

Izrada "knock out" stanične linije za gen **GLI1** primjenom sustava **CRISPR/Cas9**

Rinčić, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:186210>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nikolina Rinčić

**Izrada „knock-out“ stanične linije za gen *GLI1* primjenom
sustava CRISPR/Cas9**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za nasljedni rak na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Maje Sabol. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (mag. biol. exp.).

Zahvala

Hvala mentorici, doc. dr. sc. Maji Sabol na ukazanom povjerenju, silnom strpljenju i razumijevanju te nesebičnom dijeljenju znanja tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se voditeljici laboratorija, profesorici Sonji Levanat na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za izradu diplomskog rada.

Zahvaljujem se i ostalim članovima Laboratorija za nasljedni rak koji su uvijek bili spremni priskočiti u pomoć kad god je trebalo.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci i ljubavi.

Hvala ti Damire što si moj vjetar u leđa koji me uvijek pogurao onda kada je to bilo najpotrebnije.

Osobito se zahvaljujem svojoj majci bez koje sve ovo ne bi bilo moguće.

Tata, hvala ti što si uvijek bio uz mene i upućivao me na pravi put.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

IZRADA „KNOCK-OUT“ STANIČNE LINIJE ZA GEN *GLII* PRIMJENOM SUSTAVA CRISPR/Cas9

Nikolina Rinčić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U okviru diplomskog rada napravljena je „knock-out“ stanična linija za gen *GLII* primjenom sustava CRISPR/Cas9. Takva „knock-out“ stanična linija koristiti će se kao model *in vitro* za daljnje analize i može doprinijeti boljem razumijevanju uloge signalnog puta Hedgehog-Gli (HH-GLI) u nastanku i progresiji tumora. Gen *GLII* je dio navedenog signalnog puta čija je poremećena aktivacija opisana u 30% tumora. *GLII* kao isključivi aktivator signalnog puta predstavlja značajnu metu za razvoj potencijalnih terapija, stoga su SKOV3 stanice bile podvrgnute ciljanoj modifikaciji gena *GLII* primjenom sustava CRISPR/Cas9. Početni postupak je uključivao dizajn sgRNA te njeno kloniranje u plazmidni vektor. SKOV3 stanice su naposljetku transfecirane plazmidnim vektorom, a zatim nasadene u pločice s 96 bunarića gustoće 1 stanice po bunariću, kako bi se u svakom bunariću uzgojila homogena linija nastala od pojedinačnih stanica. Odabranim linijama stanica izolirani su proteini i analizirani metodom Western Blot. Metodom Western Blot ispitana je proteinska ekspresija transkripcijskog faktora GLI1 te proteina PTCH koji predstavlja njegovu ciljnu molekulu. Primjenom sustava CRISPR/Cas9 uspješno je napravljena „knock-out“ stanična linija za gen *GLII*, što je potvrđeno izostankom proteinske ekspresije GLI1 i PTCH. Potencijal provedene inhibicije je doista velik, no njene posljedice na rast stanica, njihovu migraciju i odgovor na terapiju tek moraju biti ispitane.

(55 stranica, 23 slike, 7 tablica, 107 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Hedgehog-Gli, karcinom jajnika, kloniranje, SKOV3, transfekcija

Voditelj: Dr. sc. Maja Sabol

Suvoditelj: Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Rad prihvaćen: 21. 06. 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

CRISPR/Cas9-mediated generation of *GLI1* knock out cell line

Nikolina Rinčić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Within the graduate thesis a knock-out cell line was created for the *GLI1* gene using the CRISPR/Cas9 system. Such knock-out cell line will be used as an *in vitro* model for further analyses and can contribute to a better understanding of the role of Hedgehog-Gli (HH-Gli) signal pathway in tumor development and progression. Gen *GLI1* is part of the mentioned signal pathway whose disturbed activation is described in 30% of tumors. *GLI1* as a restricted activator of the signal pathway represents a significant target for the development of potential therapies, therefore SKOV3 cells were subjected to targeted modification of the *GLI1* gene using the CRISPR/Cas9 system. The initial procedure involved sgRNA design and its cloning into the plasmid vector. The SKOV3 cells were transfected with plasmid vectors and then planted in 96-well (1 cell per well) to produce a homogeneous line from each cell in each well. Proteins were isolated from selected cell lines and analyzed with Western Blot analysis. Western blot analysis investigated the protein expression of the transcription factor GLI1 and the PTCH protein that represents its target molecule. Using the CRISPR/Cas9 system, a knock-out *GLI1* cell line was successfully developed and confirmed by the absence of protein expression of GLI1 and PTCH. The potential of this inhibition is high, but its effects on cell growth, migration, and response to therapy need to be investigated.

(55 pages, 23 figures, 7 tables, 107 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Hedgehog-Gli, ovarian cancer, cloning, SKOV3, transfection

Supervisor: Maja Sabol, PhD

Cosupervisor: Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Reviewers: Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Tomislav Ivanković, Asst. Prof.

Thesis accepted: 21.06.2018

Sadržaj

POPIS KRATICA

1. UVOD.....	1
1.1 Signalni put Hedgehog-Gli (HH-GLI).....	1
1.1.1 Povijesni pregled.....	1
1.2 Kanonska aktivacija prijenosa signala.....	2
1.2.1 Transkripcijski faktori GLI.....	3
1.3 Nekanonska aktivacija prijenosa signala	5
1.4 Uloga signalnog puta HH-GLI u embrionalnom razvoju.....	7
1.5 Uloga signalnog puta HH-GLI u odraslom organizmu.....	8
1.6 Uloga signalnog puta HH-GLI u karcinogenezi.....	9
1.7 Sustav CRISPR/Cas9.....	12
1.7.1 CRISPR/Cas9 metodologija.....	13
1.7.2 Potencijal sustava CRISPR/Cas9 u terapiji.....	16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	19
3. MATERIJALI I METODE.....	20
3.1 Materijali.....	20
3.2 Metode.....	20
3.2.1 Dizajn molekula sgRNA.....	20
3.2.2 Kloniranje sgRNA u plazmidni vektor.....	22
3.2.3 Analiza bakterijskih kolonija lančanom reakcijom polimeraze.....	24
3.2.4 Izolacija plazmidne DNA iz bakterija.....	26
3.2.5 Sekvenciranje plazmidne DNA.....	28
3.2.6 Rad na staničnim kulturama.....	29
3.2.6.1 Odmrzavanje stanica.....	29
3.2.6.2 Presađivanje i održavanje stanica u kulturi.....	29
3.2.6.3 Transfekcija stanica.....	30
3.2.6.4 Propagacija klonova.....	31

3.2.6.5 Zamrzavanje stanica.....	32
3.2.7 Izdvajanje proteina iz stanica.....	33
3.2.8 Metoda „Western blot“.....	34
4. REZULTATI.....	38
4.1 Dizajn molekula sgRNA.....	38
4.2 Analiza sekvenci sgRNA u vektoru.....	39
4.3 Morfološki izgled transfeciranih stanica.....	41
4.4 Analiza ekspresije proteina.....	42
5. RASPRAVA.....	44
6. ZAKLJUČCI.....	47
7. LITERATURA.....	48
8. ŽIVOTOPIS.....	55

POPIS KRATICA

AAV	eng. Adeno-associated virus vectors, vektori povezani s adenovirusom
Akt	Akt kinaza
APS	amonijev persulfat
BCA	eng. Bicinchoninic acid
BCL-2	eng. B-cell lymphoma, protein limfoma B stanica
BSA	eng. Bovine Serum Albumin, albumin iz goveđeg seruma
B2M	beta-2 mikroglobulin
Cas9	CRISPR-associated protein 9
CDK1	eng. Cyclin dependant kinase 1, ciklin-ovisna kinaza 1
CD24	protein CD24
CK1	eng. Casein kinase 1, Kazein kinaza 1
CRISPR	Clustered regulary interspaced short palindromic repeat
crRNA	CRISPR-derived RNA
<i>DHH</i>	gen Desert Hedgehog
DISP	protein Dispatched
DMEM	eng. Dulbecco's Minimal Essential Medium, Dulbeccov minimalni esencijalni medij
DMSO	dimetil-sulfoksid
dNTP	deoksinukleotid-trifosfati
EBV	Epstein-Bar virus
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EGFR	eng. Epidermal growth factor receptor, receptor epidermalnog faktora rasta
EpCAM	eng. Epithelial cell adhesion molecule, molekula adhezije epitelnih stanica
FBS	eng. Fetal Bovine Serum, fetalni goveđi serum
FGF	eng. Fibroblast growth factor, fibroblastni faktor rasta
FokI	protein FokI
GLI	protein Gli
<i>GLI</i>	gen Gli
GSK3 β	eng. Glycogen synthase kinase 3 beta, Kinaza glikogen sintaze 3beta
hBax	eng. Human Bcl-2-associated X protein, ljudski X protein povezan s BCL-2

HDR	eng. Homology-directed repair, homologijom vođen popravak
HH	protein Hedgehog
<i>HH</i>	gen Hedgehog
HH-GLI	Hedgehog-Gli
HIF α 1	eng. Hypoxia-inducible factor 1-alpha, inducibilni faktor hipoksije 1 alfa
HIV	virus humane imunodeficijencije
HPV	humani papiloma virus
IGF	eng. Insulin-like growth factor, faktor rasta sličan inzulinu
<i>IHH</i>	gen Indian Hedgehog
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
Kap β 2	eng. Karyopherin β 2, karioferin β 2
MCL-1	eng. Myeloid cell leukemia 1, protein stanica mijeloične leukemije 1
MDR	eng. Multidrug resistance protein, protein rezistencije na višestruke lijekove
MEK	eng. Mitogen-activated protein kinase, mitogenom aktivirana protein kinaza
MHC	eng. Major histocompatibility complex, glavni sustav histokompatibilnosti
MYC	protein Myc
<i>NANOG</i>	gen Nanog
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHEJ	eng. Nonhomologous end-joining, nehomologno sparivanje krajeva
<i>NOTCH</i>	gen Notch
NRP	protein Neuropilin
PAM	protospacer adjacent motif
PBS	eng. Phosphate Buffer Saline, fosfatni pufer
PCR	eng. Polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom
PI3K	eng. Phosphatidylinositol 3-kinase, fosfatidilinozitol 3 kinaza
PKA	eng. Protein kinase A, protein kinaza A
PNK	polinukleotid kinaza
PTCH	protein Patched

<i>PTCH</i>	gen Patched
PTHrP	eng. Parathyroid hormone-related protein, protein srodan sa paratiroidnim hormonom
<i>p53</i>	gen p53
RAS	protein RAS
RAF	protein RAF
<i>REN</i>	gen Ren
SDS	natrijev dodecil sulfat
sgRNA	single guide RNA
<i>SHH</i>	gen Sonic Hedgehog
<i>SOX2</i>	gen Sox2
SMO	protein Smoothened
<i>SMO</i>	gen Smoothened
STAT	eng. Signal transducer and activator of transcription, prijenosnik signala i aktivator transkripcije
SUFU	protein Suppressor of Fused
<i>SUFU</i>	gen Suppressor of Fused
TALENs	eng. Transcription activator-like effector nucleases, efektorske nukleaze slične transkripcijskim aktivatorima
TEMED	tetrametiletilendiamin
TGFβ	eng. Transforming Growth Factor Beta, transformirajući faktor rasta beta
TNFα	eng. Tumor necrosis factor alpha, faktor tumorske nekroze alfa
TracRNA	transactivating RNA
VEGFA	eng. Vascular endothelial growth factor A, vaskularni endotelni faktor rasta A
WNT	protein Wnt
ZFN	eng. Zinc finger nucleases, nukleaze cinkovog prsta
βTrCP	eng. β-transducin-repeat containing protein, protein koji sadrži ponavljanje beta transducina

1. UVOD

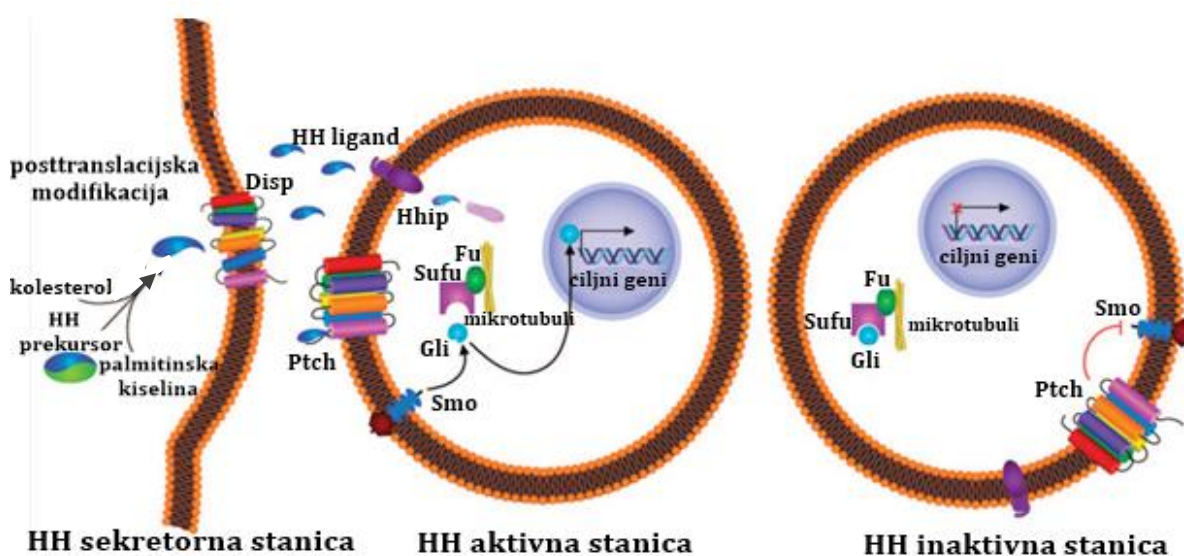
1.1 Signalni put Hedgehog-Gli (HH-GLI)

1.1.1 Povijesni pregled

Put od kutikule vinske mušice do razvoja potencijalnih terapija započeo je osamdesetih godina prošlog stoljeća istraživanjem Christiane Nüsslein-Volhard i Erica Wieschusa (Briscoe i Therond, 2005). U svom istraživanju proučavali su mutantne oblike ličinki vinske mušice *Drosophila melanogaster*. Genska mutacija koju su otkrili uzrokovala je razvojne deformacije u vidu segmentacije tijela ličinke. Mutantne ličinke imale su neobične "bodlje" na leđima koje su znanstvenike podsjetile na bodlje ježa, te je stoga gen dobio ime *Hedgehog* (hrv. jež) (Nüsslein-Volhard i Wieschus, 1980). Molekularna karakterizacija uslijedila je 12 godina kasnije te pokazala da se radi o sekrecijskom proteinu koji regulira rast susjednih stanica (Ingham i McMahon, 2001). Danas su poznata tri tkivno specifična homologa gena Hedgehog kod sisavaca, *Sonic Hedgehog (SHH)*, *Indian Hedgehog (IHH)* i *Desert Hedgehog (DHH)*. Ostale komponente signalnog puta HH-GLI, receptor *Patched (PTCH)*, koreceptor *Smoothed (SMO)* te transkripcijski faktori GLI, također su identificirani pomoću genetike vinske mušice te svoje nazive duguju fenotipskim karakteristikama mutantnih ličinki. Geni *PTCH* i *SMO* su dobili ime po izgledu krila mutantnih ličinki vinske mušice (*patched* hrv. zakrpan, *smoothed* hrv. zaglađen). Gen *GLI* predstavlja iznimku jer naziv duguje činjenici da je do 50 puta amplificiran u malignim gliomima (Kinzler i sur., 1987). Nedugo nakon toga otkriveni su geni *GLI2* i *GLI3* (Ruppert i sur., 1988) te njihova funkcija transkripcijskih faktora (Kinzler i sur., 1988). Pavletich i Pabo su 1993. godine riješili kristalnu strukturu proteina GLI te njihov način vezanja za molekulu DNA. Funkcija proteina koji sačinjavaju ovaj signalni put čvrsto je evolucijski sačuvana među različitim vrstama, no postoje određene razlike između sisavaca i beskralješnjaka (Murone i sur., 1999). Iako su istraživanja u sklopu razvojne biologije omogućila bolje razumijevanje ovog signalnog puta, još su mnoga pitanja ostala neodgovorena. Danas je poznata ključna uloga signalnog puta HH-GLI u pravilnom embrionalnom razvoju. Posljedice nenormalnog funkcioniranja HH-GLI mogu se vidjeti u obliku razvojnih poremećaja kao što je Gorlinov sindrom te novija istraživanja potvrđuju vezu HH-GLI s nastankom mnogih sporadičnih tumora (Briscoe i Therond, 2013).

1.2 Kanonska aktivacija prijenosa signala

Kanonska aktivacija signalnoga puta HH-GLI se temelji na vezanju liganda HH na receptor PTCH (Slika 1). Kod sisavaca postoje tri tkivno specifična homologa gena *HH*: *Sonic Hedgehog (SHH)*, *Indian Hedgehog (IHH)* i *Desert Hedgehog (DHH)* (Ingham i McMahon, 2001). Za biološku aktivnost liganda HH su važne posttranslacijske modifikacije u vidu vezanja kolesterola i palmitinske kiseline (Peters i sur., 2004). Osim što vezanjem za receptor PTCH mogu pokrenuti autokrinu aktivaciju HH-GLI, stvaranjem koncentracijskog gradijenta oko tkiva, izazivaju odgovore i okolnih stanica, što im daje karakteristike morfogena (Cross i Bury, 2004). Glavni regulator sekrecije HH je protein *Dispatched (DISP)* koji omogućava njegovo otpuštanje i djelovanje na okolne stanice (Burke i sur., 1999). Receptor PTCH predstavlja negativni regulator signalnog puta HH-GLI tako što u odsustvu liganda HH onemogućava prijenos signala inhibirajući koreceptor *Smoothened (SMO)* (Ingham, 1991). Kod sisavaca su opisana dva homologa proteina PTCH: PTCH1 i PTCH2 (Zaphiropoulos, 1999). Vezanjem liganda HH, prestaje inhibicija SMO od strane PTCH, omogućen je prijenos signala i aktivacija transkripcijskih faktora GLI te naposljetku dolazi do transkripcije ciljnih gena među kojima je i sam PTCH. (Marigo, 1996).

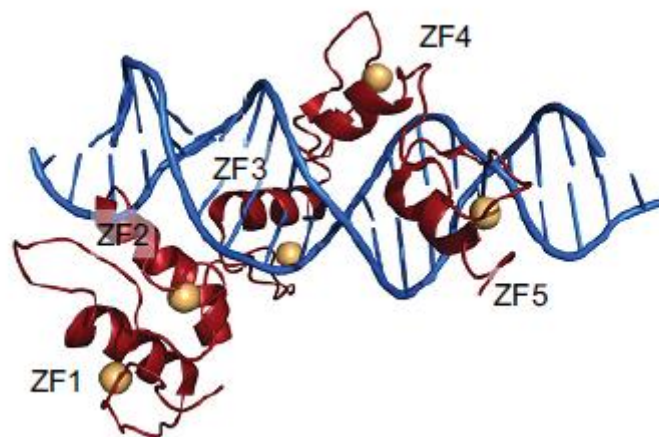


Slika 1. Prikaz signalnog puta HH-GLI kod sisavaca. Desni dio slike prikazuje inaktivan signalni put: u odsustvu liganda HH receptor PTCH inhibira koreceptor SMO čime se blokira prijenos signala. Proteini GLI su vezani za represor SUFU koji sprječava njihovu translokaciju u jezgru i obilježava ih za razgradnju u proteasomu. Cijepanjem proteina GLI u proteasomu nastaje represorski oblik koji blokira transkripciju ciljnih gena. Lijevi dio slike prikazuje kanonski prijenos signala koji se ostvaruje vezanjem liganda HH za receptor PTCH. Na taj način prestaje inhibicija koreceptora SMO i dolazi do prijenosa signala. Proteini GLI se otpuštaju od represora SUFU te nepocijepani translociraju u jezgru gdje potiču transkripciju ciljnih gena (preuzeto i prilagođeno prema Velcheti i Govindan, 2007).

Uz receptor PTCH, u primanju signala sudjeluje koreceptor Smoothened (SMO). SMO je za razliku od PTCH pozitivni regulator signalnog puta HH-GLI jer u odsustvu PTCH biva stalno aktivan te vrši transdukciju signala u stanicu (Murone i sur., 1999). Priroda interakcije PTCH i SMO predstavlja jedno od najvećih nerazjašnjenih pitanja vezanih za HH-GLI. Vezanje HH na PTCH dokida inhibiciju SMO te je omogućena njegova aktivacija. Smatra se da je za aktivaciju ključna njegova fosforilacija posredovana kinazama PKA i CK1, te transport sa unutarstaničnih vezikula na staničnu membranu (Jia i sur., 2004). Aktivirani SMO uzrokuje kaskadni prijenos signala koji je posredovan fosforilacijom molekula. U konačnici, fosforilacija proteina GLI omogućava ulazak u jezgu, njihovo vezanje za ciljne gene i transkripciju (Osterlund i Kogerman, 2006).

1.2.3 Transkripcijski faktori GLI

Obitelj gena *GLI* čine proteini s motivom cinkovog prsta (Slika 2) koji djeluju kao transkripcijski faktori vežući se za specifične, evolucijski konzervirane sekvence DNA (Ruppert, 1988). Kod sisavaca postoje tri gena, *GLI1*, *GLI2* i *GLI3*. Proteini *GLI1* i *GLI3* prepoznaju evolucijski očuvanu sekvencu 5'-GACCACCCA-3' u promotorskim regijama ciljnih gena, dok *GLI2* prepoznaje jako sličnu sekvencu 5'-GAACCACCCA-3'.



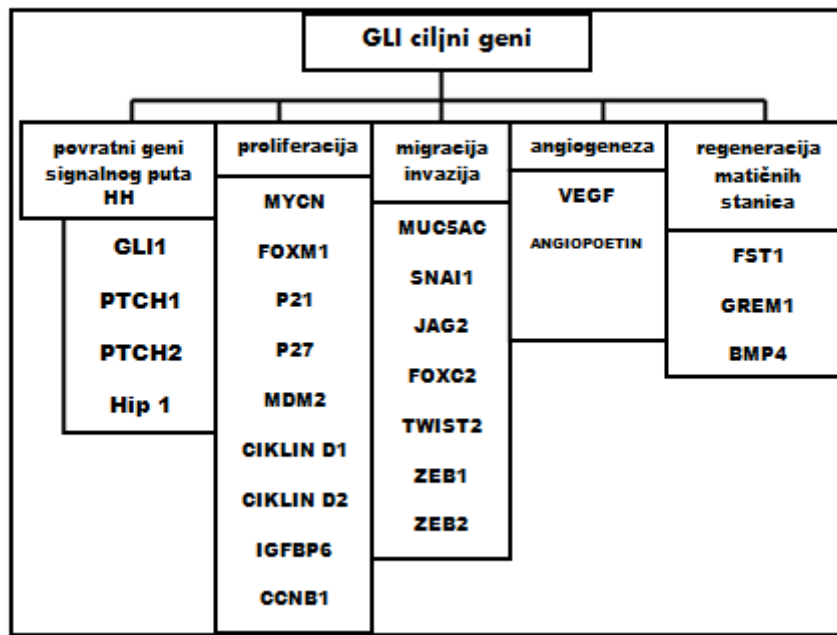
Slika 2. Shematski prikaz strukture proteina GLI vezanog za DNA. Regije cinkovog prsta (5) prikazane su u obliku crvenih zavojnica (žute kugle predstavljaju atome cinka) (preuzeto iz Mastrangelo, 2018).

Proteini GLI djeluju kao aktivatori ili represori ovisno o građi njihovih terminalnih domena. N-terminalna domena sadrži represijsku aktivnost, dok C-terminalna regija sadrži aktivacijsku domenu. Kod *GLI1* je N-terminalna domena jako skraćena čime je izgubio

represorsku aktivnost, te isključivo djeluje kao transkripcijski aktivator. GLI 2 i GLI3 mogu djelovati i kao aktivatori i kao represori (Dai i sur., 1999). Dvojna uloga GLI2 i GLI3 ovisi o staničnom kontekstu, te je primarno kontrolirana fosforilacijom. GLI 2 i GLI3 se primarno aktiviraju kao odgovor na signal, dok je transkripcija gena GLI1 posljedica njihove aktivacije (Sasaki i sur., 1999). Međuodnos ova tri proteina GLI i njihov utjecaj na stanice se često naziva u literaturi kôd GLI (Ruiz i Altaba, 2007). Proteini GLI imaju preklapajuće funkcije, stoga razvoj pojedinih GLI „knock-out“ modela predstavlja veliki potencijal za bolje razumijevanje funkcija pojedinog proteina.

Ključan regulator aktivnosti proteina GLI kod sisavaca je tumor supresor SUFU (eng. *Suppressor of Fused protein*). SUFU predstavlja negativni regulator signalnog puta HH-GLI tako što u odsustvu liganda HH, zadržava GLI u citoplazmi, upućuje na razgradnju u proteasomu te time onemogućava transkripciju ciljnih gena (Stone i sur., 1999). Proteini GLI se prvo fosforiliraju pomoću kinaza PKA, GSK3 β i/ili CK1, nakon čega ih prepoznaje ubikvitin ligaza β TrCP (eng. *β -transducin-repeat containing protein*) što dovodi do njihove degradacije i stvaranja represorske forme proteina GLI koja vežući se za DNA onemogućava transkripciju ciljnih gena (Pan i sur., 2006). Shi i suradnici su dokazali da SUFU vezanjem za GLI prekriva vezno mjesto za transportni protein, importin Kap β 2 te tako onemogućava njegov transport u jezgru (2014). Osim ovog načina regulacije, SUFU se može lokalizirati u jezgri, te direktno vezati za GLI vezna mjesta na DNA i inhibirati gensku transkripciju (Chen i sur., 2009). Vezanje liganda HH za receptor PTCH uzrokuje raspad kompleksa GLI-SUFU i nastanak aktivirane forme proteina GLI koji odlazi u jezgru i veže za promotorske regije ciljnih gena.

Glavni ciljni geni signalnog puta HH-GLI su *PTCH1*, *PTCH2* i *GLI1*, stoga razina njihovih mRNA i proteina predstavlja vjerodostojni indikator za praćenje aktivnosti signalnog puta (Dai i sur., 1999). Ostali geni čiju transkripciju kontroliraju (Slika 3) su članovi signalnog puta WNT, regulator apoptoze *BCL2*, *VEGFA*, regulatori staničnog ciklusa ciklin D, ciklin E, *MYC* te mnogi drugi (Zhang i sur., 2013).



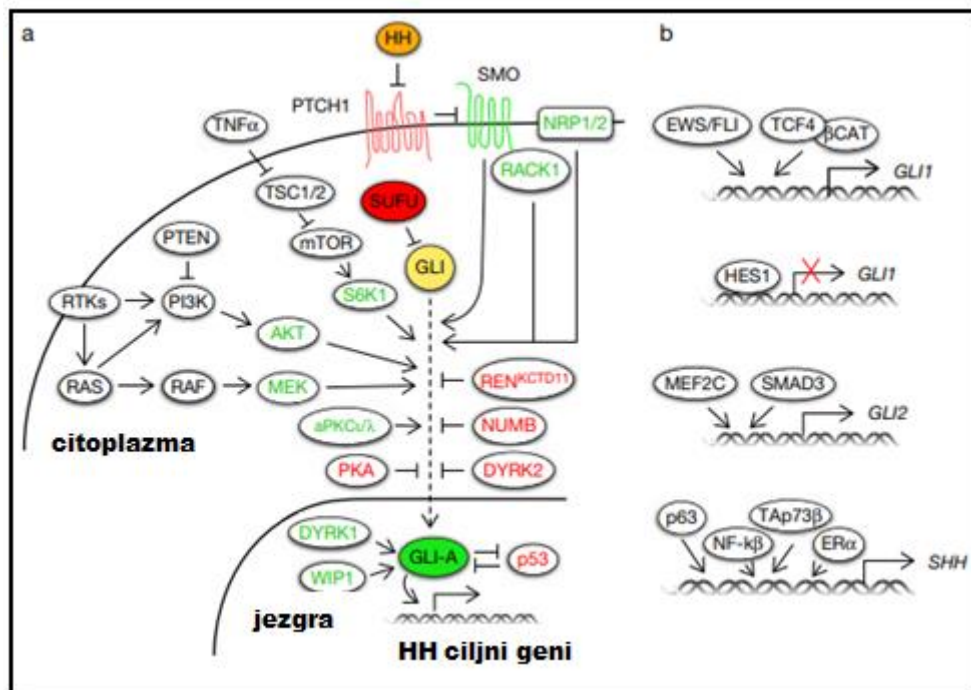
Slika 3. Ciljni geni signalnog puta HH-GLI (preuzeto i prilagođeno prema Zheng i sur., 2013).

1.3 Nekanonska aktivacija prijenosa signala

Za kanonsku klasičnu aktivaciju signalnog puta HH-GLI nužna je prisutnost liganda HH koji pokreće signalnu kaskadu i aktivira transkripcijske faktore GLI (Hanna i Sevde, 2016). Novija istraživanja otkrivaju važnost nekanonske kontrole signalnog puta koja odstupa od klasične aktivacije. Pod pojmom nekanonske aktivacije znanstvenici uključuju interakciju HH-GLI s ostalim signalnim putevima, utjecaj epigenetskih mehanizama te nenormalnu aktivaciju HH-GLI uzrokovanu mutacijama (Škoda i sur., 2017; Pandolfi i Stecca, 2015; Levanat, 2014). Nekanonska aktivacija HH-GLI povezuje se s pojavom razvojnih deformacija i malignom transformacijom stanica (Stecca i sur., 2010).

Mnoga istraživanja dokazuju važnost integracije HH-GLI s drugim signalnim putevima u modifikaciji proteina GLI (Slika 4). Otkrivena je interakcija između HH-GLI i signalnog puta PI3K/AKT. PI3K/AKT onemogućava degradaciju GLI2 u proteasomu interferirajući s fosforilacijom posredovanom kinazama PKA/GSK3 β (Riobo i sur., 2006). Signalni put PI3K/AKT2 inhibira funkciju GLI1 u neuroblastomima. AKT2 kinaza fosforilira kinazu GSK3 β , te na taj način onemogućava destabilizaciju SUFU, što rezultira smanjenom lokalizacijom GLI1 u jezgri i transkripcijom gena (Paul i sur., 2013). Međudnos HH-GLI i signalnog puta RAS/RAF/MEK opisan je u više primjera. K-Ras i N-Ras potiču aktivnost

GLI1, reguliraju njegovu ekspresiju u odsutnosti SMO (Nolan-Stevaux i sur., 2009) te potiču prelazak s autokrine na parakrinu signalizaciju HH-GLI u adenokarcinomu gušterače (Lauth i sur., 2010). Opisana je i interakcija sa signalnim putem EGFR u vidu aktivacije GLI1 i GLI2 (Schnidar i sur., 2009). Hilman i suradnici su opisali primjer mehanizma pozitivne povratne sprege između HH-GLI i obitelji gena *Neuropilin (NRP)*. Aktivirani HH-GLI inducira aktivnost NRP1 i NRP2 koji zauzvrat potiču jaču aktivaciju HH-GLI potencirajući transdukciju signala između SMO i SUFU (2011). Interakcija negativne prirode opisana je između GLI1 i p53 kod živčanih matičnih stanica. p53 smanjuje aktivnost i lokalizaciju GLI1 u jezgru, dok GLI1 potiče njegovu degradaciju aktivacijom ubikvitin ligaze E3 (Abe i sur., 2008).



Slika 4. A: Shematski prikaz signalnog puta HH-GLI te njegovih pozitivnih (zeleno) i negativnih (crveno) regulatora. B: Direktni transkripcijski regulatori proteina GLI1, GLI2 i SHH (preuzeto i prilagođeno prema Pandolfi i Stecca, 2015).

Osim interakcije s ostalim signalnim putevima, nekanonska aktivacija prema nekim tumačenjima podrazumijeva nenormalno funkcioniranje onkogene prirode, uzrokovano najčešće mutacijama. Raifenberg i suradnici su u svom istraživanju iz 2005. godine opisali aktivaciju HH-GLI neovisnu o ligandu. Konstitutivna aktivacija signalnog puta je uzrokovana pozitivnim mutacijama SMO ili negativnim mutacijama PTCH i/ili SUFU. Prvi takav slučaj je opisan kod pacijenta s mutacijom PTCH1 oboljelog od Gorlinovog sindroma (Johnson i

sur., 1996). Kod različitih vrsta karcinoma opisana je autokrini i parakrini signalizacija HH-GLI koja potiče proliferaciju i diferencijaciju tumorskih stanica (Škoda i sur., 2017).

1.4 Uloga signalnog puta HH-GLI u embrionalnom razvoju

Embriogeneza je složen, strogo kontroliran proces u kojem sudjeluje više signalnih puteva. Jedan od ključnih regulatora pravilnog razvoja je i signalni put HH-GLI. Proteini HH djeluju kao mitogeni i morfogeni u različitim fazama razvoja te potiču morfogenezu okolnih stanica. Nepravilno funkcioniranje bilo koje komponente HH-GLI izaziva teške posljedice u vidu nepravilnog razvoja, rezultirajući razvojnim deformacijama (Petrova i Joyner, 2014).

Tijekom embrionalnog razvoja SHH je izražen na stanicama neuralne cijevi, notokordu te pupoljicima ekstremiteta (Jia i Jiang, 2006). SHH je također eksprimiran na epitelno-mezenhimalnoj granici organa kao što su pluća, želudac, dlačni folikuli i zubi gdje potiče proliferaciju, preživljenje i diferencijaciju stanica (Ingham i McMahon, 2001). Signalna interakcija između epitela i mezenhima je nužna za pravilnu organogenezu. Smatra se da je epitel izvor liganada koji odlaze na okolne mezenhimalne stanice i aktiviraju HH-GLI. Nakon toga same mezenhimalne stanice, još uvijek nepoznatim signalnim putevima djeluju na epitelne stanice (Walterhouse i sur., 2003). Najpoznatiji fenotipski defekt povezan sa gubitkom funkcije SHH je ciklopija, tip holoprosencefalije s teškim razvojnim posljedicama (Zhang i sur., 2001). IHH i DHH su tkivno mnogo specifičniji za razliku od SHH koji je tkivno široko eksprimiran. IHH je ključan za pravilnu morfogenezu kostiju. Zajedno s proteinom srodnim s paratiroidnim hormonom (PTHrP eng. *Parathyroid hormone-related protein*) regulira ponašanje hondrocita (Jia i Jiang, 2006). DHH je nužan za pravilan razvoj Sertolijevih stanica testisa te spermatogenezu (Bitgood i McMahon, 1995). Gubitak funkcije SMO tijekom embriogeneze rezultira ranom letalnošću (Zhang i sur., 2001). Kod ljudi, mutacije u genu *PTCH* dovode do pojave Gorlinovog sindroma, dominantne autosomalne bolesti koju karakteriziraju razvojne deformacije kao što su holoprosencefalija, ciklopija, malformacija udova, rascijep nepca i usana, te sklonost razvoja velikog broja tumora (Briscoe i Therond, 2013). Gubitak funkcije bilo koje od komponenti ima teške posljedice u vidu embrionalnog razvoja, stoga HH-GLI predstavlja jedan od najvažnijih razvojnih signalnih puteva.

1.5 Uloga signalnog puta HH-GLI u odraslom organizmu

U odraslom organizmu signalni put HH-GLI je inaktivan ili slabo aktivan. Međutim, pravilno funkcioniranje HH-GLI nužno je za održavanje matičnih i progenitorskih stanica, regeneraciju tkiva, te naposljetku održavanje homeostaze (Petrova i Joyner, 2014).

S obzirom na važnost HH-GLI u embrionalnom razvoju središnjeg živčanog sustava, ne iznenađuje činjenica da je HH-GLI jedan od najvažnijih regulatora odrasle neurogeneze (Traiffort i sur., 2010). SHH je nužan za održavanje matičnih i progenitorskih stanica u subventrikularnoj zoni i lateralnim ventrikulima (Petrova i Joyner, 2014). Mutacije u genu SHH kod miševa uzrokuje nestanak progenitorskih stanica u zonama neurogeneze (Balordi i Fishell, 2007). U tkivima ektodermalnog podrijetla kao što je koža, HH-GLI eksprimiran na epidermalnim matičnim stanicama potiče sazrijevanje folikula dlake (Sato i sur., 1999). U koštanom tkivu HH održava strukturu kostiju, te sudjeluje u popravku i revaskularizaciji nakon ozljede (Fuchs i sur., 2012). Povišene razine transkripcije SHH i IHH zabilježene su nakon lomova kostiju (Ito i sur., 1999). HH-GLI igra važnu ulogu u regeneraciji mišića nakon ozljede promovirajući angiogenezu, te usmjeravanjem matičnih mišićnih stanica prema mjestu ozljede (Koleva i sur., 2005). Kao kod kostiju i mišića, HH-GLI igra ključnu ulogu u regeneraciji respiratornog i gastrointestinalnog sustava (Petrova i Joyner, 2014). HH-GLI signalizacija je važna u dojci tijekom trudnoće i laktacije (Lewis i sur., 1999), dok u maternici kontrolira proliferaciju mezenhima tijekom implantacije (Stewart i sur. 1997).

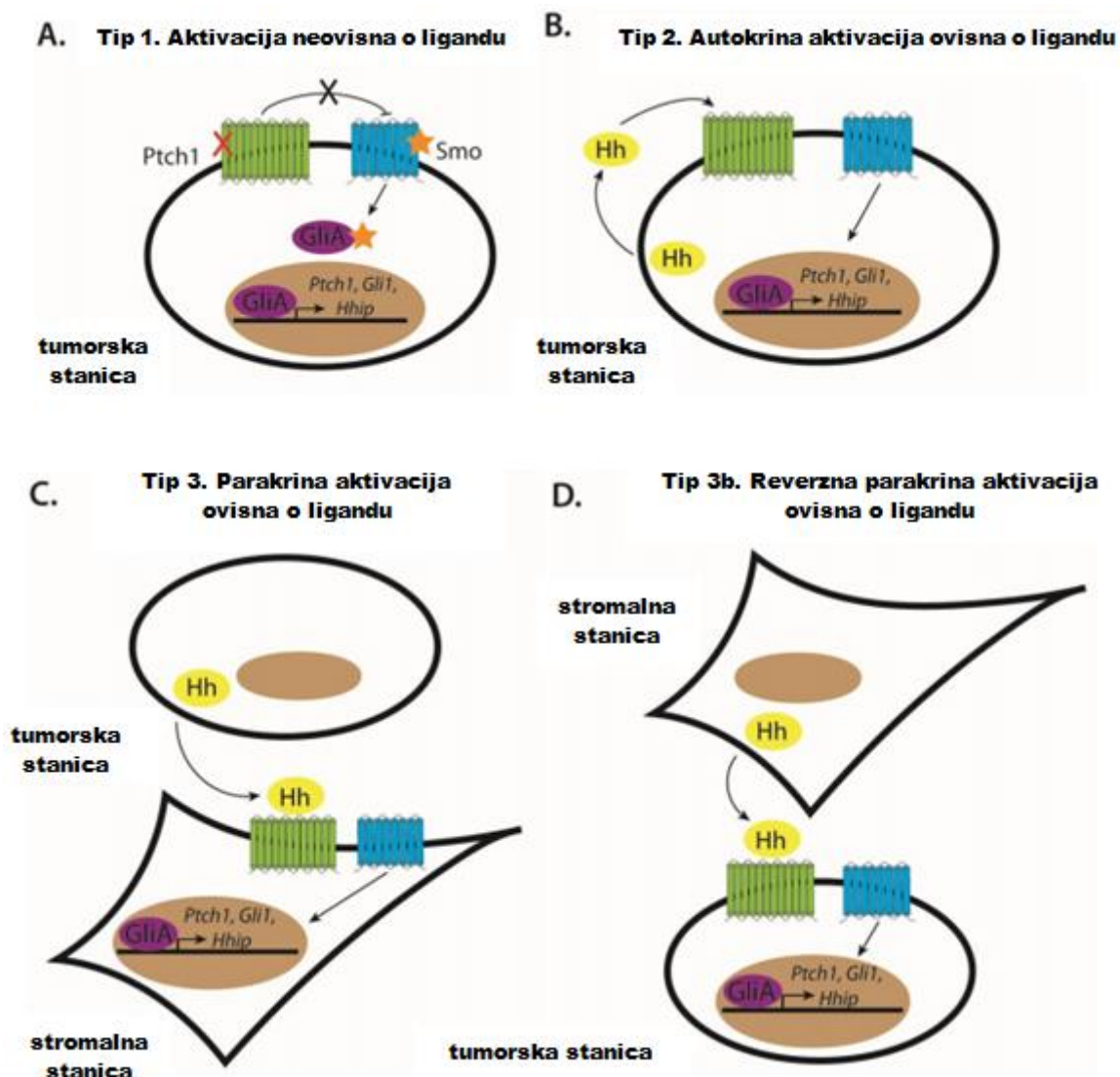
Bez obzira na brojna opažanja, glavni mehanizmi regulacije i održavanja populacije matičnih i progenitorskih stanica još uvijek nisu opisani. Iako je primarno aktivan tijekom embrionalnog razvoja, vidimo da HH-GLI sudjeluje u regulaciji jako važnih funkcija u odraslom organizmu, te je njegova uloga u održavanju homeostaze organizma neupitna.

1.6 Uloga signalnog puta HH-GLI u karcinogenezi

Normalan embrionalni razvoj uključuje aktivnost pojedinih signalnih puteva koji reguliraju proliferaciju, preživljavanje i diferencijaciju stanica, kao što su HH-GLI (Briscoe i Therond, 2013), WNT (Fodde i Brabletz, 2007), TGF- β (Derynck i sur., 2001), NOTCH (Rizzo i sur., 2008). Jednom kada se stanice maligno transformiraju, preuzimaju te koriste normalnu staničnu mašineriju za održavanje fizioloških funkcija u vidu tkivnog rasta, preživljenja, vaskularizacije i regeneracije. Signalni put HH-GLI tijekom embriogeneze regulira brojne aspekte stanične proliferacije koji su tumorskim stanicama nužni tijekom procesa karcinogeneze (Hanna i Shevde, 2016). Mnoga istraživanja su pokazala da HH-GLI podupire proces karcinogeneze na više načina.

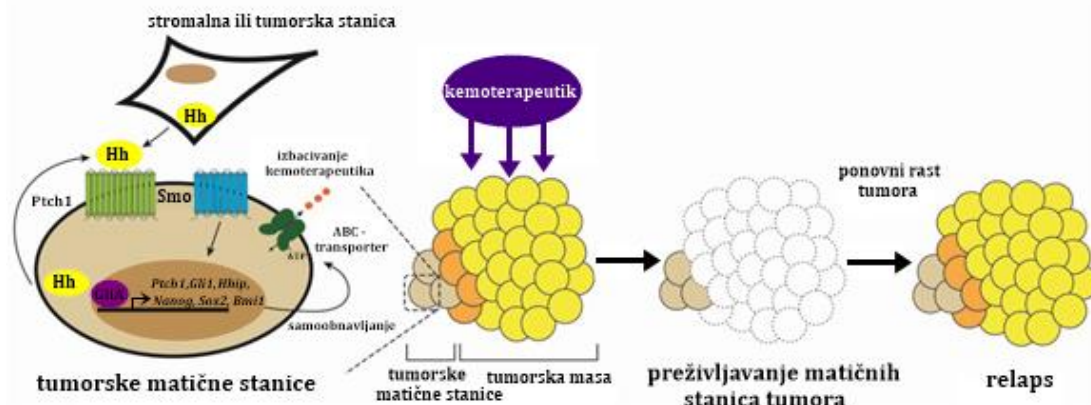
Prvi opisani mehanizam aktivacije HH-GLI u karcinomima je aktivacija neovisna o ligandu uzrokovana mutacijama u genima *PTCH1*, *SUFU* ili *REN* koje dovode do konstitutivne aktivacije SMO, ili amplifikacijom gena *GLI1* i *GLI2* koje uzrokuju konstitutivnu aktivaciju HH-GLI. Autokrini aktivacija ovisna o ligandu HH-GLI zabilježena je u karcinogenezi jajnika, debelog crijeva, kože, dojke, prostate, pluća i mnogih drugih organa. U ovakvom slučaju dolazi do povišene ekspresije liganda HH bez prisutnosti genetičkih aberacija. Stanica proizvodi i ponovo veže ligand HH te na taj način stvara pozitivnu povratnu petlju u vidu aktivacije HH-GLI (Cochrane i sur., 2015). Opisana je i parakrina aktivacija ovisna o ligandu koja predstavlja odraz mehanizma na kojem se temelji djelovanje HH-GLI tijekom embrionalnog razvoja. Tumorske stanice proizvode ligande HH koji aktiviraju stanice okolne tumorske strome. Mehanizam interakcije tumorskih stanica i strome nije u potpunosti razriješen, međutim poznate su posljedice ovakvog tipa aktivacije. Stanice strome na poticaj luče različite faktore rasta (VEGF, IGF) te aktiviraju druge signalne puteve (WNT, IL-6) čime stvaraju mikrokoliš pogodan za daljnji razvoj tumorskih stanica (Yauch i sur., 2008). Ovakav tip aktivacije se povezuje s karcinomom gušterače (Bailey i sur., 2009). Opisana je i reverzna parakrina aktivacija gdje stanice iz tumorskog mikrokoliša kao što su stromalne stanice koštane srži i endotelne stanice, luče ligande HH te tako potiču rast tumorskih stanica (Pandolfi i Stecca, 2015) (Slika 5). Smatra se da ovakav način aktivacije igra veliku ulogu u razvoju glioma (Becher i sur., 2008) i limfoma (Dierks i sur., 2007). Veliki značaj u abnormalnoj aktivaciji HH-GLI igraju i epigenetski mehanizmi u vidu hipermetilacije promotora gena *PTCH* u dermoidima i fibromima jajnika (Cretnik i sur., 2007).

Nedavna istraživanja pokazuju da HH-GLI ima veliku ulogu u održavanju tumorskih matičnih stanica (Pandolfi i Stecca, 2015) (Slika 6). U svakom tumoru postoji populacija matičnih stanica koje se sporo dijele, ali u potrebnim okolnostima imaju sposobnost brze proliferacije i stvaranja nove populacije tumorskih stanica (Nicolis i sur., 2007). Znanstvenici smatraju da su zbog svojstva spore diobe odgovorne za rezistenciju na konvencionalne terapije te relaps bolesti (Škoda i sur, 2017).



Slika 5. Tipovi aktivacije signalnog puta HH-GLI u tumorskim stanicama. A. Aktivacija neovisna o ligandu: mutacije u genima *PTCH*, *SUFU*, *REN* uzrokuju konstitutivnu aktivaciju SMO ili amplifikacija gena *GLI1* i *GLI2* konstitutivnu aktivnost HH-GLI. B. Autokrina aktivacija ovisna o ligandu: tumorska stanica pojačano eksprimira ligand HH te ga istovremeno i veže stvarajući pozitivnu petlju u održavanju aktivnost HH-GLI. C. Parakrina aktivacija ovisna o ligandu: tumorske stanice luče ligand HH kojeg vežu stanice okolne strome. Aktivirane stanice strome zauzvrat luče različite faktore rasta koji promoviraju progresiju tumorskih stanica. D. Reverzna parakrina aktivacija ovisna o ligandu: stanice okolne strome proizvode ligand HH kojeg vežu tumorske stanice (preuzeto i prilagođeno prema Cochrane i sur., 2015).

HH-GLI igra važnu ulogu u razvoju i diferencijaciji jajnika, stoga ne iznenađuje njegova povezanost s razvojem karcinoma jajnika. Neki znanstvenici smatraju da je nenormalna aktivacija HH-GLI u karcinomima jajnika stalna pojava, dok se drugi ipak ne slažu. Razlog kontradiktornih rezultata proizlazi vjerojatno iz interakcije HH-GLI s ostalim signalnim putevima. Yang i suradnici su pokazali da aktivacija HH-GLI nije stalna pojava u karcinomu jajnika zbog izostanka korelacije ekspresije SHH i ciljnih gena signalnog puta, što se može objasniti aktivacijom signalnog puta drugim mehanizmima (2009). Hiperaktivacija HH-GLI je važna za proliferaciju i održavanje klonskog rasta stanica primarnih karcinoma jajnika (Bhattacharya i sur., 2008). Ray i suradnici su pokazali utjecaj HH-GLI na formiranje sferoidnih stanica jajnika, koje pokazuju svojstva tumorskih matičnih stanica kao što su kemorezistencija, samoobnavljanje te diferencijacija (2011). HH-GLI u karcinomima jajnika potiče staničnu proliferaciju, dok inhibicija dovodi do supresije rasta i apoptoze tumorskih stanica. Zeng i suradnici su pokazali utjecaj HH-GLI na ekspresiju adhezijske molekule CD24 koja igra važnu ulogu u invaziji i migraciji tumorskih stanica jajnika (2017).



Slika 6. Uloga HH-GLI u održavanju tumorskih matičnih stanica. Tumorske stanice vežu ligand HH kojeg su proizvele stanice okolne strome, tumorske stanice ili same matične tumorske stanice. Aktivacijom HH-GLI regulira se ekspresija matičnih gena *NANOG*, *SOX2* i *BMI1* koji održavaju populaciju matičnih stanica. Tumorske matične stanice su kemorezistente zbog svojstva spore diobe te omogućavaju ponovno stvaranje populacije tumorskih stanica nakon terapije uzrokujući relaps bolesti (preuzeto i prilagođeno prema Cochrane i sur., 2015).

Vidljivo je da HH-GLI sudjeluje u različitim aspektima karcinogeneze, stoga ne čudi činjenica da je atraktivna meta za razvoj potencijalnih tumorskih terapija. Prvi otkriveni inhibitor signalnog puta HH-GLI je ciklopamin koji inhibirajući SMO onemogućava daljnji prijenos signala (Levanat i sur., 2008). Sve se veći naglasak stavlja na razvoj kombinirane

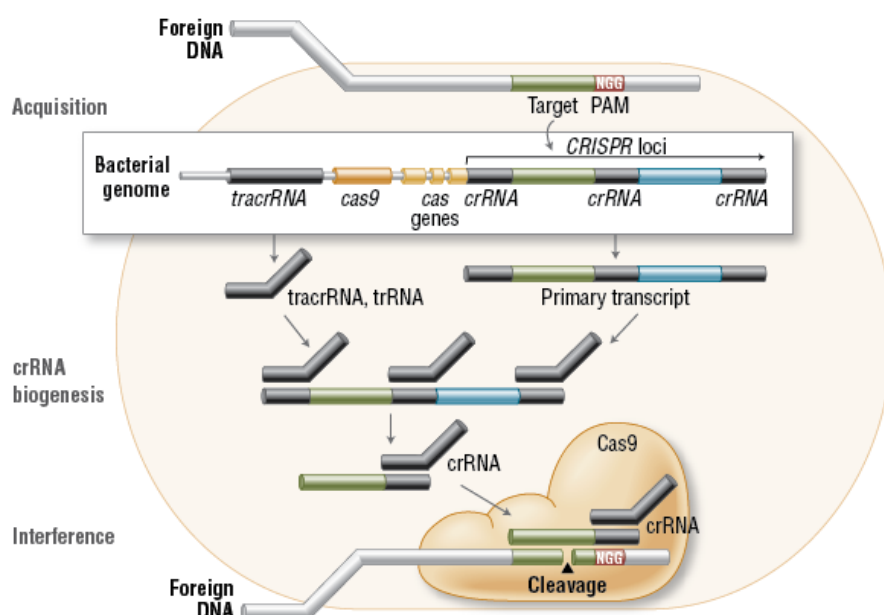
terapije zbog interakcije HH-GLI sa drugim signalnim putevima. Bolje razumijevanje HH-GLI i signalnih puteva s kojima je u interakciji pruža mogućnost razvoja efikasnijih terapija u vidu djelovanja na više ključnih komponenti kojima će se potencijalno zaustaviti progresiju tumorskih stanica.

1.9 Sustav CRISPR/Cas9

Uređivanje genoma je istraživački pristup korišten u studijama genomike, transgeničnih životinja i genske terapije, koji je doživio svoj procvat u zadnjem desetljeću (Zhang i sur., 2014). Znanstvenicima je oduvijek bio izazov otkriti funkciju gena u individualnom fenotipu, stoga su svi pristupi bili usmjereni na utišavanje ili prekomjernu ekspresiju istraživanog gena (Banga i Boyd, 1992). Tehnike uređivanja genoma temelje se na programiranim i visokospecifičnim nukleazama koje mogu uzrokovati specifične promjene u genomu organizma pomoću DNA- specifične vezne domene i DNA-nespecifične cijepajuće domene (Zhang i sur., 2014). Ključni korak u tehnikama uređivanja genoma je uzrokovanje dvolančanog loma unutar genskog lokusa od interesa (Carroll, 2011). Dvolančani lomovi inducirani nukleazama izazivaju popravak mehanizmom nehomolognog sparivanja krajeva (NHEJ eng. *Nonhomologous end-joining*) ili popravka vođenog homologijom (HDR eng. *Homology-directed repair*). Popravak posredovan mehanizmom NHEJ može izazvati insercije ili delecije što dovodi do pomaka okvira čitanja kodirajuće sekvence. Mehanizmom HDR možemo izazivati specifične točkaste mutacije rekombinacijom sekvence ciljnog lokusa i donorskog kalupa DNA. Danas je poznato više metoda koje koriste specifične nukleaze za postizanje ciljanih dvostrukih lančanih lomova. Među najpoznatijima su nukleaze cinkovog prsta (ZFN eng. *Zinc finger nucleases*) te efektorske nukleaze slične transkripcijskim aktivatorima (TALENs eng. *Transcription activator-like effector nucleases*), no najveću pažnju u zadnjem desetljeću plijene nukleaze Cas9 (*CRISPR-associated protein 9 nuclease*). Nukleaze Cas9 predstavljaju najnoviji trend u uređivanju genoma jer omogućavaju jednostavno i brzo djelovanje prevladavajući neke od glavnih problema prije korištenih nukleaza. U sljedećem će se ulomku stoga posebna pažnja posvetiti ovoj revolucionarnoj metodi, njezinim mogućnostima, potencijalnim nedostacima te budućim perspektivama (Sander i Joung, 2014).

1.9.1 Metodologija CRISPR/Cas9

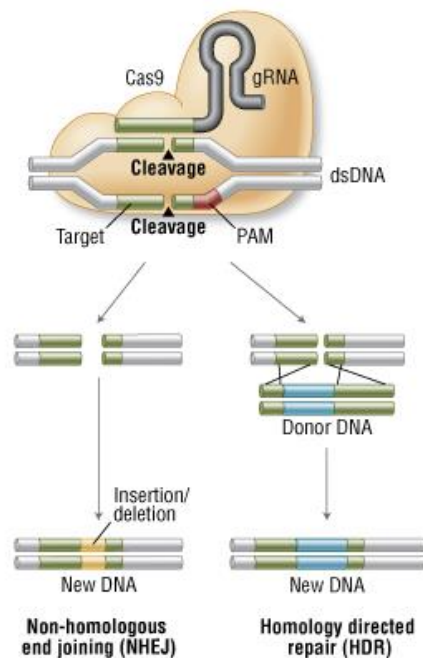
Uređivanje genoma metodom CRISPR/Cas9 temelji se na otkriću adaptivnog mehanizma imunološkog sustava bakterija koji omogućava eliminaciju stranog genetičkog materijala (Barangou i sur., 2007). Bakterije reagiraju na invaziju patogena tako što integriraju kratke fragmente strane nukleinske kiseline u vlastiti genom, u posebnu regiju repetitivnih uzoraka zvanu CRISPR (eng. *Clustered regular interspaced short palindromic repeat*) (Wiedenheft i sur., 2012). Sustav CRISPR/Cas je zabilježen u 40% genoma bakterija te 90% genoma arheja (Grissa i sur., 2007).



Slika 7. Endogeni mehanizam CRISPR/Cas9 u bakterijama. Strana DNA se ugrađuje u bakterijski genom unutar CRISPR lokusa. CRISPR lokus se transkribira i procesira u crRNA, tracrRNA i protein Cas9. Protein Cas9 tvori kompleks sa crRNA i tracrRNA te cijepa komplementarnu stranu DNA vezanu za sekvencu PAM (slika preuzeta s www.neb.com).

Lokus CRISPR se sastoji od gena povezanih s CRISPR (Cas eng. *CRISPR-associated genes*) i konzerviranih ponavljajućih serija sekvenci (direktna ponavljanja) između kojih se nalaze neponavljajuće varijabilne sekvence (*spacers*) s podudarajućim sekvencama stranog genetičkog materijala (*protospacers*) (Hsu i sur., 2014). Transkripcijom regije CRISPR nastaje kratka molekula crRNA (*CRISPR-derived RNA*) koja sadrži sekvencu komplementarnu sekvenci nukleinske kiseline prethodnog patogena koji je pokušao napasti bakteriju. crRNA usmjerava protein Cas u pronalaženju komplementarne ciljne sekvence invadirajućeg patogena i omogućava njeno cijepanje (Slika 7) (Wiedenheft i sur., 2012).

Iz toga proizlazi da se na poticaj različitih patogena, regije *spacers* koriste kao transkripcijski kalupi za specifične crRNA (Zhang i sur., 2014). Više od 40 različitih proteina Cas je do sada opisano (Haft i sur., 2005). Proteini Cas igraju važnu ulogu u biogenezi crRNA, ugradnji varijabilnih regija i degradaciji strane DNA. Na temelju sekvenci i strukture proteina Cas, sustav CRISPR/Cas se dijeli u tri osnovna tipa (Makarova i sur., 2011). Najjednostavniji je drugi tip CRISPR/Cas9 koji se temelji na aktivnosti proteina Cas9 (Slika 8). Protein Cas9 se sastoji od nukleazne domene HNH i nukleazne domene slične RuvC, te sudjeluje u pronalasku strane DNA vođen molekulom RNA i cijepanju iste (Jinek i sur., 2012). Zbog sudjelovanja u oba aspekta mehanizma, CRISPR/Cas9 se smatra najjednostavnijim za primjenu. Upravo je zbog pogodnih karakteristika sustav CRISPR/Cas9 bakterije *Streptococcus pyogenes* modificiran za primjenu u uređivanju genoma.



Slika 8. Sustav CRISPR/Cas9. sgRNA komplementarna ciljnoj sekvenci stvara kompleks sa nukleazom Cas9. Vežanje za ciljnu sekvencu je omogućeno prepoznavanjem sekvence PAM koja je vezana za sekvencu od interesa. Prepoznavanjem sekvence PAM, Cas9 uzrokuje dvostruke lomove u ciljnoj sekvenci koji aktiviraju stanične mehanizme popravka DNA (slika preuzeta s www.neb.com).

Uređivanje genoma sustavom CRISPR/Cas9 se temelji na izazivanju dvostrukih lančanih lomova i pokretanju staničnih mehanizama popravka DNA. Značajno je i to da postoje nikazne (eng. *nickase*) varijante proteina Cas9 koje uzrokuju jednolančane lomove ciljne sekvence. Takvi proteini Cas9 imaju mutaciju u jednoj od nukleaznih domena, NHN ili RuvC (Haft i sur., 2005).

U endogenom sustavu CRISPR/Cas9, zrela se molekula crRNA udružuje sa transaktivirajućom crRNA (tracrRNA eng. *Transactivating* RNA) kako bi formirale kompleks koji vodi protein Cas9 do ciljne sekvence. TracrRNA je djelomično komplementarna crRNA te sudjeluje u njezinom sazrijevanju. Na ciljnoj molekuli, protein Cas9 zahtjeva prepoznavanje sekvence komplementare crRNA i kratku sekvencu od tri nukleotida 5'-NGG, PAM (*Protospacer adjacent motif*) (Zhang i sur., 2014). Sekvence PAM okružuju sekvence strane nukleinske kiseline koja je inkorporirana u regiju CRISPR genoma bakterije. Ciljna sekvenca mora direktno biti vezana za PAM regiju te taj događaj služi kao dokaz za pronalazak ciljne sekvence. Istraživanja su pokazala da protein Cas9 ne reagira na potpuno komplementarnu sekvencu crRNA ukoliko ne postoji susjedna sekvenca PAM (Sternberg i sur., 2014). Interakcija sekvence PAM i proteina Cas9 je bitna za njegovu katalitičku aktivnost (Knight i sur., 2015). Nakon prepoznavanja sekvence PAM, kompleks Cas9/RNA destabilizira dupleks DNA i izaziva dvolančane lomove pomoću nukleaznih domena HNH i RuvC proteina Cas9 (Shvets i sur., 2017). Uslijed dvolančanih lomova pokreću se stanični mehanizmi popravka DNA, NHEJ te zahtjevniji HDR. NHEJ može rezultirati delecijama i insercijama u ciljnoj sekvenci te tako narušiti ili ukiniti funkciju gena ili genomskih elemenata (Zhang i sur., 2014).

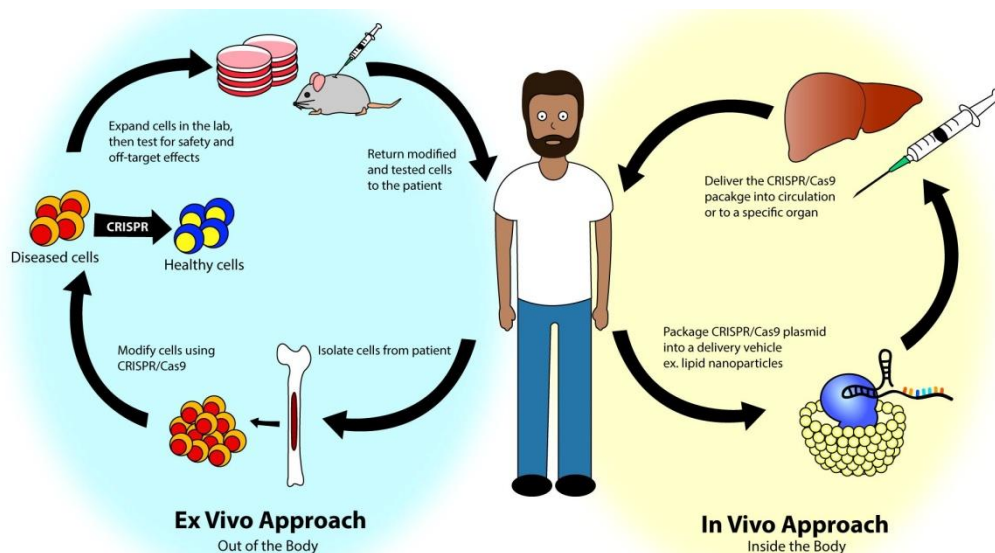
U odnosu na meganukleaze ZFNs i TALENs koje se temelje na fuzijskim proteinima koji sadrže DNA-veznu domenu i nespecifičnu nukleaznu domenu restriksijskog enzima FokI, CRISPR/Cas9 se temelji na mehanizmu koji omogućava jednostavnu i jeftinu modifikaciju ovisno o svrsi istraživanja. Metoda uređivanja genoma primjenom sustava CRISPR/Cas9 temelji se na fuzijskoj formi kompleksa crRNA-tracrRNA u obliku kimerične sgRNA (eng. *Single guide* RNA) (Jinek i sur., 2012). sgRNA sadrži sekvencu od 20 nukleotida komplementarnu sekvenci od interesa. Mehanizam usmjeravanja proteina Cas9 i prepoznavanja ciljne sekvence je jednak endogenom mehanizmu bakterije. Sinteza sgRNA je jeftina i jednostavna, stoga CRISPR/Cas9 omogućava znanstvenicima dizajniranje različitih sgRNA komplementarnih ciljnim sekvencama te simultano djelovanje na više gena odjednom. Izazivanjem specifičnih mutacija u ciljanim genima, možemo dobiti mnogo informacija o funkciji tih gena i njihovoj ulozi u razvoju različitih patoloških stanja. Sustav CRISPR/Cas9 se primjenjuje već na velikom broju modelnih organizama kao što su glodavci, ribe, oblici te vinska mušica (Zhang i sur., 2014). Veliki potencijal pokazuje u izazivanju željenih genetičkih modifikacija kod biljaka u vidu stvaranja vrijednijeg fenotipa i rezistencije na bolesti (Xie i Yang, 2013). Zbog lake modifikacije, CRISPR/Cas9 pokazuje

primjenu u regulaciji transkripcije željenih gena (Cheng i sur., 2013), genotipizaciji visokosrodnih bakerijskih sojeva (Richter i sur., 2013), genskoj terapiji i mnogo drugih tipova istraživanja. Osobito veliki potencijal predstavlja u razvoju genske terapije u vidu ometanja funkcije gena uključenog u nastanak bolesti, ispravljanja mutacije koja uzrokuje bolest ili insercije zaštitnog gena.

Usprkos velikom potencijalu sustava CRISPR/Cas9, postoje i važni nedostaci o kojima se mora raspravljati. Najveći problemi sustava CRISPR/Cas9 je visoki rizik za nastanak neželjenih mutacija, te transport CRISPR/Cas9 do ciljnih tkiva i stanica u organizmu. Veliki genomi često sadrže višestruke sekvence DNA homologne ciljnim sekvencama, zbog čega može doći do neželjenih mutacija koje mogu dovesti do stanične smrti ili transformacije (Zhang i sur., 2014). Xiao i suradnici su nedavno razvili jednostavni alat za pretraživanje mogućih neželjenih mutacija u cijelom genomu (Xiao i sur., 2014). Što se tiče transporta CRISPR/Cas9 u organizam, njegova uspješnost ovisi o tipu ciljnog tkiva odnosno stanica, no svakako bi se trebalo posvetiti razvoju boljih metoda od plazmidnih injekcija ili injekcija koje sadrže komponente CRISPR (Zhang i sur., 2014). U svakom slučaju, CRISPR/Cas9 otvara mnoga vrata u shvaćanju funkcije gena i djelovanju na genske defekte. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se stopa neželjenih mutacija smanjila i omogućila potencijalna sigurnija primjena. U sljedećem potpoglavlju ćemo spomenuti jedan aspekt u kojem CRISPR/Cas9 ima nevjerojatan potencijal, primjena u razvoju antitumorske terapije.

1.9.2 Potencijal sustava CRISPR/Cas9 u terapiji

Otkriće sustava CRISPR/Cas9 te njegov potencijal u uređivanju genoma u potpunosti je revolucionirao područje genske terapije. CRISPR/Cas9 pokazuje veliku potencijalnu primjenu u liječenju malignih oboljenja u vidu modulacije genske ekspresije te razvoja antitumorske terapije (Slika 9). Osim direktnog utjecaja na tumorske stanice, CRISPR/Cas9 djelujući na imunološke stanice i onkolitičke viruse indirektno može djelovati na suzbijanje rasta tumora (Yi i Li, 2016). U prošlom potpoglavlju smo vidjeli da sustav CRISPR/Cas9 može uzrokovati precizne mutacije koje za posljedice imaju gubitak ili povratak funkcije gena. CRISPR/Cas9 ima veliki potencijal za stvaranje aberacija u genima koji sudjeluju u razvoju karcinoma i ciljano utišavanje gena nužnih za preživljenje tumorskih stanica. Onkogeni i tumor supresor geni su česte mete prilikom razvoja antitumorskih terapija (Hanahan i Weinberg, 2011).



Slika 9. Primjeri primjene sustava CRISPR/Cas9 u liječenju karcinoma. Pristup *ex vivo* uključuje izolaciju stanica iz pacijenta, njihovu modifikaciju i održavanje u kulturi, te provjeru potencijalnih neželjenih mutacija na pokusnim životinjama prije vraćanja pacijentu (lijevo). Pristup *in vivo* uključuje unos vezikula koje sadrže plazmid s komponentama CRISPR/Cas9 u cirkulaciju ili specifični organ (desno) (slika preuzeta s www.sitn.hms.harvard.edu).

U jednoj studiji baziranoj na primjeni sustava CRISPR/Cas9 u karcinomu mokraćnog mjehura, uspješno su aktivirani tumor supresor geni *p53*, *E-kaderin* i *hBax* čime je znatno smanjena proliferacija i migracija tumorskih stanica (Liu i sur., 2014). Kelly i suradnici su u ljudskim stanicama Burkittovog limfoma utišali anti-apoptotički gen *MCL-1* i tako potakli apoptozu tumorskih stanica (Kelly i sur., 2014). Nedavna istraživanja dokazuju važnost gena *CDK11* u razvoju ciljane terapije karcinoma. Feng i suradnici su koristeći sustav CRISPR/Cas9 utišali navedeni gen u osteosarkomu. Delecija gena koji je inače iznimno važan za proliferaciju tumorskih stanica, uzrokovala je znatno smanjenje proliferacije i invazije (Feng i sur., 2015). Utišavanje gena *MDR1* koristeći sustav CRISPR/Cas9 poništilo je kemorezistenciju stanica osteosarkoma (Liu i sur., 2016). Razvoj mnogih malignih oboljenja je povezan s pojavom infekcija onkogenim virusima kao što su humani papiloma virus (HPV), Epstein-Barr virus (EBV) te virusi hepatitisa B i C (De Martel i sur., 2012). S obzirom da se sustav CRISPR/Cas9 temelji na imunološkom mehanizmu bakterija, ima veliki potencijal za suzbijanje i uklanjanje virusnih infekcija. Korištenjem virusnih specifičnih kompleksa Cas9/sgRNA, mogu se uzrokovati mutacije u virusnom genomu te smanjiti utjecaj virusnih onkogeno (Yi i Li, 2016). Ebina i suradnici su primjenom sustava CRISPR/Cas9 omeli funkciju promotora genoma HIV-1, što je u konačnici dovelo do znatno niže ekspresije

HIV-1 u zaraženim ljudskim stanicama (Ebina i sur., 2013). Fuzioniranjem proteina Cas9 za različite epigenetske regulatore, sustav CRISPR/Cas9 dobiva primjenu i u regulaciji epigenetskih mehanizama. Vezanje proteina Cas9 za domenu DNA metiltransferaze 3A stvara fuzijski protein koji uzrokuje ciljanu metilaciju (Vojta i sur., 2016). Na taj način se mogu metilirati promotori visokoeksprimiranih onkogeni kao što je *EpCAM* u karcinomu ovarijske (Nunna i sur., 2014). CRISPR/Cas9 se koristi za modifikaciju imunoloških stanica. Meissner i suradnici su utišali gen *B2M* u pomoćničkim CD4⁺ limfocitima što je rezultiralo smanjenom ekspresijom MHC-1. Ovakvom modifikacijom se mogu proizvoditi univerzalne T stanice koje se mogu primijeniti na različite vrste tumora bez obzira na genotip ljudskih leukocita (Meissner i sur., 2014). Kao što je već spomenuto, unatoč velikom potencijalu, nedostaci postoje. Veliki je rizik na nastanak neželjenih mutacija, stoga se takvi događaji moraju otkriti kako bi se kontrolirali i izbjegli u budućnosti. Spomenuli smo i problem transporta do ciljnog tkiva odnosno stanica. Najefikasniji transporter CRISPR/Cas9 komponenti su vektori vezani za adenoviruse (AAVs eng. *Adeno-associated virus vectors*) (Chen i Goncalves, 2016). Problem je isto smanjena stopa HDR popravka u odnosu na mehanizam NHEJ. Često je za popravak mutacija poželjan mehanizam HDR (Wang i sur., 2013). Nedavno istraživanje je pokazalo da upotreba sparenih nikaza Cas9 povećava stopu popravka oštećenja DNA mehanizmom HDR (Osborn i sur., 2014). Istraživanja su pokazala da mutacije u genima *p53* i *p21* uzrokuju rezistenciju tumorskih stanica na primjenu radioterapije (Lee i Bernstein, 1993). Upotrebom sustava CRISPR/Cas9 takve mutacije bi se mogle popraviti te potaknuti ponovna osjetljivost stanica na radioterapiju.

CRISPR/Cas9 doista pruža mogućnosti koje su se prije dva desetljeća činile nemogućima. Jednostavna modifikacija sustava predstavlja veliki potencijal u različitim pristupima razvoja antitumorske terapije. Potrebno je mnogo istraživanja i ispitivanja na modelnim organizmima. U ovom diplomskom radu prikazat će se primjena CRISPR/Cas9 sustava za izradu „knock-out“ staničnog modela koji će se koristiti za istraživanje uloge signalnog puta HH-GLI u karcinomima jajnika.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Gen *GLII* kao isključivi aktivator signalnog puta, predstavlja jednu od ključnih transkripcijskih meta signalnog puta HH-GLI, stoga je njegova ekspresija odličan marker za prećenje aktivnosti signalnog puta. *GLII* je ujedno i ciljna meta mnogih drugih signalnih puteva koji su interakciji s HH-GLI te uzrokuju njegovu nekonvencionalnu, nekanonsku aktivaciju. Ometanje funkcije takvog gena primjenom sustava CRISPR/Cas9 koji omogućava precizno uređivanje genoma, potencijalno bi moglo smanjiti aktivnost signalnog puta, a naposljetku uzrokovati pad proliferacije i rasta tumorskih stanica.

Na temelju dosadašnjih provedenih istraživanja, glavni cilj ovog rada bio je:

1. Dizajn visokospecifične sgRNA koja će mutacijom poremetiti funkciju gena *GLII* primjenom sustava CRISPR/Cas9
2. Kloniranje sgRNA u plazmidni vektor i validacija vektora sekvenciranjem
3. Transfekcija stanica SKOV3 plazmidnim vektorom koji kodira za protein Cas9 i sgRNA
4. Uspostava klonskih linija transfeciranih stanica iz pojedinačnih stanica SKOV3
5. Dokaz gubitka funkcije gena *GLII* provjerom njegove proteinske ekspresije
6. Potvrda gubitka funkcije gena *GLII* provjerom proteinske ekspresije njegove transkripcijske mete, gena *PTCHI*

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

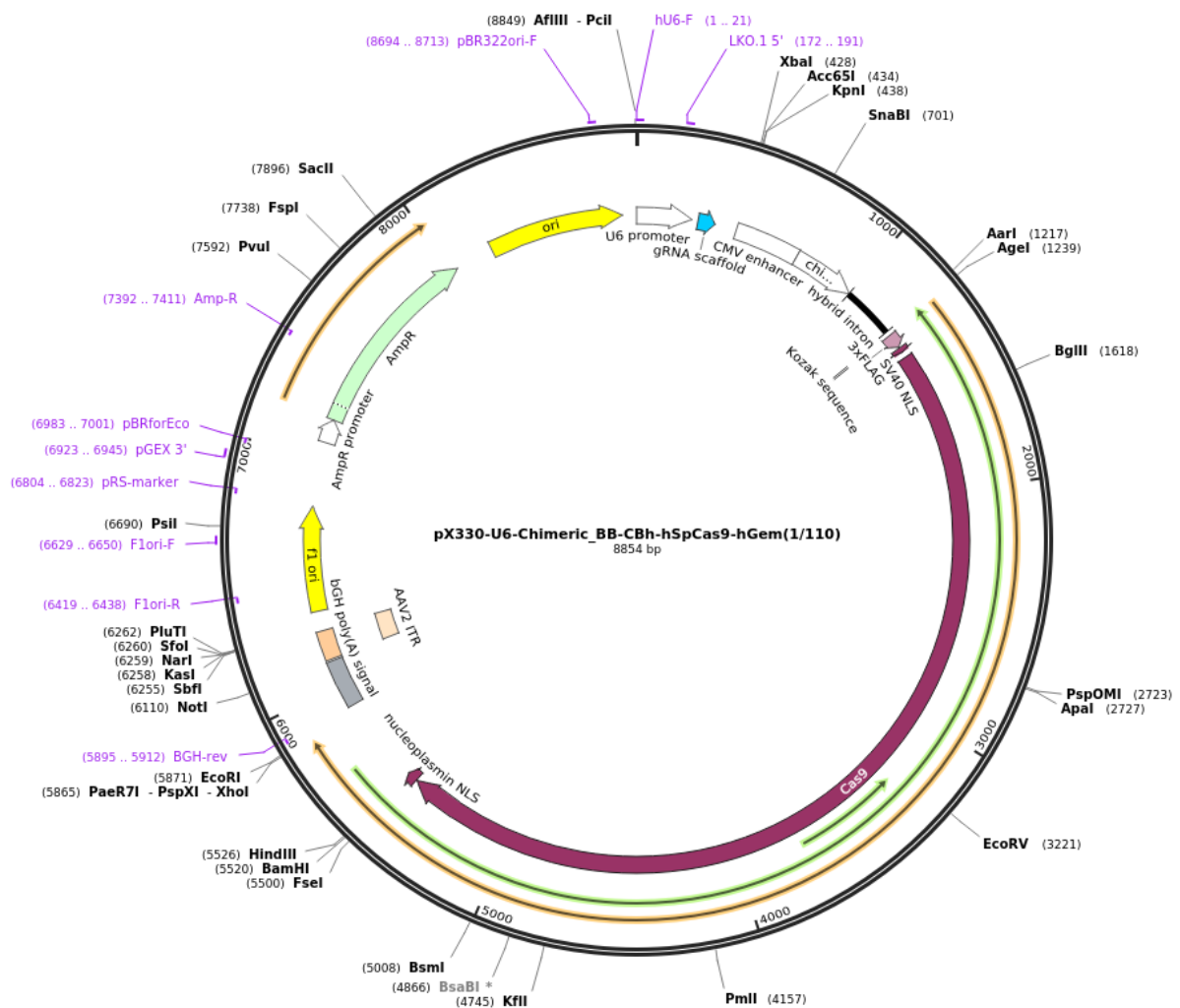
Materijal na kojem je istraživanje provedeno je stanična linija adenokarcinoma jajnika čovjeka SKOV3. Radi se o komercijalno dostupnoj staničnoj liniji koja se uzgaja kao adherentna kultura u DMEM mediju s 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS). Stanična linija je održavana i uzgajana u inkubatoru s kontroliranom atmosferom od 95% zraka i 5% CO₂, pri temperaturi 37 °C, u petrijevkama za kultivaciju humanih stanica. Stanice su održavane u ekspanzionalnoj fazi rasta te korištene za postavljanje pokusa transfekcije plazmidnim vektorom.

3.2 METODE

3.2.1 Dizajn molekula sgRNA

Nukleotidna sekvenca za gen *GLII* pribavljena je iz javno dostupnog servisa NCBI (National Center for Biotechnology Information) koji se nalazi na web adresi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Tamo smo pretraživanjem baze podataka pronašli sekvencu gena *GLII* čovjeka s označenim pozicijama eksona, introna i mjesta početke translacije (NC_000012 region 57459135..57472451). Navedena sekvenca obuhvaća kompletnu sekvencu gena *GLII* sa svim eksonima i intronima te 1000 nukleotida sekvence uzvodno od prvog eksona.

Molekule sgRNA za izradu „knock out“ gena *GLII* dizajnirala je doc.dr.sc Maja Sabol uz pomoć programa koji je javno dostupan i nalazi se na web adresi crispr.mit.edu. Navedeni program dizajnira set preporučenih sekvenci sgRNA na temelju željene sekvence maksimalne duljine 500 pb. Stoga smo iz kompletne sekvence gena *GLII* izdvojili dio sekvence približne duljine 400 pb u kojem se mjesto početka translacije (ATG mjesto) nalazilo otprilike u sredini sekvence, te smo je unijeli u program za dizajniranje sgRNA. Po završetku analize, pet najboljih sgRNA označili smo na sekvenci gena *GLII* u programu SnapGene Viewer (GSL Biotech, USA) i odabrali onu koja se nalazi najbliže mjestu početka translacije.



Slika 10. Ciljni vektor pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (preuzeto s www.addgene.org).

Odabranu sgRNA potrebno je uklonirati u ekspresijski vektor. Za potrebe ovog istraživanja korišten je vektor pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene, plasmid #42230) (Cong i sur, 2013) (Slika 10). Odabrana sgRNA kupljena je u obliku dva jednolančana sintetska oligonukleotida (Sigma), koji zbog specifičnog dizajna ciljnog vektora moraju na krajevima imati adaptore kojima će se specifično ugraditi u vektor. Stoga su na 5' krajeve oligonukleotida dodani adapteri koji će nakon hibridizacije jednolančanih oligonukleotida u dvolančani stvoriti ljepljive krajeve za kloniranje u vektor pocijepan enzimom BbsI.

Sekvence oligonukleotida su sljedeće:

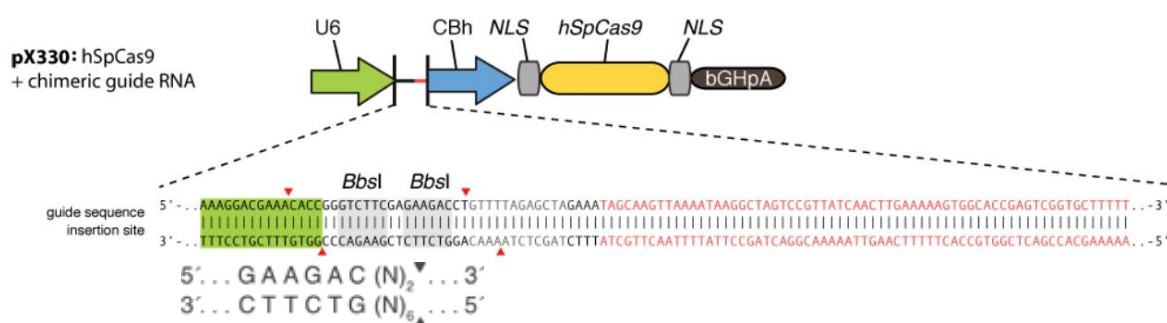
GLI1 FW oligo 5' **CACCGCCCTTTTTGGTGATTCATCTGG** 3'

GLI1 RV oligo 5' **AAACCCAGATGAATCACCAAAAAGGGC** 3'

3.2.2 Kloniranje sgRNA u plazmidni vektor

Kloniranje kratkih oligonukleotida sgRNA pomoću plazmidnog vektora se sastoji od više koraka: digestije plazmidnog vektora, pripreme oligonukleotida, njihove ligacije te transformacije kompetentnih bakterija.

Prvi korak je digestija plazmidnog vektora. Napravila sam reakcijsku smjesu za digestiju od vektora pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9, enzima BbsI (New England Biolabs), pufera CutSmart (New England Biolabs) i vode (Tablica 1). Pripremljenu smjesu sam ostavila otprilike sat vremena na termoblok zagrijan na 37 °C . U tom periodu dolazi do digestije plazmidnog vektora cijepanjem pod utjecajem enzima BbsI. BbsI enzim je specifičan po tome što ne cijepa unutar palindromske sekvence već nekoliko nukleotida nizvodno od palindroma. Zbog takvog djelovanja enzima BbsI, nastaju krajevi koji nisu ljepljivi, pa stoga nije potrebno vršiti korak defosforilacije plazmidnog vektora (Slika 11).



Slika 11. Sekvenca plazmida pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 s označenim mjestima cijepanja enzimom BbsI, te prikaz palindromske sekvence koju prepoznaje taj enzim. Sivo su označeni palindromski sljedovi koje enzim prepoznaje, a crvenim strelicama točna mjesta cijepanja (preuzeto s www.addgene.org).

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za digestiju plazmidnog vektora

komponenta	volumen
vektor pX330	1 µg
enzim BbsI	0.5 µl
pufer CutSmart	2 µl
voda	do 20 µl

Nakon otprilike sat vremena, reakcijsku smjesu sam stavila 20 minuta na termoblok zagrijan na 65 °C kako bih inaktivirala enzim BbsI. Tijekom digestije radi se priprema sgRNA za ugradnju u vektor, koja se sastoji od međusobnog povezivanja oligonukleotida (hibridizacije) te njihove fosforilacije. Prvo sam napravila desetostruka razrijeđenja oligonukleotida od radnog razrijeđenja (10 mM). Pomiješala sam 10 µl radnog razrijeđenja i 90 µl qH₂O za svaki oligonukleotid kako bih dobila potrebnu koncentraciju od 1 mM. Smjese sam kratko vorteksirala i centrifugirala. Nakon toga sam napravila reakcijsku smjesu koju čini 10 µl oligonukleotida GLI1 FW oligo i 10 µl oligonukleotida GLI1 RV oligo. Smjesu sam kratko vorteksirala i centrifugirala, te stavila jednu minutu grijati na 95 °C u uređaj za PCR (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700). Smjesu sam nakon zagrijavanja ostavila hladiti na sobnoj temperaturi. Nakon što se reakcijska smjesa ohladila, dodala sam komponente koje će izvršiti fosforilaciju oligonukleotida: 1 µl enzima T4 PNK (polinukleotid kinaza) (New England Biolabs) i 2.4 µl T4 ligaznog pufera (New England Biolabs). Enzim T4 PNK dodaje fosfatnu skupinu na 5' kraj oligonukleotida koja je potrebna za uspješnu ligaciju oligonukleotida u vektor. Smjesu sam inkubirala 30 minuta na 37 °C na termobloku. Nakon pola sata, smjesu sam zagrijala 20 minuta na 65 °C kako bih suzbila aktivnost enzima.

Sljedeći korak predstavlja ligacija inserta i plazmidnog vektora. Napravila sam ligacijsku smjesu od pocijepanog vektora, inserta, T4 DNA ligaze (New England Biolabs), T4 DNA ligaznog pufera (New England Biolabs) i vode, te je inkubirala dva sata na sobnoj temperaturi (Tablica 2). T4 DNA ligaza stvara fosfodieterske veze između inserta i plazmida te omogućava njihovo spajanje.

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za ligaciju vektora i inserta

komponenta	volumen
pocijepani vektor (digestijska smjesa)	1 µl
insert (fosforilirani oligonukleotid)	1 µl
pufer T4 DNA ligaze	2 µl
T4 DNA ligaza	1 µl
voda	14 µl

Posljednji korak je transformacija bakterija ligacijskom smjesom. Kompetentne bakterije (*Escherichia coli*, soj DH5 α) pohranjene na -80°C otopila sam na ledu. Dodala sam 5 μ l ligacijske smjese u jednu ampulu bakterija te promješala smjesu vrhom pipete kružnim pokretima. Smjesu sam inkubirala 10 minuta na ledu, a potom zagrijala 30 sekundi na 42 °C na termobloku. Smjesu sam ohladila na ledu jednu minutu, te nakon toga dodala 250 μ l medija LB (Sigma) bez antibiotika. Smjesu sam inkubirala jedan sat na 37 °C na termobloku uz miješanje. Nakon inkubacije sam razmazala 100 μ l bakterijske kulture na selektivnu ploču koja sadrži LB medij, agar i antibiotik ampicilin (100 μ g/ml) te bakterije inkubirala na 37°C preko noći.

3.2.3 Analiza bakterijskih kolonija lančanom reakcijom polimeraze

Na krutoj hranjivoj podlozi su narasle kolonije bakterija koje su primile plazmid te time stekle gen za rezistenciju na antibiotik kojeg hranjiva podloga sadrži. *Colony PCR* je metoda koja omogućava pretraživanje kolonija bakterija koje su ugradile plazmid sa željenim ukloniranim insertom. Metodom *Colony PCR* umnažala sam odsječak DNA plazmida duljine 334 pb koji obuhvaća mjesto cijepanja enzimom BbsI, gdje se nakon ligacije ugradio oligonukleotid za sgRNA (Slika 12).



Slika 12. Položaj i sekvence početnica koje se koriste za *Colony PCR* u odnosu na mjesto cijepanja enzimom BbsI.

Reakcijska smjesa priprema se za veći broj uzoraka (obično broj testnih uzoraka + pozitivna kontrola + negativna kontrola + 1) kako bi se omjer svih komponenti bio ujednačen u svim uzorcima (tzv. „master mix“). Na temelju izračunatih volumena, složila sam reakcijsku smjesu od 10 x pufera (Roche), specifičnih početnica (pX330 FW i pX330 RV) (Sigma),

dNTP (Roche), qH₂O i enzima FastStart Taq DNA polimeraze (Roche) (Tablica 3). Složenu reakcijsku smjesu sam kratko vorteksirala i centrifugirala.

Tablica 3. Reakcijska smjesa za *colony PCR*

komponenta	volumen (1x)
qH ₂ O	7.72μl
puffer	1 μl
primer F	0.5μl
primer R	0.5μl
dNTP	0.2 μl
DNA polimeraza	0.08 μl
UKUPNI VOLUMEN SMJESE:	10 μl

Uz epruvete od 0,2 ml, označila sam i set epruveta od 2 ml. U svaku epruvetu od 2 ml dodala sam 1 ml LB medija s ampicilinom (100 μg/ml). Drugi set epruveta služi za pripremu starter bakterijskih kultura koje se analiziraju metodom *Colony PCR*. Dodala sam po 10 μl reakcijske smjese u označene epruvete od 0,2 ml. S unutarnje strane poklopca epruveta sam dodala kap-dvije parafinskog ulja koje će onemogućiti hlapljenje reakcijske smjese. S sterilnim nastavkom pipete sam dotakla željenu koloniju na krutoj podlozi te sadržaj resuspendirala u reakcijskoj smjesi unutar pripadajuće epruvete od 0,2 ml. Nakon toga sam još jednom sadržaj na nastavku resuspendirala u LB mediju s ampicilinom unutar pripadajuće tubice od 2 ml. Na taj način ću odmah imati spremne bakterijske kolonije koje nakon provedbe PCR-a pokažu inserciju željenog fragmenta. Ovaj postupak sam obavila za sve narasle bakterijske kolonije. Uzorku pozitivne kontrole sam dodala u reakcijsku smjesu nepocijepani vektor pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9, dok u negativnoj kontroli nije stavljen DNA kalup.

Epruvete sam naposljetku kratko vorteksirala i centrifugirala te stavila u uređaj za PCR (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700) na sljedeći program:

<u>94 °C</u> 4:00	} 45x
94 °C 0:30	
60 °C 1:00	
<u>72 °C</u> 0:30	
72 °C 7:00	
4 °C ∞	

Epruvete od 2 ml stavila sam na termoblok na 37°C nekoliko sati, dok sam krute bakterijske podloge zaštićene parafilmom pohranila na 4°C. Identifikaciju željenog inserta u bakterijskim kolonijama ispitala sam gel elektroforezom na agaroznom gelu (1%) u nativnim uvjetima koristeći boju *Midori green* (Bulldog Bio inc.). Jedan gram agaroze rastopila sam u mikrovalnoj pećnici u 100 ml TAE pufera (40 mM Tris, 20 mM octena kiselina, 1 mM EDTA), u agarozu dodala 4 µl boje *Midori green* i izlila u kadicu za elektroforezu s češljicom. Agarozu sam ostavila da se ohladi 30 minuta, a zatim sam uklonila češljic i kadicu stavila u sustav za horizontalnu elektroforezu u TE pufer. Po 3 µl svakog uzorka sam na parafilmu pomiješala s kapljicom plavog pufera za nanošenje na gel i nanijela u jažice. U prvu jažicu stavila sam 3 µl standarda MassRuler Express Forward DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Uzorke sam podvrgnula elektroforezi pri stalnom naponu od 100 V kroz 30 minuta, te zatim gel slikala na instrumentu UVITEC Alliance 4.7 (UVITEC Cambridge, UK).

3.2.4 Izolacija plazmidne DNA iz bakterija

Bakterijskim kolonijama koje su na agaroznom gelu pokazale prisutnost željenog inserta u plazmidu, izolira se plazmidna DNA kako bi sekvenciranjem potvrdili rezultate PCR reakcije. Bakterijske starter kolonije sam nasadila u tekuću hranjivu podlogu (medij LB + ampicilin) na način da sam cijeli sadržaj starter kulture (1 ml) stavila u staklenu tikvicu sa 100 ml LB medija s ampicilinom (100 µg/ml) i inkubirala u inkubatoru tresilici na 37°C preko noći.

Prije početka postupka, izdvojila sam 500 μ l bakterijske kulture i pomiješala s 500 μ l 50%-tnog glicerola u epruveti za zamrzavanje od 2 ml, te pohranila na -80°C . Ostatak sadržaja tekuće bakterijske kulture sam podjednako raspodijelila na dvije epruvete *Falcon* od 50 ml. Za izolaciju plazmidne DNA sam koristila komplet Nucleobond Xtra Midi (*Macherey-Nagel*). Epruvete *Falcon* s bakterijama sam centrifugirala 20 minuta na 4°C pri 5000 rpm. Odlila sam supernatant i dodala 8 ml pufera za resuspenziju. Falcon epruvete sam dobro promućkala dok se sav bakterijski talog nije resuspendirao u puferu, te sam naposljetku spojila sadržaj Falcon epruveta u jednu zajedničku. Nakon toga sam dodala pufer za lizu stanica, promućkala sadržaj izvrtanjem pet puta i ostavila pet minuta na sobnoj temperaturi. Po isteku vremena, dodala sam pufer za neutralizaciju uslijed čega otopina mijenja boju iz plave u bijelu i nastaje mnogo bijelih grudica. Bijele grudice predstavljaju koagulirane proteine, odnosno stanični otpad. Nakon dodavanja pufera za neutralizaciju, otopinu sam dodala pažljivo u kolonu za pročišćavanje DNA koju sam prethodno natopila s 5 ml pufera EQU. Nakon prolaska otopine kroz filter sam dodala 12 ml pufera EQU i to isključivo na vanjske dijelove kolone (ne direktno u kolonu). Nakon prolaska pufera uklonila sam filter kolone i dodala pufer za ispiranje WASH. Uklonila sam tikvicu s otpadnom otopinom te ju zamjenila novom epruveticom. Na donju membranu kolone sam dodala pufer za eluciju ELU koji će isprati vezanu DNA s kolone u epruvetu. Sastav pufera predstavlja zaštićeni podatak proizvođača. Nakon ovog koraka sam u epruvetu s ispranom DNA dodala izopropanol koji će izazvati precipitaciju plazmidne DNA. Otopinu sam rasporedila u 4 tubice od 2 ml i centrifugirala pola sata na 4°C pri 15000 rpm. Dobivene taloge plazmidne DNA sam isprala u 70% etanolu, te ih naposljetku osušila i otopila u 100 μ l pufera TE.

Koncentraciju i čistoću plazmidne DNA sam izmjerila na spektrofotometru NanoPhotometer (Implen, Njemačka). Uređaj mjeri apsorbanciju pri valnim duljinama od 230 nm, 260 nm i 280 nm. Uređaj sam kalibrirala nanošenjem 1 μ l TE pufera bez plazmidne DNA te sam zatim krenula na mjerenje koncentracije plazmidne DNA, također na način da sam 1 μ l uzorka nanijela na uređaj. Omjer A_{260}/A_{280} govori o čistoći plazmidne DNA te što je taj omjer bliži vrijednosti 2 to je DNA čišća, a ukoliko je omjer niži može se raditi o kontaminaciji proteinima koji apsorbiraju pri 280 nm.

3.2.5 Sekvenciranje plazmidne DNA

Za provjeru rezultata *colony* PCR-a, izolirane plazmidne DNA su sekvencirane po Sangerovoj metodi. Sekvenciranje je obavila dr.sc Vesna Musani. Prije samog početka sekvenciranja, sve komponente su kratko centrifugirane (osim DNA polimeraze koja do same upotrebe stoji u zamrzivaču na -20°C). Napravljene su dvije reakcijske smjese, jedna za svaku početnicu (pX330 FW i pX330 RV) (Tablica 4). Reakcijske smjese su sadržavale komplet za sekvenciranje Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), početnicu i vodu.

Tablica 4. Sastav reakcijskih smjesa za sekvenciranje po Sangeru.

komponenta	volumen
Komplet	1 μl
DNA	3 μl
početnica	1 μl
Voda	3 μl

Reakcijske smjese su naposljetku kratko vorteksirane i centrifugirane. U označene epruvete od 0,2 ml je dodano 5 μl reakcijske smjese, a potom su dodana 3 μl odgovarajuće plazmidne DNA. Tubice su kratko vorteksirane i centrifugirane, te prebačene u uređaj za PCR (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700) na sljedeći program:

96°C 1:00 min
96°C 0:10 min
50°C 0:05 min } 25x
60°C 4:00 min
4°C ∞

Nakon reakcije plazmidne DNA su pohranjene na 4°C do korištenja. Prije stavljanja na instrument ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), uzorke je potrebno istaložiti centrifugiranjem i otopiti u formamidu. Nakon toga slijedi očitavanje na instrumentu i analiza sekvenci.

Analizu sekvenci radila sam u programu BioEdit (Ibis Therapeutics) na način da sam usporedila sekvence i kromatograme svakog uzorka sekvenciranog iz oba smjera sa referentnom sekvencom praznog plazmidnog vektora te provjerila je li se na ispravnom mjestu ugradio slijed sgRNA.

3.2.6 Rad sa staničnim kulturama

Sav rad sa staničnim kulturama sam obavljala u sterilnim uvjetima. Posuđe koje sam koristila je sterilno, kao i otopine, puferi i mediji. Sve aktivnosti vezane uz stanične kulture obavljala sam u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima sa laminarnim protokom zraka. Radnu površinu sam prije i nakon rada čistila alkoholom, te sterilizirala UV svjetlom.

3.2.6.1 Odmrzavanje stanica

Stanice su bile pohranjene u mediju za zamrzavanje (50% serum, 40% DMEM medij, 10% DMSO) u krio-ampulama na -80°C . Odmrzavanje stanica sam obavila u što kraćem roku, kako bi citotoksični utjecaj DMSO bio minimalan. Krio-ampule sam stavila na led, a u međuvremenu obilježila prikladne sterilne staklene epruvete u koje sam dodala 5 ml medija za rast stanica, medij DMEM (Gibco, Life Technologies, SAD) kompletiran s 10% FBS (fetalni goveđi serum, GE Healthcare, UK). Ampule sa stanicama sam kratko zagrijala u rukama, dovoljno da se zaleđena smjesa odvoji od stijenke, a većina sadržaja i dalje ostane zaleđena. Sadržaj sam brzo prelila u staklene epruvete i centrifugirala na 1200 rpm 5 minuta. Nakon centrifugiranja je bio vidljiv talog stanica koje su se isprale od krioprotektanta DMSO. Supernatant sam odlila, a taloge stanica resuspendirala u 10 ml DMEM medija. Sadržaj svake epruvete sam prenijela u prikladnu petrijevku promjera 10 cm (Sarstedt, Njemačka). Petrijevke sam lagano protresla kako bi se sadržaj ravnomjerno rasporedio te pohranila u inkubator (37°C , 5% CO_2).

3.2.6.2 Presađivanje i održavanje stanica u kulturi

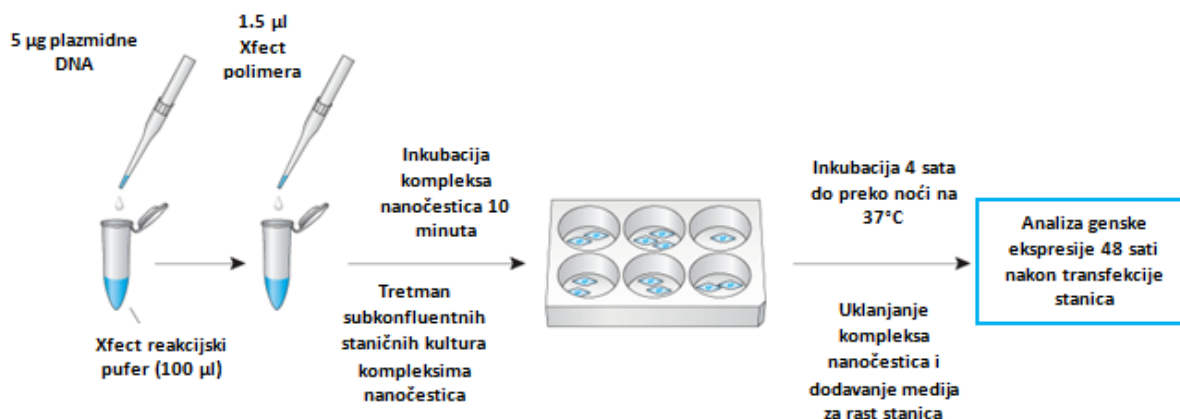
Stanicama u kulturi sam mijenjala medij svaka dva do tri dana. Stanična linija SKOV3 je adherentna, stoga sam medija mijenjala tako da bih pipetom sakupila sav medij iz petrijevke i bacila u otpad, te čistom pipetom dodala 10 ml svježeg medija. Stanice sam presađivala kada bi narasle toliko da prekriju površinu petrijevke odnosno postanu konfluentne.

Kako bih stanice presadila, prvo sam sav medij uklonila čistom pipetom. Potom sam na stanice dodala 5 ml PBS (1,7 mM KH_2PO_4 , 136 mM NaCl, 1 mM Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , pH 7,2), petrijevke kratko prodrmla, pokupila sadržaj i bacila. Koristeći PBS sam isprala zaostali medij zato što serum može deaktivirati djelovanje tripsina. Zatim sam dodala 1 ml tripsina s dodatkom 1 mM EDTA i ostavila da djeluje 5-10 minuta. Stanice sam povremeno provjeravala pod mikroskopom kako bih pratila proces odvajanja od podloge (tripsinizacija).

Na odvojene stanice sam dodala 5 ml kompletnog medija i resuspendirala ih propuhivanjem kroz pipetu. Jedan ml sadržaja sam nasadila u čistu petrijevku i nadopunila sa 10 ml svježeg medija.

3.2.6.3 Transfekcija stanica

Transfekcijom će se uspostaviti kultura stanica u kojoj uneseni vektor nije stabilno ugrađen u stanični genom. Princip unosa plazmidnog vektora koji kodira za protein Cas9 i sgRNA temelji se na endocitozi. Za transfekciju sam koristila komplet Xfect RNA Transfection Reagent (Takara, USA). Reagens u interakciji sa sgRNA stvara biorazgradive nanočestice te tako omogućava efikasnu transfekciju s minimalnim citotoksičnim efektom. Za početak sam pomiješala u sterilnu epruvetu 5 µg plazmidne DNA i 100 µl XFECT pufera (potreban volumen plazmidne DNA sam izračunala na temelju njene koncentracije formulom $c=m/v$). Sadržaj sam vorteksirala pet sekundi te dodala 1,5 µl XFECT polimera, nakon čega sam ponovo sadržaj vorteksirala 10 sekundi. Sadržaj epruvete sam inkubirala 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Stanicama koje su do tada bile pohranjene u inkubatoru, sam uklonila medij sterilnom pipetom, isprala u 5 ml PBS, te tripsinizirala sa 1 ml tripsina s dodatkom 1 mM EDTA. Nakon toga sam stanice resuspendirala u 5 ml medija i prebacila u sterilnu staklenu epruvetu. 20 µl stanica sam resuspendirala u 80 µl metilenskog modrila, te 20 µl sadržaja prebacila u Neubauerovu komoricu za brojanje stanica. Izbrojala sam stanice, te pomoću formule $(br.stanica/0,4) \times 5 \times 10^3$ izračunala potreban broj stanica po mililitru medija. Stanice sam nasađivala u pločice za uzgoj s 6 bunarića tako da u svakom bunariću bude 2×10^5 stanica. Za nasađivanje stanica sam koristila 3 bunarića (dvije negativne kontrole + uzorak). Nakon inkubacije od 10 minuta, stanicama sam dodala sav sadržaj plazmidne DNA, XFECT pufera i XFECT polimera, te nadodala 2 ml čistog medija DMEM bez dodatka seruma. Stanice sam inkubirala četiri sata na 37°C 5% CO₂. Nakon inkubacije, stanicama sam uklonila medij i nadodala 2 ml čistog kompletiranog DMEM medija (Slika 13). 24 sata nakon transfekcije sam ponovo zamijenila stanicama medij. Uz transfecirane stanice (jedan bunarić) sam napravila dva negativna kontrolna uzorka (1. stanice s isključivo 2 ml medija, 2. stanice s XFECT puferom i XFECT polimerom bez plazmidne DNA). Selekcija stanica pomoću antibiotika ili fluorescentnog markera nije izvršena jer je sustav CRISPR/Cas9 ručno konstruiran tj. nije komercijalnog podrijetla.



Slika 13. Protokol za transfekciju stanica (preuzeto i prilagođeno prema www.clontech.com)

3.2.6.4 Propagacija klonova

Kloniranje stanica je postupak odabira jedne jedine stanice koja dijeljenjem stvara potpuno identične stanice (klonove). Za kloniranje stanica sam koristila metodu graničnog razrjeđenja u kojoj se stanice razrjeđuju tako da je, nakon nasađivanja u pločice za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića, velika vjerojatnost da se u bunariću nađe samo jedna stanica koja će diobom stvoriti klon stanica.

Transficiranim stanicama sam uklonila medij, dodala 1 ml PBS-a u svaki bunarić, te ih naposljetku tripsinizirala koristeći 200 µl tripsina s 1 mM EDTA. Nakon nekoliko minuta sam sakupila sadržaj i prebacila u odgovarajuće sterilne epruvete, te izbrojala stanice kao što je već opisano gore. Izračunala sam koliko trebam razrijediti stanice kako bi konačna koncentracija stanica bila 1-2 stanice / 100 µl. U plastičnoj kadici sam dodala potreban volumen medija i stanica, te koristeći pipetu sa osam nastavaka, dodala 100 µl suspenzije u svaki bunarić pločice za uzgoj stanica s 96 bunarića. Stanice sam potom pohranila u inkubator na 37°C uz 5% CO₂ do sljedećeg dana, kada sam pregledala sve bunariće i označila bunariće u kojima sam vidjela samo jednu prilijepljenu stanicu. Bunariće bez stanica ili sa više stanica sam odbacila. Stanicama sam mijenjala medij tako što bih ga uklonila pomoću vakuumske sisaljke, a pipetom dodala 100 µl svježeg medija u svaki bunarić.

Nakon što su stanice formirale kolonije, presadila bih ih sa ploče za uzgoj s 96 bunarića na ploču za uzgoj s 24 bunarića. Svaka dva do tri dana sam mijenjala medij, dodavajući 1 ml čistog DMEM medija dok stanice nisu postale konfluentne, zatim sam presadila stanice u pločicu za uzgoj sa 6 bunarića. Stanicama sam u međuvremenu redovito mijenjala medij.

Naposlijetku, kada su stanice postale konfluentne, presadila sam ih u petrijevke promjera 10 cm. Kada bi stanice popunile cijeli površinu petrijevke, razrijedila bi ih u mediju u omjeru 1:5. Naposljetku sam napravila 4 razrjeđenja svakog klona koje sam zamrznula, dok je jedna petrijevka iskorištena za izolaciju proteina za Western blot analizu.

Probirom kojeg sam temeljila na konfluentnosti stanica, dobila sam sedam klonskih linija kojima sam testirala proteinsku ekspresiju GLI1.

3.2.6.5 Zamrzavanje stanica

Dio stanica sam dugotrajno zamrznula u slučaju potrebe određenog klona, a dio kratkotrajno za izolaciju proteina. U oba slučaja je stanice najbolje zamrzavati kada su optimalne gustoće (80-90% konfluentne). Postupak dugotrajnog zamrzavanja počinje slično kao i postupak presađivanja. Stanicama sam uklonila medij, dodala 5 ml i tripsinizirala. Trispinizirane stanice sam resuspendirala u 5 ml medija i prenijela u sterilnu staklenu epruvetu. Epruvete sa stanicama sam ostavila pola sata na ledu da se polako ohlade. Kasnije sam stanice centrifugirala na 1200 rpm 5 minuta u centrifugi ohlađenoj na 4°C. Nakon centrifugiranja sam odlila supernatant, a taloge stanica resuspendirala u 1 ml hladnog medija za zamrzavanje (50% serum, 40% DMEM medij, 10% DMSO) i prebacila u označene krio-ampule. Ampule sa stanicama sam pohranila u zamrzivač na -80°C, a za dugotrajniju pohranu stanice se stavljaju u tankove s tekućim dušikom.

Dio stanica od svakog klona mi je trebao za izolaciju proteina. Zbog toga sam taj dio stanica zamrznula na drugačiji način. Prilikom rada sam petrijevke držala na ledu kako bi stanice pretrpjele što manji temperaturni šok. Stanicama sam prvo čistom pipetom uklonila medij te dodala 1 ml PBS. PBS sam uklonila te ponovila postupak sa još 1 ml PBS. Nakon toga sam stanicama dodala 700 µl PBS te sterilnom strugalicom sastrugala stanice od površine. Stanice sam strugala dok se nije izgubio osjećaj klizave površine, sadržaj pokupila pipetom i prebacila u označenu tubicu od 5 ml. Strugalicu sam nakon svakog uzorka isprala u etanolu i destiliranoj vodi. Stanice sam centrifugirala 5 min pri 1200 rpm, odlila supernatant i taloge pohranila u frižider na -20°C. Prilikom podizanja stanica nisam koristila tripsin jer razara membranske proteine od interesa (PTCH), stoga je metoda struganja prikladnija.

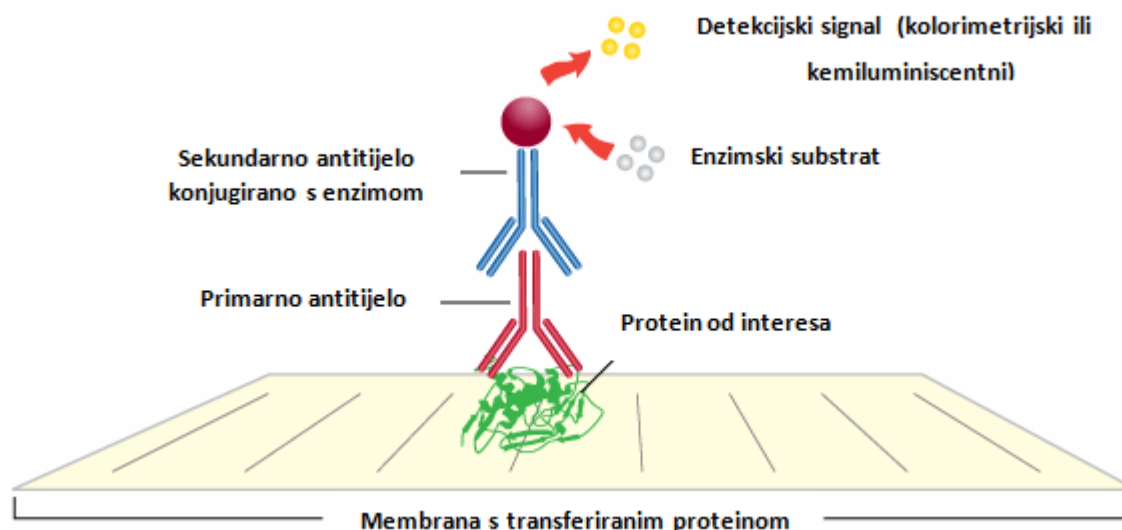
3.2.7 Izdvajanje proteina iz stanica

Proteini iz stanica se izoliraju koristeći pufer za lizu koji se sastoji od pufera RIPA (25 mM Tris-HCl, 1% Na-deoksiholat, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0,1% SDS) i inhibitora proteaza, uz sonikaciju. Inhibitor proteaza se dodaje u obliku tablete (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche, Švicarska), jedna tableta na 10 ml pufera. Pohranjene taloge stanica resuspendirala sam u 50 µl pufera za lizu, te sadržaj prebacila u zasebne sterilne tubice od 1,5 ml koje su prikladnije za homogenizaciju i kasnije korake. Stanice sam držala na ledu tijekom cijelog postupka izolacije proteina. Suspenzije stanica sam sonificirala dva puta po 15 sekundi pomoću sonifikatora Labsonic M (Sartorius, Njemačka), a nakon toga centrifugirala 20 minuta na 13200 rpm u centrifugi ohlađenoj na 4°C. Supernatant sam sakupila i prebacila u čistu, prikladno označenu mikroepruvetu i pohranila u zamrzivač na -80°C do upotrebe.

Koncentraciju proteina sam odredila pomoću kolorimetrijske metode po Bradford-u, koristeći komercijalnu otopinu Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, USA). Mjerenje se zasniva na svojstvu kiseline BCA da promjeni boju prilikom vezanja za bazične i aromatske aminokiseline u proteinima. Nakon vezanja za proteine dolazi do snažne apsorpcije na 562 nm koja se linearno povećava s koncentracijom proteina. Koncentracija proteina se vrlo jednostavno može odrediti usporedbom apsorpcija sa standardnom krivuljom poznatih koncentracija. Prvo sam napravila niz serijskih razrjeđenja poznatog standardnog proteina, 1 mg/ml BSA (goveđi albumin iz seruma) redom: 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 25 µg/ml te 0 µg/ml prateći upute u kitu. Nakon toga sam napravila i radnu otopinu reagensa koja se sastoji od otopine A i otopine B u omjeru 50:1. 25 µl uzorka i standarda sam pipetirala u pločicu sa 96 bunarića u duplikatu. Dodala sam u svaki bunarić 200 µl radne otopine, te 30 sekundi prodrmla pločicu. Nakon toga sam pločicu inkubirala 30 minuta na 37°C, a kasnije ohladila na sobnoj temperaturi. Naposljetku sam izmjerila apsorpciju na 562 nm na spektrofotometru (Labsystems Multiskan MS, Finska). Dobivene vrijednosti sam unijela u računalo i nacrtala standardnu krivulju na temelju koje sam odredila vrijednosti koncentracije proteina.

3.2.8 Metoda „Western blot“

Metodom „Western blot“ se detektiraju proteini u određenom uzorku pomoću specifičnih protutijela. Daje nam informaciju o tome je li protein i u kojoj mjeri eksprimiran (Slika 14)



Slika 14. Princip detekcije proteina protutijelima u Western analizi. Na protein vezan na membrani veže se primarno protutijelo specifično za taj protein. Na primarno protutijelo veže se sekundarno protutijelo specifično za Fab fragment primarnog protutijela. Sekundarno protutijelo konjugirano je s peroksidazom, koja djeluje na kemiluminiscentni reagens (substrat) te on počinje svijetliti (preuzeto i prilagođeno prema www.leinco.com).

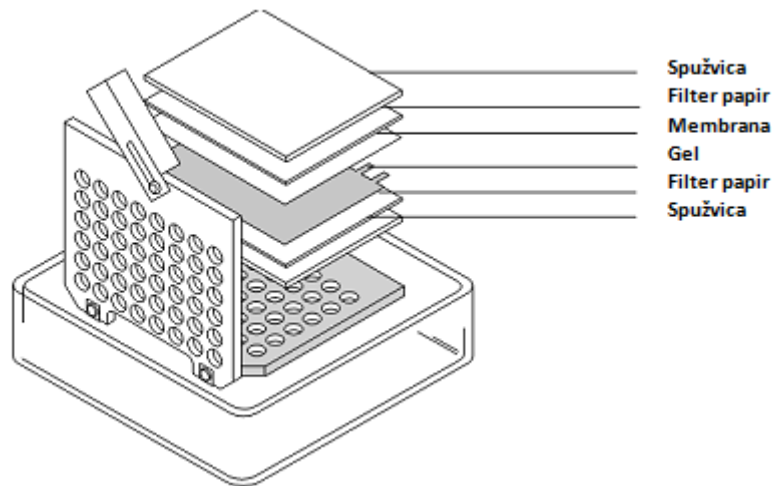
Prvi korak u Western analizi je razdvajanje proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu. SDS djeluje denaturirajuće na proteine i prekriva ih negativnim nabojem, što omogućava putovanje proteina prema pozitivnom polu na temelju molekularne mase. Veći proteini će putovati sporije, a manji brže. Prvo sam napravila gel za razdvajanje kao što je opisano u tablici 5. APS i TEMED sam dodala neposredno prije izlivanja gela između stakala. Gel za razdvajanje sam stavila do otprilike $\frac{3}{4}$ visine stakla kako bih imala mjesta za gel za sabijanje. Na gel za razdvajanje sam pažljivo nanijela izopropanol i ostavila ga da se polimerizira pola sata. Nakon toga sam napravila gel za sabijanje kao što je opisano u tablici 3.5. Kao što je bio slučaj sa gelom za razdvajanje, tako sam i prilikom pripreme gela za sabijanje dodala APS i TEMED neposredno prije izlivanja. APS i TEMED kataliziraju polimerizaciju akrilamida i bisakrilamida. Prije izlivanja gela za sabijanje sam uklonila izopropanol. Gel za sabijanje sam nalila do vrha stakla, a potom stavila češljic za formiranje jažica. Gel za sabijanje se također polimerizira pola sata.

Tablica 5. Sastav i omjeri komponenti za izradu akrilamidnih gelova

komponenta	volumen
gel za razdvajanje	
voda	4,95 ml
30% akrilamid-bisakrilamid mješavina	2,35 ml
1.5 M TRIS-HCl pufer, pH 8,8	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% amonij persulfat	0,1 ml
TEMED	0,007 ml
gel za sabijanje	
voda	3,4 ml
30% akrilamid-bisakrilamid mješavina	0,83 ml
1 M TRIS-HCl pufer, pH 6,8	0,63 ml
10% SDS	0,05 ml
10% amonij persulfat	0,05 ml
TEMED	0,004 ml

Nakon pripreme gela sam denaturirala proteinske uzorke. Dodala sam 50 µg proteina u mikroeprijetu i dodala $\frac{1}{4}$ konačnog volumena 4x pufera za nanošenje (pufer LB, sastav: 0,2 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 M DTT, 8% SDS, 40% glicerol, 0,001% bromfenol blue). Uzorke sam zagrijala 5 minuta na 95°C i centrifugirala jednu minutu na 13200 rpm. Pola sata nakon što sam napravila gel, uklonila sam češljic te postavila stakla s gelom u sustav za vertikalnu elektroforezu Mini-Protean III (Bio-Rad, SAD) s puferom za elektroforezu (1 M glicin, 50 mM Tris, 1% SDS). U prvu jažicu sam nanijela 4 µl proteinskog markera BioRad Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad, SAD), a zatim redom uzorke. Elektroforeza se odvijala pri konstantnom naponu 110 V u trajanju 2 sata.

Elektroforezu sam zaustavila kada je fronta boje iz pufera LB stigla do donjeg ruba gela. Pažljivo sam izvadila gel i složila tzv. sendvič za prijenos na membranu. U plastični nosač sam na prozirnu stranu složila redom: spužvica, dva komada filter papira, nitrocelulozna membrana, gel, dva komada filter papira i opet spužvica (Slika 15). Sustav sam zatvorila crnom stranom nosača i stavila ga u sistem za prijenos na membranu u pufer za prijenos (200 mM Tris, 1,5 M glicin, svježe se dodaje još 10-20% metanola). Nitroceluloznoj membrani sam odrezala gornji lijevi ugao zbog označavanja orijentacije. Prijenos se odvijao pri konstantnom naponu 100 V 90 minuta.



Slika 15. Slaganje slojeva prilikom prijenosa na membranu (preuzeto i prilagođeno prema www.radio.cuci.udg.mx).

Nakon što je prijenos završio, izvadila sam i stavila membranu u kadicu za bojanje. Membranu sam bojala bojom Naphtol Blue (10% metanol, 2% octena kiselina, 0,1% Naphtol Blue Black) nekoliko sekundi, a potom je stavila u otopinu za odbojavanje (50% metanol, 7% octena kiselina u vodi). Membranu sam odbojavala dok nije pobijelila i dok pruge proteina nisu ostale plave. Nakon toga sam membranu isprala tri puta u puferu TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7,5) na tresilici. Membranu sam izrezala na trakice kako bi je mogla tretirati istovremeno s više protutijela. Membranu sam blokirala u 5% otopini mlijeka u prahu u puferu TBST pola sata na sobnoj temperaturi na tresilici. Primarna antitijela sam razrijedila u 5% mlijeku u puferu TBST kako je navedeno u tablici 6. Kao kontrolu sam koristila aktin. Nakon blokiranja sam membrane stavila u kadice sa otopinom primarnih antitijela, zatvorila te inkubirala preko noći na 4°C na tresilici.

Tablica 6. Primarna i sekundarna antitijela korištena u Western blot analizi

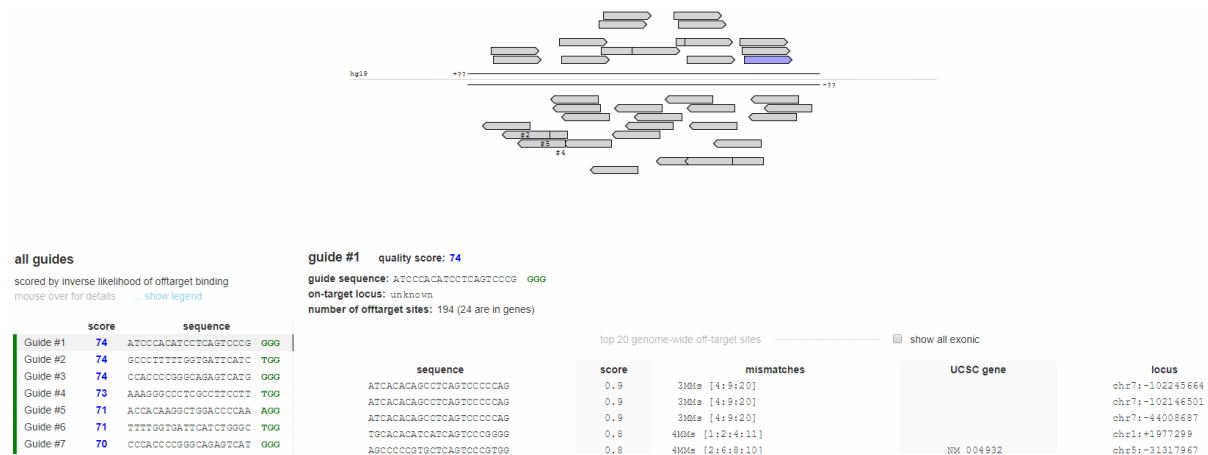
antigen	proizvođač	kataloški broj	životinja	razrjeđenje
primarna antitijela				
β-ACTIN	ProteinTech	60008-1-Ig	mouse	1:4000
GLI1	Cell Signaling	C68H3 #3538	rabbit	1:1000
PTCH1	ProteinTech	17520-1-AP	rabbit	1:600 – 1:1000
sekundarna antitijela				
HRP goat anti-mouse Ig	BD Pharmingen	554002 (lot 7223628)	goat	1:5000
HRP goat anti-rabbit IgG	BD Pharmingen	554021 (lot 6272517)	goat	1:5000

Sljedeći dan sam isprala membrane 3x5 minuta u puferu TBST na njihalici. Napravila sam otopinu sekundarnih protutijela odgovarajućih razrjeđenja u 5% otopini mlijeka u TBST-u. Membrane sam inkubirala u otopini sekundarnih protutijela sat vremena pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije sam membrane ponovo isprala 3x5 minuta u puferu TBST. Za detekciju signala sam koristila kombinaciju kemiluminiscentnih reagensa SuperSignal West PICO i SuperSignal West FEMTO (Thermo Scientific, SAD), koje sam međusobno pomiješala u omjeru 3:1. Membrane sam stavila u plastičnu kadicu, nakapala kemiluminiscentnim reagensom i inkubirala 5 minuta u mraku. Nakon inkubacije sam uklonila višak kemiluminiscentnog reagensa papirnatim ubrusom te prenijela membrane na prozirnu foliju. Membrane u foliji sam slikala u aparatu za slikanje UVITEC Alliance 4.7 (UVITEC Cambridge, UK).

4. REZULTATI

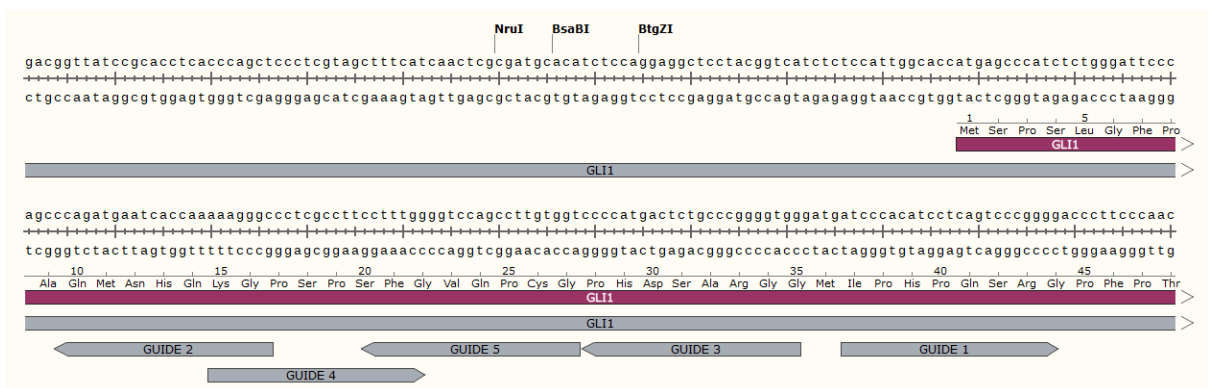
4.1 Dizajn molekula sgRNA

Na temelju odabranog dijela sekvence *GLII* od približno 400 pb, program za dizajniranje sgRNA ponudio je sve moguće opcije oligonukleotidnih sekvenci (Slika 16).



Slika 16. Prikaz rezultata dizajna sgRNA sa web sučelja crispr.mit.edu. Grafički su prikazani položaji i orijentacije svih pronađenih sgRNA, a u nastavku se nalazi tablični prikaz preporučenih sgRNA poredan od najboljih prema najlošijima, te analiza potencijalnih nespecifičnih mjesta cijepanja.

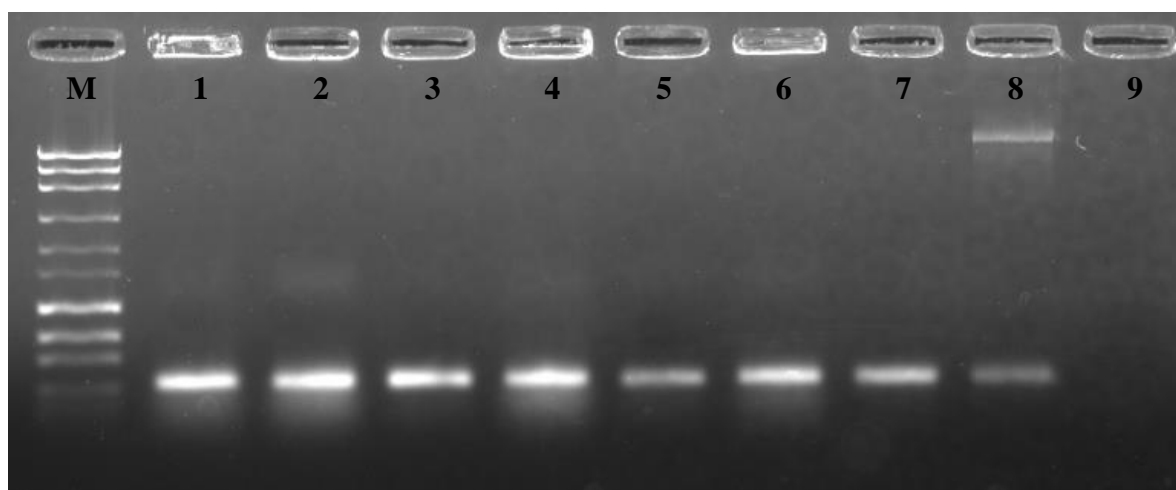
Pet najboljih molekula sgRNA je označeno na sekvenci gena *GLII* u programu SnapGene Viewer (GSL Biotech, USA) te je odabrana sgRNA koja se nalazila najbliže mjestu početka translacije (ATG) (Slika 17).



Slika 17. Prikaz dijela sekvence gena *GLII* koja obuhvaća mjesto početka translacije te položaje i orijentacije 5 najboljih sgRNA. Odabrana sgRNA na slici je označena kao GUIDE 2.

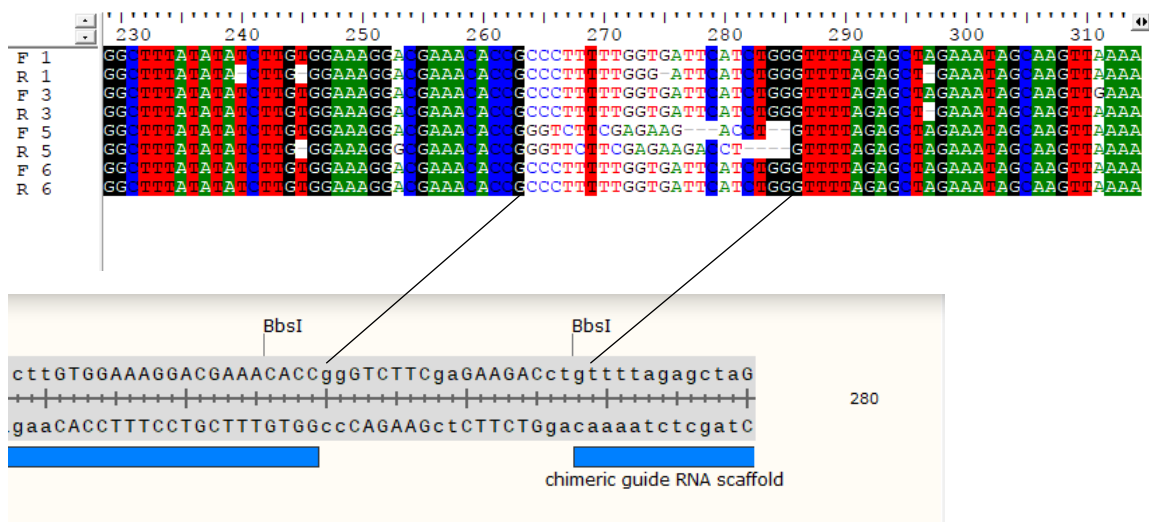
4.2 Analiza sekvenci sgRNA u vektoru

Prije sekvenciranja plazmidne DNA metodom po Sangeru, ispitana je prisutnost željenog inserta metodom *colony PCR*. Provjerom rezultata metodom *colony PCR* gel elektroforezom izvršena je brza pretraga bakterijskih kolonija koje posjeduju plazmide s ukloniranim željenim odsječkom DNA (tzv. pozitivne kolonije) (Slika 18). Bakterijske kolonije su pokazale prisutnost željenog inserta, a rezultati su potvrđeni pozitivnim signalom pozitivne kontrole i negativnim signalom negativne kontrole.



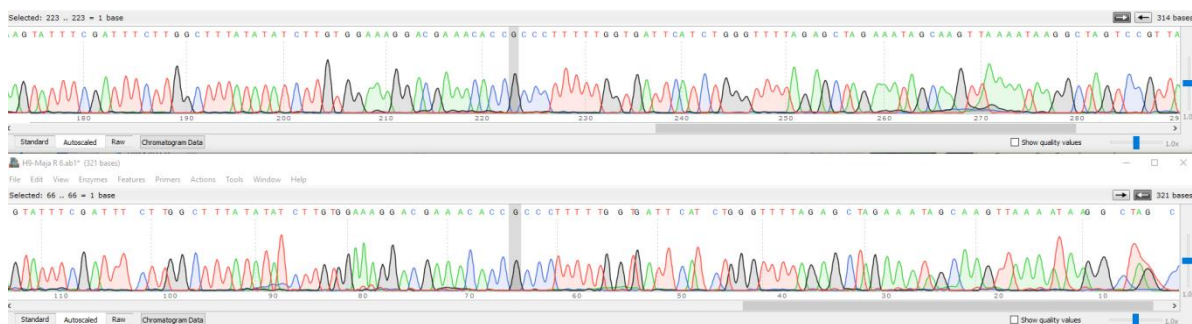
Slika 18. Provjera rezultata *colony PCR*-a na 1% agaroznom gelu. U prvaj jažici se nalazi marker (M), a potom slijede redom uzorci bakterijskih kolonija (1-7). Jažica 8 predstavlja pozitivnu kontrolu (plazmid pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9), a posljednja (9) negativnu kontrolu (reakcijska smjesa bez DNA kalupa).

Potvrda rezultata *colony PCR*-a je izvršena sekvenciranjem po Sangeru. Analiza dobivenih sekvenci je napravljena u programu BioEdit (Ibis Therapeutics). Uspoređivanjem sekvenci i kromatograma svakog uzorka sekvenciranog iz oba smjera s referentnom sekvencom praznog plazmidnog vektora, izdvojene su bakterijske kolonije koje su imale slijed sgRNA ugrađen na ispravnom mjestu (Slika 19). Analizom je utvrđeno da su bakterijske kolonije 1, 3 i 6 imale slijed sgRNA ugrađen na ispravnom mjestu i sadržavale potpunu oligonukleotidnu sekvencu GLI1. Neke bakterijske kolonije, kao što je kolonija 5 su imale prazan plazmid bez željenog sgRNA odsječka.



Slika 19. Analiza rezultata sekvenciranja plazmidne DNA bakterijskih kolonija 1, 3, 5 i 6. Bakterijske kolonije 1, 3 i 6 imaju pravilno ugrađen slijed sgRNA te sadrže točnu sgGLI1 sekvencu 5' CACCGCCCTTTTGGGTGATTCATCTGG '3. Bakterijska kolonija 5 sadrži prazan vektor bez željene sgRNA sekvence što se jasno vidi usporedbom sekvence praznog plazmida iz donjeg dijela slike.

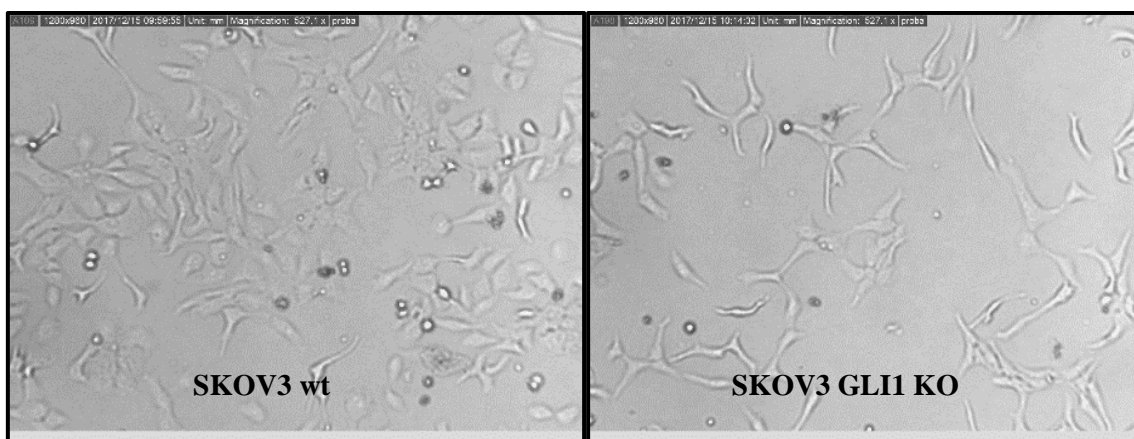
Uspješnost sekvenciranja dodatno potvrđuje izgled kromatograma pozitivnih bakterijskih kolonija (Slika 20). Kromatogrami pozitivnih bakterijskih kolonija bili su jasnog izgleda bez pozadinskih signala, što potvrđuje kvalitetu izolirane plazmidne DNA i točnost ugradnje željene sgRNA.



Slika 20. Kromatogram pozitivne bakterijske kolonije. Na kromatogramu je sivom bojom označen 5' gvanin oligonukleotidne sekvence sgRNA.

4.3 Morfološki izgled transfeciranih stanica

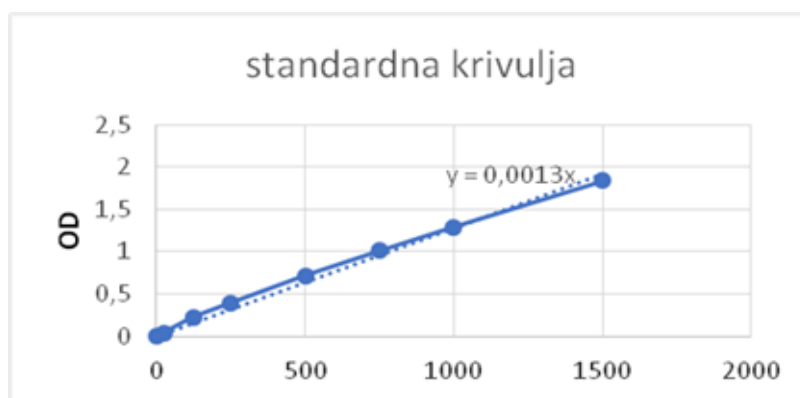
Da bi se izvršila ciljana modifikacija gena, SKOV3 stanice su transfecirane plazmidnim vektorom te nasađene u pločicu s 96 bazenčića gustoće 1 stanice po bunariću. Nastale homogene kolonije podrijetlom iz jedne stanice su nakon transfekcije održavane u kulturi presađivanjem temeljenim na konfluentnosti. Tijekom propagacije klonova, stanice su redovito promatrane pod svjetlosnim mikroskopom i bilježene su nastale promjene u morfologiji i rastu. Opažena je promjena morfološkog izgleda klonske linije SKOV3 GLI1A. Stanice su morfološki bile vidljivo drugačije od stanica SKOV3 divljeg tipa. Za razliku od divljeg tipa stanica SKOV3, klonska linija SKOV3 GLI1A je imala tanje i izduženije stanice (Slika 21). Kod klonske linije SKOV3 GLI1A je naposljetku i zabilježen izostanak proteinske ekspresije GLI1. Druge klonske linije kod kojih je ekspresija GLI1 bila na uobičajenoj razini imale su fenotip mnogo sličniji divljem tipu stanica SKOV3.



Slika 21. Morfološki izgled stanica. Lijevo: SKOV3 stanice divljeg tipa. Desno: Klonska linija SKOV3 sa smanjenom ekspresijom proteina GLI1.

4.3 Analiza proteinske ekspresije

Nakon transfekcije plazmidnim vektorom te nasađivanja u pločicu s 96 bazenčića, kako bi se stvorile homogene kolonije, izvršena je propagacija SKOV3 klonskih linija. Kod sedam klonskih linija dobivenih propagacijom, ispitana je proteinska ekspresija transkripcijskog faktora GLI1 te njegove transkripcijske mete PTCH1 metodom Western Blot. Prije ispitivanja proteinske ekspresije, izmjerena je koncentracija proteina izoliranih iz dobivenih SKOV3 klonskih linija metodom po Bradford-u. Koristeći dobivene vrijednosti apsorbancija serijskih razrjeđenja poznatog standardnog proteina, 1 mg/ml BSA (goveđi albumin iz seruma) izrađena je standardna krivulja na temelju koje je izračunata koncentracija proteina (Slika 22).



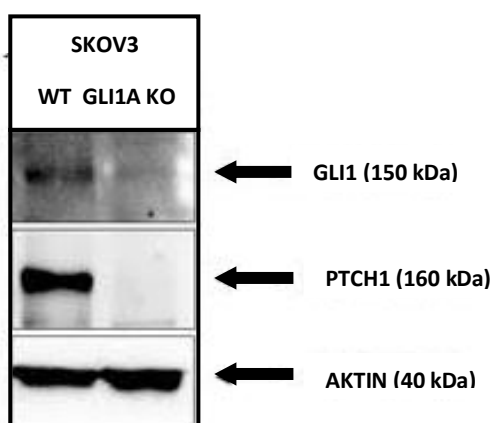
Slika 22. Standardna krivulja BCA na temelju koje se računa koncentracija proteina. Na osi x je OD (optička gustoća), što je vrijednost očitavanja apsorbancije instrumenta.

Formula na kalibracijskoj krivulji (nagib pravca) koristi se za izračun koncentracije na temelju formule $x=(y/0,0013)*10$ da bi se dobila koncentracija proteina u ng/ μ l (Tablica 7).

Tablica 7. Izračun koncentracije proteina na temelju standardne krivulje. Zadnji stupac predstavlja volumen proteina koje je potrebno nanijeti u jažicu za konačnu količinu od 50 µg. OD – optička gustoća

uzorak	OD	konc. (ng/µl)	konc. (µg/µl)	50 µg
SKOV3	0,536	4123,077	4,123077	12,12687
SKOV3 A	0,1915	1473,077	1,473077	33,94256
SKOV3 B	0,3975	3057,692	3,057692	16,3522
SKOV3 C	0,939	7223,077	7,223077	6,922258
SKOV3 D	0,6005	4619,231	4,619231	10,82431
SKOV3 E	0,348	2676,923	2,676923	18,67816
SKOV3 F	0,59	4538,462	4,538462	11,01695
SKOV3 G	0,454	3492,308	3,492308	14,31718
SKOV3 H	0,3225	2480,769	2,480769	20,15504
SKOV3 I	0,6035	4642,308	4,642308	10,77051

Metoda Western Blot je pokazala izostanak proteinske ekspresije GLI1 i PTCH1 kod klonске linije SKOV3 GLI1A (Slika 23). Aktin je korišten za normalizaciju količine. Izostanak proteinske ekspresije GLI1 i PTCH1 potvrđuje nastanak mutacije kojom je aktivnost transkripcijskog faktora GLI1 blokirana.



Slika 23. Rezultati western blot ekspresije proteina GLI1, PTCH1 te aktina. Proteini su izolirani iz SKOV3 stanica divljeg tipa (WT), koje pokazuju proteinsku ekspresiju GLI1 i PTCH1, dok linija SKOV3 GLI1A dobivena propagacijom, pokazuje „knock-out“ proteina GLI1 te njegove transkripcijske mete PTCH1, što je dokazano izostankom produkta od 150 kDa i 160 kDa.

5. RASPRAVA

Signalni put HH-GLI je uključen u regulaciju niza procesa nužnih za normalan embrionalni razvoj. Predstavlja jedan od temeljnih regulatora razvoja tkiva i organogeneze udova, probavnog sustava, pluća, kosti i mnogih drugih organa (Briscoe i Therond, 2013). U odraslom organizmu njegova aktivnost biva suprimirana, ali je i dalje nužna za homeostatsko stanje organizma, u vidu održavanja populacije matičnih stanica (Petrova i Joyner, 2014). Signalni put HH-GLI igra jako važnu ulogu u razvoju i diferencijaciji zrelog jajnika (Walterhouse, 2013). Njegovo aberantno funkcioniranje povezuje se razvojem mnogih malignih oboljenja, među kojima je i karcinom jajnika (Kurman i Shih., 2010). Hiperaktivacija HH-GLI je važna za proliferaciju i održavanje klonskog rasta stanica primarnih karcinoma jajnika (Bhattacharya i sur., 2008). Zbog nespecifičnih simptoma i kasne dijagnoze, karcinom jajnika predstavlja maligno oboljenje sa jednom od najvećih stopa mortaliteta (Kurman i Shih, 2010). Zbog toga se pažnja mora usmjeriti na razvoj što efikasnijih terapija. Rezultati mnogih istraživanja su kontradiktorni zbog kompleksne međuinterakcije HH-GLI sa ostalim signalnim putevima.

U ovom diplomskom radu je fokus bio na transkripcijskom faktoru GLI1, isključivom aktivatoru signalnog puta HH-GLI. Smatra se da je upravo GLI1 spona interakcije HH-GLI i mnogih drugih signalnih puteva. Transkripcijski faktor GLI1 djeluje na ekspresiju brojnih gena uključenih u regulaciji karcinogeneze kao što su *C-MYC*, *BCL-2* i *Ciklin D1* (Ciucci i sur., 2013). Utišavanje njegove funkcije potencijalno može djelovati na smanjenje proliferacije tumorskih stanica, te naposljetku povlačenje bolesti. Primjenom sustava CRISPR/Cas9 inhibirana je njegova funkcija i na taj način izrađena "knock-out" stanična linija na kojoj će se vršiti daljnje analize o učinku izazvane inhibicije. Razvoj "knock-out" stanične linije ima prednosti nad metodama koje se inače koriste za utišavanje funkcije gena, kao što je utišavanje posredovano molekulama siRNA. U slučaju "knock-out" stanične linije, izazvani efekt je stalan, što čini sami model stabilnijim i pouzdanijim za korištenje. Utišavanje sa molekulama siRNA izaziva prolazan efekt te jako ovisi o efikasnosti transfekcije.

Provjerom proteinske ekspresije ispitana je uspješnost izrade „knock out“ modela u transfeciranim klonskim linijama stanica. Gubitak proteinske ekspresije GLI1, pratio je i gubitak ekspresije PTCH1 u klonskoj liniji SKOV3 GLI1A. Ova korelacija potvrđuje funkcionalni gubitak GLI1 jer PTCH1 predstavlja njegovu transkripcijsku metu. Proteinska

ekspresija *GLI1* i *PTCH1* direktno odražava aktivnost HH-GLI, jer aktivnošću HH-GLI dolazi do njihove transkripcije. Signalni put HH-GLI je u uskoj interakciji s mnogim drugim signalnim putevima kao što su PI3K/AKT, EGFR, RAF/MEK, K-RAS te WNT/ β -katenin (Pandolfi i Stecca, 2015). Ciljna meta mnogih od tih signalnih puteva koji uzrokuju nekonvencionalnu aktivaciju HH-GLI, je upravo *GLI1* (Slika 6.1). Smatra se da upravo takav tip aktivacije HH-GLI igra veliku ulogu u razvoju karcinoma, u vidu nekontrolirane proliferacije, zaobilaženja apoptoze, promoviranja metastaziranja i angiogeneze (Palle i sur., 2015). Inhibiranjem funkcije *GLI1* direktno se može djelovati na smanjenje stope aktivnosti HH-GLI uzrokovane ostalim signalnim putevima.

Klonska linija SKOV3 *GLI1A* imala je promjenjen morfološki izgled. Promjena morfologije može, ali i ne mora biti posljedica gubitka funkcije transkripcijskog faktora *GLI1* signalnog puta HH-GLI. Ne može se sa sigurnošću reći da je inaktivacija *GLI1* uzrokovala morfološke promjene, jer promjene na razini nukleotida nisu analizirane. Isto tako postoji mogućnost da se radi o posljedici neželjene mutacije. U velikim genomima često postoje višestruke homologne regije, te zbog toga postoji rizik za nespecifično vezanje molekula sgRNA i enzima Cas9, te nastanka neželjenih promjena (Zhang i sur., 2014). Također je poznato da stanične linije karcinoma jajnika vrlo često sadrže velike rearanžmane genoma, sa višestrukim delecijama i amplifikacijama. U ovoj staničnoj liniji pokazano je da gen *GLI1* nije promijenjen na taj način, odnosno da nema višestrukih kopija u genomu stanice (Roschke i sur., 2002). Inaktivacija funkcije *GLI1* se sigurno odražava na funkciju drugih signalnih puteva s kojima je HH-GLI u interakciji, stoga te promjene potencijalno mogu doprinijeti promjenjenom morfološkom izgledu klonske linije.

Utjecaj inhibicije *GLI1* u transfeciranim stanicama treba tek biti istražen. Izrađena "knock-out" stanična linija će se koristiti u budućim analizama koje će proučiti posljedice inhibicije *GLI1* na rast, migraciju stanica te odgovor na terapiju. Park i suradnici su svojim istraživanjem na mišjim „knock-out“ modelima pokazali da *GLI1* izaziva razvojne defekte tek u kombinaciji s ukidanjem *GLI2* (2000). Zbog preklapajuće funkcije proteina *GLI1*, konstruiranje pojedinačnih „knock-out“ modela omogućava bolje razumijevanje njihove konkretne funkcije. Doista postoji veliki potencijal u postupcima ukidanja funkcije aktivatora HH-GLI kao što je *GLI1*. Najveću prepreku predstavlja međudodnos HH-GLI sa ostalim signalnim putevima, gdje priroda interakcije mnogih proteina još uvijek nije identificirana. Budućnost razvoja terapija predstavlja multifaktorijski pristup u kojem se pokušava djelovati na više aspekata određene signalne mreže. Iako utjecaj ove inhibicije mora tek biti

istražen, smisao ovog postupka je itekako vidljiv. Transkripcijski faktor GLI1 djelujući na ekspresiju specifičnih gena regulira višestruke aspekte karcinogeneze, stoga manipuliranje njegove funkcije predstavlja jako dobar temelj za razvoj potencijalnih terapija.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

1. Visokospecifične molekule sgRNA su uspješno klonirane u plazmidni vektor što je potvrđeno sekvenciranjem
2. Stanice SKOV3 su uspješno transfecirane plazmidnim vektorom koji sadrži sgRNA i protein Cas9
3. Metodom graničnog razrjeđenja su uspješno uspostavljene klonske linije transfeciranih SKOV3 stanica iz pojedinačnih stanica
4. Primjena sustava CRISPR/Cas9 uzrokovala je promjene u morfologiji klonske linije SKOV3
5. Primjenom sustava CRISPR/Cas9 uzrokovan je gubitak funkcije GLI1 što je potvrđeno izostankom njegove proteinske ekspresije western blot analizom
6. Potpuni funkcionalni gubitak GLI1 je dodatno potvrđen izostankom proteinske ekspresije njegove transkripcijske mete, proteina PTCH1

7. LITERATURA

- Abe Y., Oda-Sato E., Tobiume K., Kawauchi K., Taya Y., Okamoto K., Oren M., Tanaka N., (2008). Hedgehog signaling overrides p53-mediated tumor suppression by activating Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:4838–4843.
- Bailey J.M., Mohr A.M., Hollingsworth M.A.,(2009) Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene.* 28:3513–25.
- Balordi F., Fishell G., (2007). Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J. Neurosci.* 27:5936-5947.
- Banga S.S., Boyd J.B., (1992) Oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:1735-1739.
- Barrangou R., Fremaux C., Horvath P.,(2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 315:1709–1712.
- Becher O.J., Hambardzumyan D., Fomchenko E.I., Momota H., Mainwaring L., Bleau A.M., et al. (2008). Gli activity correlates with tumor grade in platelet-derived growth factor-induced gliomas. *Cancer Res.* 68(7):2241-9.
- Bhattacharya R., Kwon J., Ali B., et al. (2008). Role of hedgehog signaling in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 14:7659-66
- Bitgood M. J., Shen L., McMahon A. P., (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr. Biol.* 6:298-304.
- Briscoe J., Théron P.P., (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14:418–431.
- Burke R., Nellen D., Bellotto M., Hafen E., Senti K.A., Dickson B.J., Basler K. (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterolmodified Hedgehog from signaling cells. *Cell* 99:803–815.
- Carroll D.,(2011). Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* 188:773–782.
- Chen H., Wilson C.W., Li Y.J., Law K.K., Lu C.S., Gacayan R., Zhang X., Hui C.C., Chuang P.T., (2009). Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes Dev.* 23(16):1910-28.
- Chen X., Gonçalves M.A., (2016). Engineered viruses as genome editing devices, *Mol. Ther.* 24; 447-457.
- Cheng A.W., Wang H., Yang H., Shi L., Katz Y., Theunissen T.W., Rangarajan S., Shivalila C.S., Dadon D.B., Jaenisch R., (2013) Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res.* 23:1163-1171.
- Ciucci A., De Stefano I., Vellone V.G., et al. (2013). Expression of the glioma-associated oncogene homolog 1 (*gli1*) in advanced serous ovarian cancer is associated with unfavorable overall survival. *PloS one.* 8:e60145.
- Cochrane C.R., Szczepny A., Watkins D.N., Cain J.E.,(2015). Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers,* 7:1554-1585.

- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F., (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 339 (6121):819-23.
- Cretnik M., Musani V., Oreskovic S., Leovic D., Levanat S.,(2007). The patched gene is epigenetically regulated in ovarian dermoids and fibromas, but not in basocellular carcinomas. *Int J Mol Med*.19(6):875-83.
- Cross S.S., Bury J.P., (2004). The hedgehog signaling pathways in human pathology. *Curr Diag Pathol*. 10(2): 157-168.
- Dai P., Akimaru H., Tanaka Y., Maekawa T., Nakafuku M., Ishii S. (1999). Sonic Hedgehog induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem*. 274, 8143–8152.
- Derynck R., Akhurst R.J., Balmain A., (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*. 29:117–29.
- Dierks C., et al. (2007). Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat. Med*. 13:944-951.
- Ebina H., Misawa N., Kanemura Y., Koyanagi Y., (2013) Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep*, 3, 2510.
- Feng Y., Sassi S., Shen J.K., Yang X., Gao J., Osaka E., Zhang J., Yang S., Yang C., Mankin H.J., (2015). Targeting Cdk11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-cas9 system, *J. Orthop Res*. 33:199-207.
- Fodde R., Brabletz T., (2007). Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol*.19:150–8.
- Fuchs S., Dohle E., Kirkpatrick C. J., (2012). Sonic Hedgehog-mediated synergistic effects guiding angiogenesis and osteogenesis. *Vitam. Horm*. 88:491-506.
- Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C., (2007). The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*. 8; 172.
- Haft D.H., Selengut J., Mongodin E.F., Nelson K.E., (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput. Biol*. 1, e60.
- Hanahan D., Weinberg R.A., (2011). Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*. 144; 646-674.
- Hanna A., Shevde A.L., (2016). Hedgehog signaling: modulation of cancer properties and tumor microenvironment. *Molecular Cancer* 15:24.
- Hillman R.T., Feng B.Y., Ni J., Woo W.M., Milenkovic L., Hayden Gephart M.G., Teruel M.N., Oro A.E., Chen J.K., Scott M.P. (2011). Neuropilins are positive regulators of Hedgehog signal transduction. *Genes Dev*.25:2333–2346.
- Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O. et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 31:827-832.
- Ingham P.W. (1991). Segment polarity genes and cell patterning within the *Drosophila* body segment. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 1(2): 261-267.

- Ingham P. W., McMahon A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15:3059–3087.
- Ito H., Akiyama H., Shigeno C., Iyama K.I., Matsuoka H., Nakamura T. (1999). Hedgehog signaling molecules in bone marrow cells at the initial stage of fracture repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262:443-451.
- Jia J., Jiang J., (2006). Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cell Mol Life Sci.* 63: 1249-1265.
- Jia J., Tong C., Wang B., Luo L., Jiang J., (2004). Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature* 432: 1045–1050.
- Jinek M., et al.(2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.
- Johnson R.L., Rothman A.L., Xie J., Goodrich L.V., Bare J.W., Bonifas J.M., Quinn A.G., Myers R.M., Cox D.R., Epstein E.H.J., et al. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the Basal cell nevus syndrome. *Science* 272:1668–1671.
- Kelly G.L., Grabow S., Glaser S.P., Fitzsimmons L., Aubrey B.J., Okamoto T., Valente L.J., Robati M., Fairlie L.W., (2014). Targeting of MCL-1 kills MYC-driven mouse and human lymphomas even when they bear mutations in p53, *Genes Dev* 28; 58-70.
- Kinzler K., Bigner S., Bigner D., Trent J., Law M., O'Brien S., Wong A., Vogelstein B. (1987). Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 236:70–73.
- Kinzler K.W., Ruppert J.M., Bigner S.H., Vogelstein B. (1988). The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature* 332: 371–374.
- Knight S. C., Xie L., Tjian R., (2015). Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science.* 350:823–826.
- Kurman R.J., Shih I.M., (2010). The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol.*34(3):433-43.
- Lauth M., Rohhalter V., Bergström A., Kooshesh M., Svenningsson P., Toftgård R., (2010). Antipsychotic drugs regulate hedgehog signaling by modulation of 7-dehydrocholesterol reductase levels. *Mol Pharmacol.* 78(3):486-96.
- Lee J.M., Bernstein A., (1993). p53 mutations increase resistance to ionizing radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90; 5742-5746.
- Levanat S., (2014). Hedgehog signaling and cross-talk therapeutic potential. *Periodicum Biologorum* 116, 4:371-379.
- Levanat S., Cretnik M., Musani V., (2008). Hh-Gli signaling pathway functions and its therapeutic potential in cancer. *Croat. Chem. Acta* 81(1) 1-5.
- Lewis K. E., Drossopoulou G., Paton I. R., Morrice D. R., Robertson K. E., Burt D. W., Ingham P. W., Tickle C., (1999). Expression of ptc and gli genes in talpid3 suggests bifurcation in Shh pathway. *Development* 126:2397-2407.
- Liu T., Shen J.K., Li Z., Choy E., Hornicek F.J., Duan Z., (2016). Development and potential applications of CRISPR-cas9 genome editing technology in sarcoma, *Cancer Lett.* 373; 109-118.

Liu Y., Zeng Y., Liu L., Zhuang C., Fu X., Huang W., Cai Z., (2014). Synthesizing AND gate genetic circuits based on CRISPR-Cas9 for identification of bladder cancer cells, *Nat. Commun.* 5; 5393.

Makarova K.S., Haft D.H, Koonin E.V., (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:467–477.

Marigo V., Davey R.A, Zuo Y., Cunningham J.M., Tabin C.J., (1996). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 384: 176-179.

Mastrangelo E., Milani M.,(2018). Role and inhibition of GLI1 protein in cancer. *Lung Cancer (Auckl)* 9: 35–43.

Meissner T.B., Mandal P.K., Ferreira L., Rossi D.J., Cowan C.A., (2014). Genome editing for human gene therapy, *Methods Enzymol.* 546; 273-295.

De Martel C., Ferlay J., Franceschi S., Vignat J., Bray F., Forman D., Plummer M., (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis, *Lancet Oncol.* 13; 607-615.

Murone M., Rosenthal A., de Sauvage F.J. (1999). Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Exp. Cell Res.* 253: 25–33.

Nicolis S.K., (2007). Cancer stem cells and “stemness” genes in neuro-oncology. *Neurobiol Dis.* 25(2):217-29.

Nolan-Stevaux O., Lau J., Truitt M.L., Chu G.C., Hebrok M., Fernández-Zapico M.E., Hanahan D. (2009). GLI1 is regulated through Smoothed-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes Dev.* 23:24–36.

Nunna S., Reinhardt R., Ragozin S., Jeltsch A., (2014). Targeted methylation of the epithelial cell adhesion molecule (EPCAM) promoter to silence its expression in ovarian cancer cells, *PLoS one*, 9 e87703.

Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E., (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795–801.

Osborn M.J., Gabriel R., Webber B.R, De Feo A.P., McElroy A.N., Jarjour J., Starker C.G., Wagner J.E., Jounq J.K., Voytas D.F.,(2014). Fanconi anemia gene editing by the CRISPR/Cas9 system, *Human Gene Ther.* 26; 114-126.

Osterlund T., Kogerman P., (2006). Hedgehog signalling: How to get from Smo to Ci and Gli *Trends Cell. Biol.* 16:176–180.

Palle K., Mani C., Tripathi K., Athar M., (2015). Aberrant GLI1 activation in DNA damage response, carcinogenesis and chemoresistance. *Cancers* 7:2330-2351.

Pan Y., Bai C.B., Joyner A.L., Wang B.(2006). Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol. Cell. Biol.* 26: 3365–3377.

Pandolfi S., Stecca B., (2015). Cooperative integration between HEDGEHOG-GLI signalling and other oncogenic pathways: implications for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med.* 9;17:e5.

Park H.L., Bai C., Platt K.A., Matisse M.P., Beeghly A., Hui C.C., Nakashima A. (2000). Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development.* 127(8):1593-605.

- Paul P., et al. (2013) Gli1 transcriptional activity is negatively regulated by AKT2 in neuroblastoma. *Oncotarget* 4:1149-1157.
- Pavletich N.P., Pabo C.O., (1993). Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science* 261:1701–1707.
- Peters C., Wolf A., Wagner M., Kuhlmann J., Waldmann H., (2004). The cholesterol membrane anchor of the Hedgehog protein confers stable membrane association to lipid-modified proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101:8531–8536.
- Petrova R., Joyner A.L., (2014). Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Development*. 141:3445-3457
- Ray A., Meng E., Reed E., Shevde L.A., Rocconi R.P., (2011). Hedgehog signaling pathway regulates the growth of ovarian cancer spheroid forming cells. *International Journal of Oncology* 39: 797-804.
- Reifenberger J., Wolter M., Knobbe C.B., Köhler B., Schönicke A., Scharwächter C., et al. (2005). Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 152(1):43-51.
- Richter H., Randau L., Plagens A., (2013). Exploiting CRISPR/Cas: Interference mechanisms and applications. *Int. J. Mol. Sci.* 13:14518-14531.
- Riobo N.A., et al.(2006). Phosphoinositide3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci.* 103:4505-4510.
- Rizzo P., Osipo C., Foreman K., Golde T., Osborne B., Miele L., (2008). Rational targeting of Notch signaling in cancer. *Oncogene*. 27:5124–31.
- Roschke A.V., Stover K., Tonon G., Schaffer A.A., Kirsch I.R., (2002). Stable Karyotypes in Epithelial Cancer Cell Lines Despite High Rates of Ongoing Structural and Numerical Chromosomal Instability. *Neoplasia* 4 (1):19 – 31.
- Ruiz Altaba A., Mas C., Stecca B., (2007). The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol.* 17:438–447.
- Ruppert J.M., Kinzler K.W., Wong A.J., Bigner S.H., Kao F.T., Law M.L., Seunav H.N., O'Brien S.J., Vogelstein B., (1988). The GLI-Kruppel family of human genes. *Mol. Cell. Biol.* 8:3104–3113.
- Sander J.D., Joung J.K., (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology* 32:4, 347-355.
- Shvets A.A., Kolomeisky A.B., (2017). Mechanism of Genome Interrogation: How CRISPR RNA-Guided Cas9 Proteins Locate Specific Targets on DNA. *Biophys J.* 3;113(7):1416-1424.
- Sasaki H., Nishizaki Y., Hui C., Nakafuku M., Kondoh H., (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 126:3915–3924.
- Sato N., Leopold P. L., Crystal R. G., (1999). Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of Sonic hedgehog. *J. Clin. Invest.* 101: 855-864.
- Schnidar H., et al.(2009). Epidermal growth factor receptor signaling synergizes with Hedgehog/GLI in oncogenic transformation via activation of the MEK/ERK/JUN pathway. *Cancer Research*. 69:1284-1292.

- Shi Q., Han Y., Jiang J., (2014). Suppressor of fused impedes Ci/Gli nuclear import by opposing Trn/Kap β 2 in Hedgehog signaling. *J. Cell Sci.* 127(5): 1092--1103.
- Skoda A.M., Simovic D., Karin V., Kardum V., Vranic S., Serman Lj., (2018). The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci.* 18(1):8-20
- Stecca B. Ruiz i Altaba A., (2010). Context dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. *Journal of Molecular Cell Biology* 2:84-95.
- Sternberg S. H., Redding S., Doudna J.A., (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature.* 507:62–67.
- Stewart C.L., Cullinan E.B., (1997). Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. *Dev Genet.* 21:91-101.
- Stone D.M., Murone M., Luoh S., Ye W., Armanini M.P., Gurney A., Phillips H., Brush J., Goddard A., de Sauvage F.J., et al. (1999). Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 23), 4437–4448.
- Traiffort E., Angot E., Ruat M., (2010). Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *J. Neurochem.* 113: 576-590.
- Velcheti V., Govindan R., (2007). Hedgehog signaling pathway and lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2 (1):7-10.
- Vojta A., Dobrinić P., Tadić V., Bočkor L., Korać P., Julg B., Klasić M., Zoldoš V., (2016). Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation, *Nucleic Acids Res.* gkw159.
- Walterhouse D.O., Lamm M.L., Villavicencio E., Iannaccone P.M., (2003). Emerging roles for hedgehog-patched-Gli signal transduction in reproduction. *Biol Reprod* 69: 8 –14.
- Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., Jaenisch R., (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering, *Cell* 153; 910-918.
- Wiedenheft B., Sternberg S.H., Doudna J.A., (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature.* 482:331–338.
- Xiao A., Cheng Z., Kong L., Zhu Z., Lin S., Gao G., Zhang B., (2014). CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool. *Bioinformatics*, in press.
- Xie K., Yang, Y.. (2013). RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol. Plant* 6:1975–1983.
- Yang L., He J., Huang S., Zhang X., Bian Y., He N., Zhang H., Xie J., (2009). Activation of hedgehog signaling is not a frequent event in ovarian cancers. *Molecular Cancer* 8:112
- Yauch R.L., et al. (2008) A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* 455: 406-410.
- Yi L., Li J.,(2016). CRISPR-Cas9 therapeutics in cancer: promising strategies and present challenges, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1866, 2, (197).

Zaphiropoulos P.G., Undén A.B., Rahnama F., Hollingsworth R.E., Toftgård R., (1999). PTCH2, a novel human patched gene, undergoing alternative splicing and up-regulated in basal cell carcinomas. *Cancer Res.* 59: 787-792.

Zeng C., Chen T., Zhang Y., Chen Q., (2017). Hedgehog signaling pathway regulates ovarian cancer invasion and migration via adhesion molecule CD24. *Journal of Cancer* 8; 786-792.

Zhang F., Wen Y., Guo X., (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*, 23: 40-46.

Zhang X.M., Ramalho-Santos M., McMahon A.P., (2001). Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/ R asymmetry by the mouse node. *Cell* 105:781-792.

Zhang Z., Feng J., Pan C., Zhou Z., Liu F., Zhang L., Zhao Y., (2013). Atrophin-Rpd3 complex represses Hedgehog signaling by acting as a corepressor of CiR. *J. Cell Biol.*, 203:575-583.

Zheng X., Zeng W., Gai X., Xui Q., Li C., Liang Z., Tuoi H., Liu Q., (2013). Role of the Hedgehog pathway in hepatocellular carcinoma (Review). *Oncology Reports.* 30: 2020-2026.

8. ŽIVOTOPIS

Nikolina Rinčić je rođena 06.08.1994. godine u Splitu. Osnovnu i srednju školu je završila u Trogiru. Govori engleski, njemački i slovački jezik. 2013. godine je upisala studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Nakon tri godine školovanja i stjecanja titule prvostupnika, nastavlja obrazovanje na diplomskom studiju Eksperimentalne biologije: modul fiziologija i imunobiologija. Tijekom školovanja je sudjelovala u brojnim manifestacijama s ciljem popularizacije znanosti kao što su Noć biologije te Znanstveni piknik. Diplomski rad je izradila na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za nasljedni rak pod vodstvom dr.sc. Maje Sabol. Dobitnica je top stipendije Općine Marina.