

Ciljana mutageneza gena SPRTN i Tdp2a u zebrici (Danio rerio) pomoću sustava CRISPR

Eršetić, Matea

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:217:045651>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Matea Eršetić

**Ciljana mutageneza gena *sprtn* i *tdp2a* u
zebrici (*Danio rerio*) pomoću sustava
CRISPR**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Matea Eršetić

**Targeted mutagenesis of *sprtn* and *tdp2a*
genes in zebrafish (*Danio rerio*) using the
CRISPR system**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, pod voditeljstvom dr. sc. Marte Popović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

Zahvale

Srdačno se zahvaljujem mentorici dr. sc. Marti Popović na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju prilikom izrade diplomskog rada. Uz njeno stručno vodstvo i podršku stekla sam znanja koja će mi zasigurno koristiti u budućoj znanstvenoj karijeri, a njeni su brojni savjeti uvelike pomogli prilikom pisanja diplomskog rada.

Također se želim zahvaliti suvoditeljici izv. prof. dr. sc. Ivani Ivančić Baće na korisnim komentarima i uputama prilikom pisanja diplomskog rada. Njeno znanje i iskustvo olakšali su ovaj složeni proces i zasigurno poboljšali kvalitetu rada.

Zahvaljujem se i svim djelatnicima Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju na Institutu Ruđer Bošković. Bilo mi je iznimno drago s njima surađivati tijekom eksperimentalnog dijela diplomskog rada i njihova je prisutnost doprinijela ovom lijepom iskustvu.

Posebice bih se htjela zahvaliti mag. educ. biol. et chem. Ivanu Antičeviću koji je imao ulogu neposrednog voditelja. Svojim je savjetima pomogao u svakom koraku provedbe eksperimenata i uvijek bio spreman odgovoriti na sva moja pitanja.

Hvala kolegama Marini Horvat i Marinu Kutnjaku s kojima sam cijeli semestar provela u laboratoriju kada su radili na svojim diplomskim radovima. Bili ste odlična podrška prilikom svakog neuspjeha i uvijek spremni na raspravu o rezultatima.

Na kraju bih se htjela zahvaliti svim prijateljima i članovima obitelji na podršci tijekom izrade diplomskog rada i cijelog fakultetskog razdoblja. Iznimno mi je drago što sam s vama podijelila sva iskustva iz proteklih godina. Hvala vam!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Ciljana mutagenеза gena *sprtn* i *tdp2a* u zebrici (*Danio rerio*) pomoću sustava CRISPR

Matea Eršetić

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Unakrsna vezanja DNA-protein nastaju uspostavom ireverzibilnih kovalentnih veza između DNA i proteina, a njihovo je uklanjanje neophodno za očuvanje integriteta staničnog genoma. Metaloproteaza Sprtn sudjeluje u proteolitičkoj razgradnji adukata histona i topoizomeraza, a nastali peptidni ostatci topoizomeraze II supstrat su za tirozil-DNA fosfodiesterazu 2 (Tdp2). Mutacije navedenih proteina smanjuju sposobnost popravka oštećenja DNA, a poznata je mutacija Y117C koja uzrokuje sindrom Rujis-Aalfs u ljudi, kojeg karakteriziraju preuranjeno starenje i razvoj hepatocelularnog karcinoma u mladoj dobi. Uvođenjem mutacije L147A u katalitičku regiju gena *sprtn* ribe zebrice (*Danio rerio*) pomoću sustava CRISPR/Cas12a, izradila sam animalni model sa smanjenom efikasnošću popravka unakrsnih vezanja DNA-protein za proučavanje funkcije proteina Sprtn. Također, selektirala sam dva utemeljitelja s pomakom okvira čitanja u genu *tdp2a* zebrice nakon primjene sustava CRISPR/Cas9 i uzgojila njihovo potomstvo. Uzgoj homozigotnih linija za navedene mutacije i mogućnost stvaranja dvostrukih mutanata poboljšat će razumijevanje uloga proteina Tdp2a i Sprtn u popravku oštećenja DNA te imati potencijalne primjene u liječenju bolesti čovjeka uzrokovanih mutacijama u navedenim genima.

(92 stranica, 26 slika, 27 tablica, 166 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: unakrsna vezanja DNA-protein, popravak oštećenja DNA, animalni model

Voditelj: dr. sc. Marta Popović

Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Doc. dr. sc. Ivana Šola

Prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Rad prihvaćen: 2. 9. 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Targeted mutagenesis of *sprtn* and *tdp2a* genes in zebrafish (*Danio rerio*) using the CRISPR system

Matea Eršetić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

DNA-protein crosslinks occur by establishing irreversible covalent bonds between DNA and proteins, and their removal is necessary to preserve the integrity of the cellular genome. The metalloprotease Sprtn participates in the proteolytic degradation of histone and topoisomerase adducts, and the resulting peptide residues of topoisomerase II are substrates for tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (Tdp2). Mutations in these proteins reduce the ability to repair DNA damage, and the Y117C mutation is known to cause Rujis-Aalfs syndrome in humans, which is characterized by premature aging and the development of hepatocellular carcinoma at a young age. By introducing the L147A mutation into the catalytic region of the zebrafish (*Danio rerio*) *sprtn* gene using the CRISPR/Cas12a system, I developed an animal model with reduced DNA-protein crosslink repair efficiency to study Sprtn protein function. Also, I selected two founders with a frameshift in the zebrafish *tdp2a* gene after applying the CRISPR/Cas9 system and bred their offspring. The cultivation of homozygous lines for these mutations and the ability to form double mutants will improve understanding of the roles of Tdp2a and Sprtn proteins in DNA damage repair and have potential applications in the treatment of human diseases caused by mutations in these genes.

(92 pages, 26 figures, 27 tables, 166 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: DNA-protein crosslinks, DNA damage repair, animal model

Supervisor: dr. sc. Marta Popović

Assistant Supervisor: assoc. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Reviewers:

Assoc. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Asst. prof. dr. sc. Ivana Šola

Prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Thesis accepted: 2. 9. 2021.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Unakrsna vezanja DNA-protein	1
1.1.1. Vrste i nastanak.....	1
1.1.2. Topoizomeraze: najčešći izvor enzimatskih unakrsnih vezanja DNA-protein....	2
1.2. Popravak unakrsnih vezanja DNA-protein	4
1.2.1. Različiti mehanizmi popravka	4
1.2.2. Sprtn: glavna animalna proteaza za uklanjanje unakrsnih vezanja DNA-protein	5
1.2.3. Tirozil-DNA fosfodiesteraza 1	7
1.2.4. Tirozil-DNA fosfodiesteraza 2	7
1.3. Sustav CRISPR (engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>)	10
1.3.1. Uloga sustava CRISPR u adaptivnoj imunosti bakterija i arheja	10
1.3.2. Mehanizam djelovanja sustava CRISPR	11
1.3.3. Primjena sustava CRISPR u genetičkom inženjerstvu	13
1.4. Zebrica (<i>Danio rerio</i>) kao modelni organizam	15
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	16
3. MATERIJALI I METODE.....	17
3.1. Materijali	17
3.1.1. Standardne kemikalije.....	17
3.1.2. Puferi i mediji	17
3.1.3. Boje.....	17
3.1.4. Markeri veličina	17
3.1.5. Nukleotidi	17
3.1.6. Početnice	17
3.1.7. RNA vodilje	17
3.1.8. Enzimi	18
3.1.9. Bakterijske stanice	18
3.1.10. Komercijalni kompleti	18
3.1.11. Uređaji i oprema	18
3.1.12. Računalni programi.....	18
3.2. Metode.....	19
3.2.1. Dizajn RNA vodilja	19
3.2.2. Dizajn početnica.....	20
3.2.3. Lančana reakcija polimerazom	22
3.2.3.1. Sinteza RNA vodilja.....	23

3.2.3.1.1.	Cas9 gRNA.....	23
3.2.3.1.2.	Cas12a gRNA	23
3.2.3.2.	Taq PCR liziranih embrija.....	24
3.2.3.3.	Phusion PCR liziranih embrija	25
3.2.3.4.	Ciljana mutageneza s mutagenim početnicama	26
3.2.4.	Agarozna gel elektroforeza nukleinskih kiselina.....	28
3.2.5.	Pročišćavanje nukleinskih kiselina	29
3.2.5.1.	Pročišćavanje DNA	29
3.2.5.2.	Izolacija DNA iz agaroznog gela.....	30
3.2.5.3.	Pročišćavanje RNA.....	31
3.2.6.	Određivanje masene koncentracije nukleinskih kiselina	31
3.2.7.	Transkripcija <i>in vitro</i>	32
3.2.8.	Reakcija enzimatske restrikcije.....	32
3.2.9.	Mikroinjektiranje	33
3.2.10.	Testiranje efikasnosti sustava CRISPR/Cas9 i CRISPR/Cas12a.....	34
3.2.11.	Ciljana mutageneza u genu <i>sprtn</i>	35
3.2.12.	Digestija embrija zebrice	37
3.2.13.	Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM).....	37
3.2.14.	T7 endonukleazni test	39
3.2.15.	Analiza nukleotidnih sekvenci.....	40
3.2.15.1.	Kloniranje	40
3.2.15.2.	Transformacija bakterija.....	42
3.2.15.3.	Izrada tekućih prekonoćnih bakterijskih kultura	42
3.2.15.4.	Izolacija plazmida iz bakterija.....	43
3.2.15.5.	Utvrđivanje mutacija u analiziranim sekvencama.....	43
4.	REZULTATI.....	44
4.1.	Ciljana mutageneza u genu <i>sprtn</i>	44
4.1.1.	Dizajn RNA vodilja	44
4.1.2.	Dizajn početnica.....	45
4.1.3.	Sinteza gDNA	45
4.1.4.	Transkripcija <i>in vitro</i>	46
4.1.5.	Ispitivanje efikasnosti sustava Cas9/Cas12a i gRNA	47
4.1.5.1.	Vijabilnost injektiranih embrija.....	47
4.1.5.2.	Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM)	48
4.1.5.3.	Priprema uzoraka za T7 endonukleazni test	49

4.1.5.4.	T7 endonukleazni test	51
4.1.5.5.	Potvrda efikasnosti sustava Cas9/Cas12a i gRNA analizom nukleotidnih sekvenci	55
4.1.6.	Izrada kalupa za popravak	57
4.1.6.1.	Dizajn i uvođenje mutacija u kalup za popravak.....	57
4.1.6.2.	Potvrda uvođenja mutacija u kalup za popravak analizom nukleotidnih sekvenci	58
4.1.6.3.	Izolacija kalupa za popravak	59
4.1.7.	Selekcija i uzgoj embrija s ugrađenim kalupom za popravak.....	60
4.2.	Selekcija riba utemeljitelja za animalni model s mutacijom u genu <i>tdp2a</i>	61
4.2.1.	Primjena CRISPR/Cas9 za uvođenje mutacija u gen <i>tdp2a</i>	61
4.2.2.	Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM).....	61
4.2.3.	Analiza nukleotidnih sekvenci za utvrđivanje mutacija u genu <i>tdp2a</i>	64
5.	RASPRAVA.....	66
6.	ZAKLJUČAK.....	75
7.	LITERATURA	76
8.	ŽIVOTOPIS.....	92

Popis kratica

BER – engl. *base excision repair*, popravak izrezivanjem baza

bp – engl. *base pair*, bazni par

Cas – engl. *CRISPR-associated*, asociran s CRISPR-om

CRISPR – engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, grupirana pravilno raspoređena kratka palindromska ponavljanja

crRNA – CRISPR RNA

DPC – engl. *DNA-protein crosslink*, unakrsna vezanja DNA-protein

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

EAPII – engl. *ETS1-associated protein 2*, protein 2 asociran s ETS1

gRNA – engl. *guide RNA*, RNA vodilja

HR – engl. *homologous recombination*, homologna rekombinacija

HRM – engl. *high resolution melting*, mekšanje DNA visoke rezolucije

MMR – engl. *mismatch repair*, popravak krivo sparenih baza

mRNA – engl. *messenger RNA*, glasnička RNA

NER – engl. *nucleotide excision repair*, popravak izrezivanjem nukleotida

NHEJ – engl. *nonhomologous end joining*, nehomologno spajanje krajeva

PAM – engl. *protospacer adjacent motif*, motiv uz protorazmaknicu

PARP1 – engl. *poly(ADP-ribose) polymerase-1*, poli(ADP-riboza) polimeraza-1

PCNA – engl. *proliferating cell nuclear antigen*, proliferirajući stanični jezgreni antigen

PCR – engl. *polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom

PER – engl. *photoenzymatic repair*, fotoenzimatski popravak

pre-crRNA – engl. *precursor crRNA*, prekursorska crRNA

RJALS – engl. *Rujis-Aalfs syndrome*, sindrom Rujis-Aalfs

ROS – engl. *reactive oxygen species*, reaktivni kisikovi radikali

RT – engl. *repair template*, kalup za popravak

sgRNA – engl. *single-molecule guide RNA*, jednomolekularna RNA vodilja

Sprtn – engl. *SprT-like domain at the N-terminus*, N-terminalna domena poput SprT

TALEN – engl. *transcription activator-like effector nucleases*, efektorske nukleaze poput transkripcijskih aktivatora

Tdp1 – tirozil-DNA fosfodiesteraza 1

Tdp2 – tirozil-DNA fosfodiesteraza 2

TGF- β – engl. *transforming growth factor beta*, transformirajući faktor rasta beta

TLS – engl. *translesion synthesis*, translezijska sinteza

T_m – engl. *melting temperature*, temperatura taljenja

TNF – engl. *tumor necrosis factor*, faktor nekroze tumora

Top1 – topoizomeraza I

Top2 – topoizomeraza II

Top3 – topoizomeraza III

Top-ccs – engl. *topoisomerase cleavage complexes*, kompleksi DNA i topoizomeraze

tracrRNA – engl. *trans-activating RNA*, trans-aktivirajuća RNA

TTRAP – engl. *TRAF and TNF receptor-associated protein*, protein asociiran s TRAF-om i receptorom TNF-a

UBA – engl. *ubiquitin-associated*, asociiran s ubikvitinom

UV – engl. *ultraviolet*, ultraljubičasto

Wss1 – engl. *weak suppressor of smt3*, slab supresor *smt3*

ZFN – engl. *zinc finger nuclease*, nukleaza s cinkovim prstom

1. UVOD

1.1. Unakrsna vezanja DNA-protein

1.1.1. Vrste i nastanak

Specifična građa molekule DNA u obliku uzvojnice koju čine dva antiparalelna lanca omogućava pohranu, nasljeđivanje i ekspresiju genetskog materijala. Različiti procesi, poput stvaranja složene kromatinske strukture, genske ekspresije, replikacije i rekombinacije, omogućavaju rast, razvoj, diobu i preživljavanje stanica (Hübner i sur., 2013). Za održavanje svake navedene stanične funkcije i integriteta genoma stanice bitna je interakcija nukleinskih kiselina s kompleksnim proteinskim sustavom. Složenost ovih procesa zahtijeva izmjenu velikog broja proteina koji se nalaze u blizini DNA ili s njom stvaraju prijelazne interakcije, no ponekad može doći do stvaranja ireverzibilnih kovalentnih veza između DNA i proteina. Takve se lezije nazivaju unakrsna vezanja DNA-protein (engl. *DNA-protein crosslinks*, DPCs) i mogu nastati pod utjecajem različitih endogenih ili egzogenih čimbenika (Fielden i sur., 2018).

U antitumorskim terapijama često se koriste ionizirajuća zračenja i kemijske tvari te oni čine najčešće egzogene uzroke DPC (Huang i Li, 2013). Direktno uzrokovanje DPC ionizirajućim zračenjem uključuje stvaranje nestabilnih kationskih radikala na DNA, a indirektno dovodi do radiolize vode i povećanja koncentracije reaktivnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Vaz i sur., 2017). Kemoterapijski lijekovi poput kamptotecina i etoposida induciraju DPC na mjestu interakcije DNA i enzima topoizomeraze, a ultraljubičasto svjetlo (engl. *ultraviolet*, UV) dovodi do ekscitacije baza DNA (najčešće timidina) i stvaranja kovalentnih veza s aminokiselinama poput cisteina, lizina, fenilalanina, triptofana i tirozina (Zhang i sur., 2004; Pommier, 2009).

Endogeni uzroci mogu se podijeliti u dvije skupine, ovisno o tome dovode li do stvaranja enzimatskih ili neenzimatskih DPC. Neenzimatski DPC najčešće nastaju pod utjecajem reaktivnih aldehida prisutnih u stanici, a oni su obično produkt metaboličkih i regulatornih procesa poput metabolizma aminokiselina i oksidativne demetilacije (Swenberg i sur., 2011). Ukoliko je aldehid u blizini kromatina, može reagirati s primarnim aminom baze DNA i stvoriti stabilnu amidnu vezu s lizinom ili argininom okolnih proteina, čime nastaje DPC (Bandaru i sur., 2002). Acetaldehid također može dovesti do stvaranja DPC reakcijom s primarnim aminima baza DNA, a on nastaje kao intermedijer u metabolizmu ugljikohidrata i

etanola (Garcia i sur., 2009). Najbolje su istražena unakrsna vezanja DNA-protein koja nastaju zbog djelovanja formaldehida te se ovaj induktor DPC često koristi za stvaranje lezija u svrhu njihova proučavanja (Conaway i sur., 1996; Quievryn i Zhitkovich, 2000). Endogeni formaldehid nastaje prilikom demetilacije histona i kao intermedijer pri enzimatskom uklanjanju metilnih skupina s DNA (Trewick i sur., 2002; Walport i sur., 2012). Stanice posjeduju enzime aldehyd dehidrogenaze koji metaboliziraju različite aldehide poput formaldehida i acetaldehida te vrše detoksifikaciju (Vasiliou i sur., 2004). Usprkos tome, njihova je koncentracija 100 – 400 μM u tkivu čovjeka vjerojatno i dalje dovoljna da redovito uzrokuju DPC (Heck i Casanova, 2004; Tong i sur., 2013). Prilikom popravaka izrezivanjem baza (engl. *base excision repair*, BER) ili spontanom gubitkom baza, nastaju abazna mjesta na DNA koja imaju reaktivne aldehydne skupine te također mogu dovesti do stvaranja kovalentnih veza s okolnim proteinima (Sczepanski i sur., 2010).

Mnogi proteini formiraju prijelazne kovalentne komplekse s DNA prilikom enzimatskih reakcija, a enzimatski DPC nastaju ako se takvi kompleksi ne razriješe. Jedni od najčešćih tipova enzimatskih DPC su oni uzrokovani topoizomerazama koje se pod utjecajem endogenih čimbenika ili nakon izlaganja stanica kemoterapeuticima poput kamptotecina ili etoposida trajno vežu na DNA (Mao i sur., 2001; Pommier i sur., 2006). Nakon uklanjanja baze sustavom BER pomoću DNA glikozilaze, ostaje mjesto bez baze koje može oksidirati u prisutnosti slobodnih radikala i tvoriti DPC s proteinima popravka poput DNA polimeraze β (Hashimoto i sur., 2001; Sung i sur., 2005). Slično je primijećeno i za druge enzime popravka oštećenja DNA poput O⁶-metilgvanin-DNA metiltransferaze i poli(ADP-riboza) polimeraze-1 (PARP1) (Loeber i sur., 2008; Prasad i sur., 2014).

1.1.2. Topoizomeraze: najčešći izvor enzimatskih unakrsnih vezanja DNA-protein

Tijekom provedbe replikacije i transkripcije, potrebno je promijeniti konformaciju određenih dijelova genoma koji se nalaze u različitim stupnjevima kondenzacije i omogućiti pristup proteinskim kompleksima za interakciju s DNA. Prilikom takve strukturne reorganizacije genoma, događa se topološko zapletanje DNA koje onemogućava osnovne stanične funkcije (Shure i Vinograd, 1976). Razdvajanje lanaca prilikom transkripcije i replikacije dovodi do superzavijene DNA i torzijske napetosti. Višak pozitivnih superzavoja otežava daljnje razdvajanje lanaca, što onemogućava pomicanje DNA i RNA polimeraze te

napredovanje reakcije, a negativna superzavijenost koja ostaje iza polimeraze dovodi do stvaranja nepoželjnih nukleinskih struktura poput R-petlji, z-DNA i intramolekularnih ukosnica (Pommier, 2013).

Topoizomeraze, enzimi koji su prisutni u eukariota, arheja i bakterija, uklanjaju superzavoje različitim mehanizmima (Forterre i sur., 2007). Topoizomeraza I (Top1) uvodi jednolančani lom stvarajući kovalentni intermedijer između DNA i enzima, što omogućuje okretanje pocijepanog oko nepocijepanog lanca do rješavanja superzavijenosti, nakon čega slijedi ligacija DNA. Drugi mehanizam uključuje prolazak dvolančane ili jednolančane DNA kroz katalitički intermedijer. Topoizomeraza II (Top2) omogućuje prolazak nepocijepanog dupleksa DNA kroz dvolančani lom, a topoizomeraza III (Top3) propušta jedan lanac kroz jednolančani lom, a obje reakcije završavaju ligacijom lanaca (Pommier i sur., 2014).

Stvaranje katalitičkih intermedijera tijekom transesterifikacijske reakcije uključuje kovalentno vezanje topoizomeraze na 3' (Top1) ili 5' (Top2 i Top3) kraj DNA pomoću fosfotirozinske veze i formiranje prijelaznih kompleksa DNA i topoizomeraze (engl. *topoisomerase cleavage complexes*, Top-ccs) (Pommier, 2009). Ukoliko takvi kompleksi postanu trajno i ireverzibilno vezani pod utjecajem endogenih čimbenika (npr. aldehida ili promjena uzvojnice DNA) ili kemijskih agensa poput kamptotecina, nastaju Top1 DPC. Enzim će uzrokovati lom, ali ne će moći dovršiti reakciju i ostat će lomovi DNA, a isto se događa i s molekulama etoposida i enzimom Top2 koji dovode do Top2 DPC (Pommier, 2009). Topoizomeraze mogu ostati vezane na DNA i ako se u njihovoj blizini nalaze oksidativni radikali ili prilikom enzimatske aktivnosti naiđu na velike adukte na DNA, pogrešno ugrađene ribonukleotide ili mjesta bez baze (Ashour i sur., 2015). Dva su glavna procesa kojima stanica uklanja Top DPC. Jedan način uključuje proteaze karakteristične za DPC: Sprtn (engl. *SprT-like domain at the N-terminus*, N-terminalna domena poput SprT) u sisavaca i Wss1 (engl. *weak suppressor of smt3*, slab supresor *smt3*) u kvasca, koje proteolitički smanjuju proteinski dio DPC te fosfodiesteraze koje zatim režu vezu između DNA i peptidnih ostataka topoizomeraza (Bahmed i sur., 2010; Vaz i sur., 2017). Drugi način uključuje nukleazu Mre11 koja reže DNA s lezijom DPC, što je do sad primijećeno za popravak Top2 DPC (Deshpande i sur., 2016; Hoa i sur., 2016).

1.2. Popravak unakrsnih vezanja DNA-protein

1.2.1. Različiti mehanizmi popravka

Postojanje DPC vrlo je štetno za opstanak stanice jer kontinuirano dovodi do blokiranja pristupa proteinskim kompleksima koji vrše replikaciju, transkripciju, popravak DNA i remodeliranje kromatina (Barker i sur., 2005). Nemogućnost popravka DPC dovodi do genomske nestabilnosti u obliku lomova kromatida, kromosomskih aberacija i mutacija, a može dovesti i do stanične smrti (Stinglee i Jentsch, 2015). Izlaganje acetaldehidu dovodi do povećane stope mutacija, izmjene genetskog sadržaja između susjednih kromatida i aneuploidije u stanica sisavaca te kolapsa replikacijske vilice u kvasca (Dellarco, 1988; Nakano i sur., 2013; Noguchi i sur., 2017).

Prvi modeli korišteni za razjašnjavanje uklanjanja DPC uključivali su kanonične puteve popravka oštećenja DNA poput popravka izrezivanjem nukleotida (engl. *nucleotide excision repair*, NER) i homologne rekombinacije (engl. *homologous recombination*, HR). Istraživanja bakterijskih proteina pokazala su kako kompleks za popravak izrezivanjem baza može ukloniti kovalentno vezane peptide s DNA, ali samo ako su manji od 16 kDa (Minko i sur., 2002). Proučavanje kompleksa za NER u sisavaca također je pokazalo kako je ovaj sustav svojom efikasnošću limitiran na izrezivanje proteina do 16 kDa (Reardon i Sancar, 2006). Na bakterijama je pokazano kako popravak homolognom rekombinacijom može zaobići DPC koji su preveliki za NER, a vjerojatno je uključen i u razrješavanje DPC uzrokovanih formaldehidom u stanicama sisavaca (Nakano i sur., 2007; Nakano i sur., 2009). Za sad je poznato kako NER i HR vjerojatno sudjeluju u popravku DPC samo u određenim uvjetima: ovisno o veličini adukta, razini oštećenja i replikacijskom stanju stanice (Klages-Mundt i Li, 2017).

Kako bi se omogućio pristup proteinima koji su uključeni u različite sustave popravka oštećenja, potrebna je djelomična proteolitička razgradnja adukta. Prvi takav sustav otkriven je u kvascu gdje metaloproteaza Wss1 cijepa DPC koji sadrže proteine poput Top1 i histona H1 do manjih peptidnih ostataka (Stinglee i sur., 2014). Daljnjim se istraživanjima potvrdila važnost proteaze Wss1 za preživljavanje stanica izloženih formaldehidu, a mutanti kvasca bez ovog proteina akumulirali su DPC i imali značajne promjene u strukturi kromosoma (Stinglee i sur., 2014). Otkrićem animalne metaloproteaze Sprtn, evolucijski povezane s kvašćevim proteinom Wss1, pronađeni su novi dokazi koji upućuju na proteolitičku razgradnju DPC do manjih fragmenata koje zatim mogu ukloniti specijalizirani enzimi poput tirozil-DNA

fosfodiesteraza u slučaju popravka Top1 i Top2 DPC (Lopez-Mosqueda i sur., 2016; Stinglele i sur., 2016; Vaz i sur., 2016).

Aktivnost proteaza mora biti strogo regulirana kako bi one razgrađivale samo DPC, a ne i ostale proteine koji su vezani na DNA poput histona ili sastavnica replisoma. Poznato je kako postoji više razina regulacije proteaza poput ekspresije u određenim fazama staničnog ciklusa, vezanja na DNA, proteolitičkog procesiranja same proteaze i posttranslacijskih modifikacija (Fielden i sur., 2018). Također, proteaze koje razgrađuju kovalentno vezane proteine na manje peptide moraju djelovati na različite supstrate zbog velikog raspona veličina DPC (Klages-Mundt i Li, 2017).

1.2.2. Sprtn: glavna animalna proteaza za uklanjanje unakrsnih vezanja DNA-protein

Sprtn je metaloproteaza ovisna o DNA čiji su supstrati različiti proteini asocirani s kromatinom poput histona (H1, H2A, H2B, H3 i H4), Top1 i Top2 (Lopez-Mosqueda i sur., 2016; Vaz i sur., 2016; Morocz i sur., 2017). Kao i za Wss1, vezanje Sprtn na DNA bitno je za poticanje njegove aktivnosti i proteolitičku razgradnju proteina kovalentno vezanih na DNA (Morocz i sur., 2017). Strukturne analize pokazuju kako Sprtn posjeduje N-terminalnu domenu SprT koja je odgovorna za proteolitičku razgradnju DPC, a na C-kraju ima motive i domene za interakciju s proliferirajućim staničnim jezgrenom antigenom (engl. *proliferating cell nuclear antigen*, PCNA) i ubikvitinom (Centore i sur., 2012; Juhasz i sur., 2012). Također sadrži više elemenata koji vežu DNA poput bazične regije uz domenu SprT i preferencijalno se aktivira pomoću jednolančane DNA (Lopez-Mosqueda i sur., 2016; Stinglele i sur., 2016; Toth i sur., 2017; Vaz i sur., 2016). Domena SprT sastoji se od metaloproteazne subdomene i subdomene koja veže cink (Li i sur., 2019). Ova su istraživanja dovela do zaključaka kako Sprtn asocira s kompleksom za replikaciju DNA jer je PCNA bitna za procesivnost DNA polimeraze (Vaz i sur., 2016).

Regulacija aktivnosti proteaze Sprtn osigurana je međudjelovanjem nekoliko različitih mehanizama kako ne bi došlo do nekontrolirane proteolitičke razgradnje esencijalnih staničnih proteina. U neaktivnom je stanju monoubikvitinirana i ne može se vezati na kromatin, a detekcija DPC vodi do deubikvitinacije i omogućava joj vezanje na oštećeno mjesto na DNA (Stinglele i sur., 2016). Nakon vezanja na DNA, Sprtn može katalizirati proteolitičko rezanje

vlastite domene na C-kraju i rezanje supstrata (Vaz i sur., 2016). Istraživanje prisutnosti proteina Sprtn u stanici pokazalo je kako je dominantno prisutan u S-fazi staničnog ciklusa, a izvan nje pretežito degradiran (Mosbech i sur., 2012; Duxin i sur., 2014).

Prije otkrića njegove uloge u popravku DPC, Sprtn je bio prepoznat kao regulator translezijske sinteze (engl. *translesion synthesis*, TLS), specijaliziranog replikacijskog sustava koji koristi polimeraze TLS s malom stopom točnosti replikacije. Polimeraze TLS mogu zaobići određene lezije na DNA bez njihova popravka, a na stanicama *sprtn knock-out* primijećena je nemogućnost tolerancije pomoću TLS-a na lezije uzrokovane UV-om (Sale i sur., 2012; Maskey i sur., 2014). Osim poremećene funkcije TLS-a, takve su stanice pokazivale i druge fenotipske karakteristike: nepotpunu replikaciju DNA, nakupljanje abnormalnih kromosoma i staničnu smrt, što je upućivalo na dodatne uloge proteina Sprtn. Potpuni *knock-out* gena *sprtn* u miševa dovodi do smrti tijekom embrionalnog razvoja, a mutacije koje uzrokuju smanjenu aktivnost Sprtn-a rezultiraju jedinkama koje ubrzano stare i pokazuju značajnu kromosomsku nestabilnost (Maskey i sur., 2014). Utvrđivanjem njegove uloge u popravku Top1 DPC, zaključeno je kako do ovakvog fenotipa dolazi zbog akumulacije oštećenja DNA u obliku DPC te da Sprtn ima ključnu funkciju u supresiji tumorigeneze u stanicama jetre miševa (Maskey i sur., 2017).

Sličan fenotip (genomska nestabilnost i podložnost razvoju raka jetrenih stanica) primijećen je i kod nekoliko pojedinaca oboljelih od nepoznate bolesti. Genomskom analizom utvrđeno je kako fenotip uzrokuje bialelna mutacija u genu *SPRTN* gdje je zbog delecija došlo do pomaka okvira čitanja i translacije mutiranog oblika proteina (Lessel i sur., 2014). Primijećena je i supstitucija Tyr117Cys koja se nalazi unutar metaloproteazne domene SprT, pet aminokiselina uzvodno od Glu112 koja je potrebna za TLS (Kim i sur., 2013; Lessel i sur., 2014). Danas je poznato kako mutacija Tyr117Cys uzrokuje sindrom Rujis-Aalfs (engl. *Rujis-Aalfs syndrome*, RJALS), autosomalnu recesivnu bolest koju karakteriziraju kromosomska nestabilnost, prerano starenje i rana pojava raka jetrenih stanica u djece (Lessel i sur., 2014; Ramadan i sur., 2017). Posljedice mutacije u genu *SPRTN* na staničnoj razini uključivale su sporiju replikaciju DNA te veći broj zastajućih replikacijskih rašlji i dvolančanih lomova DNA (engl. *double-strand break*, DSB) (Lessel i sur., 2014). Povezivanjem fenotipskih obilježja RJALS-a sa znanjem o strukturi Sprtn-a (Tyr117Cys remeti strukturni integritet katalitičke domene), zaključeno je kako Sprtn asocira s proteinima za replikaciju i uklanja DPC tijekom

sinteze DNA. Zbog toga su mutacije u katalitičkoj domeni onemogućile popravak štetnih lezija na DNA i dovele do razvoja bolesti (Vaz i sur., 2016; Li i sur., 2019).

1.2.3. Tirozil-DNA fosfodiesteraza 1

Zbog važnosti topoizomeraza u osnovnim staničnim procesima koji se odvijaju na molekuli DNA, bitno je regulirati njihovu aktivnost i spriječiti trajno vezanje enzima na DNA. Prvi enzim za koji je potvrđena uloga u uklanjanju vezane Top1 na 3' kraju DNA, bez rezanja same molekule DNA, nazvan je tirozil-DNA fosfodiesteraza 1 (Tdp1) (Yang i sur., 1996). Kasnije je utvrđeno kako Tdp1 ima sposobnost uklanjanja različitih opstruktivnih formacija na 3' kraju DNA poput 3'-fosfoglikolata koji nastaju tijekom radioterapije te apurinskih ili apirimidinskih mjesta koja su uzrokovana alkilirajućim agensima u kemoterapiji (Inamdar i sur., 2002; Nilsen i sur., 2012). Funkcija proteina Tdp1 regulirana je posttranslacijskim modifikacijama: fosforilacijom, sumoilacijom i poli(ADP)ribozilacijom (Das i sur., 2009; Hudson i sur., 2012; Das i sur., 2014). Zanimljivo je kako su eksperimenti na kvascu pokazali da delecija gena za Tdp1 dovodi do veće osjetljivosti stanica na agense koji stvaraju Top2 DPC, što bi upućivalo na mogućnost sudjelovanja Tdp1 i u ovom popravku DPC (Nitiss i sur., 2006).

Tdp1 pripada superporodici fosfolipaza D i sastoji se od dvije domene. N-terminalna domena ima regulatornu ulogu i pomaže u održavanju stabilnosti proteina, a C-terminalna domena ima katalitičku ulogu (Interthal i sur., 2001). Tdp1 hidrolizira 3'-tirozin na različitim strukturama DNA, ali najbolja mu je učinkovitost na jednolančanoj DNA (Debéthune i sur., 2002). Tdp1 ne može pristupiti mjestu djelovanja zbog steričke barijere samog enzima Top1 veličine 68 kDa te ne može ukloniti cijeli protein vezan na DNA. Kako bi Tdp1 mogao djelovati, prvo je potrebna proteolitička razgradnja Top1 pomoću Sprtn na manje peptide (Lopez-Mosqueda i sur., 2016; Vaz i sur., 2016). Tdp1 može uklanjati 3'-peptide veličine 1 – 100 aminokiselina, ali preferencijalno djeluje na dulje oligonukleotide i kraće peptide (Interthal i sur., 2005; Raymond i sur., 2005).

1.2.4. Tirozil-DNA fosfodiesteraza 2

Nakon otkrića uloge proteina Tdp1 u popravku Top1 DPC, pronađen je još jedan enzim koji ima sposobnost uklanjanja topoizomeraza koje su ostale kovalentno vezane na DNA. Za razliku od Tdp1 koji uklanja Top1 i različite adukte s 3' kraja DNA, tirozil-DNA

fosfodiesteraza 2 (Tdp2) hidrolizira samo fosfotirozinsku vezu. Također, Tdp2 ima puno jaču aktivnost na 5'-fosfotirozinskim vezama od one na 3' kraju (Murai i sur., 2012). Zbog ovih je svojstava Tdp2 prepoznat kao enzim koji uklanja Top2 DPC te dosad nije potvrđeno može li izrezati i druge vrste kovalentno vezanih molekula s 5' kraja DNA (Ledesma i sur., 2009; Zeng i sur., 2011).

Protein koji se danas naziva Tdp2 zapravo je otkriven nekoliko puta kroz različita istraživanja. U početku je bio poznat kao TTRAP (engl. *TRAF and TNF receptor-associated protein*, protein asociran s TRAF-om i receptorom TNF-a), odnosno protein koji veže receptor unutarstaničnog citokina TNF (engl. *tumor necrosis factor*). TTRAP (Tdp2) dovodi do povećane aktivacije puta MAPK/JNK/p38 te inhibicije aktivacije signalnog puta NFκB, a također reagira s faktorima asociranim s receptorom TNF-a (TRAF2, TRAF3, TRAF5 i TRAF6) (Pype i sur., 2000). Ovi su signalni putevi uključeni u regulaciju staničnog odgovora na različite izvore stresa, ali također kontroliraju proliferaciju, diferencijaciju, preživljavanje i migraciju stanica (Wagner i Nebreda, 2009).

Neovisno o otkriću njegove uloge u ovim signalnim putevima, provedena je metoda dvostrukog kvašćevog hibrida (engl. *yeast two-hybrid*) kako bi se pronašli novi interakcijski partneri proteina ETS1. Na taj je način Tdp2 ponovno otkriven, u ovom slučaju kao negativni transkripcijski regulator za proteine ETS1 i AP1 te je nazvan EAPII (engl. *ETS1-associated protein 2*) (Pei i sur., 2003). Bilo je potrebno gotovo deset godina kako bi se otkrila uloga TTRAP/EAPII/Tdp2 u popravku Top2 DPC i povezalno znanje o različitim funkcijama ovog proteina s njegovom strukturom i sekvencom (Rodrigues-Lima i sur., 2001; Ledesma i sur., 2009). Novija istraživanja pokazala su kako Tdp2 ima ulogu u poticanju stanične smrti djelujući na signalni put TGF-β (engl. *transforming growth factor beta*, transformirajući faktor rasta beta) (Várady i sur., 2011). Također je primijećeno kako se nalazi u povišenim količinama u tkivu raka pluća gdje potiče proliferaciju stanica djelujući na regulatore staničnog ciklusa poput ciklina D1 (Li i sur., 2011; Do i sur., 2012).

Tdp2 ima dvije domene: katalitičku domenu na C-kraju i domenu asociranu s ubikvitinom (engl. *ubiquitin-associated*, UBA) na N-kraju koja ima regulatornu ulogu (Schellenberg i sur., 2012). Pripada skupini nukleaza s domenom EEP koje cijepaju okosnice DNA i RNA te sadrži četiri konzervirana katalitička motiva (TWN, LQE, GDXN i SDH) (Gao i sur., 2012). Kristalna struktura Tdp2 iz miša i zebrice upućuje na monomernu organizaciju proteina i aktivno mjesto kojeg čine četiri bitne aminokiseline oko jednog iona magnezija

(Schellenberg i sur., 2012; Shi i sur., 2012). Regulacija aktivnosti proteina Tdp2 uključuje posttranslacijske modifikacije poput fosforilacije i interakcije s ubikvitiniranim proteinima pomoću domene UBA (Shi i sur., 2012; Bian i sur., 2016). Tdp2 ne može ukloniti Top2 DPC u uvjetima *in vitro* ako Top2 nije denaturiran ili proteolitički razgrađen na manje peptide (Gao i sur., 2014; Lopez-Mosqueda i sur., 2016). Kako je pokazano da Sprtn proteolitički cijepa Top2 DPC, pretpostavlja se da djeluje prije Tdp2 i omogućava mu pristup peptidnim ostacima Top2 (Vaz i sur., 2016). Tdp2 ostavlja DSB s ljepljivim krajem od četiri baze te 5'-fosfatne i 3'-hidroksilne krajeve koji su direktni supstrati za protein Ku i ligazu IV te dovode do sljepljivanja putem NHEJ-a (engl. *nonhomologous end joining*, nehomologno spajanje krajeva) (Adhikari i sur., 2012; Shi i sur., 2012). Alternativni način popravka Top2 DPC uključuje nukleazu Mre11 iz kompleksa MRN (Deshpande i sur., 2016; Hoa i sur., 2016).

Zbog velike važnosti Tdp2 u metabolizmu DNA i očuvanju integriteta genoma, istražuju se mogućnosti korištenja lijekova u antitumorskoj terapiji koji ciljaju na njegovo djelovanje. Lijekovi su dizajnirani tako da blokiraju katalitičku aktivnost Tdp2 ili uzrokuju nastajanje Top2 DPC (Nitiss, 2009; Pommier i sur., 2010). Veći broj korištenih lijekova pripada drugoj skupini te uključuje etoposid, doksorubicin i mitoksantron (Gao i sur., 2012). Uloga Tdp2 u uklanjanju Top2 DPC potvrđena je i eksperimentima s deletiranim genom u kojima su ptičje, mišje i ljudske stanice pokazale veću osjetljivost na spomenute otrove od stanica divljeg tipa (Ledesma i sur., 2009; Zeng i sur., 2011, Zeng i sur., 2012; Gómez-Herreros i sur., 2013).

1.3. Sustav CRISPR (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)

1.3.1. Uloga sustava CRISPR u adaptivnoj imunosti bakterija i arheja

Mikrobi su razvili specifične prilagodbe kako bi preživjeli u različitim uvjetima i podnijeli izlaganje stranim genetskim elementima. Značajni se dijelovi bakterijskih i arhejskih genoma sastoje od gena koji su u njihov organizam ušli prilikom razmjene genetskog materijala sa srodnim i nesrodnim vrstama putem horizontalnog prijenosa gena (Nakamura i sur., 2004). Horizontalni prijenos gena može se dogoditi ulaskom DNA u bakteriju iz njene okoline (transformacija) te ugradnjom heterologne DNA s mobilnih genetskih elemenata poput plazmida (konjugacija) ili bakteriofagnih genoma (transdukcija) (Thomas i Nielsen, 2005). Zbog ovih procesa postoji neprestana opasnost od ulaska različitih molekula DNA u bakterije i arheje, čime je objašnjena potreba za postojanjem obrambenih mehanizama koji stanicama omogućuju razlikovanje strane DNA od vlastitog genoma. Ovi sustavi čuvaju integritet genoma, ali ponekad dopuštaju ulazak i zadržavanje egzogenih DNA te dovode do stjecanja poželjnih adaptacija na okolišne uvjete (Horvath i Barrangou, 2010).

Jedan od takvih obrambenih mehanizama za postizanje adaptivne imunosti mikroba nazvan je CRISPR (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, grupirana pravilno raspoređena kratka palindromska ponavljanja), a poseban je po tome što se kontinuirano prilagođava i modificira kada bakterija reagira s novim molekulama DNA. Lokusi CRISPR široko su rasprostranjeni i pronađeni u 42 % bakterija i 85 % arheja. Postoji više klasifikacija sustava CRISPR koje se danas koriste. Tradicionalna podjela bazira se na nukleotidnoj sekvenci i uključuje dvije klase koje se zajedno sastoje od šest tipova (I – VI) i 50 podtipova (Makarova i sur., 2020). Ukoliko se proučava mehanizam djelovanja sustava, ponekad je jednostavnije napraviti podjelu s obzirom na to koja vrsta nukleinske kiseline (DNA ili RNA) aktivira sustav CRISPR (Nussenzweig i Marraffini, 2020).

Unatoč raznolikosti sustava, svi lokusi CRISPR sadrže dvije osnovne anatomske strukture. Prva se odnosi na niz gena povezanih s CRISPR-om (engl. *CRISPR-associated, cas*) koji sudjeluju u manipulaciji nukleinskih kiselina, a druga na kratke, djelomično palindromske, ponavljajuće nekodirajuće DNA sekvence (engl. *repeats*) (Jansen i sur., 2002). Ova su ponavljanja isprekidana kratkim varijabilnim sekvencama koje se nazivaju razmaknice (engl. *spacers*) i stranog su porijekla – odgovaraju sekvencama bakteriofagnog genoma ili plazmida

koji su ušli u stanicu. Preživjele stanice imat će razmaknice ugrađene u lokus CRISPR pomoću kojih će se prepoznati strana DNA prilikom ponovnog ulaska tih molekula u stanicu domaćina, što će bakteriji ili arheji omogućiti preživljavanje (Marraffini i Sontheimer, 2008).

Velika količina ugrađenih razmaknica odgovara sekvencama genoma različitih bakteriofaga, no postoje i razmaknice koje putem sustava CRISPR onemogućuju konjugaciju plazmida ili transformaciju (Marraffini i Sontheimer, 2008). Zbog sposobnosti stanica domaćina da se obrane od strane DNA, sustav CRISPR mogao bi biti vrlo koristan u nepovoljnim okolišnim uvjetima te je primijećeno kako se može horizontalno prenositi na evolucijski udaljenije organizme (Godde i Bickerton, 2006). Također postoji i bakteriofagni sustav koji djeluje protiv CRISPR/Cas i nazvan je anti-CRISPR. Radi se o malim peptidima koji se međusobno razlikuju u strukturi i nukleotidnoj sekvenci, ali svi ometaju rezanje ili prepoznavanje strane DNA koje vrši sustav CRISPR/Cas (Pawluk i sur., 2016; Stanley i sur., 2019). Većinom djeluju kao alosterički inhibitori koji vezanjem onemogućavaju konformacijske promjene kompleksa crRNA:Cas (CRISPR RNA i protein Cas) ili oponašaju strukturu DNA i funkcioniraju kao kompetitivni inhibitori. Zanimljivo je kako sustav anti-CRISPR ne bi trebao biti u mogućnosti inaktivirati CRISPR jer su lokusi CRISPR/Cas konstitutivno eksprimirani i vjerojatno bi uklonili virusni genom prije nego se on transkribira. Pretpostavka je da opetovane infekcije jedne stanice dovode do postepenog slabljenja sustava CRISPR i stanicu vode u stanje imunosupresije u kojem se ne može obraniti od strane DNA (Landsberger i sur., 2018).

1.3.2. Mehanizam djelovanja sustava CRISPR

Proces imunskog odgovora stanice domaćina na ulazak strane DNA odvija se u tri koraka. U prvoj fazi (imunizacija ili adaptacija) dolazi do integracije novih razmaknica u lokus CRISPR koje potječu od strane DNA, a za taj su proces zaslužni konzervirani proteini kompleksa Cas1/Cas2. U drugoj se fazi (ekspresija) prepisuju ugrađene razmaknice i nastaju male molekule CRISPR RNA (crRNA). Interakcijom crRNA i nukleaza Cas nastaje kompleks koji može prepoznati i ukloniti strane nukleinske kiseline. Sustavi klase I (tipovi I, III i IV) imaju nukleaze Cas vođene molekulom RNA koja se sastoji od više proteinskih podjedinica, a klasa II (tipovi II, V i VI) koristi ribonukleoproteinski kompleks od jednog proteina (crRNA:Cas). U trećoj fazi (interferencija) dolazi do prepoznavanja ciljane nukleinske kiseline

i njene razgradnje pomoću crRNA i proteina Cas (Rath i sur., 2015; Nussenzweig i Marraffini, 2020).

Molekule crRNA imaju dva obilježja: palindromsku sekvencu koja potječe od ponavljanja u lokusu CRISPR te varijabilnu sekvencu razmaknice koja je komplementarna ciljanoj molekuli (Bolotin i sur., 2005). Kako bi sustav bio funkcionalan, stanica mora prepoznati RNA koje se koriste u procesu obrane od strane DNA, a to čini preko ponavljajuće sekvence koja je konstantna (Haurwitz i sur., 2010). Prepisivanjem s lokusa CRISPR prvotno nastaje dugačak transkript pre-crRNA (engl. *precursor crRNA*, prekursorska crRNA) koji sadrži više razmaknica. Mehanizam sazrijevanja pre-crRNA razlikuje se između klasa. Sustavi klase I koriste zasebnu endoribonukleazu (Cas6 ili Cas5d), a sustavi klase II proces provode istim kompleksom koji vrši i razgradnju ciljane molekule (Carte i sur., 2008; Deltcheva i sur., 2011). Kako bi enzimi klase 2 prepoznali pre-crRNA potrebna im je još jedna molekula, tracrRNA (engl. *trans-activating RNA*, trans-aktivirajuća RNA), koja se veže na konstantnu regiju u pre-crRNA. Time se stvara struktura ukosnice i omogućava vezanje enzima Cas9 ili Cas12a (Shmakov i sur., 2017).

Nakon sklapanja ribonukleoproteinskog kompleksa nukleaze Cas i zrele crRNA, omogućeno je pretraživanje citosola za prisutnost stranih nukleinskih kiselina (Brouns i sur., 2008). Cas9 i Cas12a oboje pripadaju skupini proteina Cas koju aktiviraju DNA molekule. Međusobno su slične strukture, ali na drugačiji način stvaraju dvolančane lomove u DNA (DSB-ove) (Cong i sur., 2012). Cas9 ima dvije nukleazne domene (HNH i RuvC) te svaka od njih reže jedan lanac i stvara tupe krajeve (Sapranaukas i sur., 2011). Cas12a sadrži samo jednu nukleaznu domenu (RuvC) te ostavlja stršće krajeve nakon DSB-a (Swarts i sur., 2017).

Za oba enzima, vezanje zrele crRNA potiče traženje kompatibilnih motiva uz protorazmaknicu (engl. *protospacer adjacent motif*, PAM), što je potrebno za prepoznavanje DNA i invaziju lanaca. PAM je motiv koji se nalazi uz sekvencu koja je izvor razmaknice (u stranoj DNA), a odsutan je u lokusu CRISPR. Na ovaj način obrambeni sustav prokariota prepoznaje i reže samo stranu DNA, a ne i komplementarne sekvence unutar razmaknica u lokusu CRISPR (Redding i sur., 2015). Odmatanje DNA i komplementarno vezanje DNA s crRNA dovodi do promjene u razmještanju nukleaznih domena, što im omogućuje interakciju s mjestima za rezanje (Sternberg i sur., 2015; Singh i sur., 2018). Pomicanje domene HNH proteina Cas9 simultano dovodi do aktivacije domene RuvC na nekomplementarnom lancu, a time je osigurano rezanje oba lanca (Sternberg i sur., 2015). Cas12a, koji ima samo jednu

domenu RuvC, prvo reže lanac koji nije vezan za crRNA, a zatim komplementarni lanac kojemu je omogućen pristup do nukleazne domene (Swarts i Jinek, 2019). Traženje motiva PAM omogućava interakciju ovih enzima samo s manjim brojem ciljanih mjesta u stranoj DNA jer bi u protivnom pretraživanje komplementarne sekvence crRNA trajalo duže (Jeon i sur., 2018). S druge strane, primijećeno je kako neki bakteriofagi imaju točkaste mutacije unutar sekvence PAM-a, čime su stekli imunitet na sustav CRISPR (Deveau i sur., 2010). Nakon DSB-a dolazi do razgradnje pocijepane DNA, no poznato je kako Cas9 i Cas12a ne disociraju s mjesta gdje su uveli lom, osim u ekstremnim uvjetima *in vitro*. Zbog toga su za njihovo odvajanje vjerojatno zaslužni drugi unutarstanični faktori (Sternberg i sur., 2015; Singh i sur., 2018).

1.3.3. Primjena sustava CRISPR u genetičkom inženjerstvu

Primjena genetičkog inženjerstva omogućava proučavanje raznih unutarstaničnih procesa i signalnih puteva na molekularnoj razini, ali se također može koristiti u medicini i biotehnologiji. Od samog otkrića uloge DNA u prijenosu nasljedne informacije postavljalo se pitanje mogućnosti promjene nukleotidne sekvence na točno određenim pozicijama. Otkrićem sustava ZFN (engl. *zinc finger nuclease*, nukleaza s cinkovim prstom) i TALEN (engl. *transcription activator-like effector nucleases*, efektorske nukleaze poput transkripcijskih aktivatora) otvorila se mogućnost za ciljanu mutagenezu različitih organizama. Princip ovih metoda bio je povezati endonukleaznu katalitičku domenu na modularne DNA-vezujuće proteine koji bi uveli DSB na ciljanom mjestu u genomu. Zbog kompleksnosti dizajna i sinteze proteina za svaki pojedini eksperiment, ovi se sustavi nisu koristili u većem broju istraživanja (Doudna i Charpentier, 2014).

Otkrićem sustava CRISPR i mehanizma kojim djeluje pronađen je efikasniji i jednostavniji način za uvođenje željenih mutacija. CRISPR koristi molekulu RNA za navođenje enzima poput Cas9 ili Cas12a do ciljanog mjesta u genomu na osnovi komplementarnosti nukleotidne sekvence (Ran i sur., 2013). Korištenje CRISPR/Cas9 pojednostavljeno je fuzioniranjem crRNA i tracrRNA u jednu molekulu sgRNA (engl. *single-molecule guide RNA*), a Cas12a i u nativnom sustavu koristi samo crRNA. Prilikom svakog eksperimenta, potrebno je dizajnirati i sintetizirati odgovarajuću RNA vodilju (engl. *guide RNA*, gRNA) i koristiti protein Cas za stvaranje ribonukleoproteinskog kompleksa (Swarts i Jinek, 2018). CRISPR omogućava bolju efikasnost uvođenja ciljanih mutacija i lako je

primjenjiv u različitim organizmima, a također su testirani i razni konstrukti poput sustava za metilaciju ciljanih regija u genomu koji koristi navođenje putem sustava CRISPR (Ran i sur., 2013; Vojta i sur., 2016).

Poput ZNF i TALEN, proteini Cas uvode DSB na ciljanom lokusu u genomu (Urnov i sur., 2010). Unutarstanični mehanizmi za popravak DNA rješavaju DSB na dva načina: nehomolognim spajanjem krajeva (NHEJ) ili homolognom rekombinacijom (HR). NHEJ je popravak sklon pogreškama koji ne koristi kalup za popravak, a ligacijom DSB-ova uvodi insercijske ili delecije mutacije. Zbog toga se NHEJ može koristiti za stvaranje *knock-out* mutanata koji će zbog insercija ili delecija imati pomaknut okvir čitanja ili ugrađen preuranjeni STOP kodon (Perez i sur., 2008). Popravak putem HR-a obično se događa u manjem postotku od NHEJ-a, ali može se koristiti za uvođenje preciznih i definiranih mutacija u lokus od interesa. Ovo se postiže korištenjem kalupa za popravak koji može biti jednolančani oligonukleotid ili u dvolančanom obliku s dužim homolognim segmentima oko promijenjenog slijeda nukleotida. HR je obično aktivan samo tijekom diobe te njegova efikasnost varira s obzirom na tip i stanje stanice, lokus te kalup za popravak (Saleh-Gohari i Helleday, 2004).

U svrhu proučavanja uloga pojedinih proteina, korisno je napraviti animalne modele koji imaju promijenjenu sekvencu proteina (*knock-in*) ili ne ekspimiraju funkcionalan protein (*knock-out*). Izravnim injektiranjem gRNA i mRNA (engl. *messenger RNA*, glasnička RNA) koja kodira za protein Cas ili translatiran protein u embrionalni stadij životinja omogućeno je brže stvaranje transgeničnih linija s više modificiranih alela (Wang i sur., 2013). Jedan od limitirajućih faktora prilikom korištenja CRISPR/Cas9 odnosi se na mogućnost selekcije samo onih ciljanih mjesta koja u svojoj blizini sadrže PAM 5'-NGG. Zbog toga se razvijaju sustavi s drugim proteinima poput Cas12a koji koristi drugačiji PAM (TTTV) i omogućuju primjenu sustava CRISPR u većem broju lokusa (Ran i sur., 2013). Osim specifičnog mjesta PAM, pomoću algoritamskih analiza potrebno je istražiti i vjerojatnost nespecifičnog vezanja gRNA na ostale dijelove genoma što bi dovelo do uvođenja neželjenih mutacija. Također, prilikom svakog eksperimenta potrebno je provesti ispitivanje efikasnosti sustava dizajnirane gRNA i odabranog proteina.

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

Zebrica (*Danio rerio*) je slatkovodna riba iz porodice Cyprinidae. Vrstu karakterizira cilindrično tijelo veličine 4 – 5 cm sa specifičnim uzorkom svijetlih i tamnih horizontalnih pruga (Spence i sur., 2008). Zbog spolnog dimorfizma lako je razlikovati muške i ženske jedinke prema obliku njihova tijela i obojenosti ventralne regije. Ženke odjednom polažu velik broj jajašaca, a potomstvo brzo raste i dosiže spolnu zrelost za dva – tri mjeseca (Gerlai i sur., 2000). Postoji više razloga zbog kojih se zebrica sve češće koristi kao animalni model u istraživanjima farmakogenetike, neurologije i embriologije. Za razliku od miševa, jednog od najpoznatijih modela kralježnjaka, zebrice ne zahtijevaju velik prostor za rast i razvoj te je trošak njihova uzgoja tri puta manji od onog za održavanje istog broja miševa (Lieschke i Currie, 2007). Također, njihovi se embriji razvijaju izvan tijela ženke i prozirni su, čime je omogućeno proučavanje početnih razvojnih faza kralježnjaka bez ikakvih invazivnih postupaka. Kako je od jedne ženke moguće dobiti 200 – 300 oplodjenih jajašaca tjedno, a embriogeneza traje samo 72 sata, u vrlo kratkom vremenu moguće je uzgojiti velik broj jedinki za potrebe raznih istraživanja (Simonetti i sur., 2015).

Analizom sekvenciranog genoma utvrđeno je kako zebrice, miševi i ljudi imaju 12719 zajedničkih gena te je 70 % ljudskih gena pronađeno u zebrici (Howe i sur., 2017). Injektiranjem gena koji uzrokuju bolesti u ljudskoj populaciji u embrije zebrice, mogu se promatrati fenotipska obilježja bolesti na ribama. Zbog toga se koriste kao modelni organizmi u svrhu pronalaska metode liječenja genetskih poremećaja poput depresije, shizofrenije i Parkinsonove bolesti (Simonetti i sur., 2015). Također, fiziološki i morfološki aspekti zebrica poput mišićnih vlakana te središnjeg živčanog, skeletnog i kardiovaskularnog sustava nalikuju ljudskim sustavima i mogu se koristiti za pojednostavljeno proučavanje anatomije kralježnjaka (Lieschke i Currie, 2007).

Zanimljivo područje istraživanja koje koristi zebrice kao modelni organizam odnosi se na proučavanje oštećenja u DNA i mehanizama popravka. Zebričin genom sadrži ortologne gene za gotovo sve eukariotske puteve popravka oštećenja DNA: popravak izrezivanjem baze (BER), popravak izrezivanjem nukleotida (NER), fotoenzimatski popravak (engl. *photoenzymatic repair*, PER), popravak krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*, MMR), homolognu rekombinaciju (HR), nehomologno spajanje krajeva (NHEJ) i translezijsku sintezu (TLS) (Pei i Strauss, 2013).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U svrhu boljeg razumijevanja važnosti proteina Sprtn i Tdp2a u popravku unakrsnih vezanja DNA-protein, potrebno je konstruirati animalne modele za njihovo proučavanje. Uvođenje mutacija u gene *sprtn* i *tdp2a* ribe zebrice (*Danio rerio*) omogućit će uzgoj jedinki s promijenjenom aminokiselinskom sekvencom i proteinskom strukturom, a time će se poboljšati razumijevanje popravka ove vrste oštećenja u kralježnjaka. Ciljevi diplomskog rada odnose se na testiranje i pronalazak efikasnog sustava CRIPSR/Cas9 ili CRISPR/Cas12a za uvođenje *knock-in* mutacije u katalitičku domenu gena *sprtn*. Za ove je sustave potrebno dizajnirati i izraditi RNA vodilje i kalup za popravak za uvođenje željene mutacije, a nakon mikroinjektiranja u embrije zebrice selektirati i uzgojiti jedinke s ugrađenim kalupom. Za proučavanje uloge Tdp2a potrebno je utvrditi vrste mutacija koje jedinke prenose na potomstvo nakon primjene sustava CRISPR/Cas9 te selektirati mušku i žensku jedinku sa željenim mutacijama (preuranjeni STOP kodon ili promjena okvira čitanja) za uzgoj potomstva s mutiranim proteinom Tdp2a.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Destilirana voda (u daljnjem tekstu „voda“) *UltraPure DNase/RNase-Free (Thermo Fisher Scientific)*, RNazni sprej *RNase AWAY™ Surface Decontaminant (Thermo Fisher Scientific)*, Phenol Red (0.2 g/l), KCl (2 M), 70 %-tni etanol, 95 %-tni etanol, 100 %-tni izopropanol, ampicilin (100 mg/ml u 70 %-tnom etanolu).

3.1.2. Puferi i mediji

Pufer TAE (c (Tris) = 40 mM, c (EDTA) = 1 mM, pH = 8.0), medij E3 50x (engl. *embryo medium*, E3) (c (NaCl) = 250 mM, c (KCl) = 8.5 mM, c (CaCl₂) = 16.5 mM, c (MgSO₄) = 16.5 mM, pH = 7.8), pufer za digestiju embrija (engl. *embryo digestion buffer*) (c (Tris-Cl) = 10 mM, c (KCl) = 50 mM, w/v (Tween-20) = 0.3 %, pH = 8.5), tekući medij LB (Luria-Bertani) i agar LB, pufer *CutSmart (NEB)*, pufer *10X Buffer 2 (NEB)*.

3.1.3. Boje

Boja *Gel-Star Nucleic Acid Gel Stain (Lonza)* za agaroznu gel elektroforezu, boja za nanošenje uzoraka na gel *DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Fisher Scientific)*.

3.1.4. Markeri veličina

DNA marker veličina *GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific)*.

3.1.5. Nukleotidi

Otopina smjese nukleotida (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) *dNTP Mix (Thermo Fisher Scientific)*.

3.1.6. Početnice

Sve su početnice za PCR naručene od komercijalnog dobavljača (*Macrogen*, Nizozemska).

3.1.7. RNA vodilje

Sve su RNA vodilje naručene od komercijalnog dobavljača (*Macrogen*).

3.1.8. Enzimi

Proteinaza K (20 mg/ml, *Alfa Aesar*), endonukleaza Cas9 (20 μ M, *NEB*), endonukleaza Cas12a (100 μ M, *NEB*), endonukleaza T7 I (*NEB*), restrikcijska endonukleaza *SceI* (*NEB*).

3.1.9. Bakterijske stanice

Ultrakompetentne stanice *Escherichia coli XL10-Gold*.

3.1.10. Komercijalni kompleti

Komercijalni kompleti za pročišćavanje nukleinskih kiselina: *Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit* (*Monarch*), *MinElute PCR Purification Kit* (*QIAGEN*), *Monarch® DNA Gel Extraction Kit* (*NEB*) i *Monarch® RNA Cleanup Kit* (*Monarch*), komercijalni komplet za HRM-u *MeltDoctor™ HRM Master Mix* (*Applied Biosystems*), komercijalni komplet za izolaciju plazmida *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit*, komercijalni komplet za ciljanu mutagenezu na plazmidu *QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Agilent Technologies*).

3.1.11. Uređaji i oprema

PCR uređaj *T1000 Thermal Cycler* (*Bio-Rad*), uređaj za gel elektroforezu *Biometra Compact XS/S* (*Analytik Jena*), uređaj za snimanje gelova *ChemiDoc XRS+ System* (*Bio-Rad*), centrifuge *Universal 32R* (*Hettich*) i *MIKRO 120* (*Hettich*), optički stripovi (engl. *strips*) *MicroAmp Optical 8-Cap Strips* (*Applied Biosystems*), HRM uređaj *StepOnePlus* (*ThermoFischer Scientific*), termoblok *Bio TDB-100* (*Biosan*), inkubator-tresilica *Innova™ 40 Incubator Shaker* (*Eppendorf*), mikroskopska lupa *SMZ-171-TLED* (*Motic*), nastavak za mikroskop *Model SFA Stereo Microscope Fluorescence Adapter Royal Blue* (*NIGHTSEA*), laminar *LaminAir HB 2448* (*Heraeus*), mikroinjektor *FemtoJet® 4x series* (*Eppendorf*).

3.1.12. Računalni programi

Računalni programski paket *BioEdit* verzije 7.2, *DNASTAR Lasergene PrimerSelect* verzije 7.00, *High Resolution Melt Software* verzije 3.2, *BioEdit* verzije 7.2., *Motic Images Plus* verzije 2.00, *Image Lab* verzije 6.1, *SnapGene Viewer* verzije 5.2.4., *Microsoft 365*.

3.2. Metode

3.2.1. Dizajn RNA vodilja

Za ciljanu mutagenezu u genu *sprtn* pomoću sustava CRISPR, potrebno je dizajnirati RNA vodilju. Nukleotidnu sekvencu gena *sprtn* iz organizma ribe zebrice preuzela sam s mrežne stranice *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>), a sekvence sam obrađivala pomoću računalnog programskog paketa *BioEdit* verzije 7.2. Za pronalazak odgovarajućih gRNA, koristila sam mrežnu stranicu *CRISPRScan* (<https://www.crisprscan.org/>). Mutacija u katalitičkoj regiji koju je potrebno uvesti (leucin na poziciji 147 u alanin, L147A) nalazi se unutar trećeg egzona te sam zbog toga potencijalne gRNA tražila unutar navedenog egzona i u okolnim intronima dva i tri. Za CRISPR/Cas9 gRNA koristila sam PAM NGG, a za CRISPR/Cas12a TTTV.

Odabrala sam tri gRNA za CRISPR/Cas9 (gRNA-A, -B i -C) koje odgovaraju regijama gena *sprtn* međusobno udaljenima minimalno 500 nukleotida kako bi se testirala efikasnost ovog sustava u različitim dijelovima gena. U obzir sam uzela samo one sekvence za koje je preko stranice *CRISPRScan* algoritamski izračunato kako postoji mala vjerojatnost nespecifičnog vezanja gRNA na druga područja u genomu zebrice te je predviđena visoka efikasnost gRNA. Sve Cas9 gRNA dizajnirala sam u intronima gena *sprtn*, a intronske regije ribe zebrice vrlo su varijabilne. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije (engl. *high resolution melting*, HRM) za detekciju mutacija osjetljiva je i na manje razlike u nukleotidnim sekvencama te bi detektirala i intronske polimorfizme i mogla dovesti do lažno pozitivnih rezultata. Zbog toga su efikasnosti Cas9 gRNA ispitane T7 endonukleaznim testom. Za CRISPR/Cas12a odabrala sam dvije gRNA (gRNA-D i -E), međusobno udaljene oko 400 nukleotida s istim ciljem testiranja efikasnosti, uzimajući u obzir podatke o mogućim nespecifičnim vezanjima. gRNA-E također je u intronskoj regiji i ispitana je T7 endonukleaznim testom, a gRNA-D nalazi se u trećem egzonu te je njena efikasnost testirana metodom HRM. Odabrane gRNA i njihove sekvence navedene su u Tablici 1, a naručene su od dobavljača (*Macrogen*) u obliku plazmidne DNA (Tablica 2).

Tablica 1. Popis dizajniranih RNA vodilja (gRNA) i njihovih sekvenci za ciljanu mutagenezu u genu *sprtn* ribe zebrice (*Danio rerio*).

Naziv	Enzim	Nukleotidna sekvenca 5' → 3'
gRNA-A	Cas9	GGGCGTGGTGAACCCCGCCA
gRNA-B	Cas9	TCATTGCCCTTCAGCATTCC
gRNA-C	Cas9	GGGTCTGGATAAGTTTTATG
gRNA-D	Cas12a	GATGGACACGGCCCAGAGTTCT
gRNA-E	Cas12a	CGACATCGCCCAACCCTAATGCT

Tablica 2. Popis korištenih plazmida.

Naziv	Opis i korištenje
Plazmid A	Sinteza gDNA-A (Cas9)
Plazmid B	Sinteza gDNA-B (Cas9)
Plazmid C	Sinteza gDNA-C (Cas9)
Plazmid D	Sinteza gDNA-D (Cas12a)
Plazmid E	Sinteza gDNA-D (Cas12a)
Plazmid-wt-RT	Uvođenje ciljanih mutacija u RT za <i>sprtn</i>
Plazmid-RT	Plazmid s mutacijama za ciljanu mutagenezu gena <i>sprtn</i>

gDNA označava RNA vodilju u DNA obliku. Plazmidi A – E naručeni su od dobavljača (*Macrogen*). RT označava kalup za popravak.

3.2.2. Dizajn početnica

Uzvodne i nizvodne početnice za lančanu reakciju polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) dizajnirala sam koristeći mrežnu stranicu *NCBI BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Odabrala sam parove početnica s udjelom citozina i gvanina 40 – 60 % te čije se temperature taljenja (engl. *melting temperature*, T_m) razlikuju za 3 – 4 °C, koristeći mrežnu stranicu *T_m Calculator* (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>). Pomoću računalnog programskog paketa *DNASTAR Lasergene PrimerSelect* verzije 7.00 odabrala sam parove početnica koji su imali najmanju vjerojatnost stvaranja nepoželjnih dimera ili ukosnica.

Za T7 endonukleazni test odabrala sam početnice veličine 20 – 25 nukleotida za umnažanje fragmenata veličine 400 – 600 bp (engl. *base pair*, bazni par), na način da sekvenca gRNA bude bliža uzvodnoj ili nizvodnoj početnici kako bih uspješnim testom dobila fragmente

različitih veličina. Za HRM-u sam odabrala početnice veličine 20 – 25 nukleotida za umnažanje fragmenata do 100 bp oko odabrane gRNA. Za izradu kalupa za popravak (engl. *repair template*, RT) dizajnirala sam početnice duljine 25 – 45 bp na način da se obje vežu na isti lanac DNA te koristeći mrežnu stranicu za izračun vrijednosti T_m (<https://depts.washington.edu/bakerpg/primertemp/>). Kako bih pomoću RT-a uvela ciljane mutacije u gen *sprtn*, u sredini jedne početnice uvela sam mutacije za L147A (C4541G i T4542C), a u sredinu druge početnice za PAM TTTV, odnosno VAAA (A4118G i A4119G) jer je mutageneza provedena na (-) lancu (engl. *antisense*). Odabrane početnice i njihove sekvence navedene su u Tablici 3, a u Tablici 4 su korištene početnice koje nisam dizajnirala.

Tablica 3. Popis dizajniranih početnica i njihovih sekvenci.

Naziv	Nukleotidna sekvenca 5' → 3'	Mjesto vezanja	Opis i korištenje
Početnica-A-F	TCACATTGGGGTTAAGGGCG	3494 – 3513	Taq PCR liziranih embrija
Početnica-A-R	CCCATCCCCCTTTTTCACATA	3995 – 4015	Taq PCR liziranih embrija
Početnica-B-F	AAGTTATCCAATCGATCCAAACAAT	5043 – 5067	Taq PCR liziranih embrija
Početnica-B-R	TTGTCCTTGTCAGCTTTAAACA	5614 – 5636	Taq PCR liziranih embrija
Početnica-C-F	AAGTGGCACCAACATCACGG	4624 – 4643	Phusion PCR liziranih embrija
Početnica-C-R	AAGTTATCCAATCGATCCAAACAAT	5043 – 5057	Phusion PCR liziranih embrija
Početnica-D-F	TTCATGAGATGATCCACGCTCT	4521 – 4542	HRM liziranih embrija
Početnica-D-R	CAACCAAGCAAGTGGCACC	4615 – 4633	HRM liziranih embrija
Početnica-E-F	CACATTGTCATGAGCTCGTCTG	3711 – 3732	Phusion PCR liziranih embrija
Početnica-E-R	GGGGAAGTACTGCTGTTACGT	4178 – 4198	Phusion PCR liziranih embrija
Početnica-M-K-F	CTTCTTCATGAGATGATCCACGCTG CACTTTTGTGACTCAA	4517 – 4559	Mutageneza katalitičkog mjesta za RT
Početnica-M-P-F	CATCGCCCAACCCTAATGCTGGGAC CATATATTGTGCAGCCC	4097 – 4138	Mutageneza sekvence PAM za RT

F označava uzvodnu početnicu (engl. *forward*), a R nizvodnu početnicu (engl. *reverse*). Slova A – E označene su početnice za pripadajuće gRNA. Mjesto vezanja odnosi se na dio gena *sprtn* ribe zebrice (*Danio rerio*). M označava početnice za ciljanu mutagenezu, K za katalitičko mjesto, a P za sekvencu PAM. Podebljanim slovima označeni su nukleotidi koji uvode mutacije. RT označava kalup za popravak, PCR lančanu reakciju polimerazom, a HRM mekšanje DNA visoke rezolucije. Početnice su naručene od dobavljača (*Macrogen*).

Tablica 4. Popis korištenih početnica i njihovih sekvenci.

Naziv	Nukleotidna sekvenca 5' → 3'	Opis i korištenje
Cas9-gDNA-1	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTT GATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCT AGCTCTAAAAC	Sinteza Cas9 gDNA
Cas9-gDNA-2	GGATCCTAATACGACTCACTATAG	Sinteza Cas9 gDNA
Cas9-gDNA-3	AAAAAAGCACCGACTCGG	Sinteza Cas9 gDNA
Cas12a-gDNA-4	CCCTAATACGACTCACTATAGGGTTTCAAAGATTA AATAATTTCTACTAAGTGTAGAT	Sinteza Cas12a gDNA
Početnica-Tdp2a-F	CTACTAAATTGTTATTTTAATGC	HRM liziranih embrija (Tdp2a)
Početnica-Tdp2a-R	AATCTTCACACAAGGAGGTA	HRM liziranih embrija (Tdp2a)

Početnice za sintezu Cas9 gDNA naručene su prema Modzelewski i sur. (2018), a za Cas12a prema Fernandez i sur (2018).

3.2.3. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (PCR) omogućava umnažanje specifičnih fragmenata DNA te je brz i jednostavan način za dobivanje većih količina DNA. Za PCR potrebno je pripremiti smjesu koja se sastoji od kalupa DNA, početnica, nukleotida (adenina, timina, citozina i gvanina) i enzima DNA polimeraze. Početnice su kraći oligonukleotidi komplementarni određenim sljedovima u kalupu i određuju veličinu fragmenta koji će se umnožiti. PCR se sastoji od tri glavna koraka. U fazi denaturacije dolazi do razdvajanja dvolančane uzvojnice DNA zbog povišene temperature. Snižavanjem temperature omogućeno je vezanje početnica na kalup u procesu hibridizacije, a u zadnjem se koraku temperatura podiže kako bi se omogućila ekstenzija i funkcioniranje DNA polimeraze. Zbog vezanih početnica, polimeraza nastavlja komplementarni lanac dodatkom slobodnih nukleotida, a time dovodi do umnažanja željenih fragmenata. U ovoj se metodi koriste posebni uređaji za PCR kako bi se regulirala temperatura reakcije u zadanim vremenskim intervalima koji odgovaraju duljini i složenosti fragmenata. Opetovanim ponavljanjem ciklusa u uređajima za PCR moguće je dobiti velike količine umnoženih molekula (Garibyan i Avashia, 2013).

3.2.3.1. Sinteza RNA vodilja

3.2.3.1.1. Cas9 gRNA

Za izradu svake gRNA koristila sam tri početnice: Cas9-gDNA-1, Cas9-gDNA-2 i Cas9-gDNA-3 (u Tablici 4, prema Modzelewski i sur., 2018) te naručenu sekvencu za pojedinu gDNA (sekvenca gRNA u DNA obliku). Navedene početnice vežu se na specifične dijelove plazmida (Tablica 2) u kojem se nalazi gDNA kako bi se umnožila samo ciljane sekvence, a očekivana veličina produkta iznosila je 127 bp. Smjesu za PCR ukupnog volumena od 50 μ l napravila prema Tablici 5, a uređaj za PCR namjestila prema Tablici 6. Protokol za sintezu gDNA prilagođen je prema Modzelewski i sur. (2018). Nakon PCR-a, napravila sam agaroznu gel elektroforezu za potvrdu prisutnosti fragmenata željene veličine.

Tablica 5. Popis sastojaka smjese za Phusion PCR za sintezu Cas9 gDNA.

Sastojci smjese	Volumen (μ l)
H ₂ O	35.5
5x pufer Phusion HF	10
Smjesa dNTP-ova (10 mM)	1
Počelnica Cas9-gDNA-1 (1 μ M)	1
Počelnica Cas9-gDNA-2 (1 μ M)	1
Počelnica Cas9-gDNA-3 (100 μ M)	0.5
Plazmid A/B/C (100 μ M)	0.5
Polimeraza Phusion HF (2 U/ μ l)	0.5
Ukupan volumen	50

Tablica 6. Postavke uređaja za Phusion PCR za sintezu Cas9 gDNA.

Broj ciklusa	Denaturacija	Vežanje početnica	Ekstenzija
1	95 °C, 2 min		
2-31	95 °C, 10 s	57 °C, 10 s	72 °C, 10 s
32			72 °C, 2 min

3.2.3.1.2. Cas12a gRNA

Za izradu svake Cas12a gDNA (sekvenca gRNA u DNA obliku) koristila sam jednu univerzalnu početnicu Cas12a-gDNA-4 (u Tablici 4, prema Fernandez i sur., 2018) i naručenu

sekvencu koja je ubačena u plazmid (plazmidi D i E u Tablici 2). Navedena početnica veže se na specifičan dio plazmida u kojem se nalazi gDNA kako bi se umnožila samo ciljana sekvenca, a očekivana veličina produkta iznosila je 80 bp. Smjesu za PCR ukupnog volumena 20 μ l napravila sam prema Tablici 7, a uređaj za PCR namjestila prema Tablici 8. Protokol za sintezu gDNA prilagođen je prema Fernandez i sur. (2018). Nakon PCR-a, napravila sam agaroznu gel elektroforezu za potvrdu prisutnosti fragmenata željene veličine.

Tablica 7. Popis sastojaka smjese za Phusion PCR za sintezu Cas12a gDNA.

Sastojci smjese	Volumen (μ l)
H ₂ O	12.6
5x pufer Phusion HF	4
Smjesa dNTP-ova (10 mM)	0.4
Početnica Cas12a-gDNA-4 (10 μ M)	1
Plazmid D/E (10 μ M)	1
Polimeraza Phusion	1
Ukupan volumen	20

Tablica 8. Postavke uređaja za Phusion PCR za sintezu Cas12a gDNA.

Broj ciklusa	Denaturacija	Vežanje početnica	Ekstenzija
1	98 °C, 3 min		
2-31	98 °C, 30 s	52 °C, 30 s	72 °C, 10 s
32			72 °C, 5 min

3.2.3.2. Taq PCR liziranih embrija

Kako bih umnožila fragmente veličine 400 – 600 bp oko sekvence korištene Cas9 gRNA, provela sam Taq PCR na liziranim uzorcima embrija (izvor genomske DNA). Za svaku konstruiranu gRNA koristila sam specifične uzvodne i nizvodne početnice prema Tablici 3 te po deset lizata injektiranih embrija (CRISPR/Cas9 + gRNA) i pet embrija divljeg tipa. Kako bih ove uzorke kasnije koristila za T7 endonukleazni test i detekciju potencijalnih mutacija, također sam istim postupkom umnožila i dva kontrolna uzorka (T7 (+) kao pozitivnu i T7 (-) kao negativnu kontrolu). Smjesu za PCR ukupnog volumena 57.5 μ l napravila prema Tablici

9, a uređaj za PCR namjestila prema Tablici 10. Nakon PCR-a, provela sam agaroznu gel elektroforezu za potvrdu prisutnosti fragmenata željene veličine.

Tablica 9. Popis sastojaka smjese za Taq PCR liziranih embrija zebrice (*Danio rerio*) nakon mikroinjektiranja CRISPR/Cas9 i Cas9 gRNA.

Sastojci smjese	Volumen (μl)
Genomska DNA (lizat embrija)	7.5
10x PCR pufer	5
MgCl ₂ (50 mM)	3
Uzvodna početnica (10 μM)	1.5
Nizvodna početnica (10 μM)	1.5
Polimeraza Taq	0.35
Smjesa dNTP-ova (10 mM)	1.25
H ₂ O	37.4
Ukupan volumen	57.5

Uzvodne i nizvodne početnice za sintezu pripadajuće gRNA odabrane su prema Tablici 3.

Tablica 10. Postavke uređaja za Taq PCR liziranih embrija zebrice (*Danio rerio*) nakon mikroinjektiranja CRISPR/Cas9 i Cas9 gRNA.

Broj ciklusa	Denaturacija	Vežanje početnica	Ekstenzija
1	95 °C, 1 min		
2-31	95 °C, 15 s	* °C, 15 s	72 °C, 10 s
32			72 °C, 5 min

*Temperatura vežanja za pojedine parove početnica izračunata je pomoću mrežne stranice *T_m Calculator* (<https://tcalculator.neb.com/#!/main>).

3.2.3.3. Phusion PCR liziranih embrija

Kako bih umnožila fragmente veličine 400 – 600 bp oko sekvence korištene Cas12a gRNA, provela sam Phusion PCR na liziranim uzorcima embrija (izvor genomske DNA). Za svaku konstruiranu gRNA koristila sam specifične uzvodne i nizvodne početnice prema Tablici 3 te po deset lizata injektiranih embrija (CRISPR/Cas12a + gRNA) i pet embrija divljeg tipa. Kako bih ove uzorke kasnije koristila za T7 endonukleazni test i detekciju potencijalnih mutacija, također sam istim postupkom umnožila i dva kontrolna uzorka (T7 (+) kao pozitivnu

i T7 (-) kao negativnu kontrolu). Smjesu za PCR ukupnog volumena 57.5 μ l napravila sam prema Tablici 11, a uređaj za PCR namjestila prema Tablici 12. Nakon PCR-a, napravila sam agaroznu gel elektroforezu za potvrdu prisutnosti fragmenata željene veličine.

Tablica 11. Popis sastojaka smjese za Phusion PCR liziranih embrija zebrice (*Danio rerio*) nakon mikroinjektiranja CRISPR/Cas12a i Cas12a gRNA.

Sastojci smjese	Volumen (μ l)
Genomska DNA (lizat embrija)	7.5
5x Phusion HF pufer	10
Uzvodna početnica (10 μ M)	2.5
Nizvodna početnica (10 μ M)	2.5
Polimeraza Phusion	5
Smjesa dNTP-ova (10 mM)	1
H ₂ O	29
Ukupan volumen	57.5

Uzvodne i nizvodne početnice za sintezu pripadajuće gRNA odabrane su prema Tablici 3.

Tablica 12. Postavke uređaja za Phusion PCR liziranih embrija zebrice (*Danio rerio*) nakon mikroinjektiranja CRISPR/Cas9 i Cas9 gRNA.

Broj ciklusa	Denaturacija	Vezanje početnica	Ekstenzija
1	98 °C, 30 s		
2-31	98 °C, 10 s	* °C, 30 s	72 °C, 15 s
32			72 °C, 10 min

*Temperatura vezanja za pojedine parove početnica izračunata je pomoću mrežne stranice *T_m Calculator* (<https://tmcaculator.neb.com/#!/main>).

3.2.3.4. Ciljana mutageniza s mutagenim početnicama

Nakon pronalaska efikasnog sustava za uvođenje dvolančanog loma u ciljanoj regiji gena *sprtn*, potrebno je dizajnirati i izraditi kalup za popravak (RT). Glavni cilj korištenja sustava CRISPR/Cas9 i CRISPR/Cas12a za mutagenizu gena *sprtn* bio je uvesti mutaciju na poziciji 147 (leucin u alanin), aminokiseline bitne za njegovu katalitičku aktivnost. Cas9 i Cas12a uvode dvolančani lom pokraj pozicije PAM koja je karakteristična za korišteni enzim i gRNA, a nakon toga dolazi do unutarstaničnih procesa za popravak lomova. Kako bi se

osiguralo uvođenje željenih mutacija, potrebno je u stanicu mikroinjektirati i kalup za popravak koji stanica može koristiti za homolognu rekombinaciju. Zbog toga se RT dizajnira kao veliki fragment DNA koji u sredini nosi promjene u slijedu nukleotida, odnosno ciljane mutacije, a oko njih nalaze se dugački segmenti homologni genomu organizma u kojem se mutageneza izvodi.

Za izradu RT-a koristila sam plazmid koji već sadrži veliki segment (2 kb, 3453 – 5452) gena *sprtn* ribe zebrice divljeg tipa. Ovaj je fragment ubačen u plazmid pKHR5 (kompleks je nazvan plazmid-wt-RT, u Tablici 2) na restrikcijskim mjestima *NotI* i *BamHI*. To je plazmid koji sadrži kompleks α -kristalin::*mVenus* (engl. *alpha-crystallin::Venus*), a on daje zeleni fluorescentni signal i u kasnijim se koracima koristi za odabir jedinki s ugrađenim kalupom nakon mikroinjektiranja (Hoshijima i sur., 2016).

Za ugradnju željenih mutacija (C4541G i T4542C) u plazmid s RT-om koristila sam komercijalni komplet za ciljanu mutagenezu *QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) i pripadajući protokol. Osim uvođenja mutacija u katalitičku regiju *sprtn*, također je bilo potrebno uvesti mutacije u regiju PAM (A4118G i A4119G) za odabranu gRNA. U protivnom bi enzim sustava CRISPR uveo dvolančani lom i na kalupu za popravak, a uvođenjem ovih mutacija on više ne može prepoznati promijenjeni PAM. Ovim je kompletom moguće uvođenje mutacija na ukupno pet različitih mjesta, no za potrebe eksperimenta korištene su samo dvije mutagene početnice (početnica-M-K-F i početnica-M-P-F, u Tablici 3). Za ovu se metodu koriste početnice koje se vežu na isti lanac plazmida te polimeraza umnaža kalup uvodeći mutacije koje se nalaze u sredini početnica. Nakon PCR-a, originalni se kalup degradira pomoću enzima DpnI koji cijepa samo metiliranu DNA. Na taj način nastaje plazmid s ugrađenim RT-om koji sadrži željene mutacije.

Smjesu za ciljanu mutagenezu ukupnog volumena 25 μ l napravila sam prema Tablici 13, a uređaj za PCR namjestila prema Tablici 14. Za izračun potrebnog volumena početnica koristila sam formulu:

$$X_{pM} \text{ početnice} = \frac{100 \text{ ng početnice}}{330 * \text{ broj baza početnice}} * 1000$$

Prema preporukama proizvođača, u smjesu je bilo potrebno staviti 100 ng svake početnice. Obje korištene početnice imale su 42 nukleotida te sam zbog toga svake dodala 0.7 μ l (10 μ M). Nakon provedenog PCR-a, uzorak sam ohladila na 37 °C te u epruvetu dodala 1 μ l restrikcijskog enzima DpnI. Nakon inkubacije od pet minuta na 37 °C, u epruveti je

nepocijepan ostao samo novosintetizirani plazmid koji sadrži mutacije. Ovaj sam uzorak zatim koristila za transformaciju bakterija, što je opisano u poglavlju 3.2.15.

Tablica 13. Popis sastojaka smjese za PCR za ciljanu mutagenezu na plazmidu koji sadrži kalup za popravak.

Sastojci smjese	Volumen (μ l)
Plazmid-wt-RT	0.18
Pufer (10x <i>QuikChange Lightning</i>)	2.5
<i>QuikSolution</i>	0.4
Početnica-M-K-F (10 μ M)	0.7
Početnica-M-P-F (10 μ M)	0.7
Smjesa enzima (<i>QuikChange Lightning Multi</i>)	1
Smjesa dNTP-ova (10 mM)	1
H ₂ O	18.52
Ukupan volumen	25

Tablica 14. Postavke uređaja za PCR za ciljanu mutagenezu na plazmidu koji sadrži kalup za popravak.

Broj ciklusa	Denaturacija	Vežanje početnica	Ekstenzija
1	95 °C, 2 min		
2-31	95 °C, 20 s	55 °C, 30 s	65 °C, 3.5 min
32			65 °C, 5 min

3.2.4. Agarozna gel elektroforeza nukleinskih kiselina

Agarozna gel elektroforeza predstavlja jednostavnu i efikasnu metodu za razdvajanje, identifikaciju i pročišćavanje nukleinskih kiselina (DNA i RNA). Korištenjem električnog polja, negativno nabijene nukleinske kiseline putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi kroz agarozni matriks. Manje molekule brže prolaze kroz gel koji djeluje kao porozno sito, što omogućava razdvajanje DNA ili RNA s obzirom na njihovu veličinu. Ovisno o tome kakvi se fragmenti žele analizirati, mogu se koristiti gelovi s različitim udjelom agaroze. Manji udjeli agaroze (0.8 – 1 %) služe za razdvajanje većih molekula (0.5 – 7 kb), a gušći gelovi (2 %) bolji su za razlučivanje molekula manjih od 1.5 kb (Mesapogu i sur., 2013). Kako bi se vizualizirali fragmenti razdvojeni gel elektroforezom, koriste se različite interkalirajuće boje poput etidij

bromida ili novijih alternativa *GelRed* i *SYBR Green*. Vežanje boja na nukleinske kiseline dovodi do vidljivih vrpca na gelu prilikom gledanja pod ultraljubičastim svjetlom.

Za provedbu reakcije agarozne gel elektroforeze, pripremila sam agarozne gelove otapajući određene količinu agaroze u volumenu pufera TAE za elektroforezu (c (Tris) = 40 mM, c (EDTA) = 1 mM, pH = 8.0). Za različite pokuse koristila sam gelove različite gustoće. 1 – 2 g agaroze otopila sam u 100 ml pufera TAE za elektroforezu koristeći mikrovalnu pećnicu, uz povremeno zaustavljanje i lagano miješanje otopine, dok se agarozna nije potpuno otopila i otopina postala bistra. Nakon otapanja agaroze, tikvicu sa smjesom pažljivo sam ohladila u posudi s hladnom vodom, ali nedovoljno da dođe do polimerizacije. U takvu sam smjesu dodala 0.5 μ l boje *Gel-Star Nucleic Acid Gel Stain (Lonza)* za vizualizaciju nukleinskih kiselina. Nakon izlivanja u aparaturu za elektroforezu koju sam prethodno očistila 70 %-tnim etanolom i destiliranom vodom, mjehuriće zraka uklonila sam pomoću plastičnog nastavka za mikropipete i stavila odgovarajući češljic s jažicama.

Nakon polimerizacije od 30 minuta, izvadila sam češljic i aparaturu napunila s 400 ml pufera TAE. U uzorke sam dodala boju za nanošenje (engl. *loading dye*) *DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Fisher Scientific)* kako bih ju razrijedila šest puta, a po potrebi sam uzorke razrijedila i vodom kako bih što manji volumen uzorka koristila za gel elektroforezu. U jažice sam nanijela 1 μ l DNA markera veličina *GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific)* te 10 – 50 μ l uzorka, ovisno o eksperimentu. Nakon 30 – 60 minuta reakcije elektroforeze na 100 V, spremila sam fotografiju vizualiziranog rezultata na gelu pomoću uređaja za snimanje gelova *ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad)* i računala.

3.2.5. Pročišćavanje nukleinskih kiselina

3.2.5.1. Pročišćavanje DNA

Nakon PCR-a, potrebno je napraviti postupak pročišćavanja DNA kako bi se u daljnjim koracima eksperimenata radilo samo sa željenim fragmentima, bez ostalih komponenata smjese PCR-a poput proteina i korištenih pufera. Zbog toga sam nakon svakog provedenog PCR-a napravila pročišćavanje DNA i određivanje koncentracije uzorka. Za postupak purifikacije DNA koristila sam komercijalni komplet *Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (NEB)* i tijekom cijelog postupka centrifugu namještenu na 13000 RPM.

Uzorke sam razrijedila u omjeru 5:1 (za linearnu dvolančanu DNA) ili 7:1 (za plazmide) vezujućim puferom (engl. *binding buffer*). Kolonu za purifikaciju namjestila sam u odgovarajuću epruvetu za skupljanje uzorka (engl. *collection tube*), na nju nanijela promiješani uzorak i centrifugirala jednu minutu. Nakon što sam odbacila propuštenu otopinu (engl. *flow-through*), vratila sam kolonu u epruvetu, dodala 200 µl pufera za ispiranje (engl. *wash buffer*), centrifugirala jednu minutu i odbacila propuštenu otopinu. Zatim sam opet dodala 200 µl pufera za ispiranje i ponovila postupak iz prethodnog koraka. Nakon centrifugiranja, kolonu sam premjestila u novu epruvetu i mikropipetom na matriks kolone pažljivo dodala 10 µl vode zagrijane na 50 °C (prema uputama proizvođača za poboljšanje prinosa). Nakon inkubacije od jedne minute na sobnoj temperaturi, epruvete sam centrifugirala jednu minutu. Ukoliko uzorci nisu korišteni isti dan, pospremila sam ih na -20 °C.

3.2.5.2. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Nakon provedene agarozne gel elektroforeze, fragmenti željene veličine mogu se izrezati iz gela i pročistiti pomoću različitih komercijalnih kompleta poput *MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN)* i *Monarch® DNA Gel Extraction Kit (NEB)*. Za izolaciju RT-a, smjesu od 250 µl razdijelila sam na pet jednakih alikvota i njima napunila jažice agaroznog gela. Nakon što su se fragmenti dovoljno odvojili, pod UV-om sam skalpelom označila ureze oko željenih fragmenata. Fragmente sam prebacila u epruvete i izvagala ih koristeći praznu epruvetu kao taru. Na svaki sam uzorak dodala određeni volumen pufera *QG* (100 µl na svakih 100 mg gela), prema uputama proizvođača *QIAGEN*. Epruvete sam stavila na termoblok zagrijan na 50 °C na 15 minuta, uz povremeno miješanje, do potpunog otapanja gela u puferu.

Na svaki uzorak dodala sam 100 µl 100 %-tnog izopropanola na svakih 100 mg te sam sadržaj promiješala okrećući epruvetu nekoliko puta. Kolonu za eluciju (*MinElute*) namjestila sam u epruvetu za skupljanje uzoraka te na kolonu nanijela jedan uzorak. Nakon centrifugiranja od jedne minute na 11000 RPM, odbacila sam propuštenu otopinu i na istu kolonu nanijela sljedeći uzorak. Ovaj sam postupak ponovila sa svim uzorcima kako bih na kraju svu količinu RT-a odjednom eluirala u jednu epruvetu. Zatim sam na kolonu dodala 200 µl pufera za ispiranje (engl. *wash buffer*) koristeći drugi kit (*NEB*). Nakon centrifugiranja na 13000 RPM, ponovno sam dodala 200 µl pufera za ispiranje i centrifugirala uzorak. Zatim sam kolonu premjestila u novu epruvetu i na matriks kolone dodala 10 µl vode zagrijane na 50 °C. Nakon izmjerene koncentracije, uzorak RT-a pohranila sam na -20 °C.

3.2.5.3. Pročišćavanje RNA

Potrebno je napraviti postupak pročišćavanja RNA kako bi se u daljnjim koracima eksperimenata koristili samo željeni fragmenti, bez ostalih komponenata smjese poput proteina koji zaostaju od prijašnjih postupaka. Za postupak purifikacije RNA koristila sam komercijalni komplet *Monarch® RNA Cleanup Kit (NEB)* i centrifugu namještenu na 13000 RPM. Prema preporuci proizvođača, uzorke dobivene transkripcijom *in vitro* razrijedila sam vodom kako bih povećala početni volumen otopine. U uzorke s 500 ng kalupa (gRNA-A, -B i -C) dodala sam 35 µl (do ukupnog volumena od 50 µl), a one s 300 ng kalupa (gRNA-D i -E) 15 µl vode (do volumena od 30 µl).

Na razrijeđene uzorke dodala sam 100 µl (za 500 ng kalupa) ili 60 µl (za 300 ng kalupa) vezujućeg pufera, a zatim 150 µl 95 %-tnog etanola. Uzorke sam promiješala resuspendirajući ih mikropipetom. Kolonu za purifikaciju namjestila sam u odgovarajuću epruvetu za skupljanje uzoraka, na nju nanijela cijeli uzorak i centrifugirala jednu minutu. Nakon što sam odbacila propuštenu otopinu, vratila sam kolonu u epruvetu, dodala 500 µl pufera za ispiranje, centrifugirala jednu minutu i odbacila propuštenu otopinu. Zatim sam opet dodala 200 µl pufera za ispiranje i ponovila postupak iz prethodnog koraka. Nakon centrifugiranja, kolonu sam premjestila u novu epruvetu i mikropipetom na sredinu matriksa kolone pažljivo dodala 30 µl vode, a zatim sam epruvete centrifugirala jednu minutu. Uzorke sam do korištenja pohranila na -80 °C.

3.2.6. Određivanje masene koncentracije nukleinskih kiselina

Nakon provedene purifikacije nukleinskih kiselina, bilo je potrebno odrediti koncentracije i čistoću dobivenih produkata. U ovu sam svrhu koristila uređaj *BioSpec-nano (Shimadzu)* koji spektrofotometrijski mjeri apsorbanciju malog volumena otopina (1 µl) nukleinskih kiselina ili proteina. Za određivanje koncentracija DNA i RNA, apsorbanciju sam mjerila na 260 nm, a uređaj spojen na računalo određuje i omjere $A_{260/280}$ i $A_{260/230}$ koji daju informaciju o mogućim onečišćenjima uzorka proteinima, odnosno organskim spojevima i solima. Prije početka mjerenja koncentracije uzoraka, izmjerila sam apsorbanciju vode u kojoj su uzorci bili eluirani za nuliranje uređaja. Zatim sam pojedinačno izmjerila masene koncentracije i provjerila čistoću uzorka.

3.2.7. Transkripcija *in vitro*

Transkripcija *in vitro* jednostavan je postupak za sintezu RNA koristeći kalup koji sadrži promotorsku sekvencu bakteriofaga (poput T7) uzvodno od željene sekvence. Za reakciju je potrebno koristiti smjesu nukleotida i polimerazu koja prepoznaje odgovarajuću promotorsku sekvencu, kao što je RNA polimeraza T7 (Beckert i Masquida, 2011). Promotor T7 u kalup gDNA ugrađen je prilikom PCR-a korištenjem odgovarajućih početnica. Umnožene sekvence gDNA dobivene PCR-om potrebno je prevesti u RNA oblik kako bi gRNA i sustav CRISPR bili funkcionalni.

Smjesu ukupnog volumena 15 μ l za transkripciju *in vitro* napravila sam prema Tablici 15, koristeći pojedine gDNA dobivene PCR-om kao kalup. Pritom sam koristila komercijalni komplet *Standard RNA Synthesis (NEB)*. Reakcijske smjese inkubirala sam četiri sata (za 500 ng kalupa, gRNA-A, -B i -C) ili šest sati (za 300 ng kalupa, gRNA-D i -E) na 37 °C. Nakon toga u svaku sam reakcijsku smjesu dodala 1 μ l enzima DNaze kako bih uklonila DNA kalup i provela sam inkubaciju od 30 (500 ng kalupa) ili 60 minuta (300 ng kalupa) na 37 °C. Inkubacije sam provela pomoću PCR uređaja, a cijeli je proces rađen u sterilnim uvjetima uz korištenje otopine koja uništava RNaze.

Tablica 15. Popis sastojaka smjese za transkripciju *in vitro* i sintezu gRNA.

Sastojci smjese	Volumen (μ l)
H ₂ O	Do 15 μ l
Smjesa dNTP-ova (10 mM)	5
300 ili 500 ng kalupa	*
Polimeraza T7	1
Ukupan volumen	15

*Volumen dodanog kalupa ovisio je o koncentraciji pročišćene gDNA.

3.2.8. Reakcija enzimatske restrikcije

Nakon provedenog PCR-a mutagenim početnicama za uvođenje željenih mutacija u plazmid-RT, bilo je potrebno izrezati i izolirati RT od ostatka plazmida. U tu sam svrhu koristila restrikcijsku endonukleazu I-SceI, enzim koji prepoznaje i cijepa specifičnu sekvencu 5' TAGGGATAACAGGGTAAT 3'. Korišteni plazmid sadrži dva restrikcijska mjesta za I-

SceI, a cijepanjem će nastati dva fragmenta veličine 3941 bp (RT) i 3042 bp (ostatak plazmida). Plazmid za restriksijsku reakciju dobila sam postupkom izolacije plazmida iz transformiranih bakterija, što je opisano u poglavlju 3.2.15. Smjesu ukupnog volumena 250 μ l pripremila sam prema Tablici 16, koristeći pufer *CutSmart* (NEB) i enzim SceI (NEB). Uzorak sam inkubirala tri sata na 37 °C te preko noći na 14 °C, koristeći uređaj za PCR.

Tablica 16. Popis sastojaka smjese za enzimatsku restrikciju i izrezivanje kalupa za popravak iz plazmida.

Sastojci smjese	Volumen (μ l)
Pufer <i>CutSmart</i> (NEB)	25
Enzim SceI	5
Plazmid-RT	18.46
H ₂ O	201.54
Ukupan volumen	250

3.2.9. Mikroinjektiranje

Mikroinjektiranje je proces unošenja egzogenih tvari (poput DNA, RNA i proteina) u stanicu pomoću posebne igle s tankim vrškom. Koristi se za proučavanje različitih procesa u živim stanicama poput prijenosa signala, ali također predstavlja jednu od jednostavnijih metoda za stvaranje genetski modificiranih organizama u kombinaciji sa sustavom CRISPR/Cas9 ili CRISPR/Cas12a (Zhao i sur., 2019). Alternativne metode poput korištenja kalcijeva fosfata ili virusnih vektora za unos molekula u stanicu dovode do citotoksičnosti, a elektroporacija ima manju efikasnost i zahtjeva velike količine pripremljenog proteina za svaku transdukciju (Teruel i sur., 1999; Colosimo i sur., 2000; Tompers i Labosky, 2004). Nedostatci mikroinjektiranja uključuju dugotrajnost postupka jer je u svaku odabranu stanicu potrebno zasebno injektirati željenu smjesu molekula te je za ovu metodu potrebno koristiti posebnu opremu poput mikroinjektora (Modzelewski i sur., 2018).

Dan prije planiranog mikroinjektiranja, potrebno je odvojiti željeni broj odraslih riba zebrica u posebne akvarije za mrijest koji imaju poroznu plastičnu pregradu u obliku slova S. Zebrice se mrijeste u gornjem dijelu akvarija s nižom razinom vode, a njihovi embriji prolaze kroz pore pregrade i skupljaju se na dnu posude. Do sljedećeg dana u akvarij se stavlja i prozirna pregrada između ženki i mužjaka kako bi se kontroliralo vrijeme početka mrijesta. Za

mrijest su korištene zebrice divljeg tipa, po dvije ženke i tri mužjaka za svaki proces mikroinjektiranja. Na dan provedbe mikroinjektiranja, uklonjena je pregrada između mužjaka i ženki. Nakon mrijesta, pomoću sita su skupljeni oplodeni embriji zebrica i izvršeno je mikroinjektiranje pomoću mikroskopske lupe *SMZ-171-TLED (Motic)* i mikroinjektora *FemtoJet® 4x series (Eppendorf)*. Sve korištene zebrice pripadaju certificiranom soju AB prema Europskom referentnom centru za zebrice (Karlsruhe, Njemačka) i uzgajane su prema svim pravilima Priručnika za uzgoj i brigu o laboratorijskim životinjama Europske Unije (86/609/EEC) i Zakona o zaštiti životinja Republike Hrvatske (NN 135/2006).

3.2.10. Testiranje efikasnosti sustava CRISPR/Cas9 i CRISPR/Cas12a

Prilikom skupljanja embrija i postavljanja uređaja za mikroinjektiranje, pripremila sam smjesu proteina CRISPR (Cas9 ili Cas12a) i odgovarajuće gRNA. Smjesu za injektiranje sustava s proteinom Cas9 napravila sam prema Tablici 17. U epruvetu sam dodala Cas9, gRNA (konačne koncentracije 215 ng/μl) i KCl, smjesu inkubirala pet minuta na 37 °C pomoću uređaja za PCR, a zatim sam dodala vodu i *Phenol Red* koji služi lakšoj vizualizaciji otopine prilikom mikroinjektiranja. Smjesu za injektiranje sustava s proteinom Cas12a napravila sam prema Tablici 18. U epruvetu sam dodala Cas12a, gRNA (konačne koncentracije 182 ng/μl) i KCl, smjesu inkubirala deset minuta na 37 °C pomoću uređaja za PCR, a zatim sam dodala vodu i *Phenol Red*. Sve otopine za injektiranje čuvane su na ledu do korištenja. Ovaj je postupak ponovljen za svaku od dizajniranih molekula gRNA.

Prilikom mikroinjektiranja, u svaki je embrij ubačen oko 1 nl smjese, a igla je bila usmjerena u žumanjčanu vrećicu. Kako bi što više stanica primilo protein i gRNA, smjesa je injektirana u embrije koji su bili u jednostaničnom stadiju, a kasnijim će diobama nove stanice također sadržavati injektirane molekule. Nakon toga su embriji stavljeni u petrijeve zdjelice s medijem E3 1x (oko 50 embrija po posudi) i čuvani u inkubatoru na 37 °C. Nakon 24 sata, uklonjeni su nevijabilni embriji i izračunat je postotak preživjelih embrija prema formuli:

$$\text{Vijabilnost embrija} = \frac{\text{broj vijabilnih embrija nakon 24 h}}{\text{ukupan broj embrija}}$$

Tablica 17. Popis sastojaka smjese sustava CRISPR/Cas9 za mikroinjektiranje u jednostanične embrije ribe zebrice (*Danio rerio*).

Sastojci smjese	Volumen (μ l)
Cas9 gRNA (A, B ili C)	*
Cas9 (20 μ M)	0.37
KCl (2 M)	0.3
H ₂ O	Do 2 μ l
<i>Phenol Red</i> (0.2 g/l)	0.4
Ukupan volumen	2

*Volumen dodane gRNA ovisio je o koncentraciji pročišćene gRNA.

Tablica 18. Popis sastojaka smjese sustava CRISPR/Cas12a za mikroinjektiranje u jednostanične embrije ribe zebrice (*Danio rerio*).

Sastojci smjese	Volumen (μ l)
Cas12a gRNA (D ili E)	*
Cas12a (100 μ M)	0.79
KCl (2 M)	0.3
H ₂ O	Do 2 μ l
<i>Phenol Red</i> (0.2 g/l)	0.4
Ukupan volumen	2

*Volumen dodane gRNA ovisio je o koncentraciji pročišćene gRNA.

3.2.11. Ciljana mutageneza u genu *sprtn*

Za uvođenje željenih mutacija (C4541G i T4542C) u gen *sprtn* ribe zebrice, bilo je potrebno u njihove embrije mikroinjektirati smjesu odabranog proteina i gRNA (Cas12a i gRNA-E) te izrađeni kalup za popravak (RT). Postupak stavljanja riba na mrijest i skupljanja embrija isti je kao u poglavlju 3.2.9. Prilikom skupljanja oplodjenih embrija i postavljanja uređaja za mikroinjektiranje, pripremila sam smjese prema Tablicama 19 i 20. Napravila sam dvije smjese za injektiranje kako bih odredila koji omjeri gRNA i Cas12a naspram RT-a daju najbolje rezultate. Smjesa B sadržavala je dva puta više RT-a na istu količinu proteina i gRNA kao u smjesi A. U epruvete sam dodala Cas12a, gRNA (početne koncentracije 1442.30 ng/ μ l) i KCl, smjese inkubirala deset minuta na 37 °C pomoću uređaja za PCR, a zatim dodala RT (početne koncentracije 143.07 ng/ μ l), vodu i *Phenol Red*. Sve otopine za injektiranje čuvane

su na ledu do korištenja. Postupak mikroinjektiranja i uzgoja embrija isti je kao u poglavlju 3.2.10.

Mikroinjektirani embriji stari četiri dana pregledani su pod mikroskopskom lupom. Ukoliko je došlo do integracije RT-a u genom zebrice, doći će do ekspresije zeleno-fluorescirajućeg markera *mVenus* koji se nalazio u RT-u. Ova se fluorescentna oznaka može uočiti u leći embrija ako se oni osvijetle plavim svjetlom (ekscitacija na valnim duljinama 440 – 460 nm) za što je korišten nastavak za mikroskop *Model SFA Stereo Microscope Fluorescence Adapter Royal Blue (NIGHTSEA)*. Pomoću ovog sustava određen je broj embrija s integriranim RT-om te su oni izdvojeni od *mVenus* negativnih embrija i uzgajani do odraslog stadija.

Tablica 19. Popis sastojaka smjese A za mikroinjektiranje sustava CRISPR/Cas12a i kalupa za popravak (RT) u jednostanične embrije ribe zebrice (*Danio rerio*) za ciljanu mutagenezu u genu *sprtn*.

Sastojci smjese	Volumen (μl)
gRNA-E	0.19
Cas12a (100 μM)	0.6
KCl (2 M)	0.23
<i>Phenol Red</i> (0.2 g/l)	0.4
RT	0.53
Ukupan volumen	1.95

Tablica 20. Popis sastojaka smjese B za mikroinjektiranje sustava CRISPR/Cas12a i veće količine kalupa za popravak (RT) u jednostanične embrije ribe zebrice (*Danio rerio*) za ciljanu mutagenezu u genu *sprtn*.

Sastojci smjese	Volumen (μl)
gRNA-E	0.19
Cas12a (100 μM)	0.6
KCl (2 M)	0.45
H ₂ O	0.31
<i>Phenol Red</i> (0.2 g/l)	0.4
RT	1.05
Ukupan volumen	3

3.2.12. Digestija embrija zebrice

Ispitivanje efikasnosti sustava CRISPR/Cas9 ili CRISPR/Cas12a te metoda HRM za pronalazak potencijalnih riba utemeljitelja zahtijeva rad s genomskim materijalom embrija zebrice. Zbog toga je embrije potrebno lizirati kako bi se genomski DNA oslobodila iz stanica i bila dostupna za daljnje analize. Postupak odabira riba za mrijest i skupljanja embrija za injektiranje sustava za ciljanu mutagenezu gena *sprtn* opisan je u poglavlju 3.2.9.

Za pronalazak riba utemeljitelja za animalni model s mutacijom u *tdp2a* (tirozil-DNA fosfodiesteraza 2a), korištene su ribe zebrice koje su injektirane sustavom CRISPR/Cas9 i gRNA bez dodanog kalupa za popravak. Na taj je način u zebrici došlo do cijepanja genome DNA u ciljanoj regiji *tdp2a* i popravka pomoću kojeg može doći do uvođenja mutacija. Kako su zebrice višestanični organizmi, moguće je da različite stanice sadrže različite tipove mutacija u ciljanoj regiji te je potrebno odrediti postoje li mutacije u stanicama germinativne linije od kojih nastaje novo potomstvo i odgovaraju li takve mutacije za uzgoj linije s nefunkcionalnim proteinom (prerani STOP kodon ili pomak u okviru čitanja). Kako bi se odredile jedinke koje mutacije prenose na potomstvo, pojedinačne ženke i mužjaci križani su sa zebricama divljeg tipa. Zatim su njihovi embriji skupljeni za digestiju i kasniju analizu metodom HRM.

Embriji zebrice lizirani su 48 h nakon fertilizacije te je za svaki ciklus eksperimenata lizirano po deset injektiranih embrija, odnosno embrija potencijalnih utemeljitelja, te pet kontrolnih embrija divljeg tipa iste starosti. Pojedinačne sam embrije premjestila u zasebne epruvete i mikropipetom uklonila višak medija. Epruvete sam premjestila na ledeni stalak za provedbu smrzavanja suhih uzoraka (engl. *dry-freeze*) te u svaku dodala 50 µl pufera za digestiju embrija. Epruvete s embrijima inkubirala sam deset minuta na 98 °C pomoću uređaja za PCR, ohladila ih i svakoj smjesi dodala 5 µl proteinaze K (20 mg/ml). Nakon toga sam epruvete inkubirala tri sata na 55 °C, uz povremeno okretanje epruveta kako bi se smjesa promiješala. Kako bih inaktivirala proteinazu K, uzorke sam inkubirala deset minuta na 98 °C. Na ohlađene sam uzorke dodala 100 µl vode i centrifugirala ih na 11000 RPM u trajanju od 30 minuta na 4 °C, a zatim supernatante premjestila u nove epruvete i uzorke pohranila na -20 °C.

3.2.13. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM)

Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM) omogućuje izradu profila krivulje mekšanja DNA molekula kako bi se detektirale moguće varijacije u sekvencama analiziranih

uzoraka. Pri povišenim temperaturama dolazi do denaturacije (odvajanja) DNA lanaca, a temperatura taljenja (T_m) označava temperaturu pri kojoj se pola DNA nalazi u jednolančanom obliku. T_m ovisi o duljini i udjelu baza GC analizirane molekule jer su gvanin i citozin povezani s tri vodikove veze što ih čini stabilnijima te će se teže razdvojiti od adenina i timina s dvije vodikove veze. Za izradu profila krivulje taljenja DNA potrebno je umnažanje željenih fragmenata u prisutnosti interkalirajuće fluorescentne boje *SYBR Green*. Ona se veže za mali udio dvolančane DNA neovisno o sekvenci molekule te time emitira jak fluorescencijski signal koji se zabilježi pomoću uređaja za HRM analizu. Tijekom HRM-e temperatura se postepeno povisuje nakon zadnjeg ciklusa PCR-a, što dovodi do denaturacije lanaca umnoženih molekula, otpuštanja boje *SYBR Green* i smanjenja fluorescentnog signala. Analizom dobivenih podataka pomoću računalnih se programa mogu utvrditi potencijalne razlike u T_m pojedinih molekula (Druml i Cichna-Markl, 2014). HRM analiza može se koristiti za genotipizaciju i proučavanje varijacija u sljedovima nukleotida, poput mutacija ili poznatih alelnih varijacija (Słomka i sur., 2017).

Uzorke za HRM analizu pripremila sam u laminaru s kontroliranim protokom zraka i sterilnim uvjetima. Smjesu za HRM-u pipetirala sam u optičke stripove (engl. *strips*) *MicroAmp Optical 8-Cap Strips (Applied Biosystems)* u mraku zbog osjetljivosti fluorescentnih molekula boje *SYBR Green* na svjetlost. Kao izvor genomske DNA koristila sam otopine digestiranih embrija starosti 48 h, a komercijalni komplet *MeltDoctor™ HRM Master Mix (Applied Biosystems)* sadržavao je smjesu potrebnog enzima, pufera i nukleotida. Smjese pojedinih reakcija ukupnih volumena 10 μ l napravila sam prema Tablici 21. Nakon pripreme uzoraka, stripove sam centrifugirala na podlozi za mikrotitarske pločice, pet minuta na 500 g. Protokol na uređaju *StepOnePlus (ThermoFischer Scientific)* namješten je prema uputama proizvođača, a rezultate sam obradila pomoću računalnog programskog paketa *High Resolution Melt Software* verzije 3.2. Ovu sam metodu koristila za pronalazak riba utemeljitelja za animalni model s mutacijom u *tdp2a* i za testiranje efikasnosti sustava CRISPR/Cas12a s gRNA-D.

Tablica 21. Popis sastojaka smjese za metodu mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM).

Sastojci smjese	Volumen (μ l)
Genomska DNA (lizat)	0.5
<i>MeltDoctor</i> TM <i>HRM Master Mix</i>	5
Uzvodna početnica (5 μ M)	0.6
Nizvodna početnica (5 μ M)	0.6
H ₂ O	3.3
Ukupan volumen	10

Uzvodne i nizvodne početnice za pripadajuću gRNA odabrane su prema Tablicama 3 i 4.

3.2.14. T7 endonukleazni test

T7 endonukleazni test vrsta je metode enzimatskog rezanja krivo sparenih baza koja koristi bakteriofagne enzime rezolvaze poput endonukleaza T4, T4 VII i T7 I (Babon i sur., 2003). Ovi enzimi prepoznaju i režu heteroduplekse koji nastaju zbog krivo sparenih baza u molekulama DNA, a primarna im je uloga razrješavanje Holidayevih struktura koje nastaju prilikom replikacije bakteriofaga (Dickie i sur., 1987). Nakon korištenja sustava za uvođenje mutacija poput CRISPR/Cas9, uzorci DNA zagrijavaju se kako bi došlo do razdvajanja lanaca, a zatim postupno ohlađuju dok ne dođe do ponovnog komplementarnog spajanja. Ukoliko je mutageneza bila uspješna, postojat će određeni udio molekula DNA s mutacijama te će se ovim postupkom dio mutiranih lanaca spojiti s DNA divljeg tipa (Babon i sur., 2003). Enzim endonukleaza T7 I prepoznaje sve vrste krivo sparenih baza heterodupleksa i male petlje koje nastaju zbog insercijskih ili delecijских mutacija (Kleff i Kemper, 1988; Solaro i sur., 1993).

Kako bi se odredila efikasnost sustava enzima Cas9 ili Cas12a i pripadajuće gRNA, potrebno ih je mikroinjektirati u željene stanice te provjeriti je li došlo do uvođenja mutacija u regiji od interesa. U svrhu detekcije mutacija u genu *sprtn*, provela sam T7 endonukleazni test na mikroinjektiranim embrijima nakon digestije. Ukoliko je došlo do rezanja heterodupleksa, nakon agarozne gel elektroforeze vidjet će se fragmenti različitih veličina (zbog asimetričnog dizajna početnica oko gRNA), a njihov će zbroj odgovarati ukupnoj veličini umnoženih fragmenata nakon PCR-a. U uzorcima gdje sustav za mutagenezu nije efikasan, bit će prisutni samo nepocijepani fragmenti veličine 400 – 600 pb.

Za T7 endonukleazni test dodala sam 200 ng umnoženih fragmenata genomske DNA liziranih embrija nakon PCR-a, 2 μ l pufera 2 10x (*NEB*) i vode do 19 μ l. Po dvije takve smjese

napravila sam za svaki analizirani uzorak kako bih nakon provedene metode vidjela razliku između kontrolnih uzoraka i onih na koje je djelovala endonukleaza T7. Nakon pripreme uzoraka, inkubirala sam ih pet minuta na 95 °C pomoću uređaja za PCR kako bi došlo do razdvajanja lanaca. Zatim sam uređaj namjestila da smanjuje temperaturu uzoraka za 2 °C svake sekunde do postizanja temperature od 85 °C, a nakon toga za 0.1 °C svake sekunde do temperature od 25 °C, kako bi došlo do ponovnog spajanja lanaca. Nakon provedenog programa u kontrolne sam uzorke dodala 1 µl vode, a u drugu skupinu 1 µl endonukleaze T7 (*NEB*), te provela inkubaciju od 30 minuta na 37 °C. Kako bih detektirala veličinu dobivenih fragmenata i rezultate T7 endonukleaznog testa, provela sam agaroznu gel elektroforezu i cijeli volumen uzorka nanijela u jažice gela.

3.2.15. Analiza nukleotidnih sekvenci

3.2.15.1. Kloniranje

Kako bih analizirala sekvence od interesa, provela sam postupak kloniranja fragmenata DNA u vektor *pJET1.2/blunt*. *pJET1.2/blunt* linearizirani je vektor za kloniranje u koji se mogu ubaciti inserti od šest do deset kb, a sadrži letalni gen koji je inaktiviran nakon uspješne integracije DNA u mjesto za kloniranje. Na taj se način omogućava preživljavanje samo onim stanicama koje su primile rekombinantni plazmid. Korištenjem polimeraze Phusion umnoženi fragmenti imaju tupe krajeve (engl. *blunt-ends*) koji se mogu izravno ligirati u plazmid, a prije ligacije fragmenata nastalih polimerazom Taq potrebno je ukloniti 3'-dA ljepljive krajeve (engl. *sticky-ends*). Za kloniranje sam koristila komercijalni komplet *CloneJET™ PCR Cloning Kit* (*Thermo Fisher Scientific*) i odgovarajući priručnik.

Kloniranje sam provodila u više dijelova eksperimenata. U prvom sam dijelu klonirala fragmente liziranih embrija zebrice koji su nakon T7 endonukleaznog testa upućivali na nastanak mutacija i efikasan sustav CRISPR/Cas9 ili CRISPR/Cas12a. U tom je slučaju bilo potrebno potvrditi prisutnost mutacija i analizirati sekvence ciljane regije kloniranjem fragmenata u plazmid. Jedina iznimka ovog procesa odnosi se na potvrdu mutacija nakon T7 endonukleaznog testa za gRNA-E gdje je sekvencirana smjesa provedenog PCR-a. Nakon pronalaska efikasnog sustava za mutagenezu u genu *sprtn* i izrade kalupa za popravak (RT), provela sam kloniranje i analizu sekvenci za potvrdu pravilno ugrađenih mutacija u RT kako bih napravila ciljanu mutagenezu pomoću sustava CRISPR. Kloniranje sam također koristila prilikom pronalaska riba utemeljitelja za animalni model s mutacijom u genu za *Tdp2a*. Nakon

pronalaska muške i ženske jedinke koje na potomstvo prenose promjene u sekvenci *tdp2a*, kloniranjem i analizom sekvenci utvrdila sam točne mutacije.

Smjesu za ligaciju nakon Phusion PCR-a (*blunt-ends*) ukupnog volumena 10 μ l pripremila sam prema Tablici 22. Količina korištenog purificiranog produkta iz PCR-a ovisila je o duljini fragmenata. Za fragmente od oko 100 bp koristila sam 5 ng produkta, a za fragmente 400 – 600 bp 13 ng produkta. Ligacijsku sam smjesu postavila na 22 °C preko noći. Smjesu za ligaciju nakon Taq PCR-a (*sticky-ends*) ukupnog volumena 9 μ l pripremila sam prema Tablici 23 kako bih uklonila 3'-dA ljepljive krajeve. Uzorke sam inkubirala pet minuta na 70 °C, a zatim dodala 0.5 μ l vektora za kloniranje *pJET1.2/blunt* (50 ng/ μ l) i 0.5 μ l DNA ligaze T4.

Tablica 22. Popis sastojaka smjese za ligacijsku reakciju fragmenata s tupim krajevima u vektor za kloniranje.

Sastojci smjese	Volumen (μ l)
Purificirani produkt PCR-a	*
Reakcijski pufer 2x	5
Vektor za kloniranje <i>pJET1.2/blunt</i> (50 ng/ μ l)	0.5
DNA ligaza T4	0.5
H ₂ O	Do 10
Ukupan volumen	10

*Volumen purificiranog uzorka ovisio je o koncentraciji DNA (5 ng za fragmente do 100 bp, 13 ng za fragmente 400 – 600 bp).

Tablica 23. Popis sastojaka smjese za uklanjanje stršćih krajeva DNA prije kloniranja.

Sastojci smjese	Volumen (μ l)
Purificirani produkt PCR-a	*
Reakcijski pufer 2x	5
<i>DNA Blunting</i> enzim	0.5
H ₂ O	Do 9
Ukupan volumen	9

*Volumen purificiranog uzorka ovisio je o koncentraciji DNA (5 ng za fragmente do 100 bp, 13 ng za fragmente 400 – 600 bp).

3.2.15.2. Transformacija bakterija

Za transformaciju su korištene već pripravljene ultrakompetentne stanice *E. coli XL10-Gold*, a postupak je prilagođen prema protokolu za 5-alpha kompetentne stanice *E. coli (NEB)*. Bakterije su do korištenja bile pohranjene na -80 °C. Agarozne ploče pripremila sam pažljivim otapanjem 150 ml agara u mikrovalnoj pećnici. Otopljenu sam smjesu ostavila da se ohladi oko 30 minuta te u laminaru s kontroliranim protokom zraka i sterilnim uvjetima dodala 150 µl ampicilina (100 mg/ml u 70 %-tnom etanolu) u mraku zbog osjetljivosti antibiotika na svjetlost. Zatim sam napravljenu smjesu izlila u petrijeve zdjelice tako da agar pokrije cijelo dno. Ploče sam ostavila da se osuše u laminaru, a zatim ih do korištenja pospremila na 4 °C.

Bakterijske stanice otopila sam na ledu, po 25 µl alikvotirala u zasebne epruvete te u svaku dodala po 1 µl ligacijske smjese iz koraka 3.2.15.1. Uzorke sam inkubirala 30 minuta na ledu, a zatim napravila postupak toplinskog šoka (engl. *heat-shock*) kako bi plazmid s ubačenim fragmentom ušao u stanice. Toplinski šok provela sam u trajanju od 40 sekundi na 42 °C koristeći termoblok, a zatim stanice premjestila na led. Nakon dvije minute, na svaku reakcijsku smjesu dodala sam 475 µl tekućeg medija LB zagrijanog na 37 °C u vodenoj kupelji. Epruvete sam pomoću samoljepljive trake pričvrstila za dno inkubator-tresilice za inkubaciju od 60 minuta na 37 °C i 220 RPM.

Nakon inkubacije, u laminaru sam 250 µl smjese izlila na agarozne ploče s ampicilinom za selekciju bakterija koje su primile rekombinantni plazmid. Ovakav je postupak proveden za većinu eksperimenata, osim prilikom postupka kloniranja nakon ciljane mutageneze na plazmidu koji je sadržavao RT. U tom sam slučaju nakon inkubacije na tresilici provela postupak centrifugiranja od pet minuta na 500 g na 37 °C, uklonila supernatant i dodala 200 µl medija LB zagrijanog na 37 °C u vodenoj kupelji. Svih 200 µl izlila sam na ploče s ampicilinom. Kako bih smjesu rasporedila po cijeloj ploči, koristila sam sterilne staklene kuglice. Ploče sam ostavila bez poklopca na nekoliko minuta kako bi se osušile, a zatim ih spremila u inkubator na 37 °C na otprilike 12 sati.

3.2.15.3. Izrada tekućih prekonocnih bakterijskih kultura

Nakon što su transformirane bakterije rasle na 37 °C oko 12 sati, ploče sam izvadila iz inkubatora kako ne došlo do spajanja zasebnih kolonija. Pomoću vodene kupelji zagrijala sam tekući medij LB do 37 °C i dodala antibiotik ampicilin (100 mg/ml u 70 %-tnom etanolu), razrijeđen 1000x, kako bi se osigurao rast samo bakterijama koje imaju rekombinantni plazmid.

U sterilne epruvete ulila sam po pet ml LB-a s antibiotikom. Sterilnim plastičnim nastavkom za mikropipete dotaknula sam pojedinačnu koloniju te nastavak ubacila u epruvetu s medijem. Nakon što sam ovaj postupak ponovila za svaku koloniju, začepljene sam epruvete stavila u inkubator-tresilicu preko noći na 37 °C i 220 RPM kako bi narasle tekuće prekonodne bakterijske kulture.

3.2.15.4. Izolacija plazmida iz bakterija

Nakon što su tekuće bakterijske kulture narasle, bilo je potrebno napraviti izolaciju plazmida iz bakterija (tzv. *miniprep*). U tu sam svrhu koristila komercijalni komplet *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit* i pripadajući protokol. Po 600 µl bakterijskih suspenzija premjestila sam u epruvete od 1.5 ml i dodala 100 µl pufera za lizu 7x (engl. *7X lysis buffer*). Sadržaj epruveta promiješala sam okrećući zatvorenu epruvetu 4 – 6 puta. Na svaki sam uzorak dodala 350 µl hladnog (4 °C) pufera za neutralizaciju (engl. *neutralization buffer*) i epruvete okrenula 2 – 3 puta. Kada su uzorci u potpunosti poprimili žutu boju, što označava završetak neutralizacijske reakcije, centrifugirala sam ih četiri minute na 11000 RPM (kao i u daljnjim koracima). Kolone (*Zymo-Spin™ IIN*) sam namjestila u epruvete za sakupljanje uzorka (engl. *collection tube*) i u njih pipetirala po 700 µl supernatanta. Uzorke sam centrifugirala 15 sekundi, odbacila sam propuštene otopine (engl. *flow-through*) i dodala 200 µl pufera za ispiranje (engl. *endo-wash buffer*). Nakon centrifugiranja 30 sekundi, na kolone sam dodala po 400 µl pufera za ispiranje (engl. *wash buffer*) i centrifugirala jednu minutu. Zatim sam kolone premjestila u čiste epruvete i izravno na matriks kolone dodala 30 µl vode koju sam zagrijala na 50 °C pomoću termobloka. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi od jedne minute, uzorke sam centrifugirala jednu minutu kako bih eluirala plazmid. Odredila sam koncentraciju eluiranih plazmida prema opisanom postupku u 3.2.6. te uzorke do korištenja pohranila na -20 °C. Za analizu nukleotidnih sekvenci plazmida, uzorci su poslani na sekvenciranje tvrtki *Macrogen*.

3.2.15.5. Utvrđivanje mutacija u analiziranim sekvencama

Dobivene sam nukleotidne sekvence analizirala pomoću računalnog programskog paketa *BioEdit* verzije 7.2. Sekvence gena *sprtn* i *tdp2a* ribe zebrice preuzela sam s mrežne stranice *Ensembl* (<https://www.ensembl.org/index.html>). Poravnavanjem nukleotidnih sekvenci odredila sam točne lokacije nastalih mutacija, a konverzijom u aminokiselinsku sekvencu odredila sam promjene na proteinskoj razini.

4. REZULTATI

4.1. Ciljana mutageneza u genu *sprtn*

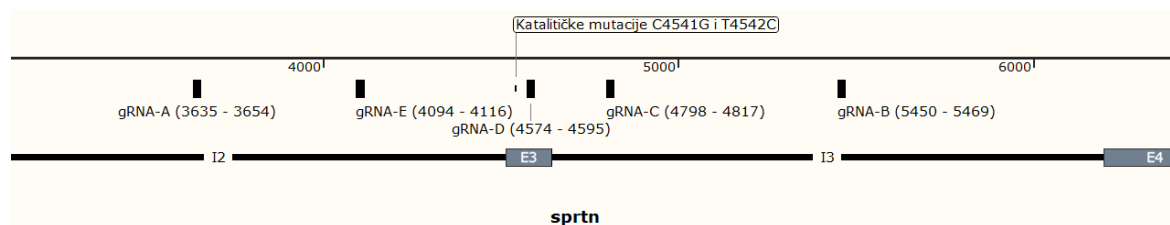
4.1.1. Dizajn RNA vodilja

Za ciljanu mutagenezu u genu *sprtn* ribe zebrice pomoću sustava CRISPR dizajnirala sam pet RNA vodilja. Sekvence gRNA odgovaraju području oko katalitičke regije gena u koju se uvodi mutacija L147A. Odabrala sam tri gRNA za CRISPR/Cas9, gRNA-A, -B i -C, i dvije gRNA za CRISPR/Cas12a (gRNA-D i -E) te sam njihove efikasnosti ispitala T7 endonukleaznim testom ili metodom mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM) nakon mikroinjektiranja u embrije zebrice. Sekvence i nazivi dizajniranih gRNA prikazani su u Tablici 1, a mjesto vezanja u genu *sprtn* i testirana efikasnost pojedine gRNA prikazani su u Tablici 24. Odabrane sekvence naručene su od dobavljača *Macrogen* u obliku plazmidne DNA, čiji su nazivi prikazani u Tablici 2. Shematski prikaz isječka gena *sprtn* od 16670 bp i položaj odabranih gRNA vidljivi su na Slici 1.

Tablica 24. Popis dizajniranih RNA vodilja (gRNA) za ciljanu mutagenezu u genu *sprtn* ribe zebrice (*Danio rerio*).

Naziv	Mjesto vezanja	Efikasnost	Način testiranja
gRNA-A	I2, 3636 – 3654	0 %	T7
gRNA-B	I3, 5450 – 5469	67 %	T7
gRNA-C	I3, 4798 – 4817	0 %	T7
gRNA-D	E3, 4574 – 4595	0 %	HRM
gRNA-E	I2, 4094 – 4116	100 %	T7

I2 označava drugi intron, I3 treći intron, a E3 treći egzon. Efikasnost sustava određena je T7 endonukleaznim testom (T7) ili metodom mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM).



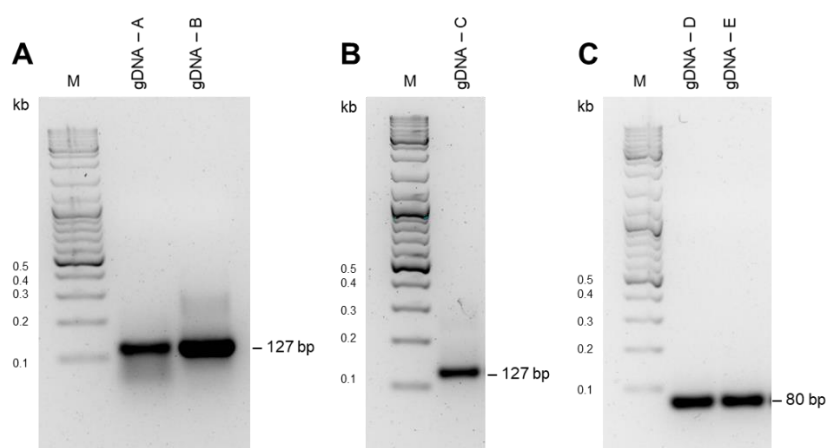
Slika 1. Shematski prikaz isječka gena *sprtn* ribe zebrice (*Danio rerio*) i položaj odabranih RNA vodilja (gRNA) za ciljanu mutagenezu (C4541G i T4542C). E označava egzon, a I intron. Shema je napravljena pomoću računalnog programskog paketa *SnapGene Viewer* verzije 5.2.4.

4.1.2. Dizajn početnica

Uzvodne i nizvodne početnice za lančanu reakciju polimerazom (PCR) i T7 enonukleazni test odabrala sam za umnažanje fragmenata veličine 400 – 600 bp koji sadrže mjesto vezanja gRNA i očekivane promjene u genu *sprtn* zbog djelovanja enzima Cas9 ili Cas12a. Za HRM-u sam odabrala početnice za umnažanje fragmenata do 100 bp koji također sadrže očekivane promjene u genu *sprtn*, a za izradu kalupa za popravak (RT) dvije početnice za uvođenje mutacija u katalitičku regiju i sekvencu PAM-a na plazmidu s RT-om divljeg tipa. Sekvence i nazivi dizajniranih početnica za testiranje efikasnosti sustava CRISPR i ciljanu mutagenezu u genu *sprtn* ribe zebrice prikazani su u Tablici 3, a u Tablici 4 navedene su sekvence korištenih početnica koje nisam dizajnirala.

4.1.3. Sinteza gDNA

Sekvence dizajniranih gRNA naručene su u obliku plazmidne DNA (Tablica 2) te je za njihovu sintezu potrebno umnožiti ciljani fragment plazmida (gDNA) i prevesti ga u RNA oblik transkripcijom *in vitro*. Za umnažanje gDNA provela sam Phusion PCR s odabranim početnicama iz Tablice 4, a rezultati PCR-a nakon agarozne gel elektroforeze prikazani su na Slici 2. Umnažanje željenog fragmenta rezultiralo je jednom vrpcom od očekivanih 127 bp za uzorke Cas9 (gDNA-A, -B i -C), odnosno od 80 bp za uzorke Cas12a (gDNA-D i -E). Iz ostatka smjese nakon PCR-a napravila sam pročišćavanje DNA i odredila masene koncentracije dobivenih gDNA (Tablica 25).



Slika 2. Umnažanje gDNA metodom PCR. Slike A – C prikazuju sintetizirane gDNA nakon Phusion PCR-a. Slika A prikazuje gDNA-A i gDNA-B, Slika B gDNA-C, a Slika C gDNA-D i gDNA-E. M označava marker veličina nukleinskih kiselina *GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use* (Thermo Fisher Scientific). Korišteni su 2 %-tni agarozni gelovi, a elektroforeza je provedena na 100 V, 30 min za A te 45 min za B i C.

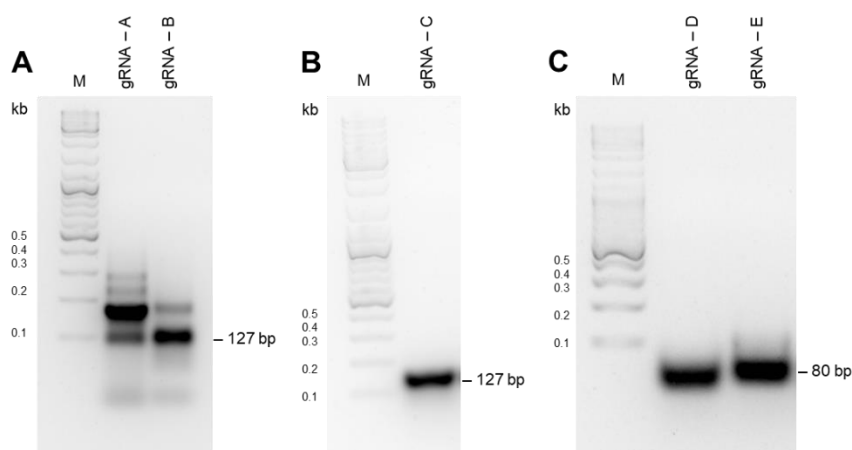
Tablica 25. Masene koncentracije pročišćenih gDNA (vodilja u DNA obliku) nakon Phusion PCR-a za sintezu gRNA.

gDNA	Masena koncentracija
gDNA-A	$\gamma = 120.68 \text{ ng}/\mu\text{l}$
gDNA-B	$\gamma = 196.14 \text{ ng}/\mu\text{l}$
gDNA-C	$\gamma = 102.07 \text{ ng}/\mu\text{l}$
gDNA-D	$\gamma = 38.51 \text{ ng}/\mu\text{l}$
gDNA-E	$\gamma = 34.39 \text{ ng}/\mu\text{l}$

Koncentracije su određene spektrofotometrijski pomoću uređaja *BioSpec-nano* (Shimadzu).

4.1.4. Transkripcija *in vitro*

Nakon umnažanja dizajniranih sekvenci u DNA obliku (gDNA), provela sam postupak transkripcije *in vitro* za dobivanje gRNA koje će navoditi enzim Cas9 ili Cas12a do ciljanog mjesta u genu *sprtn* ribe zebrice za uvođenje dvolančanog loma. Rezultati transkripcije *in vitro* nakon tretmana DNazom i agarozne gel elektroforeze za gRNA A – E prikazani su na Slici 3. Postupak sinteze RNA za uzorke gDNA-C, -D i -E rezultirao je jednom vrpcom na gelu od 127 bp za Cas9 RNA, odnosno 80 bp za Cas12a RNA. Na Slici 3A vidljiva je vrpca od očekivanih 127 bp za gRNA-A i -B, ali i više vrpce manje i veće veličine. Iz ostatka smjese napravila sam pročišćavanje RNA i odredila masene koncentracije dobivenih gRNA (Tablica 26).



Slika 3. Sinteza gRNA *in vitro*. Slike A – C prikazuju sintetizirane gRNA nakon transkripcije *in vitro* i DNaznog tretmana. Slika A prikazuje gRNA-A i gRNA-B, Slika B gRNA-C, a Slika C gRNA-D i gRNA-E. M označava marker veličina nukleinskih kiselina *GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use* (Thermo Fisher Scientific). Korišteni su 1.5 %-tni agarozni gelovi, a elektroforeza je provedena na 100 V, 45 min za A i B te 30 min za C.

Tablica 26. Masene koncentracije pročišćenih RNA vodilja (gRNA) nakon transkripcije *in vitro*.

gRNA	Masena koncentracija
gRNA-A	$\gamma = 2173.00 \text{ ng}/\mu\text{l}$
gRNA-B	$\gamma = 1690.29 \text{ ng}/\mu\text{l}$
gRNA-C	$\gamma = 3399.42 \text{ ng}/\mu\text{l}$
gRNA-D	$\gamma = 1371.46 \text{ ng}/\mu\text{l}$
gRNA-E	$\gamma = 1165.21 \text{ ng}/\mu\text{l}$

Koncentracije su određene spektrofotometrijski pomoću uređaja *BioSpec-nano* (Shimadzu).

4.1.5. Ispitivanje efikasnosti sustava Cas9/Cas12a i gRNA

4.1.5.1. Vijabilnost injektiranih embrija

Nakon sinteze gRNA, pripremila sam smjesu s kompleksom gRNA i pripadajućeg enzima (Cas9 ili Cas12a) za uvođenje mutacija u gen *sprtn* i testiranje efikasnosti navedenih sustava. Priređena smjesa injektirana je u žumanjčanu vrećicu jednostačnog stadija embrija ribe zebrice (*Danio rerio*). Vijabilnost injektiranih embrija prikazana je u Tablici 27, a određena je 24 h nakon injektiranja. Vijabilnost kontrolnih (neinjektiranih) embrija iznosila je 85 % – 97 %. Vijabilnost embrija injektiranih smjesama A i B za utvrđivanje optimalnog omjera gRNA i Cas12a naspram RT-a također je prikazana u Tablici 27. U prvom je eksperimentu injektirano previše smjese i vijabilnost embrija iznosila je 27 %, a u ostalim su eksperimentima vijabilnosti injektiranih embrija 63 % – 84 %. Preživljavanje embrija injektiranih smjesom B bilo je niže od onog prilikom korištenja smjese A (44 % naspram 68 %).

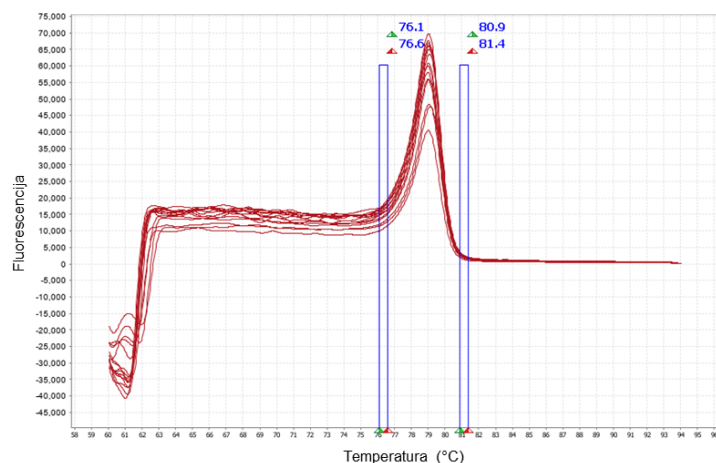
Tablica 27. Vijabilnost embrija zebrice (*Danio rerio*) injektiranih smjesom Cas9/Cas12a i gRNA (A – E). Smjese A i B odnose se na injektiranje Cas12a i gRNA-E za ciljanu mutagenezu u genu *sprtn*. Vijabilnost je određena kao omjer živih embrija nakon 24 h i ukupnog broja embrija.

gRNA	Broj injektiranih embrija	Vijabilnost (%)
gRNA-A*	59	27
gRNA-A	45	84
gRNA-B	49	71
gRNA-C	70	71
gRNA-D	46	63
gRNA-E	51	84
Smjesa A (gRNA-E)	87	68
Smjesa B (gRNA-E)	107	44

*U prvom je eksperimentu injektirano previše smjese.

4.1.5.2. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM)

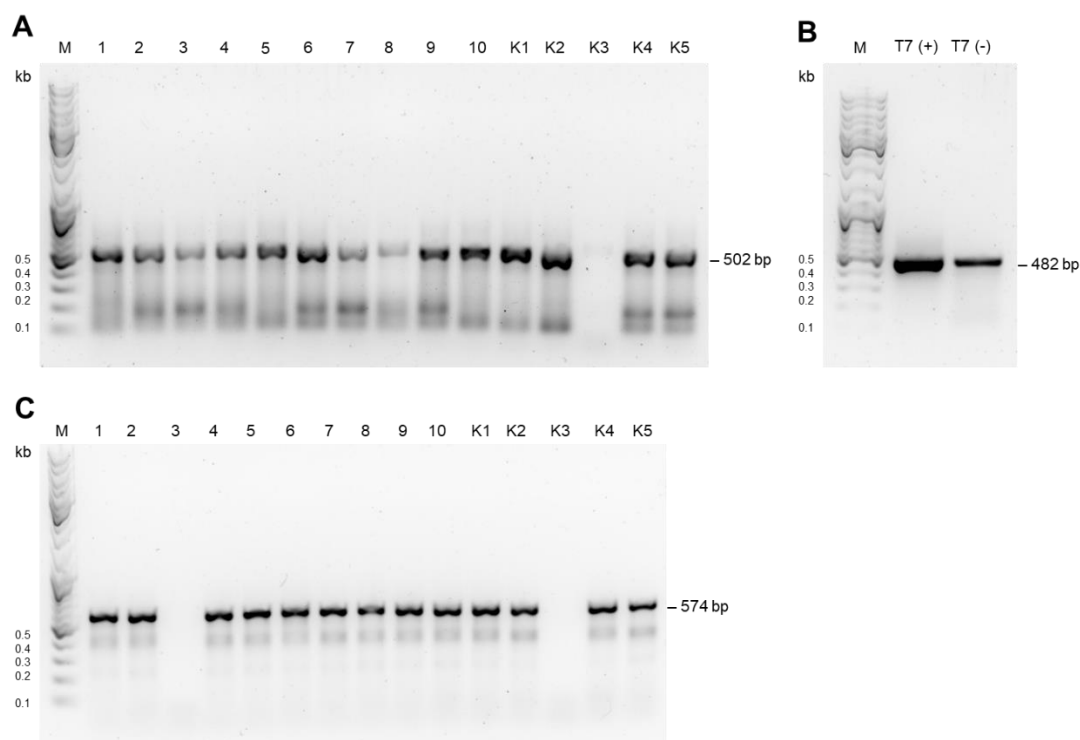
Metodu mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM) koristila sam za testiranje efikasnosti sustava CRISPR/Cas12a s gRNA-D. Rezultati za lizirane embrije zebrice nakon injektiranja smjese Cas12a i gRNA-D prikazani su na Slici 4 u obliku derivacijske krivulje taljenja. Injektirani i kontrolni embriji imaju vrlo slične krivulje, što je očito prema vrhovima krivulje koji se preklapaju za sve uzorke. Također, korišteni program za analizu rezultata *High Resolution Melt Software* verzije 3.2 potencijalne razlike u temperaturi taljenja označava krivuljama različite boje, a u ovom su slučaju sve crvene. Analizom podataka u navedenom programu, potvrdila sam kako i injektirani i kontrolni uzorci imaju T_m u rasponu 79.0 – 79.1 °C. Na temelju ovih rezultata, zaključila sam da ovaj sustav nije efikasan za uvođenje mutacija u gen *sprtn*.



Slika 4. Rezultat metode mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM) liziranih embrija zebrice za testiranje efikasnosti sustava Cas12a i gRNA-D u obliku derivacijske krivulje. Temperature taljenja injektiranih i neinjektiranih uzoraka iznosile su 79.0 – 79.1 °C. Podaci su obrađeni pomoću računalnog programskog paketa *High Resolution Melt Software* verzije 3.2.

4.1.5.3. Priprema uzoraka za T7 endonukleazni test

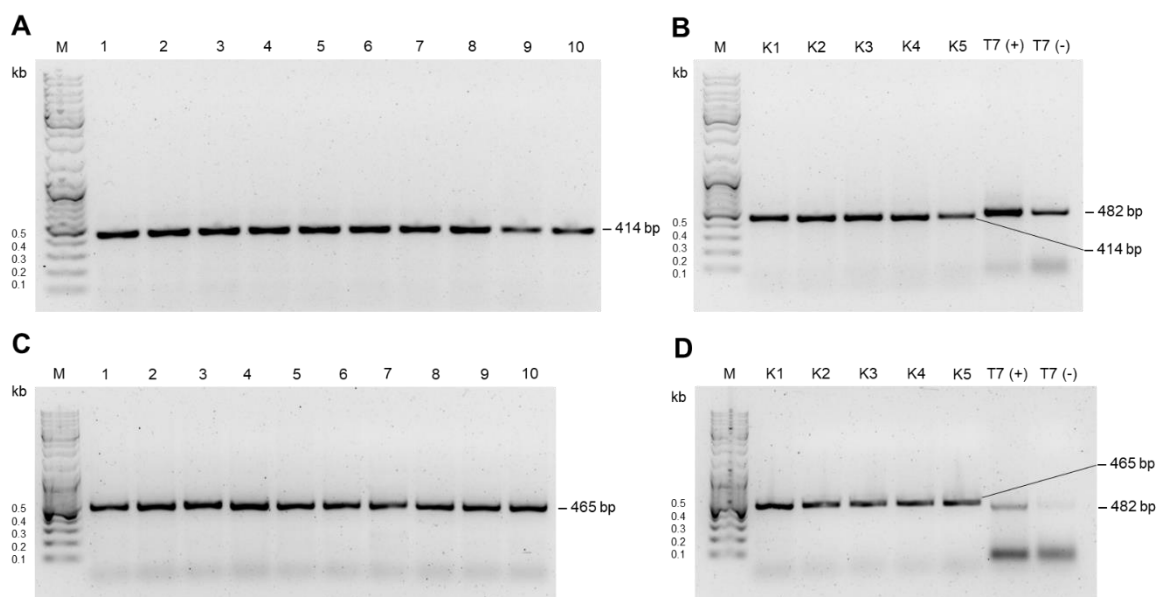
Nakon mikroinjektiranja embrija zebrice smjesom proteina Cas9 i pojedine gRNA te proteolitičke razgradnje embrija, provela sam Taq PCR za umnažanje fragmenata veličine 400 – 600 bp za testiranje efikasnosti sustava T7 endonukleaznim testom. Rezultati PCR-a nakon agarozne gel elektroforeze prikazani su na Slici 5. Umnažanje fragmenata oko dizajnirane gRNA-A (Slika 5A) rezultiralo je izraženijom vrpcom od 502 bp koja odgovara željenom fragmentu, ali i više manjih vrpce u svakoj jažici. Kontrolni uzorci za T7 endonukleazni test imali su samo jedan signal od očekivanih 482 bp (Slika 5B). Umnažanje fragmenata oko dizajnirane gRNA-B (Slika 5C) rezultiralo je jačom vrpcom od 574 bp koja je veličine željenog fragmenta, ali su vidljivi i slabiji fragmenti manje veličine na oko 400 bp. Jažice s uzorcima K3 za eksperiment s gRNA-A te uzorci 3 i K3 za gRNA-B nisu imale mjerljive vrpce s umnoženom DNA. Ovim sam postupkom uspješno umnožila fragmente željene veličine iz lizata embrija nakon mikroinjektiranja gRNA-A i gRNA-B, no fragmenti manjih veličina sa slika 5A i 5B mogli bi otežati interpretaciju rezultata T7 endonukleaznog testa.



Slika 5. Umnažanje DNA za testiranje efikasnosti Cas9 i gRNA T7 endonukleaznim testom. Slika A prikazuje umnožene fragmente embrija s gRNA-A od 502 bp. Slika B prikazuje kontrolne uzorke za T7 endonukleazni test od 482 bp. Slika C prikazuje umnožene fragmente embrija s gRNA-B od 574 bp. M označava marker veličina nukleinskih kiselina *GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific)*. Brojevi 1 – 10 označavaju pojedinačne lizate injektiranih embrija, a K1 – K5 kontrolne neinjektirane embrije. T7 (+) označava pozitivnu, a T7 (-) negativnu kontrolu. Korišteni su 1 %-tni agarozni gelovi, a elektroforeza je provedena na 100 V u trajanju od 45 min.

Nakon mikroinjektiranja embrija zebrice smjesom proteina Cas9/Cas12a i pojedine gRNA te proteolitičke razgradnje embrija, provela sam Phusion PCR za umnažanje fragmenata veličine 400 – 600 bp za testiranje efikasnosti sustava T7 endonukleaznim testom. Rezultati PCR-a nakon agarozne gel elektroforeze prikazani su na Slici 6. Umnažanje fragmenata oko dizajnirane gRNA-C (Slike 6A i 6B) rezultiralo je jednom vrpcom od 414 bp koja odgovara željenom fragmentu. Kontrolni uzorci za T7 endonukleazni test (Slika 6B) imali su jedan signal od očekivanih 482 bp te slabije signale na oko 100 bp. Umnažanje fragmenata oko dizajnirane gRNA-E (Slike 6C i 6D) rezultiralo je jednom vrpcom od 465 bp koja je veličine željenog fragmenta. Kontrolni uzorci za T7 endonukleazni test (Slika 6D) imali su jedan signal od očekivanih 482 bp koji se nalazio niže na gelu od vrpce sa fragmentima od 465 bp, a također su imali izraženije fragmente na oko 100 bp. Ovim sam postupkom uspješno umnožila fragmente željene veličine iz lizata embrija nakon mikroinjektiranja gRNA-C i gRNA-E te

nema fragmenata manjih veličina koji bi otežali interpretaciju rezultata T7 endonukleaznog testa.



Slika 6. Umnožanje DNA za testiranje efikasnosti Cas9/Cas12a i gRNA T7 endonukleaznim testom. Slika A prikazuje umnožene fragmente injektiranih embrija s gRNA-C od 414 bp, a Slika B pripadajuće neinjektirane embrije (414 bp) i kontrolne uzorke za T7 endonukleazni test od 482 bp. Slika C prikazuje umnožene fragmente injektiranih embrija s gRNA-E od 465 bp, a Slika D pripadajuće neinjektirane embrije (465 bp) i kontrolne uzorke za T7 endonukleazni test od 482 bp. M označava marker veličina nukleinskih kiselina *GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific)*. Brojevi 1 – 10 označavaju pojedinačne lizate injektiranih embrija, a K1 – K5 kontrolne neinjektirane embrije. T7 (+) označava pozitivnu, a T7 (-) negativnu kontrolu. Korišteni su 1 %-tni agarozni gelovi, a elektroforeza je provedena na 100 V, 45 min za A i B te 30 min za C i D.

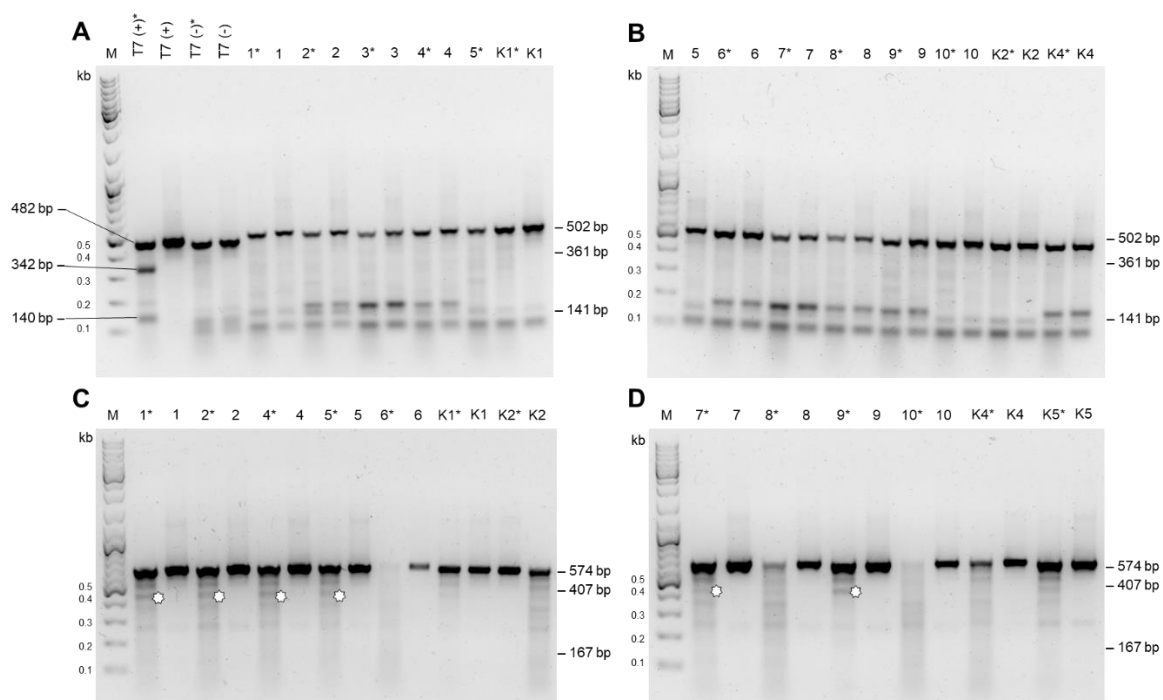
4.1.5.4. T7 endonukleazni test

Za utvrđivanje efikasnosti sustava enzima Cas9 ili Cas12a i pripadajuće gRNA, provela sam T7 endonukleazni test na umnoženim fragmentima liziranih embrija zebrice. Ukoliko je nakon mikroinjektiranja došlo do uvođenja mutacija u regiji od interesa, T7 endonukleaza porezat će takva mjesta zbog nastalih heterodupleksa, a nakon agarozne gel elektroforeze bit će vidljivi fragmenti različitih veličina. Njihov će zbroj odgovarati ukupnoj veličini umnoženih fragmenata nakon PCR-a. Ako testirani sustav nije efikasan, na gelu će biti vidljiv samo nepocijepani fragment.

Na Slici 7A prikazani su kontrolni uzorci za T7 endonukleazni test. Kod pozitivne kontrole T7 (+) vidljiva su dva fragmenta od 140 bp i 342 bp te cijeli fragment od 482 bp u uzorku s dodanim enzimom T7, odnosno samo cijeli fragment od 482 bp bez enzima. U jažicama s negativnom kontrolom T7 (-) bio je samo nepocijepani fragment od 482 bp. Za

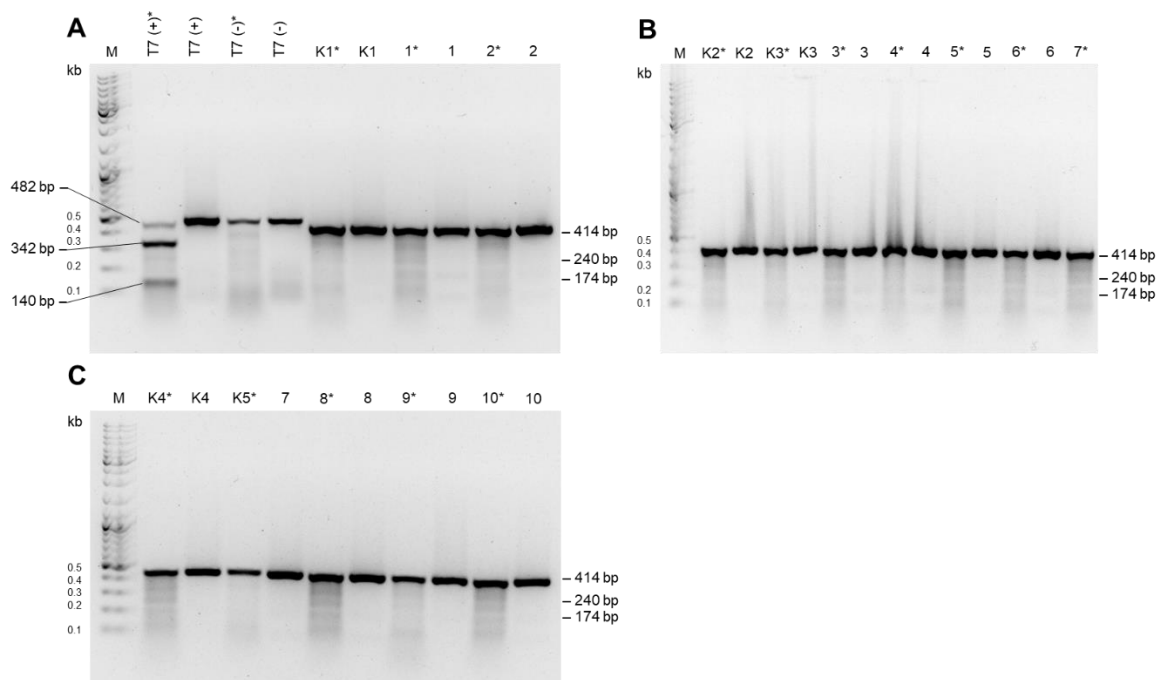
lizirane embrije s gRNA-A (Slike 7A i 7B) očekivala sam fragmente od 141 bp i 361 bp nakon dodatka T7 (ukoliko je došlo do uvođenja mutacija u promatranj regiji), odnosno samo fragment od 502 bp bez T7. Vrpce injektiranih (1 – 10) i neinjektiranih (K1 – K5) embrija bile su slične: nepocijepani fragment od 502 bp i manji fragmenti 100 – 200 bp koji su bili vidljivi i nakon PCR-a na Slici 5A. Fragment od 361 bp nije vidljiv ni u jednoj jažici. Kako nije bilo vidljivih razlika između injektiranih i kontrolnih uzoraka te uzoraka s i bez T7, odredila sam da ovaj sustav nije efikasan za uvođenje mutacija u gen *sprtn*.

Za lizirane embrije s gRNA-B (Slika 7C i 7D) očekivala sam fragmente od 167 bp i 407 bp nakon dodatka T7 (ukoliko je došlo do uvođenja mutacija u promatranj regiji), odnosno samo fragment od 574 bp bez T7. Fragment od 167 bp nije vidljiv ni u jednoj jažici, ali fragment od 407 bp primijetila sam u šest od devet analiziranih uzoraka (uzorak jednog embrija nije korišten zbog slabog signala nakon PCR-a na Slici 5C). Fragment od 407 bp nije vidljiv u jažicama bez dodanog enzima i u neinjektiranim embrijima. Signal fragmenta od 574 bp bio je slabiji u uzorcima s T7 gdje je došlo do cijepanja. Zbog toga sam odredila da je efikasnost ovog sustava 67 % i odlučila pripremiti navedene uzorke za sekvenciranje i utvrđivanje točnih mutacija. Kod uzoraka tretiranih enzimom T7 također postoje i više vrpce ispod 407 bp, no one su bile slabijeg intenziteta. Za uzorke 6 i 10 s enzimom T7 dobiven je vrlo slab signal.



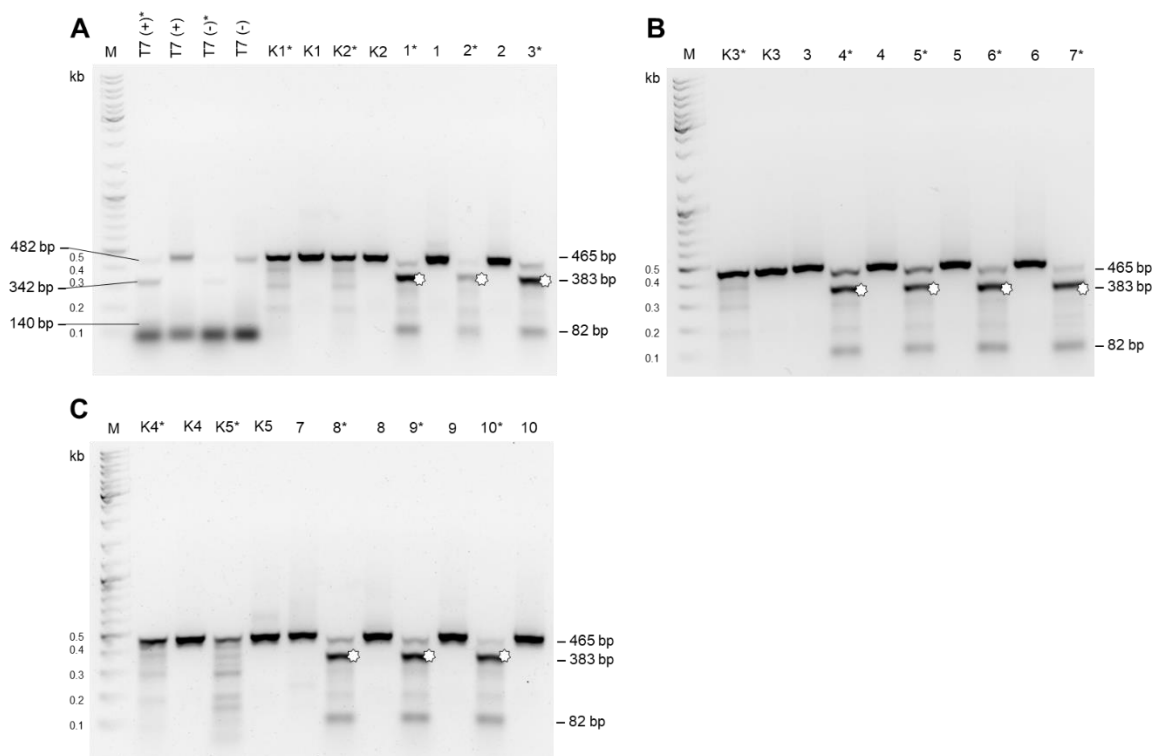
Slika 7. Rezultati T7 endonukleaznog testa i utvrđivanje efikasnosti sustava Cas9 i gRNA. Slika A i B prikazuju rezultate testa za gRNA-A, a Slike C i D gRNA-B. Na Slici A prikazani su kontrolni uzorci: pozitivna kontrola T7 (+) s pocijepanim fragmentima (342 bp i 140 bp) i negativna kontrola T7 (-) s nepocijepanim fragmentom (482 bp). Očekivane veličine fragmenata nakon cijepanja za gRNA-A iznose 141 bp i 361 bp, a gRNA-B 167 bp i 407 bp (označen zvjezdicom). Nepocijepani fragmenti iznose 502 bp (gRNA-A), odnosno 574 bp (gRNA-B). M označava marker veličina nukleinskih kiselina *GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific)*. Brojevi 1 – 10 označavaju pojedinačne lizate injektiranih embrija, a K1 – K5 kontrolne neinjektirane embrije. *Označava uzorke s enzimom T7, a u ostale je uzorke dodana voda. Korišteni su 2 %-tni agarozni gelovi, a elektroforeza je provedena na 100 V u trajanju od 60 min.

Na Slici 8A prikazani su kontrolni uzorci za T7 endonukleazni test. Rezultati i veličine fragmenata bili su isti kao na Slici 7A. Za lizirane embrije s gRNA-C (Slike 8A, 8B i 8C) očekivala sam fragmente od 174 bp i 240 bp nakon dodatka T7 (ukoliko je došlo do uvođenja mutacija u promatranj regiji), odnosno samo fragment od 414 bp bez T7. Željeni fragmenti nisu vidljivi ni u jednoj jažici. Vrpce injektiranih (1 – 10) i neinjektiranih (K1 – K5) embrija bile su slične: samo nepocijepani fragment od 414 bp u uzorcima bez enzima T7 te velik broj slabih signala manjih od 414 bp za uzorke s T7 koji se ne mogu pojedinačno razlučiti. Kako nije bilo vidljivih razlika između injektiranih i kontrolnih uzoraka te uzoraka s i bez T7, zaključila sam da ovaj sustav nije efikasan za uvođenje mutacija u gen *sprtn*.



Slika 8. Rezultati T7 endonukleaznog testa i utvrđivanje efikasnosti sustava Cas9 i gRNA-C. Na Slici A prikazani su kontrolni uzorci: pozitivna kontrola T7 (+) s pocijepanim fragmentima (342 bp i 140 bp) i negativna kontrola T7 (-) s nepocijepanim fragmentom (482 bp). Očekivane veličine fragmenata nakon cijepanja za gRNA-C iznose 174 bp i 240 bp, a nepocijepani fragmenti iznose 414 bp. M označava marker veličina nukleinskih kiselina *GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific)*. Brojevi 1 – 10 označavaju pojedinačne lizate injektiranih embrija, a K1 – K5 kontrolne neinjektirane embrije. *Označava uzorke s enzimom T7, a u ostale je uzorke dodana voda. Korišteni su 1.2 %-tni agarozni gelovi, a elektroforeza je provedena na 100 V u trajanju od 50 min.

Na Slici 9A prikazani su kontrolni uzorci za T7 endonukleazni test. Rezultati i veličine fragmenata bili su isti kao na Slici 7A, osim što su vrpce vrlo slabe i primijećen je jači signal ispod 100 bp. Za lizirane embrije s gRNA-E (Slike 9A, 9B i 9C) očekivala sam fragmente od 82 bp i 383 bp nakon dodatka T7 (ukoliko je došlo do uvođenja mutacija u promatranoj regiji), odnosno samo fragment od 465 bp bez T7. Jak signal za fragment od 383 bp vidljiv je u svakom uzorku injektiranih embrija s enzimom T7 te sam ga zbog toga označila zvjezdicom, a u svim navedenim jažicama prisutan je i manji fragment od 82 bp. Pocijepani fragmenti nisu vidljivi u jažicama bez dodanog enzima i u neinjektiranim embrijima. Također, signal nepocijepanog fragmenta od 465 bp puno je slabiji u jažicama s dodanim enzimom T7 od kontrolnih uzoraka. Na temelju ovih rezultata, zaključila sam da je efikasnost ovog sustava 100 % i odlučila pripremiti navedene uzorke za sekvenciranje i utvrđivanje točnih mutacija.

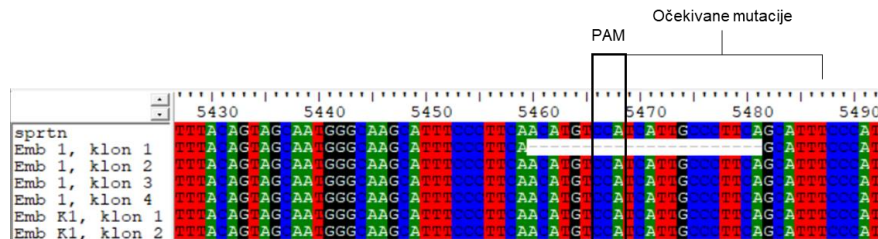


Slika 9. Rezultati T7 endonukleaznog testa i utvrđivanje efikasnosti sustava Cas9 i gRNA-E. Na Slici A prikazani su kontrolni uzorci: pozitivna kontrola T7 (+) s pocijepanim fragmentima (342 bp i 140 bp) i negativna kontrola T7 (-) s nepocijepanim fragmentom (482 bp). Očekivane veličine fragmenata nakon cijepanja za gRNA-E iznose 82 bp i 383 bp (označen zvjezdicom), a nepocijepani fragmenti iznose 465 bp. M označava marker veličina nukleinskih kiselina *GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use* (*Thermo Fisher Scientific*). Brojevi 1 – 10 označavaju pojedinačne lizate injektiranih embrija, a K1 – K5 kontrolne neinjektirane embrije. *Označava uzorke s enzimom T7, a u ostale je uzorke dodana voda. Korišteni su 1.2 %-tni agarozni gelovi, a elektroforeza je provedena na 100 V u trajanju od 60 min.

4.1.5.5. Potvrda efikasnosti sustava Cas9/Cas12a i gRNA analizom nukleotidnih sekvenci

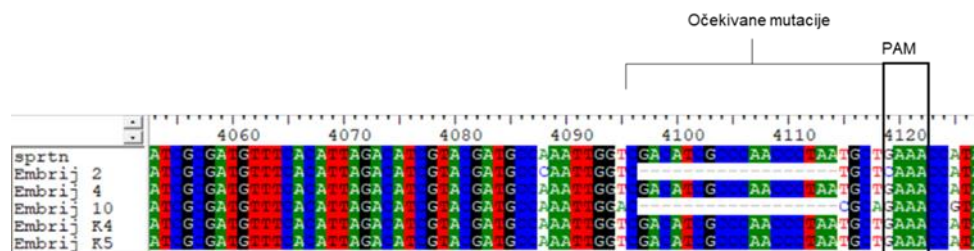
Nakon provedenog T7 endonukleaznog testa za određivanje efikasnosti sustava Cas9 i pripadajuće gRNA, odabrala sam uzorke koji su na gelu imali najjače signale za potvrdu mutacija sekvenciranjem. Sekvence sam analizirala tražeći mutacije u očekivanom području rezanja u genu *sprtn* ribe zebrice, uz sekvencu PAM slijeda CCA na *antisense* (-) lancu DNA. Sekvenca gRNA-B odgovara slijedu nukleotida 5450 – 5469 u trećem intronu gena *sprtn* (Tablica 24). Za gRNA-B odabrala sam embrije 1 i 9 prema Slikama 7C i 7D te jedan kontrolni embrij divljeg tipa (K1). Za injektirane embrije pripremila sam po četiri klonova, a od neinjektiranog embrija dva klonova za sekvenciranje. Poravnate sekvence klonova embrija 1 i kontrolnog embrija prikazane su na Slici 10. Vidljivo je kako klon 1 ima deletiranu regiju od 23 bp u području očekivanih mutacija, a ostali su klonovi divljeg tipa. Sekvence ni jednog od analiziranih klonova embrija 9 nisu sadržavale mutacije te stoga nisu prikazane. Zbog samo

jednog klonu u kojem je pronađena mutacija, pripremila sam uzorke i ostalih embrija injektiranih s gRNA-B za utvrđivanje učestalosti uvođenja mutacija. Od ukupno 50 analiziranih klonova, samo je jedan klon embrija 1 imao vidljivu promjenu, a ostale su sekvence bile divljeg tipa i stoga nisu prikazane. Na temelju ovih podataka odredila sam da sustav Cas9 i gRNA-B nije dovoljno efikasan za uvođenje željene mutacije u gen *sprtn*.



Slika 10. Poravnate nukleotidne sekvence klonova 1 – 4 embrija 1 nakon pozitivnog rezultata na T7 endonukleaznom testu za ispitivanje efikasnosti sustava Cas9 i gRNA-B. PAM označava motiv uz protorazmaknicu uz kojeg je područje očekivanih mutacija. Prva prikazana sekvenca odgovara genu *sprtn* ribe zebrice (*Danio rerio*), a zadnje dvije kontrolnim klonovima embrija divljeg tipa (K označava kontrolu). Emb označava embrij. Analiza sekvenci izvršena je pomoću računalnog programskog paketa *BioEdit* verzije 7.2, a uzorke je sekvencirala tvrtka *Macrogen*.

Nakon provedenog T7 endonukleaznog testa za određivanje efikasnosti sustava Cas12a i pripadajuće gRNA, odabrala sam uzorke koji su na gelu imali najjače signale za potvrdu mutacija sekvenciranjem. Sekvence sam analizirala tražeći mutacije u očekivanom području rezanja u gene *sprtn* ribe zebrice, uz sekvencu PAM slijeda GAAA na *antisense* (-) lancu DNA. Sekvenca gRNA-E odgovara slijedu nukleotida 4094 – 4116 u drugom intronu gena *sprtn* (Tablica 24). Za gRNA-E odabrala sam embrije 2, 4 i 10 prema Slici 9 te dva kontrolna embrija divljeg tipa (K4 i K5). Zbog jako izraženih signala na gelu, odlučila sam sekvencirati smjese nakon PCR-a za navedene uzorke jer postupak kloniranja traje duže. Takve bi smjese trebale sadržavati i sekvence divljeg tipa i mutirane sekvence. Poravnate sekvence odabranih embrija prikazane su na Slici 11. Vidljivo je kako embriji 2 i 10 imaju deletiranu regiju od 18 pb u području očekivanih mutacija, a analizirana sekvenca embrija 4 bila je divljeg tipa. Na temelju ovih podataka odredila sam da je sustav Cas12a i gRNA-E dovoljno efikasan za uvođenje željene mutacije u gen *sprtn* i dizajnirala sam pripadajući kalup za popravak.

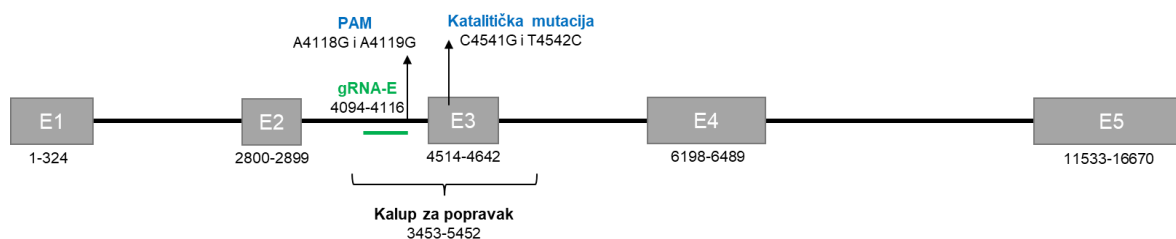


Slika 11. Poravnate nukleotidne sekvence smjese PCR-a embrija 2, 4 i 10 nakon pozitivnog rezultata na T7 endonukleaznom testu za ispitivanje efikasnosti sustava Cas12a i gRNA-E. PAM označava motiv uz protorazmaknicu uz kojeg je područje očekivanih mutacija. Prva prikazana sekvenca odgovara genu *sprtn* ribe zebrice (*Danio rerio*), a zadnje dvije kontrolnim klonovima embrija divljeg tipa (K označava kontrolu). Analiza sekvenci izvršena je pomoću računalnog programskog paketa *BioEdit* verzije 7.2, a uzorke je sekvencirala tvrtka *Macrogen*.

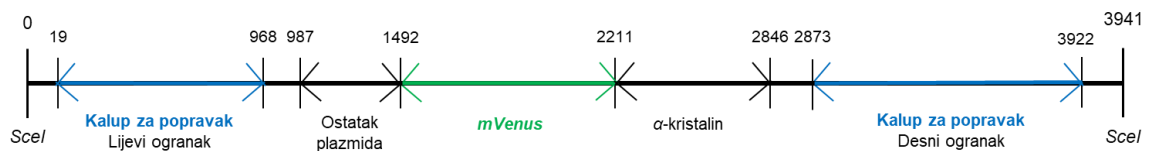
4.1.6. Izrada kalupa za popravak

4.1.6.1. Dizajn i uvođenje mutacija u kalup za popravak

Za izradu kalupa za popravak (RT) koristila sam plazmid s kompleksom α -kristalin::*mVenus* (engl. *alpha-crystallin::Venus*) i velikim segmentom (2 kb) gena *sprn* ribe zebrice divljeg tipa koji odgovara području unutar drugog i trećeg introna te trećeg egzona. Korištenjem mutagenih početnica uvela sam dvije točkaste mutacije u katalitičku regiju (C4541G i T4542C) za pretvaranje leucina u alanin na poziciji 147. Također sam uvela mutacije u sekvencu PAM-a (A4118G i A4119G) kako Cas12a ne bi porezao RT. Shematski prikaz gena *sprtn* i uvedenih mutacija prikazan je na Slici 12, a korištenog RT-a na Slici 13. Lijevi ogranak RT-a (949 bp) u plazmid je ubačen na restriksijskim mjestima *NotI* i *BamHI*, a desni ogranak (1049 bp) na *Sall* i *XhoII*.



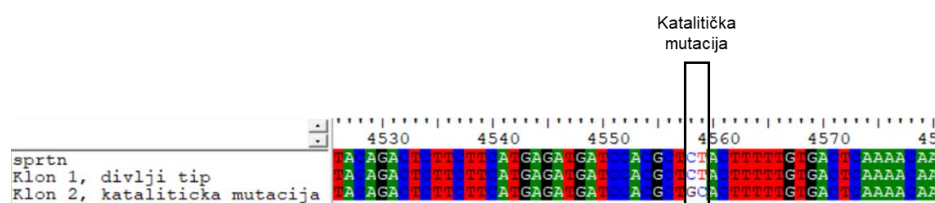
Slika 12. Shematski prikaz gena *sprtn* ribe zebrice (*Danio rerio*) i uvedenih mutacija pomoću sustava CRISPR/Cas12a i gRNA-E. Zelenom linijom označeno je mjesto vezanja gRNA-E, a strjelice označavaju položaje ciljanih mutacija u katalitičkoj regiji i sekvenci PAM u kalupu za popravak. E označava egzon. Shema je izrađena pomoću programskog paketa *Microsoft 365*.



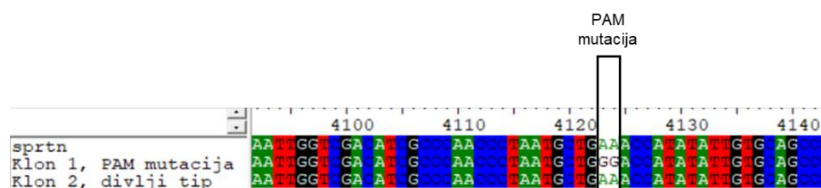
Slika 13. Shematski prikaz dizajniranog kalupa za popravak za uvođenje mutacije L147A u gen *sprtn* ribe zebrice (*Danio rerio*) sustavom CRISPR/Cas12a. *ScelI* označava restriksijska mjesta u plazmidu pKHR5. Lijevi i desni ogranak kalupa odgovaraju genu *sprtn* divljeg tipa. *mVenus* predstavlja reporterski gen pod promotorom za α -kristalin, uz ostatak plazmida nakon izrezivanja kompleksa. Neoznačeni dijelovi predstavljaju ostatke plazmida pKHR5 nakon ubacivanja u restriksijska mjesta. Shema je izrađena pomoću programskog paketa *Microsoft 365*.

4.1.6.2. Potvrda uvođenja mutacija u kalup za popravak analizom nukleotidnih sekvenci

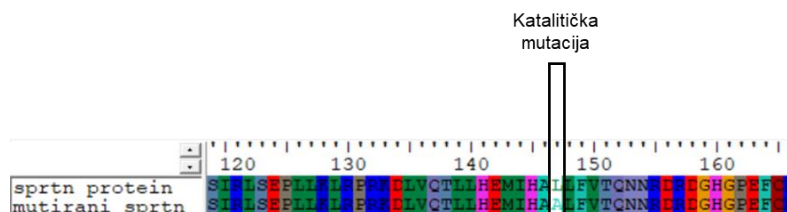
Za uvođenje ciljanih mutacija u gen *sprtn* ribe zebrice, dizajnirala sam kalup za popravak s homolognim segmentom (2 kb) navedenog gena. Ovaj sustav funkcionira mikroinjektiranjem smjese Cas12a i gRNA-E za uvođenje dvolančanog loma u ciljanoj regiji gena te RT-a za popravak homolognom rekombinacijom. U RT sam pomoću mutagenih početnica uvela mutacije u katalitičku regiju (C4541G i T4542C) i sekvencu PAM-a za gRNA-E (A4118G i A4119G). Nakon transformacije bakterija, pripremila sam plazmide pojedinačnih klonova za sekvenciranje. Rezultati obrade nukleotidnih sekvenci prikazani su na Slici 14 za katalitičku mutaciju i Slici 15 za PAM mutaciju. Homolognom rekombinacijom RT-a s ovim mutacijama doći će do promjene leucina u alanin na poziciji 147 u genu *sprtn*, što je prikazano na Slici 16. Od ukupno šest analiziranih klonova, tri su imala obje željene mutacije. Pročišćene plazmide s uvedenim mutacijama koristila sam za izolaciju RT-a iz agaroznog gela nakon enzimatske restrikcije.



Slika 14. Poravnate nukleotidne sekvence klonova nakon transformacije bakterija plazmidom koji sadrži kalup za popravak s uvedenim mutacijama u katalitičkoj regiji (C4541G i T4542C). Klon 1 sadrži nepromijenjeni slijed u odnosu na sekvencu gena *sprtn* ribe zebrice (*Danio rerio*), a klon 2 mutirani slijed. Analiza sekvenci izvršena je pomoću računalnog programskog paketa *BioEdit* verzije 7.2, a uzorke je sekvencirala tvrtka *Macrogen*.



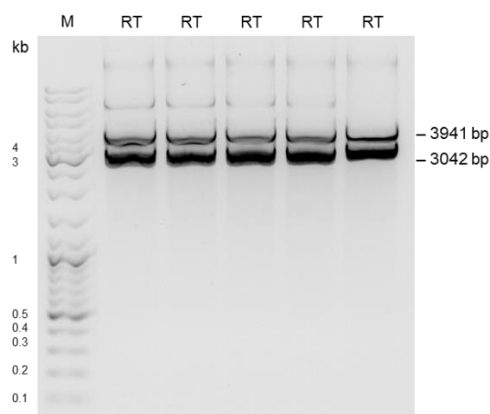
Slika 15. Poravnate nukleotidne sekvence klonova nakon transformacije bakterija plazmidom koji sadrži kalup za popravak s uvedenim mutacijama u regiji PAM (A4118G i A4119G). Klon 1 sadrži mutirani slijed, a klon 2 nepromijenjeni slijed u odnosu na sekvencu gena *sprtn* ribe zebrice (*Danio rerio*). Analiza sekvenci izvršena je pomoću računalnog programskog paketa *BioEdit* verzije 7.2, a uzorke je sekvencirala tvrtka *Macrogen*.



Slika 16. Poravnate aminokiselinske sekvence gena *sprtn* ribe zebrice (*Danio rerio*) divljeg tipa i gena s uvedenom mutacijom L147A. Analiza sekvenci izvršena je pomoću računalnog programskog paketa *BioEdit* verzije 7.2, a uzorke je sekvencirala tvrtka *Macrogen*.

4.1.6.3. Izolacija kalupa za popravak

Nakon uvođenja željenih mutacija, razgradnje kalupa divljeg tipa i korištenja restriktivske endonukleaze I-SceI za izrezivanje RT-a iz plazmida, provela sam agaroznu gel elektroforezu (Slika 17). Iz gela sam izrezala i pročistila gornji fragment od 3941 bp koji odgovara veličini izrađenog RT-a ($\gamma = 143.07 \text{ ng}/\mu\text{l}$) i koristila ga za mikroinjektiranje. Donji fragment (3042 bp) sadrži ostatak plazmida.

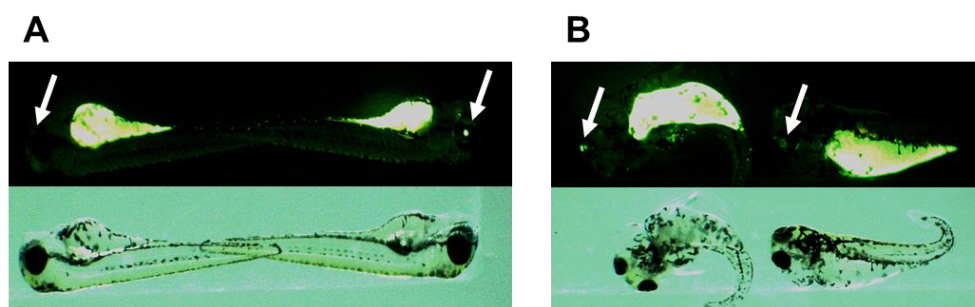


Slika 17. Cijepanje plazmida restriktivskom endonukleazom I-SceI za izolaciju kalupa za popravak za ciljanu mutagenezu u genu *sprtn* ribe zebrice (*Danio rerio*). Kalup za popravak (RT) veličine je 3941 bp, a ostatak plazmida 3042 bp. M označava marker veličina nukleinskih kiselina *GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use* (*Thermo Fisher Scientific*). Korišten je 1 %-tni agarozni gel, a elektroforeza je provedena na 100 V u trajanju od 60 min.

4.1.7. Selekcija i uzgoj embrija s ugrađenim kalupom za popravak

Nakon mikroinjektiranja smjese Cas12a, gRNA-E i RT-a u jednostanični stadij embrija ribe zebrice, embrije stare četiri dana pregledala sam pod mikroskopskom lupom. Ekspresijom zeleno-fluorescirajućeg markera *mVenus* iz RT-a nakon homologne rekombinacije, leće oka zebrice bit će žuto-zelene boje prilikom ekscitacije plavim svjetlom. Broj injektiranih embrija i vijabilnost nakon 24 h prikazani su u Tablici 25. Od 59 analiziranih embrija injektiranih smjesom A, deset ih je bilo pozitivno na *mVenus* (17 %), a samo su četiri bila vijabilna u trenutku selekcije. Od 47 analiziranih embrija injektiranih smjesom B (veća količina RT-a), 15 ih je bilo pozitivno na *mVenus* (32 %), a šest je bilo vijabilno u trenutku selekcije. Prema ovim podacima, smjesa s većim količinom RT-a imala je bolju efikasnost ugradnje kalupa.

Primjer *mVenus* pozitivnih i negativnih embrija prikazan je na Slici 18. Embriji normalne fiziologije s gornjeg dijela Slike 18A izdvojeni su i uzgajani do odraslog stadija. Primjer embrija s razvojnim poteškoćama prikazan je na Slici 18B. Takve su jedinke bile *mVenus* pozitivne, ali nisu bile vijabilne na dan selekcije. Također su bile manje veličine i sa zakrivljenom kralježnicom. Od deset uzgajanih jedinki, samo je pet ostalo vijabilno nakon razdoblja od dva tjedna. Na temelju ovih podataka, odredila sam da je mikroinjektiranjem Cas12a, gRNA-E i RT-a uspješno došlo do ugradnje kalupa za popravak u genom ribe zebrice, no samo je manji broj *mVenus* pozitivnih jedinki bio vijabilan tri dana nakon mikroinjektiranja. Također, 50 % jedinki uginulo je u prva dva tjedna uzgoja, što znači da je od ukupno 194 injektirane jedinke uspješno uzgojeno samo pet zebrica s ugrađenim kalupom za popravak.



Slika 18. Selekcija embrija ribe zebrice (*Danio rerio*) na *mVenus* nakon ugradnje kalupa za popravak za ciljanu mutagenezu u genu *sprtn*. Na gornjim slikama korištena je plava svjetlost (*Model SFA Stereo Microscope Fluorescence Adapter Royal Blue (NIGHTSEA)*), a donje su slike pod prirodnim svjetlom. Slika A pokazuje *mVenus* negativnog (lijevo) i *mVenus* pozitivnog embrija (desno) normalne fiziologije. Slika B prikazuje *mVenus* pozitivne embrije s razvojnim poteškoćama. Bijelom strjelicom označena je leća oka embrija koja fluorescira zeleno nakon ugradnje kalupa. Za obradu slika korišten je računalni programski paket *Motic Images Plus* verzije 2.00.

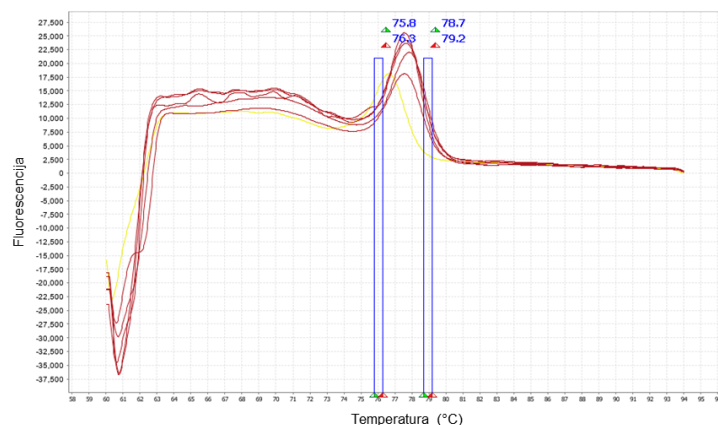
4.2. Selekcija riba utemeljitelja za animalni model s mutacijom u genu *tdp2a*

4.2.1. Primjena CRISPR/Cas9 za uvođenje mutacija u gen *tdp2a*

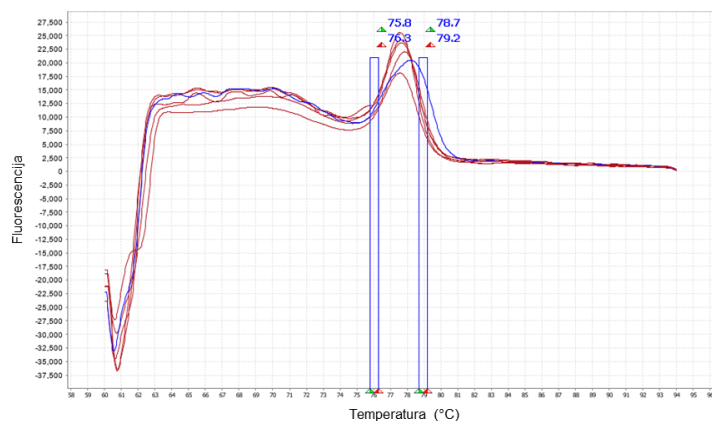
Za uvođenje promjena u gen *tdp2a* ribe zebrice korišten je sustav CRISPR/Cas9 i odgovarajuća gRNA. Nakon mikroinjektiranja sustava u jednostanični stadij, embriji zebrice uzgajani su do spolne zrelosti od tri mjeseca. U stanicama injektiranih riba postoje različite mutacije nastale nakon uvođenja dvolančanog loma i unutarstaničnih procesa za popravak oštećenja koji mogu uzrokovati preuranjeni STOP kodon i promjenu u proteinskoj sekvenci. Također, samo pojedine jedinke imaju željene mutacije u stanicama germinativne linije koje prenose na potomstvo. Zbog toga ih je potrebno križati sa zebricama divljeg tipa i utvrditi prisutnost i tip mutacija u njihovom potomstvu. Opisani postupak mutageneze nije odrađen u sklopu diplomskog rada. Nakon križanja injektiranih jedinki sa zebricama divljeg tipa, analizirala sam njihovo potomstvo za identifikaciju riba utemeljitelja za animalni model s mutacijom u genu *tdp2a*.

4.2.2. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM)

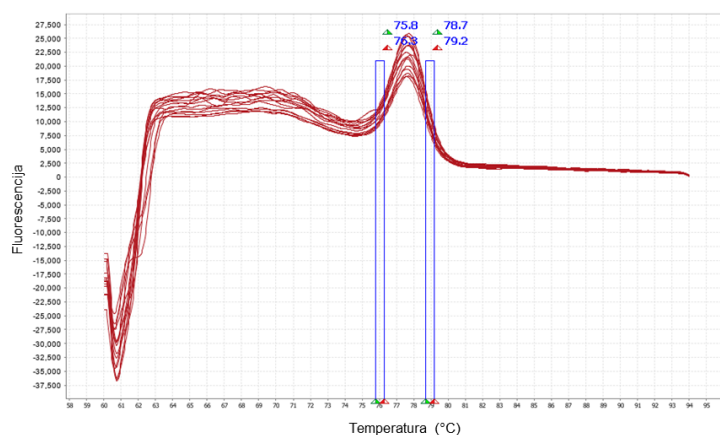
Metodu mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM) koristila sam za pronalazak riba utemeljitelja za uzgoj F1 generacije sa željenim mutacijama u genu *tdp2a*. Za HRM sam koristila već sintetizirane početnice čije su sekvence prikazane u Tablici 4. Proučavanjem dobivenih rezultata, pronašla sam HRM-a pozitivnu ženku zebrice (nazvanu Tdp2a-Ž) čije potomstvo ima različite krivulje, što je pomoću programa lako interpretirati prema razlikama u boji. Embriji divljeg tipa imali su T_m u rasponu 77.6 – 77.8 °C, šest potomaka analizirane ženke 76.6 – 78.2 °C, a ostalih četiri 77.6 – 77.8 °C. Podrobnijom analizom dobivenih podataka, odlučila sam sekvenciranjem utvrditi točan nukleotidni slijed promatrane regije gena *tdp2a* za dva embrija navedene ženke koji su imali najveća odstupanja u temperaturi taljenja. Njihove su derivacijske krivulje taljenja prikazane na Slici 19 gdje je embrij-1 imao $T_m = 76.6$ °C i Slici 20 za embrij-2 s $T_m = 78.2$ °C. Primjer embrija ženke kod kojeg nema značajne razlike u odnosu na kontrolne uzorke prikazan je na Slici 21. HRM rezultati ostale četiri analizirane ženke nisu prikazani jer su njihovi embriji imali krivulje divljeg tipa.



Slika 19. Rezultat metode mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM) liziranog embrija-1 zebrice Tdp2a-Ž za pronalazak riba utemeljitelja s mutacijom u genu *tdp2a*. Krivulja embrija-1 označena je žutom bojom ($T_m = 76.6$ °C), a crvenom su prikazane krivulje embrija divljeg tipa ($T_m = 77.6 - 77.8$ °C). Podaci su obrađeni pomoću računalnog programskog paketa *High Resolution Melt Software* verzije 3.2.

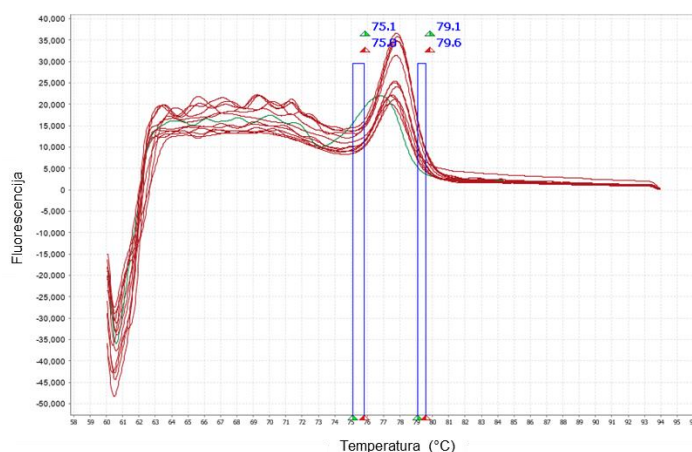


Slika 20. Rezultat metode mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM) liziranog embrija-2 zebrice Tdp2a-Ž za pronalazak riba utemeljitelja s mutacijom u genu *tdp2a*. Krivulja embrija-2 označena je plavom bojom ($T_m = 78.2$ °C), a crvenom su prikazane krivulje embrija divljeg tipa ($T_m = 77.6 - 77.8$ °C). Podaci su obrađeni pomoću računalnog programskog paketa *High Resolution Melt Software* verzije 3.2.



Slika 21. Rezultat metode mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM) liziranih embrija HRM-a negativne ženke zebrice za pronalazak riba utemeljitelja s mutacijom u genu *tdp2a*. Krivulje embrija testirane ženke ($T_m = 77.6 - 77.8$ °C) i embrija divljeg tipa ($T_m = 77.6 - 77.8$ °C) prikazane su crvenom bojom. Podaci su obrađeni pomoću računalnog programskog paketa *High Resolution Melt Software* verzije 3.2.

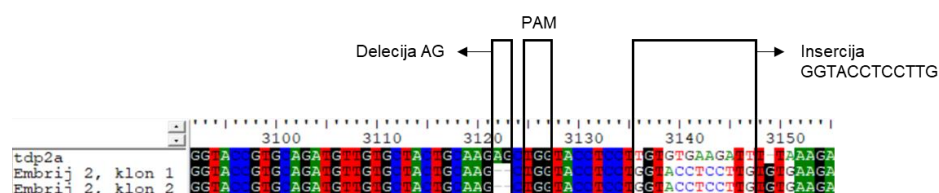
Utvrđivanje mužjaka zebrice koji mutacije u genu *tdp2a* prenosi na potomstvo napravila sam na isti način kao i za ženku. Na Slici 22 prikazana je derivacijska krivulja taljenja za HRM-a pozitivnog mužjaka zebrice (nazvanog Tdp2a-M) čije potomstvo ima različite krivulje, crvenu krivulju divljeg tipa i zelenu koja pokazuje promjenu u sekvenci. Embrij-3 s promjenom u temperaturi taljenja imao je $T_m = 76.8$ °C, za razliku od kontrolne T_m u rasponu $77.6 - 77.8$ °C kakvu je imalo i ostalih devet embrija analiziranog mužjaka. Uzorak embrija-3 također sam pripremila za sekvenciranje i utvrđivanje točnih mutacija. HRM-a rezultati ostalih četiri analiziranih mužjaka nisu prikazani jer su njihovi embriji imali sekvence divljeg tipa.



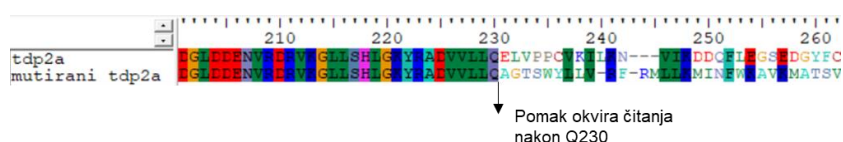
Slika 22. Rezultat metode mekšanja DNA visoke rezolucije (HRM) liziranog embrija-3 zebrice Tdp2a-M za pronalazak riba utemeljitelja s mutacijom u genu *tdp2a*. Krivulja embrija-3 označena je zelenom bojom ($T_m = 76.8$ °C), a crvenom su prikazane krivulje embrija divljeg tipa ($T_m = 77.8 - 77.9$ °C). Podaci su obrađeni pomoću računalnog programskog paketa *High Resolution Melt Software* verzije 3.2.

4.2.3. Analiza nukleotidnih sekvenci za utvrđivanje mutacija u genu *tdp2a*

Za uzgoj riba s mutacijama u genu *tpd2a*, potrebno je križati mužjaka i ženku koji u germinativnim stanicama imaju definirane mutacije u željenoj regiji (prerani STOP kodon ili pomak okvira čitanja). Analizirane nukleotidne sekvence HRM-pozitivnog embrija-1 jedinke Tdp2a-Ž prikazane su na Slici 23. Od deset sekvenciranih klonova, dva su imala mutacije u željenoj regiji: deleciju od dva nukleotida AG (3122 – 3123) i inserciju od 12 nukleotida GGTACCTCCTTG (3135 – 3136). Ostali klonovi embrija-1 imali su sekvencu divljeg tipa, kao i svi klonovi embrija-2, a zbog toga nisu prikazani. Analizom navedenih mutacija u aminokiselinskom slijedu, odredila sam da dolazi do pomaka u okviru čitanja nakon glutamina na poziciji 230 (Slika 24). Na temelju ovih podataka, odabrala sam ženku Tdp2a-Ž koja se može koristiti za uzgoj F1 generacije sa željenom mutacijom u *tdp2a*.

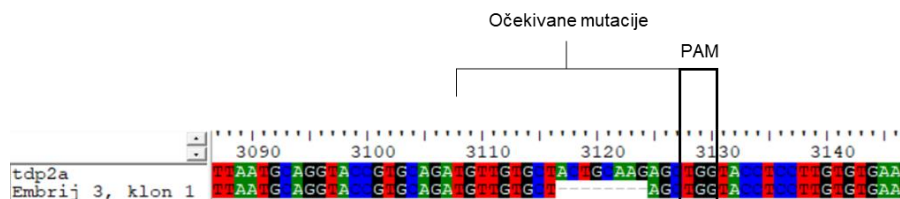


Slika 23. Poravnate nukleotidne sekvence klonova HRM-a pozitivnog embrija-2 jedinke Tdp2a-Ž. Prva prikazana sekvenca odgovara genu *tpd2a* ribe zebrice (*Danio rerio*). Klonovi 1 i 2 imaju mutacije: insercija AG (3122 – 3123) i delecija GGTACCTCCTTG (3135 – 3136). PAM označava motiv uz protorazmaknicu uz kojeg je područje očekivanih mutacija. Analiza sekvenci izvršena je pomoću računalnog programskog paketa *BioEdit* verzije 7.2, a uzorke je sekvencirala tvrtka *Macrogen*.

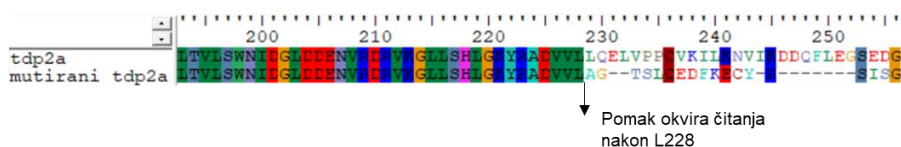


Slika 24. Poravnate aminokiselinske sekvence gena *tdp2a* ribe zebrice (*Danio rerio*) divljeg tipa i gena s pomakom u okviru čitanja nakon glutamina na poziciji 230 (Q230). Analiza sekvenci izvršena je pomoću računalnog programskog paketa *BioEdit* verzije 7.2, a uzorke je sekvencirala tvrtka *Macrogen*.

Analizirane nukleotidne sekvence HRM-pozitivnog embrija-3 jedinke Tdp2a-M prikazane su na Slici 25. Od šest sekvenciranih klonova, četiri su imala mutaciju u željenoj regiji: deleciju od osam nukleotida ACTGCAAG (3114 – 3121). Ostali klonovi embrija-1 imali su sekvencu divljeg tipa i zbog toga nisu prikazani. Analizom navedene mutacije u aminokiselinskom slijedu, odredila sam da dolazi do pomaka u okviru čitanja nakon leucina na poziciji 228 (Slika 26). Na temelju ovih podataka, odabrala sam mužjaka Tdp2a-M koji se može koristiti za uzgoj F1 generacije sa željenom mutacijom u *tdp2a*.



Slika 25. Poravnate nukleotidne sekvence klonova HRM-a pozitivnog embrija-3 jedinke Tdp2a.M. Prva prikazana sekvenca odgovara genu *tpd2a* ribe zebrice (*Danio rerio*). Klon 1 ima deleciju ACTGCAAG (3114 – 3121). PAM označava motiv uz protorazmaknicu uz kojeg je područje očekivanih mutacija. Analiza sekvenci izvršena je pomoću računalnog programskog paketa *BioEdit* verzije 7.2, a uzorke je sekvencirala tvrtka *Macrogen*.



Slika 26. Poravnate aminokiselinske sekvence gena *tdp2a* ribe zebrice (*Danio rerio*) divljeg tipa i gena s pomakom u okviru čitanja nakon leucina na poziciji 228 (L228). Analiza sekvenci izvršena je pomoću računalnog programskog paketa *BioEdit* verzije 7.2, a uzorke je sekvencirala tvrtka *Macrogen*.

Nakon identifikacije ženke i mužjaka koji u germinativnim stanicama imaju mutacije u genu *tdp2a*, jedinke su križane kako bi se uzgojilo njihovo potomstvo. Obje jedinke imaju germinativne stanice s genom divljeg tipa i varijantu s promjenom u okviru čitanja. Očekivana genotipska raspodjela njihovog potomstva uključuje 25 % jedinki divljeg tipa, 50 % heterozigota i 25 % homozigota. Homozigotne jedinke imaju dva različita alela s promjenom u okviru čitanja, ali u oba slučaja eksprimirani protein ima promijenjenu strukturu. Na broj homozigotnih jedinki F1 generacije također utječe i udio germinativnih stanica roditelja koje sadrže željene mutacije. Vijabilnost potomstva Tdp2a-Ž i Tdp2a-M nakon 24 h iznosila je 51 % i uzgojene su 64 jedinke F1 generacije. Ovim je postupkom uspješno dobivena F1 generacija koja se može koristiti da daljnje eksperimente i proučavanje uloge mutacija u *tdp2a*.

5. RASPRAVA

Animalni modeli ključni su za biomedicinska istraživanja i razumijevanje bolesti te uloge pojedinih proteina u složenim staničnim procesima. Razvoj tehnika genetičkog inženjerstva omogućio je primjenu ciljane mutageneze za uvođenje mutacija u gen od interesa. Na taj se način može promijeniti razina ekspresije ili eksprimirati mutirani protein koji je povezan s pojedinim fenotipskim obilježjima bolesti čovjeka. Mutacije transkripcijskih faktora i insercije reporterskih gena mogu pomoći u razumijevanju regulacije ekspresijskog profila stanica (Yan i sur., 2009). Genom ribe zebriće sadrži ortologne gene za sve eukariotske puteve popravka oštećenja DNA te se zebrića često koristi kao animalni model za proučavanje njihovih uloga (Pei i Strauss, 2013). Zbog toga je uvođenjem mutacija u gene za *Sprtn* i *Tdp2a*, ključne faktore u popravku unakrsnih vezanja DNA-protein, moguće proučavati njihov utjecaj na fenotip i razvoj bolesti.

U sklopu diplomskog rada dizajnirala sam i testirala pet gRNA u svrhu pronalaska efikasnog sustava CRISPR/Cas9 ili CRISPR/Cas12a za uvođenje mutacije L147A u katalitičku regiju gena *sprtn* ribe zebriće. Primjena sustava CRISPR za izradu animalnog modela omogućit će proučavanje posljedica smanjene proteazne aktivnosti enzima *Sprtn* na popravak DPC i sam fenotip organizma. Za odabir gRNA za sustav CRISPR/Cas9, program *CRISPRScan* algoritamski predviđa efikasnost sustava i mogućnost nespecifičnog vezanja gRNA na druga područja u genomu ribe zebriće, što mi je olakšalo odabir gRNA za daljnja testiranja. Međutim, s obzirom da se sustav CRISPR/Cas12a tek nedavno počeo koristiti u svrhu genetskog inženjerstva, još nije dostupna dovoljna količina informacija za izračun efikasnosti pomoću navedenog programa i bilo je teže odabrati potencijalne gRNA za uvođenje željenih mutacija (Swarts i Jinek, 2018). Ispitivanja efikasnosti gRNA dizajniranih pomoću algoritamskih izračuna pokazala su kako je samo 30 % testiranih gRNA imalo mjerljivu aktivnost *in vivo* (Uusi-Mäkelä i sur., 2018). Također, zebričin genom sadrži brojne polimorfizme, a introni se sastoje od 47 % repetitivnih sekvenci (Guryev i sur., 2006; Moss i sur., 2011). Zbog toga je teže pronaći gRNA i početnice koje se specifično vežu samo na jedno područje u njihovom genomu. Kako je egzon s katalitičkom regijom gena *sprtn* dosta malen (128 bp), sve odabrane gRNA (osim gRNA-D) dizajnirane su u području okolnih introna (drugi i treći intron). Također, odabrala sam gRNA koje su međusobno udaljene minimalno 500 nukleotida za različite sustave (Cas9 i Cas12) kako bih testirala efikasnost vezanja gRNA i navođenja nukleaze u različitim regijama gena.

Za unošenje kompleksa Cas9 ili Cas12a i odgovarajuće gRNA u zebrice proveden je postupak mikroinjektiranja smjese u žumanjčanu vrećicu jednostaničnog stadija embrija. Primijetila sam da je vijabilnost injektiranih embrija bila niža od vijabilnosti neinjektiranih embrija nakon 24 h. Ovo je vjerojatno posljedica samog postupka mikroinjektiranja u kojem se iglom ulazi u žumanjčanu vrećicu i pomoću mikroinjektora izbacuje željeni volumen smjese. Primijećeno je kako injektiranje malog volumena vode istim postupkom dovodi do 20 % veće smrtnosti embrija zebrice (Schubert i sur., 2014), što je u skladu s dobivenim izračunima vijabilnosti ovog eksperimenta. Mikroinjektiranje u samu zigotu dovelo bi do još veće smrtnosti embrija, a efikasnost sustava CRISPR nije značajno smanjena injektiranjem u žumanjčanu vrećicu (Wu i sur., 2018). Također, mikroinjektiranje smjese volumena većeg od 1 nl dovelo je do mnogo niže vijabilnosti (27 %), za razliku od injektiranja iste smjese od 1 nl (84 %). Ovi su rezultati u skladu s poznatim podacima o negativnom učinku injektiranja većih smjesa koje dovodi do oticanja žumanjčane vrećice i izlivanja njenog sadržaja, a time je smanjena vijabilnost embrija zebrice (Schubert i sur., 2014). Neka istraživanja predlažu elektroporaciju kao alternativni način ubacivanja smjese enzima Cas9/Cas12a i gRNA u embrije, no i za ovaj je postupak potrebno optimizirati trajanje elektroporacije kako bi se smanjila smrtnost embrija (Modzelewski i sur., 2018).

Pronašla sam dvije gRNA (gRNA-B za Cas9 i gRNA-E za Cas12a) koje su ribonukleoproteinski kompleks dovele do ciljanog mjesta te su Cas9 ili Cas12a uveli mutacije u regiju od interesa. Efikasnost uvođenja mutacija (insercija ili delecija) pomoću gRNA-B i Cas9 bila je vrlo niska te je u samo 2% analiziranih klonova injektiranih embrija pronađena mutirana nukleotidna sekvenca. Kako je nakon T7 endonukleaznog testa bilo vidljivo da većina jedinki (67 %) ima određeni udio mutiranih sekvenci, pretpostavljam da je ovaj sustav doveo do uvođenja mutacija, ali samo u malom postotku stanica. Primjena gRNA-B za uvođenje *knock-in* mutacije vjerojatno bi rezultirala jedinkom koja u velikoj većini stanica ima gen divljeg tipa, što bi otežalo kasniji pronalazak zebrice koja željenu mutaciju ima u stanicama germinativne linije i prenosi ju na potomstvo. Kako bi što veći broj stanica primio mutirani oblik gena, poželjno je da se mutageneza dogodi u prvih 40 minuta nakon fertilizacije, odnosno prije prve embrionalne diobe. S druge strane, embrionalni genom nije transkripcijski aktivan u prvih šest sati nakon oplodnje, dok ne dođe do razgradnje transkripata koji su porijeklom iz majčine jajne stanice (Aanes i sur., 2011). Pretpostavlja se kako je transkripcijski inaktivan kromatin nepogodan za mutagenezu jer je otežano spajanje gRNA s ciljanim mjestom u genomu, što smanjuje učestalost uvođenja DSB-ova (Uusi-Mäkelä i sur., 2018). S druge strane,

u embrionalnom razvoju događaju se konstantne promjene u konformaciji kromatina zbog čestih dioba i potrebe za replikacijom genoma, što bi moglo omogućiti pristup gRNA i nukleazi. Zbog ovih složenih procesa teško je predvidjeti efikasnost pojedinog sustava *in vivo* koristeći samo algoritamske izračune.

Za razliku od gRNA-B, 100 %-tna efikasnost sustava Cas12a i gRNA-E nakon T7 endonukleaznog testa označavala je značajno bolju vjerojatnost uvođenja mutacija u željenu regiju gena *sprtn*. Izražene vrpce na agaroznom gelu ukazivale su na uspješnost uvođenja mutacija u svim injektiranim jedinkama, a prema jačini fragmenata pretpostavila sam kako je značajan udio stanica imao mutirani oblik gena i uvedene delecije potvrdila sekvenciranjem. Istraživanja su pokazala kako samo 5 – 15 % jedinki mutacije nakon ugradnje kalupa za popravak prenosi na potomstvo (Hoshijima i sur., 2016). Zbog toga je bitno prilikom odabira sustava za izradu *knock-in* mutanata odabrati vrlo efikasnu gRNA kako bi se povećala vjerojatnost pronalaska riba utemeljitelja injektiranjem manjeg broja embrija (Hoshijima i sur., 2016). S obzirom na najveću efikasnost cijepanja, odabrala sam gRNA-E za provedbu ciljanu mutagenezu korištenjem sustava CRISPR/Cas12a i odgovarajućeg RT-a.

Prilikom određivanja efikasnosti sustava Cas9 s gRNA-A i gRNA-B, primijetila sam nespecifične fragmente nakon umnažanja DNA za T7 endonukleazni test i agarozne gel elektroforeze. Vrpce na gelu označavale su DNA veličina 100 – 400 bp, što je manje od očekivanih 502 i 574 bp. Ovo je rezultat nespecifičnog vezanja početnica i umnažanja drugih dijelova zebričinog genoma. Ti su fragmenti bili prisutni na gelovima i nakon provedbe T7 endonukleaznog testa i otežali interpretaciju rezultata jer je potrebno odrediti točne veličine fragmenta za utvrđivanje efikasnosti sustava. Kao što je već spomenuto, većina dizajniranih gRNA i početnica komplementarna je intronskim regijama gena *sprtn* koje su bogate ponavljajućim sljedovima nukleotida te su se početnice vjerojatno vezale za introne drugih gena. Ovaj bi se problem mogao riješiti izrezivanjem i pročišćavanjem željenog fragmenta iz gela nakon provedbe PCR-a kako bi se uklonili nespecifični fragmenti, ali prilikom purifikacije došlo bi do gubitka određene količine produkta. Zbog toga bi vrpce na gelu bile slabijeg intenziteta i također otežale interpretaciju rezultata.

Nakon transkripcije *in vitro* i pročišćavanja RNA, primijetila sam dodatne vrpce na gelu s uzorcima gRNA-A i gRNA-B. Slab signal ispod 100 bp vjerojatno je nastao zbog degradacije RNA prilikom rukovanja uzorcima. Molekule RNA vrlo su osjetljive zbog jednolančane strukture i podložne razgradnji pri izlaganju RNazama koje se nalaze na koži i

mikroorganizmima u zraku (Fabre i sur., 2014). Također, oprema i uređaji koje sam koristila upotrebljavaju se i za druge eksperimente i nisu predviđeni samo za rad s RNA. Zbog tih je razloga vjerojatno došlo do degradacije dijela uzoraka, no dobivene koncentracije nakon pročišćavanja RNA bile su dovoljne za nastavak eksperimenata. Veće vrpce na gelovima za iste gRNA vjerojatno su nastale zbog dimerizacije i stvaranja sekundarnih struktura molekula RNA. Takve bi se strukture mogle ukloniti zagrijavanjem uzoraka pet minuta na 70 °C prije nanošenja na gel kako bi došlo do denaturacije, ali ovaj postupak nisam provela jer takve vrpce nisu bile prisutne za ostale uzorke (Modzelewski i sur., 2018).

Degradaciju uzoraka primijetila sam i nakon umnažanja kontrolnih uzoraka za T7 endonukleazni test. Pozitivnu i negativnu kontrolu koristila sam prilikom svakog testiranja kako bih potvrdila rezanje heterodupleksa i nastajanje dva manja fragmenta nakon dodatka endonukleaze kod T7 (+), odnosno izostanak rezanja kod T7 (-) koji ne sadrži heteroduplekse. Kako sam iste uzorke koristila za sve eksperimente, epruvete s lizatom kontrolnih embrija odmrznula sam i zamrznula više puta. Pretpostavljam da je opetovano formiranje kristalića leda u blizini DNA dovelo do loma molekula i povećanog udjela fragmenta manjih od 100 bp zbog smanjenja dostupnog kalupa za vezanje početnica prilikom PCR-a. Ta je pojava primijećena istraživanjem učinaka odmrzavanja i zamrzavanja uzoraka nukleinskih kiselina (Shao i sur., 2012). Lizati embrija za ispitivanje efikasnosti dizajniranih gRNA nisu imali degradirane fragmente jer su korišteni i odmrznuti samo jednom, što nije bilo dovoljno za značajno oštećenje genomske DNA.

Za stvaranje mutacije L147A u katalitičkoj regiji gena *sprtn* koristila sam sustav CRISPR/Cas12a, gRNA-E i kalup za popravak u koji sam uvela željenu mutaciju. Istraživanja su pokazala kako postoje prednosti korištenja Cas12a umjesto Cas9 za mutagenezu: bolja specifičnost vezanja njihove gRNA i ostavljanje 5' ljepljivog kraja nakon dvolančanog loma (Fernandez i sur., 2018). Zbog visoke efikasnosti gRNA-E u navođenju Cas12a koju sam odredila T7 endonukleaznim testom, pretpostavila da će u velikom broju slučajeva Cas12a uspješno uvesti dvolančani lom i nakon mikroinjektiranja smjese za ciljanu mutagenezu. Poznato je kako sustav CRISPR/Cas12a učinkovito uvodi insercijske i delecije mutacije zbog popravka nehomolognim spajanjem krajeva te da ima bolju učinkovitost induciranja popravka homolognom rekombinacijom u zebrica od Cas9 (Moreno-Mateos i sur., 2017). Usprkos tome, učestalost HR-a s kalupom za popravak i sustavom CRISPR/Cas12a u zebrica iznosila je manje od 10 % (Moreno-Mateos i sur., 2017). Zbog toga sam pretpostavila da će u

značajnom broju slučajeva Cas12a inducirati DSB, ali ne će doći do jednakog broja ugradnje kalupa za popravak.

Kako bih testirala ovu hipotezu, koristila sam dvije smjese za injektiranje i ciljanu mutagenezu. Smjesa B imala je dvostruko više RT-a na istu količinu enzima Cas12a i gRNA-E kako bih povećala dostupnost kalupa unutarstaničnim proteinima za popravak oštećenja DNA putem homologne rekombinacije. Proučavanjem embrija starih četiri dana pod mikroskopskom lupom i plavim svjetlom, odredila sam broj embrija s ugrađenim RT-om prema prisutnosti fluorescirajućeg markera *mVenus* u leći oka zebriće. Udio *mVenus*-pozitivnih embrija nakon injektiranja smjese B bio je gotovo dva puta veći, odnosno korištenje veće količine kalupa za popravak rezultiralo je boljom efikasnošću ugradnje kalupa i mutageneze na embrijima zebriće.

Prilikom selekcije embrija zebriće za daljnji uzgoj *sprtn* mutanata, primijetila sam kako većina embrija pozitivnih na *mVenus* (60 %) nije bila vijabilna treći dan nakon mikroinjektiranja, a imali su i izražene razvojne poteškoće. Također, od deset vijabilnih jedinki pozitivnih na *mVenus*, samo ih je pet doživjelo starost od dva tjedna. Ovi bi rezultati mogli upućivati na učinak uvedene mutacije L147A u genu *sprtn* na razvoj i preživljavanje zebrića ukoliko mutirani protein ne može formirati pravilnu konformaciju aktivnog mjesta (Vaz i sur., 2016). Mutacija katalitičke regije gena *SPRTN* (Tyr117Cys, koja odgovara mutaciji Leu147Ala iz diplomskog rada) u ljudi uzrokuje sindrom Rujis-Aalfs kojeg karakteriziraju preuranjeno starenje i razvoj hepatocelularnog karcinoma u mladoj dobi (Lessel i sur., 2014). *SPRTN* s mutacijom Tyr117Cys ima samo oko 25 % sposobnosti proteina divljeg tipa da proteolitički reže vlastitu domenu na C-kraju te skoro u potpunosti gubi sposobnost razgradnje histona H3 te topoizomerase I i II, proteina koji kovalentnim vezanjem na DNA uzrokuju DPC (Vaz i sur., 2016).

Poznato je kako miševi bez ekspresije gena *sprtn* nisu vijabilni, a jedinke s mutiranim proteinom (Glu112Ala) ubrzano stare i pokazuju kromosomsku nestabilnost (Maskey i sur., 2014). Također, blokiranje translacije mRNA za *sprtn* pomoću metode morfolino u embrijima zebriće dovelo je do usporenog rasta i povećane smrtnosti embrija (Lessel i sur., 2014). Prema ovim podacima, pretpostavljam da bi uočene fenotipske karakteristike i niske stope vijabilnosti mogle biti uzrokovane uvedenom mutacijom u katalitičkoj regiji gena *sprtn*. Kako je poznato da *Sprtn* ima važnu ulogu u uklanjanju DPC tijekom sinteze DNA (Vaz i sur., 2016; Li i sur., 2019), vjerojatno je došlo do akumulacije oštećenja DNA i genomske nestabilnosti.

Nakupljanje DPC topoizomeraze I i aneuploidije primijećeni su u jetri miševa s mutiranim *Sprtn*-om (Glu112Ala) (Maskey i sur., 2014). Kako bi se potvrdila ova hipoteza, trebalo bi uzgojiti veći broj jedinki s mutiranim proteinom i odrediti imaju li veću stopu nastajanja DPC od zebrića divljeg tipa. Također bi se mogli napraviti eksperimenti za utvrđivanje osjetljivosti mutanata *Sprtn* na modelne induktore DPC poput formaldehida.

Korištenjem kalupa za popravak s reporterskim genom uspješno sam selektirala jedinke zebrića u kojima se dogodila homologna rekombinacija i ugradnja RT-a. S druge strane, potrebno je potvrditi točnu lokaciju ugradnje kalupa jer je moguće da u manjem broju slučajeva nije ugrađen u ciljanu regiju gena *sprtn*. Naime, kao kalup je korišten dugačak segment gena *sprtn* od 2 kb jer je pokazano kako su RT-ovi takve veličine vrlo efikasni za uvođenje ciljanih mutacija (Beumer i sur., 2013), ali je također primijećeno da se linearni dvolančani RT-ovi mogu integrirati u druge dijelove genoma (Singh i sur., 2015). Za postupak utvrđivanja lokacije ugradnje RT-a mogla bi se koristiti metoda PCR sa specifičnim početnicama. Jedna bi se početnica vezala za dio RT-a koji nije iz zebrićinog genoma (poput ostataka plazmida nakon izrezivanja fragmenta), a druga na dio gena *sprtn* koji je izvan kalupa. Agaroznom gel elektroforezom moglo bi se utvrditi jesu li dobiveni fragmenti očekivane veličine, a sekvenciranjem bi se utvrdio točan slijed produkta. Također, potrebno je provjeriti je li do ugradnje RT-a došlo samo na željenom mjestu u genomu jer bi se u protivnom uvele nepoželjne mutacije s nepoznatim utjecajem. Za ovaj postupak mogla bi se koristiti metoda Southern blot s probama koje su specifične za dio korištenog kalupa za popravak (Guttikonda i sur., 2016). Za uzgoj homozigota s mutiranim genom *sprtn*, potrebno je uzgojiti zebriće koje specifične željene mutacije imaju u stanicama germinativne linije. Križanjem takvih jedinki i selekcije potomstva, može se uzgojiti linija s dva mutirana alela za daljnja istraživanja.

Za proučavanje uloge Tdp2a u popravku DPC korišten je sustav CRISPR/Cas9 za uvođenje mutacija u gen *tdp2a* ribe zebrića (*Danio rerio*). Uvođenje preuranjenog STOP kodona ili pomaka u okviru čitanja rezultirat će promjenom aminokiselinske sekvence transliranog proteina, a time se može promijeniti efikasnost enzimske aktivnosti ili čak u potpunosti spriječiti sposobnost hidrolize fosfotirozinske veze između topoizomeraze II i DNA. Nakon mikroinjektiranja kompleksa Cas9 i gRNA, uvedeni su DSB-ovi i stanični mehanizmi popravili su nastala oštećenja u DNA, a različite stanice jedne jedinke imale su različite mutacije koje su pritom nastale. Učestalost popravka NHEJ-om tri puta je veća od učestalosti HR-a u ciklirajućim stanicama (Mao i sur., 2008), što omogućava lakše dobivanje

mutanata s insercijama i delecijama od *knock-in* mutanata ugradnjom kalupa za popravak. S druge strane, već je spomenuto kako su embrionalne diobe zebrice vrlo brze i mutageneza je ponekad uspješna u malom broju stanica (Aanes i sur., 2011; Uusi-Mäkelä i sur., 2018). Također, u ovom je slučaju selekcija jedinki s mutiranim genom otežana jer nema ugradnje reporterskog gena te je za utvrđivanje utemeljitelja za model s mutacijom u *tdp2a* bilo potrebno križati jedinke sa zebricama divljeg tipa i odrediti točan tip mutacije koju prenose. Metoda mekšanja DNA visoke rezolucije pokazala se kao brz i jednostavan način za skeniranje većeg broja potomstva različitih jedinki u isto vrijeme, a bila je dovoljno osjetljiva za detekciju uvedenih insercijskih i delecijjskih mutacija.

Istraživanje katalitičke aktivnosti mišjeg Tdp2 pokazalo je kako su za procesiranje 5' adukata važne aminokiseline hidrofobnog džepa oko Met214 (Schellenberg i sur., 2012). Pretpostavlja se kako Asp272 aktivira molekulu vode za nukleofilni napad, a ion Mg^{2+} i aminokiseline His236, His359 i Ser239 interagiraju s 5'-PO₄ te stabiliziraju prijelazno stanje kompleksa. Mutacije konzervirane katalitičke baze Asp272 ili aminokiselina bitnih za stabilizaciju kompleksa Ser239 i His359 narušavaju katalitičku aktivnost Tdp2 (Schellenberg i sur., 2012). Supstitucije aminokiselina Asn120, Glu152, Asp262 i His351 ljudskog Tdp2 također značajno smanjuju ili u potpunosti onemogućuju katalitičku aktivnost enzima (Gao i sur., 2012). Analizom nukleotidnih sekvenci potomstva injektiranih riba zebrica s detektiranim mutacijama, zaključila sam kako jedinka Tdp2a-Ž ima pomak u okviru čitanja nakon Glu230, a Tdp2a-M nakon Leu228. Zbog insercijskih i delecijjskih mutacija, aminokiselinski slijed nakon Glu230 i Leu228 bit će promijenjen. Zaključila sam kako će zbog ovog doći do promjene konzerviranih aminokiselina koje su bitne za stabilizaciju prijelaznog stanja prilikom katalitičke aktivnosti enzima Tdp2a. Homozigotno potomstvo za mutacije u *tdp2a* pronađenih riba utemeljitelja imat će narušenu aktivnost Tdp2a, a vjerojatno i sposobnost uklanjanja Top2 DPC.

Prilikom analize HRM krivulja potomstva, primijetila sam kako većina testiranih injektiranih jedinki (80 %) ne prenosi mutacije u *tdp2a* na potomstvo, što je vjerojatno posljedica niske efikasnosti korištene gRNA (20 %). Obje jedinke utemeljitelja imale su potomstvo s mutiranim genom i genom divljeg tipa. Kao što je očekivano, mutageneza se nije dogodila u prvih 40 minuta kada su embriji u jednostaničnom stadiju i jedinke su bile mozaične. Pronađena ženka imala je veći broj potomstva s mutiranim *tdp2a* od mužjaka te pretpostavljam kako je mužjak imao manji broj spermalnih stanica koje su primile mutiranu kopiju gena. Iako

bi 25 % njihovog potomstva trebalo biti homozigotno za mutaciju u *tdp2a*, taj je broj vjerojatno manji ako mužjak ima samo 10 % mutiranih germinativnih stanica. Za detaljnije analize trebalo bi skupiti veći broj potomaka jer sam za potrebe diplomskog rada testirala samo po deset embrija svake jedinke.

Prilikom analize vijabilnosti potomstva dva utemeljitelja Tdp2a-Ž i Tdp2a-M, odredila sam kako je samo 51 % jedinki bilo vijabilno nakon 24 h. Kako je Tdp2a bitan za očuvanje integriteta genoma, moguće je da embriji s jednom ili dvije kopije mutiranog alela imaju manju vjerojatnost preživljavanja. Delecija prva tri egzona mišjeg *tdp2* dovela je do smanjene mogućnosti popravka Top2 DPC, ali miševi nisu imali izražene razvojne poteškoće (Gómez-Herreros i sur., 2014). Također, zebrice imaju dva ortologa gena *tdp2*: *tdp2a* i *tdp2b*, tako da je teže uspoređivati učinak mutacija s organizmima koji imaju samo jednu varijantu gena. Kako je aktivnost topoizomera bitna za osnovne stanične funkcije poput replikacije i transkripcije, pretpostavlja se kako stvaranje Top2 DPC i nemogućnost njihova uklanjanja zbog nedostatka funkcionalnog Tdp2 može promijeniti ukupnu staničnu razinu transkripcije. Pokazano je kako delecija prva tri egzona *tdp2* smanjuje razinu ekspresije više od 100 gena u mozgu miševa, što bi moglo utjecati na razvoj i preživljavanje jedinki (Gómez-Herreros i sur., 2014). Pretpostavljam kako će F1 homozigotno potomstvo s mutiranim *tdp2a* biti osjetljivije na tvari poput etoposida koji uzrokuju stvaranje kovalentno-vezanih Top2 na DNA, što je primijećeno i na miševima s deletiranim *tdp2* (Gómez-Herreros i sur., 2013).

Uzgojene jedinke ribe zebrice (*Danio rerio*) s mutacijom Leu147Ala predstavljaju prvi animalni model za proučavanje mutacije Tyr117Cys koja u ljudi uzrokuje sindrom Rujis-Aalfs. Na konstruiranom modelu moći će se detaljno istražiti utjecaj slabo efikasnog proteina Sprtn na popravak DPC tijekom embrionalnog razvoja i u različitim organskim sustavima odraslog stadija zebrice. Kako su pokušaji uzgoja miševa s *knock-out* mutacijom bili neuspješni (Maskey i sur., 2014), uzgoj homozigotne linije zebrica s navedenom mutacijom po prvi bi put omogućilo karakterizaciju proteazne funkcije Sprtn-a u sustavu *in vivo*. Za ovaj je sustav potrebno utvrditi jesu li homozigotni potomci zebrica s mutacijom Tyr117Cys vijabilni i uzgojiti ih za daljnja istraživanja. Uzgoj homozigotnog potomstva pronađenih utemeljitelja s mutacijama u *tdp2a* poboljšat će razumijevanje funkcije Tdp2a u popravku Top2 DPC, ali i potencijalnih učinaka mutacija na druge vrste DPC poput onih s topoizomerazom I. Također, nakon uzgoja homozigotnog potomstva za navedene mutacije u genima *sprtn* i *tdp2a*, otvara se mogućnost njihova križanja i uzgoja dvostrukih mutanata. Na taj bi se način konstruirao

animalni model za proučavanje sprege djelovanja proteina Tdp2 i Sprtn u sustavu *in vivo*, što do sad nije bilo moguće proučavati.

6. ZAKLJUČAK

U svrhu proučavanja popravka unakrsnih vezanja DNA-protein (engl. *DNA-protein crosslinks*; DPCs) izradila sam animalne modele s mutiranim oblicima proteina Sprtn (engl. *SprT-like domain at the N-terminus*, N-terminalna domena poput SprT) i Tdp2a (tirozil-DNA fosfodiesteraze 2a) koji su bitni za uklanjanje štetnih lezija na DNA i očuvanje integriteta genoma. Za provedbu ciljane mutageneze u genu *sprtn* ribe zebrice (*Danio rerio*) dizajnirala sam i testirala različite RNA vodilje (gRNA) za sustave CRISPR/Cas9 i CRISPR/Cas12a. Uspješno sam pronašla vrlo efikasnu gRNA za sustav CRISPR/Cas12a te dizajnirala i izradila kalup za popravak za uvođenje mutacije L147A u katalitičku regiju gena *sprtn*. Nakon mikroinjektiranja dizajniranog sustava, selektirala sam i uzgojila pet jedinki s ugrađenim kalupom za popravak.

Za uzgoj homozigotne linije ribe zebrice s mutiranim oblikom proteina Tdp2a, utvrdila sam prisutnost mutacija u genu *tdp2a* nakon mikroinjektiranja sustava CRISPR/Cas9 za uvođenje mutacija. Uspješno sam pronašla mušku i žensku jedinku koje na potomstvo prenose gen *tdp2a* s pomakom u okviru čitanja nakon aminokiselina na poziciji 230, odnosno 228. Križanjem ovih jedinki, uzgojila sam njihovo potomstvo koje se može koristiti za selekciju homozigotnih jedinki za mutirani *tdp2a*. Konstruirani animalni modeli mogu poslužiti za bolje razumijevanje kompleksnih puteva popravka DNA oštećenja na *in vivo* modelu kralježnjaka i imati potencijalne primjene u liječenju bolesti čovjeka uzrokovanih mutacijama u navedenim genima.

7. LITERATURA

Aanes, H., Winata, C. L., Lin, C. H., Chen, J. P., Srinivasan, K. G., Lee, S. G., ... & Mathavan, S. (2011). Zebrafish mRNA sequencing deciphers novelties in transcriptome dynamics during maternal to zygotic transition. *Genome research*, 21(8), 1328-1338.

Adhikari, S., Karmahapatra, S. K., Karve, T. M., Bandyopadhyay, S., Woodrick, J., Manthena, P. V., ... & Uren, A. (2012). Characterization of magnesium requirement of human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase mediated reaction. *BMC research notes*, 5(1), 1-7.

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.

Babon, J. J., McKenzie, M., & Cotton, R. G. H. (2003). The use of resolvases T4 endonuclease VII and T7 endonuclease I in mutation detection. *Molecular biotechnology*, 23(1), 73-81.

Bahmed, K., Nitiss, K. C., & Nitiss, J. L. (2010). UnTTrapping the ends: A new player in overcoming protein linked DNA damage. *Cell research*, 20(2), 122-123.

Bandaru, V., Sunkara, S., Wallace, S. S., & Bond, J. P. (2002). A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to *Escherichia coli* endonuclease VIII. *DNA repair*, 1(7), 517-529.

Barker, S., Weinfeld, M., & Murray, D. (2005). DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 589(2), 111-135.

Beckert, B., & Masquida, B. (2011). Synthesis of RNA by *in vitro* transcription. *Methods in Molecular Biology*, 70(3), 29-41.

Beumer, K. J., Trautman, J. K., Mukherjee, K., & Carroll, D. (2013). Donor DNA utilization during gene targeting with zinc-finger nucleases. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 3(4), 657-664.

Bian, K., Muppani, N. R., Elkhadragey, L., Wang, W., Zhang, C., Chen, T., ... & Long, W. (2016). ERK3 regulates TDP2-mediated DNA damage response and chemoresistance in lung cancer cells. *Oncotarget*, 7(6), 6665.

Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, *151*(8), 2551-2561.

Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., ... & Van Der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, *321*(5891), 960-964.

Carte, J., Wang, R., Li, H., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2008). Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes & development*, *22*(24), 3489-3496.

Centore, R. C., Yazinski, S. A., Tse, A., & Zou, L. (2012). Spartan/C1orf124, a reader of PCNA ubiquitylation and a regulator of UV-induced DNA damage response. *Molecular cell*, *46*(5), 625-635.

Colosimo, A., Goncz, K. K., Holmes, A. R., Kunzelmann, K., Novelli, G., Malone, R. W., ... & Gruenert, D. C. (2000). Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques*, *29*(2), 314-331.

Conaway, C. C., Whysner, J., Verna, L. K., & Williams, G. M. (1996). Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation. *Pharmacology & therapeutics*, *71*(1-2), 29-55.

Cong, L., Zhou, R., Kuo, Y. C., Cunniff, M., & Zhang, F. (2012). Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains. *Nature communications*, *3*(1), 1-6.

Das, B. B., Antony, S., Gupta, S., Dexheimer, T. S., Redon, C. E., Garfield, S., ... & Pommier, Y. (2009). Optimal function of the DNA repair enzyme TDP1 requires its phosphorylation by ATM and/or DNA-PK. *The EMBO journal*, *28*(23), 3667-3680.

Das, B. B., Huang, S. Y. N., Murai, J., Rehman, I., Ame, J. C., Sengupta, S., ... & Pommier, Y. (2014). PARP1-TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage. *Nucleic acids research*, *42*(7), 4435-4449.

Deb ethune, L., Kohlhagen, G., Grandas, A., & Pommier, Y. (2002). Processing of nucleopeptides mimicking the topoisomerase I-DNA covalent complex by tyrosyl-DNA phosphodiesterase. *Nucleic acids research*, *30*(5), 1198-1204.

- Dellarco, V. L. (1988). A mutagenicity assessment of acetaldehyde. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 195(1), 1-20.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., ... & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602-607.
- 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.
- Deveau, H., Garneau, J. E., & Moineau, S. (2010). CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annual review of microbiology*, 64, 475-493.
- Dickie, P., McFadden, G., & Morgan, A. R. (1987). The site-specific cleavage of synthetic Holliday junction analogs and related branched DNA structures by bacteriophage T7 endonuclease I. *Journal of Biological Chemistry*, 262(30), 14826-14836.
- Do, P. M., Varanasi, L., Fan, S., Li, C., Kubacka, I., Newman, V., ... & Martinez, L. A. (2012). Mutant p53 cooperates with ETS2 to promote etoposide resistance. *Genes & development*, 26(8), 830-845.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213).
- 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.
- Druml, B., & Cichna-Markl, M. (2014). High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food chemistry*, 158, 245-254.
- Fabre, A. L., Colotte, M., Luis, A., Tuffet, S., & Bonnet, J. (2014). An efficient method for long-term room temperature storage of RNA. *European Journal of Human Genetics*, 22(3), 379-385.
- Fernandez, J. P., Vejnar, C. E., Giraldez, A. J., Rouet, R., & Moreno-Mateos, M. A. (2018). Optimized CRISPR-Cpf1 system for genome editing in zebrafish. *Methods*, 150, 11-18.

- Fielden, J., Ruggiano, A., Popović, M., & Ramadan, K. (2018). DNA protein crosslink proteolysis repair: From yeast to premature ageing and cancer in humans. *DNA repair*, 71, 198-204.
- Forterre, P., Gribaldo, S., Gadelle, D., & Serre, M. C. (2007). Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie*, 89(4), 427-446.
- Gao, R., Shar-yin, N. H., Marchand, C., & Pommier, Y. (2012). Biochemical characterization of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2/TTRAP): a Mg^{2+}/Mn^{2+} -dependent phosphodiesterase specific for the repair of topoisomerase cleavage complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(36), 30842-30852.
- Gao, R., Schellenberg, M. J., Shar-yin, N. H., Abdelmalak, M., Marchand, C., Nitiss, K. C., ... & 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). *Journal of Biological Chemistry*, 289(26), 17960-17969.
- Garcia, C. L., Mechilli, M., De Santis, L. P., Schinoppi, A., Katarzyna, K., & Palitti, F. (2009). Relationship between DNA lesions, DNA repair and chromosomal damage induced by acetaldehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 662(1-2), 3-9.
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), e6.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., & Rosenthal, A. (2000). Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 67(4), 773-782.
- Godde, J. S., & Bickerton, A. (2006). The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *Journal of Molecular evolution*, 62(6), 718-729.
- Gómez-Herreros, F., Romero-Granados, R., Zeng, Z., Alvarez-Quilon, A., Quintero, C., Ju, L., ... & Cortés-Ledesma, F. (2013). TDP2-dependent non-homologous end-joining protects against topoisomerase II-induced DNA breaks and genome instability in cells and *in vivo*. *PLoS genetics*, 9(3), e1003226.

Gómez-Herreros, F., Schuurs-Hoeijmakers, J. H., McCormack, M., Grealley, M. T., Rulten, S., Romero-Granados, R., ... & Caldecott, K. W. (2014). TDP2 protects transcription from abortive topoisomerase activity and is required for normal neural function. *Nature genetics*, *46*(5), 516-521.

Guryev, V., Koudijs, M. J., Berezikov, E., Johnson, S. L., Plasterk, R. H., Van Eeden, F. J., & Cuppen, E. (2006). Genetic variation in the zebrafish. *Genome research*, *16*(4), 491-497.

Guttikonda, S. K., Marri, P., Mammadov, J., Ye, L., Soe, K., Richey, K., ... & Kumpatla, S. P. (2016). Molecular characterization of transgenic events using next generation sequencing approach. *PLoS One*, *11*(2), e0149515.

Hashimoto, M., Greenberg, M. M., Kow, Y. W., Hwang, J. T., & Cunningham, R. P. (2001). The 2-deoxyribonolactone lesion produced in DNA by neocarzinostatin and other damaging agents forms cross-links with the base-excision repair enzyme endonuclease III. *Journal of the American Chemical Society*, *123*(13), 3161-3162.

Haurwitz, R. E., Jinek, M., Wiedenheft, B., Zhou, K., & Doudna, J. A. (2010). Sequence-and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*, *329*(5997), 1355-1358.

Heck, H. D. A., & 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.

Hoa, N. N., Shimizu, T., Zhou, Z. W., Wang, Z. Q., Deshpande, R. A., Paull, T. T., ... & Sasanuma, H. (2016). Mre11 is essential for the removal of lethal topoisomerase 2 covalent cleavage complexes. *Molecular cell*, *64*(3), 580-592.

Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, *327*(5962), 167-170.

Hoshijima, K., Jurynek, M. J., & Grunwald, D. J. (2016). Precise editing of the zebrafish genome made simple and efficient. *Developmental cell*, *36*(6), 654-667.

Howe, D. G., Bradford, Y. M., Eagle, A., Fashena, D., Frazer, K., Kalita, P., ... & Westerfield, M. (2017). The Zebrafish Model Organism Database: new support for human disease models, mutation details, gene expression phenotypes and searching. *Nucleic acids research*, *45*(D1), D758-D768.

- Huang, Y., & Li, L. (2013). DNA crosslinking damage and cancer – a tale of friend and foe. *Translational cancer research*, 2(3), 144.
- Hübner, M. R., Eckersley-Maslin, M. A., & Spector, D. L. (2013). Chromatin organization and transcriptional regulation. *Current opinion in genetics & development*, 23(2), 89-95.
- Hudson, J. J., Chiang, S. C., Wells, O. S., Rookyard, C., & El-Khamisy, S. F. (2012). SUMO modification of the neuroprotective protein TDP1 facilitates chromosomal single-strand break repair. *Nature communications*, 3(1), 1-13.
- Inamdar, K. V., Pouliot, J. J., Zhou, T., Lees-Miller, S. P., Rasouli-Nia, A., & Povirk, L. F. (2002). Conversion of phosphoglycolate to phosphate termini on 3' overhangs of DNA double strand breaks by the human tyrosyl-DNA phosphodiesterase hTdp1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 27162-27168.
- Interthal, H., Chen, H. J., & Champoux, J. J. (2005). Human Tdp1 cleaves a broad spectrum of substrates, including phosphoamide linkages. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43), 36518-36528.
- Interthal, H., Pouliot, J. J., & Champoux, J. J. (2001). The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12009-12014.
- Jansen, R., Embden, J. D. V., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565-1575.
- Jeon, Y., Choi, Y. H., Jang, Y., Yu, J., Goo, J., Lee, G., ... & Bae, S. (2018). Direct observation of DNA target searching and cleavage by CRISPR-Cas12a. *Nature communications*, 9(1), 1-11.
- Juhasz, S., Balogh, D., Hajdu, I., Burkovics, P., Villamil, M. A., Zhuang, Z., & Haracska, L. (2012). Characterization of human Spartan/C1orf124, an ubiquitin-PCNA interacting regulator of DNA damage tolerance. *Nucleic acids research*, 40(21), 10795-10808.
- Kim, M. S., Machida, Y., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., Pang, Y. P., & Machida, Y. J. (2013). Regulation of error-prone translesion synthesis by Spartan/C1orf124. *Nucleic acids research*, 41(3), 1661-1668.

- Klages-Mundt, N. L., & Li, L. (2017). Formation and repair of DNA-protein crosslink damage. *Science China Life Sciences*, *60*(10), 1065-1076.
- Kleff, S., & Kemper, B. (1988). Initiation of heteroduplex-loop repair by T4-encoded endonuclease VII *in vitro*. *The EMBO journal*, *7*(5), 1527-1535.
- Landsberger, M., Gandon, S., Meaden, S., Rollie, C., Chevallereau, A., Chabas, H., ... & van Houte, S. (2018). Anti-CRISPR phages cooperate to overcome CRISPR-Cas immunity. *Cell*, *174*(4), 908-916.
- Ledesma, F. C., El Khamisy, S. F., Zuma, M. C., Osborn, K., & Caldecott, K. W. (2009). A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature*, *461*(7264), 674-678.
- Lessel, D., Vaz, B., Halder, S., Lockhart, P. J., Marinovic-Terzic, I., Lopez-Mosqueda, J., ... & Kubisch, C. (2014). Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features. *Nature genetics*, *46*(11), 1239-1244.
- Li, C., Fan, S., Owonikoko, T. K., Khuri, F. R., Sun, S. Y., & Li, R. (2011). Oncogenic role of EAPII in lung cancer development and its activation of the MAPK-ERK pathway. *Oncogene*, *30*(35), 3802-3812.
- 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.
- Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, *8*(5), 353-367.
- Loeber, R., Michaelson, E., Fang, Q., Campbell, C., Pegg, A. E., & Tretyakova, N. (2008). Cross-linking of the DNA repair protein O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase to DNA in the presence of antitumor nitrogen mustards. *Chemical research in toxicology*, *21*(4), 787-795.
- 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.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J., ... & Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(2), 67-83.

- Mao, Y., Desai, S. D., Ting, C. Y., Hwang, J., & Liu, L. F. (2001). 26 S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 40652-40658.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2008). Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA repair*, 7(10), 1765-1771.
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 322(5909), 1843-1845.
- Maskey, R. S., Flatten, K. S., Sieben, C. J., Peterson, K. L., Baker, D. J., Nam, H. J., ... & Machida, Y. J. (2017). Spartan deficiency causes accumulation of Topoisomerase 1 cleavage complexes and tumorigenesis. *Nucleic acids research*, 45(8), 4564-4576.
- Maskey, R. S., Kim, M. S., Baker, D. J., Childs, B., Malureanu, L. A., Jeganathan, K. B., ... & Machida, Y. J. (2014). Spartan deficiency causes genomic instability and progeroid phenotypes. *Nature communications*, 5(1), 1-12.
- Mesapogu, S., Jillepalli, C. M., & Arora, D. K. (2013). Agarose gel electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis: methods and principles. *Analyzing Microbes* (pp. 73-91). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Minko, I. G., Zou, Y., & Lloyd, R. S. (2002). Incision of DNA-protein crosslinks by UvrABC nuclease suggests a potential repair pathway involving nucleotide excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 1905-1909.
- Modzelewski, A. J., Chen, S., Willis, B. J., Lloyd, K. K., Wood, J. A., & He, L. (2018). Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology. *Nature protocols*, 13(6), 1253-1274.
- Moreno-Mateos, M. A., Fernandez, J. P., Rouet, R., Vejnar, C. E., Lane, M. A., Mis, E., ... & Giraldez, A. J. (2017). CRISPR-Cpf1 mediates efficient homology-directed repair and temperature-controlled genome editing. *Nature communications*, 8(1), 1-9.
- Morocz, M., Zsigmond, E., Toth, R., Enyedi, M. Z., Pintér, L., & Haracska, L. (2017). DNA-dependent protease activity of human Spartan facilitates replication of DNA-protein crosslink-containing DNA. *Nucleic acids research*, 45(6), 3172-3188.

Mosbech, A., Gibbs-Seymour, I., Kagias, K., Thorslund, T., Beli, P., Povlsen, L., ... & Mailand, N. (2012). DVC1 (C1orf124) is a DNA damage-targeting p97 adaptor that promotes ubiquitin-dependent responses to replication blocks. *Nature structural & molecular biology*, *19*(11), 1084-1092.

Moss, S. P., Joyce, D. A., Humphries, S., Tindall, K. J., & Lunt, D. H. (2011). Comparative analysis of teleost genome sequences reveals an ancient intron size expansion in the zebrafish lineage. *Genome biology and evolution*, *3*, 1187-1196.

Murai, J., Shar-yin, N. H., Das, B. B., Dexheimer, T. S., Takeda, S., & Pommier, Y. (2012). Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) repairs DNA damage induced by topoisomerases I and II and base alkylation in vertebrate cells. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(16), 12848-12857.

Nakamura, Y., Itoh, T., Matsuda, H., & Gojobori, T. (2004). Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nature genetics*, *36*(7), 760-766.

Nakano, T., Katafuchi, A., Matsubara, M., Terato, H., Tsuboi, T., Masuda, T., ... & Ide, H. (2009). Homologous recombination but not nucleotide excision repair plays a pivotal role in tolerance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(40), 27065-27076.

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. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(7), 4649-4658.

Nakano, T., Morishita, S., Katafuchi, A., Matsubara, M., Horikawa, Y., Terato, H., ... & Ide, H. (2007). Nucleotide excision repair and homologous recombination systems commit differentially to the repair of DNA-protein crosslinks. *Molecular cell*, *28*(1), 147-158.

Nilsen, L., Forstrøm, R. J., Bjørås, M., & Alseth, I. (2012). AP endonuclease independent repair of abasic sites in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic acids research*, *40*(5), 2000-2009.

Nitiss, J. L. (2009). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, *9*(5), 338-350.

Nitiss, K. C., Malik, M., He, X., White, S. W., & Nitiss, J. L. (2006). Tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) participates in the repair of Top2-mediated DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(24), 8953-8958.

- Noguchi, C., Grothusen, G., Anandarajan, V., Martinez-Lage Garcia, M., Terlecky, D., Corzo, K., ... & Noguchi, E. (2017). Genetic controls of DNA damage avoidance in response to acetaldehyde in fission yeast. *Cell cycle*, *16*(1), 45-58.
- Nussenzweig, P. M., & Marraffini, L. A. (2020). Molecular mechanisms of CRISPR-Cas immunity in bacteria. *Annual Review of Genetics*, *54*, 93-120.
- Pawluk, A., Staals, R. H., Taylor, C., Watson, B. N., Saha, S., Fineran, P. C., ... & Davidson, A. R. (2016). Inactivation of CRISPR-Cas systems by anti-CRISPR proteins in diverse bacterial species. *Nature microbiology*, *1*(8), 1-6.
- Pei, D. S., & Strauss, P. R. (2013). Zebrafish as a model system to study DNA damage and repair. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *743*, 151-159.
- Pei, H., Yordy, J. S., Leng, Q., Zhao, Q., Watson, D. K., & Li, R. (2003). EAPII interacts with ETS1 and modulates its transcriptional function. *Oncogene*, *22*(18), 2699-2709.
- Perez, E. E., Wang, J., Miller, J. C., Jouvenot, Y., Kim, K. A., Liu, O., ... & June, C. H. (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*, *26*(7), 808-816.
- Pommier, Y. (2009). DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chemical reviews*, *109*(7), 2894-2902.
- Pommier, Y. (2013). Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS chemical biology*, *8*(1), 82-95.
- Pommier, Y., Barcelo, J. M., Rao, V. A., Sordet, O., Jobson, A. G., Thibaut, L., ... & Redon, C. (2006). Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, *81*, 179-229.
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., & Marchand, C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & biology*, *17*(5), 421-433.
- Pommier, Y., Shar-yin, N. H., Gao, R., Das, B. B., Murai, J., & Marchand, C. (2014). Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (tdp1 and tdp2). *DNA repair*, *19*, 114-129.

- Prasad, R., Horton, J. K., Chastain, P. D., Gassman, N. R., Freudenthal, B. D., Hou, E. W., & Wilson, S. H. (2014). Suicidal cross-linking of PARP-1 to AP site intermediates in cells undergoing base excision repair. *Nucleic acids research*, *42*(10), 6337-6351.
- Pype, S., Declercq, W., Ibrahim, A., Michiels, C., Van Rietschoten, J. G., Dewulf, N., ... & Remacle, J. E. (2000). TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor- κ B activation. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(24), 18586-18593.
- Quiévryn, G., & Zhitkovich, A. (2000). Loss of DNA-protein crosslinks from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteasome function. *Carcinogenesis*, *21*(8), 1573-1580.
- Ramadan, K., Halder, S., Wiseman, K., & Vaz, B. (2017). Strategic role of the ubiquitin-dependent segregase p97 (VCP or Cdc48) in DNA replication. *Chromosoma*, *126*(1), 17-32.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, *8*(11), 2281-2308.
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, *117*, 119-128.
- Raymond, A. C., Staker, B. L., & Burgin, A. B. (2005). Substrate specificity of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp1). *Journal of Biological Chemistry*, *280*(23), 22029-22035.
- Reardon, J. T., & Sancar, A. (2006). Repair of DNA-polypeptide crosslinks by human excision nuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(11), 4056-4061.
- Redding, S., Sternberg, S. H., Marshall, M., Gibb, B., Bhat, P., Guegler, C. K., ... & Greene, E. C. (2015). Surveillance and processing of foreign DNA by the *Escherichia coli* CRISPR-Cas system. *Cell*, *163*(4), 854-865.
- Rodrigues-Lima, F., Josephs, M., Katan, M., & Cassinat, B. (2001). Sequence analysis identifies TTRAP, a protein that associates with CD40 and TNF receptor-associated factors, as a member of a superfamily of divalent cation-dependent phosphodiesterases. *Biochemical and biophysical research communications*, *285*(5), 1274-1279.

- Sale, J. E., Lehmann, A. R., & Woodgate, R. (2012). Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nature reviews Molecular cell biology*, *13*(3), 141-152.
- Saleh-Gohari, N., & Helleday, T. (2004). Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic acids research*, *32*(12), 3683-3688.
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, *39*(21), 9275-9282.
- Schellenberg, M. J., Appel, C. D., Adhikari, S., Robertson, P. D., Ramsden, D. A., & Williams, R. S. (2012). Mechanism of repair of 5'-topoisomerase II-DNA adducts by mammalian tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2. *Nature structural & molecular biology*, *19*(12), 1363-1371.
- Schubert, S., Keddig, N., Hanel, R., & Kammann, U. (2014). Microinjection into zebrafish embryos (*Danio rerio*) – a useful tool in aquatic toxicity testing?. *Environmental Sciences Europe*, *26*(1), 1-8.
- Sczepanski, J. T., Wong, R. S., McKnight, J. N., Bowman, G. D., & Greenberg, M. M. (2010). Rapid DNA-protein cross-linking and strand scission by an abasic site in a nucleosome core particle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(52), 22475-22480.
- Shao, W., Khin, S., & Kopp, W. C. (2012). Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis. *Biopreservation and biobanking*, *10*(1), 4-11.
- Shi, K., Kurahashi, K., Gao, R., Tsutakawa, S. E., Tainer, J. A., Pommier, Y., & Aihara, H. (2012). Structural basis for recognition of 5'-phosphotyrosine adducts by Tdp2. *Nature structural & molecular biology*, *19*(12), 1372-1377.
- Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., ... & Koonin, E. V. (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature reviews microbiology*, *15*(3), 169-182.
- Shure, M., & Vinograd, J. (1976). The number of superhelical turns in native virion SV40 DNA and minicol DNA determined by the band counting method. *Cell*, *8*(2), 215-226.

- Simonetti, R. B., Marques, L. S., Streit Jr, D. P., & Oberst, E. R. (2015). Zebrafish (*Danio rerio*): The future of animal model in biomedical research. *Journal of Fisheries Sciences. com*, 9(3), 39.
- Singh, D., Mallon, J., Poddar, A., Wang, Y., Tippana, R., Yang, O., ... & Ha, T. (2018). Real-time observation of DNA target interrogation and product release by the RNA-guided endonuclease CRISPR Cpf1 (Cas12a). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(21), 5444-5449.
- Singh, P., Schimenti, J. C., & Bolcun-Filas, E. (2015). A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics*, 199(1), 1-15.
- Słomka, M., Sobalska-Kwapis, M., Wachulec, M., Bartosz, G., & Strapagiel, D. (2017). High resolution melting (HRM) for high-throughput genotyping – limitations and caveats in practical case studies. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2316.
- Solaro, P. C., Birkenkamp, K., Pfeiffer, P., & Kemper, B. (1993). Endonuclease VII of phage T4 triggers mismatch correction *in vitro*. *Journal of molecular biology*, 230(3), 868-877.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews*, 83(1), 13-34.
- Stanley, S. Y., Borges, A. L., Chen, K. H., Swaney, D. L., Krogan, N. J., Bondy-Denomy, J., & Davidson, A. R. (2019). Anti-CRISPR-associated proteins are crucial repressors of anti-CRISPR transcription. *Cell*, 178(6), 1452-1464.
- Sternberg, S. H., LaFrance, B., Kaplan, M., & Doudna, J. A. (2015). Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9. *Nature*, 527(7576), 110-113.
- Stingele, J., Bellelli, R., Alte, F., Hewitt, G., Sarek, G., Maslen, S. L., ... & Boulton, S. J. (2016). Mechanism and regulation of DNA-protein crosslink repair by the DNA-dependent metalloprotease SPRTN. *Molecular cell*, 64(4), 688-703.
- 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.

- Sung, J. S., DeMott, M. S., & Demple, B. (2005). Long-patch base excision DNA repair of 2-deoxyribonolactone prevents the formation of DNA-protein cross-links with DNA polymerase β . *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39095-39103.
- Swarts, D. C., & Jinek, M. (2018). Cas9 versus Cas12a/Cpf1: Structure-function comparisons and implications for genome editing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 9(5), e1481.
- Swarts, D. C., & Jinek, M. (2019). Mechanistic Insights into the cis-and trans-Acting DNase Activities of Cas12a. *Molecular cell*, 73(3), 589-600.
- Swarts, D. C., van der Oost, J., & Jinek, M. (2017). Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a. *Molecular cell*, 66(2), 221-233.
- Swenberg, J. A., Lu, K., Moeller, B. C., Gao, L., Upton, P. B., Nakamura, J., & Starr, T. B. (2011). Endogenous versus exogenous DNA adducts: their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment. *Toxicological sciences*, 120(suppl_1), S130-S145.
- Teruel, M. N., Blanpied, T. A., Shen, K., Augustine, G. J., & Meyer, T. (1999). A versatile microporation technique for the transfection of cultured CNS neurons. *Journal of neuroscience methods*, 93(1), 37-48.
- Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology*, 3(9), 711-721.
- Tompers, D. M., & Labosky, P. A. (2004). Electroporation of murine embryonic stem cells: A step-by-step guide. *Stem Cells*, 22(3), 243-249.
- Tong, Z., Han, C., Luo, W., Wang, X., Li, H., Luo, H., ... & He, R. (2013). Accumulated hippocampal formaldehyde induces age-dependent memory decline. *Age*, 35(3), 583-596.
- Toth, A., Hegedus, L., Juhasz, S., Haracska, L., & Burkovics, P. (2017). The DNA-binding box of human SPARTAN contributes to the targeting of Pol η to DNA damage sites. *DNA repair*, 49, 33-42.
- Trewick, S. C., Henshaw, T. F., Hausinger, R. P., Lindahl, T., & Sedgwick, B. (2002). Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature*, 419(6903), 174-178.
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S., & Gregory, P. D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 636-646.

- Uusi-Mäkelä, M. I., Barker, H. R., Bäuerlein, C. A., Häkkinen, T., Nykter, M., & Rämetsä, M. (2018). Chromatin accessibility is associated with CRISPR-Cas9 efficiency in the zebrafish (*Danio rerio*). *PloS one*, *13*(4), e0196238.
- Várady, G., Sarkadi, B., & Fátýol, K. (2011). TTRAP is a novel component of the non-canonical TRAF6-TAK1 TGF- β signaling pathway. *PLoS One*, *6*(9), e25548.
- Vasiliou, V., Pappa, A., & Estey, T. (2004). Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drug metabolism reviews*, *36*(2), 279-299.
- Vaz, B., Popovic, M., Newman, J. A., Fielden, J., Aitkenhead, H., Halder, S., ... & Ramadan, K. (2016). Metalloprotease SPRTN/DVC1 orchestrates replication-coupled DNA-protein crosslink repair. *Molecular cell*, *64*(4), 704-719.
- Vaz, B., Popovic, M., & Ramadan, K. (2017). DNA-protein crosslink proteolysis repair. *Trends in biochemical sciences*, *42*(6), 483-495.
- Vojta, A., Dobrinić, P., Tadić, V., Bočkor, L., Korać, P., Julg, B., ... & Zoldoš, V. (2016). Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic acids research*, *44*(12), 5615-5628.
- Wagner, E. F., & Nebreda, Á. R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, *9*(8), 537-549.
- Walport, L. J., Hopkinson, R. J., & Schofield, C. J. (2012). Mechanisms of human histone and nucleic acid demethylases. *Current opinion in chemical biology*, *16*(5-6), 525-534.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *cell*, *153*(4), 910-918.
- Wu, R. S., Lam, I. I., Clay, H., Duong, D. N., Deo, R. C., & Coughlin, S. R. (2018). A rapid method for directed gene knockout for screening in G0 zebrafish. *Developmental cell*, *46*(1), 112-125.
- Yan, Z., Sun, X., & Engelhardt, J. F. (2009). Progress and prospects: techniques for site-directed mutagenesis in animal models. *Gene therapy*, *16*(5), 581-588.
- Yang, S. W., Burgin, A. B., Huizenga, B. N., Robertson, C. A., Yao, K. C., & Nash, H. A. (1996). A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and

type I topoisomerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), 11534-11539.

Zeng, Z., Cortés-Ledesma, F., El Khamisy, S. F., & Caldecott, K. W. (2011). TDP2/TTRAP is the major 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase activity in vertebrate cells and is critical for cellular resistance to topoisomerase II-induced DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 403-409.

Zeng, Z., Sharma, A., Ju, L., Murai, J., Umans, L., Vermeire, L., ... & El-Khamisy, S. F. (2012). TDP2 promotes repair of topoisomerase I-mediated DNA damage in the absence of TDP1. *Nucleic acids research*, 40(17), 8371-8380.

Zhang, L., Zhang, K., Prändl, R., & Schöffl, F. (2004). Detecting DNA-binding of proteins *in vivo* by UV-crosslinking and immunoprecipitation. *Biochemical and biophysical research communications*, 322(3), 705-711.

Zhao, Y., Sun, H., Sha, X., Gu, L., Zhan, Z., & Li, W. J. (2019). A review of automated microinjection of zebrafish embryos. *Micromachines*, 10(1), 7.

Popis korištenih mrežnih stranica:

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (pristupljeno 15. 3. 2021.)

<https://depts.washington.edu/bakerpg/primertemp/> (pristupljeno 3. 5. 2021.)

<https://tmcalculator.neb.com/#!/main> (pristupljeno 16. 5. 2021.)

<https://www.crisprscan.org/> (pristupljeno 8. 3. 2021.)

<http://www.ensembl.org/index.html> (pristupljeno 15. 3. 2021.)

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Koprivnici 14. svibnja 1997. godine. Pohađala sam osnovnu školu „Đuro Ester“ u Koprivnici, a zatim opći smjer koprivničke gimnazije „Fran Galović“. Završila sam preddiplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i upisala diplomski smjer Molekularne biologije na istom fakultetu. Na drugoj godini preddiplomskog studija primala sam STEM stipendiju namijenjenu studentima s najboljim rezultatima u prirodoslovnom području. Na Botaničkom zavodu odradila sam stručnu laboratorijsku praksu i sudjelovala u istraživanju specijaliziranih metabolita biljaka. Dobitnica sam Rektorove nagrade za studentski istraživački rad pod nazivom „Mogućnost primjene natrijeva klorida, saharoze i salicilne kiseline za poboljšanje fitokemijskog sastava i antioksidacijskog kapaciteta klica rotkvice (*Raphanus sativus* L.) te njihove sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze“, a isti sam rad predstavila na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja.