

Uloga proteina ACRC u popravku unakrsnih veza DNA-protein u modelnom organizmu zebrici (Danio rerio)

Kutnjak, Marin

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:217:305599>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-15**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marin Kutnjak

**Uloga proteina ACRC u popravku unakrsnih
veza DNA-protein u modelnom organizmu
zebrici (*Danio rerio*)**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Marin Kutnjak

**The role of ACRC protein in the
DNA-protein crosslink repair in zebrafish
(*Danio rerio*) model organism**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj je rad izrađen u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju na Zavodu za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković, pod voditeljstvom dr. sc. Marte Popović i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Nenada Malenice. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ZAHVALE

Najviše sam zahvalan svojoj voditeljici, dr. sc. Marti Popović, na iskazanom povjerenju te pomoći, savjetima i podršci tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada, kao i tijekom pisanja rada.

Zahvalan sam Christine Supini, mag. biol. mol., i dr. sc. Cecile Otten, koje su mi pomagale tijekom izvođenja eksperimenata za ovaj diplomski rad i izvele eksperimente koji su dodatno obogatili moj diplomski rad.

Hvala mojem suvoditelju, doc. dr. sc. Nenadu Malenici, na pomoći i savjetima tijekom pisanja diplomskog rada i pomoći oko administrativnih obaveza.

Zahvalan sam i svim ostalim zaposlenicima Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju na ugodnoj atmosferi i svesrdnoj pomoći.

Zahvaljujem svim profesorima i asistentima koji su održavali nastavu tijekom preddiplomskog i diplomskog studija Molekularne biologije, a koji su dodatno pobudili moj interes za prirodnim znanostima i istraživačkim radom.

I naposljetku, hvala mojoj obitelji i prijateljima na strpljivosti i podršci tijekom perioda izrade diplomskog rada i cijelog studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Uloga proteina ACRC u popravku unakrsnih veza DNA- protein u modelnom organizmu zebrići (*Danio rerio*)

Marin Kutnjak

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Sažetak: Proteini koji stupaju u interakciju s DNA ili se nalaze u njoj blizini mogu postati s njom ireverzibilno kovalentno vezani, tvoreći lezije nazvane unakrsne veze DNA-protein (DPC-ovi, engl. *DNA-protein crosslinks*). DPC-ovi ometaju stanične procese koji uključuju DNA (replikaciju, transkripciju, rekombinaciju, popravak DNA), stoga predstavljaju prepreku u održavanju genomske integriteta. Protein SPRTN prva je otkrivena proteaza uključena u popravak DPC-ova u metazoa. Protein ACRC/GCNA evolucijski je očuvan regulator genomske stabilnosti metazoa. Ekspimiran je u germinativnim i pluripotentnim stanicama. Modeliranjem *in silico* uočena je strukturna sličnost proteaznih jezgara proteina SPRTN i ACRC. Stanice s mutiranim genom *acrc* karakteriziraju nestabilnost kromosoma, replikacijski stres i nakupljanje DPC-ova. Tijekom izvedbe diplomskog rada sudjelovao sam u uzgoju mutanata zebriće (*Danio rerio*) za protein ACRC kako bih istražio njegovu ulogu u popravku DPC-ova. Određivao sam razinu ukupnih DPC-ova embrija zebriće s delecijom C-kraja proteina i delecijom pretpostavljenog katalitičkog glutamata E451. Također sam izvodio ciljanu inaktivaciju gena *Acrc* u embrijima zebriće metodom CRISPR/Cas. Rezultati rada pokazali su da bi E451 i C-kraj proteina ACRC zebriće mogli biti bitni za njegovu katalitičku aktivnost u popravku DPC-ova, te da je specifičnim RNA vodikama (gRNA) za 5'-kraj i 3'-kraj gena *Acrc* zebriće moguće djelomično ciljano inaktivirati ovaj gen metodom CRISPR/Cas.

(98 stranica, 43 slike, 5 tablica, 111 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: unakrsne veze DNA-protein (DPC-ovi), DPC popravak, DPC proteaze, protein ACRC, metoda CRISPR/Cas, ciljana inaktivacija gena, zebrića (*Danio rerio*)

Voditelj: dr. sc. Marta Popović

Suvoditelj: doc. dr. sc. Nenad Malenica

Ocjenitelji:

doc. dr. sc. Nenad Malenica

prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

doc. dr. sc. Marin Ježić

Rad prihvaćen: 15. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

The role of ACRC protein in the DNA-protein crosslink repair in zebrafish (*Danio rerio*) model organism

Marin Kutnjak

Rooseveltovej trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Summary: Proteins which interact with DNA or are in its proximity can get irreversibly covalently bonded with DNA and form lesions called DNA-protein crosslinks (DPCs). DPCs impair cellular processes which include DNA and are obstacles in genomic stability maintenance. SPRTN protein was a first discovered protease involved in DPC repair in metazoans. ACRC/GCNA protein is a conserved regulator of genomic stability of metazoans. It's expressed in germ and pluripotent cells. Structural modelling of SPRTN and ACRC protease cores revealed similarities between them. Cells with mutated *acrc* gene are prone to chromosome instability, replication stress and DPCs accumulation. In my research, I participated in creation of zebrafish (*Danio rerio*) ACRC mutants, with the goal to investigate its role in DPC repair. I have determined total DPC levels of zebrafish embryos with deletion of C-end and deletion of putative catalytic glutamate E451 of ACRC protein. I also performed targeted gene inactivation of *Acrc* gene in zebrafish embryos with CRISPR/Cas method. My results showed that E451 and C-end of ACRC protein could be important for its catalytic activity in DPC repair, and that it's possible to partially inactivate *Acrc* gene with CRISPR/Cas method using specific guide RNAs for 5'- and 3'-end of this gene.

(98 pages, 43 figures, 5 tables, 111 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: DNA-protein crosslinks (DPCs), DPC repair, DPC proteases, ACRC protein, CRISPR/Cas method, targeted gene inactivation (KO, gene knockout), zebrafish (*Danio rerio*)

Supervisor: Marta Popović, PhD

Co-supervisor: Asst. Prof. Nenad Malenica, PhD

Reviewers:

Asst. Prof. Nenad Malenica, PhD

Prof. Željka Vidaković-Cifrek, PhD

Asst. Prof. Marin Ježić, PhD

Thesis accepted: September 15th, 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Unakrsne veze DNA-protein (DPC-ovi)	1
1.1.1. Neenzimski i enzimski DPC-ovi	2
1.1.2. DPC popravak	4
1.2. DPC proteaze	8
1.2.1. DPC proteaze Wss1 i SPRTN	8
1.2.2. Novootkrivene DPC proteaze: protein ACRC.....	9
1.2.3. Uloge DPC proteaza: uloge proteina ACRC	10
1.2.3.1. DPC proteaze u S-fazi	12
1.2.3.2. DPC proteaze izvan S-faze	13
1.2.3.3. DPC proteaze i transkripcija.....	14
1.2.3.4. DPC proteaze i cijepanje proteina čvrsto vezanih s DNA	14
1.2.4. Regulacija DPC proteaza.....	15
1.2.5. DPC proteaze i bolesti	17
1.3. Evolucijska očuvanost i građa proteina ACRC	18
1.4. Primjena sustava CRISPR/Cas u genetičkom inženjerstvu	20
1.4.1. Popravak dvolančanog loma DNA	21
1.4.2. Komponente sustava CRISPR/Cas.....	22
1.5. Zebrica (<i>Danio rerio</i>) kao modelni organizam.....	24
1.6. Ciljevi istraživanja	27
2. MATERIJALI I METODE	28
2.1. Postupci rada sa zebricama	28
2.1.1. Uvjeti uzgoja ribe zebrice.....	28
2.1.2. Postavljanje riba za mrijest i skupljanje embrija	28
2.1.3. Mikroinjektiranje embrija za metodu CRISPR/Cas	29
2.1.4. Eksperiment spašavanja.....	29
2.1.5. Liza embrija i uzoraka odsječka peraje	30
2.2. Dizajniranje početnica	30
2.3. Kloniranje i sekvenciranje.....	32
2.3.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	32
2.3.2. Agarozna gel-elektroforeza	33

2.3.3. Pročišćavanje DNA amplikona	33
2.3.4. Ligacija u plazmidni vektor	34
2.3.5. Transformacija bakterijskih stanica.....	34
2.3.6. Izolacija plazmida.....	35
2.3.7. Sekvenciranje plazmidne DNA i analiza sekvenci.....	36
2.4. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije (metoda HRM).....	37
2.5. Dizajniranje i sinteza RNA vodilja (gRNA)	39
2.6. Izolacija ukupne RNA	41
2.7. Reverzna transkripcija	42
2.8. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR).....	42
2.9. Metoda KCl/SDS precipitacije za izolaciju unakrsno vezanih DNA i proteina.....	43
2.10. Statistička obrada podataka	45
3. REZULTATI	46
3.1. Ciljana inaktivacija gena <i>Acrc</i> zebrice metodom CRISPR/Cas.....	46
3.1.1. Sinteza RNA vodilja za 3'-kraj gena <i>Acrc</i> zebrice	46
3.1.2. Utvrđivanje učinkovitosti RNA vodilja za 5'-kraj i 3'-kraj gena <i>Acrc</i> zebrice	47
3.1.2.1. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije	47
3.1.2.2. Kloniranje i sekvenciranje	51
3.1.3. Utvrđivanje ciljane inaktivacije gena <i>Acrc</i> zebrice metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom.....	57
3.2. Uloga proteina ACRC zebrice s delecijom katalitičkog glutamata (E451) u popravku unakrsnih veza DNA-protein	59
3.2.1. Identifikacija ženki generacije F ₁ koje su heterozigoti za katalitičku mutaciju gena <i>Acrc</i> zebrice	59
3.2.1.1. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije	59
3.2.1.2. Kloniranje i sekvenciranje	61
3.2.2. Izolacija unakrsno vezanih DNA i proteina metodom SDS/KCl precipitacije iz embrija zebrice koji imaju katalitičku mutaciju gena <i>Acrc</i> (Δ EMCH)	63
3.3. Uloga proteina ACRC zebrice s delecijom C-kraja u popravku unakrsnih veza DNA-protein	64
3.3.1. Identifikacija ženki utemeljitelja generacije F ₀ genotipizacijom embrija	64
3.3.1.1. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije	64
3.3.1.2. Kloniranje i sekvenciranje	66
3.3.2. Identifikacija mužjaka utemeljitelja generacije F ₀ genotipizacijom embrija.....	70

3.3.2.1. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije	70
3.3.2.2. Kloniranje i sekvenciranje	72
3.3.3. Izolacija unakrsno vezanih DNA i proteina metodom SDS/KCl precipitacije iz embrija zebrice koji imaju mutacije na 3'-kraju gena <i>Acrc</i> (Δ C)	76
4. RASPRAVA	79
4.1. Ciljana inaktivacija gena <i>Acrc</i> zebrice metodom CRISPR/Cas	79
4.2. Uloga proteina ACRC zebrice s delecijom katalitičkog glutamata (E451) u popravku unakrsnih veza DNA-protein	82
4.3. Uloga proteina ACRC zebrice s delecijom C-kraja u popravku unakrsnih veza DNA-protein	84
5. ZAKLJUČCI	90
6. LITERATURA	91
ŽIVOTOPIS.....	98

POPIS KRATICA

ACRC – protein koji sadrži ponavljanja kiselih aminokiselina (engl. *acidic repeat-containing protein*), potencijalna DPC proteaza; GCNA

ak – aminokiselina

CDS – sekvenca kodirajuće DNA (engl. *coding DNA sequence*)

DPC – unakrsna veza DNA-protein (engl. *DNA-protein crosslink*)

DSB – dvolančani lom DNA (engl. *DNA double-strand break*)

dsDNA – dvolančana DNA (engl. *double-stranded DNA*)

E – uzorak embrija

F – uzvodna početnica u PCR-u (engl. *forward primer*)

FA – formaldehid

FC – uzorak odsječka peraje (engl. *fin clip*)

FON – jedinka utemeljitelj ili jedinka potencijalni utemeljitelj (engl. *founder*)

GCNA – protein antigen jezgre germinativnih stanica (engl. *germ cell nuclear antigen*), potencijalna DPC proteaza; ACRC

gRNA – RNA vodilja (engl. *guide RNA*)

HDR – popravak dvolančanog loma DNA upravljani homologijom (engl. *homology-directed repair*)

HRM – metoda mekšanja DNA visoke rezolucije (engl. *high resolution melting method*)

KO – ciljana inaktivacija gena ili genski nokaut (engl. *gene knockout*)

MNE – srednja normalizirana ekspresija u qPCR-u (engl. *mean normalized expression*)

NHEJ – popravak dvolančanog loma DNA nehomolognim spajanjem krajeva (engl. *non-homologous end-joining*)

nt – nukleotid

pb – par baza

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. *quantitative polymerase chain reaction*)

R – nizvodna početnica u PCR-u (engl. *reverse primer*)

RC – konstrukt za spašavanje (engl. *rescue construct*) u eksperimentu spašavanja

ROS – reaktivni oblik kisika (ROS, engl. *reactive oxygen species*)

RT – homologni kalup za popravak (engl. *repair template*) u HDR-u

SPRTN – protein koji sadrži N-terminalnu domenu nalik SprT (engl. *SprT-like N-terminal domain*), DPC proteaza; SPARTAN; DVC-1

ssDNA – jednolančana DNA (engl. *single-stranded DNA*)

T_a – temperatura prijanjanja početnica (engl. *annealing temperature*)

T_m – temperatura mekšanja/denaturacije DNA (engl. *melting temperature*)

Wss1 – protein slabi supresor Smt3-1 (engl. *weak suppressor of Smt3-1*); DPC proteaza

wt – jedinka divljeg tipa (engl. *wild type*)

ΔC – mutacija delecije C-kraja proteina ACRC zebrice

ΔEMCH – mutacija delecije aminokiselina 451 – 454 (EMCH) proteina ACRC zebrice

1. UVOD

1.1. Unakrsne veze DNA-protein (DPC-ovi)

Molekula DNA sadrži gensku informaciju potrebnu živim bićima za rast, diferencijaciju, preživljenje i diobu. DNA je osjetljiva molekula koja se nalazi u kemijski vrlo reaktivnom okolišu. Kontinuirano dolazi do njenih oštećenja pod utjecajem različitih endogenih i egzogenih čimbenika. Gubitak integriteta molekule DNA rezultira različitim poremećajima u staničnim procesima i, posljedično, staničnom smrti te bolestima poput malignih tumora, dijabetesa, ubrzanog starenja ili neurodegeneracije (Jackson i Bartek, 2009). Kako bi očuvali genomski integritet, organizmi imaju razvijen složen sustav za njegovo održavanje, koji uključuje nekoliko puteva odgovora na oštećenje DNA (puteva DDR-a, engl. *DNA damage response*) i puteva tolerancije oštećenja DNA (puteva DDT-a, engl. *DNA damage tolerance*). Različiti putevi DDR-a uključeni su u prepoznavanje i popravak specifičnih vrsta DNA lezija (oštećenja molekule DNA), npr. popravak izrezivanjem (ekscizijom) baze ili BER (engl. *base excision repair*), popravak izrezivanjem nukleotida ili NER (engl. *nucleotide excision repair*), popravak krivo sparane baze ili MMR (engl. *mismatch repair*), put Fanconijeve anemije ili put FA (engl. *Fanconi anemia pathway*), popravak upravljan homologijom ili HDR (engl. *homology-directed repair*) te nehomologno spajanje krajeva ili NHEJ (engl. *non-homologous end-joining*). Trenutno je većina poznatih puteva DDR-a relativno dobro opisana. Međutim, još uvijek nije sasvim jasno kako stanice popravljaju unakrsne veze DNA-protein ili DPC-ove (engl. *DNA-protein crosslinks*), iako su DPC-ovi vrlo učestale DNA lezije i njihova je prisutnost citotoksična iz više razloga (Vaz i sur., 2017; Fielden i sur., 2018).

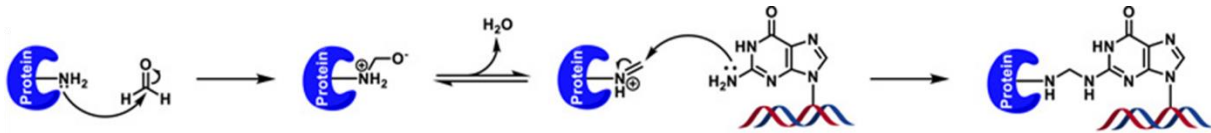
Genomi organizama kontinuirano su izloženi različitim oblicima oštećenja DNA. DPC-ovi su učestale DNA lezije koje nastaju kad protein (bilo koje veličine i drugih obilježja) postaje ireverzibilno kovalentno (unakrsno) vezan s DNA, obično nakon izlaganja fizikalnom ili kemijskom čimbeniku koji inducira (potiče) unakrsno vezanje, tj. nakon izlaganja induktoru DPC-ova. Induktori mogu biti endogeni i egzogeni. Endogeni su induktori DPC-ova a) nusprodukti staničnih metaboličkih reakcija, kao što su reaktivni oblici kisika (ROS-ovi, engl. *reactive oxygen species*), reaktivni oblici dušika (RNS-ovi, engl. *reactive nitrogen species*) i aldehidi (npr. formaldehid, acetaldehid, malondialdehid), te b) promjene u uzvojnici (heliksu) DNA, kao što su abazna (AP, apurinska/apirimidinska) mjesta, oksanini (deaminirani gvanini), urezi u lancu DNA (engl. *nicks*) i lomovi lanca DNA (engl. *breaks*). Egzogeni su induktori DPC-ova primjerice

ultraljubičasto (UV, engl. *ultraviolet*) i ionizirajuće zračenje, prijelazni metali te različiti kemoterapeutici (Kühbacher i Duxin, 2020). DPC-ovi su druge najčešće DNA lezije u stanicama. Češća su jedino abazna mjesta, koja se endogeno pojavljuju s učestalošću od oko 10 000 puta dnevno u genomu čovjeka po stanici te i sama mogu biti endogeni induktori DPC-ova u stanicama. DPC-ovi se pojavljuju s učestalošću od oko 6000 puta dnevno u genomu stanica sisavaca. U molekularnom kontekstu ta su oštećenja velika i predstavljaju fizičku prepreku za procese koji uključuju molekulu DNA: replikaciju, transkripciju, popravak, rekombinaciju DNA i remodeliranje kromatina. Zbog toga su putevi DPC popravka (popravka DPC-ova ili DPCR-a, engl. *DPC repair*) iznimno važni u prevenciji genomske nestabilnosti (tj. u održavanju genomskog integriteta), koja naposljetku može dovesti do razvoja različitih bolesti. Posljedice nepopravljenih DPC-ova djelomično su poznate, dok su komponente, regulacija i mehanizmi puteva DPC popravka još uvijek relativno neistraženo područje, iako privlače sve veće zanimanje istraživača posljednjih nekoliko godina. Na staničnoj razini narušeni DPC popravak rezultira nastajanjem dvolančanih lomova DNA (DSB-ova, engl. *DNA double-strand breaks*), genomskom nestabilnošću i/ili staničnom smrću, dok na razini organizma može uzrokovati maligne tumore, preuranjeno starenje i neurodegenerativne bolesti (Ruggiano i Ramadan, 2021; Vaz i sur., 2017).

1.1.1. Neenzimski i enzimski DPC-ovi

DPC-ovi nastaju kad se proteini ireverzibilno kovalentno (unakrsno) vežu s DNA uslijed izlaganja fizikalnim (npr. UV zračenju) ili kemijskim čimbenicima (npr. aldehidima), u slučaju neenzimskih DPC-ova, ili uslijed neispravnih enzimskih reakcija, u slučaju enzimskih DPC-ova (Stingele i Jentsch, 2015). Kod neenzimskih DPC-ova teoretski se bilo koji protein, bilo koje veličine, strukture i uloge, može unakrsno vezati s DNA ako se nalazi u njenoj blizini tijekom djelovanja čimbenika za indukciju DPC-ova. Formaldehid (FA) jedan je od najjačih induktora DPC-ova. Potiče unakrsno vezanje brojnih proteina, dakle nije specifičan. Prirodno je prisutan u staničnom okolišu jer nastaje u endogenim staničnim procesima kao što su lipidna peroksidacija te demetilacija DNA, RNA i histona. Izlaganje formaldehidu može biti i egzogeno, npr. preko pušenja, onečišćenog zraka, industrijskih smola, boja, ljepila te određenih prehrambenih, kozmetičkih i građevinskih proizvoda (Ruggiano i Ramadan, 2021). Procijenjeno je da endogena koncentracija formaldehida u krvi čovjeka, majmuna i štakora iznosi oko 100 μM , dok u nekim tkivima štakora može iznositi do 400 μM (Heck i Casanova, 2004). Nastajanje DPC-a potaknuto

formaldehidom uključuje nastajanje intermedijera Schiffove baze na aminokiselini proteina i bazi DNA, koji reagiraju i povezuju se metilenskom unakrsnom vezom, što je prikazano na Slici 1 (Tretyakova i sur., 2015). Formaldehid nastao u endogenim staničnim procesima lako se može naći u blizini DNA, stoga je nastajanje DPC-ova u stanicama kontinuirano, a stanice moraju imati razvijene mehanizme za njihov popravak kako bi izbjegle negativne posljedice tih DNA lezija.



Slika 1. Nastajanje unakrsne veze DNA-protein potaknuto formaldehidom. Mehanizam uključuje nastajanje intermedijera Schiffove baze na aminokiselini proteina i bazi DNA, koji reagiraju i povezuju se metilenskom unakrsnom vezom. Preuzeto i prilagođeno prema Tretyakova i sur., 2015.

Enzimski DPC-ovi mogu biti inducirani endogeno ako enzimi koji stupaju u interakciju s DNA tijekom svojih normalnih katalitičkih ciklusa naiđu na promjenu u uzvojnici DNA (npr. abazna mjesta) ili na lokalno povećanu koncentraciju aldehida ili ROS-ova. Egzogeno mogu biti inducirani uslijed djelovanja specifičnih egzogenih induktora DPC-ova, primjerice kemoterapeutika koji se vežu na određeni enzim i potiču ireverzibilno kovalentno vezanje enzima s okosnicom DNA. Poznati primjeri enzimskih DPC-ova su kompleksi za cijepanje topoizomeraze 1 (Topo-1) i topoizomeraze 2 (Topo-2), naziva Topo-1cc i Topo-2cc (engl. *topoisomerase-1/topoisomerase-2 cleavage complex*). Enzimi Topo-1 i Topo-2 relaksiraju superzavoje DNA (engl. *DNA supercoils*) tijekom replikacije i transkripcije. Relaksiranje se postiže dekateneranjem molekule DNA uz uvođenje jednonlačanih ili dvolančanih lomova i religaciju pocijepanih krajeva. Topo-1 uvodi jednonlačani ili dvolančani lom u DNA i veže se s 3'-krajem DNA, dok Topo-2 uvodi dvolančani lom i veže se s 5'-krajem (Ashour i sur., 2015). Tijekom normalne reakcije topoizomeraze s DNA, nastaje reverzibilni kovalentni intermedijer (kompleks za cijepanje) u kojem su fosfotirozilnom vezom (koja je fosfodieterska veza) povezani katalitički tirozin enzima i fosfatna grupa nukleotida DNA. Do stabilizacije kompleksa za cijepanje, tj. do nastajanja DPC-a, može doći spontano ako je DNA oštećena (enzim i DNA tada postaju vezani ireverzibilno kovalentno, odnosno unakrsno). Međutim, taj proces može biti induciran i djelovanjem određenih kemoterapeutika, kao što su kamptotecin (CPT, engl. *camptothecin*), koji inhibira Topo-1, i etopozid, koji inhibira Topo-2 (Pommier, 2009; Nitiss, 2009). CPT i etopozid inhibitori su

navedenih enzima i koriste se kao lijekovi u kemoterapiji (Stingele i sur., 2017). Enzimski DPC-ovi uključuju i enzim DNMT1 (DNA metiltransferazu 1) unakrsno vezan s 5-aza-2'-deoksicitidinom (5-aza-dC) ugrađenim u molekulu DNA. 5-aza-dC je inhibitor enzima DNMT1, tj. inhibitor metilacije DNA (Santi i sur., 1984; Maslov i sur., 2012). Još jedan enzimski DPC predstavlja protein HMCES (protein specifičan za embrionalne matične stanice koji veže 5-hidroksimetilcitozin, engl. *5-hydroxymethylcytosine-binding, ES-cell-specific*) unakrsno vezan s abaznim mjestima jednolančane DNA (Mohni i sur., 2019).

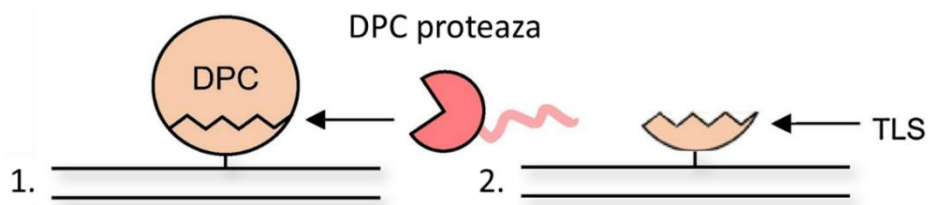
Spojevi koji induciraju DPC-ove uobičajeno imaju važnu primjenu u biomedicini, posebno kao kemoterapeutici u liječenju malignih tumora. Ti spojevi na različite načine inhibiraju određene proteine, a jedan od mehanizama inhibicije upravo je poticanje unakrsnog vezanja određenih proteina s DNA, tj. poticanje nastajanja DPC-ova, te tzv. zarobljavanje proteina na DNA (engl. *trapping*). Inducirani DPC-ovi ometaju replikaciju DNA u tumorskim stanicama te vezani proteini (enzimi) gube svoju aktivnost, što rezultira apoptozom tumorskih stanica. Primjeri učestalo korištenih kemoterapeutika uključuju već spomenuti kamptotecin (inhibira Topo-1), etopozid (Topo-2) i 5-aza-dC (DNMT1) te razne druge: olaparib i talazoparib (inhibiraju PARP-1, poli(ADP-riboza)polimerazu 1), doksorubicin i mitoksantron (Topo-2) te cisplatinu, koja potiče unakrsno vezanje različitih proteina s kompleksima DNA-platina (Fielden i sur., 2018). Njihova bi se učinkovitost mogla i povećati kad bi se induktori DPC-ova koristili u kombinaciji s inhibitorima enzima uključenih u DPC popravak (nukleaza, proteaza i esteraza). Istraživanja koja će opisati mehanizme enzima uključenih u DPC popravak i njihove inhibitore stoga imaju velik potencijal u otkrivanju zanimljivih pristupa koji bi se mogli iskoristiti za dizajniranje novih kemoterapeutika za liječenje malignih bolesti.

1.1.2. DPC popravak

Narušeni DPC popravak rezultira osjetljivošću na čimbenike za indukciju unakrsnih veza DNA-protein, pogreškama u replikaciji DNA i abnormalnostima staničnog ciklusa, što su prvi koraci u razvijanju kromosomske nestabilnosti te tumorigenezi u čovjeka i domaćeg miša (*Mus musculus*) (Ide i sur., 2018). Iz tog razloga postoje različiti stanični putevi koji popravljaju ovakva oštećenja. DPC-ovi se u stanicama popravljaju pomoću nukleaza, proteaza i/ili pomoću esteraza. DPC nukleaze cijepaju (razgrađuju/degradiraju, procesiraju) komponentu nukleinske kiseline koja

se nalazi u DPC-u (nukleolitički DPC popravak), dok DPC proteaze cijepaju proteinsku komponentu DPC-a (proteolitički DPC popravak). Putevi koji uključuju nukleaze, poput popravka izrezivanjem nukleotida (NER-a) i puta u kojem djeluje nukleaza Mre11 (koja je inače uključena u homolognu rekombinaciju), djeluju u prokariotskim i eukariotskim stanicama tako što najprije dolazi do cijepanja DNA komponente DPC-a, uz odvijanje ostalih kasnijih koraka potrebnih za popravak DNA. Međutim, trenutno se smatra da NER ima tek ograničenu ulogu u popravku DPC-ova jer može popraviti samo male DPC-ove (veličine 8 – 10 kDa u stanicama sisavaca). Pretpostavlja se da prvo djeluju DPC proteaze, koje djelomično cijepaju proteinsku komponentu DPC-a, a potom djeluju enzimi NER-a izrezivanjem sekvence (slijeda) nukleotida s kojom je vezan manji peptidni ostatak (Vaz i sur., 2017).

Translezijska sinteza DNA (TLS) mehanizam je tolerancije oštećenja DNA u kojem se uobičajeno korištena DNA polimeraza zamjenjuje TLS DNA polimerazom sklonom pogreškama (engl. *error-prone*). TLS polimeraza može tijekom sinteze DNA zaobići (engl. *bypass*) DNA leziju i ugraditi nukleotid u novi lanac DNA. Za TLS polimeraze je poznato da uglavnom zaobilaze samo manje prepreke (npr. pirimidinske dimere i abazna mjesta) te sve do nedavno nije bilo dokaza da TLS polimeraze zaista mogu zaobići unakrsno vezane peptide, koji su ipak nešto veće lezije. Naime, nedavno je pokazano da TLS polimeraze čovjeka tijekom replikacije mogu zaobići mali peptid od 15 aminokiselina unakrsno vezan s DNA te da pritom vjerojatno ugrađuju ispravan nukleotid u novi lanac DNA (Ghodke i sur., 2021). Moguće je da nakon DPC proteolize u određenim slučajevima djeluje TLS polimeraza kako bi se replikacija DNA mogla nastaviti u prisutnosti manjeg peptidnog ostatka (Slika 2), a s ciljem sprječavanja zastajanja i eventualnog kolapsa replikacijskih rašlji.



Slika 2. Put DPC popravka u kojem djeluju DPC proteaza i TLS polimeraza. Nakon djelovanja DPC proteaze, koja djelomično cijepa proteinsku komponentu DPC-a ostavljajući manji peptidni ostatak, djeluje TLS polimeraza, koja zaobilazi manji peptidni ostatak nastavljajući replikaciju DNA. DPC – unakrsna veza DNA-protein (engl. *DNA-protein crosslink*), TLS – translezijska sinteza DNA. Preuzeto i prilagođeno prema Fielden i sur., 2018.

Ranije spomenuti Topo-1cc i Topo-2cc mogu biti popravljani pomoću tirozil-DNA fosfodiesteraza 1 i 2 (TDP1 i TDP2, engl. *tyrosyl-DNA phosphodiesterase*), koje hidrolitički cijepaju fosfotirozilnu vezu. Fosfotirozilna veza postaje dostupna esterazama TDP1 i TDP2 tek nakon djelomičnog proteolitičkog cijepanja ili strukturnih promjena topoizomeraza (Pommier i sur., 2014; Gao i sur., 2014). Osim enzima TDP1, pokazano je da bi u popravak Topo-1cc mogla biti uključena i nukleaza APE2 sisavaca (APN2 je ortolog u kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*). Nukleaza APE2 vjerojatno uklanja blokirane 3'-krajeve DNA koji nastaju nakon proteolitičkog cijepanja kompleksa Topo-1cc (Álvarez-Quilón i sur., 2020). Moguće je i da 5'-endonukleaza XPF-ERCC1 sudjeluje u popravku Topo-1cc urezivanjem molekule DNA (Zhang i sur., 2011). Nedavno je pokazano da bi u popravak Topo-2cc mogla biti uključena, paralelno s TDP2, i SUMO-ligaza ZATT ili ZNF451 (engl. *zinc finger protein associated with TDP2 and TOP2*). SUMO-ilacija kompleksa Topo-2cc pomoću ligaze ZATT potiče regrutiranje enzima TDP2, što omogućuje oslobađanje intaktnog Topo-2 od DNA *in vitro*. SUMO-ilacija kompleksa Topo-2cc mijenja njegovu konformaciju, vjerojatno kako bi fosfotirozilna veza postala dostupna enzimu TDP2 (Schellenberg i sur., 2017). U popravku DPC-ova na dvolančanim lomovima DNA (npr. DPC-ova koje čine Topo-2 i Spo11) sudjeluje nukleaza Mre11 kao dio kompleksa MRN (Mre11/Rad50/Nbs1). Endonukleaznu aktivnost kompleksa MRN potiču proteinski adukti na 5'-kraju DNA (Deshpande i sur., 2016).

26S proteasom najbolje je opisana proteaza (proteazni kompleks), a cijepa različite stanične proteine koji su prethodno modificirani ubikvitinom. Osim što je ključan za održavanje homeostaze proteina i aminokiselina, uključen je i u regulaciju raznih drugih staničnih procesa, uključujući stanični ciklus, replikaciju, transkripciju, prijenos signala i odgovor na stres (Bard i sur., 2018), a možda je uključen i u DPC popravak. Uloga proteasoma u popravku DPC-ova dosad je pokazana neizravno za protein HMCES (Mohni i sur., 2019) te *in vitro* za ubikvitinirane modelne DPC-ove (Larsen i sur., 2019). Protein HMCES veže se s abaznim mjestima jednolančane DNA ispred replikacijskih rašlji, čime se sprječava replikacija TLS polimerazom i posljedične mutacije DNA. Neizravno je pokazano da se upravo HMCES unakrsno vezan s DNA vjerojatno ubikvitinira i potom cijepa pomoću proteasoma (Mohni i sur., 2019). Larsen i sur. (2019) pokazali su da je proteasom uključen u popravak modelnih DPC-ova *in vitro* te da je za njegovo regrutiranje (aktiviranje) potrebna ubikvitinacija DPC-a. Put popravka DPC-ova u koji je uključen proteasom neovisan je o putu u koji je uključen protein SPRTN (za koji nije potrebna ubikvitinacija DPC-a),

a oba puta djeluju tijekom replikacije DNA. Međutim, drugim istraživanjima još se uvijek nije uspjelo utvrditi je li proteasom, pored svih svojih ostalih uloga, uključen i u proteolitički DPC popravak, stoga to ostaje otvoreno pitanje.

Prethodno navedeni enzimi imaju tek ograničene uloge u popravku DPC-ova, dok je češći i rašireniji način DPC popravka u stanicama popravak proteolitičkim cijepanjem proteinske komponente DPC-a, koji obavljaju specijalizirane DPC proteaze, opisane u sljedećem poglavlju.

1.2. DPC proteaze

DPC proteaze cijepaju proteinsku komponentu DPC-a u procesu zvanom DPC proteoliza (engl. *DPC proteolysis*) (Vaz i sur., 2017; Stingele i sur., 2017). DPC proteoliza privukla je pažnju istraživača nakon otkrića metaloproteaza Wss1 (slabi supresor Smt3-1, engl. *weak suppressor of Smt3-1*) u kvasca (Stingele i sur., 2014) i SPRTN (SPARTAN ili DVC-1, protein koji sadrži N-terminalnu domenu nalik SprT, engl. *SprT-like N-terminal domain*) u viših eukariota (Vaz i sur., 2016). Obje proteaze imaju intrinzično metaloproteazno aktivno mjesto u specijaliziranim, ali filogenetski različitim proteaznim domenama: u domeni WLM (engl. *Wss1p-like metalloproteases*) proteina Wss1 i domeni SprT proteina SPRTN (Vaz i sur., 2017). Wss1 i SPRTN ovise o vezanju DNA kako bi obavljali svoju proteolitičku aktivnost, no nemaju definiranu specifičnost za određenu sekvencu nukleotida DNA ni sekvencu aminokiselina proteina (Vaz i sur., 2016). To se svojstvo smatra prednošću zbog heterogenosti proteina koji tvore unakrsne veze s DNA, ali isto tako predstavlja rizik neželjene proteolize (cijepanja) proteina povezanih s kromatinom koji obavljaju neku ulogu. DPC proteoliza mora biti strogo regulirana kako bi se taj rizik smanjio ili izbjegao. Sveobuhvatno razumijevanje ovih mehanizama još uvijek ne postoji. Osim DPC-ova i druge su vrste supstrata opisane za DPC proteaze, primjerice čvrsto (ali ne i unakrsno) vezani proteini. Sasvim je sigurno da DPC proteaze imaju višestruke uloge u održavanju genomskog integriteta u stanicama (Ruggiano i Ramadan, 2021).

1.2.1. DPC proteaze Wss1 i SPRTN

Proteini Wss1 i SPRTN prve su otkrivene DPC proteaze i jedine za koje je dosad dokazana proteolitička aktivnost u popravku DPC-ova. Proteolitički DPC popravak otkriven je u kvasca, u kojeg metaloproteaza Wss1 sudjeluje u tom procesu (Stingele i sur., 2014). Istraživanje na ekstraktima jajeta žabe roda *Xenopus* ukazalo je na sličan put u metazoa (mnogostaničnih životinja) (Duxin i sur., 2014), a ubrzo je otkriveno da je u taj put uključen protein SPRTN (Stingele i sur., 2016; Vaz i sur., 2016; Lopez-Mosqueda i sur., 2016). Filogenetske analize pokazale su da Wss1 i SPRTN nisu ortolozi, već funkcionalni homolozi (Vaz i sur., 2017; Fielden i sur., 2018; Reinking i sur., 2020). Sličnost njihovih aminokiselinskih sekvenci postoji u proteaznim domenama, prvenstveno oko aktivnog mjesta tipičnog za metaloproteaze, koje sadrži aminokiselinski motiv HEXXH (Vaz i sur., 2016). Wss1 i SPRTN pružaju otpornost na formaldehid, što upućuje na

njihovu općenitu ulogu u DPC popravku. To je potvrđeno i dokazano u nedavnim istraživanjima pomoću testova cijepanja proteina supstrata *in vitro*, koji su pokazali da Wss1 i SPRTN mogu cijepati proteine koji vežu DNA, proteine različitih veličina i struktura (Stingele i sur., 2014; Stingele i sur., 2016; Vaz i sur., 2016; Lopez-Mosqueda i sur., 2016). Strukturne analize domene WLM, proteazne domene proteina Wss1 kvasca, pokazale su da ona nema džep koji veže supstrat, stoga se u nju može smjestiti pregršt proteina različitih struktura (Yang i sur., 2017). Poznati supstrati proteina Wss1 *in vitro* jesu Topo-1, histon H1 i proteini HMG (engl. *high mobility group*) (Stingele i sur., 2014). SPRTN je također pleiotropna DNA-ovisna metaloproteaza, a njegovi poznati supstrati uključuju histone H1, H2A, H2B, H3 i H4, topoizomerase Topo-1 i Topo-2 te proteine HMG1, HLTF (engl. *helicase-like transcription factor*) i FAN1 (engl. *Fanconi anemia-associated nuclease*). DPC proteoliza ostavlja peptidni ostatak vezan s DNA, zasad nepoznate veličine. Iako je taj peptidni ostatak manja prepreka za replikaciju i transkripciju, on se mora ukloniti nekim drugim procesom (npr. pomoću nukleaza ili tirozil-DNA fosfodiesteraza) paralelno s proteolizom ili nakon nje (Vaz i sur., 2017). Odvijanje potonjih procesa još je uvijek nedovoljno opisano.

1.2.2. Novootkrivene DPC proteaze: protein ACRC

Nedavno su, uz proteaze Wss1 kvasca i SPRTN metazoa, otkrivene još neke proteaze koje su potencijalno uključene u DPC popravak: ACRC/GCNA (protein koji sadrži ponavljanja kiselih aminokiselina ili antigen jezgre germinativnih (spolnih) stanica, engl. *acidic repeat-containing protein* ili *germ cell nuclear antigen*), serinske proteaze FAM111A i FAM111B (engl. *family with sequence similarity 111 member A/B*), aspartatske proteaze DDI1 i DDI2 (engl. *DNA damage inducible 1/2*) u čovjeka te njihovi odgovarajući ortolozi u drugih vrsta. Od gena za navedene proteine, *SPRTN* je jedini esencijalan, tj. potreban za vijabilnost stanica sisavaca (Reinking i sur., 2020). Navedene novootkrivene proteaze nedavno su neizravno povezane s popravkom DPC-ova i cijepanjem proteina čvrsto vezanih s DNA. Međutim, ni za jednu od tih proteaza nije izravno dokazano da vrši proteolitičku aktivnost u popravku DPC-ova pomoću testova cijepanja proteina supstrata *in vitro*. Rezultati su zasad uglavnom neizravni i indikativni, kao što su rezultati testova osjetljivosti na određene induktore DPC-ova koji pokazuju povećanje razina DPC-ova u tretiranim stanicama i organizmima s odgovarajućom mutacijom. S obzirom na novootkriveni veći broj

proteaza trenutno je otvoreno pitanje u kolikoj se mjeri njihove uloge preklapaju, a koliko su specifične u kontekstu supstrata na koje djeluju te faza staničnog ciklusa i razvojnih stadija u kojima su aktivni.

Protein ACRC ili GCNA sadrži metaloproteaznu domenu SprT, koja je evolucijski očuvana (postojana, konzervirana) u eukariota (Fielden i sur., 2018; Carmell i sur., 2016). U metazoa je eksprimiran u germinativnim i pluripotentnim stanicama embrija. Nedavno je pokazano da bi mogao biti uključen u popravak Topo-2cc u germinativnim stanicama (Bhargava i sur., 2020; Dokshin i sur., 2020). Za ACRC ektopično eksprimiran u stanicama sisavaca u kulturi pokazano je da bi mogao biti uključen u popravak DPC-ova s DNMT1 induciranih dodatkom 5-aza-dC (Borgermann i sur., 2019). Gen *ACRC* nije esencijalan u staničnim linijama sisavaca, ali njegova ciljana inaktivacija (KO, engl. *knockout*) povećava smrtnost (letalnost) embrija u vinske mušice (*Drosophila melanogaster*), oblića *Caenorhabditis elegans* i zebrice (*Danio rerio*) (Bhargava i sur., 2020).

Izravni dokazi da proteini ACRC, DDI i FAM111 popravljaju DPC-ove trenutno nedostaju. Međutim, poznato je da FAM111 i DDI imaju katalitičku aktivnost. Pokazano je da FAM111A ima svojstvo samocijepanja (engl. *self-cleavage*) *in vitro* i u stanicama (Kojima i sur., 2020; Hoffmann i sur., 2020) te da Ddi1 kvasca i DDI2 čovjeka cijepaju *in vitro* supstrate s dugim lancima ubikvitina (Yip i sur., 2020; Dirac-Svejstrup i sur., 2020). Neka su istraživanja indicirala da specifične mutacije gena za ACRC (Bhargava i sur., 2020), Ddi1 kvasca (Serbyn i sur., 2020) i FAM111A (Kojima i sur., 2020; Hoffmann i sur., 2020) uzrokuju sintezu nefunkcionalnih proteina.

1.2.3. Uloge DPC proteaza: uloge proteina ACRC

Postojanje različitih DPC proteaza upućuje na to da su stanicama potrebni različiti enzimi kako bi izbjegle citotoksičnost DPC-ova. To je i očekivano s obzirom na heterogenost proteina koji se unakrsno vežu s DNA. Iako SPRTN nema specifično mjesto cijepanja supstrata, preferencijalno cijepa proteine koji vežu DNA u slabo strukturiranim regijama proteina koje su bogate lizinom, argininom i serinom (Vaz i sur., 2016). Postojanje alternativnih proteaza potencijalno bi osiguralo da se i proteini koji nemaju takva svojstva mogu učinkovito cijepati, a kako bi se u konačnici spriječila genomska nestabilnost. Uz neke sličnosti proteaznih domena, gdje se nalaze očuvane (pretpostavljene) katalitičke aminokiseline, proteaze djelomično dijele i sličnosti u općenitoj

organizaciji domena, što upućuje na njihovu potencijalno sličnu i/ili povezanu ulogu i regulaciju (Ruggiano i Ramadan, 2021).

U metazoa je protein ACRC najviše eksprimiran u germinativnim stanicama i ranim embrionalnim stadijima (Carmell i sur., 2016). Zbog toga je većina dosadašnjih istraživanja provedena na animalnim modelima, a ne na ljudskim stanicama. U vinske mušice i *C. elegans* mutacija gena *Acrc* uzrokuje a) replikacijski stres u germinativnim stanicama i embrijima, što je pokazano nastajanjem žarišta (engl. *nuclear foci*) RPA/ γ H2AX u jezgri (RPA od engl. *replication protein A*) i osjetljivošću na hidrokisireju (HU), te b) genomsku nestabilnost, što je pokazano poremećajima segregacije kromosoma i nastajanjem mikrojezgara. Žarišta RPA/ γ H2AX nastaju kao dio staničnog odgovora na dvolančane lomove DNA, a HU je inhibitor ribonukleotid-reduktaze. Opisane pojave općenito uzrokuju smanjeni reprodukcijski potencijal. Poremećaji fertiliteta (plodnosti) *C. elegans* dodatno su pogoršani ako je uz *Acrc* mutiran i *Dvc-1* (homolog gena *SPRTN*) (Bhargava i sur., 2020; Dokshin i sur., 2020). Embriji vinske mušice s mutiranim genima *acrc* i *mh* (engl. *maternal haploid*, homolog gena *SPRTN*) ne završavaju embriogenezu. Mutacijom (delecijom) gena *Acrc* dolazi do povećanja razine ukupnih DPC-ova u germinativnim stanicama i ranim embrijima vinske mušice, *C. elegans* i zebrice (Bhargava i sur., 2020), a Topo-2cc su među najviše prisutnim DPC-ovima (Bhargava i sur., 2020; Dokshin i sur., 2020). Embriji *C. elegans* mutanti za *Dvc-1* i *Acrc* jednako su osjetljivi na formaldehid, što upućuje na potencijalno funkcionalno preklapanje proteina DVC-1 i ACRC (Borgermann i sur., 2019).

Kako bi opisali ulogu proteina ACRC u kralježnjaka, Bhargava i sur. (2020) uzgojili su zebrice mutante za gen *Acrc*, i to mutante koji su imali pomak okvira čitanja i preuranjeni stop-kodon na početku gena, kod kojih se nije mogao sintetizirati funkcionalan protein ACRC. Potomstvo ženki homozigotnih mutanti za *Acrc* (embriji stari 27 h) imalo je različite morfološke poremećaje i 100 %-tnu smrtnost, bez obzira na genotip mužjaka s kojim je ženka križana (mužjaci su bili ili divljeg tipa ili homozigotni mutanti za *Acrc*). Proučavanjem istih embrija (u stadiju 64 – 128 stanica) i usporedbom s embrijima divljeg tipa, uočili su asinkronizirane mitotske diobe i kromosomske mostove. Ti rezultati upućuju na to da mutacija gena *Acrc* zebrice rezultira smrtnošću po majčinskom učinku (engl. *maternal-effect lethality*) koju obilježava kromosomska nestabilnost. Sličan fenotip isti su istraživači uočili u vinske mušice i *C. elegans*. Dakle protein ACRC vjerojatno je esencijalan za rani embrionalni razvoj zebrice po majčinskom učinku. Drugim

riječima, produkti majčinog gena *Acrc* (mRNA za ACRC i/ili proteini ACRC) koji se prenose citoplazmom jajne stanice imaju učinak na fenotip potomaka i esencijalni su za njihov rani embrionalni razvoj. Vjerojatno su bitni za održavanje genomske stabilnosti u stanicama embrija, iako mehanizmi njihova djelovanja nisu poznati. Kako bi uvidjeli je li mutacija gena *Acrc* rezultirala povećanim razinama DPC-ova, proveli su test RADAR (engl. *rapid approach to DNA adduct recovery*) na embrijima zebrice (u stadiju od 1000 stanica), pomoću kojeg su uočili blago povećane razine DPC-ova u embrijima potomcima roditelja s mutacijom. Testom RADAR izoliraju se i detektiraju DPC-ovi iz stanica ili tkiva (Bhargava i sur., 2020). Povećane razine DPC-ova upućuju na moguću ulogu proteina ACRC u DPC popravku u zebrice.

Germinativne stanice i embriji posebno su osjetljivi na genomsku nestabilnost koja je rezultat nakupljanja DPC-ova jer bi se takve pogreške mogle prenijeti na potomstvo ili stanice mladog organizma. Također, promjene obrazaca ekspresije gena i demetilacije histona tijekom embriogeneze mogle bi posebno izložiti germinativne stanice nastalom formaldehidu i stvaranju DPC-ova, a upravo bi sprječavanje nasljeđivanja nastalih pogrešaka moglo biti jedno od objašnjenja za potrebom djelovanja više DPC proteaza (Ruggiano i Ramadan, 2021).

1.2.3.1. DPC proteaze u S-fazi

DPC-ovi mogu zaustaviti kompleks CMG (Cdc45-Mcm2-7-Gins), replikacijski kompleks DNA helikaze, i/ili DNA polimerazu tijekom replikacije DNA, ovisno o njihovoj veličini i poziciji na replikacijskim rašljama (Duxin i sur., 2014; Nakano i sur., 2013). Stanice koje se aktivno dijele (stanice koje prolaze S-fazu) osjetljivije su na formaldehid i kamptotecin od stanica koje se ne dijele (Vaz i sur., 2016; Hsiang i sur., 1989; Kumari i sur., 2012). Ako se ne poprave, DPC-ovi kao prepreke mogu uzrokovati produljeno zastajanje replikacijskih rašlji, koje vodi kolapsu rašlji, nastajanju dvolančanih lomova DNA i genomskoj nestabilnosti (Cortez, 2019). Pretpostavlja se da u kvasca protein Wss1 osigurava uspješan završetak replikacije DNA nakon izlaganja formaldehidu (Stinglee i sur., 2014), dok se Ddi1 regrutira na mjesto oštećenja radi uklanjanja modelnog DPC-a u kvašćevim stanicama sinkroniziranim u S-fazi (Serbyn i sur., 2020). Za protein FAM111A također postoje indikacije da je aktivan u stanicama tijekom S-faze (Kojima i sur., 2020). Međutim, popravak DPC-ova u kontekstu replikacije DNA izravnije je pokazan jedino za

SPRTN, koji putuje s replisomom tijekom replikacije (Vaz i sur., 2016), iako je još uvijek nepoznato kako SPRTN stupa u interakciju s replisomom s ciljem popravka DPC-ova u S-fazi.

Protein ACRC također je aktivan u S-fazi. Postojanje replikacijskog stresa (nastajanje žarišta RPA/ γ H2AX) u mitotski aktivnim germinativnim stanicama vinske mušice i *C. elegans* s mutiranim genom *acrc* ukazuje na njegovu ulogu tijekom replikacije DNA, kao i nastajanje DPC-ova u kojima se nalaze komponente Mcm2-7 kompleksa helikaze CMG u embrijima vinske mušice s mutiranim genom *acrc* (Bhargava i sur., 2020). Jedno je istraživanje pokazalo da bi ACRC mogao imati ulogu u popravku unakrsnih veza proteina DNMT1 (Borgermann i sur., 2019). Unakrsne veze proteina DNMT1 nastaju iza replikacijskih rašlji, gdje se DNMT1 regrutira na novonastalu DNA kako bi se održao obrazac metilacije DNA (metilacijom citozina), a unakrsno se može vezati s DNA u prisutnosti 5-aza-dC ugrađenog u lanac na mjestu citozina (Maslov i sur., 2012). Još ostaje potvrditi je li ACRC zaista ključan za popravak DPC-ova proteina DNMT1 te koji su još DPC-ovi njegovi supstrati u S-fazi. Otvoreno je pitanje zašto bi dvije DPC proteaze (ili više njih) bile aktivne tijekom S-faze, tj. koja je funkcionalna razlika između proteaza ACRC i SPRTN.

1.2.3.2. DPC proteaze izvan S-faze

Unatoč brojnim dokazima koji povezuju protein SPRTN s DPC proteolizom u kontekstu replikacije, trenutno se ne može tvrditi da SPRTN nema i ulogu neovisnu o replikaciji (Stinglee i sur., 2016; Vaz i sur., 2016). Primjerice, mutacije gena *SPRTN* ili njegova insuficijencija mogu uzrokovati hepatocelularni karcinom u čovjeka i miša (Maskey, 2017; Lessel i sur., 2014). Jetra je vjerojatno izloženija od drugih organa nastajanju DPC-ova zato što tvari koje se udišu ili unose prehranom mogu u jetri biti razgrađene do formaldehida, koji potom inducira nastajanje DPC-ova. Međutim, većina je hepatocita mirujuća (nalaze su u G₀-fazi) (Grisham, 1962), tj. većina stanica ne prolazi S-fazu staničnog ciklusa, stoga je moguće da SPRTN djeluje i izvan S-faze. Poznato je također da ekspresija mutiranog proteina mh (homologa proteina SPRTN) s majčinog kromosoma u zigoti vinske mušice rezultira gubitkom očevih kromosoma tijekom prve mitotske diobe i smrću haploidnih embrija. Do gubitka očevih kromosoma dolazi zbog nedostatka kondenzacije očeve DNA tijekom mitoze, što se odvija izvan S-faze, a mehanizam još nije razjašnjen (Delabaere i sur., 2014).

Protein ARCR također moguće proteazno djeluje izvan S-faze. Njegova je ekspresija najveća tijekom mitoze, kad se lokalizira na kromosomima (Dokshin i sur., 2020). Kompleksi Topo-2cc potencijalni su supstrati proteina ACRC (Bhargava i sur., 2020; Dokshin i sur., 2020), a oni su obilni u mitozu zato što je aktivnost Topo-2 potrebna za odvajanje sestrinskih kromatida. Na ulogu proteina ACRC u popravku Topo-2cc upućuje otkriće da ACRC i Topo-2 stupaju u interakciju u *C. elegans* i miša, da se kolokaliziraju na kondenziranim kromosomima tijekom mitoze u embrijima *C. elegans*, te da je *C. elegans* s mutacijom gena *Acrc* osjetljiv na etopozid, specifični induktor DPC-ova kompleksa Topo-2cc, ali ne i na kamptotecin, specifični induktor DPC-ova kompleksa Topo-1cc (Dokshin i sur., 2020). Zaključno, dosad prikupljeni rezultati upućuju na to da su DPC proteaze važne u održavanju genomske integriteta tijekom replikacije DNA, a moguće i izvan S-faze staničnog ciklusa.

1.2.3.3. DPC proteaze i transkripcija

DPC-ovi su, osim za replikaciju DNA, potencijalne prepreke i za uspješno odvijanje transkripcije (Ide i sur., 2018). Iako zastajanje i mutageneza transkripcije mogu biti prijetnja za genomsku stabilnost (Brégeon i Doetsch, 2011), učinci DPC-ova na napredovanje (progresiju) RNA polimeraza tijekom transkripcije uglavnom su neistraženo područje. Ipak, neki dokazi povezuju DPC proteaze s transkripcijom. Primjerice, pokazano je da Rpb1 (najveću i katalitičku podjedinicu RNA polimeraze II) potencijalno cijepaju proteaze Ddi1 i Wss1 kvasca nakon izlaganja hidroksiureji ili UV zračenju. Obje proteaze stupaju u izravnu interakciju s Rpb1 (Serbyn i sur., 2020). Opisana je i veza između podjedinice Rpb1 i proteaze FAM111A u ljudskim stanicama: povećana razina ekspresije FAM111A rezultira smanjenim razinama Rpb1 na kromatinu, a proteini također stupaju u interakciju (Hoffmann i sur., 2020).

1.2.3.4. DPC proteaze i cijepanje proteina čvrsto vezanih s DNA

Provedene su analize masenom spektrometrijom na DPC-ovima izoliranim iz stanica koje nemaju ekspresiju proteina SPRTN (Vaz i sur., 2016) i ACRC (Bhargava i sur., 2020) kako bi se utvrdilo koji su proteini najčešće unakrsno vezani s DNA. Ta su pretraživanja pokazala da su topoizomeraze, histoni i komponente Mcm kompleksa helikaze CMG najčešći proteini u DPC-ovima stanica bez ekspresije proteina SPRTN i vinskih mušica s mutiranim genom *acrc* (Vaz

i sur., 2016; Bhargava i sur., 2020). Očekivano je da se u takvim pretraživanjima pronađu proteini koji vežu DNA, jer se pretpostavlja da će proteini koji djeluju u blizini DNA češće od drugih proteina biti ireverzibilno kovalentno (unakrsno) vezani s DNA. Međutim, proteini koji se nalaze u blizini DNA mogu s njom biti vezani i tzv. čvrsto, ali neunakrsno. Proteini i DNA obično su u tom slučaju vezani kovalentnim vezama, ali mogu biti vezani i drugim vrstama interakcija, npr. van der Waalsovima ili hidrofobnim interakcijama, vodikovim ili ionskim vezama. Priroda ovih veza te razlike između unakrsno i čvrsto vezanih proteina nisu potpuno jasni i istraženi. Nekoliko je istraživanja pokazalo da bi DPC proteaze mogle biti uključene i u cijepanje proteina koji su čvrsto vezani s DNA kako bi stanice bile zaštićene od pogrešaka u replikaciji. Npr. Wss1 potencijalno cijepa takve histone (Maddi i sur., 2020), FAM111A enzim PARP-1 (Kojima i sur., 2020), a SPRTN kinazu Chk1 (engl. *checkpoint kinase 1*) (Halder i sur., 2019).

1.2.4. Regulacija DPC proteaza

Aktivne DPC proteaze potencijalno su opasne za sve proteine, stoga stanice imaju razvijene regulacijske mehanizme kako bi ograničile njihovu aktivnost. Primjerice, Wss1 i SPRTN postaju aktivni tek nakon vezanja s jednolančanom DNA (ssDNA, engl. *single-stranded DNA*) i dvolančanom DNA (dsDNA, engl. *double-stranded DNA*) (Stingele i sur., 2016; Vaz i sur., 2016). Na taj su način proteini jezgre koji se ne nalaze u blizini kromatina zaštićeni od neželjenog cijepanja proteazama (Li i sur., 2019). Također, Wss1 i SPRTN imaju svojstvo samocijepanja *in trans* u prisutnosti DNA, što je regulacijski mehanizam za zaustavljanje proteazne aktivnosti kad se enzimi nađu na kromatinu na kojem nema DPC-ova, tj. kad njihova aktivnost nije potrebna. Postoji fina regulacija između aktiviranja proteazne aktivnosti ovih proteaza radi popravka DPC-ova i njihove inaktivacije samocijepanjem, međutim detalji takve regulacije još su nepoznati (Stingele i sur., 2016). Još jedan aspekt regulacije aktivnosti DPC proteaza jesu posttranslacijske modifikacije (fosforilacija, ubikvitinacija, SUMO-ilacija i acetilacija) DPC proteaza i/ili njihovih supstrata te interakcije proteaza s proteinima partnerima, koji također mogu biti modificirani. SPRTN primjerice stupa u interakcije s proteinom PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*), ATPazom p97 i proteinom TEX264 (engl. *testis expressed 264*), koji veže Topo-1 (Ruggiano i Ramadan, 2021). Interakcijski partner TEX264 prepoznaje Topo-1cc na kromatinu tijekom replikacije te regrutira SPRTN i p97 na mjesto Topo-1cc, što je korak potreban za kasnije

djelovanje enzima TDP1, koji uklanja manji peptidni ostatak zaostao nakon proteolize proteinom SPRTN (Fielden i sur., 2020).

Posttranslacijske modifikacije (PTM-ovi) općenito imaju velik regulacijski potencijal. DPC proteaze mogu vezati mali protein ubikvitin svojom domenom povezanom s ubikvitinom (UBA, engl. *ubiquitin-associated domain*) ili domenom cinkova prsta koja veže ubikvitin (UBZ, engl. *ubiquitin-binding zinc finger*), ili mogu vezati mali protein SUMO (engl. *small ubiquitin-like modifier*) svojim motivom za interakciju s proteinom SUMO (SIM, engl. *SUMO-interacting motif*) (Stingele i sur., 2014; Stingele i sur., 2016; Borgermann i sur., 2019). Tretman stanica induktorima DPC-ova (npr. formaldehidom ili 5-aza-dC) potiče signalne kaskade koje završavaju modifikacijama unakrsno vezanih proteina ubikvitinom ili proteinom SUMO (Borgermann i sur., 2019; Vaz i sur., 2020; Sun i sur., 2020). Trenutno se pretpostavlja da je regrutiranje ili zadržavanje proteaza na mjestu oštećenja DNA regulirano PTM-ovima. Primjerice, ACRC se pojavljuje na kromatinskim žarištima proteina DNMT1 koji nastaju nakon tretmana 5-aza-dC, a to je lokaliziranje ovisno o SUMO-ilaciji DPC-ova i motivima SIM proteina ACRC, koji prepoznaju SUMO (Borgermann i sur., 2019). SPRTN formira žarišta u jezgri nakon izlaganja formaldehidu, a ne formira ih uslijed farmakološke inhibicije puta ubikvitinacije, iako još nije dokazano da regrutiranje proteina SPRTN na mjesto DPC-a ovisi o njegovoj domeni UBZ (Borgermann i sur., 2019; Vaz i sur., 2020). I same DPC proteaze mogu biti posttranslacijski modificirane. SPRTN je tako reguliran ubikvitinacijom i fosforilacijom. U normalnim je uvjetima monoubikvitiniran, dok nakon izlaganja formaldehidu gubi ubikvitin i lokalizira se na kromatinu (Stingele i sur., 2016). Predložen je model u kojem SPRTN može biti reguliran i fosforilacijom u povratnoj sprezi s kinazom Chk1, gdje SPRTN cijepa C-kraj Chk1 i oslobađa njezin aktivni N-kraj s kromatina. Cjelovite kinaze Chk1 ili samo njihovi N-krajevi potom fosforiliraju SPRTN, što potiče njegovo regrutiranje na kromatin i naposljetku popravak DPC-ova tijekom replikacije DNA (Halder i sur., 2019). Sumarno, inicijalna istraživanja ukazuju na to da bi aktivnost DPC proteaza mogla biti regulirana, između ostalog, posttranslacijskim modifikacijama samih proteaza, njihovih supstrata i njihovih interakcijskih partnera.

1.2.5. DPC proteaze i bolesti

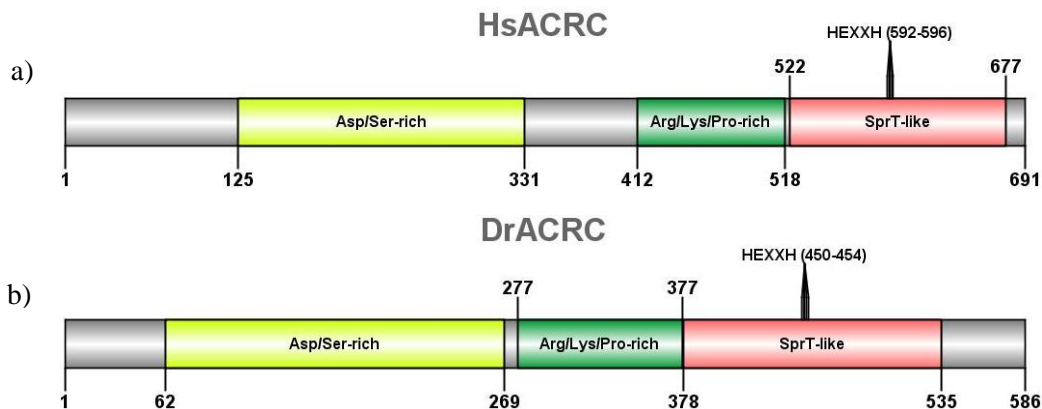
Replikacijski stres jedan je od glavnih uzroka malignih tumora (Gaillard i sur., 2015). Replikacijski stres može biti potaknut preprekama ispred replikacijskih rašlji koje mogu činiti, između ostalog, proteini koji su ireverzibilno kovalentno (unakrsno) ili čvrsto vezani s DNA. Neke ljudske bolesti ukazuju na vezu između narušenog DPC popravka, replikacijskog stresa i razvoja tumora.

Mutacije gena *SPRTN* čovjeka uzrokuju rijetku autosomalnu recesivnu progeroidnu bolest RJALS (Ruijs-Aalfsov sindrom). RJALS je prva i za sada jedina bolest koja je izravno povezana s narušenim proteolitičkim DPC popravkom, do kojeg dolazi zbog mutacija u genu *SPRTN* (Vaz i sur., 2016). Bolesnici pokazuju znakove preuranjenog starenja (imaju katarakte, sijedu kosu, lipodistrofiju) te rano razvijaju hepatocelularni karcinom. Stanice pacijenata koji imaju RJALS karakteriziraju replikacijski stres, povećan broj dvolančanih lomova DNA, kromosomske aberacije i povećana razina ukupnih DPC-ova (Lessel i sur., 2014).

Mutacije gena *FAM111A* uzrokuju KCS2 (Kenny-Caffeyjev sindrom tipa 2), rijetku autosomalnu dominantnu bolest koju karakteriziraju nizak rast, hipoparatiroidizam, hipokalcijemija i abnormalan razvoj kostiju. Heterozigotne mutacije gena *FAM111A* također su opisane u pacijenata koji imaju GCLEB (displaziju krhkih kostiju, engl. *gracile bone dysplasia*) ili osteokraniostenozu. GCLEB je letalan u novorođenčadi zbog značajnih koštanih abnormalnosti. Pretpostavlja se da mutacije koje uzrokuju KCS2 i GCLEB mijenjaju proteolitičku aktivnost proteina FAM111A, međutim ta veza još nije dokazana (Isojima i sur., 2014; Unger i sur., 2013). Mutacije gena *ACRC* povezane su s dječjim tumorima germinativnih stanica (GCT-ovima, engl. *pediatric germ cell tumors*). Gen *ACRC* u čovjeka se nalazi na kromosomu X. Smanjena razina ekspresije gena *acrc* (zbog gubitka kopije gena i hipermetilacije promotora) opisana je u 66 % GCT-ova i korelira s lošom prognozom za pacijenta (Bhargava i sur., 2020). Taj podatak upućuje na ulogu proteina ACRC u održavanju genomske stabilnosti germinativnih stanica, međutim veza s DPC popravkom tek treba biti utvrđena.

1.3. Evolucijska očuvanost i građa proteina ACRC

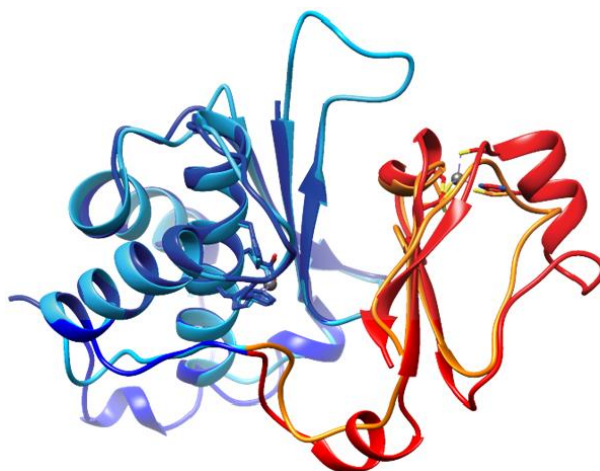
Rano u embrionalnom razvoju metazoa, primordijalne germinativne stanice odvajaju se od somatskih stanica i prolaze specifičan razvojni put kako bi održale genomski integritet tijekom generacija. Protein ACRC očuvan je tijekom 1,5 milijardi godina evolucije vrsta. Budući da ima visoku razinu ekspresije u germinativnim stanicama metazoa, smatra se da je prvenstveno povezan sa spolnim razmnožavanjem i plodnošću (Carmell i sur., 2016). ACRC sadrži N-terminalnu kiselinu intrinzično neuređenu regiju (IDR, engl. *intrinsically disordered region*), koja je očuvana unatoč divergenciji sekvence aminokiselina između vrsta. U svih skupina metazoa, osim u sisavaca reda Rodentia (tj. u glodavaca, primjerice miša i štakora, *Rattus norvegicus*), ortolozi proteina ACRC sadrže i C-terminalnu proteaznu domenu SprT (Slika 3), motiv cinkova prsta (ZnF, engl. *zinc finger*) te HMG kutiju (engl. *high mobility group box*). HMG kutija i ZnF poznati su motivi koji vežu DNA (Bhargava i sur., 2020). Iako je građa proteina poznata, malo je informacija dostupno o njegovoj ulozi u stanicama. Najnovija ga istraživanja povezuju s DPC popravkom, no još uvijek nema dokaza o proteolitičkoj aktivnosti proteina ACRC niti je određena njegova kristalna struktura.



Slika 3. Građa proteina ACRC a) čovjeka i b) zebriće. Prikazi su izrađeni u programu IBS 1.0.3 (Illustrator for Biological Sequences). Brojevima su označene aminokiseline koje odjeljuju određene dijelove proteina. HsACRC – protein ACRC čovjeka (*Homo sapiens*), DrACRC – protein ACRC zebriće (*Danio rerio*), Asp/Ser-rich – regija bogata aspartatom i serinom, Arg/Lys/Pro-rich – regija bogata argininom, lizinom i prolinom, SprT-like – domena nalik domeni SprT, HEXXH – motiv HEXXH (H – histidin, E – glutamat, X – bilo koja aminokiselina).

Fielden i sur. (2018) proveli su filogenetsku analizu aminokiselinskih sekvenci domena SprT i WLM različitih vrsta te zaključili da su ortolozi proteina ACRC filogenetski vrlo bliski ortolozima proteina SPRTN obitelji SPRT, dok su udaljeniji od ortologa Wss1 obitelji WLM.

Ortolozni proteina ACRC pronađeni su u arheja i eukariota, dok ih nije bilo u bakterija. Također, molekularnim modeliranjem *in silico* ustanovili su da je 3D struktura proteazne jezgre domene SprT proteina ACRC čovjeka vrlo slična strukturi proteazne jezgre domene SprT proteina SPRTN čovjeka (Slika 4). Pretpostavljena proteazna jezgra proteina ACRC sadrži dva α -heliksa koji imaju tri histidina (histidini koordiniraju ion cinka) i katalitički glutamat, isto kao proteazna jezgra proteina SPRTN. Prva dva histidina (H) i glutamat (E) zajedno čine motiv HEXXH, motiv karakterističan za metaloproteaze ovisne o cinku. Iako imaju slične proteazne jezgre, SPRTN i ACRC znatno se razlikuju u aminokiselinskoj sekvenci i organizaciji domena. Primjerice, upravo je domena SprT smještena na N-kraju proteina SPRTN, dok je u proteina ACRC smještena na C-kraju. ACRC je velikim dijelom neuređen protein: pretpostavlja se da 80 % aminokiselinske sekvence ima visoku razinu neuređenosti, i to na N-kraju proteina (prve dvije trećine proteina; regija IDR). SPRTN je međutim djelomično neuređen (56 % sekvence je neuređeno), i to na svojem C-kraju (Fielden i sur., 2018).



Slika 4. Superimponirana struktura domene SprT proteina SPRTN čovjeka (PDB: 6MDX) i predikcija strukture domene SprT proteina ACRC čovjeka. Metaloproteazna subdomena (proteazna jezgra) proteina SPRTN obojena je plavo, a ACRC svjetloplavo; subdomena koja veže cink proteina SPRTN obojena je crveno, a ACRC narančasto; ioni cinka prikazani su kao sive kuglice, a aminokiseline koje koordiniraju cink kao sivi štapići. Prikaz je izradila dr. sc. Nives Ivić (Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska) u programu Modeller (osobna komunikacija).

1.4. Primjena sustava CRISPR/Cas u genetičkom inženjerstvu

Od 2012. godine sve veći značaj u znanstvenoj zajednici dobivaju metode temeljene na prokariotskom sustavu CRISPR/Cas9 (CRISPR od engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, Cas9 od engl. *CRISPR-associated protein-9*). Do danas su se razvile brojne tehnike za ciljano i precizno mijenjanje sekvence DNA u stanicama i dalje se razvijaju, a sustav CRISPR trenutno ima središnje mjesto u genetičkom inženjerstvu i uređivanju genoma (engl. *genome editing*). Za rad na razvoju metode za uređivanje genoma CRISPR/Cas9 znanstvenice Emmanuelle Charpentier i Jennifer A. Doudna dobile su Nobelovu nagradu za kemiju 2020. godine. Neke od metoda koje su se koristile za ciljano uređivanje genoma prije početka primjene sustava CRISPR/Cas uključivale su nukleaze cinkova prsta (ZFN, engl. *zinc finger nucleases*) te efektorske nukleaze nalik aktivatoru transkripcije (TALEN, engl. *transcription activator-like effector nucleases*) (Li i sur., 2021).

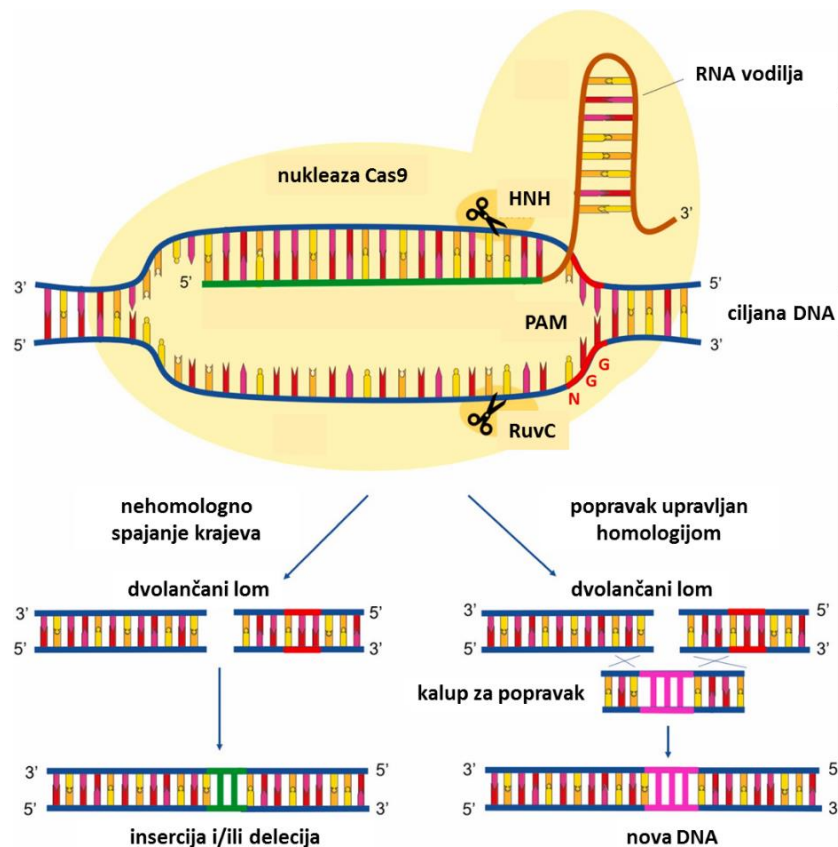
2012. godine otkriveno je da sustav CRISPR/Cas9 bakterije *Streptococcus pyogenes* ima velik potencijal u genetičkom inženjerstvu. Njezin sustav CRISPR/Cas9 sastoji se od sekvenci CRISPR, koje kodiraju molekule RNA (one djeluju kao vodilje za Cas9), te endonukleaze Cas9, koja uvodi dvolančane lomove u DNA (DSB-ove) (Jinek i sur., 2012). U odnosu na ranije spomenute tehnike (temeljene na nukleazama ZFN i TALEN), CRISPR je jednostavniji jer koristi jednu kratku RNA vodilju (gRNA, engl. *guide RNA*), čija sekvenca određuje gdje će u molekuli DNA biti uveden DSB te nema potrebe za zahtjevnom i skupom sintezom nukleaza specifičnih za određenu sekvencu DNA (Lino i sur., 2018). Sustav je prirodno evoluirao u prokariota kao sustav zaštite od bakteriofaga i plazmida, a danas se u molekularnoj biologiji koristi kao izrazito učinkovit sustav za uređivanje genoma s brojnim primjenama. Metode temeljene na sustavu CRISPR omogućuju učinkovito ciljanje i mijenjanje sekvence DNA u stanicama desetaka vrsta (uključujući stanice čovjeka i drugih eukariota). Često se koriste u laboratorijima iako još uvijek postoje određeni tehnički nedostaci i izazovi koje treba savladati (Kozovska i sur., 2021).

Sustavi CRISPR podijeljeni su u šest tipova (I – VI), koji su grupirani u dva razreda (1 i 2) s obzirom na aminokiselinsku sekvencu i strukturu proteina Cas. Najčešće je korišten sustav CRISPR tipa II, koji je ujedno i najjednostavniji. Istražuju se i razvijaju nove varijante proteina Cas vođenih molekulama gRNA koje bi mogle zadovoljiti specifične primjene (Nidhi i sur., 2021).

1.4.1. Popravak dvolančanog loma DNA

Ribonukleoproteinski kompleks proteina Cas i molekule gRNA prepoznaje sekvencu u genomskoj DNA koja je komplementarna sekvenci gRNA te uvodi dvolančani lom na ciljanom mjestu. Stanica zatim popravlja DSB najčešće na jedan od dvaju načina: nehomolognim spajanjem krajeva (NHEJ-om) ili popravkom upravljanim homologijom (HDR-om), tj. homolognom rekombinacijom (HR-om) (Slika 5).

NHEJ koristi stanične enzime za popravak kako bi se religirali krajevi pocijepane DNA, bez potrebe za homolognim kalupom za popravak (RT-om, engl. *repair template*), ali su obično potrebne kratke homologne sekvence DNA u blizini krajeva mjesta loma, tzv. mikrohomologije duljine 1 – 4 nukleotida. Potonji je proces sklon pogreškama i relativno neprecizan jer postoji velika šansa za uvođenje mutacija (insercija i/ili delecija) u sekvenci DNA na mjestu popravka, što se eksperimentalno koristi za uvođenje mutacija u genima od interesa (Hefferin i Tomkinson, 2005). Za HDR je potreban homologni kalup za popravak, koji može biti endogen (izvor kalupa je sama stanica; obično je kalup sestrinska kromatida) ili dodan egzogeno. Ukratko, osnovni koraci HDR-a uključuju: izrezivanje (engl. *resection*) krajeva DNA na mjestu loma kako bi nastali 3'-jednolančani krajevi, nastajanje filamenata 3'-jednolančanih krajeva s vezanim proteinom RAD51, invaziju filamenata u homolognu DNA i naposljetku sintezu DNA pomoću DNA polimeraze i odvajanje lanaca. HDR se može koristiti za izmjenu sekvence DNA na mjestu DSB-a ako se egzogeno doda kalup za popravak koji ima željenu mutaciju. Proces je općenito manje učinkovit od NHEJ-a (Chen i sur., 2018). Osim NHEJ-a i HDR-a, koji su najčešći, poznata su još dva mehanizma popravka dvolančanih lomova u stanicama: alternativni NHEJ (alt-NHEJ) ili spajanje krajeva posredovano mikrohomologijom (MMEJ, engl. *microhomology-mediated end joining*) te prijanjanje jednolančanih krajeva (SSA, engl. *single-strand annealing*) (Yang i sur., 2020).



Slika 5. Djelovanje nukleaze Cas9 i popravak dvolančanog loma DNA. Nukleaza Cas9 upravljana RNA vodiljom dolazi do ciljanog mjesta na genomskoj DNA i uvodi dvolančani lom. Popravak dvolančanog loma DNA u stanici najčešće se odvija na jedan od dvaju načina: nehomolognim spajanjem krajeva ili popravkom upravljanim homologijom. Detalji su objašnjeni u tekstu. HNH – domena nukleaze nalik HNH, RuvC – domena nukleaze nalik RuvC, PAM – engl. *protospacer adjacent motif*. Preuzeto i prilagođeno prema Kozovska i sur., 2021.

1.4.2. Komponente sustava CRISPR/Cas

Funkcionalni sustav CRISPR/Cas zahtijeva tri osnovne komponente: endonukleazu (Cas9) i dvije male molekule RNA, crRNA (CRISPR RNA) i tracrRNA (engl. *trans-activating crRNA*). Molekula crRNA ključna je za ciljanje specifične sekvence DNA, a tracrRNA povezuje Cas9 i crRNA (Jinek i sur., 2013). Cas9 je velika DNA endonukleaza s više domena i uloga. Njezina je primarna uloga cijepanje DNA na ciljanom mjestu. Iako je za prirodno funkcioniranje sustava CRISPR/Cas u bakterijama potrebno više različitih enzima, za metode uređivanja genoma potreban je samo jedan enzim – endonukleaza Cas9, odnosno neka njezina varijanta ili homolog. Endonukleaza veže grRNA, u prisutnosti grRNA veže ciljanu DNA (ako je ciljano mjesto uzvodno (5') od motiva PAM, engl. *protospacer adjacent motif*) te cijepa ciljanu DNA uvodeći dvolančani

lom (Kozovska i sur., 2021). Cas9 ima dva režnja: režanj za prepoznavanje (režanj REC, engl. *recognition lobe*) i nukleazni režanj (režanj NUC, engl. *nuclease lobe*). Nukleazni režanj sadrži dvije endonukleazne domene: domenu nukleaze nalik RuvC i domenu nukleaze nalik HNH. Nukleaze nalik HNH i RuvC cijepaju svaka jedan lanac DNA (HNH cijepa lanac komplementaran gRNA, a RuvC drugi lanac), što rezultira dvolančanim lomom udaljenim 3 pb uzvodno od PAM-a (Jinek i sur., 2012; Nishimasu i sur., 2014).

Protein Cas9 vođen je do ciljanog mjesta na DNA pomoću dviju molekula RNA: crRNA i tracrRNA. U većini metoda za uređivanje genoma ove su dvije molekule kombinirane u jednu molekulu – gRNA ili sgRNA (RNA vodilju, engl. *guide RNA* ili *single guide RNA*). gRNA sadrži sekvencu od 20 nukleotida komplementarnu ciljanjoj sekvenci DNA, koja je ključna za navođenje proteina Cas9 do ciljanog mjesta, tj. koja odgovara sekvenci crRNA, te sekvencu potrebnu za vezanje s proteinom Cas9, koja odgovara sekvenci tracrRNA (Kozovska i sur., 2021).

Osim spomenutih 20 nukleotida gRNA, za vezanje proteina Cas9 na ciljano mjesto u genomu potreban je i motiv PAM. PAM je kratka sekvenca od 3 pb na ciljanom lancu DNA koja je potrebna za endonukleaznu aktivnost Cas9. Za prirodni Cas9 vrste *S. pyogenes* sekvenca motiva PAM glasi 5'-NGG-3', gdje N označava bilo koji nukleotid. PAM se mora nalaziti neposredno nizvodno od 3'-kraja mjesta na DNA koje cilja gRNA. Homolozi proteina Cas9 izolirani iz različitih vrsta bakterija imaju različite sekvence PAM-a (Nidhi i sur., 2021). Primjerice, Cas12a ima sekvencu PAM-a 5'-TTTV-3', gdje V označava A, C ili G (Chen i sur., 2020).

Komponente sustava CRISPR/Cas eksperimentalno se dostavljaju u stanice na nekoliko načina: kao a) plazmidna DNA koja sadrži gene za protein Cas i gRNA, b) ribonukleoproteinski kompleks gRNA-Cas i kao c) mRNA za Cas i gRNA (Lino i sur., 2018).

1.5. Zebrica (*Danio rerio*) kao modelni organizam

Neka vrsta životinje može biti animalni modelni organizam (animalni model) ako se zbog svojih bioloških svojstava smatra vjerodostojnim predstavnikom veće grupe organizama, dok istodobno treba imati svojstva koja omogućuju lakše rukovanje i proučavanje te životinje. Općenito, dobar animalni model trebao bi imati sve ili većinu sljedećih svojstava: a) sekvenciran genom u visokoj kvaliteti, b) tjelesnu građu, organe, fiziološke procese i signalne puteve slične onima složenijih organizama čiji je predstavnik, c) ortologiju gena koji se proučavaju (obično se zahtijeva da su geni modelnog organizma ortolozi gena čovjeka), d) jednostavan i ekonomičan uzgoj u laboratorijskim uvjetima te e) mogućnost genetičkih manipulacija i mjerenja fenotipskih promjena analiziranih jedinki (Flinn i sur., 2008).

Pokusi na životinjama važan su dio znanstvenih istraživanja. Iako se animalni modeli ponekad mogu zamijeniti alternativnim modelima (npr. staničnim linijama u kulturi), znanstvena istraživanja još uvijek ovise o njima. Animalni modeli potrebni su primjerice radi razumijevanja određenih bolesti i bioloških procesa na razini cijelog organizma, a bez toga da se u opasnost dovodi ljudski organizam (Lieschke i Currie, 2007). Istraživanja na sisavcima predstavljaju bioetički problem (debate s temama bioetike danas su zastupljenije nego ikad prije) i relativno su skupa, stoga se često koriste i drugi animalni modelni organizmi, prije svega beskralježnjaci i ribe (Bozkurt, 2020). Budući da su kralježnjaci, ribe imaju čovjeku slične određene razvojne puteve, fiziološke procese i organske sustave, stoga se smatraju relativno dobrim modelnim organizmima (Ribas i Piferrer, 2014). Tako se danas u laboratorijima diljem svijeta koristi riba zebrica ili engl. *zebrafish* (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)) kao modelni organizam koji u određenoj mjeri omogućuje uštedu sredstava i vremena potrebnih za istraživanja (Slika 6). Koristi se kao modelni organizam za istraživanje uloge brojnih gena, razvoja organskih sustava (razvojna biologija), tumora, toksikologije, novih potencijalnih lijekova, ljudskih bolesti i poremećaja te za istraživanja u akvakulturi (Bozkurt, 2020).

Zebrica je vrsta ribe koja pripada porodici šarana (Cyprinidae), koja obuhvaća više od 2000 vrsta (<https://www.iucnredlist.org/species/166487/6219667>). Nekada joj je taksonomsko ime bilo *Brachydanio rerio*, a ime *Danio rerio* uvedeno je za ovu vrstu 1981. godine (Chu, 1981). Zebrica je mala tropska slatkovodna riba koja izvorno (autohtono) živi u riječnim koritima država južne Azije (Indije, Pakistana, Bangladeša, Nepala i Butana). Vrijeme razvoja zebrice, tj. dostizanja

spolne zrelosti, iznosi oko dva i pol mjeseca, što je velika prednost zbog mogućnosti relativno brzog uzgoja transgeničnih linija. Jedan zdravi par mužjaka i ženke zebrice obično može proizvesti 200 – 300 oplođenih jaja tjedno (Bozkurt, 2020). Embriji završavaju embriogenezu tijekom 72 h nakon oplodnje, dok se pigmentacija u embrija pojavljuje u periodu 30 – 72 h nakon oplodnje (Hill i sur., 2005). U laboratorijskim uvjetima uzgoja odrasle zebrice obično imaju masu između 0,5 i 0,9 g te duljinu vilice (FL, engl. *fork length*) od 22 do 38 mm (Ribas i Piferrer, 2014). Prosječno žive oko tri godine, dok u laboratorijskim uvjetima mogu živjeti do maksimalno nešto više od pet godina (Kishi i sur., 2009). Jedinke su prozirne u embrionalnom i ličinačkom (larvalnom) stadiju (jedinke starije od tri dana) (Slika 6b), što je prednost za izvođenje različitih testova i pretraživanja na njima. Bočna pruga plave boje razvija se u odraslom stadiju ribe (Bozkurt, 2020). Zebrice pokazuju spolni dimorfizam. Razlike između mužjaka i ženki teško je uočiti u mladim riba, no odrasle jedinke obično se mogu lako razlikovati. Mužjaci su obično manji, imaju vitkije i duguljasto tijelo sa zlatnim i plavim prugama duž tijela, dok su ženke veće, oblije i imaju bijeli trbuh te srebrne i plave pruge. Vanjska oplodnja i razvoj embrija izvan majčinog tijela velika su prednost za različite manipulacije na embrijima i praćenje staničnih procesa tijekom embriogeneze (Ribas i Piferrer, 2014).



Slika 6. Riba zebrica (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)). Pod a) je prikazana zebrica stara jedan mjesec (preuzeto i prilagođeno prema Teame i sur., 2019), a pod b) embriji zebrice stari dva dana (snimljeno u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković).

Iako je u odnosu na druge kralježnjake relativno jednostavan modelni organizam, zebrica ima razne prednosti u odnosu na ostale modelne organizme, od kojih su najbitnije vanjska embriogeneza, prozirnost embrija i ličinaka te homologija fiziologije zebrice i fiziologije čovjeka (uz izuzetak organa pluća i posteljice). Embriji, ličinke i odrasle jedinke maleni su građom te je njihovo uzgajanje povoljnije u odnosu na veće animalne modele, dok je generacijsko vrijeme

relativno kratko. Mikroinjektiranje oplođenih jajnih stanica (zigota) relativno je lako izvedivo i povoljno. Prozirnost embrija i ličinaka olakšava, između ostalog, istraživanja u razvojnoj biologiji jer je moguće pratiti i manipulirati razvojem embrija (Bozkurt, 2020). Genom zebrice sekvenciran je u visokoj kvaliteti. Mnoge tehnike molekularne biologije donekle su dobro uhodane za zebricu (npr. tehnike za engl. *knockdown* i *knockout* gena te djelomično za *knockin* gena) (Lantz-McPeak i sur., 2015). Kao modelni organizam koristi se, uz ranije spomenuto, u istraživanjima identifikacije gena uključenih u razvoj mišića, kostiju i masnog tkiva, gena odgovornih za metabolizam nutrijenata, gena povezanih s bolestima, stresom, ponašanjem i dr. Osim toga, lijekovi koji utječu na fiziologiju riba mogu se testirati na zebricama (Bozkurt, 2020).

Haploidni genom zebrice organiziran je u 25 kromosoma, koji sadrže oko $1,7 \times 10^9$ pb DNA, što je otprilike dva puta manje pb od genoma većine sisavaca – primjerice haploidni genom čovjeka sadrži oko $3,3 \times 10^9$ pb (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/zebrafish/data>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human/data>). Genom zebrice sadrži 25 592 kodirajuća gena (https://m.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Annotation). Dvije istraživačima najvažnije baze podataka za zebricu jesu Zebrafish Information Network (ZFIN) te Zebrafish International Resource Center (ZIRC).

Proteini ACRC čovjeka i zebrice (te ostalih metazoa) su ortolozi (Fielden i sur., 2018) i imaju jednaku organizaciju domena (Bhargava i sur., 2020), na temelju čega se može pretpostaviti da imaju i evolucijski očuvanu ulogu, stoga je zebrica pogodan modelni organizam za proučavanje uloge ovog proteina.

1.6. Ciljevi istraživanja

Protein ACRC evolucijski je očuvan regulator genomske stabilnosti u metazoa. Uočena je strukturna sličnost proteaznih jezgara te filogenetska srodnost proteina ACRC i proteina SPRTN, koji je poznata proteaza uključena u popravak unakrsnih veza DNA-protein (DPC popravak). Međutim, za ACRC još uvijek nije jasno je li uključen u DPC popravak i koji bi dijelovi proteina mogli biti ključni za njegovu potencijalnu ulogu u stanicama. Ciljevi istraživanja bili su sljedeći:

1. Dizajnirati i sintetizirati RNA vodilje (gRNA) za 3'-kraj gena *Acrc* zebriće. Utvrditi učinkovitost gRNA za 5'-kraj i 3'-kraj gena *Acrc* zebriće metodom mekšanja DNA visoke rezolucije (metodom HRM) te kloniranjem i sekvenciranjem. Koristiti učinkovite gRNA za ciljanu inaktivaciju gena *Acrc* metodom CRISPR/Cas u embrijima zebriće i metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (metodom qPCR) utvrditi inaktivaciju gena.
2. Identificirati ženke generacije F₁ koje su heterozigoti za mutaciju delecije pretpostavljenog katalitičkog glutamata (E451) proteina ACRC metodom HRM te kloniranjem i sekvenciranjem. Na embrijima potomcima heterozigota provesti izolaciju DPC-ova metodom SDS/KCl precipitacije i odrediti njihovu razinu.
3. Identificirati jedinke utemeljitelje generacije F₀ koje imaju mutacije delecije C-kraja proteina ACRC genotipizacijom embrija metodom HRM te kloniranjem i sekvenciranjem. Na embrijima potomcima utemeljitelja provesti izolaciju DPC-ova metodom SDS/KCl precipitacije i odrediti njihovu razinu.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Postupci rada sa zebricama

2.1.1. Uvjeti uzgoja ribe zebrice

Kao modelni organizam koristio sam ribu zebricu (*Danio rerio* (Hamilton, 1822)), odrasle jedinke i embrije (ličinke) različite starosti. Jedinke divljeg tipa bile su soja AB. Šesti dan nakon oplodnje embriji se prebacuju iz inkubatora u staklene spremnike sa stalnim protokom vode i počinju hraniti. Odrasle ribe uzgajaju se u plastičnim akvarijima sa stalnim protokom vode, u fotoperiodima od 14 h svjetlosti i 10 h tame (svjetla se uključuju u 9:00, a isključuju u 23:00). Temperatura vode u akvarijima iznosi 28 ± 1 °C, kao i temperatura u inkubatoru s embrijima. pH-vrijednost vode održava se oko 7,9.

2.1.2. Postavljanje riba za mrijest i skupljanje embrija

Odrasle ribe postavljao sam za mrijest u poslijepodnevnim satima nakon hranjenja. Mužjaka (mužjake) i ženku (ženke) izvadio sam iz odgovarajućih akvarija i stavio ih u mrijesticu napunjenu vodom iz protoka. Između mužjaka i ženke stavio sam pregradu. Sljedeći dan u 9:00 podignuo sam pregradu između riba i ostavio ih da se mrijeste 30 – 60 min ili kraće. Potom sam ribe vratio u njihove akvarije i skupio embrije u plastičnu petrijevu zdjelicu s medijem E3 (1X). Embrije sam raspodijelio u petrijeve zdjelice tako da ih ne bude više od 30-ak u jednoj. Iz petrijevih zdjelica s embrijima uklonio sam nečistoće pomoću kapaljke i mikropipete. Embrije sam prebrojio i stavio u inkubator (28 ± 1 °C). Tijekom sljedećih dana pratio sam razvoj embrija i provjeravao njihovo preživljenje (vijabilnost). Preživljenje sam obično bilježio za embrije stare 24 h i starije, ako je došlo do naknadnog ugibanja embrija. Za eksperimente sam skupljao i po potrebi dekontaminirao embrije (ličinke) različite starosti: 6 h, jedan dan, dva dana, tri dana, četiri dana i šest dana.

Za mrijest sam postavljao jedinke određenog genotipa na čijim sam embrijima vršio eksperimente i redovito jedinke divljeg tipa kao kontrolu. Za injektiranje embrija za metodu CRISPR/Cas postavljao sam jedinke divljeg tipa, a za identificiranje jedinki utemeljitelja (engl. *founders*) genotipizacijom embrija, eksperimente spašavanja i izolaciju unakrsno vezanih DNA i proteina jedinke određenih linija. Kod injektiranja (za metodu CRISPR/Cas i eksperimente

spašavanja) bilo je osobito važno skupiti embrije što ranije (odmah nakon mrijesta) kako bi se injektiranje moglo provesti na zigotama.

Sastav medija E3 (50X): 250 mM NaCl, 8,5 mM KCl, 16,5 mM CaCl₂, 16,5 mM MgSO₄ u ultračistoj vodi, pH 7,8

Sastav medija E3 (1X): 1/50 volumena medija E3 (50X) u destiliranoj vodi, 0,18 g/l NaHCO₃, pH 7,8

2.1.3. Mikroinjektiranje embrija za metodu CRISPR/Cas

Mikroinjektiranje (injektiranje) embrija provodila je dr. sc. Cecile Otten (Laboratorij za molekularnu ekotoksikologiju, Institut Ruđer Bošković). Embriji su injektirani u jednostaničnom stadiju (tj. u stadiju zigote) prodiranjem igle za mikroinjektiranje kroz žumanjak (engl. *yolk*) do stanice. Embrijima je injektiran oko 1 nl smjese za injektiranje sastava: 0,015 % fenol-crveno, 300 mM KCl, 2 μM protein Cas (Cas9 i/ili Cas12a), 150 ng/μl gRNA, ultračista voda do 1 nl. Injektirane su gRNA za 5'-kraj gena *Acrc* s Cas12a i gRNA za 3'-kraj gena *Acrc* s Cas9 u embrije divljeg tipa pojedinačno (za utvrđivanje učinkovitosti gRNA) ili zajedno (za ciljanu inaktivaciju gena metodom CRISPR/Cas).

2.1.4. Eksperiment spašavanja

Eksperimente spašavanja (engl. *rescue experiments*) za komplementaciju gena provodila je Cecile Otten. Embriji koji su bili potomci mozaičnih ženki utemeljitelja generacije F₀ s mutacijama na 3'-kraju gena *Acrc* (jedinke linije injektirane kompleksom gRNA2-Cas9) redovito su ugibali u periodu između 6 i 12 h starosti. Ti su embriji bili podvrgnuti tzv. eksperimentu spašavanja. Embrijima je u jednostaničnom stadiju injektiran oko 1 nl smjese za eksperiment spašavanja sastava: 0,015 % fenol-crveno, 300 mM KCl, 250 ng/μl konstrukt za spašavanje, ultračista voda do 1 nl. Konstrukt za spašavanje (RC, engl. *rescue construct*) jest mRNA za ekspresiju proteina ACRC zebrice dobivena transkripcijom *in vitro* s plazmidnog konstrukta. U eksperimentima spašavanja injektirane su mRNA za protein ACRC zebrice divljeg tipa i mRNA za ACRC s mutacijom E451A.

2.1.5. Liza embrija i uzoraka odsječka peraje

Kapaljkom sam prebacio pojedinačne embrije određene starosti iz petrijeve zdjelice u mikroepruvetu volumena 0,2 ml, mikropipetom uklonio sav medij E3, dodao 50 µl pufera za lizu, inkubirao uzorke u uređaju za PCR (10 min, 98 °C) i ohladio uzorke na ledu 5 min. Potom sam dodao 5 µl proteinaze K (koncentracije 20 mg/ml), promiješao, inkubirao uzorke u uređaju za PCR 3 h na 55 °C uz povremeno miješanje i 10 min na 98 °C te ih ohladio na ledu 5 min. Uzorke sam prenio u mikroepruvete od 1,5 ml, dodao 100 µl ultračiste vode i centrifugirao uzorke (30 min, 4 °C, 10 000 g) te supernatant prenio u mikroepruvete od 0,2 ml. Uzorke sam alikvotirao.

Na isti način lizirao sam i uzorke odsječka repne peraje odraslih riba. Uzorke odsječka peraje uzeo sam tako da sam uspavao ribu u anestetiku (1X) u čaši, prebacio ju na sterilnu podlogu i sterilnim skalpelom odrezao mali dio lijevog ili desnog vrha repne peraje ribe, koji sam prebacio u mikroepruvetu od 0,2 ml i nastavio prema ranije opisanom postupku. Dobivene uzorke lizata embrija i uzorke lizata odsječka peraje koristio sam za metodu HRM te za lančanu reakciju polimerazom u eksperimentu kloniranja.

Sastav pufera za lizu: 10 mM Tris, 50 mM KCl, 0,3 % Tween 20 u ultračistoj vodi, pH 8,5

Sastav anestetika (20X) (MS-222 / trikain-metansulfonat): 0,4 % MS-222 u ultračistoj vodi

Sastav anestetika (1X): 1/20 volumena anestetika (20X) u mediju E3 (1X)

2.2. Dizajniranje početnica

Za dizajniranje para F-početnice i R-početnice kojima se može umnožiti dio genomske DNA koji ciljaju odabrane gRNA koristio sam mrežno dostupan alat Primer-BLAST (NCBI, National Center for Biotechnology Information). Početnice i ampikon koji one obuhvaćaju morali su biti prikladni za metodu mekšanja DNA visoke rezolucije, što sam provjerio pomoću mrežno dostupnog alata uMelt Quartz (mora se dobiti jedinstveni vrh krivulje mekšanja). Za određivanje temperature prijanjanja (T_a , engl. *annealing temperature*) određenog para početnica za PCR s Phusion DNA polimerazom koristio sam mrežno dostupan alat NEB Tm Calculator v1.13.0. U daljnjem tekstu navedene su početnice za gen *Acrc* zebrice koje sam koristio i njihovi osnovni parametri.

Korištene početnice:

1) za sintezu RNA vodilja za 3'-kraj gena *Acrc* zebrice (g7 i g8), $T_a = 57\text{ }^\circ\text{C}$, veličina DNA amplikona iznosi 127 pb:

IVT-FWD ili F (početnica): 5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAG-3'

IVT-REV ili R (početnica): 5'-AAAAAAGCACCGACTCGG-3'

IVT-Scaffold-Long (univerzalni oligonukleotid):

5'-AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACT
TGCTATTTCTAGCTCTAAAAC-3'

g7 (specifični oligonukleotid):

5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGGGTGCCCGAGGCTTCGAGTTTTAGAGCTAGAA-3'

g8 (specifični oligonukleotid):

5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGAGAAGTCTTGATGGTTTGGTTTTAGAGCTAGAA-3'

2) za utvrđivanje učinkovitosti RNA vodilja za 5'-kraj i 3'-kraj gena *Acrc* zebrice (za metodu HRM i PCR):

a) 5'-gRNA (g2), $T_a = 62\text{ }^\circ\text{C}$, veličina DNA amplikona iznosi 90 pb

F: 5'-TGATTCAAGCACAGGTCCAG-3'

R: 5'-ATGTGTTCTCTTGAGACCG-3'

b) 3'-gRNA (g7), $T_a = 63\text{ }^\circ\text{C}$, veličina DNA amplikona iznosi 87 pb

F: 5'-TTTGTGCTTTATGCACCGGA-3'

R: 5'-TCTCTTTCACAAAGGTGGCG-3'

3) za utvrđivanje ciljane inaktivacije gena *Acrc* zebrice (za metodu qPCR)

a) za referentni gen (*Eif1b*), učinkovitost iznosi 97 %

F: 5'-CAGAACCTCCAGTCCTTTGATC-3'

R: 5'-GCAGGCAAATTTCTTTTTGAAGGC-3'

b) za gen *Acrc*, učinkovitost iznosi 96 %

F: 5'-TGGGAGCCAAGTACCAGTTA-3'

R: 5'-TTTACACACAACCACCCTGC-3'

4) za liniju riba injektiranih RNA vodiljom gRNA2 (za metodu HRM i PCR), $T_a = 68$ °C, veličina DNA amplikona iznosi 105 pb

F: 5'-TGCGGCCACATGGCTCATAAAC-3'

R: 5'-GAAACCATCGGGAGCTCAGGATG-3'

5) za liniju riba injektiranih RNA vodiljom gRNA1 (za metodu HRM i PCR), $T_a = 61$ °C, veličina DNA amplikona iznosi 73 pb

F: 5'-ACAGATCGGTTACGGGATAC-3'

R: 5'-CACGAACATTGTTTATGAGCCATGT-3'

2.3. Kloniranje i sekvenciranje

2.3.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Za lančanu reakciju polimerazom ili PCR (engl. *polymerase chain reaction*) koristio sam komercijalni paket Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (<https://international.neb.com/products/m0530-phusion-high-fidelity-dna-polymerase#Product%20Information>). PCR-om se ciklički eksponencijalno umnaža DNA amplikon (PCR produkt) dodanog DNA kalupa koji obuhvaćaju dvije početnice (engl. *primers*): F ili uzvodna (engl. *forward*) i R ili nizvodna (engl. *reverse*) početnica. Reakcijsku smjesu pipetirao sam u mikroepruvetu od 0,2 ml na hladnom stalku. Sastav reakcijske smjese: 5 µl reakcijskog pufera HF (5X Phusion HF Buffer), 0,5 µl dNTP-ova (10 mM), po 1,25 µl F-početnice i R-početnice (10 µM), 1 µl uzorka genomske DNA, 0,25 µl DNA polimeraze (Phusion DNA Polymerase), 15,75 µl ultračiste vode. Smjese sam promiješao, stavio u uređaj za PCR i pokrenuo reakciju. Parametri reakcije: početna denaturacija (30 s, 98 °C); 35 ciklusa denaturacije (10 s, 98 °C), prijanjanja početnica (engl. *annealing*) (30 s, temperatura ovisi o korištenim početnicama – vidjeti poglavlje 2.2.) i elongacije (15 s, 72 °C); završna elongacija (10

min, 72 °C). Phusion DNA polimeraza stvara PCR produkt tupih krajeva koji se može koristiti izravno za ligaciju u linearizirani vektor. Dobivene DNA amplikone provjeravao sam agaroznom gel-elektroforezom te sam ih pročišćavao iz PCR smjese i koristio za ligaciju u vektor.

2.3.2. Agarozna gel-elektroforeza

Uspješnost amplifikacije DNA amplikona lančanom reakcijom polimerazom provjeravao sam agaroznom gel-elektroforezom. Pripremio sam 500 ml pufera TAE (1X). U 100 ml pufera TAE (1X) dodao sam 1,5 ili 2 g agaroze (za 1,5 ili 2 %-tni agarozni gel) te otopio agarozu u mikrovalnoj pećnici. Otopinu sam ohladio i dodao 1 µl boje GelRed. Tu sam smjesu prelio u kalup, stavio češljic za jažice i ostavio da gel polimerizira oko 30 min. U kadicu za elektroforezu nalio sam 400 µl pufera TAE (1X) i gel sam nakon polimerizacije stavio u kadicu te uklonio češljic. Uzorke sam pripremio tako što sam pomiješao 5 µl PCR smjese i 1 µl boje za nanošenje uzorka na gel (6X DNA Loading Dye). U jažice sam nanio 2 µl markera veličine DNA (Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladder Mix) i 6 µl pripremljenog uzorka. Kadnicu sam spojio na izvor napona i proveo elektroforezu tijekom 45 – 60 min pri naponu od 100 V. Nakon elektroforeze gel sam snimio u uređaju ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) i snimku gela obradio u programu Image Lab 6.0.1. Nakon što sam gel-elektroforezom provjerio da je DNA amplikon odgovarajuće veličine uspješno umnožen, proveo sam pročišćavanje DNA amplikona iz PCR smjese.

Sastav pufera TAE (50X): 2 M Tris, 1 M ledena octena kiselina, 50 mM EDTA u ultračistoj vodi, pH 8,0

Sastav pufera TAE (1X): 1/50 volumena pufera TAE (50X) u destiliranoj vodi

2.3.3. Pročišćavanje DNA amplikona

Za pročišćavanje DNA amplikona iz PCR smjese koristio sam komercijalni paket Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (<https://international.neb.com/products/t1030-monarch-pcr-dna-cleanup-kit-5-ug#Product%20Information>). Postupak sam provodio na sobnoj temperaturi. Razrijedio sam uzorak dodatkom 100 µl pufera za vezanje (DNA Cleanup Binding Buffer) u 20 µl uzorka (PCR smjese) i promiješao. Uzorak sam prenio u kolonu sa sabirnom mikroeprevetom i centrifugirao (1 min, 16 000 g). Uklonio sam eluat, u kolonu dodao 200 µl pufera za ispiranje (DNA

Wash Buffer) i centrifugirao (1 min, 16 000 g). Ponovio sam prethodni korak. Kolonu sam prebacio u mikroeprevetu volumena 1,5 ml, dodao 10 μ l ultračiste vode u sredinu matriksa kolone, pričekao 1 min i potom centrifugirao (1 min, 16 000 g). Pomoću uređaja Nanodrop odredio sam masenu koncentraciju (u ng/ μ l) eluirane DNA te parametre A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} . Kao slijepu probu koristio sam ultračistu vodu koju sam koristio i za eluciju DNA. Dobivene pročišćene DNA amplikone pohranio sam u zamrzivač na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i koristio ih za ligaciju u plazmidni vektor.

2.3.4. Ligacija u plazmidni vektor

Za ligaciju DNA amplikona u plazmidni vektor koristio sam komercijalni paket CloneJET PCR Cloning Kit (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1232#/K1232>). Plazmidni vektor za kloniranje pJET1.2/blunt sadrži letalni gen *eco47IR*, koji biva prekinut ligacijom DNA inserta u mjesto kloniranja. Nakon transformacije stoga mogu preživjeti i formirati kolonije samo bakterijske stanice s rekombinantnim vektorom, a ne i stanice koje su primile recirkularizirani vektor bez inserta, koje eksprimiraju letalni restriksijski enzim. Vektor ima gen za rezistenciju na ampicilin, tako da u prisustvu ampicilina mogu preživjeti samo transformirane stanice. U reakcijsku smjesu potrebno je dodati 5 ng PCR produkta za produkt veličine 100 pb, odnosno razmjerno tome različitu masu za PCR produkte različitih veličina. Reakcijsku smjesu pipetirao sam u mikroeprevetu od 0,2 ml na hladnom stalku. U reakcijsku smjesu za ligaciju s tupim krajevima dodao sam: 10 μ l reakcijskog pufera 2X (2X Reaction Buffer), određeni volumen pročišćenog DNA amplikona (ovisno o veličini amplikona i masenoj koncentraciji uzorka), 1 μ l lineariziranog vektora za kloniranje s tupim krajevima pJET1.2/blunt (pJET1.2/blunt Cloning Vector), ultračistu vodu do volumena 19 μ l te 1 μ l T4 DNA ligaze (T4 DNA Ligase). Smjesu sam promiješao te inkubirao u uređaju za PCR tijekom 30 min na $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dobivenu ligacijsku smjesu odmah sam koristio za transformaciju bakterijskih stanica ili sam ju pohranio u zamrzivač na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ za kasniju upotrebu.

2.3.5. Transformacija bakterijskih stanica

Za transformaciju sam koristio dobivene ligacijske smjese i kompetentne stanice bakterije *Escherichia coli* XL10-Gold uzgajane u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju prema internom protokolu. Za transformaciju sam koristio interni protokol prilagođen za učinkovitu

transformaciju navedenih stanica. Stanice sam izvadio iz zamrzivača (-80 °C) i stavio ih na led tijekom 15 min da se otope. U mikroeprevetu volumena 1,5 ml dodao sam 25 µl suspenzije stanica i 1 µl ligacijske smjese, promiješao te inkubirao stanice na ledu 30 min. Potom sam stanice u termobloku izložio toplinskom šoku (40 s, 42 °C) i inkubirao ih na ledu 2 min. Nakon inkubacije dodao sam 475 µl medija LB (engl. *lysogeny broth*) ugrijanog na 37 °C i stanice stavio u inkubator tresilicu (1 h, 37 °C, 225 okretaja u minuti). Na ugrijane (37 °C) LB/agar ploče s ampicilinom stavio sam 250 µl suspenzije bakterijskih stanica i razmazao ju sterilnim staklenim kuglicama, a ostatak suspenzije pohranio sam u hladnjak na 4 °C. Ploče sam inkubirao u inkubatoru preko noći (oko 16 h) na 37 °C.

Nakon inkubacije ploča i razvoja bakterijskih kolonija pripremio sam medij LB s ampicilinom. U plastičnu epruvetu dodao sam 5 ml pripremljenog medija. Plastičnim nastavkom za mikropipetu uzeo sam dio bakterijske kolonije s ploče te nastavak ispustio u epruvetu s medijem. Epruvete sam stavio u inkubator tresilicu na inkubaciju preko noći (oko 16 h, 37 °C, 225 okretaja u minuti). Iz dobivenih bakterijskih kultura u suspenziji izolirao sam plazmidnu DNA.

Matična otopina ampicilina: 100 mg/ml ampicilina u 70 %-tnom etanolu

Priprema medija LB: 25 g bujona LB u prahu (Luria-Bertani Broth, Biolab) otopljeno u 1 l ultračiste vode

Priprema smjese LB/agar: 25 g bujona LB u prahu (Luria-Bertani Broth, Biolab) i 35 g agara (Nutrient Agar, Biolab) otopljeno u 1 l ultračiste vode

Priprema medija LB s ampicilinom: u medij LB dodana 1/1000 volumena matične otopine ampicilina

Priprema smjese LB/agar s ampicilinom: u smjesu LB/agar dodana 1/1000 volumena matične otopine ampicilina

2.3.6. Izolacija plazmida

Za izolaciju plazmida iz bakterijskih stanica koristio sam komercijalni paket Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (<https://www.zymoresearch.com/collections/zyppy-plasmid-kits/products/zyppy-plasmid-miniprep-kit>). Protokol se temelji na alkalnoj lizi i učinkovito odvaja plazmidnu DNA od bakterijskih stanica. Izolirana plazmidna DNA visoke je kvalitete i može se koristiti za različite kasnije postupke: transformaciju bakterija, cijepanje restrikcijским endonukleazama, ligaciju, PCR, transkripciju, sekvenciranje i dr.

Postupak sam provodio na sobnoj temperaturi. Dodao sam 600 μ l bakterijske kulture uzgojene u mediju LB u mikroepruvetu volumena 1,5 ml. Dodao sam 100 μ l pufera za lizu 7X (7X Lysis Buffer) i promiješao okretanjem mikroepruvete 4 – 6 puta. Nakon 2 min inkubacije dodao sam 350 μ l hladnog pufera za neutralizaciju (Neutralization Buffer) i promiješao okretanjem mikroepruvete 2 – 3 puta. Uzorke sam centrifugirao (4 min, 11 000 g). 900 μ l supernatanta prenio sam u kolonu (Zymo-Spin™ IIN column), kolonu stavio u sabirnu mikroepruvetu (Collection Tube) i centrifugirao (15 s, 11 000 g). Uklonio sam supernatant, u kolonu dodao 200 μ l prvog pufera za ispiranje (Endo-Wash Buffer) i centrifugirao (30 s, 11 000 g). Nakon toga u kolonu sam dodao 400 μ l drugog pufera za ispiranje (Zyppy™ Wash Buffer) i centrifugirao (1 min, 11 000 g). Kolonu sam prenio u novu mikroepruvetu volumena 1,5 ml, dodao 30 μ l ultračiste vode (ugrijane na 50 °C) izravno na matriks kolone, inkubirao 1 min na sobnoj temperaturi i centrifugirao (30 s, 11 000 g) kako bih eluirao plazmidnu DNA. Pomoću uređaja Nanodrop odredio sam masenu koncentraciju (u ng/ μ l) izolirane DNA te parametre A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} . Kao slijepu probu koristio sam ultračistu vodu koju sam koristio i za eluciju plazmidne DNA.

2.3.7. Sekvenciranje plazmidne DNA i analiza sekvenci

Za sekvenciranje izoliranih plazmida s ugrađenim DNA amplikonom koristio sam uslugu sekvenciranja DNA EZ-seq tvrtke MacroGen (Amsterdam, Nizozemska) (https://dna.macrogen-europe.com/eng/support/ces/ezseq_intro.jsp). Prema uputama za navedenu uslugu za svaki sam uzorak u mikroepruvetu volumena 1,5 ml stavio po 5 μ l uzorka izolirane plazmidne DNA koncentracije 100 ng/ μ l i 5 μ l početnice za sekvenciranje (pJET1.2 Forward Sequencing Primer) koncentracije 10 μ M. Na mikroepruvetu sam zalijepio naljepnicu s jedinstvenim barkodom.

Dostavljene nukleotidne sekvence (sljedove) molekule DNA obrađivao sam i analizirao u programu BioEdit v7.2.5 (BioEdit Sequence Alignment Editor). Sekvencu DNA otvorio sam u programu BioEdit, skratio ju na oko 200 nukleotida te poravnao (engl. *align*) sekvencu ili njezin reverzni komplement s reverznim komplementom konsenzusne nukleotidne sekvence gena *Acrc* zebrice. Gen *Acrc* transkribira se (prepisuje) s minus-lanca kromosoma 14, stoga sam kod poravnavanja koristio njegov reverzni komplement. Odredio sam koju mutaciju ili mutacije (promjene) u nukleotidnoj sekvenci i na kojoj poziciji gena *Acrc* ima sekvencirani DNA amplikon. Kako bih odredio na kojoj se poziciji mutacija nalazi u sekvenci kodirajuće DNA (CDS-a, engl.

coding DNA sequence), najprije sam poravnao reverzni komplement konsenzusne nukleotidne sekvence gena *Acrc* zebrice s konsenzusnom sekvencom eksona u kojem se nalazi umnožena sekvenca. Odredio sam na kojoj se poziciji u sekvenci eksona nalazi mutacija, poravnao sekvencu eksona s konsenzusnom sekvencom CDS-a i odredio na kojoj se poziciji u CDS-u nalazi mutacija. Unio sam mutaciju određenu za sekvencirani DNA amplikon na odgovarajuću poziciju CDS-a i takvu sekvencu CDS-a preveo u aminokiselinsku sekvencu, koju sam poravnao s aminokiselinskom sekvencom dobivenom prevođenjem konsenzusne sekvence CDS-a, tj. s konsenzusnom aminokiselinskom sekvencom proteina ACRC. Odredio sam koju mutaciju (mutacije) u aminokiselinskoj sekvenci i na kojoj poziciji proteina ACRC ima sekvencirani DNA amplikon. Kao rezultate, za sekvencirane DNA amplikone slikama sam prikazao nukleotidne i aminokiselinske sekvence poravnate s odgovarajućom konsenzusnom sekvencom te naveo koju mutaciju ili mutacije i na kojoj poziciji imaju sekvence u usporedbi s odgovarajućom konsenzusnom sekvencom nukleotida gena *Acrc* ili aminokiselina proteina ACRC. Konsenzusne nukleotidne sekvence gena *Acrc* zebrice, sekvence njegovih eksona i CDS-a preuzeo sam iz baze podataka Ensembl (https://www.ensembl.org/Danio_gerio/Info/Index). Gen *Acrc* zebrice nalazi se na kromosomu 14, transkribira se s minus-lanca, ima 13 eksona, veličine je 19 737 pb, a protein ACRC ima 586 aminokiselina.

2.4. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije (metoda HRM)

Za metodu HRM koristio sam komercijalni paket MeltDoctor™ HRM Master Mix (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_070283.pdf). Metoda mekšanja/taljenja/denaturacije DNA visoke rezolucije ili metoda HRM (engl. *high resolution melting method*) metoda je koja omogućuje identificiranje varijacija u sekvenci DNA nakon provedene reakcije PCR. Sekvence DNA razlikuje na temelju njihova nukleotidnog sastava, duljine, udjela GC parova baza i komplementarnosti lanaca. HRM započinje s amplifikacijom regije od interesa PCR-om u prisutnosti stabilnog oblika fluorescentne boje SYTO® 9, koja se veže s dvolančanom DNA (dsDNA). Ta boja ima intenzivnu fluorescenciju kad je vezana s dsDNA i slabu fluorescenciju kad nije vezana s dsDNA. Nakon amplifikacije PCR-om slijedi korak postupne denaturacije DNA. Kad dsDNA denaturira u jednolančanu DNA (ssDNA), boja se otpušta, što uzrokuje smanjenje njezine fluorescencije. Uređaj mjeri emitiranu fluorescenciju, a pritom se kao rezultat oblikuje krivulja

mekšanja karakteristična za određeni PCR amplikon ili amplikone uzorka. Profil denaturacije DNA za pojedini uzorak jedinstven je s obzirom na umnožene PCR amplikone. Krivulje mekšanja mogu pružiti informacije kod pretraživanja mutacija, genotipizacije i obrazaca metilacije.

Krivulja mekšanja oblikuje se kad se postepeno denaturiraju PCR amplikoni u rasponu temperatura (od manjih prema većim) u prisutnosti boje koja veže dsDNA. Tijekom denaturacije, intenzivno fluorescira jedino boja koja je vezana s dsDNA, a tu fluorescenciju detektira i bilježi optički sustav uređaja. Prilikom denaturacije dsDNA, boja se oslobađa u otopinu, mijenja konformaciju i fluorescencija joj se smanjuje oko tisuću puta. Denaturacija se mjeri na temelju promjene fluorescencije u određenom uzorku s postepenim povećanjem temperature. Na manjoj temperaturi DNA je dvolančana i boja intenzivno fluorescira; s povećanjem temperature dolazi do denaturacije lanaca DNA i smanjenja fluorescencije. Ovo smanjenje fluorescencije započinje sporo, no kasnije dolazi do naglog smanjenja. Najveće smanjenje fluorescencije obično se opaža kod temperature koja odgovara temperaturi mekšanja prisutne DNA (T_m , engl. *melting temperature*). T_m se definira kao točka na krivulji mekšanja u kojoj je 50 % DNA dvolančano, a 50 % jednolančano (denaturirano). Na krivuljama mekšanja s poravnom fluorescencijom (koje sam koristio za prikaz rezultata), T_m odgovara temperaturi na kojoj poravnata fluorescencija iznosi 50 %, a ovisi o karakteristikama PCR amplikona: udjelu GC parova baza te duljini i sastavu nukleotidne sekvence. Krivulje mekšanja mogu se prikazati kao polazne ili neobrađene (engl. *raw melt curves*), derivativne (engl. *derivative*) i poravnate (engl. *aligned*), a rezultati se mogu prikazati i kao diferencijalni graf (engl. *difference plot*). Svaki od prikaza profila denaturacije DNA ima svoje prednosti. Za prikaz svojih rezultata odabrao sam poravnate krivulje mekšanja jer se pomoću njih mogu najjasnije razlikovati skupine (varijante) u koje su analizirani uzorci svrstani.

Uzorke sam pipetirao u mikroploču s 96 jažica. Sastav reakcijske smjese: 5 μ l glavne smjese (MeltDoctor™ HRM Master Mix), po 0,6 μ l F-početnice i R-početnice (5 μ M), 0,5 μ l uzorka genomske DNA, 3,3 μ l ultračiste vode. Mikroploču s pripremljenim reakcijskim smjesama sam centrifugirao (5 min, 4 °C, 500 g). Na uređaju za qPCR pokrenuo sam reakciju s parametrima: aktivacija enzima (10 min, 95 °C); 40 ciklusa denaturacije (15 s, 95 °C) te prijanjanja početnica s elongacijom (1 min, 60 °C); denaturacija (10 s, 95 °C); prijanjanje (1 min, 60 °C); mekšanje/denaturacija visoke rezolucije (15 s, 95 °C), prijanjanje (15 s, 60 °C). Rezultate sam

analizirao u programu High Resolution Melt Software v3.2 te sam prikazao krivulje mekšanja s poravnatom fluorescencijom i T_m za analizirane uzorke.

2.5. Dizajniranje i sinteza RNA vodilja (gRNA)

Za dizajniranje RNA vodilja (gRNA) za 3'-kraj gena *Acrc* zebrice (g7 i g8) koristio sam mrežno dostupan alat CRISPRscan. Alat za unesenu sekvencu DNA pronalazi komplementarne gRNA koje se nalaze uz motiv PAM određenog proteina Cas. U daljnjem tekstu navedene su gRNA za gen *Acrc* zebrice koje sam koristio (navedena je samo sekvenca komplementarna ciljanoj sekvenci genomske DNA, tj. crRNA) te ekson u kojem se nalazi komplementarna sekvenca genomske DNA.

Korištene gRNA:

5'-gRNA (g2): 5'-GTCCGACTCTGACAACTCCTCAG-3' (ekson 3)

3'-gRNA (g7): 5'-GGGGGTGCCCGAGGCTTCGA-3' (ekson 13)

3'-gRNA (g8): 5'-GGAGAAGTCTTGATGGTTTG-3' (ekson 13)

gRNA1: 5'-GGCCGCATGACACATTTCA-3' (ekson 12)

gRNA2: 5'-GGAGCATAAAGCCTCCAGAA-3' (ekson 12)

Sintezu gRNA radio sam prema protokolu koji su opisali Modzelewski i sur. (2018). U ovoj metodi, oligonukleotid jedinstven za gRNA, koji sadrži promotor za T7 RNA polimerazu i sekvencu crRNA komplementarnu određenom mjestu na genomu, prijanja s univerzalnim oligonukleotidom koji sadrži sekvencu tracrRNA (IVT-Scaffold-Long), čime nastaje PCR kalup koji se umnaža dvjema početnicama (IVT-FWD i IVT-REV). Amplificirani DNA amplicon veličine 127 pb služi kao DNA kalup za transkripciju *in vitro* T7 RNA polimerazom, kojom nastaje gRNA veličine 127 baza.

Prvi je korak bila sinteza DNA kalupa PCR-om za transkripciju *in vitro*. Za PCR sam koristio komercijalni paket Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. Reakcijsku smjesu pipetirao sam u mikroeprevetu od 0,2 ml na hladnom stalku. Sastav reakcijske smjese: 17,75 μ l

ultračiste vode, 5 µl reakcijskog pufera HF, 0,5 µl dNTP-ova (10 mM), po 0,5 µl početnica IVT-FWD i IVT-REV (1 µM), 0,25 µl oligonukleotida IVT-Scaffold-Long, 0,25 µl specifičnog oligonukleotida za g7 ili g8 (100 µM), 0,25 µl DNA polimeraze. Smjese sam promiješao, stavio u uređaj za PCR i pokrenuo reakciju. Parametri reakcije: početna denaturacija (2 min, 95 °C); 35 ciklusa denaturacije (10 s, 95 °C), prijanjanja početnica (10 s, 57 °C) i elongacije (10 s, 72 °C); završna elongacija (2 min, 72 °C). Dobiveni DNA amplikon provjerio sam agaroznom gel-elektroforezom (poglavlje 2.3.2.) i pročistio DNA amplikone iz PCR smjese (poglavlje 2.3.3.).

DNA amplikone dobivene PCR-om koristio sam kao DNA kalupe za transkripciju *in vitro*. Za transkripciju *in vitro* koristio sam komercijalni paket HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (<https://international.neb.com/products/e2050-hiscribe-t7-quick-high-yield-rna-synthesis-kit#Protocols,%20Manuals%20&%20Usage>). Reakcijsku smjesu pipetirao sam u mikroeprijetu od 0,2 ml na hladnom stalku. Sastav reakcijske smjese: 7,5 µl smjese NTP-ova, 500 ng pročišćenog DNA amplikona, 1,5 µl smjese za T7 RNA polimerazu, ultračista voda do 15 µl. Nakon pripremanja reakcijske smjese uzorke sam promiješao i inkubirao u uređaju za PCR (4 h, 37 °C), potom dodao 15 µl ultračiste vode i 1 µl DNaze I te inkubirao uzorke (30 min, 37 °C). Dodao sam 19 µl ultračiste vode do konačnog volumena od 50 µl.

Nakon transkripcije pročistio sam RNA iz smjese koristeći komercijalni paket Monarch® RNA Cleanup Kit (50 µg) (<https://international.neb.com/products/t2040-monarch-rna-cleanup-kit-50-ug#Product%20Information>). Postupak sam provodio na sobnoj temperaturi. Dodao sam 100 µl pufera za vezanje (RNA Cleanup Binding Buffer) u 50 µl uzorka. Dodao sam 150 µl apsolutnog etanola i promiješao. Uzorak sam prenio u kolonu sa sabirnom mikroeprijetom i centrifugirao (1 min, 16 000 g). Uklonio sam eluat, u kolonu dodao 500 µl pufera za ispiranje (RNA Cleanup Wash Buffer) i centrifugirao (1 min, 16 000 g). Ponovio sam prethodni korak. Kolonu sam prebacio u mikroeprijetu volumena 1,5 ml, dodao 30 µl ultračiste vode u sredinu matriksa kolone i centrifugirao (1 min, 16 000 g). Pomoću uređaja Nanodrop odredio sam masenu koncentraciju (u ng/µl) eluirane RNA (gRNA) te parametre A₂₆₀/A₂₈₀ i A₂₆₀/A₂₃₀. Kao slijepu probu koristio sam ultračistu vodu koju sam koristio i za eluciju RNA. Dobivene pročišćene gRNA provjerio sam agaroznom gel-elektroforezom (poglavlje 2.3.2., uz napomenu da sam elektroforezu provodio 30 min), alikvotirao ih i pohranio u zamrzivač na -80 °C. gRNA su korištene za injektiranje embrija za utvrđivanje učinkovitosti gRNA i metodu CRISPR/Cas.

2.6. Izolacija ukupne RNA

Za izolaciju ukupne RNA iz embrija zebrice koristio sam komercijalni paket Monarch® Total RNA Miniprep Kit (<https://international.neb.com/products/t2010-monarch-total-rna-miniprep-kit#Protocols,%20Manuals%20&%20Usage>). Postupak sam provodio na sobnoj temperaturi. Skupio sam po 15 embrija različite starosti po uzorku u mikroepruvete od 1,5 ml. Dodao sam 150 µl ultračiste vode i 150 µl reagensa za zaštitu (Protection Reagent). Uzorke sam sonicirao (dva ciklusa: 3 × 20 s soniciranje, 30 s pauza; 8 °C; velika snaga). Dodao sam 30 µl reakcijskog pufera za proteinazu K (Prot K Reaction Buffer) i 15 µl proteinaze K (Prot K), inkubirao uzorke u termobloku (5 min, 55 °C), vorteksirao ih i centrifugirao (2 min, 16 000 g). Supernatant sam prenio u mikroepruvetu od 1,5 ml. Dodao sam 300 µl pufera za lizu (RNA Lysis Buffer) i vorteksirao. Uzorak iz prošlog koraka prenio sam u kolonu za uklanjanje genomske DNA (gDNA removal column) sa sabirnom mikroepruvetom (collection tube). Centrifugirao sam 30 s pri 16 000 g i uklonio kolonu s gDNA. U sabirnu mikroepruvetu (u kojoj se nalazila RNA) dodao sam jedan volumen apsolutnog etanola i promiješao. Uzorak sam prenio u kolonu za pročišćavanje RNA (RNA purification column) sa sabirnom mikroepruvetom i centrifugirao (30 s, 16 000 g). Uklonio sam eluat. Dodao sam 500 µl pufera za ispiranje (RNA Wash Buffer) i centrifugirao (30 s, 16 000 g). Dodao sam 5 µl DNaze I (DNase I) i 75 µl reakcijskog pufera za DNazu I (DNase I Reaction Buffer) izravno na matriks kolone te inkubirao 15 min na sobnoj temperaturi. Dodao sam 500 µl pufera za prajming RNA (RNA Priming Buffer), centrifugirao (30 s, 16 000 g) i uklonio eluat. Dodao sam 500 µl pufera za ispiranje, centrifugirao (30 s, 16 000 g) i uklonio eluat. Dodao sam 500 µl pufera za ispiranje i centrifugirao (2 min, 16 000 g). Kolonu sam prenio u mikroepruvetu volumena 1,5 ml. Dodao sam 40 µl ultračiste vode izravno na sredinu matriksa kolone i centrifugirao (30 s, 16 000 g). U eluatu se nalazila izolirana ukupna RNA. Pomoću uređaja Nanodrop odredio sam masenu koncentraciju (u ng/µl) izolirane RNA te parametre A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} . Kao slijepu probu koristio sam ultračistu vodu koju sam koristio i za eluciju RNA. Uzorke RNA alikvotirao sam i pohranio u zamrzivač na -80 °C. Uzorke izolirane RNA koristio sam za reverznu transkripciju.

2.7. Reverzna transkripcija

Za reverznu transkripciju koristio sam komercijalni paket ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (<https://international.neb.com/products/e6560-protoscript-ii-first-strand-cdna-synthesis-kit#Product%20Information>). U mikroeprevetu od 0,2 ml dodao sam 300 ng uzorka izolirane RNA, 2 µl smjese početnica (Random Primer Mix; sadrži oligo-dT početnice i nasumične heksamere u omjeru 1 : 1) i ultračistu vodu do 8 µl. Uzorke sam inkubirao u uređaju za PCR (5 min, 65 °C) radi denaturacije RNA te ih stavio na led 5 min. Dodao sam 10 µl reakcijske smjese (ProtoScript II Reaction Mix (2X)) i 2 µl enzimske smjese (ProtoScript II Enzyme Mix (2X)). Uzorke sam inkubirao u uređaju za PCR (5 min, 25 °C; potom 1 h, 42 °C i na kraju 5 min, 80 °C). Dobivene uzorke cDNA alikvotirao sam i pohranio u zamrzivač na -20 °C. Uzorke cDNA koristio sam za qPCR.

2.8. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR)

Za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom ili qPCR (engl. *quantitative polymerase chain reaction*) koristio sam komercijalni paket GoTaq® qPCR Master Mix (<https://worldwide.promega.com/products/pcr/qpcr-and-rt-qpcr/qpcr-kits/?catNum=A6001>). Tijekom reakcije dolazi do ugradnje fluorescentne boje BRYT Green® Dye u dvolančanu DNA, a uređaj bilježi porast fluorescencije u uzorku u realnom vremenu. Kao referentni gen koristio sam gen *Eif1b*. Za svaki uzorak radio sam triplikat u mikroploči s 96 jažica. Sastav reakcijske smjese: 5 µl glavne smjese (GoTaq® qPCR Master Mix (2X)), po 0,03 µl F-početnice i R-početnice (100 µM), 0,1 µl referentne boje CXR (CXR Reference Dye), 5 ng uzorka cDNA, ultračista voda do 10 µl. Mikroploču s pripremljenim reakcijskim smjesama sam centrifugirao (5 min, 4 °C, 500 g). Na uređaju za qPCR pokrenuo sam reakciju s parametrima: aktivacija DNA polimeraze (GoTaq® Hot Start Polymerase activation) 2 min, 95 °C; 40 ciklusa denaturacije (15 s, 95 °C) te prijanjanja početnica s elongacijom (1 min, 60 °C). Rezultate sam iz programa 7500 Fast System SDS Software prenio u Microsoft Excel. Podatke sam obradio u programu Microsoft Excel 2019 (iz paketa programa Microsoft Office Professional Plus 2019). Za svaki uzorak izračunao sam srednju vrijednost tehničkih replika parametra C_t za gene *Acr3* i *Eif1b*, te izračunao vrijednost srednje normalizirane ekspresije ili vrijednost MNE (engl. *mean normalized expression*). MNE sam izračunao za svaki uzorak tako što sam podijelio umnožak učinkovitosti početnica za *Eif1b* i

srednje vrijednosti C_t za *Eif1b* s umnoškom učinkovitosti početnica za *Acrc* i srednje vrijednosti C_t za *Acrc*, te dobiveni broj pomnožio s 1 000 000. Na grafu sam prikazao srednju vrijednost MNE dviju bioloških replika i standardnu pogrešku srednje vrijednosti. qPCR sam koristio za utvrđivanje ciljane inaktivacije gena *Acrc* u embrijima zebrice metodom CRISPR/Cas

2.9. Metoda KCl/SDS precipitacije za izolaciju unakrsno vezanih DNA i proteina

Za izolaciju unakrsno vezanih DNA i proteina (ukupnih DPC-ova) koristio sam metodu KCl/SDS precipitacije proteina. Korišteni protokol prilagođen je prema protokolu koji su opisali Mórocz i sur. (2017), a protokol su izvorno opisali i patentirali Zhitkovich i Costa (1992). Metoda se temelji na tome što dodatak kalijeva klorida i natrijeva dodecil-sulfata (SDS-a) rezultira nastajanjem netopljivog precipitata koji se lako može odvojiti centrifugiranjem. Kako se SDS čvrsto veže s proteinima, ali ne i s DNA, svi proteini i kompleksi DNA-protein učinkovito precipitiraju u prisutnosti SDS-a i KCl, dok slobodna DNA ostaje u supernatantu nakon prvog centrifugiranja. Količina precipitirane DNA tako predstavlja razinu ukupnih DPC-ova.

Kao uzorke sam koristio grupe od 100 embrija starih 6 h ili deset embrija starih tri dana, tri biološke replike po skupini. Embrije sam skupio u mikroeprevete volumena 1,5 ml nakon tretmana određenih skupina formaldehidom koncentracije 5 mM tijekom 1 h. Iz mikroepreveta sam izvukao sav medij E3 i/ili formaldehid. U uzorke sam dodao 400 μ l pufera za lizu i inkubirao ih 15 min na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje. Iglom sam probušio rupice na poklopcima mikroepreveta i spremio uzorke u tekući N_2 preko noći. Sljedeći dan izvadio sam uzorke iz tekućeg N_2 i otopio ih u termobloku (55 °C, 15 min). Uzorke sam sonicirao (dva ciklusa: 3 \times 20 s soniciranje, 30 s pauza; 8 °C; velika snaga). Nakon soniciranja dodao sam 400 μ l pufera KCl u uzorke, promiješao i inkubirao ih na ledu 5 min (pritom je dolazilo do precipitacije proteina, što je bilo vidljivo kao bijela viskozna otopina). Uzorke sam centrifugirao (4 °C, 5 min, 21 000 g). Odvojio sam supernatante u zasebne mikroeprevete koje sam spremio na -20 °C (ta frakcija sadržavala je tzv. slobodnu (otopljenu) DNA, tj. DNA koja nije bila vezana s proteinima). Zatim sam tri puta ponovio korak ispiranja: dodao sam 400 μ l pufera KCl na taloge, otopio taloge u termobloku (55 °C, 5 min) uz povremeno miješanje (otapanjem je otopina postala prozirna), ohladio uzorke na ledu (5 min) (pritom je opet nastajala bijela viskozna otopina) i centrifugirao ih

(4 °C, 5 min, 15 000 g). Nakon ispiranja u uzorke sam dodao 400 µl pufera KCl i proteinazu K (konačne koncentracije 0,2 mg/ml) i inkubirao ih u termobloku (55 °C, 1 h) uz povremeno miješanje. Dodao sam BSA (goveđi albumin iz seruma) konačne koncentracije 1,25 mg/ml i inkubirao uzorke na ledu 5 min, a potom ih centrifugirao (4 °C, 5 min, 15 000 g). Odvojio sam supernatante u posebne mikroeprovete (ta frakcija sadržavala je DNA unakrsno vezanu s proteinima). U po 50 µl uzoraka slobodne i unakrsno vezane DNA dodao sam RNazu A konačne koncentracije 0,2 mg/ml i inkubirao uzorke u termobloku (37 °C, 30 min) uz povremeno miješanje.

Koncentraciju slobodne i unakrsno vezane DNA u uzorcima odredio sam kvantifikacijom Picogreenom (komercijalni paket: Quant-iT™ 1X dsDNA HS Assay, [https://www.thermo fisher.com/order/catalog/product/Q33232#/Q33232](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33232#/Q33232)). Fluorescentna boja Picogreen ugrađuje se u dvolančanu DNA te je intenzitet fluorescencije nakon ekscitacije razmjernan koncentraciji dvolančane DNA u uzorku. Svaki uzorak i standarde mjerio sam u triplicatu. U jažicu crne mikroploče s 96 jažica dodao sam 10 µl standarda ili 5 µl uzorka i 200 µl radne otopine. Mikroploču sam stavio u tresilicu za mikroploče (5 min, 460 okretaja u minuti) i inkubirao uzorke 2 min na sobnoj temperaturi. Izmjerio sam fluorescenciju uzoraka na čitaču mikroploča (ekscitacija 480 nm, emisija 530 nm). Rezultate sam obradio u programu Microsoft Excel 2019 (iz paketa programa Microsoft Office Professional Plus 2019). Izradio sam standardni pravac, pomoću jednadžbe pravca i izmjerene fluorescencije izračunao koncentraciju DNA u uzorcima i izračunao srednje vrijednosti replika za svaki uzorak. Udio unakrsno vezane DNA za svaki uzorak odredio sam tako što sam podijelio koncentraciju unakrsno vezane DNA sa zbrojem koncentracija unakrsno vezane i slobodne DNA te pomnožio rezultat sa 100. Kao rezultat prikazao sam graf sa srednjim vrijednostima udjela unakrsno vezane DNA triju bioloških replika sa standardnom pogreškom srednje vrijednosti.

Sastav pufera za lizu: 2 % SDS, 20 mM Tris, inhibitori proteaza (1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml kimostatin, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM fenilmetilsulfonil-fluorid), inhibitori fosfataza (2 mM natrijev fluorid, 2 mM natrijev pirofosfat, 5 mM natrijev ortovanadat) u ultračistoj vodi, pH 7,5

Sastav pufera KCl: 20 mM Tris, 200 mM KCl u ultračistoj vodi, pH 7,5

2.10. Statistička obrada podataka

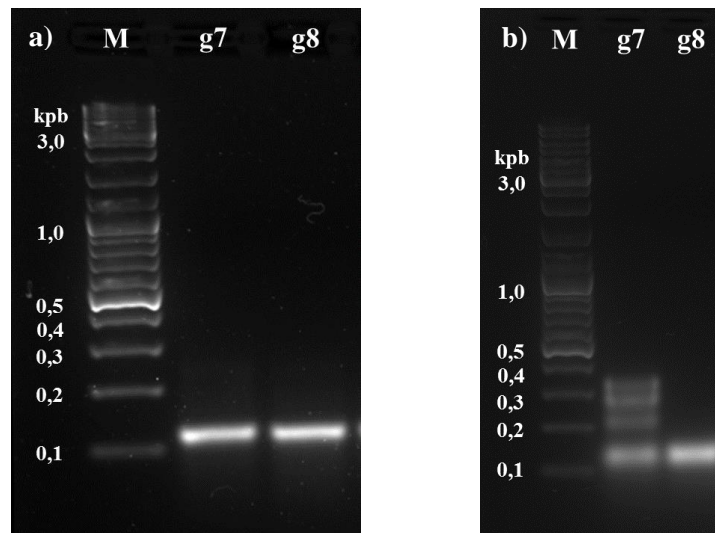
Sve dobivene brojčane podatke obradio sam u računalnom programu Microsoft Excel 2019 (iz paketa programa Microsoft Office Professional Plus 2019), pri čemu sam konačne rezultate prikazao kao srednje vrijednosti dviju (za razinu ekspresije gena) ili triju (za udio unakrsno vezane DNA) bioloških replika, a odstupanje od srednje vrijednosti izrazio sam kao standardnu pogrešku srednje vrijednosti. Podatke sam statistički obradio u računalnom programu Statistica v12.0. Proveo sam jednosmjernu analizu varijance (engl. *one-way ANOVA*), nakon čega sam izveo Tukeyjev test značajnosti (engl. *Tukey's honest significance test*) s ciljem određivanja značajnosti razlika između različitih skupina uzoraka. Kod svih provedenih eksperimenata statistički značajnim smatrao sam rezultate za koje sam dobio razinu značajnosti manju ili jednaku 0,05 ($p \leq 0,05$).

3. REZULTATI

3.1. Ciljana inaktivacija gena *Acrc* zebrice metodom CRISPR/Cas

3.1.1. Sinteza RNA vodilja za 3'-kraj gena *Acrc* zebrice

Dizajnirao sam dvije RNA vodilje (gRNA, engl. *guide RNA*) za 3'-kraj gena *Acrc* zebrice (3'-gRNA), naziva g7 i g8, te proveo njihovu sintezu. Agaroznom gel-elektroforezom provjerio sam da su lančanom reakcijom polimerazom (PCR-om) uspješno umnoženi DNA kalupi veličine 127 pb za sintezu dizajniranih gRNA za protein Cas9 (Slika 7a) te da su transkripcijom *in vitro* uspješno sintetizirane dvije gRNA veličine 127 baza (Slika 7b). Kod gRNA g7 (Slika 7b) bilo je vidljivo nekoliko pruga (vrpci) u gelu zato što su molekule RNA dimerizirale i stvarale različite sekundarne strukture (vjerojatno zbog komplementarnih ponavljanja GGGGG i CCC u sekvenci crRNA), koje su različitom brzinom putovale u gelu. Za gel na koji sam nanosio uzorke RNA također sam koristio marker veličine DNA, tako da se točna veličina gRNA ne može predvidjeti na temelju korištenog markera. RNA vodilju za 5'-kraj gena *Acrc* zebrice (5'-gRNA) za protein Cas12a, naziva g2, dizajnirala je i izvršila sintezu Cecile Otten.



Slika 7. Provjera sintetiziranih gRNA za 3'-kraj gena *Acrc* zebrice (3'-gRNA) agaroznom gel-elektroforezom. Pod a) je prikazan DNA ampikon umnožen lančanom reakcijom polimerazom koji je služio kao DNA kalup za sintezu gRNA, a pod b) gRNA sintetizirana transkripcijom DNA kalupa *in vitro*. Agarozna gel-elektroforeza pod a) provedena je u 2 %-tnom agaroznom gelu, a pod b) u 1,5 %-tnom agaroznom gelu. Veličina DNA ampikona iznosi 127 pb, a gRNA 127 baza. M – marker veličine DNA (kpb), g7 – prva 3'-gRNA, g8 – druga 3'-gRNA, gRNA – RNA vodilja (engl. *guide RNA*).

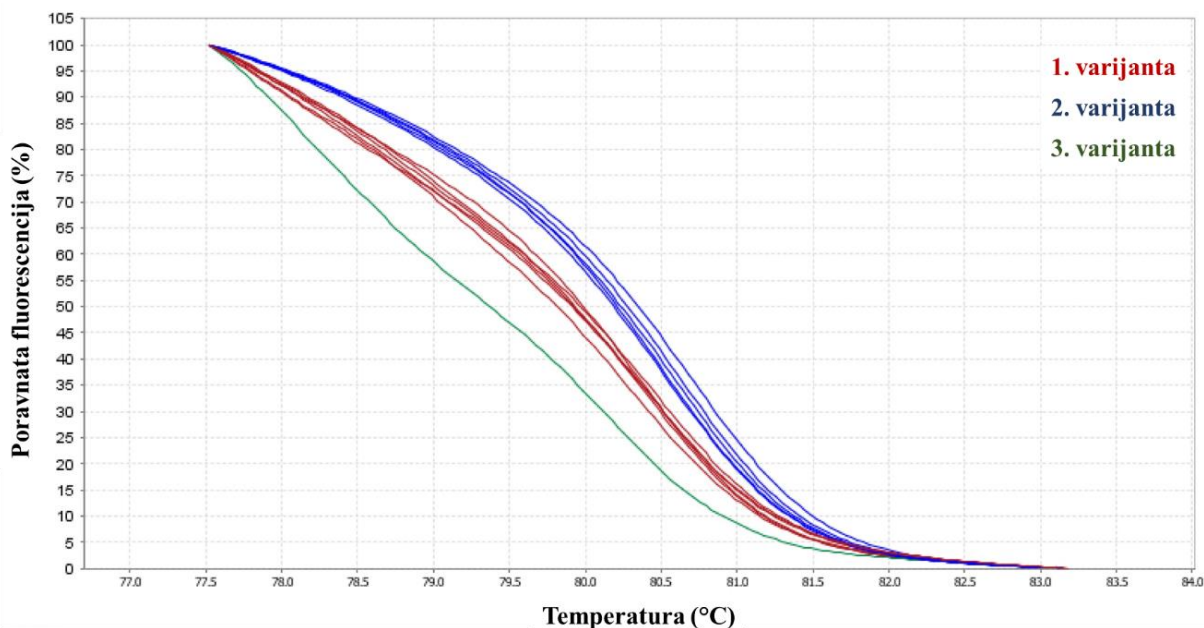
3.1.2. Utvrđivanje učinkovitosti RNA vodilja za 5'-kraj i 3'-kraj gena *Acrc* zebrice

3.1.2.1. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije

A) RNA vodilja za 5'-kraj gena

U sedam embrija u jednostaničnom stadiju injektiran je ribonukleoproteinski kompleks 5'-gRNA-Cas12a. Embrije sam skupio nakon 24 h i lizirao ih te uzorke lizata embrija koristio za metodu mekšanja DNA visoke rezolucije (metodu HRM). Metodom HRM utvrdio sam da su svi analizirani uzorci injektiranih embrija (uzorci E1 – E7) bili HRM pozitivni, tj. da je 7/7 ili 100 % embrija bilo HRM+. Određeni je uzorak HRM+ ako se oblik njegove krivulje mekšanja i/ili njegova temperatura mekšanja (T_m) razlikuju u odnosu na iste parametre uzorka divljeg tipa, što upućuje na različitu sekvencu DNA umnoženih DNA amplikona uzorka. Ako razlike u tim parametrima nema, uzorak je HRM negativan (HRM-). Sam program svrstava analizirane uzorke u različite varijante (skupine) uzoraka ovisno o obliku krivulje mekšanja i temperaturi mekšanja (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_070283.pdf). Različite varijante uzoraka program je označio različitim bojama (Slika 8, Tablica 1). Prvoj varijanti (označenoj crveno) pripadali su uzorci E1 – E4, E6 i E7 ($T_m = 80,3 – 80,4$ °C), drugoj varijanti (označenoj plavo) uzorci wt1 – wt5 (uzorci embrija divljeg tipa, engl. *wild type*; $T_m = 80,5 – 80,7$ °C), a trećoj varijanti (označenoj zeleno) pripadao je uzorak E5 ($T_m = 80,1$ °C).

Prema rezultatima metode HRM, gRNA za 5'-kraj gena *Acrc* zebrice (5'-gRNA) 100 % je učinkovita u induciranju dvolančanih lomova DNA u kombinaciji s proteinom Cas12a. Drugim riječima, rezultati metode HRM upućuju na to da su u stanicama svih injektiranih embrija inducirani dvolančani lomovi i popravak DNA nehomolognim spajanjem krajeva s posljedičnim mutacijama u sekvenci DNA. Kako bih provjerio do kojih je mutacija u sekvenci DNA došlo uslijed popravka dvolančanih lomova u stanicama injektiranih embrija, za kloniranje i sekvenciranje odabrao sam uzorke E1, E5 i E7, koji su svi bili HRM+ i imali su različite T_m .



Slika 8. Poravnate krivulje mekšanja u metodi mekšanja DNA visoke rezolucije za analizirane uzorke embrija. Crvenom, plavom i zelenom bojom označene su različite varijante uzoraka koje je odredio program. Popis odgovarajućih uzoraka, varijanti kojima pripadaju i temperatura mekšanja prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Temperature mekšanja (u °C) u metodi mekšanja DNA visoke rezolucije za analizirane uzorke embrija. Uzorci koje je program svrstao u različite varijante uzoraka označeni su pripadajućim bojama – crvenom, plavom i zelenom (vidjeti Sliku 8). Uzorci koji su odabrani za kloniranje i sekvenciranje podcrtani su. T_m – temperatura mekšanja (engl. *melting temperature*), wt – uzorak embrija divljeg tipa (engl. *wild type*), E – uzorak injektiranog embrija.

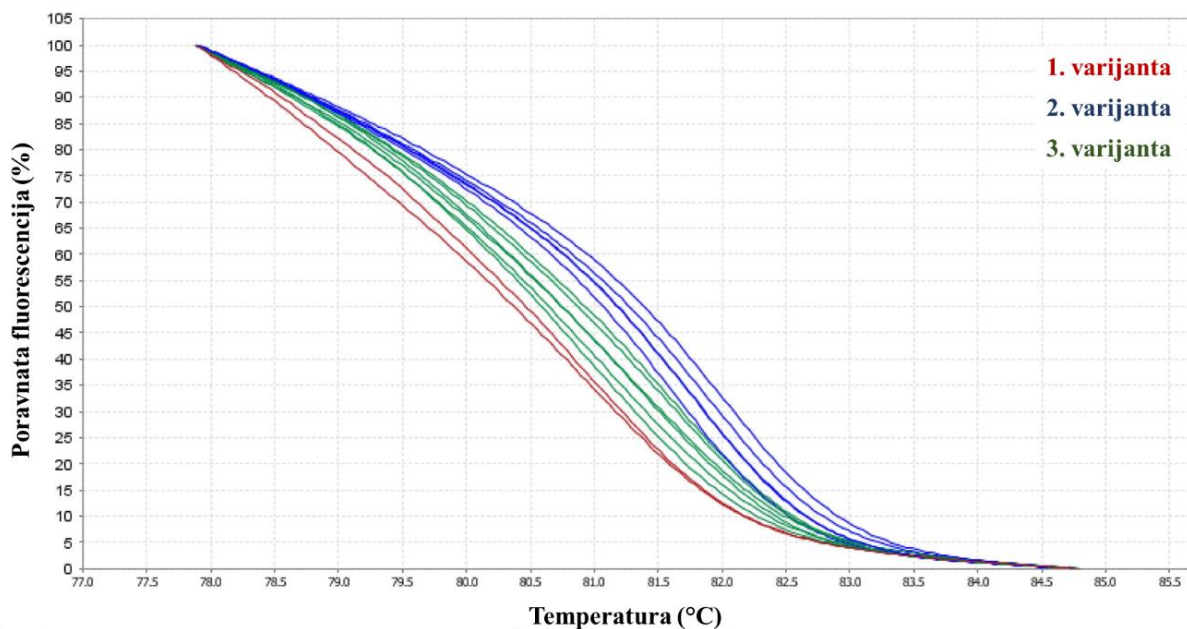
Uzorak	T_m (°C)	Uzorak	T_m (°C)
<u>E1</u>	<u>80,4</u>	<u>E7</u>	<u>80,3</u>
E2	80,4	wt1	80,5
E3	80,4	wt2	80,7
E4	80,3	wt3	80,5
<u>E5</u>	<u>80,1</u>	wt4	80,6
E6	80,3	wt5	80,5

B) RNA vodilja za 3'-kraj gena

U osam embrija u jednostaničnom stadiju injektiran je kompleks 3'-gRNA-Cas9 (3'-gRNA bila je g7). Embrije sam skupio nakon 24 h i lizirao ih te uzorke lizata embrija koristio za metodu

HRM. Metodom HRM utvrdio sam da su svi analizirani uzorci injektiranih embrija (uzorci E1 – E8) bili HRM+, tj. da je 8/8 ili 100 % embrija bilo HRM+. Program je uzorke svrstao u različite varijante označene različitim bojama (Slika 9, Tablica 2). Prvoj varijanti (označenoj crveno) pripadali su uzorci E1 i E6 ($T_m = 80,9 \text{ }^\circ\text{C}$), drugoj varijanti (označenoj plavo) uzorci wt1 – wt5 (uzorci embrija divljeg tipa; $T_m = 81,6 - 82,0 \text{ }^\circ\text{C}$), a trećoj varijanti (označenoj zeleno) pripadali su uzorci E2 – E5, E7 i E8 ($T_m = 80,9 - 81,6 \text{ }^\circ\text{C}$).

Prema rezultatima metode HRM, gRNA za 3'-kraj gena *Acrc* zebrice (3'-gRNA, g7) 100 % je učinkovita u induciranju dvolančanih lomova DNA u kombinaciji s proteinom Cas9. Drugim riječima, rezultati metode HRM upućuju na to da su u stanicama svih injektiranih embrija inducirani dvolančani lomovi i popravak DNA nehomolognim spajanjem krajeva s posljedičnim mutacijama u sekvenci DNA. Kako bih provjerio do kojih je mutacija u sekvenci DNA došlo uslijed popravka dvolančanih lomova u stanicama injektiranih embrija, za kloniranje i sekvenciranje odabrao sam uzorke E4, E5 i E6, koji su svi bili HRM+ i imali su različite T_m ili su svrstani u različite varijante uzoraka.

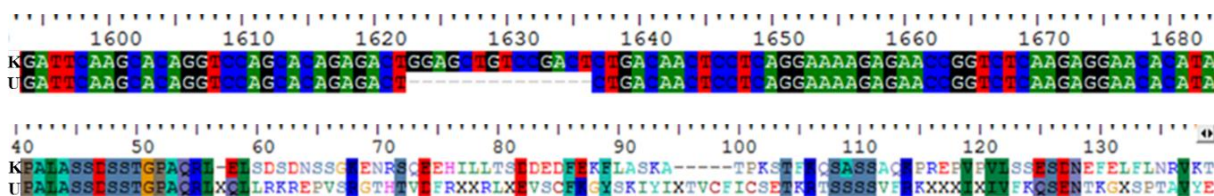


Slika 9. Poravnate krivulje mekšanja u metodi mekšanja DNA visoke rezolucije za analizirane uzorke embrija. Crvenom, plavom i zelenom bojom označene su različite varijante uzoraka koje je odredio program. Popis odgovarajućih uzoraka, varijanti kojima pripadaju i temperatura mekšanja prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Temperature mekšanja (u °C) u metodi mekšanja DNA visoke rezolucije za analizirane uzorke embrija. Uzorci koje je program svrstao u različite varijante uzoraka označeni su pripadajućim bojama – crvenom, plavom i zelenom (vidjeti Sliku 9). Uzorci koji su odabrani za kloniranje i sekvenciranje podcrtani su. T_m – temperatura mekšanja (engl. *melting temperature*), wt – uzorak embrija divljeg tipa (engl. *wild type*), E – uzorak injektiranog embrija.

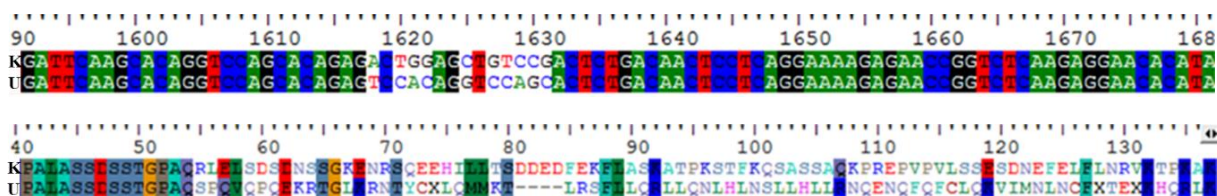
Uzorak	T_m (°C)	Uzorak	T_m (°C)
E1	80,9	E8	81,1
E2	81,2	wt1	82,0
E3	81,2	wt2	81,7
<u>E4</u>	<u>81,5</u>	wt3	81,9
<u>E5</u>	<u>80,9</u>	wt4	81,8
<u>E6</u>	<u>80,9</u>	wt5	81,6
E7	81,6		

Četiri sekvencirana DNA amplikona uzorka embrija E1 imala su sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 11), a jedan je imao deleciju nukleotida 1621 – 1634 (GGA GCT GTC CGA CT, 14 nt), tj. pomak okvira čitanja nakon 56. aminokiseline i preuranjeni stop-kodon na mjestu 57. aminokiseline (Slika 12).



Slika 12. Poravnata sekvencija nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija E1. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvencija nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvencija nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvencija aminokiselina proteina ACRC zebrice, a u drugom redu (U) sekvencija aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

Dva sekvencirana DNA amplikona uzorka embrija E5 imala su sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 11), a jedan je imao složenu mutaciju u kojoj je došlo do promjene nukleotida 1618 – 1631 (ACT GGA GCT GTC CG u TCC ACA GGT CCA GC), tj. pomak okvira čitanja nakon 54. aminokiseline i preuranjeni stop-kodon na mjestu 74. aminokiseline (Slika 13).



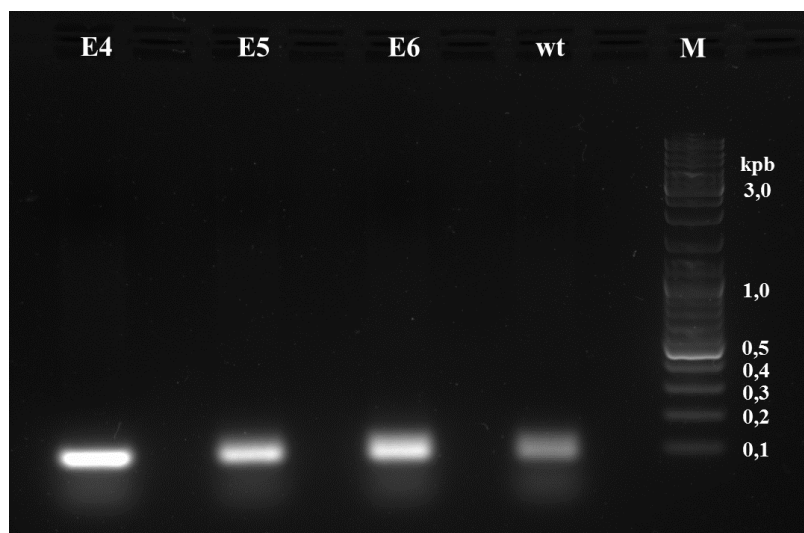
Slika 13. Poravnata sekvencija nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija E5. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvencija nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvencija nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvencija aminokiselina proteina ACRC zebrice, a u drugom redu (U) sekvencija aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

Četiri sekvencirana DNA amplikona uzorka embrija E7 imala su sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 11) te nisam pronašao mutacije u sekvenci DNA amplikona u usporedbi sa

sekvencom nukleotida divljeg tipa. Vjerojatno bih pronašao mutacije nakon sekvenciranja većeg broja amplikona s obzirom na to da je uzorak bio HRM+.

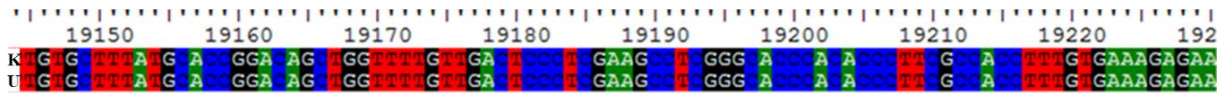
B) RNA vodilja za 3'-kraj gena

Agaroznom gel-elektroforezom provjerio sam da su lančanom reakcijom polimerazom uspješno umnoženi DNA amplikoni uzoraka E4, E5, E6 i wt veličine 87 pb (Slika 14). DNA amplikone pročistio sam iz PCR smjesa, ligirao ih u plazmidni vektor te sam rekombinantne plazmide koristio za transformaciju kompetentnih bakterijskih stanica, iz kojih sam nakon formiranja bakterijskih kolonija i kultura u suspenziji izolirao plazmide za sekvenciranje.



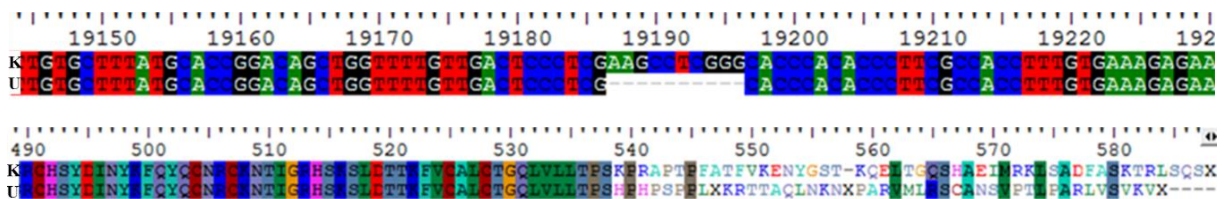
Slika 14. Provjera agaroznom gel-elektroforezom DNA amplikona umnoženih lančanom reakcijom polimerazom. Agarozna gel-elektroforeza provedena je u 1,5 %-tnom agaroznom gelu. Veličina amplikona sekvence divljeg tipa iznosi 87 pb. M – marker veličine DNA (kpb), wt – uzorak embrija divljeg tipa (engl. *wild type*), E4, E5 i E6 – uzorci embrija odabrani za sekvenciranje (vidjeti Tablicu 2).

Nakon sekvenciranja, sekvence DNA analizirao sam u programu BioEdit. Dva sekvencirana DNA amplikona uzorka embrija divljeg tipa (wt) imala su sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 15).



Slika 15. Poravnata sekvenca nukleotida za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija wt. U prvom redu (K) prikazana je konsenzusna sekvenca nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvenca nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusna sekvenca preuzeta je iz baze podataka Ensembl. wt – uzorak embrija divljeg tipa (engl. *wild type*).

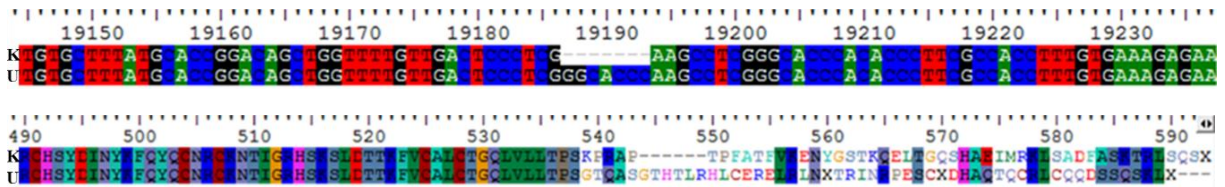
Četiri sekvencirana DNA amplikona uzorka embrija E4 imala su sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 15), a jedan je imao deleciju nukleotida 19187 – 19196 (AAG CCT CGG G, 10 nt), tj. pomak okvira čitanja nakon 538. aminokiseline i preuranjeni stop-kodon na mjestu 547. aminokiseline (Slika 16).



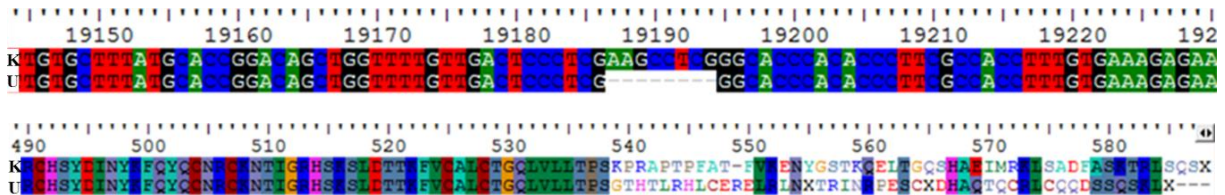
Slika 16. Poravnata sekvenca nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija E4. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvenca nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvenca nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvenca aminokiselina proteina ACRC zebrice, a u drugom redu (U) sekvenca aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

Jedan sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija E5 imao je sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 15), dva su imala inserciju između nukleotida 19186 i 19187 (GGC ACC C, 7 nt), tj. pomak okvira čitanja nakon 538. aminokiseline i preuranjeni stop-kodon na mjestu 560. aminokiseline (Slika 17a), a tri su imala deleciju nukleotida 19187 – 19194 (AAG CCT CG, 8 nt), tj. pomak okvira čitanja nakon 538. aminokiseline i preuranjeni stop-kodon na mjestu 555. aminokiseline (Slika 17b).

a)



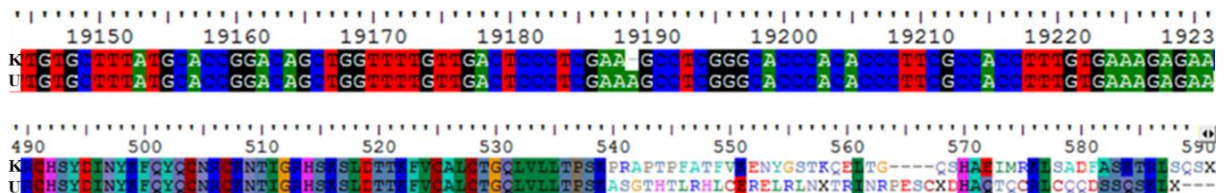
b)



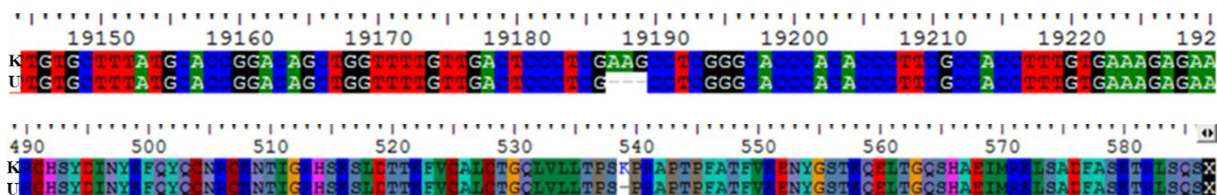
Slika 17. Poravnata sekvenca nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirane DNA amplikone uzorka embrija E5; prva sekvenca (a) i druga sekvenca (b). U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvenca nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvenca nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvenca aminokiselina proteina ACRC zebrice, a u drugom redu (U) sekvenca aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

Tri sekvencirana DNA amplikona uzorka embrija E6 imala su sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 15), jedan je imao inserciju između nukleotida 19188 i 19189 (A, 1 nt), tj. pomak okvira čitanja nakon 539. aminokiseline i preuranjeni stop-kodon na mjestu 558. aminokiseline (Slika 18a), a jedan je imao deleciju nukleotida 19187 – 19189 (AAG, 3 nt), tj. deleciju aminokiseline K539 (Slika 18b).

a)



b)

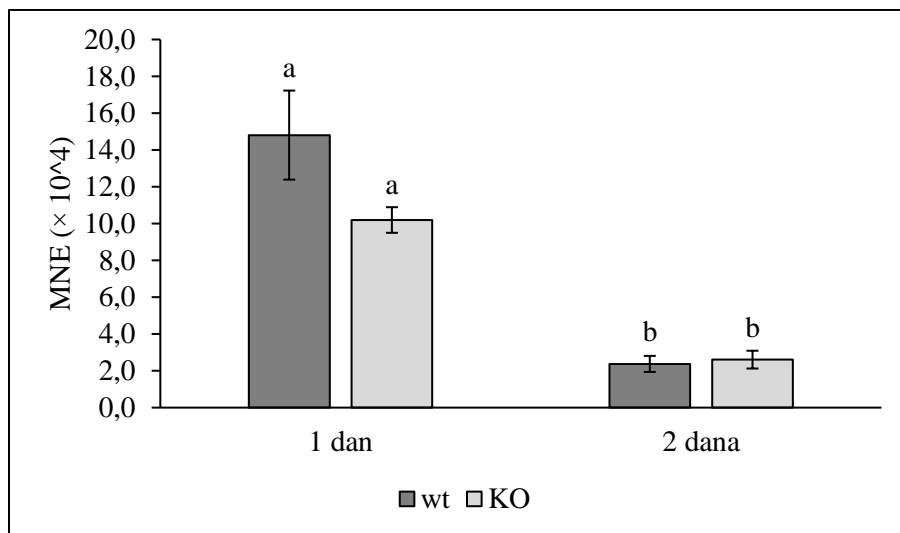


Slika 18. Poravnata sekvenca nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirane DNA amplikone uzorka embrija E6; prva sekvenca (a) i druga sekvenca (b). U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvenca nukleotida gena *Acrc* zebreice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvenca nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvenca aminokiselina proteina ACRC zebreice, a u drugom redu (U) sekvenca aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

Na temelju rezultata metode HRM i rezultata sekvenciranja utvrdio sam da su dizajnirane 5'-gRNA (g2) i 3'-gRNA (g7) učinkovite RNA vodilje, stoga sam ih koristio za ciljanu inaktivaciju gena *Acrc* u embrijima zebreice metodom CRISPR/Cas. Inaktivaciju gena utvrđivao sam mjerenjem razine ekspresije gena *Acrc* metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR-om) (poglavlje 3.1.3.). S obzirom na to da je g7 bila učinkovita gRNA, nije bilo potrebe za provjerom učinkovitosti g8, druge dizajnirane i sintetizirane 3'-gRNA.

3.1.3. Utvrđivanje ciljane inaktivacije gena *Acrc* zebrice metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom

U 60 embrija u jednostaničnom stadiju koinjektirani su kompleksi 5'-gRNA-Cas12a i 3'-gRNA-Cas9. Nakon 24 h (jednog dana) i 48 h (dva dana) skupio sam 15 embrija po uzorku, sonicirao ih, izolirao ukupnu RNA, proveo reverznu transkripciju RNA te dobivene uzorke cDNA koristio za qPCR. Analizirao sam embrije dviju skupina: wt i KO. wt označava embrije divljeg tipa, a KO embrije koinjektirane RNA vodiljama za 5'-kraj i 3'-kraj gena *Acrc* zebrice (KO od engl. *knockout*). Na temelju rezultata qPCR-a utvrdio sam da je gen *Acrc* zebrice bio djelomično inaktiviran pomoću gRNA za 5'-kraj i 3'-kraj gena te odgovarajućih proteina Cas. Smanjenje razine ekspresije gena (na razini mRNA) embrija koji su prošli ciljanu inaktivaciju gena (embrija iz skupine KO) bilo je vidljivo u embrija starih jedan dan, koji su imali 1,45 puta manju ekspresiju od embrija divljeg tipa, tj. imali su 31,2 % manju ekspresiju od embrija divljeg tipa, iako ta razlika nije bila statistički značajna (Slika 19). U embrija starih dva dana nije bila vidljiva značajna razlika između embrija iz skupina KO i wt te su razine ekspresije u obiju skupina bile značajno manje nego u embrija starih jedan dan (Slika 19). Razinu ekspresije gena *Acrc* u embrija starih tri i šest dana odredio sam u zasebnim eksperimentima (nije prikazano). Jednako kao i u embrija starih dva dana, razine ekspresije u embrija starih tri i šest dana bile su značajno manje nego u embrija starih jedan dan te nisam uočio značajne razlike između embrija iz skupina KO i wt.



Slika 19. Razina ekspresije gena *Acrc* (na razini mRNA) u embrijima zebrice starim jedan i dva dana određena metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom i prikazana vrijednostima MNE ($\times 10^4$). Razina ekspresije gena prikazana je kao srednja vrijednost razine ekspresije dviju bioloških replika \pm standardna pogreška srednje vrijednosti. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$ (prema Tukeyjevom testu značajnosti) označeni su različitim slovima. MNE – srednja normalizirana ekspresija (engl. *mean normalized expression*), wt – embriji divljeg tipa (engl. *wild type*), KO – embriji zebrice koinjektirani RNA vodiljama za 5'-kraj i 3'-kraj gena *Acrc* zebrice (KO od engl. *knockout*), 1 dan – embriji stari jedan dan, 2 dana – embriji stari dva dana.

3.2. Uloga proteina ACRC zebrice s delecijom katalitičkog glutamata (E451) u popravku unakrsnih veza DNA-protein

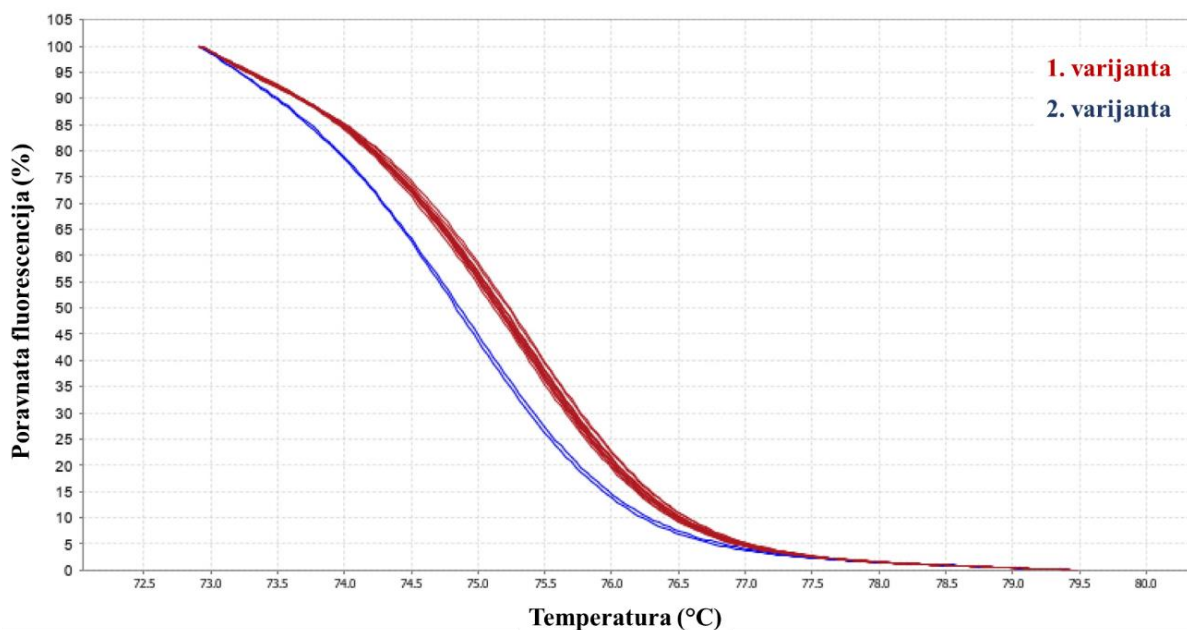
Ribe linije koju sam koristio injektirane su RNA vodiljom gRNA1, proteinom Cas9 i kalupom za popravak RT1 u jednostaničnom stadiju te uzgojene do odrasle dobi (generacija F₀). Homolognim kalupom za popravak RT1 u gen *Acrc* željela se unijeti mutacija pretpostavljenog katalitičkog glutamata A16349C (E451A) i gen za fluorescentni protein mVenus pod promotorom za alfa-kristalin. Za svoje eksperimente koristio sam odrasle ribe generacije F₁ koje su bile potomci mozaičnog mužjaka utemeljitelja generacije F₀, koji je prenosio različite mutacije na svoje potomstvo, i ženke divljeg tipa.

3.2.1. Identifikacija ženki generacije F₁ koje su heterozigoti za katalitičku mutaciju gena *Acrc* zebrice

3.2.1.1. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije

Uzeo sam uzorke odsječka peraje (FC1 – FC10, engl. *fin clip*) redom deset analiziranih ženki generacije F₁ (FC1 – FC10), među kojima sam htio identificirati heterozigote za katalitičku mutaciju gena *Acrc*, uzorke lizirao i uzorke lizata odsječka peraje koristio za metodu HRM. Metodom HRM utvrdio sam da su dva od deset analiziranih uzoraka odsječka peraje (uzorci FC2 i FC6) bila HRM+, tj. da je 2/10 ili 20 % uzoraka bilo HRM+, dok su ostali uzorci (FC1, FC3 – FC5 i FC7 – FC10) bili HRM-. Program je uzorke svrstao u različite varijante označene različitim bojama (Slika 20, Tablica 3). Prvoj varijanti (označenoj crveno) pripadali su uzorci FC1, FC3 – FC5, FC7 – FC10 i wt1 – wt4 (uzorci odsječka peraje jedinke divljeg tipa; T_m = 75,3 °C), a drugoj varijanti (označenoj plavo) pripadali su uzorci FC2 i FC6 (T_m = 74,9 °C).

Kako bih provjerio koje mutacije u sekvenci DNA imaju HRM+ uzorci (FC2 i FC6), koristio sam iste uzorke za kloniranje i sekvenciranje.



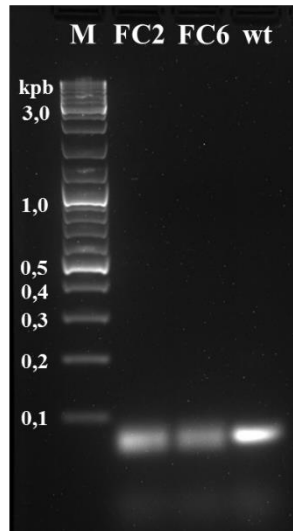
Slika 20. Poravnate krivulje mekšanja u metodi mekšanja DNA visoke rezolucije za analizirane uzorke odsječka peraje. Crvenom i plavom bojom označene su različite varijante uzoraka koje je odredio program. Popis odgovarajućih uzoraka, varijanti kojima pripadaju i temperatura mekšanja prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Temperature mekšanja (u °C) u metodi mekšanja DNA visoke rezolucije za analizirane uzorke odsječka peraje. Uzorci koje je program svrstao u različite varijante uzoraka označeni su pripadajućim bojama – crvenom i plavom (vidjeti Sliku 20). Uzorci koji su odabrani za kloniranje i sekvenciranje podcrtani su. T_m – temperatura mekšanja (engl. *melting temperature*), wt – uzorak odsječka peraje jedinke divljeg tipa (engl. *wild type*), FC – uzorak odsječka peraje analizirane jedinke (engl. *fin clip*).

Uzorak	T_m (°C)	Uzorak	T_m (°C)
FC1	75,3	FC8	75,3
<u>FC2</u>	<u>74,9</u>	FC9	75,3
FC3	75,3	FC10	75,2
FC4	75,3	wt1	75,3
FC5	75,3	wt2	75,3
<u>FC6</u>	<u>74,9</u>	wt3	75,3
FC7	75,3	wt4	75,3

3.2.1.2. Kloniranje i sekvenciranje

Agaroznom gel-elektroforezom provjerio sam da su lančanom reakcijom polimerazom uspješno umnoženi DNA amplikoni uzoraka FC2, FC6 i wt veličine 73 pb (Slika 21). DNA amplikone pročistio sam iz PCR smjesa, ligirao ih u plazmidni vektor te sam rekombinantne plazmide koristio za transformaciju kompetentnih bakterijskih stanica, iz kojih sam nakon formiranja bakterijskih kolonija i kultura u suspenziji izolirao plazmide za sekvenciranje.



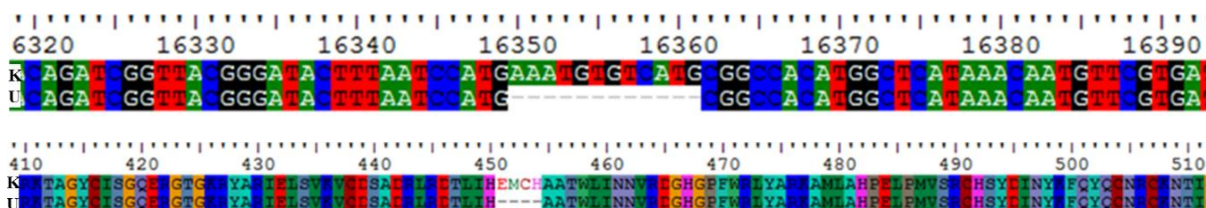
Slika 21. Provjera agaroznom gel-elektroforezom DNA amplikona umnoženih lančanom reakcijom polimerazom. Agarozna gel-elektroforeza provedena je u 2 %-tnom agaroznom gelu. Veličina amplicona sekvence divljeg tipa iznosi 73 pb. M – marker veličine DNA (kpb), wt – uzorak odsječka peraje jedinke divljeg tipa (engl. *wild type*), FC2 i FC6 – uzorci odsječka peraje (engl. *fin clip*) odabrani za sekvenciranje (vidjeti Tablicu 3).

Nakon sekvenciranja, sekvence DNA analizirao sam u programu BioEdit. Dva sekvencirana DNA amplicona uzorka odsječka peraje jedinke divljeg tipa (wt) imala su sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 22).



Slika 22. Poravnata sekvenca nukleotida za sekvencirani DNA amplicon uzorka odsječka peraje wt. U prvom redu (K) prikazana je konsenzusna sekvenca nukleotida gena *Acrc* zebriće (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvenca nukleotida sekvenciranog DNA amplicona uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusna sekvenca preuzeta je iz baze podataka Ensembl. wt – uzorak odsječka peraje jedinke divljeg tipa (engl. *wild type*).

Jedan sekvencirani DNA amplikon uzorka odsječka peraje FC2 imao je sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 22), a četiri amplikona imala su deleciju nukleotida 16349 – 16360 (AAA TGT GTC ATG, 12 nt), tj. deleciju aminokiselina 451 – 454 (EMCH, 4 ak) (Slika 23). Isti je slučaj bio i za sekvencirane DNA amplikone uzorka odsječka peraje FC6.

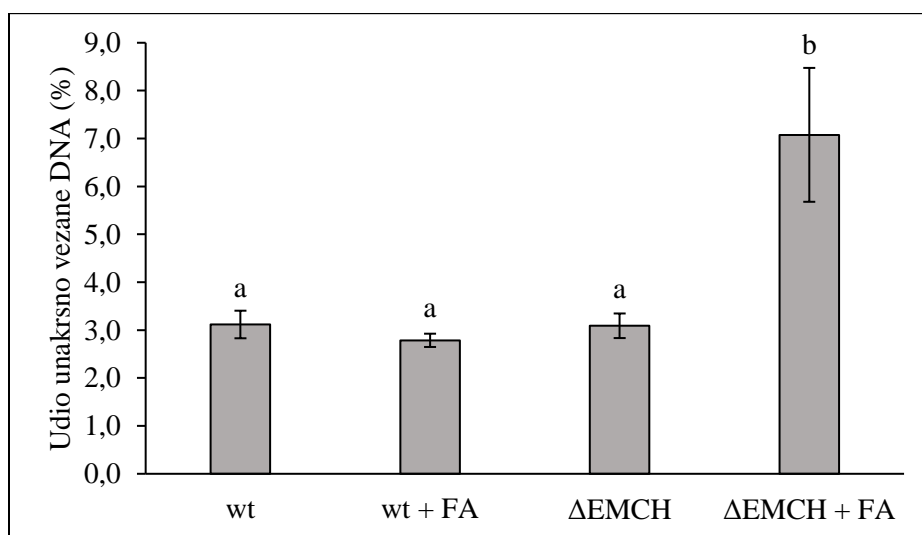


Slika 23. Poravnata sekvenca nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka odsječka peraje FC2. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvenca nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvenca nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvenca aminokiselina proteina ACRC zebrice, a u drugom redu (U) sekvenca aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

Na temelju rezultata metode HRM i rezultata sekvenciranja identificirao sam dvije ženke generacije F₁ (FC2 i FC6) koje su heterozigoti za katalitičku mutaciju gena *Acrc* – za deleciju nukleotida 16349 – 16360 (AAA TGT GTC ATG), tj. deleciju aminokiselina 451 – 454 (EMCH) proteina ACRC (dalje u tekstu: mutacija Δ EMCH). E451 je pretpostavljeni katalitički glutamat, dio motiva HEXXH proteazne jezgre proteina, a H454 jedan od triju histidina uključenih u koordinaciju iona cinka. Christine Supina, mag. biol. mol. (Laboratorij za molekularnu ekotoksikologiju, Institut Ruđer Bošković), identificirala je mužjaka (nazvanog m2) heterozigota za mutaciju Δ EMCH. Ženke FC2 i FC6 te mužjaka m2 koristio sam za daljnje eksperimente (poglavlje 3.2.2.).

3.2.2. Izolacija unakrsno vezanih DNA i proteina metodom SDS/KCl precipitacije iz embrija zebrice koji imaju katalitičku mutaciju gena *Acrc* (Δ EMCH)

Križao sam ženku (FC6) i mužjaka (m2) heterozigote za mutaciju Δ EMCH. Skupio sam embrije stare tri dana (deset po uzorku), iz njih izolirao unakrsno vezane DNA i proteine (DPC-ove) metodom SDS/KCl precipitacije, izmjerio koncentraciju DNA i odredio udio DNA unakrsno vezane s proteinima. Kod embrija potomaka ženke i mužjaka heterozigota za mutaciju Δ EMCH očekivao sam da je bilo 25 % embrija divljeg tipa, 50 % heterozigota i 25 % homozigota za mutaciju Δ EMCH. Analizirao sam embrije četiriju skupina: wt, wt + FA, Δ EMCH i Δ EMCH + FA. wt označava embrije divljeg tipa, Δ EMCH embrije potomke ženke i mužjaka heterozigota za mutaciju Δ EMCH, a FA embrije tretirane formaldehidom koncentracije 5 mM tijekom perioda od 1 h. Između embrija iz skupina wt, wt + FA i Δ EMCH nije bilo statistički značajnih razlika u razini DPC-ova (udjelu DNA unakrsno vezane s proteinima) (Slika 24). Embriji iz skupine Δ EMCH + FA imali su redom 2,27 puta (127 %), 2,54 puta (154 %) i 2,29 puta (129 %) veću razinu DPC-ova u odnosu na skupine wt, wt + FA i Δ EMCH (Slika 24), odnosno prosječno 2,37 puta (137 %) veću razinu DPC-ova u odnosu na ostale skupine, i te su razlike bile značajne.



Slika 24. Udio DNA unakrsno vezane s proteinima (u %) u embrijima zebrice starim tri dana određen izolacijom unakrsno vezanih DNA i proteina metodom SDS/KCl precipitacije i mjerenjem koncentracije DNA. Udio unakrsno vezane DNA prikazan je kao srednja vrijednost udjela unakrsno vezane DNA triju bioloških replika \pm standardna pogreška srednje vrijednosti. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$ (prema Tukeyjevom testu značajnosti) označeni su različitim slovima. wt – embriji divljeg tipa (engl. *wild type*), Δ EMCH – embriji potomci ženke i mužjaka generacije F_1 koji su heterozigoti za deleciju aminokiselina 451 – 454 (Δ EMCH) proteina ACRC zebrice, FA – embriji tretirani formaldehidom koncentracije 5 mM tijekom perioda od 1 h.

3.3. Uloga proteina ACRC zebrice s delecijom C-kraja u popravku unakrsnih veza DNA-protein

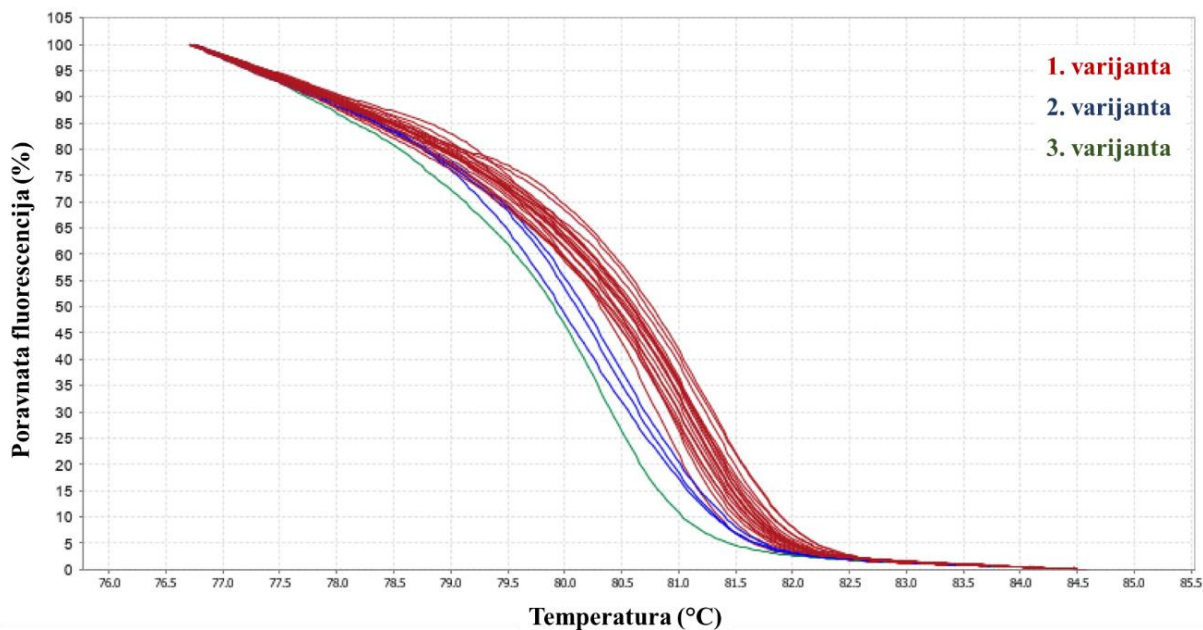
Ribe linije koju sam koristio injektirane su RNA vodiljom gRNA2 i proteinom Cas9 u jednostaničnom stadiju te uzgojene do odrasle dobi (generacija F₀).

3.3.1. Identifikacija ženki utemeljitelja generacije F₀ genotipizacijom embrija

3.3.1.1. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije

Od ukupno 12 ženki (FON1 – FON12), među kojima sam želio identificirati utemeljitelje, samo su se dvije opetovano mrijestile (FON8 i FON9). Križao sam te dvije ženke individualno s mužjacima divljeg tipa. Skupio sam po deset njihovih embrija starih 6 h. Obično se embriji skupljaju najranije 24 h nakon oplodnje kako bi se dobila veća količina genomske DNA za daljnje analize, međutim u ovom slučaju skupljao sam ih ranije jer su embriji ugibali u periodu između 6 i 12 h starosti i imali su 100 %-tnu smrtnost. Embrije 8.1 – 8.10 ženke FON8 i 9.1 – 9.10 ženke FON9 lizirao sam te sam uzorke lizata embrija koristio za metodu HRM. Metodom HRM utvrdio sam da je šest od dvadeset analiziranih uzoraka embrija (uzorci 8.3, 8.5, 8.8, 9.5, 9.8 i 9.10) bilo HRM+, tj. da je 6/20 ili 30 % uzoraka bilo HRM+, i to 3/10 (30 %) uzoraka embrija ženke FON8 i 3/10 (30 %) uzoraka embrija ženke FON9, dok su ostali su uzorci (8.1, 8.2, 8.4, 8.6, 8.7, 8.9, 8.10, 9.1 – 9.4, 9.6, 9.7 i 9.9) bili HRM-. Program je uzorke svrstao u različite varijante označene različitim bojama (Slika 25, Tablica 4). Prvoj varijanti (označenoj crveno) pripadali su uzorci 8.1, 8.2, 8.4 – 8.10, 9.1 – 9.4, 9.6, 9.7, 9.9 i wt1 – wt4 (uzorci embrija divljeg tipa; T_m = 80,8 – 81,2 °C), drugoj varijanti (označenoj plavo) uzorci 9.5, 9.8 i 9.10 (T_m = 80,1 – 80,4 °C), a trećoj varijanti (označenoj zeleno) pripadao je uzorak 8.3 (T_m = 80,3 °C). Iako je program svrstao uzorke embrija 8.5 i 8.8 u istu varijantu kao uzorke embrija divljeg tipa, na temelju različite temperature mekšanja odredio sam ih kao HRM+ uzorke, što sam potvrdio i sekvenciranjem (uzorci su imali mutacije u sekvenci DNA).

Kako bih provjerio koje mutacije u sekvenci DNA imaju HRM+ uzorci (8.3, 8.5, 8.8, 9.5, 9.8 i 9.10), koristio sam iste uzorke za kloniranje i sekvenciranje.



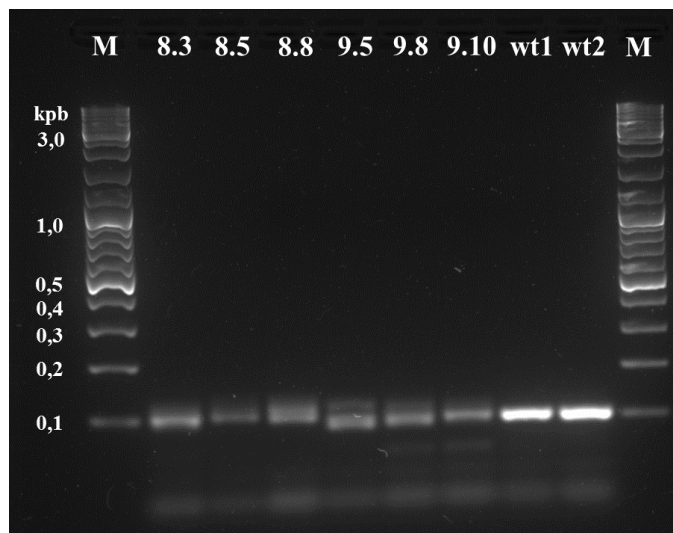
Slika 25. Poravnate krivulje mekšanja u metodi mekšanja DNA visoke rezolucije za analizirane uzorke embrija. Crvenom, plavom i zelenom bojom označene su različite varijante uzoraka koje je odredio program. Popis odgovarajućih uzoraka, varijanti kojima pripadaju i temperatura mekšanja prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Temperature mekšanja (u °C) u metodi mekšanja DNA visoke rezolucije za analizirane uzorke embrija. Uzorci koje je program svrstao u različite varijante uzoraka označeni su pripadajućim bojama – crvenom, plavom i zelenom (vidjeti Sliku 25). Uzorci koji su odabrani za kloniranje i sekvenciranje podcrtni su. T_m – temperatura mekšanja (engl. *melting temperature*), wt – uzorak embrija divljeg tipa (engl. *wild type*), 8.1 – 8.10 i 9.1 – 9.10 – uzorci embrija analiziranih jedinki.

Uzorak	T_m (°C)	Uzorak	T_m (°C)	Uzorak	T_m (°C)
8.1	81,2	8.9	81,0	9.7	80,9
8.2	81,1	8.10	81,1	<u>9.8</u>	<u>80,4</u>
<u>8.3</u>	<u>80,3</u>	9.1	81,0	9.9	80,9
8.4	81,1	9.2	81,1	<u>9.10</u>	<u>80,4</u>
<u>8.5</u>	<u>80,8</u>	9.3	81,0	wt1	81,1
8.6	81,2	9.4	81,0	wt2	81,1
8.7	81,1	<u>9.5</u>	<u>80,1</u>	wt3	81,1
<u>8.8</u>	<u>80,8</u>	9.6	80,9	wt4	81,0

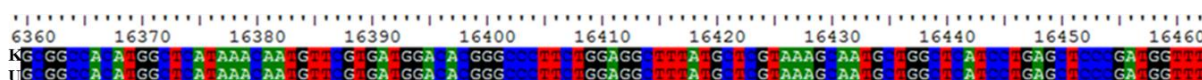
3.3.1.2. Kloniranje i sekvenciranje

Agaroznom gel-elektroforezom provjerio sam da su lančanom reakcijom polimerazom uspješno umnoženi DNA amplikoni uzoraka 8.3, 8.5, 8.8, 9.5, 9.8, 9.10, wt1 i wt2 veličine 105 pb (Slika 26). DNA amplikone pročistio sam iz PCR smjesa, ligirao ih u plazmidni vektor te sam rekombinantne plazmide koristio za transformaciju kompetentnih bakterijskih stanica, iz kojih sam nakon formiranja bakterijskih kolonija i kultura u suspenziji izolirao plazmide za sekvenciranje.



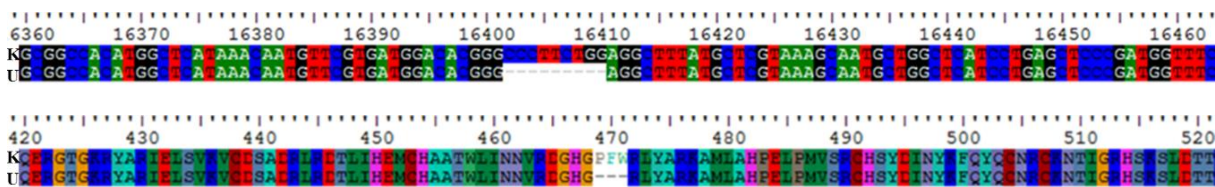
Slika 26. Provjera agaroznom gel-elektroforezom DNA amplikona umnoženih lančanom reakcijom polimerazom. Agarozna gel-elektroforeza provedena je u 2 %-tnom agaroznom gelu. Veličina amplikona sekvence divljeg tipa iznosi 105 pb. M – marker veličine DNA (kpb), wt1 i wt2 – uzorci embrija divljeg tipa (engl. *wild type*), 8.3, 8.5, 8.8, 9.5, 9.8 i 9.10 – uzorci embrija odabrani za sekvenciranje (vidjeti Tablicu 4).

Nakon sekvenciranja, sekvence DNA analizirao sam u programu BioEdit. Po jedan sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija divljeg tipa (wt1 i wt2) imao je sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 27).



Slika 27. Poravnata sekvenca nukleotida za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija wt1. U prvom redu (K) prikazana je konsenzusna sekvenca nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvenca nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusna sekvenca preuzeta je iz baze podataka Ensembl. wt – uzorak embrija divljeg tipa (engl. *wild type*).

Dva sekvencirana DNA amplikona uzorka embrija 8.3 imala su sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 27), a jedan je imao deleciju nukleotida 16402 – 16410 (CCC TTC TGG, 9 nt), tj. deleciju aminokiselina 469 – 471 (PFW, 3 ak) (Slika 28).



Slika 28. Poravnata sekvencija nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 8.3. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvencija nukleotida gena *AcrC* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvencija nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvencija aminokiselina proteina *ACRC* zebrice, a u drugom redu (U) sekvencija aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

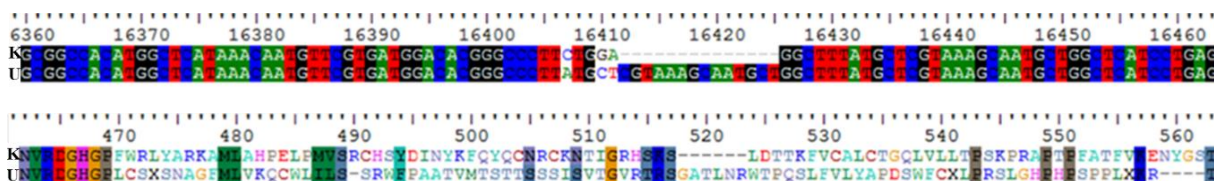
Dva sekvencirana DNA amplikona uzorka embrija 8.5 imala su sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 27), a jedan je imao deleciju nukleotida 16403 – 16421 (CCT TCT GGA GGC TTT ATG C, 19 nt). tj. pomak okvira čitanja nakon 468. aminokiseline i preuranjeni stop-kodon na mjestu 529. aminokiseline (Slika 29).



Slika 29. Poravnata sekvencija nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 8.5. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvencija nukleotida gena *AcrC* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvencija nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvencija aminokiselina proteina *ACRC* zebrice, a u drugom redu (U) sekvencija aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

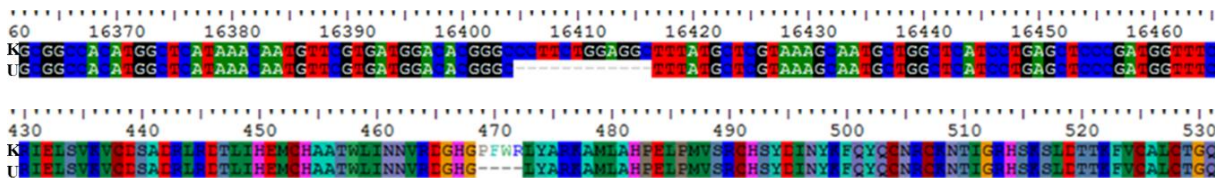
Jedan sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 8.8 imao je sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 27), a dva su imala supstitucije C16407A, G16410C i A16411T te inserciju između

nukleotida 16411 i 16412 (CGT AAA GCA ATG CT, 14 nt), tj. pomak okvira čitanja nakon 469. aminokiseline i preuranjeni stop-kodon na mjestu 473. aminokiseline (Slika 30).



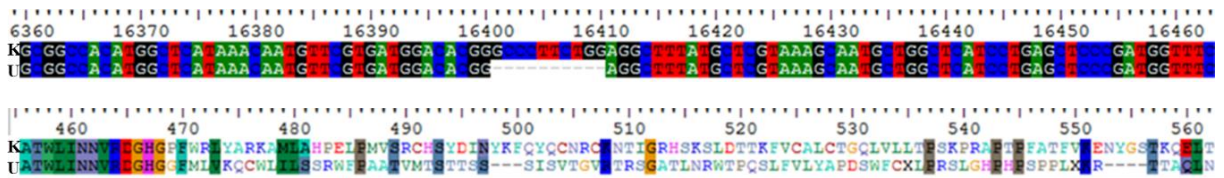
Slika 30. Poravnata sekvenca nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 8.8. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvenca nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvenca nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvenca aminokiselina proteina ACRC zebrice, a u drugom redu (U) sekvenca aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

Četiri sekvencirana DNA amplikona uzorka embrija 9.5 imala su deleciju nukleotida 16403 – 16414 (CCT TCT GGA GGC, 12 nt), tj. deleciju aminokiselina 469 – 472 (PFWR, 4 ak) (Slika 31).



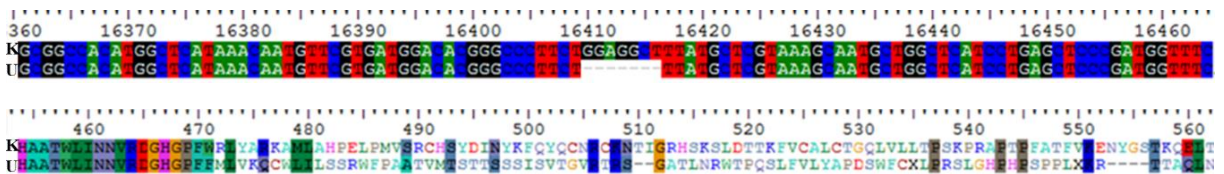
Slika 31. Poravnata sekvenca nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 9.5. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvenca nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvenca nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvenca aminokiselina proteina ACRC zebrice, a u drugom redu (U) sekvenca aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

Jedan sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 9.8 imao je sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 27), a jedan je imao deleciju aminokiselina 16401 – 16410 (GCC CTT CTG G, 10 nt), tj. pomak okvira čitanja nakon 468. aminokiseline i preuranjeni stop-kodon na mjestu 532. aminokiseline (Slika 32).



Slika 32. Poravnata sekvenca nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 9.8. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvenca nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvenca nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvenca aminokiselina proteina ACRC zebrice, a u drugom redu (U) sekvenca aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

Dva sekvencirana DNA amplikona uzorka embrija 9.10 imala su sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 27), a dva su imala deleciju nukleotida 16409 – 16415 (GGA GGC T, 7 nt), tj. pomak okvira čitanja nakon 470. aminokiseline i preuranjeni stop-kodon na mjestu 533. aminokiseline (Slika 33).



Slika 33. Poravnata sekvenca nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 9.10. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvenca nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvenca nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvenca aminokiselina proteina ACRC zebrice, a u drugom redu (U) sekvenca aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

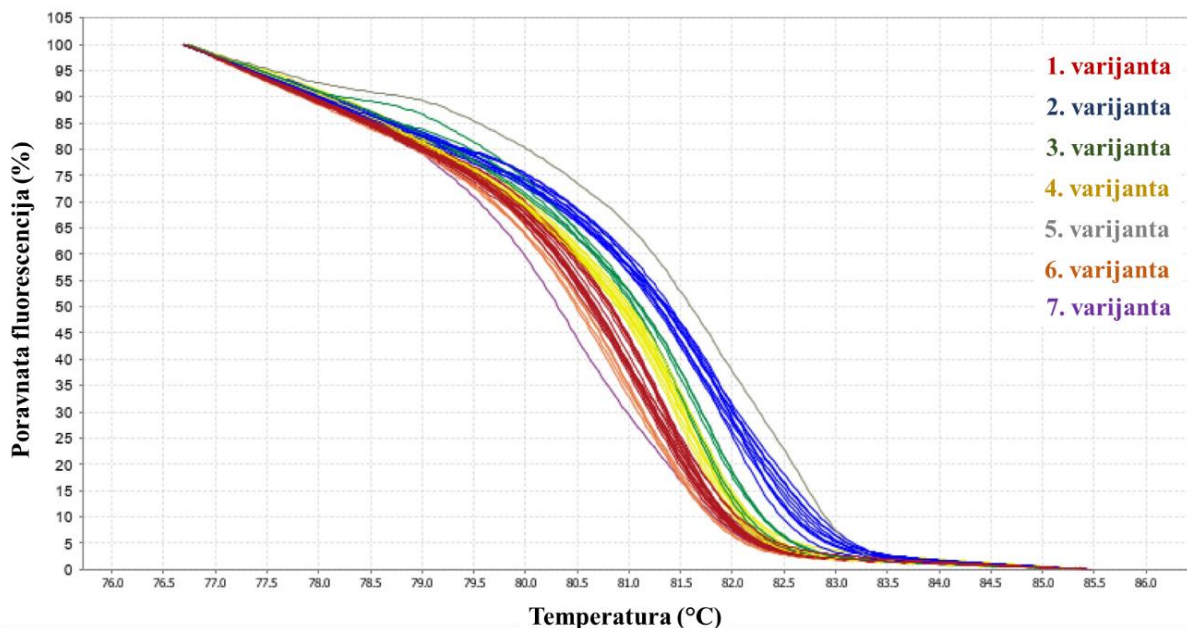
Na temelju rezultata metode HRM i rezultata sekvenciranja identificirao sam dvije mozaične ženke generacije F_0 (FON8 i FON9) koje su jedinice utemeljitelji. HRM+ embriji, njihovi potomci, bili su heterozigoti, tj. imali su mutacije u sekvenci DNA koje su naslijedili od njih. Najčešće su mutacije bile pomak okvira čitanja i preuranjeni stop-kodon na 3'-kraju gena *Acrc*, tj. delecija C-kraja proteina ACRC, stoga sam ove mutacije zbirno nazvao ΔC (dalje u tekstu: mutacije ΔC). Ženke FON8 i FON9 koristio sam za daljnje eksperimente (poglavlje 3.3.3.).

3.3.2. Identifikacija mužjaka utemeljitelja generacije F₀ genotipizacijom embrija

3.3.2.1. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije

Od ukupno šest mužjaka (FON1 – FON6), među kojima sam htio identificirati utemeljitelje, četiri su se mrijestila (FON3 – FON6). Križao sam ta četiri mužjaka individualno sa ženkama divljeg tipa. Skupio sam po deset njihovih embrija starih četiri dana – embrije 3.1 – 3.10 mužjaka FON3, 4.1 – 4.10 mužjaka FON4, 5.1 – 5.10 mužjaka FON5 i 6.1 – 6.10 mužjaka FON6 – lizirao ih i uzorke lizata embrija koristio za metodu HRM. Metodom HRM utvrdio sam da je svih 40 analiziranih uzoraka embrija (uzorci 3.1 – 3.10, 4.1 – 4.10, 5.1 – 5.10 i 6.1 – 6.10) bilo HRM+, tj. da je 40/40 ili 100 % uzoraka bilo HRM+, i to 10/10 (100 %) uzoraka embrija mužjaka FON3 – FON6. Program je uzorke svrstao u različite varijante označene različitim bojama (Slika 34, Tablica 5). Prvoj varijanti (označenoj crveno) pripadali su uzorci 3.1, 3.3, 3.5, 3.6, 3.9, 3.10, 4.1, 4.2, 5.1, 5.2, 5.4, 5.7, 5.9, 6.4, 6.5, 6.7 i 6.10 ($T_m = 80,8 - 81,3$ °C), drugoj (označenoj plavo) uzorci 3.4, 4.3, 4.7, 4.8, 6.1, 6.9 i wt1 – wt4 (uzorci embrija divljeg tipa; $T_m = 81,6 - 82,0$ °C), trećoj (označenoj zeleno) uzorci 4.6, 4.9, 4.10 i 5.5 ($T_m = 81,5 - 81,7$ °C), četvrtoj (označenoj žuto) uzorci 4.4, 4.5, 5.3, 5.6, 5.8, 6.2, 6.3, 6.6 i 6.8 ($T_m = 81,4 - 81,6$ °C), petoj (označenoj sivo) uzorak 3.2 ($T_m = 82,4$ °C), šestoj (označenoj narančasto) uzorci 3.8 i 5.10 ($T_m = 80,9 - 81,0$ °C), a sedmoj varijanti (označenoj ljubičasto) pripadao je uzorak 3.7 ($T_m = 80,4$ °C). Iako je program svrstao uzorke embrija 3.4, 4.3, 4.7, 4.8, 6.1 i 6.9 u istu varijantu kao uzorke embrija divljeg tipa, na temelju različite temperature mekšanja odredio sam ih kao HRM+ uzorke, što sam za uzorak 4.7 i potvrdio sekvenciranjem.

Kako bih provjerio koje mutacije u sekvenci DNA imaju HRM+ uzorci, neke od HRM+ uzoraka (4.1, 4.5, 4.7, 5.2 i 5.4) koristio sam za kloniranje i sekvenciranje.



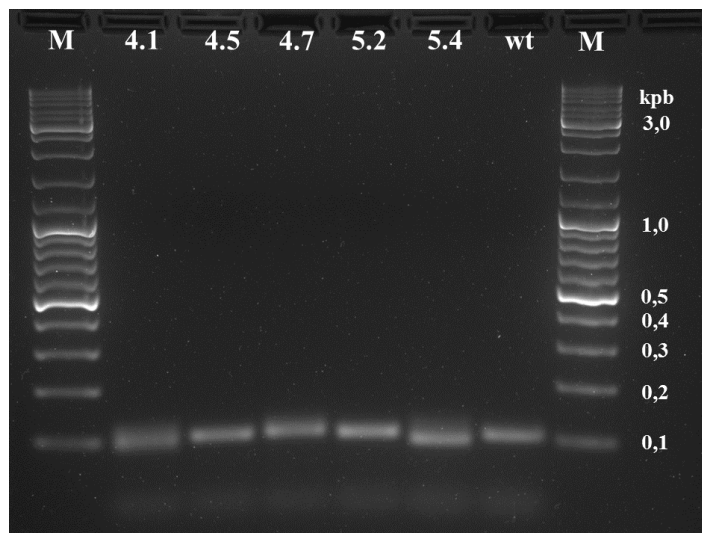
Slika 34. Poravnate krivulje mekšanja u metodi mekšanja DNA visoke rezolucije za analizirane uzorke embrija. Crvenom, plavom, zelenom, žutom, sivom, narančastom i ljubičastom bojom označene su različite varijante uzoraka koje je odredio program. Popis odgovarajućih uzoraka, varijanti kojima pripadaju i temperatura mekšanja prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Temperature mekšanja (u °C) u metodi mekšanja DNA visoke rezolucije za analizirane uzorke embrija. Uzorci koje je program svrstao u različite varijante uzoraka označeni su pripadajućim bojama – crvenom, plavom, zelenom, žutom, sivom, narančastom i ljubičastom (vidjeti Sliku 34). Uzorci koji su odabrani za kloniranje i sekvenciranje podcrtani su. T_m – temperatura mekšanja (engl. *melting temperature*), wt – uzorak embrija divljeg tipa (engl. *wild type*), 3.1 – 3.10, 4.1 – 4.10, 5.1 – 5.10 i 6.1 – 6.10 – uzorci embrija analiziranih jedinki.

Uzorak	T_m (°C)	Uzorak	T_m (°C)	Uzorak	T_m (°C)	Uzorak	T_m (°C)	Uzorak	T_m (°C)
3.1	81,1	3.10	81,3	4.9	81,6	5.8	81,6	6.7	81,1
3.2	82,4	<u>4.1</u>	<u>81,1</u>	4.10	81,5	5.9	81,1	6.8	81,5
3.3	81,3	4.2	81,1	5.1	81,1	5.10	81,0	6.9	81,7
3.4	81,7	4.3	81,6	<u>5.2</u>	<u>81,0</u>	6.1	81,6	6.10	81,0
3.5	81,3	4.4	81,5	5.3	81,5	6.2	81,5	wt1	82,0
3.6	81,3	<u>4.5</u>	<u>81,4</u>	<u>5.4</u>	<u>80,8</u>	6.3	81,4	wt2	82,0
3.7	80,4	4.6	81,6	5.5	81,7	6.4	81,1	wt3	82,0
3.8	80,9	<u>4.7</u>	<u>81,7</u>	5.6	81,6	6.5	81,2	wt4	81,9
3.9	81,2	4.8	81,7	5.7	81,3	6.6	81,5		

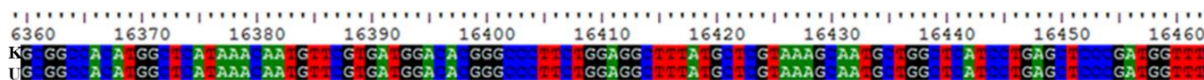
3.3.2.2. Kloniranje i sekvenciranje

Agaroznom gel-elektroforezom provjerio sam da su lančanom reakcijom polimerazom uspješno umnoženi DNA amplikoni uzoraka 4.1, 4.5, 4.7, 5.2, 5.4 i wt veličine 105 pb (Slika 35). DNA amplikone pročistio sam iz PCR smjesa, ligirao ih u plazmidni vektor te sam rekombinantne plazmide koristio za transformaciju kompetentnih bakterijskih stanica, iz kojih sam nakon formiranja bakterijskih kolonija i kultura u suspenziji izolirao plazmide za sekvenciranje.



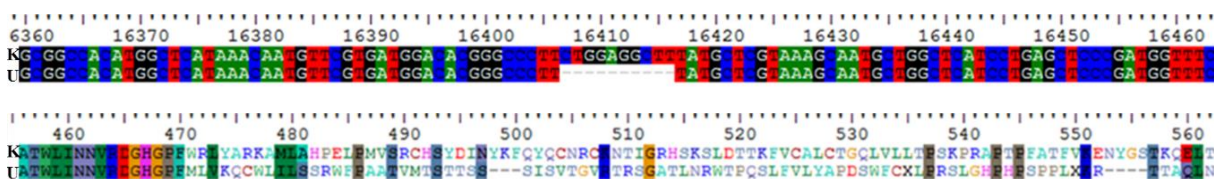
Slika 35. Provjera agaroznom gel-elektroforezom DNA amplikona umnoženih lančanom reakcijom polimerazom. Agarozna gel-elektroforeza provedena je u 2 %-tnom agaroznom gelu. Veličina amplikona sekvence divljeg tipa iznosi 105 pb. M – marker veličine DNA (kpb), wt – uzorak embrija divljeg tipa (engl. *wild type*), 4.1, 4.5, 4.7, 5.2 i 5.4 – uzorci embrija odabrani za sekvenciranje (vidjeti Tablicu 5).

Nakon sekvenciranja, sekvence DNA analizirao sam u programu BioEdit. Četiri sekvencirana DNA amplikona uzorka embrija divljeg tipa (wt) imala su sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 36).



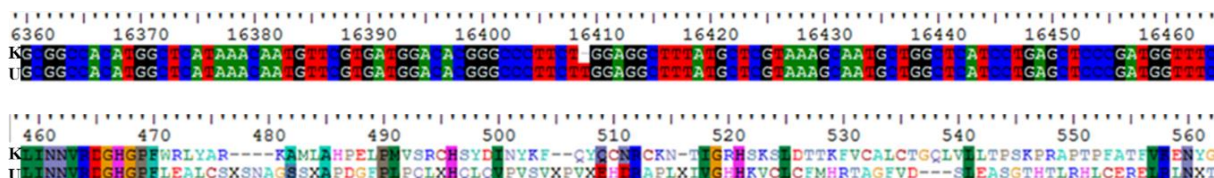
Slika 36. Poravnata sekvencija nukleotida za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija wt. U prvom redu (K) prikazana je konsenzusna sekvencija nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvencija nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusna sekvencija preuzeta je iz baze podataka Ensembl. wt – uzorak embrija divljeg tipa (engl. *wild type*).

Tri sekvencirana DNA amplikona uzorka embrija 4.1 imala su sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 36), a jedan je imao deleciju nukleotida 16407 – 16416 (CTG GAG GCT T, 10 nt), tj. pomak okvira čitanja nakon 470. aminokiseline i preuranjeni stop-kodon na mjestu 532. aminokiseline (Slika 37).



Slika 37. Poravnata sekvencija nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 4.1. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvencija nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvencija nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvencija aminokiselina proteina ACRC zebrice, a u drugom redu (U) sekvencija aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

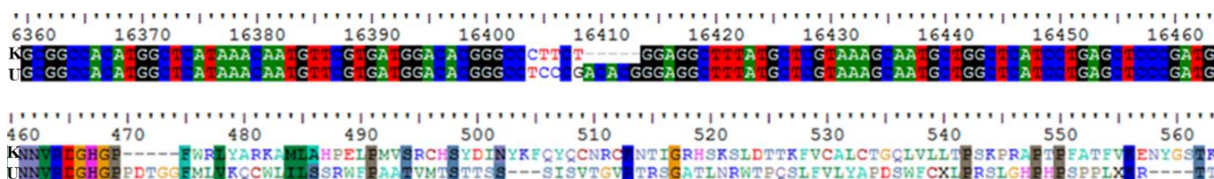
Jedan sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 4.5 imao je sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 36), a tri su imala inserciju između nukleotida 16408 i 16409 (T, 1 nt), tj. pomak okvira čitanja nakon 470. aminokiseline i preuranjeni stop-kodon na mjestu 477. aminokiseline (Slika 38).



Slika 38. Poravnata sekvencija nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 4.5. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvencija nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvencija nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvencija aminokiselina proteina ACRC zebrice, a u drugom redu (U) sekvencija aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

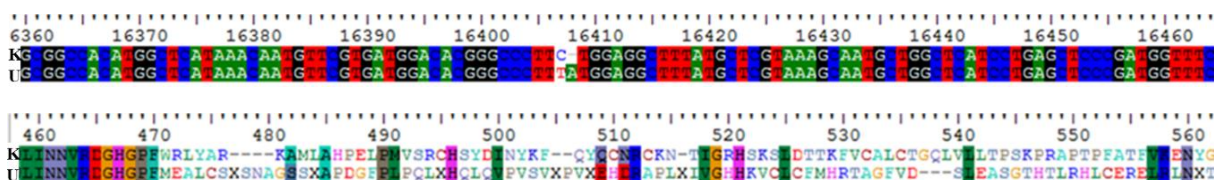
Jedan sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 4.7 imao je sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 36), a tri su imala deleciju nukleotida 16404 – 16408 (CTT CT, 5 nt) i inserciju između

nukleotida 16403 i 16409 (TCC CGA CAC G, 10 nt), tj. pomak okvira čitanja nakon 469. aminokiseline i preuranjeni stop-kodon na mjestu 537. aminokiseline (Slika 39).



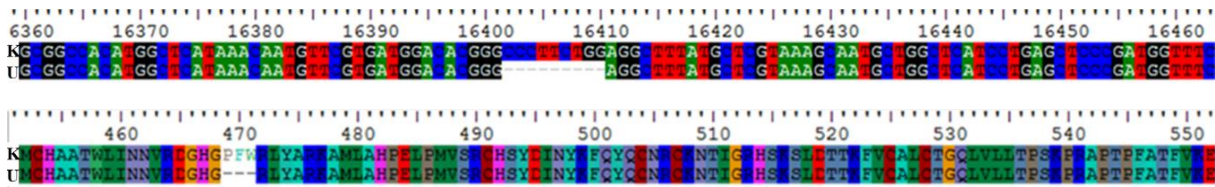
Slika 39. Poravnata sekvenca nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 4.7. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvenca nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvenca nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvenca aminokiselina proteina ACRC zebrice, a u drugom redu (U) sekvenca aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

Dva sekvencirana DNA amplikona uzorka embrija 5.2 imala su sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 36), a dva su imala supstituciju C16407T i inserciju između nukleotida 16407 i 16408 (A, 1 nt), tj. pomak okvira čitanja nakon 470. aminokiseline i preuranjeni stop-kodon na mjestu 477. aminokiseline (Slika 40).



Slika 40. Poravnata sekvenca nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 5.2. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvenca nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvenca nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvenca aminokiselina proteina ACRC zebrice, a u drugom redu (U) sekvenca aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

Jedan sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 5.4 imao je sekvencu nukleotida divljeg tipa (Slika 36), a dva su imala deleciju nukleotida 16402 – 16410 (CCC TTC TGG, 9 nt), tj. deleciju aminokiselina 469 – 471 (PFW, 3 ak) (Slika 41).

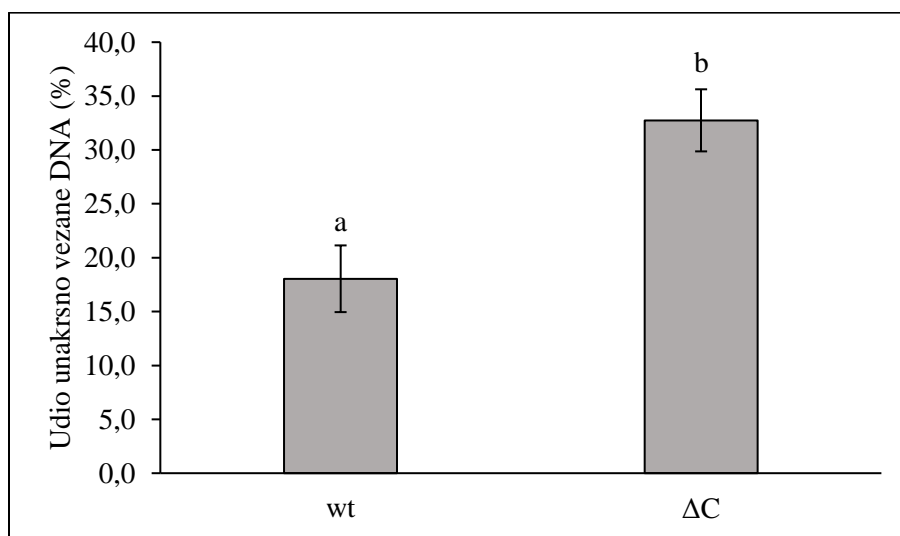


Slika 41. Poravnata sekvenca nukleotida (gornja slika) i aminokiselina (donja slika) za sekvencirani DNA amplikon uzorka embrija 5.4. U prvom redu (K) gornje slike prikazana je konsenzusna sekvenca nukleotida gena *Acrc* zebrice (reverzni komplement), a u drugom redu (U) sekvenca nukleotida sekvenciranog DNA amplikona uzorka. U prvom redu (K) donje slike prikazana je konsenzusna sekvenca aminokiselina proteina ACRC zebrice, a u drugom redu (U) sekvenca aminokiselina proteina određena za sekvencirani DNA amplikon uzorka. Sekvence su poravnate u programu BioEdit. Konsenzusne sekvence preuzete su iz baze podataka Ensembl.

Na temelju rezultata metode HRM i rezultata sekvenciranja identificirao sam dva mozaična mužjaka generacije F₀ (FON4 i FON5) koji su jedinke utemeljitelji. HRM+ embriji, njihovi potomci, bili su heterozigoti, tj. imali su mutacije u sekvenci DNA koje su naslijedili od njih. Embriji su naslijedili različite mutacije (zbirno nazvane ΔC). Mužjake FON4 i FON5 koristio sam za daljnje eksperimente (poglavlje 3.3.3.).

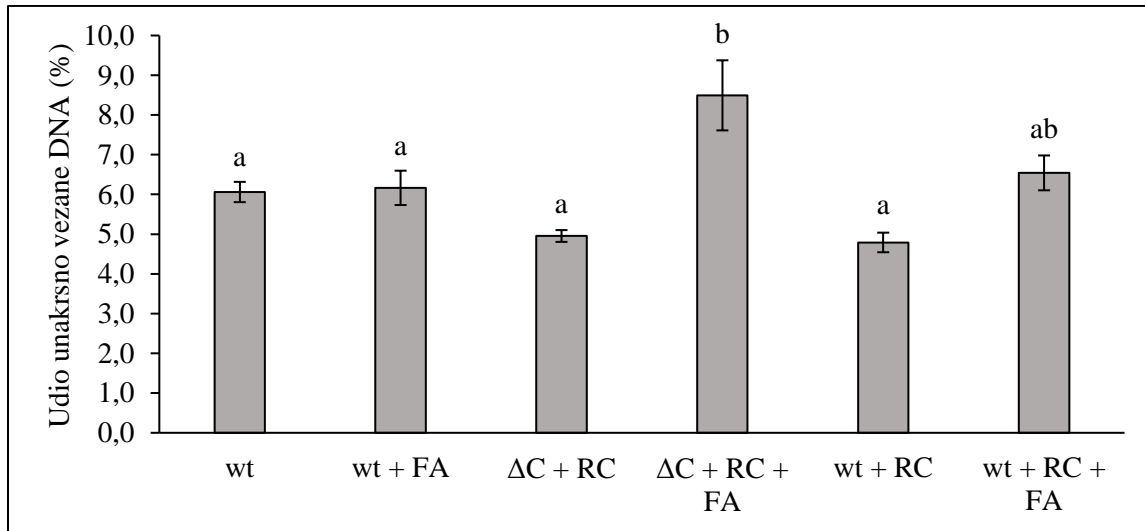
3.3.3. Izolacija unakrsno vezanih DNA i proteina metodom SDS/KCl precipitacije iz embrija zebrice koji imaju mutacije na 3'-kraju gena *Acrc* (ΔC)

U prvom eksperimentu križao sam mozaičnu ženku FON8 generacije F_0 s mutacijama na 3'-kraju gena *Acrc* i dva mužjaka divljeg tipa. Skupio sam embrije stare 6 h (100 po uzorku), iz njih izolirao unakrsno vezane DNA i proteine metodom SDS/KCl precipitacije, izmjerio koncentraciju DNA i odredio udio unakrsno vezane DNA. Obično se skupljaju embriji stari nekoliko dana, međutim, kako sam ranije spomenuo, u ovom slučaju skupljao sam ih ranije jer su embriji ugibali u periodu između 6 i 12 h starosti. Analizirao sam embrije dviju skupina: wt i ΔC . wt označava embrije divljeg tipa, a ΔC embrije potomke mozaične ženke FON8 generacije F_0 koja ima mutacije na 3'-kraju gena *Acrc* (tj. mutacije/deleciju C-kraja proteina ACRC ili ΔC) i mužjaka divljeg tipa. Embriji iz skupine ΔC imali su 1,81 puta (81 %) veću razinu DPC-ova u odnosu na embrije divljeg tipa, i ta je razlika bila statistički značajna (Slika 42).



Slika 42. Udio DNA unakrsno vezane s proteinima (u %) u embrijima zebrice starim 6 h određen izolacijom unakrsno vezanih DNA i proteina metodom SDS/KCl precipitacije i mjerenjem koncentracije DNA. Udio unakrsno vezane DNA prikazan je kao srednja vrijednost udjela unakrsno vezane DNA triju bioloških replika \pm standardna pogreška srednje vrijednosti. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$ (prema Tukeyjevom testu značajnosti) označeni su različitim slovima. wt – embriji divljeg tipa (engl. *wild type*), ΔC – embriji potomci mozaične ženke generacije F_0 koja ima mutacije na 3'-kraju gena *Acrc* (tj. mutacije/deleciju C-kraja proteina ACRC ili ΔC) i dvaju mužjaka divljeg tipa.

U drugom eksperimentu križao sam mozaične jedinke generacije F_0 s mutacijama na 3'-kraju gena *Acrc*: ženku FON8 i mužjaka FON4. Kako bih izolirao unakrsno vezane DNA i proteine iz starijih embrija, embriji potomci ovih jedinki morali su proći tzv. eksperiment spašavanja jer inače ne bi preživjeli nakon 12 h starosti. U eksperimentu spašavanja embrijima se u jednostaničnom stadiju injektirala mRNA za protein ACRC zebrice divljeg tipa ili tzv. konstrukt za spašavanje (RC). Skupio sam embrije stare tri dana (deset po uzorku), iz njih izolirao DPC-ove metodom SDS/KCl precipitacije, izmjerio koncentraciju DNA i odredio udio unakrsno vezane DNA. Analizirao sam embrije šest skupina: wt, wt + FA, ΔC + RC, ΔC + RC + FA, wt + RC i wt + RC + FA. wt označava embrije divljeg tipa, ΔC embrije potomke mozaične ženke FON8 i mužjaka FON4 generacije F_0 koji imaju mutacije na 3'-kraju gena *Acrc* (tj. mutacije/deleciju C-kraja proteina ACRC ili ΔC), RC embrije koji su prošli eksperiment spašavanja, a FA embrije tretirane formaldehidom koncentracije 5 mM tijekom perioda od 1 h. Između skupina wt, wt + FA, ΔC + RC, wt + RC i wt + RC + FA nije bilo statistički značajnih razlika u razini DPC-ova (Slika 43). Najveću razinu DPC-ova imali su embriji iz skupine ΔC + RC + FA, i to redom 1,40 puta (40 %), 1,38 puta (38 %), 1,71 puta (71 %), 1,77 puta (77 %) i 1,30 puta (30 %) veću razinu DPC-ova u odnosu na skupine wt, wt + FA, ΔC + RC, wt + RC i wt + RC + FA (Slika 43), odnosno prosječno 1,51 puta (51 %) veću razinu DPC-ova u odnosu na ostale skupine, i te su razlike bile značajne (osim razlike u odnosu na skupinu wt + RC + FA). Embriji iz skupine wt + RC + FA imali su 1,37 puta (37 %) veću razinu DPC-ova u odnosu na skupinu wt + RC (iako ta razlika nije bila statistički značajna), dok između skupina wt i wt + FA nisam uočio takav trend porasta razine DPC-ova (Slika 43).



Slika 43. Udio DNA unakrsno vezane s proteinima (u %) u embrijima zebrice starim tri dana određen izolacijom unakrsno vezanih DNA i proteina metodom SDS/KCl precipitacije i mjerenjem koncentracije DNA. Udio unakrsno vezane DNA prikazan je kao srednja vrijednost udjela unakrsno vezane DNA triju bioloških replika \pm standardna pogreška srednje vrijednosti. Rezultati koji se međusobno značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$ (prema Tukeyjevom testu značajnosti) označeni su različitim slovima. wt – embriji divljeg tipa (engl. *wild type*), ΔC – embriji potomci mozaične ženke i mužjaka generacije F_0 koji imaju mutacije na 3'-kraju gena *AcrC* (tj. mutacije/deleciju C-kraja proteina ACRC ili ΔC), RC – embriji koji su prošli eksperiment spašavanja injektiranjem mRNA za protein ACRC zebrice divljeg tipa (od engl. *rescue construct*), FA – embriji tretirani formaldehidom koncentracije 5 mM tijekom perioda od 1 h.

4. RASPRAVA

4.1. Ciljana inaktivacija gena *Acrc* zebrice metodom CRISPR/Cas

Dizajnirane gRNA za 3'-kraj gena *Acrc* zebrice (g7, g8) uspješno sam sintetizirao te provjerio učinkovitost gRNA za 5'-kraj (g2 ili u daljnjem tekstu 5'-gRNA) i 3'-kraj (g7 ili u daljnjem tekstu 3'-gRNA) gena *Acrc* zebrice metodom HRM te kloniranjem i sekvenciranjem. U embrije zebrice u jednostaničnom stadiju mikroinjektirani su ribonukleoproteinski kompleksi molekule gRNA i odgovarajućeg proteina Cas. Rezultati metode HRM (svi su uzorci bili HRM+) pokazali su da su kompleksi 5'-gRNA-Cas12a i 3'-gRNA-Cas9 (ili skraćeno 5'-gRNA i 3'-gRNA) bili 100 % učinkoviti u induciranju dvolančanih lomova na ciljanom mjestu u genomu, tj. inducirali su dvolančane lomove u stanicama svih embrija. Kako bih odredio mutacije u sekvenci DNA do kojih je u stanicama embrija došlo uslijed popravka induciranih dvolančanih lomova, nekoliko sam HRM+ uzoraka odabrao za kloniranje i sekvenciranje. Napominjem da HRM+ uzorak ne mora imati mutacije u svim stanicama, a isto tako 100 % učinkovita gRNA ne inducira dvolančane lomove u svim stanicama embrija, ali ih inducira u određenom udjelu stanica svih injektiranih embrija (tako je u ovom slučaju definirana učinkovitost gRNA prema metodi HRM). Kod 5'-gRNA sekvencirani DNA amplikoni dvaju uzoraka imali su mutacije u sekvenci DNA: deleciju i složenu mutaciju, tj. pomake okvira čitanja i preuranjene stop-kodone na aminokiselinskoj razini. Kod jednog uzorka nije bilo mutacija za četiri sekvencirana DNA amplikona, međutim mutacije bih vjerojatno pronašao da sam sekvencirao više amplikona jer je uzorak bio HRM+. Kod 3'-gRNA sekvencirani DNA amplikoni svih triju uzoraka imali su mutacije u sekvenci DNA: delecije i insercije, tj. deleciju, pomake okvira čitanja i preuranjene stop-kodone na aminokiselinskoj razini. Sekvenciranjem sam potvrdio da su dizajnirane 5'-gRNA i 3'-gRNA zaista učinkovite gRNA u kombinaciji s odgovarajućim proteinima Cas, tj. da navode proteine Cas do ciljanog mjesta na genomskoj DNA. Proteini potom uvode dvolančani lom u DNA, nakon čega dolazi do popravka dvolančanog loma uglavnom nehomolognim spajanjem krajeva (NHEJ-om). NHEJ je popravak sklon pogreškama, stoga na mjestu popravka dolazi do mutacija u sekvenci DNA – insercija i/ili delecija (Hefferin i Tomkinson, 2005), što sam i uočio u analiziranim sekvencama DNA. Tijekom popravka dvolančanog loma može doći do insercije i/ili delecije različitih sekvenci nukleotida, a taj je događaj specifičan za svaku stanicu i alel/kromosom. Različiti embriji u kojima su djelovali kompleksi gRNA-Cas stoga imaju različite mutacije te njihove stanice imaju različite mutacije, tj. embriji su mozaični. Iako se embriji injektiraju u jednostaničnom stadiju, kompleks gRNA-Cas ne

djeluje odmah nakon injektiranja i zato embriji generacije F_0 ne mogu biti homozigoti za određenu mutaciju. Homozigotni embriji dobili bi se jedino ako bi kompleks djelovao odmah u zigoti, i to na oba alela i kad bi na oba alela popravkom NHEJ-om bila uvedena ista mutacija. U nekim stanicama kompleks nije djelovao ili popravkom loma nije došlo do mutacija, stoga te stanice i stanice koje tijekom embrionalnog razvoja nastaju od njih imaju sekvencu DNA divljeg tipa. Zato su neki sekvencirani DNA amplikoni imali sekvencu nukleotida divljeg tipa. Na razini proteina (aminokiselinska sekvenca) mutacije su posljedično različite u pojedinim uzorcima, ovisno o mutacijama u sekvenci DNA. Učinkovitu primjenu sustava CRISPR/Cas9 za ciljanu mutagenezu različitih gena u embrijima zebrice među prvima su opisali primjerice Chang i sur. (2013) te Jao i sur. (2013), a do danas je metoda relativno dobro uhodana. Sumarno, utvrdio sam da su 5'-gRNA i 3'-gRNA učinkovite gRNA za gen *Acrc* zebrice, stoga sam ih koristio za ciljanu inaktivaciju ili KO (engl. *knockout*) gena *Acrc* u embrijima zebrice metodom CRISPR/Cas.

Kako bi se postigla ciljana inaktivacija gena *Acrc* u embrijima zebrice, u embrije su koinjektirani kompleksi 5'-gRNA-Cas12a i 3'-gRNA-Cas9. Nakon toga sam skupio embrije različite starosti, iz njih izolirao ukupnu RNA, proveo reverznu transkripciju te uzorke cDNA koristio za qPCR. Metodom qPCR odredio sam razinu ekspresije gena *Acrc* (na razini mRNA) u uzorcima embrija. U odnosu na embrije divljeg tipa, injektirani embriji (embriji iz skupine KO) stari jedan dan imali su 31,2 % manju razinu ekspresije gena *Acrc* (iako ta razlika nije bila statistički značajna). Embriji iz skupine KO stari dva, tri i šest dana imali su podjednaku razinu ekspresije gena kao i embriji divljeg tipa iste starosti te je razina ekspresije općenito bila vrlo mala u usporedbi s embrijima starim jedan dan. Rezultati upućuju na to da je razina ekspresije gena *Acrc* povećana u ranijem embrionalnom razvoju zebrice, dok se nakon 24 h starosti ekspresija smanjuje i općenito je mala. Prijašnji eksperimenti pokazali su da ekspresija gena *Acrc* samog embrija započinje oko 12 h nakon oplodnje i stabilna je do 24 h starosti, nakon čega se ekspresija počinje smanjivati. Razina mRNA za ACRC najveća je u embrijima starim 1 h, što odgovara majčinskoj mRNA za protein ACRC (Christine Supina; osobna komunikacija). Embriji iz skupine KO su mozaični, stoga su u kasnijim razvojnim stadijima embriji vjerojatno imali normalnu razinu transkripata gena *Acrc* divljeg tipa, tj. jednaku razinu kao i embriji divljeg tipa. U embrija starih 24 h, kad je razina ekspresije bila najveća, oni su imali manju ekspresiju nego embriji divljeg tipa jer je gen vjerojatno bio inaktiviran u određenom udjelu stanica. Čini se da je za preživljenje i razvoj embrija zebrice potreban protein ACRC i/ili mRNA za ACRC naslijeđena citoplazmom jajne stanice preko

majčinskog učinka. Naime, Bhargava i sur. (2020) pokazali su da potomstvo ženke s mutiranim genom *Acrc* (s pomakom okvira čitanja i preuranjenim stop-kodonom na 5'-kraju gena) ima 100 %-tnu smrtnost. Isti fenotip uočio sam kod embrija koji su bili potomci mozaičnih ženki generacije F₀ s mutacijama na 3'-kraju gena *Acrc*, dok kod potomaka mužjaka s istim mutacijama i ženki divljeg tipa taj fenotip nisam opazio. Iako je gen bio inaktiviran u određenom udjelu stanica embrija iz skupine KO, oni su imali eksprimiranu dostatnu količinu proteina ACRC da bi preživjeli (embriji su imali 100 %-tno preživljenje nakon injektiranja) i to upravo zato što su mozaični i određeni udio stanica eksprimirao je protein ACRC divljeg tipa. Embriji su također bili potomci roditelja divljeg tipa. Poznato je da su transkripti majke općenito prisutni tijekom prvih 6 h razvoja embrija, a proteini eksprimirani s njih vjerojatno mogu biti prisutni i dulje, dok ekspresija gena s genoma samog embrija općenito započinje nakon otprilike 2,8 h razvoja (Laue i sur., 2019). Embriji su stoga moguće imali i vlastiti eksprimiran i majčin protein ACRC divljeg tipa, dok su mRNA za ACRC bile transkribirane isključivo s genoma embrija.

Općenito, 5'-gRNA i 3'-gRNA pokazale su se učinkovitim u navođenju odgovarajućih proteina Cas do ciljanog mjesta na genomu i indukciji dvolančanih lomova, ali na temelju rezultata qPCR-a zaključio sam da je učinkovitost ciljane inaktivacije ili delecije cijelog gena (tj. delecije dijela gena između sekvenci komplementarnih 5'-gRNA i 3'-gRNA) u stanicama metodom CRISPR/Cas bila mala. Ipak, u određenom udjelu stanica vjerojatno je došlo do takvog ishoda i zato sam qPCR-om detektirao nešto manju razinu ekspresije u embrija iz skupine KO. Da je do delecije gena došlo u svim stanicama svih embrija djelovanjem obje gRNA, ekspresiju ne bih uopće mogao detektirati, što nije bio slučaj. Moguće je da su u nekim stanicama također djelovale obje gRNA, ali nije došlo do delecije gena, već do popravka dvolančanih lomova NHEJ-om. Još je jedan mogući ishod taj da gRNA u pojedinim stanicama nisu djelovale ili da je djelovala samo jedna gRNA. U prethodnim slučajevima ekspresija bi se vjerojatno mogla detektirati, osim ako je došlo do pomaka okvira čitanja i pojave preuranjenog stop-kodona na 5'-kraju gena (a možda i na 3'-kraju gena) jer bi se transkribirana mRNA vjerojatno razgrađivala. Poznato je da molekule mRNA koje imaju preuranjeni stop-kodon općenito bivaju razgrađene u procesu razgradnje mRNA posredovane besmislenom mutacijom (u procesu NMD, engl. *nonsense-mediated mRNA decay*) jer se s njih ne može translatirati (prevesti) funkcionalan protein (Bidou i sur., 2012). Različite opisane mogućnosti mogle bi se potvrditi dizajniranjem specifičnih početnica i sekvenciranjem većeg broja različitih DNA amplikona uzoraka embrija iz skupine KO.

Zaključno, rezultati metode HRM, sekvenciranja i qPCR-a pokazali su da su dizajnirane gRNA za 5'-kraj i 3'-kraj gena *Acrc* zebrice bile učinkovite u induciranju dvolančanih lomova na ciljanom mjestu DNA u stanicama embrija zebrice, ali su bile manje učinkovite u ciljanom inaktivaciji gena, tj. deleciji cijelog gena. Iako o učinkovitosti delecije gena u embrijima zebrice i drugim modelima metodom CRISPR/Cas nema mnogo podataka, neka su novija istraživanja pokazala da ova metoda zaista može biti primjenjiva. Primjerice, Bauer i sur. (2015) uspjeli su metodom CRISPR/Cas9 uz dvije gRNA postići deleciju cijelog gena *Pim1* (veličine 8 kpb) u mišjoj staničnoj liniji (u 39,5 % analiziranih stanica došlo je do delecije jednog ili obaju alela), a za utvrđivanje gubitka ekspresije deletiranog gena koristili su metodu qPCR. Na sličan su način Song i sur. (2016) postigli nasljednu deleciju od čak 105 kpb u genu *TYR* embrija zeca, a Hoshijima i sur. (2019) nasljedne delecije veličine od 0,5 do 50 kpb u različitim genima embrija zebrice. Delecije tih gena rezultirale su i odgovarajućim fenotipom u zečeva i zebrica s mutacijama.

4.2. Uloga proteina ACRC zebrice s delecijom katalitičkog glutamata (E451) u popravku unakrsnih veza DNA-protein

U liniji riba injektiranih RNA vodiljom gRNA1, proteinom Cas9 i kalupom za popravak RT1 (kojim se u gen *Acrc* željela unijeti mutacija pretpostavljenog katalitičkog glutamata A16349C, tj. E451A, i gen za fluorescentni protein mVenus) nisu pronađene jedinke generacije F₀ koje prenose gen za mVenus i željenu mutaciju na potomstvo, iako su uzgojene samo jedinke generacije F₀ koje su imale ekspresiju proteina mVenus (jedinke pozitivne za protein mVenus ili mVenus+ jedinke). Da je u injektiranih embrija generacije F₀ došlo da dvolančanog loma i popravka loma popravkom upravljanim homologijom (HDR-om), gdje bi se kao kalup za popravak koristio RT1, došlo bi do njegove ugradnje na homologno mjesto u genomu u određenom udjelu stanica. S obzirom na to da RT1 ima gen za protein mVenus i da su uzgojene samo mVenus+ jedinke generacije F₀, da su stanice germinativne linije ovih jedinki imale ugrađen RT1, određeni udio njihovih potomaka generacije F₁ naslijedio bi taj gen, što bi se fenotipski moglo uočiti kao zelena fluorescencija eksprimiranog proteina u leći oka embrija nakon ekscitacije plavom svjetlošću. Dakle, germinativne stanice jedinki generacije F₀ vjerojatno nisu imale ugrađen RT1. S obzirom na to da su uzgojeni injektirani embriji generacije F₀ koji su eksprimirali protein mVenus, u malom udjelu stanica tih embrija nakon injektiranja došlo je do ugradnje RT1, međutim

vjerojatno ne i u stanicama iz kojih je kasnije nastala linija germinativnih stanica. Ranije je za gRNA1 utvrđeno metodom HRM da je 10 % učinkovita u induciranju dvolančanih lomova u embrijima zebrice, tj. injektirani kompleks gRNA1-Cas9 inducira dvolančane lomove u DNA i popravak NHEJ-om s posljedičnim mutacijama. Međutim, iako nije unesena željena mutacija kalupom za popravak, u istoj liniji identificiran je mužjak generacije F₀ koji je na svoje potomke (križanjem sa ženkom divljeg tipa) prenosio deleciju nukleotida 16349 – 16360 gena *Acrc* (AAA TGT GTC ATG), tj. deleciju aminokiselina 451 – 454 (mutaciju ΔEMCH) proteina ACRC (Christine Supina; osobna komunikacija). Dakle taj je mužjak prenosio deleciju pretpostavljenog katalitičkog glutamata E451 i drugog histidina (H454) iz motiva HEXXH, koji je u metaloproteaza uključen u koordinaciju iona cinka zajedno s još dva histidina proteazne jezgre proteina. Motiv HEXXH dio je proteazne jezgre te se pretpostavlja da je odgovoran za katalitičku (proteolitičku) aktivnost proteina ACRC, koja još uvijek nije izravno dokazana (Fielden i sur., 2018). Na taj se način došlo do mutacije (delecije) aminokiseline E451, koja se u principu htjela unijeti i kalupom za popravak RT1. Među potomcima navedenog mužjaka generacije F₀ i ženke divljeg tipa identificiran je mužjak generacije F₁ koji je heterozigot za mutaciju ΔEMCH (Christine Supina). Metodom HRM te kloniranjem i sekvenciranjem koristeći uzorke odsječka peraje, među ženkama potomcima istog mužjaka generacije F₀ identificirao sam dvije ženke generacije F₁ koje su heterozigoti za mutaciju ΔEMCH.

Križao sam mužjaka i ženku generacije F₁ heterozigote za mutaciju ΔEMCH, skupio njihove embrije generacije F₂ (embrije iz skupine ΔEMCH), koje sam koristio za izolaciju ukupnih DPC-ova metodom SDS/KCl precipitacije i određivanje udjela DNA unakrsno vezane s proteinima (određivanje razine DPC-ova). Između embrija iz skupine ΔEMCH i embrija divljeg tipa nije bilo razlike u udjelu DPC-ova. Međutim, embriji iz skupine ΔEMCH koji su tretirani formaldehidom (jakim, nespecifičnim induktorom DPC-ova) koncentracije 5 mM tijekom 1 h imali su prosječno 137 % veću razinu DPC-ova u odnosu na netretirane embrije iz skupine ΔEMCH te netretirane i tretirane embrije divljeg tipa. Među analiziranim embrijima iz skupine ΔEMCH teoretski bi trebalo biti 25 % embrija divljeg tipa, 50 % heterozigota i 25 % homozigota za mutaciju ΔEMCH jer su njihovi roditelji bili heterozigoti za istu mutaciju. Ovi rezultati indiciraju da bi protein ACRC mogao biti uključen u popravak DPC-ova u embrija zebrice te da bi upravo glutamat E451 mogao biti bitan za katalitičku aktivnost proteina kao dio proteazne jezgre. Na to upućuju i eksperimenti spašavanja u kojima je embrijima koji su bili potomci mozaičnih ženki generacije F₀ s mutacijama

na 3'-kraju gena *Acrc* i koji su inače imali 100 %-tnu smrtnost, injektirana mRNA za protein ACRC zebrice s mutacijom E451A (Cecile Otten; osobna komunikacija). Ti embriji nisu preživjeli, za razliku od embrija istih roditelja kojima je injektirana mRNA za ACRC divljeg tipa. Moguće je da je u embrija divljeg tipa nakon indukcije nastajanja DPC-ova formaldehidom odmah došlo do aktivacije proteina ACRC i popravka nastalih DPC-ova, stoga nisu imali povećanu razinu DPC-ova u odnosu na netretirane embrije. S druge strane, u homozigota za mutaciju Δ EMCH (i moguće u heterozigota ako jedna kopija gena divljeg tipa nije bila dostatna za potrebnu ekspresiju proteina, tj. ako je došlo do haploinsuficijencije) možda je bio narušen popravak DPC-ova zbog katalitičke mutacije proteina ACRC i njegove nefunkcionalnosti, stoga su imali povećanu razinu DPC-ova. Uz određeni period oporavka nakon tretmana formaldehidom možda bi i tretirani embriji iz skupine Δ EMCH imali normalnu razinu DPC-ova (u ovim sam eksperimentima krenuo s lizom embrija neposredno nakon tretmana). Bhargava i sur. (2020) pokazali su da bi pretpostavljeni katalitički glutamat proteina ACRC mogao biti bitan za ulogu proteina u održavanju genomske stabilnosti u jajnim stanicama vinske mušice. Za potvrdu dobivenih rezultata u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju uzgajaju se jedinke generacije F₂ homozigoti za mutaciju Δ EMCH te se na njihovim homozigotnim embrijima utvrđuje razina DPC-ova.

4.3. Uloga proteina ACRC zebrice s delecijom C-kraja u popravku unakrsnih veza DNA-protein

U liniji ribi injektiranih RNA vodiljom gRNA2 i proteinom Cas9 identificirao sam ženke i mužjake utemeljitelje generacije F₀, tj. jedinke koje prenose mutacije na 3'-kraju gena *Acrc* na potomstvo. Za gRNA2 ranije je utvrđeno metodom HRM da je 90 – 100 % učinkovita u induciranju dvolančanih lomova u embrijima (Christine Supina; osobna komunikacija). Za identifikaciju ženki utemeljitelja mrijestio sam ženke generacije F₀ s mužjacima divljeg tipa i skupio embrije stare 6 h. Samo dvije od 12 analiziranih ženki opetovano su se mrijestile i davale embrije. Obično se embriji skupljaju najranije 24 h nakon oplodnje kako bi se dobila veća količina genomske DNA za daljnje analize, međutim u ovom slučaju skupljao sam ih ranije jer su embriji ugibali u periodu između 6 i 12 h starosti i imali su 100 %-tnu smrtnost. Uzorke embrija genotipizirao sam metodom HRM te kloniranjem i sekvenciranjem. Po tri od deset uzoraka embrija svake od dviju analiziranih ženki bila su HRM+ i te sam uzorke odabrao za provjeru mutacije sekvenciranjem. Sekvencirani DNA

amplikoni uzoraka imali su različite mutacije: delecije, supstitucije i inserciju, tj. delecije, pomake okvira čitanja i preuranjene stop-kodone na razini aminokiselinske sekvence. Supstitucije nisu uobičajene mutacije koje se unose u sekvencu DNA popravkom NHEJ-om. Opisane supstitucije možda su uistinu individualne razlike u sekvencama DNA embrija. Za potvrđivanje te pretpostavke trebalo bi sekvencirati više DNA amplikona za određeni embrij. Ponekad je ipak moguće da se i popravkom NHEJ-om unesu supstitucije nukleotida (Pfeiffer i sur., 2000). Na temelju rezultata metode HRM i rezultata sekvenciranja identificirao sam dvije mozaične ženke generacije F₀ koje su jedinice utemeljitelji. HRM+ embriji, njihovi potomci, bili su heterozigoti, tj. imali su mutacije u sekvenci DNA koje su naslijedili od njih. Najčešće su mutacije bile pomak okvira čitanja i preuranjeni stop-kodon na 3'-kraju gena *Acrc*, tj. delecija C-kraja proteina ACRC, stoga sam ove mutacije zbirno nazvao mutacije ΔC . Embriji su naslijedili različite mutacije jer su ženke mozaične (njihove germinativne stanice imaju različite mutacije, stoga embriji iste ženke mogu naslijediti različite mutacije). Kompleks gRNA2-Cas9 potiče dvolančane lomove na 3'-kraju gena *Acrc*, stoga do mutacija dolazi na 3'-kraju gena, odnosno na C-kraju proteina ACRC. Za identifikaciju mužjaka utemeljitelja mrijestio sam mužjake generacije F₀ sa ženkama divljeg tipa i skupio njihove embrije. Mrijestila su se četiri od šest analiziranih mužjaka. Uzorke embrija genotipizirao sam metodom HRM te kloniranjem i sekvenciranjem. 100 % uzoraka embrija svakog od četiriju analiziranih mužjaka bilo je HRM+ te sam nekoliko uzoraka embrija dvaju mužjaka odabrao za sekvenciranje. Sekvencirani DNA amplikoni uzoraka imali su različite mutacije: delecije, insercije, supstituciju, tj. deleciju, pomake okvira čitanja i preuranjene stop-kodone na razini aminokiselinske sekvence. Na temelju rezultata metode HRM i rezultata sekvenciranja identificirao sam dva mozaična mužjaka generacije F₀ koji su jedinice utemeljitelji. HRM+ embriji, njihovi potomci, bili su heterozigoti, tj. imali su mutacije u sekvenci DNA (mutacije ΔC) koje su naslijedili od njih. Embriji su naslijedili različite mutacije jer su mužjaci mozaični (njihove germinativne stanice imaju različite mutacije, stoga embriji istog mužjaka mogu naslijediti različite mutacije). Identificirane mužjake i ženke utemeljitelje mrijestio sam te njihove embrije koristio za izolaciju DPC-ova metodom SDS/KCl precipitacije i određivanje udjela DNA unakrsno vezane s proteinima.

Izolaciju DPC-ova i mjerenje udjela DNA koja je unakrsno vezana s proteinima izveo sam najprije na embrijima starim 6 h koji su bili potomci mozaične ženke utemeljitelja generacije F₀ i dvaju mužjaka divljeg tipa (embriji iz skupine ΔC). Skupljao sam embrije stare 6 h zato što su u periodu između 6 i 12 h starosti ovi embriji ugibali i imali su 100 %-tnu smrtnost, neovisno o

genotipu mužjaka. Embriji generacije F₁ od ženke utemeljitelja naslijedili su alel za gen *Acrc* divljeg tipa ili alel za gen *Acrc* s mutacijom na 3'-kraju gena, dok su od mužjaka naslijedili alel divljeg tipa. Embriji su dakle bili ili divljeg tipa ili heterozigoti za mutacije ΔC . Ženka utemeljitelj ranije je injektirana kompleksom gRNA2-Cas9 u jednostaničnom stadiju. Stanice ženki utemeljitelja imaju različite mutacije, a koje nasljeđuju i njihovi embriji. Prema metodi HRM, tri od deset embrija potomaka obiju ženki utemeljitelja naslijedila su mutacije, dakle 30 % embrija, dok je 70 % embrija bilo divljeg tipa (naslijedilo je alel divljeg tipa od ženke križane s mužjacom divljeg tipa). Iako bi za potvrdu tih udjela trebalo sekvencirati DNA amplikone većeg broja embrija, među embrijima iz skupine ΔC vjerojatno je dakle bilo embrija divljeg tipa i embrija heterozigota za mutacije ΔC . Svi ovi embriji ugibali su u periodu između 6 i 12 h starosti, dakle svi su pokazivali fenotip smrtnosti po majčinskom učinku, bez obzira na genotip oca (mužjak divljeg tipa ili mužjak utemeljitelj iz iste linije kao i ženka). Smrtnost po majčinskom učinku uočili su i Bhargava i sur. (2020) za embrije potomke ženki homozigota za mutaciju gena *Acrc* (pomak okvira čitanja i preuranjeni stop-kodon na početku gena, tj. imale su nefunkcionalan protein ACRC). Ako sam križao mužjaka utemeljitelja s mutacijama ΔC sa ženkom divljeg tipa, preživljenje embrija iznosilo je do 87,0 %. U svakom slučaju, čini se da je funkcionalan protein ACRC esencijalan za rani embrionalni razvoj zebriće. U velikoj studiji u kojoj je opisano 315 gena esencijalnih za rani razvoj zebriće, pokazano je da većina mutanata za ove gene ima vidljiv fenotip i ugiba do starosti od pet dana (Amsterdam i sur., 2004). U odnosu na embrije divljeg tipa (wt), embriji iz skupine ΔC stari 6 h imali su 81 % veću razinu DPC-ova u normalnim uvjetima (bez tretmana formaldehidom). Taj rezultat upućuje na zaključak da je DPC popravak kod ovih embrija bio narušen, a budući da njihova majka ima mutacije u genu *Acrc*, vjerojatno su razlog narušenog popravka DPC-ova upravo mutacije na 3'-kraju ovog gena, tj. na C-kraju proteina ACRC. Kao što sam već spomenuo, poznato je da su transkripti majke općenito prisutni u stanicama embrija zebriće tijekom prvih 6 h embrionalnog razvoja, a proteini koje kodiraju te mRNA vjerojatno mogu biti prisutni i dulje. Transkripcija mRNA s genoma samog embrija općenito započinje nakon otprilike 2,8 h razvoja i dostiže najveću razinu nakon 6 h (Laue i sur., 2019). Međutim, prijašnji eksperimenti pokazali su da ekspresija gena *Acrc* s genoma samog embrija započinje oko 12 h nakon oplodnje i zadržava se na podjednakoj razini do 24 h starosti, nakon čega se ekspresija počinje smanjivati. Količina mRNA za ACRC najveća je u embrijima starim 1 h, što odgovara mRNA naslijeđenoj od majke preko citoplazme jajne stanice jer embriji tada još nemaju ekspresiju

gena sa svojeg genoma (Christine Supina; osobna komunikacija). Embriji od majke mogu naslijediti mRNA za ACRC, s koje se translata ACRC, i vjerojatno sam protein ACRC. Svi ovi podatci upućuju na zaključak da embriji stari 6 h nemaju vlastitu ekspresiju gena *Acrc*, već im razvoj ovisi o mRNA za ACRC i proteinu ACRC naslijeđenim od majke. To znači da i analizirani embriji iz skupine ΔC nemaju vlastitu ekspresiju ovog gena i da je povećana razina DPC-ova vjerojatno posljedica nasljeđivanja mRNA i/ili proteina s mutacijom ΔC od majke majčinskim učinkom. Razina DPC-ova embrija vjerojatno ne bi bila veća da je ženka s mutacijama ΔC križana s mužjekom iste linije jer je protein ACRC prisutan u stanicama embrija starih 6 h naslijeđen isključivo citoplazmom jajne stanice i ne ovisi o genotipu embrija. Spomenuo sam da su embriji iz skupine ΔC ili divljeg tipa ili heterozigoti za mutacije ΔC , tako da imaju vlastitu kopiju gena divljeg tipa i kad bi imali vlastitu ekspresiju gena, vjerojatno ne bi ugibali nakon 6 h starosti i imali bi manju razinu DPC-ova u normalnim uvjetima. Prema fenotipu koji se redovito očituje na svim embrijima (ugibanje embrija), moglo bi se pretpostaviti da svi embriji po majčinskom učinku nasljeđuju nefunkcionalni ACRC ili ga uopće ne nasljeđuju zbog razgradnje (sam protein ACRC ili mRNA za ACRC). Kao prvo objašnjenje, moguće je da se sintetizira ACRC sa skraćenim C-krajem i on je nefunkcionalan, tj. ne vrši popravak DPC-ova, koji se endogeno često javljaju u stanicama, pogotovo u stanicama koje prolaze S-fazu (Vaz i sur., 2017), stoga embriji imaju povećanu razinu DPC-ova. Drugo bi objašnjenje moglo biti da se sintetizira mRNA koja se ne translata u protein i razgrađuje se, ili se mRNA translata u skraćeni protein, koji potom biva razgrađen, stoga embriji uopće nemaju ACRC koji bi trebali naslijediti po majčinskom učinku. U svakom slučaju, čini se da je C-kraj proteina ACRC (aminokiseline 469/470/471 – 586, oko 20 % proteina) bitan za funkcioniranje proteina: moguće je da je taj dio bitan za pravilno smatanje proteina (engl. *fold*ing). Opisani C-kraj djelomično obuhvaća i domenu SprT (koja obuhvaća aminokiseline 378 – 535), iako ne obuhvaća motiv HEXXH (aminokiseline 450 – 454), tj. motiv HEMCH proteazne jezgre, za koji se pretpostavlja da je odgovoran za moguću katalitičku aktivnost proteina (Fielden i sur., 2018). Možda je C-kraj bitan za pravilno smatanje domene SprT, nakon čega bi protein mogao postati katalitički aktivan. Ako se protein ne smata pravilno, vjerojatno se razgrađuje i embriji ne nasljeđuju funkcionalan protein po majčinskom učinku. Poznato je da nepravilno smotanim proteinima općenito pomažu proteini šaperoni i košaperoni kako bi takvi proteini poprimili nativnu konformaciju (Kim i sur., 2013). Ako se ne može pravilno smotati, nepravilno smotani protein može formirati agregate, koji predstavljaju opasnost za stanicu, stoga

najčešće nakon ubikvitinacije podliježe procesu razgradnje u proteasomu (Guo i sur., 2014). Ranije spomenuti Bhargava i sur. (2020) uočili su blago povećane razine DPC-ova provedbom testa RADAR na embrijima starim 3 h (stadij od 1000 stanica). 100 %-tna smrtnost embrija koju sam primijetio zaista je posljedica mutacija gena *Acrc* u ženke majke s mutacijama ΔC . To je potvrđeno eksperimentima spašavanja u kojima je injektirana mRNA za protein ACRC zebriće divljeg tipa u embrije iz skupine ΔC u jednostaničnom stadiju: ti su embriji bili vijabilni nakon 24 h i razvili su se u odrasle jedinke (Cecile Otten; osobna komunikacija). Takvi embriji imali su preživljenje do 100 %, kao i embriji divljeg tipa, dok su neinjektirani embriji iz skupine ΔC imali preživljenje od 0 %. Dakle za uočeni fenotip vjerojatno je odgovoran protein ACRC sa skraćenim C-krajem, koji je nefunkcionalan, iako još nije sasvim jasno zašto svi embriji nasljeđuju takav protein citoplazmom jajne stanice. Dakle sve jajne stanice ženke utemeljitelja prenose mRNA ili proteine ACRC s mutacijama ΔC (ili se oni razgrađuju) iako je ženka mozaična za tu mutaciju, tj. ima i alele gena *Acrc* divljeg tipa u određenom udjelu stanica, kao što i neki embriji od nje nasljeđuju alel divljeg tipa. Taj će se problem riješiti genotipizacijom riba generacije F_1 koje su potomci ženke i mužjaka utemeljitelja s mutacijama ΔC . Te su ribe prošle eksperiment spašavanja i preživjele su do odrasle dobi. Među ribama generacije F_1 moći će se pronaći jedinke koje imaju mutacije ΔC u genu *Acrc* na oba alela te će se moći odrediti razina DPC-ova u njihovim homozigotnim embrijima generacije F_2 .

Izolaciju DPC-ova i mjerenje udjela DNA unakrsno vezane s proteinima proveo sam na embrijima starim tri dana koji su bili potomci ženke i mužjaka utemeljitelja za mutacije ΔC gena *Acrc* (embriji iz skupine ΔC). Kako bih mogao izolirati DPC-ove iz embrija starijih od 6 h, tj. kako bi embriji preživjeli nakon 12 h starosti, morali su proći ranije spomenuti eksperiment spašavanja injektiranjem konstrukta za spašavanje (RC-a), tj. injektiranjem mRNA za protein ACRC zebriće divljeg tipa. Među embrijima iz skupine ΔC vjerojatno je bilo embrija divljeg tipa te heterozigota i homozigota za mutacije ΔC (jer su oba roditelja prenosila mutacije na potomstvo). Nisam uočio značajnu razliku u razini DPC-ova između embrija iz skupina wt, wt + RC i ΔC + RC, što upućuje na to da je protein ACRC bio eksprimiran i funkcionalan nakon injektiranja RC-a barem tijekom sljedeća tri dana. Dakle ACRC eksprimiran s injektirane mRNA mogao je nadomjestiti potencijalno nefunkcionalan protein ACRC s mutacijom ΔC . Međutim, ako je nastajanje DPC-ova bilo potaknuto tretiranjem embrija 5 mM formaldehidom tijekom 1 h (FA), embriji iz skupine ΔC imali su prosječno 51 % veću razinu DPC-ova u odnosu na embrije iz svih ostalih skupina (wt, wt

+ FA, ΔC + RC, wt + RC i wt + RC + FA). Objašnjenje bi moglo biti u tome da iako su embriji iz skupine ΔC imali funkcionalan ACRC eksprimiran s injektirane mRNA, vjerojatno neki od njih nisu imali funkcionalan vlastiti ACRC (homozigoti i/ili heterozigoti za mutacije ΔC). Zato je DPC popravak u koji je uključen protein ACRC kod njih bio smanjen i posljedično su imali povećanu razinu DPC-ova uslijed njihove indukcije formaldehidom. Embriji stari tri dana više nemaju mRNA i vjerojatno ni proteine ACRC naslijeđene majčinskim učinkom, a imaju aktivnu ekspresiju vlastitih gena. Povećana razina DPC-ova u ovom je slučaju stoga vjerojatno bila posljedica mutacija ΔC gena *Acrc* koje su embriji naslijedili od svojih roditelja. Homozigoti za mutacije ΔC možda uopće nisu imali sintezu funkcionalnog proteina ACRC, dok jedna kopija gena divljeg tipa u heterozigota možda nije bila dostatna za ekspresiju količine proteina potrebne za normalnu stopu popravka DPC-ova (haploinsuficijencija). Uz određeni period oporavka nakon tretmana formaldehidom možda bi i tretirani embriji iz skupine ΔC imali normalnu razinu DPC-ova. Uslijed mikroinjektiranja igla za injektiranje prodire kroz membranu i poznato je da dolazi do mehaničkog oštećenja stanice (Liu i sur., 2015). Embriji divljeg tipa koji su prošli eksperiment spašavanja i tretman formaldehidom imali su 37 % veću razinu DPC-ova u odnosu na iste embrije koji nisu bili tretirani, dok takav trend povećanja nisam uočio u embrija divljeg tipa u koje nije bio injektiran RC. Opaženi rezultat vjerojatno je bio posljedica većeg unosa formaldehida u injektirane embrije zbog njihova mehaničkog oštećenja prilikom injektiranja RC-a.

Sumarno, embriji potomci mozaične ženke s mutacijama ΔC u genu *Acrc* ugibali su tijekom 6 – 12 h razvoja (neovisno o genotipu mužjaka), vjerojatno zbog majčinskog učinka te su embriji stari 6 h imali povećanu razinu DPC-ova. Embriji stari tri dana potomci mozaične ženke i mužjaka s mutacijama ΔC u genu *Acrc*, koji su prošli eksperiment spašavanja (injektiranjem mRNA za protein ACRC zebrice divljeg tipa), imali su povećanu razinu DPC-ova tek nakon tretmana formaldehidom. Embriji koji su prošli eksperiment spašavanja uzgojeni su i do odrasle dobi. Rezultati upućuju na esencijalnu ulogu proteina ACRC u ranom embrionalnom razvoju zebrice i njegovu vjerojatnu ulogu u DPC popravku.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja zaključio sam sljedeće:

1. Rezultati metode HRM, sekvenciranja i qPCR-a pokazali su da su dizajnirane gRNA za 5'-kraj i 3'-kraj gena *Acrc* zebrice bile učinkovite u induciranju dvolančanih lomova na ciljanom mjestu genomske DNA u stanicama embrija zebrice, no bile su manje učinkovite u ciljanom inaktivaciji gena metodom CRISPR/Cas, tj. deleciji cijelog gena.
2. Embriji potomci roditelja heterozigota za mutaciju delecije aminokiselina 451 – 454 proteina ACRC (mutaciju Δ EMCH) imali su povećanu razinu ukupnih DPC-ova nakon tretmana formaldehidom. Mutacija Δ EMCH uključuje deleciju katalitičkog glutamata E451 i drugog histidina iz motiva HEXXH, koji je u metaloproteazama uključen u koordinaciju iona cinka zajedno s još dva histidina proteazne jezgre proteina. U embrija homozigota i moguće heterozigota za mutaciju Δ EMCH vjerojatno je bio narušen popravak induciranih DPC-ova zbog katalitičke mutacije proteina ACRC, stoga su imali povećanu razinu DPC-ova. Ovi rezultati indiciraju da bi ACRC mogao biti uključen u popravak DPC-ova, a da bi upravo E451 mogao biti bitan za katalitičku aktivnost proteina kao dio njegove proteazne jezgre.
3. Embriji potomci mozaične ženke utemeljitelja s mutacijama na 3'-kraju gena *Acrc* (mutacijama Δ C) ugibali su u periodu između 6 i 12 h starosti i imali su 100 %-tnu smrtnost (neovisno o genotipu mužjaka), vjerojatno zbog smrtnosti po majčinskom učinku. Embriji stari 6 h imali su povećanu razinu DPC-ova, vjerojatno zbog narušenog DPC popravka.
4. Embriji stari tri dana, koji su bili potomci mozaične ženke i mužjaka utemeljitelja s mutacijama Δ C i koji su prošli eksperiment spašavanja injektiranjem mRNA za protein ACRC zebrice divljeg tipa, imali su povećanu razinu DPC-ova tek nakon tretmana formaldehidom. DPC popravak kod ovih je embrija također vjerojatno bio narušen, a budući da su od majke i/ili oca mogli naslijediti mutacije na 3'-kraju gena *Acrc*, tj. na C-kraju proteina, vjerojatno su razlog narušenog popravka DPC-ova bile upravo te mutacije. C-kraj proteina ACRC (oko 20 % proteina) na temelju ovih rezultata čini se bitnim za funkcioniranje proteina, a sam protein esencijalnim za embrionalni razvoj.

6. LITERATURA

- Álvarez-Quilón, A. i sur. (2020). Endogenous DNA 3' blocks are vulnerabilities for BRCA1 and BRCA2 deficiency and are reversed by the APE2 nuclease. *Molecular Cell* 78(6), 1152–1165.e8.
- Amsterdam, A., Nissen, R. M., Sun, Z., Swindell, E. C., Farrington, S., Hopkins, N. (2004). Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(35), 12792–12797.
- Ashour, M. E., Atteya, R., El-Khamisy, S. F. (2015). Topoisomerase-mediated chromosomal break repair: an emerging player in many games. *Nature Reviews Cancer* 15(3), 137–151.
- Bard, J., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C., Martin, A. (2018). Structure and function of the 26S proteasome. *Annual Review of Biochemistry* 87, 697–724.
- Bauer, D. E., Canver, M. C., Orkin, S. H. (2015). Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9. *Journal of Visualized Experiments* 95, e52118.
- Bhargava, V. i sur. (2020). GCNA preserves genome integrity and fertility across species. *Developmental Cell* 52(1), 38–52.e10.
- Bidou, L., Allamand, V., Rousset, J. P., Namy, O. (2012). Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. *Trends in Molecular Medicine* 18(11), 679–688.
- Borgermann, N., Ackermann, L., Schwertman, P., Hendriks, I. A., Thijssen, K., Liu, J. C., Lans, H., Nielsen, M. L., Mailand, N. (2019). SUMOylation promotes protective responses to DNA-protein crosslinks. *The EMBO Journal* 38(8), e101496.
- Bozkurt, Y. (2020). Introductory chapter: importance of zebrafish (*Danio rerio*) as model organism in biomedical research. U: Bozkurt, Y. (ur.) *Zebrafish in Biomedical Research*. IntechOpen.
- Brégeon, D., Doetsch, P. W. (2011). Transcriptional mutagenesis: causes and involvement in tumour development. *Nature Reviews Cancer* 11(3), 218–227.
- Carmell, M. A. i sur. (2016). A widely employed germ cell marker is an ancient disordered protein with reproductive functions in diverse eukaryotes. *eLife* 5, e19993.
- Chang, N., Sun, C., Gao, L., Zhu, D., Xu, X., Zhu, X., Xiong, J. W., Xi, J. J. (2013). Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Research* 23(4), 465–472.
- Chen, C. C., Feng, W., Lim, P. X., Kass, E. M., Jasin, M. (2018). Homology-directed repair and the role of BRCA1, BRCA2, and related proteins in genome integrity and cancer. *Annual Review of Cancer Biology* 2, 313–336.
- Chen, P. i sur. (2020). A Cas12a ortholog with stringent PAM recognition followed by low off-target editing rates for genome editing. *Genome Biology* 21, 78.
- Chu, X. L. (1981). A preliminary revision of fishes of the genus *Danio* from China. *Zoological Research* 2(2), 145–156.
- Cortez, D. (2019). Replication-coupled DNA repair. *Molecular Cell* 74(5), 866–876.

- Delabaere, L., Orsi, G. A., Sapey-Triomphe, L., Horard, B., Couble, P., Loppin, B. (2014). The Spartan ortholog maternal haploid is required for paternal chromosome integrity in the *Drosophila* zygote. *Current Biology* 24(19), 2281–2287.
- Deshpande, R. A., Lee, J. H., Arora, S., Paull, T. T. (2016). Nbs1 converts the human Mre11/Rad50 nuclease complex into an endo/exonuclease machine specific for protein-DNA adducts. *Molecular Cell* 64(3), 593–606.
- Dirac-Svejstrup, A. B. i sur. (2020). DDI2 is a ubiquitin-directed endoprotease responsible for cleavage of transcription factor NRF1. *Molecular Cell* 79(2), 332–341.e7.
- Dokshin, G. A. i sur. (2020). GCNA interacts with Spartan and topoisomerase II to regulate genome stability. *Developmental Cell* 52(1), 53–68.e6.
- Duxin, J. P., Dewar, J. M., Yardimci, H., Walter, J. C. (2014). Repair of a DNA-protein crosslink by replication-coupled proteolysis. *Cell* 159(2), 346–357.
- Fielden, J. i sur. (2020). TEX264 coordinates p97- and SPRTN-mediated resolution of topoisomerase I-DNA adducts. *Nature Communications* 11, 1274.
- Fielden, J., Ruggiano, A., Popovic, M., Ramadan, K. (2018). DNA-protein crosslink proteolysis repair: from yeast to premature ageing and cancer in humans. *DNA Repair* 71, 198–204.
- Flinn, L., Breaud, S., Lo, C., Ingham, P. W., Bandmann, O. (2008). Zebrafish as a new animal model for movement disorders. *Journal of Neurochemistry* 106, 1991–1997.
- Gaillard, H., García-Muse, T., Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nature Reviews Cancer* 15(5), 276–289.
- Gao, R., Schellenberg, M. J., Huang, S. Y., Abdelmalak, M., Marchand, C., Nitiss, K. C., Nitiss, J. L., Williams, R. S., Pommier, Y. (2014). Proteolytic degradation of topoisomerase II (Top2) enables the processing of Top2·DNA and Top2·RNA covalent complexes by tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 2 (TDP2). *The Journal of Biological Chemistry* 289(26), 17960–17969.
- Ghodke, P. P., Gonzalez-Vasquez, G., Wang, H., Johnson, K. M., Sedgeman, C. A., Guengerich, F. P. (2021). Enzymatic bypass of an N6-deoxyadenosine DNA-ethylene dibromide-peptide cross-link by translesion DNA polymerases. *The Journal of Biological Chemistry* 296, 100444.
- Grisham, J. W. (1962). A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Research* 22, 842–849.
- Guo, L., Giasson, B. I., Glavis-Bloom, A., Brewer, M. D., Shorter, J., Gitler, A. D., Yang, X. (2014). A cellular system that degrades misfolded proteins and protects against neurodegeneration. *Molecular Cell* 55(1), 15–30.
- Halder, S. i sur. (2019). SPRTN protease and checkpoint kinase 1 cross-activation loop safeguards DNA replication. *Nature Communications* 10(1), 3142.
- Heck, H. d., Casanova, M. (2004). The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: a critical review of the biological evidence on distant-site toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 40(2), 92–106.

- Hefferin, M. L., Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* 4(6), 639–648.
- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences* 86(1), 6–19.
- Hoffmann, S., Pentakota, S., Mund, A., Haahr, P., Coscia, F., Gallo, M., Mann, M., Taylor, N. M., Mailand, N. (2020). FAM111 protease activity undermines cellular fitness and is amplified by gain-of-function mutations in human disease. *EMBO Reports* 21(10), e50662.
- Hoshijima, K., Jurynek, M. J., Klatt Shaw, D., Jacobi, A. M., Behlke, M. A., Grunwald, D. J. (2019). Highly efficient CRISPR-Cas9-based methods for generating deletion mutations and F₀ embryos that lack gene function in zebrafish. *Developmental Cell* 51(5), 645–657.e4.
- Hsiang, Y. H., Lihou, M. G., Liu, L. F. (1989). Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Research* 49(18), 5077–5082.
- Ide, H., Nakano, T., Salem, A. M. H., Shoukamy, M. I. (2018). DNA-protein cross-links: formidable challenges to maintaining genome integrity. *DNA Repair* 71, 190–197.
- Isojima, T. i sur. (2014). A recurrent *de novo* FAM111A mutation causes Kenny-Caffey syndrome type 2. *Journal of Bone and Mineral Research* 29(4), 992–998.
- Jackson, S. P., Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461(7267), 1071–1078.
- Jao, L.-E., Wente, S. R., Chen, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(34), 13904–13909.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096), 816–821.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife* 2, e00471.
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., Hartl, F. U. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual Review of Biochemistry* 82, 323–355.
- Kishi, S., Slack, B. E., Uchiyama, J., Zhdanova, I. V. (2009). Zebrafish as a genetic model in biological and behavioral gerontology: where development meets aging in vertebrates – a mini-review. *Gerontology* 55(4), 430–441.
- Kojima, Y., Machida, Y., Palani, S., Caulfield, T. R., Radisky, E. S., Kaufmann, S. H., Machida, Y. J. (2020). FAM111A protects replication forks from protein obstacles via its trypsin-like domain. *Nature Communications* 11(1), 1318.
- Kozovska, Z., Rajcaniova, S., Munteanu, P., Dzacovska, S., Demkova, L. (2021). CRISPR: history and perspectives to the future. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 141, 111917.

- Kühbacher, U., Duxin, J. P. (2020). How to fix DNA-protein crosslinks. *DNA Repair (Amst)* 94, 102924.
- Kumari, A., Lim, Y. X., Newell, A. H., Olson, S. B., McCullough, A. K. (2012). Formaldehyde-induced genome instability is suppressed by an XPF-dependent pathway. *DNA Repair (Amst)* 11(3), 236–246.
- Lantz-McPeak, S., Guo, X., Cuevas, E., Dumas, M., Newport, G. D., Ali, S. F., Paule, M. G., Kanungo, J. (2015). Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology* 35(3), 261–272.
- Larsen, N. B., Gao, A. O., Sparks, J. L., Gallina, I., Wu, R. A., Mann, M., Räsche, M., Walter, J. C., Duxin, J.P. (2019). Replication-coupled DNA-protein crosslink repair by SPRTN and the proteasome in *Xenopus* egg extracts. *Molecular Cell* 73(3), 574–588.e7.
- Laue, K., Rajshekar, S., Courtney, A. J., Lewis, Z. A., Goll, M. G. (2019). The maternal to zygotic transition regulates genome-wide heterochromatin establishment in the zebrafish embryo. *Nature Communications* 10(1), 1551.
- Lessel, D. i sur. (2014). Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features. *Nature Genetics* 46(11), 1239–1244.
- Li, C., Brant, E., Budak, H., Zhang, B. (2021). CRISPR/Cas: a Nobel prize award-winning precise genome editing technology for gene therapy and crop improvement. *Journal of Zhejiang University Science B* 22(4), 253–284.
- Li, F., Raczynska, J. E., Chen, Z., Yu, H. (2019). Structural insight into DNA-dependent activation of human metalloprotease Spartan. *Cell Reports* 26(12), 3336–3346.e4.
- Lieschke, G., Currie, P. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics* 8, 353–367.
- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery* 25(1), 1234–1257.
- Liu, F., Wu, D., Wu, X., Chen, K. (2015). Analyses of the cell mechanical damage during microinjection. *Soft Matter* 11(7), 1434–1442.
- Lopez-Mosqueda, J., Maddi, K., Prgomet, S., Kalayil, S., Marinovic-Terzic, I., Terzic, J., Dikic, I. (2016). SPRTN is a mammalian DNA-binding metalloprotease that resolves DNA-protein crosslinks. *eLife* 5, e21491.
- Maddi, K., Sam, D. K., Bonn, F., Prgomet, S., Tulowetzke, E., Akutsu, M., Lopez-Mosqueda, J., Dikic, I. (2020). Wss1 promotes replication stress tolerance by degrading histones. *Cell Reports* 30(9), 3117–3126.e4.
- Maskey, R. S. (2017). Spartan deficiency causes accumulation of topoisomerase 1 cleavage complexes and tumorigenesis. *Nucleic Acids Research* 45(8), 4564–4576.
- Maslov, A. Y., Lee, M., Gundry, M., Gravina, S., Strogonova, N., Tazearslan, C., Bendebury, A., Suh, Y., Vijg, J. (2012). 5-aza-2'-deoxycytidine-induced genome rearrangements are mediated by DNMT1. *Oncogene* 31(50), 5172–5179.

- Modzelewski, A. J., Chen, S., Willis, B. J., Lloyd, K. C. K., Wood, J. A., He, L. (2018). Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology. *Nature Protocols* 13(6), 1253–1274.
- Mohni, K. N. i sur. (2019). HMCES maintains genome integrity by shielding abasic sites in single-strand DNA. *Cell* 176(1-2), 144–153.e13.
- Mórocz, M., Zsigmond, E., Tóth, R., Enyedi, M. Z., Pintér, L., Haracska, L. (2017). DNA-dependent protease activity of human Spartan facilitates replication of DNA-protein crosslink-containing DNA. *Nucleic Acids Research* 45(6), 3172–3188.
- Nakano, T., Miyamoto-Matsubara, M., Shoukamy, M. I., Salem, A. M., Pack, S. P., Ishimi, Y., Ide, H. (2013). Translocation and stability of replicative DNA helicases upon encountering DNA-protein cross-links. *The Journal of Biological Chemistry* 288(7), 4649–4658.
- Nidhi, S., Anand, U., Oleksak, P., Tripathi, P., Lal, J. A., Thomas, G., Kuca, K., Tripathi, V. (2021). Novel CRISPR-Cas systems: an updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* 22(7), 3327.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156(5), 935–949.
- Nitiss, J. L. (2009). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 9(5), 338–350.
- Pfeiffer, P., Goedecke, W., Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15(4), 289–302.
- Pommier, Y. (2009). DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chemical Reviews* 109(7), 2894–2902.
- Pommier, Y., Huang, S. Y., Gao, R., Das, B. B., Murai, J., Marchand, C. (2014). Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). *DNA Repair (Amst)* 19, 114–129.
- Reinking, H. K., Hofmann, K., Stinglele, J. (2020). Function and evolution of the DNA-protein crosslink proteases Wss1 and SPRTN. *DNA Repair* 88, 102822.
- Ribas, L., Piferrer, F. (2014). The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Reviews in Aquaculture* 6, 209–240.
- Ruggiano, A., Ramadan, K. (2021). DNA-protein crosslink proteases in genome stability. *Communications Biology* 4(1), 11.
- Santi, D. V., Norment, A., Garrett, C. E. (1984). Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(22), 6993–6997.
- Schellenberg, M. J. i sur. (2017). ZATT (ZNF451)-mediated resolution of topoisomerase 2 DNA-protein cross-links. *Science* 357(6358), 1412–1416.

- Serbyn, N., Noireterre, A., Bagdiul, I., Plank, M., Michel, A. H., Loewith, R., Kornmann, B., Stutz, F. (2020). The aspartic protease Ddi1 contributes to DNA-protein crosslink repair in yeast. *Molecular Cell* 77(5), 1066–1079.e9.
- Song, Y., Yuan, L., Wang, Y., Chen, M., Deng, J., Lv, Q., Sui, T., Li, Z., Lai, L. (2016). Efficient dual sgRNA-directed large gene deletion in rabbit with CRISPR/Cas9 system. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(15), 2959–2968.
- Stingele, J. i sur. (2016). Mechanism and regulation of DNA-protein crosslink repair by the DNA-dependent metalloprotease SPRTN. *Molecular Cell* 64(4), 688–703.
- Stingele, J., Bellelli, R., Boulton, S. J. (2017). Mechanisms of DNA-protein crosslink repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(9), 563–573.
- Stingele, J., Jentsch, S. (2015). DNA-protein crosslink repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16(8), 455–460.
- Stingele, J., Schwarz, M. S., Bloemeke, N., Wolf, P. G., Jentsch, S. (2014). A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair. *Cell* 158(2), 327–338.
- Sun, Y., Miller Jenkins, L. M., Su, Y. P., Nitiss, K. C., Nitiss, J. L., Pommier, Y. (2020). A conserved SUMO pathway repairs topoisomerase DNA-protein cross-links by engaging ubiquitin-mediated proteasomal degradation. *Science Advances* 6(46), eaba6290.
- Teame, T. i sur. (2019). The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers* 9(3), 68–77.
- Tretyakova, N. Y., Groehler, A., IV., Ji, S. (2015). DNA-protein cross-links: formation, structural identities, and biological outcomes. *Accounts of Chemical Research* 48(6), 1631–1644.
- Unger, S. i sur. (2013). FAM111A mutations result in hypoparathyroidism and impaired skeletal development. *American Journal of Human Genetics* 92(6), 990–995.
- Vaz, B., Popovic, M., Ramadan, K. (2017). DNA-protein crosslink proteolysis repair. *Trends in Biochemical Sciences* 42(6), 483–495.
- Vaz, B., Popovic, M., Ramadan, K. i sur. (2016). Metalloprotease SPRTN/DVC1 orchestrates replication-coupled DNA-protein crosslink repair. *Molecular Cell* 64(4), 704–719.
- Vaz, B., Ruggiano, A., Popovic, M., Rodríguez-Berriguete, G., Kilgas, S., Singh, A. N., Higgins, G., Kiltie, A., Ramadan, K. (2020). SPRTN protease and SUMOylation coordinate DNA-protein crosslink repair to prevent genome instability. *bioRxiv*, 2020.02.14.949289.
- Yang, H., Ren, S., Yu, S., Pan, H., Li, T., Ge, S., Zhang, J., Xia, N. (2020). Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks. *International Journal of Molecular Sciences* 21(18), 6461.
- Yang, X., Li, Y., Gao, Z., Li, Z., Xu, J., Wang, W., Dong, Y. (2017). Structural analysis of Wss1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports* 7(1), 8270.

Yip, M. C. J., Bodnar, N. O., Rapoport, T. A. (2020). Ddi1 is a ubiquitin-dependent protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(14), 7776–7781.

Zhang, Y. W., Regairaz, M., Seiler, J. A., Agama, K. K., Doroshov, J. H., Pommier, Y. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 39(9), 3607–3620.

Zhitkovich, A., Costa, M. (1992). A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and *in vivo*. *Carcinogenesis* 13(8), 1485–1489

https://dna.macrogen-europe.com/eng/support/ces/ezseq_intro.jsp (pristupljeno 24. 8. 2021.)

<https://international.neb.com/products/e2050-hiscribe-t7-quick-high-yield-rna-synthesis-kit#Protocols,%20Manuals%20&%20Usage> (pristupljeno 24. 8. 2021.)

<https://international.neb.com/products/e6560-protoscript-ii-first-strand-cdna-synthesis-kit#Product%20Information> (pristupljeno 25. 8. 2021.)

<https://international.neb.com/products/m0530-phusion-high-fidelity-dna-polymerase#Product%20Information> (pristupljeno 23. 8. 2021.)

<https://international.neb.com/products/t1030-monarch-pcr-dna-cleanup-kit-5-ug#Product%20Information> (pristupljeno 23. 8. 2021.)

<https://international.neb.com/products/t2010-monarch-total-rna-miniprep-kit#Protocols,%20Manuals%20&%20Usage> (pristupljeno 25. 8. 2021.)

<https://international.neb.com/products/t2040-monarch-rna-cleanup-kit-50-ug#Product%20Information> (pristupljeno 25. 8. 2021.)

https://m.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Annotation (pristupljeno 9. 8. 2021.)

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_070283.pdf (pristupljeno 23. 8. 2021.)

<https://worldwide.promega.com/products/pcr/qpcr-and-rt-qpcr/qpcr-kits/?catNum=A6001> (pristupljeno 25. 8. 2021.)

https://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index (pristupljeno 24. 8. 2021.)

<https://www.iucnredlist.org/species/166487/6219667> (pristupljeno 13. 8. 2021.)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human/data> (pristupljeno 9. 8. 2021.)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/zebrafish/data> (pristupljeno 23. 8. 2021.)

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1232#/K1232> (pristupljeno 9. 8. 2021.)

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33232#/Q33232> (pristupljeno 23. 8. 2021.)

<https://www.zymoresearch.com/collections/zyppy-plasmid-kits/products/zyppy-plasmid-miniprep-kit> (pristupljeno 24. 8. 2021.)

ŽIVOTOPIS

Završio sam Osnovnu školu Vladimir Nazor Virovitica 2012. godine kao najučenic generacije te Katoličku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Virovitici 2016. kao najučenic generacije i najučenic županije. Tijekom obrazovanja u osnovnoj i srednjoj školi sudjelovao sam na brojnim školskim, županijskim, međuzupanijskim i državnim natjecanjima. Tijekom srednje škole sudjelovao sam na sedamnaest državnih natjecanja (iz matematike, hrvatskog jezika, vjeronauka, geografije, grčkog jezika i filozofije), a tijekom osnovne škole na tri državna natjecanja (iz geografije i tehničke kulture) i regionalnom natjecanju iz matematike. Od najznačajnijih uspjeha istaknuo bih dva prva mjesta na državnom natjecanju iz hrvatskog jezika (2013. i 2015. godine), za koja mi je Agencija za odgoj i obrazovanje uručila nagradu Oskar znanja.

Preddiplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisao sam 2016. godine i završio ga s velikom pohvalom 2019. stekavši akademski naziv sveučilišnog prvostupnika molekularne biologije (univ. bacc. biol. mol.), nakon čega sam upisao diplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na istom fakultetu. Dobitnik sam STEM stipendije Ministarstva znanosti i obrazovanja ak. god. 2017./2018. i 2018./2019. te stipendije Sveučilišta u Zagrebu za izvrsnost ak. god. 2020./2021. Tijekom studija dvaput sam sudjelovao na manifestaciji Noć biologije Biološkog odsjeka PMF-a (2018. i 2021.), Simpoziju studenata bioloških usmjerenja u Zagrebu (2019. i 2021.) te simpozijima studenata biologije u Sarajevu i Banjoj Luci (2019. i 2020.). 2019. godine u Istraživačkoj stanici Petnica (Srbija) završio sam šestodnevnu školu molekularne biologije naziva „PCR u biološkim i biomedicinskim istraživanjima“. 2020. završio sam internetsku radionicu „Introduction to Astrobiology“, koju je održao Amity University Mumbai (Indija). Dobitnik sam Rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu ak. god. 2020./2021. za individualni znanstveni rad u području prirodnih znanosti. Tijekom studija bio sam član Udruge studenata biologije PMF-a, tj. BIUS-a (u sekciji za genetiku te grupama za bioetiku i astrobiologiju). Od hobija bih istaknuo gledanje filmova i serija te čitanje i pisanje. Aktivno govorim engleski i njemački jezik.