

# Karakterizacija tirozil-DNA-fosfodiesteraza (Tdp1 i Tdp2) u popravku unakrsne veze DNA i proteina u modelnom organizmu ribe zebrice

---

Jukić, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:415343>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-18**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Luka Jukić

**Karakterizacija tirozil-DNA-fosfodiesteraza (Tdp1 i  
Tdp2) u popravku  
unakrsne veze DNA i proteina u modelnom  
organizmu ribe zebrice**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistra kemije

Zagreb, 2021.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju pod mentorstvom dr. sc. Marte Popović i neposrednim voditeljstvom mag. educ. biol. et chem. Ivana Antičevića. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Marko Močibob.



## Zahvale

Ovim putem bih htio zahvaliti mentorici dr. sc. Marti Popović i ostaloj ekipi iz Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju što su mi pružili priliku izrade diplomskog rada. Hvala Vam na svom trudu i vremenu kojeg ste uložili u mene te svim savjetima i sugestijama. Zbog vaše predanosti, stručnosti i dobronamjernosti uspio sam mnogo toga naučiti i zbog toga sam vam neizmjereno zahvalan. Bila mi je čast dijeliti laboratorij sa svima vama.

Također jedno veliko hvala Ivanu koji mi je uvijek bio spreman pomoći i učinio mi rad mnogostruko lakšim i zanimljivijim, a atmosferu prijateljskom. Bez tvoje pomoći ne bih niti približno toliko toga naučio koliko sam naučio i iskreno smatram da nisam mogao imati boljeg neposrednog mentora.

Hvala doc. dr. sc. Marku Močibobu što mi je pomogao oko realizacije diplomskog rada i dao mi izuzetno korisne savjete oko pisanja i formalnog dijela diplomskog rada te mi tako uvelike olakšao te segmente diplomskog rada.

Hvala svim mojim prijateljima što su vjerovali u mene. Posebno hvala Marku, Martinu, Filipu, Ani i ostalima koji su me bodrili i u koje se mogu uvijek pouzdati. Presretan sam što vas imam.

Najviše hvala Mami Tanji, Tati Toniju i sestri Lei. Vi ste uvijek bili tu za mene, i u teškim, i u manje teškim trenucima cijelog mog studiranja i za to vam nikada neću moći dovoljno zahvaliti. Bez vaše podrške ne bi bilo mog uspjeha. Hvala.



## Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT .....	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	3
2.1. Oštećenja DNA i tipovi DNA popravka .....	3
2.2. DNA-PROTEIN unakrsna vezanja (engl. <i>DNA-protein crosslinks, DPCs</i> ) .....	7
2.3. Popravak DNA-protein unakrsnih vezanja .....	10
2.4. Topoizomeraze i njihova unakrsna vezanja (engl. <i>crosslink</i> ) za DNA .....	13
2.5. Tirozil-DNA-fosfodiesteraza 1 .....	15
2.6. Tirozil-DNA-fosfodiesteraza 2 .....	18
2.7. CRISPR-Cas sustavi .....	21
2.8. Modelni organizmi - domaći miš i riba zebrića .....	24
§ 3. MATERIJALI I METODE.....	25
3.1. Materijali .....	25
3.1.1. Standardne kemikalije .....	25
3.1.2. Boje .....	25
3.1.3. Markeri veličina .....	25
3.1.4. Početnice .....	25
3.1.5. Nukleotidi .....	25
3.1.6. Enzimi .....	25
3.1.7. Komercijalni kompleti .....	26
3.2. Metode .....	26
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....	40
4.1. Analiza izolirane ukupne RNA .....	40
4.2. Provjera dizajniranih početnica lančanom reakcijom polimerazom .....	51
4.3. Određivanje efikasnosti početnica kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom .....	54
4.4. Kvantifikacija ekspresije <i>TDPI</i> i <i>TDP2</i> gena u tkivima miševa .....	56
4.5. Identifikacija Utemeljitelja (engl. <i>Founder</i> ) pomoću genotipizacije sa HRM metodom .....	72
§ 5. ZAKLJUČAK .....	77
§ 6. LITERATURNI IZVORI.....	78
§ 7. ŽIVOTOPIS .....	86







Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### KARAKTERIZACIJA TIROZIL-DNA-FOSFODIESTERAZA (TDP1 I TDP2) U POPRAVKU UNAKRSNE VEZE DNA I PROTEINA U MODELNOM ORGANIZMU RIBE ZEBRICE

Luka Jukić

Postoje brojna oštećenja DNA koja mogu nastajati na različite načine, bilo endogeno ili egzogeno. Jedan od načina oštećenja DNA je nastajanje DNA-protein unakrsnih vezanja, oštećenja karakterističnih po postojanju kovalentne veze između proteina i DNA. Tirozil-DNA-fosfodiesteraze (Tdp) su proteini koji kataliziraju hidrolizu fosfotirozilne veze popravljajući DNA-protein unakrsnih vezanja nastala ireverzibilnim povezivanjem enzima topoizomeraza i DNA. U svrhu ovog rada određene su razine genske ekspresije tirozil-DNA-fosfodiesteraze 1 i tirozil-DNA-fosfodiesteraze 2 u tkivima mužjaka i ženki miševa kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom te su iste međusobno uspoređene. Razina ekspresije također je uspoređena s ekspresijom tirozil-DNA-fosfodiesteraza određenoj u ribi zebri i čovjeku. Uz određivanje ekspresije provedena je identifikacija utemeljitelja Tdp1<sup>-/-</sup> linije riba zebri koristeći metodu analize mekšanja visoke rezolucije.

(86 + 12 stranica, 37 slika, 8 tablica, 167 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: DNA-protein unakrsna vezanja, kvantitativna lančana reakcija polimerazom, oštećenja DNA tirozil-DNA-fosfodiesteraza 1, tirozil-DNA-fosfodiesteraza 2

Mentor: zn. sur. dr. sc. Marta Popović  
Neposredni voditelj: mag. educ. biol. et chem. Ivan Antičević  
Nastavnik: doc. dr. sc. Marko Močibob

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Marko Močibob
  2. doc. dr. sc. Đani Škalamera
  3. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
- Zamjena: doc. dr. sc. Morana Dulić

Datum diplomskog ispita: 16. veljače 2021.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### CHARACTERISATION OF TYROSYL-DNA-PHOSPHODIESTERASES (TDP1 AND TDP2) IN DNA-PROTEIN CROSSLINK REPAIR IN ZEBRAFISH MODEL ORGANISM

Luka Jukić

There are numerous types of DNA damage that can occur in a variety of ways, either endogenously or exogenously. One of the types of DNA damage is the formation of DNA-protein cross-links, damage characterized by the existence of a covalent bond between protein and DNA. Tyrosyl-DNA phosphodiesterases (Tdps) are proteins that catalyze the hydrolysis of the phosphotyrosyl bond by repairing the DNA-crosslinked protein formed by the irreversible binding of the enzyme topoisomerases and DNA. For the purpose of this work, the levels of gene expression of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 in the tissues of male and female mice were determined by quantitative polymerase chain reaction and they were compared with each other. The expression levels in mice were also compared to the expression levels of tyrosyl-DNA phosphodiesterases in zebrafish and human. In addition to determining expression founder identification of zebrafish Tdp1<sup>-/-</sup> line was performed using the high resolution melting analysis method.

(86 + 12 pages, 37 figures, 8 tables, 167 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: DNA damage, DNA-protein crosslinks, quantitative polymerase chain reaction, tyrosyl DNA phosphodiesterase 1, tyrosyl DNA phosphodiesterase 2

Mentor: Dr. Marta Popović, Research Associate

Assistant mentor: mag. educ. biol. et chem. Ivan Antičević

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Marko Močibob, Assistant Professor
  2. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
  3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
- Substitute: Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Date of exam: February 16, 2021.



## § 1. UVOD

Oštećenja DNA uobičajena su pojava u životu svake stanice te mogu nastati na mnogo načina: tijekom staničnih procesa potrebnih za pravilno funkcioniranje stanice, u metaboličkim reakcijama i zbog djelovanja vanjskih čimbenika. Najteža posljedica oštećenja DNA je stanična smrt te se stoga, s ciljem zaštite stanice razvio cijeli niz mehanizama popravaka oštećene DNA. Pojedini mehanizmi popravka djelovat će ovisno o vrsti oštećenja te će koristiti specijalizirane enzime i načine popravka. Jedni od najštetnijih oštećenja DNA su DNA-protein unakrsna vezanja (engl. *DNA-protein crosslinks*, DPCs). Takva oštećenja nastaju uslijed ireverzibilnog vezanja proteina i DNA kovalentnom vezom.<sup>30,41</sup> DPC-ovi mogu nastati na različite načine uključujući endogene izvore oštećenja poput oksidirajućih radikala (ROS)<sup>34</sup> ili aldehida<sup>32</sup> i egzogene inducirajuće agense poput antitumorskih lijekova kamptotecina, etopozida, cisplatina i dr.<sup>43,44</sup> Za razliku od ostalih mehanizama popravaka oštećenja DNA, popravci DPC-ova slabo su proučeni te mehanizam njihova popravka još nije u potpunosti razjašnjen.<sup>64</sup> Postoji nekoliko različitih pristupa popravcima DPC-ova, a oni uključuju popravke proteolitičkom razgradnjom proteinske osnovice od strane proteaza, uklanjanje fragmenta DNA na kojoj se nalazi DPC djelovanjem nukleaza ili hidrolizu kovalentne veze između proteinskog djela i DNA od strane specijaliziranih enzima.<sup>53, 60, 78.</sup> Tirozil-DNA-fosfodiesteraze (Tdp) kataliziraju hidrolizu fosfotirozilne veze DPC-ova nastalih ireverzibilnim vezanjem DNA i topoizomeraza. Topoizomeraze su enzimi koji smanjuju torzijski stres DNA, a djeluju tako da tvore kovalentne intermedijere s DNA. Kovalentna veza uspostavlja se između tirozina enzima topoizomeraze i fosfata DNA tijekom fiziološkog katalitičkog ciklusa topoizomeraza. Međutim, uslijed prisustva endogenog ili egzogenog DPC uzročnika, opisana veza može postati ireverzibilna te se tada naziva unakrsnom (engl. *crosslink*).<sup>109, 19</sup> U stanicama sisavaca postoje dva Tdp enzima, Tdp1 i Tdp2. Tdp1 katalizira hidrolizu fosfotirozilne veze DPC-ova nastalih vezanjem enzima topoizomeraze 1 i DNA, dok Tdp2 katalizira hidrolizu fosfotirozilne veze DPC-ova nastalih vezanjem enzima Topoizomeraze 2 i DNA. Osim što se međusobno razlikuju prema supstratima na koje djeluju, Tdp1 i 2 također se razlikuju u strukturi i izgledu aktivnog mjesta. Katalitički mehanizam Tdp1 enzima temelji se na stvaranju fosfohistidinske veze između histidina u aktivnom mjestu i 3' fosfata DNA. Za razliku od Tdp1 enzima, katalitički mehanizam Tdp2 enzima ne temelji se na stvaranju kovalentne veze između Tdp2 i DNA.<sup>87,97</sup> Također, za

katalitičku aktivnost Tdp2 potrebni su magnezijevi kationi koji kataliziraju nukleofilni napad na fosfotirozilnu vezu što nije slučaj kod Tdp1 enzima.

Cilj ovog rada bio je usporediti ekspresiju gena *TDP1* i *TDP2* u tkivima dva modelna organizma, miša i zebrice te usporediti iste s ekspresijom gena za *TDP1* i *TDP2* u čovjeka. Da bi se mogla odrediti ekspresija gena bilo je potrebno izolirati ukupnu RNA iz tkiva, prevesti RNA u komplementarnu DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) te provesti kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom (engl. *Quantitative PCR*, qPCR). U tu svrhu dizajnirane su početnice za qPCR analizu *TDP1* i *TDP2* gena miša, dok je kvantifikacija ekspresije *TDP1* i *TDP2* gena zebrice određena u laboratoriju prije izrade ovoga diplomskog rada. Efikasnost dizajniranih početnica odredila se qPCR metodom te se ustanovilo da se dizajnirane početnice mogu koristiti u postupcima određivanja razine ekspresije Tdp1 i *TDP2* gena. Uz određivanje razine ekspresije *TDP1* i *TDP2* gena provodila se identifikacija potencijalnih utemeljitelja (engl. *Founders*) riba zebrica pomoću metode mekšanja DNA visoke rezolucije (engl. *High Resolution Melting*, HRM) kojom se ispitalo postojanje promjena u Tdp1 genu embrija potomaka potencijalnih utemeljitelja.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Oštećenja DNA i tipovi DNA popravka

Očuvanje informacija pohranjenih u obliku nukleotidnog slijeda u molekuli DNA jedna je od ključnih zadaća svakog organizma. Postoje brojni tipovi oštećenja DNA od kojih neki dovode do stanične smrti. S ciljem sprječavanja takvog ishoda, organizmi su razvili različite načine popravka oštećenja DNA. Oštećenja DNA mogu se podijeliti u dvije osnovne kategorije ovisno o načinu nastanka, u endogena i egzogena oštećenja. Endogena oštećenja nastaju tijekom uobičajenih staničnih procesa, bilo spontano, bilo reakcijama DNA s različitim produktima staničnih reakcija. Primjerice; spontanom pogreškama prilikom procesa replikacije gdje unatoč visokoj točnosti polimeraza može doći do supstitucija, insercija i delecija baza što može uzrokovati mutacije<sup>1,2</sup>. Nadalje spontane deaminacije baza<sup>3,4</sup>, depurinacije i depirimidinacije dušičnih baza pri fiziološkim uvjetima u stanicama dovode do nastajanja apurinskih i apirimidinskih mjesta u DNA (engl. *AP sites*)<sup>5</sup>. Česti endogeni uzročnici su i spontane metilacije baza od strane *S*-adenozilmetionina (SAM) ili endogeno nastalih spojeva<sup>6</sup> kao i reakcije sa reaktivnim kisikovim vrstama i nusproduktima metaboličkih reakcija. Reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) nastaju uglavnom kao nusprodukti staničnog disanja u aerobnim organizmima, u staničnom odgovoru u upalnim procesima te signalnim putevima. Organizmi su razvili mnoge načine obrane od štetnog utjecaja ROS-a kao što je aktivnost oksidativnih enzima i zaštita DNA pomoću histona. Unatoč tome, ROS u stanicama nastaju kontinuirano uzrokujući različite tipove oštećenja DNA kao što su oksidacije, adicije na dušične baze te jednolančane i dvolančane lomove DNA.<sup>8</sup> Često oštećenje DNA nastalo djelovanjem reaktivnih kisikovitih vrsta je modifikacija gvanina, 8-okso-gvanin koji nastaje hidrosilacijom gvanina i sparuje se s adeninom. Jedna od najštetnijih reaktivnih kisikovitih vrsta je hidroksilni radikal koji nastaje kao nusprodukt reakcijom vodikova peroksida i željezovitih kationa (Fentonova reakcija). Peroksidacija lipida još jedan je od procesa koji stvaraju za stanicu štetne spojeve, u ovom slučaju aldehide, koji su poznati inducirajući agensi za DPC.<sup>7,8,11,12</sup>

Najčešći uzročnici egzogenih oštećenja DNA su različiti okolišni čimbenici i elektromagnetska zračenja određenih valnih duljina. Od elektromagnetskog zračenja najštetnijim se smatra ionizirajuće zračenje (gama zračenje, rentgensko zračenje i čestice



nastale radioaktivnim raspadima) i UV zračenje. Najčešći egzogeni uzročnici oštećenja DNA su različiti alkilirajući agensi, reaktivni elektrofilni i aromatski amini.<sup>164</sup> Ionizirajuće zračenje među ostalom uzrokuje dvolančane i jednolančane lomove u DNA, a dvolančani lomovi smatraju se najopasnijim oštećenjima DNA. Ionizirajuće zračenje također stvara radikale u obliku reaktivnih kisikovih vrsta koji potom oštećuju baze DNA ili šećerne skupine. Oštećenja nastala ionizirajućim zračenjima slična su oštećenjima nastalim djelovanjem ROS-a.<sup>9,10,13,14</sup> Za razliku od ionizirajućeg zračenja, apsorpcija UV zračenja od strane DNA molekula potiče fotokemijske procese koji za ishod imaju nastajanje različitih vrsta DNA lezija. Najčešća oštećenja pojavljuju se u obliku pirimidinskih dimera, točnije nastajanje ciklobutan pirimidinskih dimera i (6-4) fotoprodukata.<sup>165</sup>

S obzirom na štetnost oštećenja DNA, u stanici se s ciljem očuvanja molekula DNA, razvio cijeli niz signalnih puteva i mehanizama odgovora na oštećenje DNA (engl. *DNA damage response*, DDR). Postoji nekoliko osnovnih mehanizama popravka koji obuhvaćaju različite vrste enzima i djeluju specifično na određeni tip oštećenja DNA.<sup>18</sup> Njihova aktivnost usklađena je signalnim putevima koji se aktiviraju nakon nastanka oštećenja DNA, a temelje se na kaskadama proteinskih kinaza.<sup>17</sup> Ustanovljeno je da su proteinske kinaze Ataxia telangiectasia mutirana (engl. *Ataxia telangiectasia mutated*, ATM) i Ataxia telangiectasia i Rad3 srodan protein (engl. *Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*, ATR) najvažnije u DDR signalizaciji, a one se među ostalom aktiviraju dvolančanim (ATM) i jednolančanim (ATR) DNA lomovima. ATM i ATR kinaze fosforiliraju cijeli niz proteina čime dolazi do poticanja transkripcije i aktivacije proteina koji služe u popravku oštećenja DNA, usporavanja napredovanja stanice kroz kontrolne točke u staničnoj diobi te, ako je potrebno, indukcije stanične smrti. Koji će se enzimi i putevi popravka aktivirati ovisi o tipu oštećenja DNA.<sup>15,16</sup>

Popravak izrezivanjem baza (engl. *Base excision repair*, BER) popravljaju oštećenja baza kao što su deaminacija, alkilacija ili oksidacija, a temelji se na aktivnosti enzima *N*-glikozilaza (Slika 2.1.1.). To su enzimi koji kataliziraju reakciju cijepanja *N*-glikozidne veze i tako uklanjaju pogrešnu bazu iz DNA stvarajući abazično mjesto. Proces započinje tako da određena glikozilaza cijepa pogrešnu bazu, a zatim djeluje AP-endonukleaza (APE1 u ljudskim stanicama) koja katalizira hidrolizu fosfodieterske veze na 5' kraju nukleotida s pocijepanom bazom. Djelovanjem polimeraze i DNA-ligaze nanovo se sintetizira dio lanca DNA koji je sadržavao pogrešnu bazu prema kalupu drugog lanca. Postoje dva puta BER-a ovisno o vrsti

oštećenja i tipu glikozilaze (glikozilaze mogu biti monofunkcionalni ili bifunkcionalni enzim koji djeluje i kao liaza), a razlikuju se po tome koji od enzima zarezuje DNA.<sup>21-23</sup>

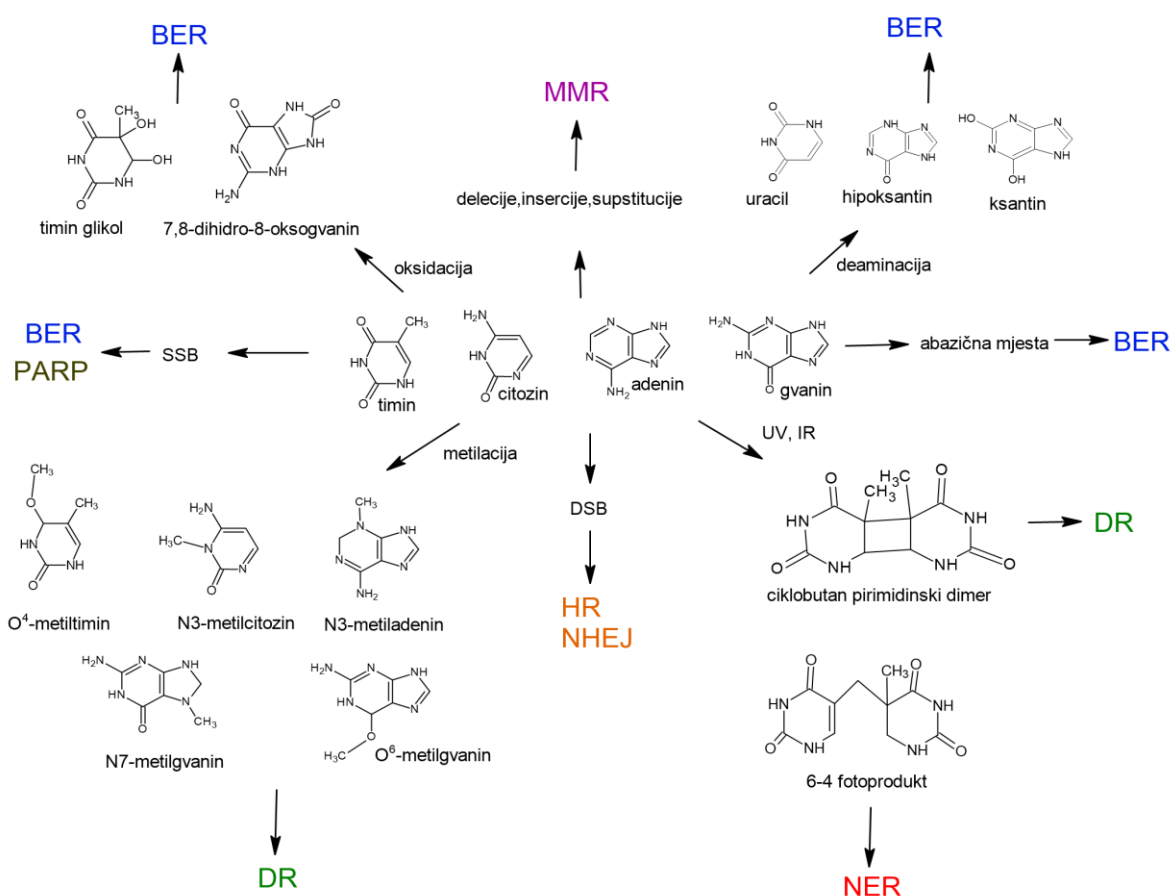
Popravak izrezivanjem nukleotida (engl. *Nucleotide excision repair*, NER) aktivira se kada nastaju veća oštećenja DNA koja uzrokuju distorzije uzvojnice, uglavnom kao posljedice UV zračenja (Slika 2.1.1.). Enzimi koji sudjeluju u procesu popravka oštećenja razlikuju se u eukariota i prokariota, ali je načelni mehanizam djelovanja sličan. Kao dio NER mašinerije enzima, aktiviraju se enzimski kompleksi koji cijepaju dio lanca DNA oko oštećenja te ga cijepaju s 5' i 3' kraja. Zatim se pocijepani dio lanca DNA nanovo sintetizira djelovanjem helikaza, DNA-polimeraza i DNA-ligaza.<sup>26</sup> Također, pokazano je da NER sudjeluje i u popravku DPC-eva *in vitro*, dok njegova uloga *in vivo* i dalje ostaje nerazjašnjenja.<sup>48,64</sup>

Popravak pogrešno sparenih baza (engl. *Mismatch repair*, MMR) služi za popravke oštećenja nastalih pogreškama prilikom replikacije, odnosno prilikom pojave delecija, insercija i supstitucija baza. Djelovanjem tog procesa znatno se povećava ukupna točnost same replikacije. Kod bakterija, MMR djeluje tako da se vrši diskriminacija starog od nosintetiziranog lanca na temelju metilnih skupina na N<sup>6</sup> adeninu u GATC sekvencama, nastalih djelovanjem DNA-adenin-metilaze (metilaza Dam). Nosintetizirani lanac nakon replikacije neko vrijeme ne sadrži metilne skupine te se MutL-MutS proteinski kompleks veže za krivo pridružene baze. MutH endonukleaza veže se za djelomično metiliranu GATC sekvencu koja cijepa nosintetizirani lanac nakon što dođe u kontakt s kompleksom. Djelovanjem cijelog niza helikaza i egzonukleaza pomiče se dio lanca koji sadrži pogrešni nukleotid te se DNA stabilizira i ponovno sintetizira djelovanjem replikacijskih enzima. Eukariotske stanice sadrže homologe Mut proteina i djeluju na kompleksniji, ali u osnovi sličan način.<sup>19,20</sup>

Izravni popravak (engl. *Direct Repair*, DR) služi za popravak alkiliranih dušičnih baza ili pirimidinskih dimera bez uklanjanja same baze (Slika 2.1.1.). U popravku oštećenja nastalih alkiliranjem, posebice O<sup>6</sup>-metilgvanina, koriste se metiltransferaze, koje prenose metilnu skupinu na cistein u svojem aktivnom mjestu što za posljedicu ima gubitak katalitičke aktivnosti same metiltransferaze.<sup>24,25</sup> Uz O<sup>6</sup>-metilgvanin-DNA-metiltransferaze (engl. *O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase*, MGMT) enzimi iz skupine fotolijaza djeluju popravljajući ciklobutanske pirimidinske dimere, oštećenja nastalih djelovanjem UV zračenja.<sup>143</sup>

Dvolančani lomovi najčešće se popravljaju pomoću dva mehanizma; homolognom rekombinacijom (engl. *Homologous Recombination*, HR) i nehomolognim spajanjem krajeva

(engl. *Non Homologous End- Joining, NHEJ*).<sup>152</sup> U procesu nehomolognog spajanja krajeva u eukariotskim se stanicama aktivira Ku-heterodimer (Ku 70/80) koji tvori kompleks s DNA-ovisnim proteinskim kinazama i veže se za DNA. Fosforilacijom enzima Ku dolazi do promjene konformacije kompleksa i približavanja molekula DNA. Zatim djeluje cijeli niz proteina uključujući i DNA-ligazu IV u popravku DNA loma. NHEJ mehanizam može uzrokovati oštećenja DNA u obliku manjih insercija i/ili delecija (engl. *indel*).<sup>153</sup> Homologna rekombinacija temelji se na prisutnosti visoko homolognih nizova unutar dviju molekula DNA uglavnom se smatra točnim popravkom (engl. *error free*), za razliku od NHEJ puta popravka (engl. *error prone*)<sup>155</sup>. Nakon dvolančanog loma dolazi do nukleaznog skraćivanja lanca na 5' kraju (engl. *end resection*) te time ostaje jednolančani 3' kraj koji se sparuje s komplementarnim lancem obližnjeg dupleksa.<sup>154</sup> On služi kao kalup prilikom sinteze ostatka sparenog lanca. Nakon sinteze, lanac se veže za svoj prvotni komplementarni lanac te dolazi do ponovne sinteze lanca popravljajući na taj način dvolančani lom. U procesu sudjeluju različite helikaze, nukleaze, DNA ligaze i RAD proteini.<sup>27,155</sup>



Slika 2.1.1. Tipovi poznatih oštećenja DNA i kanonski mehanizmi njihova popravka (izrađeno u programskom alatu ACD/ChemSketch).

## 2.2. DNA-PROTEIN unakrsna vezanja (engl. *DNA-protein crosslinks, DPCs*)

Putevi DNA popravka opisani u prethodnom potpoglavlju dobro su proučeni te je poznato njihovo djelovanje. Međutim, postoje oštećenja DNA za koje nisu u potpunosti poznati sustavi popravka. Velik broj proteina se u različitim situacijama veže za DNA molekule, najčešće s ciljem izvršavanja fizioloških funkcija. Međutim, u slučaju da takvi proteini postanu ireverzibilno kovalentno vezani za DNA nastaje tzv. unakrsno vezanje DNA-protein (engl. *DNA-protein crosslinks, DPC*).

DPC-ovi mogu nastajati na različite načine i izrazito su štetni za stanicu jer mogu uzrokovati mutacije i staničnu smrt.<sup>30</sup> Glavni razlozi štetnosti DPC-ova je njihova veličina i mjesto nastanka. Budući da su jako veliki i nastaju na DNA, oni obustavljaju sve procese nužne za stanično funkcioniranje koji uključuju DNA, a to su replikacija, transkripcija, odmatanje DNA djelovanjem helikaza i druge tipove DNA popravka.<sup>28,29</sup>

DPC-ovi se mogu podijeliti u dvije osnovne kategorije: a) općeniti ili ne-enzimatski DPC-ovi koje čine različiti proteini koji uslijed endogenih i/ili egzogenih uzročnika zbog svoje blizine DNA stvaraju ireverzibilnu kovalentnu vezu sa DNA<sup>41</sup>, i b) enzimatski DPC-ovi koji nastaju iz kovalentnih intermedijera DNA i proteina tijekom fizioloških enzimatskih ciklusa staničnih enzima.<sup>91,101,102</sup>

Različiti proteini se reverzibilno vežu za DNA s ciljem izvršavanja svojih funkcija. Tako se stvaraju kovalentni međuprodukti proteina i DNA koji su uglavnom kratkoživući. U nekim slučajevima dolazi do stabilizacije međuprodukta ireverzibilnim vezanjem što vodi do nemogućnosti odvajanja proteina od DNA. Enzimi koji čine enzimatske DPC-ove su npr. DNA topoizomeraze, DNA-glikozilaze i DNA-polimeraze. Postoji više uzročnika nastajanja DPC-ova u stanicama, a njihova osnovna podjela je na endogene i egzogene uzročnike. Najvažniji endogeni uzročnici koji doprinose formiranju DPC-ova su aldehidi, metali, reaktivne kisikove vrste i različita već postojeća oštećenja DNA (npr. promjene DNA uzvojnice kao što su AP mjesta).<sup>37</sup> Aldehidi nastaju kao nusprodukti tijekom metaboličkih i staničnih procesa kao što su primjerice demetilacijske reakcije histonskih proteina kao i hidroksilacije metiliranih baza DNA od strane dioksigenaze AlkB gdje se oslobađa se formaldehid. Oksidacijom etanola nastaje acetaldehid, a peroksidacijama lipida malondialdehid. Formaldehid je snažno sredstvo induciranja DPC-ova, a djeluje na specifičan način. Prvo stupa u reakciju s aminokiselinama proteina, uglavnom s cisteinom, lizinom i histidinom. Oni reagiraju tvoreći reaktivnu Schiffovu

bazu koja potom reagira najčešće s egzocikličnom amino skupinom baza DNA, pretežito gvaninom, stvarajući metilenski most između DNA i proteina.<sup>31-33</sup>

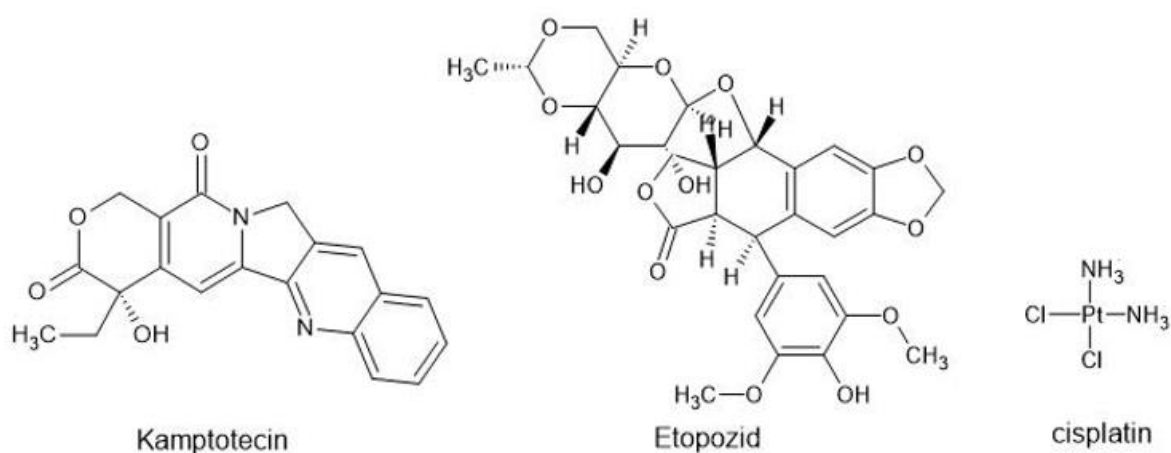
Uz druge vrste oštećenja DNA, reaktivne kisikove vrste mogu uzrokovati i pojavu DPC-ova. Reakcijom reaktivnih radikala, posebice hidroksilnih, s proteinima ili DNA mogu nastajati radikali koji posljedično međusobno reagiraju. Moguće je nastajanje radikala baza koji potom reagiraju s proteinom ili suprotno tomu, nastajanje reaktivnih radikala pojedinih aminokiselina koji stupaju u reakciju s bazama DNA. Rađeni su eksperimenti u kojima su se elektromagnetskim zračenjem inducirali radikali (većinom hidroksilni) i u kojima je proučavano stvaranje veza između aminokiselina i dušičnih baza. Ustanovljeno je postojanje veza između timina i alifatskih aminokiselina te između timina i tirozina.<sup>34,35</sup>

Ispostavilo se da oštećenja DNA utječu na stvaranje DPC-ova i to uglavnom onih proteina koji se vežu za DNA. Abazična mjesta većinom nastaju pogreškama ili spontanom djelovanjem DNA-glikozilaza u sklopu popravka oštećenja izrezivanjem baza. One djeluju tako da kovalentne intermedijere reakcija vezanja DNA i proteina učine ireverzibilnima te tako nastaju DPC-ovi. Osim abazičnih mjesta različite lezije i steričke promjene DNA uzvojnice također potiču stvaranje DPC-ova. Zbog postojanja takvih promjena DNA uzvojnice dokazano je nastajanje DPC-ova DNA-glikozilaza, DNA-polimeraza i DNA-metiltransferaza.<sup>36,37</sup>

DPC-ovi mogu nastati i djelovanjem cijelog niza egzogenih uzročnika kao što je primjerice zračenje, antitumorski lijekovi te okolišni spojevi. Od različitih vrsta zračenja najveći učinak na formiranje DPC-ova imaju ionizirajuće zračenje i UV zračenje. UV zračenje može izravno stvarati DPC-ove, formiranjem DNA kationa, ili neizravno, formiranjem reaktivnih kisikovih vrsta.<sup>90</sup> Ustanovljeno je također da količina formiranih DPC-ova i dvolančanih lomova ionizirajućim zračenjem ovisi o staničnim uvjetima. Kada vladaju hipoksični uvjeti u stanici djelovanjem ionizirajućeg zračenja nastaju DPC-ovi kao najčešće oštećenje DNA, dok u uvjetima normalne količine kisika većinom nastaju dvolančani lomovi. Budući da su DPC-ovi manje štetni za stanicu nego što su dvolančani lomovi, u uvjetima može doći do slabiju djelotvornosti uništavanja stanica tretmanima ionizirajućim zračenjem.<sup>38-40</sup>

Zanimljivo je da DPC-ovi i njihovi putevi popravka imaju potencijalnu primjenu u antitumorskoj terapiji. Stvaranje DPC-ova izrazito je obećavajuća metoda u borbi protiv tumora te se razvijaju različite metode i spojevi kao potencijalni lijekovi. Nekolicina njih već sada se primjenjuje. Djeluju na različite enzime, ali osnovna karakteristika im je da stvaranjem DPC-ova uzrokuju smrt tumorskih stanica. Mogu djelovati tako da potiču nastajanje enzimatskih i

neenzimatskih DPC-ova, a već je razvijen cijeli niz spojeva koji inhibiraju mehanizme popravka takvih DPC-eva.<sup>43,44</sup> Spojevi koji sadrže platinu djeluju tako da tvore neenzimatske DPC-ove. Najkorišteniji spoj u toj grupi je cisplatin (Slika 2.2.1.), a mogu se još koristiti oksaliplatin i karboplatin. Cisplatin se koristi kao sastojak kemoterapija u liječenju različitih vrsta karcinoma, kao što su karcinom testisa, dojke, jajnika i dr. Derivati spoja kamptotecina (Slika 2.2.1.) stabiliziraju kovalentne međuprodukte DNA-topoizomeraza 1 i koriste se u liječenjima karcinoma tankog crijeva<sup>42,43</sup> Na sličan način djeluje i etopozid te njemu slični spojevi i to na DNA-topoizomeraza 2 komplekse tako da također blokiraju njihovu katalitičku aktivnost formirajući DPC-ove.<sup>44</sup> Etopozid se koristi u liječenju karcinoma pluća, leukemije, limfoma i ostalih vrsta karcinoma<sup>44</sup> O topoizomerazama biti će više riječi u daljnjem tekstu. Poli-ADP-riboza polimeraza (engl. *Poly (ADP-ribose) polimerase*, PARP) najčešće sudjeluje u popravku jednolančanih lomova DNA. U različitim fazama testiranja su određeni spojevi koji djeluju na PARP proteine, djelujući tako da induciraju nastajanje PARP DPC-ova. Spojevi kao što su olaparib i telazoparib koriste u liječenjima rakova jajnika i dojke te bi se mogli pokazati učinkoviti u liječenju drugih vrsta karcinoma.<sup>45,46</sup>



Slika 2.2.1. Strukturne formule antitumorskih lijekova koji induciraju DPC-ove (izrađeno u programskom alatu ACD/ChemSketch).

### 2.3. Popravak DNA-protein unakrsnih vezanja

DPC-ovi su izrazito toksična i raznolika skupina oštećenja DNA. Različiti proteini mogu tvoriti DPC-ove te mogu biti na mnogo načina kovalentno povezani s DNA. Zato su organizmi, s ciljem zaštite genetičkog materijala, razvili mehanizme njihova popravka. Ovi mehanizmi uključuju kanonske puteve popravke kao što su popravak izrezivanjem nukleotida i homologna rekombinacija koji primarno popravljaju druge tipove oštećenja DNA, ali sudjeluju i u DPC popravku (NER) ili toleranciji oštećenja (HR) u određenim okolnostima.<sup>47, 48</sup> NER mehanizam popravka popravlja nešto veća oštećenja DNA, prvenstveno ona koja dovode do promjene strukture DNA, kao što su primjerice oštećenja nastala djelovanjem UV zračenja. Pokazalo se da su stanice s nefunkcionalnim NER mehanizmom popravka osjetljivije od normalnih stanica na izlaganje formaldehidu, modelnom agensu za izazivanje DPC-ova.<sup>50</sup> Kod popravaka DPC oštećenja smatra se da NER najčešće djeluje na DPC-ove nastale djelovanjem aldehida<sup>48</sup> i to nakon smanjenja proteinskog dijela DPC-a proteaznim enzimima, iako ova hipoteza nije još dokazana.<sup>47,49</sup> In vitro je dokazano da NER može ukloniti DPC-eve do 11 kDa u stanicama sisavaca odnosno do 16 kDa u bakterijskim stanicama<sup>47,48</sup>

Ranije se smatralo se da se oni DPC-ovi koji se ne mogu popraviti NER mehanizmom popravljaju mehanizmima homologne rekombinacije. Međutim, budući da još nisu pronađeni čvrsti dokazi načelne uključenosti mehanizma djelovanja homologne rekombinacije u popravcima DPC-eva, već samo u popravku dvolančanih lomova koji su nastali uslijed nemogućnosti popravka DPC-, danas se pretpostavlja da homologna rekombinacija ne uklanja DPC, već predstavlja određeni tipa tolerancije na DPC oštećenja.<sup>47</sup>

Do sada spominjani kanonski mehanizmi popravka nisu dovoljni za učinkoviti popravak svih DPC-ova koji se pojavljuju za vrijeme života stanica. Zato su organizmi razvili specifične putove popravke DPC-ova od kojih su neki evolucijski izrazito očuvani i pronalazi ih se u svim domenama života. Postoji nekoliko načina na koje se DPC-ovi mogu specifično popraviti, iako mehanizmi nisu još istraženi, te nije jasno koji su mehanizmi dominantni u stanicama i u kojim uvjetima.<sup>64,65</sup>

Klasični načini popravaka oštećenja DNA se nisu pokazali efikasnim u popravcima DPC-ova, posebice DPC-ova većih molekularnih masa. Kao što je spomenuto, DPC-ovi su raznoliki što otežava njihov popravak. Upravo zbog te raznolikosti pretpostavilo se postojanje dodatnog univerzalnog mehanizma njihova popravka koji bi se mogao temeljiti na proteolitičkom djelovanju enzima proteaza. Pravilnim djelovanjem proteaza omogućuje se

uspješno odvijanje daljnjih staničnih procesa koji uključuju interakcije proteina s DNA. Zbog toga se popravci posredovani proteazama smatraju izrazito važnima za očuvanje intaktnosti genoma.<sup>64</sup> Kao ključni enzimi u tim popravcima pokazale su se dvije metaloproteaze. U kvascima je to Wss1 (engl. *Weak suppressor of SMT3 protein 1*), a u višim eukariotima SPRTN ili DVC1. Oba enzima su centralni čimbenik DPC popravka.<sup>59,60</sup>

Dokazano je da je proteaza SPRTN aktivna u DPC popravku *in vitro* i *in vivo*. Aktivan enzim SPRTN neophodan je za DPC popravak. On može razgrađivati DPC-ove nastale djelovanjem endogenih uzročnika kao i enzimatske DPC-ove topoizomeraze 1 i topoizomeraze 2.<sup>60</sup> SPRTN je također važan u staničnoj obrani od tretmana formaldehidom. Mutacije u genu SPRTN kod ljudi uzrokuju *Ruijs-Aalfs sindrom*, (RJALS sindrom) bolest čije su značajke rano starenje i pojava karcinoma jetre u ranoj dobi.<sup>133</sup> Smatra se da Wss1 i SPRTN djeluju tako da za vrijeme replikacije proteolitički razgrađuju postojeće DPC-ove ispred replikacijskih rašlji. Na taj način sprječavaju potencijalno zaustavljanje replikacije i moguće nastajanje dvolančanih lomova u DNA. Uz protein SPRTN, nagađa se da bi u procesu proteolitičke razgradnje DPC-ova mogla djelovati i novootkrivena potencijalna proteaza ACRC (engl. *Acidic repeat-containing protein*, ACRC). ACRC proteaza posjeduje strukturne sličnosti s humanim SPRTN proteinom, te je njezina funkcija predmet istraživanja.<sup>148</sup>

Eksperimentima na kvascima utvrđeno je da Wss1 djeluje na DPC-ove koju čini topoizomeraza 1. Ujedno je pokazano da Wss1 cijepa i druge proteine, kao što su histoni i proteini grupe visoke mobilnosti (engl. *High mobility group proteins*, HMG). Wss1 je također aktivan prilikom staničnog odgovora na izlaganje modelnom DPC inducirajućem agensu, formaldehidu.<sup>59-63</sup>

SPRTN i Wss1 su u mnogočemu slični; oboma je potrebna DNA za aktivaciju te su najaktivniji za vrijeme procesa replikacije. Sadržavaju cinkove ione pa spadaju u skupinu cinkovih metaloproteaza, imaju sličnu N-terminalnu Sprt domenu, aktivno mjesto<sup>61</sup> kao i vezna mjesta za p97 protein. Pretpostavlja se da sudjeluju u procesu translezijske replikacije (engl. *translesion DNA synthesis*, TLS), procesa kojim je moguća replikacija DNA, usprkos prisutnom oštećenju DNA. Međutim, osim mnogih sličnosti postoje i određene različitosti. Uspoređujući njihove aminokiselinske sekvence vidljivo je da je Wss1 protein značajno kraći od SPRTN proteina. U strukturi Wss1 sadržane su domene koji služe za vezanje SUMO proteina, dok su kod SPRTN-a sadržane vezne domene za ubikvitin i PCNA (engl. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Važno je naglasiti da se filogenetskim analizama uspostavilo kako Wss1



i SPRTN protein evolucijski nisu jako srodni, odnosno ne pokazuju očekivanu mjeru sličnosti na razini aminokiselinskog slijeda.<sup>64</sup> Nadalje, ovi proteini prisutni su u različitim domenama života.<sup>61,62</sup>

Proteolitička razgradnja djelovanjem SPRTN i Wss1 nije potpuna, već nakon proteolize zaostaju mali fragmenti proteina vezani za DNA. Ti peptidni fragmenti dalje se uklanjaju drugim mehanizmima kao što je NER, Tdp enzimima ili je moguć nastavak replikacije procesom translezijske sinteze.<sup>139</sup> Također, SPRTN i Wss1 proteolitički djeluju na DPC-ove nastale ireverzibilnim vezanjem topoizomeraze 1, dok se zaostali peptidni fragment uklanja djelovanjem Tdp1 enzima<sup>61</sup>. Takav mehanizam djelovanja potvrđuje činjenica da Tdp enzimi ne mogu djelovati na cjelokupne komplekse topoizomeraza i DNA, već na manje proteinske fragmente<sup>61</sup>. Stoga se smatra da je moguće prvotno djelovanje SPRTN enzima na topoizomeraze čime se dobivaju manji peptidni fragmenti koji nadalje omogućuju obradu Tdp enzimima.<sup>59-63</sup>

Izrazito je važna regulacija aktivnosti proteaza kako ne bi došlo do nespecifičnih djelovanja proteaza na ostale proteine vezane za DNA, a ne samo na DPC-ove. Proteolitičko djelovanje SPRTN-a uglavnom je ograničeno na S fazu staničnog ciklusa, kada postaje aktivan što je u skladu s opaženim povećanim aktivnostima SPRTN-a za vrijeme replikacije.<sup>60</sup> Također se smatra da katalitička aktivnost SPRTN-a ovisi o njegovoj deubikvitinaciji, koja se inducira nastankom DPC-ova. Ubikvitiniran SPRTN pokazuje zanemarivu katalitičku aktivnost.<sup>60</sup> U S fazi SPRTN se deubikvitinira i postaje aktivan, dok se u ostalim fazama ponovno inaktivira ubikvitinacijom. Vezanje SPRTN-a za DNA smatra se još jednim načinom regulacije. SPRTN postaje aktivan tek vezanjem za DNA.<sup>60</sup> Da tome nije tako slobodni SPRTN potencijalno bi mogao izvršavati svoju proteolitičku aktivnost cijepajući proteine u svojoj blizini. Proces samorazgradnje SPRTN proteina kao način njegove inaktivacije također je tema istraživanja i o tom procesu se još ne zna mnogo.<sup>62,63</sup>

Kao što je već spomenuto, postoje enzimi koji kataliziraju cijepanje kovalentne veze između DNA i točno određenih proteina. To je primjerice skupina Tdp (tirozil-DNA-fosfodiesteraza) enzima koji djeluju na komplekse DNA i topoizomeraza hidrolizirajući fosfotirozilnu vezu. O Tdp enzimima biti će više riječi kasnije. U usporedbi s univerzalnim načinima popravka oštećenja DNA, o specifičnim popravcima DPC-ova, posebice njihovoj aktivaciji, regulaciji i međudjelovanjima ne zna se mnogo. Doduše njihovim intenzivnijim proučavanjem moglo bi se doći do značajnijih pomaka u razumijevanju njihovog djelovanja.

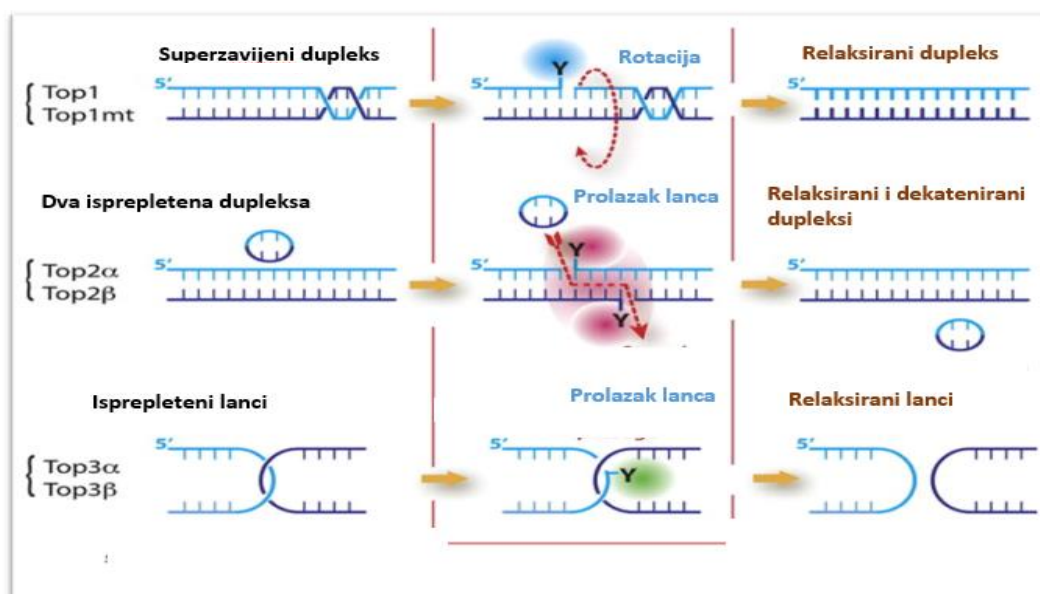
Uz proteolitičku razgradnju i cijepanje kovalentne veze između DNA i proteina pokazano je da se DPC-ovi mogu popravljati djelovanjem nukleaza pomoću kojih dolazi do cijepanja DNA komponente DPC-ova.<sup>53</sup> Popravak DPC-ova odvija se djelovanjem nukleaza koje cijepaju fosfodiesterske veze između nukleotida u DNA. Na taj način odstranjuje se DPC, odnosno dio DNA na kojoj se nalazi kovalentno vezani protein. Jedan od proučenih mehanizama nukleaznog djelovanja je putem MRN kompleksa. Kompleks djeluje uglavnom na enzimske DPC-ove i to na one koji nastaju na dvolančanim DNA lomovima, kao što su Top2 i Spo11 proteini.<sup>51-56</sup> Popravak započinje aktivacijom MRN kompleksa koji prepoznaje nastali DPC i dvolančani lom na 5' ili 3' kraju DNA. Nakon prvog cijepanja kompleks klizi po DNA i ponovno katalizira cijepanje. Cijepanje se događa na mjestu bliže kovalentno vezanom proteinu. Nakon cijepanja različitim se načinima degradira pocijepani DPC, a dobivena DNA sadrži samo dvolančani lom te se ona popravljaju već spomenutim univerzalnim mehanizmima popravka dvolančanih lomova DNA (najčešće NHEJ ili HR).<sup>57,58</sup>

#### **2.4. Topoizomeraze i njihova unakrsna vezanja (engl. *crosslink*) za DNA**

Molekule DNA u stanicama gusto su pakirane tvoreći superzavijene strukture (Slika 2.4.4.) Prilikom različitih procesa u stanici, primjerice replikacije, transkripcije i rekombinacije, dolazi do odmotavanja dvolančane DNA, odnosno razdvajanja lanaca DNA molekula. Posljedica tih procesa je nastajanje torzijskog stresa u obliku previjanja i podvijanja DNA, nastajanje čvorova, katenata i drugih, često štetnih, promjena topologije DNA (Slika 2.4.4.) Torzijski stres može uzrokovati različita oštećenja DNA i uvelike narušiti pravilno funkcioniranje stanice te je stoga od izrazite važnosti održavati stabilnost DNA uzvojnice. Topoizomeraze su enzimi koji funkcioniraju tako da smanjuju topološki stres uzrokujući kratkoživuće jednolančane i dvolančane lomove DNA. Reakcijama transesterifikacije tvore kovalentni intermedijer s DNA neophodan za njihovo katalitičko djelovanje.<sup>65-69</sup>

Humane stanice sadrže šest gena koji kodiraju topoizomeraze, a same topoizomeraze mogu se podijeliti na dvije glavne skupine ovisno o njihovim supstratima te mehanizmu njihova djelovanja: (1) topoizomeraze tipa I koje cijepaju jedan lanac i (2) topoizomeraze tipa II koje cijepaju oba lanca DNA (Slika 2.4.4.). Tip I topoizomeraza može se podijeliti na daljnje podgrupe, tip IA, tip IB i tip IC. One se međusobno razlikuju u nastalom kovalentnom intermedijeru enzima i DNA. Tip IA stvara kovalentni intermedijer između enzima i fosfata na 5'-kraju DNA, dok tip IB stvara kovalentni intermedijer između enzima i fosfata na 3'-kraju

DNA<sup>74</sup>. Tip IC dosada je pronađen samo u arheama te djeluje na sličan način kao i tip IB.<sup>72</sup> Topoizomeraze tipa II dijele se na dvije grupe, tip IIA koji je prisutan u svim domenama života i tip IIB koji nije pronađen u životinjskim stanicama. U humanim stanicama za sada je otkriveno šest topoizomeraza; topoizomeraza 1 i topoizomeraza 1mt (topoizomeraza aktivna u mitohondrijima stanica, a kodirana u jezgri stanica) koje pripadaju tipu IB, topoizomeraza 2 $\alpha$  i topoizomeraza 2 $\beta$  koje pripadaju tipu II te topoizomeraza 3 $\alpha$  i topoizomeraza 3 $\beta$  koje pripadaju tipu IA (Slika 2.4.4.). Svi tipovi topoizomeraza tvore kovalentne intermedijere s DNA, ali se njihov mehanizam djelovanja uvelike razlikuje. Topoizomeraze podskupine IA cijepaju jedan lanac DNA tvoreći kovalentnu vezu fosfatom na 5'-kraju, dok topoizomeraze podskupine IB djeluju tako da stvaraju kovalentnu vezu s fosfatom na 3'-kraju. Glavna zadaća eukariotskih topoizomeraze tipa IA (topoizomeraze 3) je razdvajanje isprepletenih jednolančanih DNA molekula i RNA lanaca (Slika 2.4.4.).<sup>73</sup> Topoizomeraze skupine II kataliziraju dvolančane lomove stvarajući kovalentni intermedijer na 5'-kraju te služe u relaksaciji DNA ili dekatenciji cirkularnih DNA (Slika 2.4.4.).<sup>70,72-76</sup>



Slika 2.4.4. Mehanizmi djelovanja topoizomeraza. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 71.

Svi tipovi topoizomeraza obavljaju svoju funkciju tvoreći kovalentni intermedijer s DNA. U unakrsno vezanim enzimima topoizomeraza i DNA (engl. *Topoisomerase-DNA cleavage complex*, Topcc), kovalentna veza uspostavlja se između tirozina i fosfata DNA molekule. Takvi katalitički intermedijeri načelno su kratkoživući i nakon relaksacije DNA slijedi

relicacija DNA. U slučaju različitih lezija kao i endogeno i egzogeno nastalih oštećenja DNA može doći do stabilizacije kovalentnog intermedijera što uzrokuje prestanak religacije DNA. Takvi DPC-ovi štetni su za stanicu budući da je, uz ireverzibilno vezanje proteina i DNA došlo do jednolančanog odnosno dvolančanog loma DNA. Najčešća oštećenja DNA koja uzrokuju stvaranje Top1cc i Top2cc DPC-ova su abazična mjesta, pogrešno sparane<sup>91</sup> i metilirane baze, oksidirane baze<sup>101</sup>, lezije nastale UV<sup>102</sup> i ionizirajućim zračenjem<sup>108</sup> i drugi. DPC-ovi topoizomeraze 1 nastajat će uglavnom za vrijeme procesa replikacije (Top1 enzim najaktivniji je u replikaciji) te će uzrokovati kolaps replikacijskih rašlji.<sup>109</sup> Za razliku od Top1 enzima, Top2 enzim aktivan je za vrijeme procesa transkripcije te Top2cc kompleksi uzrokuju zaustavljanje transkripcije i nastajanje dvolančanih lomova DNA.<sup>119</sup>

## 2.5. Tirozil-DNA-fosfodiesteraza 1

### 2.5.1. O Tdp1 enzimu

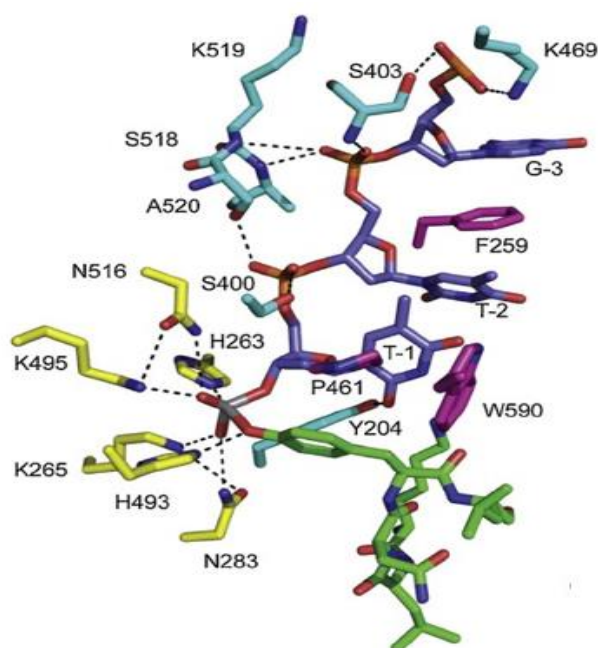
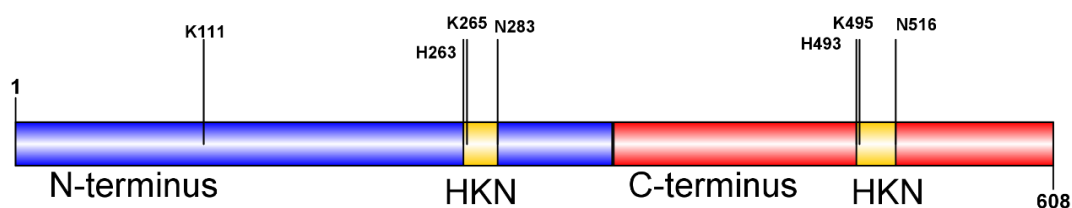
Tirozil-DNA-fosfodiesteraza 1 je enzim koji katalizira hidrolizu fosfotirozilne veze na 3'-kraju DNA ostavljajući fosfate na 3'-krajevima, a njegovo djelovanje je uglavnom spregnuto s djelovanjem polinukleotid-kinaze/fosfataze (engl. *polynucleotide phosphatase/kinase*, PNKP), bifunkcionalnog enzima koji fosfataznom aktivnošću generira OH skupine na 3'-kraju. Tdp1 je primarno bitan u popravku topoizomeraza 1-DNA DPC-a.<sup>77,78</sup> Aktivan je prilikom procesa replikacije kada zbog Top1cc DPC-ova može doći do kolapsa replikacijskih rašlji i dvolančanog loma DNA. Nakon 'izrezivanja' Top1 DPC peptidnog ostatka pomoću Tdp1, ostaje jednolančani lom koji se dalje popravljiva djelovanjem PARP enzima.<sup>79</sup> Budući da se Tdp1 enzimi pronalaze u prokariotima i eukariotima, vidljiva je njihova važnost u procesima očuvanja intaktnosti genoma stanice. Pronalaze se kako u jezgrama stanica tako i u mitohondrijima popravljajući DPC-ove nastale djelovanjem jezgrene, odnosno mitohondrijske topoizomeraze 1 (Top 1mt).<sup>79-8</sup> Tdp1 enzim ne može hidrolizirati DPC-ove cjelokupnog enzima topoizomeraze 1, već je potrebna prethodna proteolitička razgradnja kompleksa. Ostatak kompleksa koji je ostao nakon proteolitičke razgradnje može biti supstrat Tdp1 enzimu.<sup>82</sup> Uz hidrolizu fosfotirozilne veze na 3'-kraju, Tdp1 *in vitro* hidrolizira i fosfotirozilnu vezu na 5'-kraju, ali s puno manjom efikasnošću.<sup>81</sup> Iako je primarna uloga Tdp1 enzima popravak DPC-ova, Tdp1 ne djeluje samo na fosfotirozilnu vezu između topoizomeraze 1 i DNA već može uklanjati i različite lezije na 3'-kraju DNA, kao što su primjerice fosfoglikolati ili 3'-

deoksiriboza fosfati. Iz toga je vidljivo da su Tdp1 enzimi važni u popravcima oštećenja DNA nastalih oksidativnim reakcijama.<sup>81,83-85</sup>

### 2.5.2 Struktura Tdp1 enzima

Humani protein Tdp1 mase 68 kDa sastoji se od 608 aminokiselina i uključuje dvije domene; N-terminalnu i C-terminalnu. Prvih 350 aminokiselina čini N-terminalnu domenu, dok ostatak čini C-terminalnu (Slika 2.5.1.). Tdp1 enzim dio je grupe fosfolipaza D jer sadrži HKD (histidin-lizin-aspartat) motive koji su značajka enzima te skupine (Slika 2.5.1.) i sudjeluju u katalitičkim reakcijama hidrolize fosfotirozilne veze. Za razliku od ostalih proteina ove skupine, Tdp1 umjesto aspartata (D) posjeduje asparagin (N) (Slika 2.5.1.).

Kristalizacijskim eksperimentima utvrđeno je da je Tdp1 monomer čije aktivno mjesto formiraju oba HKN motiva, svaki iz svoje domene.<sup>87</sup> Aktivno mjesto nalazi se u asimetrično raspoređenom rascjepu koji je pozitivno nabijen te po dimenzijama može prihvatiti negativno nabijen lanac DNA. Jedan motiv čini His263, Lys 265 i Asn283, dok drugi čini His493, Lys495 i Asn516. Uz katalitičke motive u aktivnom mjestu nalaze se Gln294 i Glu538. Na taj način svaka od dviju domena u aktivno mjesto pridonosi jedan histidin, lizin i asparagin. U aktivnom mjestu postoji niz vodikovih veza između aminokiselina što pridonosi pravilnoj orijentaciji i izgledu aktivnog mjesta. Lizini tvore vodikove veze sa kisicima na karbonilnim skupinama histidina, dok dva asparagina tvore vodikove veze s dvije molekule vode u sredini aktivnog mjesta. Simetričnost aktivnog mjesta nije postignuta zbog različitih aminokiselina koje su u interakciji s histidinima. Glu538 i Ser514 iz C-terminalne domene pozicioniraju His263 iz N-terminalne domene međusobnim povezivanjem vodikovim vezama, dok je His493 pozicioniran ostvarivanjem vodikovih veza s Gln294 i Thr281. Vidljivo je da su dva histidina u kemijski različitim okruženjima.<sup>86-88</sup>

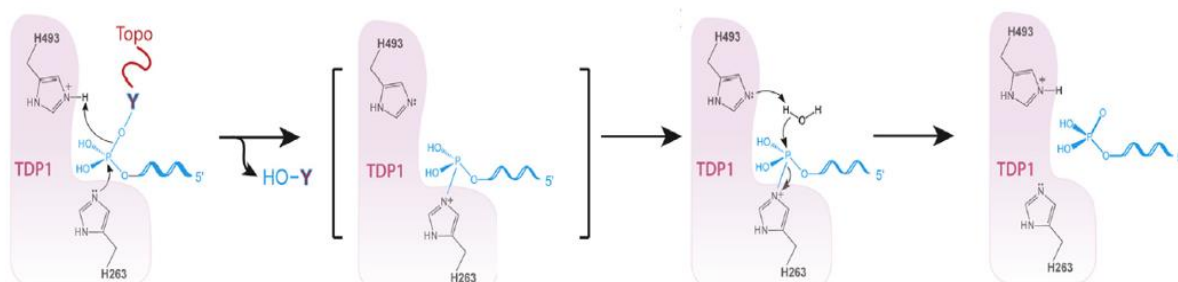


Slika 2.5.1. Topološki prikaz i izgled aktivnog mjesta humanog TDP1 enzima. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 71.

### 2.5.3 Katalitički mehanizam *Tdp1* enzima

Katalitički mehanizam hidrolize fosfotirozilne veze uključuje dva koraka. Za pravilno odvijanje procesa hidrolize nisu potrebni metalni ioni niti ATP. Dva katalitički aktivna histidina obnašaju različite uloge. U prvom koraku His263 koji se nalazi u N-terminalnoj domeni djeluje kao nukleofil stvarajući fosfohistidinsku vezu preko N2 atoma imidazalnog prstena dok His493 kao proton-donor protonira tirozin izlazne skupine koju čini proteinski ostatak Topoizomeraza 1 DPC-a (Slika 2.5.1.). U prvom koraku nastaje Tdp1-DNA kompleks tako da je DNA za Tdp1 vezana preko His263. U drugom koraku deprotonirani His493 djeluje kao proton akceptor deprotonirajući molekulu vode što uzrokuje stvaranje reaktivnog hidroksidnog iona. Dolazi do

nukleofilnog napada na fosfatnu skupinu uzrokujući pucanje fosfohistidinske veze prilikom čega nastaje 3'-fosfat te se Tdp1 regenerira. Nakon djelovanja Tdp1 enzima produkt koji sadrži 3'-fosfat treba biti dalje procesiran polinukleotid-kinazom/fosfatazom (Slika 2.5.2.).<sup>87,88</sup>



Slika 2.5.2. Katalitički mehanizam TDP1 enzima. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 71.

## 2.6. Tirozil-DNA-fosfodiesteraza 2

### 2.6.1 O Tdp2 enzimu

Za razliku od tirozil-DNA-fosfodiesteraze 1, Tdp2 ima višestruke uloge u stanici. Prije otkrića njegove fosfodiesterazne aktivnosti proučavane su njegove uloge u različitim signalnim putevima. Prvotno je bio povezivan s TNF (engl. *Tumor necrosis factor*) i TRAF (engl. *TNF receptor-associated factor*) enzimima te je dokazano da se za njih veže što utječe na aktivaciju signalnih puteva čiji su članovi Mitogenom aktivirane proteinske kinaze (engl. *Mitogen-activated protein kinase*, MAP) i Janus kinaze. Uz aktivaciju signalnih puteva njegovo vezanje za TNF i TRAF enzime za posljedicu ima inhibiciju aktivnosti NFκB (engl. *Nuclear Factor kappa B*) transkripcijskog faktora važnog u regulaciji djelovanja imunološkog sustava.<sup>92</sup> Tdp2 također djeluje u modulaciji aktivnosti faktora transkripcije ETS1 vezanjem za taj transkripcijski faktor.<sup>93</sup>

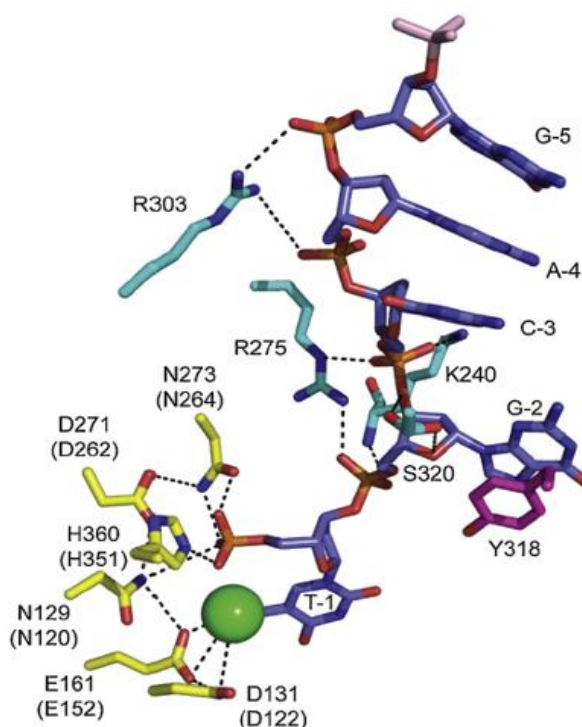
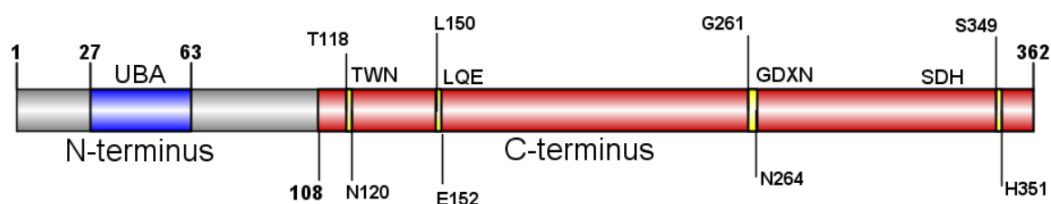
Uloga Tdp2 enzima u kataliziranju hidrolize fosfotirozilne veze otkrivena je nakon gore spomenutih funkcija. Pokazano je da Tdp2 prvenstveno katalizira hidrolizu fosfotirozilne veze na 5'-kraju jednolančane DNA. Utvrđeno je da Tdp2, kao i Tdp1, posjeduje 3'-fosfodiesteraznu aktivnost, ali je ista višestruko slabija nego kod Tdp1 enzima. Za razliku od Tdp1 enzima koji

ima više različitih supstrata.<sup>82,84</sup> Tdp2 katalizira specifično hidrolizu fosfotirozilne veze, a prisustvo dvovalentnih metalnih iona ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) utječe na njegovu aktivnost. Tretmanom Tdp2 deficijentnih stanica inhibitorima topoizomeraze 2 dolazi do oštećenja stanica. Iz svega navedenoga utvrđeno je da je primarna funkcija Tdp2 u popravku Top2-DNA kompleksa putem hidrolize fosfotirozilne veze. Uz popravak Top2-DNA DPC-a, Tdp2 može djelovati i na Top3-DNA DPC-eve te mu kao supstrati nisu potrebni dugi lanci DNA već je u stanju djelovati i na lance od svega nekoliko nukleotida. Postoje neke naznake da bi Tdp2 enzim mogao katalizirati hidrolizu veze DPC-a cjelokupne Topoizomeraze 2, ali za sada nema čvrstih dokaza da se to odvija *in vivo* te se smatra da je, kao i za aktivnost Tdp1 enzima potrebna prvo proteolitička razgradanja proteinskom dijela DPC-a SPRTN enzimom.<sup>94-96,100,103</sup>

### 2.6.2 Struktura Tdp2 enzima

Struktura humanog Tdp2 enzima uvelike se razlikuje od strukture Tdp1 enzima. Tdp2 enzim je manji, manje molekulske mase od 41 kDa i 362 aminokiseline. Kao i Tdp1 enzim, Tdp2 sadržava dvije domene, N-terminalnu i C-terminalnu domenu i pripada u monomerne enzime (Slika 2.6.1.). N-terminalnu domenu čini prvih 108 aminokiselina, dok ostatak čini C-terminalnu domenu. U N-terminalnoj domeni nalazi se domena za vezanje ubikvitina UBA (engl. *Ubiquitin Associated domain*) koju čine aminokiseline 26. do 63. U C-terminalnoj domeni nalazi se aktivno mjesto te četiri očuvana katalitička motiva (TWN, LQE, GDXN i SDH) što je značajka koju dijele  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$  nukleaze kao što je primjerice DNazaI i APE1 endonukleaza (Slika 2.6.1.). N-terminalna domena je neuređena, dok je C-terminalna domena visoko uređena i konzervirana. Kristalografskim analizama pokazano je da Tdp2 enzim sadrži uski rascjep koji služi za vezanje DNA. U njemu se nalazi katalitičko mjesto kojeg formiraju četiri aminokiseline (N120, E152, D262 i H351) vežući magnezijeve ione. Također dolazi do stabilizacije i pravilnog pozicioniranja Tdp2 supstrata formiranjem vodikovih veza između kisikovih atoma fosfata triju terminalnih nukleotida te dušikovih atoma aminokiselina. Pomoću cijelog niza vodikovih veza i vezanja magnezijevog iona dolazi do pravilne orijentacije supstrata u aktivnom mjestu u katalizi hidrolize koja slijedi.<sup>97,98</sup>



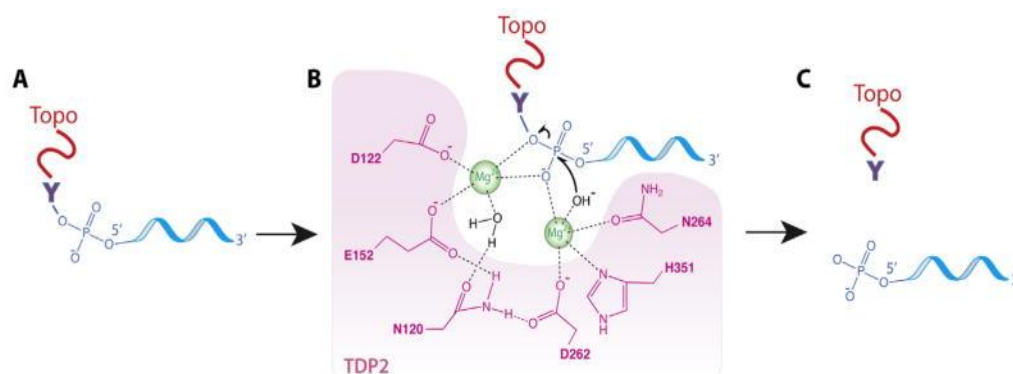


Slika 2.6.1. Topološki prikaz i izgled aktivnog mjesta humanog TDP2 enzima. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 71.

### 2.6.3 Katalitički mehanizam Tdp2 enzima

Mehanizam katalize hidrolize fosfotirozilne veze Tdp2 enzima drugačiji je od katalize Tdp1 enzima. Za razliku od Tdp1 enzima za hidrolizu su ključni metalni ioni. Ujedno tijekom katalitičkog procesa ne dolazi do formiranja kovalentnih intermedijera između Tdp2 enzima i njegovih supstrata. Prvi  $Mg^{2+}$  ion koordiniraju H351 i D262 i N264 dok drugi koordiniraju E152 i D122 (Slika 2.6.1.). Kao svojevrsni most između E152 i D262 služi N120 povezujući ih vodikovim vezama. On također tvori vodikove veze s molekulom vode. Nakon vezanja supstrata u aktivno mjesto dolazi do koordinacije dva magnezijeva iona koji kataliziraju nukleofilni napad na fosfotirozilnu vezu preko hidroksidnog iona (Slika 2.6.2.). Nakon

hidrolize dolazi do otpuštanja produkata koji čine polipeptid i DNA s fosfatnim 5'-krajem koji se potom popravljaju djelovanjem ligaza.<sup>97-99</sup>



Slika 2.6.2. Katalitički mehanizam TDP2 enzima. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 71.

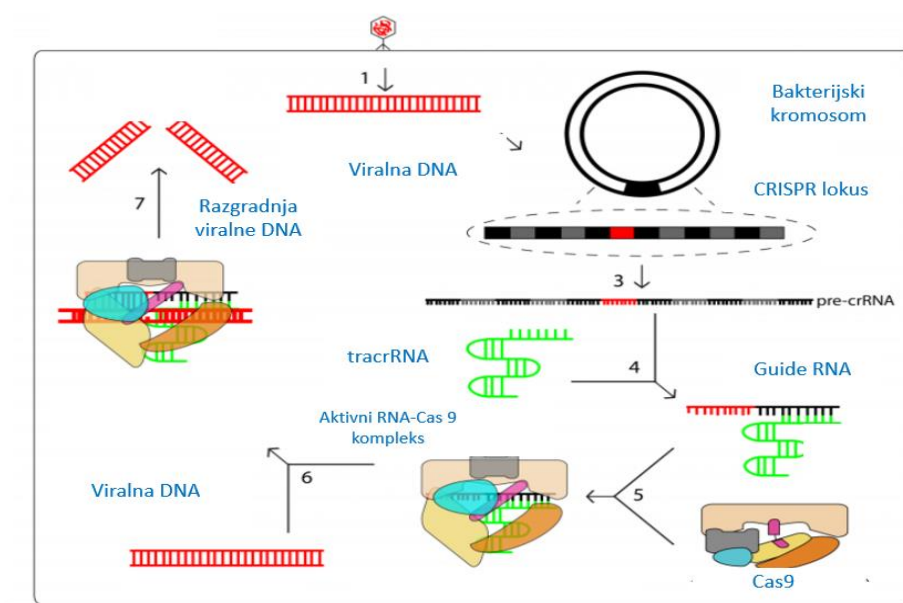
## 2.7. CRISPR-Cas sustavi

### 2.7.1. Otkriće i princip djelovanja CRISPR-Cas sustava

CRISPR-Cas sustavi su se zbog svoje preciznosti i robustnosti pokazali kao revolucionaran način editiranja genoma. 2020. godine, Jennifer A. Doudna i Emmanuelle Charpentier dobitnice su Nobelove nagrade za kemiju, što dodatno ukazuje na važnost ove metode editiranja genoma.

Krajem osamdesetih godina dvadesetog stoljeća otkriveni su ponavljajući dijelovi DNA bakterijskog genoma palindromskog oblika te njima povezani geni. Dijelovi DNA nazvani su CRISPR (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), dok su geni nazvani Cas (engl. *CRISPR associated genes*). CRISPR dijelovi DNA međusobno su odvojeni različitim DNA sekvencama-razmaknicama (engl. *Spacer*) čijim je proučavanjem ustanovljeno da pripadaju sekvencama različitih bakteriofaga koji su u jednom trenutku napadali bakterijsku stanicu, što je potkrijepilo teorije da bakterije i arheje posjeduju neku vrstu adaptivnog imunološkog sustava.<sup>103-107,110</sup> Mehanizam djelovanja CRISPR-Cas sustava u obrani od bakteriofaga sastoji se od nekoliko temeljnih koraka. Prvo se pomoću Cas kompleksa u bakterijski genom integriraju dijelovi viralne DNA nakon kratkih sljedova nukleotida (najčešće 2-6) zvanih PAM regije (engl. *Protospacer Adjacent Motiv*)<sup>112</sup> u obliku razmaknica (Slika 2.7.1.). Nakon uspješne integracije, DNA koja sadrži razmaknicu se transkribira i dolazi do procesiranja nezrele crRNA (engl. *CRISPR RNA*) cijepanjem različitim enzimima i povezivanjem s tracrRNA (engl. *trans activating CRISPR RNA*). Zrela crRNA sastoji se od CRISPR ponavljajućeg elementa, razmaknica i tracrRNA molekule (Slika 2.7.1.). Ulaskom

viralne DNA u bakterijsku stanicu aktivira se kompleks kojeg čine Cas9 enzim, tracrRNA i crRNA. Cas9 prepoznaje viralnu DNA prema PAM regiji, a dio crRNA ulazi u interakciju nekovalentnim povezivanjem s viralnom DNA temeljem komplementarnosti sljedova. Endonukleaznim djelovanjem Cas-RNA kompleksa nastaju dvolančani lomovi u viralnoj DNA.<sup>111-114</sup>



Slika 2.7.1. Proces inkorporacije i razgradnje viralne DNA u bakterijski genom djelovanjem CRISPR-Cas9 sustava. Preuzeto i prilagođeno prema ref. 118.

### 2.7.2. Korištenje CRISPR-Cas9 sustava u editiranju genoma

Korištenjem CRISPR-Cas9 sustava moguće je na različite načine modificirati genom stanica te se isti na različite načine koristi za uvođenje genomskih promjena u eukariotskim stanicama i modelnim organizmima. Također se može koristiti za genske *knock-in* i *knock-out* postupke. Temelji se na nastajanju dvolančanih lomova DNA djelovanjem Cas9 enzima koji se potom popravljaju putevima popravka dvolančanih lomova. Cas9 otkriven je u organizmu *Streptococcus pyogenes* te pokazuje endonukleaznu aktivnost i sinergijsko djelovanje s RNA molekulama. Za aktivaciju Cas9 enzima potrebne su dvije molekule RNA što dodatno otežava njegovo efikasno korištenje. U crRNA nalazi se dio od dvadeset nukleotida koji navodi Cas9 enzim na točno određeno mjesto cijepanja DNA, dok tracrRNA služi za stabilizaciju i sazrijevanje crRNA te je neophodna za aktivnost Cas9 enzima. Da bi se olakšala primjena sustava dizajnirana je posebna, kimerna RNA molekula u kojoj su sadržane funkcije crRNA i

tracrRNA molekule. Takva molekula, tzv. sgRNA (*engl. Single guide RNA*) mora sadržavati spomenuti slijed od dvadeset nukleotida komplementaran ciljnom mjestu koji je inače sadržan u crRNA te slijed koji odgovara tracrRNA. sgRNA dobivena je spajanjem 5'-kraja tracrRNA i 3'-kraja crRNA molekule preko oblika ukosnice nastale baznim sparivanjima.<sup>115</sup> Za uspješnost djelovanja CRISPR-Cas9 sustava nužna je prisutnost PAM sekvence koja se pretražuje u genomu tako da bude nizvodno od ciljne DNA sekvence (na 5'-kraju). PAM sekvenca za Cas9 enzim u *Streptococcus pyogenes* je NGG. Nakon vezanja sgRNA/Cas9 kompleksa za ciljno mjesto na DNA, Cas9 cijepa dvostruki DNA lanac najčešće tri baze uzvodno od PAM sekvence<sup>115</sup>. Dvolančani lomovi DNA nastali aktivnošću Cas9 enzima najčešće se popravljaju nehomolognim sparivanjem krajeva i homolognom rekombinacijom. Odabir metode popravka nastalog dvolančanog loma uvelike će ovisiti o željenoj promjeni ciljnog gena.<sup>116,117</sup>

U procesima koji za cilj imaju gensku inaktivaciju ili izrezivanje, *Knock-Out* (KO), CRISPR-Cas9 sustavi koriste se tako da na točno odabranom mjestu u egzonu gena induciraju dvolančani lom. Cilj KO eksperimenata je dobiti nefunkcionalni genski produkt, tj. protein. Da bi se to postiglo mora doći do promjene okvira čitanja DNA (*engl. frameshift*) ili pojavu preuranjenog stop kodona što se postiže pojavom insercija ili delecija na mjestu loma. Stoga je cilj da nakon dvolančanog loma dolazi do popravka nehomolognim sparivanjem krajeva jer tim mehanizmom nastaju različite insercije i delecije budući da NHEJ put popravka često nije u potpunosti točan.<sup>155, 156</sup> Alternativno, može se izrezati i cijeli gen, inducirajući dva neovisna loma sa dvije odvojene sgRNA u blizini početka i u blizini kraja gena.

CRISPR-Cas sustavi također se koriste u *Knock-in* (KI) eksperimentima sa ciljem uvođenja mutacija od interesa, ubacivanjem cijelih gena koji bi mogli služiti kao reporteri ili stvaranjem fuzijskih proteina (npr. obilježavanje proteina od interesa sa zelenim fluorescentnim proteinom, *engl. Green Fluorescence Protein, GFP*). U tom slučaju, preferirani mehanizam popravka nastalog dvolančanog loma DNA je homologna rekombinacija. Za pravilno djelovanje procesa homologne rekombinacije potrebno je uz Cas9 i sgRNA uvesti i dio DNA koji će služiti kao kalup tijekom tog procesa. Da bi DNA kalup mogao služiti kao predložak, on treba pokazivati homologiju na mjestima gdje je došlo do cijepanja DNA. Između mjesta homologije najčešće se nalazi insert od interesa. Na taj se način djelovanjem CRISPR-Cas9 sustava mogu uvesti mutacije ili cijeli geni na točno određena mjesta u genom domaćina.<sup>116,117</sup>

## 2.8. Modelni organizmi - domaći miš i riba zebrica

Modelni organizmi se koriste u istraživanjima da bi se otkrile i razumjele biološke pojave i procesi koji su prisutni i u čovjeku. Modelni organizmi koriste se i u kliničkim ispitivanjima za proučavanje tijeka razvoja ljudskih bolesti te načina djelovanja različitih lijekova i tretmana. U izradi ovog rada korištena su dva modelna organizma; domaći miš i riba zebrica.

Miš (*Mus musculus*) je temeljni modelni organizam za proučavanje sisavaca. Kao i čovjekov, mišji genom je sekvenciran te je miš genetički jako sličan čovjeku (sadrži otprilike 97% istih gena kao i čovjek) što ga čini dobrim modelnim organizmom. Budući da su biljojedi, i blage naravi, njihov je uzgoj relativno jednostavan i jeftin.<sup>160</sup> Riba zebrica (*Danio rerio*) dijeli 70% gena sa čovjekom, ali u usporedbi sa mišem ima brojne prednosti: puno veći broj potomaka, kraće vrijeme sazrijevanja i odrastanja jedinki te nižu cijenu održavanja. Za razliku od miševa oplodnja u ribama zebricama je vanjska te su oplođeni embriji prozirni što postupke genetičkih manipulacija embrija čini višestruko jednostavnijim nego kod miševa.<sup>159</sup> Također, transparentnost embrija omogućuje *in vivo* praćenje bioloških procesa pomoću fluorescentnih proteina reportera. Kao i čovjek, miševi imaju dva *TDP* gena, *TDP1* i *TDP2*, dok kod riba zebrica humani *TDP1* gen ima jedan ortolog, *TDP1*<sup>163</sup>, a *TDP2* gen ima dva ortologa, *TDP2a*<sup>162</sup> i *TDP2b*<sup>161</sup> gen.

## § 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Standardne kemikalije

Agaroz (Sigma), DNase RNase-free voda (Invitrogen), etanol (Kemika), Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Kemika), 2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol - Tris (Sigma), Izopropanol (Kemika), kloroform (Kemika), magnezijev klorid (Kemika),  $\beta$ -merkaptioetanol (Sigma), octena kiselina (Kemika), RNase away reagens (Thermo Fischer Scientific), TRIzol (Ambion).

#### 3.1.2. Boje

Loading Dye Solution (6X, Bromfenol plavo, ksilen cijanol FF i glicerol) (Thermo Fisher Scientific), Gel-Star Nucleic Acid Gel Stain (Lonza) za agaroznu DNA gel elektroforezu.

#### 3.1.3. Markeri veličina

GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Shimadzu) za agaroznu DNA gel elektroforezu.

#### 3.1.4. Početnice

Sve početnice su sintetizirane od strane komercijalnog dobavljača (Macrogen).

#### 3.1.5. Nukleotidi

Otopina smjese nukleotida (dATP, dCTP, dGTP i dTTP): dNTP Mix (Thermo Fischer Scientific) za Taq-PCR.

#### 3.1.6. Enzimi

Taq DNA-polimeraza (Thermo Fischer Scientific), Power SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems), DNaza I, Proteinaza K i pripadajući puferi (Ambion), MeltDoctor HRM Mastermix (Applied Biosystems).

### 3.1.7. Komercijalni kompleti

RNeasy Mini Kit (*Qiagen*), Direct-zol RNA Miniprep Plus (*Zymo Research*), Monarch Total RNA Miniprep kit (*NEB*), Monarch RNA Cleanup Kit (*NEB*), ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis kit (*NEB*).

### 3.1.8. Instrumenti

Analitička vaga *BP 6100* (*Sartorius*), homogenizator *Ultra turrax t25* (*Ika*), centrifuga *Universal 320R* (*Hettich Zentrifugen*), uređaj za gel elektroforezu *Biometra Compact XS / S* (*Analytik Jena*), termoblok *Bio TDB-100* (*Biosan*), uređaj za snimanje agaroznih gelova *ChemiDoc XRS+ System* (*Bio-Rad*), uređaj za mjerenje koncentracije i čistoće RNA i DNA otopina *BioSpec-nano* (*Shimadzu*), PCR uređaj *T1000 Thermal Cycler* (*Bio-Rad*), qPCR uređaj *7300 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*), HRM uređaj *StepOnePlus* (*ThermoFischer Scientific*), optički stripovi *MicroAmp Optical 8-Cap Strips* (*Applied Biosystems*), optičke mikrolitarske ploče *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate* (*Applied Biosystems*), plastične epruvete, računalni programski paket *Bioedit*, računalni programski paket *StepOnePlus*, računalni programski paket *7300 Real-Time PCR System*, računalni programski paket *Primer Select*.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija ukupne RNA

S ciljem proučavanja razine ekspresije *TDPI* i *TDP2* na razini mRNA važno je izolirati ukupnu RNA u intaktnom stanju. RNA molekule izrazito su osjetljive i podložne brznoj degradaciji, bilo hidrolizom ili uslijed djelovanja sveprisutnih RNaza. Za razliku od DNA, RNA je podložnija hidrolizi jer se sastoji od šećera riboze, koja za razliku od deoksiriboze ne sadržava 2'-hidroksilnu skupinu na prstenu pentoze.

Izolacija ukupne RNA iz mišjih tkiva obavljena je na nekoliko načina kako bi se ispitali različiti protokoli. Za homogenizaciju tkiva korišten je mehanički homogenizator *Ultra turrax t25* proizvođača *Ika*. Prije početka postupka izolacije RNA sve radne površine, homogenizator i pipete oprane su 70%-tnim etanolom i *RNase away* reagensom s ciljem izbjegavanja kontaminacija i degradacije RNA od strane RNaza. Prije i nakon homogenizacije uzorci su bili

na ledu, a homogenizator se između uzastopnih homogenizacija pojedinog tkiva dobro ispirao 70%-tnim etanolom i destiliranom vodom kako bi se izbjegle kontaminacije među tkivima. Otopine izolirane RNA su prije provođenja reverzne transkripcije alikvotirane i pohranjene na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

a) QIAGEN RNeasy Mini Kit

Izolacija RNA iz životinjskih tkiva odvijala se tako da se uzelo najviše 30 mg zaleđenog životinjskog tkiva koje se uronilo u 600 - 800  $\mu\text{L}$  RLT pufera za lizu dobivenog dodatkom 10  $\mu\text{L}$   $\beta$ -merkaptioetanol (c = 14,3 mol / L) u 1 mL RLT pufera. Slijedila je mehanička homogenizacija tkiva u trajanju od 30 sekundi pri 13500 okretaja u minuti. Prilikom homogenizacije važno je da se uzorci ne pjene i da se homogenizator dobro očisti između homogenizacija. Također je važno da se sve obavlja na ledu. Nakon homogenizacije uzorci su centrifugirani 3 minute pri sobnoj temperaturi na  $14000 \times g$ . Ovim se korakom odstranjivao netopljivi materijal koji je mogao začepiti kolonu te posljedično dovesti do smanjenja količine i čistoće izolirane RNA. Supernatant se nanosio na kolonu za odvajanje DNA te se ista ponovno centrifugirala 1 min pri sobnoj temperaturi na  $9000 \times g$ . Otopina koja je prošla kroz kolonu odvojila se u čistu tubicu te joj je dodan jedan volumen 70%-tnog etanola (jednak volumenu supernatanta). Nakon miješanja jednim repipetiranjem, otopina se nanosila na *RNeasy* kolonu za odvajanje RNA. Tada je došlo do razdvajanja RNA koja se veže na membranu kolone i tako odvaja od ostalih komponenata koje prolaze kroz membranu kolone. Kolona sa vezanom RNA ispirala se pomoću RW1 i RPE pufera te centrifugiranjem (30 s pri sobnoj temperaturi na  $8000 \times g$ ). Kolona se potom prebacila u čistu tubicu te se suhim centrifugiran kolone uklonio zaostali etanol. RNA je eluirana tako da se *RNeasy* kolona prebacila u novu plastičnu tubicu, a na membranu kolone dodalo se 30  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode *DNase RNase-free* vode proizvođača *Invitrogen*. Kolona se zatim centrifugirala 1 min pri sobnoj temperaturi na  $8000 \times g$ . Otopine RNA se označene, određena im se koncentracija i čistoća te su pohranjene na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

b) Izolacija RNA korištenjem TRIzol reagensa

Reagens TRIzol je monofazna otopina koja se sastoji od nekoliko različitih komponenata među kojima su gvanidin izotiocijanat i fenol. TRIzol reagens inhibira RNaznu aktivnost i razara stanične komponente, zbog čega je izrazito učinkovita metoda izolacije RNA. Dodatkom kloroforma dolazi do separacije faza čime se DNA i proteini odvajaju od RNA. Daljnjom precipitacijom iz pojedinih se faza mogu izolirati DNA ili RNA. Metoda je dobra zbog toga što



se mogu izolirati veće količine RNA visoke čistoće i koristiti manje početne mase tkiva iz kojih se izolira RNA. Nedostaci ove metode su dugotrajni postupak metode te mogući zaostatak organskih otapala u izoliranoj RNA, manipulacija sa kloroformom u digestoru te dulje trajanje procesa u odnosu na druge opisane metode. Na 50 do 100 mg uzoraka životinjskih tkiva dodalo se 1 mL ohlađenog TRIzol reagensa. Važno je da volumen samih uzoraka ne bude veći od 10% volumena dodanog TRIzola. Nakon dodatka TRIzol reagensa slijedila mehanička homogenizacija 30 sekundi pri 13500 okretaja u minuti. Homogenizirani uzorci inkubirali su se 5 minuta pri sobnoj temperaturi s ciljem potpunog razaranja nukleoproteinskih kompleksa. U smjesu se potom dodano 0,2 mL kloroforma na svaki 1 mL TRIzol reagensa. Nakon dodatka kloroforma smjesa se snažno protresla i pripremila za postupak centrifugiranja kojem je cilj razdvajanje faza. Smjesa je nekoliko minuta inkubirana i centrifugirana 15 min pri 4° C na 12000 × g što zbog separacije faza vodi do raslojavanja u tri sloja. U gornjem (vodenom) sloju nalazi se RNA, a u donjem (fenol-kloroform) DNA i proteini. Ove dvije faze odvojene su trećom fazom, takozvanom interfazom u kojoj te također nalazi DNA. Gornji vodeni sloj pažljivo se odvojio i prenio u novu plastičnu tubicu. Odvojenom gornjem sloju dodano je 0,5 mL 100%-tnog izopropanola (po 1 mL dodanog TRIzol reagensa) te je nakon inkubacije od 10 minuta pri sobnoj temperaturi otopina ponovno centrifugirana 10 minuta pri 4° C na 12000 × g. Na taj način dolazi do precipitacije RNA koja tvori bijeli talog na dnu plastične tubice. RNA se ispirala pomoću 70%-tnog etanola tako da se talog resuspendirao s 1 mL 70%-tnog etanola i ponovno centrifugirao 5 minuta pri 4° C na 7500 × g. Supernatant se uklonio, a RNA precipitat se sušio na sobnoj temperaturi te se potom resuspendirao u 50 µL *DNase RNase-free* vode proizvođača *Invitrogen*.

Nakon izolacije RNA TRIzol reagensom slijedio je tretman DNazom I. U reakcijsku smjesu dodano je 8 ng RNA, 10 µL pufera DNaze I, 1 µL DNaze I i ostatak od 100 µL reakcijske smjese čini *DNase RNase-free* voda. Smjesa se inkubirala jedan sat pri temperaturi od 37° C. S ciljem odstranjivanja preostale DNaze i njoj pripadajućeg pufera koristio se komercijalno dostupni komplet *Monarch RNA Cleanup Kit (New England BioLabs)*. Postupak pročišćavanja napravljen je prema uputama proizvođača.

#### c) Direct-zol RNA Miniprep Plus

Direct-zol RNA Miniprep Plus je metoda izolacije RNA iz životinjskih tkiva kojom se može izolirati i do 100 µg RNA različitih veličina, a slično kao prethodno opisana metoda, temelji se

na lizi stanica korištenjem TRIzol reagensa. RNA se izolira i odvaja pomoću RNA kolone, dok se DNA razgrađuje djelovanjem DNaze I. RNA izolirana tom metodom dovoljno je čista za korištenja u daljnjim eksperimentima kao što je primjerice reverzna transkripcija.

Životinjska tkiva liziraju se dodatkom 500  $\mu\text{L}$  TRIzol reagensa na 20 do 50 mg izvagnih zaleđenih tkiva. Nakon dodatka TRIzol reagensa slijedila mehanička homogenizacija u trajanju od 30 sekundi pri srednjoj jačini homogenizatora. U lizat se poslije homogenizacije dodao jedan volumen 96%-tnog etanola te se otopina nanijela na kolonu i centrifugirala 1 minutu pri sobnoj temperaturi na  $13000 \times g$ . Inkubacija DNazom I služila je za dodatno pročišćavanje RNA od mogućih kontaminacija DNA molekula. Otopina DNaze I pripremila se tako da se u otopinu proteina prvo dodalo 400  $\mu\text{L}$  RNA pufera za ispiranje (priredjen dodatkom četiri volumena 96%-tnog etanola) i potom centrifugirala 1 minutu pri sobnoj temperaturi na  $13000 \times g$ . Zatim se dodalo 80  $\mu\text{L}$  otopine DNaze I (75  $\mu\text{L}$  pufera i 5  $\mu\text{L}$  vodene otopine DNaze I koncentracije  $c = 6 \text{ U} / \mu\text{L}$ ). Otopina se inkubirala 15 minuta pri sobnoj temperaturi te se zatim ispirala i centrifugirala prvo s 400  $\mu\text{L}$  Direct-zol RNA pufera za predispiranje za predispiranje pa potom s 700  $\mu\text{L}$  RNA pufera za ispiranje. Puferi služe za odvajanje RNA od preostalih onečišćenja kao što je DNaza I. S ciljem odstranjivanja preostale DNaze i njoj pripadajućeg pufera koristio se komercijalno dostupni komplet *Monarch RNA Cleanup Kit* (New England BioLabs). Postupak pročišćavanja proveden je prema uputama proizvođača. Slijedilo je eluiranje RNA iz stacionarne faze dodatkom 100  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode centrifugiranjem u trajanju od 1 minute pri sobnoj temperaturi na  $13000 \times g$ .

#### d) Monarch total RNA miniprep kit

Monarch total RNA miniprep kit predstavlja metodu izolacije RNA koja se temelji na digestiji DNazom I i proteinazom K te odvajanjem RNA pomoću DNA i RNA kolona. Prvi korak sastoji se od liziranja i homogenizacije životinjskih tkiva. Tkiva su vagona te im se dodao DNA/RNA *Protection Reagens* čiji dodani volumen ovisi o vagonoj masi. Za tkiva mase između 10 i 30 mg dodalo se između 300 i 600  $\mu\text{L}$  reagensa, dok se za tkiva između 30 i 50 mg dodalo više od 600  $\mu\text{L}$  reagensa. Nakon dodatka reagensa uzorci su mehanički homogenizirani pri srednjoj jačini u trajanju od 60 sekundi. Homogenizirani uzorci inkubirani su 5 minuta otopinom proteinaze K i pripadajućeg pufera pri  $55^\circ \text{C}$  priredjenog dodatkom otopine proteinaze K i pufera u omjeru jedan prema sedam (45  $\mu\text{L}$  proteinaze K i 300  $\mu\text{L}$  pufera). Sama otopina proteinaze K priredila se tako da je liofilizirana proteinaza K prvo resuspendirana u 1040  $\mu\text{L}$

odgovarajućeg pufera pa se potom dodatkom 30  $\mu\text{L}$  pufera za proteinazu K i 15  $\mu\text{L}$  resuspendirane otopine dobilo finalnih 45  $\mu\text{L}$  otopine proteinaze K. Proteinaza K spada u skupinu serinskih proteaza te cijepa peptidne veze alifatskih i aromatskih aminokiselina unutar peptida. Koristi se za degradaciju nukleaza čija bi aktivnost mogla dovesti do razaranja RNA. Nadalje se koristila za inaktivaciju preostalih proteina koji bi mogli dodatno kontaminirati izoliranu RNA. Uzorci su 2 minute centrifugirani pri sobnoj temperaturi na  $16000 \times g$  te se supernatantu dodao jedan volumen pufera za lizu (engl. *Lysis buffer*). Uzorci su potom prebačeni u kolonu za odvajanje DNA te su se centrifugirali 1 minutu pri sobnoj temperaturi na  $16000 \times g$ . Kroz stacionarnu fazu DNA kolone prolazi RNA, a DNA ostaje vezana. Eluatu se dodao jedan volumen 95%-tnog etanola i prebacio se u RNA kolonu. Nakon ponovnog centrifugiranja pri istim uvjetima slijedila je razgradnja DNazom I koja se nalazila u pripadajućem puferu. Pufer se nanosio na stacionarnu fazu kolone i inkubirao 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Najprije se na RNA kolonu dodalo 500  $\mu\text{L}$  RNA *priming* pufera pa se nakon centrifugiranja (1 min, sobna temperatura,  $14000 \times g$ ) dodalo 500  $\mu\text{L}$  RNA pufera za ispiranje onečišćenja (engl. *wash buffer*) te se ponovno centrifugirao (2 min, sobna temperatura,  $14000 \times g$ ). Ovim načinom odstranjena je preostala DNaza I i etanol. Eluiranje RNA provelo se dodavanjem 50  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode na stacionarnu fazu, a centrifugiranjem (1 min, sobna temperatura,  $14000 \times g$ ) RNA je eluirana u novu plastičnu tubicu.

### 3.2.2. Određivanje koncentracije i čistoće nukleinskih kiselina

Koncentracija i čistoća izolirane RNA određene su pomoću *BioSpec-nano* uređaja proizvođača *Shimadzu*. Nanodrop je spektrofotometar kojim se mjeri apsorbancija u ultraljubičastom spektru elektromagnetskog zračenja. Jedna od glavnih prednosti ovog uređaja je što se koncentracije otopina mogu odrediti koristeći male volumene otopina RNA ili DNA (1 ili 2  $\mu\text{L}$ ). Uz mjerenje koncentracije također se može procijeniti čistoća uzoraka nukleinskih kiselina. Otopinu kojoj se određuje koncentracija nije potrebno dodatno obrađivati te je postupak određivanja izrazito kratak. Mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm određuje se koncentracija nukleinskih kiselina, dok se određivanjem vrijednosti omjera apsorbancije pri različitim valnim duljinama dobivaju informacije o čistoći mjerene DNA ili RNA otopine.<sup>156</sup> Omjer  $A_{260/280}$  govori o onečišćenju otopina proteinima budući da je to maksimum apsorpcije aminokiselina aromatskih bočnih ogranaka. Omjer  $A_{260/230}$  govori o onečišćenju organskim spojevima i različitim solima. Tijekom mjerenja koncentracija i čistoća otopina DNA, omjer

$A_{260/280}$  oko 1,8 i omjer  $A_{260/230}$  oko 2,0 ukazuju na otopine DNA malih onečišćenja. Za RNA optimalna je vrijednost omjera  $A_{260/280}$  oko 2,0, dok je optimalna vrijednost omjera  $A_{260/230}$  iznad 2,0. Instrument se nulira stavljajući 1  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode te se nakon nuliranja nanosi 1  $\mu\text{L}$  otopine za određivanje koncentracije i čistoće nukleinskih kiselina.<sup>156</sup>

### 3.2.3. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija je proces u kojem se cDNA sintetizira iz jednolančane molekule RNA. Tako sintetizirana DNA naziva se komplementarna DNA; cDNA (engl. *complementary DNA*). U procesu reverzne transkripcije potrebne su početnice za sintezu prvog lanca, a prvi lanac cDNA komplementaran je RNA kalupu kojeg čine mRNA molekule. U reverznoj transkripciji kao početnice mogu služiti nasumični heksameri, oligo dT početnice ili početnice specifične za proučavani gen.<sup>120</sup> Reverzne transkriptaze su enzimi koji kataliziraju sintezu cDNA koristeći RNA kao kalup. Otkrivene su u retrovirusima, gdje se reverznom transkripcijom iz viralne RNA sintetizira cDNA koja se daljnjim mehanizmima integrira u genom domaćina.<sup>121</sup> Prije početka sinteze cDNA sve radne površine oprane su s 70%-tnim etanolom i *RNase away* reagensom da ne bi došlo do kontaminacije izoliranih RNA.

S ciljem sinteze cDNA koristio se *ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis* kit. Ukupna reakcijska smjesa iznosila je 20  $\mu\text{L}$ . U reakcijsku smjesu je dodano 10  $\mu\text{L}$  ProtoScript II Reaction Mix (2X) pufera i 2  $\mu\text{L}$  ProtoScript II Enzyme Mix (2X) otopine koja sadržava rekombinantnu M-MuLV reverznu transkriptazu povećane termostabilnosti. Kao početnice korišteni su nasumični heksameri ( $c = 60 \mu\text{mol} / \text{L}$ ) te se dodavalo 2  $\mu\text{L}$  otopine početnica tako da njihova koncentracija u reakcijskoj smjesi iznosila 6  $\mu\text{mol} / \text{L}$ . Otopina nasumičnih heksamera također sadrži dNTP-ove ( $c = 1 \text{ mmol} / \text{L}$ ) potrebne za sintezu cDNA. Za točnost daljnjih metoda kvantifikacije presudno je da se reakciju započinje s uvijek istom početnom masom RNA, a za uspješnu reakciju početna masa RNA može iznositi do 1  $\mu\text{g}$ . Ovisno o koncentraciji izolirane RNA izračunan je volumen RNA koji se morala dodati u reakcijsku smjesu kako bi ukupna početna masa dodane RNA iznosila 1  $\mu\text{g}$ . Ukoliko je bilo potrebno, dodana je i ultra čista voda tako da je ukupni volumen reakcijske smjese iznosio 20  $\mu\text{L}$ . Reakcijska smjesa najprije se 5 minuta inkubirala na 25°C. Nakon početne inkubacije temperatura se podizala na 48°C te se reakcijska smjesa inkubirala 60 minuta na navedenoj temperaturi. Završni korak bio je inaktivacija reverzne transkriptaze zagrijavanjem reakcijske smjese 5 minuta na temperaturu od 80°C. Termičkom inaktivacijom transkriptaza sprječava se

njihova potencijalna interakcija prilikom kvantitativne lančane reakcije polimerazom. Nakon završetka postupka uzorci su se spremili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Budući da se u reakciju reverzne transkripcije unosio  $1\text{ }\mu\text{g}$  RNA po  $20\text{ }\mu\text{L}$  reakcijske smjese konačne koncentracije otopine cDNA iznosila je  $50\text{ ng} / \mu\text{L}$  ako se uzme u obzir 100%-tna efikasnost postupka reverzne transkripcije.<sup>120</sup>

#### 3.2.4. Agarozna gel elektroforeza nukleinskih kiselina

Gel elektroforeza služi kao metoda razdvajanja nukleinskih kiselina na temelju njihove veličine, odnosno oblika. Sve nukleinske kiseline pri neutralnom pH negativno su nabijene te se tijekom elektroforeze kreću prema pozitivnom polu. Negativni naboji proizlaze iz fosfatnih skupina te je omjer naboja i nukleotida u DNA i RNA molekulama jednak. S jednakim omjerom mase i naboja kretanje DNA i RNA molekula kroz gel ovisit će prvenstveno o njihovoj veličini i obliku. Molekule DNA i RNA manjeg broja nukleotida gibat će se kroz gel brže, dok će se molekule s većim brojem nukleotida kretati sporije. Brzina putovanja molekula kroz molekulsko sito također ovisi o njihovom obliku. Superzavijene molekule putovat će brže, a relaksirane molekule sporije, budući da zbog svoje konformacije zauzimaju više prostora.<sup>122,123</sup>

Agarozni gel dobiven je otapanjem agaroze u TAE puferu (TAE pufer ( $c$  (Tris) =  $40\text{ mmol} / \text{L}$ ,  $c$  (EDTA) =  $1\text{ mmol} / \text{L}$  titriran s  $\text{CH}_3\text{COOH}$  do  $\text{pH} = 8,0$ ). Djeluje kao vrsta molekulskog sita čija veličina pora ovisi o masi otopljene agaroze prilikom formiranja gela. Tijekom gel elektroforeze za razdvajanje RNA molekula, koristili su se 1,3%-tni agarozni gelovi (tj.  $\gamma = 13\text{ g dm}^{-3}$ ). Gel je pripravljen dodavanjem  $1,3\text{ g}$  agaroze u  $100\text{ mL}$  TAE pufera te zagrijavanjem otopine u mikrovalnoj pećnici uz povremeno miješanje pri jačini od  $600\text{ W}$  dok se agarozna ne otopi. Otopina agaroze ostavljena je da se lagano hladi. U smjesu se dodalo  $0,5\text{ }\mu\text{L}$  *GelStar* reagensa koji služi za vizualizaciju nukleinskih kiselina te se još tekuća otopina agaroze izlivala u aparaturu za elektroforezu *Biometra Compact XS / S* proizvođača *Analytik Jena* u koju su dodani češljevi za formiranje jažica. Hlađenjem dolazi do prelaska otopine u gel. Aparatura u kojoj se nalazio gel punila se s  $400\text{ mL}$  TAE pufera tako da je gel bio uronjen u pufer. Otopina RNA se miješala s bojom za nanošenje proizvođača *Thermo Fisher Scientific* u omjeru 1 prema 6 i nanosila se u jažice. Glicerolska komponenta služi za slijeganje otopine na dno jažice. Aparatura se spojila na napon od  $90\text{ V}$  pri sobnoj temperaturi. Kao marker veličine DNA molekula koristio se *GeneRuler DNA Ladder Mix* kojeg se  $1\text{ }\mu\text{L}$  nanosio u zasebnu jažicu.<sup>123</sup>

### 3.2.5. Priprema početnica

Početnice su dizajnirane tako da budu usko specifične, odnosno da se vežu na gen od interesa. Za dizajn početnica korišteno je nekoliko računalnih programskih paketa. Softverskim alatom NCBI baze *Primer-BLAST* tražene su početnice s idealnom temperaturom mekšanja između 58° i 62° C. Duljina dizajniranih početnica iznosila je 18 do 25 nukleotida s udjelom gvanina i citozina između 40% i 60%.<sup>124</sup> Početnice su tako dizajnirane da se barem jedna od njih veže na granici dvaju egzona, odnosno da se jedan dio početnice veže za jedan egzon, dok se drugi dio veže za drugi, njemu susjedni egzon (engl. *exon-exon junction*). Na taj se način spriječilo vezanje početnica na genomsku DNA ako je ista zaostala u manjoj količini tijekom procesa RNA izolacije. Osim za *TDPI* i *TDP2* gene, početnice su dizajnirane za takozvane *housekeeping* gene, gene koji su u relativnoj kvantifikaciji imali ulogu endogene kontrole. Endogenu kontrolu čine geni čija je ekspresija slična u svim ispitivanim tkivima. Potom je ispitivana vjerojatnost tvorbe sekundarnih struktura uključujući dimere (engl. *crossdimers* i *selfdimers*) i ukosnice (engl. *hairpin*), jer iste mogu utjecati na efikasnost PCR reakcije koristeći softverski alat *Primer Select*. Visoke negativne vrijednosti Gibbsovih energija ukazuju na visoku vjerojatnost nastanka nepoželjnih sekundarnih struktura početnica.<sup>139</sup> Duljina PCR amplikona za qPCR bila je oko 100 bp.<sup>124,125</sup>

Tablica 3.2.1. Nukleotidni sljedovi početnica korištenih za lančanu reakciju polimerazom s pripadajućim temperaturama mekšanja i udjelom gvanina i citozina.

Početnica	Nukleotidni slijed (5'-3')	<i>T<sub>m</sub></i> / °C	% GC
Tdp1_F	TTGGAACACACCACACGAAA	57	45
Tdp1_R	GGGTTTTCTGGTGCCAGTCT	60	55
Tdp2_F	CGACTGGCAGACGCAGAAAG	61	60
Tdp2_R	CTCGGACTTGAAGGACGTGG	62	60
18S_rRNA_F	GATGGTAGTCGCCGTGCCTA	62	60
18S_rRNA_R	CCTGCTGCCTTCCTTGGA	60	61

### 3.2.6. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polimerase Chain Reaction*, PCR) je metoda amplifikacije odsječka DNA *in vitro*. Metoda lančane reakcije polimerazom razvila se pronalaskom termostabilnih bakterijskih DNA-polimeraza koje zadržavaju svoju aktivnost pri

visokim temperaturama.<sup>126</sup> DNA-polimeraze sintetiziraju lance DNA u smjeru 5' prema 3' kraju iz deoksiribonukleotida koristeći jedan od lanaca DNA kao kalup. Budući da DNA polimeraze ne mogu sintetizirati cjelokupni lanac DNA *de novo*, za aktivnost polimeraza potrebne su početnice. Za sintezu DNA koriste se dvije početnice, uzvodna (engl. *Forward*, F) i nizvodna (engl. *Reverse*, R). Uz početnice, DNA polimerazu i deoksiribonukleotide (dNTP), za uspješnu PCR reakciju potrebni su  $Mg^{2+}$  ioni koji služe kao kofaktori polimeraza te ujedno tvore komplekse s deoksiribonukleotidima.<sup>127</sup> Magnezijevi ioni uglavnom su sadržani u komercijalnim puferima ili se u reakcijsku smjesu dodaju iz otopine  $MgCl_2$ .

Lančana reakcija polimerazom sastoji se od tri koraka. U prvom koraku dolazi do termičke denaturacije DNA, odnosno međusobnog razdvajanja lanaca DNA. U drugom koraku reakcijska smjesa se hladi na određenu temperaturu koja omogućuje sljepljivanje početnica na njima komplementarne segmente DNA (engl. *annealing temperature*,  $T_a$ ). Zbog visoke koncentracije, početnice će se na DNA slijepiti prije nego komplementarni lanci koji su u prvom koraku odvojeni. U trećem koraku dolazi do sinteze novog lanca djelovanjem DNA-polimeraze. Za PCR reakciju ključno je da je DNA-polimeraza termostabilna, odnosno da ne dolazi do inaktivacije tijekom koraka denaturacije. Ta tri koraka se ponavljaju čineći cikluse prilikom kojih dolazi do eksponencijalnog umnažanja ciljnog segmenta DNA omeđenog početnicama. PCR reakcija uglavnom traje tridesetak ciklusa te nakon toga dolazi do prestanka eksponencijalnog umnažanja ciljnog segmenta uglavnom zbog smanjene enzimske aktivnosti.<sup>128</sup> U tipičnom PCR eksperimentu početna denaturacija prvog ciklusa duljeg je trajanja nego u ostalim ciklusima zbog toga što je za efikasnost reakcije ključno što bolje razdvojiti lance. Često i završno produljenje traje duže nego u prijašnjim ciklusima kako bi se osigurala potpuna sinteza.<sup>132</sup>

Ukupni volumen reakcijske smjese za testni PCR iznosio je 15  $\mu$ L. U reakcijsku smjesu dodao se Taq pufer (1x) koji sadržava magnezijeve ione, smjesa dNTP-ova potrebnih za sintezu DNA lanca (konačne koncentracije od 0,2 mmol / L), uzvodne i nizvodne početnice (konačne koncentracije 0,2  $\mu$ mol / L), Taq DNA polimeraza (konačne koncentracije 0,025 U /  $\mu$ L) i na kraju cDNA (10 ng po reakciji). Ostatak do 15  $\mu$ L smjese činila je *DNase RNase-free* voda. Temperature mekšanja izračunate su pomoću  $T_m$  kalkulatora dostupnog na mrežnim stranicama (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>). Trajanje i temperatura inkubacije pojedinih koraka PCR postupka odredile su se ovisno o korištenim početnicama i duljinama DNA amplicona.

Nakon završetka lančane reakcije polimerazom dobiveni produkti analizirani su agaroznom gel elektroforezom.

Tablica 3.2.2. Uvjeti pri kojima je provedena lančana reakcija polimerazom.

Korak	Vrijeme trajanja / min	Temperatura / °C	Broj ciklusa
Početna denaturacija	0,5	95	1
Denaturacija	0,5	95	30
Sparivanje početnica	1,0	52-56	30
Elongacija	0,5	68	30
Završna elongacija	5,0	68	1

### 3.2.7. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom

Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. *quantitative PCR*, qPCR) je PCR metoda kojom se mjeri fluorescencija koja je mjera količine umnožene DNA. Za razliku od konvencionalnog PCR postupka u kojem se mjeri količina DNA umnožena nakon zadnjeg ciklusa (npr. nakon 30 ciklusa), u qPCR postupku prati se amplifikacija željenog segmenta DNA u stvarnom vremenu (engl. *Real Time PCR*, RT-PCR). Za reakcijsku smjesu u qPCR reakciji potrebne su slične komponente kao i u klasičnom PCR-u: termostabilna DNA polimeraza, prikladni pufer s magnezijevim ionima, DNA kalup, deoksiribonukleotidi i specifični par početnica. Uz to potreban je i reagens koji sadrži fluorofor. Tijekom vezanja fluorofora za dvolančanu DNA dolazi do njegove fluorescencije. Budući da se aktivnost polimeraze temelji na katalizi sinteze dvolančane DNA, nastaje sve više DNA molekula te se time povećava i količina vezanog fluorofora što za posljedicu ima povećanje fluorescencije. Mjerenjem vrijednosti fluorescencije u ovisnosti o vremenu (točnije, o broju ciklusa) može se odrediti početna razina ekspresije određenog gena. Prvo se postavlja granična vrijednost fluorescencije (engl. *threshold*) za koju je važno da se nalazi u eksponencijalnom dijelu amplifikacijske krivulje. Zatim se određuje u kojem je ciklusu dostignuta granična vrijednost fluorescencije ( $C_t$ ). Ako je umnažani DNA segment sadržan u većoj količini, granična vrijednost fluorescencije bit će dostignuta pri nižem broju ciklusa, što znači da je ekspresija proučavanog gena viša, odnosno postojalo je više cDNA molekula u inicijalnom uzorku. Granična vrijednost fluorescencije bit će dostignuta u višem broju ciklusa ukoliko je umnažanog segmenta koji služi kao kalup manje. *TDPI* i *TDP2* geni kvantificirani su pomoću



relativne kvantifikacije u kojoj se proučava ekspresija pojedinog gena u odnosu na endogenu kontrolu. Endogenu kontrolu čine geni čija se ekspresija bitno ne mijenja ovisno o tkivu koje se proučava ili ovisno o uvjetima u kojem se uzorci nalaze. Različiti geni koriste se kao endogene kontrole kao što su primjerice GAPDH (Glicerinaldehid-3-fosfat-dehidrogenaza),  $\beta$ -aktin, 18S rRNA i drugi. Neki od tih gena su tzv. *housekeeping* geni, koji služe za održavanje osnovnih staničnih funkcija i visoko su eksprimirani u približno jednakim razinama u svim dijelovima organizma.<sup>130</sup> Endogena kontrola koristi se za normalizaciju zbog različitih eksperimentalnih varijabilnosti tijekom pripreme i analize uzoraka kao što su uspješnost RNA izolacije, reverzne transkripcije, razgradnja RNA i tehničke pogreške. Uz endogenu kontrolu također se mjeri fluorescencija reakcijske smjese bez DNA kalupa (engl. *nontemplate control*, NTC) čime se provjerava postojanje kontaminacija reakcijskih smjesa.<sup>131</sup> U procesu relativne kvantifikacije je iznimno bitno da geni od interesa, kao i *housekeeping* gen imaju sličnu efikasnost amplifikacije, tj. da sve korištene početnice imaju sličnu efikasnost blizu 100%.<sup>129</sup> Zato se prije kvantifikacije genske ekspresije ciljnog gena najprije određuje efikasnost dizajniranih qPCR početnica tako da se varira koncentracija cDNA između uzoraka uz konstantnu koncentraciju početnica (300 nmol / L) te se iz jednadžbe pravca određuje efikasnost amplifikacije koristeći sljedeće formule:

$$(1) \text{ efikasnost} = 10^{(-1/\text{našib pravca})} - 1$$

$$(2) \text{ faktor amplifikacije} = 10^{(-1/\text{našib pravca})}$$

Također je bitno da linearnost pravca ( $R^2$ ) bude blizu 1.

Efikasnost početnica provjeravala se za *TDPI* i *TDP2* gen te za 18S rRNA gen koji je služio kao endogena kontrola. Za određivanje efikasnosti 18S rRNA početnica određivala se ekspresija otopina cDNA šest različitih koncentracija (u rasponu koncentracija od 1 ng /  $\mu$ L do 0,003 ng /  $\mu$ L). Za određivanje efikasnosti *TDPI* i *TDP2* početnica koristilo se pet otopina cDNA različitih koncentracija (u rasponu koncentracija od 5 ng /  $\mu$ L do 0,03 ng /  $\mu$ L).

Nakon što je ustanovljena zadovoljavajuća efikasnost dizajniranih početnica u qPCR eksperimentu, provela se relativna kvantifikacija ekspresije *TDPI* i *TDP2* gena na razini mRNA u tkivima miša. Reakcijske smjese od 10  $\mu$ L sadržavala je 5  $\mu$ L SYBR Green reagensa, 2,5  $\mu$ L ultra čiste vode, po 0,5  $\mu$ L svake od početnica, a ostatak je činilo 1,5  $\mu$ L otopine cDNA poznate koncentracije. Pripremljene reakcijske smjese nosile su se optičke stripove ili optičke mikrolitarske pločice (*Applied Biosystems*). Iste se zatim kratko centrifugiraju ( $500 \times g$ , 5 min

pri sobnoj temperaturi) kako bi smjesa, zaostala na stjenkama tubica, pala na dno tubica te se provodi qPCR koristeći instrument *7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*.

Mjerila se vrijednost fluorescencije reakcijske smjese koja se povećava po svakom ciklusu. Kada vrijednost fluorescencije dostigne graničnu vrijednost određuje se ciklus  $C_t$  u kojem se to dogodilo. Određivala se srednja  $C_t$  vrijednost tehničkih triplikata kao i standardna devijacija iste. Za relativnu kvantifikaciju ekspresije *TDPI* i *TDP2* gena korištena je Q-gene metoda.<sup>136,137</sup> Ona se temelji na određivanju MNE (engl. *Mean Normalized Expression*) vrijednosti prema kojoj se računa MNE vrijednost prikazana na Slici 3.2.1.

$$(3) MNE = \frac{E(\text{endogena kontrola})^{C_{t\text{endogena kontrola}}}}{E(\text{ciljni gen})^{C_{t\text{ciljni gen}}}} \times 10^6$$

Slika 3.2.1. Formula za računanje MNE vrijednosti.

MNE vrijednosti su pokazatelji ekspresije gena u pojedinom tkivu. Veće MNE vrijednosti u tkivu sugeriraju veću ekspresiju određenog gena. Izračunate MNE vrijednosti statistički se obrađuju za prikaz ekspresije *TDPI* i *TDP2* gena u svakom tkivu.

### 3.2.8. Analiza Mekšanja visoke rezolucije (engl *High Resolution Melting, HRM*)

Mekšanje visoke rezolucije (engl *High Resolution Melting*, HRM) je metoda za detekciju mutacija, delecija, polimorfizama i drugih promjena na dvolančanoj DNA molekuli. Temelji se na mjerenju fluorescencije PCR amplikona prilikom razdvajanja DNA lanaca nastalih lančanom reakcijom polimeraze nakon povećanja temperature reakcije.<sup>167</sup> Prvo se priredi reakcijska smjesa koja sadržava DNA od interesa, enzime i pufere potrebne za uspješnu PCR reakciju kao i početnice specifične za umnažanje segmenta DNA u kojem se sumnja na mutaciju. Također se dodaju posebni reagensi (MeltDoctor HRM Mastermix proizvođača *Applied Biosystems*, sastoji se od DNA polimeraze, magnezijevih soli, dNTP-ova, fluorescentnih boja i ostalih sastojaka) koje fluoresciraju kada su u interakciji sa dvolančanom DNA. Reakcija najprije započinje PCR reakcijom zbog koje dolazi do umnažanja ciljnog segmenta. Zatim se postepeno povećava temperatura reakcijske smjese prilikom čega se istovremeno prati vrijednost fluorescencije nastale interakcijama fluorofora sadržanih u bojama s molekulama DNA. Postizanjem određene temperature dolazi do razdvajanja lanaca DNA u PCR amplikonu. Razdvajanjem lanaca smanjuje se vrijednosti fluorescencije jer fluorofori fluoresciraju samo kada su u interakcijama s dvolančanom DNA. Zbog mutacija, PCR

amplikoni drugačije su strukture od uzoraka divljeg tipa (engl. *Wild Type*, WT) te će zato pokazivati različite temperature mekšanja, odnosno pri različitim temperaturama će doći do denaturacije DNA. Analiziranjem krivulje vrijednosti fluorescencije u ovisnosti o temperaturi te usporedbom sa uzorcima DNA koje ne sadržavaju mutaciju moguće je odrediti sadržava li ispitivana DNA mutaciju. Također se na temelju razlike u krivuljama može pretpostaviti o kojim je mutacijama riječ (npr. veća delecija ili insercija nasuprot supstituciji ili manjoj deleciji ili inserciji). Metoda HRM analize omogućuje određivanje potencijalnih mutacija DNA u velikom broju uzoraka u kratkom vremenu.<sup>167</sup>

Reakcija započinje tako da se pripremila reakcijska smjesa ukupnog volumena 10  $\mu$ L. U smjesu se dodalo 5  $\mu$ L *MeltDoctor HRM Master Mix* koji u sebi sadržava enzime i boju koja u interakciji sa dsDNA fluorescira. Dodalo se po 0,6  $\mu$ L uzvodne i nizvodne početnice te 0,5  $\mu$ L DNA kalupa. Ostatak reakcijske smjese činila je ultra čista voda. Uzorci su se centrifugirali 5 min pri 4° C na 500  $\times$  g. Na HRM uređaju *StepOnePlus* proizvođača *ThermoFischer Scientific* odabran je protokol koji se sastoji od četrdeset ponavljajućih ciklusa denaturacije, elongacije i mjerenja fluorescencije uslijed povećanja temperature smjese. Dobiveni rezultati obrađivani su *StepOnePlus* softverskim paketom kojim su formirane i analizirane derivacije krivulja mekšanja DNA. Na taj se način određuje postojanje različitih insercija, delecija ili drugih mutacija i polimorfizama u uzorcima.

Na embrijima riba zebrića izvršen je eksperiment koristeći Cas9 i sgRNA kompleks s ciljem inaktivacije *TDP1* gena promjenom okvira čitanja i pojavom preuranjenog stop kodona. Embriji riba zebrića injektirani su Cas9 i sgRNA kompleksom te su uzgajani nekoliko mjeseci. Nakon dostizanja spolne zrelosti odrasle ribe zebriće, potencijalni utemeljitelji (engl. *founders*), križani su u divljim tipom riba zebrića te su potom njihovi embriji skupljeni i HRM metodom izvršena je genotipizacija potomaka kako bi se pronašao utemeljitelj, tj. jedinka koja prenosi mutaciju na potomke (engl. *germline*).

Postupak identifikacije utemeljitelja izvršen je za tri ribe zebriće, dva mužjaka i jednu ženku. Analizirano je po deset embrija dobivenih križanjem prva dva mužjaka s divljim tipom te deset embrija dobivenih križanjem ženke ribe zebriće s mužjakom divljeg tipa. Također su korišteni embriji divljih tipova riba zebrića kao interna kontrola eksperimenta genotipizacije pomoću HRM metode. Formirale su se derivacije krivulja mekšanja DNA koje su funkcije vrijednosti fluorescencije u ovisnosti o temperaturi. Krivulje potomstva potencijalnih utemeljitelja uspoređivale su se s krivuljama embrija divljih tipova. Različit oblik i maksimum

krivulje u odnosu na divlje tipove ukazuje na drugačije vrijednosti fluorescencije, odnosno vrijednosti disocijacije DNA. Embriji potencijalnih utemeljitelja koji imaju razlike u  $T_m$  vrijednostima veće od  $0,5^\circ\text{C}$  u odnosu na embrije divljih tipova smatraju se potencijalnim nositeljima željene mutacije, što se dalje potvrđuje sekvenciranjem.<sup>167</sup>

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Analiza izolirane ukupne RNA

Da bi se mogla kvantificirati ekspresija *TDPI* i *TDP2* gena potrebno je prvo izolirati ukupnu RNA iz uzoraka mišjih tkiva. Izolirana RNA treba biti visoke čistoće i kvalitete, odnosno bez degradacija i kontaminacija kako bi se mogla dalje koristiti za reakcije reverzne transkripcije. Otopine izolirane RNA trebaju također biti iznad granične koncentracije kako bi se mogle koristiti u procesu reverzne transkripcije. Budući da se po protokolu<sup>135</sup> u reakciju reverzne transkripcije ulazi s 1 µg RNA, te ukupni volumen otopine izolirane RNA smije iznositi 12 µL vidljivo je da koncentracija otopine izolirane RNA mora iznositi najmanje 83 ng / µL. (Tablice 4.1.1. i 4.1.2. i Slike 4.1.1.- 4.1.7.).

RNA je izolirana iz tkiva mozga, jetre, bubrega, crijeva, jajnika i testisa triju jedinki ženki i mužjaka miševa različitim metodama izolacija. RNA je iz tkiva prve ženke miša izolirana pomoću kolona za odstranjivanje DNA koristeći RNeasy Mini Kit komercijalni komplet proizvođača *Qiagen*. Iz tkiva jedinke druge ženke izolirana je TRIzol metodom koristeći *Ambion* protokol, dok je iz treće jedinke ženke izolirana kombinacijom TRIzol metode i kolona prema *Direct-zol RNA Miniprep Plus* protokolu i komercijalnom kompletu proizvođača *Zymo Research*. Tijekom izolacija RNA TRIzol metodom i kombinacijom TRIzol metode i kolona otopine izolirane RNA dodatno su tretirane otopinom DNaze I i pročišćene koristeći komercijalno dostupnim kompletom *Monarch RNA Cleanup Kit* proizvođača *New England BioLabs*. Postupak pročišćavanja napravljen je prema uputama proizvođača. Otopinama izoliranih RNA određivana je masena koncentracija i čistoća određivanjem vrijednosti omjera apsorbancija pri različitim valnim duljinama *BioSpec-nano* spektrofotometrom proizvođača *Shimadzu*. Agaroznom gel elektroforezom dobio se uvid u razine degradacije izolirane RNA te potencijalne kontaminacije DNA molekulama. Omjer  $A_{260/280}$  govori o onečišćenju otopina proteinima budući da je to maksimum apsorpcije aminokiselina aromatskih bočnih ogranaka, dok omjer  $A_{260/230}$  govori o onečišćenju organskim spojevima i različitim solima.<sup>134</sup> Za otopine izolirane RNA optimalna vrijednost omjera  $A_{260/280}$  je oko 2,0, dok je optimalna vrijednost omjera  $A_{260/230}$  iznad 2,0 (u intervalu između 1,8 i 2,2).

Tablica 4.1.1. Masena koncentracija i omjeri apsorbancija otopina RNA izoliranih različitim metodama iz tkiva ženki miševa. Izolacija ukupne RNA pomoću kolona (prva ženka) provedena je *Qiagen RNeasy Mini Kit* komercijalni kompletom, TRIzol metoda (druga ženka) prema *Ambion* protokolu i kombinacija kolona i TRIzol reagensa (treća ženka) prema *Direct-zol RNA Miniprep Plus* komercijalnom kompletu. (\*TRIzol metoda, \*\**NEB Monarch Total RNA Miniprep Kit*, \*\*\**Qiagen RNeasy Mini Kit*).

Prva ženka (F1)-izolacija RNA pomoću kolona				
Tkivo	Odstranjivanje DNA	$\gamma$ (RNA) / ng $\mu\text{L}^{-1}$	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Mozak	gDNA kolona	133	2,0	1,8
Jetra*	DNaza I, <i>Monarch RNA Cleanup Kit</i>	310	2,1	1,9
Bubreg	gDNA kolona	192	2,0	1,9
Crijevo	gDNA kolona	201	2,1	2,3
Jajnici	gDNA kolona	205	1,8	1,0
Druga ženka (F2)-TRIzol metoda				
Mozak	DNaza I, <i>Monarch RNA Cleanup Kit</i>	307	2,1	2,0
Jetra	DNaza I, <i>Monarch RNA Cleanup Kit</i>	268	2,1	2,0
Bubreg	DNaza I, <i>Monarch RNA Cleanup Kit</i>	279	2,1	2,0
Crijevo	DNaza I, <i>Monarch RNA Cleanup Kit</i>	203	2,1	2,0
Jajnici	DNaza I, <i>Monarch RNA Cleanup Kit</i>	262	2,1	2,0
Treća ženka (F3)-kombinacija TRIzol metode i kolone				
Mozak	DNaza I, <i>Monarch RNA Cleanup Kit</i>	248	2,1	1,8
Jetra	DNaza I, <i>Monarch RNA Cleanup Kit</i>	116	2,0	0,7
Bubreg	DNaza I, <i>Monarch RNA Cleanup Kit</i>	340	2,0	1,2
Crijevo**	gDNA kolona, DNaza I	913	2,2	2,1
Jajnici	DNaza I, <i>Monarch RNA Cleanup Kit</i>	36	2,2	0,9

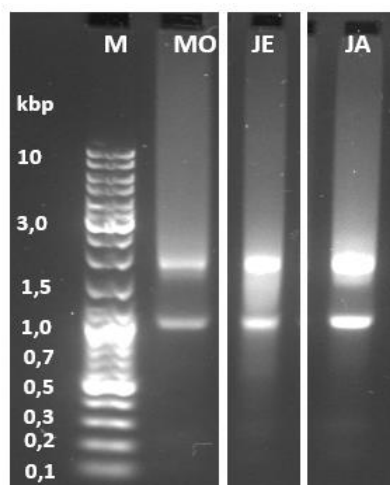
RNA otopine izolirane iz mozga, crijeva, jajnika i bubrega prve ženke miša bile su dovoljno visoke koncentracije za daljnju reverznu transkripciju, dok je otopina RNA izolirana iz jetre

ženke miša bila niske koncentracije, vjerojatno zbog prevelike početne mase korištene prilikom izolacije. Zbog toga je izolacija RNA iz jetre prve ženke miša ponovljena TRIzol metodom te je tako izolirana RNA dovoljno visoke koncentracije i čistoće za uspješnu provedbu reverzne transkripcije. Vrijednosti omjera  $A_{260/280}$  su oko i iznad 2,0 dok su vrijednosti omjera  $A_{260/230}$  u intervalu od 1,8 do 2,3 što ukazuje na slaba onečišćenja otopina izoliranih RNA jedinke prve ženke miša. Iznimka je otopina RNA izolirane iz jajnika prve ženke miša čija je vrijednosti omjera  $A_{260/230}$  niža.

Kao i kod izolacije RNA iz tkiva prve ženke miša, koncentracija otopina izoliranih RNA iz tkiva druge ženke miša dovoljno su visoke za provođenje reverzne transkripcije. Također je iz omjera apsorbancija vidljivo da nisu prisutna značajna onečišćenja RNA izolirane iz tkiva druge ženke miša. Otopine RNA izolirane iz tkiva treće ženke miša dovoljno su visokih koncentracija za provođenje reverzne transkripcije te vrijednosti omjera  $A_{260/280}$  ukazuju na mala onečišćenja proteinima. RNA iz jajnika nije uspješno izolirana zbog tehničke greške što je vidljivo i u niskoj koncentraciji i omjerima apsorbancija. Otopine RNA izolirane iz tkiva jetre i bubrega pokazuju niske vrijednosti  $A_{260/230}$  omjera što upućuje onečišćenja, dok su otopine RNA izolirane iz mozga i crijeva slabo onečišćene.

Iako mjerenje pomoću *Nanodrop* uređaja daje uvid u čistoću izoliranih otopina RNA, ono ne govori o samoj sačuvanosti RNA, odnosno razini degradacije te je stoga provedena agarozna gel elektroforeza otopina izoliranih RNA. Priređivali su se 1,3 % gelovi na koje je dodano 200 ng otopina RNA te je elektroforeza provedena 30 minuta pri 90 V na sobnoj temperaturi. Kao marker veličina koristio se *GeneRuler DNA Ladder Mix* (M). Zbog tehničke pogreške prilikom nanošenja na gel, otopine RNA izolirane iz crijeva i bubrega nisu prikazane. Analizirajući izgled gela vidljivo je da su prisutne dvije intenzivne vrpce. Gornja vrpca predstavlja 28S rRNA, a donja vrpca 18S rRNA. Intenziteti dviju karakterističnih vrpca u uzorcima otopina RNA izolirane iz jetre i jajnika odnose se tako da je intenzitet donje vrpce otprilike dvaput manji od intenziteta gornje vrpce (28S rRNA je otprilike dvostruko veća od 18S rRNA), što je pokazatelj očuvanosti i slabe degradacije rRNA iz čega se može zaključiti kako je mRNA isto očuvana. Nisu vidljive vrpce kojima bi se mogla pripisati kontaminacija DNA molekulama (Slika 4.1.1.). Razmazi iznad i ispod gornje vrlo su slabo izraženi te se zaključuje da nije došlo do značajnijeg raspada RNA tijekom izolacije. Iako je otopina RNA izolirana iz jajnika pokazivala nisku vrijednost omjera  $A_{260/230}$ , zbog visokog integriteta RNA vidljivog iz agarozne elektroforeze (Slika 4.1.1.), visoke koncentracije i omjera  $A_{260/280}$

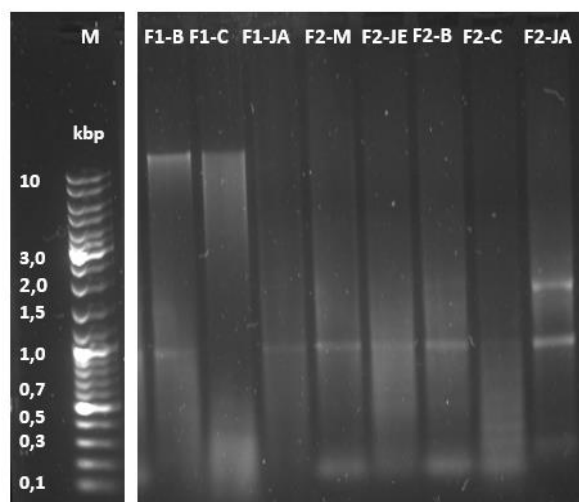
apsorbancija odlučeno je da će se ti uzorci koristiti u postupku reverzne transkripcije zajedno s ostalim uzorcima.



Slika 4.1.1. Agarozna gel elektroforeza otopina RNA izoliranih iz tkiva prve ženke miša pomoću kolona. Oznake: M – DNA marker (*GeneRuler DNA Ladder Mix*), MO – mozak, JE – jetra, JA – jajnik. U agaroznoj gel elektroforezi korišteni su 1,3% gelovi.

Slijedila je agarozna gel elektroforeza otopina izoliranih RNA iz tkiva druge ženke miša. Osim otopina izoliranih RNA iz tkiva druge ženke miša na gel su također nanese otopine RNA izolirane iz tkiva jetre, bubrega i crijeva prve ženke miša koje su izolirane koristeći *Rneasy Mini Kit* komercijalni komplet. Kao svojevrsna pozitivna kontrola s ciljem provjere uspješnosti samog postupka elektroforeze nanescena je i otopina RNA izolirane iz jajnika prve ženke miša za koju je poznato da je uspješno izolirana (Slika 4.1.1.). Kod svih otopina osim kod otopina RNA izoliranih iz crijeva (F1C, F2C) prisutna je 18S rRNA vrpca, a kod otopina RNA izolirane iz jajnika druge ženke miša također je vidljiva još 28S rRNA vrpca (Slika 4.1.2.). U uzorcima bubrega i crijeva iz prve ženke miša vidljivi su manji razmazi u gornjem dijelu gela ispod jažica što vjerojatno predstavlja gDNA. Slaba 28S vrpca indicirala bi raspad RNA, međutim s obzirom na nepostojanje 28S vrpce u pozitivnoj kontroli, može se zaključiti da je vjerojatno došlo do degradacije RNA uslijed prisustva RNaza prilikom pripreme i izvođenja agarozne elektroforeze i/ili zbog zagrijavanja pufera prilikom korištenja višeg napona. Ovako izolirani uzorci dalje su korišteni u procesu reverzne transkripcije te će se uspješnost same izolacije moći procijeniti pomoću ekspresije endogene kontrole koristeći qPCR.

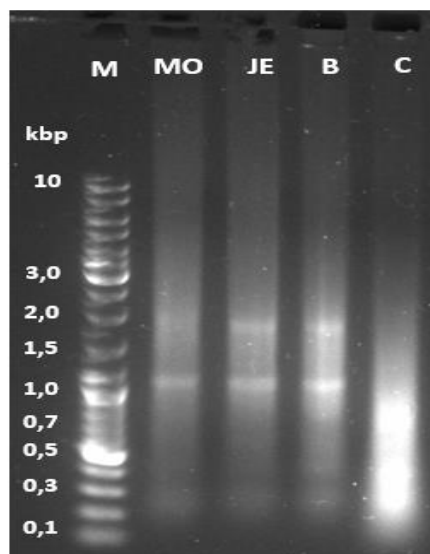




Slika 4.1.2. Agarozna gel elektroforeza otopina RNA izoliranih iz tkiva prve i druge ženke miša. Oznake: M – DNA marker (*GeneRuler DNA Ladder Mix*), F1 – prva ženka, F2 – druga ženka, MO – mozak, JE – jetra, B-bubreg, C – crijevo, JA – jajnik. U agaroznoj gel elektroforezi korišteni su 1,3% gelovi.

Kod svih otopina osim kod otopina RNA izoliranih iz crijeva (F1-C, F2-C) prisutna je 18S rRNA vrpca, a kod otopina RNA izolirane iz jajnika druge ženke miša također je vidljiva još 28S rRNA vrpca (Slika 4.1.2.). U uzorcima bubrega i crijeva iz prve ženke miša vidljivi su manji razmazi u gornjem dijelu gela ispod jažica što vjerojatno predstavlja gDNA. Slaba 28S vrpca indicirala bi raspad RNA, međutim s obzirom na nepostojanje 28S vrpce u pozitivnoj kontroli, može se zaključiti da je vjerojatno došlo do degradacije RNA uslijed prisustva RNaza prilikom pripreme i izvođenja agarozne elektroforeze i/ili zbog zagrijavanja pufera prilikom korištenja višeg napona. Ovako izolirani uzorci dalje su korišteni u procesu reverzne transkripcije te će se uspješnost same izolacije moći procijeniti pomoću ekspresije endogene kontrole koristeći qPCR.

Agarozna gel elektroforeza otopina izolirane RNA iz tkiva treće ženke miša pokazala je prisustvo 28S rRNA i 18S rRNA u uzorku mozga, jetre i bubrega, dok se RNA crijeva čini potpuno raspadnuta (Slika 4.1.3.). U uzorku mozga vidi se mogući raspad jer je 28SrRNA vrpca slabijeg intenziteta u odnosu na 18SrRNA. Nisu vidljivi veći razmazi iznad 28S rRNA vrpce što upućuje na malu kontaminaciju gDNA. Raspad RNA najvjerojatnije je uslijedio tijekom izolacije kada se crijevo najdulje seciralo i pročišćivalo od preostalog fecesa. Dobivene otopine korištene su u postupku reverzne transkripcije te je uspješnost izolacije dodatno provjeravana lančanom reakcijom polimeraze i qPCR reakcijom.



Slika 4.1.3. Agarozna gel elektroforeza otopina RNA izoliranih iz treće ženke miša. Oznake: M – DNA marker (*GeneRuler DNA Ladder Mix*), MO – mozak, JE – jetra, B-bubreg, C – crijevo. U agaroznoj gel elektroforezi korišteni su 1,3% gelovi.

RNA iz tkiva mužjaka miša izolirana je iz mozga, jetre, bubrega, crijeva i testisa testirajući dvije različite metode izolacije kolonama za odstranjivanje DNA. Za izolaciju RNA iz tkiva prvog i drugog mužjaka koristio se *RNeasy Mini Kit* komercijalni komplet proizvođača *Qiagen*, dok je za izolaciju RNA iz trećeg mužjaka korišten *Monarch Total RNA Miniprep Kit* komercijalni paket proizvođača *New England Biolabs* koji se temelji na izolacije pomoću kolona i djelovanjem proteinaze K te naknadnim tretman DNazom I.

Tablica 4.1.2. Masena koncentracija i omjeri apsorbancija otopina RNA izoliranih različitim metodama iz tkiva mužjaka miševa. Izolacija ukupne RNA pomoću kolona (prvi i drugi mužjak) provedena je *Qiagen RNeasy Mini Kit* komercijalni kompletom, dok je izolacija RNA kombinacijom kolona i proteinaze K (treći mužjak) provedena prema *Monarch Total RNA Miniprep Kit* komercijalnom kompletu. (\**NEB Monarch Total RNA Miniprep Kit*).

<b>Prvi mužjak (M1)-Izolacija RNA pomoću kolona</b>				
<b>Tkivo</b>	<b>Odstranjivanje DNA</b>	<b><math>\gamma</math> (RNA) / ng <math>\mu\text{L}^{-1}</math></b>	<b><math>A_{260/280}</math></b>	<b><math>A_{260/230}</math></b>
Mozak	gDNA kolona	100	2,1	1,7
Jetra*	gDNA kolona + DNaza I	1513	1,9	1,8
Bubreg	gDNA kolona	516	2,1	1,0
Crijevo*	gDNA kolona + DNaza I	656	2,1	2,2
Testisi	gDNA kolona	678	2,1	2,1
<b>Drugi mužjak (M2)- Izolacija RNA pomoću kolona</b>				
Mozak	gDNA kolona	178	2,1	1,7
Jetra*	gDNA kolona + DNaza I	1302	2,1	2,2
Bubreg	gDNA kolona	97	2,1	1,3
Crijevo*	gDNA kolona + DNaza I	872	2,2	2,2
Testisi	gDNA kolona	89	2,1	1,7
<b>Treći mužjak (M3)-Izolacija pomoću kolona i djelovanjem proteinaze K</b>				
Mozak	gDNA kolona + DNaza I	320	2,1	2,3
Jetra	gDNA kolona + DNaza I	480	2,1	2
Bubreg	gDNA kolona + DNaza I	788	2,1	2,3
Crijevo*	gDNA kolona + DNaza I	943	2,2	2,3
Testisi	gDNA kolona + DNaza I	355	2,1	2

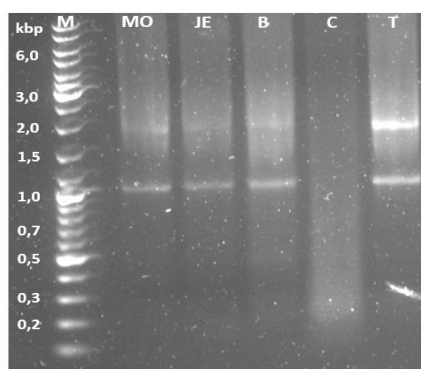
Koncentracije RNA izolirane iz tkiva mozga, bubrega i testisa prvog mužjaka miša dovoljno su visoke za ulazak u proces reverzne transkripcije, dok je određena koncentracije RNA izolirane iz jetre preniska te se postupak izolacije morao ponoviti koristeći drugu metodu izolacije. Uz jetru, RNA je bilo potrebno izolirati i iz tkiva crijeva prvog mužjaka miša zbog odsustva karakterističnih vrpca (Slika 4.1.4.) U Tablici 4.1.2. prikazane su koncentracije i omjeri apsorbancija RNA izolirane iz jetre i crijeva nakon uspješne izolacije. Vrijednost omjera  $A_{260/280}$  izrazito je visoka te za sve otopine iznosi oko 2,0, što sugerira jako mala onečišćenja otopina

proteinima. Za razliku od vrijednosti omjera  $A_{260/280}$ , omjer  $A_{260/230}$  je za jetra, crijevo i testise optimalan, nešto manji od optimalnog u slučaju mozga, te vrlo nizak u slučaju bubrega (Tablica 4.1.4.) što ukazuje na postojanje onečišćenja u RNA izoliranoj iz bubrega prvog mužjaka miša.

RNA izolirana iz mozga, bubrega i testisa drugog mužjaka miša korištena je za reverznu transkripciju, dok je izolacija crijeva i jetre ponovno ponovljena zbog preniske koncentracije koristeći *Monarch Total RNA Miniprep Kit* komercijalni paket (Tablica 4.1.2.). Izolati nisu onečišćeni proteinima što je vidljivo iz omjera  $A_{260/280}$  koji je blizu idealnog (oko 2,0 vrijednosti), dok je onečišćenje organskim spojevima i/ili solima prisutno u uzorku bubrega.

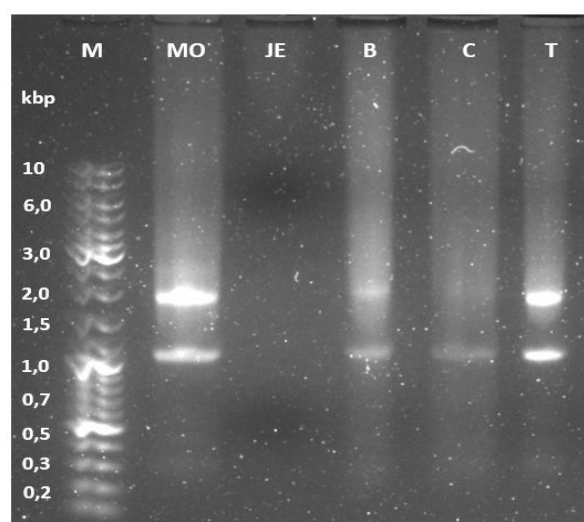
Zbog varijabilnosti u prinosu, kvaliteti i čistoći RNA, za izolaciju RNA iz uzoraka tkiva trećeg mužjaka ispituje se drugačiji komplet, *Monarch Total RNA Miniprep Kit*. Izolacija se temelji na vezanju RNA putem RNA kolona kao i kod prethodne metode, ali se gDNA uklanja i pomoću tretmana DNazom I i gDNA eliminatorskih kolona. U usporedbi sa ostalim korištenim metodama, u ovom kompletu se koristi enzim proteinaza K koja uklanja proteine iz izolata, provodi se dvostruko pročišćavanje gDNA, te su same RNA kolone potencijalno različite. Svi RNA izolati iz tkiva trećeg mužjaka miša izrazito su visoke koncentracije te nemaju očišćenja, omjeri  $A_{260/280}$  i  $A_{260/230}$  su blizu idealnih (iznad 2,0) (Tablica 4.1.6.). Iz toga se može zaključiti da je ova metoda superiorna ostalima za izolaciju RNA iz tkiva miša. Veći prinosi najvjerojatnije su posljedica tretmana proteinazom K prilikom homogenizacije, što doprinosi homogenizaciji uzorka, dok je viša čistoća vidljiva iz značajno viših  $A_{260/230}$  omjera u odnosu na druge metode vjerojatno posljedica superiornih RNA kolona i procesa pročišćavanja.

Nakon određivanja koncentracija i čistoća otopina izoliranih RNA provedena je agarozna gel elektroforeza. Priređivali su se 1,3 % gelovi na koje je dodano 200 ng otopina RNA te je elektroforeza provedena 30 minuta pri 90 V na sobnoj temperaturi.



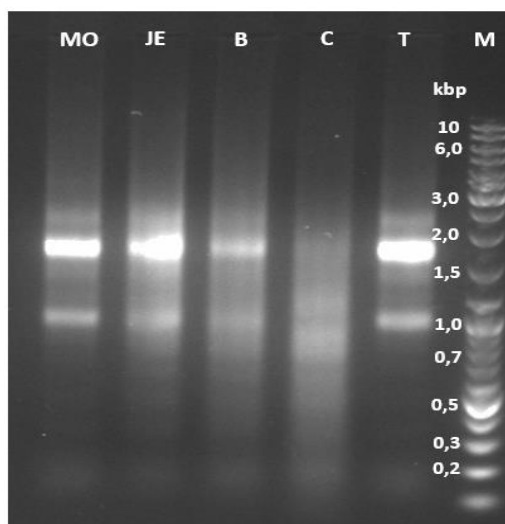
Slika 4.1.4. Agarozna gel elektroforeza otopina RNA izoliranih iz tkiva prvog mužjaka miša. Oznake: M – DNA marker (*GeneRuler DNA Ladder Mix*), MO – mozak, JE – jetra, B-bubreg, C – crijevo, T – testisi. U agaroznoj gel elektroforezi korišteni su 1,3% gelovi.

Kod svih uzoraka osim kod uzoraka otopina RNA izolirane iz crijeva vidljive su vrpce koje predstavljaju 28S rRNA i 18S rRNA. Intenziteti dviju vrpca otopina RNA izoliranih iz mozga, jetre i bubrega otprilike su jednaki, dok je kod otopine RNA izolirane iz testisa gornja vrpca koja predstavlja 28S rRNA većeg intenziteta nego donja vrpca koja ukazuje na 18S rRNA što sugerira slab raspad RNA i efikasnu izolaciju. Na svim uzorcima vidljivi su slabiji razmazi iznad 28S rRNA vrpce koji upućuju na postojanje manje kontaminacije gDNA (Slika 4.1.4.). Kao i u slučaju crijeva ženke, raspad je najvjerojatnije posljedica predugog postupka sekcija tkiva, a ne postupka RNA izolacije



Slika 4.1.5. Agarozna gel elektroforeza otopina RNA izoliranih iz tkiva drugog mužjaka miša. Oznake: M – DNA marker (*GeneRuler DNA Ladder Mix*), MO – mozak, JE – jetra, B-bubreg, C – crijevo, T – testisi. U agaroznoj gel elektroforezi korišteni su 1,3% gelovi.

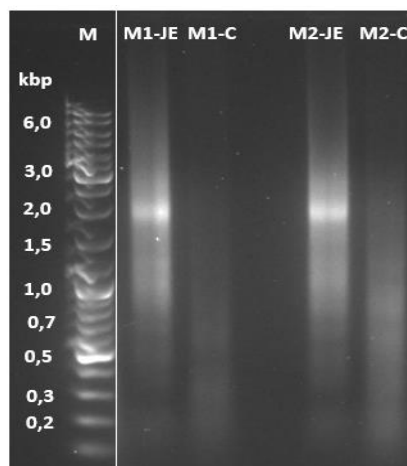
RNA izolati iz mozga, bubrega i testisa drugog mužjaka miša sadrže 28S rRNA i 18S rRNA vrpce s time da je gornja vrpca (28S rRNA) većeg intenziteta od donje, 18S rRNA vrpce, te se zaključuje da je RNA dobrog integriteta, dok je u slučaju crijeva vjerojatno dijelom raspadnuta s obzirom da je 28S vrpca slabija od 18S (Slika 4.1.5.). Sudeći po razini intenziteta razmaza koji predstavlja gDNA može se zaključiti da kontaminacije DNA molekulama nisu velike (Slika 4.1.5.).



Slika 4.1.6. Agarozna gel elektroforeza otopina RNA izoliranih iz tkiva trećeg mužjaka miša. Oznake: M – DNA marker (*GeneRuler DNA Ladder Mix*), MO – mozak, JE – jetra, B-bubreg, C – crijevo, T – testisi. U agaroznoj gel elektroforezi korišteni su 1,3% gelovi.

Agarozna gel elektroforeza otopina RNA izolirane iz tkiva trećeg mužjaka miša pokazala je da su gornje, 28S vrpce kod svih otopina dvostruko i više većeg intenziteta od donjih vrpci, što ukazuje na visoki integritet izolirane RNA (Slika 4.1.6.), značajno superioran u odnosu na druge korištene metode. Također, kontaminacija gDNA koja je bila vidljiva u prethodnim postupcima (kitovima i metodama) nije prisutna (Slika 4.1.6.) što je vjerojatno posljedica dvostrukog gDNA pročišćavanja (DNAzaI i gDNA kolone). Ponovno je uočljiv raspad RNA crijeva, što potvrđuje prijašnju hipotezu da je RNA crijeva raspadnuta zbog posljedica preduge izolacije tkiva, a ne same RNA izolacije.

Zbog jako malih koncentracija otopina RNA izoliranih iz tkiva jetre i crijeva prvog i drugog mužjaka miša, izolacija je ponovljena koristeći *Monarch Total RNA Miniprep Kit* koji se pokazao najuspješnijim postupkom izolacije RNA. Sve izolirane RNA su visoke koncentracije (Tablica 4.1.7) dok je iz gel elektroforeze opet vidljiv raspad izolata crijeva što potvrđuje prijašnju hipotezu (Slika 4.1.7).



Slika 4.1.7. Agarozna gel elektroforeza otopina RNA izoliranih iz tkiva prvog i drugog mužjaka miša. Oznake: M – DNA marker (*GeneRuler DNA Ladder Mix*), M1 – prvi mužjak, M2 – drugi mužjak JE – jetra, C – crijevo. U agaroznoj gel elektroforezi korišteni su 1,3% gelovi.

Vidljiv je i djelomičan raspad RNA jetre (slabija 18S rRNA vrpca), moguće zbog ponovnog otapanja tkiva jetre ili zbog raspada RNA prilikom procesa agarozne elektroforeze. Kako bi se odgovorilo na navedena pitanja i potvrdio raspad RNA crijeva, sva četiri uzorka prevode se dalje u cDNA, te će se provjeriti pomoću ekspresije HKG -a pomoću qPCR metode.

Završetkom izolacija RNA iz tkiva triju mužjaka i ženki miševa različitim metodama vidljive su sličnosti u uspješnosti izolacija. Kod otopina RNA izoliranih iz većine tkiva dobivene koncentracije dovoljno su visoke za daljnji postupak reverzne transkripcije. Izuzev ovoga, vrijednosti omjera apsorbancija pri različitim valnim duljinama ukazuju na visoku čistoću otopina, uz par iznimaka, kao što su otopine RNA izolirane iz tkiva bubrega mužjaka miševa i otopine RNA izolirane iz crijeva. Agarozna gel elektroforeza koristila se za dobivanje informacija o DNA kontaminacijama i razini degradacije izolirane RNA. Gelovi se međusobno poprilično razlikuju ovisno o korištenim metodama te je na nekim prisutna degradacija izolirane RNA uslijed djelovanja RNaza. Idealno bi bilo da su intenziteti gornje (28S rRNA) i donje (18S rRNA) za RNA karakteristične vrpce u omjeru dva naprema jedan, odnosno da je gornja vrpca dvostruko intenzivnija od donje. Budući da su intenziteti vrpca dodatni pokazatelj koncentracije pojedine vrste RNA, takav omjer intenziteta ukazuje na očuvane rRNA molekule slabe degradacije. Osim karakterističnih vrpca moguće je vidjeti druge vrpce koje ukazuju na potencijalne kontaminacije. Moguće kontaminacije DNA očitovat će se u postojanju vrpca na položajima iznad karakterističnih RNA vrpca od otprilike nekoliko tisuća nukleotida te će se nalaziti na samom vrhu DNA gela (gDNA). Uz postojanje vrpca moguće su kontaminacije koje

se očituju u postojanju takozvanih razmaza. Osim kontaminacija, može uočiti i degradacija izolirane RNA. To se najčešće događa zbog spore izolacije i djelovanja RNaza. Degradacije RNA očituju se u postojanju razmaza između dvije karakteristične vrpce što ukazuje na raspad 28S rRNA, dok se raspad 18S rRNA očituje u razmazu ispod donje vrpce.

Iako se kvalitete izoliranih RNA međusobno razlikuju, kod skoro svih otopina RNA vidljive su dvije karakteristične vrpce što je dobar pokazatelj uspješne izolacije i slabe degradacije RNA. Suprotno tome, otopine RNA izolirane iz crijeva svih mužjaka i ženki miševa ne pokazuju karakteristične vrpce. Takvi izgledi gelova sugeriraju da je veća razina raspada RNA izoliranih iz crijeva nego RNA izoliranih iz ostalih tkiva miševa, što je najvjerojatnije zbog postupka izolacije tkiva crijeva koji će se popraviti/ubrzati u budućim izolacijama. Također, zaključuje se da je *Monarch Total RNA Miniprep Kit* metoda superiorna ostalima zbog tretmana proteinazom K, dvostrukog pročišćavanja gDNA te vjerojatno bolje izvedenih RNA kolona i postupka pročišćavanja na koloni. Izolacija pomoću kolona i TRIzol metode koristeći *Direct-zol RNA Miniprep Plus* protokolu i komercijalni komplet najmanje učinkovita

## 4.2. Provjera dizajniranih početnica lančanom reakcijom polimerazom

Početnice su dizajnirane za *TDP1* i *TDP2* gen te za 18S rRNA gen koji je služio kao takozvani referentni gen (engl. *Housekeeping gene*) u procesu relativne kvantifikacije qPCR reakcijom tako da daju PCR amplikon od 90-110 parova baza. Prvi korak provjere početnica uključivao je Taq-PCR i gel-elektroforezu kako bi se odredila specifičnost početnica (da daju jednu vrpcu očekivane veličine) te izostanak njihove dimerizacije.

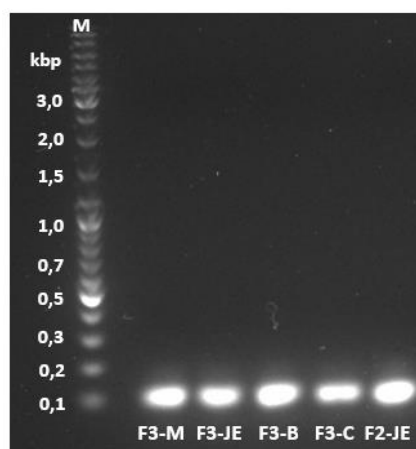
U procesu Taq-PCR reakcije kao kalup je korišteno 10 ng otopine cDNA (masene koncentracije 50 ng /  $\mu$ L) dobivene izolacijom RNA iz pojedinih tkiva, a uvjeti pri kojima je proveden PCR navedeni su u metodama. Prilikom PCR reakcija temperatura sparivanja prilagođavala se ovisno o korištenim početnicama jer početnice imaju različitu temperaturu mekšanja. Nakon provedene PCR reakcije produkti su provjeravani agaroznom gel elektroforezom na 1,8 % gelu ( $w / V = 1,8 \%$ ) te je na gel nanoseno 5  $\mu$ L PCR smjese zajedno s bojom u omjeru jedan naprema šest. Gel elektroforeza provođena je 30 min pri 90 V na sobnoj temperaturi. Kao marker veličina koristio se GeneRuler DNA Ladder Mix koji je na gelovima označen slovom M, dok su uzorci označeni dosadašnjim kraticama. Gelovi su potom vizualizirani koristeći *ChemiDoc XRS+ System (BioRad)* uređaj.



Tablica 4.2.1. Početnice korištene za umnažanje segmenta 18S rRNA, *TDP1* i *TDP2* gena PCR reakcijom uz navedene temperature mekšanja i očekivane veličine PCR amplikona.

Početnica	Nuklotidni slijed (5'-3')	Veličina PCR amplikona	Temperatura mekšanja / °C
18S_rRNA_F	GATGGTAGTCGCCGTGCCTA	100	62
18S_rRNA_R	CCTGCTGCCTTCCTTGGA	100	60
Tdp1_F	TTGGAACACACCACACGAAA	110	57
Tdp1_R	GGGTTTTCTGGTGCCAGTCT	110	60
Tdp2_F	CGACTGGCAGACGCAGAAAG	100	61
Tdp2_R	CTCGGACTTGAAGGACGTGG	100	62

Taq PCR provođen je koristeći početnice specifične za 18S rRNA čiji su nukleotidni slijed, temperatura mekšanja i očekivana veličina PCR amplikona prikazani u Tablici 4.2.1. Kao temperatura sparivanja početnica koristila se temperatura 5° C niža od temperature mekšanja jedne od početnica (55° C). Izgled gela prikazan je na Slici 4.2.1.

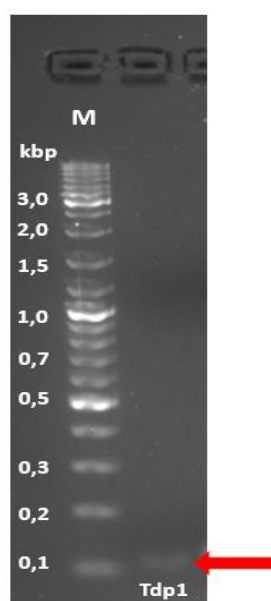


Slika 4.2.1. Agarozna gel elektroforeza PCR reakcijske smjese koristeći početnice za 18S rRNA. Oznake: M – DNA marker (*GeneRuler DNA Ladder Mix*), F2 – druga ženka, F3 – treća ženka JE – jetra, C – crijevo, B – bubreg, M--mozak. U agaroznoj gel elektroforezi korišteni su 1,8% gelovi.

Na slici je označeno iz kojih tkiva su izolirane cDNA. Vidljivo je da za sve uzorke postoji jedna vrpca na veličinama od oko 100 baznih parova što upućuje na pravilni PCR amplikon. Može se zaključiti da su dizajnirane početnice dovoljno kvalitetne i specifične te da je postupak reverzne transkripcije bio uspješan. Intenziteti dobivenih vrpca sugeriraju velike količine PCR amplikona te je međusobnom usporedbom vrpce vidljivo da su intenziteti različitih uzoraka

približno jednaki. Takvi rezultati očekivani su za endogenu kontrolu budući da je 18S rRNA visoko i uniformno eksprimirana kroz različita tkiva. PCR reakcija provedena je zatim koristeći početnice koje se specifično vežu za *TDPI* gen.

Reakcija se provodila na uzorcima cDNA koja je dobivena reverznom transkripcijom RNA izolirane iz tkiva jetre druge ženke miša. Kao temperatura sparivanja početnica koristila se temperatura 5 °C manja od temperature niže temperature mekšanja jedne od početnica (52°C).



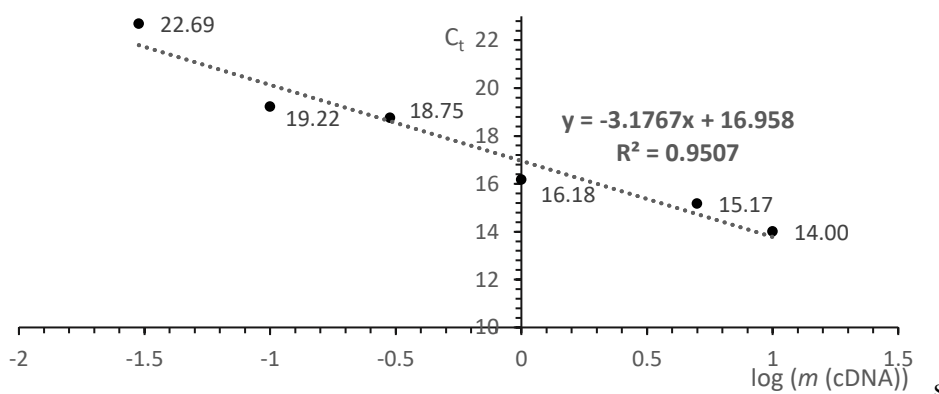
Slika 4.2.2. Agarozna gel elektroforeza PCR reakcijske smjese koristeći početnice za *TDPI*. M – DNA marker (*GeneRuler DNA Ladder Mix*). U agaroznoj gel elektroforezi korišteni su 1,8% gelovi.

Na slici 4.2.2. vidljiva je jedna vrpca na veličini od otprilike 100 parova baza što odgovara očekivanoj veličini *TDPI* specifičnog amplikona. Vrpu je slabijeg intenziteta što upućuje na nisku ekspresiju *TDPI* gena u korištenom tkivu. Slabiji intenziteti vrpci mogu se objasniti i nižom efikasnošću PCR reakcije, što će se dalje ispitati pomoću qPCR metode. PCR reakcija provedena je koristeći početnice specifične vežu za *TDP2* gen te je također dobivena jedna vrpca slabijeg intenziteta na veličini od otprilike 100 parova baza iz čega se zaključilo da su dizajnirane početnice kvalitetne i specifične za *TDP2* gen.

### 4.3. Određivanje efikasnosti početnica kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom

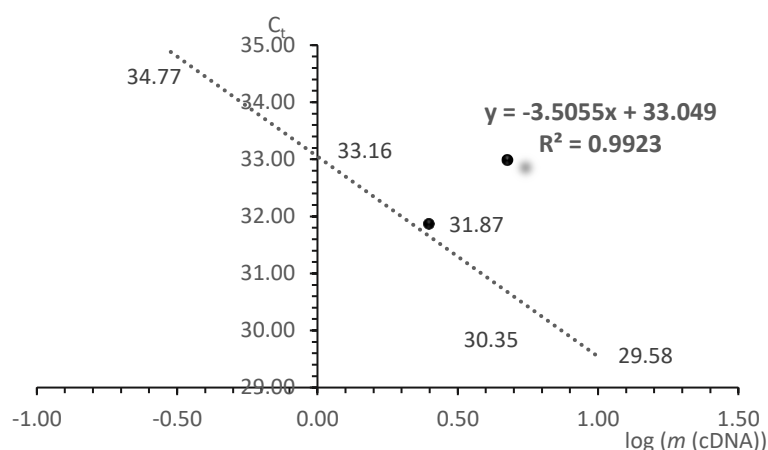
Nakon uspješno provedenih Taq-PCR reakcija slijedi ispitivanje učinkovitosti početnica za qPCR reakcije, odnosno efikasnosti amplifikacije u svrhu određivanja relativne razine genske ekspresije. Shodno tome provjeravala se efikasnost početnica dizajniranih za *TDPI* i *TDP2* gene, kao i za referentni gen 18S rRNA. Otopine cDNA poznate koncentracije serijski su razrjeđivane te je priređena reakcijska smjesa koja čine početnice, ultra čista voda, SYBR Green reagens te cDNA točno određene količine koja će se razlikovati među priređenim otopinama. Priređivani su tehnički triplicati otopine cDNA te su analizirane dobivene  $C_t$  vrijednosti i napravljen je graf ovisnosti  $C_t$  vrijednosti o logaritmu početne mase dodane cDNA. Vrijednosti nagiba pravca korišteni su u izračunu efikasnosti i faktora amplifikacije qPCR reakcije uvrštavanjem vrijednosti u formule (1) i (2) prikazane u potpoglavlju 3.2.7. Metoda.

Efikasnost qPCR reakcije određivana je korištenjem početnica specifičnih za 18S rRNA. Koristila se cDNA dobivena reverznom transkripcijom RNA izolirane iz tkiva bubrega druge ženke miša. Određena je jednadžba pravca te kvadrat koeficijenta korelacije ( $R^2$ ). Izgled grafa i pripadajuća jednadžbu pravca prikazani su na Slici 4.3.1. koji su korišteni za izračun efikasnosti i faktora amplifikacije. Efikasnost 18S rRNA početnica iznosi 106 % što je u željenom rasponu od 90 do 110%. Faktor amplifikacije iznosi 2,06 što je skoro idealno i govori da iz svake molekule cDNA u jednom ciklusu nastaju dvije molekule. Kvadrat koeficijenta korelacije pokazuje vrijednost od 0,95 što je na nižem rubu optimalnog raspona (0,95 - 1), ali je prihvatljiva za izračun jednadžbe pravca.<sup>151</sup> Dizajnirane početnice pokazale su se zadovoljavajućima te će se koristiti u daljnjim qPCR reakcijama za određivanje ekspresije 18S rRNA kao endogene kontrole (Slika 4.3.1).



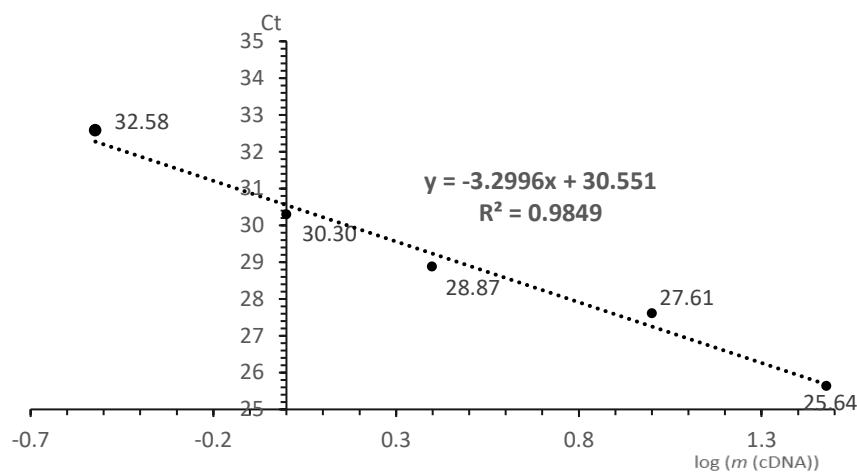
Slika 4.3.1. Provjera efikasnosti 18S rRNA početnica pomoću grafa ovisnosti  $C_t$  vrijednosti o logaritmu mase cDNA u qPCR reakcijama amplifikacije sa početnicama za 18S rRNA gen.

Određivanje efikasnosti amplifikacije qPCR reakcije provedeno je koristeći početnice specifične za *TDPI* gen. Koristila se cDNA dobivena reverznom transkripcijom RNA izolirane iz tkiva mozga treće ženke miša. Određena je jednažba pravca te  $R^2$  vrijednost. Izgled grafa i pripadajuća jednažba pravca prikazane su na Slici 4.3.2. Vrijednost nagiba pravca korištena je za izračun efikasnosti i faktora amplifikacije. Efikasnost ispitivanih početnica iznosila je 117 %, što je malo iznad optimalnog intervala od 90% do 110 % dok je faktor amplifikacije iznosio 2,16 te je također iznad optimalne vrijednosti.  $R^2$  iznosi 0,99 što se nalazi u optimalnom rasponu vrijednosti te sugerira efikasno dizajnirane početnice i učinkovitu amplifikaciju cDNA različitih početnih koncentracija.<sup>129,151</sup> Iako su vrijednosti efikasnosti i faktora amplifikacije bile nešto više, zbog izrazito dobre  $R^2$  vrijednosti odlučeno je da će početnice biti korištene u kvantifikaciji ekspresije *TDPI* gena.



Slika 4.3.2. Graf ovisnosti  $C_t$  vrijednosti o logaritmu mase dodane cDNA. U pokusu se korištene početnice specifične za *TDPI* gen.

Uz 18S rRNA i *TDPI* određena je efikasnost dizajniranih početnica za *TDP2* gen. Koristila se cDNA dobivena reverznom transkripcijom RNA izolirane iz tkiva mozga treće ženke miša. Određena je jednažba pravca te  $R^2$  vrijednost. Izgled grafa i pripadajuća jednažba pravca prikazani su na Slici 4.3.3. Vrijednosti efikasnosti i faktora amplifikacije nalaze se u optimalnom rasponu što sugerira uspješan dizajn *TDP2* početnica i zadovoljavajuću efikasnost qPCR reakcije. Efikasnost iznosi 100 % dok je vrijednost faktora amplifikacije 1,97. Kvadrat koeficijenta korelacije pravca iznosi 0,98 što je u intervalu optimalne vrijednosti.



Slika 4.3.3. Graf ovisnosti  $C_t$  vrijednosti o logaritmu mase dodane cDNA dobiven koristeći početnice specifične za *TDP2* gen.

Analizirajući vrijednosti efikasnosti i faktora amplifikacije utvrđeno je da su dizajnirane početnice za sva tri gena dovoljno dobre te će se koristiti u daljnjoj kvantifikaciji genske ekspresije *TDPI* i *TDP2* gena u mišjim tkivima. Ključno je da su efikasnosti sva tri para dizajniranih početnica slične (efikasnost 18S rRNA početnica iznosi 2,06, *TDPI* početnica 2,17, a *TDP2* početnica 1,97) što predstavlja nužan preduvjet za točnu relativnu kvantifikaciju genske ekspresije.<sup>129,151</sup>

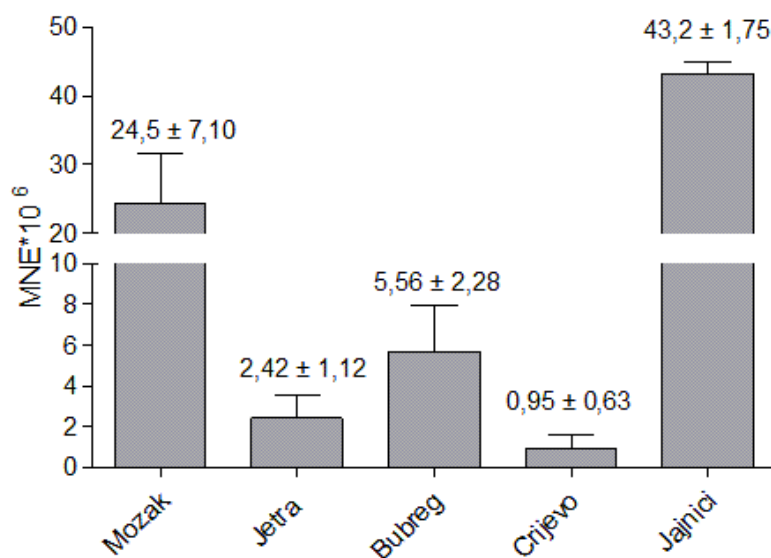
#### 4.4. Kvantifikacija ekspresije *TDPI* i *TDP2* gena u tkivima miševa

##### 4.4.1. Kvantifikacija genske ekspresije *TDPI* kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom

Za analizu su uzete  $C_t$  vrijednosti s postotkom devijacije manjim od 2%. Ekspresija *TDPI* gena nije određena u tkivu crijeva i jajnika treće ženke zbog raspada RNA. Za određivanje ekspresije *TDPI* gena korišteni su biološki triplikati (tri jedinke), osim za kvantifikaciju ekspresije u tkivima crijeva i jajnika gdje su za izračun MNE vrijednosti korišteni podaci ekspresije *TDPI* gena u tkivima dviju jedinki ženki miševa. Za kvantifikaciju ekspresije gena u tkivima iste jedinke rađeni su tehnički triplikati.

*TDPI* gen je najjače eksprimiran u tkivima jajnika ( $MNE \times 10^6 = 43,2 \pm 1,75$ ). Ekspresija *TDPI* gena mozgu otprilike je dvostruko manja nego u jajnicima te je viša od ekspresije u ostalim tkivima ženki miševa (Slika 4.4.1.). U ostalim tkivima *TDPI* je slabije eksprimiran, posebice u tkivima crijeva gdje je ekspresija najniža. U usporedbi s jajnicima

*TDPI* je oko 45 puta slabije eksprimiran u uzorcima crijeva te oko 18 puta slabije eksprimiran u tkivima jetre. Nakon jajnika i mozga *TDPI* gen najjače je eksprimiran u bubregu. U kontekstu relativnih razina ekspresije prema definiranim pragovima ekspresije, ekspresija *TDPI* gena je niska u crijevu, bubregu i jetri i srednja u mozgu i jajnicima ženke miša (Tablica 4.4.1.)

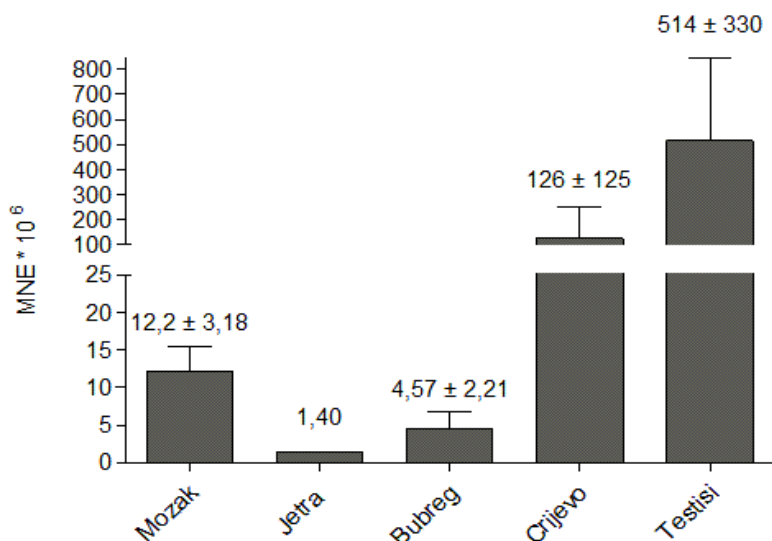


Slika 4.4.1. Ekspresija *TDPI* gena (na razini mRNA) u tkivima ženke miša prikazana MNE vrijednostima. Iznad stupaca navedene su MNE vrijednosti sa standardnom pogreškom aritmetičke sredine bioloških triplikata.

Na isti se način provjeravala razina ekspresije *TDPI* gena u tkivima mužjaka miševa. Ponovno su korišteni biološki triplikati za sve osim za uzorke crijeva trećeg mužjaka i uzorke jetre prvog i drugog mužjaka gdje je došlo do RNA raspada. U daljnju analizu uzete su srednje  $C_t$  vrijednosti s postotkom standardne devijacije manjim od 1%. Pomoću  $C_t$  vrijednosti izračunate su MNE vrijednosti. Za kvantifikaciju ekspresije gena u tkivima iste jedinice rađeni su tehnički triplikati.

*TDPI* gen najjače je eksprimiran u tkivima testisa ( $MNE \times 10^6 = 514 \pm 330$ ). Nakon testisa najveća ekspresija *TDPI* gena je u crijevima koja je otprilike 4 puta manja nego ekspresija u testisima. Najniža je ekspresija u tkivu jetre gdje je *TDPI* gen otprilike 370 puta slabije eksprimiran nego u testisima ( $MNE \times 10^6 = 1,40$ ). U tkivima mozga i bubrega ekspresija je također niska. Vidljivo je da je u mozgu *TDPI* oko 42 puta slabije eksprimiran nego što je u tkivima testisa ( $MNE \times 10^6 = 12,2 \pm 3,18$ ) dok je u tkivima bubrega 112 puta slabije eksprimiran (Slika 4.4.2.). *TDPI* je manje od tri puta slabije eksprimiran u tkivima bubrega nego što je u mozgu, dok je u jetri otprilike devet puta slabije eksprimiran nego u tkivima mozga (Slika

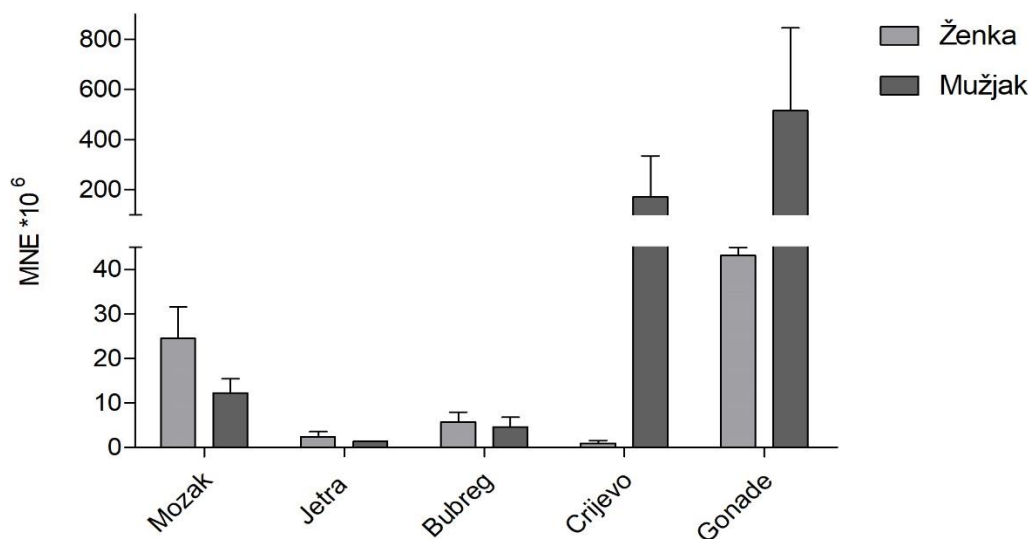
4.4.2.). Uspoređujući s definiranim razinama ekspresije, *TDPI* gen je u testisima eksprimiran u visokim razinama, u crijevima u srednje visokim razinama, dok je tkivima mozga u srednjim razinama. U tkivima jetre i bubrega ekspresija *TDPI* gena je niska.



Slika 4.4.2. Ekspresija *TDPI* gena (na razini mRNA) u tkivima mužjaka miševa prikazana MNE vrijednostima. Iznad stupaca navedene su MNE vrijednosti sa standardnom pogreškom aritmetičke sredine bioloških triplikata.

Ekspresija *TDPI* gena uspoređena je između tkiva mužjaka i ženki miševa (Slika 4.4.3). *TDPI* je najviše eksprimiran u testisima. Uspoređujući ekspresiju u tkivima testisima s ekspresijom u tkivima jajnika dolazi se do zaključka da je *TDPI* gen različito eksprimiran u muškim i ženskim spolnim organima. *TDPI* je visoko eksprimiran u testisima i to 12 puta ( $MNE \times 10^6 = 514 \pm 330$ ) više nego u jajnicima gdje je razina ekspresije srednja ( $MNE \times 10^6 = 43,2 \pm 1,75$ ). Osim u spolnim tkivima, velika razlika u ekspresiji prisutna je u tkivima crijeva. Kod mužjaka *TDPI* je eksprimiran srednje visoko ( $MNE \times 10^6 = 126 \pm 125$ ), dok je kod ženki prisutna niska ekspresija ( $MNE \times 10^6 = 0,95 \pm 0,63$ ). U crijevima ženki miša *TDPI* gen je otprilike 130 puta slabije eksprimiran nego što je u mužjaka što je ujedno i najveća razlika u ekspresiji između istih vrsta tkiva. U bubrežima i jetri mužjaka i ženki ekspresije su otprilike jednake, dok je u *TDPI* u mozgu ženki miševa dvostruko jače eksprimiran ( $MNE \times 10^6 = 24,5 \pm 7,10$ ) nego što je kod mužjaka miševa ( $MNE \times 10^6 = 12,2 \pm 3,18$ ). I kod mužjaka i kod ženki u jetri i bubregu *TDPI* gen nisko je eksprimiran, dok je u mozgu razina ekspresije srednja u oba spola (Slika 4.4.1. i 4.4.2). Može se zaključiti da je ekspresija *TDPI* gena u tkivima mužjaka i ženki miševa relativno slična. *TDPI* gen najviše je eksprimiran u spolnim organima (testisi i jajnici), dok je

u ostalim tkivima ekspresija niža, posebice u jetri, bubrezima i mozgu (Slika 4.4.3.). Crijeva su jedina tkiva gdje se uočava značajna razlika u ekspresiji *TDP1* gena ovisno o spolu jedinki.



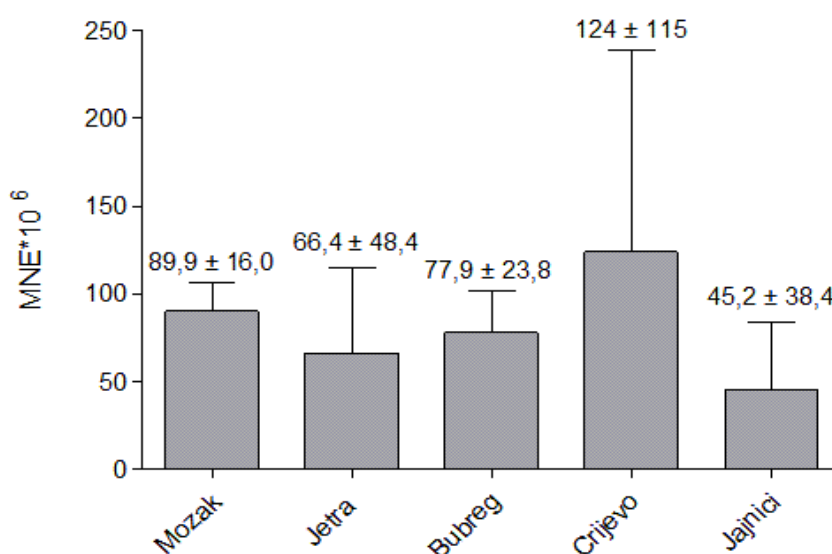
Slika 4.4.3. Usporedba ekspresije *TDP1* gena (na razini mRNA) u tkivima mužjaka i ženki miševa prikazana MNE vrijednostima.

#### 4.4.2. Kvantifikacija *TDP2* genske ekspresije kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom

Nakon određivanja ekspresije *TDP1* gena, PCR metodom određivana je ekspresija *TDP2* gena. Tijekom analiza rezultata niti jedan od uzoraka nije imao postotak devijacije veći od 2% kod jedinki ženki miševa, odnosno 1,5% kod mužjaka miševa. Kao i kod analize razine ekspresije *TDP1* gena, u određivanje MNE vrijednosti nisu uzeti uzorci crijeva i jajnika treće ženke zbog raspada RNA. Kod mužjaka miševa nisu uzeti uzorci jetre prvog i drugog mužjaka. U postupku kvantifikacije korišteni su biološki triplikati.

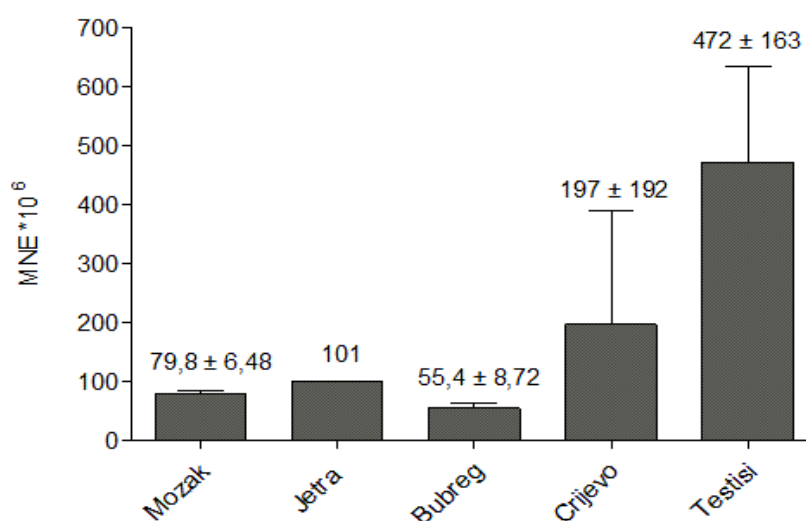
Od svih tkiva *TDP2* gen najjače je eksprimiran u crijevima ( $MNE \times 10^6 = 124 \pm 115$ ), dok je najslabija ekspresija *TDP2* gena u jajnicima ( $MNE \times 10^6 = 45,2 \pm 38,4$ ). Ekspresija *TDP2* gena u jajnicima je otprilike tri puta manja nego što je u crijevima (Slika 4.4.4.). U tkivima mozga, bubrega i jetre ekspresija je slična te se niti jedno tkivo značajno ne razlikuje od drugih po razini ekspresije *TDP2* gena. Može se zaključiti da nema velikih razlika u *TDP2* genskoj ekspresiji između različitih tkiva, odnosno da je *TDP2* gen u tkivima jedinki ženki miša relativno uniformno eksprimiran (Slika 4.4.4.). *TDP2* gen eksprimiran je u tkivima mozga, jetre, crijeva i bubrega u srednje visokim razinama, dok je u jajnicima eksprimiran u srednjim razinama (Tablica 4.4.1.).





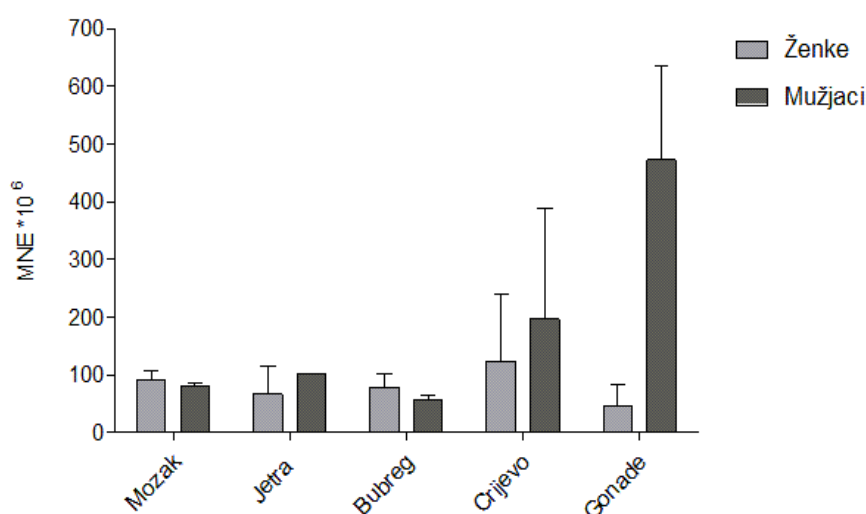
Slika 4.4.4. Ekspresija *TDP2* gena (na razini mRNA) u tkivima ženka miševa prikazana MNE vrijednostima. Iznad stupaca navedene su MNE vrijednosti sa standardnom pogreškom aritmetičke sredine bioloških triplikata.

U tkivima mužjaka *TDP2* gen najjače je eksprimiran u testisima ( $MNE \times 10^6 = 472 \pm 163$ ). Ekspresija *TDP2* gena u tkivima crijeva otprilike dvostruko manja nego što je u testisima ( $MNE \times 10^6 = 197 \pm 192$ ). *TDP2* gen najslabije je eksprimiran je u bubrezima ( $MNE \times 10^6 = 55,4 \pm 8,72$ ), gdje je *TDP2* skoro devet puta slabije eksprimiran nego što je u tkivima testisa (Slika 4.4.5.). Omjeri ekspresija *TDP2* gena u tkivima mozga, jetre i bubrega relativno su slični te niti jedno tkivo bitno ne odstupa od drugih po razini ekspresije *TDP2* gena. *TDP2* gen je u tkivima mozga i jetre šest, odnosno pet puta slabije eksprimiran nego što je u testisima (Slika 4.4.5.). Zaključuje se da je *TDP1* jače eksprimiran u tkivima testisa nego u ostalim tkivima te da su najveće razlike između ekspresije u testisima i ekspresije u ostalim tkivima. Što se tiče apsolutnih razina ekspresija *TDP2* gena među tkivima mužjaka vidljivo je da je *TDP2* gen eksprimiran u visokim razinama u testisima, dok je u tkivima bubrega *TDP2* gen eksprimiran u srednjim razinama. U ostalim tkivima (tkiva jetre, mozga i crijeva) ekspresija *TDP2* gena srednje je visoka (Tablica 4.4.1. i Tablica 4.4.3.)



Slika 4.4.5. Ekspresija *TDP2* gena (na razini mRNA) u tkivima mužjaka miševa prikazana MNE vrijednostima. Iznad stupaca navedene su MNE vrijednosti sa standardnom pogreškom aritmetičke sredine bioloških triplikata.

Razlika u apsolutnoj ekspresiji najveća među spolnim organima. U testisima *TDP2* visoko je ekspimiran ( $\text{MNE} \times 10^6 = 472 \pm 163$ ), dok je u jajnicima *TDP2* ekspimiran u srednjim razinama ( $\text{MNE} \times 10^6 = 45,2 \pm 38,4$ ). *TDP2* gen otprilike jedanaest puta jače ekspimiran u testisima nego što je u jajnicima (Slika 4.4.6.). Nakon spolnih stanica *TDP2* najviše je ekspimiran u tkivima crijeva. Iako je ekspresija *TDP2* gena malo veća u tkivima crijeva mužjaka ( $\text{MNE} \times 10^6 = 197 \pm 192$ ) uočava se da je slična razina ekspresije *TDP2* gena u muškim i ženskim crijevima. Kao i kod crijeva, ekspresije se slične i u tkivima mozga, jetre i bubrega te se može zaključiti da su u tim tkivima male razlike u ekspresiji, odnosno da razina ekspresije u tim tkivima ne ovisi u tolikoj mjeri o spolu jedinki (Slika 4.4.6.). U tkivima mozga i jetre i bubrega mužjaka i ženki miševa *TDP2* gen ekspimiran je u srednjim razinama, a u crijevima je u srednje visokim razinama. Analizirajući podatke vidi se da je jedina veća razlika u ekspresiji *TDP2* gena ekspresija u spolnim organima.

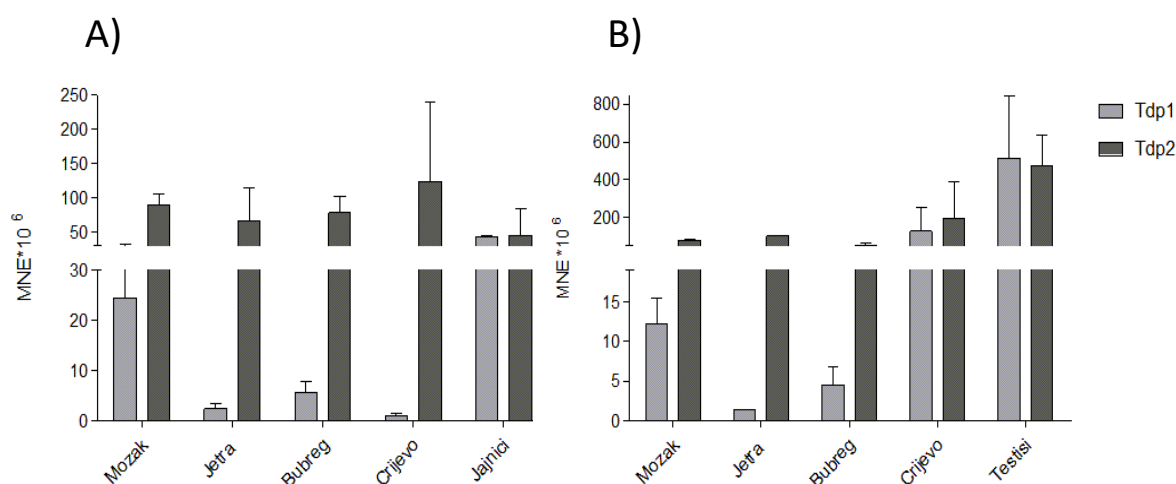


Slika 4.4.6. Usporedba ekspresije *TDP2* gena (na razini mRNA) u tkivima mužjaka i ženki miševa prikazana MNE vrijednostima.

#### 4.4.3. Usporedba ekspresije *TDP1* i *TDP2* gena u tkivima miša

Nakon određivanja razina ekspresije *TDP1* i *TDP2* gena uspoređivana je ekspresija tih dvaju gena u tkivima mužjaka i ženki miševa. Kod ženki miša, *TDP2* je značajno više eksprimiran u jetri (sedamdeset puta) i crijevu ženke (sto puta) u usporedbi sa *TDP1* ekspresijom. U bubrezima eksprimiran je deset puta više, a četiri više u mozgu. Ekspresija *TDP2* gena jednaka je *TDP1* genu u jajnicima (Slika 4.4.7.) gdje su, u kontekstu relativnih ekspresijskih razina, oba gena srednje eksprimirana (MNE vrijednosti između  $12 \times 10^6$  -  $65 \times 10^6$  - Tablica 4.4.1.).

Nakon usporedbe ekspresije *TDP1* i *TDP2* gena u tkivima ženki miševa analizirana je ekspresija istih u tkivima mužjaka (Slika 4.4.7.b). *TDP1* i *TDP2* približno su jednako eksprimirani u crijevu i testisu mužjaka, dok je *TDP2* više eksprimiran u mozgu (šest puta više), bubregu (deset puta više) i jetri (sedamdeset puta više) (Slika 4.4.8.) gdje pokazuje srednje visoku razinu ekspresije (Tablica 4.4.1). Naprotiv, *TDP1* u mozgu, bubregu i jetri mužjaka pokazuje nisku do srednju razinu ekspresije (niska ekspresija u bubregu i jetri, a srednja u mozgu). Također u kontekstu relativne ekspresije s obzirom na zadane ekspresijske pragove, oba gena su visoko eksprimirana u testisima te srednje visoko u crijevima (Tablica 4.4.1.).



Slika 4.4.8. Usporedba ekspresije *TDP1* i *TDP2* gena (na razini mRNA) u tkivima ženki (A) i mužjaka (B) miševa prikazana MNE vrijednostima.

#### 4.4.4. Određivanje razine ekspresije *TDP1* i *TDP2* gena

Razina ekspresija gena u tkivima određena je prema slijedećoj podjeli MNE vrijednosti <sup>138</sup>:

- Niska ekspresija** kada je  $MNE < 11 \times 10^6$
- Srednja ekspresija** kada je  $MNE = 12 \times 10^6 - 65 \times 10^6$
- Srednje visoka ekspresija** kada je  $MNE = 66 \times 10^6 - 255 \times 10^6$
- Visoka ekspresija** kada je  $MNE = 256 \times 10^6 - 3150 \times 10^6$
- Vrlo visoka ekspresija** kada je  $MNE > 3151 \times 10^6$

Tablica 4.4.1. Razine ekspresije *TDP1* i *TDP2* gena u tkivima ženka i mužjaka miša. Oznake: F1 - prva ženka, F2 - druga ženka, F3 - treća ženka, M1 - prvi mužjak, M2 - drugi mužjak, M3 - treći mužjak, **N** – niska razina ekspresije, **S** – srednja razina ekspresije, **SV** – srednje visoka razina ekspresije, **V** – visoka razina ekspresije, **VV** – vrlo visoka razina ekspresije, nije određeno – NO.

Tkivo	<i>TDP1</i>						<i>TDP2</i>					
	F1	F2	F3	M1	M2	M3	F1	F2	F3	M1	M2	M3
<b>Mozak</b>	S	S	S	S	N	S	SV	SV	S	SV	SV	SV
<b>Jetra</b>	N	N	N	NO	NO	N	N	SV	S	NO	NO	SV
<b>Bubrež</b>	N	N	N	N	N	N	S	SV	SV	SV	S	S
<b>Crijevo</b>	N	N	NO	N	SV	NO	N	SV	NO	N	N	V
<b>Gonade</b>	S	S	NO	V	V	SV	N	SV	NO	V	V	V

Ekspresija *TDP1* i *TDP2* gena često se razlikuje među tkivima te je iz ekspresijskih profila ponekad moguće doći do zaključaka o funkciji i razlikama u funkciji istraživanih gena. Pokazano je da je genska ekspresija regulirana cijelim nizom transkripcijskih faktora i različitih proteina, često specifičnih za proučavano tkivo.<sup>168</sup> Individualne razlike u ekspresiji *TDP1* i *TDP2* gena variraju ovisno o vrsti tkiva bioloških tripplikata. U većini vrsta tkiva razlike između najniže i najviše ekspresije gena manje su od deset puta. Razlike ekspresija u jetri ženki su za *TDP1* dvadeset, a za *TDP2* gen oko pedeset puta, dok su razlike u tkivima crijeva više od dvjesto puta što je ujedno i najveća razlika među istim vrstama tkiva. Individualna varijacija u genskoj ekspresiji poznata je pojava koja je zabilježena kod nižih<sup>144</sup> i viših eukariota pa tako i kod miševa<sup>146,147</sup> i čovjeka.<sup>145</sup> Postoji cijeli niz čimbenika koji pridonose razlikama u genskoj ekspresiji unutar iste vrste, kao što su genetsko nasljeđe, dob, spol, različiti upalni procesi, režimi hranjenja jedinki, procesi hormonske regulacije i ostali čimbenici.<sup>142, 140</sup> Također je zabilježeno je da se genska ekspresija genetički izrazito sličnih miševa istog soja koji su odrasli u istim uvjetima može uvelike razlikovati.<sup>146</sup> S obzirom na sve navedeno, individualna razlika u ekspresiji *TDP1* i *TDP2* gena kod miša nije neuobičajena.

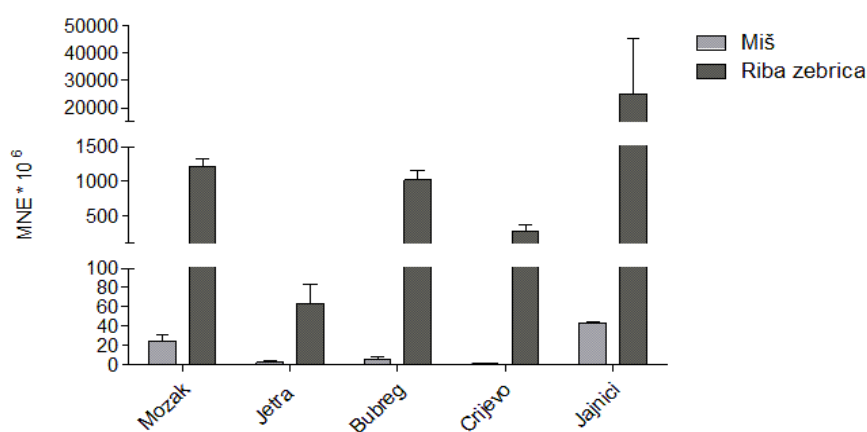
#### 4.4.5. Usporedba kvantifikacije *TDP1* genske ekspresije jedinki miša sa kvantifikacijom *TDP1* gena u zebrici

Ekspresija *TDP1* gena u mišjim tkivima uspoređivala se s ekspresijom *TDP1* gena u tkivima ribe zebrice. Razina ekspresije *TDP1* gena zebrice, kao i kod mišjih tkiva, određena je pomoću qPCR metode relativnom kvantifikacijom (Q-gene metoda) od strane mag. educ. biol. et chem Ivana Antičevića. Radi lakšeg međusobnog uspoređivanja ekspresija *TDP1* gena u tkivima miševa i riba zebrica, razine ekspresije *TDP1* gena po tkivima prikazane su u Tablici 4.4.2.

Tablica 4.4.2. Razine ekspresije *TDP1* gena u tkivima miševa i riba zebrica. Oznake: **N** – niska razina ekspresije, **S** – srednja razina ekspresije, **SV** – srednje visoka razina ekspresije, **V** – visoka razina ekspresije, **VV** – vrlo visoka razina ekspresije.

Tkivo	Miš		Riba zebrica	
	Ženke	Mužjaci	Ženke	Mužjaci
Mozak	S	S	V	V
Jetra	N	N	S	SV
Bubreg	N	N	V	V
Crijevo	N	SV	V	SV
Gonade	S	V	VV	VV

*TDPI* je generalno više eksprimiran u tkivima zebrice u usporedbi sa mišem (Slika 4.4.9.). U tkivima ženke zebrice, *TDPI* je jako visoko eksprimiran u jajnicima, visoko u crijevu, bubregu i mozgu te srednje visoko u jetri. Za razliku od navedenoga, kod ženke miša *TDPI* je srednje visoko eksprimiran u jajnicima i mozgu, te nisko eksprimiran u jetri, crijevu i bubregu ženke (Tablica 4.4.1.). Uspoređujući omjere MNE vrijednosti među tkivima ženki miša i zebrice vidljivo je da nema značajnih sličnosti između riba zebrica i miševa. Veće su razlike među ekspresijama u tkivima riba zebrica nego što u tkivima miševa. *TDPI* gen otprilike je dvadeset puta slabije eksprimiran u tkivima mozga i bubrega nego što je u tkivima jajnika, dok je u crijevima oko četiristo puta slabije eksprimiran nego što je u tkivima jajnika. Iako su razine ekspresije (MNE vrijednosti) i omjeri ekspresije *TDPI* gena drugačiji između miša i zebrice, ekspresijski profili su donekle slični: u oba organizma ekspresija *TDPI* gena najviša je u jajnicima i mozgu, dok je ekspresija manja u jetri, crijevu i bubregu.

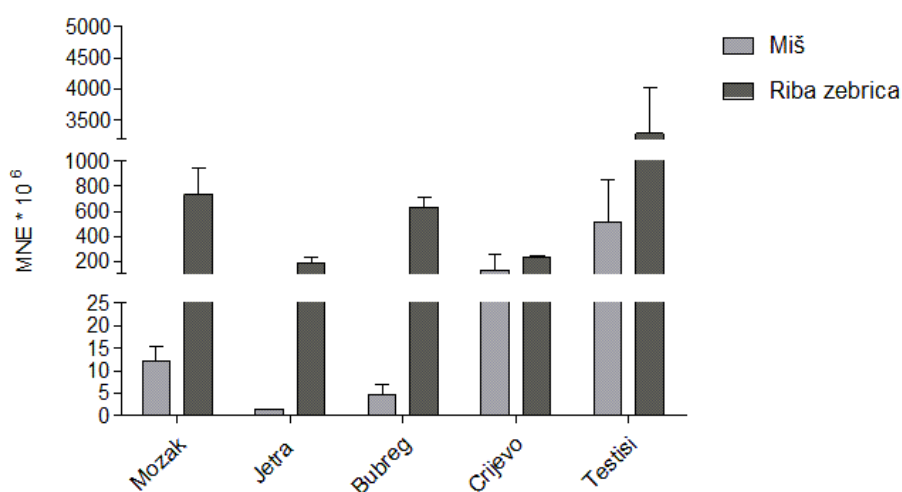


Slika 4.4.9. Grafički prikaz ekspresije *TDPI* gena (na razini mRNA) u tkivima ženki miša i ženki riba zebrica.

Kao i kod ženki, usporedbom ekspresije *TDPI* gena u mužjaka miša i zebrice dolazi se do sličnih zaključaka. U svim tkivima, osim u tkivima crijeva *TDPI* je jače eksprimiran kod mužjaka zebrice u usporedbi sa mužjakom miša (Slika 4.4.10.). Kod mužjaka zebrice, u tkivima mozga i bubrega *TDPI* je visoko eksprimiran, dok je u tkivima jetre i crijeva srednje visoko eksprimiran (Tablica 4.4.1.). Za razliku od navedenoga, kod mužjaka miša je *TDPI* je u tkivima bubrega i jetre nisko eksprimiran, u mozgu srednje eksprimiran, crijevima srednje visoko eksprimiran i u testisima visoko eksprimiran (Slika 4.4.2).

Ekspresija *TDPI* gena je i kod mužjaka miša najveća u spolnim organima ( $MNE \times 10^6 = 514 \pm 330$ ), gdje je razina ekspresije *TDPI* gena visoka. Iako su ukupne razine ekspresije *TDPI*

gena različite među dvama organizmima, relativni ekspresijski profil je sličan utoliko što je kod oba organizma *TDPI* najviše ekspimiran u testisima, pa zatim mozgu, dok je najniže ekspimiran u jetri (Slika 4.4.10.). S obzirom da je *TDPI* puno više ekspimiran u tkivima zebrice u usporedbi sa mišem osim u crijevu, kako bi se potvrdio ovaj rezultat i eliminirala mogućnost da su izmjerene razlike rezultat tehničkih razlika u izvedbi eksperimenata sa zebricama odnosno miševima, analizirati će se i četvrti i peti biološki uzorak za oba organizma.



Slika 4.4.10. Grafički prikaz ekspresije *TDPI* gena (na razini mRNA) u tkivima mužjaka miša i mužjaka riba zebrica.

Osim s ekspresijom u tkivima riba zebrica, ekspresija *TDPI* gena uspoređivana je s ekspresijom u humanim tkivima. Uvid u *TDPI* gensku ekspresiju dobiven je na mrežnim stranicama (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000042088-TDPI/tissue>)<sup>149</sup> koja je rezultat različitih analiza transkriptoma čovjeka. Za utvrđivanje ekspresijskih profila korištena su tri skupa podataka te su utvrđene vrijednosti relativnih razina ekspresija gena u tkivima normalizirane i međusobno kombinirane. Dobivene vrijednosti ekspresije gena, prikazane su kao normalizirana linearna relativna ekspresija (NX) te su izračunate za svaki gen u svakom od vrsta tkiva (Slika 4.4.11.). Budući da su korištene potpuno drugačije metode pripreme uzoraka i određivanja razina ekspresija, dobivene vrijednosti ekspresije ne mogu se mogu izravno uspoređivati s vrijednostima ekspresije u miševima. Također nisu prikazane razlike tkivnim ekspresijama ovisno o spolu i u određivanju ekspresije nisu korišteni biološki triplikati kao što su korišteni kod miševa.<sup>158</sup>



Slika 4.4.11. Grafički prikaz razine ekspresije *TDPI* gena u ljudskim tkivima. Slika preuzeta i obrađena prema ref. 149.

Ekspresije *TDPI* u organizmima čovjeka, riba zebrića i miševa slijede donekle slične ekspresijske profile. Kod čovjeka ekspresija je najveća u testisima pa slijedi mozak, crijevo, jajnici, bubrezi i jetra. Kod mužjaka i ženki zebrića najveća je ekspresija u spolnim organima pa slijedi mozak, bubreg, crijevo i jetra gdje je najniža ekspresija *TDPI* gena. Ekspresija u miševima razlikuje se prema spolu. *TDPI* gen je u tkivima mužjaka najjače ekspimiran u testisima pa slijedi crijevo, mozak, bubreg i jetra, dok je kod ženki miševa najveća ekspresija u jajnicima pa slijedi mozak, bubreg pa jetra a najniža je ekspresija u crijevima. Usporedbom različitih organizama uočljive su sličnosti i razlike u ekspresiji *TDPI* gena po tkivima. U sva tri organizma najveća ekspresija *TDPI* gena zabilježena je u spolnim organima (testisima i jajnicima). U miševima i ljudskim tkivima *TDPI* najviše je ekspimiran u testisima, dok je kod riba zebrića *TDPI* najjače ekspimiran u jajnicima, pa potom testisima. Od ostalih tkiva *TDPI* najjače je ekspimiran u mozgu, iako nije prisutna tolika razlika u ekspresiji u usporedbi s ekspresijom u preostalim tkivima. U svakom od tri organizma zabilježeni su slični ekspresijski profili *TDPI* gena u jetri i bubrezima. U tim su tkivima, uz tkiva crijeva, u prosjeku najniže ekspresije *TDPI* gena. Ekspresija u tkivima crijeva varira od promatranog organizma. U tkivima čovjeka ekspresija *TDPI* u crijevima viša je od ekspresije u tkivima bubrega i jetre, dok je kod riba zebrića niža od ekspresije u bubrezima, ali viša od ekspresije u tkivima jetre. U tkivima miševa ekspresija se razlikuje ovisno o spolu. U mužjacima miševa visoka je razina ekspresije *TDPI* gena u crijevima, dok je kod ženki miševa od svih tkiva najniža tkivima crijeva. Iako se apsolutne razine ekspresije razlikuju među analiziranim organizmima, vidljivo je da su same ekspresije u tkivima bubrega, crijeva i jetre slične. Drugim riječima, *TDPI* gen



nije značajno više ili niže eksprimiran niti u jednom od navedenih tkiva (bubreg, crijevo i jetra) analiziranih organizama.

Iz standardnih pogrešaka u tkivima riba zebrica ponovno se očituje biološka varijacija, odnosno razlike u ekspresiji *TDP1* gena u istim tkivima različitih jedinki riba zebrica. Vidljivo je da su najveće razlike u ekspresiji *TDP1* gena u tkivima spolnih organa. Postojanje značajnih razlika u ekspresiji *TDP1* gena u različitim organizmima nije neočekivano. Pokazano je da su razlike u genskim ekspresijama karakteristične i za ribe zebrice i za čovjeka.<sup>141,145</sup> Može se zaključiti da je u sva tri organizma ekspresija *TDP1* gena u tkivima jetre, crijeva i bubrega međusobno relativno slična te se ne može govoriti da je *TDP1* gen znatno jače eksprimiran u nekom od tih tkiva. U tkivima mozga *TDP1* gena je eksprimiraniji, ali ponovno razlike u ekspresijama nisu značajne. Jedine značajnije razlike među tkivima u ekspresiji *TDP1* gena vidljive su u spolnim organima gdje je ekspresija u miševima i ribama zebrica organizma višestruko veća, dok je u testisima čovjeka otprilike dvostruko veća.

#### 4.4.6. Usporedba *TDP2* genske ekspresije jedinki u organizmima miša sa ekspresijom *TDP2* gena u drugim organizmima

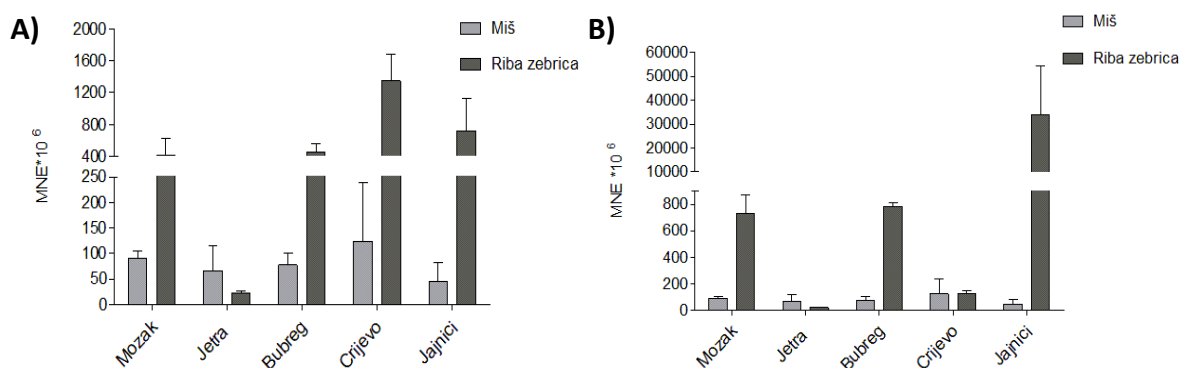
Razine ekspresije *TDP2* gena u tkivima mužjaka i ženki miša uspoređivana je sa razinama ekspresije *TDP2a* i *TDP2b* gena u tkivima ribe zebrice. Razinu ekspresije oba gena odredio je mag. educ. biol. et chem Ivan Antičević te je ista uspoređena sa razinom ekspresije *TDP2* gena u tkivima miša.

Tablica 4.4.3. Razine ekspresije *TDP2* i *TDP2b* gena u tkivima miševa i riba zebrica. Oznake: **N** – niska razina ekspresije, **S** – srednja razina ekspresije, **SV** – srednje visoka razina ekspresije, **V** – visoka razina ekspresije, **VV** – vrlo visoka razina ekspresije.

Tkivo	Miš		Riba zebrica	
	Ženke	Mužjaci	Ženke	Mužjaci
Mozak	SV	SV	V	V
Jetra	SV	SV	S	SV
Bubreg	SV	S	V	V
Crijevo	SV	SV	SV	SV
Gonade	S	V	VV	V

Određene MNE vrijednosti veće su u gotovo svim tkivima ribe zebrice nego što su u tkivima ženki miševa. MNE vrijednosti ukazuju da je *TDP2a* gen u tkivima mozga, bubrega, crijeva i jajnika visoko eksprimiran, dok je u tkivima jetre srednja razina ekspresije. *TDP2* je u tkivima miševa eksprimiran u srednje visokim razinama (Tablica 4.4.1.). Također su veće razlike u omjerima ekspresije u tkivima riba zebrica. *TDP2a* gen u jetri je otprilike 62 puta slabije eksprimiran nego što je u tkivima crijeva, dok je u mozgu i bubregu otprilike 3 puta slabije eksprimiran (Slika 4.4.12.). Iako su veće razine i omjeri ekspresija, uočljive su sličnosti u ekspresijskim profilima dvaju organizama; *TDP2* i *TDP2a* gen najviše su eksprimirani u crijevima, dok su najslabije eksprimirani u jetri gdje je *TDP2a* slično eksprimiran kao i *TDP2* gen. Također su slični omjeri ekspresija oba gena u mozgu i bubregu. Može se zaključiti da, iako su MNE vrijednosti u većini tkiva veće, relativne razine ekspresije dvaju gena među tkivima su slične te je jedino znatnije odstupanje u ekspresiji prisutno u tkivima jetre ženki riba zebrica.

Ekspresija *TDP2b* gena značajnije se razlikuje ovisno o tkivu nego što ekspresija *TDP2a* gena. U tkivima mozga i bubrega ženki zebrica *TDP2b* gen je visoko eksprimiran, dok je u jajnicima najviše eksprimiran (vrlo visoka razina ekspresije,  $MNE \times 10^6 = 33879$ ). Najniža je ekspresija u jetri gdje je *TDP2b* srednje eksprimiran (Tablica 4.4.1.). *TDP2* gen u miša ima različit ekspresijski profil u odnosu na *TDP2b* zebrice: srednje visoko je eksprimiran u mozgu, jetri, crijevu i bubrezima, dok je u jajnicima niže eksprimiran (srednja razina ekspresije). Uspoređujući sa ekspresijom *TDP2* gena, *TDP2b* gen eksprimiran je u jednakim razinama u crijevu i jetri, dok je u tkivima mozga i bubrega 8, odnosno 10 puta jače eksprimiran nego *TDP2* gen. U tkivima mozga i bubrega *TDP2b* gen je 35 puta jače eksprimiran nego što je u tkivima jetre te otprilike 6 puta jače nego što je u tkivima crijeva.



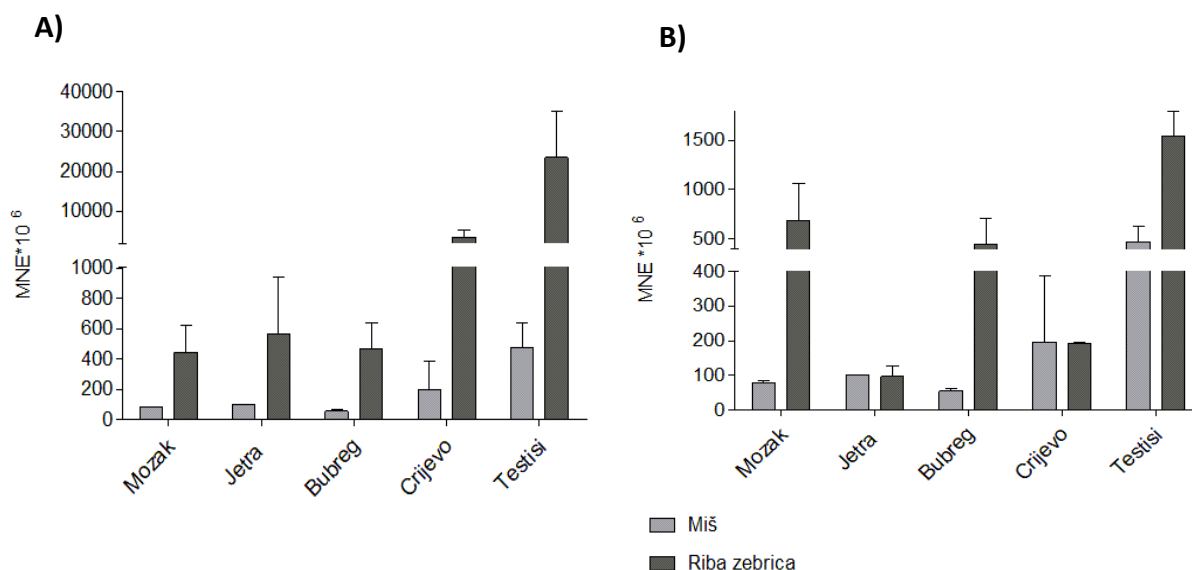
Slika 4.4.12. Grafički prikaz usporedbe ekspresije *TDP2* i *TDP2a* gena (A) te *TDP2* i *TDP2b* gena (B) u tkivima ženki miša i riba zebrica. Svjetlosivom bojom prikazana je ekspresija u tkivima ženki miša, dok je tamnosivom bojom prikazana ekspresija u tkivima riba zebrica.

Nakon uspoređivanja ekspresije u tkivima ženki, uspoređivala se ekspresija u tkivima mužjaka miševa i riba zebrica. Uspoređujući razinu ekspresije *TDP2a* gena s *TDP2* genom vidi se da je *TDP2a* gen u svim tkivima jače eksprimiran. U zebrici, u tkivima mozga, jetre i bubrega razina ekspresija *TDP2a* gena je visoka, dok je u crijevima i testisima *TDP2a* gen jako visoko eksprimiran. Kod miša, u tkivima mozga, jetre i crijeva mužjaka, *TDP2* gen eksprimiran je u srednje visokim, dok je u testisima eksprimiran u visokim razinama. *TDP2* gen najslabije je eksprimiran u bubrezima (srednja razina ekspresije) (Tablica 4.4.1.).

U tkivima mozga, jetre i bubrega *TDP2a* je približno jednako eksprimiran (Slika 4.4.13.). Ekspresija *TDP2a* u tkivima crijeva otprilike je 7 puta veća nego što je ekspresija u tkivima mozga, jetre i bubrega, dok je *TDP2a* gen u testisima oko 52 puta jače eksprimiran nego što je u mozgu i bubregu. Vidi se sličnost u ekspresijskom profilu *TDP2* mužjaka miša i *TDP2a* mužjaka zebrice: oba gena su najjače eksprimirana u testisima, dok je najslabija i približno slična ekspresija *TDP2* i *TDP2a* u bubregu, mozgu i jetri (Slika 4.4.13.)

U mužjaka, u pojedinim tkivima *TDP2b* zebrice slično je eksprimiran kao *TDP2* miša, dok je u drugim tkivima nekoliko puta više eksprimiran kod zebrice. U tkivima mozga, bubrega i testisa *TDP2b* gen eksprimiran je u visokim razinama, dok je u jetri i crijevu u srednje visokim (Tablica 4.4.1.). Što se tiče omjera ekspresija, *TDP2b* gen je u jetri i crijevu 16, odnosno 8 puta slabije eksprimiran nego što je u testisima zebrice. Tkiva jetre i crijeva pokazuju slične razine ekspresije *TDP2* i *TDP2b* gena, a najveća ekspresija oba gena je u testisima.

Vide se sličnosti u razinama ekspresije *TDP2b* gena u tkivima mužjaka i ženki riba zebrica. Najveće ekspresije su u spolnim organima (jajnicima i testisima), bubregu i mozgu, dok su ekspresije u tkivima jetre i crijeva puno niže i slične ekspresijama *TDP2* gena. Može se zaključiti da je ekspresija *TDP2b* gena tkivno specifična, odnosno da razina ekspresije *TDP2b* gena puno više varira s obzirom na tip tkiva nego što je primjerice kod ekspresije *TDP2* gena u miša ili *TDP2a* u zebrice kod kojih su prisutne male razlike u ekspresiji među tkivima. Također je vidljivo da je ekspresijski profil *TDP2a* gena zebrice sličniji *TDP2* genu u miša i čovjeka u usporedbi sa profilom *TDP2b* gena zebrice i *TDP2* ekspresijskim profilom miša.



Slika 4.4.13. Grafički prikaz usporedbe ekspresije *TDP2* i *TDP2a* gena (A) te *TDP2* i *TDP2b* gena (B) u tkivima mužjaka miša i riba zebrica. Svjetlosivom bojom prikazana je ekspresija u tkivima mužjaka miševa, dok je tamnosivom prikazana ekspresija u tkivima riba zebrica.

Dostupni podaci ekspresije *TDP2* gena u tkivima čovjeka pokazuju da je *TDP2* gen najjače eksprimiran u tkivima crijeva. Nakon crijeva, *TDP2* gen je najjače eksprimiran u testisima (3 puta slabije ekspresija), bubrezima, mozgu i jajnicima gdje je ekspresija oko 7,5 puta slabije nego što je u testisima. U tkivima bubrega *TDP2* je oko 3,4 puta slabije eksprimiran nego što je u testisima.



Slika 4.4.14. Grafički prikaz razine ekspresije *TDP1* gena u ljudskim tkivima. Slika preuzeta i obrađena prema ref. 150.

Promatrajući ekspresiju *TDP2* gena u tkivima različitih organizama uočavaju se pojedine sličnosti. U mužjacima je *TDP2* gen najjače eksprimiran u tkivima testisa i crijeva. Jedino je kod čovjeka *TDP2* gen jače eksprimiran u crijevu, dok je u ostalim organizmima jače eksprimiran u testisima. U tkivima mozga, bubrega i jetre kod sva tri organizma ekspresija je

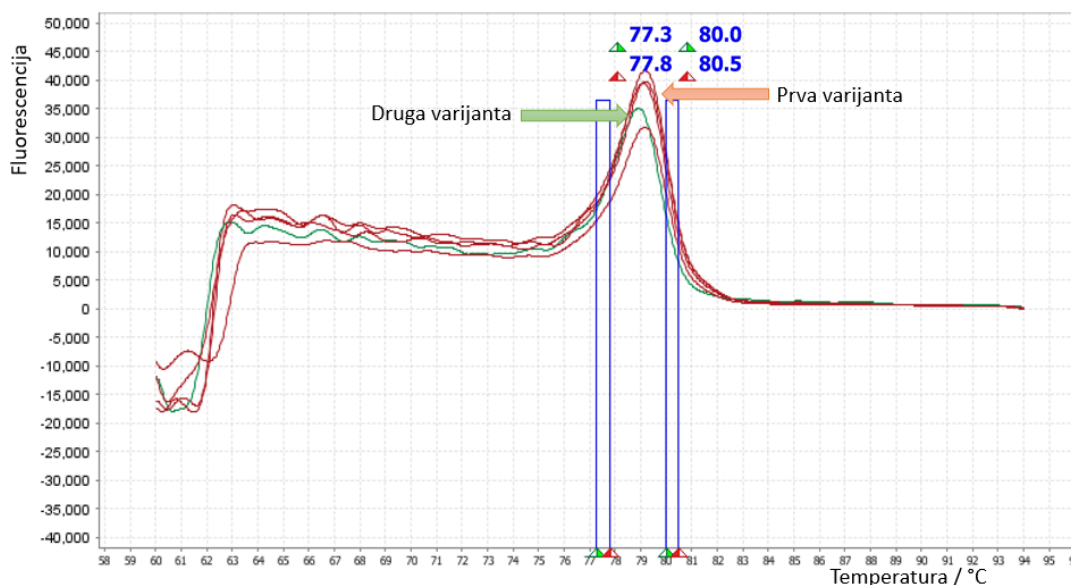
manja te su razlike u ekspresijama *TDP2* gena u istima manje. Kod ženki miševa i čovjeka *TDP2* gen najjače je eksprimiran u crijevima, dok je razina ekspresije u ostalim tkivima relativno slična i nema značajnih razlika. Kod zebrica *Tdb2a* gen visoko je eksprimiran jajnicima što je najveća razlika u odnosu na ekspresiju u tkivima čovjeka i miševa. Za razliku od ekspresije *TDP2* gena u mišu, *TDP2b* u zebrici je izrazito slabo eksprimiran u tkivima crijeva i jetre, a najjače je eksprimiran u spolnim organima, posebice jajnicima. Također, profil tkivne ekspresije *TDP2b* zebrice slična je kod oba spola.

#### 4.5. Identifikacija Utemeljitelja (engl. *Founder*) pomoću genotipizacije sa HRM metodom

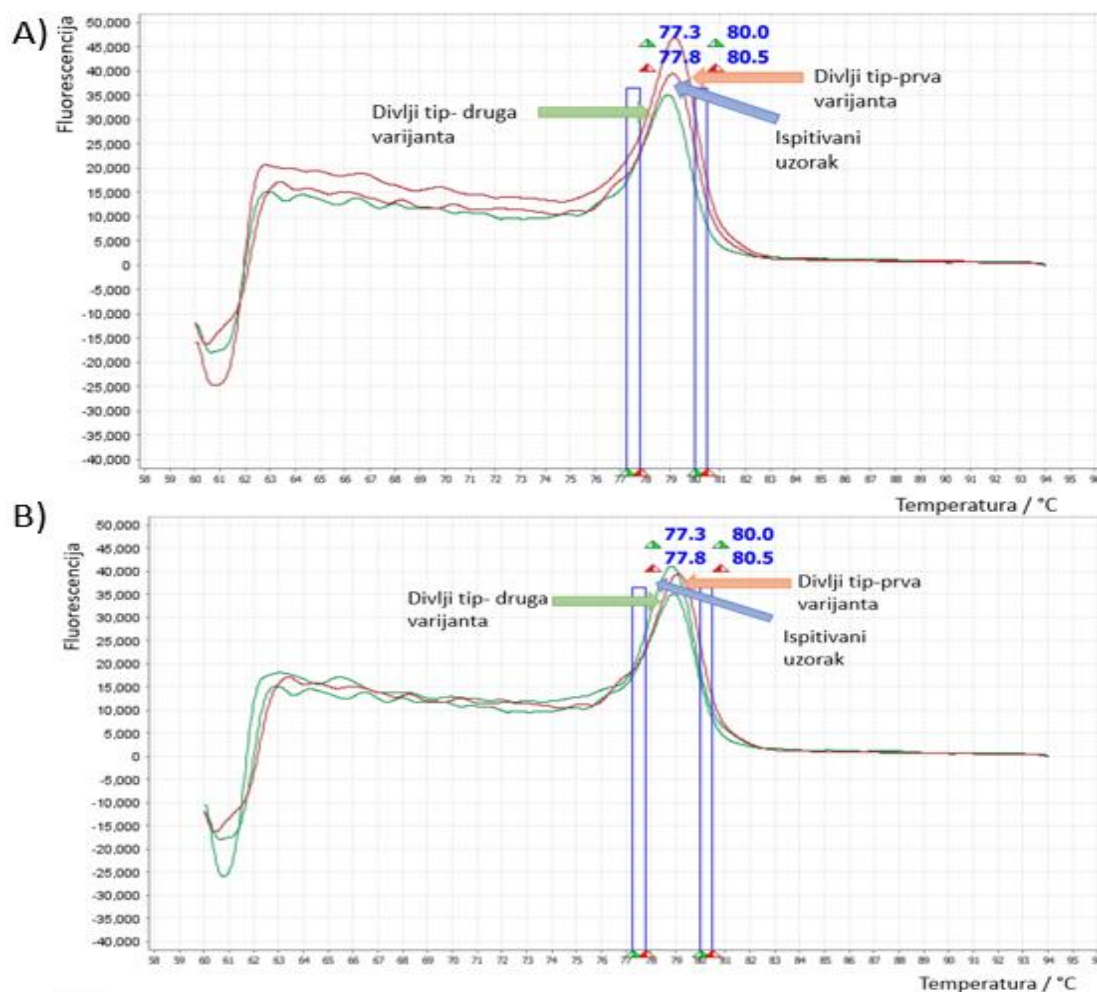
U embrijima riba zebrica izvršen je eksperiment koristeći Cas9 i sgRNA kompleks s ciljem inaktivacije *TDP1* gena promjenom okvira čitanja i pojavom preuranjenog stop kodona. Embriji riba zebrica injektirani su Cas9 i *TDP1*-specifičnim sgRNA kompleksom te su uzgajani nekoliko mjeseci. Nakon dostizanja spolne zrelosti odrasle ribe zebrice (F0 generacija), potencijalni utemeljitelji, križani su s divljim tipom riba zebrica te su potom njihovi embriji skupljani i HRM metodom izvršena je genotipizacija potomaka kako bi se pronašao utemeljitelj, tj. jedinka koja prenosi mutaciju na potomke (engl. *germline*). U svrhu križanja dva utemeljitelja te stvaranja F1 generacije HRM krivulje na liziranim embrijima potencijalnih utemeljitelja uspoređivale su se s krivuljama embrija divljih tipova. Različiti oblik i maksimum krivulje u odnosu na divlje tipove ukazuje na drugačije vrijednosti fluorescencije, odnosno vrijednosti disocijacije DNA. Embriji potencijalnih utemeljitelja koji imaju razlike u  $T_m$  vrijednostima oko i više od 0,5 °C u odnosu na embrije divljih tipova smatraju se potencijalno nositeljima željene mutacije što se dalje potvrđuje sekvenciranjem. Takve promjene u  $T_m$  vrijednostima sugeriraju postojanje željenih genskih promjena induciranih djelovanjem Cas9/sgRNA kompleksa (npr. insercije ili delecije). Niže  $T_m$  vrijednosti najčešće su posljedica različitih delecija, a što su veće delecije to su niže  $T_m$  vrijednosti. U slučaju insercija  $T_m$  će poprimiti veće vrijednosti od  $T_m$  vrijednosti divljih tipova.

Derivacija krivulja mekšanja DNA divljih tipova embrija pokazuju da postoje dvije varijante divljeg tipa (Slika 4.5.1.), vjerojatno zbog varijacije u intronskoj sekvenci u genomu divljeg tipa embrija riba zebrica što je ranije poznata pojava.<sup>166</sup> Četiri od pet embrija čine jednu varijantu, dok jedan embrij čini drugu varijantu divljeg tipa (Slika 4.5.1.). Embriji prve varijante

pokazuje  $T_m$  vrijednosti između 79,1 i 79,2° C, dok embrij druge varijante pokazuje  $T_m$  vrijednost od 78,8 ° C što je vidljivo po različitim položajima maksimuma fluorescencijskih krivulja (Slika 4.5.1.).

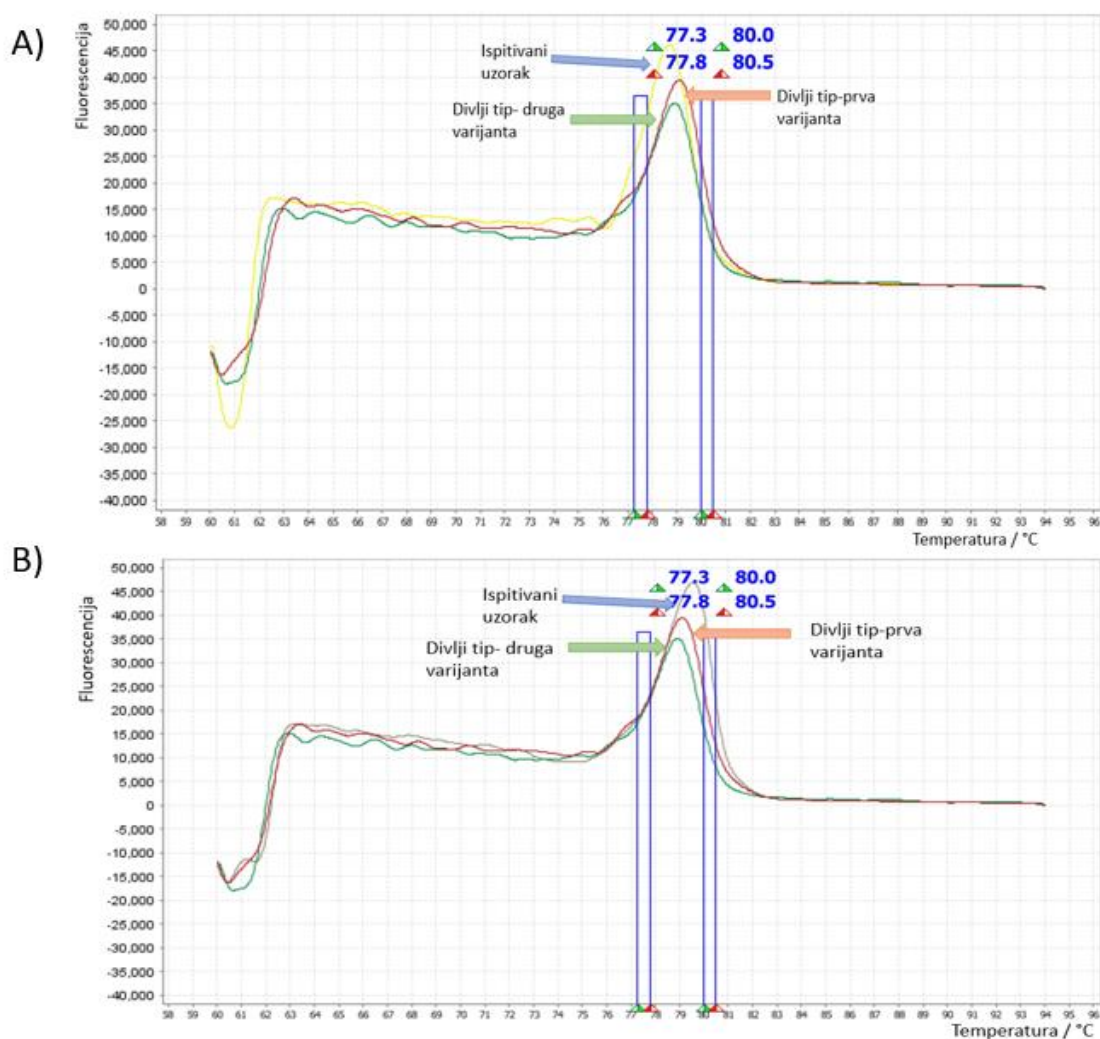


Slika 4.5.1. Derivacije krivulja mekšanja DNA embrija divljih tipova riba zebrica. Krivulje crvene boje prikazuju embrije prve varijante, dok krivulja zelene boje embrij druge varijante. Uzorci potomaka (embrija) potencijalnih utemeljitelja uspoređivani su s obje varijante divljeg tipa te su se gledale razlike među embrijima potencijalnih utemeljitelja i divljeg tipa. Prvo su se analizirale derivacije krivulja mekšanja DNA embrija prvog mužjaka, potencijalnog utemeljitelja s embrijima divljih tipova. Krivulje devet od deset ispitivanih embrija odgovaraju krivuljama prve varijante embrija divljeg tipa. Osim izgleda krivulja, također imaju slične položaje maksimuma fluorescencija što upućuje na slične  $T_m$  vrijednosti, odnosno nema značajnih razlika u  $T_m$  vrijednostima između divljeg tipa i ispitivanih embrija prvog mužjaka (Slika 4.5.2.). Krivulja desetog od ispitivanih embrija odgovara drugoj varijanti divljeg tipa što je također vidljivo po položaju maksimuma. Na slikama 4.5.2.A i 4.5.2.B prikazana su dva od deset ispitivanih uzoraka koja se poklapaju s prvom i drugom varijantom divljeg tipa. Iz dobivenih podataka zaključuje se da najvjerojatnije nije došlo do željene promjene u *TDP1* genu prvog mužjaka zebrice.



Slika 4.5.2. Usporedba derivacija krivulja mekšanja DNA ispitivanih uzoraka prvog (A) i drugog (B) embrija prvog mužjaka s dvije varijante divljeg tipa.

Analizirajući uzorke embrija drugog mužjaka, potencijalnog utemeljitelja, vidljivo je da sedam od deset uzoraka odgovara varijanti jedan divljeg tipa, dok tri uzorka ne odgovaraju niti jednoj od dvije varijante. Osim po drugačijem izgledu krivulje, navedena dva uzorka razlikuju se i po  $T_m$  vrijednostima koje u otprilike  $0,4^\circ\text{C}$  veće od  $T_m$  vrijednosti prve varijante divljih tipova (Slika 4.5.3.). Treći uzorak ima  $T_m$  vrijednosti  $0,5^\circ\text{C}$  manje od prve varijante divljih tipova. Razlike u  $T_m$  vrijednostima vidljive su na temelju položaja maksimuma fluorescencije. Na Slici 4.5.3. uspoređena su dva uzorka s divljim tipovima riba zebrića.



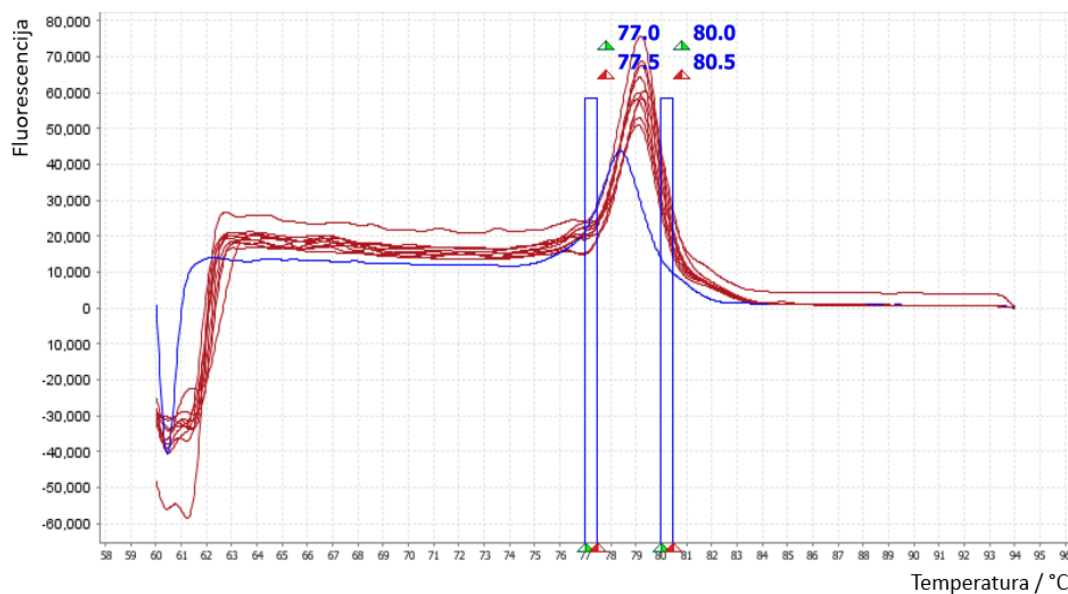
Slika 4.5.3. Usporedba derivacija krivulja mekšanja DNA uzoraka prvog (A) i drugog (B) embrija drugog mušjaka s dvije varijante divljeg tipa. Zbog drugačijih položaja maksimuma, krivulja ispitivanog uzoraka prvog embrija (A) prikazana je žutom, a drugog embrija (B) sivom bojom.

Zbog postojanja razlika u  $T_m$  vrijednostima i krivuljama među uzorcima potomstva drugog mušjaka i uzoraka divljih tipova utvrdilo se da embriji drugog mušjaka vjerojatno nose promjenu u *TDPI* genu, odnosno da je drugi mušjak ribe zebrice vjerojatni utemeljitelj. Prisutnost i tip genske promjene se potvrđuje sekvenciranjem te se *in silico* na osnovu toga predviđa proteinska promjena Tdp1 enzima (promjena okvira čitanja i/ili preuranjeni STOP kodon).

Nakon mušjaka riba zebrica izvršen je proces genotipizacije potencijalnog utemeljitelja ženke ribe zebrice kako bi se pronašla ženka utemeljitelj te potom izvršilo križanje oba spola u svrhu stvaranja F1 generacije Tdp1 deficitarnih organizama. U okviru ovog diplomskog rada testirana je jedna potencijalna ženka utemeljitelj. U uzorcima embrija ženke nije vidljivo niti



jedno značajno odstupanje derivacija krivulja mekšanja DNA određivanih embrija u usporedbi s prvom varijantom embrija divljeg tipa (Slika 4.5.4.). Slični su oblici i položaji maksimuma fluorescencija embrija ženke i divljih tipova te nema značajnih razlika u  $T_m$  vrijednostima. Može se zaključiti da ova ženka ne nosi željenu promjenu u *TDPI* genu u jajnim stanicama. Daljnje analize drugih potencijalnih ženki utemeljitelja bili su izvan obima ovog diplomskog rada.



Slika 4.5.4. Usporedba derivacija krivulja mekšanja DNA ispitivanih uzoraka ženke ribe zebrice s divljim tipom.

## § 5. ZAKLJUČAK

- Ispitivano je više načina izolacije ukupne RNA iz tkiva miša, te je pronađen optimalni komplet za izolaciju iste.
- *TDP1* gen je u tkivima jetre, bubrega i crijeva ženki miša nisko eksprimiran ( $MNE < 11 \times 10^6$ ), dok u mozgu i jajnicima pokazuje srednju ( $MNE = 12 \times 10^6 - 65 \times 10^6$ ) razinu ekspresije. U mužjaka miša, *TDP1* gen je nisko eksprimiran u jetri ( $MNE < 11 \times 10^6$ ), srednje eksprimiran u mozgu i bubregu ( $MNE = 12 \times 10^6 - 65 \times 10^6$ ), srednje visoko u crijevu ( $MNE = 66 \times 10^6 - 255 \times 10^6$ ) te visoko eksprimiran u testisima ( $MNE = 256 \times 10^6 - 3150 \times 10^6$ ).
- *TDP2* gen ženke miša pokazuje srednju razinu ekspresije u jajnicima ( $MNE = 12 \times 10^6 - 65 \times 10^6$ ), srednje visoku razinu ekspresije u mozgu, jetri, bubregu i crijevu ( $MNE = 66 \times 10^6 - 255 \times 10^6$ ). U tkivima mužjaka, *TDP2* gen je u bubregu srednje eksprimiran, srednje visoko eksprimiran u mozgu, jetri i crijevu, dok je testisima visoko eksprimiran ( $MNE = 256 \times 10^6 - 3150 \times 10^6$ ).
- Ekspresijski profil *TDP1* gena u tkivima ženki miša je: jajnici > mozak > bubreg > jetra > crijevo, dok je kod mužjaka miša ekspresijski profil: testisi > crijevo > mozak > bubreg > jetra. U usporedbi sa ekspresijskim profilima *TDP1* kod zebrica, vidljive su velike sličnosti. Ekspresijski profil *TDP1* ženki zebrice je: jajnici > mozak > bubreg > crijevo > jetra i vrlo je sličan ženki miša, dok je ekspresijski profil mužjaka zebrice testisi > mozak > bubreg > crijevo > jetra nešto manje sličan mužjaku miša. Sličnost je prisutna i u tome što je *TDP1* gen najjače eksprimiran u spolnim organima i kod miša i kod zebrice oba spola.
- Ekspresijski profili *TDP2* gena u tkivima ženki miša je: crijevo > mozak > bubreg > jetra > jajnici, dok je kod mužjaka miša ekspresijski profil: testisi > crijevo > jetra > mozak > bubreg. Vidljive su različitosti u ekspresijskim profilima miševa i zebrica. Ekspresijski profil *TDP2b* ženka zebrice je: jajnici > bubreg > mozak > crijevo > jetra, dok je mužjaka: testisi > mozak > bubreg > crijevo > jetra.
- Ekspresijski profil *TDP1* gena čovjeka (testisi > mozak > crijevo > jajnici > bubreg > jetra) uspoređen je sa ekspresijskim profilima miša i zebrica. Ekspresijski profil čovjeka poklapa se s ekspresijskim profilom mužjaka miša.
- Ekspresijski profil *TDP2* gena čovjeka (crijevo > testisi > bubreg > jetra > mozak > jajnici) uspoređen je s profilima miša i zebrica te je zaključeno da je najveće poklapanje s ekspresijskim profilom *TDP2a* gena mužjaka miševa.
- Metodom mekšanja visoke rezolucije određeno je da jedna od tri testirane jedinice riba zebrica sadržava promjenu u *TDP1* genu, odnosno da je utemeljitelj *Tdp1*<sup>-/-</sup> linije.

## § 6. LITERATURNI IZVORI

1. S. A. Lujan, A. R. Clausen, A. B. Clark, H. K. MacAlpine, D. M. MacAlpine, E. P. Malc, T. A. Kunkel, *Genome Res.* **24** (2014) 1751–1764.
2. C. Tomasetti, B. Vogelstein, *Science* **34** (2015) 78–81.
3. L. A. Frederico, T. A. Kunkel, i B.R. Shaw, *Biochemistry* **29** ( 1990) 2532–2537.
4. T. Lindahl, B. Nyberg, *Biochemistry* **13** (1974) 3405–3410.
5. T. Lindahl, B. Nyberg, *Biochemistry* **11** (1972) 3610–3618.
6. B. Rydberg ,T. Lindahl, *EMBO J.* **1** (1982) 211–216.
7. J. Imlay, S.Chin, S.Linn, *Science* **240** (1988) 640–642.
8. S. Loft, H. E.Poulsen, *J. Mol. Med.* **74** (1996) 297–312.
9. W. D. Henner, S. M, Grunberg, W. A. Haseltine, *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 11750–11754.
10. B. D. Freudenthal, W. A. Beard,L. Perera, D. D. Shock, T, Kim, T. Schlick, S. H. Wilson, *Nature* **517** (2014) 635–639.
11. J. R. Wagner, C. C. Hu, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** (1992) 3380–3384.
12. L. J Marnett, *Mutat. Res.* **424** (1999) 83–95.
13. J. P. Pouget, S. Frelon, J.-L. Ravanat, I. Testard, F. Odin, i J. Cadet, *Radiat. Res.* **157** (2002) 589–595.
14. G. W. Buchko, J. Cadet, J. L. Ravanat, P. Labataille, *Int. J. Radiat. Biol.* **63** (1993) 669–676.
15. A. C. Minella, J Swanger, E. Bryant, M. Welcker, H. Hwang i B. E. Clurman, *Curr. Biol.* **12** (2002) 1817–1827.
16. T. D. Halazonetis, V. G. Gorgoulis, i J. Bartek, *Science* **319** (2008) 1352–1355.
17. J.Bartkova, Z. Hořejší, K. Koed, A. Krämer, F. Tort, K. Zieger, J. Bartek, *Nature* **434** (2005) 864–870.
18. S. P. Jackson, J. Bartek, *Nature* **461** (2009) 1071–1078.
19. R. Lahue, K. Au, P. Modrich, *Science* **245** (1989) 160–164.
20. Al. Lu, S. Clark, P. Modrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80** (1983) 4639-4643.
21. D. M.Wilson, M. Takeshita, A. P. Grollman i B. Demple, *J. Biol. Chem.* **270** (1995) 16002–16007.
22. M. Akbari, J. Peña-Diaz, S. Andersen, N.-B. Liabakk, M. Otterlei, H. E. Krokan, *DNA Repair* **8** (2009) 834–843.

23. C. D. Mol, T. Izumi, S. Mitra, J. A. Tainer, *Nature* **403** (2000) 451–456.
24. L. K. Liem, C. W. Wong, A. Lim, B. F. L. Li, *J. Mol. Biol.* **231** (1993) 950–959.
25. M. Olsson, T. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **255** (1980) 10569–10571.
26. J. Hu, C. P. Selby, S. Adar, O. Adebali, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **292** (2017) 15588–15599.
27. R. Kanaar, J. H. Hoeijmakers, D. C. van Gent, *Trends Cell Biol.* **8** (1998) 483–489.
28. T. Nakano, RT Ouchi, J Kawazoe, S. P. Pack, K. Makino, H. Ide, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 6562–6572.
29. Y. V. Fu, H. Yardimci, D. T. Long, A. Guainazzi, V. P. Bermudez, J. Hurwitz, C. Walter, *Cell*, **146** (2011) 931–941.
30. N. Y. Tretyakova, E. D. Michaelson-Richie, T. B. Gherezghiher, J. Kurtz, X. Ming, S. Wickramaratne, M. Champion, S. Kanugula, AE. Pegg, C. C. Campbell, *Biochemistry* **52** (2013) 3171–3181.
31. Y. Shi, F. Lan, F. C. Matson, P. Mulligan, J.R. Whetstone, P. A. Cole, R. A. Casero, Y. Shi, *Cell* **119** (2004) 941–953.
32. S. C. Trewick, T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, B. Sedgwick, *Nature* **419** (2002) 174–178.
33. K. Lu, W. Ye, L.Zhou, L. B. Collins, X. Chen, A. Gold, L. M. Ball, J. A. Swenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 3388–3399.
34. E. Gajewski, A. F. Fuciarelli, M. Dizdaroglu, *Int. J. Radiat. Biol.* **54** (1988) 445–459.
35. M. S. W. Lipton, S. F. Fuciarelli, D. L. Springer, C. G. Edmonds, *Radiation Research* **145** (1996) 681.
36. M. S. DeMott, E. Beyret, D. Wong, B. C. Bales, J. T. Hwang, M. M Greenberg, B. Demple, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 7637–7640.
37. J. T. Szczepanski, R. S. Wong, J. N. McKnight, G. D. Bowman, M. M. Greenberg, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **107** (2010) 22475–22480.
38. M. I. Shoukamy, T. Nakano, M. Ohshima, R. Hirayama, A. Uzawa, Y. Furusawa, H. Ide, *Nucleic Acids Res.*, **40** (2012) e143–e143.
39. H. Zhang, C. J. Koch, C. A. Wallen, K. T. Wheeler, *Radiat. Res.* **142** (1995) 163–168.
40. H. Zhang, K.T. Wheeler, *Radiat. Res.* **140** (1994) 321–326.
41. K. Kiiantsa, N.Maizels, *Nucleic Acids Res.* **41** (2013) e104–e104.
42. C. Marchand, *Mol. Cancer Ther.* **5** (2006) 287–295.
43. B. L. Staker, K. Hjerrild, M. D. Feese, C. A. Behnke, A. B. Burgin, L. Stewart, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99** (2002) 15387–15392.
44. C. C. Wu, T. K. Li, L. Farh, L.-Y.Lin, T.-S., Lin, Y.-J. Yu, N. L. Chan, *Science* **333** (2011) 459–462.

45. K. Chválková, V. Brabec, J. Kašpárková, *Nucleic Acids Res.* **35** (2007) 1812–1821.
46. J. Murai, S-y. N. Huang, B. B. Das, A. Renaud, Y Zhang, J. H. Doroshov, Y. Pommier, *Cancer Res.* **72** (2012) 5588–5599.
47. T. Nakano, A. Katafuchi, M. Matsubara, H. Terato, T. Tsuboi, T. Masuda, T. Tatsumoto, S.P. Pack, K. Makino, D.L. Croteau, B. Van Houten, K. Iijima, H. Tauchi, H. Ide, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 27065–27076.
48. T. Nakano, S. Morishita, A. Katafuchi, M. Matsubara, Y. Horikawa, H. Terato, A. M. H. Salem, S. Izumi, S. P. Pack, K. Makino, H. Ide, *Mol. Cell* **28** (2007) 147–158.
49. D. J. Baker, G. Wuenschell, L. Xia, J. Termini, S. E. Bates, A. D. Riggs, T. R. O'Connor, *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 22592–22604
50. B. de Graaf, A. Clore, A. K. McCullough, *DNA Repair (Amst.)* **8** (2009) 1207–1214.
51. T. Rao, R. Gao, S. Takada, M. Al Abo, X. Chen, K. J. Walters, Y. Pommier, H. Aihara, *Nucleic Acids Res.* **44** (2016) 10201–10215.
52. D. L. Woodworth, K. N. Kreuzer, *Genetics* **143** (1996)1081–1090.
53. J. C. Connelly, E. S. de Leau, D. R. Leach, *DNA Repair (Amst.)* **2** (2003) 795–807.
54. S. Keeney, C. N. Giroux, N. Kleckner, *Cell* **88** (1997) 375–384.
55. M. Malik, J. L. Nitiss, *Eukaryot. Cell* **3** (2004) 82–90.
56. N. N. Hoa, T. Shimizu, Z. W. Zhou, Z. Q. Wang, R. A. Deshpande, T. T. Paull, S. Akter, M. Tsuda, R. Furuta, K. Tsutsui, S. Takeda, H. Sasanuma, *Mol. Cell* **64** (2016) 580–592.
57. R. A. Deshpande, H. Lee, S. Arora, T. T. Paull. *Mol. Cell* **64** (2016) 593–606.
58. M. J. Neale, J. Pan J, S. Keeney, *Nature* **436** (2005) 1053–1057.
59. J. Stinglele, M. S. Schwarz, N. Bloemeke, P. G. Wolf, S. A. Jentsch, *Cell* **158** (2014) 327–338.
60. B. Vaz, M. Popović, J. A. Newman, J. Fielden, H. Aitkenhead, S. Halder, A. N. Singh, I. Vendrell, R. Fischer, I. Torrecilla, N. Drobnitzky, R. Freire, D. J. Amor, P. J. Lockhart, B. M. Kessler, G. W. McKenna, O. Gileadi, K. Ramadan, *Mol. Cell* **64** (2016) 704–719.
61. J. Lopez-Mosqueda, K. Maddi, S. Prgomet, S. Kalayil, I. Marinovic-Terzic, J. Terzic, I. Dikic, *eLife* **5** (2016) e21491.
62. M. Morocz E. Zsigmond, R. Tóth, M. Z. Enyedi, L. Pintér, L. Haracska. *Nucleic Acids Res.* **45** (2017) 3172–3188.
63. J. Stinglele, R. Bellelli, F. Alte, G. Hewitt, G. Sarek, S. L. Maslen, S. E. Tsutakawa, A. Borg, S. Kjær, J. A. Tainer, J. M. Skehel, M. Groll, S. J. Boulton, *Mol. Cell* **64** (2016) 688–703.
64. B. Vaz, M. Popović, K. Ramadan, *Trends Biochem. Sci.* **42** (2017) 483-495.

65. H. Y. Wu, S. Shyy, J. C. Wang, L. F. Liu, *Cell* **53** (1988) 433–440.
66. K. Maeshima, U. K. Laemmli, *Dev. Cell* **4** (2003) 467–480.
67. Y. L. Lyu, C. P. Lin, A. M. Azarova, L. Cai, J. C. Wang, L. F. Liu, *Mol. Cell. Biol.* **26** (2006) 7929-7941.
68. H. Zhang, Y. Pommier, *Biochemistry* **47** (2008) 11196–11203.
69. G. Ju, *Science* **312** (2006) 1798–1802.
70. J. C. Wang. Interaction between DNA and an Escherichia coli protein  $\omega$ . *J. Mol. Biol.* **55** (1971) 523–533.
71. Y. Pommier, S. Y. Huang, R. Gao, B. B. Das, J. Murai, C. Marchand. *DNA Repair (Amst)* **44** (2014) 114-129.
72. B. Taneja, B. Schnurr, A. Slesarev, J. F. Marko, A. Mondragón, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104** (2007) 14670-146755.
73. M. R. Redinbo, *Science* **279** (1998) 1504–1513.
74. D. A. Koster, V. Croquette, C. Dekker, S. Shuman, N.H. Dekker, *Nature* **434** (2005) 671-674.
75. P. Brown, N. Cozzarelli, *Science*, **206** (1979) 1081–1083.
76. M. Gellert, K. Mizuuchi, M. H. O’Dea, H. A. Nash, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73** (1976), 3872–3876.
77. S.W. Yang, A. B. Burgin, B. N. Huizenga, C. A. Robertson, K. C. Yao, H. A. Nash. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **93** (1996) 11534–11539.
78. J. J. Pouliot, *Science* **286** (1999) 552–555.
79. H. Zhang, J. M. Barcelo, B. Lee, G. Kohlhagen, D. B. Zimonjic, N. C. Popescu, Y. Pommier, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98** (2001) 10608–10613.
80. S. N. Huang, Y. Pommier, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019) 3015.
81. J. Murai, S. N. Huang, B. B. Das, T. S., Dexheimer, S. Takeda, Y. Pommier, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 12848–12857.
82. L. Debethune, *Nucleic Acids Res.* **30** (2002) 1198–1204.
83. K. C. Nitiss, M. Malik, X. He, S. W. White, J. L. Nitiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103** (2006) 8953-8958.
84. K. V. Inamdar, J. J. Pouliot, T. Zhou, S. P. Lees-Miller, A. Rasouli-Nia, L. F. Povirk, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 27162–27168.
85. S. W. Yang, A. B. Jr. Burgin, B. N. Huizenga, C. A. Robertson, K. C. Yao, H. A. Nash, *Proc. Natl. Acad Sci U S A.* **93** (1996) 11534-11539.

86. H. Interthal, J. J. Pouliot, J. J. Champoux, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98** (2001) 12009–12014.
87. D. R. Davies, H. Interthal, J. J. Champoux, W. G. Hol, *Structure* **10** (2002) 237–248.
88. D. R. Davies, H. Interthal, J. J. Champoux, W. G. Hol, *Chem. Biol.* **10** (2003) 139–147.
89. B. B. Das, S. Antony, S. Gupta, T. S. Dexheimer, C. E. Redon, S. Garfield, Y. Shiloh, Y. Pommier, *EMBO J.* **28** (2009) 3667–3680.
90. S. Barker, M. Weinfeld, D. Murray *Mutat. Res.* **589** (2005) 111–135.
91. J. Pourquier, L. M. Ueng, J. Fertala, D. Wang, H. J. Park, J. M. Essigmann, M. A. Bjornsti, Y. Pommier, *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 8516–8523.
92. S. Pype, W. Declercq, A. Ibrahim, C. Michiels, J.G. Van Rietschoten, N. Dewulf, M. de Boer, P. Vandenaabeele, D. Huylebroeck, J.E. Remacle, *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 18586–18593.
93. H. Pei, J. S. Yordy, Q. Leng, Q. Zhao, D. K. Watson, R. Li, *Oncogene*, **22** (2003). 2699–2709.
94. F. C. Ledesma, S. F. El Khamisy, M. C. Zuma, K. Osborn, K. W. Caldecott, *Nature* **461** (2009) 674–678.
95. Z. Zeng, F. Cortes-Ledesma, S. F. El-Khamisy, K. W. Caldecott, *J. Biol. Chem.* **286** (2010) 403–409.
96. R. Gao, S. Y. Huang, C. Marchand, Y. Pommier. *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 30842–30852.
97. F. Cortes Ledesma, S. F. El Khamisy, M. C. Zuma, K. Osborn, K. W. Caldecott, *Nature* **461** (2009) 674–678.
98. M. J. Schellenberg, C. D. Appel, S. Adhikari, P. D. Robertson, D. A. Ramsden, R. S. Williams, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19** (2012) 1363–1371.
99. K. Shi, K. Kurahashi, R. Gao, S. E. Tsutakawa, J.A. Tainer, Y. Pommier H. Aihara, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19** (2012) 1372–1377.
100. R. Gao, M. J. Schellenberg, S. N. Huang, M. Abdelmalak, C. Marchand, K. C. Nitiss, J. L. Nitiss, R. S. Williams, Y. Pommier, *J. Biol. Chem.* **289** (2014) 17960–17969.
101. F. Leteurtre, G. Kohlhausen, M. R. Fesen, A. Tanizawa, K. W. Kohn, Y. Pommier, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 7893–7900.
102. A. H. Corbett, E. L. Zechiedrich, R. S. Lloyd, N. Osheroff, *J. Biol. Chem.* **266** (1991) 19666–19671.
103. R. Jansen, J. D. Embden, W. Gaastra, L. M. Schouls, *Mol. Microbiol.* **43** (2002) 1565–1575.
104. Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, A. Nakata, *J. Bacteriol.* **169** (1987) 5429–5433.
105. F. J. Mojica, C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, E. Soria, *J. Mol. Evol.* **60** (2005) 174–82.
106. A. Bolotin, B. Quinquis, A. Sorokin, S. D. Ehrlich, *Microbiology (Reading)*. **151** (2005) 2551–2561.

107. C. Pourcel, G. Salvignol, G. Vergnaud, *Microbiology (Reading)* **151** (2005) 653-663.
108. P. Pourquier, A. A. Pilon, G. Kohlhagen, A. Mazumder, A. Sharma, Y. Pommier, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 26441-26447.
109. C. Holm, J. M. Corvey, D. Kerrigan, Y. Pommier, *Cancer Res.* **49** (1989) 6365–6368.
110. R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, P. Horvath, *Science*, **315** (2009) 1709–1712.
111. S. J. Brouns, M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. Slijkhui, A. P. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin EV, J. van der Oost, *Science*. **321** (2008) 960-964.
112. F. J. M. Mojica, C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, C. Almendros, *Microbiology (Reading)* **155** (2009) 733-740.
113. J. E. Garneau, M. E. Dupuis, M. Villion, D. A. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, S. Moineau, *Nature* **468** (2010) 67–71.
114. E. Deltcheva, K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, E. Charpentier, *Nature* **471** (2011) 602–607.
115. M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science* **337** (2012) 816–821.
116. L. Cong, F. Ann Rann, D. Cox, S. Lin, R. Barreto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, F. Zhang, *Science* **339** (2013) 819–823.
117. P. Mali, L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, G. M. Church, *Science* **339** (2013) 823–826.
118. Preuzeto sa stranice: <https://sites.tufts.edu/crispr/crispr-background/adaptive-immune-system/>  
(Datum pristupanja: 20. siječnja 2021.)
119. Y. Ban, C. W. Ho, R. K. Lin, Y. L. Lyu, L. F. Liu, *Mol. Cell Biol.* **20** (2013) 4008-4016.
120. A. Ståhlberg, J. Hakansson, X. Xian, H. Semb, M. Kubista, *Clin. Chem.* **50** (2004) 509-15.
121. L. Menéndez-Arias, A. Sebastián-Martín, M. Álvarez, *Virus Res.* **15** (2017) 153-176.
122. P. Y. Lee, J. Costumbrado, C. Y. Hsu, Y. H. Kim, *J Vis Exp.* **20** (2012) 3923
123. D. Voytas, *Curr. Protoc. Immunol.* **10** (2001)
124. C. W. Dieffenback, T. M. Lowe, G. S. Dveksler, *PCR Methods Appl.* **3** (1993) 30-37.
125. T. Mann, R. Humbert, M. Dorschner, J. Stamatoyannopoulos, W. Stafford Noble, *Nucleic Acids Res.* **37** (2009) e95.
126. R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Sharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, *Science* **239** (1988) 487-491.
127. T. A. Steitz, *Nature* **391** (1998) 231-232.



128. P. Kainz, *Biochim. Biophys. Acta* **1494** (2000) 23-27.
129. T. Nolan, R. Hands, S. A. Bustin, *Nat. Protoc.* **1** (2006) 1559–1582.
130. O. Thellin, W. Zorzi, B. Lakaye, B. De Borman, B. Coumans, G. Hennen, T. Grisar, A. Igout, E. Heinen, *J. Biotechnol.* **75** (1999) 291-295.
131. Preuzeto sa stranice: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/amplification-no-template-control.html>  
(Datum pristupanja: 20.siječnja 2021.)
132. T. C. Lorenz, *J. Vis. Exp.* **63** (2012) 3998.
133. D. Lessel, B. Vaz, B. S. Halder, *Nat. Genet.* **46** (2014) 1239–1244.
134. J. A. Glasel, *BioTechniques* **1** (1995) 62-63.
135. Preuzeto sa stranice: <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/first-strand-cdna-synthesis-e6300> (Datum pristupanja: 20.siječnja 2021.)
136. P. Y.Muller, H. Janovjak, A. R. Miserez, Z. Dobbie, *Biotechniques* **6** (2002) 1372-1374.
137. P. Simon, *Bioinformatics* **19** (2003) 1439-1440.
138. J. Lončar, *Sci. Rep.* **6** (2016) 28937.
139. N. B. Larsen, A. O. Gao, J. L. Sparks, I. Gallina, R. A. Wu, M. Mann, M. Räsche, J. C. Walter, J. P. Duxin, *Mol. Cell* **73** (2019) 574-588.
140. A. R. Sonawane, J. Platig, M. Fangy, C. Y. Chen, J. N. Paulson, C. M. Lopes-Ramos, D. L. DeMeo, J. Quackenbush, K. Glass, M. L. Kuijjer, *Cell Rep.* **21** (2017) 1077-1088.
141. T. Kudoh, M. Tsang, NA. Hukreide, X. Chen, M. Dedekian, C. J. Clarke, A. Kiang, S. Schultz, J. A. Epstein, R. Toyama, I. B. David, *Genome Res.* **12** (2001) 1979-1987.
142. D. Trabzuni, A. Ramasamy, S. Imran, R. Walker, C. Smith, M. E. Weale, J. Hardy, M. Ryten, *Nat. Commun.* **4** (2013) 2771.
143. A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. Eker, T. Carell, L. O. Essen, *Science* **306** (2004) 1789-1793.
144. R. B. Brem, G. Yvert, R. Clinton, L. Kruglyak, *Science* **296** (2002) 752-755.
145. V. G. Cheung, L. G. Conlin, T. M. Webber, M. Arcaro, K. Y. Jen, M. Morley, R. S. Spielman, *Nat. Genet.* **3** (2003) 422-425.
146. C. C.Pritchard, L. Hsu, J. Delrow, P. S. Nelson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98** (2001) 13266-13271.
147. C. C. Pritchard, D. Coil, S. Hawley, L. Hsu, P. S. Nelson, *Genome Biol.* **7** (2006) 1-11.
148. M. A. Carmell, G. A. Dokshin, H. Skaletski, YC. Hu, J. C. van Wolfswinkel, K. J. Igarashi, D. W. Bellott, M. Nefedov, P. W. Reddien, G. C. Enders, V. N. Uversky, C. G. Mello, D. C. Page, *eLife* **5** (2016) 19993.

149. Preuzeto sa stranice : <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000042088-TDP1/tissue>  
(Datum pristupanja: 20.siječnja 2021.)
150. Preuzeto sa stranice: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000111802-TDP2/tissue>  
(Datum pristupanja: 20.siječnja 2021.)
151. Svec D.,A. Tichopat, V. Novosadova, M. W. Pffaf, M. Kubista, *Biomol. Detect. Quantif.* **11** (2015) 9-16.
152. M. R. Lieber, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 1-5.
153. C. Gong, P. Bongiorno, A. Martins, N. C. Stephanou, H. Zhu, S. Shuman, M. S. Glickman, *Nat. Struct Mol. Biol.* **12** (2005) 304–312.
154. X. Li, W. D. Heyer, *Cell Res.* **1** (2008) 99–113.
155. Z. Mao, M. Bozzella, A. Seluanov, *DNA Repair* **7** (2008) 1765-1771.
156. P. Desjardins, D. Conklin, *J. Visualized Exp.* **45** (2010) 2565
157. Inoue, K. Horimoto, *PLOS ONE* **12** (2017) e0177430.
158. Preuzeto sa stranice: <https://www.proteinatlas.org/about/assays+annotation#rna>  
(Datum pristupanja: 20.siječnja 2021.)
159. G. Lieschke, P. Currie, *Nat. Rev. Genet.* **8** (2007) 353–367.
160. Preuzeto sa stranice: <https://www.mpg.de/10973406/mice>  
(Datum pristupanja: 20.siječnja 2021.)
161. Preuzeto sa stranice : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/553516>  
(Datum pristupanja: 20.siječnja 2021.)
162. Preuzeto sa stranice : <https://www.uniprot.org/uniprot/E7FEU2>  
(Datum pristupanja: 20.siječnja 2021.)
163. Preuzeto sa stranice : <https://www.uniprot.org/uniprot/F8W5U2>  
(Datum pristupanja: 20.siječnja 2021.)
164. O. Rechko, A. Kolbanovskiy, L. Malinina, N. E. Geacintov, S. Broyde, D. J. Patel, *Nature* **17** (2010) 379-388.
165. T. Douki, M. Court, S. Sauvaigo, F. Odin, J. Cadet, *Biol. Chem.* **275** (2000) 11678-11685
166. M. B. Meisner, L. Truong, E.H Scholl R. L. Tanquay, D. M. Reif, *Mamm. Genome* **29** (2018) 90–100.
167. J. Montgomery, C. T. Wittwer, R. Palais, L. Zhou, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 59-66.
168. O. Hobert, *Science* **319** (2008) 1785-1786.

## § 7. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Luka Jukić

Datum rođenja: 25. travnja 1996.

Mjesto rođenja: Zagreb, Republika Hrvatska

### Obrazovanje

2003.–2011. Osnovna škola Vrbani, Zagreb

2011.–2015. IX. Gimnazija, Zagreb

2015.–2018. Preddiplomski sveučilišni studij kemije,

Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2018.–2021. Diplomski sveučilišni studij kemije, istraživački smjer, grane: analitička kemija i biokemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016., 2018., 2019. *Otvoreni dan kemije*, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

### Ostalo

2018. 5. *Simpozij studenata kemičara*, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2019. 6. *Simpozij studenata kemičara*, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-Matematički fakultet, Zagreb

2019. - 2020. Predsjednik Studentskog zbora Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu

2019. - 2020. Studentski predstavnik u Vijeću Kemijskog odsjeka

2019. - 2020. Studentski predstavnik u Fakultetskom vijeću Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu