

Utjecaj narušavanja gena HBS1L, PELO, NONO, SND1 na mRNA koja kodira mutirani protein S-adenozilhomocistein-hidrolazu

Šimunić, Ena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:244028>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-01**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ena Šimunić

**UTJECAJ NARUŠAVANJA GENA *HBS1L*,
PELO, *NONO* I *SND1* NA mRNA KOJA
KODIRA MUTIRANI PROTEIN S-
ADENOZILHOMOCISTEIN-HIDROLAZU**

Diplomski rad

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

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za narednu genomiku Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Olivera Vugreka i neposrednim voditeljstvom Filipa Rokića, mag.chem. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec.

Zahvale

Hvala divnim ljudima iz Laboratorija za naprednu genomiku Instituta Ruđer Bošković na strpljenju i pomoći pri izradi ovog rada.

Posebno hvala dr. sc. Oliveru Vugreku na ukazanom povjerenju, pruženoj prilici i mentorstvu.

Najviše i najposebnije hvala Filipu Rokiću na ogromnim žiwcima i najvećem strpljenju sa mnom.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. S-adenozilhomocistein-hidrolaza	3
2.1.1. <i>Struktura i funkcija.....</i>	<i>3</i>
2.1.2. <i>Reakcija koju katalizira S-adenozilhomocistein-hidrolaza.....</i>	<i>4</i>
2.2. Nedostatna aktivnost S-adenozilhomocistein-hidrolaze	7
2.3. Mehanizmi razgradnje mRNA.....	9
2.3.1. <i>Razgradnja mRNA s preuranjenim STOP kodonom</i>	<i>10</i>
2.3.2. <i>Razgradnja mRNA bez STOP kodona.....</i>	<i>11</i>
2.3.3. <i>Razgradnja mRNA uslijed zastajanja ribosoma</i>	<i>11</i>
2.4. Modificiranje genoma.....	13
2.4.1. <i>Prva generacija modificiranja genoma, ZFN i TALEN</i>	<i>14</i>
2.4.2. <i>CRISPR-Cas sustav.....</i>	<i>14</i>
2.4.3. <i>Tipovi CRISPR-Cas sustava.....</i>	<i>15</i>
2.4.4. <i>Tip II CRISPR-Cas sustava.....</i>	<i>16</i>
§ 3. MATERIJALI I METODE.....	19
3.1. Materijali	19
3.1.1. <i>Standardne kemikalije i reagensi.....</i>	<i>19</i>
3.1.2. <i>Puferirane otopine</i>	<i>19</i>
3.1.3. <i>Enzimi</i>	<i>19</i>
3.1.4. <i>Hranjivi medij.....</i>	<i>19</i>
3.1.5. <i>Antibiotici.....</i>	<i>20</i>
3.1.6. <i>Plazmidi</i>	<i>20</i>
3.1.7. <i>Bakterijski sojevi.....</i>	<i>22</i>
3.1.8. <i>Stanične linije.....</i>	<i>22</i>
3.1.9. <i>Komercijalni kompleti.....</i>	<i>22</i>
3.2. Metode.....	22
3.2.1. <i>Odabir gena za narušavanje</i>	<i>22</i>
3.2.2. <i>Dizajn usmjeravajućih nukleotidnih sljedova za narušavanje gena</i>	<i>23</i>
3.2.3. <i>Kloniranje usmjeravajućih nukleotidnih sljedova za narušavanje gena.....</i>	<i>24</i>

3.2.4. Transformacija bakterija <i>E.coli</i> XLI toplinskim šokom.....	26
3.2.5. Nasađivanje prekonocnih kultura za izolaciju plazmida	27
3.2.6. Izolacija plazmida	27
3.2.7. Restriksijska provjera izoliranih plazmida	28
3.2.8. Transformacija bakterija <i>E.coli</i> XLI-elektroporacija i izolacija plazmida za konačnu potvrdu sekvenciranjem.....	28
3.2.9. Mjerenje koncentracije uzoraka DNA - Qubit	29
3.2.10. Konačna potvrda uspješnosti kloniranja - Sanger sekvenciranje	30
3.2.11. Uzgoj staničnih linija HEK293T WT i HEK293 EGFP SAHH YD	30
3.2.12. Određivanje toksičnosti puromicina - MTT test.....	30
3.2.13. Transfekcija- stvaranje lentivirusnih čestica.....	31
3.2.14. Transdukcija- određivanje funkcionalnog titra lentivirusnih čestica.....	32
3.2.15. Transdukcija.....	34
3.2.16. Izolacija DNA i RNA iz staničnih linija s narušenim genima.....	35
3.2.17. Analiza uspješnosti narušavanja gena metodom CRISPR-Cas9: T7 analiza.....	35
3.2.18. Reverzna transkripcija spregnuta s kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze.....	40
3.2.19. Protočna citometrija.....	42
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	44
4.1. Rezultati	44
4.1.1. Kloniranje usmjeravajućih nukleotidnih sljedova za narušavanje gena.....	44
4.1.4. Utjecaj antibiotika na preživljenje stanica - MTT test.....	47
4.1.5. Stvaranje lentivirusnih čestica i određivanje titra	47
4.1.6. Izolacija genomske DNA preživjelih stanica nakon infekcije	48
4.1.7. Analiza modifikacija genoma T7 endonukleazom.....	49
4.1.8. Protočna citometrija	54
4.1.9. Reverzna transkripcija spregnuta s kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (RT-qPCR).....	55
4.2. Rasprava	57
§ 5. ZAKLJUČAK	61
§ 6. LITERATURNI IZVORI.....	62
§ 7. DODATAK.....	LXVI
§ 8. ŽIVOTOPIS	LXVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

UTJECAJ NARUŠAVANJA GENA *HBS1L*, *PELO*, *NONO* I *SND1* NA mRNA KOJA KODIRA MUTIRANI PROTEIN S-ADENOZILHOMOCISTEIN-HIDROLAZU

Ena Šimunić

S-adenozilhomocistein-hidrolaza (SAHH) je enzim koji katalizira reakciju hidrolize S-adenozil-L-homocisteina na adenzin i homocistein. SAHH ima ključnu ulogu u održavanju metilacijskog potencijala u stanici te njegov nedostatak dovodi do teškog metaboličkog poremećaja. Preliminarni podaci pokazuju da jedna od dosad opisanih mutacija (c.982 T>G), uz smanjenje aktivnosti enzima uzrokuje i smanjenje razine SAHH mRNA uz smanjenu razinu proteina SAHH u stanicama pacijenta. Pretpostavlja se da je mehanizam razgradnje uslijed zastajanja ribosoma tijekom translacije vjerojatni mehanizam razgradnje te mRNA. U svrhu potvrde hipoteze generirane su četiri stanične linije u kojima su metodom CRISPR-Cas9 pojedinačno narušeni geni *HBS1L*, *PELO*, *NONO* i *SND1*, potencijalni ključni čimbenici u razgradnji mRNA koja kodira mutirani protein SAHH, te je analiziran utjecaj njihovog narušavanja na razinu ekspresije te mRNA. Rezultati analize razine SAHH mRNA u staničnim linijama s narušenim genima metodom RT-qPCR pokazuju da jedino u staničnoj liniji s narušenim genom *NONO* dolazi do povrata razine ekspresije mutiranog transkripta.

(84 stranica, 30 slika, 18 tablica, 47 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: CRISPR-Cas9, degradacija mRNA, *HBS1L*, *NONO*, *PELO*, SAHH, *SND1*

Mentor: dr. sc. Oliver Vugrek, znanstveni savjetnik

Neposredni voditelj: Filip Rokić, mag. chem.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec.

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
2. izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
3. doc. dr. sc. Ivan Kodrin

Zamjena: doc. dr. sc. Ivica Đilović

Datum diplomskog ispita: 17. veljače 2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

THE EFFECT OF *HBS1L*, *PELO*, *NONO* AND *SND1* KNOCK-OUT ON MUTATED S-ADENOSYLHOMOCYSTEINE HYDROLASE mRNA

Ena Šimunić

S-adenosylhomocystein hydrolase (AHCY) is an enzyme that catalyses hydrolysis of S-adenosyl-L-homocysteine to adenosine and homocysteine. AHCY has the key role in maintaining cells' methylation potential, and its deficiency leads to severe metabolic disorder. Preliminary data shows that one of the mutations described so far (c.982 T>G) leads to decrease of the enzyme function and also causes a decrease of AHCY mRNA levels together with decreased AHCY protein levels in patient cells. It can be assumed that no-go decay is the probable mechanism of AHCY mRNA decay. To test this hypothesis, four knock-out cell lines have been generated. Using a CRISPR-Cas9 mediated approach, four genes, e.g. *HBS1L*, *PELO*, *NONO* and *SND1* have been proposed as potential key factors in AHCY mRNA decay. Subsequently, all aforementioned genes have been individually knocked-out, and knock-out effects on AHCY mRNA expression levels have been analysed. RT-qPCR results show an expected rise in AHCY mRNA levels only in *NONO* knock-out cell line.

(84 pages, 30 figures, 18 tables, 47 references, original in Croatian)

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

Keywords: AHCY deficiency, CRISPR-Cas9, mRNA degradation, HBS1L, NONO, PELO, SND1.

Mentor: Dr. Oliver Vugrek, Senior scientist

Assistant mentor: Filip Rokić, mag. chem.

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
2. Dr. Snežana Miljanić Associate Professor
3. Dr. Ivan Kodrin, Assistant Professor

Substitute: Dr. Ivica Đilović, Assistant Professor

Date of exam: 17th February, 2020.

§ 1. UVOD

S-adenozilhomocistein-hidrolaza (SAHH) katalizira reakciju hidrolize *S*-adenozilhomocisteina (SAH) na adenzil i homocistein¹. Budući da je SAH produkt svih reakcija transmetilacije ovisnih o adenzilmetioninu i njihov kompetitivni inhibitor, njegovo uklanjanje ključno je za održavanje normalnog metilacijskog potencijala stanice te za normalnu funkciju organizma.²

Nedostatna aktivnost SAHH dovodi do inhibicije reakcija transmetilacije ovisnih o adenzilmetioninu što uzrokuje teške metaboličke poremećaje te patološka stanja kod ljudi, kao što su usporen psihomotorni razvoj, miopatija i poremećaji mijelinizacije. Također, teškoj kliničkoj slici doprinose i biokemijski poremećaji kao što su povećana koncentracija SAH, *S*-adenozilmetionina (SAM) te metionina u krvnoj plazmi. Ova teška i nasljedna metabolička bolest uzrokovana nedostatnom aktivnosti enzima SAHH prvi put je opisana u Hrvatskoj 2004. godine.³

Do sada je pronađeno nekoliko mutacija koje uzrokuju smanjenje aktivnosti SAHH (R49C, R49H, G71S, D86G, A89V, Y143C, Y328D i W112Ter). Posebno je zanimljiva mutacija Y328D (c.982 T > G; p.Tyr328Asp) za koju je pokazano da u fibroblastima pacijenta uzrokuje smanjenu ekspresiju mutirane molekule mRNA. Budući da ova mutacija ne uzrokuje preuranjeni STOP kodon, uzrok smanjene razine mutiranog transkripta nije potpuno jasan, no ovaj fenotip primijećen je i u staničnom modelu HEK293 stanica koji stabilno ekspimiraju fuzijski protein EGFP_SAHH_Y328D.

Molekula mRNA nastaje procesom transkripcije, pomoću RNA-polimeraze, na temelju kalupa DNA. Kod eukariota se nakon transkripcije doraduje te potom služi kao kalup u translaciji za nastajanje polipeptidnog lanca. Po završetku translacije mRNA se razgrađuje staničnim mehanizmima za degradaciju mRNA. U stanici se razgrađuju i pogrešni transkripti i polipeptidi čime se sprječava nastajanje pogrešnih proteina. Dosada poznati mehanizmi degradacije mRNA uključuju mehanizam degradacije mRNA s preuranjenim STOP kodonom (engl. *non-sense mediated decay*, *NMD*)⁴ mehanizam degradacije mRNA bez STOP kodona (engl. *non-STOP decay*, *NSD*)⁵ i mehanizam degradacije mRNA uslijed zastalih ribosoma (engl. *no-go decay*, *NGD*)⁶. Budući da mutacija Y328D (c.982 T > G; p.Tyr328Asp) ne dovodi do nestanka ili nastanka preuranjenog STOP kodona, pretpostavlja se da bi

mehanizam degradacije uslijed zastalih ribosoma mogao biti odgovoran za primijećenu smanjenu razinu mRNA mutiranog enzima SAHH.

Kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* identificirana su dva proteina Hbs1 i Dom34 (humani Pelota homolog) koja sudjeluju u mehanizmu degradacije mRNA uslijed zastalih ribosoma.⁷ Iako njihova uloga u višim organizmima nije potpuno razjašnjena, može se pretpostaviti da bi njihovi homolozi mogli imati ulogu u mehanizmu degradacije mRNA uslijed zastalih ribosoma i kod čovjeka, budući da se radi se o evolucijski očuvanim proteinima.⁷ Preliminarnim istraživanjima diferencijalnog vezanja proteina na mRNA enzima SAHH divljeg tipa i na mRNA mutiranog enzima identificirano je oko 40 proteina koji se vežu na mRNA. Iz dobivenih podataka izdvojena su dva proteina, odnosno gena, *NONO* i *SND1*, čija funkcija nije u potpunosti razjašnjena, no trenutno dostupni podaci ukazuju na mogućnost njihovog utjecaja na smanjenu razinu ekspresije mRNA mutiranog enzima. Zbog toga su oni, zajedno s genima *HBS1L* i *PELO*, odabrani za istraživanje u ovom radu.

Cilj ovog rada je istražiti utjecaj narušavanja gena *HBS1L*, *PELO*, *NONO* i *SND1* na razinu ekspresije mRNA koja kodira mutirani protein SAHH. Za narušavanje gena koristit će se metoda modificiranja genoma CRISPR-Cas na staničnoj liniji HEK293-EGFP-SAHH-YD koja stabilno eksprimira fuzijski protein EGFP-SAHH-Y328D. Uspješnost modifikacije genoma na razini DNA provjerit će se pomoću endonukleaze T7. Ekspresija mutirane molekule mRNA koja kodira za fuzijski protein EGFP-SAHH-Y328D u staničnim linijama s narušenim genima analizirat će se metodom reverzne transkripcije spregnute s kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (RT-qPCR), dok će se protočnom citometrijom analizirati promjene u proteinskoj ekspresiji fuzijskog proteina SAHH.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. S-adenozilhomocistein-hidrolaza

2.1.1. Struktura i funkcija

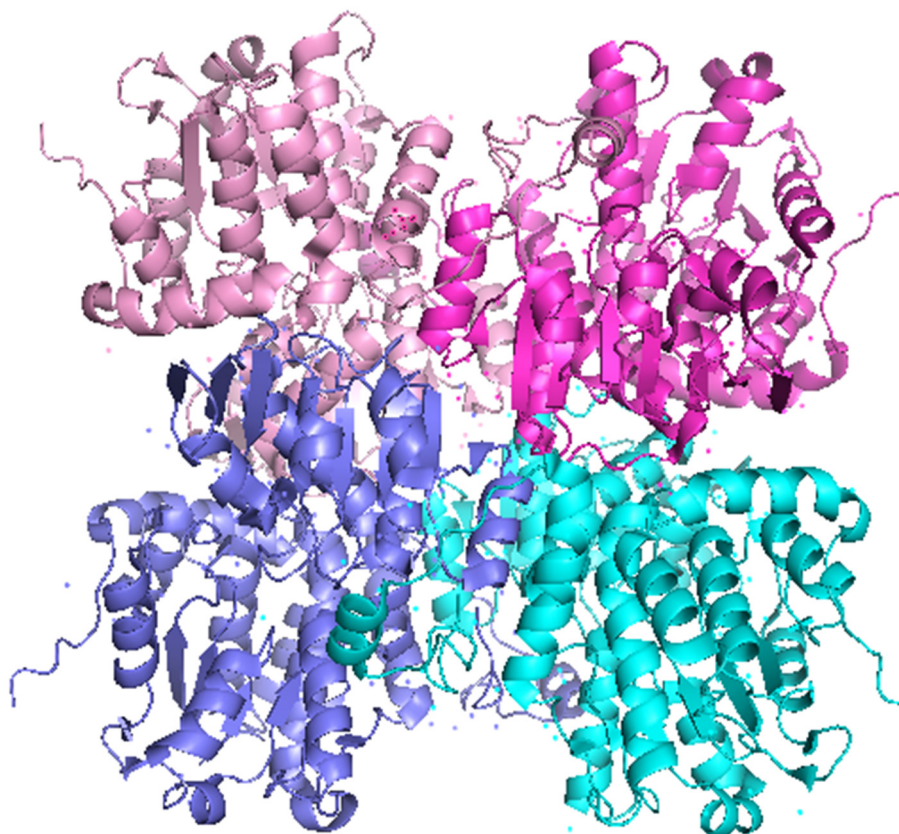
Enzim S-adenozilhomocistein-hidrolaza (SAHH) prvi je put opisan 1959. godine. Katalizira reakciju sinteze S-adenozilhomocisteina (SAH) iz adozina i L-homocisteina uz pomoć kofaktora NAD⁺. Reakcija je reverzibilna te je pri fiziološkim uvjetima ravnoteža pomaknuta u smjeru hidrolize SAH zbog brzog uklanjanja adozina i homocisteina odgovarajućim metaboličkim putevima. Ukoliko se produkti reakcije hidrolize ne uklanjaju, ravnoteža reakcije pomaknuta je u smjeru sinteze S-adenozilhomocisteina.¹ S-adenozilhomocistein-hidrolaza visoko je specifičan enzim i jedini koji kod sisavaca hidrolizira S-adenozinhomocistein, produkt svih reakcija transmetilacije ovisnih o adozilmetioninu, što ga čini ključnim faktorom za pravilno održavanje cjelokupnog staničnog metilacijskog potencijala.²

SAHH je jedan od evolucijski najočuvanijih enzima, njegova se evolucija može pratiti od bakterija do suvremenih sisavaca i biljaka.⁸ Kod čovjeka, gen za SAHH, približne veličine 31,5 kb, nalazi se na 20. kromosomu, na položaju 20q11.22.⁹ Do danas je identificirano 6 različitih transkripcijskih varijanti gena, a najčešća izoforma 1, kodira za polipeptid od 432 aminokiseline. U nastavku je prikazan aminokiselinski slijed humanog proteina SAHH (izoforme 1), preuzet iz baze podataka NCBI (NP_000678.1)¹⁰

```
MSDKLPYKVADIGLAAWGRKALDIAENEMPGLMRMRERYASASKPLKGARIAGCLHMTVETAVLIETLVTL  
GAEVQWSSCNIFSTQDHA AAAIAKAGIPVYAWKGETDEEYLWCIEQTLYFKDGPLNMI LDDGGDLTNLIH  
TKYPQLLP G I R G I S E E T T T G V H N L Y K M M A N G I L K V P A I N V N D S V T K S K F D N L Y G C R E S L I D G I K R A T D V M  
I A G K V A V V A G Y G D V G K G C A Q A L R G F G A R V I I T E I D P I N A L Q A A M E G Y E V T T M D E A C Q E G N I F V T T T G C I D  
I I L G R H F E Q M K D D A I V C N I G H F D V E I D V K W L N E N A V E K V N I K P Q V D R Y R L K N G R R I I L L A E G R L V N L G C A  
M G H P S F V M S N S F T N Q V M A Q I E L W T H P D K Y P V G V H F L P K K L D E A V A E A H L G K L N V K L T K L T E K Q A Q Y L G M S  
C D G P F K P D H Y R Y
```

Iz kristalne strukture S-adenozilhomocistein-hidrolaze vidljivo je da se radi o tetrameru. Svaka podjedinica sastoji se od C-terminalne domene, katalitičke domene i domene za vezanje kofaktora. Struktura enzima vrlo je slična stukturi NAD/NADH-ovisnih dehidrogenaza, no za razliku od njih, kod SAHH su za vezanje kofaktora potrebne dvije podjedinice (dimer). Za rigidnu strukturu središnjeg dijela enzima dva dimera se trebaju povezati u tetramer. Podjedinice su čvrsto povezane u sredini tetramera, a rubni dijelovi, na

kojima se nalaze katalitičke domene su mobilniji. Katalitičke domene povezane su domenama za vezanje kofaktora. Kombinacijom rigidne sredine i fleksibilnog vanjskog dijela, SAHH postiže dvije konformacije - otvorenu i zatvorenu. Kada ligand nije vezan, enzim je u otvorenoj konformaciji, s aktivnim mjestom izloženom okolini. Vezanjem liganda dolazi do konformacijske promjene te enzim prelazi u zatvorenu konformaciju. Ligand se veže u katalitičku domenu koja se zatim približava domeni za vezanje kofaktora.¹¹

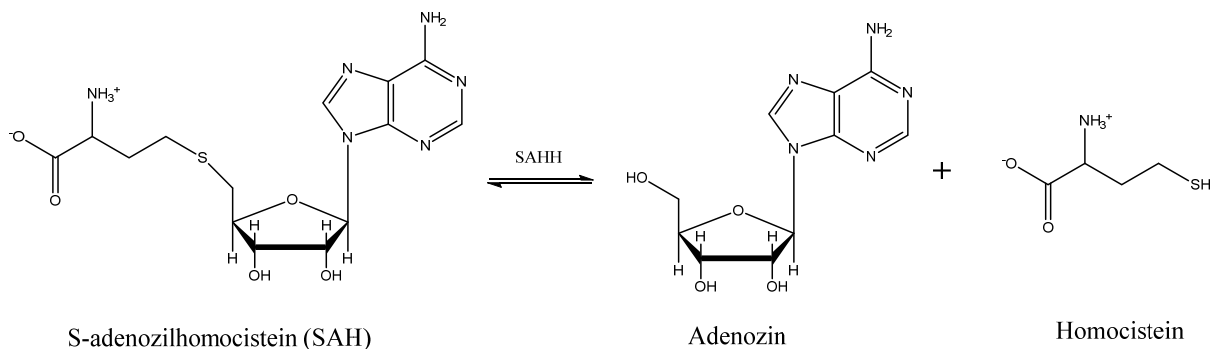


Slika 1. Tetramerna struktura proteina SAHH, svaki monomer prikazan je drugačijom bojom.¹²

2.1.2. Reakcija koju katalizira *S*-adenozilhomocistein-hidrolaza

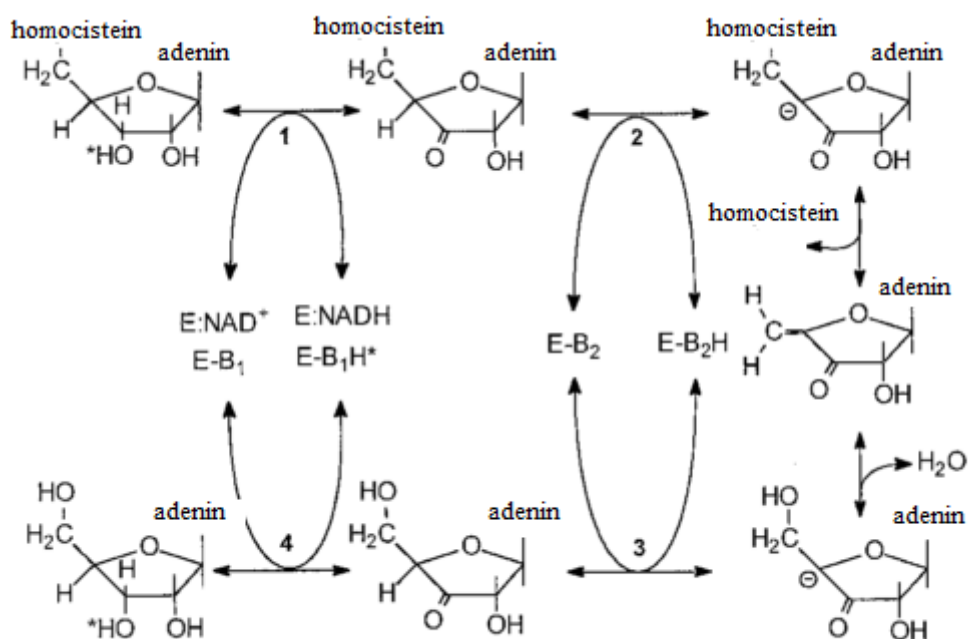
S-adenozilhomocistein-hidrolaza (SAHH) u *in vivo* uvjetima katalizira reakciju hidrolize *S*-adenozilhomocisteina na homocistein i adozin (slika 2). *S*-adenozilhomocistein (SAH) je produkt mnogobrojnih bioloških reakcija transmetilacije. Nastaje prijenosom aktivirane metilne skupine sa *S*-adenozilmetionina (SAM) na velik broj različitih supstrata, kao što su DNA, RNA, proteini, polisaharidi te fosfolipidi.²

Pri povišenim koncentracijama, SAH djeluje kao kompetitivni inhibitor metiltransferaza ovisnih o *S*-adenozilmetioninu. Budući da je SAHH jedini enzim kod sisavaca koji hidrolizira *S*-adenozilhomocistein, njegova je uloga ključna u mnogobrojnim staničnim putevima. Osigurava normalno odvijanje cijelog spektra različitih metaboličkih reakcija, zbog čega nedostatak enzima ili njegova smanjena funkcija imaju ozbiljne posljedice na organizam.



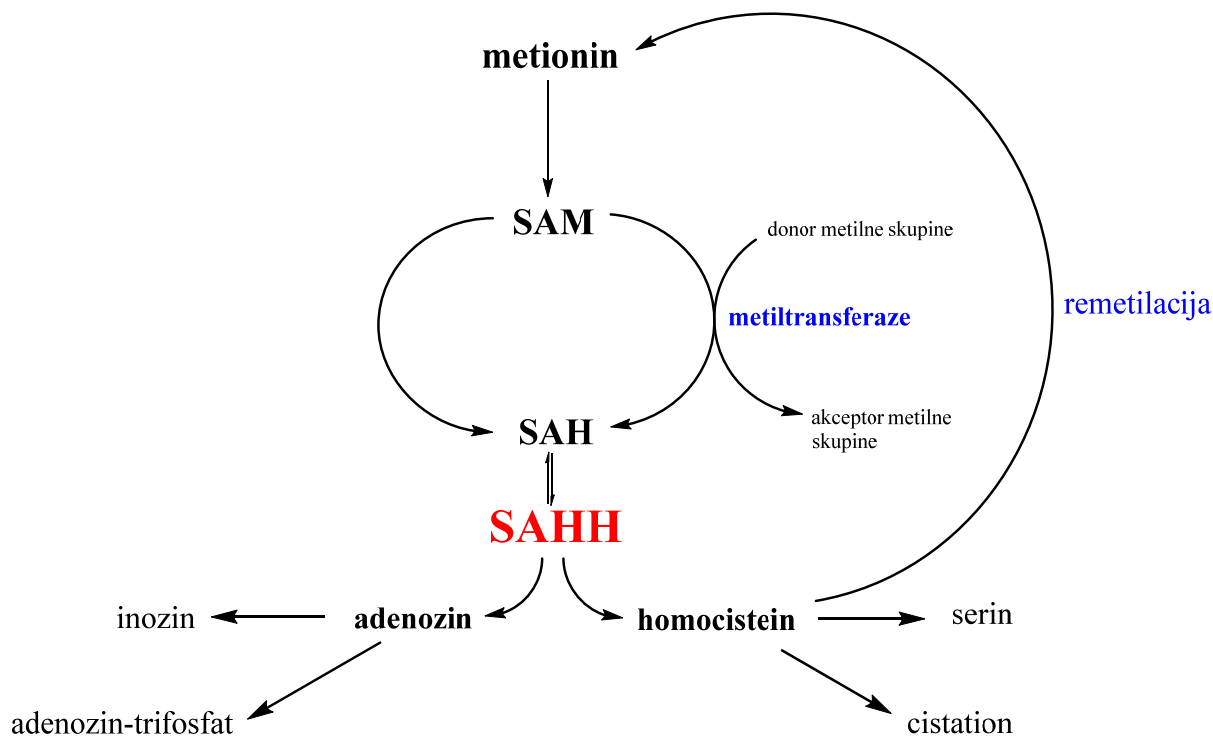
Slika 2. Reakcija koju katalizira *S*-adenozilhomocistein-hidrolaza. Nacrtno pomoću programa ChemDraw Professional 15.1.

Reakcija koju katalizira *S*-adenozilhomocistein-hidrolaza ovisna je o kofaktoru NAD^+ . Mehanizam reakcije započinje oksidacijom ugljika na položaju 3' čime nastaje 3'-ketoadenozinski međuprodukt i NADH . Nastanak oksidiranog intermedijera omogućuje bazi iz aktivnog mjesta deprotoniranje položaja 4'. β -eliminacijom homocisteina nastaje 3'-keto-4',5'-dehidroadenzin, te u posljednjem koraku dolazi do Michaelove adicije vode na dvostruku vezu i regeneracije NAD^+ . Mehanizam reakcije prikazan je na slici 3. Na temelju kinetičkih mjerenja i kristalne strukture mutiranog enzima i divljeg tipa pokazano je da ključnu ulogu u mehanizmu reakcije imaju aminokiselinski ostaci His54, Asp130, Glu155, Lys185 i Asp189.¹³



Slika 3. Shematski prikaz mehanizma reakcije katalizirane *S*-adenozilhomocistein-hidrolazom, preuzeto i modificirano iz ¹³

Produkti reakcije hidrolize, adenzin i homocistein, koriste se kao supstrati u ostalim metaboličkim putevima. Adenzin se u metaboličkom putu razgradnje purinskih baza prevodi u inozin djelovanjem adenzin-deaminaze ili u adenzin-trifosfat pomoću adenzin-kinaze. Homocistein sudjeluje u biosintezi metionina i citozina. Metionin nastaje u jetri i bubrezima remetilacijom homocisteina pomoću betaina ili prijenosom metilne skupine s 5-metiltetrahidrofolata na homocistein pomoću metionin-sintaze. Reakcijom transulfuracije iz homocisteina nastaje cistation djelovanjem cistation- β -sintaze, koji potom sudjeluje u metaboličkom putu biosinteze citozina (slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz metaboličkih puteva u koje je uključen SAHH. Preuzeto i modificirano iz ¹⁴.

2.2. Nedostatna aktivnost *S*-adenozilhomocistein-hidrolaze

Nedostatna aktivnost *S*-adenozilhomocistein hidrolaze teška je i nasljedna metabolička bolest, prvi puta opisana u Hrvatskoj 2004. godine.³ Zbog iznimno važne uloge SAHH u brojnim metaboličkim reakcijama, njena smanjena aktivnost dovodi do teških metaboličkih poremećaja, najviše zbog inhibicije metiltransferaza ovisnih o *S*-adenozilmetioninu. Ključni simptomi nedostatne aktivnosti enzima SAHH su usporeni psihomotorni razvoj, miopatija (smanjen tonus mišića) te poremećaji mijelinizacije.¹⁵ Ovakve kliničke slike popraćene su i biokemijskim poremećajima povišenih koncentracija *S*-adenozilhomocisteina (SAH), *S*-adenozilmetionina (SAM) i metionina u krvnoj plazmi.¹⁶

Do sada je identificirano nekoliko mutacija koje uzrokuju smanjenu aktivnost SAHH. Mutacije R49C, R49H, G71S, D86G, A89V i W112Ter nalaze se u domeni za vezanje supstrata SAH, mutacija Y143C u aktivnom mjestu enzima (katalitičkoj domeni), a mutacija Y328D nalazi se u domeni za vezanje kofaktora NAD⁺. Većina navedenih mutacija (R49C, G71S, D86G, A89V i Y328D) spada u skupinu mutacija u kojima je originalna aminokiselina zamijenjena drugom aminokiselinom (engl. *missense*). Takve mutacije često dovode do

neaktivnosti enzima ili njegove smanjene funkcije. Mutacija W112Ter uzrokuje preuranjeni STOP kodon, što dovodi do nepotpune translacije i biosinteze proteina te potpunog gubitka aktivnosti enzima.³

Prvi pacijent kojem je dijagnosticiran nedostatak funkcije enzima SAHH bio je dječak iz Hrvatske, čiji je psihomotorni razvoj od rođenja bio usporen. Glavni simptomi poremećaja bili su smanjen tonus mišića, loša kontrola pokreta glave te nezainteresiranost za podražaje. Laboratorijskim dijagnostičkim pretragama krvi uočene su povišene razine alanin-aminotransferaze, aspartat-aminotransferaze te kreatin-kinaze. Također, u krvnoj plazmi uočene su znatno povišene razine metionina, S-adenozilhomocisteina i S-adenozilmetionina. Dijagnostičkim pretragama aktivnosti enzima SAHH uočena je njegova smanjena aktivnost, točnije samo 3% aktivnosti u ekstraktima jetre i 5-10% aktivnosti u ekstraktima fibroblasta i hemolizatima eritrocita.³

Sekvenciranjem gena koji kodira za S-adenozilhomocistein-hidrolazu kod pacijenta su otkrivene dvije točkaste mutacije u 4. eksonu, po jedna u svakom alelu. Mutacije se nalaze na položajima c.336 G > A; p.W112Ter i c.428A > G; p.Y143C te je svaka naslijeđena od jednog roditelja. Mutacija naslijeđena od majke, na položaju 112 aminokiselinskog slijeda proteina, uvodi preuranjeni STOP kodon, dok mutacija naslijeđena od oca, na položaju 143 mijenja tirozin u cistein.³ Daljnja istraživanja enzima SAHH s mutacijom Y143C pokazala su da mutirani enzim ne zadržava svoju tetramernu strukturu, već se raspada na monomere, što dovodi do potpunog gubitka njegove funkcije.¹⁶

Drugi pacijent bio je mlađi brat prvog pacijenta. Od rođenja je pokazivao iste simptome nedostatne aktivnosti enzima SAHH. Kao terapija, ograničena je količina metionina u prehrani oba pacijenta. Oba pacijenta počela su napredovati u psihomotornom razvoju nakon uvođenja restriktivne prehrane.¹⁷ Treći pacijent kod kojeg je dijagnosticirana nedostatna aktivnost enzima SAHH bio je 26-godišnjak koji je, kao i prva dva pacijenta, od rođenja pokazivao znakove usporenog psihomotornog razvoja. Njegova je dijagnoza postavljena na temelju povišene koncentracije S-adenozilhomocisteina u krvnoj plazmi i mutacija u genu za SAHH pronađenih sekvenciranjem. Radi se o dvije točkaste mutacije, prethodno opisanoj mutaciji Y143C (c.428A > G; p.Y143C) naslijeđenoj od oca i mutaciji A89V (c.266C > T; p.A89V) koja nije pronađena kod roditelja. Daljnjim istraživanjima utvrđeno je da mutacija A89V također uzrokuje znatno smanjenje funkcije enzima.¹⁸

Godine 2015. opisana je nova mutacija, Y328D (c.982 T > G; p.Tyr328Asp) kod pacijentice koja je od najranije dobi pokazivala sve već navedene simptome.¹⁴ Za ovu mutaciju je također ustanovljeno da uzrokuje znatno smanjenje aktivnosti enzima SAHH, tako što onemogućuje dimerizaciju podjedinica, zbog čega enzim ne može zauzeti funkcionalnu tetramernu strukturu. U daljnjim istraživanjima pokazana je i smanjena ekspresija molekule mRNA kao i samog proteina u fibroblastima pacijenta s naslijeđenim mutacijama Y143C i Y328D u genu za SAHH. Budući da obje navedene mutacije ne dovode do nastanka STOP kodona, smanjena razina mRNA kod pacijenta ostaje nerazjašnjena. Ne može se objasniti pomoću staničnog mehanizma za uklanjanje transkripata s preuranjenim STOP kodonom (engl. *non-sense mediated decay*, NMD), s obzirom da ga ne sadrži, te se pretpostavlja da do smanjene razine mRNA dolazi zbog aktivacije nekog drugog staničnog mehanizma uklanjanja pogrešnih transkripata. U staničnom modelu koji stabilno eksprimira mutirani SAHH Y328D (c.982 T > G; p.Tyr328Asp) također je zabilježena smanjena razina mRNA.¹⁹

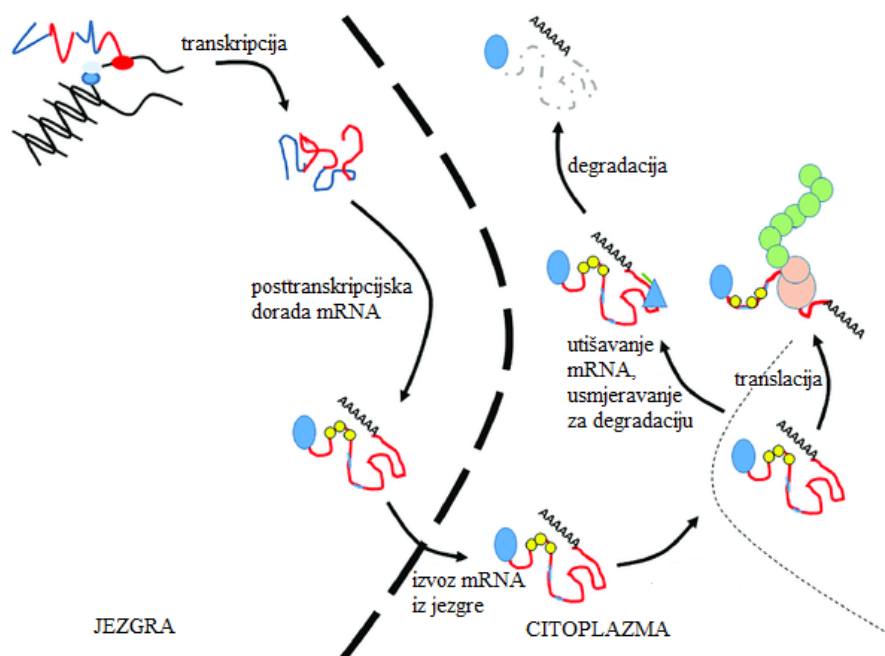
2.3. Mehanizmi razgradnje mRNA

Molekula mRNA nastaje procesom transkripcije pomoću RNA-polimeraze koja kao kalup koristi DNA. Kod eukariota, mRNA se nakon transkripcije doraduje. Na 3' kraj dodaje se poliadenozinski rep, a na 5' kraj 7-metilgvanozinska kapa. Posttranskripcijski doradena mRNA spremna je za sljedeći korak u biosintezi proteina, odnosno translaciju, gdje dolazi do sinteze polipeptidnih lanaca na ribosomima u citoplazmi.

Proces translacije odvija se u tri faze: inicijacija, elongacija i terminacija. U fazi inicijacije sastavlja se 80S ribosomski kompleks sa inicijatorskom metionil-tRNA^{Met} u P mjestu ribosoma na START kodonu mRNA. Proces inicijacije pokreću inicijatorski faktori u citoplazmi. U fazi elongacije produžuje se polipeptidni lanac, aminoacilirana tRNA veže se u A mjesto ribosoma te nastaje peptidna veza između aminokiselina u A i P mjestu. Deacilirana tRNA se iz P mjesta ribosoma, pomakom ribosoma za jedan kodon prema 3'-kraju mRNA, pomiče u E mjesto, gdje se otpušta u citoplazmu. Elongaciju omogućuju elongacijski faktori. Posljednja faza sinteze polipeptidnog lanca je faza terminacije. Ulaskom STOP kodona na mRNA u P mjesto ribosoma terminacijski faktori uzrokuju hidrolizu terminalne peptidil-tRNA veze, otpuštanje sintetiziranog polipeptidnog lanca i slobodne tRNA u citoplazmu te rastavljanje 80S ribosomskog kompleksa na 40S i 60S podjedinice.

Nakon završetka translacije, molekula mRNA se daljnjim staničnim mehanizmima usmjerava prema degradaciji. Dva glavna puta degradacije započinju deadenilacijom 3'-

poliadenozinskog kraja mRNA te uklanjanjem „kape“ s 5'-kraja, što dovodi do degradacije mRNA u 3'→5' i 5'→3' smjeru. Održavanje ravnoteže između translacije i degradacije mRNA važno je za regulaciju ekspresije gena.²⁰



Slika 5. Životni ciklus mRNA. Preuzeto i modificirano iz ²¹.

Kako bi se osigurala točnost cjelokupnog procesa biosinteze proteina, stanica provodi različite mehanizme nadzora, popravka te u konačnici uklanjanja transkripata koji sadrže grešku. Pogreške u biosintezi mRNA mogu se pojaviti u svim koracima: prilikom transkripcije, dorade 5'- i 3'- kraja te poliadenilacije. Takve pogrešno sintetizirane mRNA mogu dovesti do nastanka pogrešnog produkta translacije, odnosno do nastajanja pogrešnog polipeptidnog lanca. Kako bi se to izbjeglo, u stanici su prisutni različiti mehanizmi degradacije odnosno uklanjanja pogrešno sintetiziranih molekula mRNA.

2.3.1. Razgradnja mRNA s preuranjenim STOP kodonom

Najpoznatiji mehanizam razgradnje mRNA je razgradnja mRNA koja sadrži preuranjeni STOP kodon (engl. *non-sense mediated decay (NMD)*) kojim se uklanjaju mRNA koje sadrže preuranjeni STOP kodon. Preuranjeni STOP kodon u molekuli mRNA može nastati zbog točkaste mutacije, pomaka okvira čitanja ili uslijed pogrešaka kod dorade primarnog

transkripta. Ukoliko se takva mRNA ne bi uklonila, translacijom bi došlo do sinteze nepotpunog polipeptidnog lanca te do nastanka nefunkcionalnog proteina.

Ovaj mehanizam uklanjanja pogrešno sintetiziranih mRNA jedan je od najbolje istraženih i prisutan je u gotovo svim organizmima.⁴ S medicinske perspektive, ima važnu ulogu u fenotipskom izražavanju genetičkih poremećaja koji su posljedica preuranjene terminacije translacije zbog postojanja preuranjenog STOP kodona. Ključnu ulogu u ovom mehanizmu degradacije imaju RNA-helikaze. Koriste ATP kako bi se pomicale duž mRNA i uklanjale sekundarne strukture te djeluju kao „markeri“ koji su privremeno vezani na jednom mjestu. Na taj način signaliziraju drugim sudionicima degradacijskog mehanizma koja mRNA se treba ukloniti. Kod većine organizama, za ovaj mehanizam degradacije mRNA, najvažnija je ATP-ovisna RNA-helikaza UPF1/SMG2 iz obitelji helikaza SF1. Fosforilacijom helikaza prelazi u aktivan oblik, uklanja proteine vezane na mRNA te njene sekundarne strukture, što oslobađa put nukleazama za degradaciju.⁴

2.3.2. Razgradnja mRNA bez STOP kodona

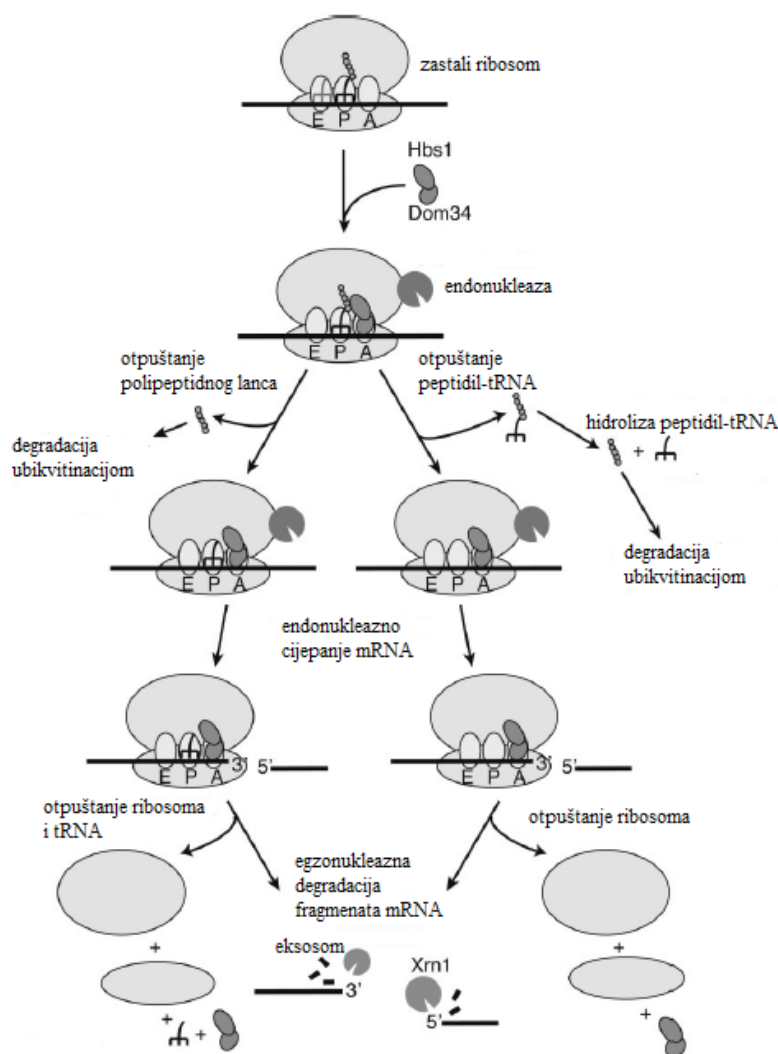
Nasuprot mRNA s preuranjenim STOP kodonom, uslijed mutacija i pogrešaka tijekom biosinteze, mogu nastati molekule mRNA bez STOP kodona, koje se razgrađuju procesom razgradnje mRNA bez STOP kodona (engl. *non-stop decay*, NSD).

U stanicama sisavaca ključnu ulogu u ovom mehanizmu degradacije imaju SKI kompleks i adaptorski protein Ski7. Struktura C-kraja proteina Ski7 slična je strukturi elongacijskog faktora EF1A i faktora otpuštanja eRF3, što omogućuje vezanje proteina Ski7 u A mjesto ribosoma zastalog na 3' kraju mRNA. Posljedično, dolazi do otpuštanja ribosoma i terminacije translacije. SKI kompleks povezan s eksosomom potom deadenilira i degradira nastali transkript u 3' → 5' smjeru.⁵

2.3.3. Razgradnja mRNA uslijed zastajanja ribosoma

Mehanizam razgradnje mRNA uslijed zastajanja ribosoma (engl. *no-go decay*, NGD) još je jedan od mehanizama popravka pogreške koji djeluju tijekom translacije u eukariotskim stanicama. Mehanizam prepoznaje mRNA na kojima zastaju ribosomi tijekom koraka elongacije u translaciji i označava ih za endonukleazno cijepanje. Nastali fragmenti mRNA uklanjaju se egzonukleazom *Xrn1* u 5' → 3' smjeru.

Dva evolucijski očuvana proteina Dom34 (humani Pelota homolog) i Hbs1 pokreću mehanizam degradacije mRNA uslijed zastajanja ribosoma. Ovi proteini su slični faktorima otpuštanja eRF1 i eRF3, pa se pretpostavlja da mehanizam ovog procesa nalikuje na proces terminacije translacije. Prilikom elongacije ribosom može zastati zbog npr. postojanja sekundarnih struktura mRNA. Ukoliko zastoje traje duže i pritom je A mjesto ribosoma prazno, dolazi do interakcije kompleksa Dom34/Hbs1 s A mjestom ribosoma. Ta interakcija dovodi do hidrolize peptidil-tRNA i otpuštanja polipeptidnog lanca ili do otpuštanja peptidil-tRNA dok ribosom ostaje vezan na mRNA. U sljedećem koraku postoje tri mogućnosti: može doći do nukleaznog cijepanja mRNA u blizini ribosoma, do otpuštanja ribosoma i do degradacije nastalog polipeptidnog lanca ubikvitinacijom. Na kraju se fragmenti mRNA uklanjaju egzokleazom *Xrn1* ili eksosomom. (slika 6).⁶

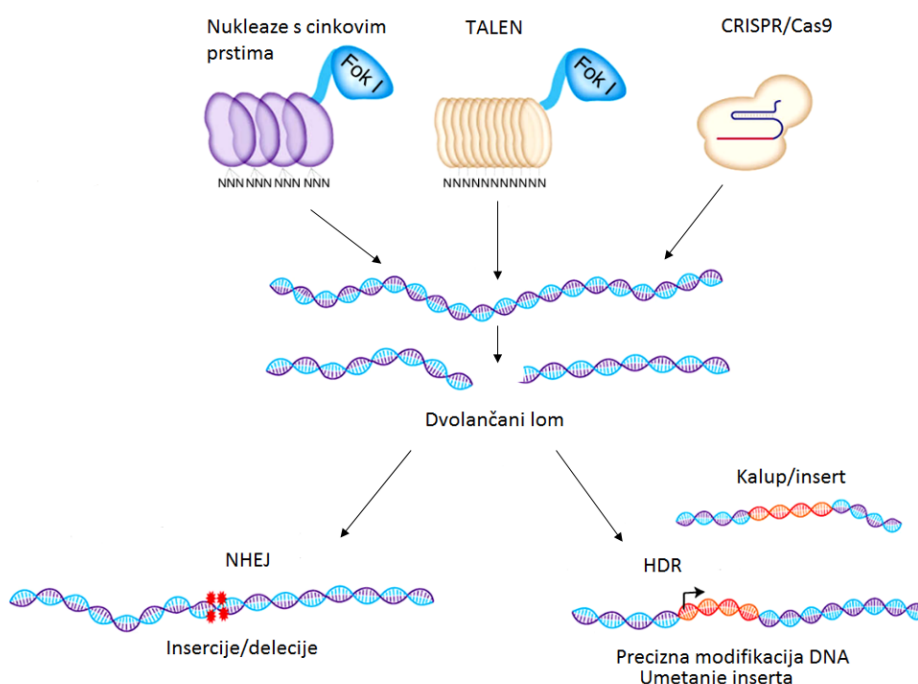


Slika 6. Razgradnja mRNA uslijed zastajanja ribosoma (engl. *no-go decay*), pretpostavljeni mehanizam, preuzeto i modificirano iz ⁶

2.4. Modificiranje genoma

Razvoj novih tehnologija i metoda manipulacije genoma početkom 21. stoljeća obilježio je prekretnicu za biološka i medicinska istraživanja te modernu znanost općenito. Uvođenje modifikacija u genome živih organizama omogućilo je i unaprijedilo istraživanje nasljednih genetskih bolesti i poremećaja te razvoj boljih modelnih sustava.

Do danas je razvijeno nekoliko metoda modifikacije genoma (ZFN, TALEN, CRISPR-Cas) koje se temelje na uvođenju ciljanog dvolančanog loma molekule DNA. Nastalo oštećenje DNA stanica nastoji ukloniti postojećim mehanizmima popravka koji uključuju nehomologno spajanje krajeva (engl. *nonhomologous end-joining*, *NHEJ*) ili homolognu rekombinaciju. Nehomologno spajanje krajeva dovodi do uvođenja insercija i delecija na mjestu dvolančanog loma što često uzrokuje pomak okvira čitanja, odnosno narušavanje funkcije modificiranog gena (engl. *knock-down*). Ovaj pristup inaktivacije određenog gena omogućuje proučavanje njegove funkcije te njegovog utjecaja na mnogobrojna patogena stanja prisutna kod oboljelih pacijenata. S druge strane, homologna rekombinacija omogućuje ugradnju željene mutacije ili cijelog inserta na ciljano mjesto u genomu (engl. *knock-in*) čime uvelike unaprjeđuje razvoj životinjskih i staničnih modela u znanosti i medicini.



Slika 7. Shematski prikaz metoda modificiranja genoma, preuzeto i modificirano iz²².

2.4.1. Prva generacija modificiranja genoma, ZFN i TALEN

Prve metode uvođenja modifikacija u genom temeljene su na nukleazama s cinkovim prstima (engl. *zinc-finger nucleases, ZFNs*) te transkripcijskim efektorskim nukleazama (engl. *transcription activator-like effector nucleases, TALENs*). Obje metode koriste prethodno programirane nukleaze sastavljene od DNA-vezujućih domena specifičnih za ciljani nukleotidni slijed, te domene za nespecifično cijepanje DNA endonukleaze Fok I. Cijepanjem DNA uvode se dvolančani lomovi te se pokreću prethodno spomenuti stanični mehanizmi za popravak molekule DNA.

Kod eukariota, proteini koji mogu vezati DNA najčešće sadrže domenu cinkovog prsta s motivom Cys₂-His₂. Sam cinkov prst najčešće se sastoji od tridesetak aminokiselina te ima očuvanu ββα konfiguraciju. Aminokiseline na površini α-zavojnice, s različitim stupnjem selektivnosti, vežu tri para baza u velikom utoru DNA. Modularna struktura cinkovog prsta i endonukleaze Fok I omogućuje stvaranje sintetskih varijanti proteina za vezanje određenih nukleotidnih slijedova u DNA, što omogućuje uvođenje modifikacija na željeno mjesto u genom.²³

Kao i cinkovi prsti, TALE nukleaze prepoznaju specifične nukleotidne slijedove. Potječu iz patogenih bakterija *Xanthomonas*, koje uzrokuju bolesti kod biljaka, te sadrže DNA-vezujuće domene sastavljene od 33-35 ponavljajućih aminokiselina koje prepoznaju određeni par nukleotidnih baza. Specifičnost TALE nukleaza određena je s dvije hipervarijabilne aminokiseline (engl. *repeat-variable disresidues, RVDs*). Fuzioniranjem efektorskih domena na ponavljajuće aminokiselinske slijedove TALE nukleaza mogu se dobiti sintetski proteini za uvođenje ciljanih modifikacija u genom.²⁴

2.4.2. CRISPR-Cas sustav

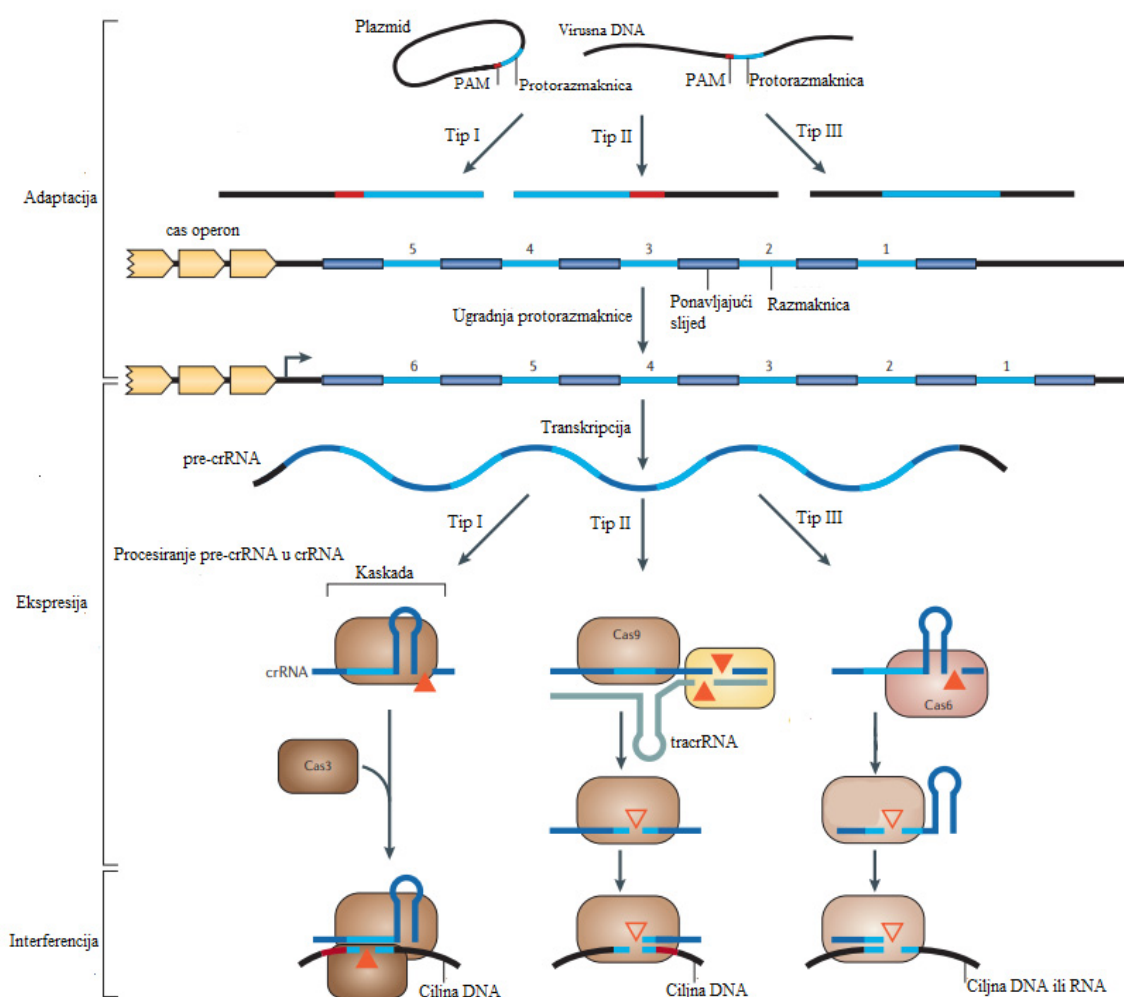
CRISPR (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) - Cas (engl. *CRISPR-associated*) sustav jedna je od najnovijih metoda modificiranja genoma različitih organizama. Razvijena je na temelju kratkih ponavljajućih nukleotidnih slijedova pronađenih u genomima prokariota koji potječu od DNA virusa koji su prethodno inficirali bakteriju. Također je ustanovljeno da ti ponavljajući slijedovi imaju vrlo važnu ulogu u imunološkom sustavu bakterija te zapravo omogućuju vrlo specifično prepoznavanje i obranu od virusnih DNA ukoliko dođe do ponovne infekcije.²⁵

CRISPR-Cas sustav kod bakterija djeluje u tri faze (adaptacija, ekspresija i interferencija) te osigurava specifično ciljanje egzogenih nukleinskih kiselina pomoću informacija zapisanih u genomu bakterija te posredovanjem molekula RNA. Kratki sljedovi DNA preuzeti od virusa, prilikom transkripcije prepisuju se u male interferirajuće CRISPR RNA (crRNA) koje tvore ribonukleoproteinski kompleks s endonukleazom Cas te je usmjeravaju prema komplementarnim sljedovima koji se trebaju cijepati.²⁶ CRISPR-Cas sustav može se koristiti i u eukariotskim stanicama za ciljanu modifikaciju genoma, pomoću dizajniranog oligonukleotidnog slijeda veličine oko 20 nukleotida sadržanog unutar usmjeravajuće RNA. Do sada su opisana tri tipa i deset podtipova CRISPR-Cas sustava, no zbog iznimne kompleksnosti i raznovrsnosti sustava, pretpostavlja se da ih ima još mnogo neopisanih.²⁷

2.4.3. Tipovi CRISPR-Cas sustava

Svi tipovi CRISPR-Cas sustava imaju zajedničke molekularne mehanizme djelovanja, a najviše se razlikuju po tipu ribonukleoproteinskog kompleksa crRNA:Cas.²⁶ U koraku adaptacije kod tipa I, izbor protorazmaknice (nukleotidnog slijeda preuzetog od virusa, engl. *proto-spacer*) temelji se na vrsti PAM motiva (engl. *proto-spacer adjacent motif*). Odabrana protorazmaknica se zatim ugrađuje u CRISPR lokus kako bi se mogla eksprimirati u sljedećem koraku. Ekspresijom ugrađene razmaknice nastaje CRISPR transkript (pre-crRNA) koji zatim kompleks pod nazivom Kaskada cijepa te nastaje crRNA, s ponavljajućim fragmentom od 8 nukleotida na 5'-kraju i strukturom ukosnice na 3'-kraju. U koraku interferencije, crRNA usmjerava kompleks Kaskadu do ciljnog, komplementarnog nukleotidnog slijeda, što dovodi do cijepanja strane molekule DNA nukleazom Cas3.²⁸

Tip III CRISPR-Cas sustava djeluje na sličan način kao tip I, no u koraku adaptacije nisu važni PAM slijedovi. U koraku ekspresije nastaje pre-crRNA, koja se zatim doručuje pomoću nukleaze Cas6. Nastala crRNA kraća je od crRNA kod tipa I. Važna razlika tipa III CRISPR-Cas sustava u odnosu na tip I je mogućnost ciljanja i cijepanja i DNA (podtip III-A) i RNA (podtip III-B).²⁸



Slika 8. CRISPR podsustavi. Preuzeto i modificirano iz ²⁸.

2.4.4. Tip II CRISPR-Cas sustava

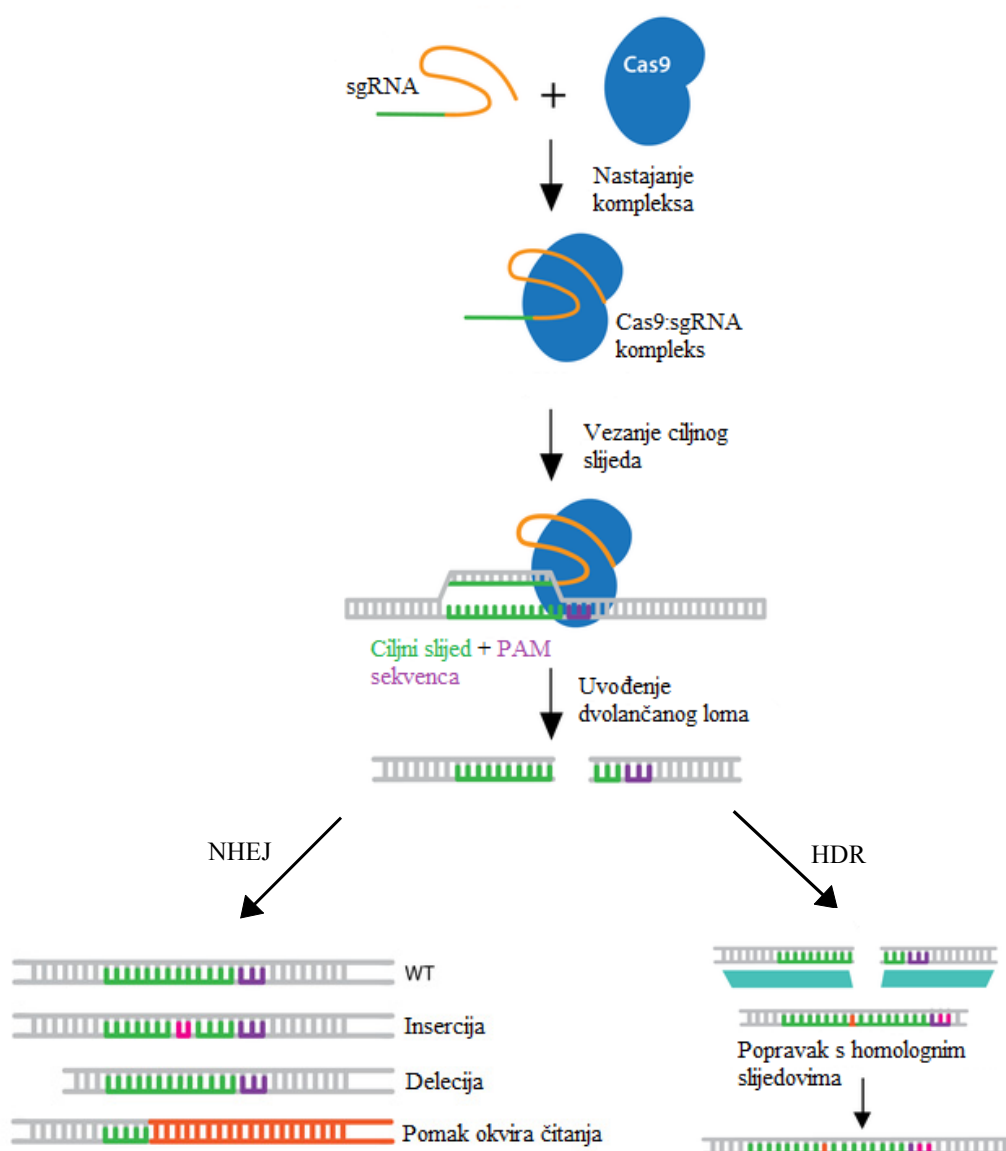
U tipu II CRISPR-Cas sustava sudjeluje endonukleaza Cas9, koja pomoću crRNA uvodi dvolančane lomove na točno određenim mjestima u genomu. Kod prokariota, crRNA se sastoji od dijela komplementarnog mjestu cijepanja (razmaknice, engl. *spacer*) i dijela komplementarnog tracrRNA (*trans-activating crRNA*). U sustavu CRISPR-Cas tip II, crRNA i tracrRNA tvore RNA dupleks koji s endonukleazom Cas9 tvori aktivan ribonukleoproteinski kompleks.

Kako bi cijepanje endonukleazom Cas9 bilo moguće, ciljani gen mora sadržavati PAM sljedove nizvodno od željenog mjesta cijepanja. Različiti tipovi endonukleaze Cas prepoznaju različite PAM sljedove, SpCas9 (*S. pyogenes* Cas9) prepoznaje slijed NGG.²⁹ Kod sustava

CRISPR-Cas tip II PAM sljedovi važni su i u koraku adaptacije, gdje sudjeluju u izboru protorazmaknice.

Nastale dvolančane lomove stanica popravlja nehomolognim spajanjem krajeva ili homolognom rekombinacijom. Nehomolognim spajanjem krajeva, uz mogućnost pomaka okvira čitanja, može doći i do uvođenja STOP kodona. Transkripcijom preuranjenog STOP kodona u mRNA nastaje pogrešan transkript, što može dovesti do pokretanja mehanizma degradacije mRNA s preuranjenim STOP kodonom (*Non-sense mediated decay, NMD*), ili do nastanka nefunkcionalnog proteina koji se potom degradira. Na temelju prirodnih crRNA i tracrRNA, za potrebe modificiranja genoma umjetno su stvorene sgRNA (*single guide RNA*, usmjeravajući nukleotidni sljedovi za narušavanje gena). Dugački su 20 nukleotida i sastoje se od nukleotidnih sljedova koji odgovaraju crRNA i tracrRNA međusobno povezanih petljom. sgRNA tvore funkcionalni kompleks s endonukleazom Cas9 te usmjeravaju enzim na komplementarne sljedove u genomu.²⁷

Metoda CRISPR-Cas uz brojne prednosti i mogućnosti primjene ima i svoje nedostatke. Trenutno, najveći nedostatak uključuje uvođenje neželjenih modifikacija u genom na drugim, neplaniranim mjestima (engl. *off-target* efekti) koje mogu dovesti do neželjenih posljedica. Kako bi se takvi neželjeni efekti smanjili, prilikom dizajna sgRNA potrebno je obratiti pažnju na vjerojatnost modifikacija na neplaniranim mjestima. Također, na dizajn sgRNA utječe i položaj PAM slijeda, iako on sam nije dio sgRNA. Ciljni slijed koji usmjerava endonukleazu Cas9 čini dvadesetak nukleotida uzvodno od PAM slijeda, a do samog cijepanja i nastanka dvolančanog loma dolazi otprilike tri nukleotida uzvodno od PAM slijeda. Za dizajn sgRNA dostupni su različiti online alati koji izabiru i boduju nukleotidne sljedove prema vjerojatnosti modifikacije genoma na ciljnom mjestu i vjerojatnosti modifikacija koje nisu na ciljnom mjestu (*off-target* efekata).



Slika 9. Djelovanje CRISPR-Cas9 sustava, preuzeto i modificirano iz ³⁰

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije i reagensi

Agar (*Fluka*), agarozna (*Roth*), etanol, 96 % p.a. (*Gram-Mol*), dimetil sulfoksid, DMSO, (*Sigma*), etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (*Sigma*), glicerol (*Kemika*), etidij bromid (*Sigma*), propan-2-ol (*Gram-Mol*), glicerol (*Thermo Scientific*), reagens za transfekciju *Lipofectamine 3000* (*Thermo Fischer Scientific*), reagens za poboljšanje transfekcije *p3000TM* (*Thermo Fisher Scientific*), medij za transfekciju bez seruma *Opti-MEM* (*Thermo Fisher Scientific, Gibco*).

3.1.2. Pufferirane otopine

NEBuffer 3.1 (100 mmol dm⁻³ NaCl, 50 mmol dm⁻³ Tris – HCl, 10 mmol dm⁻³ MgCl₂, 100 µg mL⁻¹ BSA, pH 7,9), puffer za T4-DNA ligazu (*NEB*, 50 mmol dm⁻³ Tris – HCl, 10 mmol dm⁻³ MgCl₂, 1 mmol dm⁻³ ATP, 10 mmol dm⁻³ DTT, pH 7,5), TAE puffer (40 mmol dm⁻³ Tris-acetat, 1 mmol dm⁻³ EDTA, pH 8,2), PBS puffer za stanične kulture (140 mmol dm⁻³ NaCl, 2,7 mmol dm⁻³ KCl, 10 mmol dm⁻³ Na₂HPO₄, 1,8 mmol dm⁻³ KH₂PO₄, pH 7,4), puffer P1 (50 mmol dm⁻³ Tris-HCl, 10 mmol dm⁻³ EDTA, 100 µg mL⁻¹ RNaza A, pH 8,0), puffer P2 (200 mmol dm⁻³ NaOH, 1% SDS), puffer P3 (3 mmol dm⁻³ CH₃COOK, pH 5,5).

3.1.3. Enzimi

Restriksijska endonukleaza- *BsmBI* (*NEB*), T4-DNA-ligaza (*NEB*), otopina tripsina i EDTA (*Sigma*), DNA polimeraza- *Q5 Hot Start High-Fidelity* (*NEB*), T7-endonukleaza 1 (*NEB*).

3.1.4. Hranjivi medij

LB (Luria-Bertani) medij je hranjivi medij koji se koristi za uzgoj bakterijskih kultura *E.coli*. Medij sadrži 5 g dm⁻³ kvašćevog ekstrakta, 10 g dm⁻³ triptona i 10 g dm⁻³ NaCl. Nakon pripreme, medij se sterilizira autoklaviranjem 45 min na 120°C. Za pripremu krutih hranjivih podloga u medij se dodaje agar konačne koncentracije 12,5 g dm⁻³. Ohlađenom mediju dodaju se antibiotici ampicilin do konačne koncentracije 100 µg mL⁻¹ i tetraciklin do konačne koncentracije 10 µg mL⁻¹.

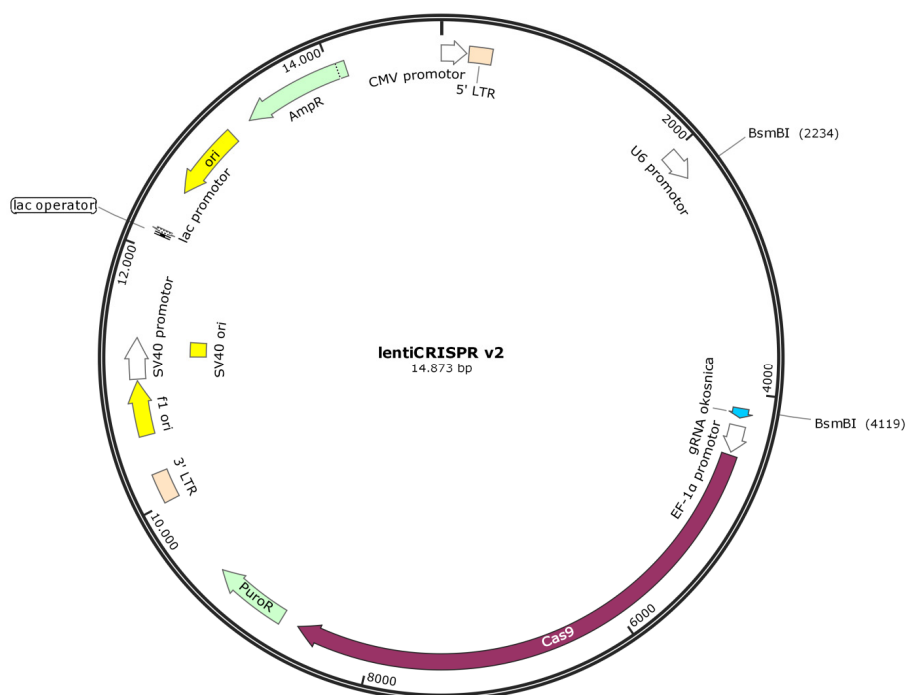
DMEM medij, *Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma)*, s dodanim L-glutaminom i fetalnim goveđim serumom (FBS) do konačne koncentracije 10%.

3.1.5. Antibiotici

Antibiotici ampicilin (*Thermo Scientific*) i tetraciklin (*Sigma*) korišteni su kod uzgoja bakterijskog soja *E.coli* XL1. Sam bakterijski soj ima otpornost na tetraciklin, a korišteni transfecirani plazmid lentiCRISPRv2 sadrži kodirajući slijed za otpornost na ampicilin. Puromicin (*Thermo Fisher Scientific, Gibco*) je korišten za selekciju staničnih linija u kulturi.

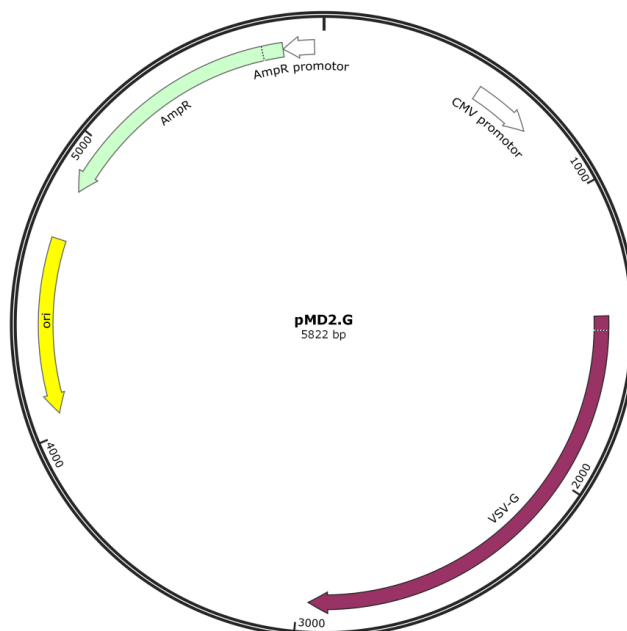
3.1.6. Plazmidi

Plazmid lentiCRISPRv2³¹ (slika 10.) korišten je kao okosnica kod kloniranja usmjeravajućih nukleotidnih sljedova za narušavanje gena. Sadrži kodirajući slijed za endonukleazu Cas9 iz organizma *S. pyogenes* i mjesta prepoznavanja za restriksijsku endonukleazu BsmBI koja omogućuju ispravno kloniranje usmjeravajućih nukleotidnih sljedova za narušavanje gena. Uz navedene sljedove, plazmid sadrži i promotorski slijed U6, kodirajuće sljedove za otpornost na ampicilin i puromicin te duge ponavljajuće nukleotidne sljedove na 5'- i 3'-kraju (LTR) koji omogućuju virusnu ugradnju plazmidnog fragmenta u genom stanica.

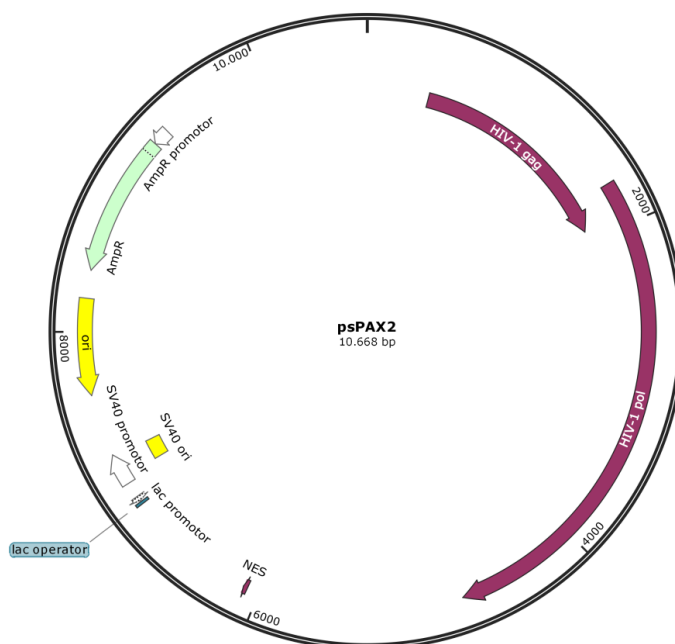


Slika 10. Mapa plazmida lentiCRISPRv2. Konstruirano korištenjem SnapGene Viewer 4.3.7. programskog alata.

Za dobivanje lentivirusnih čestica, uz plazmid lentiCRISPRv2 korišteni su plazmidi pMD2.G³² i psPAX2³³. Ti plazmidi sadrže kodirajuće sljedove za proteine koji su potrebni za nastajanje funkcionalnih lentivirusnih čestica (VSV-G, HIV-1 gag, HIV-1 pol). Mape plazmida prikazane su na slikama 11 i 12.



Slika 11. Mapa plazmida pMD2.G. Konstruirano korištenjem SnapGene Viewer 4.3.7. programskog alata.



Slika 12. Mapa plazmida psPAX2. Konstruirano korištenjem SnapGene Viewer 4.3.7. programskog alata.

3.1.7. Bakterijski sojevi

Za umnažanje plazmida s kloniranim usmjeravajućim nukleotidnim sljedovima za narušavanje gena korišten je bakterijski soj *E. coli* XL1-Blue. Za transformaciju bakterija plazmidnom DNA korištene su kemokompetentne i elektrokompetentne bakterije. Soj XL1 je *recA*⁻ soj, odnosno deficijentan je za rekombinazu A, što omogućuje umnažanje plazmida u bakterijama bez mogućnosti njegove rekombinacije.

3.1.8. Stanične linije

HEK 293 (*human embryonic kidney*) stanična linija dobivena je iz stanica bubrega embrija 1973. godine u Nizozemskoj i od tada se često koristi u istraživanjima zbog predvidljivog i brzog rasta.³⁴ Postoji nekoliko varijanti staničnih linija izvedenih iz HEK 293, od kojih je posebno važna HEK 293T stanična linija koja je iznimno pogodna za transfekciju jer sadrži virusni (SV40) T-antigen koji omogućuje episomalnu replikaciju transfeciranih plazmida koji sadrže SV40 ishodište replikacije.

HEK 293 EGFP SAHH YD stanična linija stabilno eksprimira fuzijski protein mutirane verzije proteina SAHH (Y328D) i zelenog fluorescentnog proteina (EGFP).

3.1.9. Komercijalni kompleti

Komercijalni kompleti za određivanje koncentracije DNA i RNA u uzorku- *Qubit*® *dsDNA BR Assay Kit* (*Thermo Scientific*), *Qubit*® *dsDNA HS Assay Kit* (*Thermo Scientific*) i *Qubit*® *RNA BR Assay Kit* (*Thermo Scientific*), komplet za izolaciju DNA iz stanica u kulturi *Dneasy Blood & Tissue Kit* (*Qiagen*), komplet za izolaciju RNA iz stanica u kulturi *Zymo Research Quick-RNA*, komercijalni komplet za izolaciju plazmidne DNA *PureYield*™ *Plasmid Miniprep System* (*Promega*), komercijalni komplet za pročišćavanje DNA *Agencourt AMPure XP PCR Purification*.

3.2. Metode

3.2.1. Odabir gena za narušavanje

Odabir gena za narušavanje te ispitivanje njihovog utjecaja na smanjenu razinu ekspresije mRNA koja kodira za mutiranu protein SAHH (Y328D) temeljio se na hipotezi da uslijed translacije mutiranog transkripta dolazi do zastajanja ribosoma te degradacije NGD mehanizmom. U tu svrhu, odabrani su humani geni *HBSIL* i *PELO* jer je pokazano da njihovi

homolozi u kvascu, točnije, njihovi proteinski produkti, imaju ključnu ulogu u aktivaciji i provođenju tog staničnog mehanizma.

S druge strane, u sklopu preliminarnih istraživanja detektirano je 40 proteina vezanih specifično na mutirani transkript. Korištenjem tog seta podataka izdvojena su dva proteina, odnosno gena, *NONO* i *SNDI*, čija funkcija do danas nije detaljno istražena, no na temelju trenutno dostupnih podataka snažno upućuje na mogući utjecaj na razinu mutiranog transkripta.

3.2.2. Dizajn usmjeravajućih nukleotidnih sljedova za narušavanje gena

Korištenjem online dostupnog alata „GPP sgRNA Designer“³⁵ dizajnirani su nukleotidni sljedovi za narušavanje gena (engl. *small guide RNA*, sgRNA) *HBSIL*, *PELO*, *NONO* i *SNDI* CRISPR-Cas9 sustavom. Kod dizajna navedenim alatom, odabrana je opcija enzima „SpyoCas9“ i PAM slijeda „NGG“ te verzija genoma „GRCh38 Ensembl v.98“. Uz to, uključena je i opcija rangiranja dizajniranih nukleotidnih sljedova na temelju idealnih uvjeta „Pick order“. Kao konačni uvjet, odabrana su tri najbolje rangirana slijeda za svaki gen koji ciljaju različite eksone što bliže 5'-kraju gena (Tablica 1.). Ciljanjem različitih eksona i uvođenjem promjena na početku gena željela se povećati mogućnost dobivanja funkcionalnog narušavanja gena (engl. *knock-out*). Za potrebe kloniranja sljedova u plazmid lentiCRISPRv2, dodane su baze CACC na 5'-kraj uzvodnog oligonukleotida. Dodatno, ukoliko uzvodni oligonukleotid nije počinjao bazom G, bilo ju je potrebno uključiti u dizajn (5'CA~~CCG~~...). Na svaki oligonukleotid usmjeren nizvodno, na 5'-kraj dodan je slijed AAAC, a ukoliko slijed nije završavao bazom C, ona je dodana na njegov 3' kraj.

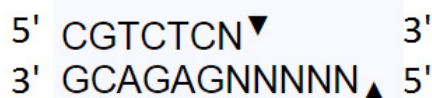
Tablica 1. Sekvence usmjeravajućih nukleotidnih sljedova za narušavanje gena

Gen	Ime početnice	Oligonukleotidni slijed (5' -> 3')	Ciljni ekson
<i>HBSIL</i> (NG_012002.1)	sgRNA_HBSIL_KO1_F	CACCGTATTGTATTTGCGCCGTCAAC	2
	sgRNA_HBSIL_KO1_R	AAACGTTGACGGCGAAATACAATAC	
	sgRNA_HBSIL_KO2_F	CACCGATGCCTTGATCACATGAGAG	4
	sgRNA_HBSIL_KO2_R	AAACCTCTCATGTGATCAAGGCATC	
	sgRNA_HBSIL_KO3_F	CACCGCACACGATTCAAGCATCAGA	6
	sgRNA_HBSIL_KO3_R	AAACTCTGATGCTTGAATCGTGTGC	

<i>PELO</i> (AF143952.2)	sgRNA_PELO_KO1_F	CACCGCACACTTACAACCTCGTGC	2
	sgRNA_PELO_KO1_R	AAACGCACGAGGTTGTAAGTGTGC	
	sgRNA_PELO_KO2_F	CACCGCTGCGGGTTAAGGGGACCA	2
	sgRNA_PELO_KO2_R	AAACTGGTCCCCTTAACCCGCAGC	
	sgRNA_PELO_KO3_F	CACCGATCGAGCTTTCTATGGACT	3
	sgRNA_PELO_KO3_R	AAACAGTCCATAGAAAGCTCGATC	
<i>NONO</i> (NG_046742.1)	sgRNA_NONO_KO1_F	CACCGCTGGACAATATGCCACTCCG	5
	sgRNA_NONO_KO1_R	AAACCGGAGTGGCATATTGTCCAGC	
	sgRNA_NONO_KO2_F	CACCGTTAGATGATGAAGAGGGAC	6
	sgRNA_NONO_KO2_R	AAACGTCCCTTTCATCATCTAAC	
	sgRNA_NONO_KO3_F	CACCGCAACATCAAGGAGGCTCGTG	7
	sgRNA_NONO_KO3_R	AAACCACGAGCCTCCTTGATGTTGC	
<i>SND1</i> (NG_051199.1)	sgRNA_SND1_KO1_F	CACCGAACCTCAGCAACATTCGTGC	2
	sgRNA_SND1_KO1_R	AAACGCACGAATGTTGCTGAGGTTC	
	sgRNA_SND1_KO2_F	CACCGGAACGGTTCACATACTATC	5
	sgRNA_SND1_KO2_R	AAACGATAGTATGTGAACCGTTCC	
	sgRNA_SND1_KO3_F	CACCGCTCCTCCCAGATTACTACC	6
	sgRNA_SND1_KO3_R	AAACGGTAGTAATCTGGGAGGAGC	

3.2.3. Kloniranje usmjeravajućih nukleotidnih sljedova za narušavanje gena

Restriksijske endonukleaze su enzimi koji prepoznaju i cijepaju specifične nukleotidne sljedove. Enzim *BsmBI* prepoznaje i cijepa slijed prikazan na slici 13.



Slika 13. Nukleotidni slijed koji prepoznaje restriksijska endonukleaza *BsmBI*.

Kao okosnica za kloniranje korišten je plazmid lentiCRISPRv2. Plazmid je pocijepan restriksijskom endonukleazom *BsmBI* kako bi se dizajnirani oligonukleotidi mogli ligirati u ispravnoj orijentaciji. Za cijepanje okosnice plazmida lentiCRISPRv2 korišteni su reagensi navedeni u tablici 2 u navedenim količinama.

Tablica 2. Sastav reakcije restriksijske razgradnje.

Reagens	V/ μL
lentiCRISPRv2 (1400ng)	3,1
NEBuffer 3.1	1,4
<i>BsmBI</i>	1
mqH ₂ O	8,5
V(ukupno)	14

Pripremljena reakcijska smjesa inkubira se sat vremena na temperaturi od 55 °C, nakon čega se uspješnost reakcije cijepanja provjeri agaroznom gel-elektroforezom (100 V, 20 min). Kao negativna kontrola na gel se nanese nepocijepani plazmid.

Agarozna gel elektroforeza je metoda za razdvajanje i pročišćavanje nukleinskih kiselina na temelju njihove veličine. Metoda se temelji na različitoj brzini putovanja čestica nukleinskih kiselina kroz pore agaroznog gela pod utjecajem električnog polja, pri čemu je brzina putovanja obrnuto proporcionalna logaritmu molarne mase molekule. Agaroz je linearni polimer D-galaktoze i 3,6-anhidro-L-galaktoze. Količina agaroze u gelu definira veličinu pora gela, a time i raspon veličina molekula nukleinskih kiselina koje se mogu odijeliti. Za detekciju nukleinskih kiselina u gelu koriste se interkalirajući reagensi, kao što je etidij-bromid. Interkalacija etidij-bromida između baza DNA znatno povećava njegovu fluorescenciju što omogućava vizualizaciju fragmenata DNA pobudom pod UV svjetlom transiluminatora ($\lambda=312$ nm). Za agaroznu gel elektroforezu korišten je 1%-tni agarozni gel, pripremljen otapanjem 1 g agaroze u 100 mL TAE pufera uz dodatak 5 μL otopine etidij bromida. U jažice se nanese 1 μL uzorka pomiješan s 1 μL boje *Gel Loading Dye, Purple* (NEB). Za određivanje veličine fragmenata korišten je marker molekulskih masa *Load 2-Log DNA Ladder* (NEB).

Prije kloniranja potrebno je spariti dizajnirane oligonukleotide u dvolančani fragment koji će se ligirati u plazmid i služiti kao usmjeravajući nukleotidni slijed za narušavanje gena (sgRNA). Pripreme se otopine parova oligonukleotida tako da je koncentracija svakog oligonukleotida u smjesi 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ prema tablici 3.

Tablica 3. Sastav razrijeđene smjese oligonukleotida

Reagens	V/ μL
Uzvodni oligonukleotid	10
Nizvodni oligonukleotid	10
m $\mu\text{H}_2\text{O}$	80
V(ukupno)	100

Pripremljena smjesa parova oligonukleotida prvo se inkubira 5 min na 95 °C a zatim 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacija, smjesa oligonukleotida se razrijedi 20 puta do konačne koncentracije od 0,5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ svakog oligonukleotida. Sveukupno je pripremljeno 12 smjesa oligonukleotida, po tri smjese različitih parova oligonukleotida za svaki gen.

Reagensi za reakciju ligacije okosnice lentiCRISPRv2 i pripremljenih smjesa slijepljenih oligonukleotida pripreme se prema tablici 4. Reakcija se inkubira preko noći na 16°C.

Tablica 4. Reagensi potrebni za reakciju ligacije

Reagens	V/ μL
lentiCRISPRv2 (100 ng)	1
Pufer za T4-DNA-ligazu	1
Smjesa parova početnica (0,5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$)	1
T4-DNA-ligaza	0,5
m $\mu\text{H}_2\text{O}$	6,5
V(ukupno)	10

Nakon prekonodne inkubacije, cjelokupne reakcije ligacije ponovo se razgrade restriktivnim enzimom *BsmBI* kako bi se pocijepali neželjeni produkti, npr. religirana okosnica lentiCRISPRv2 ili ligirane dvije okosnice. Željeni produkt (plazmid s ugrađenim ciljnim slijedom) ostaje nerazgrađen jer se pravilnom ugradnjom oligonukleotidnih sljedova narušava mjesto prepoznavanja (restriktivsko mjesto) korištene restriktivske endonukleaze. Reakcija se provodi 1 h na 55 °C.

3.2.4. Transformacija bakterija *E.coli XL1* toplinskim šokom

Toplinski šok (engl. *heat shock*) jedna je od metoda transformacije bakterija. Radi se o kemijskoj metodi transformacije u kojoj se bakterije podvrgavaju kratkom toplinskom šoku. Točan mehanizam unosa DNA u stanicu ovom metodom je nepoznat, no smatra se da

toplinski šok destabilizira staničnu membranu, te tako omogućava ulazak molekule DNA u stanicu.

Na ledu se alikvotima od 10 μL kemokompetentnih bakterija *E.coli* XL1 doda 10 μL pojedine ligacijske smjese (plazmida s ugrađenim ciljnim slijedom). Pripremljene smjese se inkubiraju na ledu 15 min, zatim 45 s u termobloku na 42°C (*heat shock*), te konačno 2 min na ledu. Transformiranim bakterijama doda se 100 μL prethodno temperiranog (37°C) LB medija te se prenese u tresilicu na 37 °C, uz 250 rpm, 1 h kako bi se oporavile od toplinskog šoka.

Transformirane bakterije nasade se na ploče s hranjivom podlogom koja sadrži antibiotike ampicilin i tetraciklin. Hranjiva podloga pripremi se zagrijavanjem LB medija s agarom uz dodatak antibiotika. Hranjivi medij izlije se u plastične Petrijeve zdjelice i ostavi stajati dok se ne ohladi. Prilikom nasađivanja, suspenzija bakterijskih stanica razmazuje se po hranjivoj podlozi pomoću sterilnog staklenog štapića dok se potpuno ne upije. Za rast bakterijskih kolonija, zdjelice se inkubiraju preko noći na 37°C.

3.2.5. Nasađivanje prekonoćnih kultura za izolaciju plazmida

U staklene epruvete koje sadrže 2 mL LB medija sa selektivnim antibioticima, sterilnim nastavkom za pipetu prenese se mala količina bakterijskih stanica odabrane kolonije s krute hranjive podloge. Nasađene su po četiri kolonije za svaki plazmidni konstrukt, odnosno sveukupno 48 bakterijski klonova. Epruvete se preko noći stave u tresilicu na 37°C, uz 250 rpm.

3.2.6. Izolacija plazmida

Plazmidi iz prekonoćnih kultura izolirani su metodom alkaline lize bakterijskih stanica u tri koraka. Prekonoćne kulture preliju se u 1,5 mL tube i centrifugiraju se 1 min na 11 000 xg. Supernatant se odlije, a talog se resuspendira u 200 μL pufera P1. Doda se 200 μL pufera P2 te se inkubira 5 min. Tuba se nekoliko puta preokrene i doda se 200 μL pufera P3. Tuba se ponovo nekoliko puta preokrene, a zatim se centrifugira 10 min na 4°C i 18 000 g. Supernatant se prebaci u nove tube i doda se 450 μL izopropanola (*Gram-Mol*). Centrifugira se minimalno 30 min na 25 000 g pri 4 °C. Supernatant se odlije, doda se 500 μL 70%-tnog etanola (*Gram-Mol*) te se centrifugira 10 min na 25 000 g pri 4 °C. Etanol se odlije i tube se

ostave otvorene oko 15 min kako bi sav etanol ispario. Dobiveni talog DNA resuspendira se u 20 μL ultra čiste vode (mqH_2O).

Uspješnost izolacije plazmida provjerena je agaroznom gel elektroforezom (100 V, 20 min). 2 μL uzorka pomiješano je se 1 μL boje *Gel Loading Dye, Purple (NEB)*. Kao marker korišten je 1 μL *Load 2-Log DNA Ladder (NEB)*.

3.2.7. Restriksijska provjera izoliranih plazmida

Ukoliko izolirani plazmidi sadrže ugrađeni ciljani slijed, mjesto prepoznavanja restriksijske endonukleaze *BsmBI* je narušeno, te se oni ne cijepaju u reakciji s enzimom. Ova činjenica iskorištena je u svrhu prve provjere uspješnosti kloniranja. Kao pozitivna kontrola cijepanja, korišten je početni plazmid lentiCRISPRv2.

U PCR tubama pomiješaju se reagensi navedeni u tablici 5, u navedenim količinama. Smjesa se inkubira 1 h na 55 °C, a zatim se provede temperaturna inaktivacija enzima na 80°C, 20 min. Produkti reakcije analiziraju se agaroznom gel elektroforezom (100 V, 20 min).

Tablica 5. Reakcija restriksijske razgradnje plazmida enzimom *BsmBI*

Reagens	V/ μL
Izolirani plazmid	8
NEBuffer 3.1	1
<i>BsmBI</i>	0,1
mqH_2O	0,9
V(ukupno)	10

3.2.8. Transformacija bakterija *E.coli XL1*-elektroporacija i izolacija plazmida za konačnu potvrdu sekvenciranjem

Elektroporacija je jedna od fizikalnih metoda za unos DNA u stanice. Stanice se podvrgavaju jakom, kratkotrajnom električnom polju, što dovodi do otvaranja tranzijentnih pora na staničnoj membrani i omogućuje ulazak molekule DNA u stanicu. To je najučinkovitija i najpouzdanija (najreproducibilnija) metoda za unos DNA u bakterijske stanice.

Uzorci plazmida za koje je restriksijskom razgradnjom potvrđeno da se ne cijepaju u reakciji s restriksijskom endonukleazom *BsmBI*, razrijeđeni su dodatkom 50 μL mqH_2O . Alikvoti od 50 μL elektrokompetentnih bakterija *E.coli XL1* drže se na ledu i doda im se 0,15 μL plazmidne DNA. Smjesa DNA i bakterija se prebaci u ohlađene, sterilizirane kivete za

elektroporaciju s aluminijskim elektrodama te se one pravilno postave u elektroporator. Elektroporacija se provodi u uređaju *Gene Pulser Xcell (Bio-Rad)*. Parametri elektroporatora podese se na napon od 2,5 kV, otpor 200 Ω i kapacitivnost 25 μF te se primijeni puls u trajanju od 5,0 ms. Transformiranim stanicama odmah se doda 1 mL LB medija te se stave u tresilicu na 37 °C, 1 h pri 250 rpm. Nakon oporavka, alikvoti transformiranih bakterijskih stanica od 150 μL i 850 μL se nasade na ploče s krutom hranjivom podlogom koja sadrži antibiotike. Ploče se inkubiraju preko noći na 37°C.

U staklene epruvete sa 6 mL LB medija te antibioticima ampicilin i tetraciklin nasade se prekonoćne kulture za izolaciju plazmida iz odabranih klonova s ploča. Nasađeno je 12 prekonoćnih kultura, po jedna za svaki plazmid. Plazmidi se iz prekonoćnih kultura izoliraju prema uputama proizvođača, korištenjem komercijalnog kompleta za izolaciju plazmida *PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega)*.³⁶ Agaroznom gel elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu provjereni su pročišćeni plazmidi (100 V, 20 min).

3.2.9. Mjerenje koncentracije uzoraka DNA - Qubit

Koncentracije uzoraka DNA mjerene su fluorimetrijskom metodom, korištenjem uređaja *Qubit® 3.0 (Thermo Scientific)*. Metoda se temelji na specifičnom vezanju fluorescentnog reagensa na molekulu DNA koje dovodi do emitiranja zračenja. Fluorimetar mjeri samo zračenje emitirano uslijed vezanja fluorescentne boje na molekulu DNA, čime se eliminira utjecaj onečišćenja na rezultat analize. Ova metoda je pouzdanija od metode mjerenja koncentracije klasičnim UV spektrofotometrom jer se klasičnom metodom mjeri ukupna apsorbanacija koja može potjecati od različitih molekula i onečišćenja u otopini.

Za mjerenje koncentracije DNA korišteni su komercijalni kompleti *Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Thermo Scientific)* i *Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Scientific)*. Prije mjerenja koncentracije DNA u uzorku, potrebno je kalibrirati instrument korištenjem standardnih otopina, prema uputama proizvođača. Radna otopina se pripremi miješanjem 1 μL fluorescentnog reagensa i 189 μL pufera te se u nju doda 10 μL otopine standarda 1, odnosno standarda 2. Otopine za mjerenje koncentracije DNA u nepoznatim uzorcima pripreme se miješanjem 1 μL otopine fluorescentnog reagensa s 198 μL pufera. Tako pripremljenoj otopini dodaje se 1 μL uzorka DNA nepoznate koncentracije. Optički pogodna tuba s pripremljenim uzorkom stavi se u uređaj i izmjeri se masena koncentracija DNA u uzorku.

3.2.10. Konačna potvrda uspješnosti kloniranja - Sanger sekvenciranje

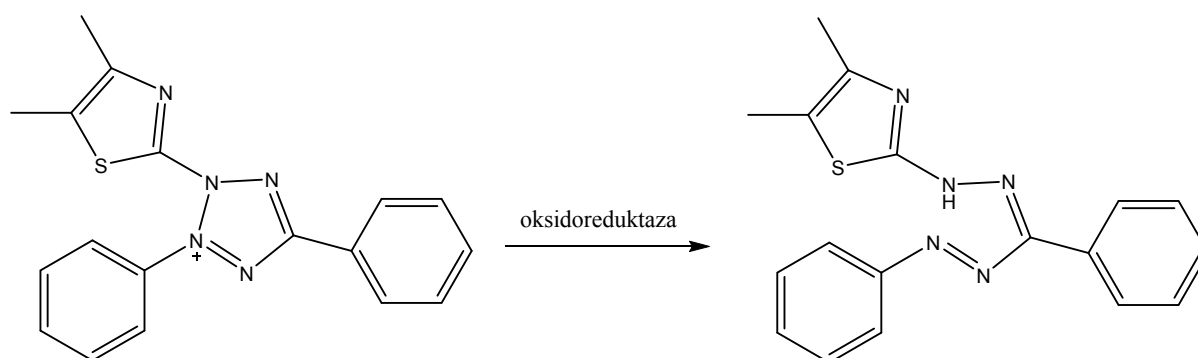
Za konačnu potvrdu uspješnog kloniranja usmjeravajućih nukleotidnih sljedova za narušavanje gena, plazmidima je određen točan nukleotidni slijed sekvenciranjem prema Sangeru. Pripremljeni su alikvoti izoliranih plazmida od 20 μL približne koncentracije 100 ng μL^{-1} . Izolirani plazmidi sekvencirani su u servisu *Macrogen* u Nizozemskoj.

3.2.11. Uzgoj staničnih linija HEK293T WT i HEK293 EGFP SAHH YD

Stanične linije HEK293T WT i HEK293 EGFP SAHH YD uzgajaju se u *Dulbecco modified Eagle Medium* mediju, u plastičnim bocama površine 25 cm^2 i 75 cm^2 . Uzgoj stanica odvija se u inkubatoru *HERACell Vios 160i CO₂ Incubator (Thermo Scientific)* na 37 °C, u atmosferi zasićenoj s vodenom parom i uz 5 % ugljikova (IV) oksida, CO₂. Alikvot stanica odleđen je iz spremnika s tekućim dušikom tako što je pomoću 5 mL medija temperiranog na 37°C prebačen u *Falcon* epruvetu, te centrifugiran 5 min na 300 g, kako bi se stanice istaložile. Medij se odlije, a stanice se resuspendiraju u 5 mL sterilnog medija i prebace se u plastičnu bocu površine 25 cm^2 . Stanice se ostave preko noći u inkubatoru na 37 °C. Nakon 24 h, ili kad stanice popune površinu boce od 25 cm^2 , potrebno ih je prebaciti u veću bocu, površine 75 cm^2 . Presađivanje stanica odvija se na sljedeći način: iz boce se pipetom izvuče medij i stanice isperu s oko 5 mL PBS pufera. Zatim se u plastičnu bocu doda 0,5 mL tripsina i pričekava se oko 5 min kako bi se stanice odlijepile od podloge. Odlijepljene stanice se zatim resuspendiraju u 5 mL DMEM medija, kako bi se inaktivirao tripsin i prebace se u plastičnu *Falcon* tubu. Suspenzija se centrifugira 5 min na 300 g. Medij iznad taloga stanica se odlije, a stanice se resuspendiraju u 10 mL sterilnog DMEM medija temperiranog na 37 °C. Suspenzija se prebaci u plastičnu bocu veće površine, 75 cm^2 .

3.2.12. Određivanje toksičnosti puromicina - MTT test

Kako bi bilo moguće provesti selekciju staničnih linija puromicinom, potrebno je odrediti njegovu radnu koncentraciju, odnosno najmanju koncentraciju antibiotika pri kojoj ne dolazi do rasta stanica. Radna koncentracija određena je MTT testom, kolorimetrijskom metodom koja se temelji na mjerenju apsorbancije formazana ($\lambda=570$ nm). Budući da formazan nastaje redukcijom 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijevog bromida (MTT) pomoću NAD(P)H ovisnih oksidoreduktaza, ovom metodom se može utvrditi udio metabolički aktivnih stanica.



Slika 14. Reakcija redukcije MTT-a u formazan, nacrtano pomoću programa ChemDraw Professional 15.1.

U mikrotitarsku pločicu s 96 jažica nasadi se po 3000 stanica HEK293 EGFP SAHH YD resuspendiranih u 200 μL DMEM medija. Stanice se 24 h inkubiraju na 37°C , a zatim im se doda antibiotik puromicin (*Thermo Fisher Scientific, Gibco*) ($\gamma = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) u sljedećim koncentracijama: $0,2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Kao kontrola koriste se jažice bez antibiotika, a sam test se provodi u tehničkim triplikatima. Stanice s antibiotikom se inkubiraju 5 dana na 37°C . Sadržaj mikrotitarske pločice (medij) izlije se te se u svaku jažicu dodaje po $40 \text{ } \mu\text{L}$ otopine MTT-a. Stanice se inkubiraju 4 h na 37°C kako bi NAD(P)H ovisne oksidoreduktaze u metabolički aktivnim stanicama reducirale MTT u netopljivi formazan. Potom se u svaku jažicu doda po $170 \text{ } \mu\text{L}$ DMSO, te se stavi na tresilicu 15 min kako bi se kristali formazana otopili. Mikrotitarska pločica se zatim stavi u spektrofotometar i očita se apsorbancija na $\lambda=570 \text{ nm}$ za svaku pojedinu jažicu. Dobiveni podaci se analiziraju i odredi se postotak preživjelih stanica u mediju s različitim koncentracijama puromicina.

3.2.13. Transfekcija- stvaranje lentivirusnih čestica

Transfekcija je proces namjernog unosa DNA u eukariotske stanice. Postoje različite fizikalne i kemijske metode za transfekciju, kao što su elektroporacija, lipofekcija ili transfekcija mikroinjekcijom. Ovdje je korištena metoda transfekcije uz reagens *LipofectamineTM 3000 Transfection Reagent (Thermo FisherScientific)*. Reagens sadrži kationsku, lipidnu formulaciju koja omogućuje nastajanje kompleksa s negativno nabijenom plazmidnom DNA te pakiranje nastalih kompleksa u liposome. Nastali liposomi imaju pozitivno nabijenu

površinu, što im omogućuje fuzioniranje s negativno nabijenom staničnom membranom te unos plazmidne DNA u stanicu.³¹

U četiri petrijevke promjera 10 cm nasadeno je po 4 milijuna stanica HEK293T WT, u 10 mL DMEM medija. Nakon 24 h, na stanice se dodaje smjesa reagensa za transfekciju pripremljena na sljedeći način: u jednoj tubi pomiješa se 42 µL transfekcijskog reagensa *Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent* (Thermo Fisher Scientific) i 500 µL medija za transfekciju *Opti-MEM* (Thermo Fisher Scientific, Gibco). U drugoj tubi pomiješa se 500 µL medija za transfekciju *Opti-MEM*, 36 µL *p3000™* (Thermo Fisher Scientific) reagensa i ukupno 18 µg DNA, odnosno smjese plazmida (Tablica 6.). Pripremljene smjese se pomiješaju i inkubiraju 15 min na sobnoj temperaturi, a zatim se konačna smjesa doda na stanice. Za stvaranje lentivirusnih čestica koje sadrže željeni insert potrebno je, uz lentiCRISPRv2 plazmid, dodati i plazmid koji kodira gene za pakiranje lentivirusa (psPAX2) i plazmid koji kodira gene za lentivirusnu ovojnica (pMD2.G).

Tablica 6. Udio pojedinih plazmida korištenih u transfekciji, jednake količine plazmidne DNA s ugrađenim usmjeravajućim nukleotidnim sljedovima za narušavanje gena korištene su za sva 4 gena. (*knock-out* konstrukti 1, 2 i 3)

	m/ng
pMD2G	3600
pSPAX2	6588
Knock-out konstrukti 1	2652
Knock-out konstrukti 2	2652
Knock-out konstrukti 3	2652

} 7956 ng

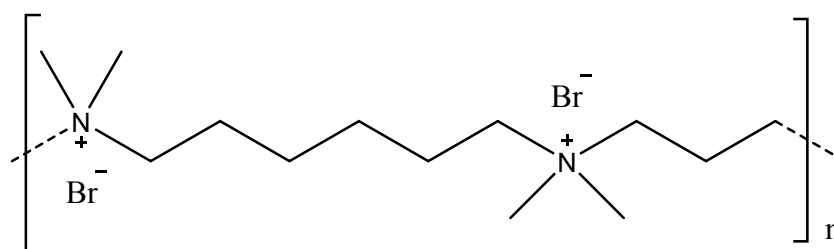
Nakon 24 h promjeni se transfekcijski medij u petrijevkama te se stanicama doda 6 mL svježeg medija. Medij koji sadrži lentiviruse prvi put se skupi 48 h nakon transfekcije te se profiltrira kroz filter sa veličinama pora od 0,45 µm kako bi se iz lentivirusnog supernatanta uklonile zaostale stanice. Na transfecirane stanice ponovno se doda 6 mL svježeg medija te se stanice ostave u inkubatoru dodatnih 24 h. Postupak sakupljanja lentivirusa se ponovi još jednom 72 h nakon transfekcije. Sakupljeni medij s lentivirusnim česticama čuva se na -80°C.

3.2.14. Transdukcija- određivanje funkcionalnog titra lentivirusnih čestica

Transdukcija je proces unosa DNA u stanicu pomoću virusa. U prirodi dovodi do horizontalnog prijenosa gena među bakterijama, a u laboratoriju se koristi za uvođenje gena u

genom bakterijskih i eukariotskih stanica. U prirodi transdukciju provode bakteriofazi, a u laboratoriju se najčešće koriste retrovirusi te lentivirusi. Lentivirusi su podvrsta retrovirusa koji, za razliku od retrovirusa, mogu inficirati i stanice koje se ne dijele, što ih čini najpogodnijima za unos DNA u stanicu. Sadrže gen za reverznu transkriptazu, koja omogućuje prepisivanje virusne RNA u DNA, te integrazu koja omogućuje ugradnju DNA u stanicu domaćina.

Za povećanje uspješnosti transfekcije korišten je reagens *Polybrene* (*Sigma*), kationski polimer (heksadimetrin bromid, slika 15.) koji neutralizira elektrostatsko odbijanje između virusnih čestica i površine stanice.



Slika 15. *Polybrene*, heksadimetrin bromid, konstruirano pomoću programa ChemDraw Professional 15.1.

U mikrotitarsku pločicu s 12 jažica nasadi se po 300 000 stanica HEK293 EGFP SAHH YD po jažici, u 2 mL DMEM medija s dodanim *Polybrene* (*Sigma*) reagensom do konačne koncentracije $8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Na stanice se dodaju sljedeći volumeni lentivirusnih čestica: $0 \mu\text{L}$, $50 \mu\text{L}$, $100 \mu\text{L}$, $150 \mu\text{L}$, $200 \mu\text{L}$ i $400 \mu\text{L}$. Pripremljena smjesa za transdukciju centrifugira se 2 h na $33 \text{ }^\circ\text{C}$ i 1000 g .

Nakon 24 h medij s reagensima za transdukciju se makne, stanice se dva puta isperu PBS-om i presade se iz mikrotitarske pločice s 12 jažica u pločicu s 96 jažica. Nasađuje se po 2500 stanica po jažici, po četiri jažice za svaki uvjet u kojem se provodila transdukcija (za svaki dodani volumen lentivirusnih čestica). Stanice se nasađuju u $200 \mu\text{L}$ DMEM medija. U dvije od četiri jažice nasađene za svaki uvjet, dodaje se antibiotik puromicin do konačne koncentracije $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Stanice se uzgajaju 5 dana u inkubatoru na 37°C .

Nakon 5 dana napravi se MTT test kako je opisano u odlomku 3.2.12. U svaku jažicu se dodaje po $40 \mu\text{L}$ pripremljene otopine MTT-a. Iz očitane apsorbancije pri 570 nm izračuna se postotak preživjelih stanica u jažicama s dodanim antibiotikom, odnosno stanica koje su

ugradile plazmid s usmjeravajućim nukleotidnim slijedom za narušavanje gena. Iz broja preživjelih stanica odredi se broj lentivirusnih čestica u 1 mL medija prema formuli:

$$\text{titar} = \frac{1\text{mL}}{\text{razrijeđenje}} \times \frac{\% \text{ preživljenja}}{100 \%} \times \text{broj nasađenih stanica}$$

3.2.15. Transdukcija

Na temelju prethodno određene koncentracije lentivirusa, izračuna se broj stanica koji je potrebno inficirati tako da multiplicitet infekcije bude jednak 10 (engl. *multiplicity of infection*, MOI), kako bi se osigurao gotovo siguran unos DNA u svaku stanicu. Multiplicitet infekcije odnosi se na omjer broja lentivirusnih čestica i broja stanica koje se inficiraju. (Tablica 7.)

Tablica 7. Broj stanica za infekciju uz multiplicitet infekcije (MOI) 10.

Ciljani narušeni gen	Broj stanica
HBS1L	45 525
PELO	28 575
NONO	47 962
SND1	41 452

Odgovarajući broj stanica nasadi se u mikrotitarsku pločicu s 12 jažica u DMEM mediju s dodatkom *Polybrene* reagensa do konačne koncentracije $8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Na stanice se doda 1 mL suspenzije lentivirusnih čestica te se pripremljena smjesa centrifugira 2 h na 33°C i 1000 g . Kao negativna kontrola transdukcije, koriste se stanice bez dodatka lentivirusa. Nakon centrifugiranja, stanice se prebace u inkubator. Nakon 24 h stanicama se promjeni medij uz dodatak puromicina do konačne koncentracije od $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Selekcija puromicinom provodi se 5 dana, odnosno sve dok u kontrolnim jažicama bez dodatka lentivirusa nema preživjelih stanica. Nakon selekcije, preživjele stanice koje su primile plazmid s usmjeravajućim nukleotidnim slijedom za narušavanje gena uzgajaju se u DMEM mediju do potrebnog broja stanica da daljnju analizu. Preostali alikvoti stanica čuvaju se u mediju s 5 % DMSO-a na -80°C te se nakon toga prebacuju u spremnik s tekućim dušikom.

3.2.16. Izolacija DNA i RNA iz staničnih linija s narušenim genima

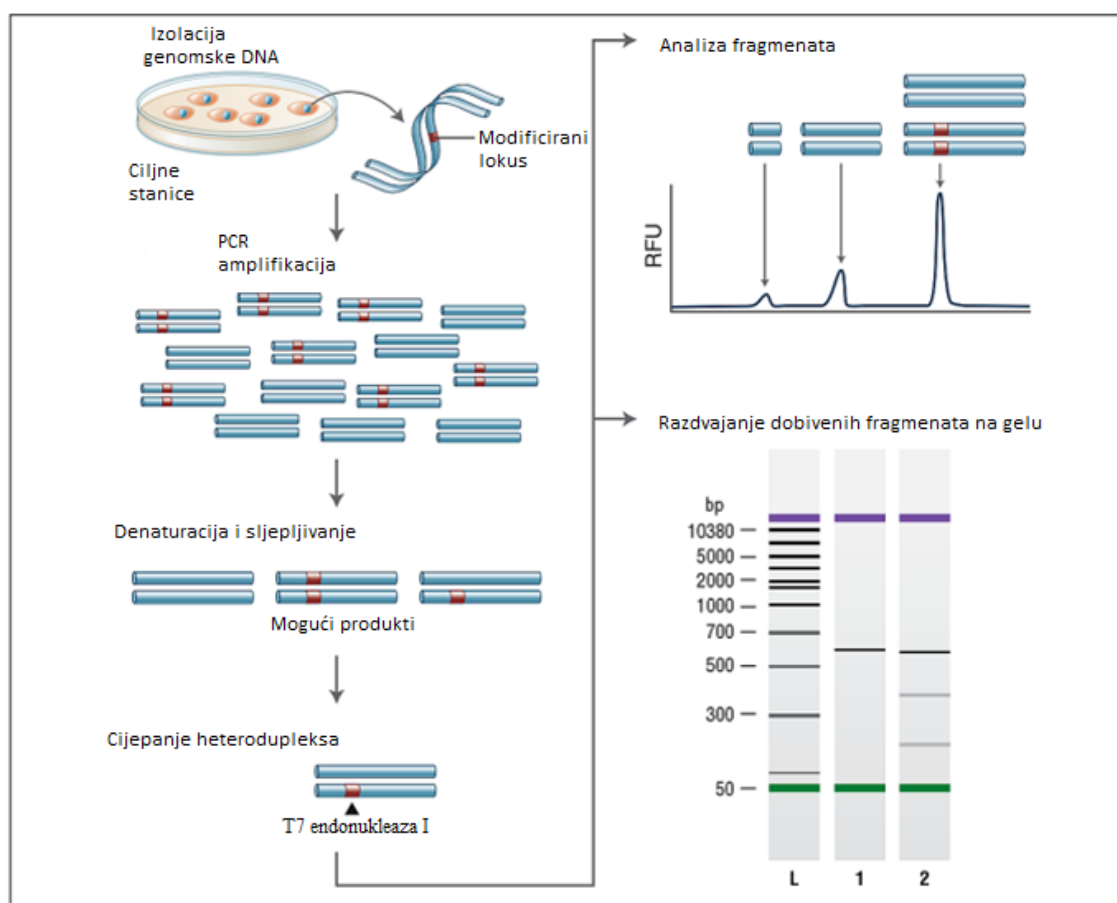
Odvoje se dva alikvota od milijun stanica svake stanične linije HEK 293 EGFP SAHH YD s narušenim genom (*HBSIL* knock-out, *PELO* knock-out, *NONO* knock-out i *SNDI* knock-out) te se stanice dva puta isperu PBS-om. DNA se izolira prema uputama proizvođača korištenjem komercijalnog kompleta za izolaciju *DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)*.³⁵ Agaroznom gel elektroforezom (100 V, 20 min) provjeri se integritet izolirane DNA.

RNA se izolira korištenjem komercijalnog kompleta za izolaciju RNA *Zymo Research Quick-RNA Miniprep kit*. Stanice se resuspendiraju u 600 μ L *RNA lysis* pufera i centrifugiraju 1 min pri 10 000 g. Supernatant se prenese u kolonicu za izolaciju označenu žutom bojom i centrifugira se 1 min na 10 000 g. U ostatak nakon centrifugiranja doda se 600 μ L 96% -tnog etanola. Otopina se nakon miješanja prenese u kolonicu za izolaciju označenu zelenom bojom i centrifugira se 30 s pri 10 000 g. Kolonica se zatim ispere dodatkom 400 μ L *RNA wash* pufera i centrifugira se 30 s pri 10 000 g. Pripremi se reakcijska smjesa za tretman DNazom I, tako da se pomiješa 75 μ L *DNA digestion* pufera i 5 μ L DNaze I. 80 μ L pripremljene smjese doda se direktno na matriks kolonice za izolaciju i inkubira se 15 min na sobnoj temperaturi. Ponovo se centrifugira 30 s na 10 000 g, zatim se doda 400 μ L *RNA prep* pufera i centrifugira se pri istim uvjetima. Kolonica se ispere dodatkom 700 μ L *RNA wash* pufera, centrifugira se 30 s na 10 000 g, te ponovo dodatkom 400 μ L *RNA wash* pufera i centrifugiranjem 2 min na 10 000 g. Kolonica se prenese u čistu 1,5 mL tubu i doda se 100 μ L vode bez DNaza i RNaza direktno na matriks kolonice. RNA se eluira centrifugiranjem 30 s na 10 000 g i spremi se na -80°C .

3.2.17. Analiza uspješnosti narušavanja gena metodom CRISPR-Cas9: T7 analiza

Jedna od metoda koja se koristi za analizu modifikacija genoma je analiza T7 endonukleazom. T7 endonukleaza prepoznaje i cijepa pogrešno sparane baze u DNA, Hollidayeve strukture i heteroduplekse DNA. Enzim cijepa prvu, drugu ili treću fosfodiestersku vezu na 5'-kraju od pogrešno sparenih baza.

Metoda se sastoji od PCR umnažanja fragmenta molekule DNA od oko 1000 pb oko predviđenog mjesta cijepanja T7 endonukleaze, reakcije cijepanja T7 endonukleazom, pročišćavanja, analize produkata pomoću uređaja *Bioanalyzer (Agilent Technologies)* i kvantifikacije rezultata. (slika 16.)



Slika 16. Shematski prikaz glavnih koraka analize modifikacije genoma T7 endonukleazom, preuzeto i modificirano iz ³⁹.

Konstruirane su početnice za umnažanje fragmenta od oko 1000 pb oko predviđenog mjesta cijepanja korištenjem online dostupnog alata na stranici <http://primer3.ut.ee/> (Tablica 8.)

Tablica 8. Početnice korištene za umnažanje fragmenta od oko 1000 pb oko predviđenog mjesta cijepanja endonukleaze T7.

Gen	Početnica	Nukleotidni slijed početnice
<i>HBS1L</i>	HBS1L_KO1_T7_F	GAAAACTTGGGACCTGGGTA
	HBS1L_KO1_T7_R	GCAGGGCATTTTAACCTGTG
	HBS1L_KO2_T7_F	CACACTCACCCCTTCCTTTC
	HBS1L_KO2_T7_R	GCTGGCTGTCAATTCCTTT
	HBS1L_KO3_T7_F	CCACGGTTGTATTTGTGTGG

	HBS1L_KO3_T7_R	GTTTCATCCAAGACCCATGC
<i>PELO</i>	PELO_KO1_T7_F	AAACAGCTGGACAGGTTGCT
	PELO_KO1_T7_R	TTGAGAGTCGAAGTCGATGG
	PELO_KO2_T7_F	CATCCGCAAGGTACAGACAG
	PELO_KO2_T7_R	TCTATTCTGAAGCGAATGCAG
	PELO_KO3_T7_F	TCGAGTTCGCACATCTTGTT
	PELO_KO3_T7_R	TACTGCATAGGCATCGTCTTT
<i>NONO</i>	NONO_KO1_T7_F	GGCCAATGGTCTTTGTTTTTC
	NONO_KO1_T7_R	TAGAGACGGGCTTTCAGCAT
	NONO_KO2_T7_F	CGTGGGATGACGATTATGAA
	NONO_KO2_T7_R	GCATTCCTTGTGAGGACCAA
	NONO_KO2_T7_F	AGCTGGGGTAATTCTGGACA
	NONO_KO2_T7_R	GGCACATGGGAGATATAACCG
<i>SND1</i>	SND1_KO1_T7_F	TTGTTGGATTTCTGGGTCAA
	SND1_KO1_T7_R	AGCCCAATCCCCAACATTAC
	SND1_KO2_T7_F	TGGTGGCAGTACTGAGATGTG
	SND1_KO2_T7_R	CATGGAGTCAACCAACCACA
	SND1_KO3_T7_F	CTTCAGTGTGAGCCATGAGG
	SND1_KO3_T7_R	GCAAAGGCAAGGTAGGTGAG

PCR reakcija pripremljena je prema tablici 9 te se provodi uz postavke uređaja navedene u tablici 10. Kao kalup, korištene su četiri različite genomske DNA izolirane iz staničnih linija HEK293 EGFP SAHH YD koje potencijalno imaju narušene gene (*HBSIL*, *PELO*, *NONO* ili *SND1*). Kao negativna kontrola korištena je DNA izolirana iz stanične linije HEK 293 EGFP SAHH YD. Koncentracija genomske DNA izmjerena je uređajem *Qubit® 3.0* (*Thermo Scientific*), na način opisan u odlomku 3.2.9. PCR reakcija provodi se uz *Q5* polimerazu, enzim iznimno visoke vjernosti umnažanja DNA (oko 280 puta veća vjernost od *Taq* polimeraze). Za ovu metodu iznimno je važna niska stopa uvođenja pogreške polimeraze kako

T7 endonukleaza ne bi cijepala pogrešno sparane baze nastale uslijed PCR reakcije, već samo one pogrešno sparane baze koje su rezultat modifikacije genoma metodom CRISPR-Cas9.

Tablica 9. Sastav PCR reakcije za umnažanje fragmenta koji obuhvaća predviđeno mjesto modifikacije genoma.

Reagens	V/ μL	Konačna koncentracija
<i>Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix</i>	25	1X
Uzvodna početnica (10 μM)	2,5	0.5 μM
Nizvodna početnica (10 μM)	2,5	0.5 μM
Kalup DNA	varijabilno	100 ng
m qH_2O	Do 50 μL	

Tablica 10. Postavke PCR uređaja za reakciju umnažanja fragmenta DNA.

	Temperatura/ $^{\circ}\text{C}$	Vrijeme/s	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98	30	1
Denaturacija	98	5	35
Sljepljivanje početnica	65	10	35
Produljenje	72	20	35
Konačno produljenje	72	2 min	1
Pauza	4-10		

Dobiveni produkti provjere se agaroznom gel elektroforezom (100 V, 20 min) tako da se 3 μL uzorka pomiješa s 1 μL boje *Gel Loading Dye, Purple (NEB)*. Kao marker koristi se *Load 2-Log DNA Ladder (NEB)*. PCR produkti potom se pročiste koristeći komercijalni komplet za pročišćavanje DNA *Zymo DNA Clean and ConcentratorTM*, prema uputama proizvođača⁴⁰, te im se izmjeri koncentracija pomoću uređaja *Qubit[®] 3.0 (Thermo Scientific)*, na način opisan u odlomku 3.2.9.

Nakon pročišćavanja i kvantifikacije PCR produkata, pripremi se smjesa za njihovu denaturaciju te ponovno sljepljivanje, kako bi nastali heterodupleksi koje T7 endonukleaza može pocijepati. 200 ng PCR produkta pomiješa se s 2 μL 10X NEBuffer 2 pufera i nadopuni vodom do 19 μL . Denaturacija i sljepljivanje provodi se prema uvjetima navedenim u tablici 11.

Tablica 11. Postavke PCR uređaja za denaturaciju i ponovno sljepljivanje PCR produkata.

	Temperatura	Brzina promjene temperature	Vrijeme
Početna denaturacija	95°C		5 min
Sljepljivanje	95-85°C	-2°C/s	
	85-25°C	-0.1°C/s	
Pauza	4°C		

Nakon sljepljivanja i nastanka DNA heterodupleksa, u smjesu se dodaje 1 µL enzima T7 Endonukleaze I (*NEB*) te se reakcija cijepanja provodi 15 min na 37°C. Endonukleaza se potom inaktivira dodatkom 1,5 µL otopine EDTA koncentracije 0,25 mol dm⁻³. Produkti reakcije pročiste se pomoću magnetskih kuglica (*Agencourt AMPure XP PCR Purification*) na sljedeći način: 20 µL uzorka prenese se u mikrotitarsku pločicu s 96 jažica te se svakom uzorku doda po 36 µL (1.8X) suspenzije magnetskih kuglica (*AMPure XP*). Uzorci s kuglicama se 10 puta izmješaju pipetom i inkubiraju se 10 min na sobnoj temperaturi što omogućuje vezanje fragmenata DNA na magnetske kuglice. Mikrotitarska pločica postavi se na magnetski stalak (*Agencourt SPRIPlate 96 Super Magnet Plate*) kako bi se magnetske kuglice vezale uz stijenke jažica, na 2 do 5 min, odnosno dok se otopina ne razbistri. Pipetom se izvuče otopina iz jažica pazeći da se ne dodiruju kuglice. Magnetske kuglice ispiru se dodatkom 180 µL 80%-tnog etanola i inkubacijom od 30 s dva puta. Važno je osigurati da u jažicama nije zaostalo etanola nakon ispiranja. Mikrotitarska pločica skine se s magnetskog stalka i u svaku jažicu doda se 20 µL mqH₂O. Uzorak se promiješa pipetom 10 puta i inkubira 5 min na sobnoj temperaturi. Mikrotitarska pločica zatim se ponovo stavi na magnetski stalak i pričeka se 2-5 min dok se otopina ne razbistri. 15 µL eluata prenese se u čistu jažicu i spremi se na -20°C.

Pročišćeni uzorci analiziraju se pomoću uređaja Bioanalyzer (Agilent Technologies), prema uputama proizvođača⁴¹. Uspješnost sustava CRISPR-Cas9 kvantificira se na temelju dobivenih koncentracija fragmenata DNA nastalih cijepanjem T7 endonukleazom i koncentracije glavnog, nepocijepanog fragmenta. Postotak učinkovitosti sustava računa se prema formuli:

$$\% \text{ modifikacije} = \frac{\gamma(\text{pocijepani fragmenti})/\text{pgmL}^{-1}}{\gamma(\text{nepocijepani fragmenti} + \text{pocijepani fragmenti})/\text{pgmL}^{-1}} \times 100\%$$

Kao negativna kontrola u reakcijama cijepanja endonukleazom T7 korišteni su PCR produkti reakcija u kojoj je kao kalup korištena genomska DNA izolirana iz nemodificiranih stanica HEK293 EGFP SAHH YD.

3.2.18. Reverzna transkripcija spregnuta s kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze

Metoda reverzne transkripcije spregnute s kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (RT-qPCR) koristi se za kvantifikaciju ekspresijske razine mRNA. Ova vrlo osjetljiva metoda sastoji se od sinteze cDNA reverznom transkriptazom koja se zatim amplificira lančanom reakcijom polimeraze te se mjeri fluorescencija koja odgovara količini umnožene DNA. Reverzna transkriptaza (RNA-ovisna DNA-polimeraza) je enzim koji kao kalup koristi RNA i na njemu stvara komplementarnu DNA (cDNA). Kao početnice u ovoj reakciji mogu se koristiti nasumični heksameri, početnice specifične za ciljani gen ili oligo (dT) početnice. Oligo (dT) početnice omogućuju specifično praćenje količine mRNA, jer većina eukariotskih mRNA ima poliA rep na 3'-kraju. Fluorescencija se u ovoj metodi mjeri korištenjem boje *SYBR Green* koja fluorescira vezanjem na dvolančanu DNA. Za kvantifikaciju ekspresijske razine mRNA potrebno je normalizirati razine ekspresije u odnosu na endogenu kontrolu. Kao endogena kontrola koriste se geni čija je ekspresija u zadanoj staničnoj liniji stabilna, npr. β -aktin ili gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (GAPDH).

Za sintezu cDNA korištena je ukupna stanična RNA te komercijalni komplet za reakciju reverzne transkripcije *ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB)*. Korišteni reagensi i odgovarajuće količine navedeni su u tablici 12. Koncentracija uzoraka ukupne stanične RNA izmjerena je fluorimetrijskom metodom korištenjem uređaja *Qubit® 3.0 (Thermo Scientific)* i komercijalnog kompleta za mjerenje koncentracije RNA *Qubit® RNA BR Assay Kit (Thermo Scientific)*. Koncentracija RNA izmjerena je istim postupkom kao što je opisano u odlomku 3.2.9. za mjerenje koncentracije DNA.

Tablica 12. Sastav reakcije reverzne transkripcije za sintezu cDNA.

Reagens	
Ukupna stanična RNA	650 ng
Početnice: oligo dT	0,1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$
mqH ₂ O	Do 8 μL

Uzorci se denaturiraju 5 min na 65°C, kratko se centrifugiraju i stave na led. Uzorcima se potom doda 10 µL 2x *Protoscript II Reaction Mix (NEB)* i 2 µL 10x *Protoscript II Enzyme Mix (NEB)*. Pripremljena reakcijska smjesa inkubira se prema postavkama navedenim u tablici 13.

Tablica 13. Postavke uređaja za PCR za reakciju reverzne transkripcije

	Temperatura	Vrijeme
Sinteza cDNA	42°C	1 h
Inaktivacija enzima	80°C	5 min

Kao endogena kontrola u reakciji RT-qPCR korišten je β-aktin. Budući da se radi o proteinu ključnom za normalnu funkciju stanice, njegova je ekspresija stabilna te se može koristiti kao endogena kontrola. Početnice korištene u reakciji za umnažanje endogene kontrole i gena za *S*-adenozilhomocistein-hidrolazu fuzioniranog sa zelenim fluorescentnim proteinom navedene su u tablici 14. Reakcijska smjesa sadrži fluorescentnu boju ROX 1, koja služi kao pasivna referentna fluorescencija. Ima ulogu u poništavanju malih razlika u fluorescenciji koje potječu od npr. mjehurića ili malih razlika između jažica te tako omogućuje dobivanje preciznijih rezultata. Reakcijska smjesa za reakciju RT-qPCR pripremi se prema tablici 15. Za svaki uzorak napravljena su četiri tehnička replikata. Reakcija se provodi u optički pogodnim pločicama s 96 jažica u uređaju *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)* nakon čega je provedena i temperaturna denaturacija produkata reakcija kako bi se provjerila njihova specifičnost.

Tablica 14. Početnice za reakciju RT-qPCR

Početnica	Nukleotidni slijed
EGFP_Cf/F	GCATGGACGAGCTGTACAAG
ahhg3/R	CGGAATGCCAGCCTTGGCAAT
β-aktin (uzvodna i nizvodna početnica)	Iz komercijalnog kompleta <i>Human Housekeeping Gene Primer Sets (MCLAB)</i>

Tablica 15. Sastav RT-qPCR reakcije.

Reagens	V/ μL	Konačna koncentracija
2 x Power <i>SYBR Master Mix</i> (<i>NEB</i>)	10	1x
Uzvodna početnica	0,2	0,1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$
Nizvodna početnica	0,2	0,1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$
cDNA	1	
mQ H ₂ O	8,6	

Pripremljena reakcijska smjesa u optički pogodnoj pločici stavi se u uređaj za RT-qPCR namješten prema postavkama navedenim u tablici 16.

Tablica 16. Postavke uređaja za RT-qPCR

	T/°C	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	5 min	1
Denaturacija	95	15 s	40
Produljenje	60	35 s	40

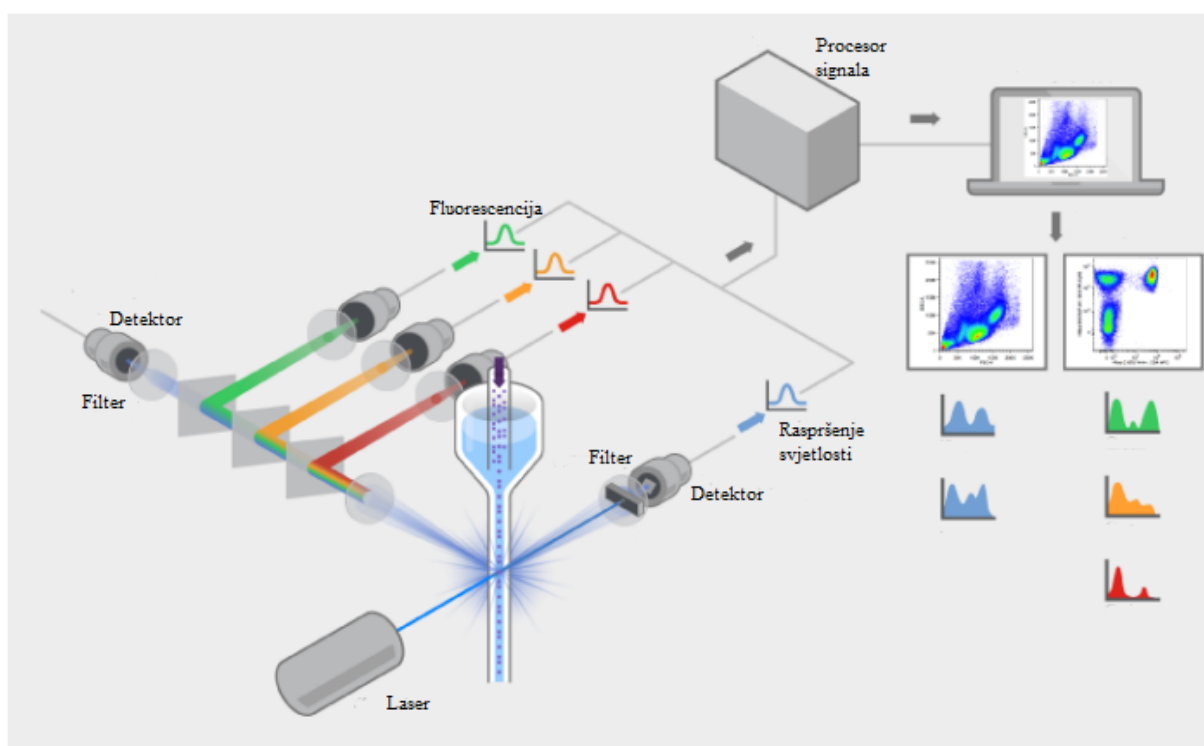
Dobiveni podaci se analiziraju korištenjem programa *StepOne™ Software v.2.3* (*Thermo Fisher Scientific*) i *Microsoft Excel* te se izračuna relativna količina RNA u uzorcima u odnosu na divlji tip.

3.2.19. Protočna citometrija

Protočna citometrija je metoda koja omogućava analizu velikog broja pojedinačnih stanica u kratkom vremenu. Također je moguće analizirati velik broj staničnih parametara koristeći fluorescentne spojeve ili fluorescentno obilježena protutijela. Na taj način moguće je analizirati ekspresiju proteina, posttranslacijske modifikacije, količinu DNA, organela, membranski potencijal i sl. Uz navedene parametre, protočnom citometrijom mogu se analizirati i fluorescentno obilježeni proteini.

Protočni citometar sastoji se od mehaničkog dijela za fluide, optičkog sustava i elektronike. Mehanički dio zadužen je za izdvajanje pojedinačnih stanica iz suspenzije i njihov prijenos do mjesta na kojem ih obasjava laser, što dovodi do raspršenja svjetlosti i pobude fluorofora. Sustavom leća i filtera raspršena svjetlost i emitirana fluorescencija dolaze do detektora. Detektirani signal se zatim obrađuje i dobiveni rezultati analiziraju se programom *FlowJo* (*Tree Star, Inc.*).

Za analizu na protočnom citometru (*BD FACSCalibur™*, *Becton Dickinson*) izdvoji se 500 000 stanica svake stanične linije HEK 293 EGFP SAHH YD s narušenim genom (*HBS1L* knock-out, *PELO* knock-out, *NONO* knock-out i *SND1* knock-out) te se stanice isperu PBS-om. Na citometru je analizirano 10 000 stanica po uzorku. Plavim laserom ($\lambda = 488$ nm) pobuđuje se zeleni fluorescentni protein fuzioniran s mutiranom verzijom proteina SAHH (Y328D). Pobuda dovodi do emisije fluorescencije koja se detektira pomoću filtera za zelenu boju (FL1, 530/30 nm). Analizom dobivenih rezultata odredi se udio fluorescentnih stanica, odnosno razina ekspresije zelenog fluorescentnog proteina.



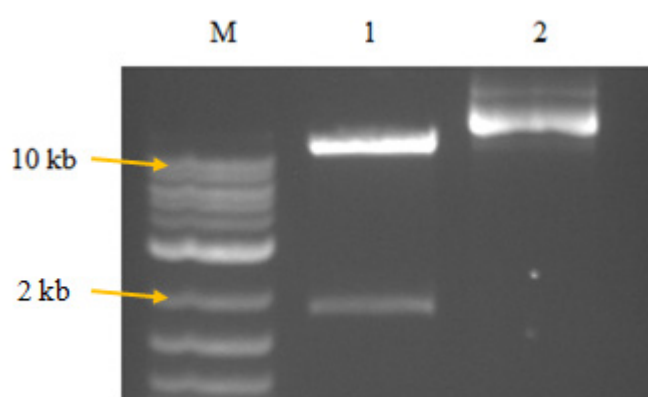
Slika 17. Shema protočnog citometra, preuzeto i modificirano iz ⁴².

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

4.1.1. Kloniranje usmjeravajućih nukleotidnih sljedova za narušavanje gena

Plazmid lentiCRISPRv2 pocijepan je restrikcijском endonukleazom *BsmBI*, kako bi se konstruirani oligonukleotidi mogli pravilno ligirati na plazmidnu okosnicu. Na slici 18. prikazan je gel nakon provedene agarozne gel elektroforeze.

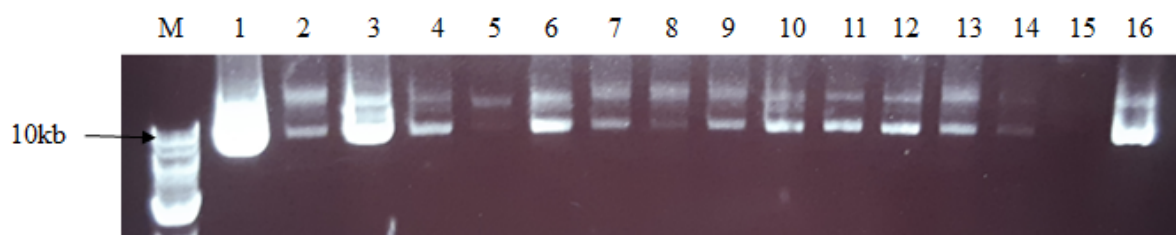


Slika 18. Restrikcijска razgradnja plazmida lentiCRISPR v2. M- marker molekulskih masa *Load 2-Log DNA Ladder (NEB)*, 1- lentiCRISPRv2 pocijepan restrikcijском endonukleazom *BsmBI*, 2- kontrolni, nepocijepani plazmid lentiCRISPRv2.

U prvoj jažici, u kojoj je nanesen uzorak pocijepanog plazmida vidljiva je vrpca iznad 10 kb koja odgovara većem fragmentu plazmida veličine oko 13 kb i vrpca koja odgovara fragmentu između restrikcijских mjesta za *BsmBI*, veličine oko 2 kb. U drugoj jažici pojavljuje se vrpca iznad 10 kb koja odgovara superzavijenom obliku nepocijepanog plazmida lentiCRISPRv2.

4.1.2. Izolacija plazmida

Nakon reakcije ligacije slijepljenih oligonukleotida i pocijepane okosnice plazmida lentiCRISPRv2 te kemijske transformacije ligacijske smjese u bakterije, provedena je izolacija plazmida iz bakterijskih kolonija koje su narasle preko noći na selektivnim podlogama, kako je opisano u odlomku 3.2.6. Nakon izolacije, dobiveni plazmidi analizirani su na agaroznom gelu. Na slici 19. prikazani su neki od izoliranih plazmida.



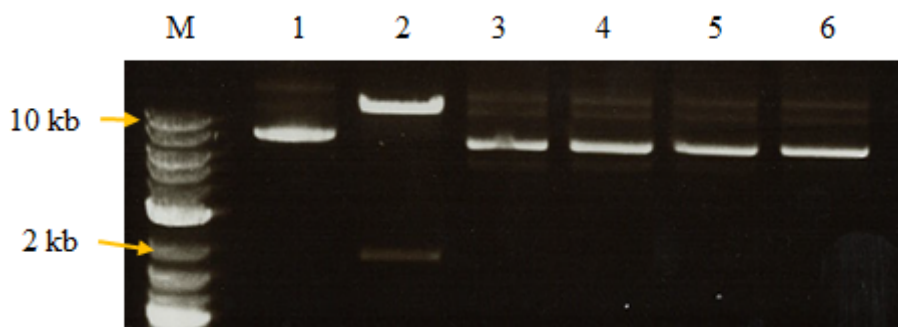
Slika 19. Izolirani plazmidi iz bakterijskih kolonija. M- marker molekulskih masa *Load 2-Log DNA Ladder* (NEB), 1- H11, 2 - H12, 3 – H21, 4 – H22, 5 – H23, 6 – H24, 7 - H34, 8 - P11, 9 - P12, 10 - P31, 11 - N33, 12 - N34, 13 - S13, 14 - S14, 15 - S31, 16 - S33. Oznake- slova H, P, N i S odnose se na gene koje se želi narušiti- *HBSIL* (H), *PELO* (P), *NONO* (N) i *SND1* (S). Prva znamenka odnosi se na usmjeravajući nukleotidni konstrukt za narušavanje gena (1, 2 ili 3), a druga znamenka odnosi se na koloniju iz koje je plazmid izoliran (1, 2, 3 ili 4).

Na slici je vidljivo da svaki uzorak izoliranog plazmida sadrži dvije karakteristične vrpce. Gornja vrpca može se pripisati relaksiranom obliku izoliranog plazmida (14 kb) dok donja vrpca manje veličine pripada superzavijenom obliku plazmida koji putuje brže kroz agarozni gel. Također je vidljivo da svaki uzorak pokazuje različit intenzitet vrpce što upućuje na različit prinos izoliranih plazmida ovisno o uzorku.

4.1.3. Restriksijska analiza izoliranih plazmida i sekvenciranje

Potvrda uspješnog kloniranja dizajniranih oligonukleotida u plazmidnu okosnicu provedena je na dva načina: restriksijskom razgradnjom endonukleazom *BsmBI* te konačno sekvenciranjem izoliranih plazmida kao što je opisano u odlomku 3.2.7. i 3.2.10.

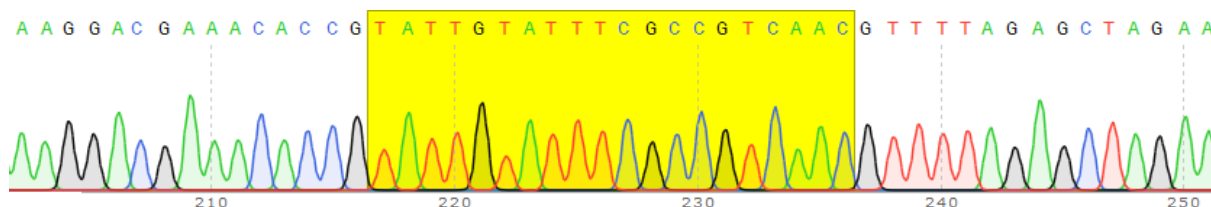
Na slici 20 prikazan je agarozni gel dobivenih fragmenata nakon restriksijske razgradnje. Ukoliko je nukleotidni slijed ispravno kloniran u plazmid, gube se restriksijska mjesta za cijepanje enzimom *BsmBI* te plazmid nakon reakcije ostaje nepocijepan. Ukoliko nije došlo do ugradnje oligonukleotida u plazmidnu okosnicu, prilikom cijepanja nastaju dvije vrpce. Vrpca veličine 13 kb odgovara većem fragmentu pocijepanog plazmida, a druga vrpca veličine 2 kb odgovara fragmentu između restriksijskih mjesta za *BsmBI*. Plazmidi za koje je utvrđeno da nemaju restriksijsko mjesto za endonukleazu *BsmBI* poslani su u servis za sekvenciranje na točno određivanje nukleotidnog slijeda.



Slika 20. Restriksijska razgradnja izoliranih plazmida endonukleazom *BsmBI*. M- marker molekulskih masa *Load 2-Log DNA Ladder* (NEB). 1- negativna kontrola cijepanja, prethodno provjeren plazmid lentiCRISPRv2-UPF1-KO1, 2- pozitivna kontrola cijepanja, plazmid lentiCRISPRv2 koji ne sadrži insert odnosno ima očuvano restriksijsko mjesto za *BsmBI*. 3 i 4- uzorci plazmida s oligonukleotidom za narušavanje gena *PELO*, konstrukt broj 3, klon 1 (P31), odnosno klon 2 (P32). 5 i 6- uzorci plazmida s oligonukleotidom za narušavanje gena *NONO*, konstrukt broj 1, klon 1 (N11), odnosno klon 2 (N12).

Na slici je vidljivo da ne dolazi do cijepanja plazmida u jažicama 3, 4, 5 i 6 budući da je vidljiva karakteristična vrpca superzavijenog plazmida. U jažici (2) u koju je nanesa pozitivna kontrola cijepanja vidljive su dvije vrpce, jedna koja odgovara lineariziranom obliku plazmida veličine oko 13 kb te vrpca veličine oko 2 kb koja odgovara pocijepanom fragmentu plazmida između restriksijskih mjesta.

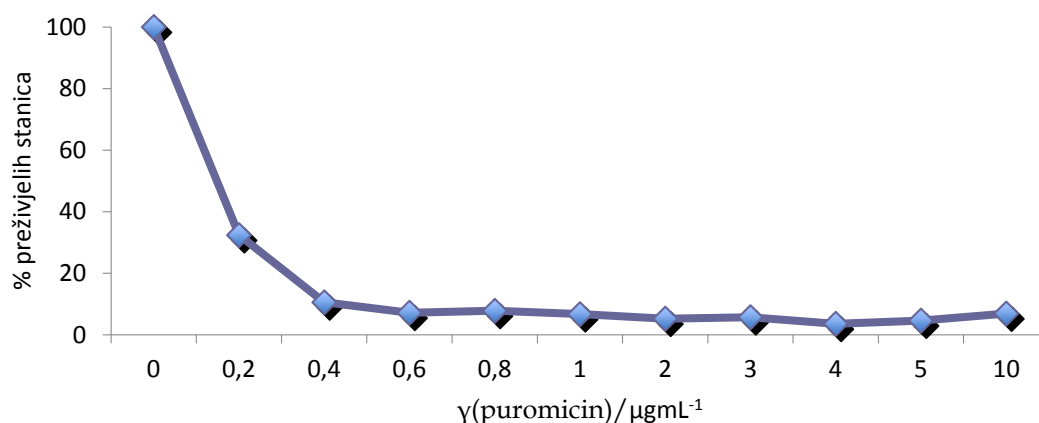
Konačna potvrda uspješnog kloniranja uzoraka plazmida koji se ne cijepaju dobivena je određivanjem točnog nukleotidnog slijeda plazmida Sangerovim sekvenciranjem. Kromatogram s označenim nukleotidima koji odgovaraju sekvenci usmjeravajućeg nukleotidnog slijeda za narušavanje gena *HBSIL* prikazan je na slici 21.



Slika 21. Kromatogram sekvenciranog plazmida s ugrađenim usmjeravajućim nukleotidnim slijedom 1 za narušavanje gena *HBSIL*. Žutom bojom označen je nukleotidni slijed koji odgovara nukleotidnom slijedu dizajniranog oligonukleotida (Tablica 1).

4.1.4. Utjecaj antibiotika na preživljenje stanica - MTT test

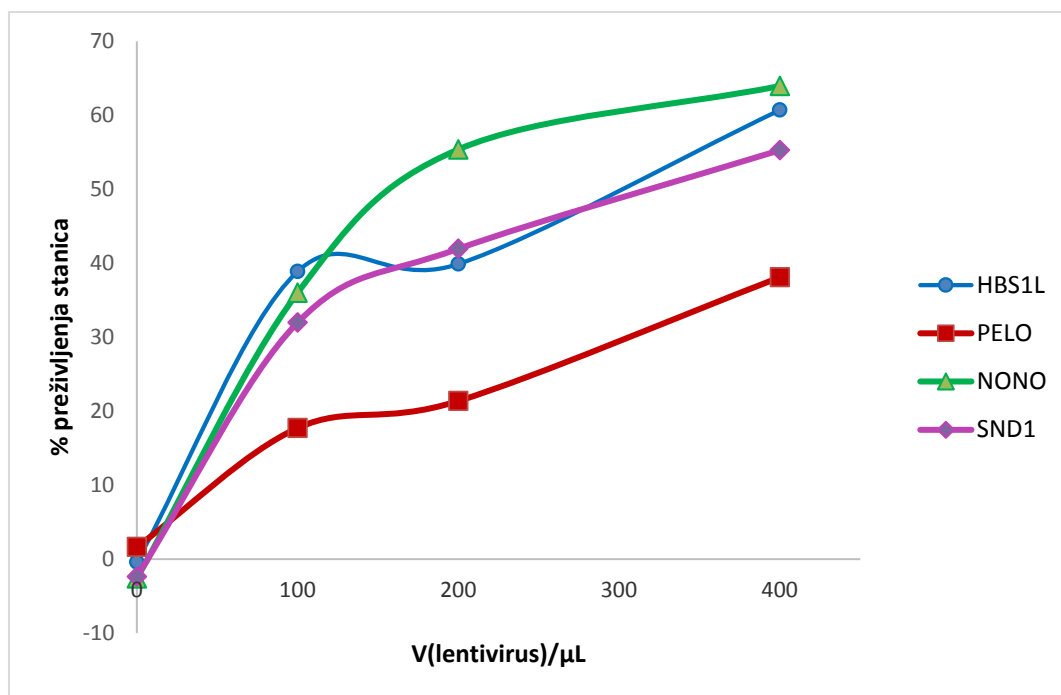
Prije početka rada sa staničnim linijama potrebno je odrediti radnu koncentraciju antibiotika puromicina koji će se koristiti za selekciju stanica koje su primile prethodno konstruirane plazmide. Točnije, potrebno je odrediti najmanju koncentraciju puromicina koja nakon određenog vremena dovodi do potpune smrti netransfeciranih stanica. U ovom radu ta koncentracija određena je MTT-testom, kao što je opisano u odlomku 3.2.12. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija pri $\lambda = 570$ nm izračunat je postotak preživjelih stanica u ovisnosti o koncentraciji dodanog puromicina. Dobiveni grafički prikaz prikazan je na slici 22. Kao radna koncentracija odabrana je koncentracija puromicina od $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Slika 22. Grafički prikaz ovisnosti postotka preživjelih stanica nakon 5 dana selekcije o koncentraciji dodanog puromicina.

4.1.5. Stvaranje lentivirusnih čestica i određivanje titra

Lentivirusne čestice dobivene su transfekcijom HEK293T WT stanica prikladnom kombinacijom plazmida kao što je opisano u odlomku 3.2.13. Za određivanje funkcionalnog titra dobivenih lentivirusnih čestica (broja infektivnih virusa po mL) korišten je postotak preživljenja stanica koje su primile gen za rezistenciju na puromicin. Relativni postotak preživljenja stanica određen je MTT testom u odnosu na stanice koje nisu tretirane antibiotikom. Dobiveni grafički prikaz prikazan je na slici 23.



Slika 23. Preživljenje stanica za svaki ciljani narušeni gen u ovisnosti o volumenu lentivirusnih čestica korištenog za transdukciju

Broj lentivirusnih čestica u 1 mL (funkcionalni titar) izračunat je na temelju postotka preživjelih stanica i početnog broja nasađenih stanica, prema sljedećoj formuli:

$$\text{titar} = \frac{1\text{mL}}{\text{razrijeđenje}} \times \frac{\% \text{ preživljenja}}{100 \%} \times \text{broj nasađenih stanica}$$

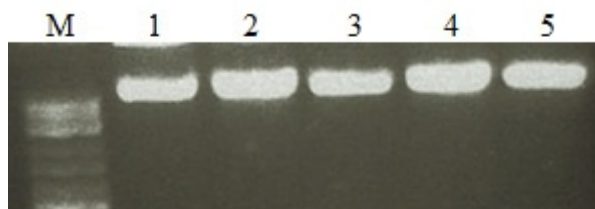
Tablica 17. Broj lentivirusnih čestica u 1mL medija

Ciljani narušeni gen	Broj lentivirusnih čestica u 1 mL
<i>HBS1L</i>	455 250
<i>PELO</i>	285 750
<i>NONO</i>	479 625
<i>SND1</i>	414 525

4.1.6. Izolacija genomske DNA preživjelih stanica nakon infekcije

Nakon određivanja funkcionalnog titra lentivirusnih čestica, stanice HEK293 EGFP SAHH YD inficirane su uz multiplicitet infekcije 10, odnosno omjer stanica i lentivirusa iznosio je

1:10 za svaki narušavani gen kako bi se osigurala visoka frekvencija ugradnje željenog inserta u genom svake stanice. Nakon infekcije i selekcije, preživjele stanice iskorištene su za izolaciju DNA i RNA u svrhu daljnje analize. Na slici 24. prikazana je gel elektroforeza genomske DNA nakon izolacije iz stanica

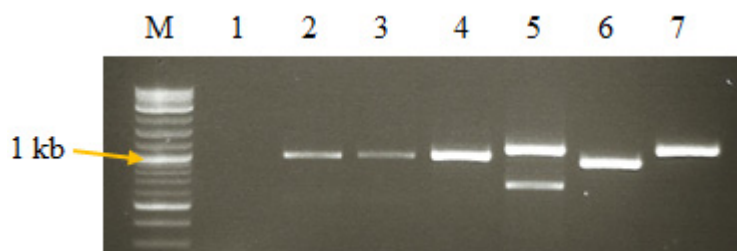


Slika 24. Genomska DNA izolirana iz staničnih linija HEK293 EGFP SAHH YD za koje se pretpostavlja da imaju narušene gene *HBSIL*, *PELO*, *NONO* ili *SNDI*. M- marker molekulskih masa *Load 2-Log DNA Ladder (NEB)*, 1- gDNA izolirana iz stanične linije HEK293 EGFP SAHH YD, 2- gDNA izolirana iz stanične linije HEK293 EGFP SAHH YD s narušenim genom *HBSIL*, 3- gDNA izolirana iz stanične linije HEK293 EGFP SAHH YD s narušenim genom *PELO*, 4- gDNA izolirana iz stanične linije HEK293 EGFP SAHH YD s narušenim genom *NONO*, 5- gDNA izolirana iz stanične linije HEK293 EGFP SAHH YD s narušenim genom *SNDI*.

Na slici je u svakoj jažici vidljiva vrpca koja odgovara genomske DNA izoliranoj iz odgovarajuće stanične linije.

4.1.7. Analiza modifikacija genoma T7 endonukleazom

Uspješnost uvođenja modifikacija CRISPR-Cas9 sustavom provjerena je korištenjem endonukleaze T7, kao što je opisano u odlomku 3.2.17. U lančanoj reakciji polimerazom kao kalup je korištena genomska DNA izolirana iz staničnih linija HEK293 EGFP SAHH YD s narušenim genom *HBSIL*, *PELO*, *NONO* ili *SNDI*. U prvom koraku umnožen je fragment približne veličine 1 kb koji sadrži mjesto nastanka dvolančanog loma, odnosno sadrži potencijalne insercije i delecije nastale nehomolognom rekombinacijom uslijed djelovanja CRISPR-Cas9 sustava. Na slici 25. prikazan je gel nakon provedene agarozne gel elektroforeze nekih od produkata lančane reakcije polimerazom.

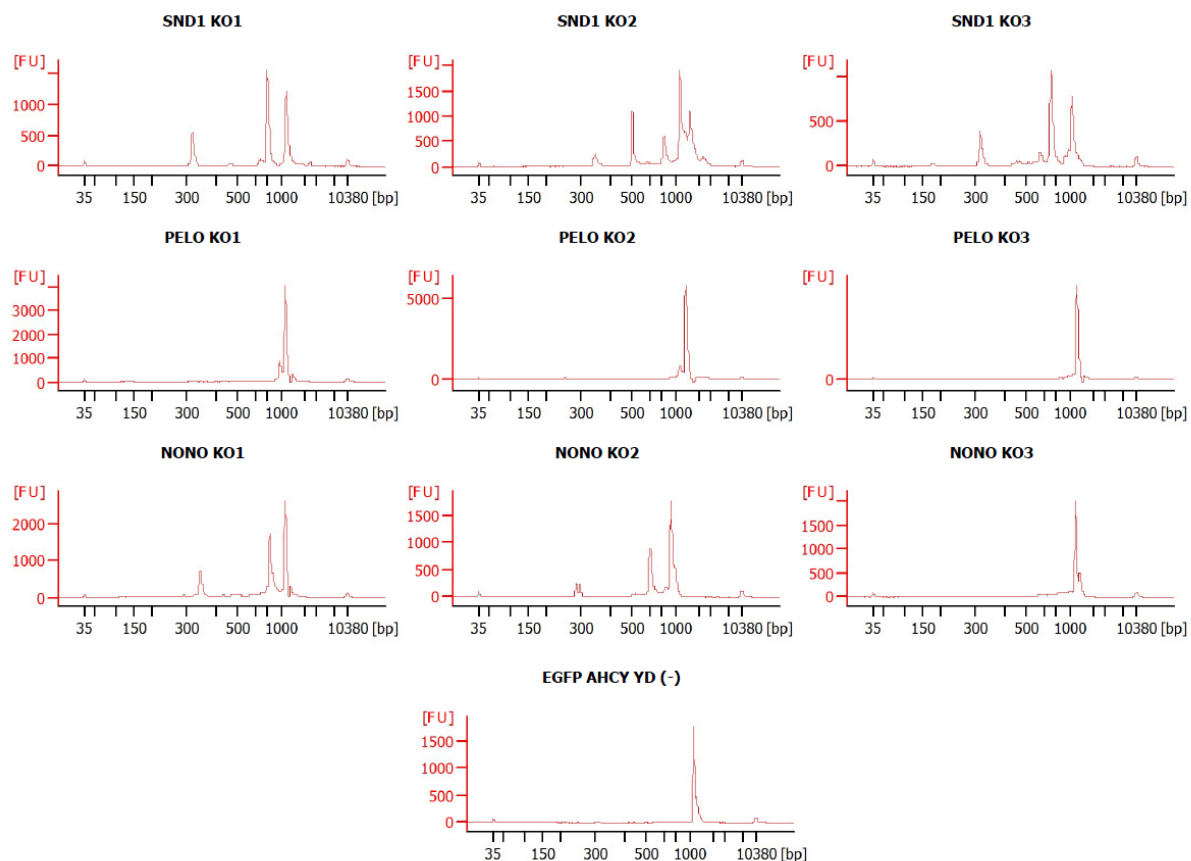


Slika 25. M- marker molekularnih masa *Load 2-Log DNA Ladder (NEB)*, 1- negativna kontrola reakcije, reakcija bez dodanog kalupa DNA, 2, 3, 4, 5, 6, 7 PCR produkti koji sadrže uvedene modifikacije

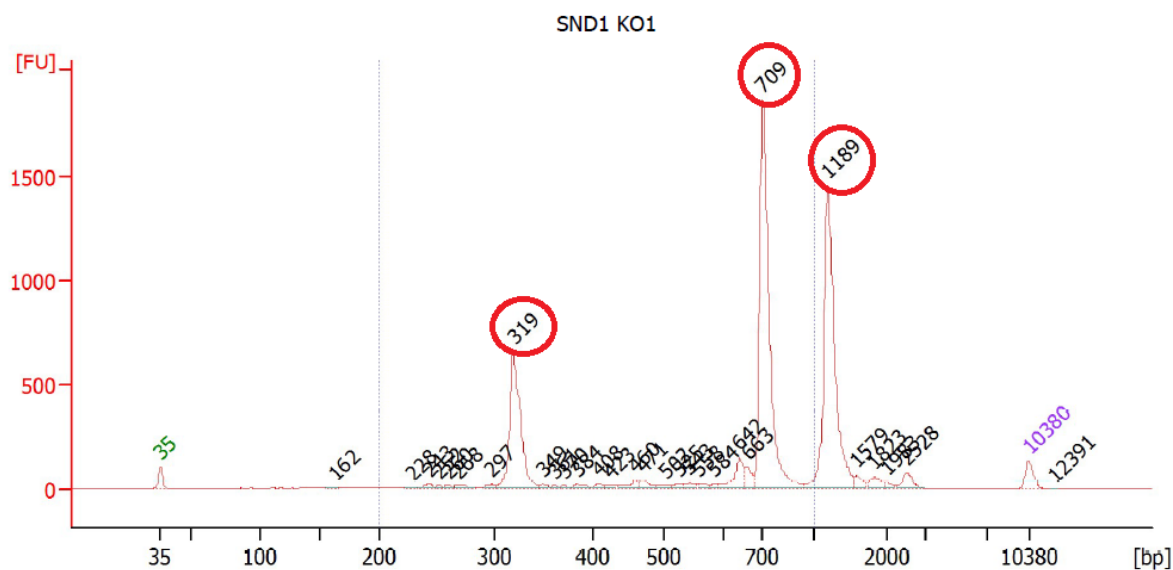
Optimizacijom uvjeta lančane reakcije polimerazom za neselektivne reakcije (jažica 5) dobiveni su svi ciljani produkti.

Ukoliko je došlo do uvođenja modifikacija u očekivanoj regiji staničnog genoma, T7 endonukleaza će cijepati glavni fragment na dva manja fragmenta. Dodatno se može formirati i nepocijepani heterodupleks molekule DNA koji formira dodatnu vrpču na gelu, na položaju veće veličine od veličine glavnog fragmenta, budući da zbog različitih sekundarnih struktura ovakva molekula DNA putuje sporije od homodupleksa.

Na slici 26. nalaze se grafički prikazi dobiveni analizom uzoraka genomske DNA izoliranih iz staničnih linija HEK293 EGFP SAHH YD s narušenim genima *SND1*, *PELO* i *NONO* pomoću uređaja Bioanalyzer (Agilent Technologies). Kao negativna kontrola korištena je genomska DNA izolirana iz stanične linije HEK293 EGFP SAHH YD bez modifikacije genoma. Na slici 27. izdvojen je grafički prikaz analize genomske DNA izolirane iz stanične linije HEK293 EGFP SAHH YD za koju se pretpostavlja da ima narušeni gen *SND1*. Vidljive su vrpce koje odgovaraju fragmentima DNA dobivenim nakon cijepanja endonukleazom T7 (vrpce veličine 319 pb i 709 pb) te glavni fragment veličine 1189 pb.



Slika 26. Grafički prikaz analize modifikacije gena *SND1*, *PELO* i *NONO* endonukleazom T7. Za svaki gen prikazani su fragmenti koji obuhvaćaju modifikacije uvedene korištenjem tri različita usmjeravajuća nukleotidna slijeda za jedan gen (KO1, KO2, KO3). Na y-osi nalazi se razina fluorescencije (FU), a na x-osi veličina fragmenata DNA (bp).



Slika 27. Grafički prikaz analize modifikacije gena *SND1* uvedene pomoću usmjeravajućeg nukleotidnog slijeda 1 (KO1). Crvenim oznakama označeni su produkti cijepanja i glavni fragment.

Na temelju dobivenih rezultata analize kvantificirana je uspješnost metode (Tablica 18.) Uspješnost modifikacije (% target efficiency) izračunata je prema formuli:

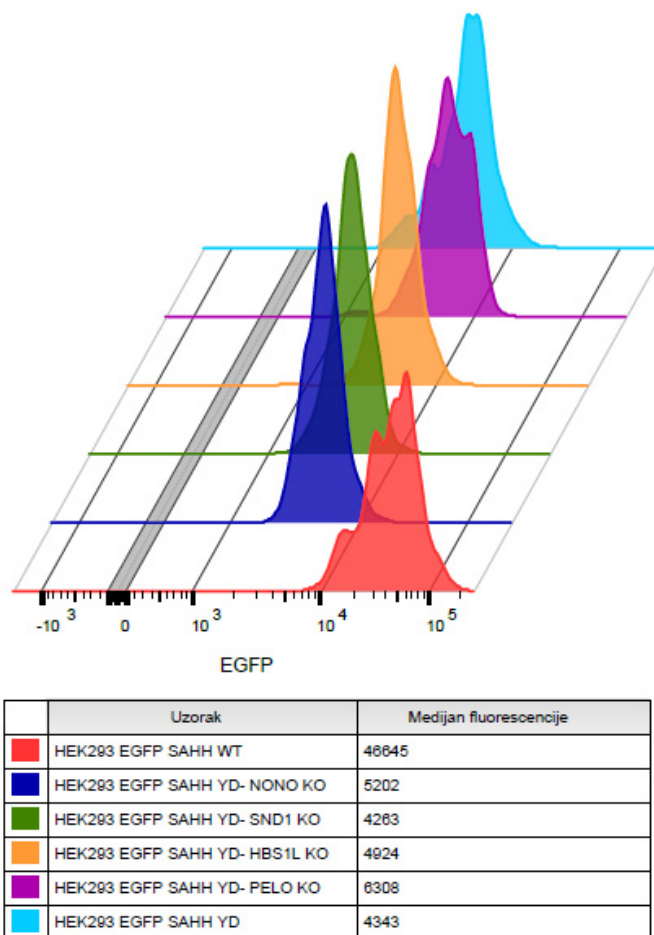
$$\% \text{ modifikacije} = \frac{\gamma(\text{pocijepani fragmenti})/\text{pgmL}^{-1}}{\gamma(\text{nepocijepani fragmenti} + \text{pocijepani fragmenti})/\text{pgmL}^{-1}} \times 100\%$$

Tablica 18. Veličine fragmenata PCR produkata te produkata cijepanja endonukleaze T7. Uspješnost CRISPR-Cas9 sustava izražena je s % uspješnosti modifikacije.

		Glavni fragment /bp	Fragment 1/bp	Fragment 2/bp	% uspješnost modifikacije	Heterodupleks/bp
HBS1L	KO1	1005	/	/	/	/
	KO2	1380	393	844	46,26	1547
	KO3	1026	/	/	/	/
PELO	KO1	1127	/	/	/	/
	KO2	1141	/	/	/	/
	KO3	1265	/	/	/	/
NONO	KO1	1126	346	757	65,81	/
	KO2	888	291,5	604	45,53	/
	KO3	1208	/	/	/	1385
SND1	KO1	1189	319	709	68,11	/
	KO2	1144	348	761	23,68	1605
	KO3	1047	317	660	71,15	/

4.1.8. Protočna citometrija

Protočnom citometrijom analiziran je intenzitet fluorescencije fuzijskog proteina EGFP SAHH kod različitih modificiranih i nemodificiranih staničnih linija (slika 28.). Medijan fluorescencije izračunat je na temelju mjerenja 10 000 stanica svake stanične linije.

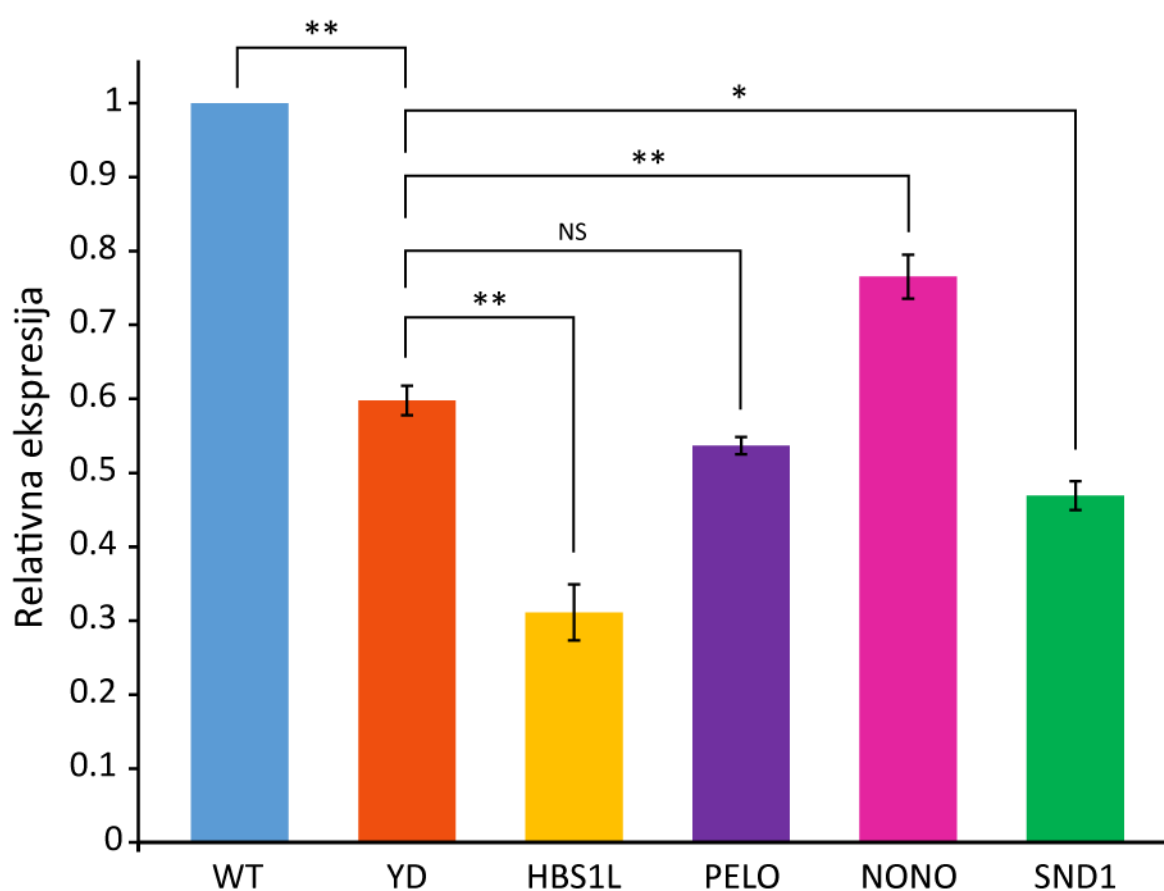


Slika 28. Histogram razine fluorescencije zelenog fluorescentnog proteina u analiziranim staničnim linijama.

Na slici je vidljivo da je medijan fluorescencije zelenog fluorescentnog proteina u stanicama divljeg tipa (HEK293 EGFP SAHH WT) oko deset puta veći od medijana fluorescencije u ostalim analiziranim stanicama koji eksprimiraju mutiranu verziju fuzijskog proteina (HEK293 EGFP SAHH YD). Usporedbom intenziteta fluorescencije mutiranih proteina u različitim modificiranim linijama može se zaključiti da u stanicama s narušenim genima ne dolazi do značajnog povećanja fluorescencije u odnosu na stanice HEK293 EGFP SAHH YD.

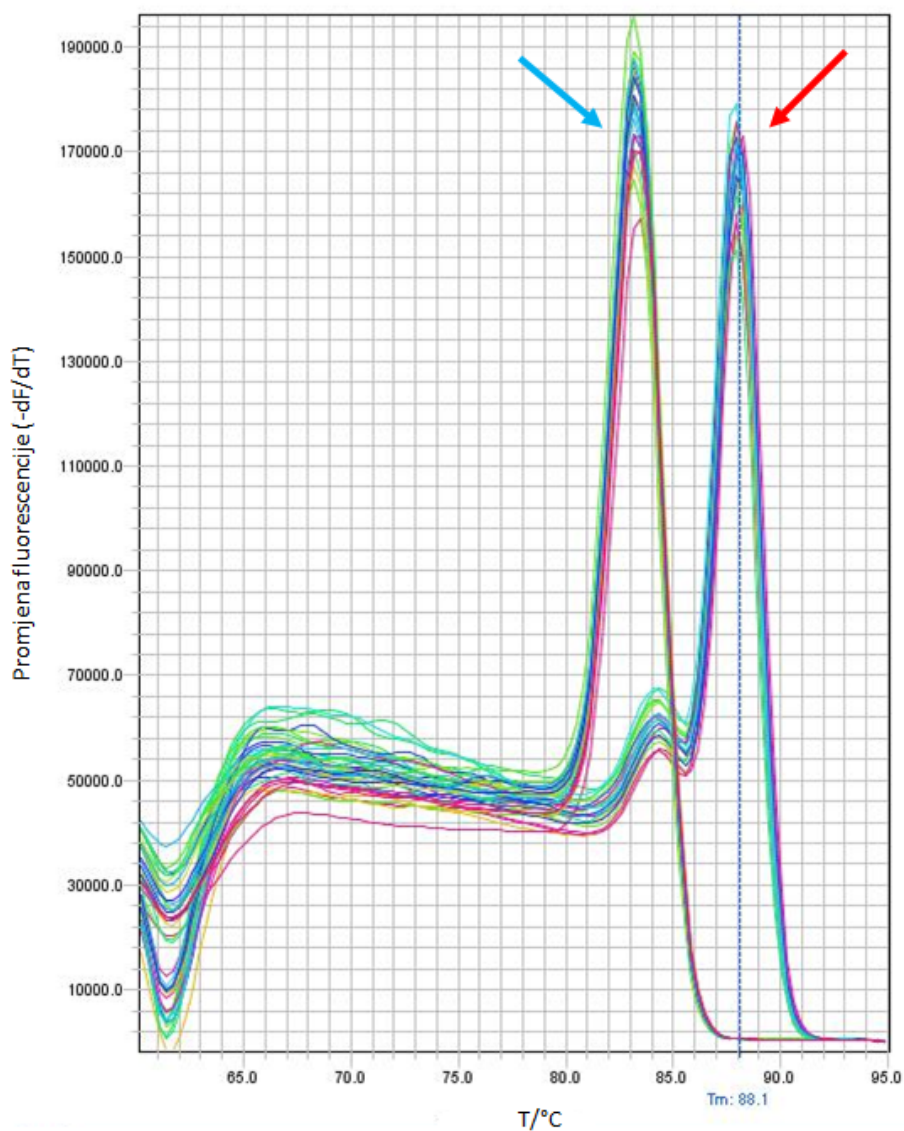
4.1.9. Reverzna transkripcija spregnuta s kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (RT-qPCR)

Reakcija reverzne transkripcije spregnute s kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (RT-qPCR) provedena je kao što je opisano u odlomku 3.2.18. Dobiveni podaci su analizirani korištenjem programa *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)* i *Microsoft Excel*. Izračunate C_T vrijednosti normalizirane su na endogenu kontrolu (ΔC_T) te potom na uzorak divljeg tipa ($\Delta\Delta C_T$). Relativna količina RNA u uzorku izračunata je prema formuli $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 29.



Slika 29. Relativna ekspresija molekule mRNA koja kodira za enzim SAHH u uzorcima staničnih linija HEK293 EGFP SAHH YD s narušenim genima *HBS1L*, *PELO*, *NONO* i *SND1*. Na slici su označene p vrijednosti dobivene T-testom. *označava vrijednost $p < 0,05$, a ** označavaju vrijednost $p < 0,01$.

Na slici je vidljiva značajna razlika u količini eksprimirane mRNA u uzorku s divljim tipom enzima (WT) i u uzorku s mutiranim enzimom (YD). U uzorcima s narušenim genima *HBS1L* i *SND1* dolazi do smanjenja razine ekspresije mRNA, dok u uzorku s narušenim genom *PELO* ne dolazi do značajne razlike u ekspresiji. U uzorku s narušenim genom *NONO* vidljiv je statistički značajan porast razine ekspresije molekule mRNA koja kodira za enzim SAHH.



Slika 30. Krivulja mekšanja produkata RT-qPCR reakcije. Plavom strelicom označena je vrpca koja odgovara mekšanju produkta kontrolne reakcije, a crvenom vrpca koja odgovara mekšanju produkta SAHH gena.

Iz dobivene krivulje mekšanja vidljivo je da je provedena reakcija specifična te da ne dolazi do umnažanja neželjenih produkata.

4.2. Rasprava

S-adenozilhomocistein-hidrolaza iznimno je važan enzim za gotovo sve organizme, uključujući i čovjeka. Njegova nedostatna aktivnost, uzrokovana genetskim mutacijama, dovodi do teških metaboličkih poremećaja, najviše zbog inhibicije *S*-adenozilmetionin ovisnih metiltransferaza koja posljedično uzrokuje tešku kliničku sliku kod pacijenata.

Od otkrića prvog pacijenta do danas je otkriveno 8 mutacija koje uzrokuju ili smanjenu razinu samog proteina ili njegovu smanjenu aktivnost¹⁶ no kod pacijenta koji sadrži nedavno otkrivenu mutaciju u genu za enzim SAHH (c.982 T > G; p.Tyr328Asp) također je primijećena i smanjena razina ekspresije molekule mRNA u fibroblastima. Mehanizam ovog fenomena do danas ostaje nerazjašnjen, te s obzirom na nedostatak ciljane terapije, temeljna molekularna istraživanja ovog oboljenja ključna su za njegovo bolje razumijevanje i razvoj budućih terapija za pacijente.

Trenutna saznanja o različitim staničnim mehanizmima razgradnje abnormalnih transkripata upućuju na potencijalni mehanizam razgradnje uslijed zastajanja ribosoma tijekom translacije istraživanog transkripta zbog njegove različite sekundarne strukture uzrokovane prethodno navedenom mutacijom.⁴³ Kako bi se potvrdila ova tvrdnja, glavni predmet ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj gena *HBSIL* i *PELO* kao ključnih čimbenika navedenog mehanizma degradacije na razinu ekspresije mutiranog transkripta. Uz to, ispitan je i utjecaj dodatna dva gena, *NONO* i *SNDI*, koji su na temelju prethodnih istraživanja pokazali povećan afinitet za vezanje mutiranog transkripta.

Ispitivanje utjecaja ova četiri gena na razinu ekspresije mutiranog transkripta u ovom radu provedeno je narušavanjem pojedinog gena CRISPR-Cas sustavom (engl. *knock-out*). Ovakav pristup temelji se na ispitivanju funkcije, odnosno utjecaja narušenog gena na promatrani fenomen uvođenjem direktnih modifikacija na razini genoma. Direktna modifikacija nukleotidnog slijeda gena ovom metodom vrlo često omogućuje potpunu te lako izvedivu ireverzibilnu inaktivaciju promatranog gena, za razliku od starijih metoda koje indirektnim putem reverzibilno utječu na razinu aktivnosti gena djelovanjem malih interferirajućih RNA molekula (siRNA). Narušavanjem navedenih gena, bilo da se radi o degradacijskim faktorima (*HBSIL*, *PELO*) ili veznim proteinima (*NONO*, *SNDI*), pokušala se povratiti smanjena ekspresija mutiranog transkripta za enzim SAHH čime bi se potvrdila

njihova uloga u staničnom mehanizmu odgovornom za smanjenu ekspresiju istraživanog transkripta.

Prije samog početka istraživanja, s obzirom na limitiranost izvornog kliničkog materijala pacijenta bilo je potrebno odabrati prikladni stanični model koji dobro opisuje istraživani fenomen. U tu svrhu odabran je stanični model HEK293 stanica koje su prethodno modificirane na način da stabilno eksprimiraju mutiranu verziju enzima SAHH fuzioniranu sa zelenim fluorescentnim proteinom (EGFP SAHH Y328D) te za koje je potvrđeno da zadržavaju ekspresijski fenotip transkripta koji je otkriven u fibroblastima pacijenta. Zbog svog brzog i predvidljivog rasta kao i lakoće unosa strane DNA, odnosno modifikacije stanica, ovaj stanični model uvelike pojednostavljuje i ubrzava laboratorijsko izvođenje planiranog istraživanja. Uz to, fuzija zelenog fluorescentnog proteina na mutiranu verziju enzima SAHH omogućuje korištenje jednostavnih i brzih fluorimetrijskih metoda za praćenje i kvantifikaciju relativne proteinske ekspresije mutiranog SAHH između različitih staničnih konstrukata koji su generirani u ovom istraživanju.

Prvi korak istraživanja uključivao je dizajn varijabilne komponente CRISPR-Cas sustava za narušavanje gena tzv. usmjeravajućeg slijeda nukleotida, sgRNA. Iako je do danas dostupan veliki broj različitih bioinformatičkih alata za dizajn navedenih sljedova većina njih temelji se na *in-silico* predviđanjima njihove efikasnosti te nespecifičnih efekata (engl. *off-target effect*) bez eksperimentalne potvrde. Stoga je u ovom radu, unatoč velikoj efikasnosti ove metode za narušavanje pojedinog gena modifikacijom samo jednog lokusa,⁴⁴ korišten pristup modifikacije tri različita lokusa simultano za svaki pojedini gen kako bi se pospješila vjerojatnost njegovog potpunog narušavanja. Ovakav pristup omogućuje i usporedbu efikasnosti pojedine *in-silico* dizajnirane sgRNA te time i optimizaciju cjelokupne metode za buduća istraživanja CRISPR-Cas sustavom. Prema dobivenim rezultatima moguće je zaključiti da je najefikasniji slijed korišten za gen *NONO* KO1 koji je rezultirao sa 66% modificirane populacije stanica, za gen *SND1* KO3 (71%) te za gen *HBSIL* KO2, jedini slijed koji je rezultirao modifikacijama genoma kod 46% populacije stanica (Tablica 18). sgRNA slijedovi dizajnirani za narušavanje gena *PELO* nisu uveli modifikacije stoga njihova usporedba nije moguća iz ovog istraživanja. Jedno od mogućih objašnjenja ovog rezultata leži u funkciji njegovih proteinskih produkata u stanici. Naime, ukoliko je narušeni gen esencijalan za stanicu ili ima veliki utjecaj na njezinu proliferaciju i normalni stanični metabolizam, ispitivanje njegove funkcije ovom metodom gotovo je nemoguće zbog

nemogućnosti kultivacije i analize takvih stanica u normalnim laboratorijskim uvjetima. U tom slučaju, djelomično i reverzibilno utišavanje esencijalnog gena prethodno spomenutim interferirajućim molekulama siRNA čini se prikladnijim pristupom. Iz tog razloga, rezultati uspješnosti modificiranja CRISPR-Cas sustavom (Tablica 18.) predstavljaju mogući dokaz esencijalne prirode proteinskih produkata gena *PELO* za korišteni stanični model. Ova tvrdnja potkrijepljena je i drugim neovisnim istraživanjem u kojem je pokazan visok utjecaj narušavanja gena *PELO* na vijabilost stanične linije K562.⁴⁵

Kao što je prethodno spomenuto, efikasnost narušavanja pojedinog gena u ovom radu analizirana je isključivo na razini DNA zbog pretpostavke da se višestrukim promjenama nukleotidnog slijeda gotovo sigurno izvršilo njegovo narušavanje odnosno narušila se sinteza ispravnog proteinskog produkta. No s obzirom na nasumičnu prirodu staničnog popravka dvolančanih lomova nehomolognom rekombinacijom, konačna potvrda narušavanja gena svakako bi trebala obuhvaćati i analizu ekspresije njihovih proteinskih produkata koja je u ovom radu izostavljena zbog kompleksnosti njezine tehničke izvedbe. Neovisno o tome, dobiveni rezultati efikasnosti CRISPR-Cas sustava pokazuju vrlo visoki postotak modificirane populacije stanica (>40% za gotovo svaki uspješno modificirani lokus) stoga je moguće sa velikom vjerojatnošću pretpostaviti da je zaista došlo do značajne promjene u količini proteina HBS1L, NONO i SND1. Rezultati relativne ekspresije mutirane verzije gena za fuzijski protein dobiveni qPCR-om također potkrjepljuju ovu pretpostavku. Naime, iz rezultata je vidljivo da narušavanje gena *PELO* nije bilo uspješno te sukladno tome ne postoje značajne promjene u razini molekule mRNA koja kodira za enzim EGFP SAHH Y328D u staničnoj liniji u kojoj nije narušen niti jedan gen (uzorak "YD") u odnosu na staničnu liniju u kojoj je potencijalno narušen gen *PELO* (uzorak "PELO") (slika 29.). S druge strane, za sve uspješno narušene gene vidljiva je promjena u ekspresiji mutiranog transkripta EGFP SAHH Y328D.

Jedini stanični konstrukt koji u ovom istraživanju pokazuje pretpostavljeni efekt povrata razine ekspresije mutiranog transkripta nakon narušavanja gena te time potvrđuje njegov utjecaj na sam predmet istraživanja je stanična linija s narušenim genom *NONO* (slika 29.). Njegov proteinski produkt NONO (engl. *Non-POU Domain Containing Octamer Binding Protein*) pripada multifunkcionalnoj obitelji proteina DBHS (engl. *Drosophila behavior/human splicing*) za koju je poznato da sudjeluje u procesu regulacije gena imajući ulogu u staničnim putevima kao što su transkripcijska regulacija, RNA procesiranje i

transport te popravak DNA oštećenja.⁴⁶ Sama struktura proteina NONO uključuje višestruke DNA, RNA i protein vezujuće domene uz nuklearni lokalizacijski signal na C-kraju polipeptidnog lanca. Također je pokazano da NONO sudjeluje u regulaciji gena odgovornih za proliferaciju MCF-7 i MDA-MB-231 staničnih linija direktnom interakcijom sa molekulama mRNA.⁴⁷

Budući da RNA-vezujući proteini prepoznaju specifične sekundarne strukture i nukleotidne sljedove DNA i RNA molekula kao vezne motive, moguće je da zbog točkaste mutacije mutirani transkript mijenja svoju sekundarnu strukturu te time potiče interakciju s proteinom NONO, ili nekim drugim efektorskim proteinima koji su dio većeg, zasada nepoznatog kompleksa, koji zatim negativno regulira njegovu ekspresiju.

§ 5. ZAKLJUČAK

Kako bi se analizirao utjecaj narušavanja gena *HBSIL*, *PELO*, *NONO* i *SNDI* na mRNA koja kodira mutirani protein SAHH korištena je metoda CRISPR-Cas9 u staničnom modelu HEK293 stanica koje stabilno eksprimiraju mutiranu verziju enzima SAHH fuzioniranu sa zelenim fluorescentnim proteinom (EGFP SAHH Y328D). Uspješnost narušavanja pojedinog gena analizirana je isključivo na razini DNA, zbog pretpostavke da se višestrukim promjenama nukleotidnog slijeda, korištenjem tri različita usmjeravajuća nukleotidna slijeda za svaki narušavani gen, gotovo sigurno izvršilo njegovo narušavanje, odnosno narušila se sinteza ispravnog proteinskog produkta.

Od tri uspješno modificirana gena, *HBSIL*, *NONO* te *SNDI*, jedino stanični konstrukt s narušenim genom *NONO* pokazuje efekt povrata razine ekspresije mRNA koja kodira mutirani protein SAHH. Budući da produkt tog gena pripada multifunkcionalnoj proteinskoj obitelji DHBS te da sadrži višestruke DNA, RNA i protein vezujuće domene moguće je da prepoznaje i veže mutirani transkript upravo zbog točkaste mutacije. Vezanjem mutiranog transkripta na protein NONO dolazi do negativne regulacije njegove ekspresije.

Narušavanje gena *PELO* nije bilo uspješno, najvjerojatnije zbog važne uloge njegovog proteinskog produkta u stanici. Ovaj rezultat u skladu je s drugim neovisnim istraživanjem te ukazuje na moguću esencijalnu ulogu proteinskog produkta gena *PELO* u korištenom staničnom modelu.

Rezultati ovog istraživanja ne potvrđuju početnu hipotezu degradacije mRNA koja kodira mutirani protein SAHH mehanizmom degradacije uslijed zastajanja ribosoma (engl. *no-go decay*), no u skladu su i nadovezuju se na prethodna istraživanja te služe kao temelj budućim istraživanjima s ciljem pronalaska svih komponenata odgovornih za ovu enigmatsku vrstu razgradnje mRNA koja kodira mutirani protein SAHH.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

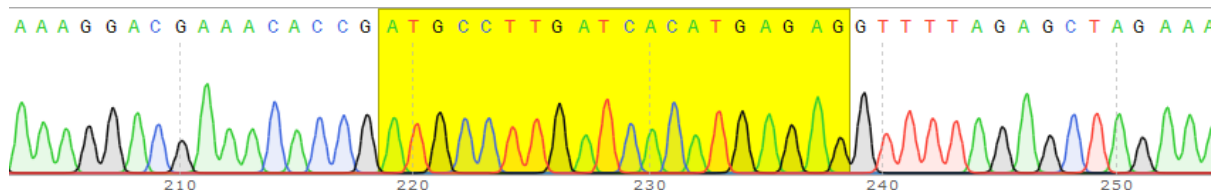
1. G. de la Haba, G. L. Cantoni, The Enzymatic Synthesis of S-Adenosyl-L-homocysteine from Adenosine and Homocysteine, *J. Biol. Chem* **234** (1959) 603-608.
2. M. A. Turner, X. Yang, D. Yin, K. Kuczera, R. T. Borchardt, P. L. Howell, Structure and Function of S-adenosylhomocysteine Hydrolase, *Cell. Biochem. Biophys.* **33** (2000) 101-125
3. I. Barić, K. Fumić, B. Glenn, M. Ćuk, A. Schulze, J. D. Finkelstein, S. Jill James, V. Mejaški,-Bošnjak, L. Pažanin, I. P. Pogribny, M. Radoš, V. Sarnavka, M. Šćukanec-Špoljar, R. H. Allen, S. Stabler, L. Uzelac, O. Vugrek, C. Wagner, S. Zeisel, S. Harvey Mudd, S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: A genetic disorder of methionine metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 4234-4239
4. N. Hug, D. Longman, J. F. Cáceres, Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway, *Nucleic Acids Res.* **44** (2016) 1483-1495
5. A. Van Hoof, P. A. Frischmeyer, H. C. Dietz, R. Parker, Exosome-Mediated, Recognition and Degradation of mRNAs Lacking a Termination Codon, *Science* **295** (2002), 2262-2264
6. Y. Haringaya, R. Parker, No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation, *Wiley Interdiscip. Rev.: RNA* **1** (2010) 132-141
7. C. J. Shoemaker, D. E. Eyler, R. Green, Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no go decay, *Science* **330** (2010) 369-372
8. <http://www.ensembl.org/Multi/GeneTree/Image?gt=ENSGT00950000182981>, (datum pristupa 15. prosinca 2019.)
9. https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000101444;r=20:34280268-34311802 (datum pristupa, 1. srpnja 2019)
10. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000678.1?from=1&to=432&report=fasta, (datum pristupa 1. srpnja 2019.)
11. K. M. Lee, W. J. Choi, Y. Lee, H. Y. Lee, L. X. Zhao, H. W. Lee, J. G. Park, H. O. Kim, K. Y. Hwang Y. S. Heo, S. Choi, L. S. Jeong, X-ray Crystal Structure and Binding Mode Analysis of Human S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Complexed with Novel Mechanism-Based Inhibitors, Haloneplanocin A Analogues *J. Med. Chem.* **54** (2011) 930-938).
12. <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3NJ4>, (datum pristupa 1. srpnja 2019.)

13. T. Yamada, Y. Takata, J. Komoto, T. Gomi, H. Ogawa, M. Fujioka, F. Takusagawa, Catalytic mechanism of S-adenosylhomocysteine hydrolase: Roles of His 54, Asp130, Glu155, Lys185, and Asp189, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37** (2005) 2417-2435
14. K. A. Strauss, C. Ferreira, T. Bottiglieri, X. Zhao, E. Arning, S. Zhang, S. H. Zeisel, M. L. Escolar, N. Presnick, E. G. Puffenberger, O. Vugrek, L. Kovačević, C. Wagner, G. V. Mazariegos, S. Harvey Mudd, K. Soltys, Liver transplantation for treatment of severe S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency, *Mol. Genet. Metab.* **116** (2015) 44-52
15. I. Grbeša, A. Kalo, R. Belužić, L. Kovačević, A. Lepur, F. Rokić, H. Hochberg, I. Kanter, V. Simunović, P. M. Muñoz-Torres, Y. Shav-Tal, O. Vugrek, Mutations in S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) affects its nucleocytoplasmic distribution and capability to interact with S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1 protein, *Eur. J. Cell Biol.* **96** (2017) 579-590
16. R. Belužić, M. Ćuk, T. Pavkov, K. Fumić, I. Barić, S. Harvey Mudd, I. Jurak, O. Vugrek, A single mutation at Tyr143 of human S-adenosylhomocysteine hydrolase renders the enzyme thermosensitive and affects the oxidation state of bound cofactor nicotinamide-adenine dinucleotide, *Biochem. J.* **400** (2006) 245-253
17. I. Barić, M. Ćuk, K. Fumić, O. Vugrek, R. H. Allen, B. Glenn, M. Maradin, L. Pažanin, I. Pogribny, M. Radoš, V. Sarnavka, A. Schulze, S. Stabler, C. Wagner, S. H. Zeisel, S. Harvey Mudd, S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: A second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy, *J. Inherit. Metab. Dis.* **28** (2005) 885-902
18. N. R. M. Buist, B. Glenn, O. Vugrek, C. Wagner, S. Stabler, R. H. Allen, I. Pogribny, A. Schulze, S. H. Zeisel, I. Barić, S. Harvey Mudd, S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a 26-year-old man, *J. Inherit. Metab. Dis.* **29** (2006) 538-545
19. L. Kovačević, *Nedostatak S-adenozilhomocistein-hidrolaze: molekularni mehanizmi novog oboljenja*, Doktorski rad, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, 2017., str. 79
20. R. Parker, U. Sheth, P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation, *Mol. Cell* **25** (2007) 635-646
21. L. W. Harries, RNA Biology Provides New Therapeutic Targets for Human Disease, *Front. Genet.* **10** (2019.) 1-12
22. M. Adli, The CRISPR tool kit for genome editing and beyond, *Nat. Commun.* **9** (2018)
23. Q. Liu, D. J. Segal, J. B. Ghiara, C. F. Barbas, Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94** (1997) 5525-5530
24. A. Nga-Sze Mak, P. Bradley, R. A. Cernadas, A. J. Bogdanove, B. L. Stoddard, The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target, *Science* **335** (2012) 716-719

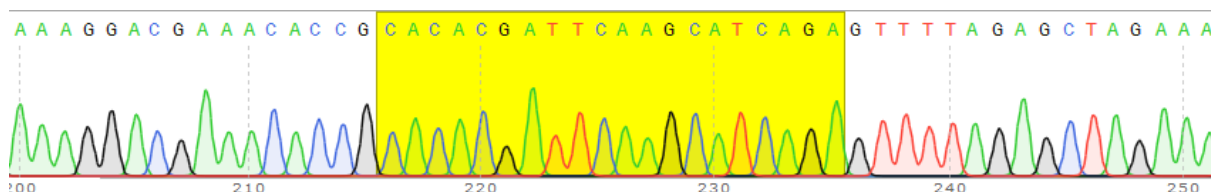
25. M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science* **337** (2012) 816-821
26. (R. Barrangou, The roles of CRISPR–Cas systems in adaptive immunity and beyond, *Curr. Opin. Immunol.* **32** (2015) 36-41)
27. F. Zhang, Y. Wen, X. Guo, CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges, *Hum. Mol. Genet.* **23** (2014) 40-46.
28. K. S. Makarova, D. H. Haft, R Barrangou, S. J. J. Brouns, E. Charpentier, P. Horvath, S. Moineau, F. J. M. Mojica, Y. I. Wolf, A. F. Yakunin, J. Van der Oost, E. V. Koonin, Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems, *Nat. Rev. Microbiol.* **9** (2011) 467-477)
29. R. Heler, P. Samai, J. W. Modell, C. Weiner, G. W. Goldberg, D. Bikard, L. A. Marraffini, Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR–Cas adaptation *Nature* **519** (2015) 199-204
30. <https://www.addgene.org/guides/crispr/>, (datum pristupa 25. studenoga 2019.)
31. Addgene plasmid #52961, <http://n2t.net/addgene:52961> (datum pristupa 14. Srpnja 2019.)
32. Addgene plasmid #12259, <https://www.addgene.org/12259/> (datum pristupa 14. Srpnja 2019.)
33. Addgene plasmid #12260, <https://www.addgene.org/12260/>. (datum pristupa 14. Srpnja 2019.)
34. F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russel, R. Nairn, Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5, *J. Gen. Virol.* **36** (1977) 59-72.
35. <https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgRNA-design> (datum pristupa 19. listopada 2018.)
36. <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/pureyield-plasmid-miniprep-system-protocol.pdf?la=en> (datum pristupa 1. kolovoza 2019.)
37. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202303003001?via%3Dihub> (datum pristupa 1. kolovoza 2019.)
38. <file:///C:/Users/user/Downloads/EN-DNeasy-Blood--Tissue-Handbook.pdf>(datum pristupa 1. kolovoza 2019.)
39. B. Gerve, P. Kocjan, A. Singh, B. Hornblower, E. Schildkraut, Determining efficiency of On-Target CRISPR/Cas9 Genome Editing Using NEB® EnGen™ Mutation Detection Kit on LabChip Gel Xpress (GX) Touch Technology

- <https://www.neb.com/-/media/catalog/application-notes/determining-efficiency-of-crispr-cas9-editing-using-neb-engen-mutation-detection-kit-on-labchip-gx-t.pdf> (datum pristupa 12. rujna 2019.)
40. https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4003t_d4003_d4004_d4013_d4014_dna_clean_concentrator_-5.pdf (datum pristupa 2. kolovoza 2019.)
41. https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90321_SensitivityDNA_KG_EN.pdf (datum pristupa 2. kolovoza 2019.)
42. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html> (datum pristupa 14. listopada 2019.)
43. F. Rokić, Analiza stabilnosti mRNA i određivanje mRNA-vezanih proteina kod nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein-hidrolaze, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
44. A. Roy, J. H. Goodman, G. Begum, B. F. Donnelly, G. Pittman E. J. Weinman, D. Sun, A. R. Subramanya, Generation of WNK1 knockout cell lines by CRISPR/Cas-mediated genome editing, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **308** (2015) 366-376.
45. T. Wang, K. Birsoy, N. W. Hughes, K. M. Krupczak, Y. Post, J. J. Wei, W. S. Lander, D. M. Sabatini, Identification and characterization of essential genes in the human genome, *Science* **350** (2015) 1096-1101
46. G. J. Knott, C. S. Bond, A. H. Fox, The DBHS Proteins SFPQ, NONO and PSPC1: a multipurpose molecular scaffold, *Nucleic Acid Res.* **44** (2016) 3989-4004.
47. K. Iino, Y. Mitobe, K. Ikeda, K. I. Takayama, T. Suzuki, H. Kawabata, Y. Suzuki, K. Horie-Inoue, S. Inoue, RNA-binding protein NONO promotes breast cancer proliferation by post-transcriptional regulation of SKP2 and E2F8, *Cancer Sci.* **111** (2020) 148-159.

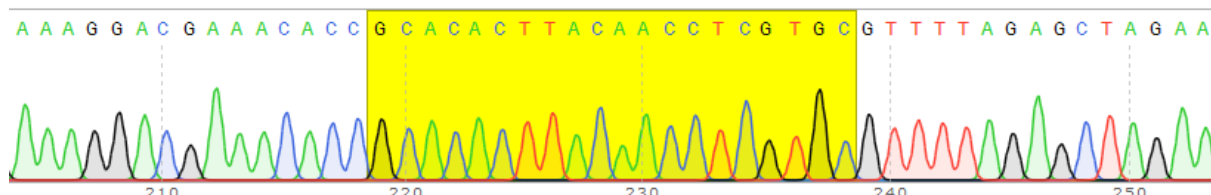
§ 7. DODATAK



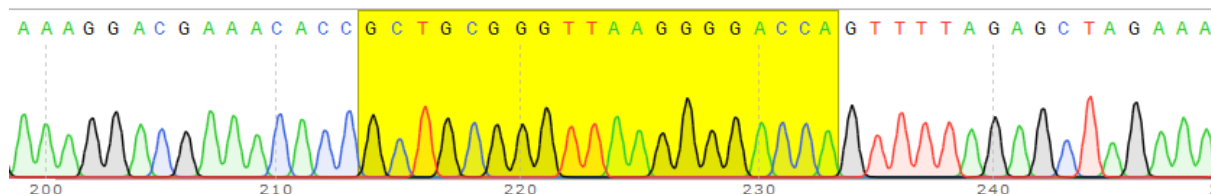
Plazmid s ugrađenim nukleotidnim slijedom 2 za narušavanje gena *HBSIL*



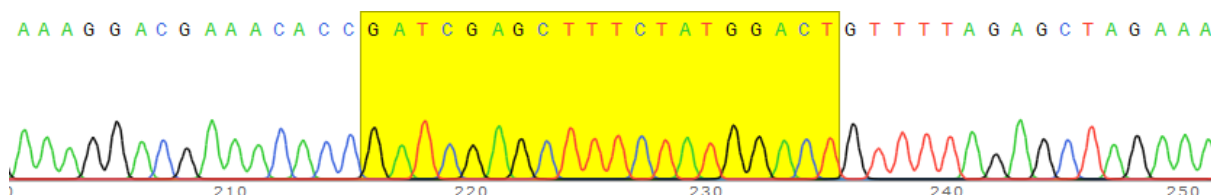
Plazmid s ugrađenim nukleotidnim slijedom 3 za narušavanje gena *HBSIL*



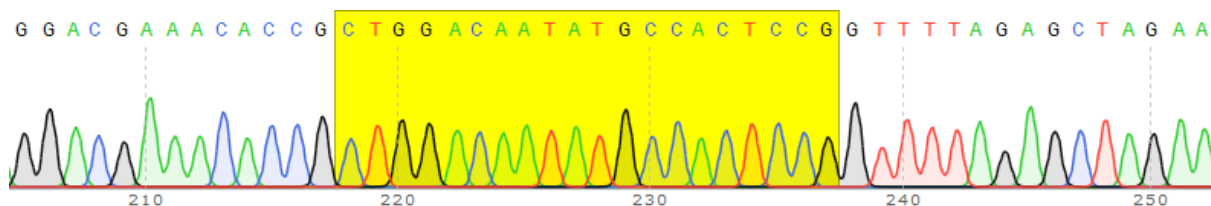
Plazmid s ugrađenim nukleotidnim slijedom 1 za narušavanje gena *PELO*



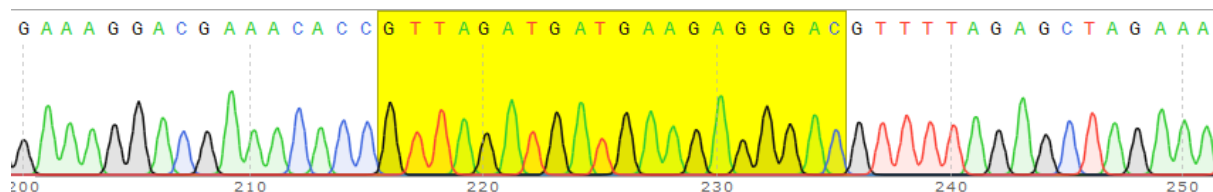
Plazmid s ugrađenim nukleotidnim slijedom 2 za narušavanje gena *PELO*



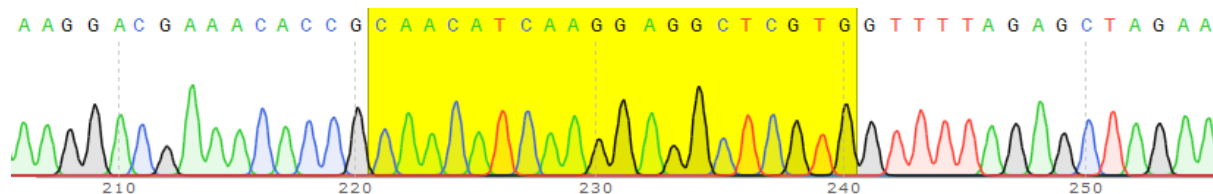
Plazmid s ugrađenim nukleotidnim slijedom 3 za narušavanje gena *PELO*



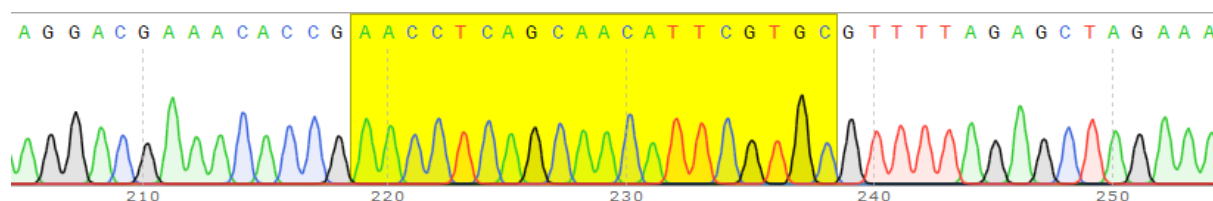
Plazmid s ugrađenim nukleotidnim slijedom 1 za narušavanje gena *NONO*



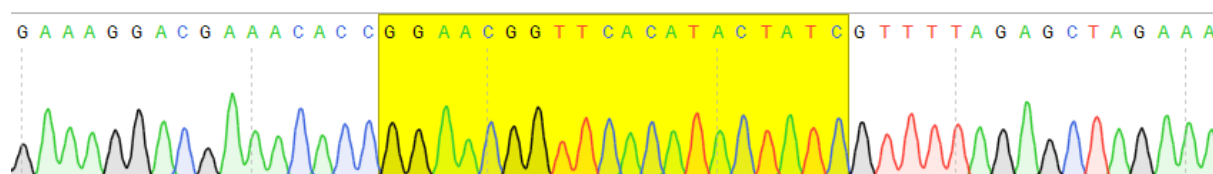
Plazmid s ugrađenim nukleotidnim slijedom 2 za narušavanje gena *NONO*



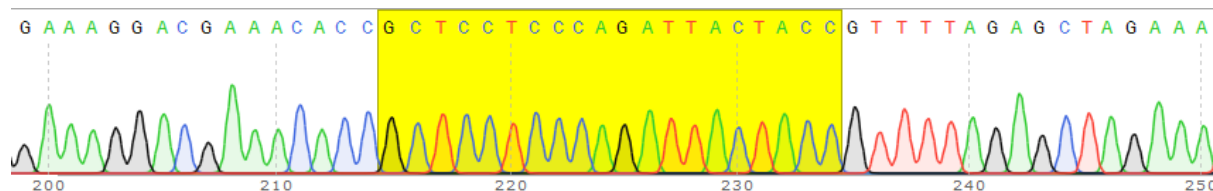
Plazmid s ugrađenim nukleotidnim slijedom 3 za narušavanje gena *NONO*



Plazmid s ugrađenim nukleotidnim slijedom 1 za narušavanje gena *SND1*



Plazmid s ugrađenim nukleotidnim slijedom 1 za narušavanje gena *SND1*



Plazmid s ugrađenim nukleotidnim slijedom 1 za narušavanje gena *SND1*

Slika D1. Kromatogrami sekvenciranih plazmida s ugrađenim usmjeravajućim nukleotidnim slijedom 1, 2 ili 3 za narušavanje gena *HBSIL*, *PELO*, *NONO* ili *SND1*. Žutom bojom označen je nukleotidni slijed koji odgovara nukleotidnom slijedu dizajniranog oligonukleotida (Tablica 1).

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ena Šimunić

Datum rođenja: 9. studenog 1994.

Mjesto rođenja: Varaždin

Obrazovanje

2001.–2009. II. Osnovna škola Varaždin, Varaždin

2009.–2013. Prva Gimnazija Varaždin, Varaždin

2013.–2017. Preddiplomski studij Kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2014.-2017. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka (Dan i noć na PMF-u)

2014.-2017. PRIMUS (Radionice za osnovnoškolski uzrast)

2015. Otvoreni dan Instituta Ruđer Bošković

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. E. Šimunić, S. Vuk, A. Skuhala, N. Smrečki, M. Babić, O. Jović, I. Pulić, D. Matković-Čalogović, Z. Popović, *Biološki aktivni kompleksi bakra (II) s N-alkilnim derivatima iminodiacetamida*, XI. Susret mladih kemijskih inženjera (SMLKI), Zagreb, 2016. – postersko izlaganje

Publikacije

1. N. Smrečki, O. Jović, B. M. Kukovec, E. Šimunić, S. Vuk, A. Skuhala, M. Babić, T. Rončević, N. Ilić, I. Kekez, D. Matković-Čalogović, Z. Popović, Copper(II) complexes with N-alkyliminodiacetamide ligands. Preparation, structural, spectroscopic and DFT studies and biological evaluation, *Inorg. Chim. Acta* **471** (2018) 521-529.