

Ekspresija gena xpa, acrc i tdp1 u ribe zebrice (Danio rerio) i identifikacija zebrica mutiranog gena xpa

Vinković, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:656517>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Luka Vinković

**Ekspresija gena *xpa*, *acrc* i *tdp1* u ribe zebrice
(*Danio rerio*) i identifikacija zebrica
mutiranog gena *xpa***

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Luka Vinković

**Expression of *xpa*, *acrc* and *tdp1* genes in
zebrafish (*Danio rerio*) and identification of
xpa deficient mutants**

Master thesis

Zagreb, 2022.

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek
rad

Diplomski

Ekspresija gena *xpa*, *acrc* i *tdp1* u ribe zebrice (*Danio rerio*) i identifikacija zebrica mutiranog gena *xpa*

Luka Vinković

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Križne veze DNA i proteina su ireverzibilne, kovalentne veze DNA i proteina koje ograničavaju obavljanje staničnih procesa. Protein Acrc se zbog metaloproteazne domene i uloge u očuvanju genomske stabilnosti povezuje s popravkom križnih veza DNA i proteina. Još jedan mehanizam koji sudjeluje u popravku križnih veza DNA i proteina je popravak izrezivanjem nukleotida u kojem protein Xpa ima esencijalnu ulogu proteina nosača u ovom mehanizmu popravka. Tirozil DNA fosfodiesteraza 1 (Tdp1) specifična je za određenu vrstu oštećenja pa svojom hidrolitičkom aktivnošću razrješuje fosfotirozilnu vezu između topoizomeraze 1 i jednolančane DNA. Analizom ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu u tkivima ribe zebrice (*Danio rerio*) uočeno je da, osim pada ekspresije ovih gena starenjem, postoje tkiva u kojima ekspresija raste, što je suprotno očekivanjima. Analizom razlike ekspresije gena između spolova uočeno je da je ekspresija u pojedinim tkivima veća kod ženki zebrice, a u pojedinim kod mužjaka pa se za određeni spol ne može tvrditi da je otporniji na križne veze DNA i proteina na temelju ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1*. Uz analizu ekspresije gena cilj je bio identificirati zebrice s mutiranim genom *xpa* u svrhu stvaranja Xpa deficijente linije zebrica. Pronađena mutacija nije inaktivirala protein Xpa.

Ključne riječi: DNA popravak, križne veze DNA i proteina, starenje, ekspresija, genska promjena

(85 stranica, 23 slika, 8 tablica, 60 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr. sc. Marta Popović

Komentor: Doc. dr. sc. Nenad Malenica

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology
thesis

Master

Expression of *xpa*, *acrc* and *tdp1* genes in zebrafish (*Danio rerio*) and identification of *xpa* deficient mutants

Luka Vinković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

DNA-protein crosslinks are irreversible, covalent bonds of DNA and proteins that limit the cell performance. Acrc protein is being connected to DNA-protein crosslink repair because of its metalloprotease domain and a role in genome stability. Another mechanism involved in DNA-protein crosslink repair is nucleotide excision repair in which protein Xpa has an essential scaffolding role. Tyrosyl DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1) is specific for a particular type of damage as it resolves the phosphotyrosyl bond between topoisomerase I and single-stranded DNA. Analysis of *acrc*, *xpa* and *tdp1* gene expression with real-time polymerase chain reaction in zebrafish (*Danio rerio*) tissues showed that besides of the reduction in expression of these genes there are tissues that exhibit increased expression which wasn't expected. Analysis of expression differences between zebrafish genders showed that some tissues exhibit higher expression in females while some have higher expression in males so it can't be declared that a particular gender is more resistant to DNA-protein crosslinks based on expression of *acrc*, *xpa* and *tdp1* genes. There was also a goal to identify zebrafish with mutated *xpa* gene with a purpose of creating a Xpa deficient zebrafish line, but the only detected modification doesn't inactivate the protein.

Keywords: DNA repair, DNA-protein crosslinks, expression, gene modification
(85 pages, 23 figures, 8 tables, 60 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: dr. sc. Marta Popović

Co-mentor: Doc. dr. sc. Nenad Malenica

Reviewers:

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 DNA oštećenja i popravak	1
1.2 Križne veze DNA i proteina i mehanizmi njihova popravka	2
1.3 Acre.....	7
1.4 Xpa.....	9
1.5 Tdp1	11
1.6 Sustav CRISPR/Cas-9.....	12
1.7 Zebrica (<i>Danio rerio</i>).....	16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1 Materijali.....	17
3.1.1 Osnovne kemikalije.....	17
3.1.2 Antibiotici	17
3.1.3 Bakterijske stanice	17
3.1.4 Plazmidi	17
3.1.5 Puferi i mediji	17
3.1.6 Boje.....	17
3.1.7 Markeri veličina	17
3.1.8 Početnice	17
3.1.9 Nukleotidi	18
3.1.10 Oprema.....	18
3.1.11 Komercijalni kompleti	18
3.1.12 Instrumenti	18
3.2 Metode	18
3.2.1 Dizajn početnica.....	18
3.2.2 Izolacija RNA iz tkiva ribe zebrice.....	20
3.2.3 Određivanje koncentracije izolirane RNA.....	21
3.2.4 Elektroforeza izolirane RNA i DNA umnožene PCR-om	22
3.2.5 Reverzna transkripcija izolirane RNA	23

3.2.6 PCR	23
3.2.7 qPCR	25
3.2.8 Pročišćavanje DNA.....	28
3.2.9 Ligacija	28
3.2.10 Transformacija bakterijskih stanica	28
3.2.11 Priprema agaroznih ploča za uzgoj bakterija	29
3.2.12 Nasađivanje i uzgoj bakterija.....	29
3.2.13 Uzgoj specifičnih kolonija	29
3.2.14 Izolacija plazmida iz bakterija	30
3.2.15 Sekvenciranje i analiza dobivenih sekvenci.....	30
3.2.16 Obrada podataka	30
4. REZULTATI.....	32
4.1 Identifikacija odgovarajućih početnica za određivanje ekspresije gena <i>tdp1</i> i <i>xpa</i> zebrice pomoću qPCR-a.	32
4.2 Određivanje efikasnosti početnica za umnažanje gena <i>tdp1</i> i <i>xpa</i> u qPCR reakciji u svrhu analize njihove ekspresije u zebrici	34
4.3 Određivanje koncentracije i čistoće izolirane RNA.....	37
4.4 Analiza kvalitete izolirane RNA	40
4.5 Odabir endogene kontrole za qPCR.....	41
4.6 Analiza ekspresije gena <i>acrc</i> , <i>xpa</i> i <i>tdp1</i> zebrice	42
4.7 Analiza promjene ekspresije gena <i>acrc</i> , <i>xpa</i> i <i>tdp1</i> tijekom starenja zebrice.....	44
4.8 Analiza spolnih razlika u ekspresiji gena <i>acrc</i> , <i>xpa</i> i <i>tdp1</i> zebrice	45
4.9 Analiza razlike ekspresije gena <i>acrc</i> , <i>xpa</i> i <i>tdp1</i> između različitih tkiva zebrice	49
4.10 Usporedba ekspresije gena <i>acrc</i> , <i>xpa</i> i <i>tdp1</i> zebrice s njihovim ortolozima u čovjeku i mišu	51
4.11 Identifikacija zebrica mutiranog gena <i>xpa</i>	57
5. RASPRAVA	62
5.1 Analiza promjene ekspresije gena <i>acrc</i> , <i>xpa</i> i <i>tdp1</i> tijekom starenja zebrice.....	62
5.2 Analiza spolnih razlika u ekspresiji gena <i>acrc</i> , <i>xpa</i> i <i>tdp1</i> zebrice	63
5.3 Analiza razlike ekspresije gena <i>acrc</i> , <i>xpa</i> i <i>tdp1</i> između različitih tkiva zebrice	64

5.4 Usporedba ekspresije gena <i>acrc</i> , <i>xpa</i> i <i>tdp1</i> zebrice s njihovim ortolozima u čovjeku i mišu	65
5.5 Identifikacija zebrica mutiranog gena <i>xpa</i>	66
6. ZAKLJUČAK	68
7. LITERATURA	69
8. ŽIVOTOPIS	74

KRATICE

Arc - engl. *acidic-repeat containing protein*

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

bp- engl. *base pairs*, parovi baza

Cas - *CRISPR associated protein*

CRISPR - engl. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeat*

crRNA - CRISPR RNA

Csa - engl. *Cockayne syndrome WD repeat protein A*

Csb - engl. *Cockayne syndrome protein B*

Ct - engl. *cycle threshold*

DDR – engl. *DNA damage response*, odgovor na DNA oštećenja

DDT – engl. *DNA damage tolerance*, tolerancija DNA oštećenja

DNMT1 - DNA metiltransferaza 1

DPC- engl. *DNA-protein crosslink*, križna veza DNA-protein

DPC-PR - engl. *DPC proteolysis repair*

E - efikasnost početnica

ERCC1 - engl. *Excision Repair Cross Complementary Group 1*

FA – Fanconijeva anemija

Gcna - engl. *germ cell nuclear antigen*

GG-NER - engl. *global genome NER*, globalni genomski NER

GTE_x - engl. *Genotype-Tissue Expression*

HKG – engl. *housekeeping gene*

HPA – engl. *Human Protein Atlas*

HR - engl. *homologous recombination*, homologna rekombinacija

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

MNE - engl. *Mean Normalized Exoression*, srednja normalizirana ekspresija

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

NHEJ - engl. *non-homologous end joining*, nehomologno sparivanje krajeva

OD - engl. *optical density*, optička gustoća

PAM - engl. *protospacer adjacent motif*

PARP1 - poli(ADP-riboza) polimeraza 1

PCNA - engl. *proliferating cell nuclear antigen*

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

PKNP - polinukleotid kinaza fosfataza

qPCR – kvantitativni PCR

Rad23b - engl. *UV excision repair protein Radiation sensitive 23b*

RFC - engl. *replication factor C*

ROS - engl. *reactive oxygen species*, reaktivne kisikove vrste

Rpa - engl. *Replication protein A*

rRNA – ribosomska RNA

SCAN1 - engl. *Spinocerebellar Ataxia with Axonal Neuropathy*

SD – standardna devijacija

SIM - engl. *SUMO-interacting motif*

SUMO - engl. *small ubiquitin-like modifiers*

TC-NER - engl. *transcription-coupled NER*, NER povezan s transkripcijom

Tdp1 - tirozil-DNA fosfodiesteraza 1

Tdp2 - tirozil-DNA fosfodiesteraza 2

TFIIH - transkripcijski inicijacijski faktor II H

TLS - engl. *translesion synthesis*, translezijska sinteza

Top1 – topoizomeraza 1

Top 2 – topoizomeraza 2

TOP-cc - engl. *topoisomerase DNA covalent complex*

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

Wss1 - engl. *weak suppressor of Smt3*

Xpa - engl. *Xeroderma pigmentosum complementation group A*

Xpb - engl. *Xeroderma pigmentosum group B*

Xpc - engl. *Xeroderma pigmentosum complementation group C*

Xpd - engl. *Xeroderma pigmentosum group D*

XPF - *Xeroderma Pigmentosum Group F*

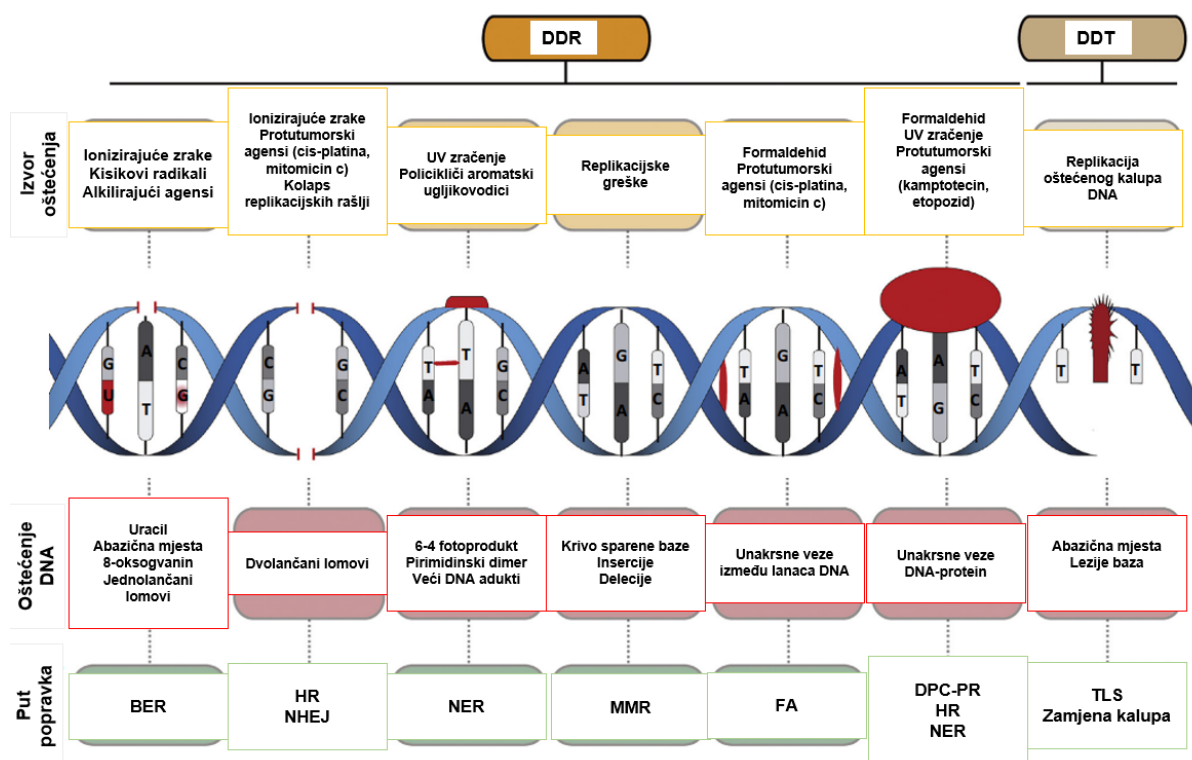
Xpg - engl. *Xeroderma pigmentosum group G*

1.UVOD

1.1 DNA oštećenja i popravak

Zbog uloge DNA kao središta pohrane informacija za razvoj, funkciju i razmnožavanje stanica nužno je održavanje njezine stabilnosti i pravilne strukture. Sve promjene pravilne strukture DNA predstavljaju oštećenja DNA i ugrožavaju njezinu stabilnost što šteti staničnom integritetu i dovodi do razvoja bolesti. Oštećenja DNA česta su pojava unutar stanica, a nastaju spontano tijekom odvijanja endogenih staničnih procesa ili zbog prisutnosti različitih egzogenih čimbenika. Endogeni stanični procesi su procesi koji se odvijaju tijekom staničnog metabolizma, a dovode do oksidacije dušičnih baza, deaminacije, hidrolize dušičnih baza, stvaranje adukata s drugim spojevima, stvaranja krivo sparenih baza i stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*; ROS) koje posljedično uzrokuju lomove lanaca DNA. Egzogeni čimbenici različitih su vrsta pa tako UV zračenje može stvoriti pirimidinske dimere, adukate s drugim spojevima i ROS-ove, ionizirajuće zračenje uzrokuje direktno i indirektno oštećenje i lomove lanaca DNA, a kemijski spojevi poput vinil klorida i policikličkih aromatskih spojeva stvaraju različite vrste DNA adukata (Ambekar, 2017). Kako bi stanice osigurale normalno funkcioniranje razvile su različite mehanizme popravka koji su zaslužni za uklanjanje određenih vrsta oštećenja. Popravak izrezivanjem baza (engl. *base excision repair*; BER) tako služi za popravak nepravilnih kemijskih modifikacija dušičnih baza, koje se u ovom putu popravka izrezuju iz lanca DNA što uzrokuje prepoznavanje nukleotida bez baza, njihovo izrezivanje iz jednog lanca DNA i naknadnu sintezu izrezanog dijela DNA s pravilnim dušičnim bazama (slika 1). Popravak krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*; MMR) stanice koriste kako bi uklonile krivo sparene baze jednog lanca DNA koje nastaju prilikom replikacije DNA koje se ovim popravkom izrezuju i zamjenjuju sintezom DNA pravilnih parova dušičnih baza. Popravak izrezivanjem nukleotida (engl. *nucleotide excision repair*; NER) za razliku od BER-a ima ulogu u popravku većih DNA oštećenja poput pirimidinskih dimera i DNA adukata zbog čega se iz lanca DNA koji nosi oštećenje izrezuje veći fragment DNA uzvodno i nizvodno od oštećenja te se fragment zajedno s oštećenjem ukloni, a naknadnom sintezom stvara se novi lanac DNA pravilne strukture. Put popravka Fanconijeve anemije (FA) prepoznaje i popravljiva oštećenja nastala križnim povezivanjem između DNA lanaca (slika 1) (Walden i Deans 2014). Translezijska sinteza (engl. *translesion synthesis*; TLS) omogućava stanicama zaobilazanje letalnih oštećenja koje zaustavljaju sintezu DNA u S fazi ciklusa koristeći više DNA polimeraza niske točnosti (engl. *low fidelity*) koje mogu dodavati nukleotide nasuprot oštećenom lancu s ciljem očuvanja integriteta genoma, a na uštrb

preciznosti jer su ove polimeraze sklone greškama (Ma i sur. 2020). Homolognom rekombinacijom (engl. *homologous recombination*; HR) popravljaju se dvolančani lomovi DNA prema homologiji s neoštećenim lancem DNA, dok se nehomolognim sparivanjem krajeva (engl. *non-homologous end joining*; NHEJ) od dvolančanih lomova DNA najprije stvaraju tupi krajevi DNA koji se naknadno slijepe (slika 1) (Ambekar 2017). Navedeni mehanizmi popravka pomno su proučavani i detaljno objašnjeni, ali za neka DNA oštećenja mehanizmi popravka nisu još razjašnjeni. Jedno od takvih oštećenja su križne veze DNA i proteina (engl. *DNA-protein crosslinks*; DPCs) čija su uloga i mehanizmi popravka opisani u nastavku.

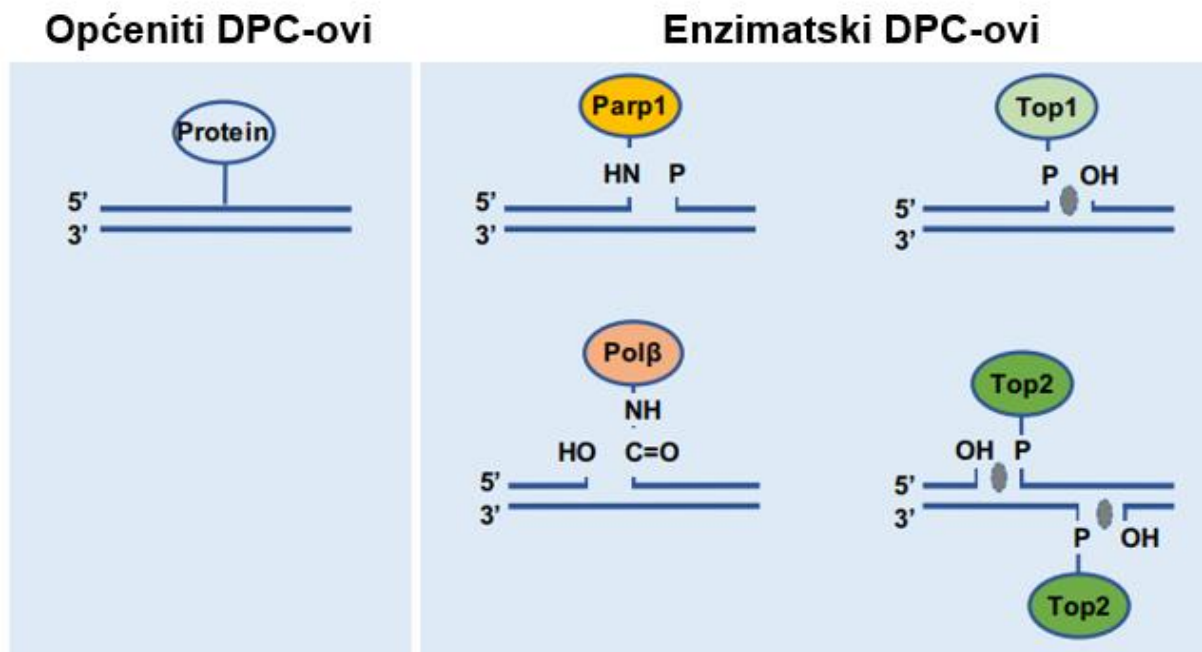


Slika 1. Shema različitih puteva popravka koji popravljaju oštećenja DNA. DDR – odgovor na DNA oštećenja (engl. *DNA damage response*), DDT – tolerancija DNA oštećenja (engl. *DNA damage tolerance*;) (adaptirano iz Vaz i sur. 2017).

1.2 Križne veze DNA i proteina i mehanizmi njihova popravka

Molekule DNA u stanicama stupaju u interakcije s mnogim proteinima u svojoj okolini u svrhu obavljanja staničnih procesa replikacije, transkripcije, popravka DNA i remodeliranja kromatina koji omogućuju preživljavanje i diobu stanica. Ovi nužni stanični procesi u kojima sudjeluju enzimi te različiti fizički i kemijski čimbenici mogu dovesti do stvaranja križnih veza

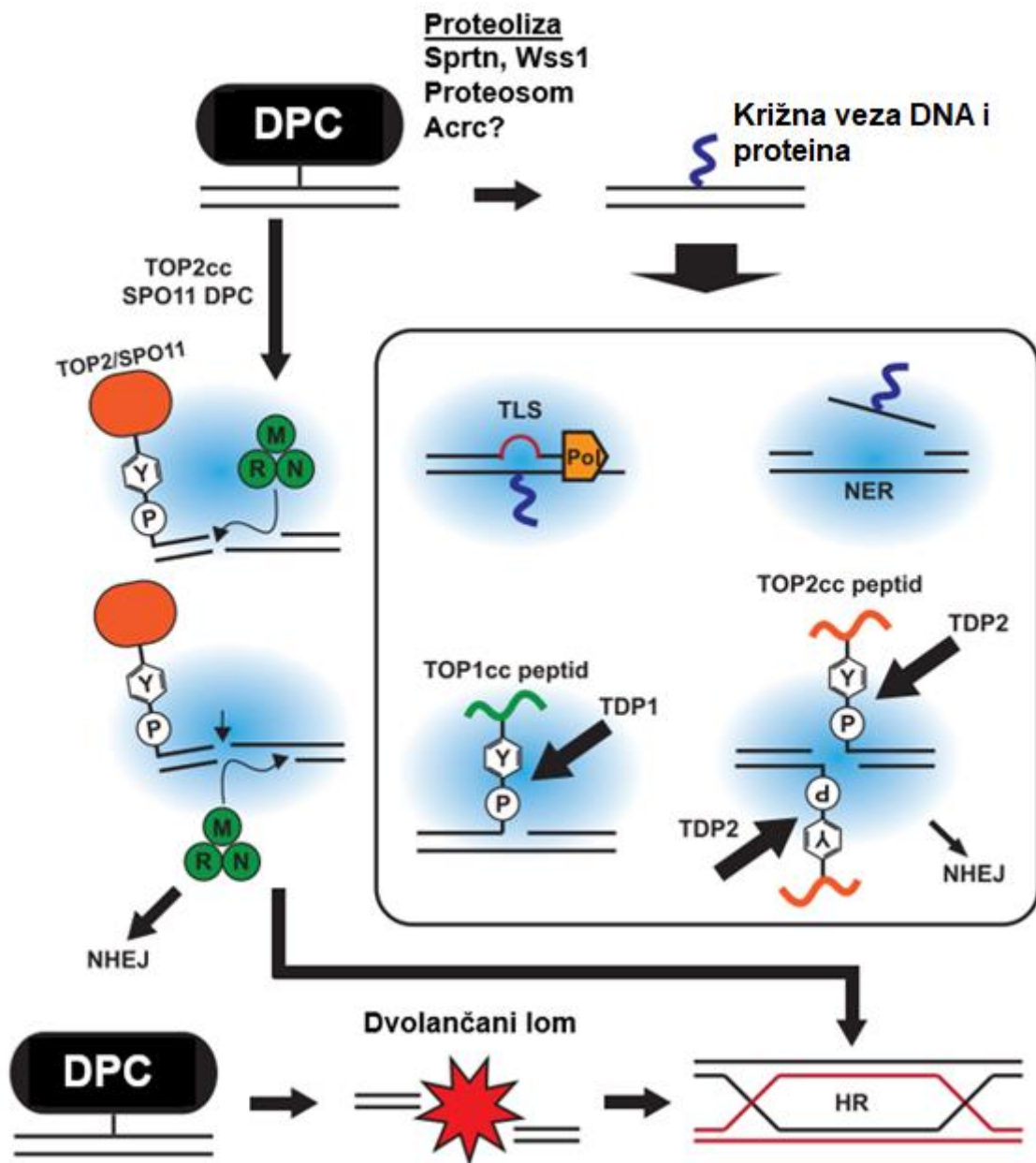
DNA i proteina. Križne veze DNA i proteina su ireverzibilne kovalentne veze koje ograničavaju normalno obavljanje staničnih funkcija predstavljajući fizičku prepreku enzimima koji interagiraju s molekulama DNA. Prisutnost DPC-ova mijenja staničnu fiziologiju upravo zbog stvaranja dvolančanih lomova, nemogućnosti normalnog obavljanja procesa uključujući replikaciju, transkripciju i popravak DNA što se na razini organizma povezuje sa starenjem, neurodegenerativnim bolestima te nastankom tumora (Fielden i sur. 2018; Lessel i sur. 2014; Vaz i sur. 2016). Fizički čimbenici koji dovode do stvaranja DPC-ova su ionizirajuće zračenje za koje se smatra da stvara ionizirajuće radikale koji naknadno oštećuju DNA te UV zračenje koje pobuđuje molekulu DNA zbog čega dolazi do njenog vezanja na okolne proteine (Shetlar 1980; Zhang i sur. 2020). Kemijski čimbenici koji uzrokuju stvaranje križnih veza su aldehidi, kemoterapeutici i metali. Aldehidi djeluju tako da u reakciji amino skupinama proteina stvaraju intermedijere Schiffovih baza koje reagiraju s dušičnim bazama molekule DNA što uzrokuje njihovo međusobno povezivanje (Tretyakova i sur. 2015). Kemoterapeutici poput kamptotecina specifično vežu katalitička mjesta enzima topoizomeraze 1 (Top1) u prolaznim vezama s DNA s ciljem stvaranja DPC-ova unutar tumorskih stanica što u konačnici dovodi do smrti tumorskih stanica (Pommier i sur. 2014). DPC-ovi nastaju i prilikom pogreške u razrješavanju prolaznih veza DNA i enzima koji stupaju u interakcije s DNA poput DNA metiltransferaze 1 (DNMT1), DNA polimeraza te topoizomeraza 1 i 2 (Top2) koje se svojim katalitičkim mjestom ulaze u kovalentnu interakciju s fosfodieterskom vezom DNA koja se u normalnim staničnim uvjetima razriješi. Ukoliko do toga ne dođe nastaju križne veze DNA i proteina, a topoizomeraze 1 i 2 (engl. *topoisomerase 1/2 DNA covalent complex*; TOP1/2-cc) su jedne od najproučavanijih enzimskih DPC-ova. S obzirom na učestalost nastajanja aldehida prilikom demetilacije histona, razgradnje alkohola, lipidne peroksidacije i metabolizma aminokiselina te potrebe stanica za promjenom topološkog stanja DNA pomoću topoizomeraza vidljivo je da su čimbenici koji dovode do nastanka križnih veza DNA i proteina sveprisutni (Fielden i sur. 2018). Osim što DPC-ovi nastaju na različite načine uobičajeno se dijele i na dva tipa: (1) općenite (neenzimatske) DPC-ove koji uključuju bilo koji protein vezan na DNA prilikom djelovanja endogenih ili egzogenih uzročnika te (2) enzimatske DPC-ove koji uključuju enzime koji ulaze u direktnu interakciju s DNA poput prethodno navedenih, topoizomeraza i DNA polimeraza, koje se mogu vezati na DNA u slučaju preuranjenog prekida sinteze DNA (slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz općenitih i enzimatskih DPC-ova te načina njihovog vezanja na DNA (adaptirano iz Zhang i sur. 2020) .

Općeniti DPC-ovi su najzastupljeniji u stanici u fiziološkim uvjetima, a najčešće nastaju na apurinskim ili apirimidinskim mjestama te DNA u takvim DPC-ovima nema lomove, već su proteini vezani na neprekinutu dvolančanu uzvojniju, a najčešće im pripadaju DPC-ovi histona i transkripcijskih faktora s obzirom da su najprisutniji u blizini DNA (Vaz i sur. 2017). S druge strane, enzimatski DPC-ovi na DNA su vezani za lomove dvolančane uzvojnice pa se tako topoizomeraza 1 veže na 3' kraj jednolančanog loma DNA, topoizomeraza 2 na 5' krajeve dvolančanog loma DNA, a poli(ADP-riboza) polimeraza 1 (PARP1) na 3' kraj jednolančanog loma nastalog tijekom neuspjele sinteze DNA (Vaz i sur. 2017). Različite veličine proteina koji čine DPC-ove od malih, histona do velikih, topoizomeraza 2 kao i razlike u kemijskoj strukturi veza zahtjevaju široki raspon puteva popravka. Od otkrića SPRTN proteaze kao centralnog čimbenika DPC popravka 2016. godine (Vaz i sur. 2016; Stignele i sur. 2016; Lopez-masqueda i sur. 2016), intenzivna istraživanja ovog puta popravka DNA donijela su brojne nove spoznaje te se danas DPC popravka dijeli na (1) popravak ovisan o proteazama (engl. *DPC proteolysis repair*; DPC-PR), (2) ovisan o nukleazama i (3) direktna hidroliza fosfotirozilne veze (Kojima i sur. 2020; Vaz i sur. 2017; Zhang i sur. 2020). Kod popravka ovisnog o nukleazama aktivnost NER-a uvjetovana je prethodnom proteolizom DPC-ova, dok to nije slučaj kod ostalih popravaka ovisnim o nukleazama pa se tijekom NER-a peptidni ostatak izrezuje iz DNA tek nakon djelovanja proteaza na DPC (Kojima i sur. 2020; Vaz i sur. 2017). Translezijska sinteza

(TLS) također se spominje u kontekstu interakcije s DPC-ovima, ali ne kao popravak već tolerancija njihove prisutnosti jer TLS može zaobići manje peptide vezane na DNA tijekom sinteze DNA (slika 3) (Kojima i sur. 2020; Vaisman i Woodgate 2017).



Slika 3. Shema puteva popravka križnih veza DNA i proteina (adaptirano iz Kojima i sur. 2020)

U popravku DPC-ova HR se spominje u kontekstu aktivnosti Mre11, Rad50 i Nbs1 (MRN) kompleksa, ali sam mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen (Qiu i Huang 2021; Vaz i sur. 2017; Zhang i sur. 2020). Iako istraživanja ukazuju da nedostatak Mre11 ne uzrokuje akumuliranje DPC-ova u stanicama sisavaca (Vaz i sur. 2016) uvideno je da MRN kompleks miče TOP2-cc i Spo11 (kvašćev homolog topoisomerase 6) s 5' krajeva dvolančanih lomova

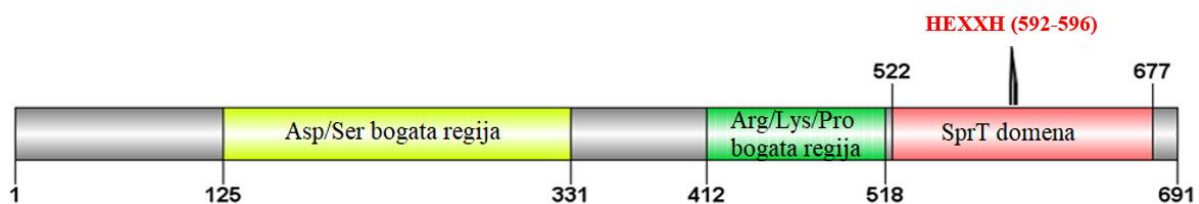
izrezivanjem DNA nizvodno od oštećenja (Slika 3) (Aparicio i sur. 2016; Deshpande i sur. 2016; Hoa i sur. 2016). Međutim, uočeno je da MRN kompleks ne može prepoznati DPC-ove bez prisutnih lomova DNA pa je moguće da ovaj način popravka zahtjeva i aktivnost drugih načina popravka DNA koji generiraju lomove DNA (Kojima i sur. 2020; Zhang i sur. 2020). Kao što je prethodno spomenuto, translezijska sinteza omogućuje stanicama zaobilaženje oštećenja DNA koje zaustavljaju replikativnu sintezu, a među takvim oštećenjima su i DPC-ovi. Tijekom TLS djeluju polimeraze iz Y-obitelji polimeraza čija su aktivna mjesta veća i prilagodljivija pa na lanac komplementaran oštećenju mogu dodavati nukleotide, a daljnju sintezu nesparenog lanca DNA odrađuje polimeraza Pol ζ iz B-obitelji polimeraza (Kojima i sur. 2020; Vaisman i Woodgate 2017). Učinak TLS pokazan je na ekstraktu jaja žaba roda *Xenopus* u kojima TLS zahtjeva prethodnu degradaciju proteina koji čini DPC u manji peptid (slika 3), a smatra se da se oštećenje koje ostaje nakon degradacije i zaobilaženja oštećenja s TLS popravljiva NER-om (Duxin i sur. 2014). Hidroliza fosfotirozilne veze karakteristična je za križne veze DNA te topoizomeraza 1 i 2, a nju provode enzimi Tdp1 i 2 (tirozil-DNA fosfodiesteraza 1/2) (slika 3). Neki DPC-ovi zbog svoje veličine nisu dostupni enzimima koji ih popravljaju te stoga trebaju pomoć DPC-PR koja proteolizom smanjuje veličin proteina u DPC-ovima (slika 3) i tako omogućava njihovu daljnju obradu enzimima koji omogućuju potpuno uklanjanje DPC-ova hidrolizom fosfotirozilne veze ili obradom DNA (Kojima i sur. 2020). Također, za TOP2-cc, pokazano je in vitro da se može ukloniti bez djelovanja proteaza, pomoću sprege djelovanja ZATT proteina čije djelovanje uzrokuje promjenu konformacije TOP2-cc, koji zbog toga postaje dostupan enzimskoj aktivnosti TDP2 (Schellenberg i sur. 2017). Zbog svoje uloge u razgradnji proteina najproučavaniji stanični sustav za proteolizu, 26S proteosom, proučavan je i u kontekstu DPC-PR (Ruggiano i Ramadan 2021). Prije proteolize 26S proteosomom stanični proteini uobičajeno se modificiraju poliubikvitinacijom koja je temelj za prepoznavanje i razgradnju proteosomom pa je ubikvitinacija proteina u DPC-ovima proučavana kako bi se odredila uloga proteosoma u DPC-PR. Istraživanja vezana za proteosom pokazuju različite rezultate pa tako inhibicija proteosomu homolognih ATP-ovisnih proteaza u bakterijama ne utječe na bakterijsko preživljenje nakon izlaganja čimbenicima koji izazivaju DPC-ove, a inhibicija proteosoma u ljudskim stanicama spriječila je razgradnju histonskih i topoizomernih DPC-ova i povećala osjetljivost na formaldehid, no poznato je da sami inhibitori proteosoma mogu uzrokovati nedostatak slobodnog ubikvitina u jegri zbog čega nije jasno ako je za popravak nužan proteosom ili označavanje ubikvitinom (Vaz i sur. 2017). Novije istraživanje Larsen i sur., 2019 pokazalo je da proteosom kao i protein Sprtn neovisno jedno o drugome sudjeluju u proteolizi DPC-ova u ekstraktu jaja žabe roda *Xenopus* i to u

koordinaciji s replikacijskom sintezom DNA, ali se razlikuju u ovisnosti o poliubikvitinizaciji koja je ključna za proteolizu proteosomom, ali nije potrebna za proteolizu sa Sprtn. Osim modifikacije ubikvitinom DPC-ovi se modficiraju i SUMOilacijom (engl. *small ubiquitin-like modifiers*, SUMO), a ona je potrebna za proteosomalnu razgradnju DNMT1 te topoizomeraznih DPC-eva u ljudskim stanicama te ne ovisi o replikaciji DNA, već se odvija u interfazi (Borgermann i sur. 2019; Sun i sur. 2020). Uz proteosom proteolizu DPC-ova mogu obavljati DNA-ovisne proteaze što je postalo očito nakon otkrića proteina Wss1 (engl. *weak suppressor of Smt3*) u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* čija je proteolitička aktivnost pokazana *in vitro*, a njen nedostatak stanice kvasca čini osjetljivim na čimbenike koji stvaraju DPC-ove. Nakon identifikacije uloge proteina Wss1 istraživači su usmjerili pažnju na otkrivanje proteaze s ovakvom ulogom u metazoa te je određen funkcionalni homolog Sprtn čiji nedostatak u oblicima, mišjim embrionalnim fibroblastima i ljudskim stanicama izaziva pretjeranu osjetljivost na čimbenike koji dovode do nastanka općenitih i enzimatskih DPC-ova, a za ljudski protein Sprtn pokazana je *in vitro* aktivnost u uklanjanju DPC-ova (slika 3) (Fielden i sur. 2018). Određeno je da se proteoliza DPC-ova proteinom Sprtn odvija tijekom replikacije DNA u S fazi (kada je uz G2 fazu ekspresija Sprtn najveća) i to u području replikacijskih rašlji, a svoju proteolitičku aktivnost obavlja metaloproteaznom SprT domenom čije mutacije uzrokuju i Rujis-Aalfs sindrom (Kojima i sur. 2020; Vaz i sur. 2016). Aktivnost proteina Sprtn u stanici je regulirana s više mehanizama pa je tako protein u stanici u najvećoj količini monoubikvitiniran, ali u slučaju tretmana formaldehidom povećava se količina neubikvitiniranog proteina koji za razliku od ubikvitiniranog oblika ima mogućnost vezanja kromatina (Stingele i sur. 2016). Vlastita proteoliza proteina Sprtn moguće je mehanizam kojim se Sprtn inaktivira kako bi se uklonila nepoželjna proteoliza kromatina (Stingele i sur. 2016; Vaz i sur. 2016).

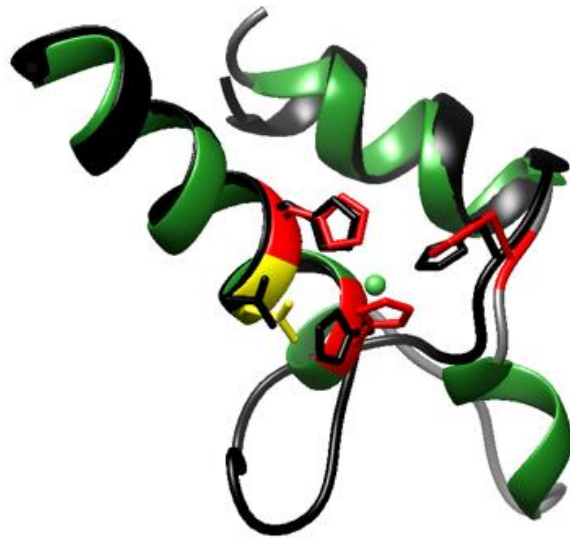
1.3 Acrc

Proteini iz obitelji Acrc (engl. *acidic-repeat containing protein*) također poznati i kao Gcna (engl. *germ cell nuclear antigen*) pojavili su se kod evolucijski najstarijih eukariota poput amebe *Dictyostelium discoideum*, a ekspresija proteina Acrc bilježi se u reproduktivnim stanicama duž eukariotskog filogenetskog stabla zbog čega se Acrc povezuje s plodnosti, a poznato je i da su miševi (*Mus musculus*) s mutacijom u ovom proteinu sterilni, a mutanti oblića *Caenorhabditis elegans* imaju poremećenu segregaciju kromosoma u mejozi (Carmell i sur. 2016). Protein Acrc sadrži N-terminalne kisele intrizično neuređene regije, SprT domenu (koja

nije prisutna kod miša), strukturni motiv cinkovih prstiju (engl. *zinc finger*) te HMG-kutiju (engl. *HMG-box*) (slika 4) (Bhargava i sur. 2020). Upravo zbog prisutnosti SprT domene u proteinu Acrc na temelju 3D strukture domene SprT (slika 5) određena je homologija proteina Acrc i proteina Sprtn za kojeg je otprije poznato da u popravku DPC-ova ima ulogu proteaze ovisne o DNA (Fielden i sur. 2018). Zbog uloge proteina Sprtn znanstvenici su počeli uvelike istraživati i ulogu proteina Acrc u popravku križnih veza DNA i proteina. Tako je kod oblića otkriveno da je količina proteina Acrc regulirana staničnim ciklusom pa je tako najveća količina proteina prisutna tijekom mitoze, a najmanja u G1 fazi ciklusa i da protein Acrc lokalizira s kondenziranim kromatinom te topoizomerazom 2 (Dokshin i sur. 2020). Nadalje, utvrđeno je da mutanti Acrc nisu osjetlivi na etopozid koji inaktivira topoizomerazu 2, nego na kampotecin koji inaktivira topoizomerazu 1, a mišji mutanti nakupljaju TOP2-cc što ukazuje na visoku povezanost proteina Acrc s popravkom TOP2-cc (Dokshin i sur. 2020). Također, istraživanja kod vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) su pokazala da Acrc popravljajući oštećenja DNA neovisno o proteinu Sprtn, a zaključeno je da je SprT domena potrebna za sprječavanje nastanka oštećenja u germinativnim stanicama, dok intrizično neuređena regija ima ulogu u stabilnosti kromosoma tijekom rane embriogeneze (Bhargava i sur. 2020). Značajnost proteina Acrc vidljiva je i kod riba zerbice (*Danio rerio*) pa tako potomstvo zerbice s nefunkcionalnim proteinom pokazuje velike morfološke deformacije i u konačnici smrt što je rezultat asinkronih mitotskih dioba, a embriji zerbice s nedostatkom proteina imaju blago povećane količine DPC-ova (Bhargava i sur. 2020). Također, za ACRC je pokazano da ulazi u interakciju s SUMOiliranim DPC-ovima kako bi došlo do njihove razgradnje, a u tu interakciju ulazi pomoću SIM (engl. *SUMO-interacting motif*) motiva (Borgermann i sur. 2019).



Slika 4. Topologija proteina Acrc (HEXXH-motiv cinkovih prstiju).

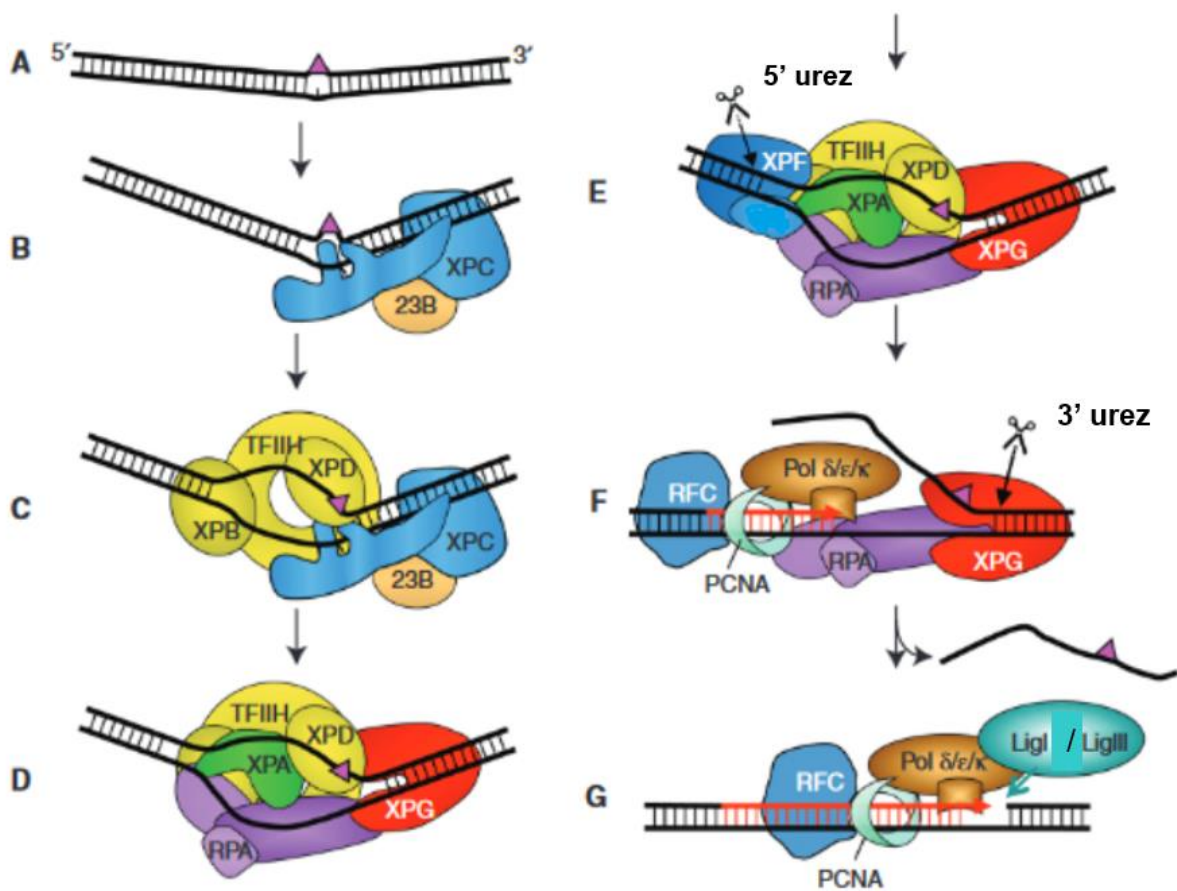


Slika 5. Model srži SprT domene proteina Sprtn i Acrc (Fielden i sur. 2018).

1.4 Xpa

Protein Xpa (engl. *Xeroderma pigmentosum complementation group A*) središnja je komponenta NER puta popravka koja svojom ulogom omogućava da sve ostale komponente budu na pravom mjestu tijekom popravka DNA (Schärer 2013). Postoje dva puta NER-a: globalni genomski NER (engl. *global genome NER*; GG-NER) koji se može aktivirati bilo gdje u genomu te NER povezan s transkripcijom (engl. *transcription-coupled NER*; TC-NER) koji se aktivira za popravak oštećenja lanaca DNA koji se aktivno prepisuju. GG-NER započinje kada kompleks proteina Xpc (engl. *Xeroderma pigmentosum complementation group C*), proteina Rad23b (engl. *UV excision repair protein Radiation sensitive 23b*) i Cetn2 (Centrin 2) pretraživanjem DNA naiđe na jednolančanu DNA koja je rezultat prisutnosti oštećenja te se kompleks veže na neoštećeni lanac DNA nasuprot oštećenju (slika 6B). Na protein Xpc se zatim veže kompleks transkripcijskog inicijacijskog faktora II H (TFIIH) koji može mijenjati svoju funkciju ovisno tome sudjeluje li u transkripciji ili GG-NER-u i svojom Xpb (engl. *Xeroderma pigmentosum group B*) podjedinicom otvara DNA što omogućuje podjedinici Xpd (engl. *Xeroderma pigmentosum group D*) da helikaznom aktivnošću odmatata DNA dok ne dođe do oštećenja koje onemogućava daljnje odmatanje pa Xpd tako potvrđuje prisutnost većih oštećenja DNA (slika 6C). Zastajanje Xpd omogućava stvaranje preincizijskog kompleksa kojeg grade proteini Xpa, Rpa (engl. *Replication protein A*) i Xpg (engl. *Xeroderma*

pigmentosum group G), nakon čega se na protein Xpa veže kompleks ERCC1-Xpf (engl. *Excision Repair Cross Complementary Group 1-xeroderma Pigmentosum Group F*) koji cijepa DNA na 5' kraju oštećenja (slika 6E). Od 5' kraja oštećenja kreće sinteza DNA pomoću DNA polimeraza $\delta/\epsilon/\kappa$, a dolazak polimeraze δ zahtjeva prisutnost homotrimera PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*) koji klizi po DNA i omogućava usidrenje polimeraze te proteina RFC (engl. *replication factor C*) čija je zadaća postavljanje PCNA na molekulu DNA (González-Magaña i Blanco 2020; Schärer 2013). Nakon sinteze Xpg cijepa DNA na 3' kraju oštećenja što omogućuje povezivanje novosintetiziranog fragmenta DNA s ostatkom DNA na 3' kraju fragmenta pomoću DNA ligaze (slika 6G) (Chatterjee i Walker 2017; Schärer 2013). TC-NER s druge strane započinje radi zastajanja RNA polimeraze II što do oštećenja dovodi proteine Csa (engl. *Cockayne syndrome WD repeat protein A*) i Csb (engl. *Cockayne syndrome protein B*) koji svojom aktivnošću pomiču RNA polimerazu II unazad od oštećenja što razotkriva mjesto oštećenja nakon čega na to mjesto dolazi TFIIH i daljnji je popravak jednak kao kod GG-NER (Chatterjee i Walker 2017).

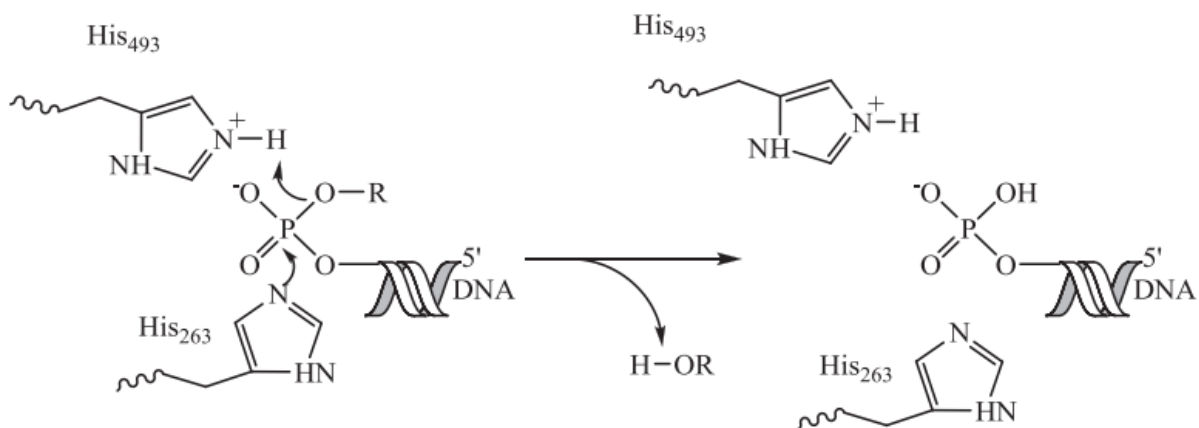


Slika 6. Shema globalnog genomskeg popravka izrezivanjem nukleotida (LigI i LigIII- DNA ligaza I i III) (adaptirano iz Schärer 2013).

1.5 Tdp1

Tdp1 i 2 enzimi su koji omogućavaju popravak križnih veza DNA s zaglavljanim topoizomerazama 1 i 2. Topoizomeraze su nužne za rješavanje topoloških problema koji nastaju prilikom transkripcije i replikacije, a rješavaju ih cijepanjem te naknadnom ligacijom DNA lanaca. Topoizomeraza 1 reže i ligira jedan lanac DNA, a topoizomeraza 2 reže i naknadno ligira oba lanca DNA (Pommier i sur. 2014). S obzirom da je Tdp1 povezan s popravkom Top1-cc mehanizam djelovanja topoizomeraze 1 bitan je za shvaćanje nastanka Top1-cc te djelovanja Tdp1 na nastalo oštećenje. Kao što je spomenuto topoizomeraza najprije stvara jednonlačani lom DNA stvarajući pritom prijelaznu kovalentnu vezu s 3' krajem DNA što omogućuje porezanom lancu rotaciju oko cijelovitog lanca čime se superuzvojnica DNA relaksira, a nakon relaksacije dolazi do ligacije porezanog lanca. U normalnim staničnim uvjetima prijelazna kovalentna veza rješava se kao što je opisano, ali u slučaju postojanja oštećenja DNA poput abazičnih mjesta, modificiranih baza ili pirimidinskih dimera prijelazno kovalentno stanje može zaglaviti te tako nastaje DPC. Na ovaj način djeluje i inhibitor topoizomeraze 1, kamptotecin, koji se razlikuje od kompetitivnih inhibitora enzima po tome da ne blokira katalitičku aktivnost topoizomeraze već stabilizira samo prijelazno stanje enzima što je vidljivo kod kvasca u kojem mutacije Top1 čine kvasce rezistentnim na kamptotecin (Nitiss i Wang 1988; Pommier i sur. 2014). Ljudski Tdp1 koji je veoma sličan zebričinom sadrži dvije domene: N – terminalnu domenu potrebnu za stabilnost i dovođenje proteina na mjesto oštećenja te C – terminalnu katalitičku domenu koja sadrži dva HKN motiva s histidinom ključnim za katalitičku aktivnost (Pommier i sur. 2014; Zaksauskaite i sur. 2021). Za hidrolizu fosfotirozilne veze Top1-cc katalitička domena Tdp1 također stvara prijelaznu kovalentnu vezu s 3' krajem DNA preko jednog HKN motiva dok drugi HKN motiv hidrolizira tu prijelaznu vezu stvarajući pritom 3' – fosfatni kraj (slika 7). S obzirom da 3' – fosfatni kraj ne omogućava početak sinteze DNA lanca uz Tdp1 djeluje i polinukleotid kinaza fosfataza (PKNP) koja stvara 3' – hidroksilni kraj i tako omogućava produženje lanca polimerazama. Tdp1 ne može maknuti nativnu topoizomerazu 1, već zahtjeva prethodnu proteolizu na stotinjak ili manje aminokiselina, a poznato je da se popravak Top1-cc može odraditi i putem NER-a koji umjesto fosfotirozilne veze cilja samu DNA. Osim popravka Top1-cc, Tdp1 popravljiva i druga oštećenja poput 3' – fosfoglikolata i 3' – deoksiriboza fosfata koji su česti produkti oksidacije DNA (Pommier i sur. 2014). Tdp1 je reguliran s više modifikacija pa se tako fosforilacija Tdp1 povezuje sa stabilizacijom i dolaskom Tdp1 na mjesto oštećenja kod dvolančanih lomova uzrokovanih nailaskom replikacijskih rašlji na Top1-cc, SUMOilacija se povezuje s dovođenjem Tdp1 na mjesta transkripcije zaustavljena s Top1-cc u postmitotičim

stanicama, a ADP – ribozilacija proteinom PARP1 se povezuje sa stabilizacijom i dovođenjem Tdp1 na mjesto Top1-cc u proliferirajućim stanicama. Za sam PARP1 pokazano je da svojom katalitičkom domenom ulazi u interakciju s N – terminalnom domenom Tdp1, a povezanost popravka Top1-cc s PARP1 vidljiva je u činjenicama da su stanice sisavaca bez PARP1 osjetljive na kamptotecin te imaju manju aktivnost Tdp1 (Pommier i sur. 2014). Istraživanje uloge Tdp1 kod zebrića temeljeno na upotrebi mutanata zebrića bez Tdp1 te inhibitora topozimeraze 1 poput kamptotecina dalo je do znanja da je Tdp1 ključan u popravku Top1-cc odraslih zebrića zbog osjetljivosti mutanata na kamptotecin, ali sami embriji zebrića nisu ovisni o Tdp1 jer njihovi mutanti ne pokazuju osjetljivost na kamptotecin (Zaksauskaite i sur. 2021).

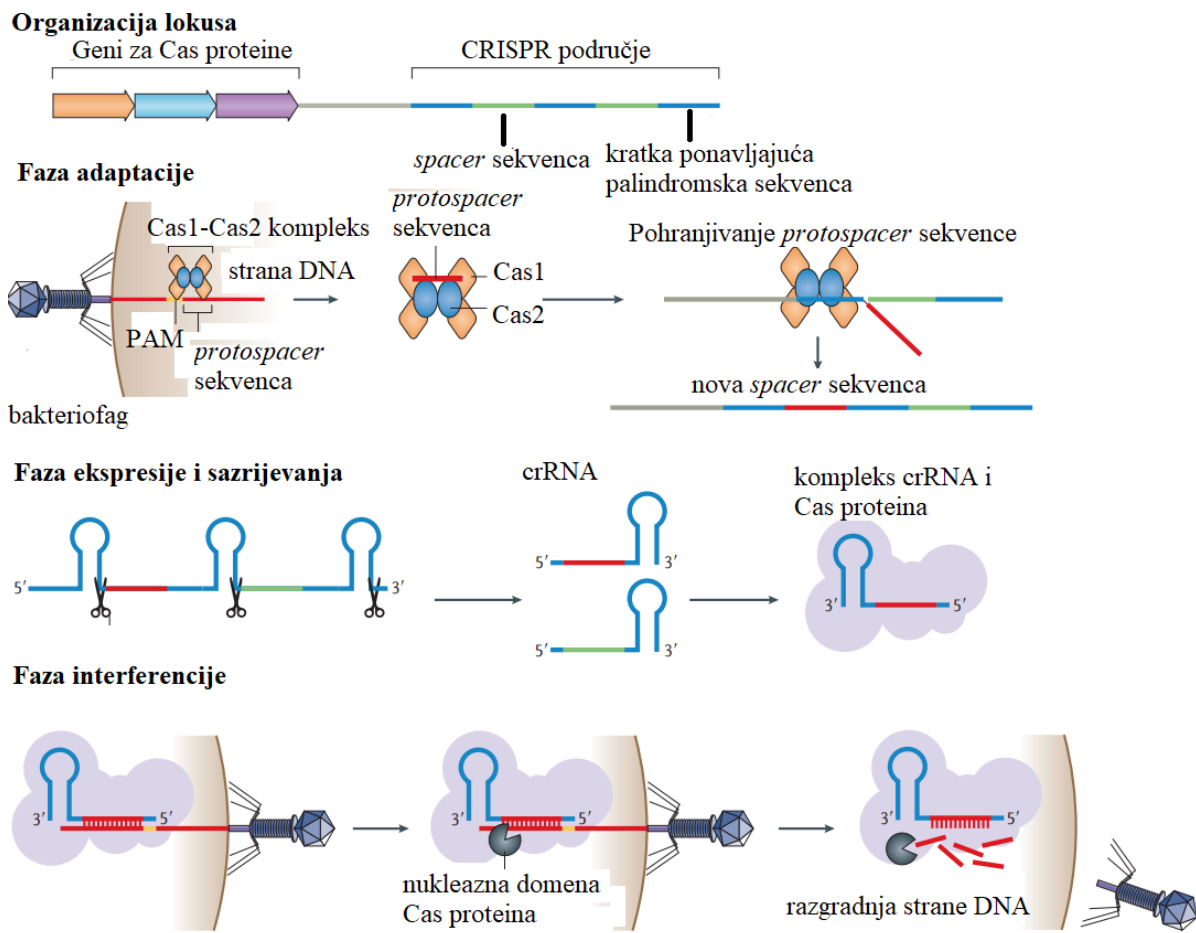


Slika 7. Shema katalitičke aktivnosti proteina Tdp1 u uklanjanju DPC-ova s 3' kraja DNA (Zakharenko i sur. 2019).

1.6 Sustav CRISPR/Cas-9

Izmjena genoma je tip genetičkog inženjerstva čiji je cilj namjerna izmjena genoma unutar živih stanica, a sustav CRISPR/Cas-9 (engl. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR associated protein 9*) pokazao se kao jedna od najefikasnijih metoda uređivanja genoma do sada poznatih čovjeku (Mengstie i Wondimu 2021). Sustav CRISPR i pripadajući Cas proteini otkriveni su i opisani kod prokariota kojima ovaj sustav omogućuje adaptivni imunitet za obranu od bakteriofaga. Kod bakterija postoje različiti tipovi sustava CRISPR/Cas, ali svima im je zajedničko da djeluju u tri faze: (1) adaptacija, (2) ekspresija i sazrijevanje te (3) interferencija (slika 8). Tijekom faze adaptacije, Cas proteini prepoznaju stranu DNA bakteriofaga koja se naziva *protospacer* te ju nakon obradnje u obliku *spacer* (razmaknica) sekvence pohranjuju unutar kratkih ponavljajućih palindromskih sekvenci bakterijskog

kromosoma koje razdvajaju različite *spacer* sekvence prema kojima je sustav i dobio ime. Za neke tipove sustava među kojima je i CRISPR/Cas9 nizvodno ili uzvodno od *protospacer* (protorazmaknica) sekvence mora se nalaziti PAM (engl. *protospacer adjacent motif*) sekvenca dugačka 2-5 parova baza čija je sekvenca specifična za sustav, a njena prisutnost je nužna kako bi tijekom faze interferencije došlo do cijepanja strane DNA. U fazi ekspresije i sazrijevanja dolazi do transkripcije CRISPR i *spacer* sekvenci i nastanka prekursorskih RNA sekvenci čijom obradom nastaju manje RNA poznate kao CRISPR RNA (crRNA), a svaka sadrži jednu *spacer* sekvencu s obje strane omeđenu s ponavljajućim palindromskim sekvencama. Takva crRNA duljine je 18-20 parova baza i ulazi u kompleks s jednim ili više (ovisno o tipu sustava) Cas proteina pa u posljednjoj fazi, fazi interferencije taj kompleks pretražuje strane nukleinske kiseline te ih prepoznaje na temelju komplementarnosti baza s crRNA. Ukoliko je strana nukleinska kiselina uspješno prepoznata Cas proteini ju cijepaju te dolazi do njene razgradnje (Amitai i Sorek 2016). CRISPR/Cas9 pripada tipu II CRISPR/Cas sustava što znači da proces sazrijevanja i interferencije obavlja jedan veliki protein tj. Cas9, a za te funkcije potrebna mu je tracrRNA (engl. *trans-activating CRISPR RNA*) koja ulazi u interakcije s crRNA s kojom čini RNA vodilju (engl. *guide RNA*, gRNA) i proteinom Cas9 kojem RNA vodilja služi kao nosač (Chylinski i sur. 2013; Mengstie i Wondimu 2021).



Slika 8. Shematski prikaz organizacije lokusa sustava CRISPR/Cas uz faze adaptacije, faze ekspresije i sazrijevanja te faze interferencije koje čine temelj adaptivnog imuniteta kod bakterija (adaptirano iz Amitai i Sorek 2016).

Za korištenja sustava CRISPR/Cas9 za potrebe genetičkog inženjerstva potrebne su dvije glavne komponente: (1) Cas9 protein te (2) jedinstvena RNA vodilja (engl. *single guide RNA*, sgRNA). Prvotni Cas9 protein koji se koristio u genetičkom inženjerstvu je izoliran iz bakterije *Streptococcus pyogenes*, a sam protein je velik i sadrži više domena koje omogućavaju obavljanje njegove funkcije. Protein Cas9 podijeljen je na REC režanj i NUC režanj. REC režanj zadužen je za vezanje gRNA, dok NUC režanj sadrži nukleazne domene RuvC i HNH koja svaka cijepa po jedan lanac DNA te domenu za interakciju s PAM sekvencom koja potvrđuje specifičnost PAM sekvence. Jedinstvena RNA vodilja je RNA dizajniranja spajanjem sekvenci tracrRNA i crRNA koje inače čine RNA vodilju. RNA vodilja u bakterijskim sustavima nastaje interakcijom tracrRNA i crRNA nakon njihovog prepisivanja s zasebnih lokusa bakterijskog genoma, a kod dizajna u genetičkom inženjerstvu sekvence koje kodiraju za ove DNA udružene su pa samim prepisivanjem odmah nastaje RNA vodilja zbog čega se ona naziva *single* (jedinstvena). Tijekom ciljane izmjene genoma sustavom

CRISPR/Cas9 protein kompleks RNA vodilje i Cas9 proteina prepoznaje PAM sekvencu nakon čega otvara DNA što omogućuje 5' kraju crRNA (dio sgRNA) da na temelju komplementarnosti stvori RNA-DNA hibrid, a Cas9 stvara tupi dvolančani lom 3 para baza uzvodno od PAM sekvence na način da HNH domena cijepa komplementarni lanac, a RuvC nekomplementarni. Nastali dvolančani lom popravljaju se aktivnošću enzima puteva popravka stanice domaćina i to homolognom rekombinacijom ili nehomolognim sparivanjem krajeva. Homologna rekombinacija je aktivna tijekom kasne S i G2 faze staničnog ciklusa te zahtjeva prisutnost homologne DNA koja se u genetičkom inženjerstvu unosi u stanicu kako bi došlo do specifične izmjene sekvence genoma prema predlošku unesene homologne sekvence. Nehomologno sparivanje krajeva aktivno je tijekom svih faza staničnog ciklusa te ne zahtjeva prisutnost homologne DNA, ali ovaj popravak DNA sklon je greškama zbog čega na mjestu loma mogu nastati nasumične insercije ili delecije DNA. Insercije i delecije nisu povoljne za normalno funkcioniranje stanica jer mogu dovesti do promjene u okviru čitanja tijekom sinteze proteina što često znači nastajanje preuranjenog stop kodona te nastanak nefunkcionalnih proteina (Mengstie i Wondimu 2021). Upravo zbog grešaka tijekom NHEJ popravka, sgRNA/Cas9 kompleks može uzrokovati inaktivaciju proteina od interesa. U slučaju proučavanja uloge određenog proteina u stanici nefunkcionalnost proteina može imati pozitivni učinak jer dovodi do promjene u staničnom metabolizmu što istraživačima daje uvid u ulogu proučavanog proteina. Zbog svoje preciznosti i relativne jednostavnosti primjene CRISPR/Cas9 postao je najrašireniji sustav za izmjenu gena modelnih organizama pa je tako i u primjeni kod ribe zebrice, modelnog organizma korištenog za izradu ovog rada. Najefikasnija metoda za izmjenu genoma zebrice uključuje mikroinjektiranje prethodno *in vitro* sastavljenog kompleksa Cas9 proteina i sgRNA u jednostanične embrije bez unosa homologne DNA što znači da popravak oštećenja DNA ide putem NHEJ puta. Nakon injektiranja, iz embrija nastaje generacija F0 zebrice koje nose mozaične mutacije nastale insercijom ili delecijom DNA na mjestu dvolančanog loma, te se takve jedinke dalje genotipiziraju u svrhu identifikacije jedinki utemeljitelja (engl. *founder*) koje prenose željenu mutaciju na potomstvo. Križanjem utemeljitelja dobiva se generacija F1 koja se genotipizira u svrhu identifikacije heterozigotnih jedinki za željenu promjenu gena. Križanjem dvaju heterozigota nastaje F2 generacija u kojoj se genotipizacijom pronalaze homozigotne jedinke. Homozigotne F2 jedinke dalje se mogu križati kako bi se dobio veći broj homozigota (F3) u svrhu bolje statističke obrade podataka od interesa na većem skupu jedinki. Na taj način dobiva se više jedinki čiji su geni izmijenjeni na jednak način što omogućuje kvalitetnije određivanje funkcije izmijenjenog gena i pripadajućeg proteina (Cornet i sur. 2018).

1.7 Zebrica (*Danio rerio*)

Riba zebrica je mala (duljine 2,5 cm do 4 cm), slatkovodna, omnivorna riba porijeklom iz rijeke Ganges u sjevernoj Indiji. Zebrica je često korišten životinjski modelni organizam zbog karakteristika kao što su potpuno sekvencirani genom, jednostavna manipulacija genomom, kratko generacijsko vrijeme od tri mjeseca, visoka plodnost i fekunditet, vanjska oplodnja, brz embrionalni razvoj, mala veličina te relativno jednostavan uzgoj koji ne zahtjeva mnogo laboratorijskog prostora (Teame i sur. 2019). Osim navedenog poznato je da otprilike 83 % gena povezanih s bolestima ljudi imaju ortologe u genomu zebrice, a sama sličnost organa i organskih sustava čovjeka i zebrice kao kralježnjaka omogućila je uspješno modeliranje ljudskih bolesti u zebrici. Tako postoje modeli zebrice za Duchenneovu mišićnu distrofiju, akutnu limfoblastičnu leukemiju, nefronoftizu, Parkinsonovu i Alzheimerovu bolest, infarkt miokarda te više metaboličkih bolesti i različitih tipova tumora (Cornet i sur. 2018; Teame i sur. 2019). Zebrica je prethodno korištena za istraživanja uloge gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* u popravku DNA, a koji su proučavani i u ovom diplomskom radu. Tako je razina *xpa* mRNA proučavana u sklopu istraživanja utjecaja egzogenih estrogena na NER popravak u embrijima zebrice, za protein Tdp1 zebrice zaključeno je da štiti od inhibitora topoizomeraze 1 i nastajanja Top1-cc u odraslom stadiju zebrice, ali ne i kod ličinki, a za nedostatak proteina Acrc u zebrici utvrđeno je da dovodi do značajnog majčinskog učinka koji karakteriziraju defekt u segregaciji kromosoma te poremećaje u sinkronizaciji staničnog ciklusa (Bhargava i sur. 2020; Notch i Mayer 2013; Zaksauskaite i sur. 2021).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja ovog diplomskog rada su (1) utvrditi da li se ekspresija gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* uključenih u popravak DPC-ova smanjuje sa starenjem organizma koristeći ribu zebricu kao modelni organizam, (2) utvrditi razine ekspresije istraživanih gena kod odraslih jedinki zebrice starosti osam mjeseci te dvije i pol godine i usporediti ih s ortolozima u čovjeka i miša ekvivalentne dobi, (3) ispitati razlike ekspresije spomenutih gena s obzirom na spol zebrice i (4) identificirati jedinke zebrice s izmijenjenom sekvencom gena *xpa* koja uzrokuje stvaranje nefunkcionalnog proteina u svrhu stvaranja Xpa deficijentne linije zebrice. S obzirom da se potencijal organizma za odgovor na DNA oštećenja smanjuje starenjem (Edifizi i Schumacher,

2015; Ribezzo i sur. 2016), usporedba razine ekspresije gena kvantitativnim PCR-om otkriti će da li je smanjenje ekspresije odabranih gena koji sudjeluju u popravku križnih veza DNA i proteina jedan od potencijalnih razloga smanjenja staničnog potencijala za popravak DNA. U svrhu usporedbe ekspresije gena tijekom starenja, analizirat će se ekspresija u odraslim, spolno zrelim zebricama starim osam mjeseci i starim jedinkama dobi dvije i pol godine.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Osnovne kemikalije

Destilirana voda (u daljnjem tekstu „voda“) *UltraPure DNase/RNase-Free (Thermo Fisher Scientific)*, 70 %-tni etanol, apsolutni etanol, reagens protiv RNaza (*Thermo Fisher Scientific*), agaroz (Euroclone)

3.1.2 Antibiotici

Ampicilin (100 mg/ml u 70 %-tnom etanolu) (*Sigma-Aldrich*)

3.1.3 Bakterijske stanice

Stanice *Escherichia coli XL10-Gold (Agilent Technologies)*

3.1.4 Plazmidi

pKHR5, pJET1.2/blunt

3.1.5 Pufferi i mediji

TAE Puffer, tekući LB medij, čvrsta hranjiva podloga LB medija i agaroze

3.1.6 Boje

GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Lonza), *DNA Gel Loading Dye (6x) (Thermo Fisher Scientific)*

3.1.7 Markeri veličina

GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Scientific)

3.1.8 Početnice

Početnice za lančanu reakciju polimerazom naručene su od komercijalnog dobavljača (*Macrogen*).

3.1.9 Nukleotidi

Smjesa dNTP-ova (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Thermo Scientific*)

3.1.10 Oprema

1,5 mL i 2 mL Safe-Lock Tubes (Eppendorf), MicroAmp Optical 8-Cap Strips (Applied Biosystems), MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)

3.1.11 Komercijalni kompleti

Monarch Total RNA Miniprep Kit (NEB), ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB), GoTaq qPCR Master Mix (Promega), CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific), Zymy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research), Taq DNA Polymerase (highQu), Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (NEB), Monarch DNA Gel Extraction Kit (NEB), Monarch PCR & DNA Cleanup kit (NEB), Monarch DNA Gel Extraction Kit

3.1.12 Instrumenti

Homogenizator Ultra-Turrax T25 (IKA – Janke & Kunkel), termoblok Thermomixer 5436 (Eppendorf), analitička vaga BP6100 Basic Plus Balance (Sartorius), laboratorijska vaga EMBN 200-2 (Kern), centrifuge Biofuge fresco (Heraeus), MIKRO 120 (Hettich), Universal 32 R (Hettich) i LSE Mini Microcentrifuge (Corning), vibracijska miješalica Bio Vortex VI (Biosan), autoklav LS-75-HG (Bari), spektrofotometar BioSpec-nano (Shimadzu), uređaj za cikličko mijenjanje temperature T100 Thermal Cycler (Bio-Rad), uređaj za qPCR 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), laminarni zaštitni uređaj LaminAir HB 2448 (Heraeus), uređaj za detekciju fluorescencije ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad), uređaj za gel elektroforezu Biometra Compact XS/S (Analytik Jena), inkubator s tresilicom New Brunswick Innova 40 (Eppendorf)

3.2 Metode

3.2.1 Dizajn početnica

U svrhu ekspresijske analize pojedinih gena potrebno je dizajnirati početnice koje omogućavaju njihovo specifično umnažanje. Kako bih dizajnirao takve početnice koristio sam sekvence gena *xpa* i *tdp1* ribe zebrice dostupne u bazi podataka mrežne stranice *Ensembl* i

mrežni alat *Primer-Blast* (NCBI) koji omogućuje unos parametara za precizno definiranje svojstava početnica. Tako sam definirao temperaturu mekšanja početnica između 58° i 62° C, duljinu početnica između 18 i 25 nukleotida, duljinu PCR amplikona između 80 i 120 parova baza, udio citozina i gvanina između 40 i 80 %, završetak početnice gvaninom ili citozinom, maksimalno 2 gvanina ili citozina u zadnjih 5 nukleotida 3' kraja početnice, maksimalno ponavljanje 4 ista nukleotida u slijedu te vezanje jedne od početnica na granicu dvaju egzona (engl. *exon-exon junction*). Vezanje jedne od početnica na granicu dvaju egzona uvjet je koji sprječava vezanje i nespecifično umnažanje genomske DNA koja može zaostati u uzorku nakon izolacije RNA. Sustav je na temelju ovih parametara prikazao sekvence traženih početnica te sam početnice dodatno provjerio pomoću računalnog alata *PrimerSelect* koji na temelju sekvenci početnica provjerava potencijalno stvaranje dimera iste početnice ili dvaju početnica i stvaranje ukosnica kod početnica. Dizajnirane početnice za gene *xpa* i *tdp1* uz početnice za gene *acrc*, *ef1a* i *atp5po* koje su prethodno dizajnirane u grupi za DNA popravak u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju na isti način kao i prethodno navedene su prikazane u tablici 1.

Tablica 1. Početnice korištene u svrhu ekspresijske analize kod ribe zebrice prethodno dizajnirane u grupi za DNA popravak u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju: gen za čiju je analizu dizajnirana početnica, naziv početnice, slijed nukleotida, duljina početnice, udio gvanina i citozina i temperatura mekšanja početnica. F-označava uzvodnu početnicu, R-označava nizvodnu početnicu.

Gen	Naziv početnice	Slijed nukleotida (5'-3')	Duljina (nt)	%GC	T _m (°C)
<i>acrc</i>	DrAcrc F1	TGGGAGCCAAGTACCAGTTA	20	50,0	57,4
	DrAcrc R1	TTTACACACAACCACCCTGC	20	50,0	57,7
<i>ef1a</i>	DrEF1a F2	TGATGCCCTTGATGCCATTCT	21	47,6	61,0
	DrEF1a R2	CACGACCCACAGGTACAGTT	20	55,0	59,0
<i>atp5po</i>	DrAtp5po F2	CTTGACAGAGCTGAAAGTGGC	20	55,0	58,2
	DrAtp5po R2	ACCACCAAGGATTGAGGCAT	20	50,0	58,3

Tablica 1. nastavak.

<i>tdp1</i>	DrTdp1 F1	AGAAGACACAGGGGATGTGG	20	55	59
	DrTdp1 R1	CCGGTACGCTTCCAGGTATT	20	55	59,5
	DrTdp1 F2	ACAGATGCTCCTGATTTACCCA	22	45,5	59,2
	DrTdp1 R2	TGTGCCGTCTGTATGCTGTA	20	50	59,1
<i>xpa</i>	DrXPA F1	GTGTGTGATAAATGCAGAGACAATG	25	40	59
	DrXPA R1	GCGGTGGCTCCCTCTTATC	19	63,2	59,9
	DrXPA F2	AACCAGCCCCAGTGATGGA	19	57,9	60,9
	DrXPA R2	ATCACACACAGACAGATCAAAACTG	25	40	59,8
	DrXPA F3	ACTCTACTTAAAGACACAGGTTGAG	25	40	58,3
	DrXPA R3	TCTGCTTCTGCACCTCTTTG	20	50	58,1
	DrXPA R4	TCACAGTCCTCAGGAGGTAATTC	24	45,8	59,8

3.2.2 Izolacija RNA iz tkiva ribe zebrice

Kako bih reverznom transkripcijom stvorio cDNA u svrhu qPCR eksperimenta, izolirao sam ukupnu RNA iz pojedinih tkiva riba zebrice. Ribe su secirane prije izrade mog diplomskog rada u istraživačkoj grupi za DNA popravak u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju te su njihova tkiva čuvana na -80°C ili -20°C ukoliko su bila uronjena u $1\times\text{DNA/RNA Protection Reagens}$ koji je dio komercijalnog kompleta *Monarch Total RNA Miniprep Kit*, a koji sam koristio za izolaciju RNA. Izolaciju sam provodio na spolno zrelih jedinkama podijeljenih na skupine: ženske jedinke starosti osam mjeseci (u daljnjem tekstu „mlade ženke“), muške jedinke starosti osam mjeseci (u daljnjem tekstu „mladi mužjaci“), ženske jedinke starosti dvije i pol godine (u daljnjem tekstu „stare ženke“) i muške jedinke starosti dvije i pol godine (u daljnjem tekstu „stari mužjaci“). Za svaku skupinu, izolaciju RNA iz pojedinih tkiva provodio sam na tri ili više bioloških replika od kojih svaku repliku čine tri jedinke zebrice. Prije početka izolacije RNA, sve površine i pribor za izolaciju prebrisani su 70 %-tnim etanolom i reagensom protiv Rnaza (*Rnaseaway*), a tijekom izolacije koristio sam rukavice kako bih maksimalno zaštitio osjetljive molekule RNA od raspada (Tan i Yiap 2009). Ukoliko sam RNA izolirao iz tkiva koja nisu prethodno uronjena u $1\times\text{DNA/RNA Protection Reagens}$ na njih sam dodao navedeni reagens kako tijekom vaganja tkiva ne bi došlo do razgradnje RNA. Nakon vaganja tkiva triju jedinki istog spola i starosti, tkiva su grupirana kako bi se iz njih mogla izolirati dostatna količina RNA. Na grupirana tkiva dodao sam 500 μL $1\times\text{DNA/RNA Protection Reagens}$ s obzirom da je većina tkiva bila mase 10-30 mg, a prema prijašnjim izolacijama u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju je zaključeno da je ta količina reagensa optimalna za homogenizaciju s mehaničkim homogenizatorom *Ultra-Turrax*

T25. Svaku vrstu tkiva homogenizirao sam 30 s i nakon toga očistio homogenizacijski nož 70 %-tnim etanolom i vodom prije homogenizacije druge vrste tkiva kako bi se spriječila kontaminacija uzoraka prethodno homogeniziranim tkivom. Na homogenizirana tkiva sam zatim dodao 25 μ L Proteinaze K i 50 μ L pripadnog pufera iz komercijalnog kompleta, izmiješao na vibracijskoj miješalici *Bio Vortex VI* i inkubirao u termobloku *Thermomixer 5436* 5 min pri temperaturi od 55 °C. Po završetku inkubacije uzorke sam opet izmiješao na vibracijskoj miješalici i centrifugirao u centrifugama *Biofuge fresco* ili *MIKRO 120* (ovisno o dostupnosti) na 13 000 okretaja/min tijekom 2 min (sva daljnja centrifugiranja u procesu izolacije RNA radio sam na istom broju okretaja centrifuge). Nakon centrifugiranja, iz uzoraka sam pažljivo odvojio supernatant, na supernatant dodao jednaki volumen *RNA Lysis* pufera, uzorke izmiješao na vibracijskoj miješalici i nanio ih na kolone za uklanjanje genomske DNA koje sam prethodno stavio u sabirne epruvete. Uzorke sam centrifugirao 30 s kako bih uklonio većinu genomske DNA te na filtrat kolone dodao jednaki volumen apsolutnog etanola i temeljito izmiješao pipetiranjem, a kolonu za vezanje genomske DNA uklonio. Uzorke sam poslije toga prebacio na kolonu za vezanje RNA i centrifugirao 30 s kako bi se RNA vezala na kolonu, a filtrat sam uklonio (filtrat je potrebno ukloniti u svakom koraku centrifugiranja osim posljednjem). Kolonu sam zatim isprao s 500 μ L *RNA Wash* pufera i opet centrifugirao 30 s. U svrhu dodatne razgradnje genomske DNA na kolonu sam do dao 5 μ L DNaze I s pripadnim puferom i inkubirao 15 min pri sobnoj temperaturi nakon čega sam na kolonu dodao 500 μ L *RNA Priming* pufera i centrifugirao 30 s. Nakon toga sam ispirao RNA na koloni dva puta tako da sam dodao 500 μ L *RNA Wash* pufera i centrifugirao prvo 30 s, a zatim 2 min (u drugom ispiranju). Nakon ispiranja, kolone s RNA sam prebacio u 1,5 mL *Safe-Lock* epruvete te sam eluirao RNA s kolona s 30 μ L vode centrifugiranjem 30 s. Epruvete s uzorcima RNA sam zatim stavio u led kako ne bi došlo do razgradnje RNA tijekom određivanja koncentracije i kvalitete RNA te pripreme cDNA.

3.2.3 Određivanje koncentracije izolirane RNA

Kako bih RNA izoliranu iz pojedinih tkiva ribe zebrice mogao koristiti u daljnjim postupcima trebao sam uzorcima izmjeriti koncentraciju. Za mjerenje koncentracije i čistoće izolirane RNA koristio sam spektrofotometar *BioSpec-nano* koji mjeri optičku gustoću (engl. *optical density*, OD) uzoraka kod valnih duljina 230 nm, 260 nm i 280 nm i na temelju Lamber-Beerovog zakona izračunava koncentraciju RNA. 230 nm je valjna duljina pri kojoj svjetlost snažno apsorbiraju tvari kao što su EDTA, lipidi, soli i ugljikohidrati, valna duljina od 260 nm je

maksimum apsorpcije RNA i DNA, dok pri 280 nm svjetlost snažno apsorbiraju proteini i fenoli. Na spektrofotometar sam prvo stavio 1 μL vode koju sam koristio za eluiranje RNA kao slijepu probu za normalizaciju mjerenja, a koncentracije uzoraka sam mjerio u triplikatima nanošenjem 1 μL uzorka na spektrofotometar. Spektrofotometar za svaki uzorak daje informacije o koncentraciji i omjerima optičke gustoće pri valnim duljinama 260 nm i 280 nm ($\text{OD}_{260/280}$) te 260 nm i 230 nm ($\text{OD}_{260/230}$). $\text{OD}_{260/280}$ ukazuje razinu onečišćenja RNA proteinima i fenolima, dok $\text{OD}_{260/230}$ ukazuje na razinu onečišćenja s EDTA, lipidima, solima ili ugljikohidratima.

3.2.4 Elektroforeza izolirane RNA i DNA umnožene PCR-om

Iako mjerenjem koncentracije RNA pomoću spektrofotometra dobivamo informacije o kvantiteti izolirane RNA, sam uređaj ne može odrediti ako je došlo do eventualne razgradnje RNA prilikom izolacije. Za određivanje kvalitete izolirane RNA koristio sam elektroforezu uzoraka RNA u 1 %-tnom agaroznom gelu. Gel sam pripremio otapanjem 1 g agaroze u 100 mL 1x TAE pufera, a za vizualizaciju RNA dodao sam 1,5 μL fluorescentne boje *GelStar Nucleic Acid Gel Stain* te čekao barem pola sata da se gel stvrdne. Stvrdnuti gel sam stavio u sustav *Biometra Compact XS/S* i u sustav dodao 1x TAE pufer za elektroforezu. U jažice gela stavio sam po 200 ng izolirane RNA svakog tkiva pomiješane s bojom *DNA Gel Loading Dye (6x)* koju sam razrijedio 6 puta te u zasebnu jažicu 1,5 μL markera veličina nukleinskih kiselina *GeneRuler DNA Ladder Mix*, a sustav za elektroforezu priključio sam na napon od 120 V tijekom 45 min. Nakon elektroforeze, gel sam stavio na vizualizaciju u uređaj za detekciju fluorescencije *ChemiDoc XRS+ System* te prema omjeru fluorescencije frakcije RNA s 28s i 18s rRNA odredio kvalitetu izolirane RNA (Skrypina i sur. 2003). Osim s RNA, gel elektroforezu provodio sam i s DNA umnoženom lančanom reakcijom polimerazom nakon umnažanja s *Taq DNA* polimerazom i *Phusion High-Fidelity DNA* polimerazom. Kako bih provjerio specifičnost vezanja dizajniranih početnica i za detekciju promjene u genu *xpa* proveo sam gel elektroforezu DNA molekula. Kod elektroforeza s DNA pripremao sam 2 %-tni agarozni gel otapanjem 2 g agaroze u 100 mL 1x TAE pufera, koristio isti sustav i pufer za elektroforezu, a u jažice sam stavio 10 μL reakcijske smjese odrađenog PCR-a pomiješane s 2 μL boje *DNA Gel Loading Dye (6x)* i 1,5 μL markera veličina nukleinskih kiselina *GeneRuler DNA Ladder Mix*. Sustav za elektroforezu priključio sam na napon od 110 V tijekom 1 h.

3.2.5 Reverzna transkripcija izolirane RNA

Izoliranu RNA preveo sam u cDNA koristeći komercijalni komplet *ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit* prema *Easy Protocol* uputama. Tako sam u reakcijsku smjesu stavio 10 μL *ProtoScript II Reaction Mix(2x)*, 2 μL *Random Primer Mix*, 2 μL *ProtoScript II Enzyme Mix(10x)* i dodao maksimalno 1000 ng RNA. Kod pojedinih uzoraka RNA koji su imali niže koncentracije dodao sam manju masu zbog granice volumena reakcijske smjese od 20 μL jer proizvođač jamči 100 % efikasnost reakcije reverzne transkripcije za mase od 1 ng do 1 μg ukupne RNA. Pripremljene uzorke stavio sam u uređaj za cikličko mijenjanje temperature *T100 Thermal Cycler* i postavio inkubaciju od 5 min pri 25 °C, koju slijedi inkubacija 1 h pri 42 °C i 5 minutna inaktivacija enzima pri 80 °C. Svaka biološka replika cDNA za pojedino tkivo zebrića sastojala se od cDNA načinjene reverznom transkripcijom RNA izolirane iz triju jedinki zebrića, osim u slučaju jedne od bioloških replika bubrega mladih zebrića gdje sam upotrijebio bubrege šest zebrića zbog njihove premale mase.

3.2.6 PCR

Za provjeru specifičnosti početnica prije njihovog korištenja u qPCR-u s dizajniranim početnicama umnažao sam cDNA jetre i jajnika koristeći komercijalni komplet s *Taq DNA* polimerazom. U svaku reakciju smjesu od dodao sam 1,5 μL *10x PCR* pufera, 0,3 μL 10 mM smjese dNTP-ova 0,9 μL 50 mM MgCl_2 , 0,3 μL 10 μM uzvodne i 0,3 μL 10 μM nizvodne početnice, 5 ng cDNA i do ukupnog volumena od 15 μL dodao sam vodu. Pripremljene uzorke sam stavio u uređaj za cikličko mijenjanje temperature *T100 Thermal Cycler* i pokrenuo ga uz postavke prikazane u tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti uređaja za cikličke izmjene temperature tijekom *Taq*-PCR reakcije: faza ciklusa, temperatura ciklusa, trajanje ciklusa i broj ciklusa.

Faza	Temperatura (°C)	Trajanje ciklusa (s)	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	60	1
Denaturacija	95	15	35
Vežanje početnica	razlikuje se između parova početnica	15	35
Elongacija	72	15	35
Završna elongacija	72	300	1

Tablica 2A. Parovi početnica s pripadajućim temperaturama vezanja početnica na kalup DNA.

Par početnica	Ta (°C)
DrTdp1 F1+R1	58,8
DrTdp1 F2+R2	57,1
DrXPA F1+R1	58,4
DrXPA F2+R2	59,5
DrXPA F3+R3	56,8
DrXPA F1+R4	58,4

Kako bih umnožio sekvencu genomske DNA izmijenjenih riba zebrica u svrhu stvaranja mutanta u genu *xpa* pomoću sustava CRISPR/Cas9, koristio sam prethodno dizajnirane početnice (tablica 3) koje omogućavaju specifično umnažanje sekvence DNA koju se ciljalo izmijeniti te komercijalni komplet s *Phusion High-Fidelity DNA* polimerazom zbog toga što ova polimeraza tijekom PCR-a stvara DNA s tupim krajevima što omogućuje ligaciju umnožene DNA i plazmida pJET u svrhu kloniranja (*blunt end cloning*). U svaku reakcijsku smjesu dodao sam 4 µL *5x Phusion HF* pufera, 0,4 µL 10 mM smjese dNTP-ova, 0,2 µL *Phusion DNA* polimeraze, 1 µL 10 µM uzvodne i 1 µL 10 µM nizvodne početnice, 50 ng genomske DNA te vode do ukupnog volumena od 20 µL. Genomska DNA riba zebrica F1 generacije mutanata u genu *xpa* prethodno je izolirana i pročišćena u istraživačkoj grupi za DNA popravak u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju. Pripremljene uzorke sam stavio u uređaj za cikličko mijenjanje temperature *T100 Thermal Cycler* i pokrenuo ga uz postavke prikazane u tablici 4.

Tablica 3. Početnice upotrebljene za genotipizaciju zebrica s potencijalnom mutacijom u genu *xpa*: naziv početnice, slijed nukleotida, duljina početnice, udio gvanina i citozina i temperatura mekšanja početnica. F-označava uzvodnu početnicu, R-označava nizvodnu početnicu.

Naziv početnice	Slijed nukleotida (5'-3')	Duljina (nt)	%GC	T _m (°C)
DrXPAE6ext F	AAGGTGGAGAAACGCTCTGT	20	50	59
DrXPAE6ext R	AAGTGCTCAAGAGTGATTGCAC	22	45	60

Tablica 4. Uvjeti uređaja za cikličko mijenjanje temperature tijekom *Phusion*-PCR reakcije: faza ciklusa, temperatura ciklusa, trajanje ciklusa i broj ciklusa.

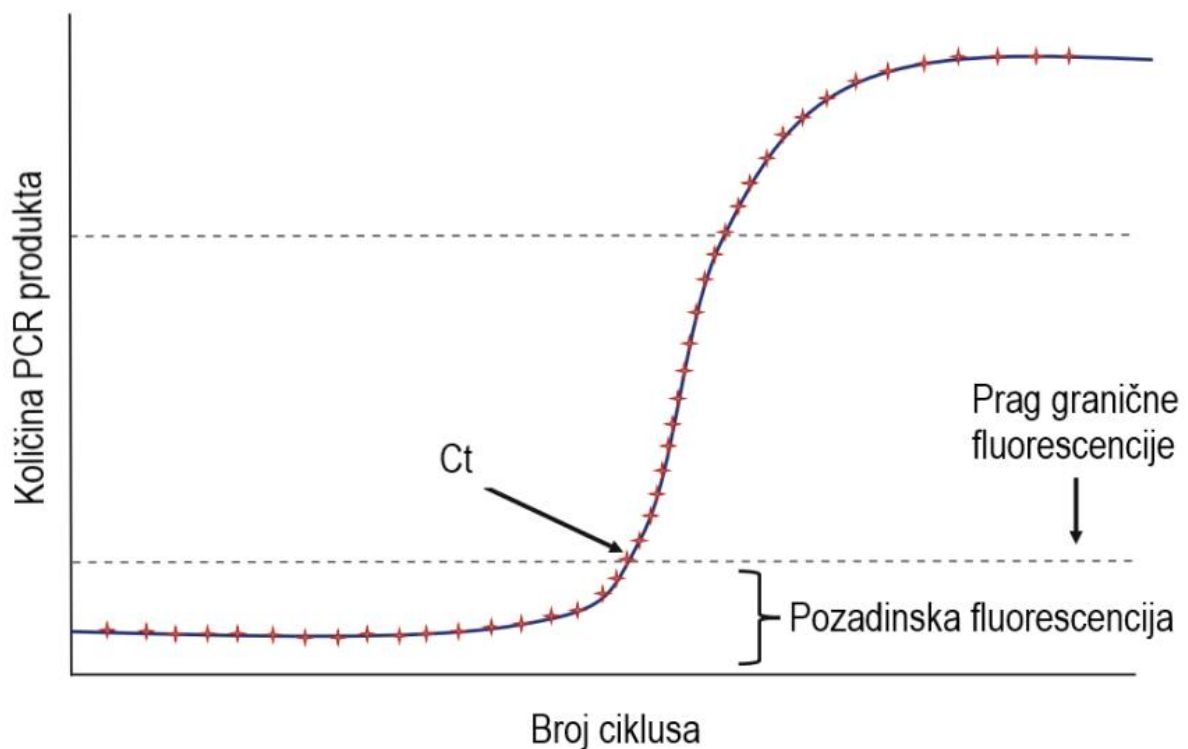
Faza	Temperatura (°C)	Trajanje ciklusa (s)	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98	30	1
Denaturacija	98	10	35
Vežanje početnica	64,3	15	35
Elongacija	72	15	35
Završna elongacija	72	300	1

3.2.7 qPCR

Kvantitativni PCR razvijen je na temelju PCR-a uz dodatak fluorokroma koji fluorescira prilikom vežanja na DNA te kameru koja može detektirati fluorescenciju na kraju svakog ciklusa. Fluorescencija je proporcionalna količini umnoženog PCR produkta. Fluorokromi koji se upotrebljavaju za qPCR mogu biti specifični ukoliko su vezani za probe koje vežu samo ciljane PCR produkte ili nespecifični koji se vežu za svaku dvolančanu DNA poput boje *SYBR Green* koja je dio *GoTaq qPCR Master Mix* koju sam i ja koristio za provedbu qPCR-a. Boja *SYBR Green* interkalira u DNA uzvojnici u mali utor DNA prilikom čega dolazi do otpuštanja fluorescencije. Kinetika qPCR reakcije prati sigmoidalni oblik prikazan na slici 9 te su za njeno tumačenje bitne tri stavke: pozadinska fluorescencija (engl. *background*) koja nije specifična za reakciju, ali ometa detektiranje male količine PCR produkta u početku reakcije, baznu liniju (engl. *baseline*) koja označava dio reakcije u kojoj se razina fluorescencije značajno ne mijenja promjenom ciklusa zbog male količine PCR produkta i prag granične fluorescencije (engl. *threshold*) koji se postavlja iznad bazne linije u eksponencijalnoj fazi rasta sigmoidalne krivulje (Segundo-Val i Sanz-Lozano 2016). Na temelju praga granične fluorescencije određuje ciklus qPCR-a u kojem fluorescencija nastala zbog umnažanja PCR produkta određenog uzorka prelazi prag granične fluorescencije koji se naziva Ct (engl. *cycle threshold*). Ct vrijednost određenog uzorka govori nam o količini početne cDNA u određenom uzorku, a Ct vrijednost je obrnuto proporcionalna s količinom početne cDNA pa tako manja Ct vrijednost označava veću količinu početne cDNA. Sama qPCR reakcija podijeljena je u tri faze vidljive na slici 9: eksponencijalnu fazu u kojoj je količina PCR produkta niska i eksponencijalno raste zbog dostupnosti reagensa, ali taj rast nije moguće detektirati zbog nedovoljne količine produkta,

linearnu fazu u kojoj se količina PCR produkta povećava linearno zbog ograničenosti reagensa, te faza platoa u kojoj se reakcija usporava i staje nakon potpunog iskorištenja dostupnih reagensa (Segundo-Val i Sanz-Lozano 2016).

Razina ekspresije gena može se odrediti koristeći metode apsolutne te relativne kvantifikacije. Kod metode apsolutne kvantifikacije razina ekspresije gena određuje se utvrđivanjem točnog broja kopija PCR produkta u određenom uzorku na temelju uspoređivanja Ct vrijednosti uzorka s Ct vrijednostima prethodno pripremljenim serijskim razrjeđenjima standardnog uzorka poznate koncentracije DNA (Segundo-Val i Sanz-Lozano 2016). S druge strane metoda relativne kvantifikacije ekspresije gena koju sam koristio za utvrđivanje ekspresije gena u ovom radu zahtjeva postojanje endogene kontrole (*housekeeping gene*; HKG). Kao endogena kontrola koriste se konstitutivni geni, to jest geni čija je ekspresija konstitutivna i ne varira između različitih tkiva pa stoga omogućuje usporedbu ekspresije ciljnih gena u različitim tkivima na temelju Ct vrijednosti.



Slika 9. Grafički prikaz krivulje kinetike qPCR reakcije (adaptirano iz Segundo-Val i Sanz-Lozano 2016).

Kvantitativni PCR radio sam kako bih odredio efikasnost početnica te odredio ekspresiju gena *xpa*, *acrc* i *tdp1*. S obzirom da je qPCR iznimno osjetljiva metoda za utvrđivanje količine DNA, postupak pripreme uzoraka radio sam u sterilnom kabinetu *LaminAir HB 2448*, a uzorke sam

pripremao u *MicroAmp Optical 8-Cap* optičkim epruветama u nizu i *MicroAmp Optical 96-Well Reaction* optičkim epruветama koje su kompatibilne s *7300 Real-Time PCR System* uređajem. Svaku reakcijsku smjesu sam pripremao prema *GoTaq qPCR Master Mix* protokolu pa sam tako u reakcijsku smjesu dodao 5 μL *GoTaq qPCR Master Mix*, 0,1 μL CXR (engl. *carboxy-X-rhodamine*) referentne boje i 0,5 μL 6 μM uzvodne te 0,5 μL 6 μM nizvodne početnice, dok se ostatak reakcije razlikovao ovisno o tome jesam li određivao efikasnost ili ekspresiju gena. Za određivanje efikasnosti u reakcijsku smjesu sam dodao cDNA u serijskim razrjeđenjima tako da je ukupna masa kalupa cDNA u pojedinoj reakciji bila 10 ng, 5ng, 2,5 ng, 1 ng, 0,3 ng i 0,1 ng, a do volumena od 10 μL dodao sam vodu. Za određivanje razine ekspresije gena u svaku reakcijsku smjesu dodao sam jednaku količinu cDNA (5 ng) što omogućuje međusobnu usporedbu ekspresije svih uzoraka i do volumena od 10 μL dodao vodu. Reakcije qPCR-a sam u početku pripremao u triplikatima, a kasnije u duplikatima te sam uz svaku reakciju pripremio i negativnu kontrolu koja nije sadržavala kalup, to jest cDNA. Kako bih osigurao spuštanje reakcijske smjese na dno PCR epruвета i PCR epruвета u nizu centrifugirao sam ih 5 min na 500 g te sam ih nakon toga stavio u *7300 Real-Time PCR System* uređaj i pokrenuo qPCR reakciju uz postavke prikazane u tablici 5.

Tablica 5. Uvjeti *7300 Real-Time PCR System* uređaja tijekom qPCR reakcije: faza ciklusa, temperatura ciklusa, trajanje ciklusa i broj ciklusa.

Faza	Temperatura (°C)	Trajanje ciklusa (s)	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	600	1
Denaturacija	95	15	40
Vežanje početnica i elongacija	60	60	40

Za svako tkivo zebrića kvantifikaciju određenog gena odradio sam na tri biološke replike priređene cDNA, a tijekom provedbe qPCR-a koristio sam dvije ili tri tehničke replike (ovisno o eksperimentu) upotrebom alikvota cDNA istog tkiva.

3.2.8 Pročišćavanje DNA

Kako bih za kloniranje DNA imao čistu umnoženu sekvencu genomske DNA bez ostataka dNTP-ova i ostalih komponenti reakcijske smjese, za PCR sam koristio *Monarch PCR & DNA Cleanup* komercijalni komplet. Na 20 μL PCR reakcijske smjese dodao sam 100 μL *DNA Cleanup Binding* pufera i izmiješao pipetiranjem te nanio na kolonu za skupljanje DNA koju sam prethodno stavio u sabirnu epruvetu. Uzorke sam zatim centrifugirao na 13 000 okretaja/min (sve korake centrifugiranja za pročišćavanje DNA radio sam s ovom jačinom centrifugiranja) 1 min. Nakon toga sam dva puta ponovio postupak dodavanja 200 μL *DNA Wash* pufera i centrifugiranja 1 min. Kolonu za skupljanje DNA sam zatim stavio u 1,5 mL *Safe-Lock* epruvetu i na kolonu stavio 10 μL vode. Pričekao sam 1 min i DNA eluirao s kolone centrifugiranjem 1 min.

3.2.9 Ligacija

U svrhu ligacije umnožene sekvence genomske DNA zebrice u plazmid koristio sam *CloneJET PCR Cloning* komercijalni komplet čija je glavna komponenta *pJET1.2/blunt* vektor koji sadrži gen za rezistenciju na ampicilin što omogućuje kasniju selekciju transformiranih bakterija uzgojem na hranjivoj podlozi s dodanim ampicilinom. U reakcijsku smjesu koju sam držao na ledu dodao sam 1 μL 2x reakcijskog pufera, 0,5 μL *pJET1.2/blunt* (50 ng/ μL) vektora, 1 μL T4 DNA ligaze, 5 ng pročišćene umnožene DNA i dopunio vodom do ukupnog reakcijskog volumena od 10 μL . Nakon pripreme inkubirao sam reakcijsku smjesu 2 h pri 22 °C.

3.2.10 Transformacija bakterijskih stanica

Za stvaranje klonova s pripremljenim plazmidima transformirao sam bakterijske stanice *Escherichia coli XL10-Gold*. Kompetentne bakterijske stanice pohranjene u epruvetama na -80 °C stavio sam na led, izmiješao pomoću nastavka pipete te u dvije zasebne epruvete odvojio 25 μL i 50 μL stanica. Na 50 μL stanica dodao sam 1 μL ligacijske smjese, a za kontrolu transformacije na 25 μL bakterija dodao sam 1 ng pKHR5 plazmida koji također nosi gen za rezistenciju na ampicilin te oba uzorka nježno promiješao nastavkom pipete i ostavio na ledu 30 min. Nakon inkubacije na ledu, stanice sam premjestio u termoblok i tamo držao 40 s pri 42 °C u svrhu otvaranja pora bakterijskih membrana i ulaska plazmida u kompetentne bakterije, a zatim sam ih 2 min stavio na led kako bi se osigurao ostanak plazmida unutar bakterija (*Promega* 2022). Na bakterije sam dodao 475 μL LB medija (prethodno ugrijanog na 37 °C)

na 25 μL bakterija, odnosno 950 μL na 50 μL bakterija. Epruvete s transformiranim bakterijama sam zatim stavio 1 h na inkubaciju pri 37 °C i 225 okretaja/min u inkubator s tresilicom *New Brunswick Innova 40*.

3.2.11 Priprema agaroznih ploča za uzgoj bakterija

Kako bih mogao uzgajati bakterije na selektivnoj podlozi pripremio sam agarozne ploče za rast bakterija. Prvo sam otopio 150 ml LB agara u mikrovalnoj pećnici, nakon čega sam medij ohladio na sobnoj temperaturi, u sterilnom kabinetu u medij sam dodao 150 μl ampicilina (koncentracije 100 mg/ml) te tako pripremljeni medij izlio u Petrijeve zdjelice s poklopcem i nakon sušenja pohranio u hladnjak na 4 °C.

3.2.12 Nasađivanje i uzgoj bakterija

Nakon inkubacije bakterija u inkubatoru s tresilicom, 100 μL transformacijske smjese pomiješao sam s 400 μL ugrijanog (37 °C) LB medija (odnosno 50 μL kontrolne transformacijske smjese s 150 μL ugrijanog LB medija) i izlio smjesu na agarozne ploče za rast bakterija s LB medijom i ampicilinom koje sam prethodno izvadio iz hladnjaka (4 °C) kako bi se zagrijale na sobnu temperaturu. Za raspoređivanje bakterija po pločama koristio sam sterilne staklene kuglice te sam nakon raspoređivanja ostavio ploče da se osuše na zraku, a potom ih preko noći (otprilike 16h) pohranio u inkubatoru pri 37 °C kako bi bakterije narasle.

3.2.13 Uzgoj specifičnih kolonija

Poslije noćne inkubacije ploče s bakterijama izvadio sam iz inkubatora te stavio u hladnjak na 4 °C kako bih spriječio daljnji rast bakterija koji može dovesti do nastanka kolonija koje ne sadrže plazmid. U svrhu umnažanja kolonija bakterija koje u plazmidima specifično nose samo jedan od umnoženih alela genomske DNA koristio sam tekuće kulture bakterija koje sam pripremao unutar laminarnog zaštitnog uređaja. U tekući LB medij sam dodao 1:1000 volumena ampicilina (koncentracije 100 mg/ml) kako bih osigurao rast rezistentnih bakterijskih stanica te ovisno o broju kolonija pripremio isti broj epruveta u koje sam dodao 3 ml ovako pripremljenog LB medija. Pojedine kolonije sam dodirnuo vrhom nastavka za pipete i nastavak ostavio u epruveti s LB medijom, nakon čega sam epruvete zaklopio te inkubirao u inkubatoru s tresilicom preko noći pri 37 °C i 225 okretaja/min.

3.2.14 Izolacija plazmida iz bakterija

Za izolaciju plazmida iz prekonocnih tekućih kultura bakterija koristio sam komercijalni komplet *Zyppy Plasmid Miniprep*. U reakcijsku epruvetu od 1,5 ml dodao sam 600 µL prekonocne tekuće kulture koju sam prethodno izmiješao na vibracijskoj miješalici i na kulturu dodao 100 µL pufera za lizu (7x) te miješao okretanjem epruvete 4-6 puta tijekom 2 min. Nakon toga, na uzorke sam dodao 350 µL neutralizacijskog pufera i opet miješao okretanjem epruvete do stvaranja precipitata. Poslije stvaranja precipitata uzorke sam centrifugirao 5 min pri 13 000 okretaja/min (sve korake izolacije plazmida radio sam na ovoj brzini rada centrifuge), te sam nakon centrifugiranja prebacio 900 µL supernatanta na *Zymo-Spin IIN* kolonu koju sam prethodno stavio u sabirnu epruvetu i centrifugirao 15 s nakon čega sam odbacio filtrat. Na kolonu sam zatim dodao 200 µL *Endo-Wash* pufera, centrifugirao 30 s pa dodao 400 µL *Zyppy Wash* pufera i centrifugirao 1 min. *Zymo-Spin IIN* kolonu sam zatim prebacio u čistu reakcijsku epruvetu od 1,5 ml i plazmide eluirao s kolone dodavanjem 30 µL vode koju sam na uzorcima ostavio 1 min pri sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirao 30 s. Reakcijske epruvete s izoliranim plazmidima stavio sam na led te im izmjerio koncentraciju pomoću spektrofotometra *BioSpec-nano* prema istom postupku kao i kod mjerenja koncentracije RNA. Dio volumena uzoraka koristio sam za stvaranje reakcijske smjese koju sam slao na sekvenciranje, a ostatak sam pohranio na -20 °C.

3.2.15 Sekvenciranje i analiza dobivenih sekvenci

Za potrebe sekvenciranja u reakcijsku smjesu dodao sam 5 µL 10 µM *pJET1.2* uzvodne početnice koja je dio komercijalnog kompleta i 5 µL izoliranih plazmida koncentracija od 30 ng/µL do 100 ng/µL te uzorke poslao na sekvenciranje u tvrtku *Macrogen*. Dobivene sekvence analizirao sam pomoću računalnog alata *BioEdit* uspoređujući dobivene sekvence sa sekvencom gena *xpa* koju sam preuzeo s mrežne stranice *Ensembl* u svrhu detekcije prisutnosti mutacije.

3.2.16 Obrada podataka

Za dobivene Ct vrijednosti gena u qPCR reakciji na tehničkim replikama cDNA izračunao sam aritmetičku sredinu te tu vrijednost zabilježio kao Ct vrijednost određenog gena u pojedinoj biološkoj replici tkiva. Prilikom kvantifikacije ciljnih gena u određenim biološkim replikama tkiva primjetio sam povećanu Ct vrijednost endogene kontrole koja kao konačni pokazatelj

kvalitete ukazuje na raspad izolirane RNA prije stvaranja cDNA ili na raspad same cDNA. Zbog navedenog, neke od bioloških replika nisam mogao koristiti za daljnje analize pa se broj bioloških replika tkivne kvantifikacije ciljnih gena razlikuje u pojedinim tkivima skupina zebrica od jedne do triju replika što je vidljivo i u prikazu rezultata. Nadalje, ovakav nedostatak replika za neka tkiva u potpunosti onemogućava provedbu statističke analize značajnosti razlika u ekspresiji ciljnih gena između mladih i starih skupina zebrica te između različitih spolova. U tkivima u kojima je moguće provesti statističku analizu značajnosti razlike u ekspresiji, rezultati višestrukog t-testa pokazuju da između tkiva analiziranih skupina nema statistički značajne razlike.

Kako bih napravio relativnu kvantifikaciju ciljnih gena koristio sam *Q-Gene* metodu temeljenu na izračunavanju srednje normalizirane ekspresije (engl. *Mean Normalized Expression*; MNE) (Muller *et al.*, 2002). MNE se izračunava prema formuli:

$$MNE = E(HKG)^{Ct(HKG)} / E(gen)^{Ct(gen)},$$

u kojoj je: E (HKG) – efikasnost početnica HKG, Ct (HKG) – srednja vrijednost Ct HKG u pojedinom tkivu, E (gen) – efikasnost početnica ciljnog gena, Ct (gen) – srednja vrijednost Ct ciljnog gena u pojedinom tkivu.

Za korištenje *Q-Gene* metode nužno je odrediti točnu efikasnost početnica ciljnih gena i endogene kontrole s obzirom da mnoge PCR reakcije nemaju idealnu efikasnost od 100 % koja označava da u svakom ciklusu PCR reakcije dolazi do udvostručenja PCR produkta (Rodríguez i sur. 2015). Također je važno da efikasnost parova početnica bude otprilike jednaka jer je to potrebno kako bi usporedba ekspresije bila značajna (Jozefczuk i Adjaye 2011). Prihvatljiva efikasnost početnica za qPCR je od 90 % do 110 %, a prema članku mrežne stranice Biosistemika efikasnost iznad 100 % indikacija je inhibicije polimeraze do koje dolazi zbog prevelikih količina DNA ili kontaminanata poput polisaharida, proteinaze K, etanola i drugih (Čepin 2017; Rodríguez *et al.*, 2015).

Za određivanje efikasnosti početnica radio sam qPCR na serijskim razrjeđenjima cDNA te sam dobivene Ct vrijednosti unosio u *Microsoft Office 365 Excel* kako bi izradio standardnu krivulju na temelju čijeg nagiba sam određivao efikasnost početnica. Sama efikasnost se izračunava prema formuli:

$$E = 10^{\frac{-1}{a}} - 1,$$

u kojoj je a koeficijent smjera pravca.

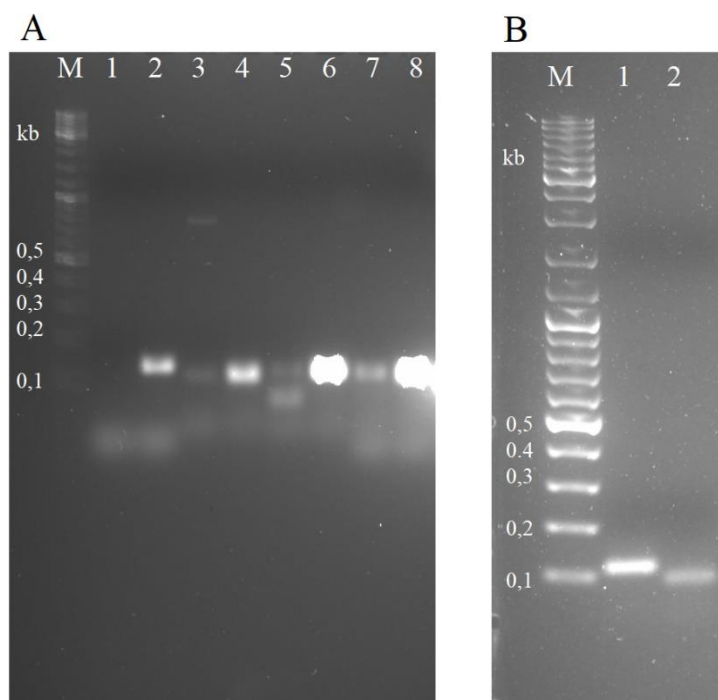
Za analizu rezultata i grafički prikaz podataka koristio sam *Microsoft Office 365 Excel* i *GraphPad Prism 8*.

U svrhu lakše interpretacije rezultata ekspresije gena postavio sam i arbitrarne ekspresijske granice na temelju srednje vrijednosti efikasnosti svih početnica za ciljne gene, efikasnosti endogene kontrole i srednje Ct vrijednosti svih Ct vrijednosti endogene kontrole (Lončar i sur. 2016). Prema dobivenim ekspresijskim granicama gen je nisko ekspimiran ako mu je $MNE * 10^6$ vrijednost manja od 2584 ($Ct \geq 27$), umjereno ekspimiran ako mu je $MNE * 10^6$ vrijednost između 2584 i 19064 ($27 \leq Ct \leq 24$), umjereno visoko ekspimiran ako mu je $MNE * 10^6$ vrijednost između 19064 i 140633 ($24 \leq Ct \leq 21$), visoko ekspimiran ako mu je $MNE * 10^6$ vrijednost između 140633 i 1037440 ($21 \leq Ct \leq 18$) te jako visoko ekspimiran ako mu je $MNE * 10^6$ vrijednost veća od 1037449 ($Ct \leq 18$). Odabrane granice proizvoljne su i postavljene radi lakšeg prikaza rezultata te ne predstavljaju standard u objašnjavanju razine ekspresije gena.

4. REZULTATI

4.1 Identifikacija odgovarajućih početnica za određivanje ekspresije gena *tdp1* i *xpa* zebrice pomoću qPCR-a.

U svrhu provjere specifičnosti početnica dizajniranih za određivanje ekspresije gena *tdp1* i *xpa* prikazanih u tablici 1, a prije određivanja njihove efikasnosti qPCR-om, dizajnirane početnice korištene su za umnažanje cDNA jetre i jajnika zebrice u PCR reakciji prema uvjetima prikazanim u tablici 2 te se nakon provedene reakcije reakcijska smjesa stavila u sustav za gel elektroforezu kako bi se umnožena DNA mogla vizualizirati, a rezultati reakcija prikazani su na slici 10.



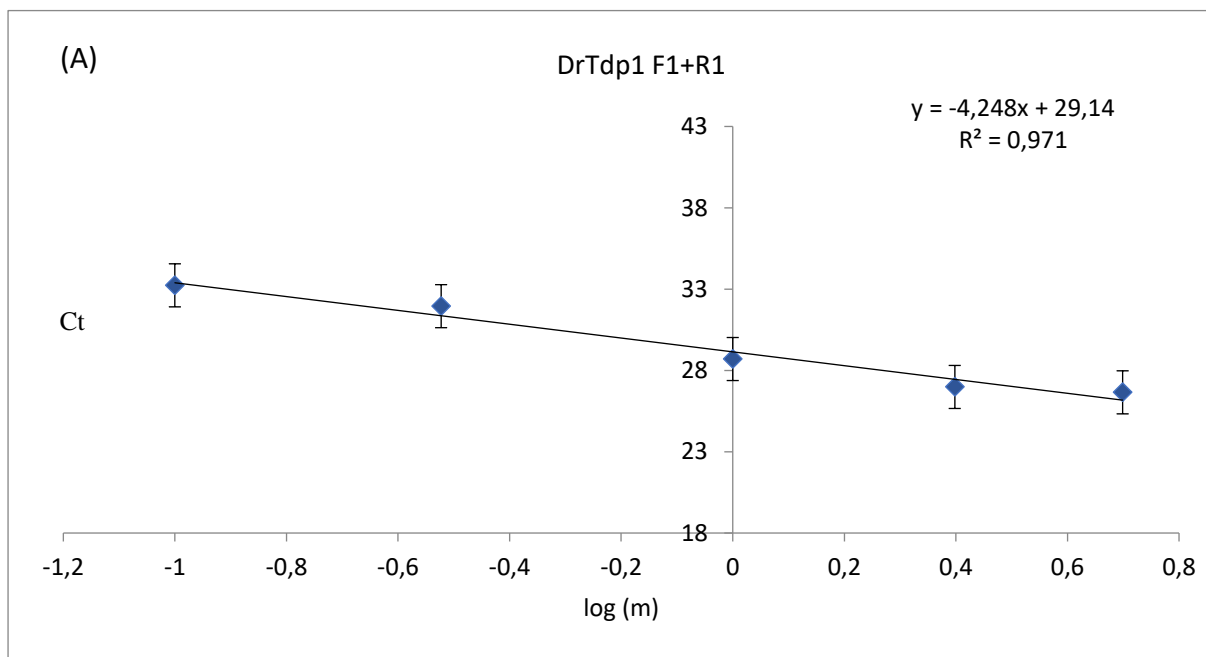
Slika 10. 2 %-tni agarozni gelovi s dodanim reakcijskim smjesama PCR reakcije za umnažanje Tdp1 i Xpa gena zebrice sa cDNA jetre i jajnika mlade ženke 1 (A) i pomiješane cDNA jajnika mlade ženke 1 i 3 (B) zebrice nakon provedene elektroforeze. M – DNA marker veličine (kb - kilobaza). A: 1 – jetra (DrTdp1 F1+R1), 2 – jajnici (DrTdp1 F1+R1), 3 – jetra (DrTdp1 F2+R2), 4 – jajnici (DrTdp1 F2+R2), 5 – jetra (DrXpa F1+R1), 6 – jajnici (DrXpa F1+R1), 7 – jetra (DrXpa F2+R2), 8 - jajnici (DrXpa F2+R2). B: 1 - jajnici (DrXpa F3+R3), 2 – jajnici (DrXpa F1+R4).

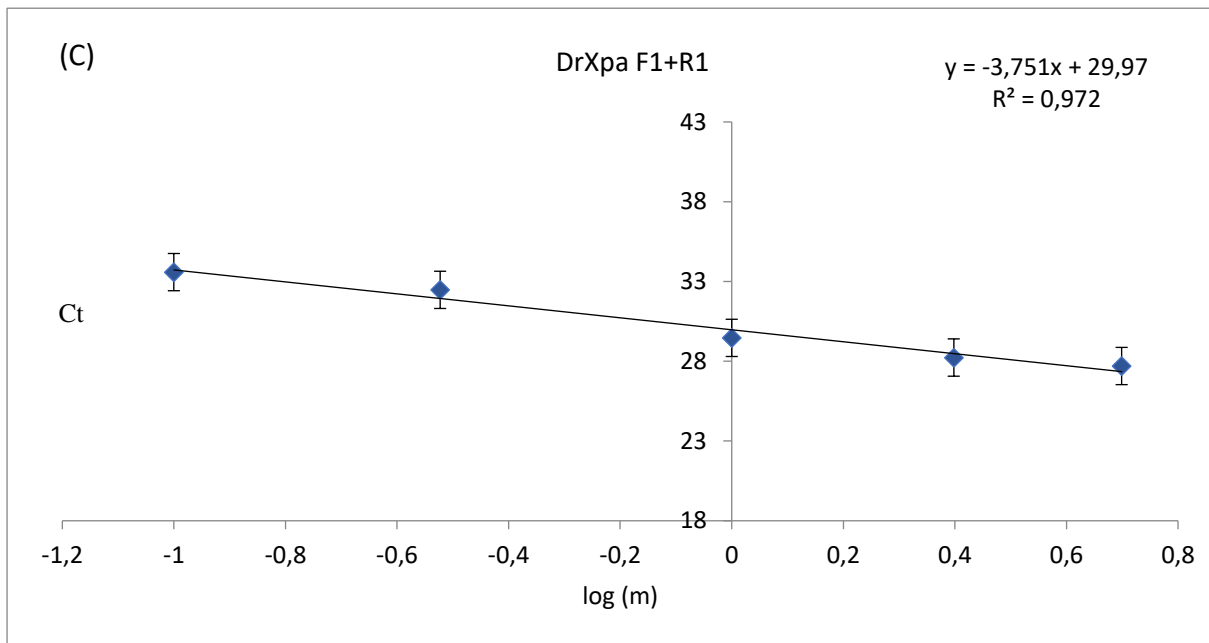
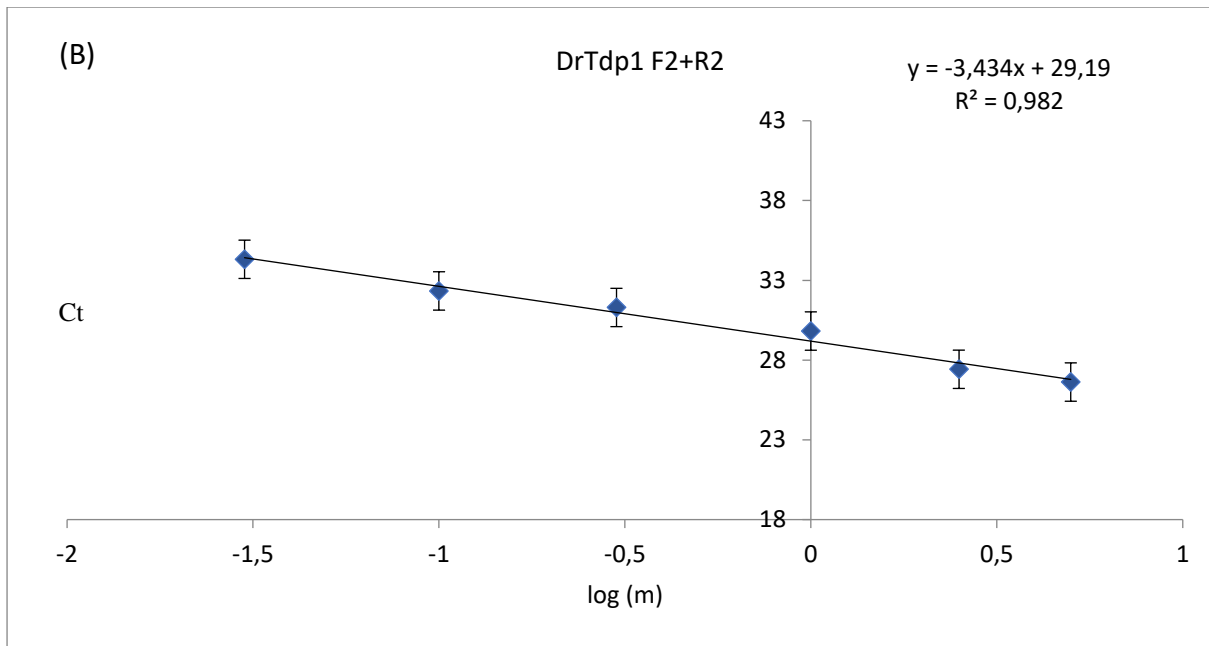
Iz slike gela prikazanog na slici 10A vidljivo je da reakcija umnažanja cDNA početnicama DrTdp1 F1+R1 nije uspjela u jednoj reakciji (jažica 1), ali jest u drugoj (jažica 2) gdje je prisutan fragment na razini 100 bp (engl. *base pairs*, parova baza) što odgovara veličini očekivanih amplikona za sve početnice. Umnažanje početnicama DrTdp1 F2+R2 uspjelo je obje reakcije (jažice 3 i 4), ali je u jažici 3 vidljivo nespecifično umnažanje iznad 0,5 kb i manje intenzivan fragment očekivane veličine od onog u jažici 4 (slika 10A). Umnažanje početnicama DrXpa F1+R1 uspjelo je u reakcijskim smjesama stavljenim u jažice 5 i 6, s jasnijim umnažanjem željenog fragmenta u jažici 6 i prisutnošću nespecifičnog fragmenta ispod 100 bp. Umnažanje početnicama DrXpa F2+R2 uspjelo je i u jednoj (jažica 7), i u drugoj reakciji (jažica 8) gdje je željeni fragment jasniji, ali u obje jažice vidljiv je razmaz DNA ispod umnoženog fragmenta što indicira nespecifično umnažanje DNA (slika 10A). U svim jažicama gela prikazanog na slici 10A vidljivi su dimeri početnica, a primjećuje se da je u svim jažicama s kalupom jetre manje izražen željeni fragment i prisutno više nespecifičnih fragmenata nego što je to u jažicama s kalupom jajnika što je vjerojatno posljedica niže ekspresije gena *tdp1* i

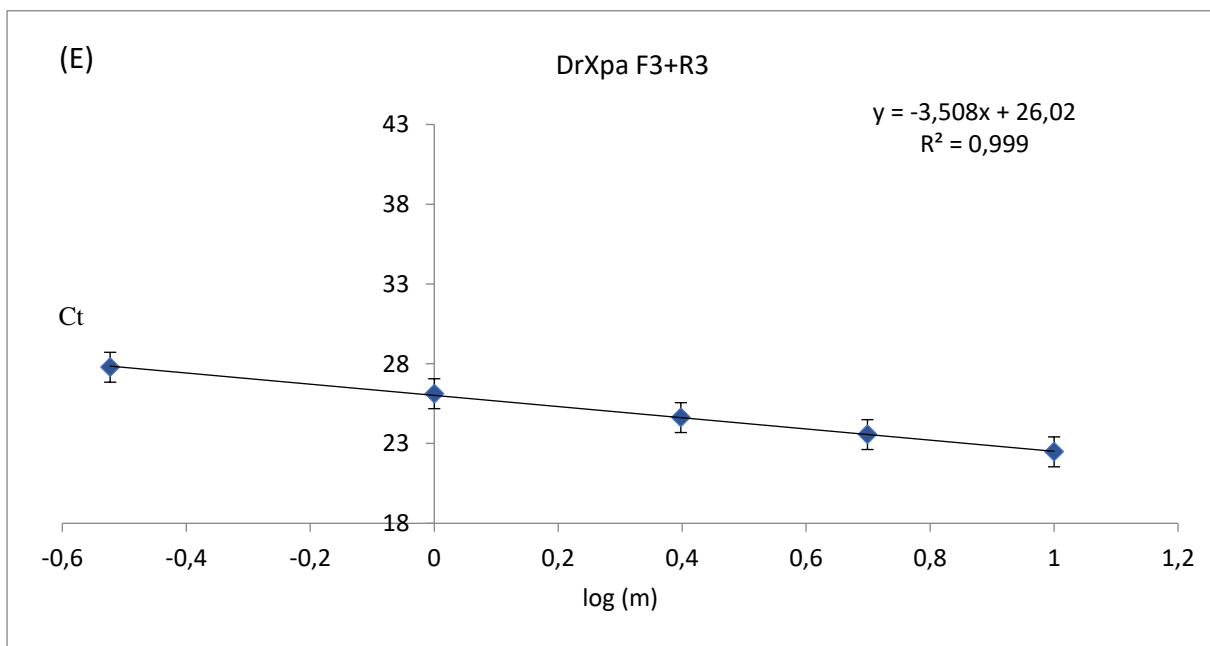
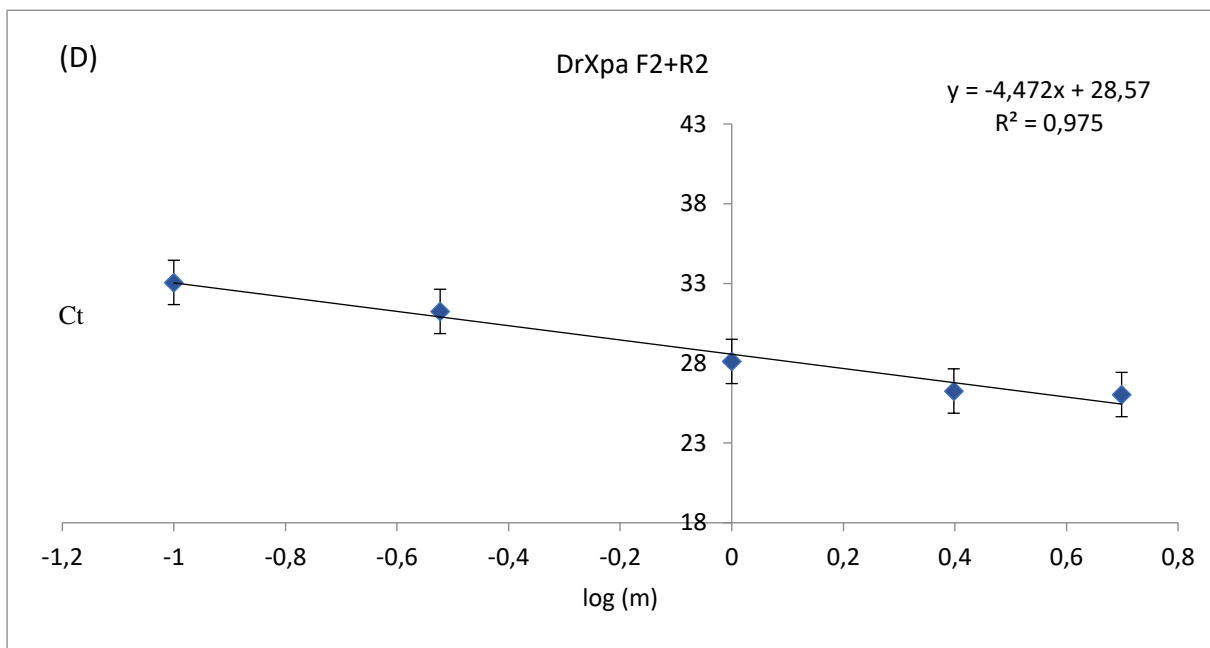
xpa, a samim time i nedostatkom kalupa za PCR reakciju. S obzirom da je umnažanje DNA s kalupom jajnika pokazalo specifično umnažanje sa svim dizajniranim početnicama krenulo se u određivanje efikasnosti PCR reakcije. Iz slike gela prikazanog na slici 10B vidljivo je da su reakcije umnažanja cDNA naknadno dizajniranim početnicama DrXpa F3+R3 (jažica 1), kao i DrXpa F1+R4 (jažica 2) bile uspješne te osim specifičnog nije bilo nespecifičnih fragmenata te se početnicama krenulo u određivanje efikasnosti PCR-a.

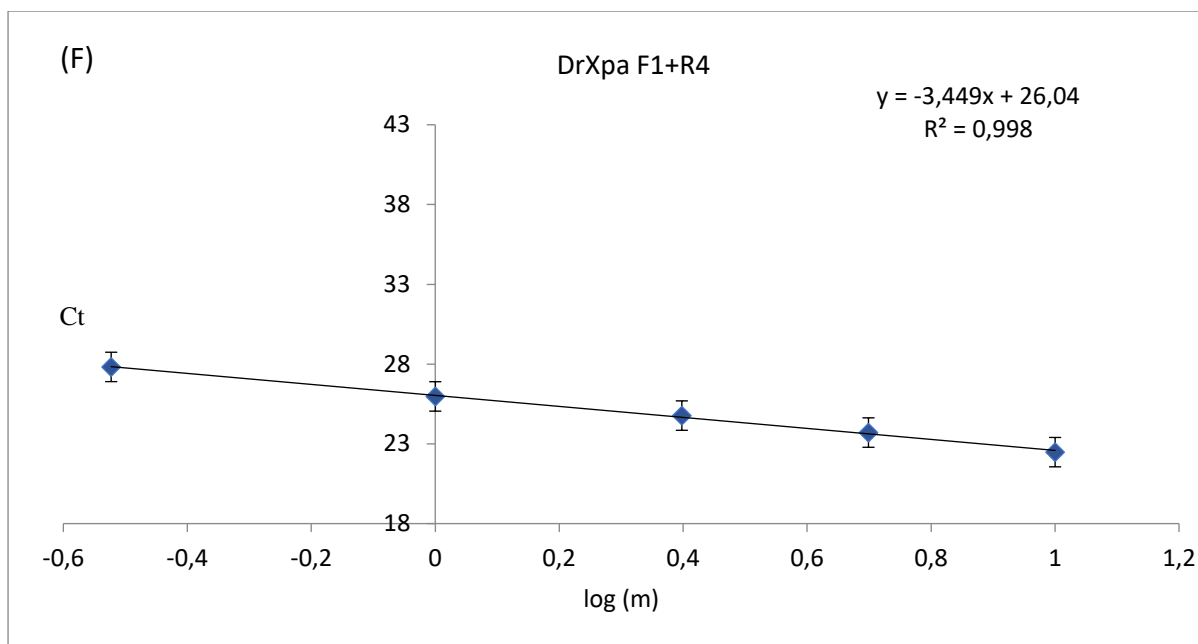
4.2 Određivanje efikasnosti početnica za umnažanje gena *tdp1* i *xpa* u qPCR reakciji u svrhu analize njihove ekspresije u zebrici

Određivanje efikasnosti početnica za gene *tdp1* i *xpa* radi se pripremom serijskih razrjeđenja kalupa cDNA i umnažanjem tako pripremljene cDNA qPCR-om, a dobivene Ct vrijednosti korištene su za izradu standardnih krivulja iz kojih se određuje efikasnost samih početnica. Kao cDNA kalup korištena je cDNA jajnika zebrice, a standardne krivulje prikazane su na slici 11.









Slika 11. Standardne krivulje za određivanje efikasnosti dizajniranih parova početnica dobivene prikazom ovisnosti Ct vrijednosti o logaritmu mase kalupa cDNA: A - DrTdp1 F1+R1, B - DrTdp1 F2+R2, C - DrXpa F1+R1, D - DrXpa F2+R2, E - DrXpa F3+R3, F - DrXpa F1+R4.

Na temelju nagiba pravca standardnih krivulja izračunata je efikasnost pojedinog para početnica pa tako za par početnica DrTdp1 F1+R1 ona iznosi 72 %, za DrTdp1 F2+R2 96 %, za DrXpa F1+R1 85 %, za DrXpa F2+R2 67 %, za DrXpa F3+R3 93 % te za DrXpa F1+R4 95 %. Izračun efikasnosti je temelj odabira početnice za korištenje opisani su u poglavlju materijala i metoda, te je zbog najvećeg postotka efikasnosti koji se nalazi unutar graničnih vrijednosti od 90 % do 110 % efikasnosti za kvantifikaciju gena *tdp1* odabran par početnica DrTdp1 F2+R2, a za kvantifikaciju gena *xpa* par početnica DrXpa F1+R4 (Slika 11).

Početnice za kvantifikaciju gena *acrc*, *ef1a* i *atp5po* koji su korišteni u ovoj analizi prethodno su dizajnirane i testirane u istraživačkoj grupi za popravak DNA u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju te su njihove efikasnosti 96 % (*acrc*), 91 % (*ef1a*) i 98 % (*atp5po*).

4.3 Određivanje koncentracije i čistoće izolirane RNA

U svrhu određivanja koncentracije i čistoće izolirane RNA, uzorci RNA analizirani su na spektrofotometru, a rezultati mjerenja prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Uzorci izoliranih RNA pojedinih skupova zebrića: koncentracija RNA, omjer optičke gustoće pri valnim duljinama 260 nm i 280 nm, omjer optičke gustoće pri valnim duljinama 260 nm i 230 nm. / - označava da nije odrađena izolacija RNA određenog tkiva.

	Mlada ženka 1				Mlada ženka 2		
Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}	Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}
Mozak	103,4	2,14	2,01	Mozak	51,65	2,00	1,94
Jetra	886,6	2,06	1,90	Jetra	1087	2,15	2,18
Bubreg	20,42	2,21	2,18	Bubreg	/	/	/
Crijevo	815,9	2,15	2,27	Crijevo	413,3	2,10	2,30
Gonade	1775	2,16	2,13	Gonade	684,2	2,13	2,22
Koža	101,6	2,21	2,33	Koža	155,3	2,06	2,28
Oči	105,4	2,13	2,04	Oči	68,75	2,02	2,03
	Mlada ženka 3				Mladi mužjak 1		
Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}	Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}
Mozak	70,47	2,07	2,18	Mozak	87,34	2,07	1,99
Jetra	3029	1,64	1,63	Jetra	185,8	2,08	2,15
Bubreg	/	/	/	Bubreg	25,73	1,72	1,38
Crijevo	325,5	2,11	2,27	Crijevo	397,9	2,06	1,90
Gonade	1720	2,16	2,25	Gonade	107,4	1,99	2,07
Koža	123,5	2,06	1,94	Koža	150,7	1,99	1,94
Oči	139,0	2,04	2,26	Oči	201,6	1,93	1,55
	Mladi mužjak 2				Mladi mužjak 4		
Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}	Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}
Mozak	80,48	2,20	2,13	Mozak	70,84	2,12	1,98
Jetra	144,7	2,15	2,06	Jetra	127,5	2,16	2,14
Bubreg	22,54	2,42	2,55	Bubreg	19,40	2,12	2,01
Crijevo	249,3	2,13	2,20	Crijevo	417,2	2,13	2,27
Gonade	50,39	2,23	1,99	Gonade	107,6	2,10	2,16
Koža	54,02	2,16	1,92	Koža	281,3	2,15	2,25
Oči	89,20	2,17	1,46	Oči	194,2	2,17	0,55

Tablica 6. Nastavak

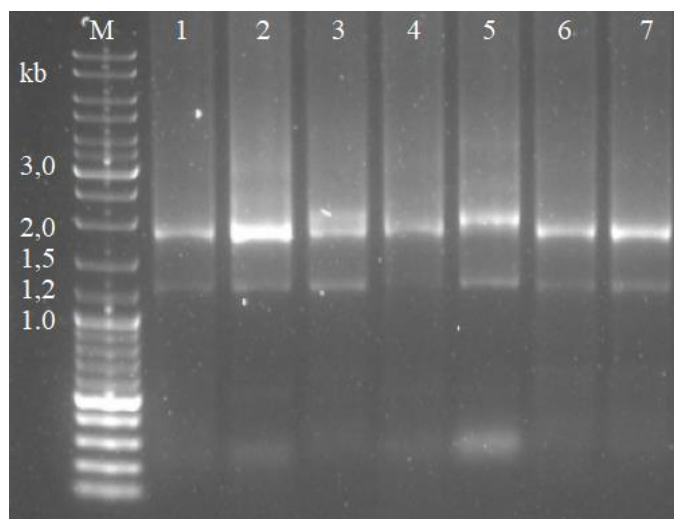
	Stara ženka 1				Stara ženka 2		
Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}	Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}
Mozak	140,3	2,11	2,03	Mozak	173,0	2,11	1,96
Jetra	654,4	2,10	2,24	Jetra	606,7	2,17	2,20
Bubreg	152,1	2,05	2,01	Bubreg	99,69	2,00	1,93
Crijevo	301,7	2,04	2,31	Crijevo	400,2	2,09	2,28
Gonade	339,7	2,11	2,01	Gonade	516,7	2,14	2,15
Koža	268,1	2,06	2,23	Koža	177,5	2,06	2,14
Oči	304,1	2,09	2,20	Oči	375,8	2,09	2,17
	Stara ženka 3				Stari mužjak 1		
Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}	Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}
Mozak	127,4	2,17	1,38	Mozak	147,0	2,17	1,14
Jetra	432,8	2,16	1,70	Jetra	684,0	2,14	2,12
Bubreg	10,31	1,51	1,89	Bubreg	62,30	2,23	0,91
Crijevo	380,7	2,11	2,28	Crijevo	698,0	2,14	2,32
Gonade	618,7	2,15	2,20	Gonade	169,0	2,15	2,18
Koža	204,3	2,11	2,27	Koža	202,0	2,13	2,25
Oči	237,3	2,15	2,23	Oči	173,0	2,11	2,23
	Stari mužjak 2				Stari mužjak 3		
Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}	Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}
Mozak	150,4	2,16	2,20	Mozak	166,7	2,14	1,95
Jetra	491,2	2,16	2,24	Jetra	241,7	2,16	2,09
Bubreg	106,4	2,17	1,97	Bubreg	70,81	2,11	1,37
Crijevo	312,6	2,15	2,25	Crijevo	368,9	2,14	2,39
Gonade	70,86	2,20	2,51	Gonade	79,15	2,24	1,51
Koža	147,0	2,15	2,33	Koža	195,0	2,19	1,74
Oči	241,4	2,18	2,18	Oči	128,5	2,18	1,81
	Mlada ženka 4				Mlada ženka 2+3		
Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}	Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}
Jetra	420,2	2,12	2,21	Bubreg	49,41	2,11	2,05
Bubreg	38,43	2,11	1,98				
	Mlada ženka 5						
Tkivo	c (RNA) (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}				
Jetra	680,5	2,12	2,21				

* Bubrezi mlade ženke 2 i 3 bili su premale mase (< 1 mg) pa je iz tog razloga korišteno 6 bubrega za jednu RNA izolaciju kako bi se dobio dovoljan prinos za qPCR analize.

U svrhu dobivanja značajnih i vjerodostojnih rezultata analize ekspresije gena metodama poput qPCR-a ili RNA blota potrebno je koristiti RNA dobre čistoće i kvalitete (Fleige i Pfaffl 2006). Provjera čistoće RNA nužna je kako u reakciji qPCR-a ne bi došlo do inhibicije reakcije zbog prisutnosti nečistoća, dok je provjera kvalitete nužna kako se u analizi ekspresije gena raspad RNA ne bi okarakterizirao kao niža razina ekspresije. Informacije o čistoći dobivaju se na temelju mjerenja optičke gustoće čije su vrijednosti uz koncentraciju izolirane RNA prikazane u tablici 7. S obzirom da se RNA s vrijednostima OD_{260}/A_{280} oko 2,0 ili više te OD_{260}/A_{230} od 2,0 do 2,2 smatra čistom, iz tablice 7 vidljivo je da se većina uzoraka RNA može okarakterizirati čistima s iznimkama jetre mlade ženke 3, bubrega i očiju mladog mužjaka 1, očiju mladog mužjaka 2 i 4, bubrega stare ženke 3, mozga i bubrega starog mužjaka 1 te bubrega i testisa starog mužjaka 3.

4.4 Analiza kvalitete izolirane RNA

Za provjeru kvalitete izolirane RNA provedena je elektorforeza uzoraka RNA pojedinih tkiva u agaroznom gelu (slika 12), a sama kvaliteta određuje se prema omjeru količine ribosomske RNA (rRNA) koja je najzastupljenija RNA u stanici (Wu i sur. 2014). RNA dobre kvalitete očituje se 1,8 - 2,0 puta većom količinom 28S rRNA od 18S rRNA koje su zbog svoje veličine i količine najizraženije vrpce RNA kod provedbe gel elektroforeze ukupne izolirane RNA (Fleige i Pfaffl 2006). Kod agaroznog gela prikazanog na slici 12 vidljivo je da je izolacija ukupne RNA iz većine tkiva stare ženke 2 bila uspješna jer nije došlo do degradacije RNA s obzirom uzorci imaju željeni omjer količine 28S rRNA (gornja vrpca):18S rRNA (donja vrpca) \approx 2:1, a uklanjanje genomske DNA također je većinom uspjelo jer nisu vidljivi značajniji signali gDNA (na vrhu gela) niti razmaz iznad 28S benda (dijelom raspadnuta gDNA) . Različit omjer prisutan je u jažici 2 s RNA izoliranom iz jetre gdje je vrpca s 28S rRNA jače izražena dok je u jažici 4 koja sadrži RNA crijeva vidljiva slabija izraženost obje vrpce što ukazuje na degradaciju RNA. Iako je gel elektroforeza ukupne RNA dobar indikator kvalitete izolirane RNA, konačni pokazatelj kvalitete je ekspresija gena endogene kontrole jer do degradacije RNA može doći prilikom nanošenja RNA na gel ili provedbe elektroforeze gdje se alikvoti RNA ne drže na ledu i mogu doći u kontakt s RNazama. Ekspresija endogene kontrole mora biti ujednačena u svim tkivima pa se u slučaju značajnog pada ekspresije može zaključiti da je došlo do degradacije RNA što se u analizi provedenog qPCRa očituje kao rast Ct vrijednosti endogene kontrole.



Slika 12. 1 %-tni agarozni gel s dodanom RNA izoliranom iz različitih tkiva stare ženke 2 nakon provedene elektroforeze: M – DNA marker veličine (kb - kilobaza), 1 – mozak, 2 – jetra, 3 – bubreg, 4 – crijevo, 5 – gonade, 6- koža, 7 – oči.

4.5 Odabir endogene kontrole za qPCR

Kako bi relativna kvantifikacija ekspresije bila moguća potrebno je odabrati pravilnu endogenu kontrolu između gena kandidata čija je ekspresija u teoriji konstitutivna i ne razlikuje se u pojedinim tkivima organizma zbog njihove neophodnosti za odvijanje metabolizma svake stanice što omogućuje usporedbu ekspresije ciljnih gena u različitim tkivima (Kozera and Rapacz, 2013). Osim navedenog poželjno je da je Ct vrijednost endogene kontrole bliska Ct vrijednostima ciljnih gena kako bi rezultati bili što pouzdaniji. Geni kandidati bili su *ef1α* koji kodira za elongacijski faktor 1α nužan u procesu translacije i *atp5po* koji kodira za O podjedinicu mitohondrijske ATP sintaze te je stoga nužan za sintezu ATP-a. Za odabir endogene kontrole zato su korištene početnice koje omogućuju specifično umnažanje gena *ef1α* i *atp5po*, a kao kalup je korištena cDNA mladog mužjaka 2. Rezultati provedenih qPCR reakcija prikazani su u tablici 7. Iz srednjih vrijednosti Ct prikazanih u tablici 8 vidljivo je da su Ct vrijednosti dobivene kvantifikacijom ekspresije qPCR-om u većini tkiva niže za gen *ef1α* u odnosu na gen *atp5po*, a *atp5po* ima ravnomjerniju ekspresiju između tkiva pa najveća razlika od medijana srednjih Ct vrijednosti (17,91) iznosi 0,57, dok najveća razlika između Ct vrijednosti i medijana srednjih Ct vrijednosti gena *ef1α* (16,48) iznosi 2,18. Zbog ravnomjerne ekspresije između tkiva kao endogena kontrola za analizu ekspresije ciljnih gena odabran je gen *atp5po*, a u korist odabiru gena *atp5po* ide i činjenica da ovaj gen ima Ct vrijednosti koje su bliže Ct vrijednostima ciljnih gena što rezultate čini pouzdanijima.

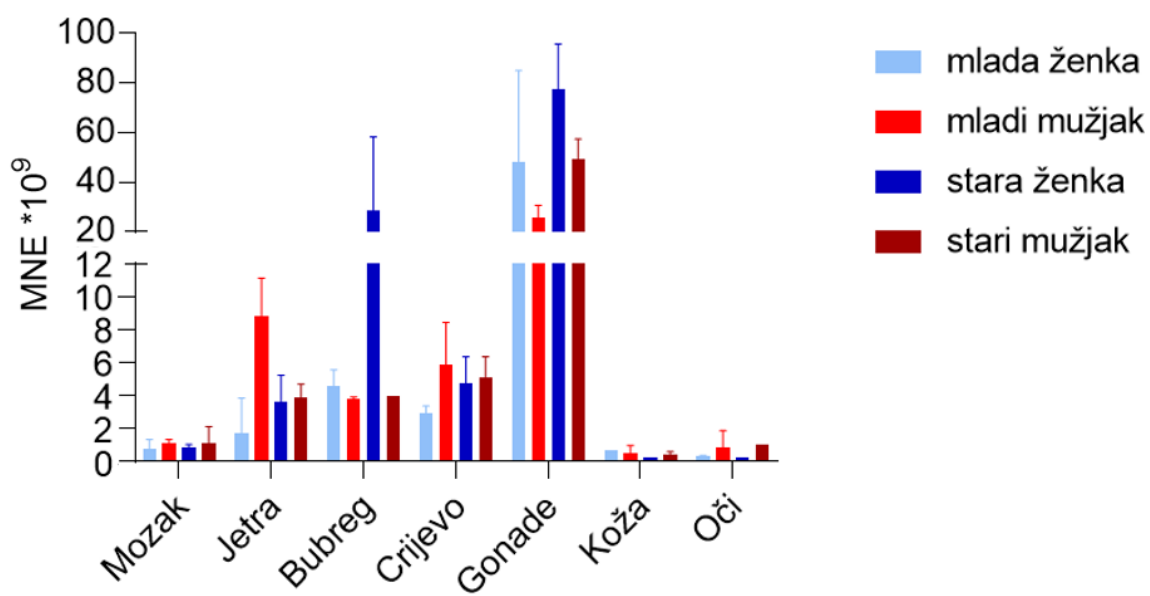
Tablica 7. Ct vrijednosti kvantitativnog PCR-a provedenog na uzorcima cDNA mladog mužjaka 2 uz početnice DrEF1a F2+R2 i DrAtp5po F2+R2. SD – standardna devijacija, NTC – negativna kontrola bez kalupa DNA, \overline{Ct} – srednja vrijednost Ct.

<i>ef1a</i>								
Mladi mužjak 2								
Tkivo	NTC	Mozak	Jetra	Bubreg	Crijevo	Gonade	Koža	Oči
Ct 1	nedet.	19,03	16,36	15,34	16,00	16,38		16,74
Ct 2	nedet.	18,30			16,03	16,45	15,58	16,82
Ct 3	nedet.		16,69	15,59	16,09	16,60	16,07	
\overline{Ct}		18,66	16,52	15,46	16,04	16,48	15,82	16,78
SD		0,52	0,23	0,18	0,05	0,11	0,35	0,06
%SD		2,76	1,40	1,14	0,28	0,69	2,21	0,35
<i>atp5o</i>								
Mladi mužjak 2								
Tkivo	NTC	Mozak	Jetra	Bubreg	Crijevo	Gonade	Koža	Oči
Ct 1	nedet.	17,78	18,35		17,72	17,92	18,14	18,09
Ct 2	nedet.		18,24	18,37	17,56	17,53		17,73
Ct 3	nedet.	17,59		18,58			18,06	
\overline{Ct}		17,69	18,30	18,48	17,64	17,72	18,10	17,91
SD		0,14	0,08	0,15	0,12	0,27	0,05	0,26
%SD		0,77	0,44	0,80	0,66	1,54	0,29	1,43

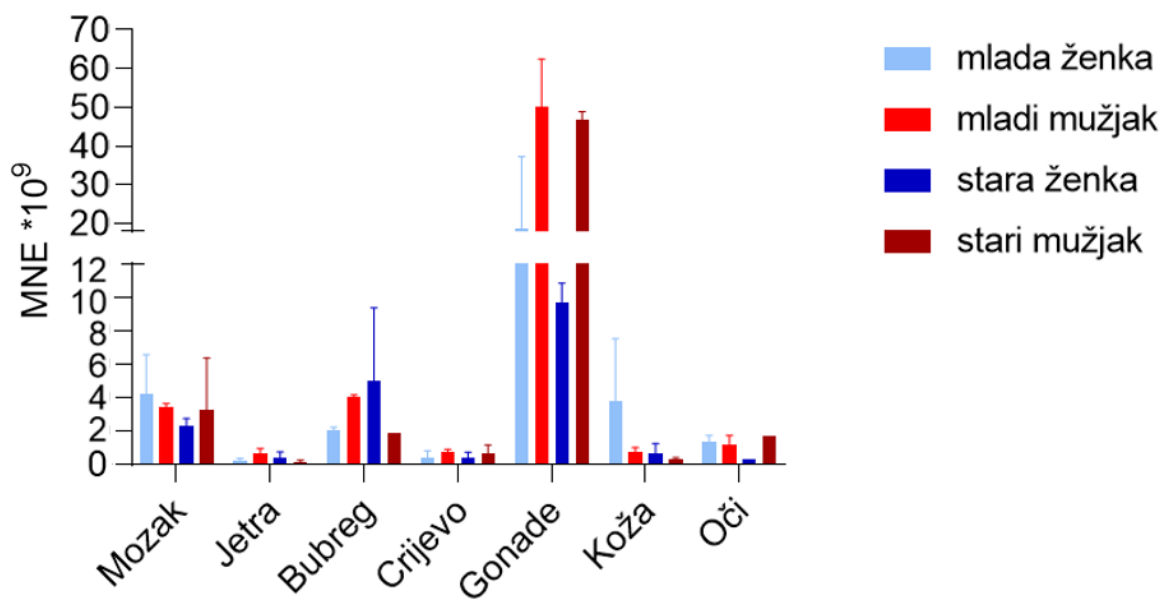
4.6 Analiza ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* zebrice

Odabir početnica dovoljne efikasnosti i endogene kontrole omogućio je analizu ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* u pojedinim tkivima ribe zebrice. Iz dobivenih Ct vrijednosti nakon provedenog qPCR-a s početnicama specifičnim za gene *acrc*, *xpa* i *tdp1* na cDNA mladih ženki, mladih mužjaka, starih ženki i starih mužjaka *Q-Gene* metodom izračunata je srednja normalizirana ekspresija za svaku biološku repliku navedenih skupina. Srednja normalizirana ekspresija zatim je unesena u računalni program *GraphPad Prism 8* te su MNE vrijednosti svake biološke replike grupirane u jedinstveni rezultat za pojedinu skupinu zebrica. MNE vrijednosti ciljnih gena u pojedinim tkivima različitih skupina zebrica prikazane su na slici 13, a usporedba MNE vrijednosti ciljnih gena u pojedinim tkivima različitih skupina zebrica prikazana je na slici 14.

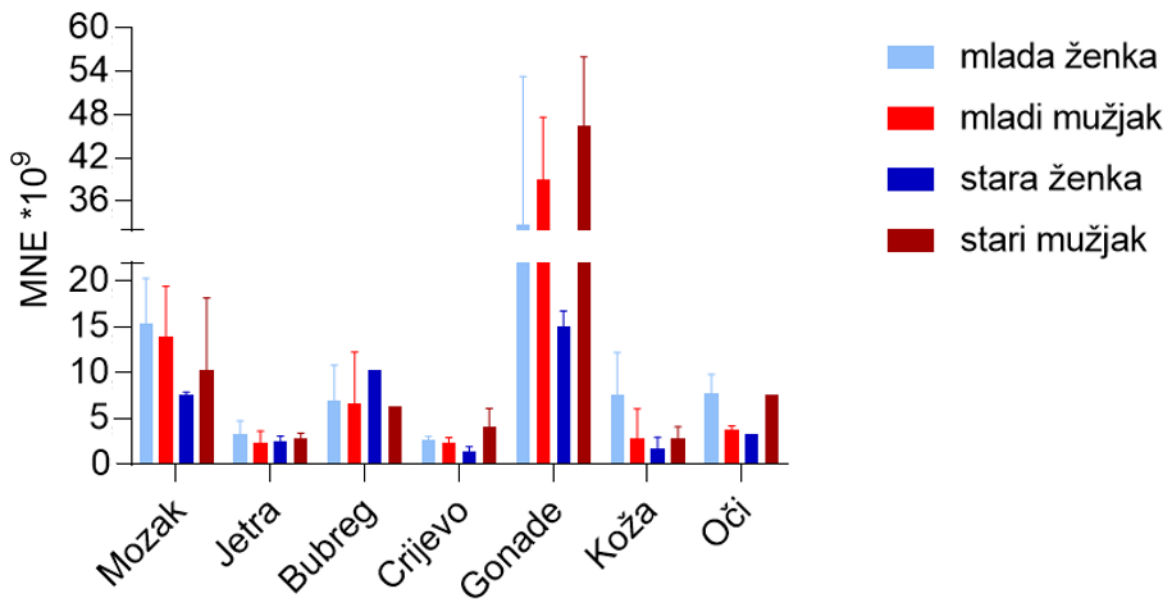
(A)



(B)



(C)



Slika 13. Grafički prikaz razine ekspresije gena u pojedinim tkivima riba zebrica iskazane kao $MNE \cdot 10^9$: A – gen *acrc*, B – gen *xpa*, C – gen *tdp1*. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost MNE 2-3 biološke replike \pm SD, osim u slučaju prikaza ekspresije gena *acrc* u koži mlade ženke, u koži i očima stare ženke te u bubregu i očima starog mužjaka, ekspresije gena *xpa* u koži stare ženke te u bubregu i očima starog mužjaka i ekspresije gena *tdp1* u bubregu i očima stare ženke te u bubregu i očima starog mužjaka gdje stupac predstavlja vrijednost 1 biološke replike. Provedena normalizacija omogućuje usporedbu ekspresije između svih uzoraka. MNE - srednja normalizirana ekspresija, SD – standardna devijacija.

4.7 Analiza promjene ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* tijekom starenja zebrice

Ekspresija gena *acrc* opada starenjem u koži gdje je razina ekspresije 2,4 puta manja kod stare ženke u odnosu na mladu ženku (slika 13A). Suprotno očekivanom, *acrc* ekspresija se zamjetno povećava starenjem u tkivu bubrega gdje je razina ekspresije 6,3 puta veća kod stare ženke, u jetri gdje je razina ekspresije veća 2,1 puta te u crijevu u kojima je razina ekspresije veća 1,6 puta (slika 13A). Ekspresija gena *acrc* se ne mijenja u mozgu, jajnicima i očima tijekom starenja ženki (slika 13A). Kod mužjaka, ekspresija gena *acrc* opada starenjem u jetri gdje je razina ekspresije 2,3 puta manja kod starog mužjaka. Obrnuta situacija prisutna je u testisima gdje razina ekspresije starenjem raste 1,9 puta (slika 13A). Ekspresija gena *acrc* se ne mijenja tijekom starenja mužjaka u mozgu, bubregu, crijevu, koži i očima (slika 13A).

Ekspresija gena *xpa* opada starenjem u tkivima kože u kojoj je razina ekspresije 5,3 puta veća kod mlade ženke u odnosu na staru ženku, očiju gdje je razina ekspresije veća 4,3 puta, jajnicima kod kojih je razina ekspresije veća 1,9 puta te mozgu u kojem je razina ekspresije veća 1,8 puta (slika 13B). Nasuprot očekivanjima, veća ekspresije gena *xpa* stare u odnosu na mladu ženku zebrice prisutna je u bubregu u kojem je razina ekspresije 2,4 puta veća kod stare ženke (slika 13B). Promjene ekspresija gena *xpa* sa starenjem ženki zebrice nema u jetri i crijevu. Kod mužjaka ekspresije gena *xpa* opada starenjem u jetri u kojoj je razina ekspresije veća 3,3 puta kod mladog mužjaka u odnosu na starog te u koži i bubregu u kojima je razina ekspresije veća 2,2 puta (slika 13B). Porast ekspresije gena *xpa* nije prisutan ni u jednom od tkiva (Slika 14B, D). Ekspresija gena *xpa* ne mijenja se starenjem u mozgu, crijevu, testisima i očima mužjaka (slika 13B).

Ekspresija gena *tdp1* opada starenjem ženke zebrice u koži u kojoj je razina ekspresije 4,2 puta veća kod mlade ženke u odnosu na staru ženku, očima u kojima je razina ekspresije veća 2,3 puta, jajnicima u kojima je razina ekspresije veća 2,2 puta, mozgu u kojem je razina ekspresije veća 2,0 puta te crijevu u kojem je razina ekspresije veća 1,8 puta (slika 13C). Porast ekspresije gena *tdp1* nije prisutan u tkivima ženki zebrice (slika 13C). Promjene u ekspresiji gena *tdp1* tijekom starenja ženki nema u jetri i bubregu (slika 13C). Kod mužjaka nema tkiva s zabilježenim padom ekspresije gena *tdp1* starenjem (slika 13C). Suprotno očekivanome, u očima mužjaka starenjem raste ekspresija gena *tdp1* pa je tako ona veća 2,0 puta kod starog u odnosu na mladog mužjaka (slika 13C). Ekspresija *tdp1* starenjem se ne mijenja u mozgu, bubregu, crijevu, testisima i koži (slika 13C).

Zaključno, ekspresija gena *acrc* starenjem zamjetno opada u koži ženke i jetri mužjaka, dok suprotno očekivanju zamjetno raste u bubregu, jetri i crijevu ženke te testisima mužjaka. Ekspresija gena *xpa* starenjem zamjetno opada u koži, očima, jajnicima i mozgu ženke te jetri koži i bubregu mužjaka, dok suprotno očekivanju zamjetno raste u bubregu ženke. Zamjetan pad ili porast ekspresije gena *tdp1* starenjem spolno je ovisan pa tako zamjetno opada u koži, očima, jajnicima, mozgu i crijevu ženke, dok je sav zamjetan porast ekspresije starenjem prisutan u očima mužjaka.

4.8 Analiza spolnih razlika u ekspresiji gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* zebrice

Spolne razlike u ekspresiji gena *acrc* kod mladih jedinki prisutne u jetri u kojoj je razina ekspresije veća 5,0 puta kod mužjaka u odnosu na ženku, u očima u kojima je veća 2,7 puta te

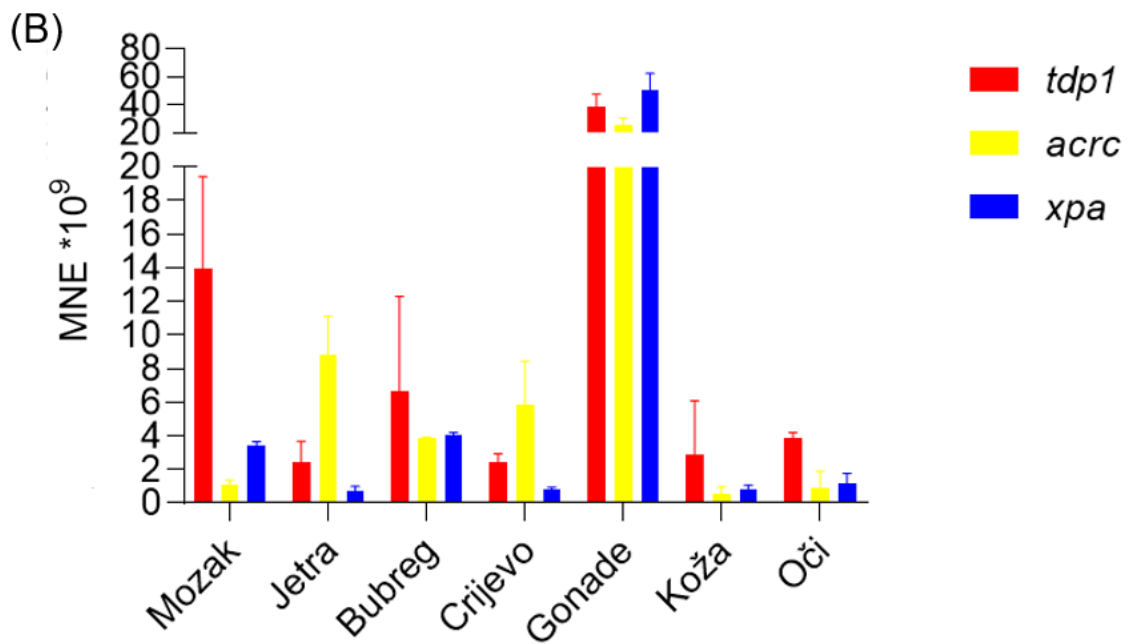
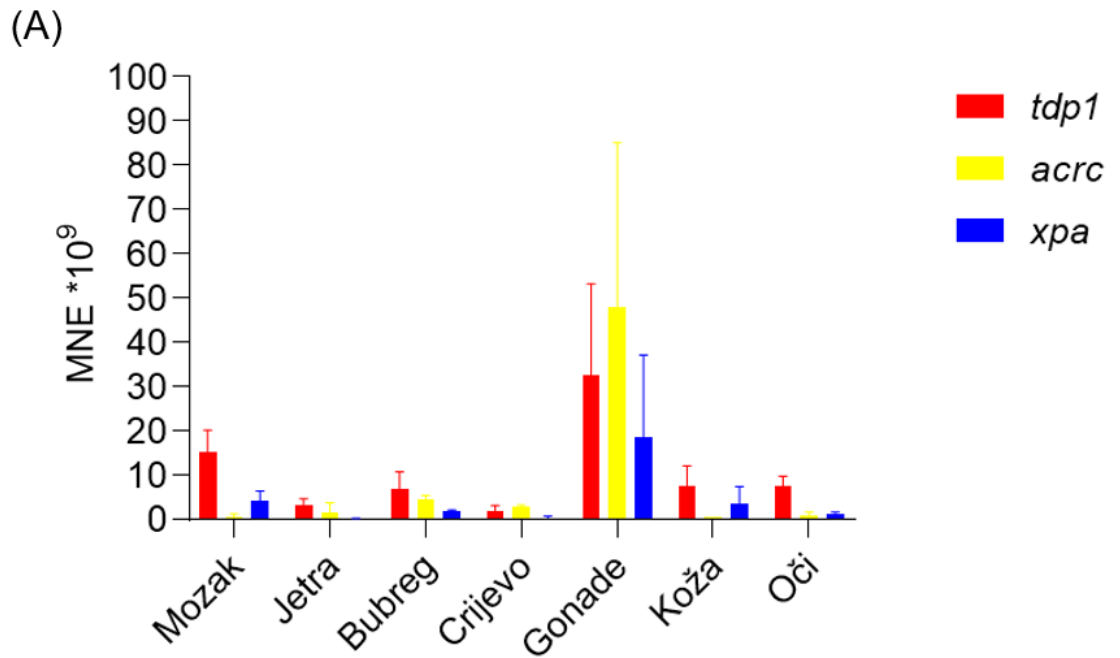
u crijevu u kojoj je veća 2,0 puta, a ni u jednom tkivu nema veće ekspresije kod ženke u odnosu na mužjaka (slika 13A). Spolne razlike u ekspresiji gena *acrc* kod starih jedinki prisutne su u bubregu gdje je razina ekspresije veća 7,3 puta kod ženki te kod gonada: jajnici imaju 1,6 puta veću razinu ekspresije u odnosu na testise (slika 13A). Veća razina ekspresije gena *acrc* starog mužjaka u odnosu na staru ženku prisutna je u očima u kojima je ekspresija veća 3,7 puta (slika 13A).

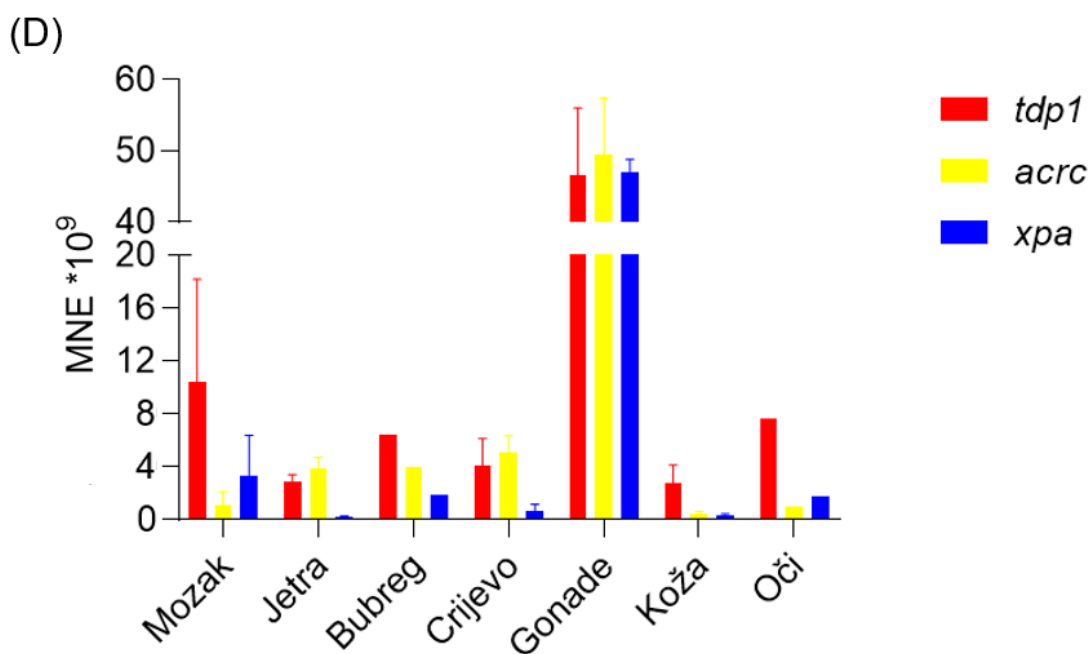
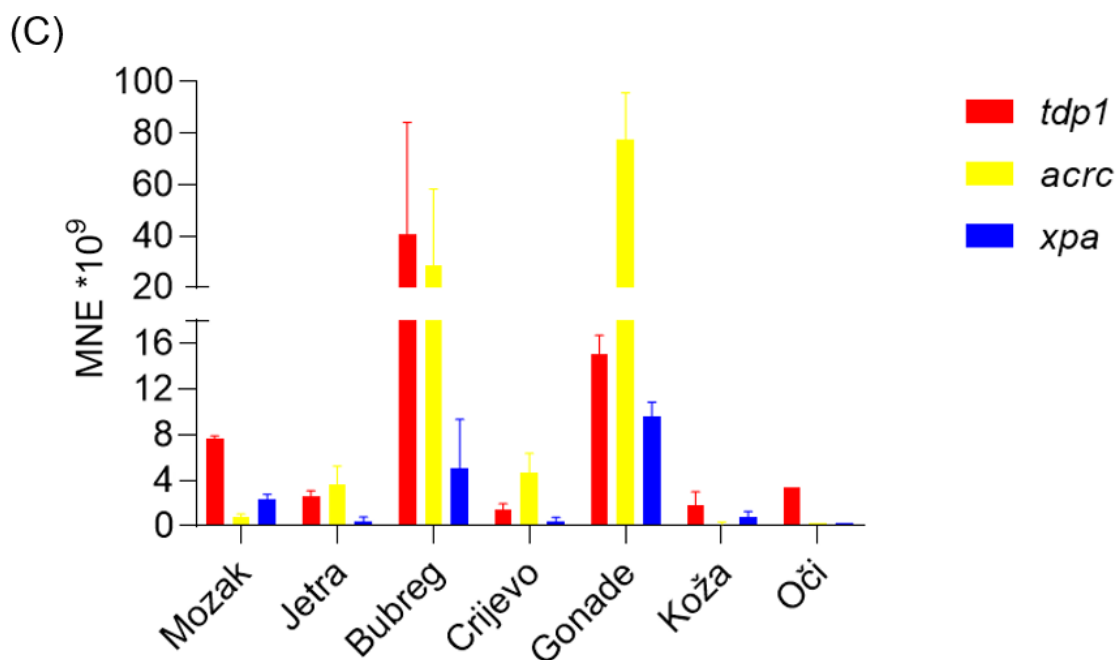
Spolne razlike ekspresije gena *xpa* između mladih jedinki prisutne su u koži gdje je razina ekspresije 5,0 puta veća kod mlade ženke u odnosu na mužjaka (Slika 13B). Veća razina ekspresije gena *xpa* mužjaka u odnosu na ženku prisutna je u testisima kod kojih je razina ekspresije veća 2,7 puta od one u jajnicima, jetri s 2,5 puta većom te bubregu s 1,9 puta većom razinom ekspresije (slika 13B). Kod starih jedinki veća razina ekspresije gena *xpa* ženke u odnosu na mužjaka prisutna je u bubregu s 2,7 puta većom, jetri s 2,2 puta većom i koži s 2,1 puta većom razinom ekspresije (slika 13B). Veća razina ekspresije gena *xpa* starog mužjaka u odnosu na staru ženku prisutna je u očima s 5,4 puta većom i gonadama s 4,9 puta većom razinom ekspresije (slika 13B).

Gen *tdp1* većinom je više eksprimiran u mladim ženki, i to: u koži gdje je ekspresija veća 2,7 puta te u očima (2,0 puta veća), a veće ekspresije nema kod mužjaka jer spolne razlike nisu zamjetne u mozgu, jetri, bubrezima, crijevu i gonadama (slika 13C). Spolne razlike u ekspresiji gena *tdp1* u starim jedinkama prisutne su u bubregu s 1,6 puta većom razinom ekspresije u ženki (slika 13C). Obrnuta situacija prisutna je u testisima koji imaju 3,1 puta veću razinu ekspresije od jajnika, u crijevu s 2,8 puta većom te u očima s 2,3 puta većom ekspresijom u mužjaka u odnosu na ženku (slika 13C).

Zaključno, zamjetna razlika u ekspresiji gena *acrc* između spolova mladih jedinki prisutna je u je u jetri, očima i crijevu gdje je ekspresija veća kod mužjaka, a ni u jednom tkivu nema zamjetno veće ekspresije kod ženki. Zamjetna spolna razlika u ekspresiji gena *acrc* u starih jedinki prisutna je u bubregu i jajnicima gdje je ekspresija veća kod ženke. Nasuprot tome, u očima je veća ekspresija gena *acrc* kod starih jedinki mužjaka. Zamjetna spolna razlika u ekspresiji gena *xpa* kod mladih jedinki prisutna je u koži u kojoj je veća ekspresija kod ženke. U gonadama, jetri i bubregu veća ekspresija gena *xpa* prisutna je kod mužjaka. Kod starih jedinki zamjetna razlika između spolova prisutna je u bubregu, jetri i koži gdje je ekspresija veća kod ženke, dok je u očima i gonadama veća ekspresija kod mužjaka. Zamjetna spolna razlika u ekspresiji gena *tdp1* kod mladih jedinki prisutna je u koži i očima gdje je ekspresija

veća kod ženke, a zamjetno veće ekspresije u muškim tkivima mladih jedinki nema. Spolne razlike u ekspresiji gena *tdp1* kod starih jedinki zamjetne su u bubregu gdje je ekspresija veća kod ženke te gonadama, crijevu i očima gdje je ekspresija veća kod mužjaka.





Slika 14. Grafički prikaz usporedbe razine ekspresije gena u pojedinim tkivima različitih skupina zebrica iskazane kao MNE*10⁹: A – mlada ženka, B – mladi mužjak, C – stara ženka, D – stari mužjak. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost MNE 2-3 biološke replike +/- SD, osim u slučaju prikaza ekspresije gena *acrc* u koži mlade ženke, u koži i očima stare ženke te u bubregu i očima starog mužjaka, ekspresije gena *xpa* u koži stare ženke te u bubregu i očima starog mužjaka i ekspresije gena *tdp1* u bubregu i očima stare ženke te u bubregu i očima starog mužjaka gdje stupac predstavlja vrijednost 1 biološke replike. Provedena normalizacija omogućuje usporedbu ekspresije između svih uzoraka. MNE – srednja normalizirana ekspresija, SD – standardna devijacija.

4.9 Analiza razlike ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* između različitih tkiva zebrice

Rezultati usporedbe razine ekspresije gena u pojedinim tkivima mlade ženke pokazuju da je *acrc* najviše eksprimiran u jajnicima, i to 11 puta više od bubrega, 16 puta više od crijeva, 27 puta više od jetre, 55 puta više od očiju, 58 puta više od mozga i čak 68 puta više od kože (Slika 14A). Slično genu *acrc*, gen *xpa* je također najviše eksprimiran u jajnicima i to 4,5 puta više nego u mozgu, 4,9 puta više nego u koži, 8,9 puta više nego u bubregu, 14 puta više nego u očima, 43 puta više nego u crijevu i 67 puta više nego u jetri (Slika 14A). Najveću ekspresiju gena *tdp1* također imaju jajnici u kojima je *tdp1* eksprimiran 2,1 puta više nego u mozgu, 4,3 puta više nego u očima i koži, 4,6 puta više nego u bubregu, 10 puta više nego u jetri i 16 puta više nego u crijevu (Slika 14A).

Usporedba razine ekspresije gena u pojedinim tkivima mladog mužjaka ukazuje da je gen *acrc* najviše je eksprimiran u testisima u kojima je ekspresija 2,9 puta veća od jetre, 4,4 puta veća od crijeva, 6,7 puta veća od bubrega, 23 puta veća od mozga, 28 puta veća od očiju i 45 puta veća od kože (Slika 14B). Gen *xpa*, kao i *acrc* najviše je eksprimiran u testisima, i to 12 puta više od bubrega, 15 puta višom od mozga, 41 puta višom od očiju, 64 puta višom od crijeva, 65 puta višom od kože te 73 puta višom od jetre (Slika 14B). Najveću razinu ekspresije gena *tdp1* u tkivima mladog mužjaka također imaju testisi s 2,8 puta većom ekspresijom od mozga, 5,8 puta većom od bubrega, 10 puta većom od očiju, 13 puta većom od kože, te 16 puta većom od crijeva i jetre (Slika 14B).

Rezultati usporedbe razine ekspresije gena u tkivima stare ženke pokazuju da najveću ekspresiju gena *acrc* imaju jajnici s 2,7 puta većom ekspresijom od bubrega, 16 puta većom od crijeva, 21 puta većom od jetre, 92 puta većom od mozga, 276 puta većom od očiju i 538 puta većom od kože (Slika 14C). Najveću ekspresiju gena *xpa* također imaju jajnici s 1,9 puta većom ekspresijom od bubrega, 4,2 puta većom od mozga, 13 puta većom od kože, 22 puta većom od jetre i crijeva te 30 puta većom od očiju (Slika 14C). Najveća ekspresija gena *tdp1* u prisutna je u tkivu testisa u kojima je ekspresija 1,5 puta veća od one u bubregu, 2,0 puta veća od mozga, 4,5 puta veća od očiju, 5,8 puta veća od jetre, 8,3 puta veća od kože te 10 puta veća od crijeva (Slika 14C).

Usporedba razine ekspresije gena između tkiva starog mužjaka pokazuje da je najviša ekspresija gena *acrc* prisutna u testisima koje imaju 9,6 puta višu ekspresiju od crijeva, 13 puta višu od bubrega i jetre, 44 puta višu od mozga, 47 puta višu od očiju te 120 puta višu od kože (Slika 14D). Najviša ekspresija gena *xpa* prisutna je u testisima čija je razina ekspresije 14 puta

viša od mozga, 25 puta viša od bubrega, 27 puta viša od očiju, 72 puta viša od crijeva, 136 puta viša od kože i 227 puta viša od jetre (Slika 14D). Najviša ekspresija gena *tdp1* također je prisutna u testisima gdje je razina ekspresije 4,5 puta viša od mozga, 6,1 puta viša od očiju, 7,3 puta viša od bubrega, 11 puta viša od crijeva, 16 puta viša od jetre te 17 puta viša od kože (Slika 14D).

Uz prikaz srednjih normaliziranih ekspresija ciljnih gena, ekspresije gena opisane su i na temelju prethodno definiranih ekspresijskih granica prema kojima ekspresija gena u pojedinom tkivu može biti niska, umjerena, umjereno visoka, visoka ili jako visoka (tablica 8). Na temelju ovih granica gen *acrc* je u svim skupinama zebrica nisko eksprimiran u mozgu, koži i očima, nisko ili umjereno eksprimiran u jetri i crijevu, umjereno ili umjereno visoko eksprimiran u bubregu te umjereno visoko eksprimiran u gonadama (Tablica 8). Gen *xpa* u svim skupinama zebrica nisko je eksprimiran u jetri, crijevu i očima, umjereno ili nisko eksprimiran u mozgu, bubregu i koži te umjereno ili umjereno visoko eksprimiran u gonadama (Tablica 8). Gen *tdp1* u svim skupinama zebrica nisko je ili umjereno eksprimiran u jetri, crijevu i koži, umjereno eksprimiran u mozgu, bubregu i očima te umjereno ili umjereno visoko eksprimiran u gonadama (Tablica 8). Od svih triju gena, *tdp1* je u najviše tkiva umjereno eksprimiran dok druga dva gena u većini tkiva imaju nižu razinu ekspresije, a umjereno visoka ekspresija prisutna je samo u gonadama. Gen *acrc* je u najviše tkiva nisko eksprimiran, nakon čega slijedi umjerena ekspresija, a gonade i bubreg stare ženke imaju umjereno visoku ekspresiju pa je tako *acrc* jedini gen koji ima umjereno visoku ekspresiju van gonada. Gen *xpa* je također u najviše tkiva nisko eksprimiran s najmanjim brojem tkiva s umjerenom ekspresijom, a umjereno visoka ekspresija gena *xpa* prisutna je samo u testisima starih i mladih muških jedinki, dok ženke u jajnicima imaju umjerenu ekspresiju (Tablica 8).

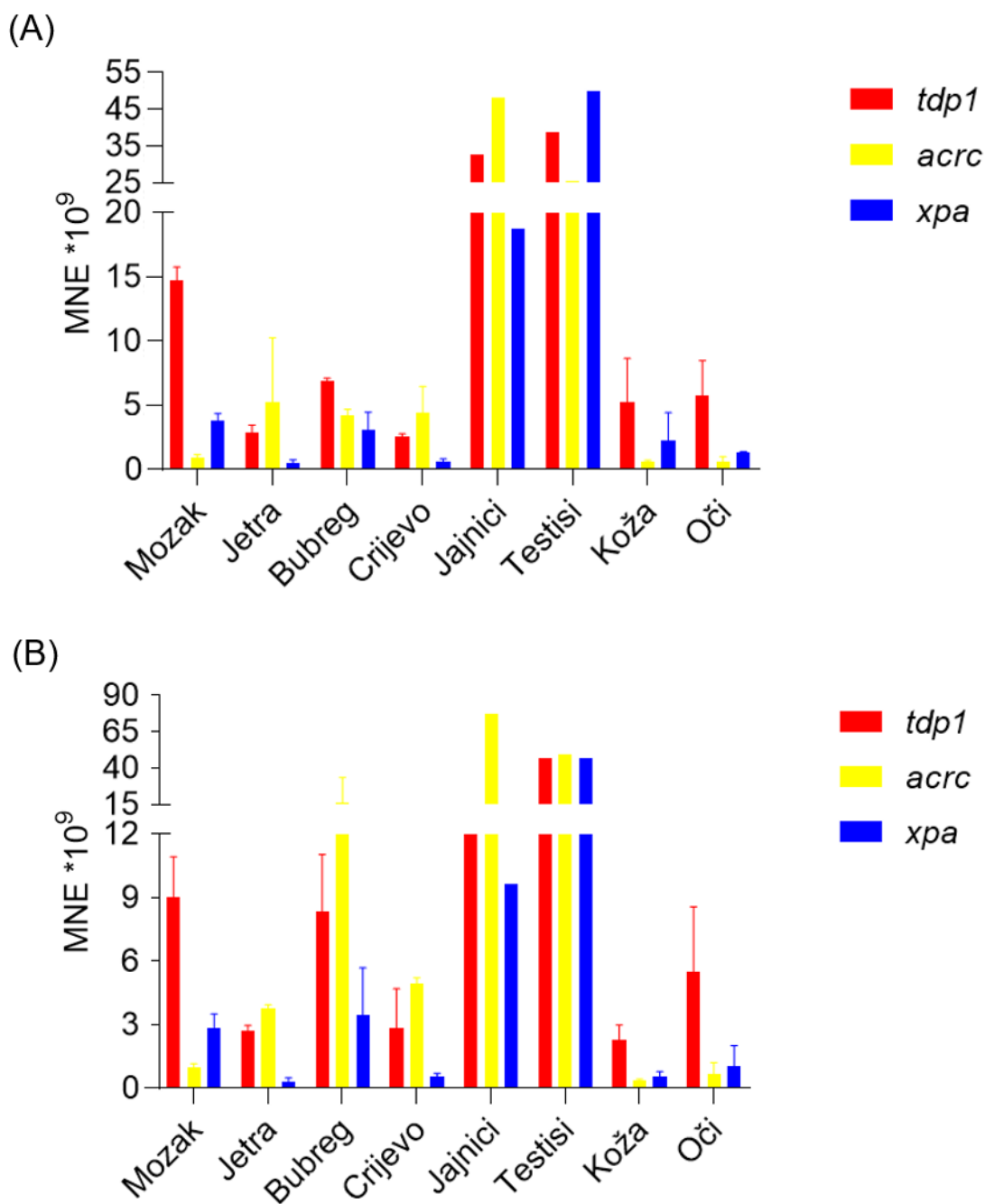
Tablica 8. Ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* prema prethodno definiranim ekspresijskim granicama u tkivima mlade ženke (MŽ), mladog mužjaka (MM), stare ženke (SŽ) i starog mužjaka (SM). **N** – niska ekspresija gena, **U** – umjerena ekspresija gena, **UV** – umjereno visoka ekspresija gena.

	<i>acrc</i>				<i>xpa</i>				<i>tdp1</i>			
	MŽ	MM	SŽ	SM	MŽ	MM	SŽ	SM	MŽ	MM	SŽ	SM
Mozak	N	N	N	N	U	U	N	U	U	U	U	U
Jetra	N	U	U	U	N	N	N	N	U	N	N	U
Bubreg	U	U	UV	U	N	U	U	N	U	U	U	U
Crijevo	N	U	U	U	N	N	N	N	U	N	N	U
Gonade	UV	UV	UV	UV	U	UV	U	UV	UV	UV	U	UV
Koža	N	N	N	N	U	N	N	N	U	U	N	U
Oči	N	N	N	N	N	N	N	N	U	U	U	U

4.10 Usporedba ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* zebrice s njihovim ortolozima u čovjeku i mišu

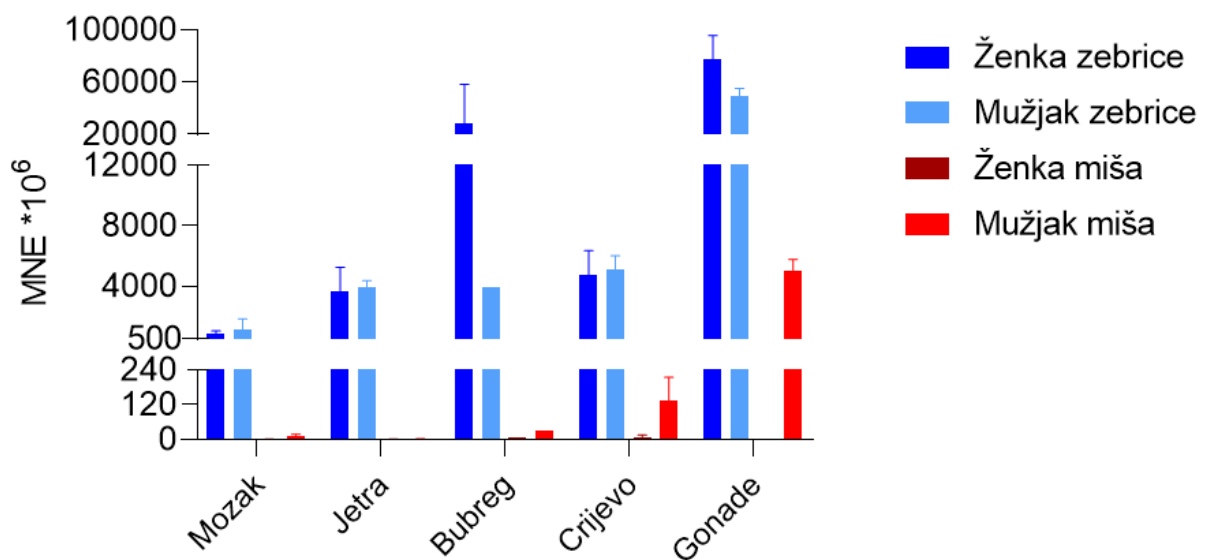
U svrhu usporedbe razine ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* zebrice s njihovom ekspresijom u čovjeku korišteni su podaci dostupni na internetskim stranicama *Human Protein Atlas* (HPA) koje sadrže udružene podatke skupa podataka dobivenih RNA sekvenciranjem u projektima HPA i GTEx (engl. *Genotype-Tissue Expression*). Razine ekspresije gena u pojedinim tkivima izražene su kao nTPM (engl. *normalized transcript per million*), a korištena tkiva (osim jajnika i testisa) nisu podjeljena po spolu ili dobi te analizirana kao u ovom diplomskom radu. Zbog razlike u metodama utvrđivanja i izražavanju podataka razine ekspresije gena opisani podaci ne mogu se izravno uspoređivati s zebricom, ali relativni odnosi razina ekspresija među pojedinim tkivima mogu se uspoređivati. S obzirom da su u projektu HPA korištena histološki normalna tkiva većinski starijih ljudi koji su tkiva donirali prilikom uklanjanja obližnjih patoloških tkiva, a u GTEx projektu tkiva su uzeta nakon smrti donora, ekspresiju gena *ACRC*, *XPA* i *TDPI* ljudi primjereno je usporediti sa starim jedinkama zebrice koje su s dvije i pol godine blizu kraja životnog vijeka (Kishi i sur. 2009). Uparivanje razina ekspresije stare ženke i starog mužjaka u svim tkivima osim gonadama za dobivanje prosječne razine ekspresije u zebrici daje nam podatke koji omogućuju usporedbu razina tkivne ekspresije proučavanih gena zebrice sa ortolozima kod ljudi (*ACRC*, *XPA*, *TDPI*). Uz usporedbu ekspresije s onom u ljudima, ekspresija gena uspoređena je i s mišjim tkivima pa je za gene *acrc* i *xpa* također

analizirana ekspresija starih jedinki miša (starosti godinu dana) kako bi mogli uspoređivati ekspresiju između sve tri vrste, dok je ekspresija *tdp1* miša uspoređivana s ekspresijom u mladim jedinkama zebrice jer ekspresija gena *tdp1* nije analizirana kod starih miševa, već samo kod mladih miševa starih 4 mjeseci. Razine ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* zebrice prikazane su na slici 15. Korištenjem prosječne vrijednosti razine ekspresije ženke i mužjaka miša u svim tkivima osim gonadama dobivena je prosječna razina ekspresije u miša. Ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* miša prethodno su određene u grupi za istraživanje DNA popravka u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju u okviru diplomskih radova Vanne Medved (PBF) i Luke Jukića (Kemijski odsjek, PMF). Vrijednosti srednje normalizirane ekspresija ciljnih gena u mišu obrađene su u računalnom programu *GraphPad Prism 8* te uz vrijednosti srednje normalizirane ekspresije ciljnih gena u zebrice prikazane na slikama 16, 17 i 18.



Slika 15. Grafički prikaz razine prosječne ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* u pojedinim tkivima muških i ženskih riba zebriica iskazane kao MNE * 10⁹ : A – mlade jedinke, B – stare jedinke. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost MNE +/- SD oba spola zebriica, a korištena MNE vrijednosti pojedinog spola računata je na temelju srednje vrijednosti normalizirane ekspresije gena 2-3 biološke replike, osim u slučaju ekspresije gena *acrc* u koži mlade ženke, u koži i očima stare ženke te u bubregu i očima starog mužjaka, ekspresije gena *xpa* u koži stare ženke te u bubregu i očima starog mužjaka i ekspresije gena *tdp1* u bubregu i očima stare ženke te u bubregu i očima starog mužjaka gdje je tkivna ekspresija gena za određeni spol zebriice određena na temelju 1 biološke replike. MNE – srednja normalizirana ekspresija, SD – standardna devijacija.

Kod zebrice najveću razinu ekspresije gena *acrc* imaju jajnici koje prate testisi s 1,6 puta manjom razinom ekspresije, a slijede ih bubreg s 4,8, crijevo s 16 i jetra s 21 puta manjom razinom ekspresije, dok tkiva mozga, očiju i kože imaju daleko manju razinu ekspresije u odnosu na jajnike i to 79, 117 i 222 puta (Slika 15B). Ljudski gen *ACRC* najveću razinu ekspresije ima u testisima, a slijede ih mozak s 2,3 puta manjom razinom ekspresije, jetra s 4,2, bubreg i oči s 5, jajnici s 5,1, crijevo s 7,2 i koža s 7,9 puta manjom razinom ekspresije od one u testisima. Usporedbom razina ekspresije gena *acrc* između zebrice i miša prikazanoj na slici 16 vidljivo je da je ekspresija u zebrici iznimno veća u svim tkivima osim u gonadama. U mišu testisi imaju iznimno veću razinu ekspresije od prvog sljedećeg tkiva s 70 puta većom razinom ekspresije od one u crijevu, a crijevo slijede bubreg s 252, mozak s 939 i jetra s 4221 puta manjom razinom ekspresije od one u testisima, dok je najmanja ekspresija u jajnicima gdje je ona čak 148346 puta manja od one u testisima (Slika 16).

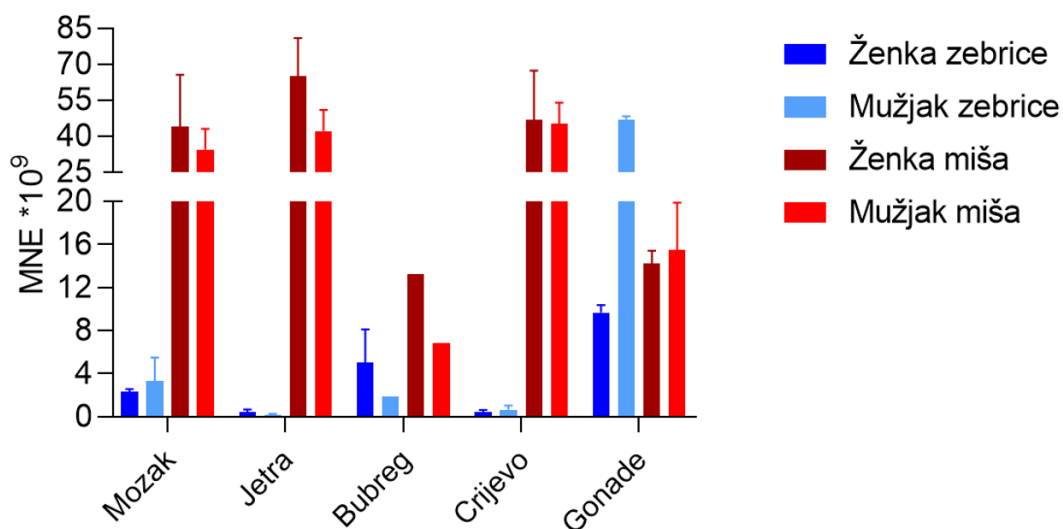


Slika 16. Grafički prikaz razine ekspresije gena *acrc* u pojedinim tkivima starih riba zebrice i starih miševa iskazane kao MNE * 10⁶. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost MNE 2-3 biološke replike zebrice ili miša +/- SD, osim u slučaju prikaza ekspresije gena *acrc* u bubregu mužjaka zebrice te u bubregu ženke i mužjaka miša gdje stupac predstavlja vrijednost 1 biološke replike. Provedena normalizacija omogućuje usporedbu ekspresije između svih uzoraka. MNE – srednja normalizirana ekspresija, SD – standardna devijacija.

Pojednostavljena usporedba ekspresija gena *acrc* u tkivima zebrice, čovjeka i miša:

- Zebrica: jajnici > testisi > bubreg > crijevo > jetra >>> mozak > oči > koža
- Čovjek: testisi > mozak > jetra > bubreg, oči > jajnici > crijevo > koža
- Miš: testisi >>> crijevo > bubreg > mozak >> jetra >> jajnici

Najveća razina ekspresije gena *xpa* kod zebrice prisutna je u testisima, u jajnicima je razina ekspresije 4,9 puta niža, nakon čega slijedi bubreg s 14 i mozak s 16 puta manjom razinom ekspresije, dok je puno niža ekspresija u očima s 46, crijevu s 85, koži s 88 i jetri s 143 puta manjom razinom ekspresije od one u testistima (Slika 15B). U ljudskim tkivima razina ekspresije gena *XPA* veoma je ujednačena pa najveću razinu ekspresije gena *XPA* ima jetra s gotovo jednakom razinom ekspresije u bubregu, a slijede ih crijevo s 1,2, jajnici s 1,4, koža s 1,5, mozak s 1,7, oči s 1,8 i testisi s 3,6 puta manjom razinom ekspresije od one u jetri. Za dobivanje prosječne razine ekspresije gena *Xpa* u starim jedinkama miš također su uparene vrijednosti razine ekspresije ženke i mužjaka miša prikazane na slici 17 svih tkiva osim gonada. Sama ekspresija gena puno je veća nego u zebrici u svim tkivima osim u gonadama, a razina ekspresije između tkiva ujednačena je kao i kod ljudskih tkiva. Najveću razinu ekspresije ima jetra, a slijede ju crijeva s 1,2, mozak s 1,4, testisi s 3,5, jajnici s 3,8 i bubreg s 5,3 puta manjom razinom ekspresije od one u jetri (Slika 17).

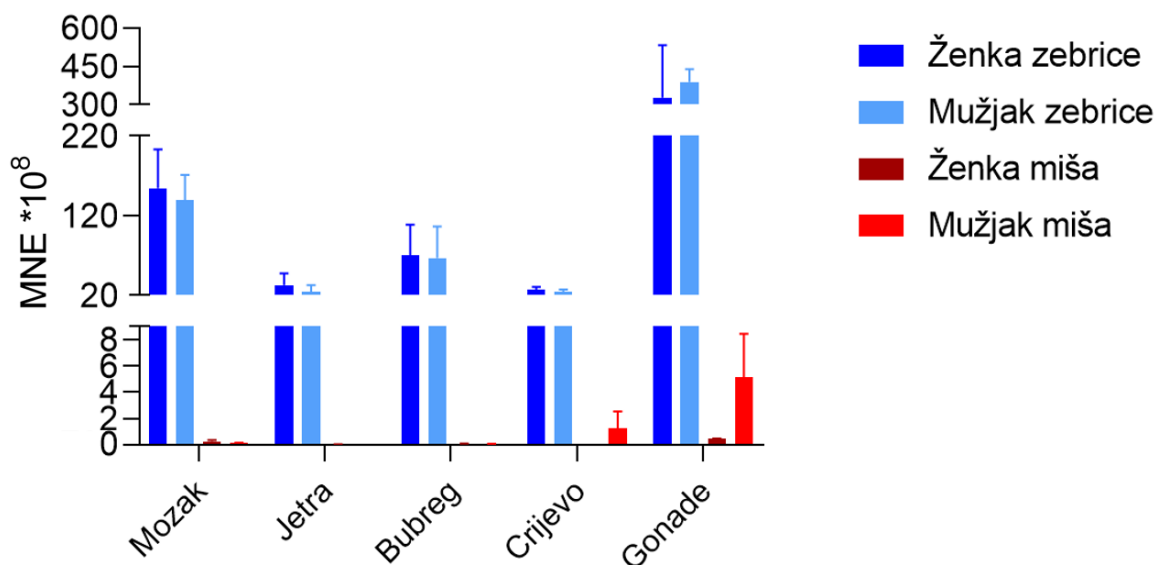


Slika 17. Grafički prikaz razine ekspresije gena *xpa* u pojedinim tkivima starih riba zebrice i starih miševa iskazane kao MNE * 10⁹. Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost MNE 2-3 biološke replike zebrice ili miša +/- SD, osim u slučaju prikaza ekspresije gena *xpa* u bubregu mužjaka zebrice te u bubregu ženke i mužjaka miša gdje stupac predstavlja vrijednost 1 biološke replike. Provedena normalizacija omogućuje usporedbu ekspresije između svih uzoraka. MNE – srednja normalizirana ekspresija, SD – standardna devijacija.

Pojednostavljena usporedba ekspresija gena *xpa* u tkivima zebrice, čovjeka i miša:

- Zebrica: testisi > jajnici >> bubreg > mozak >>> oči > crijeva > koža > jetra
- Čovjek: jetra, bubreg > crijevo > jajnici > koža > mozak > oči > testisi
- Miš: jetra > crijeva > mozak > testisi > jajnici > bubreg

Gen *tdp1* nema tako veliku varijaciju kao *acrc* i *xpa* u razini ekspresije između različitih tkiva mladih zebrica. Kao i gen *xpa*, *tdp1* je najviše eksprimiran u u testisima, ali za razliku od *xpa* ekspresija u jajnicima je slična kao u testisima (Slika 15A). Nakon gonada slijede mozak s 2,6, bubreg s 5,7, oči s 6,8 i koža s 7,4 puta manjom razinom ekspresije te jetra s 14 i crijevo s 15 puta manjom razinom ekspresije od one u testisima. U starim zebricama *tdp1* je također relativno ravnomjerno eksprimiran s najvećom ekspresijom u testisima nakon kojih slijede jajnici s 3,1, mozak s 5,2, bubreg s 5,6, oči s 8,5, crijevo i jetra s 17 te koža s 20 puta manjom ekspresijom od one u testisima. Razina ekspresije ljudskog gena *TDPI* najveća je u testisima, a slijede je crijevo s 2,7, bubreg s 3,2, jetra s 3,4, jajnici i koža s 3,5, oči s 4,6 i mozak s 4,7 puta manjom razinom ekspresije ekspresije u odnosu na testise. Izračun prosječne razine ekspresije gena *Tdp1* miša napravljen je kao i za prethodne gene na temelju vrijednosti prikazanih na slici 18. Daleko najveću razinu ekspresije gena imaju testisi s 8,1 puta većom razinom ekspresije od one u crijevu, 12 puta većom od one u jajnicima, 28 puta većom od one u mozgu, 101 puta većom od one u bubregu te 269 puta većom od one u jetri (Slika 18).



Slika 18. Grafički prikaz razine ekspresije gena *tdp1* u pojedinim tkivima mladih riba zebrice i mladih miševa iskazane kao MNE * 10^8 . Svaki stupac predstavlja srednju vrijednost MNE 2-3 biološke replike zebrice ili miša +/- SD, osim u slučaju prikaza ekspresije gena *tdp1* u jetri mužjaka miša gdje stupac predstavlja vrijednost 1 biološke replike. Provedena normalizacija omogućuje usporedbu ekspresije između svih uzoraka. MNE – srednja normalizirana ekspresija, SD – standardna devijacija.

Pojednostavljena usporedba ekspresija gena *tdp1* u tkivima stare zebrice i čovjeka:

- Zebrica: testisi > jajnici > mozak > bubreg > oči > crijevo, jetra > koža
- Čovjek: testisi > crijevo > bubreg > jetra > jajnici > koža > oči > mozak

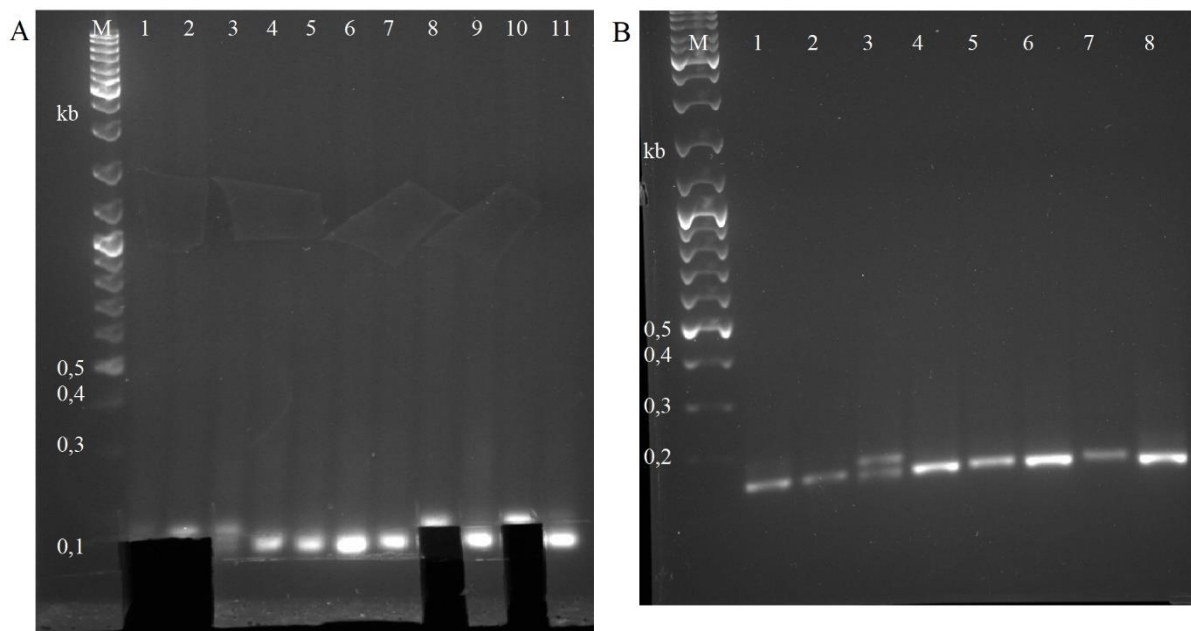
Pojednostavljena usporedba ekspresija gena *tdp1* u tkivima mlade zebrice i miša:

- Zebrica: testisi \approx jajnici > mozak > bubreg > oči > koža > jetra > crijevo
- Miš: testisi >> crijevo > jajnici > mozak >> bubrezi >> jetra

4.11 Identifikacija zebrica mutiranog gena *xpa*

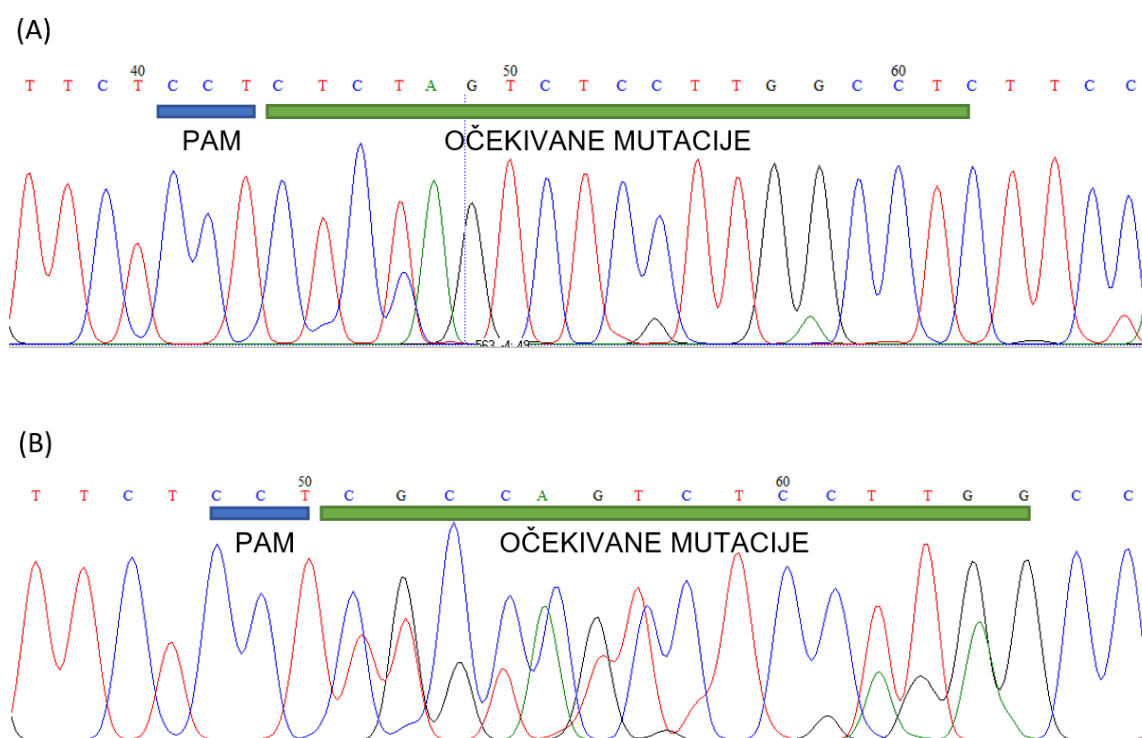
Za dobivanje mutanata koji stvaraju nefunkcionalni protein koji se traže i u ovom istraživanju poželjno je identificirati jedinke s promjenama koje dovode do pomaka okvira čitanja jer takve promjene najčešće dovode do stvaranja uranjenog stop kodona i posljedično nefunkcionalnog proteina.

U svrhu detekcije izmijenjene sekvence *Xpa* gena kod različitih jedinki zebrica F1 generacije provedena je PCR reakcija prema uvjetima prikazanim na tablici 4 s početnicama prikazanim na tablici 3 i gel elektroforeza DNA na agaroznom gelu. Elektroforeza je provedena s ciljem da se ispita razlika u veličini PCR-om umnoženog alela divljeg tipa gena *xpa* (amplikon veličine 150 bp) te izmijenjenog alela čiji je amplikon različite veličine, a gelovi su prikazani na slici 19. Elektroforeza na gelu B slike 15 provedena je kako bi došlo do jasnijeg razlučivanja vrpca na gelu.



Slika 19. 2 %-tni agarozni gelovi s dodanim reakcijskim smjesama PCR reakcije na genomskoj DNA različitih riba zebrića nakon provedene elektroforeze. M – DNA marker veličine (kb - kilobaza). A: 1 – F1 mužjak utemeljitelj IV, 2 – F1 ženka I, 3 – F1 ženka II, 4 – F1 ženka III, 5 – F1 ženka IV, 6 – F1 ženka V, 7 – F1 ženka VI, 8- F1 ženka VII, 9 – F1 ženka VIII, 10 – F1 ženka IX, 11 – mužjak divljeg tipa. B: 1 – mužjak divljeg tipa, 2 – F1 muški utemeljitelj IV, 3 – F1 ženka II, 4 – F1 ženka III, 5- F1 ženka IV, 6 – F1 ženka V, 7- F1 ženka VI, 8 – F1 ženka VIII. Iz gela A izrezani su dijelovi gela s DNA prije snimanja gela, izrezana je DNA za koju se pretpostavljalo da nosi željenu promjenu kako bi se mogla sekvencirati, dok je s gela B izrezivanje odrađeno nakon fotografiranja.

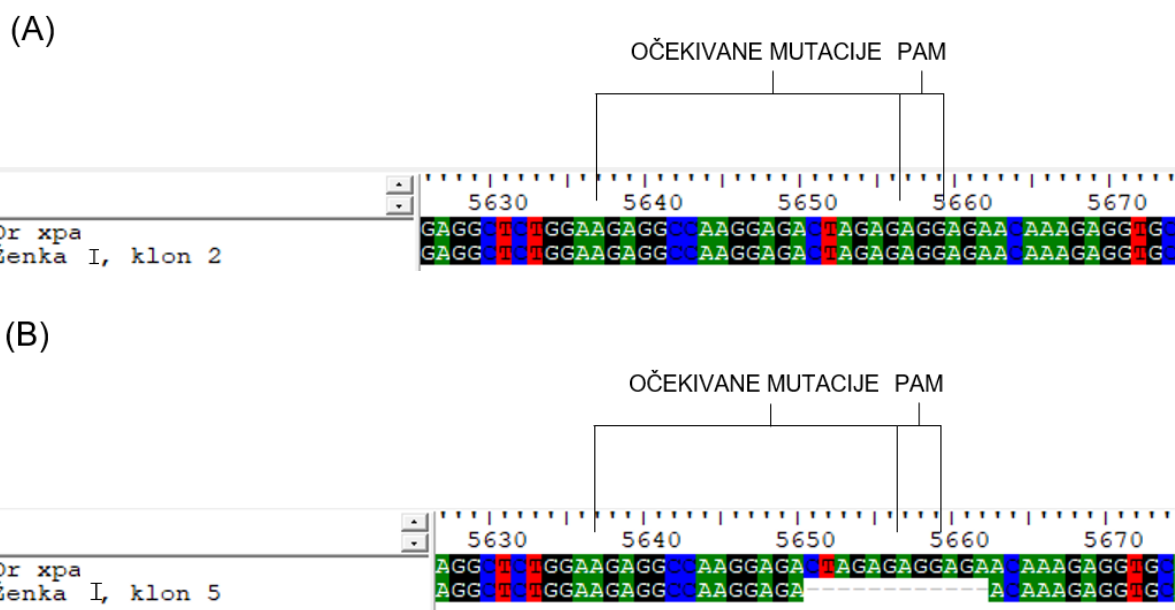
Nakon elektroforeze s gela A izrezani su uzorci DNA F1 muškog utemeljitelja IV, F1 ženke I, F1 ženke VII i F1 ženke IX te su PCR fragmenti nakon pročišćavanja poslani na sekvenciranje s nizvodnom početnicom DrXPAE6ext R koja je korištena u umnožavanju genomske DNA u PCR reakciji. Nakon provedene elektroforeze na gelu B svi uzorci su izrezani s gela te su također poslani na sekvenciranje s nizvodnom početnicom DrXPAE6ext R, a rezultati oba sekvenciranja prikazani su u obliku kromatograma na slici 20.



Slika 20. Primjeri kromatograma sekvenciranja u području ciljane izmijene genoma sustavom CRISPR-Cas9. A – kromatogram sekvence divljeg tipa, B – kromatogram izmijenjene sekvence jedinke F1 ženke I – ovakav kromatogram s po dvije očitane baze na istoj poziciji posljedica je činjenice da su ribe F1 generacije heterozigoti nastali križanjem kimernih F0 zebrića sa zebrićama divljeg tipa. Sekvenciranje je napravljeno pomoću nizvodne početnice pa su prikazane sekvence reverzno komplementarne sekvenci kodirajućeg lanca gena *xpa*, a i označena PAM sekvenca je reverzni komplement PAM sekvence (5' – NGG – 3') koju prepoznaje Cas9 protein (Mengstie i Wondimu 2021).

Uzorak mužjaka divljeg tipa, F1 muškog utemeljitelja IV, F1 ženke III, F1 ženke IV, F1 ženke VI i F1 ženke VIII imaju kromatogram divljeg tipa kakav je prikazan na slici 20A. Uzorak F1 ženke I, F1 ženke II, F1 ženke VII i F1 ženke IX imaju kromatograme izmijenjene sekvence kakav je prikazan na slici 20B.

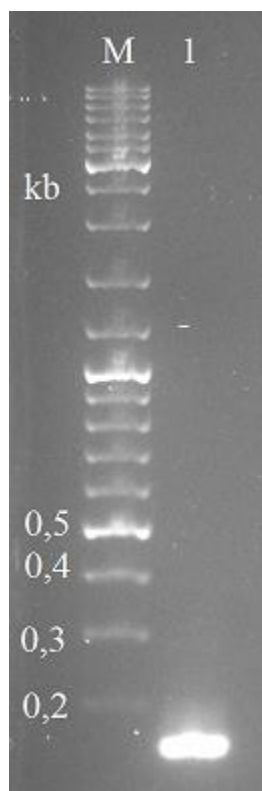
S obzirom da se iz kromatograma PCR smjese za ženku I i ženku VII činilo da je identificirana željena promjena, ove PCR smjese su dalje analizirane pomoću kloniranja i sekvenciranja više klonova kako bi precizno odredio specifičnu sekvencu izmijenjenog alela kod heterozigotnih riba F1 generacije jer klonovi u svojim u plazmidima nose samo jedan od umnoženih alela genomske DNA. Ukratko, PCR smjesa je pročišćena iz agaroznog gela i uklonirana u *pJET* plazmid te je nakon izolacije plazmida poslana na sekvenciranje uz *pJET1.2* uzvodnu početnicu, a rezultati sekvenciranja su prikazani na slici 21.



Slika 21. Sekvence dobivene sekvenciranjem *pJET* plazmida s ukloniranom DNA umnoženom PCR reakcijom. Gornja sekvenca na slici 17A i 17B je sekvenca gena *xpa* zebrice preuzeta s mrežne stranice *Ensembl*, a donja je sekvenca DNA uklonirana u plazmid. A – klonirana sekvenca divljeg tipa DNA poravnata sa sekvencom gena *xpa*. B – sekvenca DNA s prisutnom delecijom od 12 nukleotida poravnata sa sekvencom gena *xpa*.

Na sekvenciranje je poslano šest plazmida s DNA ženke I te osam plazmida s DNA ženke VII. Od šest klonova ženke I sekvenca jednog klona bila je divljeg tipa kao na slici 21A, sekvence dvaju klonova imale su deleciju od 12 nukleotida kao na slici 21B, a sekvence tri klona bile su nepoznate. Od osam klonova ženke VII sekvence dva klona bile su divljeg tipa, sekvence tri klona imale su deleciju od 12 nukleotida, a sekvence preostalih triju klonova bile su nepoznate. Delecija od 12 nukleotida uobičajeno nije povoljna promjena u procesu dobivanja mutanata s nefunkcionalnim proteinom jer ne dovodi do pomaka u okviru čitanja i nastanka uranjenog stop kodona pa tako i nefunkcionalnog proteina, već samo do skraćivanja proteina za 4 aminokiseline.

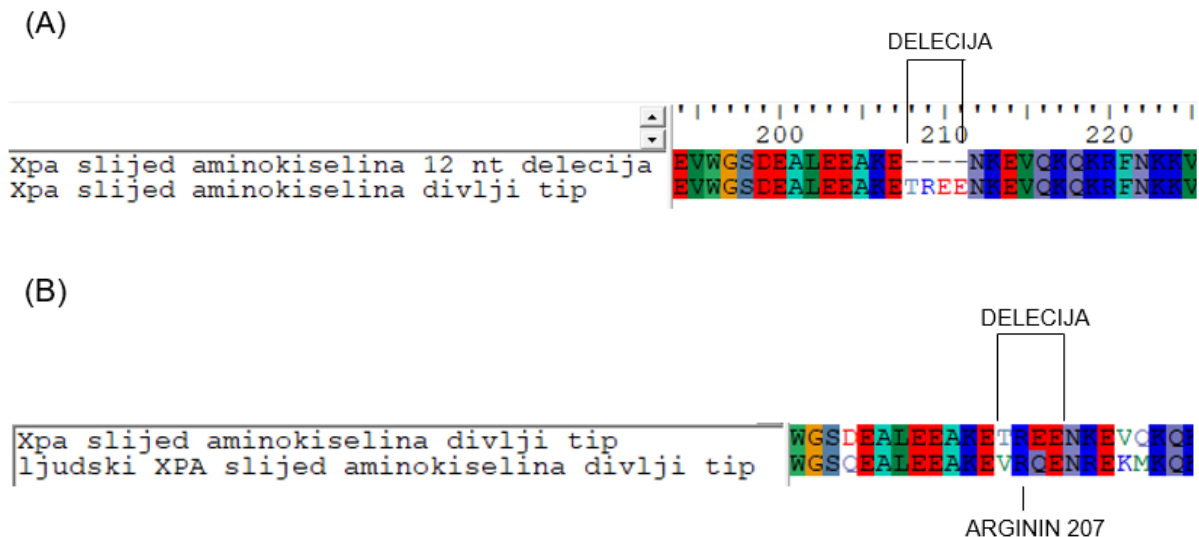
S obzirom da je u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju prethodno odrađeno sekvenciranje u DNA F1 muškog utemeljitelja IV imala prisutnu deleciju od 12 nukleotida odlučeno je da se ponovi umnažanje DNA muškog utemeljitelja te da se ona ubaci u *pJET* plazmid koji se nakon izolacije šalje na sekvenciranje kao što je već opisano. Nakon PCR reakcije provedene s početnicama prikazanim u tablici 3 i uvjetima reakcije prikazanim u tablici 4 provedena je elektroforeza reakcijske smjese u slučaju da se na gelu vidi razlika između divljeg tipa DNA i izmijenjene DNA te je li ona uopće prisutna, a gel je prikazan na slici 22.



Slika 22. 2 %-tni agarozni gel s dodanom reakcijskom smjesom PCR reakcije na genomskoj DNA ribe zebrice nakon provedene elektroforeze. M – DNA marker veličine (kb - kilobaza). 1 – F1 muški utemeljitelj IV.

Na sekvenciranje su poslani plazmidi iz dvadeset i dva DNA muškog utemeljitelja IV. Od dvadeset i dva klonova muškog utemeljitelja IV, sekvence dvanaest klonova bila su divljeg tipa kao na slici 21A, sekvenca jednog klona imala je deleciju od 12 nukleotida kao na slici 21B, a sekvence devet klonova bile su nepoznate.

Sveukupno je testirano deset riba F1 generacije, tri ribe testirane su i korištenjem klonova s ukupno trideset i šest klonova te niti kod jedne u genu *xpa* nije pronađena promjena koja mijenja okvir čitanja gena, već samo delecija 12 nukleotida. Promjena aminokislinske sekvence proteina Xpa zebrice koju uzrokuje pronađena delecija od 12 nukleotida u genu *xpa* zebrica F1 generacije kao i usporedba divljeg tipa aminokislinske sekvence proteina Xpa zebrice i čovjeka prikazani su na slici 23.



Slika 23. A - Aminokiselinske sekvence proteina Xpa zebrice kojeg kodira sekvenca gena *xpa* divljeg tipa te sekvenca s delecijom 12 nukleotida (5651-5662). B – aminokiselinske sekvence proteina Xpa zebrice i proteina XPA čovjeka.

Kako bi se stvorile *xpa* deficijentne zebrice bit će potrebno identificirati jedinke koje u genu *xpa* nakon upotrebe sustava CRISPR/Cas9 nose promjene u okviru čitanja gena *xpa* koje dovode do nastanka uranjenog stop kodona i naknadnim križanjima stvoriti homozigotne jedinke s mutiranim genom *xpa* čijim prepisivanjem i naknadnom translacijom dolazi do stvaranja nefunkcionalnog proteina Xpa.

5. RASPRAVA

5.1 Analiza promjene ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* tijekom starenja zebrice

Pad ekspresije proučavanih gena starenjem za *acrc* je zamjetan u koži ženke i jetri mužjaka, za *xpa* u koži, očima, jajnicima i mozgu ženke te jetri koži i bubregu mužjaka, a za *tdp1* u koži, očima, jajnicima, mozgu i crijevu ženke. Kako je poznato da starenjem dolazi do pada potencijala organizma za odgovor na oštećenja DNA moguće je da taj pad uzrokovan i samim smanjenjem ekspresije upravo ovih gena s ulogom u popravku križnih veza DNA i proteina (Edifizi i Schumacher 2015; Ribezzo i sur. 2016).

Suprotno očekivanju, porast ekspresije proučavanih gena starenjem za *acrc* je zamjetan u bubregu, jetri i crijevu ženke te testisima mužjaka, za *xpa* u bubregu ženke, a za *tdp1* u očima

mužjaka. S obzirom na kompleksnost popravka DPC-ova i velik broj enzima koji na različiti način sudjeluju u popravku ovih oštećenja primjećeni rast ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* u pojedinim tkivima mogao bi biti rezultat kompenzacije organizma zbog pada ekspresije drugih gena koji sudjeluju u popravku DPC-ova. Tako je naprimjer moguće da do rasta ekspresije gena *acrc* dolazi zbog pada ekspresije gena *sprt1* ili nefunkcionalnosti proteosoma s obzirom da svi navedeni čimbenici mogu sudjelovati u proteolitičkom putu popravka DPC-ova. Ovaj rad predstavlja prvu analizu *acrc* ekspresije tijekom starenja, te nije moguće usporediti naš rezultat sa objavljenima.

Do porasta ekspresije gena *xpa* moglo bi možda doći zbog zahtjeva organizma za NER-om nakon pada ekspresije gena koji održavaju integritet same DNA poput onih koji sudjeluju u BER-u ili MMR-u. Iako prema Deng i sur., 2017 koji su lančanom reakcijom u stvarnom vremenu mjerili mRNA ekspresiju gena *XPF* i *ERCC1* u limfocitima periferne krvi čovjeka ekspresija komponenti NER-a opada starenjem.

Višestruki t-test proveden na dobivenim MNE vrijednostima ekspresije ciljnih gena u biološkim replikama tkiva zebrica pokazao je da između tkiva mladih i starih jedinki zebrica nema statistički značajne razlike u razini ekspresije gena. Ovakav rezultat ukazuje da razlike u ekspresiji gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* između mladih i starih jedinki zebrica stvarno nema ili da razlika postoji, ali nije određena zbog nedovoljnog broja uzoraka.

5.2 Analiza spolnih razlika u ekspresiji gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* zebrice

Većina istraživanja vezanih za spolne razlike u nastanku tumora i popravku DNA bavi se ljudima, a prema njima, žene u većini tkiva imaju manju pojavnost tumora u odnosu na muškarce i manju razinu DNA oštećenja kod zdravih pojedinaca (Slyskova 2011; Zhu i sur., 2019). S druge strane, istraživanja ekspresije komponenti NER puta popravka nisu pronašla značajnu razliku u ekspresiji gena *ERCC1* i *XPF* između spolova (Deng i sur. 2017). Kod odraslih mladih jedinki geni *acrc* i *xpa* više su ekprimirani u većini tkiva kod mužjaka, dok je kod starih jedinki situacija obrnuta, tj. ekspresija raste u ženki, dok opada u većini organa mužjaka (slika 13A i B). Upravo suprotan profil primjećen je kod gena *tdp1*: *tdp1* je više ekprimiran u većini ženskih tkiva kod mladih odraslih jedinki, dok starenjem ekspresija opada u ženki, a raste u mužjaka (slika 13C).

Iz navedenog je vidljiv trend rasta ekspresije gena *acrc* i *xpa* starenjem ženki u usporedbi sa mužjacima, dok *tdp1* pokazuje obratni uzorak. Zbog kompleksnosti DPC popravka, ne može

se zaključivati o kapacitetu popravka samo iz ekspresijskih podataka na razini mRNA, te ovi rezultati predstavljaju vrijedan incijalni probir genske ekspresije i dalje će biti korišteni u sprezi sa drugim analizama kapaciteta popravka križnih veza DNA i proteina u budućim istraživanjima.

Višestruki t-test proveden na dobivenim MNE vrijednostima ekspresije ciljnih gena u biološkim replikama tkiva zebrića pokazao je da između tkiva ženskih i muških jedinki zebrića nema statistički značajne razlike u razini ekspresije gena. Ovakav rezultat ukazuje da razlike u ekspresiji gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* između muških i ženskih jedinki zebrića stvarno nema ili da razlika postoji, ali nije određena zbog nedovoljnog broja uzoraka.

5.3 Analiza razlike ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* između različitih tkiva zebrića

Najveća ekspresija gena *acrc* u svim skupinama zebrića prisutna je u gonadama što je u skladu s istraživanjima koja govore o važnosti *acrc* gena u reproduktivnim tkivima eukariota (Carmell i sur. 2016; Bhargava i sur. 2020). Gonade svih skupina zebrića također imaju najveću ekspresiju gena *xpa* što se ne spominje u istraživanjima vezanim za NER i predstavlja novi rezultat, jer istraživanja koja su analizirala ekspresiju gena vezanih za NER nisu analizirala ekspresiju gena u pojedinim tkivima (Deng i sur. 2017; Moriwaki i Takahashi 2008). Ekspresija gena *tdp1* također je najveća u gonadama, osim u slučaju stare ženke kod koje je ekspresija najveća u bubregu. Općenito, *acrc* i *xpa* imaju veliku razliku u srednjoj normaliziranoj ekspresiji između tkiva s najvećom razinom ekspresije i tkiva s najnižom razinom ekspresije (i do 538 puta, odnosno 227 puta), dok je najveća razlika u ekspresiji gena *tdp1* između tkiva s najvećom i tkiva s najnižom razinom ekspresije puno manja (17 puta). S obzirom na proteaznu aktivnost proteina *Acrc* očekivana je njegova niska ekspresija kako ne bi došlo do nereguliranog cijepanja proteina nužnih za metabolizam stanica, ali vidljivo je da je ekspresija u gonadama veća nego u ostalim tkivima što Bhargava i sur. 2020 povezuju s intrizično neuređenom regijom proteina *Acrc*. Proteini s intrizično neuređenom regijom sudjeluju u regulaciji tranzicije mnogih staničnih organela tijekom staničnih ciklusa i dio su mnogih struktura specifičnih za germinativne stanice pa tako upravo intrizično neuređena regija *Acrc* omogućuje pravilnu segregaciju kromosoma germinativnih stanica u oblića i vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) (Bhargava i sur. 2020). Ova regija proteina *Acrc* najvjerojatnije je potrebna i germinativnim stanicama gonada zebrića zbog čega je ekspresija ondje izrazito veća nego u ostalim tkivima, što će biti predmet idućih istraživanja.

NER put popravka koji je iznimno bitan za popravak oštećene DNA bilo da se radi o GG-NER-u ili TC-NER-u što je vidljivo i po brojnim sindromima koje uzrokuju mutacije u genima NER-a pa je očekivano da ekspresija u svim tkivima bude podjednaka (Schärer 2013). Izrazito veća razina ekspresije u gonadama naprema ostalim tkivima neočekivani je rezultat koji je možda povezan upravo s popravkom DPC-ova, a ne i ostalih oštećenja DNA s obzirom da i druga dva istraživana gena koji su dio puteva popravka DPC-ova također imaju izrazito veću ekspresiju u gonadama.

Gen *tdp1* u prosjeku ima najvišu ekspresiju od triju istraživanih gena što je u skladu s tvrdnjama Sun i sur. 2020 koji važnost enzima *tdp1* prepisuju tome da su topoizomerazne križne veze s DNA vjerojatno najučestalije od svih DPC-ova te činjenici da inaktivacija gena *tdp1* dovodi do razvoja sindroma SCAN1 (engl. *Spinocerebellar Ataxia with Axonal Neuropathy*) koji nastaje zbog nakupljanja Top1-cc u neuronima. Uz navedeno poznata je uloga *tdp1* i u popravku drugih oštećenja kao što su 3'-fosfoglikolat i 3'-deoksiriboza fosfat koji su uobičajeni produkti oksidativnog oštećenja DNA što još više naglašava njegovu važnost za stanice (Pommier i sur. 2014).

5.4 Usporedba ekspresije gena *acrc*, *xpa* i *tdp1* zebriće s njihovim ortolozima u čovjeku i mišu

Iz pojednostavljene usporedbe ekspresije gena *acrc* vidljivo je da sve tri vrste pokazuju najvišu razinu ekspresije u testisima, dok je razlika u *acrc* ekspresiji u jajnicima iznimno velika: *acrc* zebriće čak je neto više eksprimiran nego u testisima, dok je u čovjeka i miša ta ekspresija zamjetno manja u odnosu na druga tkiva. Najmanja razina ekspresije kod zebriće i čovjeka je u koži, dok ista nije analizirana kod miša. U zebrići i mišu vidljiva je velika razlika između tkiva s najvećom razinom ekspresije i ostalih tkiva, dok je u čovjeku ta razlika manje izražena. Zamjetna razlika u razinama ekspresije *acrc* postoji između čovjeka i zebriće sa jedne strane i miša sa druge strane (slike 15B i 16). Naime, *Acrc* miša povećano je eksprimiran samo u testisima, dok je u ostalim tkivima ova ekspresija niska ili vrlo niska (Slika 16). Ova razlika je očekivana, s obzirom da je ACRC protein miša različite strukture od ACRC čovjeka i zebriće (slika 4). ACRC miša ne sadrži proteaznu SprT domenu nego samo intrizično neuređenu regiju čija je uloga prethodno objašnjena (Bhargava i sur. 2020; Carmell i sur. 2016). Zbog ovakve strukture proteina pretpostavlja se da je uloga proteina ACRC miša drugačija od njegove uloge u popravku DPC-ova kod ostalih metazoa (Marta Popović; osobna komunikacija).

Redosljed ekspresija gena *xpa* uvelike se razlikuje u zebrici, čovjeku i mišu pa je tako najveća razina ekspresije kod zebrice u testisima, kod čovjeka u jetri i bubregu, kod miša u jetri, a ta tkiva s najvećom razinom ekspresije u jednoj vrsti u drugoj su među onima s najnižom uz iznimku jetre kod miša i čovjeka (pojednostavljena usporedba ekspresije gena *xpa*). Razlika u razini ekspresije između tkiva zebrice s najvećom razinom ekspresije i ostalih tkiva dosta je velika, dok miš i čovjek imaju ujednačenu razinu ekspresije između tkiva. Također, *xpa* je zamjetno više eksprimiran u miša nego u zebrice, i to u mozgu, jetri i crijevu (Slika 17). Zapažene razlike trenutno ne možemo objasniti te će biti predmet budućih istraživanja uloge NER puta u DPC popravku.

Najveća razina ekspresije gena *tdp1* kod svih triju vrsta je u testisima, ali ostala tkiva ne pokazuju pravilnost u redosljedu ekspresije (pojednostavljena usporedba ekspresije gena *tdp1*). Kao i kod prethodna dva gena u čovjeku je razlika između tkiva s najvećom razinom ekspresije i ostalih tkiva najslabije izražena, razlika je mala i u tkivima zebrice, dok je u mišu puno izraženija. Zanimljivo, trend tkivne ekspresije gena *tdp1* zebrice u usporedbi sa mišom (slika 18) sličan je onom *acrc* gena (slika 16) gdje su oba zebričina gena u analiziranim tkivima relativno jednoliko eksprimirana s povećanom ekspresijom u testisima i jajnicima, dok su u miša oba gena zamjetno eksprimirana isključivo u testisima (slike 16 i 18). U slučaju *xpa* gena, ovaj trend nije prisutan (slika 17).

Umjerena do umjereno visoka ekspresija gena *acrc* i *tdp1* u gonadama zebrice, čovjeka i miša novi je rezultat, te upućuje na važnost ovog tipa DNA popravka i potencijalnu veću incidenciju DPC-ova u germinativnom tkivu koje ima visoku učestalost stanične diobe i mejoze (Bertalanffy 1962). Ova pojava zamijećena je za gen *xpa* samo kod zebrice koja ima veću ekspresiju gena *xpa* u germinativnim tkivima u odnosu na ostala tkiva, dok čovjek i miš nemaju povećanu ekspresiju gena *xpa* u germinativnim tkivima.

5.5 Identifikacija zebrica mutiranog gena *xpa*

U procesu identifikacije zebrica mutiranog gena *xpa* pronađena je jedna vrsta izmjene genoma i to delecija 12 nukleotida u području šestog egzona od 5651. do 5662. nukleotida sekvence gena *xpa*. Ova promjena je nažalost nepovoljna jer izmjene koje mijenjaju broj nukleotida za višekratnike broja tri ne dovode do promjene okvira čitanja zbog toga što za jednu aminokiselinu kodiraju upravo tri nukleotida, a sama delecija nije dovela ni do nastajanja uranjenog stop kodona u kodonu koji kodira za prvu aminokiselinu nakon delecije, ali dolazi

do delecije četiri aminokiseline Thr₂₀₈ – Glu₂₁₁ (slika 23A). Navedene aminokiseline nalaze se u području DNA vezujuće domene ljudskog proteina XPA gdje je Arg₂₀₇ (slika 23B) jedna od aminokiselina čija mutacija dovodi do smanjene mogućnosti regrutacije XPA u preincizijski kompleks NER-a te smanjenja efikasnosti vezanja XPA i DNA, ali delecija ove aminokiseline za razliku od delecije četiri aminokiselina Gly₇₂ – Phe₇₅ koje sudjeluju u interakciji proteinom ERCC1 ne dovode do potpune nefunkcionalnosti proteina, već do inhibicije funkcionalnosti XPA (Cleaver i States 1997; Pradhan i sur. 2018). Zbog navedenog ne dolazi do sinteze potpuno nefunkcionalnog proteina, već samo nedostatka četiri aminokiselina te četvrti cilj istraživanja nije ostvaren jer nije identificirana riba čijim bi se daljnjim križanjem dobila XPA deficijentna linija zebrića. Nepoznate sekvence dobivene tijekom sekvenciranja *pJET* plazmida s ukloniranom sekvencom gena *xpa* koje se nisu mogle uspoređivati s genomskom sekvencom *xpa* vjerojatno su rezultat pogreške u sekvenciranju jer *pJET* plazmid kodira za letalni restriksijski enzim koji se inaktivira insercijom DNA zbog čega tijekom uzgoja bakterija mogu rasti samo bakterije s rekombinantnim plazmidom pa je nužno da tijekom sekvenciranja heterozigotne jedinice u bakterijama postoje samo dvije vrste rekombinantnih plazmida (Thermo Fisher Scientific 2022).

6. ZAKLJUČAK

- 1) Analizom promjene ekspresije gena *acrc* starenjem zebrića utvrđeno je da u bubregu, jetri, crijevu i jajnicima ženki zebrića te testisima mužjaka umjesto očekivanog pada ekspresije gena *acrc* dolazi do porasta njegove ekspresije. Ovakav porast ekspresije gena starenjem zabilježen je i za gen *xpa* u bubregu i jetri ženke zebrića te za gen *tdp1* u očima i crijevu mužjaka zebrića i ukazuje na moguću kompenzaciju organizma zbog pada ekspresije drugih gena koji sudjeluju u kompleksnoj mreži popravka DPC-ova. U većini tkiva zebrića ekspresija sva tri gena opada starenjem i upućuje da bi pad staničnog potencijala za DDR starenjem mogao biti uzrokovan i smanjenjem ekspresije gena koji sudjeluju u popravku DPC-ova.
- 2) Ekspresija ciljnih gena razlikuje se u tkivima ženki i mužjaka zebrića te je za gene *acrc* i *xpa* ekspresija veća u većini tkiva mladih mužjaka. Kod starih jedinki zebrića ekspresija gena *acrc* i *xpa* veća je u većini tkiva ženki. U većini tkiva mladih jedinki ekspresija gena *tdp1* veća je kod ženki, a kod starih jedinki ekspresija je veća kod mužjaka. S obzirom da sama razina mRNA nije dovoljna za postavljanje zaključaka o kapacitetu spolova za popravak DPC-ova, ovaj rezultat može se koristiti kao podloga za druge analize kapaciteta popravka križnih veza DNA i proteina.
- 3) Najveća ekspresije gena *acrc* u svim skupinama zebrića prisutna je u gonadama što je u skladu s prethodnim istraživanjima uloge ovog gena u reproduktivnim tkivima eukariota. Gonade svih skupina zebrića također imaju najveću ekspresiju gena *xpa* što predstavlja novi rezultat i ukazuje na povezanost upravo s popravkom DPC-ova, a ne i ostalih oštećenja DNA s obzirom da i druga dva istraživana gena koji su dio puteva popravka DPC-ova imaju veću ekspresiju u gonadama. Gen *tdp1* u prosjeku ima najvišu ekspresiju od triju istraživanih gena što je očekivano jer su TOP-cc vjerojatno najbrojniji DPC-ovi.
- 4) U gonadama zebrića, čovjeka i miša zabilježena je umjerena do umjereno visoka ekspresija gena *acrc* i *tdp1* i upućuje na potencijalnu veću incidenciju DPC-ova u germinativnom tkivu te važnost njihova popravka u tkivu s visokom učestalošću diobe.
- 5) U procesu identifikacije zebrića mutiranog gena *xpa* pronađena je jedna vrsta izmjene genoma i to delecija 12 nukleotida u području šestog egzona od 5651. do 5662. nukleotida sekvence gena *xpa*. Ova promjena ne dovodi do sinteze nefunkcionalnog proteina pa tijekom identifikacije riba mutiranog gena *xpa* nije identificirana riba čijim bi se daljnjim križanjem dobila Xpa deficitarna linija zebrića.

7. LITERATURA

- Amitai G., Sorek R. (2016): CRISPR-Cas adaptation: Insights into the mechanism of action. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 67–76.
- Aparicio T., Baer R., Gottesman M., Gautier J. (2016): MRN, CtIP, and BRCA1 mediate repair of topoisomerase II-DNA adducts. *J. Cell Biol.* **212**: 399–408.
- Bertalanffy D. (1962): Cell Renewal. *International Review of Cytology*. **13**: 357-366.
- Bhargava V., Goldstein C.D., Russell L., Xu L., Ahmed M., Li W., Casey A., Servage K., Kollipara R., Picciarelli Z., Kittler R., Yatsenko A., Carmell M., Orth K., Amatruda J.F., Yanowitz J.L., Buszczak M. (2020): GCNA Preserves Genome Integrity and Fertility Across Species. *Dev. Cell* **52**: 38-52.e10.
- Bioinformatics B., Muller P.Y., Miserez A.R., Dobbie Z. (2002): Short Technical Report Processing of Gene Expression Data Generated. *Gene Expr.* **32**: 1372–1379.
- Borgermann N., Ackermann L., Schwertman P., Hendriks I.A., Thijssen K., Liu J.C., Lans H., Nielsen M.L., Mailand N. (2019): SUMOylation promotes protective responses to DNA-protein crosslinks. *EMBO J.* **38**: 1–17.
- Carmell M.A., Dokshin G.A., Skaletsky H., Hu Y.C., Wolfswinkel J.C. van, Igarashi K.J., Bellott D.W., Nefedov M., Reddien P.W., Enders G.C., Uversky V.N., Mello C.C., Page D.C. (2016): A widely employed germ cell marker is an ancient disordered protein with reproductive functions in diverse eukaryotes. *Elife* **5**: 1–25.
- Chatterjee N., Walker G.C. (2017): Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* **58**: 235–263.
- Chylinski K., Rhun A. Le, Charpentier E. (2013): The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biol.* **10**: 726–737.
- Cleaver J.E., States J.C. (1997): The DNA damage-recognition problem in human and other eukaryotic cells: The XPA damage binding protein. *Biochem. J.* **328**: 1–12.
- Cornet C., Donato V. Di, Terriente J. (2018): Combining Zebrafish and CRISPR/Cas9: Toward a more efficient drug discovery pipeline. *Front. Pharmacol.* **9**: 703.
- Deng X.D., Gao Q., Zhang W., Zhang B., Ma Y., Zhang L.X., Muer C., Xie Y., Liu Y.

- (2017): The age-related expression decline of ERCC1 and XPF for forensic age estimation: A preliminary study. *J. Forensic Leg. Med.* **49**: 15–19.
- 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. *Mol. Cell* **64**: 593–606.
- Dokshin G.A., Davis G.M., Sawle A.D., Eldridge M.D., Nicholls P.K., Gourley T.E., Romer K.A., Molesworth L.W., Tatnell H.R., Ozturk A.R., Rooij D.G. de, Hannon G.J., Page D.C., Mello C.C., Carmell M.A. (2020): GCNA Interacts with Spartan and Topoisomerase II to Regulate Genome Stability. *Dev. Cell* **52**: 53-68.e6.
- Duxin J.P., Dewar J.M., Yardimci H., Walter J.C. (2014): Repair of a DNA-protein crosslink by replication-coupled proteolysis. *Cell* **159**: 346–357.
- Edifizi D., Schumacher B. (2015): Genome Instability in Development and Aging: Insights from Nucleotide Excision Repair in Humans, Mice, and Worms. *Biomolecules* **5**: 1855–1869.
- 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 (Amst)*. **71**: 198–204.
- Fleige S., Pfaffl M.W. (2006): RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* **27**: 126–139.
- González-Magaña A., Blanco F.J. biomolecules Human PCNA Structure, Function, and Interactions. doi:10.3390/biom10040570.
- Hoa N.N., Shimizu T., Zhou Z.W., Wang Z.Q., Deshpande R.A., Paull T.T., Akter S., Tsuda M., Furuta R., Tsusui K., Takeda S., Sasanuma H. (2016): Mre11 Is Essential for the Removal of Lethal Topoisomerase 2 Covalent Cleavage Complexes. *Mol. Cell* **64**: 580–592.
- Jozefczuk J., Adjaye J. (Elsevier Inc.: 2011). *Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression*. *Methods Enzymol.* **500**: .
- Kishi S., Slack B.E., Uchiyama J., Zhdanova I. V (2009): Zebrafish as a Genetic Model in Biological and Behavioral Gerontology: Where Development Meets Aging in Vertebrates-A Mini-Review. *Gerontology* **55**: 430–441.

- Kojima Y., Machida Y.J., Yuichi Machida C.J. (2020): DNA-protein crosslinks from environmental exposure: Mechanisms of formation and repair. doi:10.1002/em.22381.
- Kozera B., Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. doi:10.1007/s13353-013-0173-x.
- Larsen N.B., Gao A.O., Sparks J.L., Gallina I., Wu R.A., Mann M., Räschle M., Walter J.C., Duxin J.P. (2019): Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair by SPRTN and the Proteasome in *Xenopus* Egg Extracts. *Mol. Cell* **73**: 574-588.e7.
- Lessel D., Vaz B., Halder S., Lockhart P.J., Marinovic-Terzic I., Lopez-Mosqueda J., Philipp M., Sim J.C.H., Smith K.R., Oehler J., Cabrera E., Freire R., Pope K., Nahid A., Norris F., Leventer R.J., Delatycki M.B., Barbi G., Ameln S. Von, Högel J., Degoricija M., Fertig R., Burkhalter M.D., Hofmann K., Thiele H., Altmüller J., Nürnberg G., Nürnberg P., Bahlo M., Martin G.M., Aalfs C.M., Oshima J., Terzic J., Amor D.J., Dikic I., Ramadan K., Kubisch C. (2014): Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features. *Nat. Genet.* **46**: 1239–1244.
- Lončar J., Popović M., Krznar P., Zaja R., Smital T. (2016): The first characterization of multidrug and toxin extrusion (MATE/SLC47) proteins in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Rep.* **6**: 1–15.
- Ma X., Tang T.S., Guo C. (2020): Regulation of translesion DNA synthesis in mammalian cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **61**: 680–692.
- Mengstie M.A., Wondimu B.Z. (2021): Mechanism and Applications of CRISPR/ Cas-9-Mediated Genome Editing. doi:10.2147/BTT.S326422.
- Moriwaki S., Takahashi Y. (2008): Photoaging and DNA repair. *J. Dermatol. Sci.* **50**: 169–176.
- Nitiss J., Wang J.C. (1988). *DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: .
- Notch E.G., Mayer G.D. (2013): Impact of environmental estrogens on nucleotide excision repair gene expression in embryonic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **157**: 361–365.
- Pommier Y., Huang S. yin N., Gao R., Das B.B., Murai J., Marchand C. (2014): Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). *DNA Repair (Amst)*. **19**: 114–129.

- Pradhan S., Das P., Mattaparthi V.S.K. (2018): Characterizing the Binding Interactions between DNA-Binding Proteins, XPA and XPE: A Molecular Dynamics Approach. *ACS Omega* **3**: 15442–15454.
- Qiu S., Huang J. (2021): MRN complex is an essential effector of DNA damage repair. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **22**: 31–37.
- Ribezzo F., Shiloh Y., Schumacher B. Systemic DNA damage responses in aging and diseases The cellular DNA damage response (DDR).
doi:10.1016/j.semcancer.2015.12.005.
- Rodríguez A., Rodríguez M., Córdoba J.J., Andrade M.J. (2015): Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods Mol. Biol.* **1275**: 31–56.
- Ruggiano A., Ramadan K. (2021): DNA–protein crosslink proteases in genome stability. *Commun. Biol.* **4**: .
- Schärer O.D. (2013): Nucleotide excision repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**: .
- Schellenberg M.J., Lieberman J.A., Herrero-Ruiz A., Butler L.R., Williams J.G., Muñoz-Cabello A.M., Mueller G.A., London R.E., Cortés-Ledesma F., Williams R.S. (2017): ZATT (ZNF451)–mediated resolution of topoisomerase 2 DNA-protein cross-links. *Science (80-.)*. **357**: 1412–1416.
- Segundo-Val I.S., Sanz-Lozano C.S. (2016): Introduction to the gene expression analysis. *Methods Mol. Biol.* **1434**: 29–43.
- Shetlar M.D. (1980): Cross-Linking of Proteins to Nucleic Acids by Ultraviolet Light. *Photochem. Photobiol. Rev.* 105–197doi:10.1007/978-1-4684-3641-9_4.
- Skrypina N.A., Timofeeva A. V., Khaspekov G.L., Savochkina L.P., Beabealashvili R.S. (2003): Total RNA suitable for molecular biology analysis. *J. Biotechnol.* **105**: 1–9.
- Stingele J., Bellelli R., Alte F., Hewitt G., Sarek G., Maslen S.L., Tsutakawa S.E., Borg A., Kjær S., Tainer J.A., Skehel J.M., Groll M., Boulton S.J. (2016): Mechanism and Regulation of DNA-Protein Crosslink Repair by the DNA-Dependent Metalloprotease SPRTN. *Mol. Cell* **64**: 688–703.
- Sudhir Ambekar S. (2017): DNA: Damage and Repair Mechanisms in Humans. *Glob. J.*

Pharm. Pharm. Sci. **3**: .

Sun Y., Saha L.K., Saha S., Jo U., Pommier Y. (2020): Debulking of topoisomerase DNA-protein crosslinks (TOP-DPC) by the proteasome, non-proteasomal and non-proteolytic pathways. *DNA Repair (Amst)*. **94**: 102926.

Tan S.C., Yiap B.C. (2009): DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**: .

Teame T., Zhang Z., Ran C., Zhang H., Yang Y., Ding Q., Xie M., Gao C., Ye Y., Duan M., Zhou Z. (2019): The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Anim. Front.* **9**: 68–77.

Tretyakova N.Y., Groehler A., Ji S. (2015): DNA-Protein Cross-Links: Formation, Structural Identities, and Biological Outcomes. *Acc. Chem. Res.* **48**: 1631–1644.

Vaisman A., Woodgate R. (2017): Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology Translesion DNA polymerases in eukaryotes: what makes them tick?
doi:10.1080/10409238.2017.1291576.

Vaz B., Popovic M., Newman J.A., Fielden J., Aitkenhead H., Halder S., Singh A.N., Vendrell I., Fischer R., Torrecilla I., Drobnitzky N., Freire R., Amor D.J., Lockhart P.J., Kessler B.M., McKenna G.W., Gileadi O., Ramadan K. (2016): Metalloprotease SPRTN/DVC1 Orchestrates Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair. *Mol. Cell* **64**: 704–719.

Vaz B., Popovic M., Ramadan K. (2017): DNA–Protein Crosslink Proteolysis Repair. *Trends Biochem. Sci.* **42**: 483–495.

Walden H., Deans A.J. (2014): The fanconi anemia DNA repair pathway: Structural and functional insights into a complex disorder. *Annu. Rev. Biophys.* **43**: 257–278.

Wu J., Xiao J., Zhang Z., Wang X., Hu S., Yu J. (2014): Ribogenomics: The Science and Knowledge of RNA. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* **12**: 57–63.

Zakharenko A., Dyrkheeva N., Lavrik O. (2019): Dual DNA topoisomerase 1 and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibition for improved anticancer activity. *Med. Res. Rev.* **39**: 1427–1441.

Zaksauskaite R., Thomas R.C., Eeden F. Van, El-Khamisy S.F. (2021): Tdp1 protects from

topoisomerase 1-mediated chromosomal breaks in adult zebrafish but is dispensable during larval development. *Sci. Adv.* **7**: .

Zhang H., Xiong Y., Chen J. (2020): DNA-protein cross-link repair: What do we know now? *Cell Biosci.* **10**: 1–10.

Zhu Y., Shao X., Wang X., Liu L., Liang H. (2019): Sex disparities in cancer. *Cancer Lett.* **466**: 35–38.

How are competent bacterial cells transformed with a plasmid? (2022)

<https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-are-competent-bacterial-cells-transformed-with-a-plasmid/> (pristupljeno 06. 09. 2022.).

Čepin U. (2017) Understanding qPCR Efficiency and Why It Exceeds 100%.

<https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/> (pristupljeno 02. 09. 2022.).

8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 7. kolovoza 1998. godine u Čakovcu te cijeli život živim u Međimurju, a zadnjih pet godina živim i u Zagrebu. Osnovnu školu pohađao sam u osnovnoj školi Ivana Gorana Kovačića u Pleškovcu, a srednju školu završio sam u gimnaziji Josipa Slavenskog Čakovec gdje sam pohađao prirodoslovno-matematički smjer. Na temelju rezultata državne mature ostvario sam pravo na STEM stipendiju koju sam primao tijekom prve godine preddiplomskog studija. Preddiplomski studij molekularne biologije završio sam na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu sa završnim seminarom na temu „Kosti i hrskavica: histološka građa, ograničenja i regeneracija“ nakon čega sam na istom fakultetu upisao i diplomski studij molekularne biologije tijekom kojeg sam obavio i laboratorijsku stručnu praksu u Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka.