

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
RNA BIOLOOGIA UURIMISGRUPP

**Inimese *NAT10* geeni väljalülitamine CRISPR-Cas9 meetodil ja väljalülituse
funktsionaalne valideerimine**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Valeria Naumova

Juhendajad Pavel Kudrin, PhD

Tõnis Org, PhD

TARTU 2023

“Inimese *NAT10* geeni väljalülitamine CRISPR-Cas9 meetodil ja väljalülituse funktsionaalne valideerimine”

RNA modifikatsioonid on laialdaselt levinud eri tüüpi RNA-des: informatsiooni-RNA-des (mRNA), transpordi-RNA-des (tRNA) ja ribosomaalsetes-RNA-des (rRNA). Üks oluline RNA modifikatsioon on N4-atsetüültsütidiin (ac4C), mille puhul modifitseeritakse lämmastikaluse tsütosiini. ac4C modifikatsioon on katalüüsitud N-atsetültransferaas 10 (*NAT10*) poolt, mille puhul arvatakse, et see ensüüm on ainus ac4C modifikatsiooni allikas inimese rakkudes. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on lülitada välja (*knockout* – KO) *NAT10* geen inimese embrüonaalsetes neeru rakkudes (HEK293F) kasutades CRISPR-Cas9 mehhanismi. CRISPR-Cas9 on väga laialdaselt kasutatav tööriist genoomi modifitseerimiseks ning geenide funktsiooni uurimiseks. Käesoleva bakalaureusetöö tulemusena saadi rakuliinid, kus oli vähenenud *NAT10* mRNA suhteline ekspressioon, *NAT10* valgu ekspressioon ja võimekus katalüüsida ac4C RNA modifikatsiooni, ning rakuliinide enamus kloonide puhul oli *NAT10* geeni väljalülitamine osaline.

Märksõnad: ac4C, *NAT10*, CRISPR-Cas9, *knockout*, HEK293F

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika

“Human *NAT10* gene knockout with CRISPR-Cas9 method and knockout functional validation”

RNA modifications are widely spread across various types of RNA: messenger RNA (mRNA), transfer RNA (tRNA), and ribosomal RNA (rRNA). One important RNA modification is N4-acetylcytidine (ac4C), where the cytosine is modified. ac4C modification is catalyzed by N-acetyltransferase 10 (*NAT10*), and it is believed that this enzyme is the only source of ac4C modifications in human cells. In this study we knocked out the *NAT10* gene in human embryonic kidney cells (HEK293F) using the CRISPR-Cas9 mechanism. CRISPR-Cas9 is a widely used tool for genome engineering and the study of gene function. As a result, we demonstrate, that in knockout *NAT10* cell lines relative expression of *NAT10* mRNA, *NAT10* protein expression, and the ability to catalyze ac4C RNA modification were reduced, and in the majority of cell line clones, heterozygous knockout (KO) was observed.

Keywords: ac4C, *NAT10*, CRISPR-Cas9, *knockout*, HEK293F

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 RNA modifikatsioonid.....	7
1.2 N4-atsetüültsütidiin.....	8
1.3 N-atsetüültransferaas 10.....	9
1.4 CRISPR-Cas süsteemid.....	11
1.5 CRISPR-Cas9 süsteem.....	13
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	16
2.1 Töö eesmärgid.....	16
2.2 Materjal ja meetodika.....	16
2.2.1 Plasmidi PX459 transformatsioon E.coli DH5a tüvesse ja paljundamine.....	16
2.2.2 crRNA disain.....	16
2.2.3 crRNA oligonukleotiidide kloonimine vektorplasmidi PX459 ja Sangeri sekveneerimine.....	17
2.2.4 Rakukultuur.....	19
2.2.5 sgPX459 plasmidide transfektsioon HEK293F rakkudes.....	20
2.2.6 NAT10 KO kloonide selektsioon ja isoleerimine.....	20
2.2.7 Genoomse DNA eraldamine ja PCR.....	23
2.2.8 RNA eraldamine ja RT-qPCR.....	24
2.2.9 Western Blot (WB).....	25
2.2.10 Immunofluorestsents analüüs (IF).....	26
2.3 Tulemused ja arutelu.....	28
2.3.1 crRNA järjestuse valimine NAT10 KO läbiviimiseks.....	28
2.3.2 NAT10 KO funktsionaalne valideerimine.....	29
2.3.3 NAT10 väljalülituse efektiivsuse analüüs DNA tasemel PCR ja geelelektroforeesi abil.....	30
2.3.4 NAT10 mRNA ekspressiooni analüüs RT-qPCR abil.....	31
2.3.5 NAT10 valgu ekspressiooni analüüs WB abil.....	32
2.3.6 NAT10 valgu aktiivsuse analüüs IF abil.....	34
KOKKUVÕTE.....	36
SUMMARY.....	37
KIRJANDUSE LOETELU.....	39
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	45
LIHTLITSENTS.....	46

KASUTATUD LÜHENDID

ac4C – N4-atsetüültsütidiin

APS – ammoonium persulfaat

Ac-CoA – atsetüül koensüüm A

BCA – bitsinkoniinhape

bp – aluspaar (*base pair*)

BSA – veise seerumalbumiin

Cas – CRISPR-iga seotud (*CRISPR associated*)

CDS – kodeeriv järjestus

cDNA – komplementaarne DNA

CRISPR – klasterdatud regulaarsete vahedega lühikesed palindroomsed kordused (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*)

crRNA – CRISPR-RNA

DAPI – 4',6-diamidiino-2-fenüüliindool

DMSO – dimetüülsulfoksiid

DSB – kaksikahelaline katke (*double-strand break*)

FBS – veiseloote seerum

GAPDH – glütseraldehyüd-3-fosfaatdehüdrogenaas

GNAT – Gcn5-seotud N-atsetüültransferaas

gRNA – giid-RNA

HAT – histooni atsetüültransferaas

HDR – homoloogiliselt suunatud parandus (*homology-directed repair*)

HEK293F – inimese embrüonaalsed neeru rakud (*Human embryonic kidney cells*)

HeLa – emakakaela vähi rakud

hm⁵C – 5-hüdroksümetüültsütosiin

hTERT – inimese telomeraasi pöördtranskriptaas

IF – immunofluorestsents

indel – insertioon või deletsioon

KO – väljalülitus (*knockout*)

LB – Luria-Bertani

m⁶A – N⁶-metüüladenosiin

m⁵C – 5-metüültsütosiin

Mdm2 – E3 ubikvitiin-ligaas

mRNA – informatsiooni-RNA

NAT10 – N-atsetüültransferaas 10

ncRNA – mittekodeeriv-RNA
NHEJ – mittehomoloogne DNA-otste ühendamine (*non-homologous end joining*)
p53 – tuumorsupressor valk p53
PAM – protospaieriga külgnev motiiv (*protospacer adjacent motif*)
PBS – fosfaatpuhverdatud füsioloogiline lahus
PFS – protospaieriga äärmine järjestus (*protospacer flanking sequence*)
pre-mRNA – prekursor-mRNA
pre-rRNA – prekursor-rRNA
PS – penitsiliin ja streptomütsiin
PUS – pseudouridiin süntaas
PVDF – polüvinüülidendifluoriid
rRNA – ribosomaalne-RNA
RT-qPCR – reaalaaja kvantitatiivne PCR (*real-time quantitative PCR*)
SDOC – naatriumdeoksükolaat
SDS – naatriumdodetsüülsulfaat
sgRNA – üheaahelaline-giid-RNA
SpCas9 – *Streptococcus pyogenes*-e Cas9
ZFN – tsink-sõrme nukleasid
TAE – Tris-atsetaat-EDTA
TALENs – transkriptsiooni aktivaatori sarnased efektor nukleasid
TEMED – tetrametüül-etüleen-diamiin
tracrRNA – transaktiveeriv crRNA
tRNA – transpordi-RNA
tRNA^{met} – metioniini tRNA
tRNA^{ser/leu} – seriini/leutsiini tRNA
WB – *Western Blot*
WT – metsiktüüp (*wild type*)
Ψ – pseudouridiin

SISSEJUHATUS

RNA molekulide modifikatsioonid on leitud paljudes RNA-des ning nad mõjutavad oluliselt erinevaid RNA protsesse, näiteks RNA sünteesi, transporti, funktsiooni ja metabolismi (Cui jt., 2022). Üks oluline RNA modifikatsioon on N4-atsetüültsütidiin (ac4C), mille puhul modifitseeritakse lämmastikaluse tsütosiini (Kawai jt., 1989). Inimese mRNA-des ac4C mõjutab translatsiooni efektiivsust (Arango jt., 2018; Arango jt., 2022). ac4C samuti osaleb stressivastuses nii eukarüootides kui prokarüootides (Sas-Chen jt., 2020; Tardu jt., 2019). ac4C modifikatsioon katalüüsitakse N-atsetüültransferaas 10 (NAT10) poolt, mille puhul arvatakse, et see ensüüm on ainus ac4C modifikatsiooni allikas inimese rakkudes (Arango jt., 2018). Inimese *NAT10* on geen, mis kodeerib atsetüültransferaasi, mis suudab atsetüleerida lisaks RNA-le ka valke, sealhulgas reguleerides tuumorsupressor valgu (p53) ja telomeraasi aktiivsust (Liu jt., 2016; Kong jt., 2011). Kuna NAT10 on ainus ac4C allikas rakkudes, selle väljalülitamine aitab paremini mõista ac4C RNA modifikatsiooni funktsiooni (Roundtree jt., 2017; Arango jt., 2018).

CRISPR-Cas erinevad süsteemid on prokarüootide omandatud immuunsuse mehhanism, mis kaitsevad neid bakteriofaagide eest ning võimaldavad neil võõraid nukleiinhappeid lõigata (Barrangou jt., 2007). See on RNA-juhitud endonukleaasi-põhine süsteem, mis suudab CRISPR-RNA (crRNA) abil tuvastada ja lõigata sihtmärk DNA või RNA järjestuse (Hsu jt., 2014; Abudayyeh jt., 2016). Iga CRISPR-Cas süsteem sisaldab CRISPR-ga seotud (Cas) geenide klastrit, mittekodeerivaid RNA-sid (ncRNA) ja korduvate elementide komplekti (Ran jt., 2013). Cas nukleaaside ümberprogrammeerimine võimaldab CRISPR-Cas meetodit rakendada eukarüootsetes rakkudes, et teha genoomis spetsiifilisi muudatusi, näiteks insertioonid, deletsioonid ja punktmutatsioonid (Lin jt., 2014; Pinder jt., 2015). CRISPR-Cas9 on kõige paremini uuritud CRISPR-Cas süsteem ja väga laialdaselt kasutatav tööriist genoomi modifitseerimiseks ning geenide funktsiooni uurimiseks (Ran jt., 2013). CRISPR-Cas9 ja teistel sarnastel süsteemidel on suur terapeutiline potentsiaal geneetiliste haiguste korral. Lisaks saab sarnast lähenemist kasutada geneetiliselt modifitseeritud loom-mudelite loomiseks ravimarenduslikel eesmärkidel (Sharma jt., 2021).

Käesolev bakalaureusetöö on valminud Tartu Ülikooli geenitehnoloogia õppekava raames. Töö eksperimentaalne osa tehti Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas, bio- ja siirdemeditsiini instituudis (TÜ SIME), RNA bioloogia uurimisrühmas. Bakalaureusetöö põhieesmärk oli välja lülitada *NAT10* geen HEK293F rakkudes kasutades CRISPR-Cas9 meetodit ja teha kindlaks väljalülituse edukus järgmiste meetoditega: PCR, RT-qPCR, *Western Blot* (WB) ja immunofluorestsents (IF).

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 RNA modifikatsioonid

RNA modifikatsioone leidub eri tüüpi RNA-des: informatsiooni-RNA-des (mRNA), transpordi-RNA-des (tRNA) ja ribosomaalsetes-RNA-des (rRNA) (Roundtree jt., 2017). 50 aastat tagasi tuvastati ja kirjeldati esimesed RNA modifikatsioonid (Cohn, 1960). Nimelt leiti, et 5' *cap* ja 3' polü(A) saba RNA modifikatsioonide olemasolu eristab eukarüootse mRNA prokarüootsest mRNA-st (Holtkamp jt., 2006). Lisaks nendele leiti veel kümme erinevat modifikatsiooni, kui sekveeriti esimene tRNA 1965 aastal (Holley jt., 1965). Eukarüootsed tRNA-d on kõige rohkem modifitseeritud kui võrrelda mRNA ja rRNA-ga ning nendes leidub keskmiselt 13 modifikatsiooni ühe tRNA molekuli kohta (Roundtree jt., 2017). Tänapäevaks on tuvastatud üle 170 erineva RNA modifikatsiooni (Roundtree jt., 2017). Kõige sagedasem mRNA modifikatsioon on N⁶-metüüladenosiin (m⁶A) (Dominissini jt., 2012). m⁶A on imetajatele hädavajalik, sest see kiirendab prekursor-mRNA (pre-mRNA) protsessingut ning mRNA transporti (Holmes jt., 2021).

RNA modifikatsioonid esinevad mitte ainult adenosiinides, vaid ka teistes nukleotiidides. Tsütosiine modifitseeritakse 5-metüültsütosiiniks (m⁵C), mis on mRNA puhul oluline m⁵C sisaldavate transkriptide tuuma ekspordi jaoks (Yang jt., 2017). tRNA m⁵C modifikatsioon reguleerib stressivastust ja kontrollib translatsiooni efektiivsust ning täpsust (Schaefer jt., 2010; Tuorto jt., 2012). Lisaks mõjutavad mRNA m⁵C modifikatsioonid mRNA splaissingut, mRNA stabiilsust ja DNA reparatsiooni (Young jt., 2005; Yang jt., 2019; Chen jt., 2020). rRNA m⁵C modifikatsioon aitab hoida ribosoomi konformatsiooni stabiilsena ja on seotud ribosoomi sünteesiga (Sharma jt., 2013).

Pseudouridiin (Ψ) on uridiini isomeer, mis esineb sageli eri tüüpi RNA-des ja on oluline rRNA ning tRNA komponent (Cohn, 1960). Selle modifikatsiooni võimalikku esinemist mRNA-s eirati kuni selle olemasolu tuvastati PseudoU-seq meetodi abil > 200 inimese mRNA-s (Carlile jt., 2014). Ψ sünteesi viivad läbi pseudouridiin süntaaside (PUS) perekonna ensüümid, mis katalüüsivad isomerisatsiooni stressi tingimustes (Purchal jt., 2022). Ψ mõjutab RNA sekundaarstruktuuri ja mängib olulist rolli translatsioonil, mõjutades tRNA seondumist ribosoomiga (Fernandez jt., 2013; Karijolic jt., 2011).

1.2 N4-atsetüültsütidiin

Keskendudes tsütosiini modifitseerimisele RNA-s, on avastatud 11 erinevat modifikatsiooni, millest kolm on konserveerunud kõikides elu vormides: m⁵C, 5-hüdroksümetüültsütosiin (hm⁵C) ja ac4C (Arango jt., 2018). Esimese kahe modifikatsiooni järel lisatakse tsütosiinile veel metüülrühm ja viimasena mainitud juhul atsetüülrühm (Arango jt., 2018). Atsetüleerimine on universaalne mehhanism, mis reguleerib biomolekulide funktsioneerimist (Ito jt., 2014). Üheks atsetüleerimise näideks on mRNA ensümaatilise modifitseerimine, mille tulemusena moodustub atsetüleeritud lämmastikalus ac4C (Ito jt., 2014). ac4C on RNA modifikatsioon, mis esineb nii pro- kui ka eukarüootides ning esmakordselt avastati see pärmides ja *Escherichia coli*'s (Kruppa jt., 1972; Ohashi jt., 1972). Inimese mRNA puhul suurendab ac4C transkripti stabiilsust ja translatsiooni efektiivsust (Arango jt., 2018). ac4C modifitseerimist katalüüsib NAT10, ning arvatakse, et NAT10 on ainus ac4C modifikatsiooni allikas inimese rakkudes (Arango jt., 2018; Chen jt., 2022). Kui *NAT10* geen lülitati välja emakakaela vähi rakkudes (HeLa), siis ac4C ekspressioon vähenes 80–90% (Arango jt., 2018).

HeLa rakkude mRNA-s on tuvastatud üle tuhande ac4C modifikatsiooni koha, kusjuures suurem osa nendest esineb kodeerivates järjestustes (CDS) (Arango jt., 2018). ac4C olemasolu CDS-des suurendab elongatsiooni efektiivsust parandades interaktsiooni tRNA-ga (Arango jt., 2018). Prokarüootides mõjutab mRNA atsetüleerimine positiivselt translatsiooni, millele viitab suurenenud tRNA dekodeerimise efektiivsus (Taniguchi jt., 2018). ac4C olemasolu metioniini tRNA (tRNA^{met}) antikoodoni varieerub positsioonis, ehk sellises positsioonis, mis saab paarduda mitmete mRNA nukleotiididega järgimata *Watson-Crick* paardumise reeglit, tekitab amiidirühma konformatsiooni, mis soodustab paardumist guanosiiniga ja AUG järjestuste äratundmist mRNA koodonil (Taniguchi jt., 2018).

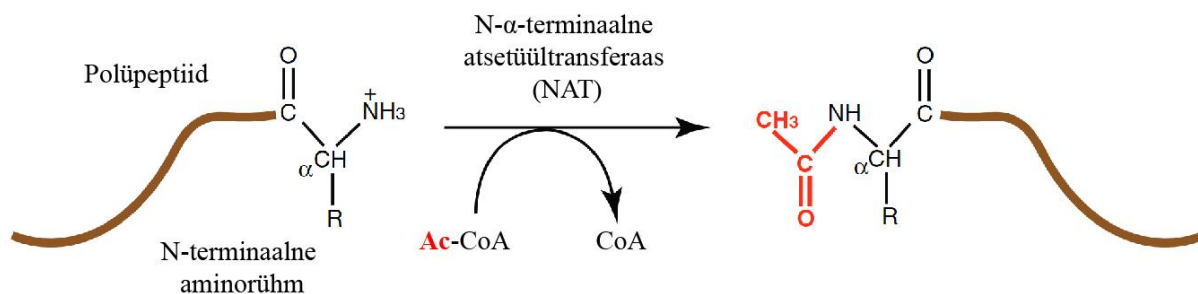
Sellised molekulaarsed protsessid nagu mRNA translatsioon ja lagunemine on omavahel tihedalt seotud: mRNA stabiilsuse vähenemine avaldub translatsiooni efektiivsuse vähenemisel ja vastupidi (Hanson ja Coller, 2018). ac4C modifikatsioon esineb lisaks mRNA-le ka 18S rRNA-s ja seriini/leutsiini tRNA-s (tRNA^{ser/leu}) (Arango jt., 2018). Võrreldes metsiktüüpi ja *NAT10 knockout* (KO) HeLa rakke on leitud, et Ser/Leu sisaldus tRNA-s pole seotud ac4C-modifitseeritud mRNA geeniekspressiooni muutusega (Arango jt., 2018). ac4C puudumine 18S rRNA-l ei avalda märkimisväärset mõju ribosoomide seondumisele mRNA-ga (Arango jt., 2018). On leitud, et ac4C(+) mRNA-de translatsioon on efektiivsem võrreldes metsiktüüpi HeLa mRNA-ga ja et ac4C(+) mRNA-de puhul on spetsiifiliselt

suurenenud ribosoomide tihedus (Arango jt., 2018). Kuna ac4C modifikatsiooni olemasolu ei mõjuta mRNA kogust, vaid mõjutab translatsiooni, siis sünteesitud valkude kogus *NAT10* KO HeLa rakkudes on märkimisväärselt vähenenud. Nende tulemuste põhjal võib järeldada, et mRNA atsetüleerimine on oluline translatsiooni regulatsioonil *in vivo* rakukultuurides (Arango jt., 2018).

Lisaks on teada, et ac4C modifikatsioon mängib olulist rolli ka stressivastuses. Näiteks suureneb ac4C hulk mRNA-s juhul kui *Saccharomyces cerevisiae* rakke töödelda H₂O₂-ga (Tardu jt., 2019). On leitud, et arhes *Thermococcus kodakarensis*'el suureneb TK0754, mis on inimese NAT10 homolog, hulk kõrgetel temperatuuridel (65–95 °C) (Sas-Chen jt., 2020). Märkimisväärne on see, et TK0754 KO tüves on täheldatud temperatuurist sõltuvat kasvu aeglustust, võrreldes metsiktüüpi tüvega (Sas-Chen jt., 2020). Seetõttu võib oletada, et ac4C modifikatsioon on vajalik arhede kasvamiseks eeskätt kõrgetel temperatuuridel, mis on ainupärane ellujäämisstrateegia *Thermococcales* seltsi jaoks (Sas-Chen jt., 2020).

1.3 N-atsetüültransferaas 10

NAT10 katalüüsib inimesel RNA modifikatsiooni ac4C (Arango jt., 2018). *NAT10* geen kuulub histooni atsetüültransferaaside (HAT) perekonda ning Gcn5-seotud N-atsetüültransferaas (GNAT) alam perekonda (Liu jt., 2016; Cai jt., 2017; Baumgartner jt., 2021). GNAT perekonna ensüümidel on olemas konserveerunud järjestustega motiivid, sealhulgas atsetüül koensüüm A (Ac-CoA) seondumismotiiv (Lu jt., 1996). Üldiselt, NAT ensüümid atsetüleerivad valke, kandes üle atsetüül-rühma Ac-CoA-st sünteesitavas polüpeptiidis oleva aminohape positiivselt laetud N-terminaalse otsa vaba α-aminorühmale (Joonis 1) (Drazic jt., 2016). Lisatud atsetüül-rühm neutraliseerib positiivse laengu ja blokeerib N-terminaalse otsa edasiste modifikatsioonide eest (Drazic jt., 2016).



Joonis 1. Aminohape N-terminaalse aminorühma atsetüleerimine. Atsetüleerimist viib läbi NAT ensüüm kandes üle atsetüül-rühma atsetüül koensüüm A-st (Ac-CoA) sünteesitavas polüpeptiidis oleva aminohappe positiivselt laetud N-terminaalse otsa vaba α-aminorühmale. Pilt on kohandatud Starheim jt., (2012) järgi.

On leitud, et NAT10-sõltuv atsetüleerimine reguleerib p53 aktiivsust. p53 on transkriptsiooni faktor, mis hoiab genoomi stabiilsust kontrollides rakkude jagunemist või indutseerides kahjustatud rakkude apoptoosi (Vousden jt., 2002; Riley jt., 2008). Normaalses tingimustes on p53 valgu kogus rakkudes madal, kuid stressi tingimustes hakkab selle hulk kiiresti kasvama (Liu jt., 2016). p53 dünaamika on reguleeritud posttranslatsiooniliste modifikatsioonide, sealhulgas atsetüleerimise kaudu (Ito jt., 2001). On leitud, et HAT-d atsetüleerivad p53 ning aktiveerivad seda (Gu ja Roeder, 1997). NAT10, mis kuulub HAT-de hulka, interakteerub nii p53 kui E3 ubikvitiin-ligaasiga (Mdm2), mis on oluline p53 inhibiitor (Honda jt., 1997; Liu jt., 2016). Nii N- kui ka C-terminaalsed NAT10 otsad interakteeruvad p53-ga, kus NAT10 atsetüleerib lüsiini 120 p53 DNA sidumise domeenis (Liu jt., 2016). Samuti on leitud, et NAT10 seondub Mdm2-ga N-terminaalse otsa kaudu ja soodustab Mdm2 degradeerumist (Liu jt., 2016). Mdm2 seondub p53-ga ja kas suunab p53 lagunema või surub alla p53 transkriptsiooni (Thut jt., 1997). NAT10 aga stabiliseerib p53 valgu Mdm2-indutseeritud ubikvitinatsiooni inhibeerimise kaudu (Liu jt., 2016). NAT10 on peamiselt lokaliseeritud tuumakesse, kuid peale DNA kahjustumist, liigub NAT10 nukleoplasmasse ning interakteerub p53-ga, aktiveerides seal p53-vahendatud rakutsükli kontrolli ja apoptoosi (Kong jt., 2011; Liu jt., 2016).

NAT10 on samuti iseloomustatud kui telomeraasi aktiivsuse regulaator (Kong jt., 2011). Kui NAT10 on üleekspresseeritud, stimuleerib see inimese telomeraasi pöördtranskriptaasi (hTERT) transkriptsiooni (Lv jt., 2003). Suurenenud hTERT aktiivsus suurendab telomeraasi aktiivsust rakkudes (Kong jt., 2011). Lisaks on leitud, et NAT10 ekspressioon suureneb oksüdatiivse stressi korral (Liu jt., 2007). Selle tulemusena NAT10 akumuleerub tuumas ning suurendab rakkude resistentsust genotoksilisusele (Liu jt., 2007).

Nagu eelnevalt mainitud, on NAT10 oluline tRNA ja mRNA atsetüleerimiseks (Ito jt., 2014; Arango jt., 2018). NAT10 osaleb ka ribosoomi biogeneesis – protsessis, mille käigus moodustuvad suur ja väike ribosoomi subühikud rRNA-dest ja ribosomaalsetest valkudest (Henras jt., 2008; Ito jt., 2014). Lisaks osaleb NAT10 prekursor rRNA (pre-rRNA) transkriptsioonis ja 18S rRNA protsessingus (Kong jt., 2010). pre-rRNA-d, mis on olulised rRNA tekkeks ning edasiseks osalemiseks ribosoomi koosseisus, on tugevalt modifitseeritud eukarüootsetes rakkudes (Henras jt., 2008).

1.4 CRISPR-Cas süsteemid

Viimaste 20 aasta jooksul on arenenud mitmed genoomi modifitseerimise tehnoloogiad, nende hulgas on tsink-sõrme nukleaasid (ZFN), transkriptsiooni aktivaatori sarnased efektor nukleaasid (TALENs) ja RNA-ga juhitud CRISPR-Cas nukleaasi süsteem (Miller jt., 2007; Christian jt., 2010; Karginov ja Hannon, 2010). Esimesed kaks tehnoloogiat põhinevad spetsiaalselt disainitud valkudel, mis suudavad seonduda konkreetse DNA-järjestusega ja seda lõigata oma ensüümaatilise aktiivsuse abil (Ran jt., 2013). CRISPR kasutab aga RNA molekule, et juhtida Cas nukleaas sihtmärk DNA järjestuseni, mille järel nukleaas lõikab selle (Karginov ja Hannon, 2010). Võrreldes TALEN-iga, on CRISPR-süsteeme kergem konstrueerida ning nad võimaldavad täpsemat genoomi modifitseerimist, kuna lõikavad spetsiifilist sihtmärkjärjestust (Sanjana jt., 2012; Miller jt., 2011).

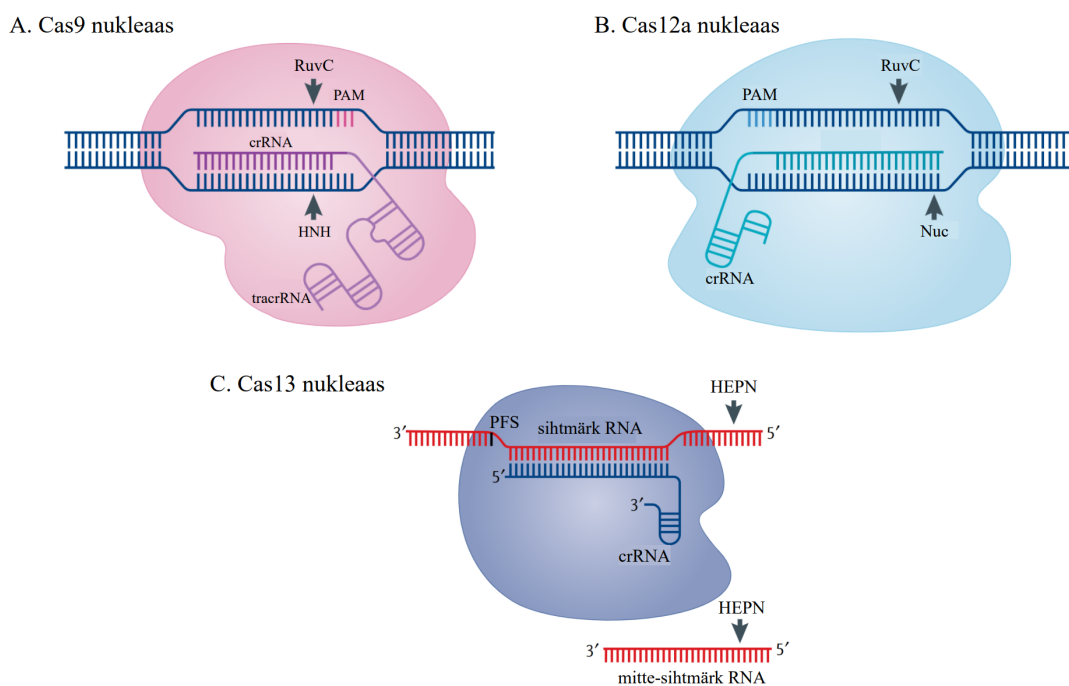
CRISPR on ingliskeelne lühend, mis tähendab *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ehk klasterdatud regulaarsete vahedega lühikesed palindroomsed kordused. Looduses on CRISPR-Cas süsteem prokarüootide omandatud immuunsuse mehhanism, mis kaitseb neid bakteriofaagide ja mobiilsete geneetiliste elementide vastu ning võimaldab neil võõraid nukleiinhappeid lõigata (Barrangou jt., 2007). Iga süsteem sisaldab Cas geenide klastrit, ncRNA-sid ja korduvate elementide komplekti (Ran jt., 2013). Need süsteemid kasutavad sihtimiseks 20-nukleotiidset crRNA-d, mis on komplementaarne DNA sihtmärkjärjestusele ja tagab Cas valgu spetsiifilisuse (Hsu jt., 2014). Mõnede CRISPR-süsteemide puhul (näiteks CRISPR-Cas9) loob crRNA ja transaktiveeriva crRNA (tracrRNA) ühendamine grRNA kompleksi (Deltcheva jt., 2011). Eksperimentaalsetes CRISPR-Cas süsteemides kasutatakse üheaahelalist-giid-RNA-d (sgRNA), mis suunab Cas nukleaasi sihtmärk-DNA-le (Ran jt., 2013). Et Cas nukleaas suudaks ära tunda sihtmärkjärjestuse, on vaja peale crRNA-d protospaiseriga külgnevat motiivi (*protospacer adjacent motif* – PAM). PAM on lühike DNA järjestus (tavaliselt 2-6 aluspaari (bp)), mis asub 3–4 nukleotiidi kaugusel lõikekohast allavoolu ehk 3' suunal ning seondub osalise komplementaarsusega DNA piirkonnale, mis pistu erinev iga CRISPR süsteemi korral (Shah jt., 2013). Näiteks on *Streptococcus pyogenes*-e Cas9 (SpCas9) nukleaasile vaja ära tundmiseks 5'-NGG PAM-i (N tähendab ükskõik millist nukleotiidi), samal ajal *Neisseria meningitidis*-e Cas9 vajab pikemat 5'-NNNNGATT PAM-i (Jinek jt., 2012; Zhang jt., 2013).

Üks kõige paremini uuritud CRISPR-süsteeme on tüüp II süsteem, mille hulka kuulub nukleaas nimega Cas9 (Jinek jt., 2012). Seda saab rakendada nii *in vitro* erinevates rakutüüpides kui ka elusorganismides, näiteks inimene, hiir ja *Drosophila melanogaster* (Ran

jt., 2013; Mali jt., 2013; Wang jt., 2013; Gratz jt., 2013). CRISPR-Cas9 süsteem on kirjeldatud peatükis 1.5 (Kirjanduse ülevaade).

Klass 2 kategooria tüüp V CRISPR-süsteemi kuulub ka nukleas Cas12a (varem tuntud kui Cpf1), mida saab samuti kasutada eukarüootsete rakkude genoomi modifitseerimiseks (Zetsche jt., 2015). Cas12a nukleas lõikab sihtmärk DNA ahelaid jättes 5' kleepuvaid üleulatuvaid otsi ja nukleas ei vaja sihtimiseks tracrRNA-d (Jeon jt., 2018). Cas12a sisaldab kaks domeeni: RuvC-sarnane endonukleasi domeen ja Nuc domeen DNA lõikamiseks (Joonis 2B) (Nishimasu jt., 2014).

Osa CRISPR-Cas süsteemidest suudavad lõigata mitte ainult DNA sihtmärk järjestust, vaid ka RNA-d. Näiteks suudab klass 2 kategooria tüüp VI CRISPR-süsteemi kuuluv Cas13 nukleas tuvastada prokarüootides üheaahelalist RNA-d (Abudayyeh jt., 2016). Cas13 nukleasid vajavad sihtmärk järjestuse tuvastamiseks protospeisseriga äärmist järjestust (*protospacer flanking sequence* – PFS), ning Cas13 lõikab nii sihtmärk kui mitte-sihtmärk RNA-d, kasutades selleks HEPN domeeni (Joonis 2C) (Abudayyeh jt., 2016). On näidatud, et ümberprogrammeeritav Cas13a nukleas lõikab nii prokarüootsetes- kui eukarüootsetes rakkudes spetsiifilised mRNA-d (Abudayyeh jt., 2016).



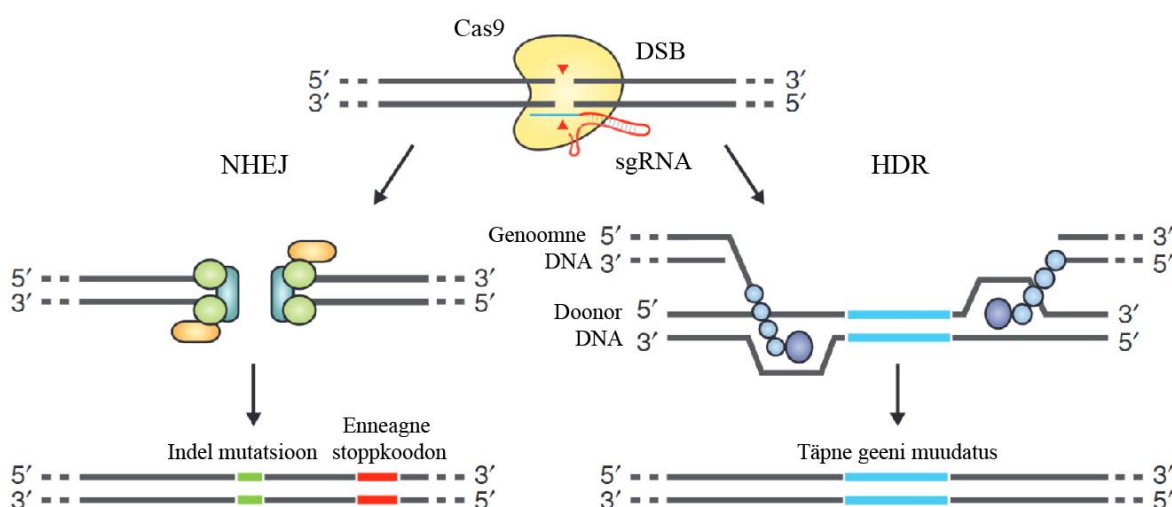
Joonis 2. Skemaatiline ülevaade erinevate CRISPR-Cas süsteemide lõikemehhanismidest. A. Cas9 nukleas kasutab sihtmärk DNA ära tundmiseks CRISPR-RNA-d (crRNA), transaktiveerivat crRNA-d (tracrRNA) ja sihtmärk DNA kolm nukleotiidi pikkust protospeisseriga külgneva motiivi (PAM). 20-nukleotiidi pikk crRNA on komplementaarne sihtmärk järjestusele ning DNA komplementaarset ahela lõikab Cas9 HNH domeen. RuvC domeen lõikab mitte-komplementaarset DNA ahelat. Cas9 tekitab tõmpide otstega kaksikahelalise katke (DSB). B. Cas12a nukleas kasutab sihtmärk DNA ära tundmiseks ainult crRNA-d ja PAM-i. Lõikamisel osalevad RuvC-sarnane domeen ja Nuc domeen ning Cas12a nukleas lõikab sihtmärk DNA ahelaid jättes 5' kleepuvaid üleulatuvaid otsi. C. Cas13 nukleas kasutab sihtmärk RNA ära tundmiseks crRNA-d ja protospeisseriga äärimise järjestuse (PFS). Cas13 lõikab nii sihtmärk kui mitte-sihtmärk RNA-d, kasutades selleks HEPN domeene. Joonis on kohandatud Pickar-Oliver ja Gersbach (2019) järgi.

1.5 CRISPR-Cas9 süsteem

Cas9 on klass 2 kategooria tüüp II CRISPR süsteemi kuuluv nukleas, millel on mitu domeeni, mis moodustavad kaks funktsionaalset osa: nukleasi ja tuvastuse osa (Nishimasu jt., 2014). Cas9 nukleas on kõige levinumalt kasutatav vahend genoomi modifitseerimiseks (Ran jt., 2013). SpCas9 oli esimene nukleas, mida eraldati prokariotsetest rakkudest, ümberprogrammeriti ja kasutati imetajate rakkude modifitseerimiseks (Jinek jt., 2012; Mali jt., 2013). Pärast DNA sihtmärgi tuvastamist tekitab Cas9 tõmpide otstega kaksikahelalise katke (DSB) (Garneau jt., 2010). Cas9 valgul on olemas kaks konserveerunud nukleasi-domeeni: HNH ja RuvC, mille abil nukleas saab edukalt lõigata sihtmärkjärjestuse (Sapranaukas jt., 2011). HNH domeen lõikab DNA ahela, mis on komplementaarne crRNA

järjestusega, RuvC domeen lõikab aga mitte-komplementaarse DNA ahela (Joonis 2A) (Jinek jt., 2012).

Kui Cas9 valk lõikab sihtmärkjärjestuse, läbib sihtmärk DNA tavaliselt ühte kahest DNA parandamise teed: mittehologogne DNA-otste ühendamine (NHEJ) või homologiliselt suunatud parandus (HDR) (Ran jt., 2013). Eukarüooidid kasutavad tihti esimest mehhanismi, kus DSB-d ligeeritakse omavahel kokku, mille puhul on suur tõenäosus, et genoomis ilmnevad juhuslikud insertioonid või deletsioonid (indel) (Lin jt., 2014). Sellised mutatsioonid geeni kodeerivas piirkonnas põhjustavad raaminihet ja enneaegse stoppkoodoni tekkimist, mis omakorda põhjustavad geeni KO (Joonis 3) (Ran jt., 2013). HDR puhul, toimetatakse koos Cas9 nukleasiga rakkudesse doonor-DNA, millel on homoloogia sihtmärk järjestusega (Lin jt., 2014). Doonor-DNA-ks võivad olla üheaahelised DNA oligonukleotiidid või kaheaahelaline DNA homoloogiliste üleulatuvate otstega (Ran jt., 2013). HDR on täpsem mehhanism kui NHEJ, seega HDR abil saab genoomi sihtmärk järjestuses teha spetsiifilisi muudatusi, näiteks punktmutatsioone või pikema DNA segmendi lisamist (Joonis 3) (Pinder jt., 2015).



Joonis 3. Kaksikahelaline katke (DSB) sihtmärkjärjestuses võib põhjustada soovimatuid muutusi genoomis. Cas9 tekitab DSB DNA sihtmärk järjestuses, mille järel sihtmärk järjestus läbib ühte kahest parandamise teest. Mittehologogse DNA-otste ühendamise (NHEJ) puhul ligeeritakse DSB-d kokku, mille puhul tekib indel mutatsioon, mis võib põhjustada enneaegse stoppkoodoni teket. Homoloogiliselt suunatud parandus (HDR) vajab DSB parandamiseks doonor-DNA-d, mis on homoloogiline sihtmärk järjestusele. HDR on täpsem mehhanism, kui NHEJ, mis võimaldab sihtmärk järjestuses teha spetsiifilisi muudatusi, näiteks punktmutatsioone või pikema DNA segmendi lisamine. Joonis on kohandatud Ran jt., (2013) järgi.

Cas9 nukleaasi HNH ja RuvC domeene muteerides saab lisada täiendavaid funktsioone. Näiteks, kui muuta RuvC domeeni katalüütilises osas aspartaatalaniiniks, tekib Cas9 nukleaasi mutatsioon, mis lõikab ainult ühte sihtmärki DNA ahelat, mitte mõlemat ahelat nagu Cas9 nukleaasi puhul (Sapranaukas jt., 2011; Cong jt., 2013). Selline üheaahelaline katkestus soodustab HDR parandamise teed, mis vähendab soovimatute indel mutatsioonide esinemissagedust (Cong jt., 2013).

Sarnaselt teiste nukleasidega, ei ole Cas9 nukleaasi lõige alati täpne, mis tähendab, et Cas9 võib madala tõenäosusega lõigata ka mitte-sihtmärki DNA järjestust (*off-target*) (Fu jt., 2013). *Off-target* efektide esinemissagedus sõltub ensüümi kontsentratsioonist ning sarnaste järjestuste esinemisest genoomis (Ran jt., 2013). Seega, tuleb crRNA järjestus, mis määrab Cas9 nukleaasi täpsust disainida hoolikalt, et vähendada *off-target* efektide esinemist (Hsu jt., 2013). Rohkem kui kolm mittepaarduvat nukleotiidi crRNA ja sihtmärki järjestuse vahel põhjustavad *off-target*-i (Fu jt., 2013). *Off-target* efektid põhjustavad organismis tõsiseid probleeme genoomi tasemel, näiteks genoomi ümberkorraldused, suured deletsioonid ja ebasoovitava geeni KO, mis lõppkokkuvõttes võib viia loomadel vähirakkude ja taimedel soovimatute fenotüüpide tekkimiseni (Cai jt., 2018; Guilinger jt., 2014).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö esimene eesmärk oli valida kõige efektiivsem crRNA järjestus NAT10 KO läbiviimiseks. Teine eesmärk oli luua mittefunktsionaalse NAT10 geeniga NAT10 KO HEK293F rakuliin. Kolmas eesmärk oli kontrollida eeldatava KO edukust järgmiste meetoditega: PCR, RT-qPCR, WB ja IF.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Plasmidi PX459 transformatsioon *E.coli* DH5a tüvesse ja paljundamine

Antud töös kasutati plasmidi PX459 V2.0 (#62988, Addgene) (Ran jt., 2013), mis sisaldab Cas9 valku kodeerivat järjestust ning ampitsilliini resistentsusgeeni, mille abil on võimalik eristada transformeeritud baktereid. Bakterite kultuure kasvatati Luria-Bertani (LB) agarsöötmele (Labema) või LB puljongis (Labema), mis olid autoklaavitud 20 min 121 °C juures. Transformatsiooniks segati kompetentsed *E.coli* DH5a bakterirakkud (45 µl) ja PX459 plasmid (100 ng). Transformatsioon viidi läbi järgmistel tingimustel: 25 min jääl hoidmine; kuumašokk 45 s 42 °C juures; 5 min jääl hoidmine. Seejärel inkubeeriti transformeeritud baktereid LB puljongis termotsükleris 1 tund 37 °C juures, külvati edasi LB agarsöötmele Petri tassile (edaspidi tassile), mis sisaldas ampitsilliini (100 µg/ml) ja inkubeeriti üleöö 37 °C juures. Järgmisel päeval võeti LB agarsöötmele tassilt üks bakterikoloonia ning inkubeeriti ampitsilliiniga (100 µg/ml) LB puljongis loksutis üleöö 37 °C juures. Plasmidi PX459 eraldamiseks kasutati FavorPrep *Plasmid Extraction Mini* komplekti (FavorGen) vastavalt tootja protokollile. DNA kontsentratsioon mõõdeti NanoDrop2000 spektrofotomeetriga (Thermo Scientific). Eraldatud plasmidi kogus oli 18 µg.

2.2.2 crRNA disain

NAT10 KO rakuliini tegemiseks kasutati CRISPR-Cas9 süsteemi (Ran jt., 2013). crRNA-d disainiti nii, et nad oleksid komplementaarsed NAT10 geeni erinevate eksonitega: ekson 4, 5 ja 9. crRNA-de disainimiseks kasutati veebiprogrammi Synthego CRISPR *Design Tool* (*Knockout Guide Design* - Synthego), ning selle abil disainiti kaks 20-aluspaari pikkused crRNA järjestused. Disainimisel jälgiti järgmiseid punkte:

- järjestus peab olema NAT10 geeni kodeeriva ala alguses
- järjestus peab asuma eksonis, mis esineb enamustes NAT10 geeni transkriptides

- järjestusel on potentsiaalselt kõrge aktiivsus, mida iseloomustatakse Doench skooriga (Doench jt., 2016). Järjestuse aktiivsus tähendab, et see peab efektiivselt suunama Cas9 nukleaasi sihtmärk järjestusele ja Cas9 lõige peab toimuma kõrgema tõenäosusega.
- võimalike *off-target* efektide esinemine
- 5'-NGG PAM järjestuse esinemine kohe peale sihtmärkjärjestust.

Töös oli kasutatud lisaks üks crRNA järjestus Arango jt., (2018) artiklist. See oli valitud positiivse kontrollina, kuna artiklis näidati, et selle järjestusega saavutati eduka KO HeLa rakkudes. Selle järjestuse omadused olid kontrollitud sama programmi abil, millega disainiti eelmised crRNA-d.

2.2.3 crRNA oligonukleotiidide kloonimine vektorplasmiiidi PX459 ja Sangeri sekveneerimine

PX459 plasmiid sisaldab sgRNA ekspressioonikasetti, mille ette tuli kloonida soovitud crRNA oligonukleotiidid. Vektorplasmiidide saamiseks viidi läbi restriksioon, mille segu lõppmaht oli 40 µl ning mis sisaldas vektorplasmiiidi PX459 (4 µg), 10x *FastDigest* rohelist puhvri (Thermo Scientific), *FastDigest* BbsI restriктаasi (2 µl, Thermo Scientific) ja destilleeritud vett (dH₂O). Restriksioonisegu inkubeeriti PCR masinas (Eppendorf nexus) järgmise programmiga: 10 min 37 °C; 10 min 65 °C. Restriksiooni õnnestumist kontrolliti 1% agarosgeelil. Geeli valmistamisel kasutati agarooosi (Bioatlas) ja 1x TAE puhvrit (40 mM Tris-HCl, 20 mM glatsiaaläädikhape, 1 mM EDTA pH 8.6) ning DNA visualiseerimiseks lisati 5 µl *Atlas ClearSight* DNA värvi (Bioatlas). DNA fragmentide suuruse kindlakstegemiseks kasutati 100 bp DNA suurusmarkerit *Ready to Load* (Solis BioDyne). Geelelektroforees viidi läbi 110 V juures 45–60 min. Peale geelelektroforeesi lõigati vektorplasmiid geelist välja ja eraldati kasutades *QIAquick Gel Extraction* komplekti (QIAGEN) vastavalt tootja protokollile. Vektorplasmiiidi kontsentratsiooni kontrolliti *Quibit dsDNA HS and BR Assay* komplekti abil (Invitrogen) vastavalt tootja protokollile ja mõõdetud *Quibit* fluoromeetriga (Invitrogen). Eraldatud ja lõigatud vektorplasmiiidi PX459 kogus oli 600 ng.

Disainitud crRNA-de kloonimiseks vektorplasmiiidi PX459 telliti vastavad komplementaarsete järjestustega üheaahelised DNA oligonukleotiidid (TAGCopenhagen) (Tabel 1). Oligonukleotiidid olid disainitud nii, et ülemise ehk edaspidise oligonukleotiidi 5' üleulatavas otsas oli CACCG järjestus ja alumise komplementaarse oligonukleotiidi 5' üleulatavas otsas oli AAAC järjestus ning 3' otsas C nukleotiid. Oligonukleotiidide 5' ja 3'

otstele lisatud järjestused olid vajalikud selleks, et ühendada neid BbsI lõike järjestusega PX459 plasmiidis armivabalt.

Tabel 1. Töös kasutatud üheaahelised DNA oligonukleotiidid crRNA sünteesimiseks. Tabelis on toodud *NAT10* geeni eksonid, milles crRNA sihtmärk asub. Ülemise oligonukleotiidi 5' üleulatuv ots (CACCG) ja alumise oligonukleotiidi 5' üleulatuv ots (AAAC) ning 3' otsas olev C nukleotiid on märgistatud rasvase kirjaga.

Ekson	Järjestused
4	5' CACCGTGGAACTGAACATAAAGC 3' 3' CACCTTGTGACTTGTATTTTCGCAAA 5'
5	5' CACCGCCTACGGACCATGAACTCAC 3' 3' CGGATGCCTGGTACTTGAGTGCAAA 5'
9	5' CACCGGAGTGCAACAGTACTCCTCA 3' 3' CCTCACGTTGTCATGAGGAGTCAAA 5'

crRNA oligonukleotiidid lahjendati lõpp-kontsentratsioonini 100 µM. Üheaahelised oligonukleotiidid liideti omavahel reaktsiooni lõppmahus 20 µl kasutades 5x puhvrit (250 mM Tris-HCl pH 7.4, 250 mM NaCl), crRNA oligonukleotiide (400 pmol/µl) ja dH₂O ning PCR masina (Eppendorf nexus) programmi: 30 min 37 °C; 5 min 95 °C; temperatuuri vähendamine 25 °C-ni 5 °C min⁻¹. Kokkuliitunud oligonukleotiidid lahjendati lõpp-kontsentratsioonini 20 fmol/µl. Vektorplasmiidide PX459 ligeerimiseks crRNA oligonukleotiididega viidi läbi ligeerimine reaktsioonisegus lõppmahuga 20 µl, mis sisaldas vektorplasmidi PX459 (40 ng), kokkuliitunud crRNA oligonukleotiidide (20 fmol), 10x T4 DNA puhvrit (1x puhver sisaldab 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT; Thermo Scientific), T4 DNA ligaasi (1 µl, Thermo Scientific) ja dH₂O. Ligeerimissegude inkubeeriti toatemperatuuril üks tund.

Saadud sgPX459 plasmiidid (E4, E5 ja E9; E – ekson) transformeeriti *E.coli* DH5α tüvesse. Plasmiidid kannavad sellist nimetust, sest peale crRNA oligonukleotiidide kloonimist sisaldavad nad terviklikku sgRNA järjestust koos tracrRNA-ga. Transformatsiooni tingimused on kirjeldatud Peatükis 2.2.1 (Materjal ja meetodika). Transformeeritud bakterid inkubeeriti SOC söötmes termotsükleris 37°C juures. SOC sööde oli valmistatud 20 mM glükoosilahusest ja SOB söötmest (Super Optimaalne Puljong, Sigma). Bakterid külvati LB agarsöötmele tassidele, mis sisaldas ampitsiliini (100 µg/ml) ja inkubeeriti üleöö 37 °C juures. Järgmisel päeval võeti igalt tassilt kolm bakterikolooniat ning inkubeeriti neid ampitsiliiniga (100 µg/ml) LB puljongis ja loksutil üleöö 37 °C juures. sgPX459 plasmiidide eraldamiseks kasutati FavorPrep *Plasmid Extraction Mini* komplekti (FavorGen) vastavalt tootja

protokollile. crRNA oligonukleotiidide kloonimise õnnestumist kontrolliti Sangeri sekveneerimise abil. Selleks saadeti sgPX459 plasmiidid (500 ng) ja praimerid (10 µM, Tabel 2), EBK DNA sekveneerimise tuumiklaborisse. Praimerid olid disainitud veebiprogrammi Chop Chop abil (CHOPCHOP).

Tabel 2. crRNA oligonukleotiidide kloonimise õnnestumise kontrolliks Sangeri sekveneerimisele saadetud plasmiidid ja praimerid.

Plasmiid	Järjestus
sgPX459_E4	5' GCTCTGGTAACTGGCTCTCAT 3'
sgPX459_E5	5' AGCCTTAACTCCAACTTGCTG 3'
sgPX459_E9	5' TTATTTAGCCTGGCATCAACCT 3'

Saadud sekveneerimise tulemused olid analüüsitud järgmiste programmide abil: *SnapGene Viewer* (Dotmatics) ja NCBI BLAST (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool). Joendamiseks oli kasutatud esialgne PX459 plasmiid ja sgPX459 plasmiidid. Edasiseks tööks parima vektorplasmidi valimiseks jälgiti:

- crRNA ülemise oligonukleotiidi esinemist järjestuses
- sgPX459 plasmidi ja esialgse PX459 plasmidi identsust. See tähendab, et muudatus joendamisel pidi olema ainult kohas, kuhu klooniti crRNA oligonukleotiidid, mitte muudes kohtades. Juhuslike mutatsioonide esinemine sgPX459 plasmidis vähendab KO edukust, kuna suureneb tõenäosus, et mutatsioonid rikuvad teiste oluliste plasmidi geenide funktsiooni, näiteks tracrRNA-d ja Cas9-d kodeerivad järjestused.

2.2.4 Rakukultuur

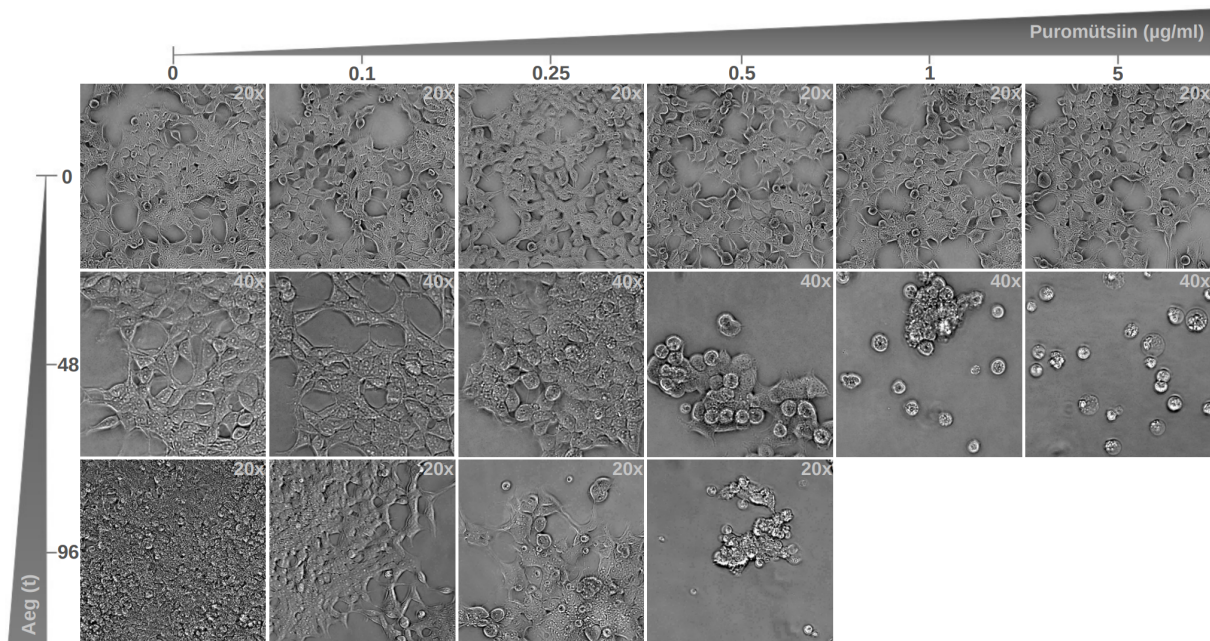
Töös kasutati inimese embrüonaalseid neeru rakke HEK293F (ATCC). Rakke kasvatati kõrge glükoosisisaldusega DMEM (41966-029, Gibco) söötmes, mis sisaldas 10% veiselote seerumit (FBS, Gibco) ja 1% penitsilliini ja streptomüsiini segu (PS, Gibco). Iga 2–3 päeva järel vaadeldi rakke mikroskoobi all (Zeiss AxioCam 208) ning 80–90% täituvuse saavutamisel külvati rakud edasi lahjendades neid 10 korda. Selleks pesti rakud *Dulbecco's* fosfaatpuhverdatud füsioloogilise lahusega (PBS, Sigma) ja võeti tassilt lahti 0.05% trüpsiini abil (Gibco). Rakke kasvatati inkubaatoris (Eppendorf CellExpert C170i) temperatuuril 37 °C ja 5.0% CO₂ sisalduse juures.

2.2.5 sgPX459 plasmiidide transfektsioon HEK293F rakkudesse

Enne transfektsiooni läbiviimist jagati rakud 24 tundi varem ja kasvatati neid DMEM söötmes (10% FBS, 1% PS) 24-kannulise koekultuuri plaadil. Rakkude plaatimisel määrati rakkude tihedust LUNA-2 automaatse rakulugejaga (Logos biosystems) ning lahjendati need tiheduseni 1.3×10^5 rakku ühe süvendi kohta. Järgmisel päeval viidi läbi transfektsioon plaadi täituvusel 70–80%. Transfektsiooniks kasutati Lipofectamine™ 3000 reagenti (Invitrogen) ning seda teostati tootja protokoll järgi. Kasutati sgPX459 plasmide (E4, E5 ja E9; plasmiidide kogus oli 500 ng ühe kannu kohta) ning Opti-MEM söödet (31985-070, Gibco). Positiivse kontrollina kasutati esialgset PX459 plasmidi ja negatiivse kontrollina kasutati Opti-MEM söödet. Rakke kasvatati inkubaatoris 37 °C juures 24 tundi.

2.2.6 NAT10 KO kloonide selektsioon ja isoleerimine

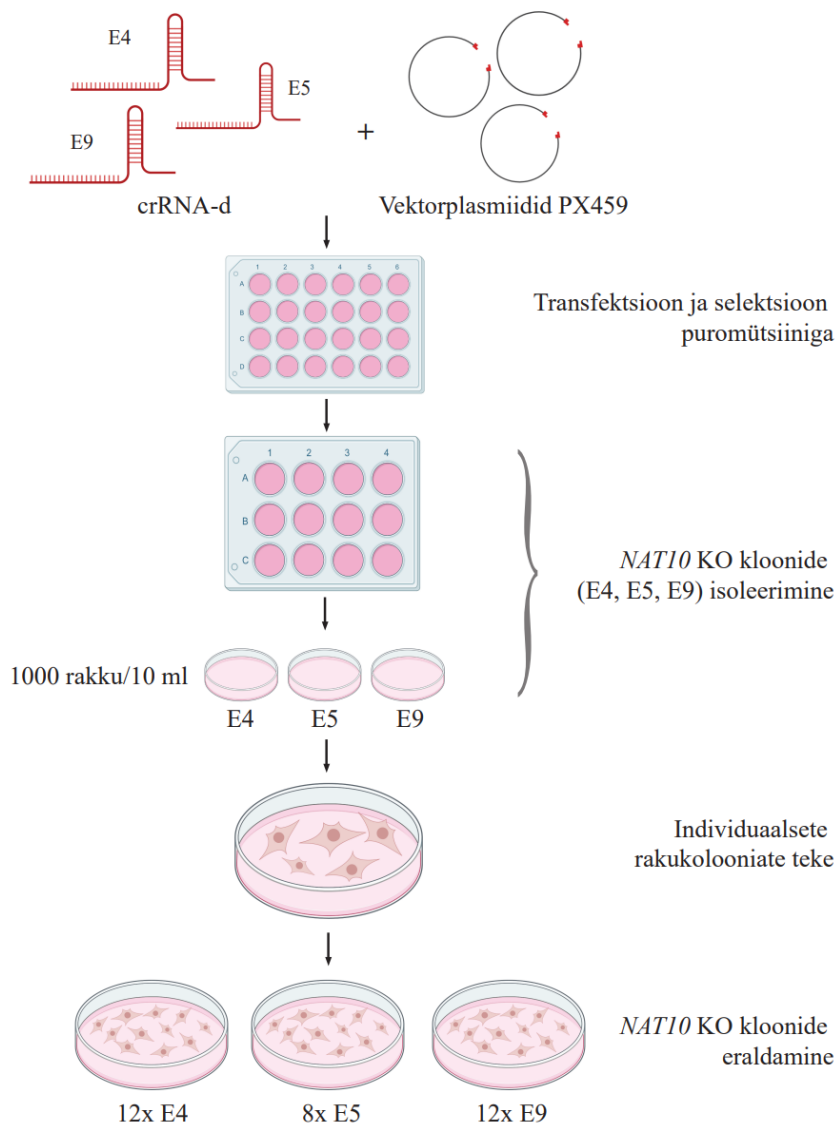
Transfekteeritud rakkude selektsioon toimus puromütsiini abil (Sigma). PX459 plasmid kannab puromütsiini resistentsusgeeni ning selle abil on võimalik eristada transfekteeritud HEK293F rakud transfekteerimata HEK293F rakkudest. Puromütsiin on aminoatsüül-tRNA analoog, mis takistab tegeliku aminoatsüül-tRNA seondumist ribosoomis sünteesitava polüpeptiidi C-terminaalsesse otsa. Niimoodi puromütsiin takistab translatsiooni, põhjustades enneaegse terminatsiooni. Puromütsiin on toksiline ühend nii pro- kui ka eukarüootsetele rakkudele, seega puromütsiini resistentsusgeeni kasutatakse tihti paljudes vektorplasmiidides selektsioonimarkerina (Iwamoto jt., 2014). Enne selektsiooni oli arvatud minimaalne puromütsiini kontsentratsioon, mille juures metsiktüüpi (WT) HEK293F rakud surevad ära. Esialgne puromütsiini kontsentratsioon oli 100 µg/ml ja soovitatav kontsentratsioon pidi jääma 0.1–5 µg/ml vahemikku, ning selleks olid tehtud vastavad lahjendused, mis on toodud joonisel 4. Rakke kasvatati 24-kannulistel koekultuuri plaadil, kuhu oli lisatud DMEM sööde (10% FBS, 1% PS) ja puromütsiini lahjendused. 48 tunni möödudes rakke vaadati mikroskoobi all ja vahetati sööde. 96 tunni möödudes esinesid elusad rakud ainult 0.1 ja 0.25 µg/ml kontsentratsioonide juures. Suuremates kontsentratsioonides enamus rakke olid surnud. Sellisel viisil oli valitud minimaalne puromütsiini kontsentratsioon selektsiooniks – 0.5 µg/ml.



Joonis 4. Minimaalse puromütsiini kontsentratsiooni määramine WT HEK293F rakkudes. X-teljel on toodud puromütsiini kontsentratsioon ($\mu\text{g/ml}$) ja Y-teljel on toodud aeg tundides (t). 96 tunni möödudes esinesid elusad rakud ainult 0.1 ja 0.25 $\mu\text{g/ml}$ puromütsiini kontsentratsioonide juures, suurematel kontsentratsioonidel oli enamus rakke surnud. Minimaalne puromütsiini kontsentratsioon selektsiooniks oli 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Pildid tehti Zeiss AxioCam 208 mikroskoobi abil. Suurendused on toodud iga pildi ülemises paremas nurgas.

24 tundi möödudes peale transfektsiooni lisati rakkudele puromütsiini (0.5 $\mu\text{g/ml}$) koos Opti-MEM söötmega ning inkubeeriti üleöö 37 °C juures. Järgmisel päeval vahetati sööde, kasutati DMEM söödet puromütsiiniga (0.5 $\mu\text{g/ml}$). 60 tunni möödudes olid kõik transfekterimata rakud surnud ning eeldati, et 24-kannulisel koekultuuri plaadil jäid ainult edukalt transfekteritud rakud ning need külvati ümber 12-kannulisele koekultuuri plaadile *NAT10* KO paljundamiseks enne kloonide isoleerimist. Isoleerimine viidi läbi Han jt., (2022) protokoll järgi (Joonis 5). Kuna transfektsiooniks kasutati kolme erinevat sgPX459 plasmidi (E4, E5 ja E9), siis isoleeriti käesolevas töös kolme *NAT10* KO rakuliini kloone: *NAT10* KO E4, *NAT10* KO E5 ja *NAT10* KO E9. Kahe päeva pärast transfekteritud rakud loendati LUNA-2 automaatse rakulugejaga (Logos biosystems). Tihedus jäi 1.13–3.56 $\times 10^6$ rakke/ml vahemikku. Edasi külvati rakud 10 cm tassidele kloonide eraldamiseks järgmise tihedusega: 1000 ja 2000 rakku 10 ml kohta. Selleks, et individuaalsest rakust (kloonist) tekiks terve koloonia, kasvatati rakke tassidel 10-14 päeva, vahetades DMEM söödet iga nelja päeva tagant. Kasvanud individuaalsed rakukolooniad markeeriti ja nende eraldamiseks kasutati kloonimis silindreid (Pyrex *cloning cylinder*, Sigma). Selles etapis kasutati ainult tasse, mis tehti tihedusel 1000 rakku/ml, kuna 2000 rakku/ml tasside puhul oli keeruline eristada individuaalseid rakukolooniaid. Iga rakukoloonia kohta paigutati üks kloonimis silinder, mis fikseeriti *Tissue-Tek* reagenti abil (Thermo Scientific). Edasi külvati iga rakukoloonia uuele

10 cm tassile ja kasvatati veel 2–3 nädalat, vahetades iga 3–4 päeva tagant söödet. Kokku eraldati 32 *NAT10* KO kloni: 12 E4 kloni, 8 E5 kloni ja 12 E9 kloni. Igast rakukloonist eraldati genomne DNA, RNA ja tehti krüostaatilised varud FBS-is, mis sisaldas 10% dimetüülsulfoksiidi (DMSO, AppliChem).



Joonis 5. Skemaatiline ülevaade käesolevas töös kasutatud CRISPR-Cas9 meetodist. Kolm erinevat crRNA-d klooniti vektorplasmidi PX459. Peale transfektiooni ja selektsiooni puromütsiiniga 24-kannulisel koekultuuri plaadil, külvati rakud 12-kannulisele koekultuuri plaadile. *NAT10* KO kloonide isoleerimiseks külvati rakud 10 cm tassidele tihedusega 1000 rakku 10 ml kohta. 10–14 päeva möödudes olid igal tassil kasvanud individuaalsed rakukolooniad. Individuaalsete rakukolooniate eraldamiseks kasutati kloonimissilindreid ja 2–3 nädala pärast oli eraldatud 32 *NAT10* KO kloni: 12 E4 kloni, 8 E5 kloni ja 12 E9 kloni. Joonis on tehtud Biorender programmis (BioRender.com).

2.2.7 Genoomse DNA eraldamine ja PCR

PCR-i tegemiseks eraldati WT HEK293F rakkude ja *NAT10* KO kloonide genoomne DNA. DNA eraldati kasutades *Genomic Mini* komplekti (A&A Biotechnology) tootja protokoll järgi. Kõik DNA-d elueeriti 50 µl Tris-puhvris, mis oli komplektis kaasas. Kontsentratsioonide kontroll teostati NanoDrop2000 spektrofotomeetriga (Thermo Scientific). PCR tehti 5x *HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load* (Solis BioDyne) protokoll järgi. Ühe reaktsiooni lõppmaht oli 20 µl ning kasutati eraldatud DNA-d (300 ng), pärisuunalisi (*forward* – F) ja pöördsuunalisi (*reverse* – R) praimerid (10 µM), 5x *HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load* (4 µl) ja dH₂O. Kasutatud praimerid on toodud tabelis 3. Praimerid olid disainitud veebiprogrammi Chop Chop abil (CHOPCHOP).

Tabel 3. PCR tegemiseks kasutatud praimerid. Tabelis on näidatud ekson, millele töös kasutatud praimerid eeldatavalt seonduvad *NAT10* geenis, praimerite järjestused ja kas tegemist on pärisuunalise (F) või pöördsuunalise (R) praimeriga. PCR-produkti suurused on näidatud aluspaarides (bp).

Seondumiskoht	Järjestused	Produkti suurus (bp)
Ekson 4	5' GCTCTGGTAACTGGCTCTCAT 3' F 5' AAGCAACCCTCAAGACTCTGAC 3' R	270
Ekson 5	5' AGCCTTAACTCCAACTTGCTG 3' F 5' AGGCTGTGCTGACTACTCACTG 3' R	231
Ekson 9	5' TTATTTAGCCTGGCATCAACCT 3' F 5' CAGAGCCCAGAGTTCCTAAAGA 3' R	280

PCR reaktsioon viidi läbi PCR masinas (Eppendorf nexus) järgmise programmiga:

- | | | |
|----------|--------|--------------|
| 1. 95 °C | 14 min | } 25 tsüklit |
| 2. 95 °C | 15 s | |
| 3. 54 °C | 1 min | |
| 4. 72 °C | 1 min | |
| 5. 72 °C | 5 min | |

PCR produktide visualiseerimiseks ning lahutamiseks valmistati 4% agarosgeel. Geeli valmistamisel kasutati agarooosi (Bioatlas) ja 1x TAE puhvrit, ning DNA visualiseerimiseks lisati 5 µl *Atlas ClearSight* DNA värvi (Bioatlas). DNA fragmentide suuruse kindlakstegemiseks kasutati 100 bp DNA suurusmarkerit *Ready to Load* (Solis BioDyne). Geelelektroforees teostati tingimustel 130 V 2–2.5 tundi.

2.2.8 RNA eraldamine ja RT-qPCR

RT-qPCR tegemiseks eraldati WT HEK293F rakkude ja *NAT10* KO kloonidest RNA. Rakkudele oli lisatud 700 µl QIAzol lüüsilahust (Qiagen) ja 140 µl kloroformi. Peale seda raputati rakulüsaat *Vortex*-il (Scientific industries) 20 sekundit ning oodati umbes 2-3 minutit, et moodustuks ülemine vesifaas ja alumine fenooli faas. Peale seda rakulüsaat tsentrifuugiti 15 min, 4 °C, 13000 rcf juures (Mikro 220R, Hettich). Pealmine vesifaas tõsteti uude tuubi ja lisati 700 µl isopropanooli ning raputati *Vortex*-il. RNA eraldamiseks kasutati *Total RNA Zol-Out* komplekt (A&A Biotechnology) ning eraldus tehti tootja protokoll järgi. Kõik DNA-d elueeriti 35 µl dH₂O-s ning kontsentratsioonide mõõtmised teostati NanoDrop2000 spektrofotomeetriga (Thermo Scientific).

Järgmise sammuna sünteesiti RNA ahelale komplementaarne DNA (cDNA). cDNA sünteesimiseks kasutati *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* komplekti (Thermo Scientific). Kõigepealt segati kokku eraldatud RNA-d (500 ng), Oligo(dT)₁₈ praimer (1 µl) ja dH₂O lõppmahus 12 µl. Seejärel lisati segu, milles oli 5x reaktsiooni puhver (4 µl), *RiboLock* RNAasi inhibiitor (20 U), 10 mM dNTP segu (2 µl), *RevertAid M-MuLV RT* (200 U) ja dH₂O. Kogu reaktsiooni lõppmaht oli 20 µl. cDNA süntees viidi läbi PCR masinas (Eppendorf nexus) järgmise programmiga: 60 min 42 °C; 5 min 70 °C. Sünteesitud cDNA-d olid lahjendatud 25 korda. RT-qPCR-i tegemiseks kasutati primereid, mis olid komplementaarsed *NAT10* geeni eksonitele 11–12 (TAGCopenhagen). Normaliseerimiseks kasutati referentsgeeni glütseraldehyüd-3-fosfaatdehüdrgenaas (*GAPDH*) primereid (TAGCopenhagen). Kasutatud primereid on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Tabelis on toodud RT-qPCR pärisuunalised (F) või pöördsuunalised (R) primereid.

<i>NAT10</i>	5' GTCAGCACCACTGCTGAGAA 3' F 5' AGCCACTTCTCCACTGCATC 3' R
<i>GAPDH</i>	5' ACCCACTCCACCTTTGA 3' F 5' TGACAAAGTGGTCGTTGAGGG 3' R

Pärisuunalised ja pöördsuunalised primereid lahjendati lõpp-kontsentratsioonini 4 µM ja segati kokku. RT-qPCR viidi läbi 384-süvendilisel plaadil lõppmahus 12 µl ja kolmes tehnilises korduses. Ühe süvendi kohta segati 2.4 µl 5x *HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus* (Solis BioDyne), 1 µl praimerite segu ja 2.6 µl dH₂O. Edasi lisati igasse süvendisse 6 µl cDNA-d. Negatiivse kontrollina kasutati dH₂O. RT-qPCR oli viidi läbi *QuantStudio 12K Flex* masinas (Applied Biosystems) järgmise programmiga:

Algne denaturatsioon	50 °C	2 min	
	95 °C	15 min	
Denaturatsioon	95 °C	15 s	} 40 tsükli
Ekstensioon	60 °C	1 min	

Saadud lävitsükli väärtused (C_t) analüüsiti MS Exceli-s $2^{-\Delta\Delta C_t}$ meetodiga (Livak ja Schmittgen, 2001) ja *GraphPad Prism* 8 (Dotmatics) programmi abil.

2.2.9 Western Blot (WB)

WB tegemiseks valiti RT-qPCR tulemuste alusel sellised *NAT10* KO kloonid, mille mRNA suhteline ekspressioon oli kõige madalam. Need rakud külvati 12-kannulise koekultuuri plaadile ning kasvatati DMEM söötmes (10% FBS, 1% PS) 3 päeva 80–90% täituvuse saavutamiseni. Kolme päeva möödudes lüüsi rakud RIPA puhvris (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Igepal 630, 0.5% naatriumdeoksükolaat (SDOC), 0.1% naatriumdodetsüülsulfaat (SDS)). Lüüsimiseks rakud tsentrifugiti (5180R, Eppendorf) 5 min 250 rcf juures, eemaldati sööde ja lisati 250 µl RIPA puhvrit. Rakke lüüsi 15 min jääl, vahepeal segades *Vortex*-il. Edasi lüsi tsentrifugiti (Mikro 220R, Hettich) 15 min, 4 °C, 14000 rcf juures ja mõõdeti supernatandi valkude kontsentratsioon bitsinkoniinhappe (BCA) meetodil. Selleks, et täpsemalt määrata valkude kontsentratsioon, tehti veise seerumalbumiini (BSA) kalibreerimisgraafik. Kalibreerimislahuste valmistamiseks kasutati *Pierce BCA Protein Assay* komplekti (Thermo Scientific). BSA standardvalgu lahjendamiseks kasutati RIPA puhvrit. BCA töölahus segati tootja protokoll järgi ning tehti “mikroplaadi protseduur”. Lahuste neeldumised mõõdeti NanoDrop2000 spektrofotomeetri (Thermo Scientific) “BSA protein” programmiga 562 nm juures. Saadud tulemuste põhjal tehti BSA kalibreerimisgraafik ning lineaarse regressiooni abil saadi sirge võrrand, mille põhjal arvutati valkude kontsentratsioonid.

WB tegemiseks valmistati 8% SDS-polüakrüülamiid geel. Lahutava ja kontsentreeriva geeliosade valmistamiseks oli kasutatud 30% Bis-akrüülamiid (PanReac AppliChem), 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS (Naxo), 10% ammoonium persulfaat (APS, Naxo), tetrametüül-etüleen-diamiin (TEMED, PanReac AppliChem) ja dH₂O. 8% SDS-polüakrüülamiid geelile kanti 6 µg iga rakulüsaati. Neid lahjendati RIPA puhvris ja segati kokku 2x SDS laadimispuhvriga (100 mM Tris HCl pH 6.8, 200 mM ditiotreitol, 4% SDS, 0.2% broomfenool sinine, 20% glütserool) ning inkubeeriti 2 min 95 °C juures. Valkude suuruse määramiseks kasutati *PageRuler Plus prestained* valkude suurusmarkerit (Thermo

Scientific). Foresivann täideti 1x SDS jooksupuhvriga (10x puhver sisaldab 0.25 M Tris-HCl pH 8.3, 1.92 M glütsiin, 1% SDS). Geelelektroforees viidi läbi järgmistel tingimustel: 15 min 90 V ja 45 min 120 V. Edasi kanti valgud üle polüvinüüldeendifluoriid (PVDF) membraanile, mida eelnevalt aktiveeriti metanoolis. Geeli ja membraani loputati 1x ülekandepuhvris (10x puhver sisaldab 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glütsiin, 20% metanool). Selleks et kanda üle valgud geelist membraanile, paigaldati need transblotterile (*Trans-Blot Turbo Transfer System*, Bio Rad) ning ülekanne toimus järgmistel tingimustel: 32 min, 25 V, 1 A. Enne membraani blokeerimist loputati seda 1x TBST-s (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween® 20). Membraani blokeeriti blokeerimislahuses (1x TBST, 5% lõssipulber) üleöö loksutis 4 °C juures.

Järgmisel päeval membraan inkubeeriti primaarsete antikehadega. Kasutati anti-NAT10 primaarse antikeha lahjendust suhtel 1:2500 (13365-1-AP, Proteintech) ja anti-GAPDH primaarse antikeha lahjendust suhtel 1:1000 (#5174s, Cell signaling technology). Lahjendused tehti 1x TBST ja 5% lõssipulbrit sisaldavas lahuses ning membraan lõigati kaheks, et inkubeerida membraani osad vastavate antikehadega üks tund loksutil toatemperatuuril. Peale inkubeerimist membraanid pesti kolm korda 5 min 1x TBST-s loksutades. Edasi inkubeeriti membraanid sekundaarse antikehaga: anti-küülik IgG, HRP-ga konjugeeritud (7074S, Cell signaling technology). Antikeha lahjendus oli 1:5000 1x TBST-s. Membraane inkubeeriti üks tund loksutil toatemperatuuril. Peale inkubeerimist membraanid pesti kolm korda 5 min 1x TBST-s loksutil. Valkude detekteerimiseks kasutati *SuperSignal West Atto* maksimaalse tundlikkusega kemoluminestsents-substraati (Thermo Scientific) tootja protokoll järgi. Valgud visualiseeriti *ImageQuant RT ECL* masina abil (General Electric). Saadud WB tulemused analüüsiti *GraphPad Prism 8* (Dotmatics) ja *ImageJ* (National Institutes of Health) programmi abil, mille abil mõõdeti WB bändide intensiivsust.

2.2.10 Immunofluorestsents analüüs (IF)

IF jaoks kasutati samu *NAT10* KO kloone, mida kasutati WB tegemiseks. Rakud kasvatati katteklaasidel 12-kannulisel koekultuuri plaadil DMEM söötmes. 4 päeva möödudes valmistati rakud IF jaoks ette. Rakud pesti PBS-iga (Sigma) ja fikseeriti 4% paraformaldehüüdiga (Sigma) ning inkubeeriti 10 minutit 37 °C juures. Edasi rakud pesti kaks korda PBS-iga ja permeabiliseerimiseks rakud inkubeeriti 20 minutit 0.1% Triton X-100-s (Sigma). Peale inkubeerimist rakud pesti kolm korda 5 minutit PBS-iga. Rakkude blokeerimiseks kasutati PBS-i, mis sisaldas 1% FBS-i (Gibco) ja 0.01% Triton X-100 ning rakud inkubeeriti üks tund toatemperatuuril. Edasi rakud inkubeeriti üleöö 4 °C juures

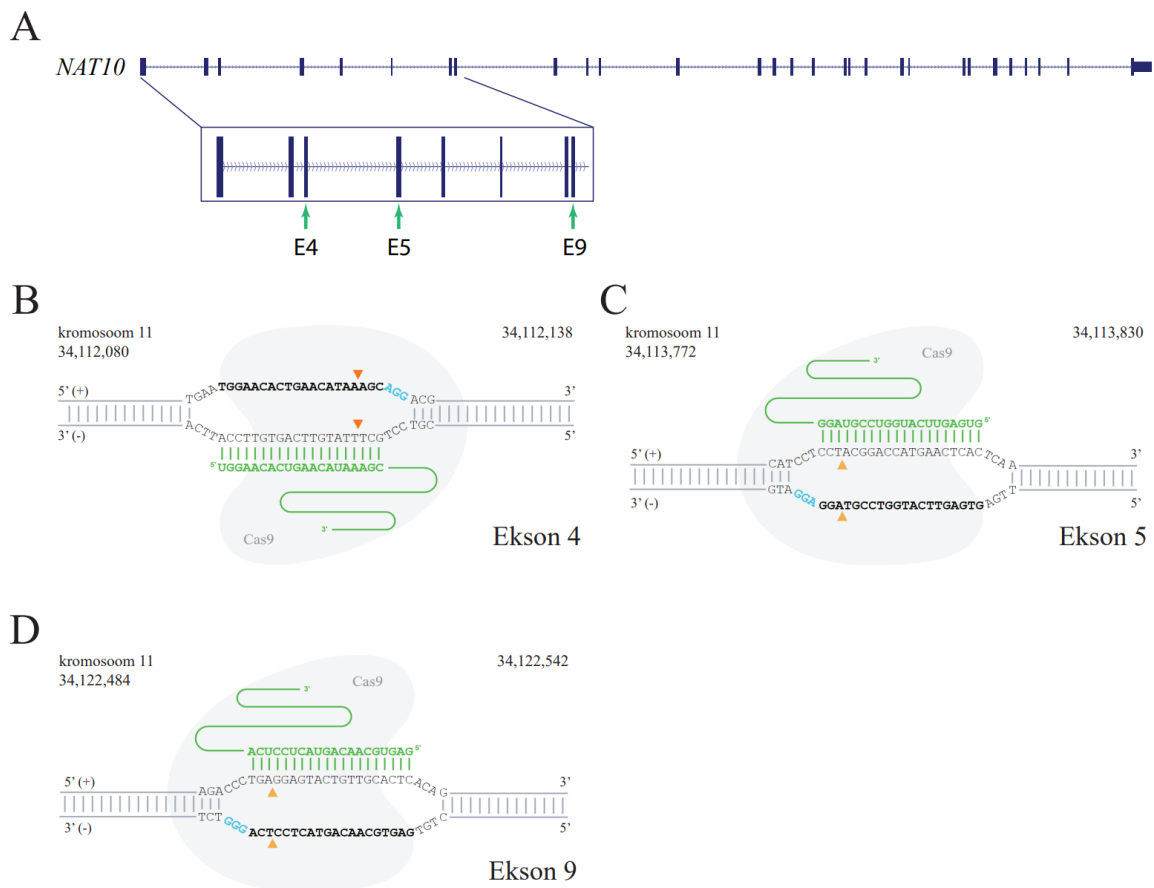
anti-ac4C primaarse antikehaga (ab252215, Abcam), lahjendusel 1:50 1x PBST-s (1x PBS, 0.05% Tween 20) niiskes kambris. Järgmisel päeval rakud pesti kolm korda 5 minutit PBST-ga. Peale seda rakud inkubeeriti üks tund toatemperatuuril pimedas sekundaarse antikehaga: anti-küülik IgG AlexaFluor488-ga konjugeeritud (4412, CellSignal). Antikeha lahjendus oli 1:50 1x PBST-s. Edasi rakud pesti kolm korda 5 minutit PBST-ga pimedas ja inkubeeriti 1 min 4',6-diamidiino-2-fenüülindoolis (DAPI; 5 µg/ml, Roche). Ettevalmistatud klaaside peale pandi kattedklaasid rakkudega ja kinnitati reagentiga *Fluorescence mounting medium* (Dako). Rakud vaadati konfokaal mikroskoobi all (Olympus FV1200MPE-BX61WI) immersiooniõliga 60x suurendusega. Saadud IF pildid analüüsiti FV10-ASW4.2 *Viewer* (Olympus), *GraphPad Prism 8* (Dotmatics) ja *ImageJ* (National Institutes of Health) programmide abil, kus iga rakuklooni jaoks mõõdeti ac4C modifikatsiooni keskmist fluorestsentsi intensiivsust viies erinevates rakkudes.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 crRNA järjestuse valimine *NAT10* KO läbiviimiseks

Efektiivse crRNA järjestuse valimine oli üks kõige olulisematest etappidest KO läbiviimiseks, kuna crRNA järjestus määrab Cas9 valgu spetsiifilisust. Eduka KO saavutamiseks soovitatakse disainida vähemalt kaks erinevat crRNA järjestust, et suurendada eduka KO rakuliini saavutamise tõenäosust. Ensembl andmebaasi kohaselt *NAT10* geen asub 11. kromosoomis, on umbes 43.25 kb pikk ning sellel on 31 eksonit (Ensembl). Käesolevas töös sihtmärk järjestused valiti *NAT10* neljandast, viiendast ja üheksandast eksonist (Joonis 6A). Arvestades crRNA disaini jaoks Peatükis 2.2.2 (Materjal ja meetodika) toodud parameetreid, disainiti kolm erinevat crRNA järjestust *NAT10* KO läbiviimiseks (Joonis 6B, C, D).

crRNA järjestus neljandast eksonist soovitati Synthego CRISPR *Design Tool* veebiprogrammi poolt, kuna antud järjestus asub *NAT10* geeni kodeeriva ala alguses, neljas ekson esineb enamustes *NAT10* geeni transkriptides, järjestusel on kõrge aktiivsus Doench skooriga 0.623 ja *off-target* efektide arv on 0. crRNA järjestus viiendast eksonist võeti Arango jt., (2018) artiklist positiivse kontrollina, kuna artiklis oli näidatud, et selle järjestusega oli saavutatud edukas KO HeLa rakkudes. Selle järjestuse ainus puudus seisneb selles, et vastavalt Synthego programmi andmetele, ei asu see järjestus *NAT10* geeni kodeeriva ala alguses. Ülejäänud crRNA disainimise parameetrid olid täidetud ning järjestuse aktiivsuse Doench skoor oli 0.645. crRNA järjestus üheksandast eksonist valiti selleks, et vaadata, kuidas mõjutab *NAT10* geeni KO edukust selline crRNA järjestus, mis ei asu *NAT10* geeni kodeeriva ala alguses. Ülejäänud crRNA disainimise parameetrid olid täidetud ning järjestuse aktiivsuse Doench skoor oli 0.687.



Joonis 6. Töös kasutatud crRNA järjestused (rohelistes). Sihtmärk järjestused on märgistatud musta värviga, PAM järjestused on helesinised ja Cas9 löikekohad on märgistatud oranžide kolmnurkadega. A. *NAT10* geeni eksonid (tume-sinised ruudud). KO-ks valiti sihtmärk järjestused *NAT10* geeni neljandast, viiendast ja ühendast eksonist (E4, E5, E9). B. crRNA järjestus *NAT10* neljandast eksonist. Cas9 nukleaaas seondub *NAT10* geeni (-) ahelaga ning tekitab DSB DNA asukohas 34,112,114 bp. C. crRNA järjestus viiendast eksonist. Cas9 nukleaaas seondub *NAT10* geeni (+) ahelaga ning tekitab DSB DNA asukohas 34,113,796 bp. D. crRNA järjestus üheksandast eksonist. Cas9 nukleaaas seondub *NAT10* geeni (+) ahelaga ning tekitab DSB DNA asukohas 34,122,508 bp. Joonis on kohandatud Synthego CRISPR Design Tool (Knockout Guide Design - Synthego) ja UCSC Genome Browser (UCSC Genome Browser) järgi.

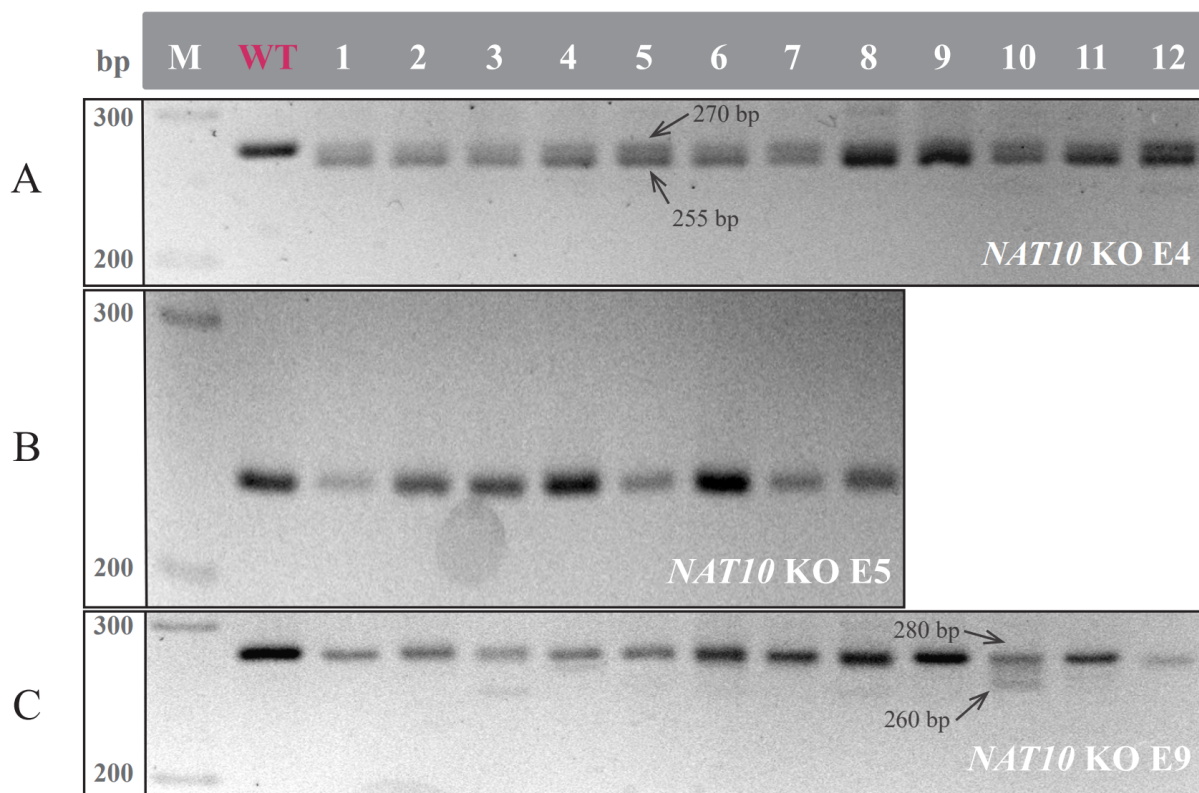
2.3.2 *NAT10* KO funktsionaalne valideerimine

Pärast *NAT10* KO rakuliinide saamist, kontrolliti, kui edukas saadud KO oli, milline crRNA järjestus oli kõige efektiivsem KO läbiviimiseks ning valiti välja kõige parem *NAT10* KO kloon. Nende eesmärkide saavutamiseks rakendati nelja meetodit. Esimeseks meetodiks oli PCR, et DNA tasemel analüüsida, kas toimus Cas9-vahendatud sihtmärk-DNA lõigu deletsioon ja kas eeldatavad KO-d olid homosügootsed või heterosügootsed. Teiseks meetodiks oli RT-qPCR, et RNA tasemel võrrelda WT HEK293F ja *NAT10* KO rakuliinide *NAT10* mRNA suhtelist ekspressiooni. Kolmandaks meetodiks oli WB, et valkude tasemel võrrelda WT HEK293F ja *NAT10* KO rakuliinide *NAT10* valgu ekspressiooni. Viimaseks

meetodiks oli IF, et analüüsida *NAT10* valgu funktsionaalsust ehk *NAT10* valgu võimekust katalüüsida ac4C modifikatsiooni *NAT10* KO rakuliinides.

2.3.3 *NAT10* väljalülituse efektiivsuse analüüs DNA tasemel PCR ja geelelektroforeesi abil

PCR-i eesmärgiks oli paljundada WT HEK293F rakkude ja *NAT10* KO kloonide (E4, E5, E9) *NAT10* geeni neljanda, viienda ja üheksanda eksoni DNA ning analüüsida, kas eeldatavad KO-d on homosügootsed või heterosügootsed. HEK293F rakuliin on kloonitud HEK293 rakuliinist, mis saadi 1973. aastal inimese aborditud embrüo neerust. HEK293 rakuliini derivaadid (sealhulgas HEK293F rakuliin) on pseudotriploidsed, mis tähendab, et kuigi rakkudes on kaks kromosoomikomplekti, siis kromosoomide arv ja struktuur on ebaregulaarsed ja võivad muutuda (Bylund jt., 2004). Iga *NAT10* KO rakuliini jaoks kasutati DNA paljundamiseks vastavaid praimereid, mis on toodud Peatükis 2.2.7 (Materjal ja meetoodika) tabelis 3. *NAT10* KO E4 rakuliini paljundatava produkti suurus pidi olema 270 bp. Pärast *NAT10* KO E4 ja WT HEK293F rakuliinide DNA paljundamist PCR meetodil ning geelelektroforeesi teostamist leiti, et selle rakuliini puhul olid kõik kloonid heterosügootsed, kuna oli näha kahte DNA bändi suurusega 270 bp ja umbes 255–260 bp, samal ajal kui WT HEK293F rakuliini puhul oli näha ainult 270 bp pikkust bändi (Joonis 7A). Heterosügootsus tähendab, et mitte kõikides alleelides toimus KO, ning sel juhul eeldatakse, et *NAT10* geeni funktsioon on osaliselt kadunud. *NAT10* KO E5 rakuliini paljundatava produkti suurus pidi olema 231 bp. Selle rakuliini puhul ei leitud erinevusi võrreldes WT HEK293F rakuliiniga, kuna esines ainult üks DNA bänd, mis suuruse järgi ei erinenud WT DNA bändist (Joonis 7B). *NAT10* KO E9 rakuliini paljundatava produkti suurus pidi olema 280 bp. Selle rakuliini puhul esines heterosügootne KO ainult kolmanda, kaheksanda ja kümnenda klooni puhul, kuna oli näha kahte DNA bändi suurusega 280 bp ja umbes 260 bp. Selle rakuliini teistes kloonides ei täheldatud erinevusi võrreldes WT HEK293F rakuliiniga (Joonis 7C). PCR tulemuste põhjal ei saavutatud homosügootset KO mitte üheski rakuliinis. Põhjuseks võib olla see, et HEK293F rakkudel on pseudotriploidne kromosoomistik, mille puhul võib olla keeruline saavutada homosügootset KO klooni. Siiski saadi heterosügootseid KO-d *NAT10* KO E4 ja E9 (kloonid 3, 8, 10) rakuliinides, mille puhul oletati, et *NAT10* geeni funktsioon võiks olla häiritud, kuid pole täielikult kadunud. Samuti võib järeldada, et kõige efektiivsem crRNA järjestus KO läbiviimiseks pärines *NAT10* neljandast eksonist, kuna *NAT10* KO E4 rakuliini kõik kloonid olid heterosügootsed.



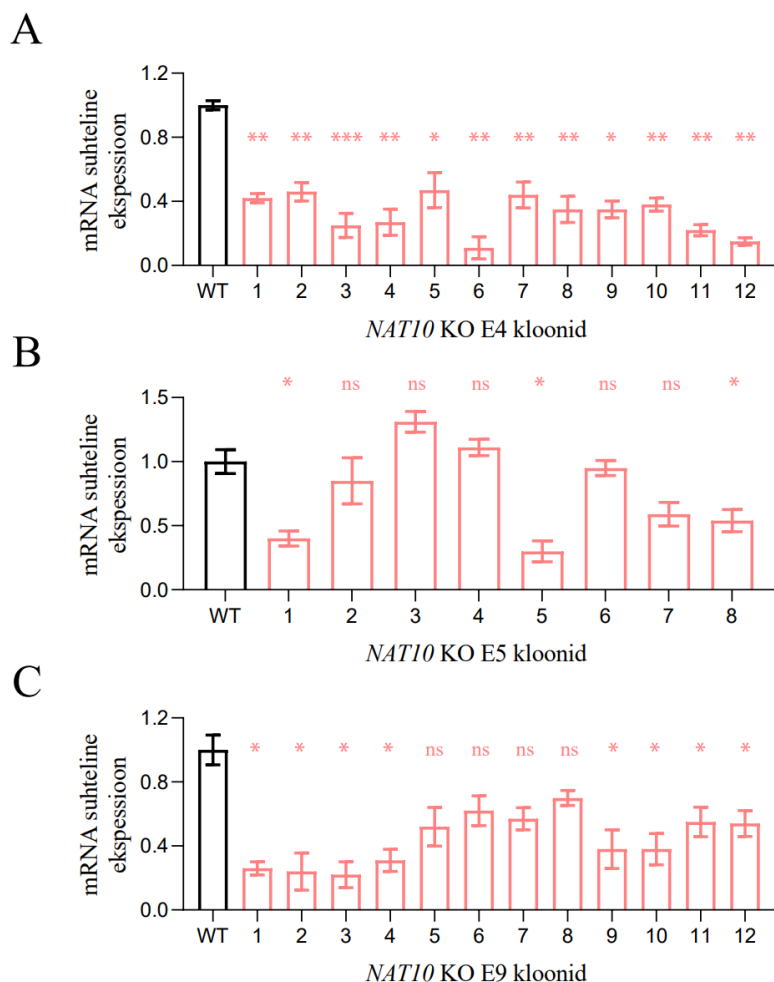
Joonis 7. PCR-iga paljundatud WT HEK293F ja *NAT10* KO (E4, E5, E9) rakuliinide DNA geelelektroforeesi pilt. Punasega on märgistatud WT HEK293F rakkude paljundatud DNA, *NAT10* KO kloonid on märgistatud numbritega 1–12. M – marker. Produkti suurus on näidatud aluspaarides (bp). Nooltega on tähistatud heterosügootsed KO-d. A. *NAT10* KO E4 rakuliini kloonid. B. *NAT10* KO E5 rakuliini kloonid. C. *NAT10* KO E9 rakuliini kloonid.

2.3.4 *NAT10* mRNA ekspressiooni analüüs RT-qPCR abil

Järgnevalt tehti RT-qPCR analüüs, et võrrelda *NAT10* mRNA suhtelist ekspressiooni WT HEK293F rakuliini ja *NAT10* KO rakuliinide (E4, E5, E9) vahel. RT-qPCR tulemuste põhjal täheldati, et kõikides *NAT10* KO rakuliinides (E4, E5, E9) oli mRNA suhteline ekspressioon vähenenud. Erandiks olid *NAT10* KO E5 rakuliini kolmas ja neljas kloon (Joonis 8B). Lisaks leiti statistilise analüüsi abil, et teise ja kuuenda rakuklooni mRNA suhteline ekspressioon ei erine WT HEK293F rakkude mRNA suhtelisest ekspressioonist oluliselt. RT-qPCR tulemused kinnitasid *NAT10* geeni funktsiooni osalist kadumist, mida tuvastati ka PCR analüüsis (Peatükk 2.3.3 (Tulemused)) kõikides *NAT10* KO rakuliinides. Kuna PCR analüüsis ei leitud KO-d kõikides kloonides, võib järeldada, et mRNA suhtelise ekspressiooni langus osades *NAT10* KO kloonides võib olla seotud juhuslike mutatsioonide tekkimisega *NAT10* geenis (näiteks lühemad insertioonid), mis samuti mõjutavad geeni avaldumist. Lisaks sellele saab väita, et kõige efektiivsem crRNA järjestus *NAT10* KO läbiviimiseks oli valitud neljandast eksonist, kuna *NAT10* KO E4 kloonidel täheldati kõige madalamat mRNA suhtelist ekspressiooni (< 0.5) (Joonis 8A). RT-qPCR tulemuste põhjal valiti WB ja IF analüüside jaoks

sellised *NAT10* KO kloonid, mille mRNA suhteline ekspressioon võrreldes WT HEK293F rakuliiniga oli kõige madalam. Edasiseks tööks valiti järgmised kloonid:

- *NAT10* KO E4 rakuliin: kloonid nr. 6, 11 ja 12
- *NAT10* KO E5 rakuliin: kloonid nr. 1 ja 5
- *NAT10* KO E9 rakuliin: kloonid nr. 1, 2, ja 3

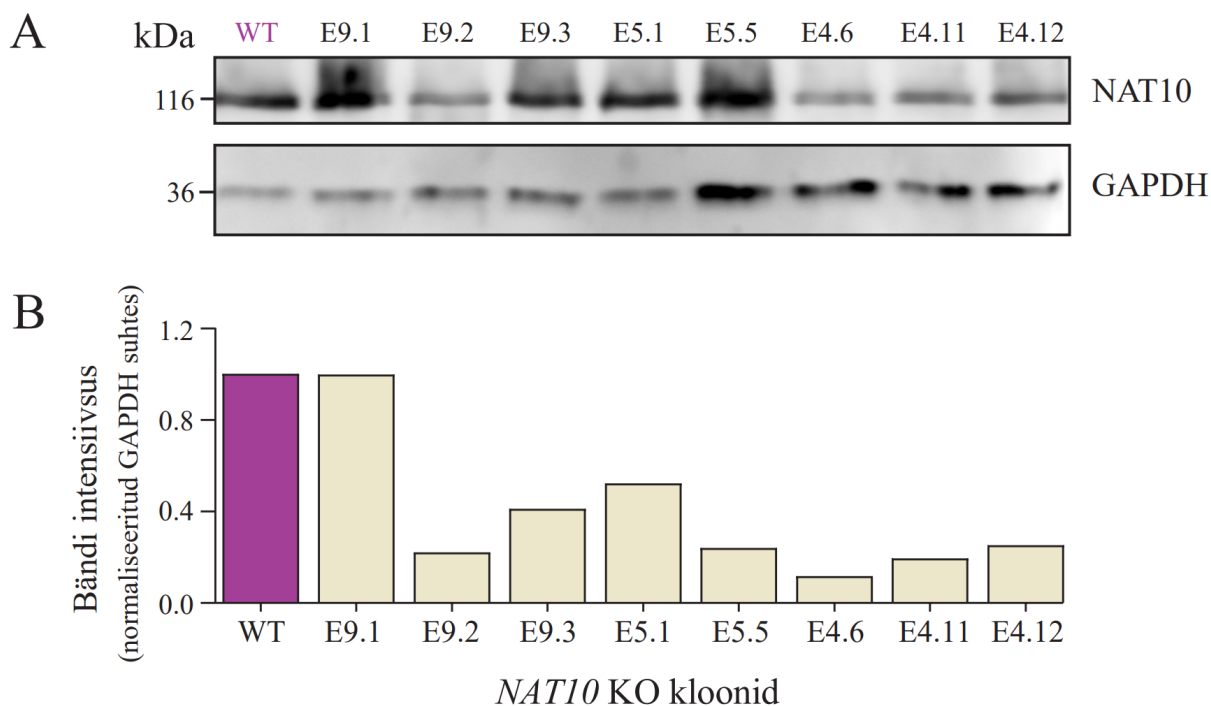


Joonis 8. *NAT10* mRNA suhteline ekspressioon *NAT10* KO (E4, E5, E9) rakuliinides. X-teljel toodud *NAT10* KO kloonid on märgistatud numbritega 1–12 (1–8 B. tulpdiaagrammi puhul), Y-teljel on toodud mRNA suhteline ekspressioon. WT HEK293F rakuliin on märgistatud musta ja *NAT10* KO kloonid roosade tulpadega. A. *NAT10* KO E4 rakuliini kloonid. B. *NAT10* KO E5 rakuliini kloonid. C. *NAT10* KO E9 rakuliini kloonid. Statistilise olulisuse leidmiseks kasutati kahepoolset paariviisilist Student t-testi, * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; ns - pole statistiliselt oluline. $N=3$. Andmed esindavad keskmist \pm standarddviaga (SEM)

2.3.5 *NAT10* valgu ekspressiooni analüüs WB abil

Järgmisena viidi läbi WB analüüs, et võrrelda *NAT10* KO (E4, E5, E9) rakuliinide ja WT HEK293F rakuliini *NAT10* valgu ekspressiooni. WB-s analüüsiti ainult neid *NAT10* KO

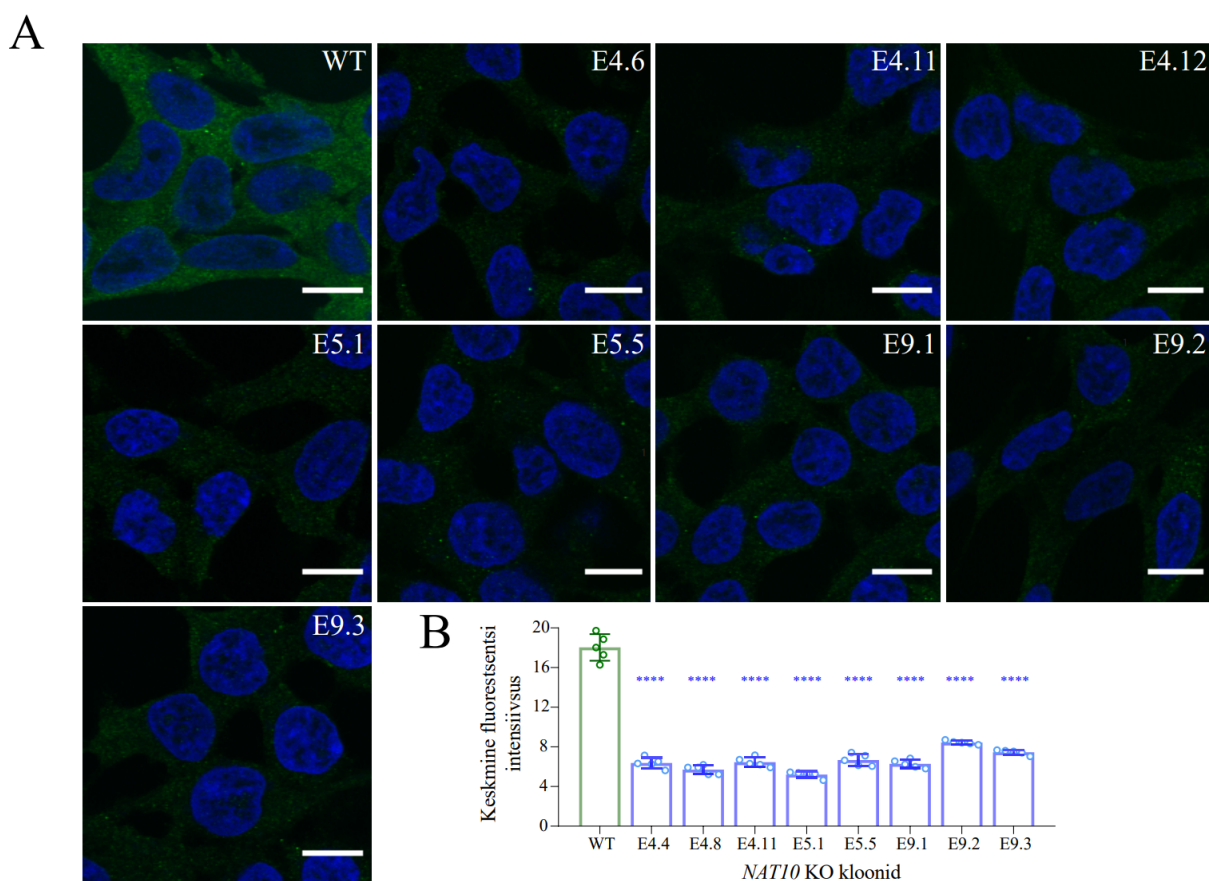
kloone, mille mRNA suhteline ekspressioon oli kõige madalam võrreldes WT HEK293F rakuliiniga (Peatükk 2.3.4 (Tulemused)). NAT10 teoreetiline molekulaarne mass on 116 kDa. Kontrollvalgus kasutati GAPDH (36 kDa), kuna võis eeldada, et selle ekspressioon ei muutunud kasutatud katsetingimustes. WB tulemused näitavad, et NAT10 valgu ekspressioon oli vähenenud kõikides uuritud kloonides, kuid valgu suurus oli sama (116 kDa) nagu WT rakuliinis mis võimaldab oletada, et *NAT10* KO rakuliinides ei tekkinud enneaegset stoppkoodonit. E4.6, E4.11 ja E4.12 kloonide puhul oli nõrgemad bändid kui WT HEK293F rakuliinis, mis viitab sellele, et *NAT10* KO E4 rakuliini KO oli edukam võrreldes *NAT10* KO E5 ja E9 rakuliinidega (Joonis 9A). Seda tulemust kinnitab ka kvantitatiivne analüüs, mis on esitatud tulpdiagrammil, kus lisaks täheldati NAT10 valgu ekspressiooni vähenemist kõikides kloonides võrreldes WT HEK293F rakkudega. Erandiks oli *NAT10* KO E9.1 kloon (Joonis 9B). Kuna sarnaselt RT-qPCRi tulemusega, oli kõige madalam NAT10 valgu ekspressioon oli *NAT10* KO E4.6, E4.11 ja E4.12 kloonidel (< 0.4), saab väita, et neljandast eksonist valitud crRNA järjestus *NAT10* KO läbiviimiseks osutus kõige efektiivsemaks.



Joonis 9. *NAT10* KO (E4, E5, E9) rakuliinide NAT10 valgu ekspressiooni analüüs. A. Joonisel on toodud analüüsitud valgud NAT10 ja GAPDH ja nende teoreetiline molekulaarne mass kilodaltonites (kDa). WT HEK293F rakud on märgistatud lilla värviga, *NAT10* KO kloonid on märgistatud numbritega vastavalt rakuliinile ja valitud RT-qPCR tulemuste põhjal kloonidele (E4, E5, E9). B. WB tulemuste kvantitatiivne analüüs GAPDH suhtes. X-teljel on toodud *NAT10* KO kloonid (beežid tulbad) ja WT HEK293F rakud on märgistatud lilla tulbaga.

2.3.6 NAT10 valgu aktiivsuse analüüs IF abil

Järgmisena viidi läbi IF analüüs, et hinnata NAT10 valgu võimekust katalüüsida ac4C modifikatsiooni eelnevate tulemuste põhjal välja valitud KO kloonides, kus NAT10 mRNA suhteline ekspressioon oli kõige madalam võrreldes WT HEK293F rakkudega (Peatükk 2.3.4 (Tulemused)). Jooniselt 10 on näha, et kõikide analüüsitud *NAT10* KO (E4, E5, E9) kloonide NAT10 valgu funktsionaalsus oli märkimisväärselt madalam, kuna ac4C modifikatsioonide hulk, mis on peegeldatud fluorestsentsi intensiivsuses, langes võrreldes WT HEK293F rakkudega umbes 3 korda (Joonis 10B). Seega saab IF tulemuste põhjal väita, et kõikides *NAT10* KO rakuliinides on NAT10 valgu funktsionaalsus häiritud. IF kinnitab ka *NAT10* geeni funktsiooni ainult osalist kadumist, kuna ac4C modifikatsioon pole täielikult kadunud.



Joonis 10. *NAT10* KO (E4, E5, E9) rakuliinide NAT10 valgu funktsionaalsuse analüüs. A. IF tulemusena saadud konfokaal mikroskoopia pildid WT HEK293F rakuliinist ja *NAT10* KO (E4, E5, E9) rakuliinidest. Roheline signaal on saadud ac4C modifikatsiooni IF analüüsil, rakutuomad on näidatud DAPI värvinguga (sinine). Pildid tehti 60x suurendusega. Skaala = 50 μ m. B. ac4C modifikatsioonile vastava fluorestsentsi intensiivsuse kvantitatiivne analüüs. WT HEK293F rakud on märgistatud rohelise tulbaga, *NAT10* KO (E4, E5, E9) kloonid on märgistatud siniste tulpadega. Statistiliseks analüüsiks kasutati kahepoolset paariviisilist Student t-testi, **** $P \leq 0,0001$. $N=5$. Andmed esindavad keskmist \pm standardhälve (SD).

Kokkuvõtvalt, antud bakalaureusetöö raames isoleeriti 12 *NAT10* KO E4, 8 *NAT10* KO E5 ja 12 *NAT10* KO E9 kloonid. Tulemuste põhjal osutus kõige edukamaks *NAT10* KO rakuliiniks E4 rakuliin, ning selle põhjal saab öelda, et parim crRNA järjestus *NAT10* KO läbiviimiseks leiti *NAT10* geeni neljandast eksonist. Isoleeritud 32-st *NAT10* KO kloonidest osutusid kõige paremateks kuues ja üheteistkümnes kloon *NAT10* KO E4 rakuliinist. Neid rakukloone plaanitakse kasutada edasiseks tööks, et uurida lähemalt, kuidas *NAT10* geeni KO mõjutab rakkude elulemust, kuna antud töö käigus täheldati, et *NAT10* KO E4 rakuliini kloonid kasvasid väga aeglaselt (umbes 3 nädalat 80–90% täituvuse saavutamiseni). *NAT10* KO (E4, E5, E9) rakuliinides oli näha vähenenud NAT10 valgu ekspressiooni ja madalamat ac4C taset vastavalt WB ja IF analüüsidele. Kuna ac4C modifikatsioon soodustab translatsiooni, siis võib üheks aeglustunud paljunemise põhjuseks olla ac4C hulga vähenemine (Arango jt., 2018). Samal ajal ei saa välistada, et täheldatud mõju raku kasvule võib olla põhjustatud valkude atsetüleerimise taseme vähenemisest. NAT10 valgu atsetüleerimise funktsioon on siiski võimalik asendada teiste GNAT perekonna liikmete poolt, samas kui RNA atsetüleerimise funktsioon on NAT10 jaoks ainulaadne ning seetõttu on ac4C defitsiit täheldatud mõju tõenäolisemaks põhjuseks (Baumgartner jt, 2021; Arango jt., 2022). On huvitav, et RT-qPCR tulemuste põhjal vähenes peaaegu kõikides kloonides mRNA suhteline ekspressioon, kuigi PCR tulemuste põhjal deletsiooni kõikides kloonides ei leitud. On teada, et eukarüooidid kasutavad sageli DSB parandamiseks NHEJ mehhanismi, mille puhul on suur tõenäosus, et parandamise kohas ilmnevad juhuslikud insertioonid või inversioonid (Lin jt., 2014). Nende ilmumine *NAT10* geenis võiks samuti mõjutada selle geeni funktsiooni ja põhjustada mRNA suhtelise ekspressiooni langust ning valgu aktiivsuse kahanemist. Soovimatute indel-ite vältimiseks võib kasutada Cas9 nukleaasi asemel Cas9 nikkaas-mutandi, mis soodustab HDR parandamise teed (Cong jt., 2013). Selle mehhanismiga võib samuti saavutada KO, kui doonor-DNA sisaldab näiteks enneagset stoppkoodonit või mutatsiooni, mis häirib geeni normaalset funktsiooni. Millised muutused kloonides toimusid, vajab edasist uurimist. Kuigi antud töö raames ei õnnestunud saavutada täielikku KO, saavutati siiski piisav *NAT10* geeni funktsiooni kadumine. Paremaks KO saavutamiseks võiks kasutada teisi rakuliini, kus on tavaline kromosoomistik. Kokkuvõttes kinnitasid meie tulemused, et *NAT10* geeni puudulikkus tõepoolest mõjutab otseselt ac4C modifikatsiooni katalüüsi, mida varem on näidatud Arango jt., 2018 uurimuses.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö peamine eesmärk oli välja lülitada *NAT10* geen HEK293F rakkudes ning tuvastada väljalülituse edukust järgmiste meetoditega: PCR, RT-qPCR, WB ja IF. *NAT10* on ainuke teadaolev ensüüm, mis katalüüsib ac4C RNA modifikatsioon. Töö kirjanduse ülevaates kirjeldati RNA modifikatsioone üldisemalt, ac4C modifikatsiooni ja *NAT10* geeni võimalikke funktsioone inimese rakkudes. Samuti tutvustati CRISPR-Cas9 süsteemi kui võimsat tööriista genoomi modifitseerimiseks.

Bakalaureusetöö eksperimentaalses osas lülitati välja *NAT10* geen HEK293F rakkudes kasutades CRISPR-Cas9 mehhanismi. Selleks disainiti spetsiifilised crRNA-d, mis olid komplementaarsed *NAT10* geeni erinevate eksonitega, ning kontrolliti nende crRNA-de efektiivsust. Disainitud crRNA oligonukleotiidid ühendati vektorplasmiidiga PX459 ning transfekteeriti HEK293F rakkudesse. Transfektsiooni edukust hinnati puromütsiini abil ja individuaalsetest rakukloonidest kasvatati ja isoleeriti kolm rakuliini: *NAT10* KO E4, *NAT10* KO E5 ja *NAT10* KO E9. Funktsionaalne valideerimine aitas mõista, kas eeldatavad KO-d on homosügootsed või heterosügootsed, kuidas muutus *NAT10* KO kloonide mRNA suhteline ekspressioon, *NAT10* valgu ekspressioon ja võimekus katalüüsida ac4C modifikatsiooni.

Kõige efektiivsemaks crRNA-ks KO läbiviimisel osutus crRNA *NAT10* geeni neljandast eksonist. Funktsionaalne valideerimine näitas, et selle crRNA puhul saavutati heterosügootne KO kõikides kloonides ja kloonide mRNA suhteline ekspressioon vähenes kõige rohkem võrreldes *NAT10* KO E5 ja E9 rakuliinidega. Lisaks näitas *NAT10* valgu ekspressiooni analüüs selle rakuliini puhul parimat tulemust ja samuti kinnitas *NAT10* ac4C puudumine rakkudest valgu katalüütilise aktiivsuse tugevat langust. Kokkuvõttes võib öelda, et kuigi antud bakalaureusetöö raames ei õnnestunud saada ühtegi homosügootset KO rakuliini, saadi mitu rakuliini, mille puhul *NAT10* geeni funktsioon on suurel määral kadunud ning need liinid on vajalik tööriist edasisteks uuringuteks.

Human *NAT10* gene knockout with CRISPR-Cas9 method and knockout functional validation

Valeria Naumova

SUMMARY

RNA modifications have been found in different RNA species where they significantly influence various RNA-related processes, such as RNA synthesis, transport, function, and metabolism (Cui *et al.*, 2022). One important RNA modification is N4-acetylcytidine, ac4C (Kawai *et al.*, 1989). ac4C in human mRNAs affects translation efficiency and also participates in stress response in both eukaryotes and prokaryotes (Arango *et al.*, 2018; Sas-Chen *et al.*, 2020; Tardu *et al.*, 2019). The ac4C RNA modification is catalyzed by N-acetyltransferase 10 (NAT10), and it is believed that this enzyme is the only source of ac4C in human cells (Arango *et al.*, 2018). CRISPR-Cas systems are diverse mechanisms of acquired immunity in prokaryotes that protect them against bacteriophages (Barrangou *et al.*, 2007). CRISPR-Cas9 is the most extensively studied CRISPR-Cas system and a widely used tool for genome engineering and studying gene function (Ran *et al.*, 2013).

The main objective of this study was to knockout the *NAT10* gene in HEK293F cells and assess the success of the knockout using the following methods: PCR and gel electrophoresis, RT-qPCR, WB and IF. In the experimental part of the study, the *NAT10* gene was knocked out in HEK293F cells using the CRISPR-Cas9 mechanism. Specific crRNAs were designed to target different exons of the *NAT10* gene, and the effectiveness of these crRNAs was evaluated. The designed crRNA oligonucleotides were ligated into the PX459 vector plasmid and transfected into HEK293F cells. The success of transfection was assessed using puromycin, and three cell lines were grown and isolated from individual cell clones: *NAT10* KO E4, *NAT10* KO E5, and *NAT10* KO E9. Functional validation was performed to determine whether the expected knockouts were homozygous or heterozygous, and to assess the NAT10 mRNA relative expression, NAT10 protein expression and its ability to catalyze ac4C modification in NAT10 KO clones.

The most effective crRNA for knockout was found to target the fourth exon of the *NAT10* gene. Functional validation showed that this crRNA achieved heterozygous knockout in all clones, and the relative mRNA expression decreased the most compared to the *NAT10* KO E5 and E9 cell lines. Additionally, NAT10 protein expression occurred the weakest in this cell line, further supported by the significant reduction in ac4C RNA modification levels. In conclusion, while no homozygous KO cell lines were obtained in this study, several cell lines

were generated where the *NAT10* gene function is largely lost, making them valuable tools for further studies.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., Cox, D. B., ... & Zhang, F. (2016). C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 353(6299), lk aaf5573. doi: 10.1126/science.aaf5573
- Arango, D., Sturgill, D., Alhusaini, N., Dillman, A. A., Sweet, T. J., Hanson, G., ... & Oberdoerffer, S. (2018). Acetylation of cytidine in mRNA promotes translation efficiency. *Cell*, 175(7), lk 1872-1886. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.030
- Arango, D., Sturgill, D., Yang, R., Kanai, T., Bauer, P., Roy, J., ... & Oberdoerffer, S. (2022). Direct epitranscriptomic regulation of mammalian translation initiation through N4-acetylcytidine. *Molecular cell*, 82(15), 2797-2814. doi: 10.1016/j.molcel.2022.05.016
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., ... & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), lk 1709-1712. doi: 10.1126/science.1138140
- Baumgartner, J. T., Habeeb Mohammad, T. S., Czub, M. P., Majorek, K. A., Arolli, X., Variot, C., ... & Kuhn, M. L. (2021). Gcn5-related N-acetyltransferases (GNATs) with a catalytic serine residue can play ping-pong too. *Frontiers in Molecular Biosciences*, lk 154. doi: 10.3389/fmolb.2021.646046
- Bylund, L., Kytölä, S., Lui, W. O., Larsson, C., & Weber, G. (2004). Analysis of the cytogenetic stability of the human embryonal kidney cell line 293 by cytogenetic and STR profiling approaches. *Cytogenetic and genome research*, 106(1), lk 28-32. doi: 10.1159/000078556
- Cai, Y., Chen, L., Sun, S., Wu, C., Yao, W., Jiang, B., ... & Hou, W. (2018). CRISPR/Cas9-mediated deletion of large genomic fragments in soybean. *International journal of molecular sciences*, 19(12), lk 3835. doi: 10.3390/ijms19123835
- Cai, S., Liu, X., Zhang, C., Xing, B., & Du, X. (2017). Autoacetylation of NAT10 is critical for its function in rRNA transcription activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 483(1), lk 624-629. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.092
- Carlile, T.M., Rojas-Duran, M.F., Zinshteyn, B., Shin, H., Bartoli, K.M., ja Gilbert, W.V. (2014). Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature* 515, lk 143–146. doi: 10.1038/nature13802
- Chen, L., Wang, W. J., Liu, Q., Wu, Y. K., Wu, Y. W., Jiang, Y., ... & Fan, H. Y. (2022). NAT10-mediated N4-acetylcytidine modification is required for meiosis entry and progression in male germ cells. *Nucleic acids research*, 50(19), lk 10896-10913. doi:10.1093/nar/gkac594
- Chen, H., Yang, H., Zhu, X., Yadav, T., Ouyang, J., Truesdell, S. S., ... & Lan, L. (2020). m5C modification of mRNA serves a DNA damage code to promote homologous recombination. *Nature communications*, 11(1), lk 1-12. doi: 10.1038/s41467-020-16722-7
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., ... & Voytas, D. F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2), lk 757-761. doi: 10.1534/genetics.110.120717

- Cohn, W. E. (1960). Pseudouridine, a carbon-carbon linked ribonucleoside in ribonucleic acids: isolation, structure, and chemical characteristics. *Journal of Biological Chemistry*, 235(5), 1488-1498.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823. doi: 10.1126/science.1231143
- Cui, L., Ma, R., Cai, J., Guo, C., Chen, Z., Yao, L., ... & Shi, Y. (2022). RNA modifications: importance in immune cell biology and related diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 334. doi: 10.1038/s41392-022-01175-9
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., ... & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602-607. doi: 10.1038/nature09886
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., ... & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature biotechnology*, 34(2), 184-191. doi: 10.1038/nbt.3437
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., ... & Rechavi, G. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 485(7397), 201-206. doi: 10.1038/nature11112
- Drazic, A., Myklebust, L. M., Ree, R., & Arnesen, T. (2016). The world of protein acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1864(10), 1372-1401. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.06.007
- Fernandez, I.S., Ng, C.L., Kelley, A.C., Wu, G., Yu, Y.T., ja Ramakrishnan, V. (2013). Unusual base pairing during the decoding of a stop codon by the ribosome. *Nature* 500, 107–110. doi: 10.1038/nature12302
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature biotechnology*, 31(9), 822-826. doi: 10.1038/nbt.2623
- Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., ... & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67-71. doi: 10.1038/nature09523
- Gratz, S. J., Cummings, A. M., Nguyen, J. N., Hamm, D. C., Donohue, L. K., Harrison, M. M., ... & O'Connor-Giles, K. M. (2013). Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 194(4), 1029-1035. doi: 10.1534/genetics.113.152710
- Gu, W., & Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, 90(4), 595-606. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80521-8
- Guilinger, J. P., Pattanayak, V., Reyon, D., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Joung, J. K., & Liu, D. R. (2014). Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity. *Nature methods*, 11(4), 429-435. doi: 10.1038/nmeth.2845

- Han, Z., Madhavan, B. K., Kaymak, S., Nawroth, P., & Kumar, V. (2022). A Fast and Reliable Method to Generate Pure, Single Cell-derived Clones of Mammalian Cells. *Bio-protocol*, 12(16). doi: 10.21769/BioProtoc.4490
- Hanson, G., & Collier, J. (2018). Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(1), 1k 20-30. doi: 10.1038/nrm.2017.91
- Henras, A.K.; Soudet, J.; Gerus, M.; Lebaron, S.; Caizergues-Ferrer, M.; Mouglin, A.; Henry, Y. (2008). The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1k 2334–2359. doi: 10.1007/s00018-008-8027-0
- Holley, R. W., Everett, G. A., Madison, J. T., & Zamir, A. (1965). Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 240(5), 1k 2122-2128
- Holmes, M. J., Padgett, L. R., Bastos, M. S., & Sullivan Jr, W. J. (2021). m6A RNA methylation facilitates pre-mRNA 3'-end formation and is essential for viability of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*, 1k 17(7), 1k e1009335. doi: 10.1371/journal.ppat.1009335
- Holtkamp, S., Kreiter, S., Selmi, A., Simon, P., Koslowski, M., Huber, C., ... & Sahin, U. (2006). Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*, 108(13), 1k 4009-4017. doi: 10.1182/blood-2006-04-015024
- Honda, R., Tanaka, H., & Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS letters*, 420(1), 1k 25-27. doi: 10.1016/s0014-5793(97)01480-4
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1k 1262-1278. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., ... & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*, 31(9), 1k 827-832. doi: 10.1038/nbt.2647
- Ito, A., Lai, C. H., Zhao, X., Saito, S. I., Hamilton, M. H., Appella, E., & Yao, T. P. (2001). p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *The EMBO journal*, 20(6), 1k 1331-1340. doi: 10.1093/emboj/20.6.1331
- Ito, S., Horikawa, S., Suzuki, T., Kawauchi, H., Tanaka, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2014). Human NAT10 is an ATP-dependent RNA acetyltransferase responsible for N4-acetylcytidine formation in 18 S ribosomal RNA (rRNA). *Journal of Biological Chemistry*, 289(52), 1k 35724-35730. doi: 10.1074/jbc.C114.602698
- Iwamoto, M., Mori, C., Hiraoka, Y., & Haraguchi, T. (2014). Puromycin resistance gene as an effective selection marker for ciliate *Tetrahymena*. *Gene*, 534(2), 1k 249-255. doi: 10.1016/j.gene.2013.10.049
- Jeon, Y., Choi, Y. H., Jang, Y., Yu, J., Goo, J., Lee, G., ... & Bae, S. (2018). Direct observation of DNA target searching and cleavage by CRISPR-Cas12a. *Nature communications*, 9(1), 1k 2777. doi: 10.1038/s41467-018-05245-x
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 1k 816-821. doi: 10.1126/science.1225829

- Karginov, F. V., & Hannon, G. J. (2010). The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Molecular cell*, 37(1), 1k 7-19. doi: 10.1016/j.molcel.2009.12.033
- Karijolich, J., ja Yu, Y.-T. (2011). Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation. *Nature* 474, 1k 395–398. 1k doi: 10.1038/nature10165
- Kawai, G., Hashizume, T., Miyazawa, T., McCloskey, J. A., & Yokoyama, S. (1989). Conformational characteristics of 4-acetylcytidine found in tRNA. *In Nucleic Acids Symposium Series* (No. 21, 1k 61-62)
- Kong, R., Zhang, L., Hu, L., Peng, Q., Han, W., Du, X., & Ke, Y. (2011). hALP, a novel transcriptional U three protein (t-UTP), activates RNA polymerase I transcription by binding and acetylating the upstream binding factor (UBF). *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 1k 7139-7148. doi: 10.1074/jbc.M110.173393
- Kruppa, J., & Zachau, H. G. (1972). Multiplicity of serine-specific transfer RNAs of brewer's and baker's yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 277(3), 1k 499-512. doi: 10.1016/0005-2787(72)90093-7
- Lin, S., Staahl, B. T., Alla, R. K., & Doudna, J. A. (2014). Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife*, 3, 1k e04766. doi: 10.7554/eLife.04766
- Liu, H., Ling, Y., Gong, Y., Sun, Y., Hou, L., & Zhang, B. (2007). DNA damage induces N-acetyltransferase NAT10 gene expression through transcriptional activation. *Molecular and cellular biochemistry*, 300, 1k 249-258. doi: 10.1007/s11010-006-9390-5
- Liu, X., Tan, Y., Zhang, C., Zhang, Y., Zhang, L., Ren, P., ... & Du, X. (2016). NAT 10 regulates p53 activation through acetylating p53 at K120 and ubiquitinating Mdm2. *EMBO reports*, 17(3), 1k 349-366. doi: 10.15252/embr.201540505
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 1k 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lu, L., Berkey, K. A., & Casero, R. A. (1996). RGF GIGS is an amino acid sequence required for acetyl coenzyme A binding and activity of human spermidine/spermine N1acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(31), 1k 18920-18924. doi: 10.1074/jbc.271.31.18920
- Lv, J., Liu, H., Wang, Q., Tang, Z., Hou, L., & Zhang, B. (2003). Molecular cloning of a novel human gene encoding histone acetyltransferase-like protein involved in transcriptional activation of hTERT. *Biochemical and biophysical research communications*, 311(2), 1k 506-513. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.09.235
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., ... & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 1k 823-826. doi: 10.1126/science.1232033
- Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D. Y., Lee, Y. L., Rupniewski, I., ... & Rebar, E. J. (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature biotechnology*, 25(7), 1k 778-785. doi: 10.1038/nbt1319

- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., ... & Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology*, 29(2), 143-148. doi: 10.1038/nbt.1755
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., ... & Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935-949. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001
- Ohashi, Z., Murao, K., Yahagi, T., Von Minden, D. L., McCloskey, J. A., & Nishimura, S. (1972). Characterization of C⁺ located in the first position of the anticodon of *Escherichia coli* tRNA^{Met} as N⁴-acetylcytidine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 262(2), 209-213. doi: 10.1016/0005-2787(72)90234-1
- Pickar-Oliver, A., & Gersbach, C. A. (2019). The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(8), 490-507. doi: 10.1038/s41580-019-0131-5
- Pinder, J., Salsman, J., & Dellaire, G. (2015). Nuclear domain ‘knock-in’ screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing. *Nucleic acids research*, 43(19), 9379-9392. doi: 10.1093/nar/gkv993
- Purchal, M. K., Eyler, D. E., Tardu, M., Franco, M. K., Korn, M. M., Khan, T., ... & Koutmou, K. S. (2022). Pseudouridine synthase 7 is an opportunistic enzyme that binds and modifies substrates with diverse sequences and structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(4), e2109708119. doi: 10.1073/pnas.2109708119
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281-2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., & Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(5), 402-412. doi: 10.1038/nrm2395
- Roundtree, I., Evans, M., Pan, T., ja He, C. (2017). Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell* 169, 1187-1200. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.045
- Sanjana, N. E., Cong, L., Zhou, Y., Cunniff, M. M., Feng, G., & Zhang, F. (2012). A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nature protocols*, 7(1), 171-192. doi: 10.1038/nprot.2011.431
- Sapranauskas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 39(21), 9275-9282. doi: 10.1093/nar/gkr606
- Sas-Chen, A., Thomas, J. M., Matzov, D., Taoka, M., Nance, K. D., Nir, R., ... & Schwartz, S. (2020). Dynamic RNA acetylation revealed by quantitative cross-evolutionary mapping. *Nature*, 583(7817), 638-643. doi: 10.1038/s41586-020-2418-2
- Schaefer, M., Pollex, T., Hanna, K., Tuorto, F., Meusburger, M., Helm, M., & Lyko, F. (2010). RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes & development*, 24(15), 1590-1595. doi: 10.1101/gad.586710

- Shah, S. A., Erdmann, S., Mojica, F. J. ja Garrett, R. A. (2013). Protospacer recognition motifs: Mixed identities and functional diversity. *RNA Biology*, 10(5), lk 891-899. doi: 10.4161/rna.23764
- Sharma, G., Sharma, A. R., Bhattacharya, M., Lee, S. S., & Chakraborty, C. (2021). CRISPR-Cas9: a preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases. *Molecular Therapy*, 29(2), lk 571-586. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.09.028
- Sharma, S., Yang, J., Watzinger, P., Kötter, P., & Entian, K. D. (2013). Yeast Nop2 and Rcm1 methylate C2870 and C2278 of the 25S rRNA, respectively. *Nucleic acids research*, 41(19), lk 9062-9076. doi: 10.1093/nar/gkt679
- Starheim, K. K., Gevaert, K., & Arnesen, T. (2012). Protein N-terminal acetyltransferases: when the start matters. *Trends in biochemical sciences*, 37(4), lk 152-161. doi: 10.1016/j.tibs.2012.02.003
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., ... & Zhang, F. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163(3), lk 759-771. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038
- Zhang, Y., Heidrich, N., Ampattu, B. J., Gunderson, C. W., Seifert, H. S., Schoen, C., ... & Sontheimer, E. J. (2013). Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*. *Molecular cell*, 50(4), lk 488-503. doi: 10.1016/j.molcel.2013.05.001
- Taniguchi, T., Miyauchi, K., Sakaguchi, Y., Yamashita, S., Soma, A., Tomita, K., & Suzuki, T. (2018). Acetate-dependent tRNA acetylation required for decoding fidelity in protein synthesis. *Nature Chemical Biology*, 14(11), lk 1010-1020. doi: 10.1038/s41589-018-0119-z
- Tardu, M., Jones, J.D., Kennedy, R.T., Lin, Q. and Koutmou, K.S. (2019) Identification and quantification of modified nucleosides in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. *ACS Chem. Biol.*, 14, lk 1403–1409. doi: 10.1093/nar/gkac594
- Thut, C. J., Goodrich, J. A., & Tjian, R. (1997). Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes & development*, 11(15), lk 1974-1986. doi: 10.1101/gad.11.15.1974
- Tuorto, F., Liebers, R., Musch, T., Schaefer, M., Hofmann, S., Kellner, S., ... & Lyko, F. (2012). RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nature structural & molecular biology*, 19(9), lk 900-905. doi: 10.1038/nsmb.2357
- Vousden, K. H., & Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), lk 594-604. doi: 10.1038/nrc864
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4), lk 910-918. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.025
- Yang, Y., Wang, L., Han, X., Yang, W. L., Zhang, M., Ma, H. L., ... & Yang, Y. G. (2019). RNA 5-methylcytosine facilitates the maternal-to-zygotic transition by preventing maternal mRNA decay. *Molecular cell*, 75(6), lk 1188-1202. doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.033

Yang, X., Yang, Y., Sun, B.-F., Chen, Y.-S., Xu, J.-W., Lai, W.-Y., Li, A., Wang, X., Bhattarai, D.P., Xiao, W., et al. (2017). 5-methylcytosine promotes mRNA export — NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m⁵C reader. *Cell research* 27, 1k 606–625. doi: 10.1038/cr.2017.55

Young, J. I., Hong, E. P., Castle, J. C., Crespo-Barreto, J., Bowman, A. B., Rose, M. F., ... & Zoghbi, H. Y. (2005). Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(49), 1k 17551-17558. doi: 10.1073/pnas.0507856102

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. Synthego CRISPR *Design Tool* <https://design.synthego.com/#/> (kasutatud 21.05.2023)
2. Chop Chop <https://chopchop.cbu.uib.no/#> (kasutatud 21.05.2023)
3. NCBI BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (kasutatud 21.05.2023)
4. Ensembl <https://www.ensembl.org/index.html> (kasutatud 21.05.2023)
5. Biorender <https://www.biorender.com/> (kasutatud 21.05.2023)
6. UCSC *Genome Browser* <https://genome.ucsc.edu/> (kasutatud 21.05.2023)

LIHTLITSENTS

Mina, Valeria Naumova,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “Inimese NAT10 geeni väljalülitamine CRISPR-Cas9 meetodil ja väljalülituse funktsionaalne valideerimine”,

mille juhendajad on Pavel Kudrin ja Tõnis Org,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Valeria Naumova

21.05.2023