER aktivira RNA polimeraza 2 čija je transkripcijska aktivnost blokirana oštećenjem (Slika 4). Djelovanje TC-NER puta popravka zahtijeva interakciju velikog broja proteina poput UV-SsA (engl. *UV-stimulated scaffold protein A*), Usp7 (engl. *ubiquitin-specific-processing protease*), Xab2 (engl. *Xpa-binding protein*) i Hmgn1 (engl. *high mobility group nucleosome-binding domain-containing protein*). Specifični proteini Csa (engl. *Cockayne syndrome WD repeat protein A*) i Csb (engl. *Cockayne syndrome protein B*) vežu se na

oštećenje, uklanjajući RNA polimerazu 2 i potiču vezanje Hmgn1 te popravak. Sljedeći stupnjevi reakcije identični su onima kod GG-NER-a (7, 30, 32, 33, 34, 35).



Slika 4. NER (engl. *Nucleotide Excision Repair*) mehanizam globalnog genoma (engl. *Global Genome NER, GG-NER*) i NER povezan s transkripcijom (*Transcription-Coupled NER, TC-NER*) (prilagođeno iz 35).

2.7. Uloga nukleotidnog ekscizijskog popravka u popravku DPC-a (engl. *DNA-protein crosslink*)

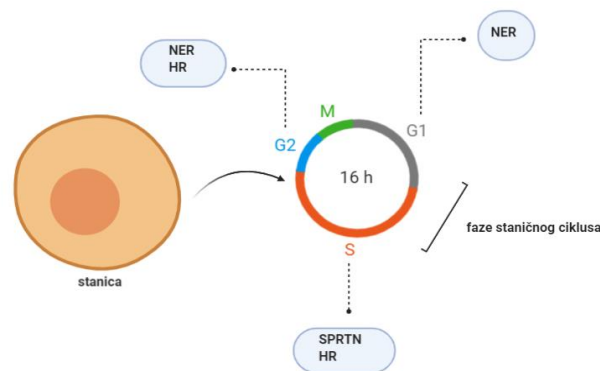
Nukleotidni ekscizijski popravak (engl. *Nucleotide Excision Repair, NER*) sudjeluje u DPC popravku (engl. *DNA-protein crosslink repair*). *In vitro* eksperimentima je dokazano da su bakterijske stanice i stanice kvasca osjetljivije na modelni DPC (engl. *DNA-protein crosslink*) induktor (engl. *inducer*), formaldehid, uslijed inaktivacije NER-a. Stanice s deficitnim NER putem popravka tretirane formaldehidom pokazuju genetičku nestabilnost, povećanu razinu nastanka dvolančanog loma (engl. *Double-Strand Break, DSB*) i učestaliju izmjenu sestrinskih kromatida (34, 36).

Osim ovih indirektnih dokaza, u *in vitro* eksperimentima u bakteriji (*Escherichia coli*) s aktivnim NER putem popravka dokazano je da se DPC manji od 11 kDa popravljaju UvrABC proteinskim kompleksom NER-a. Maksimum aktivnosti NER puta popravka javlja se pri veličini DPC-a 1,6-2,1 kDa te pada s povećanjem DPC-a. DPC veći od 11 kDa sterički ometaju vezanje UvrA, B i C proteina te stvaranje UvrABC kompleksa. Takvi, veći DPC-i popravljaju se reaktivacijom replikacijske vilice homolognom rekombinacijom (engl. *Homologous Recombination, HR*) pomoću Rec-BCD proteina. Ako ostanu nepopravljeni, blokiraju progresiju replikacijske vilice.

U eukariota, maksimum aktivnosti NER-a *in vitro* također se postiže pri veličini DPC-a od 1,6 kDa, dok je kod DPC-a od 11 kDa aktivnost zanemariva. *In vitro* eksperimenti provedeni sa humanim stanicama detektirali su gornju granicu aktivnosti NER-a kod veličine DPC-a od 8 kDa, a rijede 10 kDa. Ovisno o provedenim studijama može se zaključiti da je NER aktivan *in vitro* kod DPC-a veličine 8-14 kDa, a rijede i 16 kDa kod prokariota. Povišenjem temperature eksperimenta, sa fiziološke (37°C) na 55°C, uklanjanje DPC-a kod bakterija prošireno je na DPC veličine do 20 kDa jer je UvrABC protein termofilan (19, 34, 37, 38, 39, 40).

Aktivnost određenog proteina u DPC popravku ovisi o fazi staničnog ciklusa. NER je aktivan u G1 i G2 fazama staničnog ciklusa, kada stanica sintetizira sve potrebne proteine i povećava svoj volumen. No, visoke doze formaldehida uzrokuju zaustavljanje staničnog ciklusa. S druge strane, Sprtn je aktivan u S fazi staničnog ciklusa, u kojoj se sintetizira genetski materijal stanice (Slika 5). Tijekom G1 faze, aktivnost Sprtn-a snižena je tvorbom APC-kompleksa pomoću E3-ubikvitin ligaze, dok se ulaskom u S fazu, aktivnost Sprtn-a ponovno povećava. Također, Sprtn ima važnu ulogu u replikaciji i jedan je od ključnih enzima u DPC popravku (21). Stanice s utišanim *sprtn* genom nakon 2 h tretmana formaldehidom generirale su veći broj DPC-a od stanica divljeg tipa nakon tretmana istim agensom nakon 3 h ekspozicije. Nedostatak *sprtn*-a u stanicama tijekom S faze uzrokuje pojavu abnormalnih reakcijskih intermedijera kao što su kromatinski mostovi, koji se ne mogu razriješiti te se posljedično javlja genetička nestabilnost (41).

Izlaganje formaldehidu, osim DPC-a, inducira i DNA-DNA interlančana i intralančana umrežavanja, čime se aktivira Fanconi anemia (FA) put popravka. Eksperimentalno je dokazano da su stanice s nedostatkom FA puta popravka osjetljive na DPC inducirajuće agensa poput azacitidina i formaldehida. S druge strane, stanice s delecijom *fancd2* gena koji sudjeluje u FA putu popravka nisu pokazale povećan broj nastalih DPC-a nakon tretmana formaldehidom, što ukazuje da FA put popravka ne sudjeluje u DPC popravku (19) (Slika 5).



Slika 5. Aktivnost puteva DPC popravka (engl. *DNA-protein crosslink repair*) ovisno o fazi staničnog ciklusa u sisavaca (NER – *Nucleotide Excision Repair* (nukleotidni ekscizijski popravak), HR – *Homologous Recombination* (homologna rekombinacija) (20).

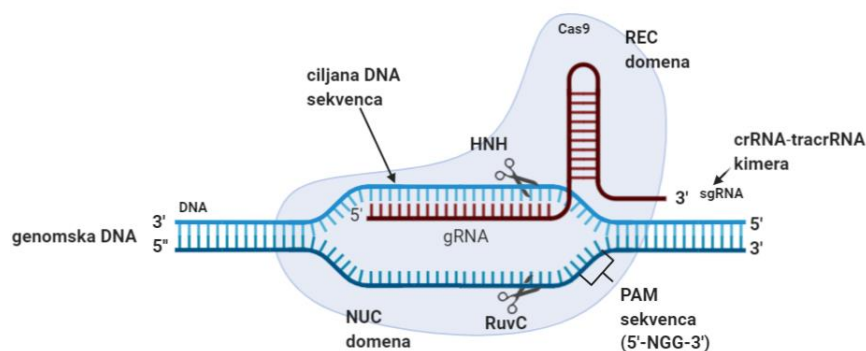
2.8. CRISPR/Cas9 editiranje genoma

CRISPR (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas9 (engl. *CRISPR-associated protein 9*) izvorno potječe od prokariotskih organizama iz domena *Bacteria* i *Archaea*. Tip je imunološkog sustava bakterija koji doprinosi obrani od bakteriofaga (42, 43). CRISPR/Cas9 sustavi dijele se prema tome je li cijepanje ciljane DNA vođeno proteinskim kompleksom s jednom podjedinicom (tip II s Cas9 endonukleazom, tip V i VI) ili više različitih podjedinica (tip I, III i IV) (42, 43).

Tri su osnovne faze CRISPR/Cas9 sustava zaslužne za obranu bakterija od bakterijskih virusa: faza akvizicije (engl. *acquisition stage*), crRNA (engl. *crRNA*) procesiranje te faza interferencije s DNA.

Nakon vezanja na površinu bakterijske stanice, virus injektira svoj genetski materijal kroz staničnu stijenku i membranu bakterije. Bakterijska stanica prepoznaje stranu DNA i fragmentira ju pomoću Cas9 endonukleaze. Fragmenti virusnog genoma zatim se ugrađuju između očuvanih ponavljajućih palindromskih ponavljanja CRISPR lokusa kao tzv. DNA razmaknica (engl. *spacer DNA*). Svaka DNA razmaknica dio je pocijepane DNA bakteriofaga (43). Uzvodno od CRISPR lokusa nalaze se geni za Cas9 enzim i *tracr* geni (engl. *trans-activating CRISPR gene*). *Spacer DNA* koristi se kao kalup za transkripciju DNA pre-crRNA, koja se zatim procesira u zrele crRNA pomoću Cas proteina. Procesirana crRNA služi kao tzv. *guide* (gRNA) čiji se *spacer* lokusi komplementarno sparuju sa stranom DNA. Uobičajena duljina gRNA je oko 20 nt (44). Osim transkripcije spacer DNA, eksprimira se Cas9 protein i sintetizira *tracr*-RNA (engl. *trans-activating CRISPR RNA*). Fuzijom crRNA sa *tracr*RNA nastaje sgRNA (engl. *single guide RNA*) kimeru. Dvije RNA sekvence koje čine kimeru povezane su preko petlje koja povezuje okosnice RNA lanaca. Važnost sgRNA kimere je u vođenju Cas9 proteina za cijepanje do ciljane DNA sekvence (45).

U trećoj fazi, Cas9 prepoznaje stranu DNA putem crRNA koja se komplementarno sparuje sa ciljnom DNA (Slika 6). Kako ne bi došlo do autolize bakterijskog genoma, Cas9 prepoznaje stranu DNA koju cijepa prema PAM sekvenci u genomu (engl. *Protospacer-Adjacent Motif*). PAM sekvenca slijedi je od tri nukleotida koji se nalazi nizvodno od mjesta koju prepoznaje *guide RNA* (Slika 6). U CRISPR/Cas9 sustavu PAM je NGG sekvenca tj. sastoji se od dvije G dušične baze, dok N predstavlja bilo koju dušičnu bazu. Fosfatna petlja Cas9 proteina veže se za okosnicu ciljnog DNA lanca nasuprot PAM sekvence. Time dolazi do lokalnog odmotavanja DNA uzvojnice i komplementarnog sparivanja sa sgRNA. Mjesto cijepanja Cas9 proteina je 3 nt uzvodno od PAM sekvence (44, 46).



Slika 6. Shematski prikaz CRISPR/Cas9 sustava (sgRNA – *single guide RNA*, gRNA – *guide RNA*, PAM – *Protospacer-Adjacent Motif*, crRNA – *crisprRNA*, tracrRNA - *trans-activating CRISPR RNA*, REC - *alfa-helical recognition lobe* (alfa-helikazni režanj za prepoznavanje), NUC - *nuclease lobe* (nukleazni režanj), HNH i RuvC - nukleazne domene) (20).

Cas9 protein sastoji se od dva reznja: nukleaznog (engl. *nuclease lobe*, *NUC*) i alfa-helikalnog koji služi za prepoznavanje (engl. *alfa-helical recognition lobe*, *REC*). NUC režanj sadrži HNH i RuvC nukleazne domene, domenu koja stupa u interakciju s PAM sekvencom (engl. *PAM-interacting domain*, *PI*) i klinastu domenu (engl. *wedge domain*, *WED*) (44, 46, 47, 48). HNH domena prepoznaje i cijepa ciljni DNA lanac, komplementaran s *guide RNA*, dok RuvC nukleaza cijepa lanac komplementaran ciljnom lancu (44, 46, 47, 48). Važnost WED domene je u prepoznavanju sgRNA, dok REC režanj prepoznaje sgRNA-DNA dupleks. Kako bi se aktivirala endonukleazna aktivnost Cas9 proteina, dolazi do različitih konformacijskih promjena. Točnije, HNH domena mijenja konformaciju ukoliko se *guide RNA* i ciljna DNA komplementarno spare. Minimalna duljina komplementarnog sparivanja je oko 10 nt (44, 47).

CRISPR/Cas9 u stanicu se uvodi putem plazmida koji sadrži gen za Cas9 protein te gene za sintezu sgRNA (47) ili se u stanicu transfecira prethodno pripremljen *in vitro* kompleks Cas9/sgRNA.

Cas9 protein, vođen komplementarnošću sgRNA sekvence sa DNA sekvencom unutar ciljnog gena, svojom endonukleaznom aktivnošću generira dvolančani lom unutar gena, koji u stanici aktivira kanoničke puteve popravka dvolančanog loma poput homologne rekombinacije (engl. *Homologous Recombination*, *HR*) i nehomolognog sparivanja krajeva (engl. *Non-Homologous End Joining*, *NHEJ*). NHEJ popravljiva dvolančani lom sparivanjem krajeva, često uvodeći insercije ili delecije, koje pomiču okvir čitanja ciljnog gena (mutacije) ili dovode do pojave preuranjenog stop kodona (engl. *knock out*). S druge strane HR, popravljiva dvolančani lom prema intaktnom DNA kalupu u stanici, čime dolazi do insercije i ligacije na mjestu dvolančanog loma (engl. *knock in*) te najčešće ne uzrokuje mutacije. NHEJ je najčešći put popravka s obzirom da je prisutan u svima fazama staničnog ciklusa. S druge strane, HR put popravka

aktivira se u S i G2 fazama staničnog ciklusa, kada stanica osigurava sestrinsku kromatidu kao donor homologne sekvence za popravak (49). Ukoliko se planira unijeti mutacija ili cijeli gen u stanicu (*knock in*), prethodno se provodi tzv. serum starvacija, čime se svim stanicama izjednačava faza staničnog ciklusa (49) Za *knock in*, stanice se sinkroniziraju u S fazi staničnog ciklusa, kako bi se osigurala predominacija HR puta popravka. S druge strane, za indukciju *knock out-a*, ne provodi se serum starvacija jer je NHEJ put popravka aktivan neovisno o fazi staničnog ciklusa (49).

Ukoliko je cilj editiranja genoma provesti preraspodjele kromosoma, generiraju se dva bliska dvolančana loma koja rezultiraju glomaznim insercijama i delecijama. S druge strane, do translokacije između kromosoma dolazi ukoliko su dvolančani lomovi generirani na dva različita DNA lanca. Budući da se PAM sekvence pojavljuju u genomu otprilike svakih 8 nt, moguće je kreirati RNA vodilju (engl. *single guide RNA, sgRNA*) koja se komplementarno sparuje sa ciljnim mjestom na DNA, nasuprot željene PAM sekvence. Na taj način omogućeno je editiranje bilo kojeg gena u genomu sa velikom specifičnošću (44).

Kao što je već navedeno, PAM sekvence se vrlo često pojavljuju u genomu. Također, RNA vodilja se može vezati za dio genoma koji nije bio ciljni, što može dovesti do cijepanja izvan ciljne DNA regije (engl. *off-target effect*). Zato se prije dizajna RNA vodilje provodi *in silico* analiza pomoću dostupnih *software-a* kako bi se odabrala sekvenca bez predviđenih *off-target* sljeppljivanja (43, 48, 50). Inaktivacijom nukleaznih domena Cas9 proteina, dobiva se modificirani Cas9 protein - dCas9, koji se koristi za regulaciju transkripcije gena. Modifikacijom Cas9 onemogućava se cijepanje DNA, no sačuvana je vezna aktivnost proteina na DNA. Fuzioniranjem aktivatora transkripcije s dCas9 aktivira se prepisivanje gena i nastajanje mRNA, a posljedično i sinteza željenog proteina (engl. *CRISPR activation, CRISPRa*). Za dvostruko povećanje aktivnosti, aktivator se veže i na N i na C kraj proteina. Fuzioniranjem represora (npr. KRAB protein) s dCas9 dolazi do suprotnog efekta. Vezanjem samog dCas9 na DNA također može doći do represije transkripcije, ako se sterički omete transkripcijski kompleks (engl. *CRISPR interference, CRISPRi*). CRISPRi visoko je specifična, pokazuje mali broj odstupanja od ciljne DNA i omogućava direktnu kontrolu transkripcije gena. S druge strane, dCas9/sgRNA kompleks ima nisku aktivnost u regulaciji ekspresije gena sisavaca i Cas9 zahtijeva NGG PAM sekvencu za prepoznavanje, što limitira dostupnost ciljnog mjesta u genomu (44, 51).

Ekspresija Cas9 može se regulirati na translacijskoj i posttranslacijskoj razini. Na translacijskoj razini, doksiciklin-inducibilni promotori kontroliraju količinu sintetiziranog Cas9. Dodatkom doksiciklina u reakcijsku smjesu aktivira se promotor i nastaje veća količina Cas9. Na posttranslacijskoj razini, Cas9 se fuzionira s inteinom (engl. *internal protein segment*). Kada

su proteini međusobno fuzionirani, nukleazna aktivnost Cas9 je inhibirana. Uklanjanjem inteina, Cas9 ponovno se aktivira (44, 47).

CRISPR/Cas9 sustav ima široku primjenu u editiranju gena. Koristi se za bolje razumijevanje specifičnih uloga određenih gena, stvaranje transgenih organizama s poboljšanim svojstvima, oponašanje uvjeta koji se događaju na genetskoj razini radi lakše borbe protiv različitih bolesti (tumori, sindromi, Alzheimerova bolest). CRISPR/Cas9 primjenjiv je i u poljoprivredi. Editiranjem genoma biljaka stječu se specifične karakteristike poput određene boje cvijeta, boljeg prinosa usjeva, rezistencije na nametnike i herbicide (47). Ovaj sustav može se koristiti za borbu protiv virusa u stanicama sisavaca. Insercijom sustava u stanice zahvaćene virusom HIV-a, hepatitisa B ili HPV-a i prepoznavanjem specifičnih sekvenci viralnog genoma, viralni genom može se inaktivirati tj. virus će izgubiti sposobnost virulencije, a stanica će postati rezistentna na virus (44). Ipak, korištenje ovog sustava u ljudskim stanicama još uvijek nije potpuno prihvaćeno sa etičkog aspekta. Negativna posljedica korištenja ovog sustava u editiranju genoma biljaka i životinja je potencijalno narušavanje ravnoteže ekosustava i hranidbenog lanca (44, 47).

Cijepanje DNA pomoću Cas9 obuhvaća niz konformacijskih promjena domena koje grade protein. Složeni mehanizam djelovanja i prilagodljivost CRISPR/Cas9 sustava predstavlja veliki potencijal u editiranju genoma. Ipak, potrebno je provesti brojna istraživanja s ciljem povećanja specifičnosti i smanjenja *off-target* efekta kako bi se sustav mogao sigurno primjenjivati na ljudima (47).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Plazmidi

Kao pozitivna kontrola za uzorke tretirane DNazom 1, nakon *in vitro* transkripcije korišten je plazmid pGFP-C3 veličine 4724 bp. pGFP-C3 je cirkularna dvolančana DNA molekula molekulske mase $3102000 \text{ g mol}^{-1}$. Plazmid sadrži velik broj jedinstvenih restrikcijskih mjesta te ishodište replikacije koje mu omogućuje samostalnu replikaciju neovisno od domaćina te izolaciju u jednolančanom obliku (f1-ori). Budući da je navedeni plazmid korišten u svrhu provjere aktivnosti enzima DNaze 1, specifične regije na plazmidu koje nisu relevantne za ovaj rad nisu označene na slici (Slika 7.).



Slika 7. Mapa plazmida pGFP-C3 (prilagođeno iz 52).

3.1.2. Oligonukleotidi

U ovom radu korištene su četiri DNA probe, čiji pregled je vidljiv u tablici 1. Navedene DNA probe korištene su za sljepljivanje i umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*), čiji se amplikon koristi kao kalup za sintezu RNA vodilje (engl. *single guide RNA, sgRNA*). Probe uključuju par početnica za PCR (IVT-FWD T7 i IVT-REV T7), reverzni oligonukleotidni kalup (IVT-scaffold-long) te univerzalnu DNA sekvencu *xpa* gena sa sekvencom za T7 promotor i *tracrRNA* (IVT-sgRNA-long).

Tablica 1. Oligonukleotidi korišteni za dizajn i umnažanje DNA sekvence *xpa* gena lančanom reakcijom polimeraze te sintezu RNA vodilje (engl. *single guide RNA, sgRNA*).

OLIGONUKLEOTID	SEKVENCA (5'-3')
IVT-FWD T7 početnica (Tm=46,1°C)	GGATCCTAATACGACTCACTATAG
IVT-REV T7 početnica (Tm=50,2°C)	AAAAAAGCACCGACTCGG
IVT-sgRNA-long-oligo	T7 promotor DNA sekvenca <i>xpa</i> gena <i>tracrRNA</i> GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGGCAAAACTATAGACTCGTTTTAGAGCTAGAA
IVT-scaffold-long oligo	<i>tracrRNA</i> CAAATCTCCATCTTATCGTTCAATTTTATTCCGATCAGGCAAT AGTTGAACTTTTTACCGTGGCTCAGCCACGAAAAA pol III terminator

3.1.3. Otopine i puferi

50x koncentrirani TAE pufer izrađuje se kako slijedi: 242 g Tris (2 molL⁻¹), 57,1 ml ledene octene kiseline (1 molL⁻¹), 100 ml EDTA (50 mmolL⁻¹, pH=8) i destilirana voda (do 1000 ml). 6x koncentrirana boja za nanošenje uzoraka u agarozni gel (migracijsko bojilo, engl. *loading*

dye) sastoji se od 25 mg bromfenola plavo u 6,7 ml destilirane vode, 25 mg ksilen cijanola FF i 3,3 ml glicerola.

3.1.4. Kemikalije i enzimi

- Agaroz; kataloški broj: 39346-81-1, Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
- 10x koncentrirana otopina za vizualizaciju DNA/RNA u agaroznom gelu nakon elektroforeze (GelStar); kataloški broj: 50535, Lonza (Basel, Švicarska)
- PCR kemikalije: 5x HF pufer (50 mmol L⁻¹ MgCl₂, DMSO), deoksiribonukleotidi (10 mM dNTP-ovi), DNaza (2 U μ L⁻¹; u 10x koncentriranom DNaza reakcijskom puferu), Invitrogen voda bez nukleaza (engl. *RNase free*); kataloški broj: F-553S, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- Phusion High Fidelity DNA Polimeraza (2 U μ L⁻¹) u 5x koncentriranom HF puferu; kataloški broj: F-530S, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- Set kemikalija za pročišćavanje DNA: pufer za vezanje DNA, pufer za ispiranje DNA, pufer za eluciju DNA, destilirana voda bez nukleaza, kivete za mikrocentrifugiranje, kolonica za vezanje nukleinskih kiselina (Monarch PCR&DNA Cleanup Kit); kataloški broj: T-1030S, New England Biolabs (NEB) (Ipswich, SAD)
- Set kemikalija za *in vitro* transkripciju: T7 RNA polimeraza, 1x koncentrirani pufer za T7 RNA polimerazu, destilirana voda bez nukleaza, ribonukleotidi (MEGashortscript™ T7 transcription Kit); kataloški broj: AM1354, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- DNaza 1 (2 U μ L⁻¹) u 10x koncentriranom DNAaza reakcijskom puferu; kataloški broj: AM2238, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- Set kemikalija za pročišćavanje RNA: pufer za vezanje RNA, etanol (>95%), pufer za ispiranje RNA, destilirana voda bez nukleaza, kivete za mikrocentrifugiranje, kolonica za vezanje nukleinskih kiselina, pufer za eluciju RNA (Monarch RNA Cleanup Kit); kataloški broj: T-2040L, NEB (Ipswich, SAD)
- DNA marker (engl. *ladder*) 100 bp-10 kb; kataloški broj: SM0243, Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD)
- *RNase away* otopina: Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)

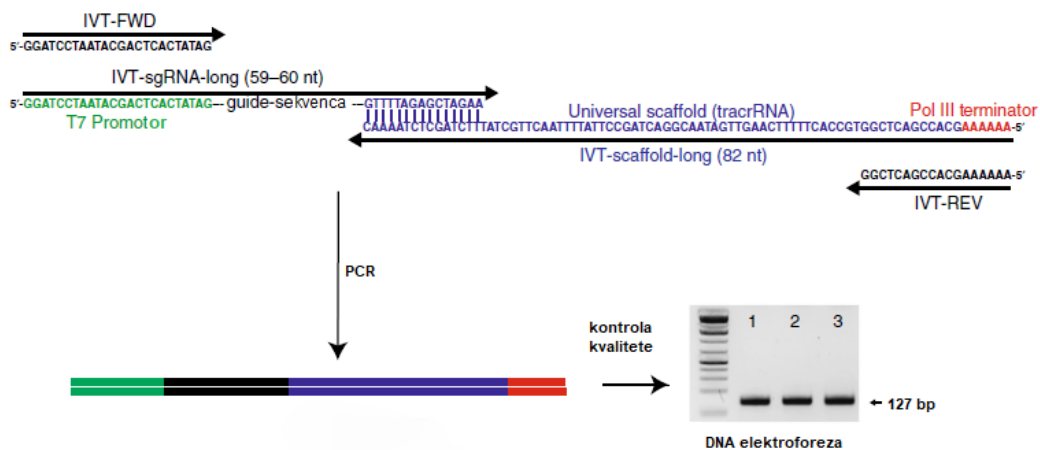
3.2. Metode

3.2.1. *In silico* dizajn i sinteza RNA vodilje (engl. *single guide RNA, sgRNA*) i početnica

Kalup za sintezu RNA vodilje (engl. *single guide RNA, sgRNA*) za *xpa* gen dizajniran je u *CRISPRscan* algoritmu (53). Početnice se odabiru koristeći *Primer-BLAST* alat (*National Center for Biotechnology Information, NCBI*) (54, 55).

3.2.2. Lančana reakcija polimeraze

Kalup za sintezu RNA vodilje (engl. *single guide RNA, sgRNA*) dobiven je sljepljivanjem vodeće (engl. *guide*) DNA sekvence gena *xpa* sa sekvencom za T7 promotor te DNA probom koja kodira za tracrRNA (Slika 8.).



Slika 8. Prikaz konstrukcije kalupa za sintezu RNA vodilje (engl. *single guide RNA, sgRNA*) i veličina očekivanog PCR ampikona nakon umnažanja DNA kalupa (prilagođeno iz 50).

Dobiveni DNA kompleks umnaža se pomoću para početnica (tablica 1.) lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) tijekom 29 ciklusa reakcija (50). Ukupan volumen reakcijske smjese iznosi 25 μ L, a u reakcijsku smjesu redom se dodaju komponente navedene u tablici 2. Sekvence DNA proba korištene u reakciji nalaze se u tablici 1., a uvjeti provođenja PCR-a navedeni su u tablici 3. PCR je proveden koristeći Phusion High Fidelity DNA polimerazu (PFX) sa 5'-3' polimeraznom i 3'-5' egzonukleaznom (lektorirajućom) aktivnošću. Ova svojstva DNA polimeraze osiguravaju visoku vjernost replikacije DNA. S obzirom da su osnovne početnice koncentracije 100 μ M, potrebno ih je razrijediti s vodom 100x do 1 μ M koncentracije. Za pripremu razrjeđenja uzima se 0,5 μ L svake početnice posebno, uz dodatak 49,5 μ L vode.

Tablica 2. Komponente reakcijske smjese PCR-a.

KOMPONENTA	VOLUMEN [μL]
H ₂ O	17,75
5x HF pufer	5,00
10 mM dNTP-ovi	0,50
1 μM IVT-FWD T7 početnica	0,50
1 μM IVT-REV T7 početnica	0,50
100 μM IVT-sgRNA-long oligo	0,25
100 μM IVT-scaffold-long oligo	0,25
2 U μL^{-1} PFX polimeraza	0,25
ukupno	25,0

Tablica 3. Uvjeti provođenja PCR-a s Phusion High Fidelity DNA polimerazom.

KORAK	TEMPERATURA	TRAJANJE	BROJ CIKLUSA
Početna denaturacija	95°C	2 minute	1
Denaturacija	95°C	10 sekundi	29
Komplementarno sparivanje početnica	57°C	10 sekundi	29
Sinteza DNA	72°C	10 sekundi	29
Završna sinteza DNA	72°C	2 minute	1

3.2.3. Agarozna gel elektroforeza

Kao provjera uspješnosti provođenja lančane reakcije polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*), provodi se horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu. Korišten je 1,2%-tni agarozni gel dobiven otapanjem 1,2 g agaroze u 100 ml TAE pufera u Erlenmeyerovoj tikvici. Izvorno, TAE pufer je 50x koncentriran te ga je potrebno razrijediti miješanjem 10 mL TAE pufera sa 490 mL destilirane vode. Kako bi se agarozna u potpunosti otopila u puferu, tikvicu s agarozom potrebno je zagrijavati kuhanjem u mikrovalnoj pećnici uz povremeno miješanje. Nakon što se sva agarozna otopila u puferu, tikvica s agarozom hladi se mlazom hladne vode do temperature oko 60°C. U ohlađenu tikvicu dodaje se 0,5 μL visoko senzitivne fluorescentne boje GelStar. Dodana boja omogućuje vizualizaciju nukleinskih kiselina u gelu nakon provođenja elektroforeze koristeći UV transiluminator. Ohlađena otopina agaroze sa fluorescentnom bojom izlijeva se u prethodno očišćenu kadnicu za elektroforezu. U gel se umetne češljic kako bi se stvorile jažice u koje se nanosi uzorak. Oko 30 minuta potrebno je

da se otopina stvrdne tj. postane gel. Gel se uranja u kadnicu sa TAE puferom. S ciljem praćenja tijekom elektroforeze, uzorak DNA nakon PCR-a pomiješa se s 6x koncentriranim migracijskim bojilom (engl. *loading dye*) te se pomoću pipete nanosi u jažicu gela. Elektroforeza se provodi pri naponu od 100-120 V kroz 30-50 minuta. Osim uzoraka, u prvu jažicu unosi se DNA marker (engl. *DNA ladder*), smjesa standarda veličine 0,1-10 kilobaza (kb)-, koji služi za identifikaciju veličine nanešenog uzorka. Izvor svjetlosti valne duljine 300 nm pobuđuje GelStar boju te boja interkalira u strukturu DNA. Pri 493 nm emitira se apsorbirana energija, što omogućuje vizualizaciju gela nakon završene elektroforeze na *ChemiDoc* uređaju (*Biorad*).

Kao provjera uspješnosti provođenja *in vitro* transkripcije, provodi se horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu. Prije pripreme agaroznog gela, laboratorijsko posuđe i kadnicu za gel elektroforezu potrebno je očistiti vodom, 70%-nim etanolom, destiliranom vodom te *RNase away* otopinom (*Sigma-Aldrich*) kako ne bi došlo do razgradnje RNA vodilje (engl. *single guide RNA, sgRNA*) nastale transkripcijom. Degradacija RNA u agaroznom gelu utječe na ispravnost rezultata elektroforeze. Pripremljen je 1,2%-tni agarozni gel dobiven otapanjem 1,2 g agaroze u 100 ml TAE pufera.

3.2.4. Pročišćavanje DNA nakon PCR-a i mjerenje koncentracije DNA

Nakon PCR-a, provodi se pročišćavanje DNA od neiskorištenih nukleotida, soli pufera potrebnih za optimalnu aktivnost DNA polimeraze te same polimeraze. Cilj je dobiti što čišći uzorak DNA, kako bi se postigli što viši prinosi i što koncentriraniji uzorak DNA koji će se koristiti u sljedećim reakcijama. Pročišćavanje se provodi nizom koraka prema protokolu *Monarch PCR&DNA Clean up kit* (*New England Biolabs, Ipswich, SAD*). Potrebno je razrijediti uzorak sa DNA veznim puferom u omjeru 5:1. U uzorak od 50 µL dodaje se 250 µL DNA veznog pufera. Kolonica za vezanje nukleinskih kiselina umeće se u kivetu za sakupljanje te se razrijeđeni uzorak pipetom nanosi na kolonicu. Uzorak se centrifugira 1 minutu pri 10000 g (engl. *gravitational field strength*). Kolonica se zatim umeće u novu kivetu za sakupljanje, a uzorku se dodaje 200 µL DNA pufera za ispiranje. Ponovno se centrifugira 1 minutu pri 10000 g. Dio uzorka koji se nije vezao za kolonicu se odbacuje (engl. *flow through*). Ispiranje se provodi pri istim uvjetima. Kolonica se zatim prebacuje u kivetu za mikrocentrifugiranje i dodaje se 10 µL DNA pufera za eluciju DNA s kolonice. Uzorak se centrifugira 1 minutu pri 10000 g kako bi se DNA eluirala s kolonice u kivetu za mikrocentrifugiranje.

Koncentracija pročišćenog DNA uzorka mjeri se pomoću *NanoDrop* spektrofotometrijskog uređaja (*BioSpec*). Koncentracija nukleinskih kiselina mjeri se pri 260 nm, jer je apsorpcijski maksimum purinskih i pirimidinskih baza koje čine strukturu DNA pri toj valnoj duljini. U uređaj se nanosi 1 µL uzorka, a kao slijepa proba služi 1 µL destilirane vode (56).

3.2.5. *In vitro* transkripcija

Umnožena DNA dobivena PCR-om služi kao kalup za provođenje *in vitro* transkripcije i sintezu RNA vodilje (engl. *single guide RNA, sgRNA*). Ukupan volumen reakcijske smjese iznosi 20 μL , a u reakcijsku smjesu redom se dodaju komponente navedene u tablici 4. Uvjeti provođenja *in vitro* transkripcije navedeni su u tablici 5. Reakcija se provodi u PCR mašini (engl. *thermal cycler*). Nakon 5,5 sati u reakcijsku smjesu dodaje se 1 μL DNaze 1 ($2\text{U } \mu\text{L}^{-1}$) s ciljem razgradnje DNA kalupa. Kontrola ispravnosti DNaze 1 provodi se dodatkom iste količine enzima u uzorak s plazmidom pGFP-C3. Uzorak s plazmidom priprema se miješanjem 6,97 μL plazmida sa 13,03 μL destilirane vode. Reakcija *in vitro* transkripcije provodi se s enzimom T7 RNA polimerazom izoliranom iz T7 bakteriofaga, koja katalizira sintezu RNA iz DNA u 5'-3' smjeru. Budući da je *in vitro* transkripcija visoko senzitivna na kontaminaciju RNazama, koje mogu razgraditi produkt transkripcije, važno je voditi brigu o čistoći radnih površina, reagensa te laboratorijske opreme. To se osigurava čišćenjem pomoću 70% etanola, *RNase away* otopine (*Sigma-Aldrich*), te korištenjem reagensa koji ne sadrže RNaze (voda, pufer za T7 RNA polimerazu, ribonukleotidi).

Tablica 4. Komponente reakcijske smjese *in vitro* transkripcije.

KOMPONENTA	VOLUMEN [μL]
10x reakcijski pufer	2,00
10x ATP	2,00
10x GTP	2,00
10x. CTP	2,00
10x UTP	2,00
H ₂ O	6,36
T7 RNA polimeraza	1,80
DNA kalup (PCR amplikon)	1,84
ukupno	20,0

Tablica 5. Uvjeti provođenja *in vitro* transkripcije.

KORAK	TRAJANJE	TEMPERATURA
<i>in vitro</i> transkripcija	5,5 sati	37°C
dodatak DNaze 1	2 sata	37°C

3.2.6. Pročišćavanje RNA vodilje (engl. *single guide RNA, sgRNA*) nakon *in vitro* transkripcije i mjerenje koncentracije RNA

Nakon *in vitro* transkripcije, provodi se pročišćavanje RNA od neiskorištenih nukleotida, soli pufera potrebnih za optimalnu aktivnost T7 RNA polimeraze te T7 RNA polimeraze. Cilj je dobiti što čišći uzorak RNA sa što višim prinosom. Pročišćavanje se provodi nizom koraka prema protokolu *Monarch® RNA Cleanup Kit* (*New England Biolabs, Ipswich, SAD*). Ukratko, uzorku se dodaje RNA vezni pufer u omjeru 2:1 tj. u 50 µL uzorka dodaje se 100 µL RNA veznog pufera. Zatim se uzorku dodaje 150 µL etanola (>95%) te se uzorak pomiješa pipetiranjem. Kolonica se ubacuje u kivetu za sakupljanje, a uzorak se pipetom nanosi na kolonicu. Centrifugira se 1 minutu pri 10000 g (engl. *gravitational field strength*), a eluat se odbacuje. U uzorak se dodaje 500 µL RNA pufera za ispiranje te se centrifugira 1 minutu pri 10000 g. Ispiranje se ponavlja pri istim uvjetima. Kolonica se prebacuje u čistu *RNase free* kivetu za mikrocentrifugiranje. Potom se RNA eluira s kolonice pomoću 10 µL vode bez nukleaza, centrifugiranjem u trajanju od 1 minute pri 10000 g.

Koncentracija pročišćenog RNA uzorka mjeri se pomoću *NanoDrop* spektrofotometrijskog uređaja (*BioSpec*) (56).

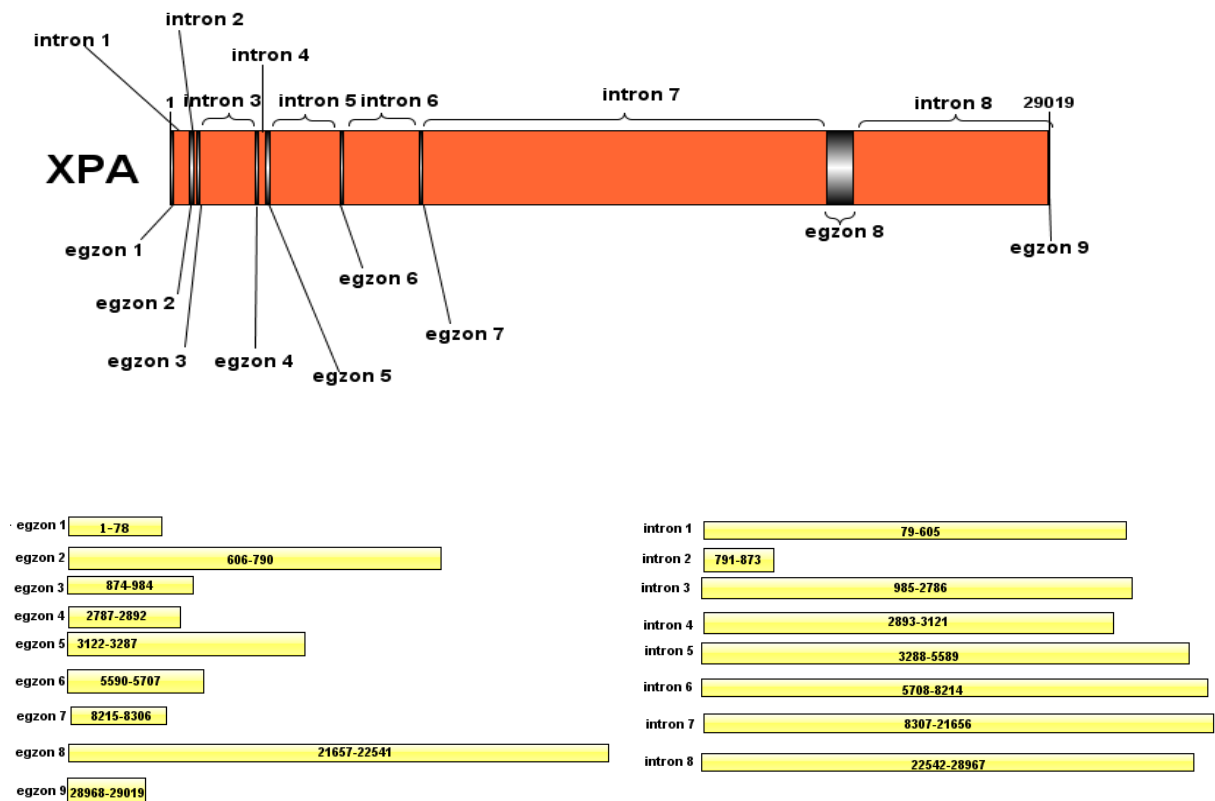
4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je konstruirati RNA vodilju (engl. *single guide RNA, sgRNA*) za CRISPR/Cas9 inaktivaciju *xpa* gena u ribi zebrici (lat. *Danio rerio*), sa svrhom inaktivacije puta DNA popravka izrezivanjem nukleotida (engl. *Nucleotide Excision Repair, NER*), kako bi se utvrdila uloga NER puta popravka u DPC popravku (engl. *DNA-protein crosslink repair, DPC repair*) *in vivo* u modelnom organizmu. Ukratko, prvo je dizajniran DNA kalup za sintezu sgRNA *in silico* (poglavlje 3.2.1.) koji je zatim izrađen sljepljivanjem DNA proba i umnožen lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) (poglavlje 3.2.2.). PCR amplikon služio je kao kalup za sintezu sgRNA *in vitro* transkripcijom (poglavlje 3.2.5.). Kao provjera *in vitro* transkripcije provedena je RNA elektroforeza u agaroznom gelu te je koncentracija sgRNA određena spektrofotometrijski (poglavlje 3.2.3.).

4.1. *In silico* odabir sekvence RNA vodilje (engl. *single guide RNA, sgRNA*) i početnica za genotipizaciju

Sekvenca *xpa* gena koji sudjeluje u DNA popravku izrezivanjem nukleotida u zebrici (lat. *Danio rerio*, engl. *zebrafish*) dobivena je koristeći *Ensembl* genomsku bazu podataka (57). Iz baze podataka preuzeta je kodirajuća DNA (engl. *coding DNA, cDNA*), koja se u genetičkom inženjerstvu često koristi za kloniranje i genetske modifikacije različitih organizama. Dobivena

sekvenca gena unosi se u *Bioedit* program (58). Pomoću ovog programa vidljiva je organizacija *xpa* gena, broj i duljina nekodirajućih regija-introna te kodirajućih regija-egzona (Slika 9.).



Slika 9. Shematski prikaz *xpa* gena s rasporedom egzona i introna (izrađeno u 59).

Mjesto cijepanja koje prepoznaje Cas9 protein mora se nalaziti uzvodno od PAM (engl. *protospacer-adjacent motif*) sekvence tj. sekvence u genomu koja sadrži slijed od tri nukleotida, NGG, pri čemu je N bilo koja dušična baza, a G gvanin. Pomoću *Bioedit* programa pronalaze se egzonske regije u kojima se želi uvesti dvolančani lom. Poželjno je da se mjesto cijepanja nalazi u prvih 30% kodirajuće regije tj. cDNA (engl. *coding DNA*). Kao genske regije u kojima se cilja uvesti dvolančani lom odabrani su egzon 1, 2 i 3, budući da čine prvih 30% cDNA u *xpa* genu. Duljina sekvence RNA vodilje (engl. *single guide RNA, sgRNA*) koja se odabire je 20 nt i nalazi se uzvodno od PAM sekvence u egzonu 1,2 ili 3 *xpa* gena zebrice.

Poželjno je da se odaberu PAM sekvence sa različitih genskih regija (egzona) i testira se više sgRNA, s obzirom da neke od njih neće biti efikasne u uvođenju dvolančanog loma (50). *CRISPRscan* algoritam (53) predviđa vjerojatnost učinkovitosti cijepanja DNA (*CRISPRscan score*) i vjerojatnost pogrešnog cijepanja unutar genoma prema sličnosti odabrane sekvence sa nekom drugom sekvencom u genomu (engl. *off-targets; Cutting Frequency Determination,*

CFD) (53, 60). Raspon *CRISPRscan score-a* varira između 1 i 100. *CRISPRscan score* bliži 100 predviđa efikasniju sgRNA tj. veća je vjerojatnost cijepanja gDNA (engl. *genomic DNA*). S obzirom da *off-target* efekt eksponencijalno raste s brojem pogrešno sparenih baza, CFD vrijednost određuje se računalno, individualno za svaki *off-target* efekt, uzimajući u obzir poziciju, broj i identitet pogrešno sparenih baza. Prema navedenim predviđanjima odabrana je *guide* sekvenca s najvišom *CRISPRscan score* vrijednosti - 35, a najmanjom vjerojatnosti *off-target* efekta (CFD) – 3,89, a navedena je u tablici 6. Nespecifično cijepanje (*off-target* efekt) može dovesti do inaktivacije drugih gena te time utjecati na uspješnost stvaranja modela za *xpa* inaktivaciju. Odabrana sekvenca dio je egzona 3, a Cas9 targetira PAM sekvencu na položaju 958/959/960 nt genomske DNA.

Tablica 6. Optimalna sekvenca prema *CRISPRscan* algoritmu te njezina svojstva.

EGZON	SEKVENCA	<i>CRISPRscan</i> <i>SCORE</i>	CFD	POZICIJA NGG na gDNA	LANAC
3	GGGGCAAAACTATAGACTC	35	3,89	958/959/960	(+)

Znajući organizaciju i duljinu introna i egzona u genu, može se odrediti genetički lokus u kojem će se pomoću CRISPR/Cas9 sustava, točnije Cas9 proteina uvesti dvolančani lom. Posljedično, doći će do popravka dvolančanog loma putevima popravka dvolančanog loma (engl. *Double-Strand Break, DSB*) homolognom rekombinacijom (engl. *Homologous Recombination, HR*) ili nehomolognim sparivanjem krajeva (engl. *Non-Homologous End Joining, NHEJ*). Ukoliko se popravak vrši putem HR, u stanice se neće uvesti mutacija. S druge strane, NHEJ popravak sklon je pogreškama (engl. *error-prone*) budući da vrši popravak neovisno o homolognoj DNA u stanici. Zbog toga se NHEJ putem popravka u stanice često uvode manje insercije i delecije, koje pomiču okvir čitanja pri translaciji. Na taj način uvodi se preuranjeni stop kodon, a posljedično dolazi do željene inaktivacije *xpa* gena. NHEJ put popravka češće sudjeluje u popravku DSB-a jer je aktivan u svim fazama staničnog ciklusa (13).

Za pronalazak početnica za genotipizaciju genske promjene pomoću HRMA (engl. *High Resolution Melting Analysis*) metode (61) koristio se *Primer-BLAST* alat (*National Center for Biotechnology Information, NCBI*) (62). Prije toga, u *Bioedit* programu poravnata je odabrana sekvenca (tablica 6.) sa genomskom *xpa* sekvencom kako bi se locirala PAM sekvenca i mjesto cijepanja Cas9 enzima. Odabran je PCR amplikon duljine oko 100 nt, minimalno 50 nt uzvodno od PAM-a kako bi se genotipizacijom vidjela promjena, budući da Cas9 cijepa 3 nt uzvodno od PAM sekvence (46).

Odabrane početnice zadovoljavale su sljedeće uvjete: duljina početnica 18-25 nt, udio GC dušičnih baza 40-60%, što manje ponavljajućih slijedova baza poput AAA ili TGTG, 3' kraj početnica završavao je sa G ili C dušičnom bazom, temperatura taljenja (engl. *melting temperature*, T_m) početnica F (engl. *forward*) i R (engl. *reverse*) nije se razlikovala za više od 5°C. Nakon odabira početnica prema gore navedenim uvjetima, iste su se analizirale u *PrimerSelect* programu (*DNASTAR*, Madison, SAD) kako bi se dobila informacija o mogućnosti dimerizacije (engl. *self dimers*, *pair dimers*) i stvaranja ukosnica (engl. *hairpin*), koja je nepoželjna te umanjuje mogućnost umnažanja *guide* sekvence. Prema rezultatima dobivenim u *PrimerSelect* programu, vjerojatno je da će se razviti 13 različitih dimera intermolekulskim povezivanjem početnica istog smjera (5'-3' ili 3'-5') (*self dimer*), 9 dimera intermolekulskim povezivanjem početnica različitog smjera (*primer dimer*) te 3 ukosnice F početnica i 6 ukosnica R početnica (*hairpin*) nastale intramolekulskim povezivanjem. Gibbsova slobodna energija (engl. *Gibbs free energy*, ΔG) nastajanja *self dimera* je $-2,24 \text{ kcalmol}^{-1}$, *primer dimera* $-2,38 \text{ kcalmol}^{-1}$, ukosnice F početnica $2,63 \text{ kcalmol}^{-1}$ te ukosnice R početnica $1,63 \text{ kcalmol}^{-1}$. ΔG je energija koja se oslobađa ili apsorbira pri nekoj reakciji. Što je njezina vrijednost negativnija ($\Delta G < 0$), veća je spontanost reakcije tj. vjerojatnije je da će se takva reakcija odvijati. Suprotno, pri $\Delta G > 0$ potrebno je uložiti energiju za odvijanje reakcije. Iz navedenih podataka, najveća je vjerojatnost nastanka primer dimera. Najmanje je vjerojatno da će nastati ukosnica intramolekulskim povezivanjem F početnice (63, 64).

Za genotipizaciju pomoću HRMA (engl. *High Resolution Melting Analysis*) metode odabran je par početnica koji najviše zadovoljava sve tražene uvjete te ima najmanju vjerojatnost tvorbe sekundarnih struktura i naveden je u tablici 7.

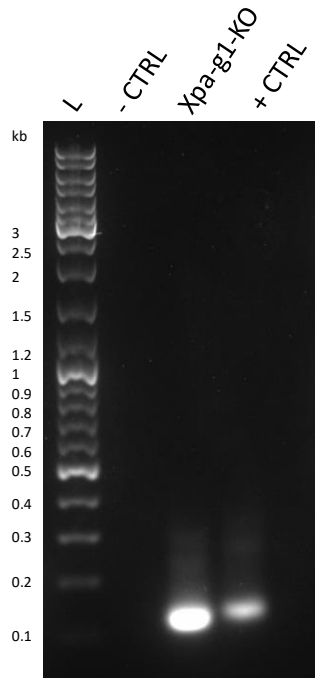
Tablica 7. Početnice za genotipizaciju pomoću HRMA (engl. *High Resolution Melting Analysis*) metode.

POČETNICA	SEKVENCA	DULJINA	UDIO GC	T_m	LANAC
FORWARD	AAATACCTCCCACCTTCAGCC	21 nt	52,38%	59,71°C	(+)
REVERSE	CAGGGGACCAAGACTCCATT	20 nt	55%	59,00°C	(-)

4.2. Izrada RNA vodilje (engl. *single guide RNA*, *sgRNA*) za inaktivaciju *xpa* gena zebrice (lat. *Danio rerio*)

Nakon sljepljivanja s DNA probama, kalup za sintezu RNA vodilje (engl. *single guide RNA*, *sgRNA*) umnožen je lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, *PCR*)

pri uvjetima navedenim u tablici 3. U svrhu provjere uspješnosti umnažanja navedene sekvence provedena je DNA elektroforeza u 1,2%-tnom agaroznom gelu (Slika 10.). U jažice se redom nanosilo 0,7 μL DNA markera (engl. *ladder*; 100 bp-10 kb; *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, SAD) koncentracije 0,5 $\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$, 1 μL negativne kontrole, 0,9 μL DNA kalupa za sintezu sgRNA (100 ng) i 1 μL pozitivne kontrole (100 ng) (Slika 10). Svi uzorci osim DNA markera prije nanošenja u jažice miješali su se s migracijskim bojilom (engl. *loading dye*) s ciljem praćenja tijekom elektroforeze.



Slika 10. Elektroforeza DNA kalupa u agaroznom gelu (1.2%) (L: DNA marker (engl. *DNA ladder*) - smjesa DNA standarda 0.1-10 kb koji se koristi za određivanje veličine PCR amplikona, - CTRL: negativna kontrola - uzorak dobiven PCR-om bez DNA kalupa, *xpa-g1-KO* - uzorak s *xpa-1-KO* kao kalupom, + CTRL: pozitivna kontrola - uzorak s *Dr-acrc-g1-KO* kao kalupom).

Iz rezultata prikazanih na slici 10. vidljivo je da u jažici u koju je nanešena negativna kontrola (- CTRL) nije dobivena vrpca. Negativna kontrola sadrži sve komponente reakcijske smjese, osim DNA kalupa te se umjesto DNA kalupa dodaje voda. Prilikom provođenja PCR-a, negativna kontrola služi kao provjera prisustva strane DNA u uzorku koja kontaminira reakcijsku smjesu i umanjuje učinkovitost umnažanja ciljne DNA sekvence. Budući da prilikom pripreme PCR reakcijske smjese za negativnu kontrolu nije dodan DNA kalup, a nije dobivena vrpca, može se zaključiti da uzorak nije kontaminiran stranom DNA koja bi u primijenjenim uvjetima davala PCR amplikon.

U jažici s kalupom za sgRNA (*xpa-g1-KO*) vidljiva je jedna vrpca. Veličina vrpce može se procijeniti usporedbom s vrpcama DNA markera. Dobiven je PCR amplikon veličine 127 bp, što je u skladu s očekivanom veličinom PCR amplikona dobivenom u optimiziranom protokolu Modzelewskog i suradnika provedenom na genu za tirozin (*tyr*) u miševa (50).

U posljednoj jažici s pozitivnom kontrolom (+ CTRL) vidljiva je jedna vrpca. Pozitivna kontrola sadrži sve komponente reakcijske smjese esencijalne za provođenje PCR reakcije. Ne sadrži DNA kalup važan za provođenje eksperimenta, već drugi, kontrolni DNA kalup koji se može umnožiti odabranim parom početnica i pri uvjetima provođenja PCR-a, a od ranije je poznat u Laboratoriju u kojem se izvodio završni rad. DNA kalup umnožen u pozitivnoj kontroli iste je veličine kao DNA kalup korišten u eksperimentu. Usporedbom sa DNA markerom zaključuje se da je dobivena vrpca veličine 127 bp. Time je potvrđeno da su PCR uvjeti optimalni za provođenje reakcije tj. da se početnice komplementarno sparuju na DNA i umnažaju DNA kalup, a količina magnezijevih iona optimalna je za aktivnost DNA polimeraze.

Nakon PCR-a, provedeno je pročišćavanje DNA prema protokolu *Monarch PCR&DNA Clean up kit* (*New England Biolabs*, Ipswich, SAD) (poglavlje 3.2.4.). Dio reakcijske smjese stavljen je na gel elektroforezu u svrhu provjere PCR-a. *NanoDrop-om* izmjerena koncentracija reakcijske smjese prije pročišćavanja iznosila je 1116 ng μ L⁻¹ tj. 27900 ng u 25 μ L reakcijske smjese (volumen PCR reakcijske smjese), a nakon pročišćavanja 90 ng μ L⁻¹ tj. 900 ng u 10 μ L reakcijske smjese (volumen pufera za eluciju DNA). Budući da *NanoDrop* u reakcijskoj smjesi osim sintetizirane DNA mjeri i koncentraciju neiskorištenih deoksiribonukleotida, početnica, DNA kalupa, soli pufera i DNA polimeraze, tijekom pročišćavanja izgubljeno je 27000 ng tj. 1026 ng po mikrolitru (μ L) reakcijske smjese, nakon uklanjanja onečišćenja. Osim koncentracije, iz omjera 260/280 i 260/230 očitanih na *NanoDrop-u* dobiva se informacija o prisustvu onečišćenja u uzorku. Apsorpcijski maksimum nukleinskih kiselina je pri 260 nm, budući da pri toj valnoj duljini apsorbiraju purinske i pirimidinske baze. Aromatski aminokiselinski ostaci proteina imaju apsorpcijski maksimum pri 280 nm stoga se koncentracija proteina mjeri pri 280 nm. Pri 230 nm najbolje apsorbiraju soli, peptidne veze i organski spojevi. Omjer 260/280 označava kontaminaciju nukleinskih kiselina proteinima. Uzorak se smatra čistim ako je 260/280 oko 1,80 za DNA. Očitani omjer 260/280 umnoženog DNA kalupa iznosi 1,90, što pokazuje da je dobiveni kalup za izradu sgRNA za *xpa* gen vrlo čist. Omjer 260/230 predstavlja kontaminaciju solima (magnezij) i organskim otapalima (etanol). Uzorak se smatra čistim ako je 260/230 između 2,00 i 2,20. Ukoliko je niži od 1,8 smatra se da je uzorak donekle onečišćen (56). Očitani omjer 260/230 umnoženog DNA kalupa iznosi 2,25. Može se zaključiti da uzorak ne sadrži značajne kontaminante.

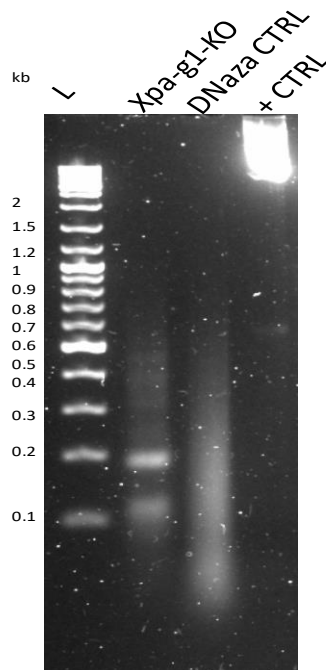
4.3. *In vitro* transkripcija i sinteza RNA vodilje (engl. *single guide RNA, sgRNA*)

PCR amplikon korišten je kao kalup za sintezu RNA vodilje (engl. *single guide RNA, sgRNA*) *in vitro* transkripcijom. Nakon 5,5 sati *in vitro* transkripcije i tretmana DNA kalupa DNazom, kao što je opisano u poglavlju 3.2.5., koncentracija dobivene RNA iznosila je $1344 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$. Kvaliteta dobivene sgRNA provjerena je elektroforezom u 1,2%-tnom agaroznom gelu (Slika 11.).

U jažice se redom nanosilo 0,7 μL markera (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD*) koncentracije $0,5 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$, 0,8 μL sgRNA (*xpa-g1-KO*, 100 ng), 10 μL kontrole DNaze 1 (DNaza CTRL, 10 ng) i 10 μL pozitivne kontrole (+ CTRL, 10 ng).

Kao kontrola DNaze (DNaza CTRL) nakon *in vitro* transkripcije služi pGFP-C3 tretiran DNazom 1 [$2 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$]. Kao što je prikazano na slici 11., nije dobivena vrpca. Razmaz na gelu pripada degradiranom DNA kalupu. Može se potvrditi da Dnaza 1 ispravno radi tj. da razgrađuje DNA kalup nakon provedene *in vitro* transkripcije.

Kao pozitivna kontrola za tehničku provjeru gel elektroforeze, kao kalup se koristio plazmid pGFP-C3, veličine 4724 bp. Dobivena je jedna vrpca iznad 2 kb. Usporedbom sa markerom ne može se sa sigurnošću potvrditi odgovara li dobivena vrpca plazmidu prema veličini. Moguć razlog tome jest visoka koncentracija korištenog plazmida ($476 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$).



Slika 11. Elektroforeza RNA u agaroznom gelu (1.2%) nakon *in vitro* transkripcije (L: ladder, 0,1 - 10 kb, *xpa-g1-KO* - sgRNA, DNaza CTRL : kontrola rada DNaze, + CTRL : pozitivna kontrola, uzorak s pGFP-C3).

Iz rezultata prikazanih na slici 11. vidljivo je da su u jažici u koju je nanjena sgRNA dobivene dvije vrpce. Usporedbom sa DNA markerom vidljivo je da su obje dobivene vrpce veličine između 0,1 i 0,2 kb. Može se zaključiti da je vrpca bliža 0,1 kb duljine 112 nt te da pripada sgRNA dobivenom *in vitro* transkripcijom. Sintetizirana RNA duljine je 112 nt, a ne 142 bp kao DNA kalup budući da se mjesto vezanja RNA polimeraze – promotor duljine 24 nt i terminator transkripcije duljine 6 nt ne umnažaju (50) (slika 11). Pretpostavlja se da vrpca bliža 0,2 kb pripada nekoj od sekundarnih struktura koje tvori sgRNA (dimeri, ukosnice), s obzirom da te strukture imaju drugačiju dinamiku kretanja kroz gel.

Sintetizirana RNA iz *in vitro* transkripcijske smjese pročišćena je prema *Monarch RNA Cleanup Kit* (New England Biolabs, Ipswich, SAD) protokolu i izrazito je visoke koncentracije koja iznosi $1248 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$. Dio reakcijske smjese stavljen je na gel elektroforezu u svrhu provjere *in vitro* transkripcije. *NanoDrop-om* izmjerena koncentracija reakcijske smjese prije pročišćavanja iznosila je $1344 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ tj. 26880 ng u 20 μL reakcijske smjese (volumen reakcijske smjese *in vitro* transkripcije), a nakon pročišćavanja $1248 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ tj. 12480 ng u 10 μL reakcijske smjese (volumen vode bez nukleaza za eluciju). Budući da *Nanodrop* u reakcijskoj smjesi prije pročišćavanja osim RNA nastale transkripcijom mjeri i koncentraciju neiskorištenih ribonukleotida, DNA kalupa i polimeraze, tijekom pročišćavanja izgubljeno je 14400 ng tj. 96 ng po μL reakcijske smjese, nakon uklanjanja onečišćenja. Očitani omjer 260/280 iznosi 2,40, dok je omjer 260/230 2,80. Uzorak se smatra čistim ako je omjer 260/280 oko 2,00 za RNA, a omjer 260/230 između 2,00 i 2,20 (56). Omjer 260/230 nešto je viši od optimalnog, što ukazuje na izrazito čist RNA uzorak bez prisutnih kontaminanata (npr. etanol). Također, izmjerena koncentracija RNA od $1248 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ nalazi se na rubu ranga detekcije NanoDrop-a pa je zato omjer nešto viši. Preporuča se razrjeđenje uzorka za dobivanje točnog omjera 260/230 između 2,00 i 2,20.

Dobivena RNA alikvotizira se u uzorke volumena 5-10 μL i pohranjuje na -80°C kako bi se spriječila degradacija RNA uzastopnim zamrzavanjem i odmrzavanjem (50).

U narednom tijeku eksperimenta sintetizirana sgRNA (engl. *single guide RNA*) miješati će se s Cas9 enzimom koji nosi signal za ulazak u jezgru (engl. *nuclear localization signal*) u molarnom omjeru 1:1. Nastali Cas9/sgRNA (RNP kompleks) (engl. *ribonucleoprotein complex*) unijeti će se u oplođenu jajnu stanicu zebrice (lat. *Danio rerio*) tehnikom mikroinjektiranja. Razvijeni injektirani embriji i embriji divljeg tipa sakupiti će se i lizirati. Na liziranim embrijima provoditi će se genotipizacija pomoću početnica dizajniranih u poglavlju 3.2.1. i HRMA metode (engl. *High Resolution Melting Analysis*) koja detektira promjenu u temperaturi taljenja (engl. *melting temperature*) između uzorka u koji se pokušava uvesti mutacija te uzorka divljeg tipa (50, 61).

5. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti da je dizajnirana RNA vodilja (engl. *single guide RNA, sgRNA*) za inaktivaciju *xpa* gena zebriće (lat. *Danio rerio*) koji sudjeluje u putu DNA popravka izrezivanjem nukleotida (engl. *Nucleotide Excision Repair*) izrazito visoke koncentracije, kvalitete i integriteta.

Efikasnost RNA vodilje (engl. *single guide RNA, sgRNA*) u navođenju Cas9 enzima na ciljno mjesto cijepanja (engl. *target*) može se odrediti nakon *in vitro* pripreme i mikroinjektiranja Cas9/sgRNA kompleksa u zebriću genotipizacijom pomoću početnica koristeći HRMA metodu (engl. *High Resolution Melting Analysis*) te praćenjem novonastalih promjena na genetskoj razini.

6. LITERATURA

1. Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, **58(5)**, 235-263.
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. Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrant, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... & McLaren, S. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498-503.
4. Hoshijima, K., Jurynek, M. J., & Grunwald, D. J. (2016). Precise editing of the zebrafish genome made simple and efficient. *Developmental cell*, *36*(6), 654-667.
5. Henle, E. S., & Linn, S. (1997). Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, **272(31)**, 19095-19098.
6. Riley, P. A. (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International journal of radiation biology*, **65(1)**, 27-33.
7. Hakem, R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *The EMBO journal*, **27(4)**, 589-605.
8. 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.
9. Desouky, O., Ding, N., & Zhou, G. (2015). Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, **8(2)**, 247-254.
10. Wyrick, J. J., & Roberts, S. A. (2015). Genomic approaches to DNA repair and mutagenesis. *DNA repair*, **36**, 146-155.
11. Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Molecular cell*, **28(5)**, 739-745.
12. Sfeir, A., & Symington, L. S. (2015). Microhomology-mediated end joining: a back-up survival mechanism or dedicated pathway?. *Trends in biochemical sciences*, **40(11)**, 701-714.
13. Iliakis, G., Murmann, T., & Soni, A. (2015). Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **793**, 166-175.
14. Sallmyr, A., & Tomkinson, A. E. (2018). Repair of DNA double-strand breaks by mammalian alternative end-joining pathways. *Journal of Biological Chemistry*, **293(27)**, 10536-10546.

15. Tretyakova, N. Y., Groehler IV, A., & Ji, S. (2015). DNA–protein cross-links: formation, structural identities, and biological outcomes. *Accounts of chemical research*, **48(6)**, 1631-1644.
16. Stingele, J., Bellelli, R., & Boulton, S. J. (2017). Mechanisms of DNA–protein crosslink repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **18(9)**, 563-573.
17. Klages-Mundt, N. L., & Li, L. (2017). Formation and repair of DNA-protein crosslink damage. *Science China Life Sciences*, **60(10)**, 1065-1076.
18. Ide, H., Nakano, T., Salem, A. M., & Shoukamy, M. I. (2018). DNA–protein cross-links: Formidable challenges to maintaining genome integrity. *DNA repair*, **71**, 190-197.
19. Vaz, B., Popovic, M., & Ramadan, K. (2017). DNA–protein crosslink proteolysis repair. *Trends in biochemical sciences*, **42(6)**, 483-495.
20. BioRender <<https://biorender.com/>> Pristupljeno 1. srpnja 2020.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Zhang, H., Xiong, Y., & Chen, J. (2020). DNA–protein cross-link repair: what do we know now?. *Cell & Bioscience*, **10(1)**, 1-10.
26. Lopez-Mosqueda, J., Maddi, K., Prgomet, S., Kalayil, S., Marinovic-Terzic, I., Terzic, J., & Dikic, I. (2016). SPRTN is a mammalian DNA-binding metalloprotease that resolves DNA-protein crosslinks. *Elife*, **5**, e21491.
27. Dokshin, G. A., Davis, G. M., Sawle, A. D., Eldridge, M. D., Nicholls, P. K., Gourley, T. E., ... & de Rooij, D. G. (2020). GCNA interacts with Spartan and topoisomerase II to regulate genome stability. *Developmental Cell*, **52(1)**, 53-68.
28. Bhargava, V., Goldstein, C. D., Russell, L., Xu, L., Ahmed, M., Li, W., ... & Kittler, R. (2020). GCNA preserves genome integrity and fertility across species. *Developmental cell*, **52(1)**, 38-52.
29. Borgermann, N., Ackermann, L., Schwertman, P., Hendriks, I. A., Thijssen, K., Liu, J. C., ... & Mailand, N. (2019). SUMOylation promotes protective responses to DNA-protein crosslinks. *The EMBO journal*, **38(8)**, e101496.
30. Kusakabe, M., Onishi, Y., Tada, H., Kurihara, F., Kusao, K., Furukawa, M., ... & Sugasawa, K. (2019). Mechanism and regulation of DNA damage recognition in nucleotide excision repair. *Genes and Environment*, **41(1)**, 2.
31. Truglio, J. J., Croteau, D. L., Van Houten, B., & Kisker, C. (2006). Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. *Chemical reviews*, **106(2)**, 233-252.
32. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*, **73(1)**, 39-85.
33. Sugitani, N., Sivley, R. M., Perry, K. E., Capra, J. A., & Chazin, W. J. (2016). XPA: A key scaffold for human nucleotide excision repair. *DNA repair*, **44**, 123-135.
34. Nakano, T., Morishita, S., Katafuchi, A., Matsubara, M., Horikawa, Y., Terato, H., ... & Ide, H. (2007). Nucleotide excision repair and homologous recombination systems commit differentially to the repair of DNA-protein crosslinks. *Molecular cell*, **28(1)**, 147-158.

35. Fousteri, M., & Mullenders, L. H. (2008). Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell research*, **18(1)**, 73-84.
36. de Graaf, B., Clore, A., & McCullough, A. K. (2009). Cellular pathways for DNA repair and damage tolerance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks. *DNA repair*, **8(10)**, 1207-1214.
37. Ide, H., Shoukamy, M. I., Nakano, T., Miyamoto-Matsubara, M., & Salem, A. M. (2011). Repair and biochemical effects of DNA-protein crosslinks. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **711(1-2)**, 113-122.
38. Ide, H., Nakano, T., Shoukamy, M. I., & Salem, A. M. (2015). Formation, repair, and biological effects of DNA-protein cross-link damage. *Advances in DNA Repair*, 43-80.
39. 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.
40. Minko, I. G., Zou, Y., & Lloyd, R. S. (2002). Incision of DNA-protein crosslinks by UvrABC nuclease suggests a potential repair pathway involving nucleotide excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99(4)**, 1905-1909.
41. Morocz, M., Zsigmond, E., Toth, R., Enyedi, M. Z., Pintér, L., & Haracska, L. (2017). DNA-dependent protease activity of human Spartan facilitates replication of DNA-protein crosslink-containing DNA. *Nucleic acids research*, **45(6)**, 3172-3188.
42. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., ... & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315(5819)**, 1709-1712.
43. Khadempour, S., Familghadakchi, S., Motlagh, R. A., Farahani, N., Dashtiahangar, M., Rezaei, H., & Gheibi Hayat, S. M. (2019). CRISPR-Cas9 in genome editing: Its function and medical applications. *Journal of cellular physiology*, **234(5)**, 5751-5761.
44. Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annual review of biochemistry*, **85**, 227-264.
45. Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature communications*, **9(1)**, 1-13.
46. 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.
47. Zhang, F., Wen, Y., & Guo, X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human molecular genetics*, **23(R1)**, R40-R46.
48. Zhang, J. H., Adikaram, P., Pandey, M., Genis, A., & Simonds, W. F. (2016). Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering. *Bioengineered*, **7(3)**, 166-174.
49. Salsman, J., & Dellaire, G. (2017). Precision genome editing in the CRISPR era. *Biochemistry and cell biology*, **95(2)**, 187-201.
50. 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.
51. Larson, M. H., Gilbert, L. A., Wang, X., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nature protocols*, **8(11)**, 2180-2196.
52. Addgene (2004) <<https://www.addgene.org/>> Pristupljeno 29. svibnja 2020.
53. 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.
54. NCBI (1988) National Center for Biotechnology Information <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Pristupljeno 24. veljače 2020.

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. Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, **(45)**, e2565.
57. Yates, A. D., Achuthan, P., Akanni, W., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., ... & Bhai, J. (2020). Ensembl 2020. *Nucleic acids research*, **48(D1)**, D682-D688.
58. Hall, T., Biosciences, I., & Carlsbad, C. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*, **2(1)**, 60-61.
59. IBS software (1997) <<http://ibs.biocuckoo.org/>> Pristupljeno 10. lipnja 2020.
60. Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., ... & Virgin, H. W. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature biotechnology*, **34(2)**, 184-191.
61. Smith, B. L., Lu, C. P., & Alvarado Bremer, J. R. (2010). High-resolution melting analysis (HRMA): a highly sensitive inexpensive genotyping alternative for population studies. *Molecular ecology resources*, **10(1)**, 193-196.
62. DNASTAR (1982) <<https://www.dnastar.com/software/lasergene/>> Pristupljeno 24. veljače 2020.
63. Plasterer, T. N. (1997). PRIMERSELECT. In *Sequence Data Analysis Guidebook* (pp. 291-302). Springer, Totowa, NJ.
64. Mann, T., Humbert, R., Dorschner, M., Stamatoyannopoulos, J., & Noble, W. S. (2009). A thermodynamic approach to PCR primer design. *Nucleic acids research*, **37(13)**, e95-e

Izjava o izvornosti

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

Lucija Mamce

ime i prezime studenta