SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Loren Petrušić

Izrada modelnog sustava za istraživanje popravka DNA-protein adukata u ljudskim stanicama pomoću CRISPR/dCas9 tehnologije

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju na Zavodu za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Marte Popović i neposrednim voditeljstvom dr.sc. Ivana Antičevića, uz komentorstvo prof. dr. sc. Olge Gornik Kljaić, Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Rad je izrađen u sklopu projekata voditeljice dr.sc. Marte Popović: uspostavnog HRZZ projekta ''Razumijevanje popravka unakrsnog vezanja DNA-Protein *in vivo* koristeći zebricu kao istraživački model '' i bilateralnog istraživačkog Slovensko-hrvatskog HRZZ projekta „Strukturna karakterizacija faktora uključenih u put popravka unakrsnog vezanja DNA-protein“. Rad je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.

POPIS KRATICA:

(6-4)PP	6-4 fosfoprodukti
53BP1	p53 vezujući protein (engl. *p53-binding protein 1*)
5'-UTR	5'-netranslatirana regija (engl. *the 5'-untranslated region*)
ABCG2	(engl. *ATP binding cassette subfamily G member 2*)
ACRC/GCNA	(engl. *acid repeat-containing protein/germ cell nuclear antigen-1*)
AP	abazično (apurinsko/apirimidinsko) mjesto (engl. *abasic site or apurinic/apyrimidinic site*)
ATP5PO	(engl. *ATP Synthase Peripheral Stalk Subunit OSCP*)
BER	popravak izrezivanjem baze (engl. *base excision repair*)
bp	parovi baza
BRCA1	(engl. *breast cancer type 1 susceptibility protein)*
BRCA2	(engl. *breast cancer type 2 susceptibility protein)*
Cas9	CRISPR pridružen protein 9 (engl. *CRISPR associated protein 9*)
cDNA	komplementarna DNA (engl. *complementary DNA*)
CFD	(engl. *cutting frequency determination*)
Cis-Pt	cisplatin
CPD	ciklobutanski dimer pirimidina (engl. *cyclobutane pyrimidine dimer)*
CPT	kamptotecin
CRISPR	klasterirana pravilno razmaknuta kratka palindromska ponavljanja (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)
crRNA	CRISPR RNA
C_t	prag ciklusa (engl. *cycle threshold*)
dCas9	enzimski inaktivan CRISPR pridružen protein 9 (engl. *dead CRISPR associated protein 9*)
dCas9-DPC	DNA-protein adukt dCas9 proteina
DDI1 i DDI2	(engl. *DNA damage inducible proteins 1 and 2)*
DDR	odgovor na DNA oštećenje (engl. *DNA damage response*)
DDT	tolerancija na DNA oštećenje (engl. *DNA damage tolerance*)
DMEM	Dulbeccov modificirani Eagle Medium
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DNMT	DNA-metiltransferaza (engl. *DNA methyltransferase*)
DPC	DNA-protein adukt (engl. *DNA-protein crosslink*)
DPCR	popravak DPC-eva (engl. *DPC repair*)
DSB	dvolančani lomovi DNA (engl. *double stranded breaks)*
dsDNA	dvolančana DNA (engl. *double-stranded DNA*)
E	učinkovitosti primera (engl. *primer efficacy*)
Ef	efikasnost utišavanja (engl. *silencing efficacy*)
ELISA	enzimski vezani imuno-apsorbirajući esej (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
Eto	etoposid

FA	formaldehid
FAP	put popravka Fanconijeve anemije (engl. Fanconi anemia pathway)
FAM111A i B	(engl. *family with sequence similarity 111 member A and B)*
FBS	fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*)
FITC	fluorescein izotiocijanat (engl. *fluorescein isothiocyanate*)
gDNA	genomska DNA (engl. *genomic DNA*)
gRNA	RNA vodilja (engl. *guide RNA)*
H3-DPC	DNA-protein adukt histona H3
HEK293T	Humane embrionalne bubrežne stanice (engl. *human embryonic kidney cells)*
HKG	gen za endogenu kontrolu (engl. *housekeeping gene*)
HMG	(engl. *High-Mobility Group protein)*
HR	homologna rekombinacija (engl*. homologous recombination*)
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*)
IVT-FWD	(engl. *in vitro transcription-forward*)
IVT-REV	(engl. *in vitro transcription-reverse*)
IVT-scaffold	(engl. *in vitro transcription-scaffold*)
IVT-sgRNA	(engl. *in vitro transcription-sgRNA*)
kpb	kilo parovi baza
MATE1	(engl. *multidrug and toxin extrusion 1*; drugi naziv: *SLC47A1*, engl. *solute carrier family 47 member 1*)
MMC	mitomicin C
MMR	popravak pogrešno sparenih baza (engl. *mismatch repair*)
MNE	srednja normalizirana ekspresija (engl. *Mean Normalized Expression*)
MRN	proteinski kompleks sastavljen od MRE11-RAD50-NBS1
mRNA	glasnička RNA (engl. *messenger ribonucleic acid*)
NER	popravak izrezivanjem nukleotida (engl*. nucleotide excision repair*)
NHEJ	ne-homologno spajanje DNA krajeva (engl*. non-homologous end joining*)
NTC	negativna kontrola bez kalupa (engl. *non-template control*)
NUC režanj	nukleazni režanj (engl. *nuclease lobe*)
p97/VCP	(engl. *valosin-containing protein)*
PALB2	(engl. *partner i localizer of BRCA2*)
PAM	(engl. *protospacer adjacent motif)*
PARP1	poli [ADP-riboza] polimeraza 1 (engl. *poly [ADP-ribose] polymerase 1*)
PCNA	proliferirajući stanični jezgreni antigen (engl. *proliferating cell nuclear antigen*)
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)
PNKP	polinukleotid kinaza fosfataza (engl. *polynucleotide kinase 3'-phosphatase*)
PxP	(engl. *purification of x-linked proteins*)
RADAR	(engl. *rapid approach to DNA adduct recovery*)
RADAR-MS	(engl. *rapid approach to DNA adduct recovery assay – mass-spectrometry*)

RANBP2	(engl. *RAN binding protein 2*)
REC režanj	režanj za prepoznavanje (engl. *recognition lobe*)
RNA	ribonukleinska kiselina
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)
RPLP0	(engl. *ribosomal protein lateral stalk subunit P0*)
RT-qPCR	(engl. *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*)
SDS	natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)
sgRNA	jedinstvena RNA vodilja (engl. *single guide RNA*)
SPRTN	(engl. *SprT-Like N-Terminal Domain)*
SSB	jednolančani lomovi DNA (engl. *single stranded breaks*)
STAR	(engl. *superior method for true DNA–protein crosslinks recovery*)
TALEN	nukleaze efektori slični aktivatorima transkripcije (engl. t*ranscription activator-like effector nuclease*)
TDP1	tirozil-DNA fosfodiesteraza 1 (engl. *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1)*
TDP2	tirozil-DNA fosfodiesteraze 2 (engl. *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2)*
TLS	translezijska sinteza DNA (engl. *translesion DNA synthesis*)
TOP1	topoizomeraza I (engl. *topoisomerase I*)
TOP1-DPC	DNA-protein adukt topoizomeraze I
TOP2	topoizomeraza II (engl. *topoisomerase II*)
TOP2-DPC	DNA-protein adukt topoizomeraze II
tracrRNA	(engl. *trans-activating CRISPR RNA)*
TSS	mjesto početka transkripcije (engl. *transcription starting site*)
Wss1	(engl. *weak suppressor of smt3-331*)
WT	netretirane stanice divljeg tipa (engl. *wild type*)
ZNF	nukleaze cinkov prst (engl. *zinc finger nuclease*)
ZNF451/ZATT	(engl. *Zinc Finger Protein 451/Zinc finger protein Associated with TDP2 and TOP2)*

SADRŽAJ RADA:

1. UVOD _____ *1*

1.1. Oštećenja i popravak DNA _____ **1**

1.1.1. DNA oštećenja _____ 1

1.1.2. DNA popravak _____ 1

1.1.2.1. Popravak izrezivanjem baze _____ 3

1.1.2.2. Popravak izrezivanjem nukleotida _____ 3

1.1.2.3. Popravak pogrešno sparenih baza _____ 4

1.1.2.4. Nehomologno sparivanje krajeva _____ 4

1.1.2.5. Homologna rekombinacija _____ 4

1.1.2.6. Put popravka Fanconijeve anemije _____ 5

1.1.2.7. Popravak DNA-protein adukata _____ 5

1.2. DNA-protein adukti (DPC-evi) _____ **6**

1.3. Popravak DNA-protein adukata (DPCR) _____ **9**

1.3.1. Popravak ovisan o nukleazama (nukleolitički put) _____ 10

1.3.2. Popravak ovisan o proteolizi (proteolitički put) _____ 11

1.3.3. Hidroliza unakrsne kovalentne veze (hidrolitički put) _____ 14

1.3.4. Komponente DPC popravka kao potencijalne mete budućih antitumorskih lijekova __ 16

1.4. Metodologija u izolaciji i kvantifikaciji DNA-protein adukata (DPC-eva) __ **19**

1.4.1. Metode izolacije DPC-eva _____ 19

1.4.2. Metode detekcije DPC-eva _____ 22

1.5. CRISPR/Cas9 tehnologija _____ **24**

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA _____ *27*

3. MATERIJALI I METODE _____ *29*

3.1. Materijali _____ **29**

3.1.1. Ljudske stanice _____ 29

3.1.2. Standardne kemikalije _____ 29

3.1.3. Puferi _____ 30

3.1.4. Enzimi _____ 30

3.1.5. Oligonukleotidi _____ 31

3.1.6. Komercijalni kompleti _____ 35

3.1.7. Antitijela _____ 35

3.1.8. Uređaji i oprema _____ 36

3.1.9. Računalni programi _____ 37

3.2. Metode 38
3.2.1. Stanična kultura 38
3.2.2. *In silico* sgRNA dizajn i *in vitro* sgRNA sinteza 38
3.2.3. Transfekcija dCas9-sgRNA kompleksa u stanice 40
3.2.4. Izolacija RNA i reverzna transkripcija 41
3.2.5. qPCR analiza 41
3.2.6. Izolacija DPC-eva RADAR metodom 42
3.2.7. Western blot 44
4. REZULTATI I RASPRAVA ***45***
4.1. Odabir ciljnih gena za utišavanje pomoću dCas9-sgRNA kompleksa **45**
4.2. Izrada sgRNA za odabrane ciljne gene **47**
4.3. Optimiranje uvjeta transfekcije dCas9-sgRNA kompleksa u HEK293T stanicama **51**
4.4. Izrada i testiranje efikasnosti qPCR početnica **54**
4.5. Procjena efikasnosti utišavanja odabranih ciljnih gena u HEK293T stanicama **55**
4.5.1. Procjena efikasnosti utišavanja *ATP5PO* i *RANBP2* gena 55
4.5.2. Procjena efikasnosti utišavanja neesencijalnih, srednje eksprimiranih gena u HEK293T stanicama 58
4.5.3. Optimizacija uvjeta transfekcije dCas9-sgRNA *MATE1* g2 u HEK293T stanicama iz aspekta qPCR analize 72
4.6. Izolacija DPC-eva iz HEK293T stanica nakon transfekcije s dCas9-sgRNA kompleksom **74**
5. ZAKLJUČCI ***78***
6. ZAHVALE ***79***
7. POPIS LITERATURE ***80***
8. SAŽETAK ***89***
9. SUMMARY ***91***
10. ŽIVOTOPIS ***93***

1. UVOD

1.1. Oštećenja i popravak DNA

1.1.1. DNA oštećenja

DNA (deoksiribonukleinska kiselina) je ključna molekula koja služi za pohranu genetičke informacije nužne za rast i razvoj stanica, pa tako i cijelog organizma (Moon *i sur.*, 2023). DNA se unutar naših stanica nalazi u izrazito reaktivnom okruženju te je konstantno izložena brojnim endogenim i egzogenim agensima koji ju mogu oštetiti (Vaz, Popovic i Ramadan, 2017). Endogeni agensi, poput reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *reactive oxygen species*) i drugih reaktivnih metabolita poput formaldehida, mogu uzrokovati kemijsko oštećenje DNA molekule. Također, tijekom replikacije DNA, DNA polimeraze, enzimi koji sudjeluju u sintezi novih lanaca, mogu uvesti pogreške u DNA slijedu na način da se spari pogrešna baza koja nije komplementarna roditeljskom lancu. Takve pogreške događaju se vrlo rijetko i obično ih DNA polimeraza sama prepozna i ispravi, no ponekad joj pogrešno sparene baze promaknu. Nadalje, mnogi okolišni agensi kao što su UV zračenje, ionizirajuće zračenje i toksične kemikalije predstavljaju opasnost za našu genetičku informaciju (Chatterjee i Walker, 2017). Zbog širokog raspona uzročnika oštećenja DNA, razlikujemo više tipova DNA oštećenja, uključujući abazična mjesta, supstitucije baza, intralančane i interlančane veze DNA molekule, DNA-protein adukte (DPC, engl. *DNA-protein crosslink*) te jednolančane i dvolančane lomove DNA molekule (Moon *i sur.*, 2023).

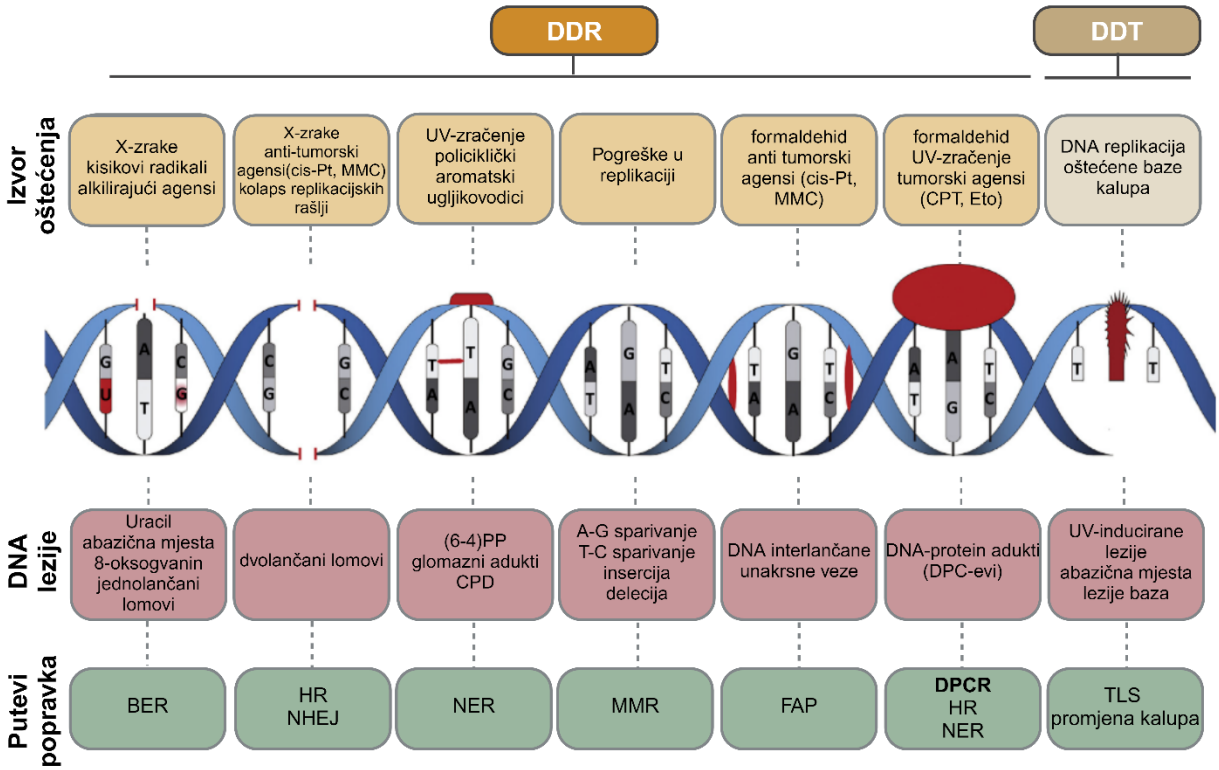
Ako se ne poprave, oštećenja DNA mogu dovesti do poremećaja u vitalnim staničnim procesima uključujući replikaciju i transkripciju. Ako se oštećenja ne poprave, ona mogu uzrokovati i pojavu mutacija, što za posljedicu ima pogrešnu sintezu proteina i gubitak njihove fiziološke funkcije. Ako to sagledamo iz šire perspektive, takve mutacije na razini organizma mogu dovesti do razvoja raznih patoloških stanja uključujući karcinome, neurodegenerativne bolesti, autoimune bolesti i mnoge druge (Ciccia i Elledge, 2010).

1.1.2. DNA popravak

Stanice konstantno teže održavanju integriteta genetske informacije, stoga su razvile kompleksnu mrežu mehanizama kako bi to postigle. Razlikujemo dva glavna mehanizma: odgovor na DNA oštećenja (DDR, engl. *DNA damage response*) i tolerancija na DNA oštećenja (DDT, engl. *DNA damage tolerance*) (Vaz, Popovic i Ramadan, 2017). DDR se aktivira kada specifični senzorni proteini prepoznaju DNA oštećenje što potiče dolazak DDR čimbenika na mjesto oštećenja i započinje popravak oštećene DNA (Chatterjee i Walker, 2017). Za razliku od

DDR-a, putevi tolerancije DNA oštećenja, potiču translezijsku sintezu DNA (TLS, engl. *translesion DNA synthesis*), u kojoj translezijske DNA polimeraze zaobilaze oštećenja i dovršavaju DNA replikaciju. Tako se popravak DNA odgađa i oštećenja se toleriraju (Vaz, Popovic i Ramadan, 2017). Ako ne dođe do popravka, niti do tolerancije na oštećenja DNA, stanica pokreće obrambene mehanizme kojima inducira apoptozu kako se genetička pogreška ne bi širila dalje kroz generacije. Važnost razumijevanja puteva popravka DNA i njihova kompleksnost potvrđena je 2015. godine kada je dodijeljena Nobelova nagrada za kemiju znanstvenicima Tomasu Lindahlu, Paulu Modrichu i Azizu Sancaru, koji su objasnili osnovne mehanizme popravka DNA i njihovu važnost za razumijevanje raznih patoloških procesa (Chatterjee i Walker, 2017).

U stanicama postoje različiti putevi popravka DNA koji se aktiviraju ovisno o vrsti oštećenja, fazi staničnog ciklusa i drugim čimbenicima (Slika 1). Neka oštećenja mogu biti popravljena izravnim obratom oštećenja pomoću aktivnosti specifičnog enzima, kao što je na primjer O^6-metilgvanin-metiltransferaza koja uklanja metilnu skupinu s O^6-metilgvanina (Pegg, 2011). Ipak, za većinu DNA oštećenja potreban je set proteina koji sudjeluje u njihovom popravku, a njihov put popravka obično se sastoji od nekoliko uzastopnih kemijskih reakcija (Jackson i Bartek, 2009).



Slika 1: Vrste DNA oštećenja i putevi njihovog popravka. Shema prikazuje glavne uzroke različitih tipova oštećenja DNA i puteve njihova popravka. Kratice: BER – popravak izrezivanjem baze (engl. *base excision repair*); cis-Pt – cisplatin; CPD – ciklobutanski dimer pirimidina (engl. *cyclobutane pyrimidine dimer*); CPT – kamptotecin; DPCR – Popravak DPC-eva (engl. *DPC repair*); DSB – dvolančani lom DNA (engl. *double-strand break*); Eto – etoposid; FAP – put popravka Fanconijeve anemije (engl*. Fanconi anemia pathway*); HR – homologna rekombinacija (engl. *homologous recombination*); MMC – mitomicin C; MMR – popravak pogrešno sparenih baza (engl. *mismatch repair*); NER – popravak izrezivanjem nukleotida (engl. *nucleotide excision repair*); NHEJ – nehomologno sparivanje krajeva (engl. *non-homologous end joining*); (6-4)PP – 6-4 fosfoprodukti; SSB – jednolančani DNA lom (engl. *single-strand break*). (Preuzeto i prilagođeno prema Vaz, Popovic i Ramadan, 2017).

1.1.2.1. Popravak izrezivanjem baze

Popravak izrezivanjem baze (BER, engl. *base excision repair*) najčešće sudjeluje u uklanjanu oštećenja jedne baze koja je nastala alkilacijom, deaminacijom (npr. deaminacijom citozina nastaje uracil), oksidacijom ili ako je u DNA molekuli nastalo abazično (apurinsko/apirimidinsko) mjesto (AP, engl. *abasic site or apurinic/apyrimidinic site*) (Chatterjee i Walker, 2017). Ovakve vrste oštećenja često se javljaju u stanicama, s učestalošću od 10 000 do 30 000 po stanici dnevno, stoga je ključno osigurati visoku efikasnost njihovog popravka (Amidon i Eichman, 2020). DNA glikozilaze su enzimi koji prepoznaju promjene u bazama i sudjeluju u hidrolizi O-glikozidne veze između baze i šećera te na taj način uklanjaju baze s oštećenjima. Zatim na nastalo AP mjesto dolazi AP endonukleaza koja cijepa fosfodiestersku okosnicu i stvara 3'-OH slobodni kraj i 5'-fosfatnu deoksiribozu. Fosfodeoksiribozu mogu ukloniti neke DNA glikozilaze ili 3'-fosfodiesteraze. Nakon što se oštećeni nukleotid u potpunosti uklonio, DNA polimeraza dodaje novi nukleotid i DNA ligaza zalijepi DNA okosnicu te je na taj način BER put popravka završen (Chatterjee i Walker, 2017).

1.1.2.2. Popravak izrezivanjem nukleotida

Popravak izrezivanjem nukleotida (NER, engl*. nucleotide excision repair*) služi u uklanjanju većih oštećenja kao što su timidinski dimeri (CPD, engl*. cyclobutane pyrimidine dimers)* nastali djelovanjem UV zračenja, glomazni DNA adukti i oštećenja koja nastaju djelovanjem nekih kemoterapeutika. Razlikujemo dvije glavne grane NER puta popravka: globalni genomski NER i NER vezan uz transkripciju. Glavna razlika je u putu aktivacije NER puta popravka, dok oba puta završavaju djelovanjem helikaze koja odmotava DNA i endonukleaze koja izrezuje nekoliko nukleotida sa svake strane oštećenja. Nakon toga DNA polimeraza sintetizira dio lanca koji je prethodno bio razgrađen, a oštećenje se smatra popravljenim nakon što DNA ligaza slijepi fosfodiestersku okosnicu (Chatterjee i Walker, 2017).

1.1.2.3. Popravak pogrešno sparenih baza

Popravak pogrešno sparenih baza (MMR, engl*. mismatch repair*) inducira se ako je DNA polimeraza tijekom replikacije pogrešno sparila par baza te sama nije uspješno prepoznala i popravila vlastitu pogrešku. Polipeptid MutS prepoznaje pogrešno sparenu bazu na novosintetiziranom lancu DNA, kojeg razlikuje od roditeljskog lanca po prisutnosti jednolančanog loma (Modrich i Lahue, 1996). MutL, zatim, zarobi MutS na mjestu pogreške te inducira 3'-inciziju DNA lanca na kojem je detektirana pogreška. Također, MutL regulira i izrezivanje nukleotida pomoću egzonukleaze 1. Nakon izrezivanja, DNA polimeraza sintetizira lanac i DNA ligaza spaja fosfodiestersku okosnicu (Chatterjee i Walker, 2017).

1.1.2.4. Nehomologno sparivanje krajeva

Nehomologno sparivanje krajeva (NHEJ, engl*. non-homologous end joining*) jedan je od načina popravka dvolančanih lomova DNA. Dvolančani lomovi DNA se smatraju najgorim oblikom DNA oštećenja jer se prekida kontinuitet DNA te lako može doći do gubitaka dijelova genetskog materijala. NHEJ put popravka reguliran je p53 vezujućim proteinom (53BP1*,* engl. *p53-binding protein 1*), a aktivira se pomoću Ku heterodimera koji prepoznaje dvolančani lom te potiče vezanje drugih proteina koji su dio puta popravka NHEJ. Proteini NHEJ popravka omogućuju približavanje dva prekinuta kraja DNA te ih procesiraju, uklanjajući skupine koje smetaju, kako bi se stvorili zadovoljavajući ljepljivi krajevi. Nakon toga dolaze DNA polimeraze μ i/ili λ koje sintetiziraju dijelove DNA lanaca na mjestu puknuća i naposlijetku DNA ligaza sljepljuje DNA krajeve. Nažalost, ovakav način popravka sklon je pogreškama, uvođenju novih nukleotida ili delecijama postojećih dijelova DNA na mjestu loma (Chatterjee i Walker, 2017).

1.1.2.5. Homologna rekombinacija

Homologna rekombinacija (HR, engl. *homologous recombination*) je put popravka dvolančanih lomova koji je manje sklon greškama u usporedbi s NHEJ putem. Međutim, HR put je aktivan samo u S/G2 fazi staničnog ciklusa kada postoji kalup za popravak, odnosno kada su homologne sestrinske kromatide blizu jedna drugoj. MRN proteinski kompleks (MRE11-RAD50-NBS1) započinje HR popravak tako da se veže na dvolančani lom DNA i privlači brojne proteine koji u konačnici služe kao mjesto sidrenja 53BP1 i BRCA1 proteina (BRCA1, engl. *breast cancer type 1 susceptibility protein*). Gen za BRCA1 protein često je mutiran u pojedinim oblicima karcinoma dojke i ovarija što ukazuje na važnost HR popravka u održavanju fiziološke funkcije stanica (Yamamoto i Hirasawa, 2022). Zatim dolazi do nukleolitičke degradacije DNA na mjestu loma tako da nastanu 3' ljepljivi krajevi na koje se veže RAD51 te uz pomoć BRCA2 (engl. *breast cancer type 2 susceptibility protein*) i PALB2 (engl. *partner i localizer of BRCA2*)

proteina čini nukleoproteinski filament koji ulazi u homologni lanac DNA gdje se navedeni proteini razgrade i omoguće sintezu DNA po homolognom kalupu (Chatterjee i Walker, 2017).

1.1.2.6. Put popravka Fanconijeve anemije

Put popravka Fanconijeve anemije (FAP, engl*. Fanconi anemia pathway*) služi za uklanjanje interlančanih lezija nastalih djelovanjem nekih antitumorskih lijekova kao što su cisplatin i mitomicin C ili kemijskih agensa poput diepoksibutana. Mutacije u FAP genima uzrokuju autosomno recesivni poremećaj Fanconijeva anemija čije obilježje je visoka frekvencija hematoloških i kongenitalnih abnormalnosti te predispozicija za razvoj tumora (Chatterjee i Walker, 2017).

1.1.2.7. Popravak DNA-protein adukata

Drugi najčešći oblika DNA oštećenja (nakon AP mjesta) su proteini koji su ireverzibilno vezani za DNA, a nazivamo ih DNA-protein adukti ili unakrsne veze DNA i proteina (DPC, engl. *DNA-protein crosslinks*) (Tretyakova, Groehler i Ji, 2015). Njihov put popravka (DPCR, engl. *DNA-protein crosslink repair*) detaljno je opisan u poglavlju „ *1.3. Popravak DNA-protein adukata (DPCR))*

1.2. DNA-protein adukti (DPC-evi)

DNA i proteini u fiziološkim uvjetima u stanici često stupaju u međusobne interakcije. Histoni su proteini oko kojih se nekovalentnim vezama omata DNA i zajedno tvore kromatinsku strukturu. Tijekom brojnih staničnih procesa, kao što su replikacija, transkripcija i popravak DNA, nužno je stupanje proteina u interakciju s DNA. Međutim, proteini nakon obavljene funkcije disociraju s DNA, čineći tu interakciju reverzibilnom (Wilson, Kellie i Wetmore, 2014).

DNA-protein adukti izrazito su toksične DNA lezije nastale ireverzibilnim kovalentnim povezivanjem proteina i DNA. Iako ovakva veza može djelovati bezazleno, DPC-evi predstavljaju veliki izazov stanicama jer remete esencijalne stanične procese uključujući replikaciju, transkripciju i popravak DNA (Tretyakova, Groehler i Ji, 2015; Ruggiano i Ramadan, 2021). Sprječavanje progresije replikacijskih rašlji može dovesti do genomske nestabilnosti te do pojave jednolančanih i dvolančanih lomova DNA, najtoksičnijih oblika DNA oštećenja. DPC-evi vrlo su česta oštećenja DNA s pojavnošću od približno 6 000 DPC-eva po stanici dnevno (Oleinick *i sur.*, 1987). Povećana frekvencija DPC-eva u stanicama povezuje se s onkogenezom, neurodegeneracijom i ubrzanim starenjem (Lessel *i sur.*, 2014).

Razlikujemo dvije vrste DPC-eva, neenzimski i enzimski DPC-evi. Neenzimski ili općeniti DPC može stvoriti bilo koji protein koji se nalazi u neposrednoj blizini DNA molekule, a najčešće se radi o histonima. Primjerice, tijekom procesa demetilacije histona oslobađa se formaldehid koji može kovalentno ireverzibilno povezati histone s DNA molekulom (Stingele, Bellelli i Boulton, 2017). Enzimski DPC-evi nastaju uspostavljanjem kovalentne ireverzibilne veze između enzima i DNA. Enzimi, čija fiziološka aktivnost uključuje stvaranje reverzibine kovalentne veze s molekulom DNA te nastanak nestabilnog, prolaznog intermedijera, u određenim uvjetima mogu postati ireverzibilno vezani na DNA molekulu (Ruggiano i Ramadan, 2021). Najbolji primjeri enzimskih DPC-eva su topoizomeraze koje kataliziraju reverzibilno cijepanje i ponovno spajanje DNA lanaca u svrhu odmotavanja zavijenog DNA superheliksa (Vaz, Popovic i Ramadan, 2017; Sun *i sur.*, 2020). Tijekom svog djelovanja, topoizomeraze tirozinskim ostatkom vrše nukleofilni napad na DNA molekulu te stvaraju prijelazni kovalentni intermedijer s DNA. Uporabom određenih kemoterapeutika navedeni intermedijer može postati trajno stabiliziran i na taj način tvoriti ireverzibilnu unakrsnu vezu s DNA, odnosno DPC (Ruggiano i Ramadan, 2021).

Poznati su mnogi agensi koji mogu uzrokovati ireverzibilno kovalentno povezivanje proteina s DNA, a dijelimo ih na endogene i egzogene agense. Endogeni spojevi stvaraju se unutar stanica tijekom raznih metaboličkih procesa i uključuju na primjer ROS, reaktivne

dušikove vrste, aldehide i razne DNA aberacije kao što su AP mjesta (Vaz, Popovic i Ramadan, 2017). Egzogeni agensi uzrokuju DPC-eve, a potječu iz stanične okoline i uključuju UV i ionizirajuće zračenje, metalne ione (krom i nikal), ali i različite kemikalije kao što su neki antitumorski lijekovi (Tretyakova, Groehler i Ji, 2015). Ionizirajuće zračenje može direktno i indirektno inducirati pojavu DPC-eva. Direktno djelovanje posredovano je ozračivanjem okosnice DNA te stvaranjem DNA radikala koji vežu proteine iz svoje okoline, dok se indirektno djelovanje odnosi na pojačanu hidrolizu vode u DNA okružju, i posljedično povećanje ROS-ova koji mogu unakrsno vezati proteine za DNA (Zhang *i sur.*, 2004).

Mnogi kemoterapeutici kao mehanizam djelovanja koriste upravo indukciju DPC-eva. Zbog pojačane indukcije DPC-eva u karcinomskim stanicama, dolazi do nemogućnosti popravka DNA i posljedično do inhibicije DNA replikacije. Takvo stanje dovodi do prevelike genomske nestabilnosti, što u konačnici uzrokuje smrt tumorskih stanica (Skok *i sur.*, 2020). Derivati dušikovog iperita (klormetin, ciklofosfamid) i derivati platine (cisplatin, karboplatin) mogu uzrokovati kovalentno povezivanje proteina i DNA molekule, ali također i interlančane DNA adukte (Tretyakova, Groehler i Ji, 2015). Određeni kemoterapeutici ciljaju specifične enzime čiji je supstrat DNA, kao što su topoizomeraza I (TOP1, engl. *topoisomerase I*), topoizomeraza II (TOP2, engl. *topoisomerase II*), poli [ADP-riboza] polimeraza 1 (PARP1, engl. *poly [ADP-ribose] polymerase 1*), DNA-metiltransferaza (DNMT, engl. *DNA methyltransferase*), te na taj način mogu uzrokovat pojavu specifičnih enzimskih DPC-eva. Analozi kamptotecina (irinotekan, topotekan) su TOP1 otrovi koji zarobe topoizomerazu I u ireverzibilnom kovalentnom kompleksu s DNA. Lijekovi koji induciraju TOP2 DPC-eve su neinterkalatori podofilotoksini (etopozid, tenipozid) koji se smatraju TOP2 otrovima te induciraju pojavu kovalentne ireverzibilne veze TOP2-DNA (Sun *i sur.*, 2020; Pommier *i sur.*, 2022). Olaparib, uz samu inhibiciju aktivnosti PARP1 enzima, koji fiziološki sudjeluje u prepoznavanju DNA oštećenja i remodeliranju kromatina, uzrokuje i stvaranje kompleksa PARP1 i DNA molekule što dodatno pridonosi citotoksičnosti olapariba (Murai *i sur.*, 2013). Unakrsno vezanje DNMT i DNA uzrokuje analog citozina 5-azadeoksicitozin koji se prvenstveno ugradi u DNA, ali također i zarobi DNMT na mjestu ugradnje (Santi, Norment i Garrett, 1984; Sun *i sur.*, 2020).

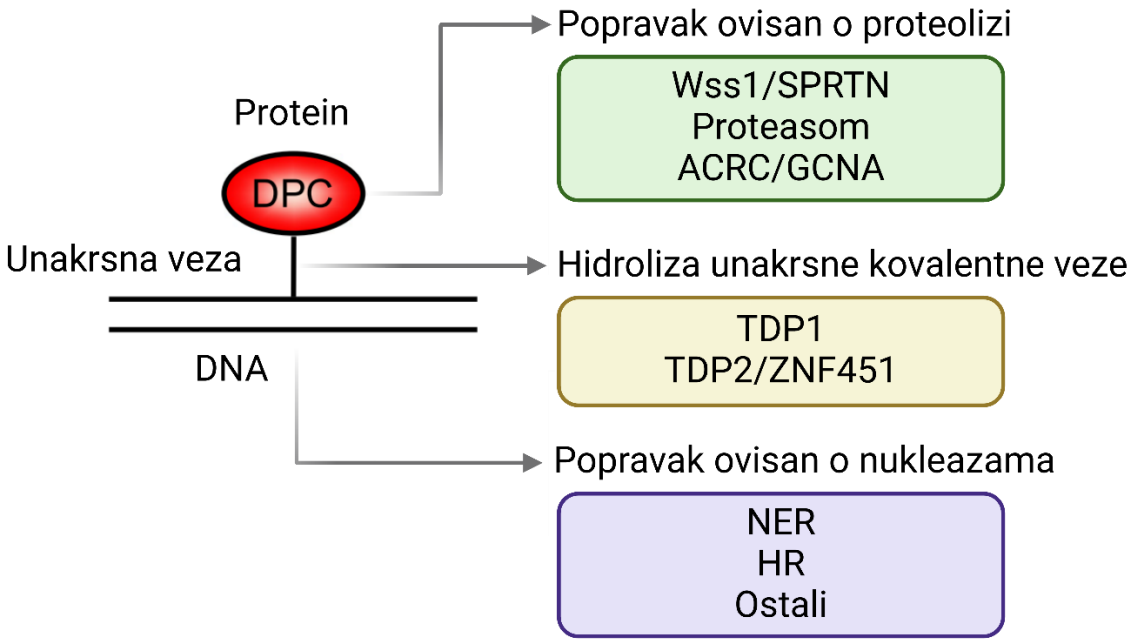
Pomoću RADAR-MS (engl. *rapid approach to DNA adduct recovery assay – mass-spectrometry*) metode analizirano je koji proteini se nalaze u „aduktomu“ - repertoaru proteina koji tvore adukte s DNA (Kiianitsa i Maizels, 2020). Fiziološki „aduktom“ uključuje enzime koji u svom reakcijskom putu tvore intermedijer s DNA (TOP1, TOP2, DNMT1, Ku) i proteini koji se nalaze u neposrednoj blizini DNA molekule (histoni, HMG (engl. *High-Mobility Group)* proteini).

Tijekom MS analize DPC-eva induciranih ROS-ovima, karcinogenim metabolitima ili antitumorskim lijekovima identificirano je stotine različitih proteina koji mogu biti kovalentno i ireverzibilno povezani s DNA. Zbog ovako širokog repertoara različitih proteina i različitih načina povezivanja s DNA, stanice su razvile kompleksnu mrežu mehanizama koji sudjeluju u popravku takvih unakrsnih veza između proteina i DNA (Kiianitsa i Maizels, 2020).

1.3. Popravak DNA-protein adukata (DPCR)

Iz prethodnog, može se zaključiti kako su DNA-protein adukti izrazito kompleksna vrsta DNA oštećenja zbog širokog raspona proteina različitih svojstava koji se na DNA ireverzibilno mogu vezati različitim brojem i vrstom kemijskih veza, djelovanjem raznih agensa. Stoga se i sam popravak DPC-eva sastoji od izrazito kompleksne, ali koordinirane mreže proteina koji svi teže uklanjanju ireverzibilno kovalentno vezanog proteina s DNA kako bi se što prije omogućilo normalno odvijanje svih DNA transakcija i spriječilo daljnje oštećenje DNA. Područje istraživanja DPC popravka relativno je novo jer je tek 2014. prepoznato kao dio DDR-a, kada je otkrivena prva DPC proteaza Wss1 (engl. *weak suppressor of smt3-331*) u kvascu (Stingele *i sur.*, 2014). Unatoč snažnoj ekspanziji u polju DPC popravka i brojnim istraživačkim naporima, još uvijek nam nedostaje dovoljno znanja za sveobuhvatno razumijevanje mehanizama DPC popravka (Vaz, Popovic i Ramadan, 2017; Ruggiano i Ramadan, 2021).

Ako DPC-eve sagledamo malo detaljnije, razlikujemo tri ključne komponentne: protein, DNA i unakrsnu vezu između njih. Na taj način može se podijeliti i sam put popravka DPC-eva, ovisno na koju je, od te tri komponente, on primarno usmjeren. Popravak ovisan o proteolizi (proteolitički put) djeluje sa svrhom uklanjanja proteina, dok popravak ovisan o nukleazama (nukleolitički put) služi za popravak DNA molekule. Razlikujemo i put popravka zadužen za direktnu hidrolizu kovalentne veze između DNA i proteinskog ostatka (hidrolitički put) (Slika 2) (Zhang, Xiong i Chen, 2020).



Slika 2: Shematski prikaz podjele DPC popravka**.** Shema prikazuje tri ključne komponente DPC-a (protein, DNA i unakrsnu vezu) te podjelu DPC popravka s obzirom na dio komponente na koji primarno djeluje. Kratice: ACRC/GCNA – engl. *acid repeat-containing protein/germ cell nuclear antigen-1*; SPRTN – engl. *SprT-Like N-Terminal Domain*; TDP1 – tirozil-DNA fosfodiesteraza 1 (engl. *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1)*; TDP2 – tirozil-DNA fosfodiesteraze 2 (engl. *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2)*; ZNF451 – engl. *Zinc Finger Protein 451*. (Preuzeto i prilagođeno prema Zhang, Xiong i Chen, 2020).

1.3.1. Popravak ovisan o nukleazama (nukleolitički put)

Prva saznanja o popravku DPC-eva upućivala su na uključenost dobro poznatih kanonski puteva popravka koji nukleazama djeluju na DNA: popravak izrezivanjem nukleotida (NER) i popravak homolognom rekombinacijom (HR). Prve studije rađene na bakterijama pokazale su uključenost NER puta popravka kod uklanjanja DPC-eva koji nisu veći od 8 – 10 kDa, a HR puta kod uklanjanja glomaznijih DPC-eva (Nakano *i sur.*, 2009). Ovakvi zaključci upućivali su na to da proteini veći od 8 – 10 kDa sprječavaju pristup NER endonukleazama te također smanjuju njihovu incizijsku efikasnost (Zhang, Xiong i Chen, 2020). Stoga se smatra kako NER put ne može biti odgovoran za popravak svih vrsta DPC-eva, već je za neke potrebna prethodna proteolitička obrada. NER put popravka uključuje izrezivanje lanca DNA uzvodno i nizvodno od

peptida vezanog na DNA, nakon čega DNA polimeraza i ligaza rekonstruiraju uklonjenu regiju (Slika 3, F).

Za sada se smatra kako HR put popravka intaktnih DPC-eva zahtjeva nužno formiranje dvolančanog loma. Većina dokaza uključenosti HR puta popravka su indirektna, stoga se još uvijek razmatra sudjeluje li HR uopće u popravku intaktnih DPC-eva ili je samo uključen u popravak dvolančanih lomova, koji su česta posljedica nepopravljenih DPC-eva (Vaz, Popovic i Ramadan, 2017). Nadalje, dokazano je da ulogu u popravku DPC-eva ima i nukleaza Mre11, koja je ključna nukleaza HR puta popravka. Studije na ljudskim stanicama pokazale su kako Mre11 u MRN kompleksu (MRE11-RAD50-NBS) sudjeluje u uklanjanju DPC-a topoizomeraze 2 (Lee *i sur.*, 2012; Hoa *i sur.*, 2016). MRN kompleks endonukleaznom aktivnošću uzrokuje nastanak jednolančanog loma 15 - 20 parova baza dalje od oštećenja te zatim svojom 3' - 5' egzonukleaznom aktivnošću uklanja dio DNA lanca koji sadrži vezan TOP2 enzim. Nakon toga, MRN kompleks uvodi jednolančani lom na komplementarnom lancu i nastali dvolančani lom se u konačnici popravlja HR ili NHEJ putem popravka (Slika 3, A) (Lee *i sur.*, 2012; Hoa *i sur.*, 2016). No, zanimljivo je kako deplecija Mre11 pomoći siRNA nije uzrokovala povećano nakupljanje DPC-eva u stanicama, što sugerira kompleksnost navedenih procesa i uključenost dodatnih mehanizama popravka TOP2 DPC-eva (Vaz *i sur.*, 2016). Dodatno, DPC bez prisutnih slobodnih krajeva DNA ne može biti prepoznat od MRN kompleksa te to posljedično onemogućava HR put popravka. Prenukleolitičko cijepanje DNA drugim putevima, kao što je NER, može proizvesti supstrat koji se kasnije može popraviti homolognom rekombinacijom. Bitno je naglasiti kako zbog raznih ograničenja, od prisutnosti dvolančanog loma nužnog za HR do steričke smetnje velikih peptida u djelovanju NER-a, uloga NER-a i HR-a u popravku DPC-eva uvelike varira i ovisi o veličini DPC-eva i okolnostima u kojima se u tom trenutku stanica nalazi (Zhang, Xiong i Chen, 2020).

1.3.2. Popravak ovisan o proteolizi (proteolitički put)

Proteolitički put popravka DPC-eva došao je do izražaja kada je pronađena Wss1 proteaza u kvascu 2014. godine (Stingele *i sur.*, 2014) te 2016. godine kada je otkriven njen homolog u sisavcima SPRTN (engl. *SprT-Like N-Terminal Domain*) proteaza (Stingele *i sur.*, 2014; Vaz *i sur.*, 2016). Proteoliza DPC-eva važan je segment popravka ovih glomaznih DNA aberacija kako bi se omogućio pristup nizvodnim enzimima da djeluju na unakrsnu vezu i poprave DNA (Slika 3, C). Za nekoliko proteaza se smatra da sudjeluju u proteolizi DPC-eva, no još uvijek nedostaju sveobuhvatni dokazi za potpuno razumijevanje mehanizama proteolize DNA-protein adukata.

Proteasom je glavni proteolitički enzim koji posreduje reguliranu razgradnju proteina u eukariotskim stanicama. Obično se proteini namijenjeni razgradnji obilježe lancima poliubikvitina što ih usmjerava prema razgradnji proteasomom. Zanimljivo je da su znanstvenici uočili ubikvitinaciju TOP1 nakon tretiranja stanica s TOP1 otrovima (kamptotecini). Također, blokada aktivnosti proteasoma inhibitorima poput MG132 spriječila je proteolizu TOP1-DPC-eva (Lin *i sur.*, 2008). Međutim, u navedenim eksperimentima bili su korišteni inhibitori proteasoma (MG132, laktacistin i bortezomib) koji uz samu inhibiciju smanjuju i dostupnost ubikvitina u stanici. Sve u svemu, podaci sugeriraju da je DPC proteoliza proces ovisan o ubikvitinu, ali izravna uloga proteasoma u popravljanju DPC-eva još uvijek nije jasna te su potrebna dodatna istraživanja koja bi to razjasnila (Vaz, Popovic i Ramadan, 2017).

Wss1 (engl. *weak suppressor of smt3-331*) je metaloproteaza pronađena u *TDP1* (tirozil-DNA fosfodiesteraza 1, engl. *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1*) - depletiranim kvascima gdje je uočeno da simultani nedostatak Wss1 i TDP1 proteina uzrokuje sporiji rast stanica kvasca i njihovu hiperosjetljivost na tretman kamptotecinom. Kada se u istim stanicama depletirala TOP1 navedeni učinci su bili poništeni (Stingele *i sur.*, 2014). Daljnja istraživanja upućuju na sudjelovanje Wss1 u uklanjanju DNA-protein adukata u stanicama kvasca (Balakirev *i sur.*, 2015; Svoboda *i sur.*, 2019).

SPRTN (engl. *SprT-Like N-Terminal Domain*) protein je otkriven kao funkcionalni homolog Wss1 proteina iz kvasaca pomoću bioinformatičke analize genetičkih sekvenci. I SPRTN i Wss1 sadrže konzerviranu proteaznu domenu HEXXH te, također, sadrže SHP domenu odgovornu za interakciju proteina sa segregazom cdc48 (p97 u višim eukariotima) (Stingele, Bellelli i Boulton, 2017). Međutim, prije otkrivanja njegove funkcije u DPC popravku, SPRTN je prvi put okarakteriziran kao protein koji sudjeluje u interakciji s proliferirajućim staničnim jezgrenim antigenom (PCNA, engl. *proliferating cell nuclear antigen*) te koji je uključen u proces translezijske sinteze DNA (Juhasz *i sur.*, 2012). *In vivo* studije otkrile su da su stanice s nedostatkom SPRTN-a preosjetljive na djelovanje DPC-inducirajućih agensa. Djelovanjem DPC-inducirajućih agensa u SPRTN-deficijentnim stanicama dolazi do akumulacije nespecifičnih DPC-eva, ali i topoizomeraznih DPC-eva, što ukazuje na nemogućnost popravka nastalih DNA-protein adukata zbog nedostatka proteazne aktivnosti SPRTN-a (Stingele *i sur.*, 2016; Vaz *i sur.*, 2016). Mutacije u oba *SPRTN* alela u germinativnim stanicama dovode do razvoja Ruijs-Aalfs sindroma, što je ljudski autosomni poremećaj kojeg karakterizira genomska nestabilnost, preuranjeno starenje te rana pojavnost hepatocelularnog karcinoma (Lessel *i sur.*, 2014). SPRTN proteaza ima veliko vezno mjesto za supstrat što ga čini nespecifičnim za

proteine koji su vezani na DNA, ali se specifično veže za dvostruku uzvojnicu DNA. To je u ovom slučaju iznimno važna karakteristika jer je zbog kompleksnosti i raznovrsnosti DPC-eva teško imati specifične proteaze koje djeluju na specifične DPC-eve (Li *i sur.*, 2019). SPRTN cijepa različite vrste proteina koji su vezani za DNA, uključujući histone H2A, H2B, H3, H4, vezujući histon H1, HMG1, TOP1, TOP2 i druge (Vaz *i sur.*, 2016). U eksperimentima je pokazano kako je SPRTN vezan uz proces replikacije u stanici te da putuje zajedno s replikacijskim rašljama i proteolitički razgrađuje kovalentno ireverzibilno vezane proteine na DNA molekuli (Vaz *i sur.*, 2016). U G1 fazi ciklusa *SPRTN* nije eksprimiran te ulaskom u S fazu naglo raste njegova ekspresija što, također, ide u prilog hipotezi SPRTN-a kao proteaze koja djeluje tijekom procesa replikacije (Mosbech *i sur.*, 2012). U proliferativnim stanicama najveći dio DPC-eva upravo se ukloni u S fazi staničnog ciklusa (Vaz *i sur.*, 2016). U neproliferativnim stanicama još uvijek ne postoje konkretne informacije kako se točno DPC-evi uklanjaju, ali nije isključeno ni djelovanje SPRTN proteina neovisno o replikaciji (Vaz, Popovic i Ramadan, 2017).

Regulacija proteazne aktivnosti SPRTN-a od iznimne je važnosti kako ne bi došlo do nekontrolirane razgradnje svih proteina vezanih za DNA, kao npr. histona koji nisu kovalentno ireverzibilno vezani za DNA, ali koji stupaju u interakciju s DNA kako bi gradili kromatinska vlakna (Zhang, Xiong i Chen, 2020). Pretpostavljena su tri načina na koja se može vršiti regulacija proteazne aktivnosti SPRTN proteina (Stingele *i sur.*, 2016). Prvi od načina je onemogućavanje vezanja SPRTN-a za kromatin tako da se SPRTN ubikvitinira. Stoga su znanstvenici predložili da nastali DPC-evi na neki način uzrokuju deubikvitinaciju SPRTN-a, što potiče njegovo vezanje na DNA i njegovu aktivaciju (Stingele *i sur.*, 2016). Također, pokazano je kako SPRTN ima sposobnost autokatalitičkog cijepanja što predstavlja važan mehanizam njegove autoregulacije (Stingele, Habermann i Jentsch, 2015). Zadnji pretpostavljeni mehanizam regulacije vezan je uz DNA i oblik u kojem se ona nalazi. I jednolančana i dvolančana DNA mogu aktivirati proteolitičku aktivnost SPRTN-a, pri čemu je jednolančana DNA učinkovitija. Kada je prisutna dvolančana DNA, SPRTN ima uglavnom aktivnost autokatalitičkog cijepanja, dok u prisustvu jednolančane DNA, SPRTN posjeduje i DPC proteaznu aktivnost i aktivnost autokatalitičkog cijepanja (Stingele *i sur.*, 2016).

U nedavnim studijama, pojavile su se nove proteaze kao potencijalni enzimi za popravak DPC-eva osim SPRTN-a, a to su ACRC (engl. *acid repeat-containing protein*)/GCNA (engl. *germ cell nuclear antigen*), FAM111A i B (engl. *family with sequence similarity 111 member A i B*) te DDI1 i DDI2 (engl. *DNA damage inducible proteins 1 i 2*) (Ruggiano i Ramadan, 2021). Filogenetskim istraživanjima dokazano je kako ACRC/GCNA sadrži SprT domenu koja pokazuje

sličnost SPRTN proteinu (Fielden *i sur.*, 2018). ACRC/GCNA eksprimirana je u germinativnim stanicama te je u eksperimentima dokazano kako targetira TOP2-DPC-eve (Bhargava *i sur.*, 2020). DDI1 i DDI2 su asparaginske proteaze koje stupaju u interakciju s ubikvitinom i proteasomom. Izravna uključenost u popravak DPC-eva još nije istražena, no nedavno je pokazano da DDI1 homolog u S.cerevisiae pomaže Wss1 u popravku DPC-eva induciranih kamptotecinom i formaldehidom (Ruggiano i Ramadan, 2021). FAM111A i njegov homolog FAM111B su serinske proteaze. FAM111A je prethodno opisan kao protein koji stupa u interakcije s PCNA te je tek nedavno implicirano da sudjeluje u popravku TOP1-DPC-eva i zarobljenog PARP1 proteina (Kojima *i sur.*, 2020). Međutim, još uvijek nedostaju sveobuhvatni dokazi da ACRC/GCNA, DDI1 i 2 i FAM111A cijepaju DPC-eve i sudjeluju u njihovom popravku (Fielden *i sur.*, 2018).

Nakon djelovanja proteolitičkih enzima na DPC-eve, oni i dalje nisu u potpunosti uklonjeni s DNA. Na njihovom mjestu ostaje mali peptid kovalentno vezan za DNA koji onda može biti popravljen nizvodnim putevima ili se može javiti tolerancija na DNA oštećenje (Zhang, Xiong i Chen, 2020).

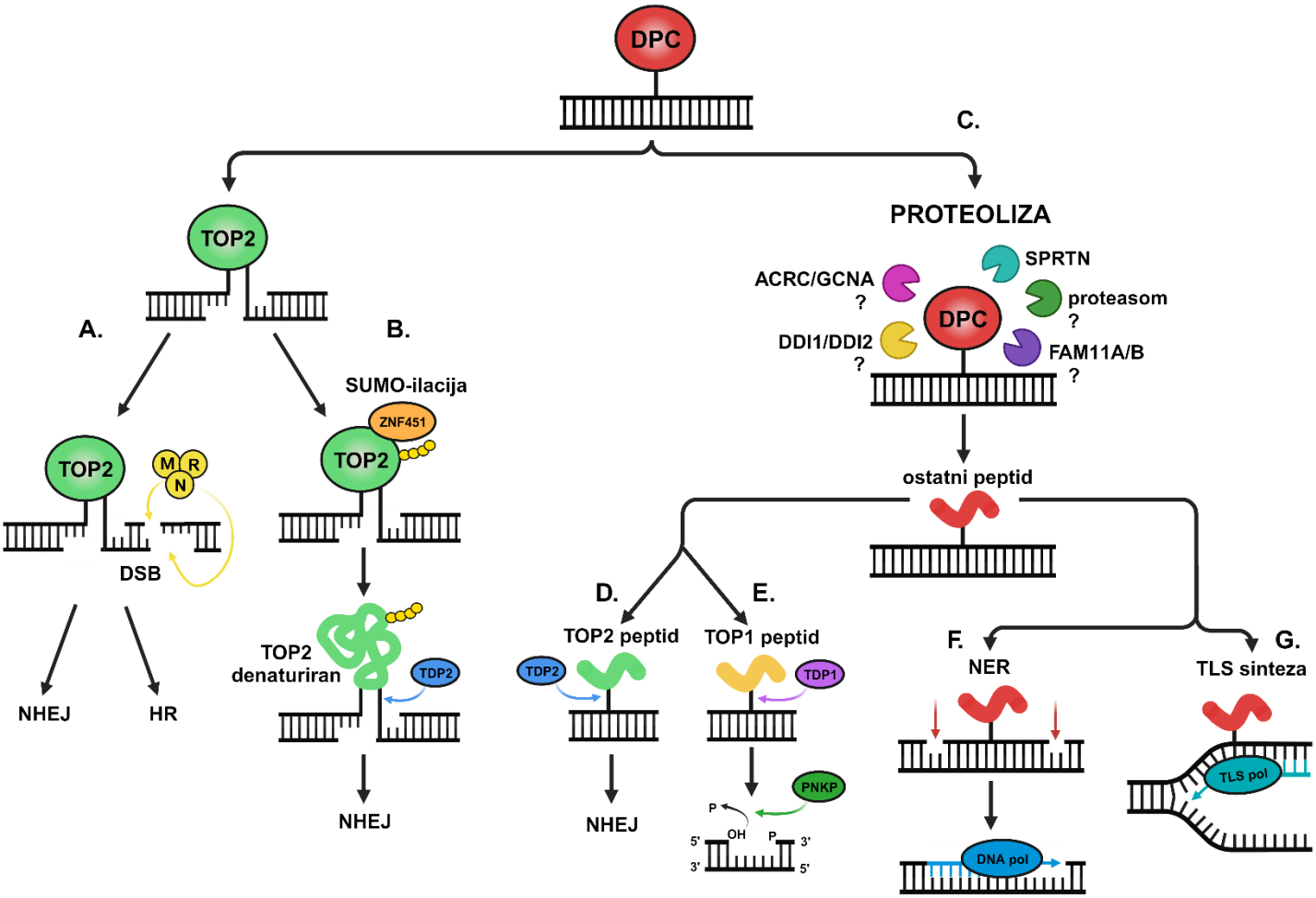
1.3.3. Hidroliza unakrsne kovalentne veze (hidrolitički put)

U prethodnom poglavlju spomenuto je kako nakon proteolize DPC-eva često zaostaje manji peptid kovalentnom vezom pričvršćen za DNA. Ponekad se TLS polimerazom može zaobići vezani peptid te se replikacija DNA može dovršiti, što rezultira tolerancijom na DNA oštećenje (Slika 3, G). Međutim, navedeni peptid može biti i uklonjen NER ili HR putem popravka (Slika 3, F) ili, u posebnim slučajevima, kada se radi o topoizomerazama, u popravku mogu sudjelovati specifični enzimi koji hidroliziraju vezu TOP-DNA (Vaz, Popovic i Ramadan, 2017).

Tirozil-DNA fosfodiesteraze 1 i 2 (TDP1 i 2) su enzimi koji specifično mogu hidrolizirati unakrsnu vezu TOP1-DPC i TOP2-DPC oštećenja, no, kao i NER, ograničeni su steričkim smetnjama DPC-eva i pristupom do unakrsne veze. Prvi je otkriven TDP1 (engl. *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1*) protein na temelju njegove aktivnosti hidroliziranja fosfotirozinskih veza na 3’ kraju molekule DNA (Yang *i sur.*, 1996). Nedostatak TDP1 proteina pojačava osjetljivost na TOP1 otrove (kamptotecini) u stanicama raznih organizama pa tako i u ljudima (Interthal i sur., 2005). Mehanizam djelovanja TDP1 proteina uključuje tirozinski napad na 3' kraj DNA i stvaranje prijelaznog kovalentnog intermedijera što u konačnici rezultira hidrolizom veze TOP1-DNA (Davies *i sur.*, 2002). Nakon hidrolize pomoću TDP1, DNA ostaje sa slobodnim 3'-fosfatnim krajem, koji se mora dalje obraditi polinukleotid kinazom fosfatazom (PNKP, engl.

polynucleotide kinase 3'-phosphatase) kako bi se stvorio 3'-hidroksilni kraj koji se zatim može produljiti polimerazama (Slika 3, E) (Zhang, Xiong i Chen, 2020). Mutacije u katalitičkoj domeni TDP1 rezultiraju nakupljanjem međuprodukata TDP1-DNA i dovode do rijetke autosomno recesivne neurodegenerativne bolesti spinocerebelarne ataksije s aksonalnom neuropatijom (Takashima *i sur.*, 2002).

TDP2 (engl. *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2*) enzim u svom katalitičkom mjestu sadrži dva metala koji sudjeluju u procesu hidrolize unakrsne veze TOP2-DPC-a (Slika 3, D). Za razliku od TDP1 proteina, svojim djelovanjem ne stvara prijelazni kovalentni intermedijer. TDP2 generira 5'-fosfatne krajeve, koji se mogu izravno povezati ligazama (Zhang, Xiong i Chen, 2020). Homozigotne mutacije gena *TDP2* povezane su sa spinocerebelarnom ataksijom, autosomno recesivnom bolešću karakteriziranom intelektualnim invaliditetom, napadajima i ataksijom (Gómez-Herreros *i sur.*, 2014). Nedavna studija pokazala je da SUMO ligaza ZNF451/ZATT (engl. *Zinc Finger Protein 451/Zinc finger protein Associated with TDP2 and TOP2*) može posredovati u izravnom uklanjanju kovalentnog kompleksa TOP2-DNA (TOP2-DPC-a) zajedno s TDP2 proteinom. Istraživači su pokazali da se ZNF451 može izravno vezati i SUMO-ilirati TOP2-DPC, što posljedično pojačava aktivnost TDP2 enzima i potiče njegovo učinkovito vezanje i hidrolizu unakrsne veze (Slika 3, B) (Schellenberg *i sur.*, 2017). Mnogo toga u ovom polju još je nepoznato, stoga su dodatna istraživanja i dalje nužna za bolje razumijevanje mehanizama popravka DPC-eva (Zhang, Xiong i Chen, 2020).



Slika 3: Shematski prikaz mogućih mehanizama DPC popravka. **A.** Popravak TOP2-DPC-a pomoću MRN kompleksa. **B.** Popravak TOP2-DPC-a pomoću ZNF451/TDP2 proteina. **C.** Proteolički put popravka DPC-eva. **D.** Popravak TOP2 ostatnog peptida pomoću TDP2 enzima. **E.** Popravak TOP1 ostatnog peptida pomoću TDP1/PNKP enzima. **F.** Uklanjanje ostatnog peptida NER putem popravka. **G.** Translezijska sinteza DNA i tolerancija ostatnog peptida. (Izrađeno pomoću BioRender.com).

1.3.4. Komponente DPC popravka kao potencijalne mete budućih antitumorskih lijekova

Enzimi TDP1 i TDP2 su obećavajuće mete u razvoju buduće antitumorske terapije te su njihove uloge u popravku DPC-eva detaljno opisane u poglavlju „*1.3.3. Hidroliza unakrsne kovalentne veze (hidrolitički put*)“. Poseban naglasak stavljen je na kombiniranu terapiju upotrebom inhibitora TDP1 s otrovima topoizomeraze 1 (kamptotecini - topotekan, irinotekan), odnosno kombinacija TDP2 s otrovima topoizomeraze 2 (podofilotoksini - etopozid, tenipozid) (Pommier *i sur.*, 2014). Ideja za ciljanje TDP1 i TDP2 u kombinaciji s otrovima TOP1 i TOP2

javila se iz činjenice da su stanice kralježnjaka s nedostatkom TDP1 i TDP2 pojačano osjetljive na inhibitore topoizomeraza (Interthal *i sur.*, 2005). Stoga se zaključuje da je TDP1 potencijalni uzrok rezistencije na TOP1 otrove (Pommier *i sur.*, 2014), a TDP2 potencijalni uzrok rezistencije na TOP2 otrove (Maede *i sur.*, 2014). Budući da TDP1 ili TDP2 depletirane stanice kralježnjaka pokazuju normalan rast, očekuje se dobra podnošljivost TDP1/TDP2 inhibitora (Gómez-Herreros *i sur.*, 2014). Smatra se kako će ovi inhibitori imati dobar efekt u stanicama karcinoma u kojima su mutirani i nefunkcionalni drugi putevi popravka DNA, jer se na taj način izbjegava popravak DPC-eva alternativnim putevima i pojačana je specifičnost prema tumorskim stanicama (Ivankin *i sur.*, 2023).

p97/VCP (engl. *valosin-containing protein*) je multifunkcionalni protein, AAA+ ATP-aza koja, zajedno s mnogim kofaktorima i adaptorima, igra važnu ulogu u staničnoj homeostazi. Dokazano je da sudjeluje u reguliranju autofagije, u razgradnji proteina čvrsto vezanih za DNA, i u razgradnji proteina koji su vezani za endoplazmatski retikulum (engl. *endoplasmic reticulum-associated degradation proteins*) (Costantini *i sur.*, 2021). Otkrivena je povećana ekspresija p97 proteina u raznim vrstama karcinoma, što se povezuje s tumorskom progresijom i metastatskim potencijalom (Yamamoto *i sur.*, 2004; Lauten *i sur.*, 2006; Li *i sur.*, 2021). Budući da p97 ima važne molekularne i stanične uloge i uključen je u različita fiziološka i patološka stanja, zanimljiva je potencijalna terapijska meta. Osim kao potencijalna meta antitumorskih lijekova, p97 može predstavljati i novi biomarker za dinamičko praćenje progresije karcinoma i terapijskih odgovora. Iako su posljednjih godina razvijeni mnogi inhibitori p97, započeta su samo dva klinička ispitivanja faze I na CB-5083 (NCT02243917 i NCT02223598), ali su prekinuta zbog štetnih učinaka na vid (Leinonen *i sur.*, 2021). Ovi podaci pokazuju da dizajn novih p97/VCP inhibitora ili derivata postojećih lijekova s jačim inhibitornim djelovanjem predstavlja zanimljiv izazov (Costantini *i sur.*, 2021).

Iz prethodnih odlomaka možemo zaključiti kako su komponente DPC popravka dobre potencijalne mete novih antitumorskih lijekova. No, zbog nedostatka znanja o mehanizmima u pozadini DPC popravka i interakcijama između različitih puteva popravka, navedeni potencijal još uvijek nije uspješno iskorišten. Najveći izazovi u daljnjem razumijevanju i istraživanjima u polju DPC popravka su: (1) nedovoljna razvijenost metodologije za kvantifikaciju količine DPC-eva i kinetike njihovog popravka, (2) velika raznolikost DPC oštećenja zbog široke lepeze veličina proteina unakrsno vezanih za DNA (25 - 250 kDa), kemije križanja, topologije DNA (odsutnost ili prisutnost jednostrukih/dvostrukih lomova DNA) i faza staničnog ciklusa te (3) nedostatak *in vivo* ispitivanja. Potaknuti nedostatkom prikladne metodologije u DPC

istraživanjima, ovim radom odlučeno je pokušati doprinijeti razvoju nove metode koja bi služila jednostavnijoj kvantifikaciji količine DPC-eva i mjerenju efikasnosti njihovog popravka u ljudskim stanicama.

1.4. Metodologija u izolaciji i kvantifikaciji DNA-protein adukata (DPC-eva)

Kako bi se moglo proučavati stvaranje i popravak DPC-eva u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima potrebno je za početak selektivno izolirati proteine koji su stvorili ireverzibilnu vezu s DNA, ali izostaviti one proteine koji su nekovalentno reverzibilno vezani za DNA kao što su na primjer histoni. Kada smo postigli dovoljno selektivnu izolaciju možemo prijeći na postupke detekcije specifičnih proteina koji čine DPC-eve. Zbog povećane popularnosti ovog područja istraživanja, znanstvenici nastoje razviti nove, kvalitetnije metode izolacije i detekcije DPC-eva kako bi mogli dobiti kompletnije informacije o samim mehanizmima nastanka i popravka DNA-protein adukata (Torrecilla *i sur.*, 2023). Razlikujemo metode izolacije DPC-eva te metode detekcije DPC-eva.

1.4.1. Metode izolacije DPC-eva

U metode izolacije DPC-eva ubrajamo odvajanje gradijentom gustoće cezijevog klorida, RADAR (engl. *rapid approach to DNA adduct recovery*) metodu, STAR (engl*. superior method for true DNA–protein crosslinks recovery*) metodu, PxP (engl. *purification of x-linked proteins*) metodu i percipitaciju s KCl/SDS-om (Torrecilla *i sur.*, 2023). U nastavku će ove metode biti ukratko opisane te će biti navedene njihove prednosti i nedostaci.

Odvajanje gradijentom gustoće cezijevog klorida (CsCl) najstarija je metoda izolacije DPC-eva. CsCl je gusta sol koja stvara linearni gradijent tijekom ultracentrifugiranja, sa gradijentnim smanjenjem gustoće od dna prema vrhu. Stanični elementi slične gustoće poravnavaju se i zaustavljaju u određenom području CsCl gradijenta u kojem je gustoća CsCl-a jednaka njihovoj gustoći (Vinograd, 1957). Kovalentno vezanje proteina na DNA modificira njezinu gustoću, što dovodi do promjene u njezinim sedimentacijskim svojstvima u CsCl gradijentu. Na temelju tog svojstva možemo razlikovati DNA koja na sebi ima vezane proteine od slobodne DNA, a slobodni proteini ostaju na vrhu CsCl gradijenta. Sam postupak uključuje lizu stanica i denaturaciju proteina pomoću snažnih deterdženata, fragmentaciju DNA pomoću propuštanja lizata kroz špricu i naposljetku ultracentrifugiranje (500 000g; 4h) u CsCl gradijentu te odvajanje frakcija različite gustoće. Odvajanje CsCl gradijentom je dobro uspostavljena metoda za frakcioniranje nukleinskih kiselina, s dugom poviješću uporabe. Međutim, ova metoda ima brojne nedostatke, a to su: jako niska procesivnost (4 - 6 uzoraka po eksperimentu), dugotrajnost samog procesa (2 dana), veliki gubici uzorka, skupa ultracentrifuga i činjenice da se ovom metodom odvajaju svi proteini koji su vezani na DNA, a ne samo DPC-evi (Torrecilla *i sur.*, 2023).

RADAR analiza trenutno je najprihvaćenija metoda za biokemijsku izolaciju DPC-eva. Razvijena je za selektivno izoliranje DPC-eva, ali ne i drugih slabo vezanih proteina za DNA, a razvili su ju Kiianitsa i Maizels 2013. te dodatno poboljšali 2014. i 2020. godine (Kiianitsa i Maizels, 2013, 2014, 2020). Postupak RADAR analize započinje lizom stanica pomoću posebnog RADAR ekstrakcijskog pufera sastavljenog od gvanidinijevog izotiocijanata (GTC, 6M), deterdženta Triton X-100 (4 %) i Sarkosyl (1 %) zajedno s Tris-HCl (pH 6.5, 10mM) i EDTA (20mM) (Kiianitsa i Maizels, 2013). Gvanidinijev izotiocijanat iz pufera koristimo kako bismo poremetili slabe nespecifične veze proteina i DNA te kako bi selektivno izdvojili DPC-eve. Nakon ekstrakcije puferom, provodi se taloženje nukleinskih kiselina etanolom, zatim centrifugiranje s kojim se dobiva talog u kojem se nalaze adukti proteina s DNA i RNA. Talog se ispire 75 % etanolom i ponovno precipitira kako bi maksimalno smanjili prisutnost slobodnih proteina u precipitatu. Nakon toga, talog se resuspendira u 8mM NaOH te se mali alikvot tretira proteinazom K kako bi ostala samo slobodna DNA kojoj se zatim može izmjeriti koncentracija pomoću DNA-vezujućih fluorescentnih boja. Kvantifikacija DNA provodi se u svrhu normalizacije uzoraka prilikom daljnjih postupaka detekcije. Zatim u uzorku vršimo digestiju nukleinskih kiselina s benzonazom kako bi se proteini koji su bili dio DPC-eva mogli razlučiti i detektirati. Detekcija proteina nakon RADAR eseja može se vršiti pomoću enzimski vezanog imuno-apsorbirajućeg eseja (ELISA, engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), slot-blot-a, i Western blot-a, a uzorak se može analizirati i spektrometrijom masa. RADAR analiza izuzetno je osjetljiva te nije potrebna velika količina uzorka kako bi se DPC-evi izolirali. Također, može se provesti s opremom koja se uglavnom nalazi u većini znanstvenih laboratorija i nije potrebno koristiti komercijalne reagense. Prednosti ove metode uključuju: visoku osjetljivost i specifičnost, ne koristi komercijalne reagense i kompleksnu opremu te se može izvoditi na širokoj paleti uzoraka od stanica, tkiva, embrija i drugih. Glavni nedostaci RADAR metode bili su velika inter- i intra- eksperimentalna varijabilnost i mogući gubici uzoraka, koje su nedavno uspješno riješene uvođenjem koraka liofilizacije umjesto proteinske precipitacije pomoću trikloroctene kiseline (Anticevic, 2023). Jedini nedostatak ove modificirane RADAR metode je relativno niska procesivnost (maksimalno 8 - 10 uzoraka) i dugotrajnost postupka (od izolacije do detekcije su potrebna 3 - 4 dana). Također, bitno je naglasiti da se njome izoliraju i DNA i RNA proteinski adukti.

STAR metoda nastala je kao prilagodba RADAR metode s ciljem smanjenja prisutnosti RNA-protein adukata kako bi se dobio izolat s proteinima selektivno vezanim za DNA. Postupak je modificiran na način da se stanice prvo liziraju u puferu koji sadrži deterdžente (1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 0,5 % deoksiholata), ali bez gvanidinijeva izotiocijanata. Nakon toga se

taloženjem i centrifugiranjem izdvajaju jezgre stanica te se na taj način uklanja citoplazmatski materijal, a s njim i RNA. Talog jezgri se zatim resuspendira u puferu koji sadrži gvanidinij-HCl te se dalje provodi taloženje DNA i obrada uzoraka u skladu s RADAR protokolom (Glumac *i sur.*, 2023). Prednost ove metode je da se većina RNA i topivih proteina učinkovito uklanja prethodnim korakom lize i centrifugiranjem, što učinkovito taloži samo DNA i DPC-eve. Međutim, taj dodatni korak može uzrokovati proteolizu i/ili nukleolizu, što za posljedicu ima digestiju i modificiranje DPC-eva koje želimo izolirati. Uz to, još uvijek postoje rasprave o učinkovitosti ove metode te su potrebni dodatni eksperimenti kako bi se razlučilo je li stvarno bolja od RADAR metode (Torrecilla *i sur.*, 2023).

PxP metoda najnovija je metoda za izolaciju DNA-protein adukata, a temelji se na elektroeluciji slobodnih proteina iz agaroznih gelova u kojima su se prethodno ugradile stanice za analizu. DNA iz stanica ostaje imobilizirana na gelu, dok slobodni proteini budu elektroeluirani što na kraju ostavlja gel s DNA i proteinima vezanim za nju. U daljnjem koraku agarozni gel se otopi, dodaje se benzonaza koja razgradi DNA te zaostaju proteini koji su bili vezani za DNA. U svrhu kontrole, paralelni uzorci se obrađuju na sličan način, osim što se DNA digestija provodi na agaroznom gelu prije provedene elektroelucije kako bi se identificirali svi proteini pozadinskog onečišćenja (Weickert *i sur.*, 2023). PxP pruža visoku razinu pouzdanosti u razlikovanju DPC-eva od kontaminirajućih proteina, zahvaljujući kontrolnim uzorcima. Jedan od nedostataka ove metode je ograničenje u broju stanica koje se mogu ugraditi u agarozni gel. Dodatno, veliki proteinski kompleksi možda se neće elektroeluirati iz agaroznih gelova. Nadalje, iako PxP metoda nudi prednost identifikacije proteina uključenih u DPC s visokom pouzdanošću, postupak može potencijalno dovesti do lažno negativnih rezultata (Torrecilla *i sur.*, 2023). Na primjer, u studiji Weickert, 2023. nisu uspješno detektirani određeni proteini koji su RADAR-om pouzdano identificirani kao formaldehidom inducirani DPC-evi (Weickert *i sur.*, 2023).

KCl/SDS percipitacija je metoda koja se, za razliku od prije predstavljenih, temelji na detekciji DNA kao mjeri količine nastalih DPC-eva. Princip metode temelji se na deterdžentu natrijevom dodecil sulfatu (SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*) koji se veže na proteine i remeti njihove nekovalentne veze koje stvaraju s DNA. Međutim svi proteini koji su kovalentnim vezama vezani za DNA, ostaju na njoj vezani jer SDS ne može poremetiti kovalentne veze (Zhitkovich i Costa, 1992). Zatim se dodatkom KCl-a precipitiraju kompleksi K+ i SDS-proteina. Centrifugiranjem u talogu zaostaju slobodni proteini i DPC-evi. Nakon detaljnog ispiranja taloga i ponovnog resuspendiranja dodaje se proteinaza koja razgradi sve proteine, i one slobodne i

one u DPC kompleksu. U otopini ostaje slobodna DNA na kojoj su prije toga bili vezani DPC-evi i zaostali SDS koji je potrebno ukloniti dodatkom goveđeg serumskog albumina te zatim centrifugiranjem. U supernatantu, nakon centrifugiranja, ostaje otopljena DNA koja se može kvantificirati pomoću raznih eseja poput *Hoechst 33258, Quant-iT™ Picogreen™* ili *Qubit™ dsDNA HS* esej (Torrecilla *i sur.*, 2023). Količina DPC-eva se određuje pomoću uvedene veličine „DPC koeficijenta" koji se računa kao omjer između količine DNA izmjerene na kraju cijelog procesa (DPC-DNA) i ukupne količine DNA u uzorku (zbroj slobodne DNA izmjerene nakon KCl precipitacije i centrifugiranja u supernatantu te DPC-DNA koja je izmjerena na kraju postupka). Prednosti KCl/SDS metode su njena niska cijena te uporaba standardnih laboratorijskih reagensa i klasičnih laboratorijskih uređaja. Najveći nedostatak ove metode je što nije moguća vizualizacija i identifikacija proteina jer se detekcija zasniva na DNA. Uz navedeno, mogući problem mogu stvarati jače nekovalentne veze koje se neuspješno kidaju primjenom SDS-a što uzrokuje smanjenje specifičnosti prema DPC-evima (Torrecilla *i sur.*, 2023).

1.4.2. Metode detekcije DPC-eva

Nakon izolacije ukupnih DPC-eva u stanicama potrebno je provesti određene detekcijske metode u svrhu identifikacije i kvantitativne procjene prisutnosti DPC-eva u danom uzorku. Za detekciju se najčešće koriste metode poput Western blot-a ili ELISA-e, ali također, moguće je nespecifično obilježavanje proteina pomoću radio ili fluorescentnih obilježivača ili analiza proteina masenom spektrometrijom (Torrecilla *i sur.*, 2023).

Western blot i ELISA omogućuju specifičnu detekciju proteina koji tvore DPC u stanicama korištenjem specifičnih primarnih protutijela te zatim primjenom sekundarnih obilježenih protutijela. Western blot detekcija vrši se na nitroceluloznoj ili poliviniliden difluoridnoj membrani te se sama detekcija uz protutijela, može vršiti i neselektivnim bojenjem srebrom. Za razliku od Western blot metode, ELISA detekcija se vrši u mikrotitarskoj pločici koja se obloži izoliranim proteinima koji tvore DPC-eve pa potom detektira pomoću protutijela (Torrecilla *i sur.*, 2023).

Obilježavanje proteina pomoću radioaktivnih ili fluorescentnih obilježivača može se provesti na dva način: preobilježavanje – izvodi se u staničnoj kulturi, ili postobilježavanje – koje se provodi nakon izolacije DPC-eva. Najčešći način preobilježavanja je pomoću radioaktivno obilježene aminokiseline ^{35}S-cisteina koja se ugradi u novosintetizirane proteine pa tako svi novosintetizirani proteini u stanici postanu radioaktivno obilježeni. Postobilježavanje može se postići pomoću radioaktivnog joda ^{125}I ili fluorescein izotiocijanata (FITC, engl. *fluorescein isothiocyanate*). Radioaktivni jod se ugrađuje u tirozinske ostatke u proteinima pa ih na taj način obilježava, no radioaktivno obilježavanje se izbjegava zbog štetnosti radioaktivnog zračenja.

FITC se veže na amino skupine proteina te ih na ta način fluorescentno obilježava te se ukupna fluorescencija mjeri na 520 nm (Torrecilla *i sur.*, 2023).

Spektrometar masa omogućuje detekciju cijelog repertoara proteina vezanih za DNA te također nudi mogućnost kvalitativne kvantifikacije uz pomoć dodanih izotopno obilježenih aminokiselina. Naknadna analiza podataka sa spektrometra masa omogućuje kvantifikaciju aminokiselina izvedenih iz DPC-a pomoću omjera lakih i teških izotopa (Torrecilla *i sur.*, 2023).

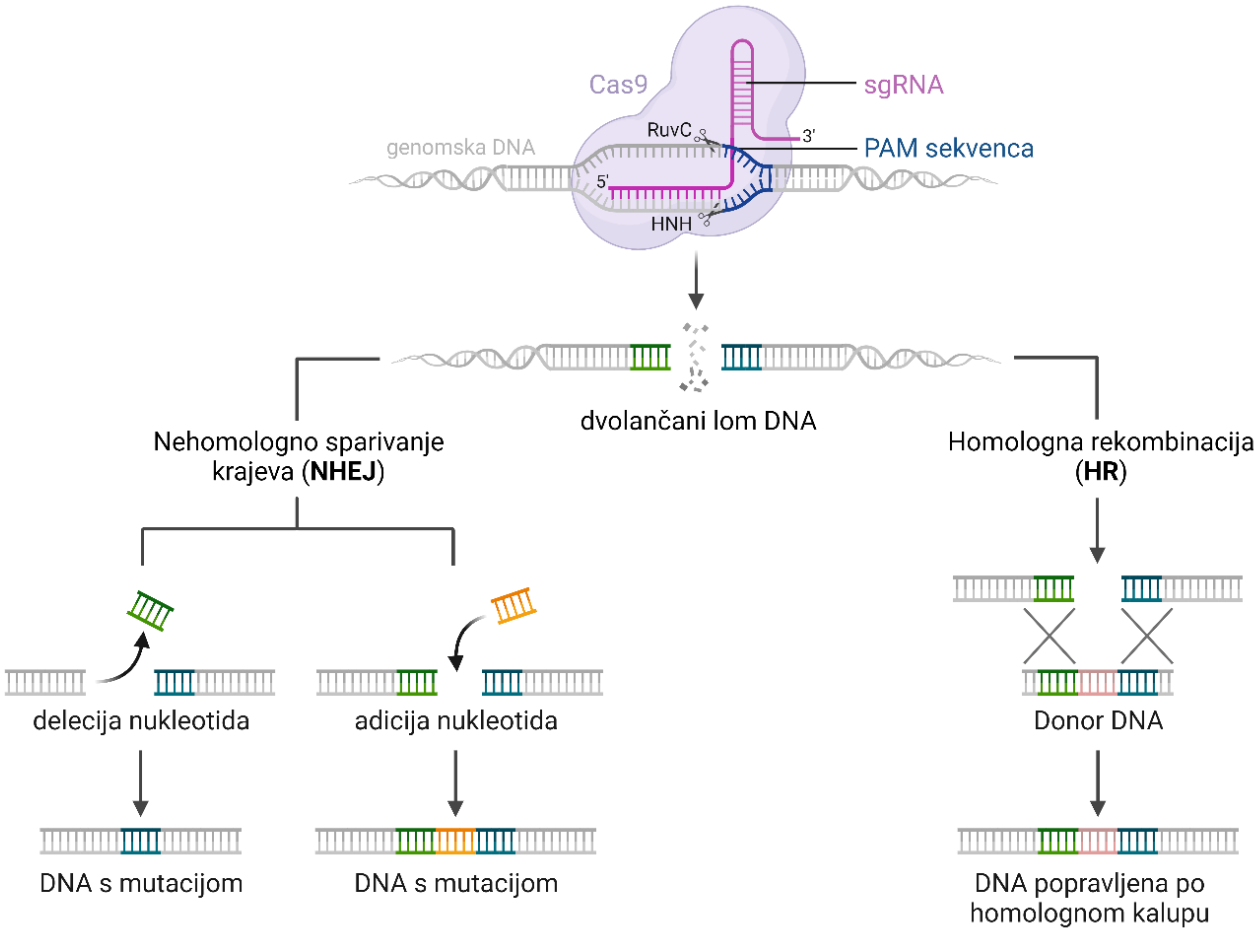
1.5. CRISPR/Cas9 tehnologija

CRISPR ponavljanja otkrivena su u *Escherichii coli* 1987. godine, a 2002. godine službeno su nazvana klasterirana pravilno razmaknuta kratka palindromska ponavljanja (CRISPR, engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) (Jansen *i sur.*, 2002). Međutim, njegova funkcija cijepanja DNA i uloga u imunološkom odgovoru bakterija otkrivena je tek 2010. godine. Zatim su 2012. Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier razjasnile biokemijsku prirodu CRISPR sustava, što im je donijelo i Nobelovu nagradu za kemiju 2020. godine (Jinek *i sur.*, 2012). Naknadno je nekoliko timova modificiralo CRISPR/Cas9 sustav i primijenilo ga u svrhu uređivanja genoma eukariotskih stanica (Gilbert *i sur.*, 2013; Shalem *i sur.*, 2014). U usporedbi s od prije dostupnim sustavima uređivanja genoma, nukleazama cinkov prst (ZFN, engl. *zinc finger nuclease*) i nukleazama efektori slični aktivatorima transkripcije (TALEN, engl. *transcription activator-like effector nuclease*), sustav CRISPR je češće korišten zbog svoje visoke specifičnosti, visoke učinkovitosti, jednostavnog reprogramiranja te lake dostupnosti (Cai *i sur.*, 2023).

CRISPR sustav u prokariotima pruža poseban oblik imunološkog odgovora bakterija na bakteriofage i plazmidne transfere. CRISPR regija u bakterijskom genomu predstavlja mjesto pohrane sekvenci raznih bakteriofaga koji su prethodno inficirali bakterijsku stanicu. Tijekom ponovne infekcije istim bakteriofagom, navedena CRISPR regija se prepisuje u RNA molekulu koja služi kao vodilja (gRNA, engl. *guide RNA*) endonukleaze Cas9 (Cas9, engl. *CRISPR associated protein 9*) koja ju navodi do genetskog materijala bakteriofaga što posljedično uzrokuje cijepanje ciljne nukleinske kiseline Cas9 enzimom. Kada je CRISPR sustav u prokariotima otkriven, shvaćeno je kako bi se on mogao iskoristiti za cijepanje DNA molekule na točno određenoj sekvenci do kojeg bi Cas9 protein dovela sintetizirana RNA vodilja. Navedena karakteristika iskorištena je za razvijanje preciznog alata za uvođene dvolančanih lomova DNA na točno određenom mjestu u DNA molekuli, CRISPR/Cas9 tehnologije (Jinek *i sur.*, 2012).

CRISPR/Cas9 sustav u bakterijama sastoji se od tri osnovne komponente: endonukleaze Cas9 i dvije molekule RNA, crRNA (engl. *CRISPR RNA*) i tracrRNA (engl. *trans-activating CRISPR RNA*). Molekula crRNA služi za ciljanje specifičnog DNA slijeda, a tracrRNA povezuje crRNA s Cas9 proteinom i stabilizira navedeni kompleks (Jiang i Doudna, 2017). Cas9 je enzim s endonukleaznom aktivnošću koji sadrži nekoliko različitih domena s različitim funkcijama. Cas9 ima dva važna režnja: režanj za prepoznavanje (REC režanj, engl. *recognition lobe*) i nukleazni režanj (NUC režanj, engl. *nuclease lobe*). NUC režanj sadrži dvije endonukleazne domene: domenu nukleaze nalik RuvC i domenu nukleaze nalik HNH. Domena nukleaze nalik

HNH zadužena je za cijepanje komplementarnog lanca DNA, a domena nukleaze nalik RuvC cijepa nekomplementarni lanac (Jinek *i sur.*, 2012). Zbog jednostavnosti, kod uporabe Cas9 sustava za uređivanje genoma, umjesto dvije crRNA i tracrRNA, sintetizirana je jedinstvena RNA vodilja (sgRNA, engl. *single guide RNA*). sgRNA sadrži sekvencu od 20 nukleotida koja je komplementarna ciljnoj sekvenci DNA (odgovara crRNA) i sekvencu potrebnu za vezanje s proteinom Cas9 (odgovara tracrRNA) (Jiang i Doudna, 2017). Za uspješno vezanje Cas9 enzima za ciljanu sekvencu nije potrebna isključivo sgRNA, već i PAM (engl. *protospacer adjacent motif*) sekvenca koja je prisutna na ciljnoj DNA molekuli. PAM sekvenca različita je kod različitih homologa Cas9 proteina izoliranih iz različitih vrsta bakterija (Jiang i Doudna, 2017). Cas9 protein koji je izoliran iz *Streptococcus pyogenes* sadrži PAM sekvencu koja glasi 5'-NGG-3' (N-nukleotid, G-gvanin). PAM sekvenca treba se nalaziti neposredno nakon 3' kraja komplementarne DNA koju prepoznaje sgRNA. Cas9 protein uglavnom uvodi dvolančani lom 3bp uzvodno od PAM sekvence (Nidhi *i sur.*, 2021). Nakon nastanka dvolančanog loma, stanica navedeni lom može popraviti NHEJ ili HR putem popravka. Ako se lom popravlja NHEJ putem, nerijetko dolazi do pojave malih delecija ili insercija što može dovesti do inaktivacije ciljnog gena (engl. *gene knock-out*). Ukoliko se u stanici nalazi DNA koja je homologna sekvenci gdje je dvolančani lom nastao te se stanica nalazi u određenoj fazi ciklusa, onda se navedeni lom može popraviti i homolognom rekombinacijom. Homologna rekombinacija može poslužiti za precizno uvođenje dijela DNA na mjesto dvolančanog loma (engl. *gene knock-in*) (Slika 4) (Yang *i sur.*, 2020).

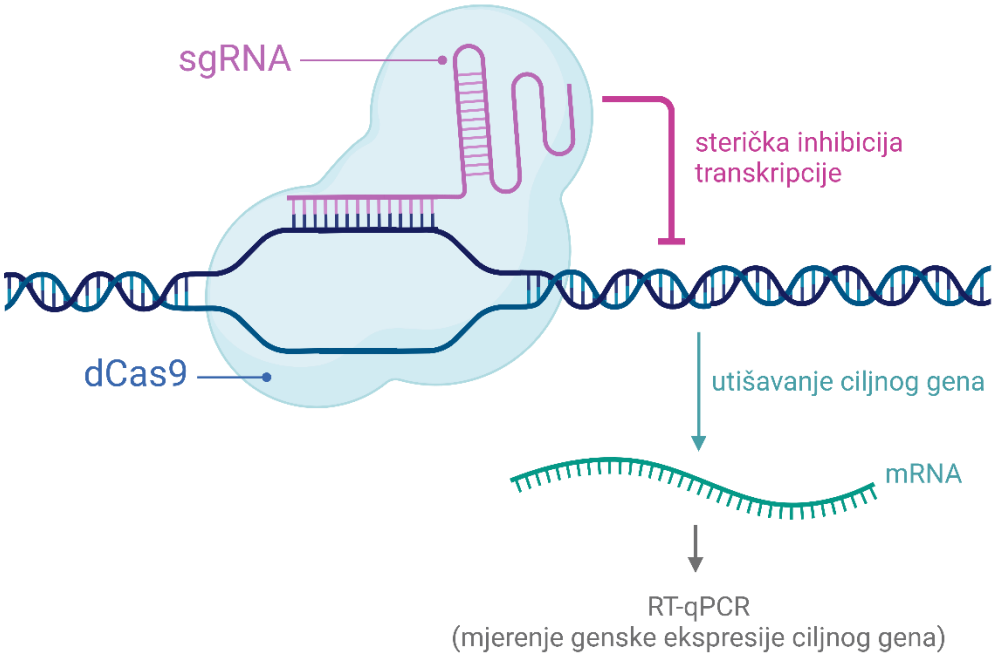


Slika 4: Shematski prikaz mehanizma djelovanja CRISPR/Cas9 tehnologije. Shema prikazuje kompleks Cas9-sgRNA, mehanizam uvođenja dvolančanog loma u ciljnu DNA molekulu te ishode popravka nastalog dvolančanog loma. (Izrađeno pomoću BioRender.com).

Mutacijom endonukleaznih domena RuvC i HNH Cas9 proteina, on gubi sposobnost uvođenja dvolančanog loma, ali zadržava sposobnost vezanja za specifičnu DNA sekvencu pomoću sgRNA. Ovakvom modifikacijom, Cas9 protein postaje katalitički inaktivan te se za takav protein koristi termin engl. *dead Cas9*, skraćeno dCas9. dCas9 koristi se u svrhu regulacije transkripcije jer svojom steričkom smetnjom inhibira pristup RNA-polimerazi ciljanom genu za koji je dCas9 vezan pomoću specifične sgRNA (Bikard *i sur.*, 2013; Qi *i sur.*, 2013; Brocken, Tark-Dame i Dame, 2018). Također, za dCas9 mogu se kovalentno vezati specifični enzimi koji služe za modulaciju kondenziranosti kromatina te na taj način pojačavaju ili utišavaju ekspresiju ciljanih gena (Gilbert *i sur.*, 2014).

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Glavni cilj ovog rada bio je utvrditi može li dCas9 poslužiti kao model za istraživanje i kvantifikaciju stvaranja i popravka DNA-protein adukata. U prethodnom poglavlju „*1.5. CRISPR/Cas9 tehnologija*“ objašnjeno je kako se dCas9 protein pomoću specifične sgRNA veže na željeno mjesto na genomskoj DNA (gDNA, engl. *genomic DNA*). Također, ranije je pokazano da dCas9 protein djeluje kao sterička blokada za transkripciju, te uzrokuje smanjenje ekspresije ciljnog gena ako se veže na gDNA u blizini ciljnog gena (Bikard *i sur.*, 2013; Qi *i sur.*, 2013). Naša pretpostavka je bila da dCas9 koji se veže na gDNA stvara ireverzibilnu vezu s DNA, odnosno DNA-protein adukt koji sprječava transkripciju ciljnog gena. Ako je dCas9 na ciljnom mjestu stvorio DPC, njegova prisutnost na tom mjestu u DNA može se dokazati mjereći mRNA (engl. *messenger ribonucleic acid*) ekspresiju ciljnog gena pomoću reverzne transkripcije spregnute s kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (RT-qPCR, engl. *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*). Ako je prisutna smanjena ekspresija ciljnog gena, može se pretpostaviti da je dCas9 vezan na DNA unutar regije ciljnog gena, čime ometa njegovu transkripciju u mRNA (Slika 5). Dokle god se bilježi utišavanje ciljnog gena (smanjena mRNA ekspresija ciljnog gena), može se zaključiti da je dCas9 vezan u ciljnom području. Kako bi se dokazalo da dCas9 tvori DPC na mjestu vezanja, potrebno je izolirati ukupne DPC-eve u stanicama tretiranim dCas9-sgRNA kompleksom pomoću RADAR protokola te nakon toga izvršiti detekciju dCas9 proteina pomoću Western blot analize i protutijela specifičnog za Cas9 protein. Ako je naša pretpostavka da dCas9 može stvoriti DPC u ljudskim stanicama *in vitro* točna, praćenjem ekspresije ciljnog gena potencijalno se može pratiti kinetika popravka dCas9-DNA adukta. Razvoj ovog sustava mogao bi uvelike doprinijeti istraživanjima u polju DNA oštećenja i popravka te pružiti dodatne informacije o kinetici uklanjanja DNA-protein adukata i ponovnog uspostavljanja intaktne DNA molekule s normalnom staničnom mRNA ekspresijom.



Slika 5: Shematski prikaz pretpostavljenog mehanizma utišavanja ciljnog gena zbog steričke smetnje dCas9 proteina te detekcija mRNA ekspresije RT-qPCR metodom. (Izrađeno pomoću BioRender.com).

Specifični ciljevi rada su:

1) Odabrati ciljne gene te sintetizirati prikladne sgRNA.

2) Transfecirati *in vitro* ljudske stanice s kompleksom dCas9-sgRNA.

3) Mjeriti ekspresiju ciljnog gena u transfeciranim stanicama.

4) Izolirati ukupne DPC-eve iz transfeciranih stanica pomoću RADAR metode.

5) Detektirati dCas9 u izoliranim DPC-evima pomoću Western blot analize.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Ljudske stanice

Humane embrionalne bubrežne stanice (HEK293T, engl. *human embryonic kidney cells*) (ATCC, CRL-1573) korištene su kao stanični model za razvoj i optimizaciju metode mjerenja DPC nastanka i popravka pomoću CRISPR/dCas9 sustava zbog njihovog kratkog vremena amplifikacije (< 24 h) i visoke učinkovitosti transfekcije (Tom, Bisson i Durocher, 2008).

3.1.2. Standardne kemikalije

Korištene standardne kemikalije navedene su u Tablici 1.

Tablica 1: Popis korištenih standardnih kemikalija s podacima o proizvođaču i zemlji podrijetla te svojstvenim kataloškim brojevima.

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ I ZEMLJA PODRIJETLA	KATALOŠKI BROJ
Agaroza	Sigma-Aldrich, Njemačka	A9535
Akrilamid/bis-alkrilamid	Sigma-Aldrich, Njemačka	A8887
Amonijev persulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Njemačka	A3678
β-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, Njemačka	63689
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories, SAD	1705061
DharmaFECT reagens za transfekciju	Horizon Discovery, UK	T-2001-02
DMEM stanični medij	Capricorn Scientific, Njemačka	DMEM-HPA
DNA ljestve - GeneRuler DNA ladder mix	Thermo Fisher Scientific, SAD	SM1551
Etanol	Kemika, Hrvatska	505655
Fetalni goveđi serum (FBS)	Capricorn Scientific, Njemačka	FBS-GI-12A
GelStarTM Nucleic Acid Gel Stain	Lonza, Švicarska	50535
Goveđi serumski albumin (BSA)	Carl Roth, Njemačka	8076.4
Mlijeko u prahu	Carl Roth, Njemačka	t145.1
Natrijev dodecil-sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Njemačka	2326.2
Opti-MEM medij	Gibco, SAD	31985070

Proteinske ljestve - Precision plus protein ladder	Bio-Rad Laboratories, SAD	1610374
RNase AWAY™ sprej za površine	Thermo Fisher Scientific, SAD	7002PK
TEMED	Sigma-Aldrich, Njemačka	D8900
Tripsin-EDTA	Sigma-Aldrich, Njemačka	T4049
Tris-HCl	Thermo Fisher Scientific, SAD	1930809
Tween 20	Ultrapure Alfa Aesar, SAD	J20605.AP
Ultračista destilirana voda (bez DNAza, RNAza)	Invitrogen, SAD	10977035

3.1.3. Puferi

Puferi koji su korišteni u eksperimentima ovog rada navedeni su u Tablici 2.

Tablica 2: Popis korištenih pufera s njihovim sastavom.

NAZIV	SASTAV
Pufer SDS-PAGE	Tris /glicin pufer: *c* (Tris) = 25 mM, *c* (Glicin) = 129 mM
Pufer TAE	*c* (Tris) = 40 mM, *c* (EDTA) = 1 mM, pH = 8.0
RADAR ekstrakcijski pufer	6 M gvanidinijev izotiocijanat, 10 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20 mM EDTA, 4 % Triton X-100, 1 % N-lauroilsarkozin natrij, 5 % β-merkaptoetanol
RADAR pufer za ispiranje	20 mM Tris HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 % etanol
SDS pufer za nanošenje	4 M urea, 62,5 mM Tris-HCl (pH=6,8), 1 mM EDTA, 2 % SDS
TBS pufer	20 mM Tris, 150 mM NaCl
TBST pufer	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween

3.1.4. Enzimi

Korišteni enzimi navedeni su u Tablici 3.

Tablica 3: Popis korištenih enzima s podacima o proizvođaču i zemlji podrijetla te svojstvenim kataloškim brojevima.

ENZIM	PROIZVOĐAČ I ZEMLJA PODRIJETLA	KATALOŠKI BROJ
Benzonaza	Sigma-Aldrich, Njemačka	71205-3
dCas9	New England Biolabs, SAD	M0652S
DNAza	Merck Millipore, SAD	71205-3
Phusion DNA polimeraza	New England Biolabs, SAD	M0530L
Power SYBR Green PCR Master mix	Applied Biosystems, SAD	4367659
Proteinaza K	Thermo Fisher Scientific, SAD	Bp1700-100 FSH
Reverzna transkriptaza	New England Biolabs, SAD	4374966

3.1.5. Oligonukleotidi

Svi korišteni oligonukleotidi sa svojim sekvencama prikazani su u Tablici 4. Svi oligonukleotidi naručeni su od Macrogen EU.

Tablica 4: Popis korištenih oligonukleotida sa svojstvenim sekvencama i svrhom korištenja svakog oligonukleotida.

NAZIV	SEKVENCA	SVRHA
IVT-FWD	GGATCCTAATACGACTCACTATAG	Sinteza sgRNA
IVT-REV	AAAAAAGCACCGACTCGG	Sinteza sgRNA
IVT-scaffold	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCC ACTTTTTCAAGTTGATAACGGA CTAGCCTTATTTTAACTTGC TATTTCTAGCTCTAAAAC	Sinteza sgRNA
HsABCG2_guide1	TAATACGACTCACTATAGGAG CGCTCCCCTCGCGCGGGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA1 (*ABCG2*)
HsABCG2_guide2	TAATACGACTCACTATAGGGGT CCACAGCCCGAAGCGGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA2 (*ABCG2*)

HsABCG2_guide3	TAATACGACTCACTATAGGGC AGCGCTTTAACAATTAGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA3 (*ABCG2*)
HsMATE1_guide1	TAATACGACTCACTATAGGGC GACCCACGGACCTCAAGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA1 (*MATE1*)
HsMATE1_guide2	TAATACGACTCACTATAGGGC CACCTTACTCACCGCGGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA2 (*MATE1*)
HsMATE1_guide3	TAATACGACTCACTATAGGC GGCAGTGAGTACCGCGCGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA3 (*MATE1*)
HsSPRTN_guide1	TAATACGACTCACTATAGGC GCTAGTGGACGCGTCGTGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA1 (*SPRTN*)
HsSPRTN_guide2	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGT CCTCGGCTAGGCGGCTTGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA2 (*SPRTN*)
HsSPRTN_guide3	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC GGAGCGCGATCATGCCCGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA3 (*SPRTN*)
HsACRC_guide1	TAATACGACTCACTATAGGA ACATATGGTGGCGCCAGGTTTTAGAGCTAGA	Sinteza sgRNA1 (*ACRC*)
HsTDP2_guide1	TAATACGACTCACTATAGGGC CTCCTGTTCCGCTTAAGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA1 (*TDP2*)
HsTDP2_guide2	TAATACGACTCACTATAGGT TTCGCTGTCCTCGCTTCGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA2 (*TDP2*)
HsTDP1_guide1	TAATACGACTCACTATAGGTCCA ACTCTGCGGAGAATGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA1 (*TDP1*)
HsATP5PO_guide1	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTGTA GGTCAAACCCGAGTGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA1 (*ATP5PO*)

HsATP5PO_guide2	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTCAG GTATACGGTATTGAGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA2 (*ATP5PO*)
HsATP5PO_guide3	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTTTG ACCTACAGCCGCCCGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA3 (*ATP5PO*)
HsRANBP2_guide1	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGACGC AGCGCCGTAGCCGGGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA1 (*RANBP2*)
HsRANBP2_guide2	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTGTG CATCTGTTGCGGATGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA2 (*RANBP2*)
HsRANBP2_guide3	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGCT GGTCTCACGCGCCTCGTTTTAGAGCTAGAA	Sinteza sgRNA3 (*RANBP2*)
HsABCG2_F_qPCR	CCCCAGGCCTCTATAGCTCA	qPCR analiza ekspresije *ABCG2*
HsABCG2_R_qPCR	AGAACCCCAGCTCTGTTCTG	qPCR analiza ekspresije *ABCG2*
HsATP5PO_F_qPCR	ATTGAAGGTCGCTATGCCACAG	qPCR analiza ekspresije *ATP5PO*
HsATP5PO_R_qPCR	AACAGAAGCAGCCACTTTGGG	qPCR analiza ekspresije *ATP5PO*
HsRANBP2_F_qPCR	TGTAGTGATACTGATGAAGACAATGG	qPCR analiza ekspresije *RANBP2*
HsRANBP2_R_qPCR	TTGTGCTAGTTATTTCTTCTGTCTGAG	qPCR analiza

		ekspresije *RANBP2*
HsRPLP0_F_qPCR	TGCTCAACATCTCCCCCTTCTC	qPCR analiza ekspresije *RPLP0*
HsRPLP0_R_qPCR	ACTGGCAACATTGCGGACAC	qPCR analiza ekspresije *RPLP0*
HsTDP1_F_qPCR	GGGACGCTTGTTTCTTCAGC	qPCR analiza ekspresije *TDP1*
HsTDP1_R_qPCR	TCACCATGCACAAGCAGGAT	qPCR analiza ekspresije *TDP1*
HsTDP2_F_qPCR	CCAGTATACATGGGATACACAAATG	qPCR analiza ekspresije *TDP2*
HsTDP2_R_qPCR	TCTGCTGCTGCTCTGAAAAATA	qPCR analiza ekspresije *TDP2*
HsSPARTN_F_qPCR	GAGGTGGATGAGTATCGGCG	qPCR analiza ekspresije *SPRTN*
HsSPARTN_R_qPCR	GGGTTCCCTGTTAGTAGCTCG	qPCR analiza ekspresije *SPRTN*
HsACRC_F_qPCR	TGATGATGCTGGTGAGCAGG	qPCR analiza

		ekspresije *ACRC*
HsACRC_R_qPCR	TCCTCAGTTGGCAGCTTTCT	qPCR analiza ekspresije *ACRC*
HsMATE1_F_qPCR	CTTGGGGTGATAGGCTCTGC	qPCR analiza ekspresije *MATE1*
HsMATE1_R_qPCR	CCCCATGTAGCTTGATGCAGT	qPCR analiza ekspresije *MATE1*

3.1.6. Komercijalni kompleti

Korišteni komercijalni kompleti navedeni su u Tablici 5.

Tablica 5: Popis korištenih komercijalnih kompleta s podacima o proizvođaču i zemlji podrijetla te svojstvenim kataloškim brojevima.

KOMERCIJALNI KOMPLET	PROIZVOĐAČ I ZEMLJA PODRIJETLA	KATALOŠKI BROJ
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, SAD	4368814
MEGAshortscript™ T7 Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, SAD	AM1354
Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit	New England Biolabs, SAD	T3010S
Monarch® RNA Cleanup Kit	New England Biolabs, SAD	T2040L
Pico Green	Invitrogen,SAD	P7581
Power SYBR Green PCR Master mix	Applied Biosystems, SAD	4367659

3.1.7. Antitijela

Antitijela korištena u svrhu detekcije navedena su u Tablici 6.

Tablica 6: Popis korištenih antitijela s navedenim izvorom i vrstom protutijela te proizvođačem, zemljom podrijetla i pripadajućem kataloškim brojevima.

ANTITIJELO	IZVOR – VRSTA	PROIZVOĐAČ	KATALOŠKI BOJ
Anti-Mouse IgG konjugirano peroksidazom iz hrena	Goat – poliklonsko	Sigma-Aldrich, Njemačka	A2554
Anti-Rabbit IgG konjugirano peroksidazom iz hrena	Goat – poliklonsko	Sigma-Aldrich, Njemačka	A0545
Cas9	Mouse – monoklonsko	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-517386
DNA	Mouse – monoklonsko	Abcam, UK	Ab27156
Rabbit Histon H3 poliklonsko primarno antitijelo	Rabbit – poliklonsko	Cell Signalling Technology, SAD	CST-9715S

3.1.8. Uređaji i oprema

Uređaji i oprema koja je korištena u eksperimentima navedena je u Tablici 7.

Tablica 7: Popis korištenih uređaja i opreme s podacima o proizvođaču i zemlji podrijetla te njihovom svrhom korištenja.

UREĐAJ	PROIZVOĐAČ I ZEMLJA PODRIJETLA	SVRHA KORIŠTENJA
Bio-dot mikrofiltracijski uređaj	Bio-Rad Laboratories, SAD	Dot-blot analiza
Biometra Compact XS/S	Analytik Jena, Njemačka	Razdvajanje nukleinskinh kiselina (agarozni gel)
BioSpec-nano	Shimadzu, Japan	Mjerenje koncentracija nukleinskih kiselina
Centrifuge Mikro 120	Hettich, Njemačka	Priprema uzorka
Centrifuge Universal 32R	Hettich, Njemačka	Priprema uzorka
ChemiDoc™ XRS+ Gel Imaging System	Bio-Rad Laboratories, SAD	Dot-blot analiza, detekcija gelova

Eppendorf thermomixer 5436	Eppendorf, Njemačka	Termoblok za sušenje DPC taloga
Infinite 200	Tecan, Švicarska	Multimodalni čitač mikropločica
Liofilizator FreeZone 2.5	Labconco, SAD	Liofilizacija
Mikroskop Wilovert Standard PH 40	ProfiLab24 GmbH, Njemačka	Mikroskop za promatranje stanične kulture
Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, SAD	SDS-PAGE elektroforeza
Mini Trans-Blot sustava	Bio-Rad Laboratories, SAD	Transfer za Western blot
PCR, T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, SAD	PCR reakcije, inkubacije
Real-Time PCR System	Applied Biosystems, SAD	qPCR analiza
UV-Transilluminator (312 nm) (Bachofer)	Lab Logistics Group GmbH, Njemačka	Vizualizacija agaroznih gelova, povezivanje DNA na najlon membranu

3.1.9. Računalni programi

Računalni programi koji su korišteni navedeni su u Tablici 8.

Tablica 8: Popis korištenih računalnih programa s podacima o proizvođaču i korištenoj verziji programa.

RAČUNALNI PROGRAM	PODRIJETLO	VERZIJA
BioEdit	Softver (A. Hall, 1999)	v. 7.2.5
CRISPRscan	The Giraldez Lab (Yale University) Mrežna stranica (https://www.crisprscan.org/)	Pristupljeno: 6.4.2023.
Ensembl	Mrežna stranica (https://www.ensembl.org/index.html)	Pristupljeno: 4.4.2023.
GraphPad Prism 8	Dotmatics	v. 10.0.2
ImageJ	Softver (Abràmoff, Magalhães i Ram, 2005)	v. 1.54f
Image Lab	BioRad	v. 6.1
Microsoft Excel	dio programskog paketa Microsoft 365 MSO	v. 2402
Primer BLAST	National Center for Biotechnology Information	Pristupljeno: 24.4.2023.

	Mrežna stranica (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)	
Primer Select	DNASTAR, Lasergene	v 7.0.0.
The Human Protein Atlas	Mrežna stranica (https://www.proteinatlas.org/)	Pristupljeno: 4.4.2023.

3.2. Metode

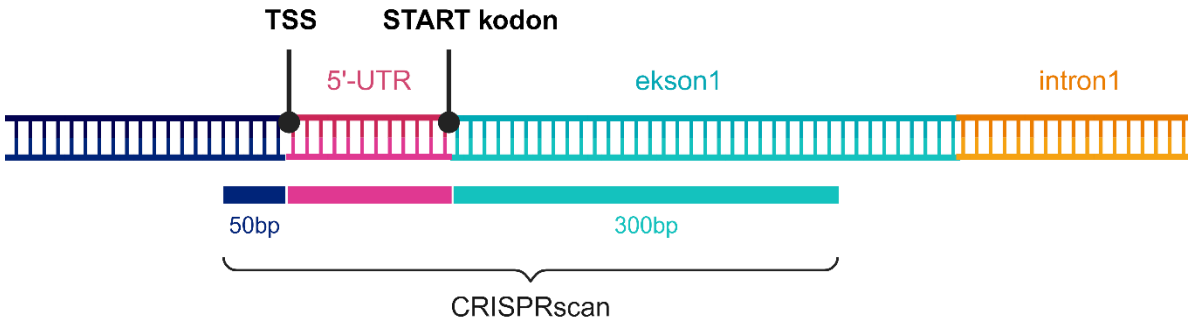
3.2.1. Stanična kultura

U eksperimentima je korištena stanična linija humanih embrionalnih bubrežnih stanica (HEK293T). Stanice su uzgajane *in vitro* u mediju Dulbeccov modificirani Eagle Medium (DMEM) (Capricorn Scientific, Njemačka), koji je dopunjen s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS, engl. *fetal bovine serum*) (Capricorn Scientific, Njemačka). Stanice su održavane na 37°C u inkubatoru i atmosferi koja sadrži 5 % CO_2. Stanice su pasažirane dva puta tjedno; na način da su se stanice prvo odvojile od adherentne površine pomoću otopine tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, Njemačka) koja je prethodno zagrijana na 37°C. Nakon kratke inkubacije u tripsin-EDTA otopini, reakcija je zaustavljena dodavanjem deset puta većeg volumena DMEM-FBS medija. Dio dobivene stanične suspenzije vraćen je u prethodno korišteni stanični flask, a ostatak suspenzije korišten je u eksperimentalne svrhe.

3.2.2. *In silico* sgRNA dizajn i *in vitro* sgRNA sinteza

Kako bismo dCas9 usmjerili na točno određeni dio ciljnog gena, bilo je potrebno sintetizirati sgRNA koja je komplementarna ciljnoj sekvenci. Nukleotidne sekvence odabranih ciljnih gena preuzete su s mrežne stranice *Ensembl*, a sekvence su obrađene pomoću računalnog programskog paketa *BioEdit* (v. 7.2.5). U svrhu pretraživanja PAM sekvenci na početnom dijelu nukleotidnih sekvenci odabranih ciljnih gena koristio se online računalni alat *CRISPRscan*. U *CRSIPRscan* je za svaki gen od interesa unesena sekvenca u rasponu -50bp od mjesta početka transkripcije (TSS, engl. *transcription starting site*) i +300bp od START kodona. Na taj način obuhvaćena je dijelom sekvenca prije 5'-netranslatirane regije (5'-UTR, engl. *the 5'-untranslated region*), cijela 5'-UTR regija i dijelom egzon 1 (sekvenca nakon 5'-UTR regije) (Slika 6) (Gilbert *i sur.*, 2014). Za svaki odabrani ciljni gen, izabrali smo 3 odgovarajuće sgRNA s najvišim *score*-om, koji govori o selektivnosti sgRNA za ciljno mjesto i što nižom

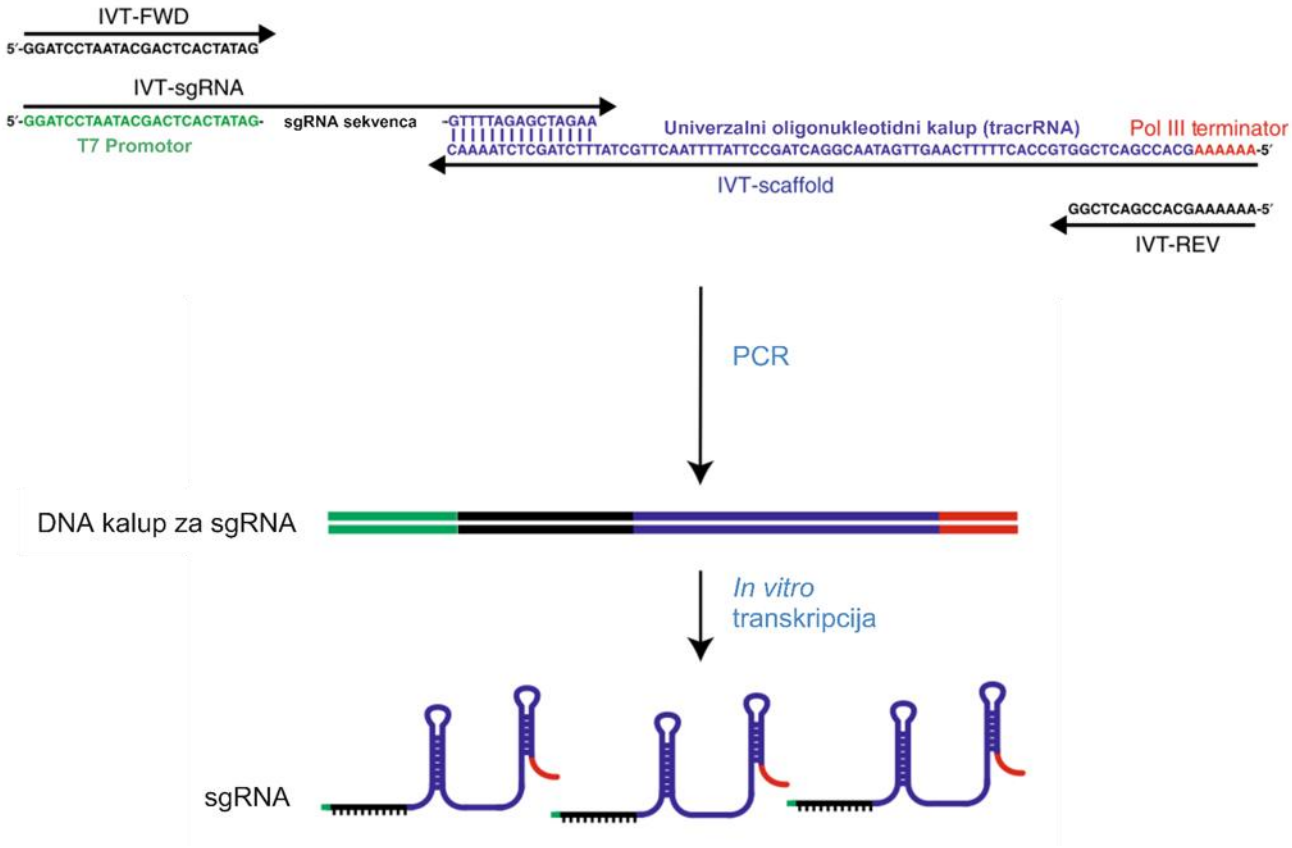
vrijednosti CFD-a (engl. *cutting frequency determination*) koji se koristi za procjenu vjerojatnosti off-target efekta (Moreno-Mateos *i sur.*, 2015).



Slika 6: Shematski prikaz ciljnog gena i raspon sekvence korišten za *in silico* dizajn sgRNA pomoću *CRISPRscan* računalnog alata. Ciljna sekvenca sastoji se od 50bp uzvodno od mjesta početka transkripcije (TSS) (označeno plavom), cijele 5'-UTR regije (označeno ružičastom) i 300bp nizvodno od START kodona (označeno zelenom). (Izrađeno pomoću BioRender.com).

Za potrebe *in vitro* sinteze sgRNA korišten je Modzelewski i sur. Nature protokol (Modzelewski *i sur.*, 2018). Za sintezu DNA kalupa za sgRNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) potreban je univerzalan oligonukleotidni kalup (IVT-scaffold, engl. *in vitro transcription-scaffold*) koji služi za sintezu kalupa za tracrRNA, koja predstavlja univerzalni dio sgRNA. Također, potreban je i ciljni oligonukleotidni kalup (IVT-sgRNA, engl. *in vitro transcription-sgRNA*) sastavljen od, redom, T7-promotora, DNA sekvence komplementarne ciljnoj sgRNA, sekvence koja je komplementarna univerzalnom oligonukleotidnom kalupu (Slika 7). Univerzalni oligonukleotidni kalup naručen je od Macrogen-a i specifični ciljni oligonukleotidni kalup, također je naručen i sintetiziran od Macrogen-a. U PCR smjesu još su dodani univerzalna uzvodna (IVT-FWD, engl. *in vitro transcription-forward*) i nizvodna (IVT-REV, engl. *in vitro transcription-reverse*) početnica te se lančanom reakcijom polimeraze sintetizirao DNA kalup, čija čistoća se provjerila elektroforezom na 1,5 % agaroznom gelu. Detekcija agaroznog gela provedena je pomoću ChemiDoc™ XRS+ Gel Imaging uređaja. Kasnije je DNA kalup pročišćen komercijalnim kompletom Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (New England Biolabs, T3010S) te je podvrgnut *in vitro* transkripciji pomoću komercijalnog kompleta MEGAshortscript™ T7 Transcription Kit (Invitrogen™, AM1354) kako bismo dobili konačni produkt – sgRNA. *In vitro* transkripcija provedena je prema uputama proizvođača, a transkribirana sgRNA pročišćena je pomoću komercijalnog kompleta Monarch® RNA Cleanup Kit (New England Biosystem, T2040L). Koncentracija sgRNA mjerena je pomoću uređaja

BioSpec-nano (Shimadzu) te je zatim sgRNA alikvotirana i pohranjena na -80 °C do daljnjeg korištenja.



Slika 7: Shematski prikaz procesa sinteze sgRNA. Za potrebe *in vtiro* sgRNA sinteze korišten je set PCR početnica (prikazan crnom bojom: IVT-FWD i IVT-REV), univerzalni oligonukleotidni kalup (prikazan plavo/crveno: IVT-scaffold) i ciljni oligonukleotidni kalup koji nosi 5' T7 promotor uz ciljnu sekvencu specifičnu za odabrani gen (prikazano zeleno/crno/plavo: IVT-sgRNA). (Preuzeto i prilagođeno prema Modzelewski *i sur.*, 2018).

3.2.3. Transfekcija dCas9-sgRNA kompleksa u stanice

Stanice HEK293T su dan prije transfekcije nasađene u pločicu s 24 jažice kako bi na dan transfekcije dosegle okvirno 70 %-tnu konfluentnost, a konfluentnost nasađivanja se prilagođavala tijekom eksperimenata optimizacije transfekcije. Za transfekciju stanica dCas9-sgRNA kompleksom korišten je komercijalno dostupan reagens DharmaFECT tvrtke Dharmacon (SAD), a sam postupak provodio se po prilagođenom protokolu proizvođača. Ukratko, protokol se sastoji od zasebne pripreme otopina A koja sadrži protein dCas9 (New England Biolabs, SAD), pripadajuću sgRNA te opti-MEM medij (31985070, Gibco) te zasebne

pripreme otopine B koja se sastoji od DharmaFECT reagensa i opti-MEM medija. Transfekcijska smjesa (otopina A + otopina B) dodana je stanicama te su zatim stanice inkubirane na 37°C (5 % CO_2) 14 - 18 sati u transfekcijskoj smjesi. Nakon 14 - 18h, stanicama je promijenjen medij te su ostavljene da rastu u inkubatoru 3 - 6 dana, nakon čega su sakupljene za qPCR analizu kako bi se provjerila učinkovitost utišavanja gena kojom potvrđujemo prisutnost dCas9 na ciljnom genu. Za potrebe RADAR eksperimenta stanice su nasađene i transfecirane u malom flasku (T25) kako bi prinos DPC-eva bio što veći.

3.2.4. Izolacija RNA i reverzna transkripcija

U svrhu analize ekspresije ciljnih gena nakon transfekcije kompleksa dCas9-sgRNA izolirana je ukupna RNA iz staničnih lizata. Stanice su sakupljene, centrifugirane te je stanični talog otopljen u 400 μL pufera za liziranje koji je sastavni dio komercijalnog kompleta Monarch Total RNA Miniprep (New England Biolabs, T2040L). Postupak izolacije i pročišćavanja RNA proveden je prema uputama proizvođača. Kako bi se osigurala minimalna degradacija RNA, uzorci su nakon centrifugiranja čuvani na ledu, a sve površine i oprema temeljito su očišćene RNase AWAY-otopinom (Thermo Fisher Scientific, 7002PK) koja inhibira RNAze. RNAze su sveprisutni enzimi koji sudjeluju u razgradnji RNA molekula što predstavlja opasnost za degradaciju RNA uzoraka. Uzorci izolirane RNA raspoređeni su u manje alikvote i pohranjeni na -80°C, a jedan dio izolirane RNA podvrgnut je reverznoj transkripciji pomoću komercijalnog kompleta High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, 4368814). Reverzna transkripcija provedena je prema uputama proizvođača te je koncentracija dobivene cDNA (engl. *complementary DNA*) izmjerena pomoću uređaja BioSpec-nano (Shimadzu). Dobivena cDNA pohranjena je na -20°C do provedbe qPCR analize.

3.2.5. qPCR analiza

qPCR analiza provedena je korištenjem Power SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems, 4367659) te je protokol prilagođen dizajniranim parovima početnica. Početnice su za svaki ciljni gen dizajnirane pomoću računalnih programa: *Primer-BLAST* (National Center for Biotechnology Information, NCBI) i *Primer Select (DNASTAR, Lasergene,* v 7.0.0.*)*. Početnice su dizajnirane tako da se nalaze na granici dva egzona kako bi se eliminirale neželjene amplifikacije potencijalno zaostale genomske DNA. Za svaki par početnica testirana je efikasnost umnažanja njihovog ciljnog gena korištenjem 6 razrjeđenja DNA kalupa (10 ng/μL, 5 ng/μL, 2,5 ng/μL, 1 ng/μL, 0,1 ng/μL, 0,03 ng/μL). Svaki uzorak izrađivao se u triplikatu na mikrotitarskoj pločici s 96 jažica. Reakcijska smjesa sastojala se od: 5 μL glavnog qPCR mix-a (GoTaq® qPCR Master Mix (2X)), 0,5 μL F-početnice i 0,5 μL R-početnice (100 μM), 0,1 μL

boje koja veže DNA-CXR, 8,5 - 0,3 ng/µL uzorka cDNA te je ultračista voda dodana do 10 µL ukupnog volumena u svakoj jažici. Analizom rezultata dobiven je linearni pravac ovisnosti C_t o koncentraciji dodanog DNA kalupa. Efikasnost qPCR početnica je određena na temelju pravca linearne regresije prema formuli E(%)=$\left(10^{\frac{-1}{a}}-1\right)\times 100$ ili $E=10^{\frac{-1}{a}}-1$ u kojoj *a* označava nagib regresijskog pravca. Odabrane su početnice koje su imale efikasnost umnažanja veću ili jednaku 90 %.

Kao gen za endogenu kontrolu (HKG, engl. *housekeeping gene*) najčešće je korišten gen *RPLP0* (engl. *ribosomal protein lateral stalk subunit P0*) koji kodira za protein koji je dio 60S podjedinice ribosoma te pokazuje sličnu ekspresiju u svim analiziranim uzorcima. U prvim eksperimentima korišteni su i drugi HKG-ovi poput *ATP5PO* i *RANBP2,* no oni su napušteni zbog prevelike varijabilnosti u C_t vrijednostima između uzoraka. Uvedena je veličina „delta od medijana“ kako bi se uspoređivale prosječne C_t vrijednost HKG-ova u svrhu procjenjivanja potencijalnog raspada ukupne izolirane RNA što može utjecati na tumačenje rezultata qPCR analize. Za kvantifikaciju korištena je Q-gene metoda (Simon, 2003), a razine ekspresije gena izražene su kao srednja normalizirana ekspresija (MNE, engl. *Mean Normalized Expression*). Podaci su obrađeni u programu *Microsoft Excel* (Microsoft 365 MSO, v. 2402), a grafički prikazi i statistička analiza izrađena je pomoću *GraphPad Prism 8* softvera. Vrijednosti MNE izračunate su na temelju učinkovitosti primera (E, engl. *primer efficacy*) i srednjih C_t vrijednosti i za referentni HKG gen i za ciljni gen, koristeći sljedeću formulu: $\mathrm{MNE}=\mathrm{E(HKG)Ct(HKG)}/\mathrm{E(gene)Ct(gene)}\times 10^6$. Prag ciklusa ($C_t$, engl. *cycle threshold*) definiran je kao broj ciklusa potrebnih da fluorescentni signal premaši pozadinski fluorescentni signal. Niža vrijednost C_t označava veću ekspresiju ciljnog gena. Efikasnost utišavanja (Ef, engl. *silencing efficacy*) izražena je kao postotak utišavanja ciljnog gena u odnosu na kontrolni uzorak prema formuli $\mathrm{Ef}=100-[\mathrm{MNE(uzorak)}/\mathrm{MNE(kontrola)}\times 100]$.

3.2.6. Izolacija DPC-eva RADAR metodom

U ovom radu za izolaciju ukupnih staničnih DPC-eva korištena je modificirana RADAR metoda (Kiianitsa i Maizels, 2013, 2020; Anticevic *i sur.*, 2023) u svrhu povećanja procesivnosti i smanjenja inter- i intra- eksperimentalne varijabilnosti. HEK293T stanice lizirane su u 1 mL prethodno zagrijanog RADAR ekstrakcijskog pufera (6 M gvanidinijev izotiocijanat, 10 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20 mM EDTA, 4 % Triton X-100, 1 % N-lauroilsarkozin natrij, 5 % β-merkaptoetanol). Pufer je zagrijavan na 55°C tijekom 10 minuta u vodenoj kupelji. U stanični lizat dodan je jednaki volumen 100 %-tnog etanola što uzrokuje taloženje DNA, nakon čega je

slijedilo centrifugiranje na 10000g 10 minuta na 4°C. Dobiveni talog DNA ispran je četiri puta puferom za ispiranje (20 mM Tris HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 % etanol) i sušen 5 minuta na 55°C u termobloku. Nakon sušenja, talog je otopljen u 1 mL 8 mM NaOH uz soniciranje.

Prije daljnje analize potrebno je kvantificirati sadržaj DNA u izoliranim DPC uzorcima. U tu svrhu uzet je alikvot od 25 µL svakog uzorka te je tretiran s proteinazom K (20 mg/mL) u periodu od tri sata na 55°C, a zatim je kvatificirana DNA koristeći *Pico Green* test prema uputama proizvođača (Invitrogen, P7581). Sadržaj DNA u DPC uzorcima normaliziran je na temelju uzorka koji sadrži najmanju količinu DNA. Nakon normalizacije, DPC uzorci su tretirani s enzimom DNAzom (Millipore, E1014) 1 sat na 37°C u termobloku kako bi se uklonila DNA i kako bi se oslobodili proteini koji su prethodno na nju bili vezani. Tretirani uzorci su zatim brzo zamrznuti u tekućem dušiku i podvrgnuti liofilizaciji tijekom noći upotrebom liofilizatora FreeZone 2.5 (Labconco, SAD) pod uvjetima od -48°C (vakuum od 5 Pa). Liofilizirani DPC uzorci zatim su otopljeni u 50 µL SDS pufera za nanošenje (4 M urea, 62,5 mM Tris-HCl (pH=6,8), 1 mM EDTA, 2 % SDS). Izolirani DPC-evi vizualizirani su uz pomoć Western blot metode koja je detaljnije opisana u dijelu „*3.2.7. Western blot*“.

Za potvrdu DNA normalizacije provedena je Dot-blot metoda u kojoj je 2 ng DNA iz uzoraka tretiranih proteinazom K prebačeno na najlon membranu pomoću Bio-dot mikrofiltracijskog uređaja (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) i vakuum pumpe sa vakuumom od 700 mbar. Najlon membrana s nanesenim uzorcima DNA podvrgnuta je inkubaciji na UV svijetlu u trajanju od 5 minuta na UV-Transiluminatoru (312 nm) (Bachofer) u svrhu povezivanja DNA s najlon membranom. Membrana je blokirana 2 sata u 5 % mlijeku u prahu razrijeđenom u TBST puferu (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween) te je isprana u TBST puferu 5 minuta da se uklone sve nevezane molekule. Nakon toga, membrana je inkubirana preko noći s primarnim antitijelom na DNA (Abcam, UK, 1:7000) na 4°C u 2,5 % BSA/TBST uz lagano miješanjem. Sljedećeg dana, nakon ispiranja membrane su inkubirane sa sekundarnim anti-mouse antitijelom konjugiranim s peroksidazom iz hrena (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) (Sigma-Aldrich, A2554, 1:10000) 45 minuta na sobnoj temperaturi s blagim miješanjem. Zatim su isprane 3 x 15 min u TBST-u i 1 x 5 min u TBS-u. HRP konjugati generiraju signal oksidacijom kemiluminiscentnog supstrata, luminola, što rezultira emisijom svjetlosti koje se onda može detektirati pomoću uređaja ChemiDoc™ XRS+ Gel Imaging System (Bio-Rad Laboratories, SAD).

3.2.7. Western blot

Za daljnji postupak detekcije DPC-eva korištena je Western blot metoda. Svi uzorci su normirani prema uzorku s najmanjom detektiranom koncentracijom DNA. Navedeni uzorci odvojeni su pomoću SDS PAGE elektroforeze (5 – 18 % gradijentni gel) u komori za elektroforezu Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad Laboratories, SAD). Proteinske ljestve Precision plus protein ladder (Bio-Rad Laboratories, 1610374) sadrže raspon standardnih proteina od 10 do 250 kDa te su korištene za određivanje veličine razdvojenih proteina. Odvojeni proteini su zatim s gela prebačeni na PVDF membranu (Millipore, MA, SAD) s mokrim prijenosom korištenjem Mini Trans-Blot sustava (Bio-Rad, 1703935). Membrane su blokirane s 5 % mlijekom u prahu (Bio-Rad, 1610374) otopljenim u TBST puferu (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween) tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi kako bi se spriječilo nespecifično vezanje za slobodni dio membrane. Nakon blokiranja, membrane su isprane u TBST puferu 5 minuta i zatim inkubirane preko noći s primarnim antitijelom za Cas9 protein (Santa Cruz Biotechnology, sc-517386, 1:1000) i primarnim antitijelom za histon H3 (Cell Signaling, #9715, 1:3000) na 4°C u 2,5 % BSA/TBST uz lagano miješanje. Histon H3 detektiran je kao kontrola nanošenja jer je histon H3 protein koji vrlo često endogeno stvara DPC-eve. Sljedećeg dana nakon ispiranja primarnog protutijela, membrane su inkubirane u sekundarnim protutijelima u 2,5 % BSA/TBST upotrebom Anti-mouse ili Anti-Rabbit protutijela konjugiranih s HRP (Sigma-Aldrich, Njemačka, 1:10000) 45 minuta na sobnoj temperaturi s blagim miješanjem, nakon čega slijedi ispiranje 3 x 15 minuta u TBST-u i 1 x 5 minuta u TBS-u. HRP sa sekundarnih antitijela stvara svjetlosni signal oksidacijom luminola, što se onda detektira pomoću uređaja ChemiDoc™ XRS+ Gel Imaging System (Bio-Rad Laboratories, SAD). Kvantifikacija vrpci s Western blot membrane odrađena je pomoću softvera ImageJ (v. 1.54f).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Odabir ciljnih gena za utišavanje pomoću dCas9-sgRNA kompleksa

Uzimajući u obzir našu hipotezu, odabir ciljnih gena vrlo je fleksibilan i najviše ovisi o tome u kojoj mjeri je navedeni gen eksprimiran u HEK293T stanicama te mogu li se pronaći dovoljno specifične i efikasne sgRNA za gensku sekvencu na početnom dijelu ciljnog gena. S obzirom da smo već imali optimirane qPCR početnice za određene gene u bazi Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju, za početne eksperimente odabrano je ciljati gen *ATP5PO* i gen *RANBP2* (HKG geni).

ATP5PO (engl. *ATP Synthase Peripheral Stalk Subunit OSCP*) gen kodira komponentu F-tipa ATPaze koja se nalazi u mitohondrijskom matriksu. Ima podjednaku ekspresiju u raznim tkivima i zbog toga se često koristi kao HKG (Stoll *i sur.*, 2016). *RANBP2* (engl. *RAN binding protein 2*) kodira proteinske skele (engl. *scaffold protein*) koje se imunolokaliziraju na kompleksu nuklearne pore i vežu RAN. RAN je mali GTP-vezujući protein iz superobitelji RAS koji je povezan s nuklearnom membranom i smatra se da kontrolira različite stanične funkcije. Također se, zbog svoje ujednačene ekspresije, često koristi kao HKG (Shibata *i sur.*, 2021).

Mjerenje ekspresije gena *AT5PO* i *RANBP2* nije pokazalo značajno utišavanje istih nakon transfekcije sgRNA-dCas9 kompleksa u HEK293T stanice (Slika 12, 13). Pretpostavljeno je da je problem nastao zbog jako visoke ekspresije HKG gena u HEK293T stanicama, što otežava detekciju malog smanjenja ekspresije navedenih gena. Također, smatra se da bi smanjena ekspresija esencijalnih proteina poput AT5PO i RANBP2 mogla biti uzrok toksičnog efekta transfekcije dCas9-sgRNA kompleksa. Zbog navedenih razloga, odlučeno je primijeniti dva nova kriterija kod odabira ciljnih gena: (1) potrebno je birati gene koji nisu esencijalni za stanično preživljenje i (2) potrebno je birati umjereno eksprimirane gene u HEK293T stanicama. Za početak je provjereno zadovoljavaju li navedene kriterije svi geni za koje smo imali već optimirane qPCR početnice i/ili sgRNA oligonukleotide u bazi Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju, te su stoga izabrani novi ciljni geni: *TDP1, TDP2, SPRTN, ACRC, MATE1* i *ABCG2*. Procjena mRNA ekspresije navedenih gena u HEK293T stanicama provjerena je u bazi „ProteinAtlas“ (https://www.proteinatlas.org/).

TDP1 gen i *TDP2* gen kodiraju tirozil-DNA fosfodiesteraze 1 i 2, koje su detaljnije opisane u poglavlju „*1.3.3. Hidroliza unakrsne kovalentne veze (hidrolitički put)*“ zbog njihove uloge u DPCR-u. *SPRTN* gen kodira proteazu koja također sudjeluje u DPCR-u, a *ACRC* gen kodira protein za koji se vjeruje da isto tako ima određenu ulogu u DPCR-u. Oba proteina detaljnije su

opisana u poglavlju „*1.3.2. Popravak ovisan o proteolizi (proteolitički put)*“. Iako ciljanje gena povezanih s DPCR-om nije bila primarna namjera, za početak su uzeti i navedeni geni u probir utišavanja, kako bi se shvatio obrazac koji dovodi do uspješnog utišavanja gena pomoću dCas9-sgRNA kompleksa.

Uz gene uključene u DPCR, odlučeno je ciljati i gene koji nemaju veze s DPCR-om, a pokazuju srednje visoku ekspresiju u HEK293T stanicama i nisu esencijalni za preživljenje stanica. *MATE1* (engl. *multidrug and toxin extrusion 1*; drugi naziv: *SLC47A1*, engl. *solute carrier family 47 member 1*) kodira membransku efluksnu pumpu koja funkcionira kao H(+)/organski kationski antiporter. Pretpostavlja se da joj je fiziološka uloga izlučivanje kationskih spojeva, uključujući endogene metabolite, lijekove i toksine, van stanica (Gessner, König i Fromm, 2018). *ABCG2* (engl. *ATP binding cassette subfamily G member 2*) kodira membranski protein iz superobitelji transportera ATP-vezne kasete. Ovaj protein funkcionira kao prijenosnik ksenobiotika koji može igrati važnu ulogu u rezistenciji na razne lijekove (Damiani i Tiribelli, 2023).

4.2. Izrada sgRNA za odabrane ciljne gene

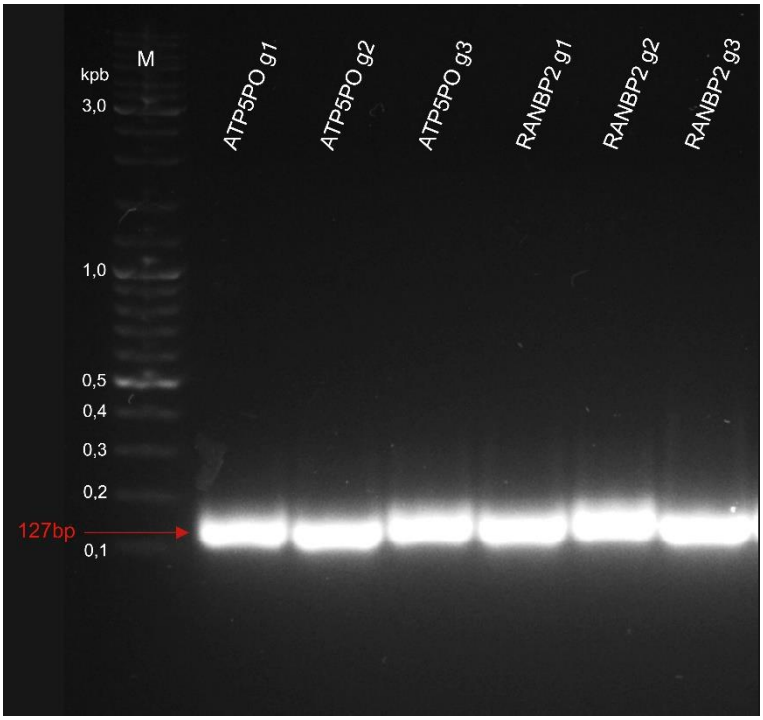
Detaljni postupak dizajna i *in vitro* sinteze sgRNA opisan je u poglavlju „*3.2.2. In silico sgRNA dizajn i in vitro sgRNA sinteza*“. Ukratko, za pretraživanje odgovarajućih sgRNA u online alatu *CRISPRscan* unesene su regije ciljnih gena koje su se protezale od -50 od TSS-a do +300 od START kodona (Slika 6). Zatim, od svih ponuđenih sgRNA, izabrane su one s najvećim „*score“*-om i najmanjim CFD-om (Metode - poglavlje 3.2.2., Tablica 9).

Tablica 9: Prikaz korištenih sgRNA za odabrane ciljne gene s njihovim karakteristikama iz *CRISPRscan* alata.

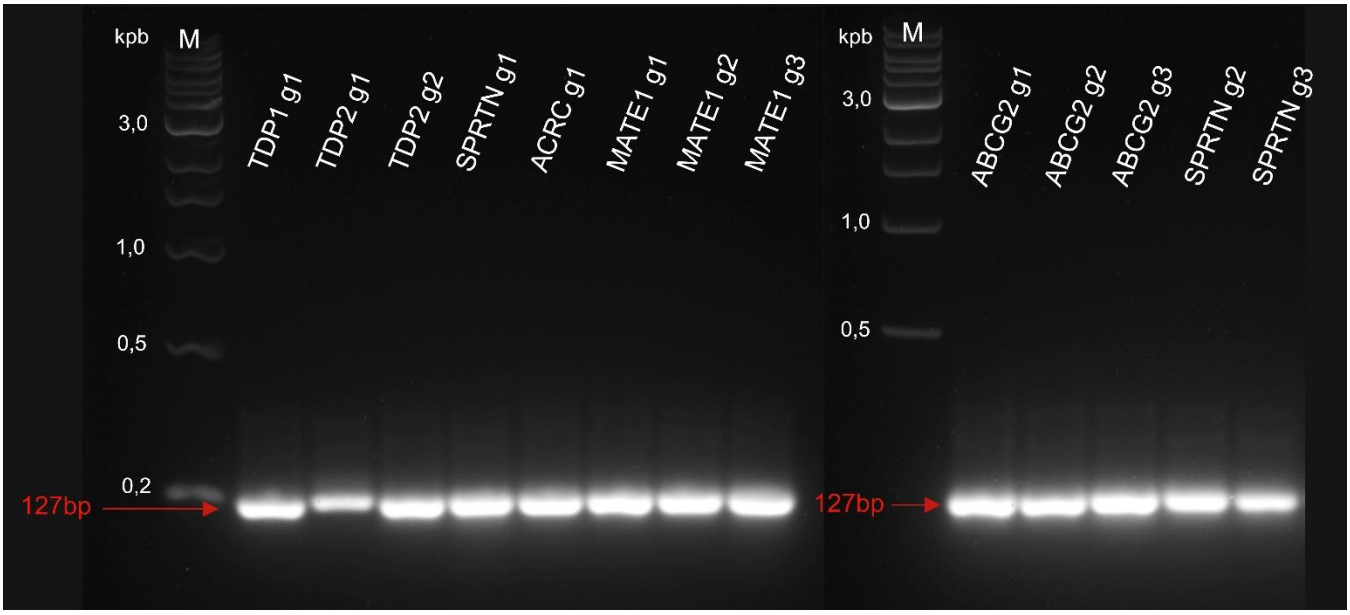
CILJANI GEN	**sgRNA**	**sgRNA oligo sekvenca (IVT-sgRNA)**	***CRISPR-scan* score**	***CRISPR-scan* CFD**
ATP5PO	g1	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTGTA GGTCAAACCCGAGTGTTTTAGAGCTAGAA	68	6,65
	g2	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTCAG GTATACGGTATTGAGTTTTAGAGCTAGAA	35	7,11
	g3	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTTTG ACCTACAGCCGCCCGTTTTAGAGCTAGAA	58	7,33
RANBP2	g1	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGACGC AGCGCCGTAGCCGGGTTTTAGAGCTAGAA	81	5,58
	g2	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTGTG CATCTGTTGCGGATGTTTTAGAGCTAGAA	68	6,23
	g3	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGCT GGTCTCACGCGCCTCGTTTTAGAGCTAGAA	79	7,56
TDP1	g1	TAATACGACTCACTATAGGTCCAACTCTGCGG AGAATGTTTTAGAGCTAGAA	46	6,66
TDP2	g1	TAATACGACTCACTATAGGGCCTCCTGTTCCG CTTAAGTTTTAGAGCTAGAA	55	7,92
	g2	TAATACGACTCACTATAGGTTTCGCTGTCCTC GCTTCGTTTTAGAGCTAGAA	53	6,93
SPRTN	g1	TAATACGACTCACTATAGGCGCTAGTGGACGC GTCGTGTTTTAGAGCTAGAA	71	0,91
	g2	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTCCTCG GCTAGGCGGCTTGTTTTAGAGCTAGAA	55	2,82
	g3	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCGGAG CGCGATCATGCCCGTTTTAGAGCTAGAA	49	4,35

ACRC	g1	TAATACGACTCACTATAGGAACATATGGTGGC GCCAGGTTTTAGAGCTAGA	80	6,53
MATE1	g1	TAATACGACTCACTATAGGGCGACCCACGGAC CTCAAGTTTTAGAGCTAGAA	90	5,78
	g2	TAATACGACTCACTATAGGGCCACCTTACTCA CCGCGGTTTTAGAGCTAGAA	65	6,02
	g3	TAATACGACTCACTATAGGCGGCAGTGAGTAC CGCGCGTTTTAGAGCTAGAA	61	6,96
ABCG2	g1	TAATACGACTCACTATAGGAGCGCTCCCCTCG CGCGGGTTTTAGAGCTAGAA	64	7,51
	g2	TAATACGACTCACTATAGGGGTCCACAGCCCG AAGCGGTTTTAGAGCTAGAA	56	8,27
	g3	TAATACGACTCACTATAGGGCAGCGCTTTAAC AATTAGTTTTAGAGCTAGAA	55	8,26

U protokolu za *in vitro* sintezu sgRNA u prvom koraku je potrebno pomoću Phusion PCR-a i skupa oligonukleotida sintetizirati DNA kalup za sgRNA. Nakon PCR-a, uzorcima je provjerena čistoća na 1,5 %-tnom agaroznom gelu metodom agarozne elektroforeze (Slika 8, 9). Potvrđeno je uspješno sintetiziranje DNA kalupa veličine 127bp za svih 19 korištenih sgRNA-a. Nakon toga, uzorak kalupa DNA je pročišćen te podvrgnut *in vitro* sintezi sgRNA. Nakon provedene *in vitro* sinteze sgRNA, njihova koncentracija je izmjerena pomoću uređaja BioSpec-nano (Shimadzu). Srednje vrijednosti izmjerenih koncentracija svih korištenih sgRNA nalaze se u Tablici 10.



Slika 8: Provedena agarozna gel-elektroforeza (1,5 %) u svrhu provjere sinteze i čistoće PCR-sintetiziranog DNA kalupa za sgRNA za gene *ATP5PO* i *RANBP2*. (M - marker veličine DNA [kpb]).



Slika 9: Provedena agarozna gel-elektroforeza (1,5 %) u svrhu provjere sinteze i čistoće PCR-sintetiziranog DNA kalupa za sgRNA za gene *TDP1, TDP2, SPRTN, ACRC, MATE1* i *ABCG2*. (M - marker veličine DNA [kpb]).

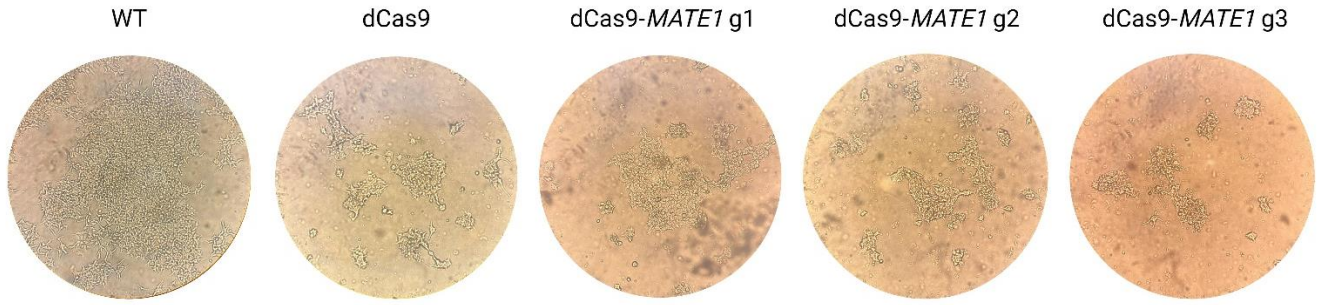
Tablica 10: Prikaz srednjih vrijednosti izmjerenih masenih koncentracija korištenih sgRNA nakon njihove *in vitro* sinteze.

OZNAKE KORIŠTENIH sgRNA	**SREDNJA VRIJEDNOST IZMJERENIH MASENIH KONCENTRACIJA [ng/μL]**
ATP5PO g1	2668,00
ATP5PO g2	2693,73
ATP5PO g3	1673,99
RANBP2 g1	1000,00
RANBP2 g2	2058,59
RANBP2 g3	2151,97
TDP1 g1	1596,39
TDP2 g1	2250,17
TDP2 g2	378,48
SPRTN g1	1645,98
SPRTN g2	1573,80
SPRTN g3	1089,00
ACRC g1	1724,50
MATE1 g1	2109,85
MATE1 g2	2093,52
MATE1 g3	1356,19
ABCG2 g1	1575,88
ABCG2 g2	2096,51
ABCG2 g3	3227,59

4.3. Optimiranje uvjeta transfekcije dCas9-sgRNA kompleksa u HEK293T stanicama

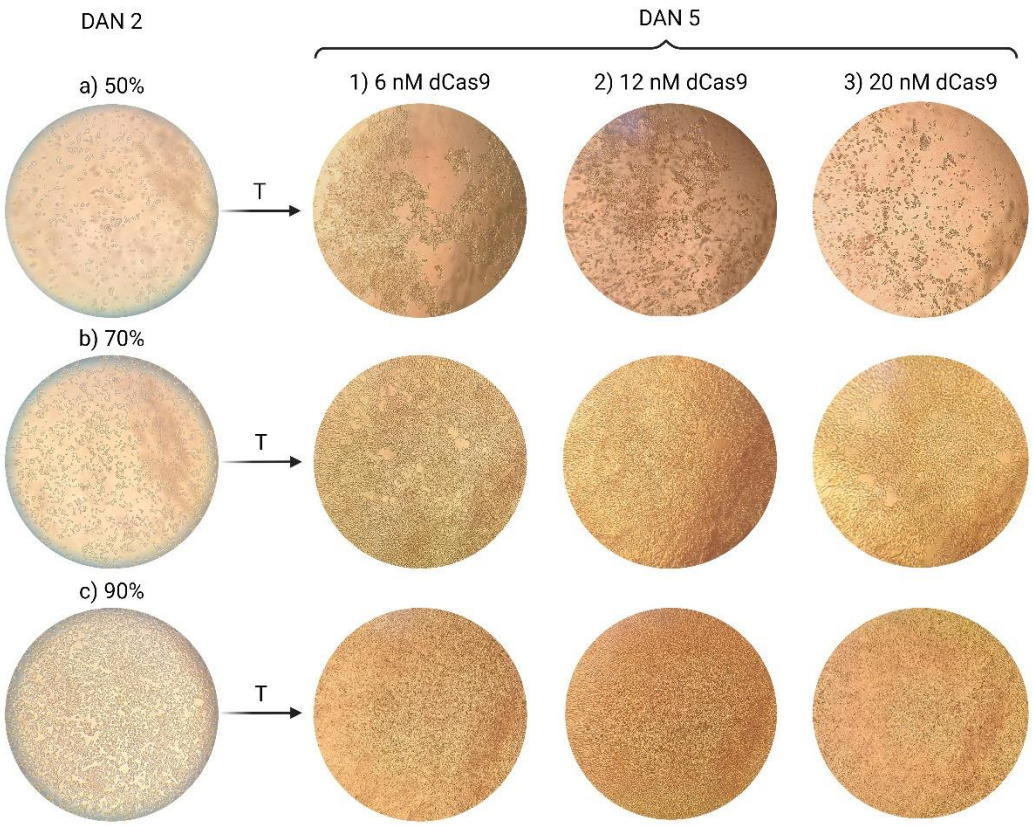
U prvim eksperimentima u kojima su se ciljali HGK geni, *ATP5PO* i *RANBP2*, koncentracije dCas9, sgRNA i DharmaFECT reagensa prilagođene su prema protokolu proizvođača (Horizon Discovery, UK). Stanice su nasađene na 30 % - 40 % konfluencije ($6 \cdot 10^5$ stanica/mL) i transfecirane idući dan s kompleksom dCas9-sgRNA: c(dCas9) = 15,63 nM, c(sgRNA) = 3,125 nM, V(DharmaFECT) = 2,27 μL/jažici, te su inkubirane u transfekcijskom mediju 14 - 18 sati, a sakupljene su 120 sati nakon transfekcije. U gore navedenim uvjetima, primijećena je toksičnost transfekcijske smjese (rezultati nisu prikazani), stoga su u sljedećem eksperimentu smanjene koncentracije kako slijedi: c(dCas9) = 8,48 nM, c(sgRNA) = 1,7 nM, V(DharmaFECT) = 1,36 μL/jažici, a konfluencija stanica ostala je na 30 % - 40 % ($6 \cdot 10^5$ stanica/mL) i vrijeme inkubacije na 14 - 18 h, a stanice su sakupljene nakon 144h. Međutim, navedeni uvjeti ponovno su uzrokovali toksični efekt na stanicama, stoga je odlučeno promijeniti ciljne gene te su odabrani neesencijalni geni: *TDP1, TDP2, SPRTN, ACRC, MATE1* i *ABCG2*.

Idući eksperiment proveden je s koncentracijama c(dCas9) = 12 nM, c(sgRNA) = 2,4 nM, V(DharmaFECT) = 2,27 μL/jažici na 30 % - 40 % ($6 \cdot 10^5$ stanica/mL) konfluentnim stanicama te je transfekcijska smjesa inkubirana 14 - 18h, a stanice su sakupljene nakon 120 sati. Ciljani su neesencijalni, srednje eksprimirani geni, no nažalost, stanice su i dalje doživljavale toksični efekt transfekcije koji se može vidjeti na fotografijama na Slici 10.



Slika 10: Fotografije koje prikazuju toksični efekt transfekcijske smjese na HEK293T stanice i posljedično smanjenje u konfluenciji stanica. Fotografije prikazuju HEK293T stanice na dan sakupljanja (~120 h nakon transfekcije). Korištena koncentracija dCas9 je 12 nM, koncentracija sgRNA je 2,4 nM te volumen dodanog DharmaFECT reagensa iznosi 2,27 μL/jažici. (WT- netretirane stanice divljeg tipa, dCas9-stanice transfecirane s dCas9, dCas9-*MATE1* g-stanice transfecirane kompleksom dCas9-sgRNA g1, g2 ili g3).

Uvidjevši problem u podnošenju transfekcije od strane HEK293T stanica, odlučeno je provesti eksperiment optimizacije transfekcijskih uvjeta kako bi stanice što bolje podnijele transfekciju te kako bi transfekcija bila što uspješnija. Eksperiment je osmišljen na način da se mijenja konfluencija stanica koja se nasađuje te se, također, mijenja koncentracija dCas9 proteina u trasfekcijskoj smjesi. Izabrane su tri različite konfluencije stanica (gustoće stanica) u trenutku transfekcije: (a) 50 % ($3 \cdot 10^6$ stanica/mL), (b) 70 % ($6 \cdot 10^6$ stanica/mL) i (c) 90 %($15 \cdot 10^6$ stanica/mL) te tri različite koncentracije dCas9 proteina: (1) 6 nM, (2) 12 nM, i (3) 20 nM. Kombinacijom različitih konfluencija i koncentracija dCas9, dobiven je raspon stanica, od kojih su neke lošije, a neke bolje podnijele transfekciju (Slika 11). Duljina inkubacije transfekcijske smjese ostala je jednaka kao i u prijašnjim eksperimentima, 14 - 18h, a stanice su sakupljene okvirno 72h nakon transfekcije. Iz Slike 11 zaključeno je kako slabije konfluentne stanice puno teže podnose transfekciju, stoga je bolje transfecirati ih kada su 70 % - 90 % konfluentne. Također, vidi se ovisnost toksičnog efekta o koncentraciji dCas9 proteina. Međutim, navedena ovisnost najviše dolazi do izražaja kod 50 % konfluentnih stanica, dok je u ostalima konfluencijama stanica (70 %, 90 %) taj efekt manje izražen. Zaključno, optimalni uvjeti transfekcije dCas9-sgRNA kompleksa u HEK293T stanice, uzevši u obzir minimalnu toksičnost (Slika 11) i najbolji efekt utišavanja (Slika 20), su sljedeći: c(dCas9) = 6 nM, c(sgRNA) = 12 nM, V(DharmaFECT) = 5,4 μL/jažici na 90 % ($15 \cdot 10^6$ stanica/mL) konfluentnim stanicama, inkubacija transfekcijske smjese 14 – 18 sati te sakupljanje stanica 72 - 120 sati nakon transfekcije. S navedenim uvjetima, odlučeno je ulaziti u transfekciju dCas9-sgRNA za RADAR analizu koja je provedena u malom staničnom flasku (T25). Stoga su volumeni prilagođeni s pločice s 24 jažice na mali flask (T25).



Slika 11: Prikaz fotografija iz eksperimenta optimiranja transfekcijskih uvjeta dCas9 proteina na HEK293T stanicama. Prvi dan stanice su nasađene s različitim gustoćama a) 50 %, b) 70 %, c) 90 %. Drugi dan stanice su transfecirane dCas9-DharmaFECT transfekcijskom smjesom u različitim koncentracijama dCas9 1) 6 nM, 2) 12 nM, 3) 20 nM. Fotografije stanica u prvom stupcu prikazuju stanice koje su nasađene s različitim konfluencijama te su uslikane na dan transfekcije (dan 2). U nastavku, prikazane su iste stanice uslikane 72h nakon transfekcije različitih koncentracija dCas9 proteina (dan 5). (T - transfekcija s dCas9).

4.4. Izrada i testiranje efikasnosti qPCR početnica

Tijekom odabira ciljnih gena, prvo se pretražila baza gena za koje Laboratorij za molekularnu ekotoksikologiju posjeduje već dizajnirane i verificirane qPCR početnice. Stoga za gene *ATP5PO, RANBP2, TDP1, TDP2, SPRTN, ACRC, MATE1, ABCG2* nije bilo potrebno dizajnirati qPCR početnice. Za gen *ABCG2* bio je unaprijed dizajniran jedan par početnica, no odlučeno je dizajnirati još jedan novi par početnica te za oba para testirati njihovu efikasnost umnažanja. Test efikasnosti proveden je pomoću qPCR analize tako da se koristio spektar koncentracija cDNA kalupa od 10 ng/μL, 5 ng/μL, 2,5 ng/μL, 1 ng/μL, 0,1 ng/μL i 0,03 ng/μL. Pomoću dobivenih C_t vrijednosti za triplikate svake koncentracije za pojedini par početnica, dobiven je linearni regresijski pravac iz kojeg je izračunata efikasnost umnažanja DNA kalupa pomoću određenog para početnica prema formuli E(%)=$\left(10^{\frac{-1}{a}}-1\right)\times 100$ ili $E=10^{\frac{-1}{a}}-1$, u kojoj *a* označava nagib regresijskog pravca. Odabrane su početnice koje su imale efikasnost umnažanja veću ili jednaku 90 %.

Prvi par početnica za gen *ABCG2* ima efikasnost 92 %, a drugi par početnica *ABCG2* ima efikasnost 100 %. Stoga je odlučeno koristiti par početnica s većom efikasnošću (drugi par). Efikasnost svih korištenih početnica navedena je u Tablici 11. Postupak dizajna qPCR početnica i testiranje njihove efikasnosti detaljnije je opisan u poglavlju: „*3.2.5. qPCR analiza*“.

Tablica 11: Korištene qPCR početnice za odabrane gene s njihovim testiranim efikasnostima.

qPCR POČETNICE ZA ODABANE GENE	EFIKASNOST ODABRANIH POČETNICA
ATP5PO	97 %
RANBP2	95 %
TDP1	90 %
TDP2	98 %
SPRTN	100 %
ACRC	100 %
MATE1	91 %
ABCG2	100 %
RPLP0	97 %

4.5. Procjena efikasnosti utišavanja odabranih ciljnih gena u HEK293T stanicama

U svrhu procjene efikasnosti utišavanja transfeciranog dCas9-sgRNA kompleksa, provedena je qPCR analiza ekspresije pripadajućih ciljanih gena. Nakon što su stanice sakupljene, provedena je izolacija ukupne RNA i reverzna transkripcija izolirane RNA u cDNA, koja se kasnije koristila za analizu ekspresije pomoću qPCR analize. Detaljan postupak od izolacije RNA do same qPCR analize opisan je u poglavljima „*3.2.4. Izolacija RNA i reverzna transkripcija*“ i „*3.2.5. qPCR analiza*“.

4.5.1. Procjena efikasnosti utišavanja *ATP5PO* i *RANBP2* gena

Početni eksperimenti bili su fokusirani na pokušaj utišavanja gena *ATP5PO* i *RANBP2* pomoću dCas9-sgRNA kompleksa. Stanice su nasađene na 30 % - 40 % konfluencije ($6 \cdot 10^5$ stanica/mL) i transfecirane s c(dCas9)=15,63 nM, c(sgRNA)=3,125 nM, V(DharmaFECT)=2,27 μL/jažici te su inkubirane u transfekcijskom mediju 14 - 18 sati, a sakupljene su 120 sati nakon transfekcije. Za transfekciju su korištene sgRNA sintetizirane za gene *ATP5PO* i *RANBP2* koje su navedene u Tablici 9.

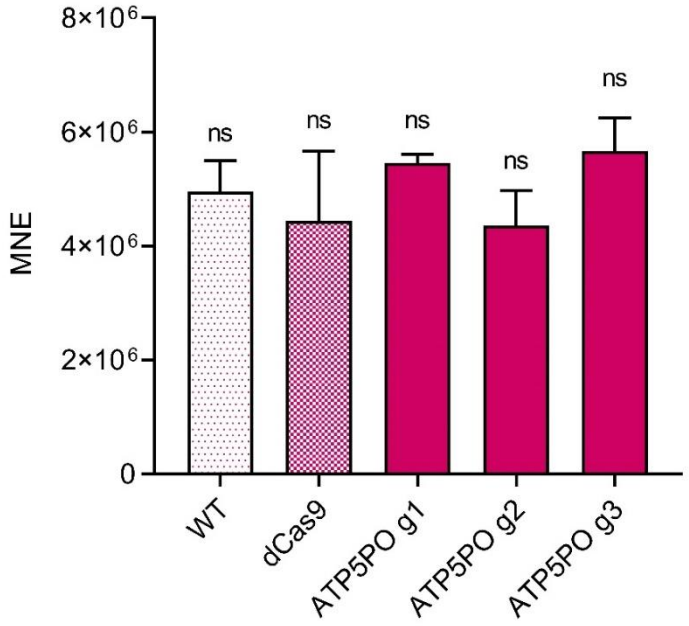
U proces reverzne transkripcije ušlo se s koncentracijom ukupne RNA od γ(RNA) = 25 ng/μL. U qPCR eksperimentu koncentracija cDNA u svakoj jažici bila je γ(cDNA) = 1,0 ng/μL, odnosno masa cDNA je bila m(cDNA) = 10 ng po jažici. U uzorcima gdje su korištene sgRNA za *ATP5PO*, kao gen za endogenu kontrolu analize qPCR-a (HKG) korišten je *RANBP2* i obrnuto, u uzorcima gdje su korištene sgRNA za *RANBP2*, korišten je HKG *ATP5PO*. Za qPCR analizu korištene su početnice za gene *ATP5PO* i *RANBP2* navedene u Tablicama 4 i 11. U qPCR analizi svaki uzorak je pipetiran u triplikatu te je za svaki par početnica uvedena negativna kontrola bez kalupa (NTC, engl. *non-template control*), koja je bila ultračista voda.

Rezultati provedenog eksperimenta grafički su prikazani kao razine srednje normalizirane ekspresije (MNE) u svim uzorcima (Slika 12, 13). Za gen *ATP5PO* rezultati ne ukazuju na efekt utišavanja (Slika 12). Dok je kod gena *RANBP2* njegova ekspresija utišana za 7,92 % pomoću sgRNA g2 u odnosu na netretirani uzorak stanica divljeg tipa (WT, engl. wild type), a za 9,52 % u odnosu na kontrolni dCas9 uzorak koji je transfeciran samo s dCas9, bez sgRNA (Slika 13). Međutim, navedeno sniženje u ekspresiji moguće je posljedica degradacije RNA u tom uzorku (uzorak *RANBP2* g2) što se može zaključiti iz povećanja C_t vrijednosti za HKG (*ATP5PO*) (Tablica 13). Drugi potencijalni uzrok za povećanje C_t vrijednosti HKG-a u tom uzorku je potencijalna eksperimentalna pogreška. No, nažalost, iz dobivenih podataka ne može se

zaključiti koji je pravi uzrok povećanju C_t vrijednosti HKG-a u tom uzorku. Ako je i došlo do utišavanja *RANBP2 gena,* to utišavanje je jako malo (8 – 10 %), te nije dovoljno za nastavak eksperimenata. Što se tiče prikladnosti *ATP5PO* i *RANBP2* gena kao endogenih kontrola (HKG) za daljnje qPCR eksperimente, u ovom eksperimentu pokazalo se da ni *ATP5PO* ni *RANBP2* nisu idealni HKG-ovi, jer im prosječne C_t vrijednosti određenih uzoraka odstupaju više od 0,50 u odnosu na medijan svih prosječnih C_t vrijednosti uzoraka (Tablica 12, 13).

Tablica 12: Prikaz dobivenih Ct vrijednosti za HKG=*RANBP2* u eksperimentu pokušaja utišavanja *ATP5PO* gena pomoću sgRNA g1, g2 i g3. (WT - cDNA izolirana iz netretiranih stanica divljeg tipa, dCas9 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih s dCas9, *ATP5PO* g - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih kompleksom dCas9-sgRNA g1, g2 ili g3, NTC (engl. non-template control) - umjesto uzorka cDNA stavljena je ultračista voda kao kontrolni uzorak, SD - standardna devijacija, %SD - relativna standardna devijacija).

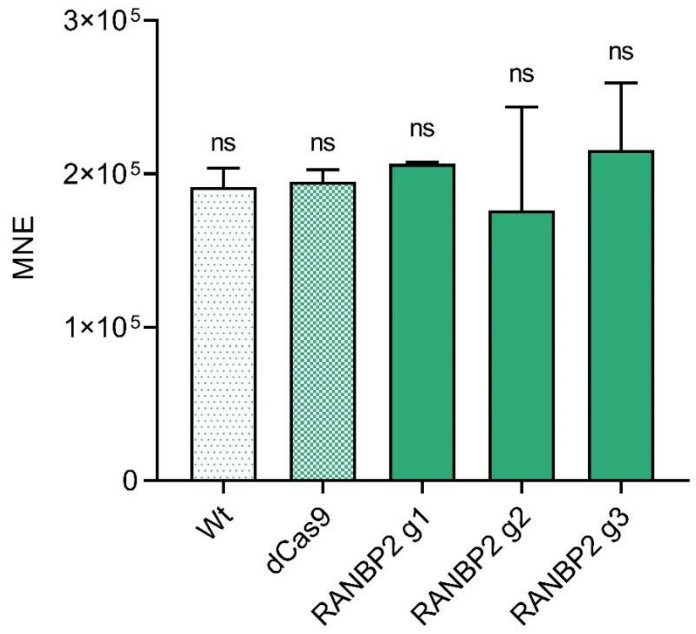
C_t (HKG=*RANBP2*)	**WT**	**dCas9**	***ATP5PO* g1**	***ATP5PO* g2**	***ATP5PO* g3**	**NTC**
1	18,30	18,12	19,04	18,65	19,21	0
2	18,07	18,63	/	18,54	19,32	0
3	18,40	18,72	/	19,10	19,03	0
srednja vrijednost	***18,26***	**18,49**	**19,04**	**18,76**	***19,19***	**0**
SD	0,17	0,32	/	0,29	0,14	/
%SD	0,94	1,73	/	1,56	0,76	/
delta od medijana	-0,51	-0,27	0,28	0,00	0,43	/



Slika 12: Grafički prikaz razina ekspresije gena *ATP5PO* (na razini mRNA) u HEK293T stanicama. Svaki stupac predstavlja srednju normaliziranu ekspresiju, MNE iz 3 biološke replike +/- SD. Statistički značajne promjene kao rezultat neuparenog Studentovog t-testa prikazane su kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ili **** ($p < 0,0001$), a statistički neznačajne promjene označene su s ns. (WT - netransfecirane stanice divljeg tipa, dCas9 - stanice transfecirane s dCas9, *ATP5PO* g - stanice transfecirane kompleksom dCas9-sgRNA g1, g2 ili g3).

Tablica 13: Prikaz dobivenih Ct vrijednosti za HKG=*ATP5PO* u eksperimentu pokušaja utišavanja *RANBP2* gena pomoću sgRNA g1, g2 i g3. (WT - cDNA izolirana iz netretiranih stanica divljeg tipa, dCas9 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih s dCas9, *RANBP2* g - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih kompleksom dCas9-sgRNA g1, g2 ili g3, NTC (engl. non-template control) - umjesto uzorka cDNA stavljena je ultračista voda kao kontrolni uzorak, SD - standardna devijacija, %SD - relativna standardna devijacija).

C_t (HKG=*ATP5PO*)	**WT**	**dCas9**	***RANBP2* g1**	***RANBP2* g2**	***RANBP2* g3**	**NTC**
1	15,52	16,21	16,81	/	16,13	0
2	15,61	15,89	16,89	17,10	16,17	0
3	15,75	16,07	16,73	16,70	16,15	0
srednja vrijednost	**15,63**	**16,05**	**16,81**	**16,90**	**16,15**	**0**
SD	0,11	0,16	0,08	0,28	0,02	/
%SD	0,73	0,99	0,48	1,66	0,12	/
delta od medijana	-0,53	-0,10	0,66	0,75	0,00	/



Slika 13: Grafički prikaz razina ekspresije gena *RANBP2* (na razini mRNA) u HEK293T stanicama. Svaki stupac predstavlja srednju normaliziranu ekspresiju, MNE iz 3 biološke replike +/- SD. Statistički značajne promjene kao rezultat neuparenog Studentovog t-testa prikazane su kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ili **** ($p < 0,0001$), a statistički neznačajne promjene označene su s ns. (WT - netransfecirane stanice divljeg tipa, dCas9 - stanice transfecirane s dCas9, *RANBP2* g - stanice transfecirane kompleksom dCas9-sgRNA g1, g2 ili g3).

4.5.2. Procjena efikasnosti utišavanja neesencijalnih, srednje eksprimiranih gena u HEK293T stanicama

Zbog primijećene toksičnosti dCas9-sgRNA kompleksa te zbog većinski neuspješne detekcije utišavanja u prijašnjem eksperimentu u kojem su ciljani HKG-ovi, sada je odabrano ciljati neesencijalne gene sa srednjom razinom ekspresije u HEK293T stanicama: *TDP1, TDP2, SPRTN, ACRC, MATE1 i ABCG2*. U svrhu utišavanja navedenih neesencijalnih gena, korištene su sgRNA navedene u Tablici 9. Transfekcija je provedena s c(dCas9)=12 nM, c(sgRNA)=2,4 nM, V(DharmaFECT)=2,27 μL/jažici na 30 % - 40 % ($6 \cdot 10^5$ stanica/mL) konfluentnim stanicama te je transfekcijska smjesa inkubirana 14 - 18h, a stanice su sakupljene nakon okvirno 120 sati.

Nakon sakupljanja stanica, iz svakog uzorka izolirana je RNA te je izmjerena njena koncentracija na uređaju BioSpec-nano (Shimadzu). Srednje vrijednosti izmjerenih masenih koncentracija RNA nalaze se u Tablici 14. Iz navedene tablice može se uočiti toksičan efekt

transfekcijske smjese na stanice, što se zaključuje iz smanjenja koncentracija ukupne izolirane RNA u uzorcima s dCas9 u odnosu na WT. Koncentracija ukupne RNA u uzorcima s dCas9 prosječno se smanjila približno 12 puta u odnosu na WT uzorak. Zbog ovako izraženog toksičnog efekta bilo je nužno provesti eksperiment optimizacije transfekcije (Poglavlja 4.3. i 4.5.3.).

Tablica 14: Prikaz srednjih vrijednosti izmjerenih masenih koncentracija ukupne izolirane RNA u svim uzorcima te podaci u kojoj turi su navedeni uzorci prevedeni u cDNA i koncentracije cDNA u prevedenim uzorcima.

NAZIV UZORKA	SREDNJA VRIJEDNOST IZMJERENIH MASENIH KONCENTRACIJA [ng/μL]	TURA U KOJOJ SU PREVEDENI U cDNA	MASENA KONCENTRACIJA cDNA
WT	192,00	Ture A, B i C	8,5 ng/μL, 7,5 ng/μL, 2,25 ng/μL
dCas9	32,00	Ture A, B i C	8,5 ng/μL, 7,5 ng/μL, 2,25 ng/μL
TDP1 g1	14,73	Tura A	8,5 ng/μL
TDP2 g1	24,92	Tura A	8,5 ng/μL
TDP2 g2	16,82	Tura A	8,5 ng/μL
SPRTN g1	10,10	Tura C	2,25 ng/μL
SPRTN g2	16,74	Tura A	8,5 ng/μL
SPRTN g3	10,65	Tura C	2,25 ng/μL
ACRC g1	42,96	Tura B	7,5 ng/μL
MATE1 g1	39,98	Tura A	8,5 ng/μL
MATE1 g2	16,47	Tura A	8,5 ng/μL
MATE1 g3	7,54	Tura C	2,25 ng/μL
ABCG2 g1	2,16	Uzorak izbačen iz daljnje analize	/
ABCG2 g2	10,60	Tura C	2,25 ng/μL
ABCG2 g3	12,60	Tura A	8,5 ng/μL

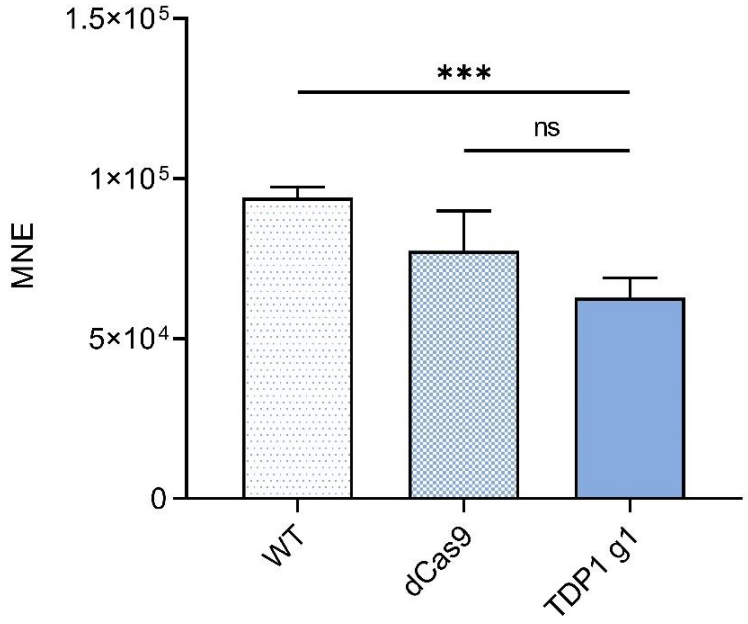
Inače se po protokolu u qPCR ulazi s m(cDNA) = 10 ng po jažici (V=10μL), odnosno s konačnom koncentracijom cDNA u jažici od γ(cDNA) = 1,0 ng/μL. Zbog velikih varijacija u koncentraciji RNA, odlučeno je provoditi reverznu transkripciju u nekoliko tura u kojima je svaka

tura normirana na određenu koncentraciju RNA s kojom se ulazi u protokol reverzne transkripcije. Tura A normirana je na γ(RNA) = 8,5 ng/μL za reverznu transkripciju, a u qPCR se ulazilo s γ(cDNA) = 0,85 ng/μL. Tura B normirana je na γ(RNA) = 7,5 ng/μL za reverznu transkripciju, a u qPCR se ulazilo s γ(cDNA) = 0,9 ng/μL. Tura C normirana je na γ(RNA) = 2,25 ng/μL za reverznu transkripciju, a u qPCR se ulazilo s γ(cDNA) = 0,29 ng/μL. S uzorkom *ABCG2* g2 nije se ulazilo u daljnje eksperimente zbog preniske koncentracije ukupne izolirane RNA od γ(RNA) = 2,16 ng/μL (Tablica 14). U ovom qPCR eksperimentu korišten je HKG *RPLP0* koji se pokazao prikladniji za naše eksperimente, jer se njegove C_t vrijednosti najmanje mijenjaju kroz uzorke. Korištene qPCR početnice za svaki odabrani neesencijalni gen navedene su u Tablicama 4 i 11.

Rezultati za gen *TDP1* pokazuju malo smanjenje u ekspresiji u uzorku *TDP1* g1. U odnosu na kontrolni dCas9 uzorak, postotak utišavanja iznosi 18,84 %, a u odnosu na kontrolni WT uzorak ono iznosi 33,23 % (Slika 14). Ako se sagledaju C_t vrijednosti HKG-a (*RPLP0)* u danim uzorcima s *TDP1* genom, uočava se kako niti jedna vrijednost ne odstupa mnogo od medijana (Tablica 15), što znači da je endogena kontrola (HKG) bila prikladna i da se navedeni podaci o utišavanju mogu uzeti kao istiniti.

Tablica 15: Prikaz dobivenih Ct vrijednosti za HKG=*RPLP0* u eksperimentu pokušaja utišavanja *TDP1* gena pomoću sgRNA g1. (WT - cDNA izolirana iz netretiranih stanica divljeg tipa, dCas9 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih s dCas9, *TDP1* g1 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih kompleksom dCas9-sgRNA g1, NTC (engl. non-template control) - umjesto uzorka cDNA stavljena je ultračista voda kao kontrolni uzorak, SD - standardna devijacija, %SD - relativna standardna devijacija).

Ct (HKG=*RPLP0*)	**WT**	**dCas9**	***TDP1* g1**	**NTC**
1	15,58	15,86	15,34	0
2	15,58	15,98	15,35	0
3	15,70	15,72	15,42	0
srednja vrijednost	**15,62**	**15,86**	**15,37**	**0**
SD	0,07	0,13	0,04	/
%SD	0,46	0,82	0,28	/
delta od medijana	0,00	-0,24	0,25	/

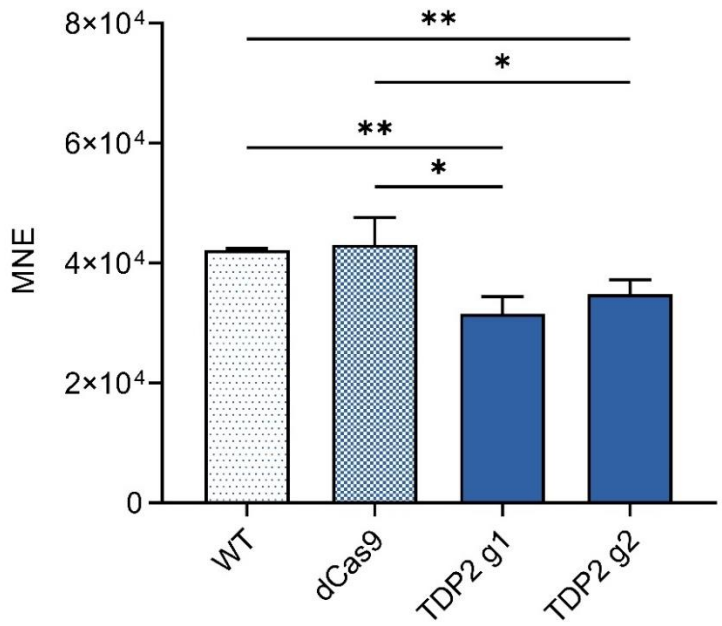


Slika 14: Grafički prikaz razina ekspresije gena *TDP1* (na razini mRNA) u HEK293T stanicama. Svaki stupac predstavlja srednju normaliziranu ekspresiju, MNE iz 3 biološke replike +/- SD. Statistički značajne promjene kao rezultat neuparenog Studentovog t-testa prikazane su kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ili **** ($p < 0,0001$), a statistički neznačajne promjene označene su s ns. (WT - netransfecirane stanice divljeg tipa, dCas9 - stanice transfecirane s dCas9, *TDP1* g1 - stanice transfecirane kompleksom dCas9-sgRNA g1).

Rezultati ekspresije za *TDP2* prikazani su grafički na Slici 15. Iz navedenog grafa može se zaključiti da i sgRNA g1 i sgRNA g2 za gen *TDP2* uzrokuju utišavanje ciljnog gena. U uzorku *TDP2* g2 detektirano je utišavanje *TDP2* gena od 19,24 % u odnosu na kontrolni dCas9 uzorak te 17,65 % u odnosu na WT. RNA vodilja sgRNA g1 za *TDP2* ima veću efikasnost utišavanja od sgRNA g2. Detektirano utišavanje u *TDP2* g1 uzorku iznosi 26,73 % u odnosu na kontrolni dCas9 uzorak, a 25,29 % u odnosu na WT. Kada se promotre C_t vrijednosti korištenog HKG-a (*RPLP0*), većina C_t uzoraka ne odstupa mnogo od medijana, osim uzorka *TDP2* g2 koji nešto više odstupa (Tablica 16). Stoga se može procijeniti da je efikasnost utišavanja sgRNA g2 ipak malo niža od gore izračunate.

Tablica 16: Prikaz dobivenih C_t vrijednosti za HKG=*RPLP0* u eksperimentu pokušaja utišavanja *TDP2* gena pomoću sgRNA g1 i g2. (WT - cDNA izolirana iz netretiranih stanica divljeg tipa, dCas9 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih s dCas9, *TDP2* g - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih kompleksom dCas9-sgRNA g1 ili g2, NTC (engl. non-template control) - umjesto uzorka cDNA stavljena je ultračista voda kao kontrolni uzorak, SD - standardna devijacija, %SD - relativna standardna devijacija).

Ct (HKG=*RPLP0*)	WT	dCas9	*TDP2* g1	*TDP2* g2	NTC
1	15,58	15,86	15,58	15,15	0
2	15,58	15,98	15,60	15,16	0
3	15,70	15,72	16,32	15,28	0
srednja vrijednost	**15,62**	**15,86**	**15,59**	**15,19**	**0**
SD	0,07	0,13	0,01	0,07	/
%SD	0,46	0,82	0,08	0,48	/
delta od medijana	0,00	-0,24	0,03	0,43	/



Slika 15: Grafički prikaz razina ekspresije gena *TDP2* (na razini mRNA) u HEK293T stanicama. Svaki stupac predstavlja srednju normaliziranu ekspresiju, MNE iz 3 biološke replike +/- SD. Statistički značajne promjene kao rezultat neuparenog Studentovog t-testa prikazane su kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ili **** ($p < 0,0001$), a statistički neznačajne promjene označene su s ns. (WT - netransfecirane stanice divljeg tipa, dCas9 - stanice transfecirane s dCas9, *TDP2* g - stanice transfecirane kompleksom dCas9-sgRNA g1 ili g2).

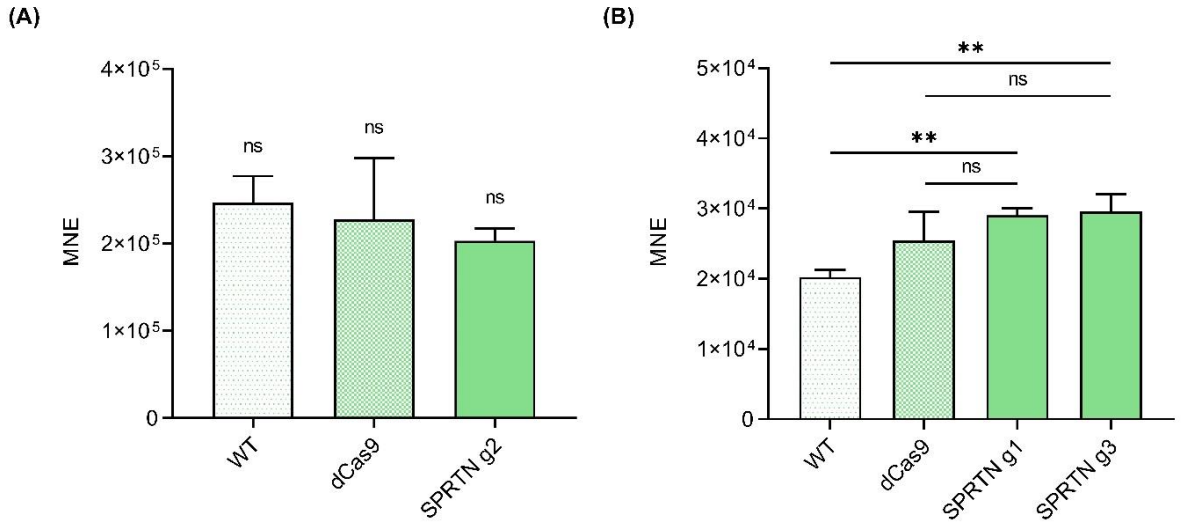
Za *SPRTN* gen prikazuju se dva odvojena grafa (Slika 16) jer je uzorak *SPRTN* g2 obrađen u turi A, a *SPRTN* g1 i g3 su obrađeni u turi C i za svaku turu nužno je imati odvojenu WT kontrolu i kontrolni dCas9 uzorak. Iz navedenih grafova vidi se kako je *SPRTN* sgRNA g2 uzrokovala utišavanje ciljnog gena (Slika 16, A), dok *SPRTN* sgRNA g1 i g3 nisu doveli do utišavanja, već je vidljiv blagi porast u ekspresiji u odnosu na kontrolni dCas9 uzorak (Slika 16, B). Kod uzorka *SPRTN* g2 detektirano je utišavanje od 10,75 % u odnosu na kontrolni dCas9 uzorak te 17,63 % u odnosu na WT (Slika 16, A). Ako se obrati pozornost na C_t vrijednosti HKG-a kod ture A (*SPRTN* g2 uzorka), ne uočava se veliko odstupanje C_t uzoraka od medijana (Tablica 17) što daje sigurnost da je utišavanje u uzorku *SPRTN* g2 stvarno postojalo, no postotak utišavanja nije zadovoljavajući za naše daljnje eksperimente. Međutim, ako se sagledaju vrijednosti C_t od HKG-a u turi C (Tablica 18), primjećuje se malo drugačija slika, gdje u oba kontrolna uzorka C_t vrijednosti HKG-a dosta odstupaju od medijana. Zbog toga se teško može razmatrati i uspoređivat MNE vrijednosti u turi C (uzorci *SPRTN* g1 i g3). Stoga se trend povećanja ekspresije u *SPRTN* g1 i g3 uzorcima može 0pripisati i efektu lažno smanjene ekspresije kontrolnih uzoraka WT i dCas9.

Tablica 17: Prikaz dobivenih C_t vrijednosti za HKG=*RPLP0* u eksperimentu pokušaja utišavanja *SPRTN* gena pomoću sgRNA g2 (tura A). (WT - cDNA izolirana iz netretiranih stanica divljeg tipa, dCas9 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih s dCas9, *SPRTN* g2 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih kompleksom dCas9-sgRNA g2, NTC (engl. non-template control) - umjesto uzorka cDNA stavljena je ultračista voda kao kontrolni uzorak, SD - standardna devijacija, %SD - relativna standardna devijacija).

Ct (HKG=*RPLP0*)	**WT**	**dCas9**	***SPRTN* g2**	**NTC**
1	15,58	15,86	15,25	0
2	15,58	15,98	15,34	0
3	15,70	15,72	15,36	0
srednja vrijednost	**15,62**	**15,86**	**15,32**	**0**
SD	0,07	0,13	0,06	/
%SD	0,46	0,82	0,39	/
delta od medijana	0,00	-0,24	0,30	/

Tablica 18: Prikaz dobivenih C_t vrijednosti za HKG=*RPLP0* u eksperimentu pokušaja utišavanja *SPRTN* gena pomoću sgRNA g1 i g3 (tura C). (WT - cDNA izolirana iz netretiranih stanica divljeg tipa, dCas9 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih s dCas9, *SPRTN* g - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih kompleksom dCas9-sgRNA g1 ili g3, NTC (engl. non-template control) - umjesto uzorka cDNA stavljena je ultračista voda kao kontrolni uzorak, SD - standardna devijacija, %SD - relativna standardna devijacija).

Ct (HKG=*RPLP0*)	**WT**	**dCas9**	***SPRTN* g1**	***SPRTN* g3**	**NTC**
1	15,37	15,79	16,43	15,98	0
2	15,43	15,92	16,44	16,01	0
3	15,50	15,92	17,54	16,09	0
srednja vrijednost	***15,43***	***15,88***	**16,44**	**16,03**	**0**
SD	0,06	0,07	0,01	0,06	/
%SD	0,40	0,45	0,06	0,36	/
delta od medijana	-0,98	-0,53	0,03	-0,38	/

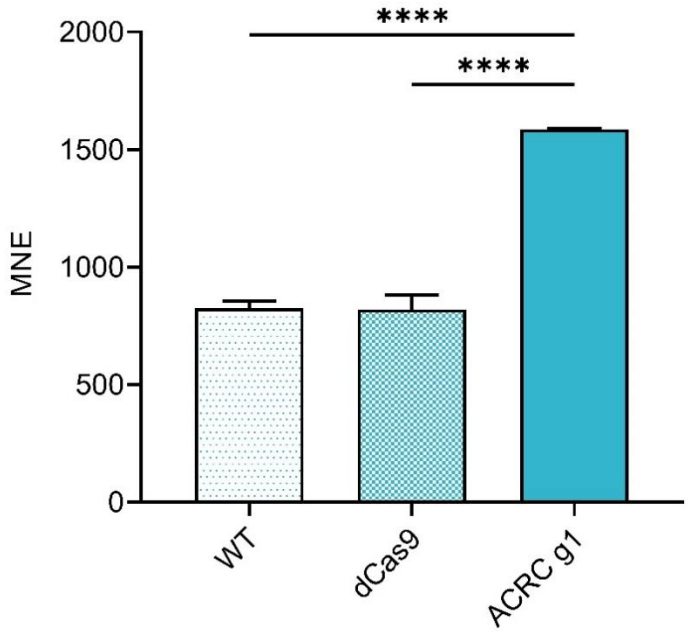


Slika 16: Grafički prikaz razina ekspresije gena *SPRTN* (na razini mRNA) u HEK293T stanicama. **(A)** Graf A prikazuje MNE za turu A, odnosno uzorak *SPRTN* g2. **(B)** Graf B prikazuje MNE za turu C, odnosno uzorke *SPRTN* g1 i g3. Svaki stupac predstavlja srednju normaliziranu ekspresiju, MNE iz 3 biološke replike +/- SD. Statistički značajne promjene kao rezultat neuparenog Studentovog t-testa prikazane su kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ili **** ($p < 0,0001$), a statistički neznačajne promjene označene su s ns. (WT - netransfecirane stanice divljeg tipa, dCas9 - stanice transfecirane s dCas9, *SPRTN* g - stanice transfecirane kompleksom dCas9-sgRNA g1, g2 ili g3).

Kod uzorka transfeciranog kompleksom dCas9-sgRNA g1 za *ACRC* gen uočava se snažno povećanje u ekspresiji (Slika 17). No, kada se sagledaju C_t vrijednosti HKG-a, uočava se veliko odstupanje od medijana za čak ΔC_t=-1,01 u uzorku *ACRC* g1 (Tablica 19). Navedene vrijednosti moguće su rezultat eksperimentalne pogreške, primjerice pogrešnog normiranja RNA prilikom ulaska u reverznu transkripciju. Stoga se navedeni rezultat ne može promatrati iz konteksta povećanja ekspresije. U ovom slučaju vjerojatno se radi o lažnom povećanju ekspresije.

Tablica 19: Prikaz dobivenih C_t vrijednosti za HKG=*RPLP0* u eksperimentu pokušaja utišavanja *ACRC* gena pomoću sgRNA g1. (WT - cDNA izolirana iz netretiranih stanica divljeg tipa, dCas9 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih s dCas9, *ACRC* g1 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih kompleksom dCas9-sgRNA g1, NTC (engl. non-template control) - umjesto uzorka cDNA stavljena je ultračista voda kao kontrolni uzorak, SD - standardna devijacija, %SD - relativna standardna devijacija).

Ct (HKG=*RPLP0*)	**WT**	**dCas9**	***ACRC* g1**	**NTC**
1	15,13	14,89	14,18	0
2	15,29	14,94	14,18	0
3	15,27	15,02	14,19	0
srednja vrijednost	**15,23**	**14,95**	**14,18**	**0**
SD	0,09	0,06	0,00	/
%SD	0,59	0,41	0,03	/
delta od medijana	0,04	-0,24	-1,01	/



Slika 17: Grafički prikaz razina ekspresije gena *ACRC* (na razini mRNA) u HEK293T stanicama. Svaki stupac predstavlja srednju normaliziranu ekspresiju, MNE iz 3 biološke replike +/- SD. Statistički značajne promjene kao rezultat neuparenog Studentovog t-testa prikazane su kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ili **** ($p < 0,0001$), a statistički neznačajne promjene označene su s ns. (WT - netransfecirane stanice divljeg tipa, dCas9 - stanice transfecirane s dCas9, *ACRC* g1 - stanice transfecirane kompleksom dCas9-sgRNA g1).

Za gen *MATE1* prikazuju se, također, dva odvojena grafa (Slika 18) jer su uzorci *MATE1* g1 i g2 obrađeni u turi A, a *MATE1* g3 je obrađen u turi C i za svaku turu nužno je imati WT kontrolu i kontrolni dCas9 uzorak. Ako se prvo stavi fokus na uzorak *MATE1* g1, može se zaključiti da postoji efekt utišavanja u iznosu od 38,37 % u usporedbi s kontrolnim dCas9 uzorkom i 59,84 % u usporedbi s WT uzorkom (Slika 18, A). Promatrajući C_t vrijednosti HKG-a (*RPLP0*) u Tablici 20, vidi se da uzorci WT, dCas9 i *MATE1* g1 ne odstupaju mnogo od medijana, stoga se podaci o utišavanju mogu protumačiti kao istiniti. Međutim, C_t vrijednost HKG-a u uzorku *MATE1* g2 dosta odstupa od medijana (Tablica 20). U MNE podacima za *MATE1* g2 uzorak može se uočiti snažan pad u ekspresiji *MATE1* gena korištenjem upravo sgRNA g2 (Slika 18, A). Iako se ne može sa sigurnošću tvrditi kolika je zapravo efikasnost tog utišavanja, može se reći da je prisutan trend utišavanja te da on okvirno iznosi 60 % u odnosu na kontrolni dCas9 uzorak i okvirno 75 % u odnosu na WT uzorak (Slika 18, A). Za uzorak

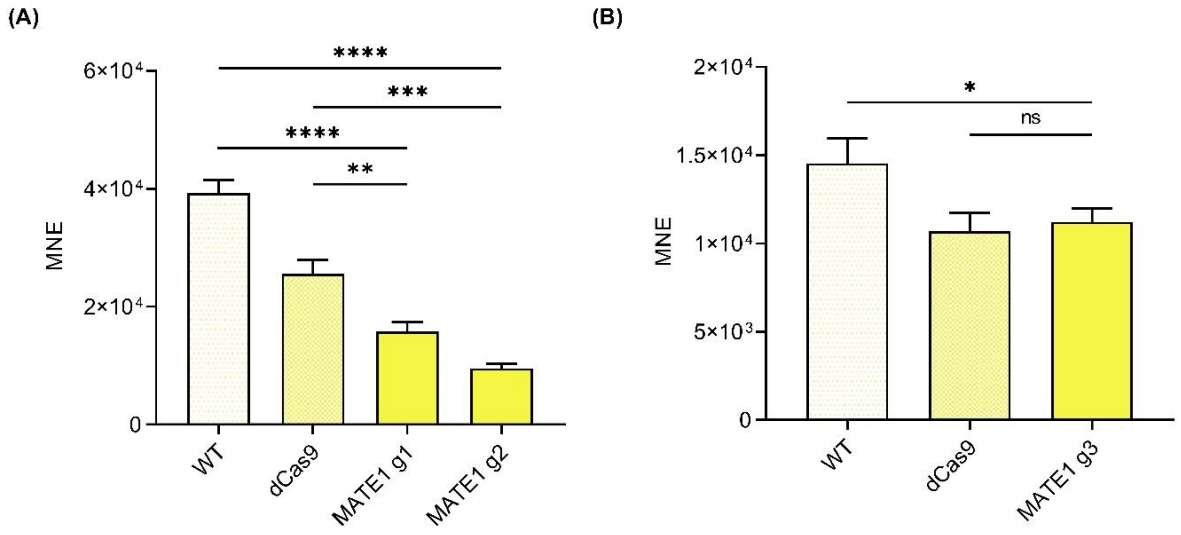
MATE1 g3 teško se mogu donositi bilo kakvi zaključci (Slika 18, B) zbog izrazite varijabilnosti u C_t vrijednostima HKG-a u kontrolnim uzorcima (dCas9 i WT) u turi C (Tablica 21).

Tablica 20: Prikaz dobivenih C_t vrijednosti za HKG=*RPLP0* u eksperimentu pokušaja utišavanja *MATE1* gena pomoću sgRNA g1 i g2 (tura A). (WT - cDNA izolirana iz netretiranih stanica divljeg tipa, dCas9 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih s dCas9, *MATE1* g - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih kompleksom dCas9-sgRNA g1 ili g2, NTC (engl. non-template control) - umjesto uzorka cDNA stavljena je ultračista voda kao kontrolni uzorak, SD - standardna devijacija, %SD - relativna standardna devijacija).

Ct (HKG=*RPLP0*)	**WT**	**dCas9**	***MATE1* g1**	***MATE1* g2**	**NTC**
1	15,58	15,86	15,54	16,35	0
2	15,58	15,98	15,61	16,42	0
3	15,70	15,72	15,70	16,47	0
srednja vrijednost	**15,62**	**15,86**	**15,62**	**16,41**	**0**
SD	0,07	0,13	0,08	0,06	/
%SD	0,46	0,82	0,53	0,35	/
delta od medijana	0,00	-0,24	0,00	-0,79	/

Tablica 21: Prikaz dobivenih C_t vrijednosti za HKG=*RPLP0* u eksperimentu pokušaja utišavanja *MATE1* gena pomoću sgRNA g3 (tura C). (WT - cDNA izolirana iz netretiranih stanica divljeg tipa, dCas9 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih s dCas9, *MATE1* g3 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih kompleksom dCas9-sgRNA g3, NTC (engl. non-template control) - umjesto uzorka cDNA stavljena je ultračista voda kao kontrolni uzorak, SD - standardna devijacija, %SD - relativna standardna devijacija).

Ct (HKG=*RPLP0*)	**WT**	**dCas9**	***MATE1* g3**	**NTC**
1	15,37	15,79	17,00	0
2	15,43	15,92	17,00	0
3	15,50	15,92	17,10	0
srednja vrijednost	**15,43**	**15,88**	**17,04**	**0**
SD	0,06	0,07	0,06	/
%SD	0,40	0,45	0,34	/
delta od medijana	-0,98	-0,53	0,63	/



Slika 18: Grafički prikaz razina ekspresije gena *MATE1* (na razini mRNA) u HEK293T stanicama. **(A)** Graf A prikazuje MNE za turu A, odnosno uzorke *MATE1* g1 i g2. **(B)** Graf B prikazuje MNE za turu C, odnosno uzorak *MATE1* g3. Svaki stupac predstavlja srednju normaliziranu ekspresiju, MNE iz 3 biološke replike +/- SD. Statistički značajne promjene kao rezultat neuparenog Studentovog t-testa prikazane su kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ili **** ($p < 0,0001$), a statistički neznačajne promjene označene su s ns. (WT - netransfecirane stanice divljeg tipa, dCas9 - stanice transfecirane s dCas9, *MATE1* g - stanice transfecirane kompleksom dCas9-sgRNA g1, g2 ili g3).

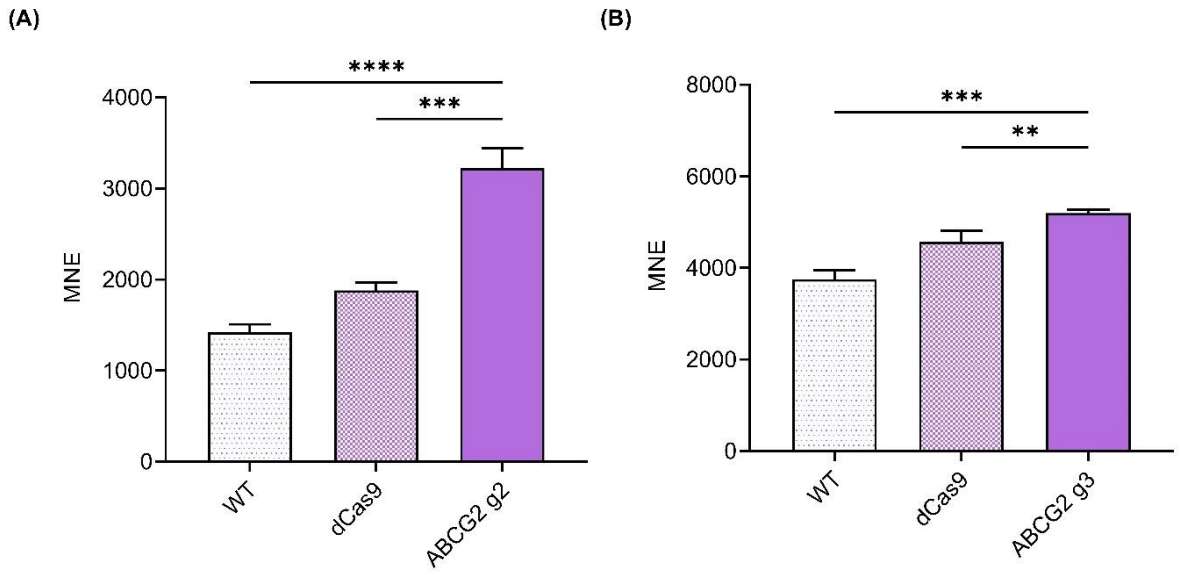
Za predstavljanje rezultata ekspresije *ABCG2* gena, također su potrebna dva grafa (Slika 19), od kojih jedan prikazuje uzorak *ABCG2* g2 koji je obrađen u turi C, a drugi graf prikazuje uzorak *ABCG2* g3 koji je obrađen u turi A. Uzorak *ABCG2* g1 izbačen je iz daljnjih eksperimenata zbog izrazito niske koncentracije ukupne RNA od 2,16 ng/μL (Tablica 14). Kod uzorka *ABCG2* g2 vidljiv je sličan efekt kao i kod uzorka *ACRC* g1, gdje je, također, razlika u C_t vrijednostima HKG-a između uzorka i kontrolnih uzoraka približno $\Delta C_t \approx 1$. Stoga se dobiva lažni efekt povećane ekspresije gena u uzorcima s dodanom sgRNA (Tablica 19, 22). Iz tog razloga nemoguće je promatrati utjecaj dCas9-sgRNA kompleksa na ekspresiju ciljnog gena (Slika 19, A). Podaci o C_t vrijednostima HKG-a za uzorak *ABCG2* g3 ukazuju na mogući raspad RNA, što se može zaključiti iz povećanja C_t vrijednosti *RPLP0* gena u tom uzorku (Tablica 23). Stoga se podaci o MNE za taj uzorak ne mogu promatrati u svrhu usporedbe ekspresije s kontrolnim uzorcima dCas9 i WT (Slika 19, B).

Tablica 22: Prikaz dobivenih C_t vrijednosti za HKG=*RPLP0* u eksperimentu pokušaja utišavanja *ABCG2* gena pomoću sgRNA g2 (tura C). (WT - cDNA izolirana iz netretiranih stanica divljeg tipa, dCas9 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih s dCas9, *ABCG2* g2 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih kompleksom dCas9-sgRNA g2, NTC (engl. non-template control) - umjesto uzorka cDNA stavljena je ultračista voda kao kontrolni uzorak, SD - standardna devijacija, %SD - relativna standardna devijacija).

Ct (HKG=*RPLP0*)	**WT**	**dCas9**	***ABCG2* g2**	**NTC**
1	15,37	15,79	17,00	0
2	15,43	15,92	17,06	0
3	15,50	15,92	17,14	0
srednja vrijednost	**15,43**	**15,88**	**17,07**	**0**
SD	0,06	0,07	0,07	/
%SD	0,40	0,45	0,40	/
delta od medijana	-0,98	-0,53	0,66	/

Tablica 23: Prikaz dobivenih C_t vrijednosti za HKG=*RPLP0* u eksperimentu pokušaja utišavanja *ABCG2* gena pomoću sgRNA g3 (tura A). (WT - cDNA izolirana iz netretiranih stanica divljeg tipa, dCas9 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih s dCas9, *ABCG2* g3 - cDNA izolirana iz stanica transfeciranih kompleksom dCas9-sgRNA g3, NTC (engl. non-template control) - umjesto uzorka cDNA stavljena je ultračista voda kao kontrolni uzorak, SD - standardna devijacija, %SD - relativna standardna devijacija).

Ct (HKG=*RPLP0*)	**WT**	**dCas9**	***ABCG2* g3**	**NTC**
1	15,58	15,86	16,08	0
2	15,58	15,98	16,18	0
3	15,70	15,72	16,23	0
srednja vrijednost	**15,62**	**15,86**	**16,16**	**0**
SD	0,07	0,13	0,08	/
%SD	0,46	0,82	0,49	/
delta od medijana	0,00	-0,24	-0,55	/



Slika 19: Grafički prikaz razina ekspresije gena *ABCG2* (na razini mRNA) u HEK293T stanicama. **(A)** Graf A prikazuje MNE za turu C, odnosno uzorak *ABCG2* g2. **(B)** Graf B prikazuje MNE za turu A, odnosno uzorak *ABCG2* g3. Svaki stupac predstavlja srednju normaliziranu ekspresiju, MNE iz 3 biološke replike +/- SD. Statistički značajne promjene kao rezultat neuparenog Studentovog t-testa prikazane su kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ili **** ($p < 0,0001$), a statistički neznačajne promjene označene su s ns. (WT - netransfecirane stanice divljeg tipa, dCas9 - stanice transfecirane s dCas9, *ABCG2* g - stanice transfecirane kompleksom dCas9-sgRNA g2 ili g3).

U konačnici, kada se sagledaju svi rezultati eksperimenta 3 „*Procjena efikasnosti utišavanja neesencijalnih, srednje eksprimiranih gena u HEK293T stanicama*“, može se izvesti nekoliko zaključaka. Jedan od većih problema ovoga eksperimenta bila je toksičnost transfekcijske smjese. Iz te činjenice može se zaključiti da ciljanje esencijalnih HKG gena nije bio ključan faktor za postojanje toksičnog efekta na stanicama. Toksični efekt uzrokovao je mali prinos tijekom izolacije ukupne RNA iz stanica te se zbog toga u samu qPCR analizu moralo ulaziti s manjim koncentracijama cDNA, nego što protokol nalaže. Najveći efekt smanjene koncentracije cDNA kalupa vidljiv je u turi C, u kojoj je koncentracija normirana na 2,25 ng/μL za reverznu transkripciju, a u qPCR se ulazilo s γ(cDNA) = 0,29 ng/μL. Navedena koncentracija manja je za više od 3 puta od koncentracije cDNA s kojom se, po protokolu, ulazi u qPCR analizu [γ(cDNA) = 1,0 ng/μL]. C_t vrijednosti HKG-a uzoraka u turi C dosta odstupaju od medijana te je najveći problem što i sami kontrolni uzorci (dCas9, WT) odstupaju od medijana. Zbog male količine cDNA, dobiva se povećani efekt varijabilnosti C_t vrijednosti u uzorcima, potencijalno zbog težeg normiranja manjih koncentracija RNA, pogrešaka u pipetiranju i slično.

U većini slučajeva ekspresija ciljnog gena promijenila se i s dodatkom samog dCas9 proteina. Iz toga se može zaključiti da sama transfekcija uzrokuje određenu promjenu u ekspresiji, vjerojatno zbog prilagodbe na toksični efekt koji sama transfekcija uzrokuje u stanicama. Stoga je u eksperimentima ekspresije, uz WT kontrolni uzorak, nužno koristiti i dCas9 kao kontrolni uzorak. Ispravnije je promjene u ekspresiji uspoređivati s kontrolnim dCas9 uzorkom, koji je bolja kontrola od WT-a jer obuhvaća i utjecaj transfekcije.

Ako se promotri tablica sa svim skupnim podacima iz ovog eksperimenta (Tablica 24), najveći postotak utišavanja vidi se redom u uzorcima *MATE1* g2, *MATE1* g1,*TDP2* g1 te *TDP2* g2. Najveći detektirani postotak utišavanja odnosi se na uzorak u kojem se koristila sgRNA *MATE1* g2, te taj postotak okvirno iznosi 60 % u odnosu na dCas9 kontrolni uzorak. Nažalost, u tom uzorku detektiran je i manji raspad RNA. Međutim, uzimajući u obzir obim raspada RNA, može se i dalje procijeniti da se radi o dovoljno velikom postotku utišavanja ciljnog gena. Uzevši i to u obzir, odlučeno je nastaviti s daljnjim eksperimentima s sgRNA *MATE1* g2. Iako je i *MATE1* g1 uzorak imao detektirano smanjenje ekspresije od 38,37 %, uspoređujući položaj sgRNA g1 i g2 na ciljnom *MATE1* genu, shvaćeno je kako su položeni vrlo blizu jedan drugome. Time se može zaključiti da je mjesto ciljanja za gen *MATE1* dobro pogođeno te da ima smisla ulaziti u buduće eksperimente s bilo kojom od ove dvije sgRNA, ali se ipak prednost dala g2 jer izaziva jače utišavanje i kad se raspad RNA uzme u obzir. Daljnji eksperimenti fokusirani su na optimizaciju transfekcije HEK293T stanica s kompleksom dCas9-sgRNA *MATE1* g2 kako bi se smanjio toksičan efekt, a zadržao učinak utišavanja ciljnog *MATE1* gena.

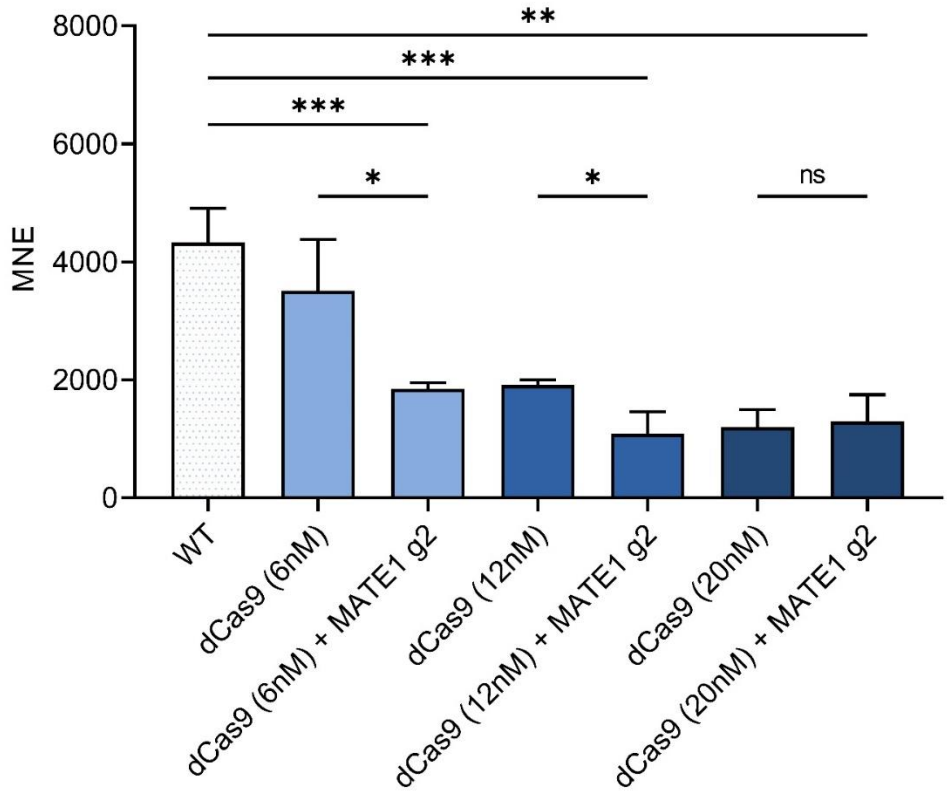
Tablica 24: Skupni prikaz svih korištenih sgRNA u trećem eksperimentu i % efikasnosti utišavanja ciljnih gena pomoću navedenih sgRNA u usporedbi s kontrolnim uzorcima (dCas9, WT). Za svaki uzorak u tablici navedena je i tura u kojoj je ukupna RNA tog uzorka izolirana i prevedena u cDNA. Svi uzorci iz ture C osjenčani su svijetlo plavom bojom te se njih ne može promatrati u svrhu procjene utišavanja ciljnih gena zbog neodgovarajućih kontrolnih uzoraka. Dodatno, svi uzorci u kojima se sumnja na potencijalni raspad RNA ili eventualne eksperimentalne pogreške osjenčani su svijetlo zelenom bojom. Boldani su % utišavanja u odnosu na kontrolni dCas9 uzorak koji su se statistički pokazali signifikantnim ($p < 0,05$) pomoću neuparenog Studentovog t-testa.

sgRNA OZNAKA	% UTIŠAVANJA U ODNOSU NA KONTROLNI dCas9 UZORAK	% UTIŠAVANJA U ODNOSU NA KONTROLNI WT UZORAK	TURA U KOJOJ SU PREVEDENI U cDNA
TDP1 g1	18,84	33,23	Tura A
TDP2 g1	**26,73**	25,29	Tura A
TDP2 g2	**19,24**	17,65	Tura A
SPRTN g1	-14,03	-43,57	Tura C
SPRTN g2	10,75	17,63	Tura A
SPRTN g3	-16,05	-46,11	Tura C
ACRC g1	-93,57	-92,34	Tura B
MATE1 g1	**38,37**	59,84	Tura A
MATE1 g2	**62,72**	75,71	Tura A
MATE1 g3	-5,13	22,86	Tura C
ABCG2 g2	-71,47	-127,26	Tura C
ABCG2 g3	-13,71	-38,36	Tura A

4.5.3. Optimizacija uvjeta transfekcije dCas9-sgRNA *MATE1* g2 u HEK293T stanicama iz aspekta qPCR analize

Na temelju zaključaka iz prethodnog eksperimenta, odlučeno je nastaviti optimiranje uvjeta transfekcije ciljajući gen *MATE1* pomoću sgRNA g2. Eksperiment je osmišljen na način da se stanice transfeciraju kada su na 90 % konfluencije ($15 \cdot 10^6$ stanica/mL) jer je u prijašnjim eksperimentima pokazano kako je na taj način najmanje izražena transfekcijska toksičnost (Slika 11). Korištene su 3 različite koncentracije dCas9 proteina: (1) 6 nM, (2) 12 nM, i (3) 20 nM. Provedena je qPCR analiza te su dobiveni rezultati prikazani na Slici 20. Iz navedenog se može zaključiti kako se dobra razina utišavanja postiže već s koncentracijama dCas9 od 6 nM. Efikasnost utišavanja *MATE1* gena pomoću dCas9-sgRNA g2 kompleksa s koncentracijom

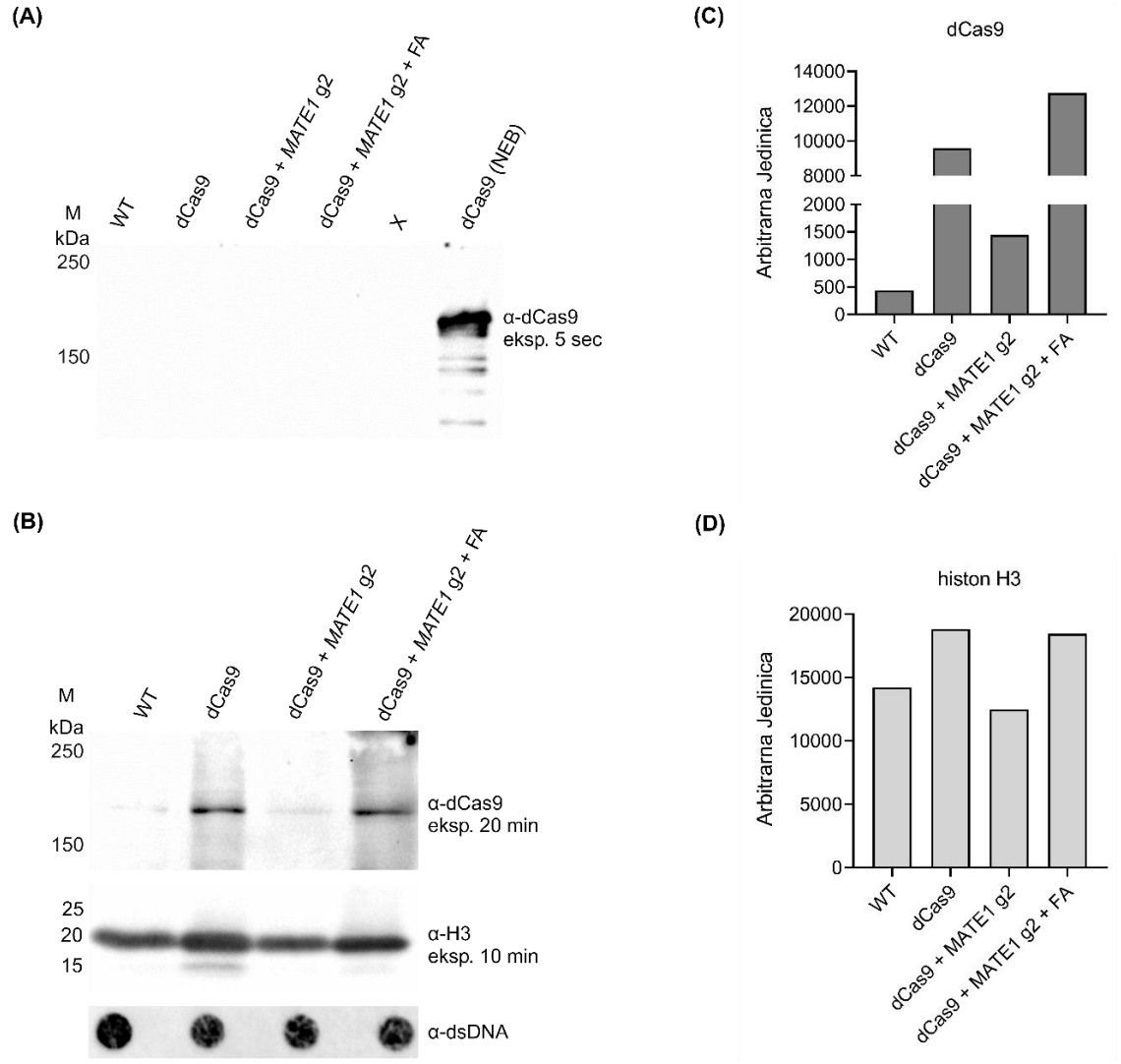
c(dCas9) = 6 nM iznosi 47,40 % u odnosu na kontrolni dCas9 uzorak i 57,34 % u odnosu na kontrolni WT uzorak. Pri koncentraciji dCas9 od 12 nM postiže se efikasnost utišavanja *MATE1* gena pomoću dCas9-sgRNA g2 od 43,18 % u odnosu na kontrolni dCas9 uzorak i 74,90 % u odnosu na WT uzorak. Ovime su potvrđene dobivene efikasnosti utišavanja *MATE1* gena pomoću dCas9-sgRNA g2 kompleksa pri koncentraciji dCas9 od 12 nM iz prethodnog eksperimenta (Slika 18). Međutim, povećanjem koncentracija dCas9 proteina, primjećuje se toksični efekt na stanice te je stoga prividno detektirano snažnije utišavanje i primjenom samog dCas9 proteina. Zadovoljavajuća efikasnost utišavanja postignuta je već pri koncentraciji dCas9 od 6 nM, stoga se RADAR eksperiment provodio u uvjetima 90 % konfluentnih stanica i s koncentracijom dCas9 proteina od 6 nM.



Slika 20: Grafički prikaz razina ekspresije gena *MATE1* (na razini mRNA) u HEK293T stanicama. Svaki stupac predstavlja srednju normaliziranu ekspresiju, MNE iz 3 biološke replike +/- SD. Statistički značajne promjene kao rezultat neuparenog Studentovog t-testa prikazane su kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) ili **** ($p < 0,0001$), a statistički neznačajne promjene označene su s ns. (WT - netransfecirane stanice divljeg tipa, dCas9 (X nM) - stanice transfecirane s dCas9 u koncentraciji od 6, 12 ili 20 nM, dCas9 (X nM)+*MATE1* g2 - stanice transfecirane kompleksom dCas9-sgRNA g2 pri koncentracijama dCas9 od 6, 12 ili 20 nM).

4.6. Izolacija DPC-eva iz HEK293T stanica nakon transfekcije s dCas9-sgRNA kompleksom

Za potrebe izolacije DPC-eva pomoću RADAR metode, stanice su nasađene u mali flask (T25) u koncentraciji od $15 \cdot 10^6$ stanica/mL (5 ml po flasku), kako bi na dan transfekcije dosegle okvirno 90 %-tnu konfluenciju. Eksperiment je proveden korištenjem 4 uzorka: (1) WT kontrola, (2) dCas9 (6 nM), (3) dCas9 (6 nM) + sgRNA *MATE1* g2 (6 nM), (4) dCas9 (6 nM) + sgRNA *MATE1* g2 (6 nM) + formaldehid (FA, 10 mM, 30 min). Transfekcijska smjesa inkubirana je 14 - 18h, a stanice su sakupljene 72h nakon transfekcije. Modificirana RADAR metoda provedena je u svrhu izolacije ukupnih staničnih DPC-eva. Uzorci su normalizirani prema količini DNA te je uspješna normalizacija potvrđena Dot-blot metodom pomoću primarnog antitijela koje prepoznaje dvolančanu DNA (dsDNA, engl. *double-stranded DNA*) (Abcam, 1:7000) (Slika 21, B). Izolirani proteini, koji su tvorili DPC-eve u stanicama, podvrgnuti su Western blot metodi, u kojoj se dCas9 (160 kDa) detektirao specifičnim primarnim antitijelom za Cas9 (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000), dok je histon H3 (20 kDa) vizualiziran pomoću antitijela za histon H3 (Cell Signaling, 1:3000). Detekcija histona H3 služila je kao kontrola izolacije DPC-eva, jer je dio molekula histona H3 endogeno prisutno kao DPC-evi u stanicama (Kiianitsa i Maizels, 2020; Anticevic *i sur.*, 2023). U svrhu kontrole antitijela za Cas9, na gel je nanesena i kontrola koja se sastojala od pročišćenog dCas9 proteina (New England Biolabs, M0652S) u količini od 5 ng (Slika 21, A). Rezultati Western blot analize prikazani su na Slici 21.



Slika 21: Prikaz rezultata Western blot analize DPC izolata. **(A)** Slika Western bot analize koristeći antitijelo specifično za Cas9 (ekspozicija 5 sekundi), **(B)** Slika Western blot analize koristeći antitijelo specifično za Cas9 (ekspozicija 20 minuta, nanesen je ekvivalent DPC-eva vezan za 2,5 µg DNA po jažici) i za histon H3 (ekspozicija 10 minuta, nanesen je ekvivalent DPC-eva vezan za 1,0 µg DNA po jažici) i Dot-blot membrane koristeći antitijelo specifično za dvolančanu DNA (2 ng po jažici); **(C)** Kvantifikacija dCas9-DPC-eva sa slike B koristeći ImageJ i **(D)** Kvantifikacija H3-DPC-eva sa slike B koristeći ImageJ. Uzorci: DPC-evi izolirani iz HEK293T stanica: WT - stanice koje nisu transfecirane, dCas9 - stanice transfecirane sa dCas9 (6nM), dCas9 + *MATE1* g2 - stanice transfecirane sa dCas9/sgRNA kompleksom (6nM), dCas9 + sgRNA *MATE1* g2 + FA - stanice transfecirane sa dCas9/sgRNA kompleksom (6nM) i tretirane sa formaldehidom (10 mM, 30 min), dCas9 (NEB) - pročišćeni dCas9 (5 ng po jažici, NEB).

U prijašnjim eksperimentima pokazano je kako kompleks dCas9-sgRNA g2 uzrokuje utišavanje *MATE1* gena (Slika 18, 20) tako da inhibira proces transkripcije, posljedično smanjujući količinu stvorene *MATE1* mRNA. Pretpostavlja se da je upravo stvaranje DPC-eva blizu promotorske regije *MATE1* gena mehanizam kojim dCas9 inhibira transkripcijsku mašineriju, što je poznato svojstvo DPC-eva (Zhang, Xiong i Chen, 2020).

Rezultati potvrđuju našu pretpostavku da dCas9 stvara DPC-eve u ljudskim stanicama jer je prisutna vrpca na oko 160 kDa koja je detektirana specifičnim dCas9 protutijelom u uzorcima transfeciranim dCas9 proteinom (Slika 21, B). Naznake da se dCas9 veže kovalentno za DNA u *Escherichia coli* (*E. coli*) primijećene su i u literaturi (Sternberg *i sur.*, 2014; Jones *i sur.*, 2017). Zanimljivo je kako je u uzorku (3) „dCas9 + *MATE1* g2“, gdje je formiran kompleks dCas9-sgRNA g2, detektirana manja količina dCas9-DPC-eva u usporedbi sa uzorkom (2) „dCas9“, u kojem je transfeciran sam dCas9 protein (Slika 21, C). Ovakvi rezultati upućuju na pojačano unakrsno vezanje „slobodnog“ dCas9 proteina za DNA, od dCas9 proteina koji na sebe ima vezanu specifičnu sgRNA. Navedeno opažanje potencijalno se može objasniti steričkom smetnjom sgRNA za unakrsno povezivanje dCas9 proteina s DNA. Što znači da je za stvaranje dCas9 - DNA unakrsne veze dovoljno vezanje dCas9 proteina na DNA putem PAM sekvence. Uzorak (4) „dCas9 + *MATE1* g2 + FA“ inkubiran je 30 minuta s potentnim DPC induktorom, formaldehidom (FA, 10nM), što je pospješilo indukciju dCas9-DPC-eva u odnosu na uzorak (3), koji je također transfeciran dCas9-sgRNA kompleksom, ali bez izlaganja formaldehidu (Slika 21, C). Ovakav rezultat vjerojatno je posljedica sposobnosti formaldehida da unakrsno poveže dCas9-sgRNA kompleks na specifičnim PAM mjestima, ali i na ostalim nespecifičnim mjestima u genomskoj DNA, što izaziva veliku količinu stvorenih DNA-dCas9 unakrsnih veza.

Indukcija histon H3 DPC-eva nakon dodatka formaldehida, koja je ranije opisana (Anticevic *i sur.*, 2023), predstavlja internu kontrolu izlaganja (Slika 21, B): uzorak (4) u odnosu na uzorak (1) WT. Zanimljivo, u uzorku (2) „dCas9“ također je primijećena indukcija H3-DPC-eva (Slika 21, D). Moguće je da velika količina dCas9-DPC-eva uzrokuje i pojačani DPC popravak, te su faktori popravka smanjeno dostupni za popravak endogenih H3-DPC-eva. Poznato je da su histonski DPC-evi izrazito česti u fiziološkim uvjetima, te predstavljaju 80 % svih staničnih DPC-eva (Kiianitsa i Maizels, 2020).

Pretraživanjem literature u svrhu boljeg razumijevanja dobivenih rezultata, došlo se do nove pretpostavke u vezi mehanizma toksičnosti dCas9 proteina u ljudskim stanicama. Stvaranje unakrsnih veza između dCas9 proteina i DNA , dCas9-DPC-eva, potencijalno može biti uzrokom njegove toksičnosti u ljudskim stanicama, u kojima pojačana količina stvorenih

DPC-eva dovodi do apoptoze. U do sada objavljenim radovima, zabilježena su razna opažanja koja se slažu s našom pretpostavkom o mehanizmu toksičnosti dCas9 proteina. Zabilježeni su izraženiji toksični učinci samog dCas9 proteina u usporedbi s kompleksom dCas9-sgRNA, što je primjerice pokazano u stanicama *E. coli*, Stanice *E. Coli* u kojima je inducirana pojačana ekspresija sgRNA, pokazivale su manje izraženu toksičnost dCas9 proteina u odnosu na one stanice koje su imale nižu ekspresiju sgRNA (Nielsen i Voigt, 2014). Navedeni rezultati mogu se objasniti zasićenjem dCas9 proteina sgRNA molekulama, te posljedično manje stvaranje DPC-eva zbog steričkih smetnji sgRNA, kao što i naši rezultati indiciraju (Slika 21, B). Eksperimenti na *Chlamydia trachomatis (C. trachomatis),* također su pokazali pojačanu toksičnost slobodnog dCas9 proteina te su, uspoređujući dva različita dCas9 proteina (iz *Streptococcus pyogenes* i iz *Staphylococcus aureus*), otkrili da je toksičniji dCas9 protein imao veći broj dostupnih PAM sekvenci u genomu *C. trachomatis* (Wurihan *i sur.*, 2020). Pretpostavljeni mehanizam toksičnosti navedenih dCas9 proteina u *C. trachomatis* slaže se s našim rezultatima, u kojima se pojačano stvaraju DPC-evi kada je dCas9 slobodan i veže se po cijelom genomu na dostupnim PAM mjestima. U radu *Zhang i Voigt (2018.)* objašnjeno je kako nespecifično vezanje dCas9 na NGG sekvence (PAM sekvence) značajno doprinosi toksičnosti dCas9 proteina. Zbog višestrukog nespecifičnog vezanja dCas9 proteina bez sgRNA na brojne PAM sekvence u genomu, pojačana je vjerojatnost stvaranja dCas9-DPC-eva, stoga je i povećan njegov toksičan efekt na stanicama. Također, toksičnost dCas9 proteina korelira s njegovom koncentracijom u stanicama, što je pokazano u brojnim radovima (Nielsen i Voigt, 2014; Cui *i sur.*, 2018; Zhang i Voigt, 2018), kao i u poglavlju 4.3. ovog rada. Povećana koncentracija dCas9 proteina lakše okupira veći broj PAM sekvenci te stvara veću količinu DPC-eva, što podupire pretpostavljeni mehanizam toksičnosti. Međutim, dodatni eksperimenti su potrebni kako bi navedeni argumenti bili eksperimentalno potvrđeni. Razumijevanje mehanizma toksičnosti dCas9 proteina uvelike bi doprinijelo budućim eksperimentima s CRISPR/dCas9 tehnologijom te bi omogućilo provođenje specifičnih modifikacija na dCas9 proteinu, kako bi dCas9 pokazivao što manju toksičnost i što veći efekt utišavanja ciljnih gena.

Dokaz da dCas9 tvori DPC i da u kompleksu s sgRNA uzrokuje utišavanje ciljnog gena otvara vrata uporabe dCas9 kao modelnog sustava za mjerenje DPCR-a u ljudskim stanicama. Razvitak navedene metode uvelike bi utjecao na polje DNA popravka i bolje razumijevanje popravka DPC-eva kao jednih od najčešćih i najtoksičnijih DNA lezija. Velika prednost dCas9 metode za proučavanje DPCR-a je upravo mogućnost kvantifikacije popravka dCas9-DPC-a pomoću izrazito osjetljive RT-qPCR analize. U budućim projektima, pokazat će se uporabna moć dCas9 proteina kao modelnog DPC-a.

5. ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata dobivenih u ovom radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Korištenjem sintetiziranih sgRNA u kompleksu s dCas9 proteinom postignuto je statistički značajno utišavanje gena *TDP2* (sgRNA g1 i g2) i *MATE1* (sgRNA g1 i g2) u odnosu na kontrolni dCas9 uzorak.
2. Mehanizam utišavanja ciljnih gena pomoću dCas9-sgRNA kompleksa temelji se na stvaranju DPC-eva na ciljnom mjestu u genu, koji sterički onemogućuju progresiju transkripcije.
3. Modelni sustav kojeg čini dCas9-sgRNA-DPC ima potencijal za uporabu u svrhu praćenja kinetike popravka dCas9-DPC-a u ljudskim stanicama s izrazito preciznom kvantifikacijom pomoću RT-qPCR-a.
4. Transfekcija dCas9 proteina je izrazito toksična u ljudskim HEK293T stanicama te se stvaranje DNA-dCas9 unakrsnih veza može tumačiti kao potencijalni mehanizam toksičnosti dCas9 u ljudskim stanicama.
5. Dokazano je da dCas9 tvori DPC-eve u ljudskim stanicama, sam i u kompleksu sa specifičnom sgRNA, te se količina stvorenih dCas9-DPC-eva povećava dodatkom DPC induktora, formaldehida.
6. Optimalni uvjeti transfekcije dCas9-sgRNA kompleksa s DharmaFECT reagensom postignuti su korištenjem 6 nM koncentracije dCas9 proteina i iste koncentracije specifične sgRNA na 90 % konfluentnim stanicama te inkubacijom transfekcijske smjese od 14 - 18 sati i skupljanjem stanica 72 - 120 sati nakon transfekcije.
7. Ispravnije je promjene u ekspresiji gena uspoređivati s kontrolnim dCas9 uzorkom, koji je bolja kontrola od WT-a jer obuhvaća i utjecaj transfekcije na ekspresiju u stanicama.

6. ZAHVALE

Zahvaljujem mentoricama dr. sc. Marti Popović i prof. dr. sc. Olgi Gornik Kljaić na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za izradu ovog rada te potpori tijekom njegovog pisanja.

Zahvaljujem dr. sc. Ivanu Antičeviću na velikom strpljenju, prenesenom znanju i usmjeravanju tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela ovog rada.

Hvala i svim članovima istraživačke grupe za DNA oštećenje i popravak na Institutu Ruđer Bošković na ugodnoj atmosferi i dobrom društvu u laboratoriju.

7. POPIS LITERATURE

A. Hall, T. (1999) ‘BioEdit a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.’, *Nucleic Acids Symposium Series*, pp. 95–98.

Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J. i Ram, S.J. (2005) ‘Image processing with ImageJ Part II’, *Biophotonics International*, 11(7), pp. 36–43.

Amidon, K.M. i Eichman, B.F. (2020) ‘Structural biology of DNA abasic site protection by SRAP proteins’, *DNA Repair*, 94, pp. 1–19. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102903.

Anticevic, I. *i sur.* (2023) ‘Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) and SPRTN protease repair histone 3 and topoisomerase 1 DNA-protein crosslinks in vivo’, *Open Biology*, 13(10). Dostupno na: https://doi.org/10.1098/rsob.230113.

Balakirev, M.Y. *i sur.* (2015) ‘Wss1 metalloprotease partners with Cdc48/Doa1 in processing genotoxic SUMO conjugates’, *eLife*, 4(September2015), pp. 1–30. Dostupno na: https://doi.org/10.7554/eLife.06763.

Bhargava, V. *i sur.* (2020) ‘GCNA Preserves Genome Integrity and Fertility Across Species’, *Developmental Cell*, 52(1), pp. 38-52.e10. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.11.007.

Bikard, D. *i sur.* (2013) ‘Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system’, *Nucleic Acids Research*, 41(15), pp. 7429–7437. Dostupno na: https://doi.org/10.1093/nar/gkt520.

Brocken, D.J.W., Tark-Dame, M. i Dame, R.T. (2018) ‘dCas9: A versatile tool for epigenome editing’, *Current Issues in Molecular Biology*, 26, pp. 15–32. Dostupno na: https://doi.org/10.21775/cimb.026.01.

Cai, R. *i sur.* (2023) ‘CRISPR/dCas9 Tools: Epigenetic Mechanism and Application in Gene Transcriptional Regulation’, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19). Dostupno na: https://doi.org/10.3390/ijms241914865.

Chatterjee, N. i Walker, G.C. (2017) ‘Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis’, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), pp. 235–263. Dostupno na: https://doi.org/10.1002/em.22087.

Ciccia, A. i Elledge, S.J. (2010) ‘The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives’, *Molecular Cell*, 40(2), pp. 179–204. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019.

Costantini, S. *i sur.* (2021) ‘Valosin-containing protein (VCP)/p97: A prognostic biomarker and therapeutic target in cancer’, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18). Dostupno na: https://doi.org/10.3390/ijms221810177.

Cui, L. *i sur.* (2018) ‘A CRISPRi screen in E. coli reveals sequence-specific toxicity of dCas9’, *Nature Communications*, 9(1), pp. 1–10. Dostupno na: https://doi.org/10.1038/s41467-018-04209-5.

Damiani, D. i Tiribelli, M. (2023) ‘ABCG2 in Acute Myeloid Leukemia: Old and New Perspectives’, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), pp. 1–19. Dostupno na: https://doi.org/10.3390/ijms24087147.

Davies, D.R. *i sur.* (2002) ‘The crystal structure of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase, Tdp1’, *Structure*, 10(2), pp. 237–248. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00707-4.

Fielden, J. *i sur.* (2018) ‘DNA protein crosslink proteolysis repair: From yeast to premature ageing and cancer in humans’, *DNA Repair*, 71(August), pp. 198–204. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.025.

Gessner, A., König, J. i Fromm, M.F. (2018) ‘Contribution of multidrug and toxin extrusion protein 1 (MATE1) to renal secretion of trimethylamine-N-oxide (TMAO)’, *Scientific Reports*, 8(1), pp. 22–24. Dostupno na: https://doi.org/10.1038/s41598-018-25139-8.

Gilbert, L.A. *i sur.* (2013) ‘CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes’, *Cell*, 154(2), p. 442. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044.

Gilbert, L.A. *i sur.* (2014) ‘Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation’, *Cell*, 159(3), pp. 647–661. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.029.

Glumac, M. *i sur.* (2023) ‘SPRTN-dependent DPC degradation precedes repair of damaged DNA: A proof of concept revealed by the STAR assay’, *Nucleic Acids Research*, 51(6), p. E35. Dostupno na: https://doi.org/10.1093/nar/gkad022.

Gómez-Herreros, F. *i sur.* (2014) ‘TDP2 protects transcription from abortive topoisomerase activity and is required for normal neural function’, *Nature Genetics*, 46(5), pp. 516–521.

Dostupno na: https://doi.org/10.1038/ng.2929.

Hoa, N.N. *i sur.* (2016) 'Mre11 Is Essential for the Removal of Lethal Topoisomerase 2 Covalent Cleavage Complexes', *Molecular Cell*, 64(3), pp. 580–592. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.011.

Interthal, H. *i sur.* (2005) 'SCAN1 mutant Tdp1 accumulates the enzyme-DNA intermediate and causes camptothecin hypersensitivity', *EMBO Journal*, 24(12), pp. 2224–2233. Dostupno na: https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600694.

Ivankin, D.I. *i sur.* (2023) 'Novel TDP1 Inhibitors: Disubstituted Thiazolidine-2,4-Diones Containing Monoterpene Moieties', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), pp. 1–17. Dostupno na: https://doi.org/10.3390/ijms24043834.

Jackson, S.P. i Bartek, J. (2009) 'The DNA-damage response in human biology and disease', *Nature*, 461(7267), pp. 1071–1078. Dostupno na: https://doi.org/10.1038/nature08467.

Jansen, R. *i sur.* (2002) 'Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes', *Molecular Microbiology*, 43(6), pp. 1565–1575. Dostupno na: https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.

Jiang, F. i Doudna, J.A. (2017) 'CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms', *Annual Review of Biophysics*, 46(1), pp. 505–529. Dostupno na: https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822.

Jinek, M. *i sur.* (2012) 'A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity', *Science*, 337(6096), pp. 816–821. Dostupno na: https://doi.org/10.1126/science.1225829.

Jones, D.L. *i sur.* (2017) 'Kinetics of dCas9 target search in Escherichia coli', *Science*, 357(6358), pp. 1420–1424. Dostupno na: https://doi.org/10.1126/science.aah7084.

Juhasz, S. *i sur.* (2012) 'Characterization of human Spartan/C1orf124, an ubiquitin-PCNA interacting regulator of DNA damage tolerance', *Nucleic Acids Research*, 40(21), pp. 10795–10808. Dostupno na: https://doi.org/10.1093/nar/gks850.

Kiianitsa, K. i Maizels, N. (2013) 'A rapid and sensitive assay for DNA-protein covalent complexes in living cells', *Nucleic Acids Research*, 41(9), pp. 1–7. Dostupno na: https://doi.org/10.1093/nar/gkt171.

Kiianitsa, K. i Maizels, N. (2014) ‘Ultrasensitive isolation, identification and quantification of DNA-protein adducts by ELISA-based RADAR assay’, *Nucleic Acids Research*, 42(13), pp. 1–12. Dostupno na: https://doi.org/10.1093/nar/gku490.

Kiianitsa, K. i Maizels, N. (2020) ‘The “adductome”: A limited repertoire of adducted proteins in human cells’, *DNA Repair*, 89(December 2019), p. 102825. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102825.

Kojima, Y. *i sur.* (2020) ‘FAM111A protects replication forks from protein obstacles via its trypsin-like domain’, *Nature Communications*, 11(1). Dostupno na: https://doi.org/10.1038/s41467-020-15170-7.

Lauten, M. *i sur.* (2006) ‘Unsupervised proteome analysis of human leukaemia cells identifies the Valosin-containing protein as a putative marker for glucocorticoid resistance’, *Leukemia*, 20(5), pp. 820–826. Dostupno na: https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404162.

Lee, K.C. *i sur.* (2012) ‘MRE11 facilitates the removal of human topoisomerase II complexes from genomic DNA’, *Biology Open*, 1(9), pp. 863–873. Dostupno na: https://doi.org/10.1242/bio.20121834.

Leinonen, H. *i sur.* (2021) ‘A p97/valosin-containing protein inhibitor drug CB-5083 has a potent but reversible off-target effect on phosphodiesterase-6’, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 378(1), pp. 31–41. Dostupno na: https://doi.org/10.1124/jpet.120.000486.

Lessel, D. *i sur.* (2014) ‘Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features’, *Nature Genetics*, 46(11), pp. 1239–1244. Dostupno na: https://doi.org/10.1038/ng.3103.

Li, C. *i sur.* (2021) ‘p97/VCP is highly expressed in the stem-like cells of breast cancer and controls cancer stemness partly through the unfolded protein response’, *Cell Death and Disease*, 12(4). Dostupno na: https://doi.org/10.1038/s41419-021-03555-5.

Li, F. *i sur.* (2019) ‘Structural Insight into DNA-Dependent Activation of Human Metalloprotease Spartan’, *Cell Reports*, 26(12), pp. 3336-3346.e4. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.082.

Lin, C.P. *i sur.* (2008) ‘A ubiquitin-proteasome pathway for the repair of topoisomerase I-DNA covalent complexes’, *Journal of Biological Chemistry*, 283(30), pp. 21074–21083. Dostupno na:

https://doi.org/10.1074/jbc.M803493200.

Maede, Y. *i sur.* (2014) 'Differential and Common DNA Repair Pathways for Topoisomerase I- and II-Targeted Drugs in a Genetic DT40 Repair Cell Screen Panel', *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(1), pp. 214–220. Dostupno na: https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0551.

Modrich, P. i Lahue, R. (1996) 'Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology', *Annual Review of Biochemistry*, 65, pp. 101–133. Dostupno na: https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.000533.

Modzelewski, A.J. *i sur.* (2018) 'Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology', *Nature Publishing Group*, 13(6), pp. 1253–1274. Dostupno na: https://doi.org/10.1038/nprot.2018.012.

Moon, J. *i sur.* (2023) 'DNA Damage and Its Role in Cancer Therapeutics', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), pp. 1–19. Dostupno na: https://doi.org/10.3390/ijms24054741.

Moreno-Mateos, M.A. *i sur.* (2015) 'CRISPRscan : designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo', 12(10). Dostupno na: https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nmeth.3543.

Mosbech, A. *i sur.* (2012) 'DVC1 (C1orf124) is a DNA damage-targeting p97 adaptor that promotes ubiquitin-dependent responses to replication blocks', *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(11), pp. 1084–1092. Dostupno na: https://doi.org/10.1038/nsmb.2395.

Murai, J. *i sur.* (2013) 'PARPi trap PARP1+2', *Cancer research*, 72(21), pp. 5588–5599. Dostupno na: https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2753.Differential.

Nakano, T. *i sur.* (2009) 'Homologous recombination but not nucleotide excision repair plays a pivotal role in tolerance of DNA-protein cross-links in mammalian cells', *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), pp. 27065–27076. Dostupno na: https://doi.org/10.1074/jbc.M109.019174.

Nidhi, S. *i sur.* (2021) 'Novel crispr–cas systems: An updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), pp. 1–42. Dostupno na: https://doi.org/10.3390/ijms22073327.

Nielsen, A.A. i Voigt, C.A. (2014) ' Multi-input CRISPR / C as genetic circuits that interface host regulatory networks ', *Molecular Systems Biology*, 10(11), pp. 1–11. Dostupno na: https://doi.org/10.15252/msb.20145735.

Oleinick, N.L. *i sur.* (1987) ‘The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells’, *British Journal of Cancer*, 55(SUPPL. 8), pp. 135–140.

Pegg, A.E. (2011) ‘Multifaceted Roles of Alkyltransferase and Related Proteins in DNA Repair, DNA Damage, Resistance to Chemotherapy, and Research Tools’, *Chemical Research in Toxicology*, 24(5), pp. 618–639. Dostupno na: https://doi.org/10.1021/tx200031q.

Pommier, Y. *i sur.* (2014) ‘Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2)’, *DNA Repair*, 19, pp. 114–129. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.020.

Pommier, Y. *i sur.* (2022) ‘Human topoisomerases and their roles in genome stability and organization’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(6), pp. 407–427. Dostupno na: https://doi.org/10.1038/s41580-022-00452-3.

Qi, L.S. *i sur.* (2013) ‘Repurposing CRISPR as an RNA-γuided platform for sequence-specific control of gene expression’, *Cell*, 152(5), pp. 1173–1183. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022.

Ruggiano, A. i Ramadan, K. (2021) ‘DNA–protein crosslink proteases in genome stability’, *Communications Biology*, 4(1), pp. 1–11. Dostupno na: https://doi.org/10.1038/s42003-020-01539-3.

Santi, D. V., Norment, A. i Garrett, C.E. (1984) ‘Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(22 I), pp. 6993–6997. Dostupno na: https://doi.org/10.1073/pnas.81.22.6993.

Schellenberg, M.J. *i sur.* (2017) ‘ZATT (ZNF451)–mediated resolution of topoisomerase 2 DNA-protein cross-links’, *Science*, 357(6358), pp. 1412–1416. Dostupno na: https://doi.org/10.1126/science.aam6468.

Shalem, O. *i sur.* (2014) ‘Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells’, *Science*, 343(6166), pp. 84–87. Dostupno na: https://doi.org/10.1126/science.1247005.

Shibata, A. *i sur.* (2021) ‘RANBP2 mutation causing autosomal dominant acute necrotizing encephalopathy attenuates its interaction with COX11’, *Neuroscience Letters*, 763(August), p. 136173. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136173.

Simon, P. (2003) ‘Q-Gene: Processing quantitative real-time RT-PCR data’, *Bioinformatics*, 19(11), pp. 1439–1440. Dostupno na: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg157.

Skok, Ž. *i sur.* (2020) 'Dual Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II and Other Cancer-Related Targets', *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(3), pp. 884–904. Dostupno na: https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00726.

Sternberg, S.H. *i sur.* (2014) 'DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9', *Nature*, 507(7490), pp. 62–67. Dostupno na: https://doi.org/10.1038/nature13011.

Stingele, J. *i sur.* (2014) 'A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair', *Cell*, 158(2), pp. 327–338. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.053.

Stingele, J. *i sur.* (2016) 'Mechanism and Regulation of DNA-Protein Crosslink Repair by the DNA-Dependent Metalloprotease SPRTN', *Molecular Cell*, 64(4), pp. 688–703. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.031.

Stingele, J., Bellelli, R. i Boulton, S.J. (2017) 'Mechanisms of DNA-protein crosslink repair', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(9), pp. 563–573. Dostupno na: https://doi.org/10.1038/nrm.2017.56.

Stingele, J., Habermann, B. i Jentsch, S. (2015) 'DNA-protein crosslink repair: Proteases as DNA repair enzymes', *Trends in Biochemical Sciences*, 40(2), pp. 67–71. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.012.

Stoll, B.J. *i sur.* (2016) 'A homozygous splice variant in ATP5PO, disrupts mitochondrial complex V function and causes Leigh syndrome in two unrelated families', 314(10), pp. 1039–1051. Dostupno na: https://doi.org/10.1002/jimd.12526.A.

Sun, Y. *i sur.* (2020) 'Debulking of topoisomerase DNA-protein crosslinks (TOP-DPC) by the proteasome, non-proteasomal and non-proteolytic pathways', *DNA Repair*, 94(July), p. 102926. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102926.

Svoboda, M. *i sur.* (2019) 'The yeast proteases Ddi1 and Wss1 are both involved in the DNA replication stress response', *DNA Repair*, 80(May), pp. 45–51. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.06.008.

Takashima, H. *i sur.* (2002) 'Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy', *Nature Genetics*, 32(2), pp. 267–272. Dostupno na: https://doi.org/10.1038/ng987.

Tom, R., Bisson, L. i Durocher, Y. (2008) 'Transfection of Adherent HEK293-EBNA1 Cells in a Six-Well Plate with Branched PEI for Production of Recombinant Proteins', *Cold Spring Harbor*

Protocols, 2008(3), p. pdb.prot4978. Dostupno na: https://doi.org/10.1101/pdb.prot4978.

Torrecilla, I. *i sur.* (2023) ‘Isolation and detection of DNA–protein crosslinks in mammalian cells’, *Nucleic Acids Research*, pp. 1–23. Dostupno na: https://doi.org/10.1093/nar/gkad1178.

Tretyakova, N.Y., Groehler, A. i Ji, S. (2015) ‘DNA-Protein Cross-Links: Formation, Structural Identities, and Biological Outcomes’, *Accounts of Chemical Research*, 48(6), pp. 1631–1644. Dostupno na: https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00056.

Vaz, B. *i sur.* (2016) ‘Metalloprotease SPRTN/DVC1 Orchestrates Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair’, *Molecular Cell*, 64(4), pp. 704–719. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.032.

Vaz, B., Popovic, M. i Ramadan, K. (2017) ‘DNA–Protein Crosslink Proteolysis Repair’, *Trends in Biochemical Sciences*, 42(6), pp. 483–495. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.03.005.

Vinograd, J. (1957) ‘Equilibrium Sedimentation of Macromolecules in’, pp. 581–588.

Weickert, P. *i sur.* (2023) ‘SPRTN patient variants cause global-genome DNA-protein crosslink repair defects’, *Nature Communications*, 14(1), pp. 1–14. Dostupno na: https://doi.org/10.1038/s41467-023-35988-1.

Wilson, K.A., Kellie, J.L. i Wetmore, S.D. (2014) ‘DNA-protein π-interactions in nature: Abundance, structure, composition and strength of contacts between aromatic amino acids and DNA nucleobases or deoxyribose sugar’, *Nucleic Acids Research*, 42(10), pp. 6726–6741. Dostupno na: https://doi.org/10.1093/nar/gku269.

Wurihan, W. *i sur.* (2020) ‘Nonspecific toxicities of Streptococcus pyogenes and Staphylococcus aureus dCas9 in Chlamydia trachomatis’, *Pathogens and Disease*, 77(9), pp. 1–8. Dostupno na: https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa005.

Yamamoto, H. i Hirasawa, A. (2022) ‘Homologous recombination deficiencies and hereditary tumors’, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). Dostupno na: https://doi.org/10.3390/ijms23010348.

Yamamoto, S. *i sur.* (2004) ‘Expression of Valosin-Containing Protein in Colorectal Carcinomas as a Predictor for Disease Recurrence and Prognosis’, *Clinical Cancer Research*, 10(2), pp. 651–657. Dostupno na: https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-1576-03.

Yang, H. *i sur.* (2020) ‘Methods favoring homology-directed repair choice in response to crispr/cas9 induced-double strand breaks’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), pp. 1–20. Dostupno na: https://doi.org/10.3390/ijms21186461.

Yang, S.W. *i sur.* (1996) ‘A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21), pp. 11534–11539. Dostupno na: https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11534.

Zhang, H., Xiong, Y. i Chen, J. (2020) ‘DNA-protein cross-link repair: What do we know now?’, *Cell and Bioscience*, 10(1), pp. 1–10. Dostupno na: https://doi.org/10.1186/s13578-019-0366-z.

Zhang, L. *i sur.* (2004) ‘Detecting DNA-binding of proteins in vivo by UV-crosslinking and immunoprecipitation’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(3), pp. 705–711. Dostupno na: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.202.

Zhang, S. i Voigt, C.A. (2018) ‘Engineered dCas9 with reduced toxicity in bacteria: Implications for genetic circuit design’, *Nucleic Acids Research*, 46(20), pp. 11115–11125. Dostupno na: https://doi.org/10.1093/nar/gky884.

Zhitkovich, A. i Costa, M. (1992) ‘A simple, sensitive assay to detect dna-protein cromlinks in intact cells and in vivo’, *Carcinogenesis*, 13(8), pp. 1485–1489. Dostupno na: https://doi.org/10.1093/carcin/13.8.1485.

8. SAŽETAK

Loren Petrušić

IZRADA MODELNOG SUSTAVA ZA ISTRAŽIVANJE POPRAVKA DNA-PROTEIN ADUKATA U LJUDSKIM STANICAMA POMOĆU CRISPR/dCas9 TEHNOLOGIJE

DNA-protein adukti (DPC) su izrazito toksične DNA lezije koje nastaju kada se proteini kovalentno, ireverzibilno vežu na DNA. DPC-evi mogu biti izazvani endogenim (aldehidi, ROS) i egzogenim (kemoterapeutici, UV zračenje) agensima. DPC-evi ometaju replikaciju i transkripciju, što dovodi do genomske nestabilnosti, a posljedično mogu uzrokovati karcinogenezu i neurodegeneraciju. Indukcija DPC-eva koristi se u kemoterapiji, gdje lijekovi poput kamptotecina i etopozida unakrsno povezuju topoizomeraze s DNA i time zaustavljaju diobu karcinomskih stanica. CRISPR/Cas9 je alat za uređivanje gena koji koristi jedinstvenu RNA vodilju (sgRNA) za ciljanje i cijepanje specifičnih DNA sekvenci, dok je dCas9 (enzimski inaktivan Cas9) njegova modificirana verzija koja se veže na DNA, ali ne može inicirati njeno cijepanje te se koristi u svrhu regulacije transkripcije. Modelni sustav za mjerenje DPC popravka (DPCR) u ljudskim stanicama još uvijek nije razvijen. Stoga je glavni cilj ovog rada stvoriti DPC sastavljen od dCas9 proteina kovalentno vezanog na specifično mjesto u genomu te mjeriti DPCR pomoću RT-qPCR-a (reverzna transkripcija-kvantitativni PCR). Ako dCas9 formira DPC na ciljnom genu i inhibira njegovu transkripciju, detektirat će se utišavanje ciljnog gena pomoću RT-qPCR-a. Kada je dCas9-DPC popravljen, utišavanje ciljnog gena neće biti moguće detektirati. Razvoj modelnog sustava za kvantifikaciju DPCR-a mogao bi poboljšati razumijevanje puteva DPCR-a i potaknuti budući razvoj lijekova. Izabrano je osam gena za ciljanje dCas9 proteinom, a za svaki gen dizajnirano je 1 - 3 sgRNA ovisno o dostupnosti PAM sekvence u specifičnoj genskoj regiji. Sintetizirane sgRNA udružene su s dCas9 u kompleks koji je zatim transfeciran u HEK293T stanice. Utišavanje ciljnih gena detektirano je koristeći RT-qPCR. Ukupni stanični DPC-evi su izolirani pomoću modificirane RADAR (brz pristup oporavku DNA adukta) metode, te je zatim specifični dCas9-DPC detektiran protein-specifičnim antitijelima pomoću Western blot metode. Od svih izabranih ciljnih gena, statistički značajno utišavanje ($p < 0.05$) detektirano je za dva gena: *TDP2* (tirozil-DNA-fosfodiesteraza 2) i *MATE1* (protein izbacivač mnogih lijekova i toksina 1). Efikasnost utišavanja iznosi 19,24 % za *TDP2* gen koristeći sgRNA g1 te 26,73 % koristeći sgRNA g2, a za *MATE1* iznosi 38,37 % koristeći sgRNA g1 i 62,72 % koristeći sgRNA g2. Detektirano utišavanje ukazuje na prisutnost dCas9 na ciljnom mjestu u genomskoj DNA. Kako je najučinkovitije utišavanje postignuto za gen *MATE1* korištenjem sgRNA g2, nastavljeno je s

izolacijom DPC-eva iz navedenog uzorka. DNA-dCas9 unakrsne veze detektirane su pomoću Western blot-a i Cas9-specifičnog antitijela. Dobiveni rezultati pokazuju kako dCas9 stvara DPC-eve u ljudskim stanicama, sam i u kompleksu sa specifičnom sgRNA, te kako snažni DPC induktor, formaldehid, pojačava stvaranje DNA-dCas9 unakrsnih veza. Zaključno, dCas9 stvara DPC-eve u ljudskim stanicama, te kada je u kompleksu sa specifičnom sgRNA, može učinkovito utišati ciljne gene. Ovi zaključci sugeriraju da bi se specifično unakrsno vezanje dCas9 na DNA moglo koristiti kao model za mjerenje DPCR-a u ljudskim stanicama te da bi stvaranje dCas9-DPC-eva mogao biti jedan od mehanizama toksičnosti transfekcije dCas9 u ljudskim stanicama.

Ključne riječi: DNA popravak, DNA-protein adukti, CRISPR/dCas9, ljudske stanice, modelni sustav.

9. SUMMARY

Loren Petrušić

CREATING A MODEL SYSTEM FOR STUDYING DNA-PROTEIN CROSSLINK REPAIR IN HUMAN CELLS USING CRISPR/dCas9 TECHNOLOGY

DNA-protein crosslinks (DPCs) are highly toxic DNA lesions that occur when a protein binds covalently and irreversibly to the DNA. DPCs can originate from endogenous (aldehydes, ROS) and exogenous (chemotherapeutics, UV radiation) agents. They interfere with replication and transcription, leading to genomic instability and consequently causing carcinogenesis and neurodegeneration. The induction of DPCs is used in chemotherapy where drugs like camptothecins and etoposide crosslink topoisomerases to DNA, thus stopping the division of cancer cells. CRISPR/Cas9 is a gene-editing tool that uses single-guide RNA (sgRNA) to target and cleave specific DNA sequences, while dCas9 (dead Cas9) is a modified version of Cas9 that binds to DNA but cannot initiate cleavage and is used for transcriptional regulation. A model system for the measurement of DPC repair (DPCR) in human cells has not yet been developed. Therefore, we aim to create a DPC consisting of dCas9 crosslinked to a specific site in the genome which could be used to measure the rate of DPCR using RT-qPCR (reverse transcription quantitative PCR). If dCas9 forms DPC at the target gene and inhibits its transcription, we can detect target gene silencing using RT-qPCR. When the dCas9-DPC is repaired, gene silencing will not be detectable. We anticipate that developing a model system to quantify DPCR will enhance our understanding of DPCR pathways and will provide an impetus for future drug development. We selected eight genes to target with dCas9 and designed 1 - 3 sgRNAs for each of them depending on the availability of the PAM sequence in the specific genomic region. These sgRNAs were then synthesized and combined with dCas9 in a complex, which was subsequently transfected into HEK293T cells. The silencing of target genes was quantified using RT-qPCR. All cellular DPCs were isolated using the modified RADAR (rapid approach to DNA adduct recovery) assay, and specific dCas9-DPC was detected with protein-specific antibodies using Western blot. Out of all selected target genes, we detected statistically significant ($p < 0.05$) silencing of two genes: *TDP2* (tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2) and *MATE1* (multidrug and toxin extrusion protein 1). The silencing efficiencies were 19,24% for *TDP2* with sgRNA g1 and 26,73% with sgRNA g2, and 38,37% and 62,72% for *MATE1* with sgRNA g1 and sgRNA g2, respectively. Observed silencing indicates dCas9 presence at the target site in genomic DNA. As the most effective silencing was achieved for the *MATE1* gene using sgRNA g2, we proceeded with DPC

isolation from this sample. DNA-dCas9 crosslinks were detected with a Cas9-specific antibody. Obtained results show that dCas9 forms DPCs in human cells with and without specific sgRNA, and that the strong DPC inducer, formaldehyde, enhances the formation of DNA-dCas9 crosslinks. In conclusion, dCas9 forms DPCs in human cells and, when coupled with specific sgRNA, can effectively silence target genes. These findings suggest that the specific crosslinking of dCas9 could be used as a model for DPCR measurements in human cells, and that dCas9 crosslinking could be one of the mechanisms of toxicity of dCas9 transfection in human cells.

Key words: DNA repair, DNA-protein crosslinks, CRISPR/dCas9, human cells, model system.

10. ŽIVOTOPIS

Loren Petrušić rođena je 26. svibnja 2001. godine u Ogulinu. Završila je smjer opće gimnazije u Gimnaziji i strukovnoj školi Bernardina Frankopana u Ogulinu. Trenutno je studentica 4. godine Medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija aktivno sudjeluje u znanstvenom radu u području onkologije. Od listopada 2022. volontira u istraživačkoj grupi za DNA oštećenje i popravak na Institutu Ruđer Bošković, gdje je ovaj rad izrađen. U kolovozu 2023. odlazi na ljetnu praksu u trajanju od mjesec dana na *Bordeaux Institute of Oncology* u Bordeauxu, Francuskoj. U akademskoj godini 2023./24. dodatno se priključila Laboratoriju za biofiziku stanice (Tolić grupa) na Institutu Ruđer Bošković, gdje volontira i izrađuje svoj diplomski rad. Od svoje prve godine studija aktivno sudjeluje u radu Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (CPSA), gdje trenutno obnaša funkciju koordinatora projekta Podcast „Pod mikroskopom“. Dobitnica je Dekanove nagrade za najbolji uspjeh na studiju tijekom sve tri uzastopne godine studija.