

In vitro test spajanja krajeva DNA

Bellulovich, Ema

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:817328>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET U SPLITU
ODJEL ZA BIOLOGIJU

ZAVRŠNI RAD

IN VITRO TEST SPAJANJA KRAJEVA DNA (engl. *in vitro* DNA end-joining assay)

Ema Bellulovich

Split, rujan 2020.

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom doc.dr.sc. Ivice Šamanića, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnika biologije i kemije.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu
Studij: Biologija i kemija
Odjel za biologiju
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Završni rad

***IN VITRO* TEST SPAJANJA KRAJEVA DNA (engl. *in vitro* DNA end-joining assay)**

Ema Bellulovich

SAŽETAK

U ovome radu opisan je *in vitro* test spajanja krajeva DNA, biokemijsko-molekularna metoda pomoću koje, koristeći stanični ekstrakt ili pročišćene proteine iz tkiva s ciljanom inaktivacijom ključnih gena uključenih u pojedine mehanizme popravka oštećenja DNA, možemo detektirati vrstu popravka dvolančanih lomova DNA. *In vitro* određivanje pojedine vrste mehanizma popravka spajanjem krajeva DNA (engl. *end-joining*) omogućuje kombinirani par polinukleotidnih sekvenci DNA koje završavaju slobodnim dvolančanim krajevima s mogućnošću ponovnog spajanja. Nakon inkubacije oštećene plazmidne DNA sa staničnim ekstraktima biljnog tkiva i na temelju analize strukture rekonstruiranih krajeva DNA elektroforezom u gelu agaroze, te određivanja slijeda nukleotida na mjestu spajanja pomoću reakcije PCR i sekvenciranja, moguće je procijeniti s kojom točnošću su se krajevi DNA povezali. Iz toga se može zaključiti radi li se o preciznom popravku „klasičnim“ nehomolognim spajanjem krajeva DNA (NHEJ), alternativnom načinu popravka krajeva (alt-EJ), ili pak mehanizmu spajanja krajeva potpomognutom mikrohomologijom (MMEJ), odnosno identificirati ključne proteine za pojedine procese.

Ključne riječi: *in vitro* test spajanja DNA krajeva, dvolančani lom DNA, stanični ekstrakt biljnog tkiva, plazmidi, restriksijski enzimi, elektroforeza, NHEJ, MMEJ

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: stranica, 20 grafičkih prikaza, 4 tablice i 23 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: Dr. sc. Ivica Šamanić, docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Ocjenjivači: Dr. sc. Ivica Šamanić, docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Dr. sc. Željana Fredotović, docentica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Dr. sc. Ana Maravić, izvanredna profesorica Prirodoslovnog-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad prihvaćen: **rujan, 2020.**

Basic documentation card

University of Split
Faculty of Science
Study: Biology and chemistry
Department of biology
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

Bachelor's thesis

***IN VITRO* DNA END-JOINING ASSAY**

Ema Bellulovich

ABSTRACT

This paper describes the *in vitro* DNA end-joining test, a biochemical-molecular method by which, using cell extract or protein fraction derived from tissue with targeted inactivation of genes involved in DNA-damage repair pathways, we can detect mechanisms of DNA double-strand break repair (DSB). An *In vitro* determination of DNA break repair mechanisms by end-joining is based on synthetic duplex oligonucleotide sequences of various DNA-end configurations with the possibility to be joined. After incubation of linear plasmid DNA as end-joining substrates in a plant cell-free extracts as a source of DNA repair enzymes, and subsequent analysis of structure of the reconstructed DNA ends by agarose gel electrophoresis, or determination of the sequence of nucleotides on junction sites by PCR and DNA sequencing, it is possible to assess the fidelity of end-joining reaction. From this it can be concluded which pathways participate in these end joining events, whether DSB is repaired by a precise or "classical" nonhomologous end-joining (NHEJ) repair pathway, alternative NHEJ (alt-EJ) or microhomology-mediated NHEJ (MMEJ). It is also possible to identify core proteins involved in specific DNA repair process.

Key words: *in vitro* DNA end-joining assay, double-strand DNA breaks (DSBs), plasmid DNA, restriction endonuclease, electrophoresis, NHEJ, MMEJ

Thesis deposited in library of Faculty of science, University of Split

Thesis consists of: pages, 20 figures, 4 tables and 23 references

Original language: Croatian

Mentor: Iвица Šamanić, Ph.D. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split

Reviewers: Iвица Šamanić, Ph.D. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split

Željana Fredotović, Ph.D. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split

Ana Maravić, PhD, Associate Professor of Faculty of Science, University of Split

Thesis accepted: **September 2020.**

IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom

***IN VITRO* TEST SPAJANJA KRAJEVA DNA (engl. *in vitro* DNA *end-joining assay*)**

izradila samostalno pod voditeljstvom doc. dr. sc. Ivice Šamanića. U radu sam primijenila metodologiju znanstveno-istraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u završnom radu na uobičajen, standardan način citirala sam i povezala s fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica

Ema Bellulovich

ZAHVALA

Moje zahvale idu svima koji su doprinijeli pisanju ovog znanstveno-istraživačkog rada, profesorima i profesoricama koji/koje su kroz posljednje tri godine oblikovali i širili moje znanje.

Posebno se zahvaljujem svome mentoru doc. dr. sc. Ivici Šamaniću koji je moje ideje uvijek podržavao, koji me inspirirao i uvijek bio spreman pomoći. Hvala mu i na strpljenju i vremenu koje je posvetio mom napretku.

Zahvaljujem se i svojoj obitelji i prijateljima na podršci koju su neizmjerljivo pružali i što su bili moj „vjetar u leđa“.

SADRŽAJ:

UVOD.....	1
1. MOLEKULA DNA	2
1.1. Podložnost DNA molekule različitim oštećenjima	4
1.1.1. Uzroci oštećenja.....	4
1.1.2. Popravci oštećenja.....	4
1.2. Dvolančani lom molekule DNA (engl. <i>double strand break</i>, DSB)	5
1.3. Popravak dvolančanih lomova DNA	6
1.3.1. Homologna rekombinacija.....	6
1.3.2. Nehomologo spajanje krajeva DNA	7
2. TEST SPAJANJA KRAJEVA DNA (engl. <i>non-homologous DNA end joining assay</i>).....	10
2.1. Vrste testa spajanja krajeva.....	10
2.1.1. <i>Ex vivo</i> test spajanja krajeva	10
2.1.2. <i>In vivo</i> test spajanja krajeva	11
3. RAZVOJ TESTA SPAJANJA KRAJEVA I OTKRIĆA	13
3.1. Prvo desetljeće istraživanja.....	13
3.2. Drugo desetljeće istraživanja-do danas.....	13
4. IN VITRO TEST SPAJANJA KRAJEVA DNA.....	15
4.1. Reagensi za induciranje loma	16
4.1.1. Ionizirajuće zračenje	16
4.1.2. Bleomicin.....	16
4.1.3. Restriksijski enzim.....	17
4.2. DNA oligonukleotidni supstrati	18
4.2.1. Plazmidi	19
4.2.2. Oligonukleotidi	20
4.2. Stanični ekstrakti (engl. <i>cell free systems</i>).....	20
4.4. Vizualizacija produkata	23
4.4.1. Tehnike vizualizacije produkta	23
4.4.2. Interpretacija rezultata.....	24
5. TEST SPAJANJA DNA KRAJEVA KAO METODA ISTRAŽIVANJA RAKA.....	28
6. POSTUPAK.....	29

<i>In vitro</i> test spajanja krajeva u proteinskom ekstraktu listova biljke <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
6.1. Priprema izvanstaničnog proteinskog ekstrakta listova biljke <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
6.2. Priprema plazmidnog supstrata sa krajevima DNA za spajanje	29
6.3. Inkubacija lineariziranih oligonukleotidnih supstrata sa krajevima DNA u izvanstaničnom proteinskom ekstraktu listova <i>Arabidopsis thaliane</i>	30
6.4. Analiza produkata spajanja krajeva DNA	32
ZAKLJUČAK	34
POPIS SLIKA	35
POPIS TABLICA	36
LITERATURA	37
SKRAĆENICE	39

UVOD

Kroz ovaj rad upoznati ćemo se sa testom spajanja krajeva DNA (engl. *in vitro DNA end-joining assay*), biokemijsko-molekularnom metodom čija je svrha identificirati vrstu popravka DNA mehanizmom nehomolognog spajanja krajeva, inaktivacijom gena uključenih u pojedine mehanizme popravka oštećenja DNA u biljne modelne vrste *Arabidopsis thaliana*, u *in vitro* uvjetima.

Postupak testa spajanja krajeva u proteinskom ekstraktu provodi se kroz četiri osnovna koraka:

1. Izazivanje dvolančanih lomova DNA u plazmidu, ciljanom razgradnjom odgovarajućom restrikcijom endonukleazom ili tretmanom bleomicinom, koji oponaša učinak ionizirajuće radijacije stvaranjem lomova u molekuli DNA.
2. Izdvajanje linearizirane plazmidne DNA koja sadrži ciljano mjesto dvolančanog loma u molekuli DNA.
3. Inkubacija oštećene plazmidne DNA s staničnim ekstraktima biljnog tkiva (engl. *cell-free extracts*) kao izvorom enzima za obnavljanje cjelovitosti molekule DNA.
4. Identifikacija obnovljenih krajeva DNA u vidu različitih konformacijskih plazmidnih formi elektroforezom u gelu agaroze i analiza slijeda sekvence DNA na mjestu spajanja krajeva nakon umažanja lančanom reakcijom polimerazom (PCR) i određivanja slijeda sekvenciranjem.

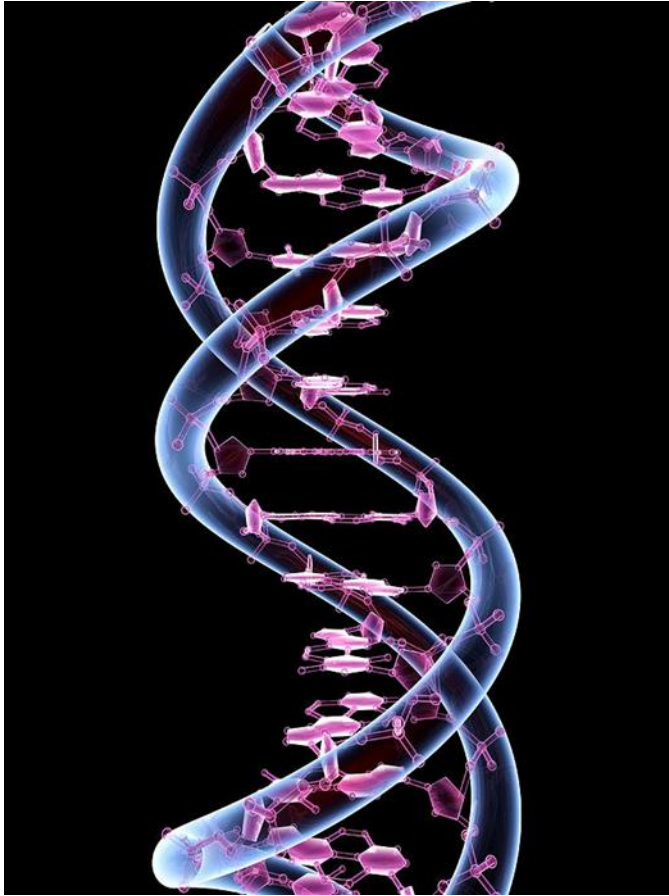
Test spajanja krajeva, odnosno interpretacija rezultata dobivenih ovom metodom još nisu u potpunosti optimizirani, međutim budućnost je svijetla, kako u optimizaciji protokola tako i u onome što sve možemo saznati primjenom iste. Ovaj test zaslužan je za otkrivanje mnogih dotad nepoznatih proteina koji sudjeluju u popravku dvolančanih lomova, za razumijevanje glavnih mehanizama popravka dvolančanih lomova DNA (engl. *double-stranded breaks*, DSB) i naravno za napredak u istraživanju liječenja tumora i degenerativnih bolesti. Isto tako, ovaj test možemo upotrijebiti za potencijalno dokazivanje kako hrana bogata bioaktivnim tvarima smanjuje količinu mutacija u ljudskom organizmu. Jedna od vrijednosti tih bioaktivnih tvari je upravo antioksidativno djelovanje koje znamo kako smanjuje količinu prirodno izazvanih dvolančanih lomova DNA, tj. smanjuje učinak slobodnih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS) koji su rezultat normalnog staničnog metabolizma. Ovim testom, uistinu možemo vizualizirati popravke oštećenja DNA na molekularnoj razini. Shodno tome, u modernom svijetu razina genotoksičnog stresa neprestano raste, a upravo zdravim prehranbenim navikama smanjujemo negativne učinke toga stresa te posljedično i šansu oboljenja od raka i drugih bolesti. Kako se u testu koriste različiti proteinski ekstrakti biljnog tkiva istraživačko polje se maksimalno povećava. Pojednostavljeno, različiti proteinski ekstrakti koristili bi se kako bi uočili koja je biljna hrana učinkovitija u popravljaju naših svakodnevnih mutacija, koji organi u ljudskom ili životinjskom tijelu aktivno koriste popravak nehomolgnim spajanjem krajeva (engl. *non homologous end joining*, NHEJ) kako bi mogli istražiti nove lijekove. Produkti dobiveni elektroforezom služe kako bi proučavali same mehanizme popravaka, otkrili ključne proteine i enzime odgovorne za isti.

1. MOLEKULA DNA

DNA ili deoksiribonukleotidna kiselina (slika 1) dugi je linearni polimer i nasljedni je materijal gotovo svih živućih organizama uključujući i čovjeka i DNA viruse. DNA je pohranjena u obliku koda koji je potreban za rast, razvoj i razmnožavanje, odnosno za normalno funkcioniranje organizama. Molekula DNA započinje 5' krajem, a završava 3' krajem i upravo na tim krajevima bazira se tema ovoga rada. Osnovnu jedinicu molekule DNA čini nukleotid (dušične baze- adenin, timin, gvanin, citozin, šećer-deoksiriboza, fosfatna skupina), pakira se u obliku dvostruke zavojnice (engl. *double helix*). Lanci su međusobno komplementarni i antiparalelni te je genetička poruka zapisana u točno određenom i karakterističnom slijedu dušikovih baza. Najvažnije uloge molekule DNA očituju se u njezinoj sintezi, koja je semikonzervativan proces u kojem dolazi do stvaranja dviju novih molekula DNA na kalupu roditeljske molekule DNA, također u transkripciji koja je proces sinteze RNA molekule na kalupu molekule DNA i konačno translaciji koja je proces prevođenja slijeda tripleta u mRNA u slijed aminokiselina u proteinima. Proces rekombinacije je izmjena genetičkog materijala između dvije molekule DNA s posljedicom stvaranja novih raspodjela gena. Postoje dvije vrste rekombinacije: homologna i nehomologna. Homologna rekombinacija odvija se između dviju homolognih molekula DNA na bilo kojem mjestu u genomu i kod eukariota i prokariota služi kao popravak grešaka nastalih u organizmu. Nehomologna rekombinacija događa se između dviju heterologne molekule DNA, na određenim mjestima u genomu s kratkim specifičnim sljedovima DNA u jednoj ili obje molekule. Uočljiva je tijekom ugradnje plazmida u kromosom bakterije.

Naravno, replikacija, transkripcija i translacija nisu jedine uloge molekule DNA niti su kroz ovaj rad opširno objašnjene no svakako ih je bilo važno spomenuti jer nas vode do pitanja- „Što ako nastane greška pri bilo kojem od tih procesa?“

Molekula DNA kao što je već spomenuto nosi genetičku uputu za sve funkcije organizama što dovodi do zaključka kako zbog svoje važnosti mora imati i načine odnosno procese popravka grešaka kao što su krivo sparene baze, greške u translaciji, transkripciji, lomovi u DNA uzrokovani različitim vanjskim utjecajima i slično. Prema tome, sljedeće poglavlje biti će posvećeno oštećenjima i popravcima istih, a ujedno i uvertira u temu ovoga rada.



Slika 1. DNA molekula (preuzeto sa <https://fineartamerica.com/featured/9-dna-molecule-conceptual-artwork-pasieka.html>)

1.1. Podložnost DNA molekule različitim oštećenjima

Stanica čovjeka doživi oko 10^{4-5} spontanih mutacija dnevno, a čovjek 10^{17} .¹

Jednako tako, molekula DNA razvila je veliki broj popravaka kako bi se broj tih mutacija smanjio (slika 2). Danas je poznato, ne samo da je naš genetički materijal sposoban popravljati greške, već da različiti vanjski čimbenici poput prehrane, rekreacije, boravka u prirodi smanjuju tu veliku brojku naših dnevnih pogrešaka i održavaju homeostazu.

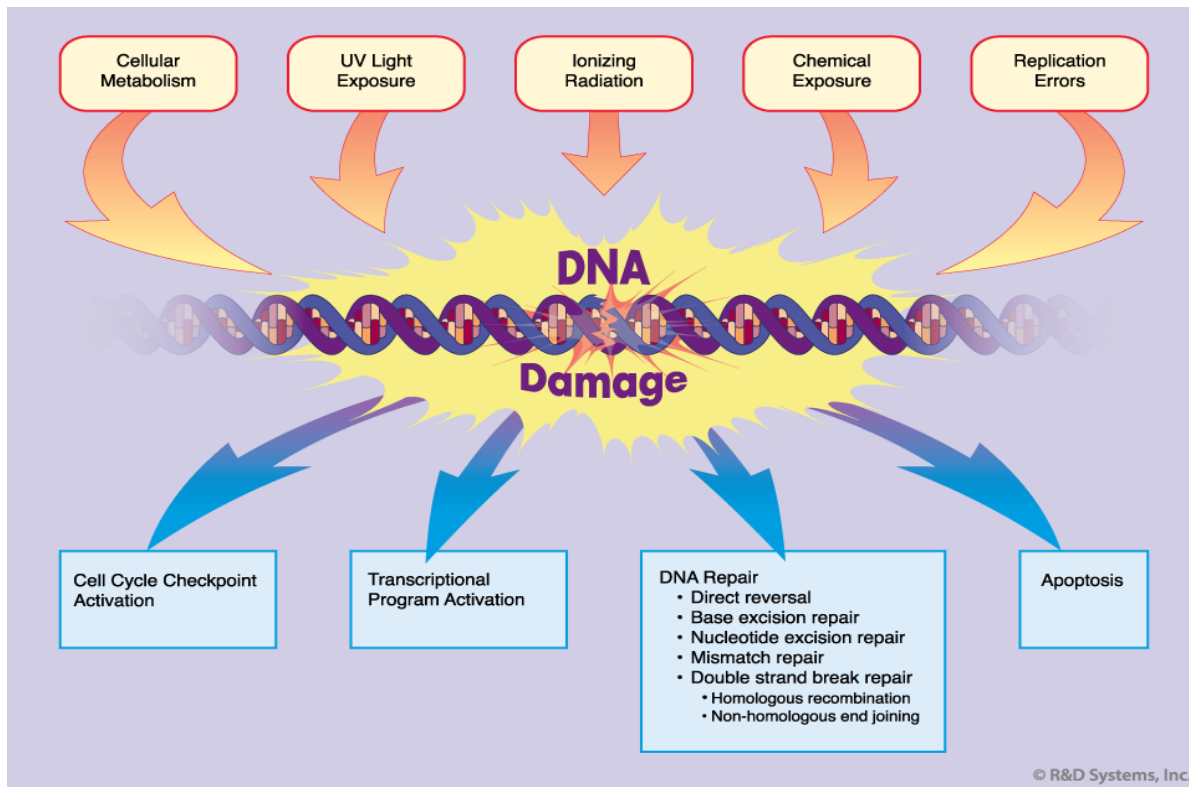
1.1.1. Uzroci oštećenja

Mutacije jesu promjene u strukturi genetičkog materijala i razlikujemo više vrsta- s obzirom na strukturu, način nastanka i s obzirom na funkciju- gubitak funkcije, dobitak funkcije i interakciju dominantno-negativnih funkcija. Točkaste mutacije su mutacije s obzirom na strukturu, obuhvaćaju jedan ili nekoliko parova baza i tu svrstavamo baznu supstituciju koje izazivaju 50% humanih patogenih mutacija, isto tako, tu pronalazimo i inserciju koja izaziva mutaciju pomaka okvira čitanja (engl. *frame shift mutation*). Kromosomske mutacije obuhvaćaju dio gena ili gen, dio kromosoma ili cijeli kromosom. Ono što je bitno napomenuti, mutacije mogu biti spontane i inducirane. Kao primjer spontane mutacije navodim gubitak baze što ima za posljedicu zaustavljanje replikacije DNA ili jednolančani lom molekule DNA. Ionizirajuće zračenje α i γ zrakama jesu inducirane mutacije te dovode do jednolančanih i dvolančanih lomova molekule DNA.

1.1.2. Popravci oštećenja

Odgovor stanice na oštećenja nastala u molekuli DNA su mnogobrojna, međutim možemo ih podijeliti u pet glavnih skupina:

1. Reverzija oštećenja: naprimjer, popravak jednolančanih lomova ligacijom - enzim DNA ligaza katalizira uspostavu fosfatno-esterske veze.
2. Uklanjanje oštećenja: naprimjer, popravak krivo sparene baze u eukariota - novi lanac prepoznaje se po jednolančanim lomovima, eukariotski homologni MutS i MutL (MSH i MLH) vežu se na pogrešno sparenu bazu, izrezuje se DNA između pogrešno sparene baze i prekida u lancu.
3. Zaobilaženje oštećenja: tu spada translezijska sinteza DNA - popravak provode specijalizirane DNA polimeraze sklone greškama.
4. Postreplikacijski popravak: rekombinacijski popravak - neoštećeni lanac roditeljske DNA normalno se replicira, a oštećeni lanac replicira se preskakanjem oštećenja i nastavlja sintezu na određenoj udaljenosti od oštećenja.
5. Popravak dvolančanih lomova: nehomologno povezivanje krajeva DNA (engl. *non-homologous DNA end joining*, NHEJ) i homologna rekombinacija molekule DNA.



Slika 2. Uzroci i popravak oštećenja DNA molekule (preuzeto sa <https://www.rndsystems.com/resources/articles/dna-damage-response>)

1.2. Dvolančani lom molekule DNA (engl. *double strand break*, DSB)

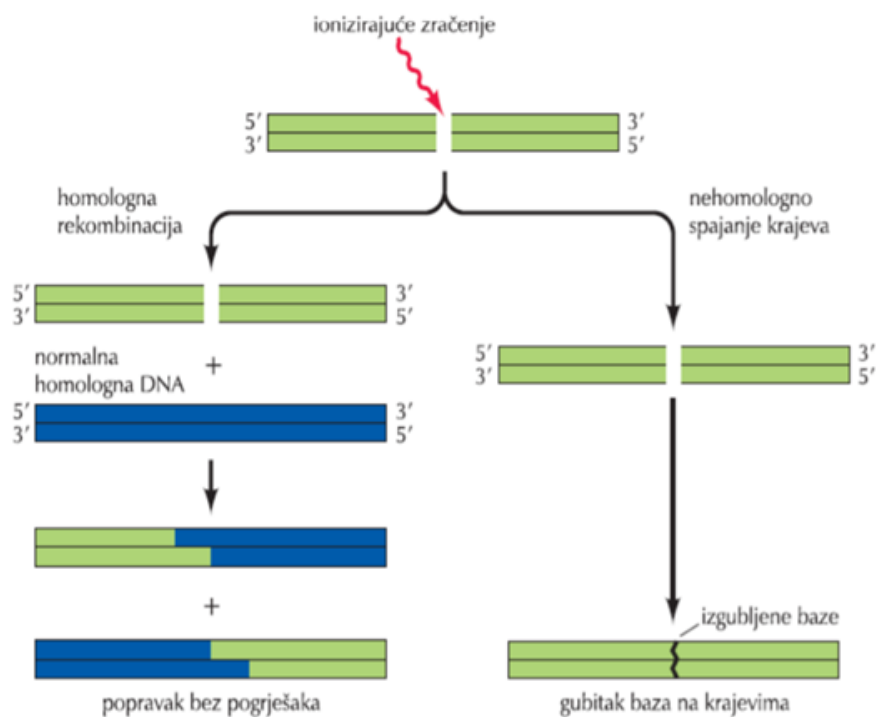
Dnevno, u jednoj stanici sisavca koja se dijeli, procijenjeno je da nastaje deset dvolančanih lomova DNA molekule, najsmrtonosnije greške kojoj molekula DNA može podlijeći.² Uzroci tog loma mogu biti patološki, kao što su ionizirajuća zračenja ili bleomycin-kemoterapijski agens (engl. *clastogenic chemicals*) ili fiziološki, kao što su reaktivne kisikove vrste, greške pri replikaciji molekule DNA, lomovi koji nastaju prilikom rekombinacije i mnogi drugi. Dvolančani lom je lom oba lanca molekule DNA, što je vrlo opasno jer nestaje neprekidnost molekule DNA. Isti se ne mogu popraviti mehanizmima koji zahtijevaju sintezu DNA kroz mjesto oštećenja zato što su oba lanca obuhvaćena lomom. Posljedice koje nosi ovakva greška ukoliko ju organizam ne uspije popraviti jesu smrt stanice, predispozicija za razvitak raka ili genetička nestabilnost.

1.3. Popravak dvolančanih lomova DNA

Dva su najvažnija načina popravka spomenutih dvolančanih lomova (slika 3).

1.3.1. Homologna rekombinacija

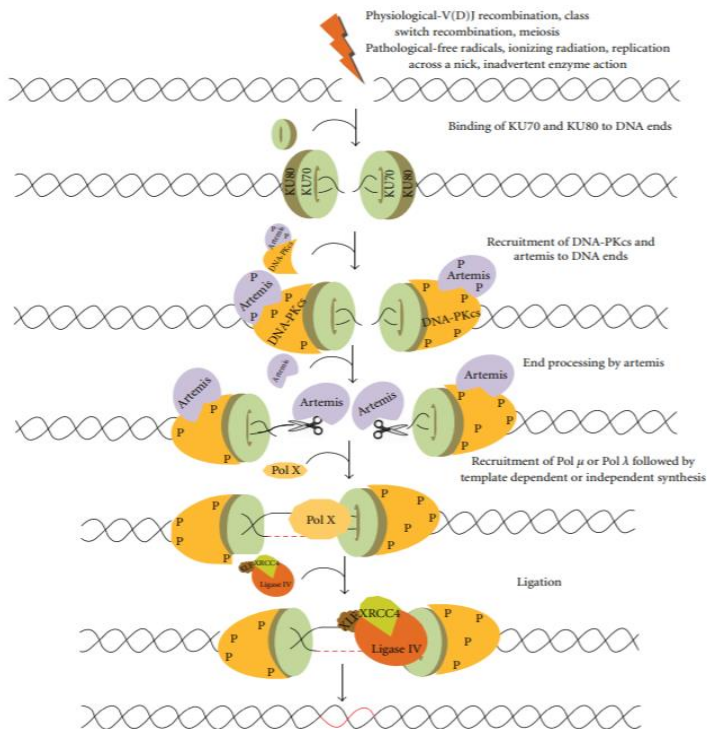
Prvi način naziva se homologna rekombinacija (engl. *homologous recombination*, HR) i uključuje rekombinaciju s normalnim kromosomom kako bi se obnovio izvorni slijed molekule DNA. Javlja se tijekom S i G2/M faze staničnog ciklusa što ukazuje kako je to ograničen popravak dvolančanih lomova. Aktivan je samo u stanicama koje se dijele. Proteini koji su potrebni za homolognu rekombinaciju jesu Rad50, Rad51, Rad54, Mre11 i Nbs1.¹ Ova metoda ima mnogo sličnosti sa samom rekombinacijom DNA molekule koju danas poznajemo.



Slika 3. Usporedba mehanizama homologne rekombinacije i nehomolognog spajanja krajeva DNA¹

1.3.2. Nehomologno spajanje krajeva DNA

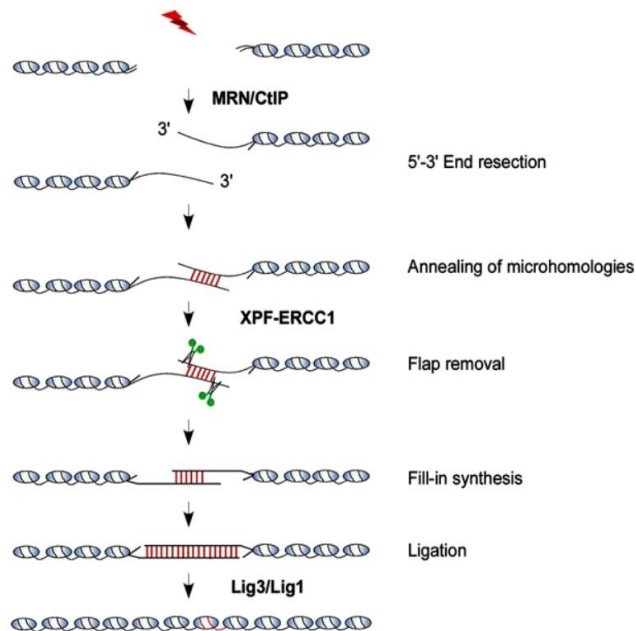
Drugi način je nehomologno spajanje krajeva DNA uz učestali gubitak baza uz mjesto oštećenja. Nehomologno spajanje krajeva DNA ili skraćeno mehanizam NHEJ, popravak je koji ne zahtjeva homolognost DNA već će spojiti direktno „kraj s krajem“ (engl. *end to end*). Događa se tijekom cijelog staničnog ciklusa te je glavni popravak dvolančanih lomova stanica koje se dijele, ali i onih koje ne. Izuzetno, ovaj mehanizam je sklon pogreškama (engl. *error-prone repair of DSB*) koje uključuju gubitak ili dobitak bar jednog nukleotida na mjestu spajanja krajeva odnosno uobičajeno je neprecizan. Također ligacija tupih krajeva (engl. *blunt ends*) vrsta je NHEJ popravka. Tijekom istraživanja stanica sisavaca s deficijencijom dvolančanog loma, otkrili su se mnogi proteini koji sudjeluju u NHEJ popravku (slika 4). Tako su proteini Ku kompleksa dobili svoju ulogu u prepoznavanju krajeva DNA molekule (engl. *DNA end-binding*). Proteini Ku70 i Ku80, djelujući kao heterodimerni kompleks vežu se na kraj DNA i prepoznaju DSB. Kako su se ta dva proteina vezala tako dolazi do regrutacije kinaza ovisnih o DNA, DNA-PKcs i nukleaze Artemis (engl. *DNA-dependent kinase DNA-PKcs:Art*). Svi zajedno stvaraju sinaptički kompleks koji će povezati dva kraja DNA molekule. Nadalje, DNA-PKcs se autofosforilira i prenosi još i fosfatnu skupinu na protein Artemis. Kompleks ovih dvaju proteina zatim može ponovo cijepati 5' kraj i 3' kraj, a sam Artemis može djelovati kao egzozukleaza. DNA polimeraze μ (Pol μ) i lambda (Pol λ) dopunjuju krajeve dok naposljetku kompleks Xlf:XRCC4:DNA ligaza IV poveže oba kraja.³ Alternativni mehanizmi spajanja krajeva (slika 6) javljaju se ukoliko nedostaju ključni proteini „klasičnog“ NHEJ mehanizma tj. Ku heterodimeri koji su skloni greškama poput delecije ili insercije baza uz mjesto oštećenja.



Slika 4. Mehanizam klasičnog nehomolognog spajanja DNA krajeva³

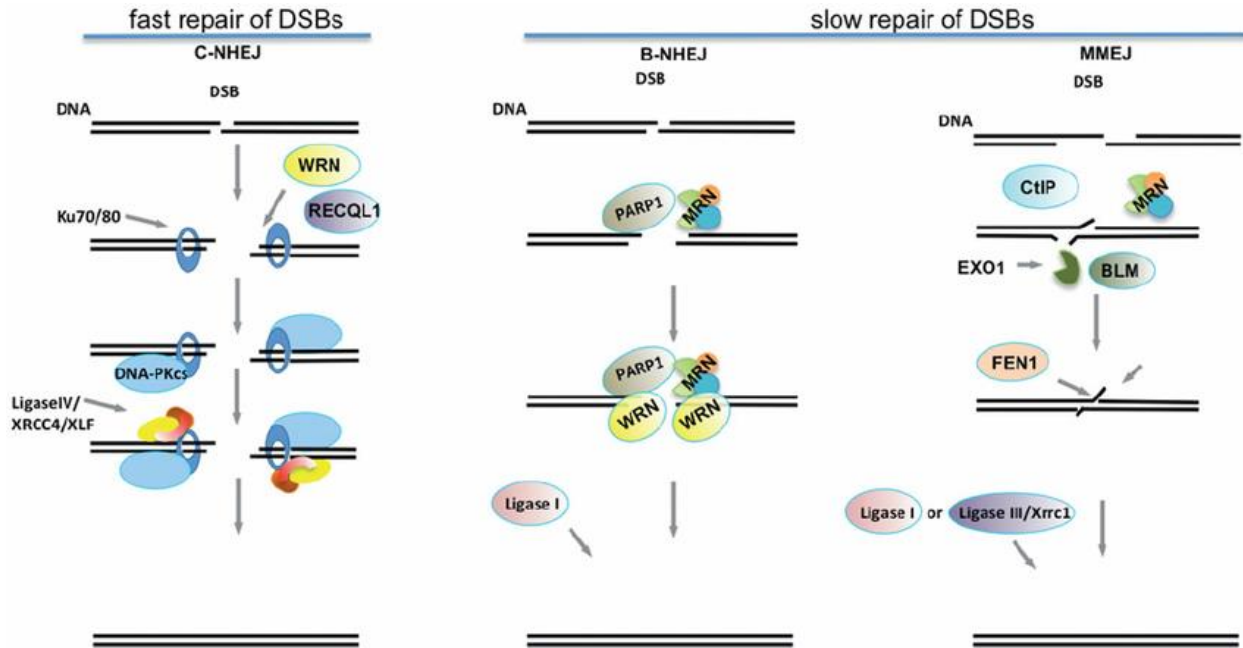
Danas, uz klasični mehanizam, razlikujemo još nekoliko različitih mehanizama nehomolognog spajanja krajeva DNA (slika 6) :

1. Spajanje mikrohomolognih regija na krajevima DNA (engl. *Microhomology mediated end joining*, MMEJ) - popravak koji se temelji na prepoznavanju kratkih regija homologije na krajevima molekule DNA (mikrohomološke regije veličine 3-7 pb). Ovaj mehanizam spada pod mutageni popravak dvolančanog loma DNA, te su posljedice kao što su gubitak ili delecija sekvence ili preraspodjela kromosoma česte. Postoje pretpostavke da MMEJ nije samo alternativni popravak već kako nekad ima prednost nad homolognim popravkom.⁴ Danas je dokazano kako je MMEJ ključan za popravak HR defektivnih tumora.⁴ Mehanizam MMEJ sastoji se od najmanje 5 koraka (slika 5). Prvi korak je resekcija krajeva DSB koji se pojavljuje i u nehomolognoj rekombinaciji. Mehanizam HR zahtjeva opsežno nukleazno cijepanje krajeva DNA kako bi se mobilizirao nukleofilni protein Rad51 koji pronalazi regiju homologije. Međutim, MMEJ zahtjeva ograničeno cijepanje i mikrohomološki krajevi se mogu odmah uočiti. Zatim slijedi povezivanje mikrohomolognih regija koje je još uvijek neshvaćeno u potpunosti. Pretpostavka je kako povezivanje mikrohomolognih regija započinje termodinamički vođenom reakcijom reguliranom posebnim enzimima uz stvaranje međuprodukta s stršećim 3' krajem (engl. *3'-flap DNA strand*) i prazninama na obje strane lanca DNA. Slijedeće je uklanjanje heterolognih stršećih nukleotida (engl. *flap trimming*) tj. 3' nehomolognog kraja kako bi DNA polimeraza mogla započeti sintezu i stabilizirati privremeno povezane nukleotide u regiji mikrohomologije (engl. *fill-in synthesis*). Ovaj korak najčešće je izvođen uz prisustvo specifične endonukleaze strukturno slične supstratu (Xpf / Ercc1). Na posljetku dolazi do popunjavanja oštećenja i ligacije posredovane ligazom III/I (slika 5).⁴



Slika 5. Spajanje krajeva potpmognuto mikrohomologijom (MMEJ)⁴

2. Alternativni mehanizam nehomolognog spajanja krajeva DNA (engl. *'alternative'* ili *'back-up'*, A-NHEJ ili B-NHEJ) - uključuje suradnju više mehanizama NHEJ popravka kako bi se lom uklonio. Ključni proteini ovoga mehanizma jesu Parp1, Parp2, DNA ligaza III i XRCC1 koji su uključeni u popravak jednolančanog loma. Nedavno je dokazano da histon H1, Mre11 i Xpf imaju jednako značajnu ulogu u ovom popravku.⁵ Alternativni mehanizam kinetički je sporiji od „klasičnog“ nehomolognog spajanja krajeva DNA i jednako sklon greškama (slika 6)



Slika 6. Usporedba klasičnog, alternativnog i B-NHEJ-a (preuzeto sa https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-DNA-end-joining-pathways-C-NHEJ-canonical-non-homologous_fig1_264126447)

Danas je poznato kako nehomologno spajanje krajeva ima veći značaj kod viših eukariota, međutim nije u potpunosti razjašnjeno kako stanica određuje koji popravak koristiti.

Ono što u daljnjem radu će biti u potpunosti analizirano, objašnjeno i opisano jest test spajanja krajeva DNA koji se temelji na mehanizmu popravka dvostranih lomova nehomolognim povezivanjem krajeva molekule DNA.

2. TEST SPAJANJA KRAJEVA DNA (engl. *non-homologous DNA end joining assay*)

Test spajanja krajeva DNA je biokemijsko-molekularna metoda na temelju koje u jednoj stanici ili staničnoj liniji, koristeći stanični ekstrakt ili pročišćene proteine iz tkiva s ciljanom inaktivacijom ključnih gena uključenih u mehanizam popravka DNA oštećenja (slika 7), možemo predvidjeti koji mehanizam će biti aktivan u popravku oštećenja. Odnosno, na temelju analize strukture i slijeda nukleotida rekonstruiranih krajeva DNA, pomoću reakcije PCR, sekvenciranja i elektroforeze možemo istražiti s kojom točnošću su se krajevi DNA povezali. Iz toga je moguće zaključiti radi li se o popravku oštećenja „klasičnim“ nehomolognim spajanjem krajeva DNA (NHEJ), alternativnom načinu popravka (alt-EJ), ili pak mehanizmu spajanja krajeva DNA potpomognutom mikrohomologijom (MMEJ).

2.1. Vrste testa spajanja krajeva

Kako je NHEJ jedan od najvažnijih popravka dvolančanih lomova DNA, danas je istraženo i utemeljeno mnogo testova *in vitro* i *in vivo* koji rekonstruiraju pojedine korake tog popravka u različitim staničnim linijama. Brojni podaci dobiveni iz tih studija opisuju očuvani niz reakcija koje su koordinirane međusobnim interakcijama različitih proteina i molekule DNA.

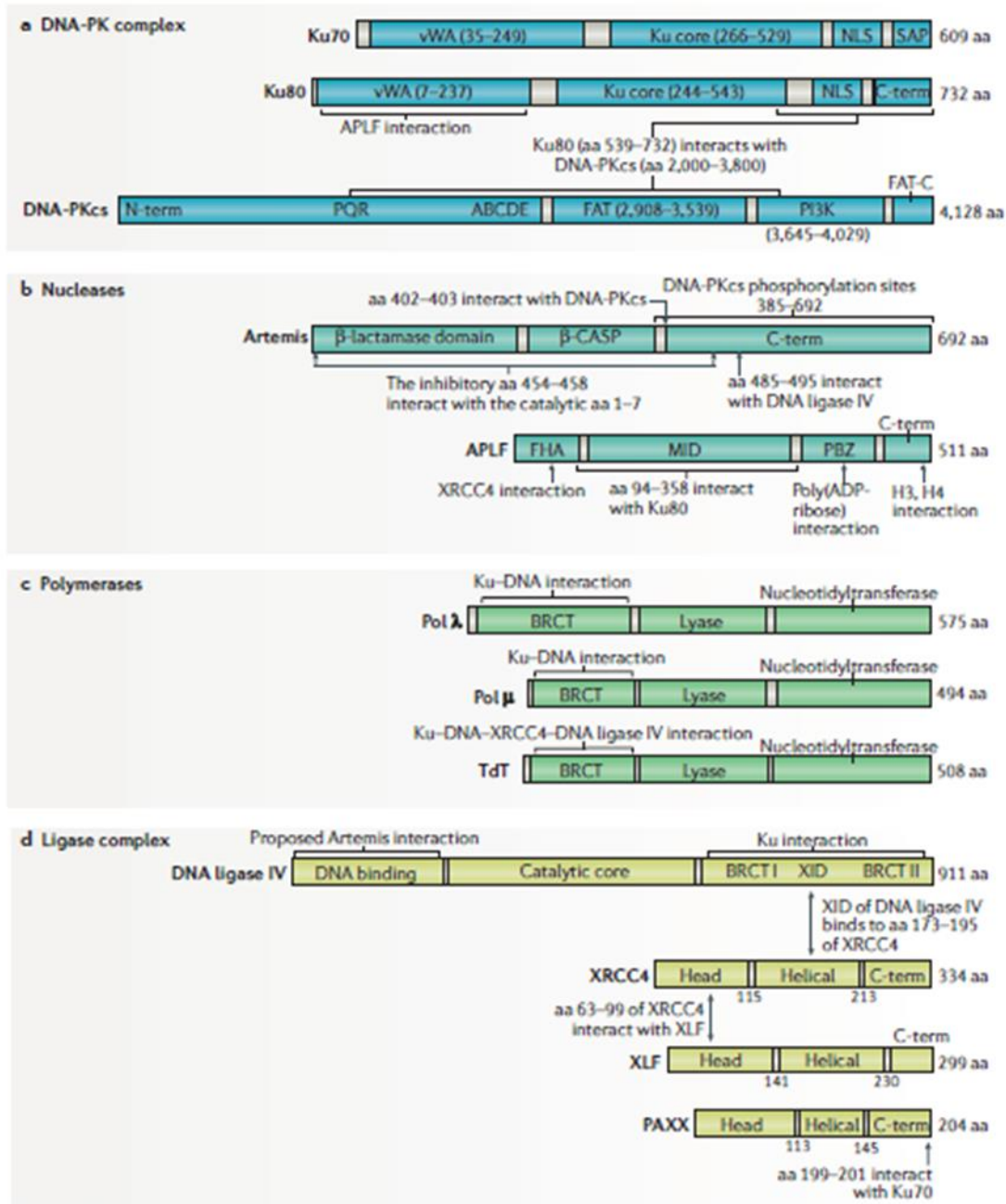
2.1.1. *Ex vivo* test spajanja krajeva

Podloga *ex vivo* odnosno unutarstaničnih testova leži u transfekciji stanica sisavaca molekulama plazmidne DNA linearilizirane odgovarajućim restrikcijским enzimima. Ista plazmidna DNA sakupljena je pomoću alkalne razgradnje ili pročišćavanjem u nenedenaturirajućim uvjetima uz visoku koncentraciju soli (engl. *high-salt based nondenaturing method*). Produkti se analiziraju pomoću Southern hibridizacije *in situ* nakon koje se vrši PCR reakcija kako bi umnožili nukleotide na mjestu ponovnog spajanja krajeva DNA zatim ih klonirali i sekvenciranjem odredili slijed nukleotida. Početak ove metode uključivao je transfektirani SV40 genom s krivo sparenim krajevima unutar stanične linije bubrega majmuna.³

Iako unutarstanični testovi imaju široku primjenu ne znači da nemaju mana koje zahtijevaju rad znanstvenika kako bi u budućnosti bili što bolje primijenjeni. Česta mana ove metode je mala količina produkta koji nekada nisu vidljivi na gelu, naprimjer dimeri, trimeri i ostali multimeri. Isto tako, tijekom ekstrakcije molekula DNA neki linearni produkti bivaju izgubljeni, stoga, efikasnost spajanja krajeva DNA je kompromitirana. Stanične linije dijele se puno brže nego tkivo iz kojega potječu, stoga je teško povezati *in vitro* događaje s onime što se zapravo događa *in vivo*.

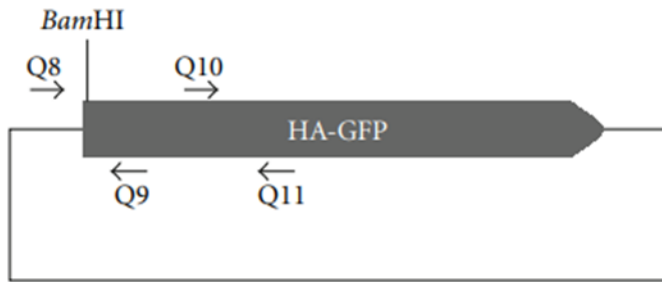
2.1.2. *In vivo* test spajanja krajeva

Za karakteriziranje proteina uključenih u mehanizme popravka oštećenja DNA spajanjem krajeva (slika 7) koristi se *in vivo* test spajanja krajeva lineariziranog plazmida pomoću mjerenja sposobnosti protoplasta da poprave dvolančane lomove DNA generirane restrikcijskim enzimima.



Slika 7. Proteini uključeni u mehanizam NHEJ i njihove poznate međusobne interakcije²

Protoplasti su biljne stanice bez stijenke, ulogu vanjske ovojnice preuzima plazmalema čime se znatno olakšava ubacivanje strane DNA u biljnu stanicu. Metodom prolazne transfekcije protoplasta moguće je u biljne stanice ubaciti cjeloviti kružni plazmid (pozitivna kontrola) i plazmid koji je lineariziran odgovarajućim restrikcijским enzimom (slika 8). Plazmid se obično cijepa u regiji koja sadrži kodirajuću regiju za zeleni fluorescentni protein (engl. *Green fluorescent protein*, GFP). Ponovnim spajanjem krajeva u *in vivo* sustavu protoplasta lista, odnosno cirkularizacijom plazmida, obnovit će se cijeloviti gen za GFP čija se ekspresija može mjeriti.



Slika 8. Plazmid pART7-HA-GFP koji sadrži restrikcijско mjesto za enzim BamHI na N-kraju kodirajuće sekvence za GFP i koristi se za transfekciju biljnih protoplasta⁶

3. RAZVOJ TESTA SPAJANJA KRAJEVA I OTKRIĆA

3.1. Prvo desetljeće istraživanja

Pfeiffer i Vielmetter (1988. godine) su prvi puta opisali *in vitro* test spajanja krajeva. Oni su koristili restriksijski enzim za induciranje loma, stanični ekstrakt jaja žaba roda *Xenopus* te kao izvor vizualizacije produkata Southern hibridizaciju *in situ*. Vidjevši rezultate došli su do zaključka kako nepoznati DNA vezujući proteini stabiliziraju DNA krajeve koji se nisu mogli spontano povezati.⁷

Prvi opisani test koji se uključivao stanice sisavaca opisao je North 1990 godine.⁷ Indukciju loma postigao je koristeći restriksijske endonukleaze, a rezultate je vizualizirao uz pomoć Southern hibridizacijske tehnike. Dvije godine kasnije, North je za detekciju koristio etidijev bromid što je uvelike smanjilo trajanje izvođenja testa. Nedugo nakon toga, Pfeifferov tim kao supstrat koristio je sintetičku DNA odnosno oligonukleotid i dokazao da je mnogo korisniji nego plazmid.⁷ Jedan od najvažnijih testova napravili su 1998. godine Iliakis i suradnici čija je ideja bila u posebnoj pripremi DNA supstrata. Kultura stanica iz tkiva prvo je bila uronjena u agarozu, zatim lizirana i tretirana s RNA-zom i proteazom kako bi sačuvala genomsku DNA. Ista je zatim bila tretirana s X- zrakama i inkubirana s HeLa staničnim proteinima. Za detekciju koristili su elektroforezu.⁷

Baumann i West (1998. godine) napravili su test koji je najčešće u uporabi.⁷ Uporabom ovog testa potvrđena je uključenost heterodimera Ku70 i Ku80, DNA-PKcs, ligaza IV/Xrcc4 u mehanizam NHEJ kod ljudi.

3.2. Drugo desetljeće istraživanja-do danas

Pastwa (2001. godine) razvio je novu strategiju; kao izvor DNA krajeva koristio je plazmid, za izvor dvolančanih lomova koristio je bleomicin, stanični ekstrakt je bio humanog podrijetla, a identifikacija produkata izvedena je elektroforezom. Kako bi uštedili vrijeme, za vizualizaciju su upotrijebili fluorescentnu boju Vista Green.⁷

Pfeiffer i njegov tim (2002. i 2003. godine) objavili su rad čija je teza bila kako NHEJ nije efikasan u popravku dvolančanog loma ako je on uzrokovan IR-om i radioizotopom joda 125, a ne RE.⁷

Pastwa i njegovi suradnici (2006. godine) su otkrili *in vitro* test, jednostavan i sličan onome koji je također sam otkrio 2001. godine, međutim koristili su 75 parova baza dug oligonukleotid koji sadrži obilježeni 5' kraj.⁷ Proizašli rezultati ukazivali su kako je oligonukleotid odličan supstrat i da pomoću istoga možemo istražiti strukturne modifikacije molekule DNA u formi točno definiranih sintetičkih lezija kao i učinka koji ima na spajanje krajeva DNA. Ovim radom također je dokazano kako isti supstrat koristi DNA ligazu IV i proteine Ku kompleksa kako bi se povezao u humanim stanicama.⁷

Svoje viđenje i unapređenje *in vitro* testa Baumann-a i Westa iznio je Diggle (2003. godine).⁷ Uzevši u test puno manje količine staničnog ekstrakta, te dobitak smislenih rezultata, doveo je do velikog otkrića u ovom području - za test spajanja krajeva mogu se koristiti klinički uzorci te se popravak može uočiti nakon samo 24 sata⁷.

U Lieberovom laboratoriju *in vitro* NHEJ test je po prvi puta izveden s DNA nekompatibilnim krajevima i pročišćenim proteinima: Ku heterodimer, DNA-PKcs, Artemis, DNA ligaza IV/Xrcc4, DNA polimerazom μ i λ . Kao DNA supstrat služio je oligonukleotid zato što on omogućava lakše modificiranje preklapajućih krajeva. Koristili su i PCR reakciju kako bi umnožili produkte te vizualizirali uz pomoć elektroforeze u poliakrilamidnom gelu (PAGE) i autoradiografije. Ovakav test je do tada bio neizveden, a ključan je za daljnje razumijevanje NHEJ popravka.⁷

Nick McElhinny (2005. godine) dolazi do novog otkrića - uloge polimeraze λ i μ . Uloga istih je da upotpune praznine kada krajevi DNA imaju djelomično komplementarna preklapanja.⁷

Ideju proučavanja nekompatibilnih krajeva DNA istražili su 2005. godine Budman i Chu i razvili kvantitativni PCR test.⁷ Proučavali su test iz 1998. godine i zaključili da su produkti uvijek dimeri, trimeri, ali nikad ciklički monomeri zbog proteinskih ekstrakata korištenih u testu. Isti su odlučili razlučiti razliku i funkciju dva glavna procesa NHEJ popravka - razgradnju i ligaciju krajeva DNA. Njihov krajnji zaključak je kako aktivnost kinaza DNA-PK i proteini ligaze IV/Xrcc4 sudjeluju u oba procesa.⁷

Današnji testovi su mnogo napredovali od tad zato što zahtijevaju puno manje vremena, mogu koristiti klinički materijal te se mogu proučavati i na fiziološkoj osnovi u stanicama sisavaca. Uz to su i jednostavniji za izvođenje. Naravno, još postoje ograničenja testova i mnogo toga za otkriti, ali brojnija istraživanja nas vode ka tome da još bolje shvatimo NHEJ kao i druge vrste popravka dvolančanih lomova DNA (slika 9).

Table 1

In vitro non-homologous DNA end joining systems: chronological summary of methodology.

Authors	Source	DNA substrates	Methods of detection	Year	Comments
Pfeiffer and Vielmetter	Xenopus egg	RE-cut plasmid DNA	Southern blotting	1988	The first in vitro NHEJ system
North et al.	Human cell	RE-cut plasmid DNA	Southern blotting	1990	The first mammalian in vitro NHEJ system
Fairman et al.	Human cell	RE-cut plasmid DNA	Ethidium bromide	1992	The first use of ethidium bromide
Beyert et al.	Xenopus egg	Oligonucleotides	Autoradiography	1994	The first use of oligonucleotides substrates
Gu et al.	Xenopus egg	Bleomycin-cut oligonucleotides	Autoradiography	1996	The first use of bleomycin-cut oligonucleotides
Cheong et al.	Human cell	IR-cut genomic DNA	AFIGE	1998	The first use of IR-cut genomic DNA
Baumann and West	Human cell	RE-cut plasmid DNA	Autoradiography	1998	The first demonstration of core proteins involvement in NHEJ
Pastwa et al.	Human cell	Bleomycin-cut plasmid DNA	Vistra Green	2001	The first use of Vistra Green
Diggle et al.	Human tissues	RE-cut plasmid DNA	SYBRGreen I	2003	The first use of human tissues
Ma et al.	Purified proteins	Oligonucleotides	PCR/autoradiography	2004	The first NHEJ reconstitution with purified proteins
Budman and Chu	Human cell	RE-cut plasmid DNA	Quantitative PCR	2005	The first use of quantitative PCR

Abbreviations: AFIGE, asymmetric field inversion gel electrophoresis; IR, ionizing radiation; RE, restriction enzymes.

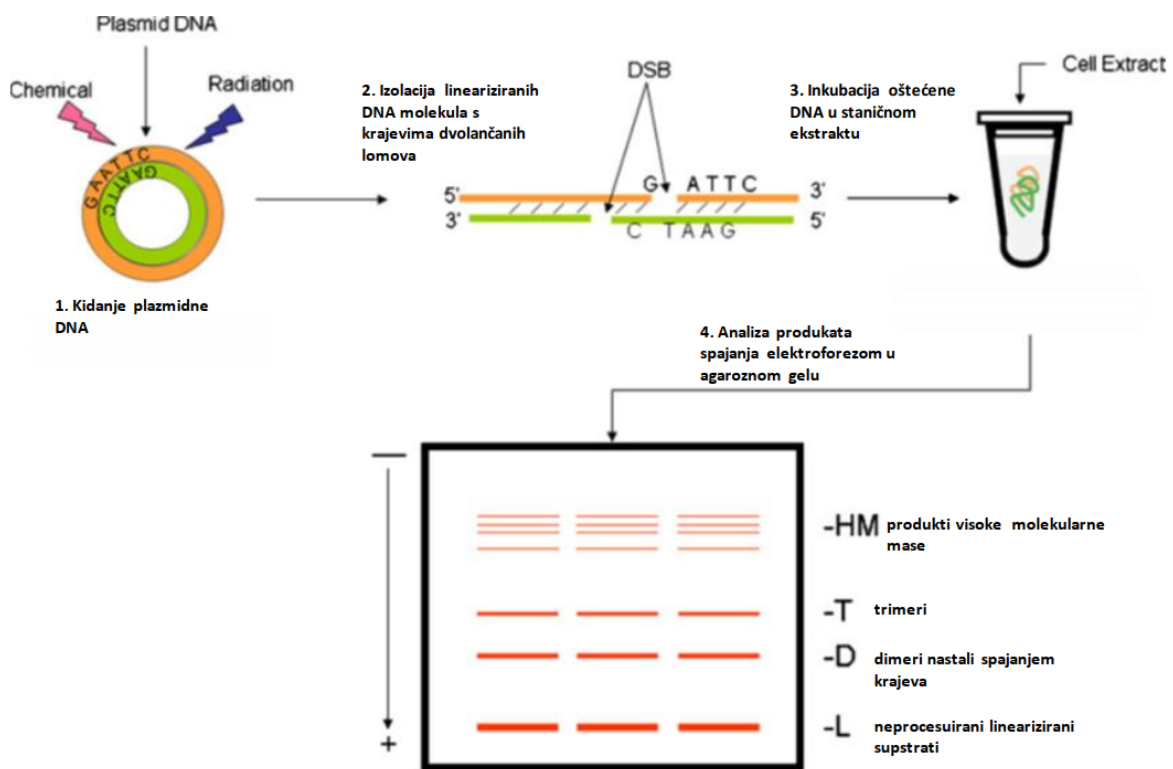
Note: Bold font, the new aspects of the analysis.

Slika 9. Kronološki redosljed razvoja metodologije in vitro testa spajanja krajeva DNA⁷

4. IN VITRO TEST SPAJANJA KRAJEVA DNA

U *in vitro* uvjetima koristi se ekstrakt stanica (engl. *cell-free system*) koji sadrži raznolike stanične proteine ili točno određene pročišćene proteine (slika 7). Proteini mogu biti cjeloviti ili su ekstrahirani iz citoplazme ili jezgre, češće porijeklom iz staničnih linija nego iz tkiva te služe kako bi popravili oštećenje DNA. Dva su tipa DNA supstrata koje koristimo u ovoj metodi - plazmidi i oligomeri. Na samom početku potrebno je inducirati DSB razgradnjom restriktivnim enzimom, tretmanom bleomicinom ili radijacijom X i γ zrakama, omogućiti popravak DSB lomova mehanizmom NHEJ u željenom staničnom ekstraktu, a na kraju produkte vizualizirati elektroforezom na agaroznom gelu ili Southern hibridizacijom *in situ* (slike 17 i 18).

Test spajanja DNA krajeva (engl. *in vitro DNA end-joining assays*)



Slika 10. Koraci *in vitro* testa spajanja DNA krajeva⁷

4.1. Reagensi za induciranje loma

Indukcija dvolančanog loma prvi je korak testa spajanja krajeva molekule DNA. Kao što je već spomenuto lom se može inducirati na nekoliko načina.

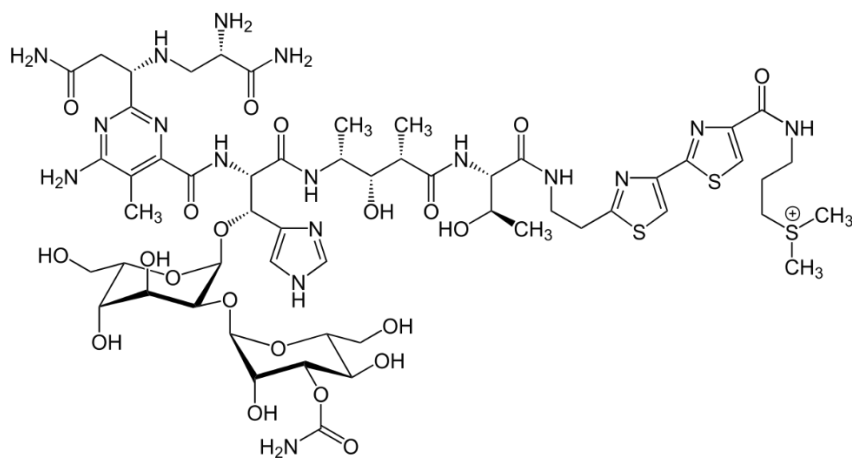
4.1.1. Ionizirajuće zračenje

Prvi način je radijacija X i γ zrakama. X i γ zrake posredno djeluju stvarajući reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive oxygen species*, ROS) i stoga uzrokuju dvolančane lomove u molekuli DNA. Gama zrake su elektromagnetske zrake najmanje valne duljine, ali najveće energije. U svemiru nastaju kao neutronske zvijezde ili eksplozijom supernova, a na zemlji raspadom radioaktivnih elemenata, svjetlošću ili eksplozijama. X zrake spadaju u elektromagnetsko zračenje, bogate su energijom i mogu prolaziti kroz različite materije. Poznate su po svojoj primjeni u medicini - CT, mamografija i sl., u molekularnoj biologiji i biotehnologiji.

4.1.2. Bleomicin

Bleomicin je citostatik (engl. *anti-cancer*), odnosno citotoksični agens koji se koristi kod liječenja melanoma, tumora testisa i jajnika te kod sarkoma.⁸ Njegova funkcija leži u tome da se veže za DNA, potiče replikaciju, međutim, tokom replikacije stvara dvolančani lom i prekida njenu sintezu. Klasificiran je u antitumorske antibiotike koji se dobivaju iz gljivica roda *Streptomyces* (slika 11).

DSB lomovi uzrokovani bleomicinom sadrže tupe krajeve ili krajeve koji samo sadrže stršće 5' krajeve (engl. *5' overhang DNA strand*) te 3' kraj blokiran fosfoglikolatom. Jako su slični lomovima što se u našim stanicama događaju zbog reaktivnih kisikovih vrsta i slobodnih radikala.⁹



Slika 11. Struktura bleomicina (preuzeto sa <https://en.wikipedia.org/wiki/Bleomicin>)

4.1.3. Restriksijski enzim

Restriksijski enzimi odnosno restriksijske endonukleaze kidaju DNA na specifičnim redosljedima. Tri su tipa endonukleaza - tip I koji kida DNA 1000-5000 nukleotida udaljeno od prepoznatog slijeda i kida samo jedan lanac, tip II kida DNA unutar ili blizu prepoznatog slijeda i tip III koji kida na točno određenom slijedu.

Većina *in vitro* testova spajanja krajeva koristi restriksijske endonukleaze za uvođenje DSB lomova u plazmide koji se koriste kao supstrati za analizu mehanizma NHEJ popravka u staničnom ekstraktu (slika 12). Činjenica kako restriksijski enzimi ne izazivaju nikakve druge lezije, osim dvolančanih lomova koji su točno definirani s obzirom na njihovu strukturu (ovisno o korištenom restriksijskom enzimu: stršeci jednolančani 5'- ili 3'- krajevi ili tupi krajevi; krajevi uvijek završavaju 3'-hidroksil i 5'-fosfatnom skupinom) i položaj unutar određenog slijeda DNA uvelike je olakšao proučavanje mehanizama NHEJ-a u staničnim ekstraktima uspoređujući originalne DSB krajeve i ponovno povezane krajeve DNA (slika 12).

U nekim slučajevima, mehanizam popravka NHEJ obnavlja mjesto restrikcije koje se tada može koristiti za jednostavnu analizu spojenih krajeva, omogućujući tako analizu većeg broja sastavljenih supstrata, bez potrebe za umnožavanjem PCR-om i sekvenciranjem slijeda nukleotida na mjestu sastavljanja krajeva DNA.

substrate	terminus configuration	main junctions	RE-cut
1. Bam/Bam 5'-coh.	CGGG GATC CTCT GGCC CTAG CAGA	a) CGGGGATC GATCCCTCT 0/0: fill-in (blunting) b) CGGGGATC CTCT 0/-4: ovlp; acc. LIG	a) no b) Bam (0/-4)
2. Pst/Pst 3'-coh.	GAC CTGA CCCC CTGG ACGT CCCC	a) GAC CTGA CCCC 0/-4: ovlp; acc. LIG b) GAC CTGA CCCC -4/-4: bl/bl (blunting)	a) Pst (0/-4) b) no
3. Sma/Sma blunt	TCC CCC GGGGAT AGC GGG CCCTA	a) TCC CCC GGGGAT 0/0: bl/bl; acc. LIG	a) Sma (0/0)
4. Bam/Asp 5'/5' NHEJ	CGGG GTAC CGGA GGCC CTAG GCCT	a) CGGGGATC GTACCGGA 0/0: fill-in (blunting) b) CGGGG (AT) C CGGA 0/-4: ovlp; acc. NHEJ	a) no b) Bam and / or Asp (ovlp)
5. BstX/BstX 3'/3'	CCAC GTAC GTGG GGTG TAAC CACC	a) CCAC GTAC GTGG 0/-4: ovlp; acc. NHEJ b) CCAC GTGG -4/-4: bl/bl (blunting)	a) BstX (ovlp) ² b) no
6. Ava/Hind 5'/bl	TCCG GACCTG AGC GGGCC GTCGAC	a) TCC GGGCC GACCTG 0/0: fill-in; acc. NHEJ	a) Ava (0/0)
7. Sma/Pst bl/3'	TCC CCC GGGG AGC GGG ACCG CCGG	a) TCC CCC TCCAGCCC 0/0: fill-in; acc. NHEJ b) TCC CCC CCCC 0/-4: bl/bl (blunting) c) TCC CCC 0/-8: inhomNHEJ	a) Pst (0/0; -1/0; -2/0) b) no c) no
8. Bam/Pst 5'/3'	CGGG CCCC GGCC CTAG ACCG CCGG	a) CGGGGATC TCCAGCCC 0/0: fill-in; acc. NHEJ b) CGGGGATC CCCC 0/0: fill/bl (blunting)	a) Pst (0/0) b) no
9. Sac/Sal 3'/5'	TTC GAGCT CCGA CTG AA G GCAC	a) TTC GAGCT TCGACCTG 0/0: fill-in; acc. NHEJ b) TTC G TCGACCTG -4/0: bl/fill (blunting) c) TTC GA CCTG -3/-4: inhomNHEJ	a) no b) Sal (-4/0) detects inacc. NHEJ c) no
10. Ava/Kpn 5'/3'	TCCG CGGA AGC GGGCC CAYG CCT	a) TCC GGGCC GTAGCGGA 0/0: fill-in; acc. NHEJ b) TCC GGGCC CGGA 0/-4: fill/bl (blunting) c) TCC GGGCC GGA 0/-5: fill/del	a) Ava (0/0) and Kpn (-1/0; 0/0) b) no c) Ava (0/-5; 0/-6)

Slika 12. Prikaz oligonukleotidnih supstrata sa karakterističnim krajevima DNA koje produciraju pojedini restriksijski enzimi¹⁰

4.2. DNA oligonukleotidni supstrati

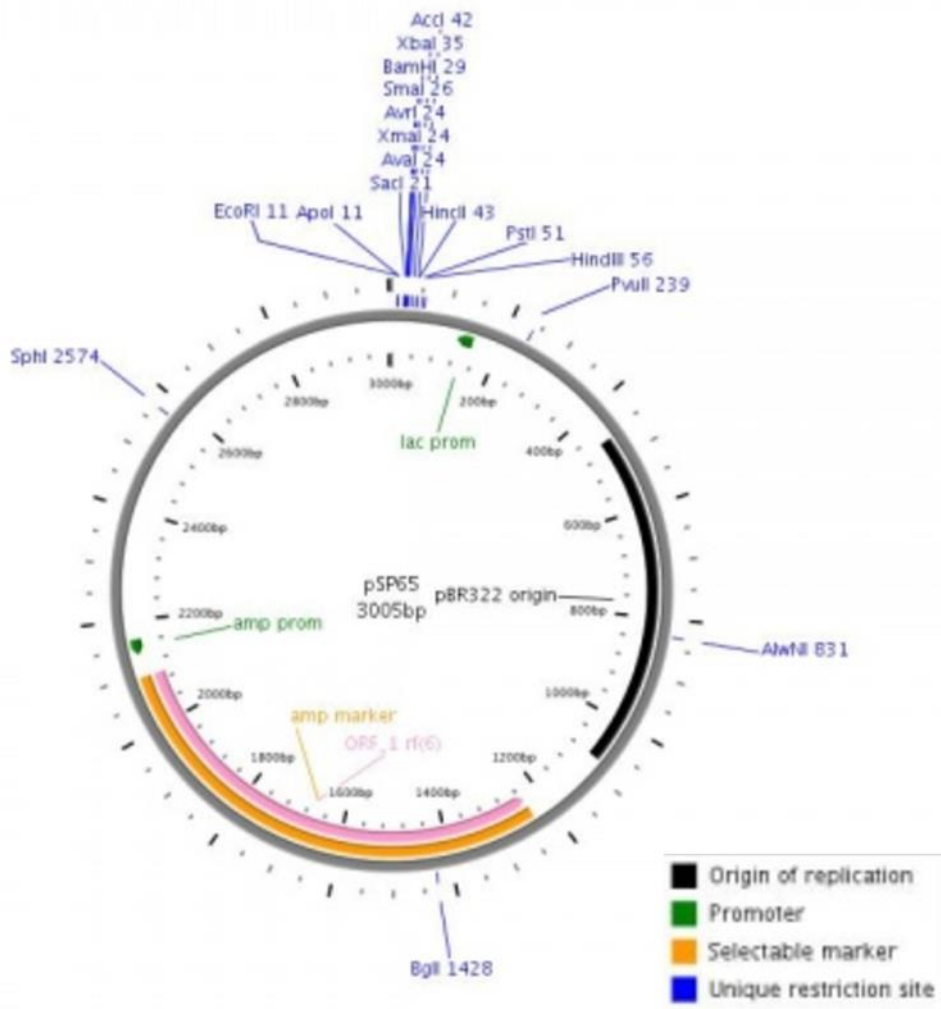
In vitro određivanje pojedine vrste mehanizma NHEJ omogućuje kombinirani par polinukleotidnih sekvenci koje završavaju slobodnim dvolančanim krajevima s mogućnošću ponovnog spajanja (slika 13), kao i proteini (npr. Ku70 / 80; DNA-PK_{CS} itd.) prisutni u izvanstaničnom sustavu (engl. *cell-free system*). Dva su različita supstrata koje možemo koristiti za ovu metodu - plazmidi i oligomeri.

Terminus configuration	Mechanism	Proteins required
A) complementary ends 	accurate NHEJ <u>ligation</u> nick ligation	Ku70/80/DNA-PK _{CS} Xrcc4/Lig4
B) non-complementary antiparallel ends <u>"complete overlaps"</u> 	accurate NHEJ <u>overlap of antiparallel ends:</u> <u>"complete overlaps"</u> nick ligation <u>"partial overlaps"</u> gap-filling and/or nucleolytic trimming; nick ligation	Ku70/80/DNA-PK _{CS} Xrcc4/Lig4 Ku70/80/DNA-PK _{CS} :Art. Xrcc4/Lig4 pol μ, λ
C) non-complementary abutting ends 	accurate NHEJ <u>fill-in of abutting ends:</u> gap-filling; nick ligation	Ku70/80/DNA-PK _{CS} :Art. Xrcc4/Lig4 pol μ, λ
D) non-complementary ends (any; s. B & C) 	inaccurate NHEJ <u>blunting</u> nucleolytic trimming and/or gap-filling; nick ligation	Ku70/80/DNA-PK _{CS} :Art. Xrcc4/Lig4 pol μ, λ any of these factors can lack
E) non-complementary ends (any; s. B & C) 	inaccurate NHEJ <u>μhomNHEJ:</u> μ hom-priming μ hom-ligation	PARP-1 Xrcc1/Lig3 pol β, δ ? Fen1 ? DNA helicase?

Slika 13. Prikaz ključnih proteina u kombinaciji s mogućim konformacijama dvolančanih krajeva DNA prilikom nehomolognog spajanja u *in vitro* staničnim ekstraktima¹⁰

4.2.1. Plazmidi

Plazmidi su male kružne dvolančane molekule DNA u bakterijama. Samoreplicirajući su, odnosno neovisni o replikaciji kromosoma bakterije. Sadrže mali broj gena koji nisu esencijalni no mogu biti vrlo korisni bakteriji - nose gen za otpornost na antibiotike, teške metale, toksine. Plazmidi imaju ulogu vektora u tehnologiji rekombinantne DNA molekule kao i oligonukleotidnog supstrata u *in vitro* testu spajanja krajeva. Pojednostavljeno oni su nosioci fragmenta molekule DNA s točno definiranom konformacijom krajeva DNA. Veličina im je 1-300 kilobaza te sadrže ishodište replikacije. U ovoj metodi može se koristiti bilo koji plazmid s poliklonirajućim mjestom kako bi se omogućila razgradnja s većim rasponom restrikcijskih mjesta za različite restrikcijske endonukleaze. Jednostavniji su za korištenje od oligonukleotida.¹¹ Jedan od češće korištenih plazmida u testovima spajanja krajeva je plazmid pSP65 (slika 14).



Slika 14. Plazmid pSP65 (Promega, 3kb) (preuzeto sa <https://ecoliwiki.org/colipedia/index.php/File:PSP65.jpg>)

4.2.2. Oligonukleotidi

Oligonukleotidi su dizajnirani na način da spajanje krajeva započinje samo na jednom kraju sekvence DNA što olakšava interpretaciju rezultata. Najčešće korišteni oligonukleotid dug je 75 parova baza. Naravno, oligonukleotid se može sintetizirati u laboratoriju ili naručiti već sintetizirani, međutim, to nije niti brz niti lak proces s obzirom da mora odražavati čitav niz genotoksičnih lezija. Smatra se kako su oligonukleotidi bolji odabir od plazmida zbog mogućnosti imitacije puno složenijih lomova DNA s razlikom u polarnošću krajeva, duljini i slijedu nukleotidnih sekvenci.¹¹

4.2. Stanični ekstrakti (engl. *cell free systems*)

Upotreba staničnog ekstrakta u ovoj metodi je od velike važnosti. U istome se nalaze proteini čija je funkcija popravak induciranog dvolančanog loma (slika 7). Kako bi što više toga istražili o NHEJ-u znanstvenici su u svojim studijama koristili različite ekstrakte.

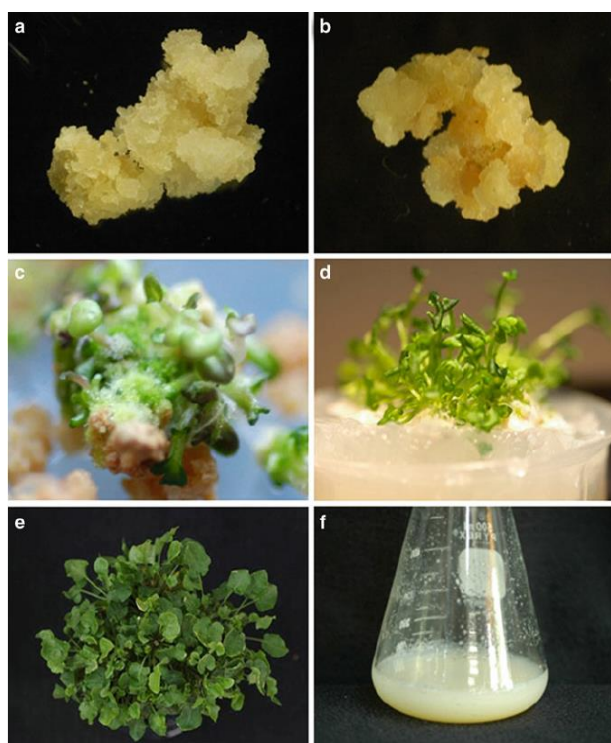
Jedan od prvih radova koji je objavljen u ovome području temeljio se na jajima žaba roda *Xenopus*. Isti je uspoređivao efikasnost spajanja krajeva DNA kroz različite stadije razvoja oocite, a autori su zaključili da je samo IV stadij pokazivao mehanizme popravka putem NHEJ-a.³

Razvitkom metode raspon ekstrakta obuhvaća i stanice sisavaca, primjerice staničnu liniju fibroblasta koja je pokazala efikasno spajanje kompatibilnih krajeva DNA u usporedbi sa tupim krajevima. Stanični ekstrakt iz jezgre HeLa stanica (slika 16) pokazao se iznimno kvalitetnim i u „*head to head*“ i „*tail to tail*“ usmjerenju spojenih fragmenata DNA. Uloga ligaze IV uspješno je objašnjena koristeći humanu limfoblastoidnu staničnu liniju.³

Ishod brojnih spomenutih istraživanja je hipoteza kako u različitim staničnim linijama mehanizam NHEJ nije jednako zastupljen niti jednako učinkovit.³ Tako je u mozgu, timusu i plućima NHEJ izrazito efikasan, a u bubrezima, jetri i srcu nije. Govoreći o biljnom proteinskom ekstraktu, moguće je uspoređivati koje biljke tj. biljna hrana, ako je svakodnevno unosimo, smanjuje količinu negativnog učinka koje dvolančani lomovi imaju na ljudsko tijelo. Veliki broj eksperimenta proveo se na modelnoj biljci *Arabidopsis thaliana* (slika 15, tablica 1).¹¹ To je biljka iz porodice krstašica (lat. *Brassicaceae*) koju i danas često koristimo u svrhu testa spajanja krajeva. Njezin genom je jedan od najmanjih biljnih genoma (115 409 949 parova baza, veliki postotak DNA je kodirajući i sadrži 25 498 gena), a ujedno i prvi genom sekvenciran iz biljke.¹² Mala je biljka s ukupno pet kromosoma ($2n = 10$). Genom ove modelne biljke kodira mnoge ortologe ljudskih proteina zaslužnih za očuvanje stabilnosti genoma i popravke dvolančanih lomova DNA. Kompleks Mre11 sastavljen od evolucijski očuvanih proteina Mre11, Rad50 i Nbs1 uključen je i u popravak homolognom rekombinacijom i u NHEJ mehanizam sisavaca i biljaka što pridonosi već spomenutom širenju područja rada i povećanju opusa iskorištenih biljnih ekstrakta.

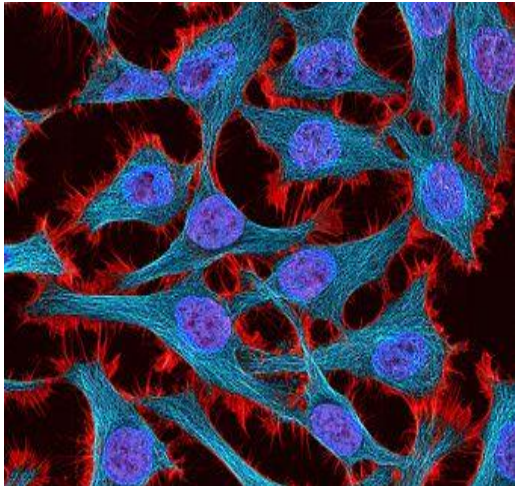
Tablica 1. Prednosti i nedostaci rada na biljci *Arabidopsis thailiana*

<i>Arabidopsis thailiana</i>	
PREDNOSTI RADA	NEDOSTATCI RADA
Potpuno sekvenciran genom	Nedostatak komercijalne vrijednosti
Najmanji genom biljke	Mali kromosomi
Kratak životni ciklus	Poteškoće u regeneraciji cijelih biljaka iz stanica koje se uzgajaju na definiranom mediju
Velika plodnost	
Jednostavan uzgoj u kontroliranim uvjetima	
Lakoća stvaranja induciranih mutacija	
Lako održavanje linija samooplodnjom	
Jednostavnost izvođenja kontroliranih križanja	
Jednostavna transformacija	
Laka nabava mutanata	



Slika 15. Stanična kultura *Arabidopsis thaliane*(preuzeto sa https://www.researchgate.net/figure/n-vitro-culture-of-Arabidopsis-Callus-tissue-is-generated-from-leaf-explants-of_fig1_256931052)

Zanimljivo je spomenuti, kako je ova metoda korištena da bi se otkrilo kod različitih bolesti ili tumora koji od spomenutih proteina popravka (slika 7) nije ispravan, stoga se često radila usporedba zdrave stanične linije i mutirane. Tako je uspoređena NHEJ aktivnost kod pacijenta s Alzheimerovom bolešću i rezultati su pokazali kako je kinaza DNA-PKcs neučinkovita u istim za razliku od zdravih stanica mozga.³

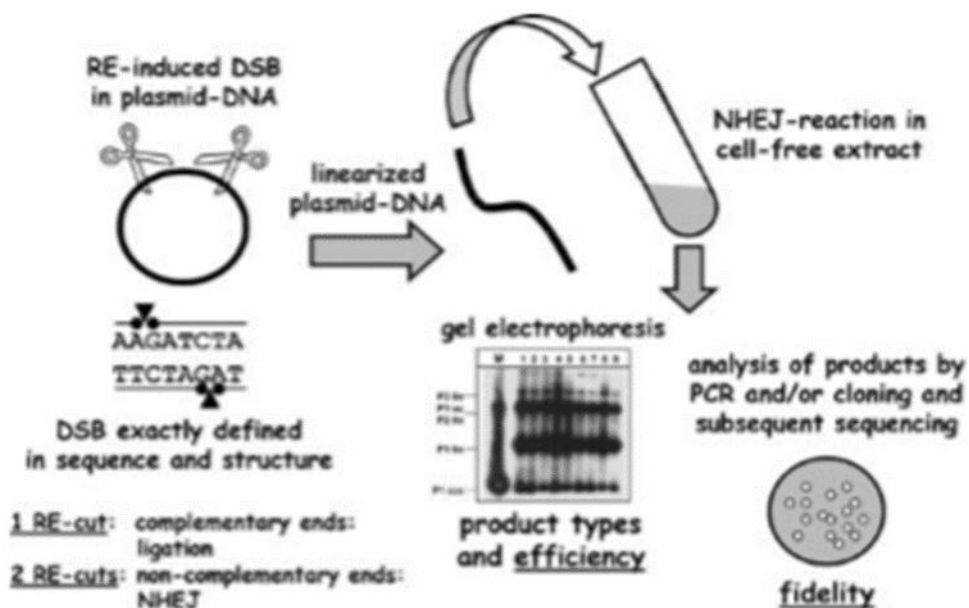


Slika 16. HeLa stanice (preuzeto sa <https://directorsblog.nih.gov/2013/08/07/hela-cells-a-new-chapter-in-an-enduring-story/>)

4.4. Vizualizacija produkata

4.4.1. Tehnike vizualizacije produkta

Za vizualizaciju produkta, odnosno interpretaciju rezultata testa najčešće se koristi elektroforeza na agaroznom gelu (slika 18). Elektroforeza je tehnika čija osnova leži u kretanju iona u električnom polju i koristimo je za razdvajanje nukleinskih kiselina ili proteina. Ovisno o tome što proučavamo, koriste se različiti gelovi. Kako su nukleinske kiseline polinukleotidne makromolekule, za test spajanja krajeva potreban je agarozni gel koji omogućuje jasnije razdvajanje molekula veće molekulske mase. Razdvajanje se najčešće vrši na temelju veličine molekule. Elektroforezom, ovisno kako naš produkt izgleda, možemo donijeti zaključak koja je vrsta NHEJ popravka zastupljena (slika 18). Produkte *in vitro* testa spajanja krajeva u staničnom ekstraktu možemo detektirati s fluorescentnim bojama, etidijevim bromidom, autoradiografijom, Southern hibridizacijom *in situ* ili PCR-om kao i odrediti slijed nukleotida sekvenciranjem (slika 17).



Slika 17. Detekcija produkta PCR-om ili sekvenciranjem¹⁰

Fluorescentne boje koje su najčešće upotrebljavane jesu: Vista Green, SYBR Green I i SYBR Gold. Također, za bojanje se koristi etidijev bromid koji je dokazano manje učinkovitiji od Vista Green boje, tj. ona je 100 puta osjetljivija nego etidijev bromid.⁹

Southern hibridizacija *in situ* je tehnika za detekciju određenog slijeda DNA u cjelokupnom uzorku DNA koja koristi fragmente DNA pokidane restrikcijskim enzimima, isti se razdvajaju prema veličini gel elektroforezom, denaturiraju i prenose na membranu nošeni otopinom soli kroz gel. Naposljetku, membrana se inkubira sa specifičnom DNA sondom koja se veže na komplementarne molekule DNA. Sonda vezana na membranu detektira se neradioaktivno ili autoradiografijom, a mjesto vezivanja sonde otkriva tražene fragmente DNA.

Autoradiografija je citokemijska tehnika za lokalizaciju bioloških makromolekula pomoću radioaktivnih izotopa.

PCR tehnika je umnožavanje fragmenata DNA lančanom reakcijom polimerazom za koju nam je potrebno poznavanje slijeda nukleotida koji omeđuje ciljni fragmenti. Ciljni fragment se nakuplja 2^n puta gdje je n broj ciklusa, teoretski iz jedne molekule DNA možemo dobiti 230 molekula DNA. Naravno vizualizacija je opet postignuta fluorescentnim bojama ili sondom.

4.4.2. Interpretacija rezultata

U tom kontekstu važno je definirati izraze precizan NHEJ (engl. *accurate*) i NHEJ sklon pogreškama (engl. *inaccurate*). Jasno je, kako precizno spajanje komplementarnih krajeva DNA rezultira uspostavom izvornog restrikcijskog mjesta. S druge strane, potpuna preciznost NHEJ mehanizma je dvojben, jer spajanje nekomplementarnih krajeva samo po sebi uzrokuje promjene u izvornom nizu. Kako ekstrakti jaja žabe iz roda *Xenopus* te stanica sisavaca s funkcionalnim NHEJ mehanizmom proizvode spektar reproducibilnih povezanih krajeva^{13 14}, mogu se razlikovati dva glavna mehanizma nehomolognog spajanja krajeva; popravak ispreplitanjem ili preklapanjem (engl. *overlap pathway*) i popravak popunjavanjem pukotine (engl. *fill-in pathay*) (slike 13B i 13C).

Dok se prilikom popravka preklapanjem spajaju suprotno-usmjereni stršeci jednolančani krajevi (5'/5'; 3'/3'), popravak ispunjavanjem pukotine povezuje granične ili dodirujuće krajeve (tupi kraj/5'; tupi kraj/3'; 5'/3').

4.4.2.1. Popravak preklapanjem (engl. *overlap pathway*)

Prilikom popravka preklapanjem, spajanjem pojedinačnih nasumičnih komplementarnih baza nastaju kratka potpuna ili djelomična preklapanja koja mogu sadržavati pogreške na unutarnjim ili vanjskim položajima. Njihov položaj određuje mehanizam budućeg popravljanja (slika 13B) ispunjavanjem pukotine (vjerojatno pomoću DNA polimeraza Pol μ i Pol λ) ili/i uklanjanjem nepovezanih baza (vjerojatno pomoću nukleaze Artemis).¹⁵

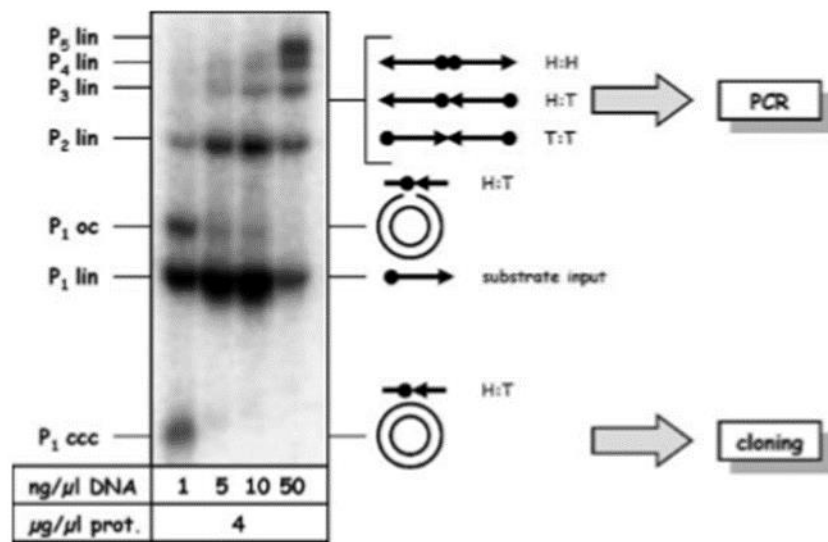
4.4.2.2. Popravak ispunjavanjem pukotine (engl. *fill-in pathway*)

U ovom slučaju, slijedovi nukleotida preklapajućih 5' i 3' krajeva ostaju potpuno očuvani, zahvaljujući sintezi DNA popunavanjem pukotina. Krajevi su prolazno povezani nekovalentnim interakcijama (uzdužno poravnati) dok 3' OH skupine na 5' preklapajućim ili tupim krajevima služe kao početnice za izravan popravak sintezom 3' preklapajućeg kraja (slika 13C).¹⁶

Kako oba ova popravka, preklapanjem i ispunjavanjem pukotina, procesom sinteze DNA, pokazuju sposobnost očuvanja sekvenci na 5' i 3' preklapajućim krajevima, mogu se označiti kao vrste preciznog popravka. S druge strane, precizan popravak NHEJ-om je znatno reduciran u staničnim ekstraktima mutanata deficitarnim za ključne faktore poput Ku80, Xrcc4 or DNA-PK_{CS}. Takve stanice su podložne nehomolognom spajanju krajeva na temelju mikrohomologije (μhomNHEJ ili MNHEJ) što rezultira stvaranjem različitih nusprodukata koje sadrže delecije nukleotida na mjestu spajanja tupih ili ravnih krajeva (slike 13D i E).¹⁷ Takav popravak označavamo kao popravak sklon pogreškama. Takvo poravnanje ili otupljivanje krajeva DNA (engl. *blunting*) može nastati na svim vrstama krajeva, bilo popunjavanjem 5' preklapanja ili egzonukleaznom razgradnjom 5' ili 3' preklapajućih krajeva. Iako je ovaj mehanizam s manjom učestalošću potvrđen u stanicama funkcionalnim za NHEJ, očito je kako ne zahtjeva sve ključne NHEJ faktore popravka, budući da je potvrđen u stanicama koje nemaju Ku70/80, DNA-PK_{CS}, ili Xrcc4/Lig4.¹⁷

Dokazano je kako u nedostatku ključnih NHEJ faktora može doći do spajanja različitih konformacija dvolančanih krajeva pomoću MNHEJ mehanizma sklonog pogreškama.¹⁷ Mikrohomologne regije u dvolančanoj DNA u blizini dvolančanog loma podložne su razmotavanju helikazom ili enzimatskoj razgradnji i tako pogodne za povezivanje. Primjerice, GATC slijed (slika 13E) na kraćem lijevom dupleksu na 3' kraju podliježe popunjavanju DNA sintezom zahvaljujući području mikrohomologije. Pri tome, komplementarni CTAG slijed na skraćenom desnom dupleksu postaje izravno povezan s lijevim skraćenim dupleksom i tako pospješuje povezivanje pukotine (engl. *nick ligation*). U sljedećem koraku, stršeći nepovezani krajevi (engl. *unpaired flap ends*) mogu biti uklonjeni egzonukleaznom razgradnjom ili endonukleaznim cijepanjem (pomoću endonukleaze Fen1).

Analiza slijeda nukleotida spojenih produkata koji su nastali u staničnim ekstraktima omogućuje identifikaciju tipa mehanizma NHEJ i procjenu njegove preciznosti. To olakšava usporedbu različitih tipova popravka (precizan popravak ovisan o kinazama DNA-PK i popravak sklon pogreškama na bazi mikrohomolognih regija) u stanicama s funkcionalnim NHEJ mehanizmom i stanicama deficitarnim za ključne faktore popravka. Ta dva mehanizma se mogu razlikovati na bazi produkata koje stvaraju i koje možemo razlikovati na gelu agaroze (slika 18). Dok precizni popravak ovisan o kinazama DNA-PK stvara kružne (oc- otvorena kružna molekula; ccc-kovalentno zatvorena kružna molekula) ili višestruke produkte, popravak sklon pogreškama na bazi mikrohomolognih regija stvara uglavnom linearne multimerne (P1 lin- linearni monomer; P2 lin- linearni dimer; P3-5 lin – višestruko povezani linearilizirani oligonukleotidi). Stoga popravak sklon pogreškama lako se prepozna u ekstraktima stanicama deficitarnim za kinaze DNA-PK uslijed nedostatka cirkularnih struktura.



Slika 18. Elektroforeza produkta spajanja krajeva nastalih nakon inkubacije u staničnom ekstraktu ¹⁰

Tablica 2. Modeli spajanja krajeva DNA *in vitro* testom

PRECIZAN POPRAVAK		POPRAVAK SKLON POGREŠKAMA
<ul style="list-style-type: none"> • Ovisan o kinazama DNA-PK • Produkti: kružne molekule - ccc,oc, višestruki produkti • Sposobnost očuvanja sekvenci na 5' i 3' preklapajućim krajevima 		<ul style="list-style-type: none"> • Izostaju ključni faktori poput Ku kompleksa, Xrcc4 i DNA-PK kinaze • Lako prepoznatljivi produkti: linearni multimeri-monomer, dimer, višestruko povezani linearizirani oligonukleotidi
POPRAVAK PREKLAPANJEM	POPRAVAK ISPUNJAVANJEM PUKOTINA	NEHOMOLOGNO SPAJANJE NA TEMELJU MIKROHOMOLOGIJE
<ul style="list-style-type: none"> • Kratka potpuna ili djelomična preklapanja s greškama na unutarnjem ili vanjskom položaju • Suprotno usmjereni krajevi • stršeci jednolančani krajevi 	<ul style="list-style-type: none"> • Povezivanje graničnih ili dodirujućih krajeva • Krajevi ostaju očuvani • Krajevi uzdužno poravnati 	<ul style="list-style-type: none"> • Delecije nukleotida na mjestu spajanja tupih ili ravnih krajeva • Mikrohomologne regije podložne razmotavanju helikazom ili enzimatskoj razgradnji

5. TEST SPAJANJA DNA KRAJEVA KAO METODA ISTRAŽIVANJA RAKA

In vitro test spajanja krajeva DNA krije svoju budućnost u biomedicinskim istraživanjima, otkrićima lijekova i prognozi različitih bolesti, a najvažnije u dijagnostici raka. Mnogi NHEJ testovi mogu imati široku primjenu u istraživanju raka, uključivši i utvrđivanje toksičnog učinka terapijskih sredstava i predviđanje recidiva raka nakon liječenja.

Kako je NHEJ glavni put popravka dvolančanih lomova DNA, mogućnost da se istraži učinkovitost tog jedinstvenog mehanizma u tumorskim stanicama ili osjetljivost istih na zračenje značajno će doprinijeti kliničkom radu. Jednostavnim riječima opisano, znajući učinkovitost popravka loma u stanicama raka ili predispoziciju da određene tumorske stanice utječu na NHEJ popravak onkolozi će moći zaključiti koji pacijenti će trebati kemoterapiju ili radijaciju kako bi im se kliničko stanje poboljšalo. Uočeno je da neuspješna terapija zračenjem ovisi o kapacitetu stanica raka da poprave dvolančane lomove DNA zbog genetičkih alteracija u genima zaduženim za NHEJ popravak koji onda doprinose rezistenciji ili senzibilnosti na radijaciju.⁷ To omogućava kategorizaciju pacijenata na one kojima je radijacija potrebna i one kojima šteti, ali i dozu radijacije koju pacijent treba.

Nadalje, nekoliko istraživanja pokazalo je kako se NHEJ popravak razlikuje ovisno o tipu stanice što bi moglo dovesti do uočavanja, naravno na molekularnom nivou, predispozicije za razvitak bolesti u populaciji.⁷ Shodno tome, ovim testom mogu se identificirati pojedinci s slabijim učinkom NHEJ popravka točnije koji dio NHEJ mehanizma je oštećen te time dovesti do prevencije određenih vrsta tumora koji nastaju kao posljedica istog.

Proteini koji su uključeni u mehanizam popravka dvolančanog DNA loma tj. u NHEJ mogu poslužiti kao biomarkeri ili ciljane molekule za antitumorske lijekove. Rezultati dobiveni ovim testom također mogu pomoći odabrati inhibitore, koji će pojačati učinak lijekova protiv raka. Inhibitor kinaza DNA-PKcs tj. lijek imenom „Wortmannin“ je posljedica upravo ovakvog istraživanja.⁷

Ono što je zadnje istraživano u ovom biomedicinskom području jest aktivnost popravka DNA dvolančanog loma u stanicama raka dojke i prevencija istoga, karcinogeni potencijali metala kadmija i predikcija povratka raka nakon tretmana kemoterapijom za rak glave i vrata.⁷

6. POSTUPAK

In vitro* test spajanja krajeva u proteinskom ekstraktu listova biljke *Arabidopsis thaliana

6.1. Priprema izvanstaničnog proteinskog ekstrakta listova biljke *Arabidopsis thaliana*

1. Svježi biljni materijal (listovi biljčica *Arabidopsis thaliana*) prethodno zamrznut u tekućem dušiku usitni se drobljenjem mikropistilom u mikroepruveti.
2. 1 g homogeniziranog biljnog tkiva doda se u 1 ml pufera za ekstrakciju proteina;

(50 mM Tris-HCl pH 7.5;

2 mM EDTA (Etilendiamintetraoctena kiselina);

0.2 mM PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride);

1 mM DTT (DL-Dithiothreiol);

1 x inhibitor proteaza, complete™, EDTA nije dodan).
3. Izdvajanje topljivih proteina centrifugiranjem pri 4 °C.
4. Određivanje koncentracije proteina kolorimetrijski (reagens za određivanje koncentracije proteina QuantiPro[®] BCA, Sigma-Aldrich).
5. Pripremiti 20% otopinu proteinskog ekstrakta u glicerolu i pohraniti pri -80 °C.

6.2. Priprema plazmidnog supstrata sa krajevima DNA za spajanje

1. Plazmid pUC18P1/4¹⁸ koristi se kao izvor krajeva DNA za *in vitro* test spajanja DNA krajeva (Slika 19). Lančanom reakcijom polimeraze s različitim kombinacijama početnica (tablica 3) kreirani su linearizirani supstrati DNA sa različitim slijedovima nukleotida podložni *in vitro* spajanju krajeva. DNA polimeraza visoke točnosti (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific) koristi se za dobivanje tupih krajeva (sa ili bez kratkih regija mikrohomologije). Ljepljivi stršeci krajevi mogu se dobiti razgradnjom lineariziranih supstrata dobivenih PCR reakcijom pomoću odgovarajućih restrikcijskih enzima (tablica 4.).

Tablica 3. Slijed nukleotida početnica korištenih prilikom kreiranja različitih krajeva u plazmidnom DNA supstratu ⁵

Naziv početnice	Upotreba	Slijed nukleotida
Q30	test spajanja krajeva	5'-GTTTCGGTGATGACGGTG-3'
Q31	test spajanja krajeva	5'-TGGCACGACAGGTTTCC-3'
Q40	test spajanja krajeva	5'-GCTGTAGGATGGTAGCTTGGCAC-3'
Q41	test spajanja krajeva	5'-ATCCTACAGCTGGAATTCGTAATC-3'
Q46	test spajanja krajeva	5'-TGGAATTCGTAATCATGGTCATAGC-3'
Q47	test spajanja krajeva	5'- CGTTGGATCCGAATTCGTAATCATGGTCATAGC-3'
Q48	test spajanja krajeva	5'- CGTTGGTACCGAATTCGTAATCATGGTCATAGC-3'
Q50	test spajanja krajeva	5'-CGATGGATCCGCTGTAGGATGGTAGCTTG-3'
Q51	test spajanja krajeva	5'-CGTTGGTACCGCTGTAGGATGGTAGCTTG-3'

Tablica 4. Slijed nukleotida na krajevima DNA plazmidnog supstrata u testu spajanja krajeva⁵

Lijevi kraj lineariziranog plazmida	Desni kraj lineariziranog plazmida	početnice
5' stršeći kraj <i>BamHI</i> (G/GATCC)	5' stršeći kraj <i>BamHI</i> (G/GATCC)	q47 + q50
3' stršeći kraj <i>KpnI</i> (GGTAC/C)	3' stršeći kraj <i>KpnI</i> (GGTAC/C)	q48 + q51
3' stršeći kraj <i>KpnI</i> (GGTAC/C)	5' stršeći kraj <i>EcoRI</i> (G/AATTC)	q48 + q51
tupi kraj (10 bp ponavljajuća sekvenca)	tupi kraj (10 bp ponavljajuća sekvenca)	q40 + q41
tupi kraj	tupi kraj	q40 + q46

6.3. Inkubacija lineariziranih oligonukleotidnih supstrata sa krajevima DNA u izvanstaničnom proteinskom ekstraktu listova *Arabidopsis thaliane*

1. Linearizirani oligonukleotidni supstrati (300 ng) inkubiraju se 2 sata pri 4 °C s 1 g proteinskog ekstrakta otopljenog u 20 µl otopine;

(50 mM Tris-HCl, pH 7.6,

10 mM MgCl₂,

1 mM DTT,

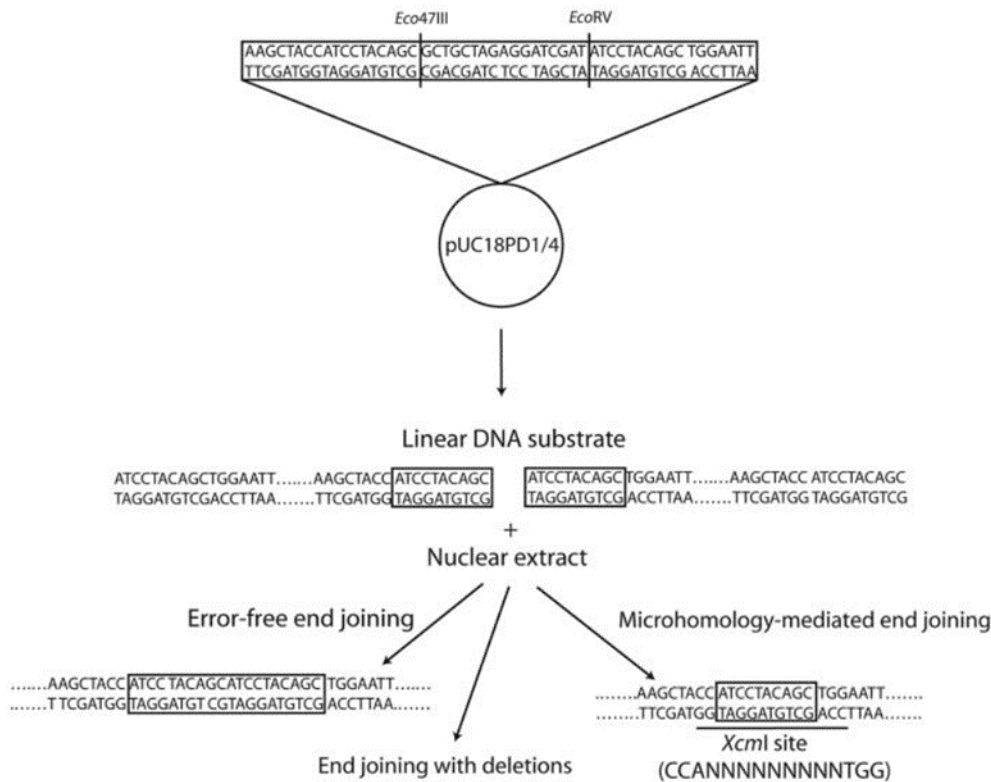
1 mM ATP,

25 % (w/v) polyethylene glycol 2000).

U cilju veće uspješnosti reakcije spajanja krajeva DNA uzima se veći omjer koncentracija DNA/proteini.

2. Nakon inkubacije, oligonukleotidni produkti spajanja krajeva se deproteiniziraju i pročišćavaju elektroforezom u 0,6 % otopini agaroze.

Kao negativna kontrola koriste se linearizirani oligonukleotidni DNA supstrati inkubirani bez proteinskog ekstrakta.



Slika 19. Prikaz plazmida pUC18P1/4 za in vitro test spajanja krajeva DNA. Razgradnjom plazmida pUC18P1/4 restriktivnim enzimima Eco47III i EcoRV nastaje linearizirani oligonukleotidni produkt s tupim krajevima koji sadrže ponavljajuće nukleotidne sekvence veličine 10 bp (ATCCTACAGC). Delecija jedne 10 bp sekvence na mjestu spojenih krajeva rezultira restriktivnim mjestom za enzim XcmI.¹⁸

6.4. Analiza produkata spajanja krajeva DNA

Uspješnost *in vitro* reakcije spajanja krajeva DNA odražava pojava spojenih linearnih oligonukleotida u obliku dimera i multimera vidljivih nakon razdvajanja elektroforezom u gelu agaroze.

1. Umnožavanje oligonukleotidnih spojenih supstrata reakcijom PCR koristeći parove početnica koje ograničavaju sekvence DNA na mjestu spojenih lineariziranih krajeva.

Korištenjem početnica q30 i q31 (tablica 3) na kalupu linearnih spojenih oligomernih sekvenci, koje su dobivene na gelu agaroze nakon inkubacije s proteinskim ekstraktom iz listova, nastaje fragment veličine 600 bp koji sadrži sekvence DNA nastale spajanjem krajeva.

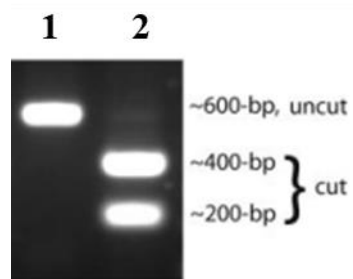
2. Ukloniravanje umnoženih fragmenta DNA u plazmid pJET1.2/blunt (2974 bp, Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit).

3. Razgradnja pojedinačnih plazmidnih klonova koji sadrže oligonukleotidne sekvence spojenih krajeva odgovarajućim restrikcijским enzimima kako bi odredili mehanizam njihovog nastanka, precizni popravak klasičnim NHEJ mehanizmom ili mehanizmom MMEJ baziranim na spajanju krajeva DNA u regiji mikrohomologije (slika 19).

4. Plazmidni klonovi koji ne stvaraju fragmente enzimatskom razgradnjom (cjeloviti fragment veličine 600 bp) ponovno se pročišćavaju s gela agaroze (slika 20) kako bi se slijed nukleotida na mjestu spajanja krajeva DNA odredio sekvenciranjem (potvrda preciznog spajanja krajeva DNA klasičnim mehanizmom NHEJ).

5. Plazmidni klonovi podložni enzimatskoj restrikciji ukazuju na spajanje krajeva mehanizmom MMEJ. Popravkom utemeljenom na mikrohomologiji (10 bp) nastaje restrikcijško mjesto za *XcmI* (CCAN9TGG). Razgradnjom PCR fragmenta (Slika 20) koji sadrži spojene krajeve (600 bp) pomoću enzima *XcmI* rezultira stvaranjem dvaju fragmenata (400 bp i 200 bp). Restrikcijško mjesto za enzim *XcmI* ne može nastati drugim mehanizmom spajanja krajeva.

6. Intenzitet jakosti vrpce DNA fragmenata na gelu određuje se obradom fotografija gela u programu ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Relativni udio MMEJ mehanizma u *in vitro* testu spajanja krajeva može se prikazati kao postotak fragmenata dobivenih *XcmI* razgradnjom u odnosu na ukupan broj umnoženih PCR fragmenata (suma cjelovitih 600 bp fragmenata i fragmenata natalih *XcmI* digestijom).



Slika 20. Oligonukleotidni linearni fragmenti koji sadrže in vitro spojene krajeve DNA nakon razdvajanja elektroforezom u gelu agaroze. Linija 1 - cjeloviti fragment veličine 600 bp nakon razgradnje enzimom XcmI. Linija 2 - fragmenti veličine 400 bp i 200 bp nastali XcmI digestijom.¹⁸

ZAKLJUČAK

In vitro test spajanja krajeva DNA, biokemijsko-molekularna metoda, omogućava nam veliki napredak i razvoj u različim znanstvenim poljima kao što su medicina, biotehnologija, molekularna biologija i biokemija. Osnova metode počiva na tome da u jednoj stanici ili staničnoj liniji, koristeći se staničnim ekstraktom ili pročišćenim proteinima iz tkiva s ciljanom inaktivacijom ključnih gena za popravak DNA oštećenja, možemo preciznije odrediti mehanizam aktivan u popravku oštećenja. Kroz razna istraživanja i eksperimente otkrili su se ključni proteini uključeni u klasični popravak nehomolognim spajanjem krajeva (NHEJ) kao što su Ku kompleks, DNA-PKcs kinaza, Xrcc4 i ligaza IV. Time je i mehanizam samog popravka bio jasniji te su se alternativni mehanizam (alt-EJ) i mehanizam popravka na temelju mikromolognih regija (MMEJ) pojavili kao rezultat mogućeg popravka. Shvaćanjem spomenutih mehanizama došlo je do hipoteze kako će se klasični mehanizam spajanja krajeva DNA zaobići ukoliko nema ključnih proteina te će stanica odabrati alternativni popravak.

Ovaj test može se izvesti u četiri koraka. Prvi korak je induciranje loma DNA s restriktivnim endonukleazama, ionizirajućim zračenjem ili biokemijskim agensima. Slijedeći korak uključuje izdvajanje linearizirane plazmidne DNA koja sadrži ciljano mjesto dvolančanog loma u molekuli DNA te inkubaciju s odabranim staničnim ekstraktom kako bi isti popravio dvolančani lom DNA. Zadnji korak je vizualizacija i detekcija produkta gel elektroforezom i bojanjem fluorescentim bojama ili autoradiografijom.

Istraživajući test spajanja krajeva DNA i pišući ovaj rad moje znanje i razumjevanje proširilo se ne samo u polju molekularne biologije već i biokemije te bioinformatike što dovodi do zaključka da je oštećenje molekule DNA, našeg genetičkog koda, izuzetno kompleksno i kako još u potpunosti nije shvaćeno. Molekula DNA može se usporediti s važnim programskim sustavom jer sadrži informacije i upute sa sintezu i funkciju ostalih staničnih dijelova, stoga, greška koja zahvaća taj programski sustav može nanijeti veliku štetu. Kako bi smanjili količinu mutacija odnosno preduhitriili štetne posljedice uzrokovane oksidativnim procesima i slobodnim radikalima razvili smo protokole i pokušali optimizirati *in vitro* test spajanja krajeva te danas ih već možemo uočiti u liječenju tumora i degenerativnih bolesti kao i u nutricionizmu - hrana koja umanjuje broj svakodnevnih mutacija.

Kao zaključak iznosim kako je ovaj test „heureka“ današnje znanosti te da u budućnosti može doprinijeti znanstvenom stvaralaštvu i tumačenju zamršenih i opsežnih procesa popravka oštećenja molekule DNA.

POPIS SLIKA

Slika 1. DNA molekula (preuzeto sa https://fineartamerica.com/featured/9-dna-molecule-conceptual-artwork-pasieka.html)	3
Slika 2. Uzroci i popravak oštećenja DNA molekule (preuzeto sa https://www.rndsystems.com/resources/articles/dna-damage-response).....	5
Slika 3. Usporedba mehanizama homologne rekombinacije i nehomolognog spajanja krajeva DNA ¹	6
Slika 4. Mehanizam klasičnog nehomolognog spajanja DNA krajeva ³	7
Slika 5. Spajanje krajeva potpmognuto mikrohomologijom (MMEJ) ⁴	8
Slika 6. Usporedba klasičnog, alternativnog i B-NHEJ-a (preuzeto sa https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-DNA-end-joining-pathways-C-NHEJ-canonical-non-homologous_fig1_264126447).....	9
Slika 7. Proteini uključeni u mehanizam NHEJ i njihove poznate međusobne interakcije ²	11
Slika 8. Plazmid pART7-HA-GFP koji sadrži restriksijsko mjesto za enzim BamHI na N-kraju kodirajuće sekvence za GFP i koristi se za transfekciju biljnih protoplasta ⁶	12
Slika 9. Kronološki redoslijed razvoja metodologije in vitro testa spajanja krajeva DNA ⁷	14
Slika 10. Koraci in vitro testa spajanja DNA krajeva ⁷	15
Slika 11. Struktura bleomycina (preuzeto sa https://en.wikipedia.org/wiki/Bleomycin).....	16
Slika 12. Prikaz oligonukleotidnih supstrata sa karakterističnim krajevima DNA koje produciraju pojedini restriksijski enzimi ¹⁰	17
Slika 13. Prikaz ključnih proteina u kombinaciji s mogućim konformacijama dvolančanih krajeva DNA prilikom nehomolognog spajanja u in vitro staničnim ekstraktima ¹⁰	18
Slika 14. Plazmid pSP65 (Promega, 3kb) (preuzeto sa https://ecoliwiki.org/colipedia/index.php/File:PSP65.jpg).....	19
Slika 15. Stanična kultura Arabidopsis thaliane(preuzeto sa https://www.researchgate.net/figure/n-vitro-culture-of-Arabidopsis-Callus-tissue-is-generated-from-leaf-explants-of_fig1_256931052)	21
Slika 16. HeLa stanice (preuzeto sa https://directorsblog.nih.gov/2013/08/07/hela-cells-a-new-chapter-in-an-enduring-story/).....	22
Slika 17. Detekcija produkta PCR-om ili sekvenciranjem ¹⁰	23
Slika 18. Elektroforeza produkta spajanja krajeva nastalih nakon inkubacije u staničnom ekstraktu ¹⁰	26
Slika 19. Prikaz plazmida pUC18P1/4 za in vitro test spajanja krajeva DNA. Razgradnjom plazmida pUC18P1/4 restriksijskim enzimima Eco47III i EcoRV nastaje linearizirani oligonukleotidni produkt s tupim krajevima koji sadrže ponavljajuće nukleotidne sekvence veličine 10 bp (ATCCTACAGC). Delecija jedne 10 bp sekvence na mjestu spojenih krajeva rezultira restriksijskim mjestom za enzim XcmI. ¹⁸	31
Slika 20. Oligonukleotidni linearni fragmenti koji sadrže in vitro spojene krajeve DNA nakon razdvajanja elektroforezom u gelu agaroze. Linija 1 - cjeloviti fragment veličine 600 bp nakon razgradnje enzimom XcmI. Linija 2 - fragmenti veličine 400 bp i 200 bp nastali XcmI digestijom. ¹⁸	33

POPIS TABLICA

Tablica 1. Prednosti i nedostaci rada na biljci <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
Tablica 2. Modeli spajanja krajeva DNA in vitro testom	27
Tablica 3. Slijed nukleotida početnica korištenih prilikom kreiranja različitih krajeva u plazmidnom DNA supstratu ⁵	30
Tablica 4. Slijed nukleotida na krajevima DNA plazmidnog supstrata u testu spajanja krajeva ⁵	30

LITERATURA

1. Janosik SM. 済無No Title No Title. Vol 42.; 2005. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
2. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(8):495-506. doi:10.1038/nrm.2017.48
3. Sharma S, Raghavan SC. Nonhomologous DNA end joining in cell-free extracts. *J Nucleic Acids.* 2010;2010. doi:10.4061/2010/389129
4. Hailong Wang & Xingzhi Xu. Microhomology-mediated end joining: new players join the team. *Cell Biosci.* Published online 2017. <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-017-0136-8>
5. Jia Q, Dulk-Ras A Den, Shen H, Hooykaas PJJ, de Pater S. Poly(ADP-ribose)polymerases are involved in microhomology mediated back-up non-homologous end joining in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 2013;82(4-5):339-351. doi:10.1007/s11103-013-0065-9
6. Jia Q, Bundock P, Hooykaas PJJ, de Pater S. *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA Integration and Gene Targeting in *Arabidopsis thaliana* Non-Homologous End-Joining Mutants . *J Bot.* 2012;2012:1-13. doi:10.1155/2012/989272
7. Pastwa E, Somiari RI, Malinowski M, Somiari SB, Winters TA. In vitro non-homologous DNA end joining assays-The 20th anniversary. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(6):1254-1260. doi:10.1016/j.biocel.2008.11.007
8. Bleomycin. Chemocare. <http://chemocare.com/chemotherapy/drug-info/bleomycin.aspx>
9. Pastwa E, Neumann RD, Winters TA. *In Vitro Repair of Complex Unligatable Oxidatively Induced DNA Double-Strand Breaks by Human Cell Extracts.* Vol 29.; 2001.
10. Ehmsen KT, Heyer W-D. and Resolution of Recombination Intermediates. *Genome.* 2010;3(Table 1):1-67. doi:10.1007/7050
11. Datta K, Purkayastha S, Neumann RD, Winters TA. An In Vitro DNA Double-Strand Break Repair Assay Based on End-Joining of Defined Duplex Oligonucleotides. In: ; 2012:485-500. doi:10.1007/978-1-61779-998-3_33
12. Poczai P, Cernák I, Varga I, Hyvönen J. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Genet Resour Crop Evol.* 2014;61(1):796-815. doi:10.1134/S1022795411020074
13. Pfeiffer P, Vielmetter W. Joining of nonhomologous DNA double strand breaks in vitro. *Nucleic Acids Res.* Published online 1988. doi:10.1093/nar/16.3.907
14. Daza P, Reichenberger S, Göttlich B, Haggmann M, Feldmann E, Pfeiffer P. Mechanisms of nonhomologous DNA end-joining in frogs, mice and men. *Biol Chem.* 1996;377(12):775-786. doi:10.1515/bchm3.1996.377.12.775

15. Pfeiffer P, Thode S, Keohavong P, Thilly WG. Resolution and conservation of mismatches in dna end joining. *Mutagenesis*. 1994;9(6):527-535. doi:10.1093/mutage/9.6.527
16. Thode S, Schäfer A, Pfeiffer P, Vielmetter W. A novel pathway of DNA end-to-end joining. *Cell*. 1990;60(6):921-928. doi:10.1016/0092-8674(90)90340-K
17. Feldmann E, Schmiemann V, Goedecke W, Reichenberger S, Pfeiffer P. DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(13):2585-2596. doi:10.1093/nar/28.13.2585
18. Liang L, Deng L, Chen Y, Li GC, Shao C, Tischfield JA. Modulation of DNA end joining by nuclear proteins. *J Biol Chem*. 2005;280(36):31442-31449. doi:10.1074/jbc.M503776200

LITERATURA S INTERNETA

1. <https://fineartamerica.com/featured/9-dna-molecule-conceptual-artwork-pasieka.html>
2. <https://www.rndsystems.com/resources/articles/dna-damage-response>
3. https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-DNA-end-joining-pathways-C-NHEJ-canonical-non-homologous_fig1_264126447
4. <https://en.wikipedia.org/wiki/Bleomycin>
5. <https://ecoliwiki.org/colipedia/index.php/File:PSP65.jpg>
6. https://www.researchgate.net/figure/n-vitro-culture-of-Arabidopsis-Callus-tissue-is-generated-from-leaf-explants-of_fig1_256931052
7. <https://directorsblog.nih.gov/2013/08/07/hela-cells-a-new-chapter-in-an-enduring-story/>

SKRAĆENICE

DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Deoksiribonukleinska kiselina
DSB	<i>Double-strand break</i>	Dvolančani lom
HR	<i>Homologous recombination</i>	Homologna rekombinacija
NHEJ	<i>Non homologous end joining</i>	Nehomologno spajanje krajeva
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Lančana reakcija polimerazom
MMEJ	<i>Microhomology mediated end joining</i>	Spajanje krajeva potpomognutom mikrohomologijom
B-NHEJ	<i>„Back-up“ non homologous end joining</i>	Alternativno nehomologno spajanje krajeva
RE	<i>Restriction endonuclease</i>	Restriksijska endonukleza
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>	Zeleni fluorescentni protein
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>	Gel elektroforeza poliakrilamidnim gelom
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Ribonukleinska kiselina
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>	Glasnička ribonukleinska kiselina
kb	<i>Kilobase</i>	Kilobaza