

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATJAŽ CIZEJ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATJAŽ CIZEJ

ANALIZA IZRAŽANJA GENA ZA SEROTONINSKI RECEPTOR 5-HT_{2c} IN
SPREMLJANJE POSTTRANSKRIPCIJSKIH MODIFIKACIJ mRNA MED NEVRONSKO
DIFERENCIACIJO MIŠJIH EMBRIOKARCINOMSKIH CELIC P19

ANALYSIS OF SEROTONIN RECEPTOR 5-HT_{2c} GENE EXPRESSION AND
MONITORING OF ITS POST-TRANSCRIPTIONAL MODIFICATIONS DURING
NEURONAL DIFFERENTIATION OF MURINE EMBRYOCARCINOMA CELLS P19

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljajal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča. Analizo nukleotidnih zaporedij molekul DNA je opravilo podjetje GATC Biotech, Konstanz, Nemčija. Vzorce RNA, izolirane iz celične linije P19 med nevrodiferenciacijo z retinojsko kislino, je prijazno daroval Miha Modic (Institute of Stem Cell Research, German Research Center for Environmental Health, Helmholtz Center Munich, Nemčija)

Zahvala

Najlepše se zahvaljujem svojemu mentorju, doc. dr. Tomažu Bratkoviču, za možnost opravljanja magistrskega dela na področju molekularne biologije, strokovno vodenje in svetovanje pri nastajanju tega dela.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča.

Ljubljana, 2017

Predsednik komisije za zagovor: izr. prof. dr. Iztok Grabnar

Član komisije za zagovor: doc. dr. Nace Zidar

VSEBINA

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 Urejanje RNA	1
1.1.1 Urejanje A v I	2
1.2 Serotoninski receptor 5-HT _{2c} ter posttranskripcijske modifikacije njegove mRNA 5	
1.3 Majhne nukleolarne RNA – snoRNA	7
1.3.1 snoRNA sirote (angl. <i>orphan snoRNA</i>)	10
1.4 SNORD115, alternativno povezovanje eksonov pre-mRNA receptorja 5-HT _{2c} ter urejanje A v I	10
2. NAMEN NALOGE	12
3. MATERIALI IN METODE	13
3.1 Materiali	13
3.1.1 Kemikalije	13
3.1.2 Začetni oligonukleotidi, kompleti, označevalci, reagenti	13
3.1.3 Pufri in raztopine	15
3.1.4 Biološki material	15
3.1.5 Gojišča	15
3.1.6 Plazmidi	15
3.1.7 Laboratorijska oprema	16
3.2 Eksperimentalne sheme	17
3.2.1 Spremljanje nivojev izražanja izbranih genov v vzorcih mišje celične linije P19 med nevrodiferenciacijo	17
3.2.2 Optimizacija metode ICE	17
3.2.2.1 Preverjanje koncentracije RNA v vzorcih, testiranje začetnih oligonukleotidov za metodo ICE	17
3.2.2.2 Testiranje učinka cianoetilacije na reverzno transkripcijo na vzorcu, izoliranem iz mišjih možganov	17

3.2.2.3	Ponovitev postopka z drugačnimi pogoji cianoetilacije na testnem vzorcu (cca. 600 ng)	18
3.2.3	Dokaz urejanja A v I z metodo »Inosine Chemical Erasing« (ICE) na vzorcu celične linije P19 št. 13	19
3.2.4	Spremljanje obsega urejanja A v I pri vzorcih RNA iz mišje celične linije P19, nevrodiferencirane z retinojsko kislino z določanjem zaporedja nukleotidov.....	19
3.2.5	Določanje razmerja med kratko in dolgo izoobliko mRNA receptorja 5-HT2c na 12 vzorcih celične linije P19 med nevrodiferenciacijo	20
3.2.6	Validacija kvantitativne analize urejanja A v I s Sangerjevo metodo določanja zaporedja nukleotidov.....	20
3.3	Metode	22
3.3.1	Spektrofotometrična ocena koncentracije nukleinskih kislin v vzorcu	22
3.3.2	Reverzna transkripcija (RT-PCR)	22
3.3.2.1	OmniScript	22
3.3.2.2	SuperScript VILO	22
3.3.3	Verižna reakcija s polimerazo (PCR) ter njene različice.....	22
3.3.3.1	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo	23
3.3.3.2	Vgnezdena verižna reakcija s polimerazo	24
3.3.3.3	»Touchdown« verižna reakcija s polimerazo.....	25
3.3.4	Agarozna gelska elektroforeza	26
3.3.5	Metoda »Inosine Chemical Erasing« (ICE)	27
3.3.6	Določanje nukleotidnega zaporedja ampikonov	29
3.3.6.1	Določanje nukleotidnega zaporedja v plazmidih	29
3.3.7	Izolacija ampikona iz elektroforeznega gela	29
3.3.8	Ligacija	29
3.3.9	Transformacija.....	30
3.3.10	Precep kolonij <i>E. coli</i>	30
3.3.11	Izolacija plazmidne DNA	30
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	32
4.1	Analiza izražanja izbranih genov med diferenciacijo celične linije P19 do nevronov	32
4.2	Rezultati analize alternativnega povezovanja eksonov receptorja 5-HT2c med nevrodiferenciacijo z dvema različnima metodama	34

4.2.1	Analiza razmerja izooblik receptorja 5-HT2c s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo	34
4.2.2	Analiza koncentracije izooblik receptorja 5-HT2c s »touchdown« RT-PCR	36
4.3	Optimizacija metode ICE.....	38
4.3.1	Optimizacija pogojev PCR s paroma začetnih oligonukleotidov F1/R1 in F2/R2	38
4.3.2	Testiranje dveh različnih kompletov za reverzno transkripcijo.....	39
4.3.3	Testiranje metode ICE na vzorcih, izoliranih iz mišjih možganov	40
4.3.4	Končna optimizacija metode ICE.....	41
4.4	Dokazovanje urejanja A v I na mestih A-E z metodo ICE.....	42
4.5	Spremljanje posttranskripcijskih modifikacij pri vzorcih RNA iz mišjih celic, nevrodiferenciranih z retinojsko kislino	43
4.6	Preverjanje ustreznosti metode sekvenciranja za določanje obsega urejanja A v I	47
4.7	Model posttranslacijskih modifikacij mRNA 5-HT2c.....	48
5.	SKLEP.....	50
6.	VIRI IN LITERATURA.....	51
7.	PRILOGE	55
	Priloga 1: Paralogi SNORD115 in začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri qPCR.....	55
	Priloga 2: Rezultati sekvenciranja amplikonov N ₆ CE+/- (testiranje mest urejanja A v I z metodo ICE).....	57
	Priloga 3: Delež inozinov na mestih urejanja A v I med nevrodiferenciacijo mišjih celic P19 v vzorcih 7 do 18	59
	Priloga 4: Poravnava cDNA mišjega in humanega <i>HRT2c</i> v območju alternativnega spajanja eksonov	65
	Priloga 5: Določitev nukleotidnega zaporedja 10 naključnim plazmidom pGEM-T Easy	66
	Priloga 6: Testiranje ustreznosti metode določanja nukleotidnega zaporedja za določanje obsega urejanja A v I na znanih mestih urejanja – sekvenciranje mešanice plazmidov pGEM7 in pGEM10.....	71
	Priloga 7: Validacija sekvenciranja po pozameznih položajih urejanja A v I - rdeče črte prikazujejo znana razmerja plazmidne cDNA pGEM7 in 10.....	73

POVZETEK

Posttranskripcijske modifikacije različnih vrst RNA v celicah so pogost in pomemben pojav, katerega glavna posledica je povečanje števila transkriptov in proteinov, ki lahko nastanejo v evkariontski celici. V okviru tega magistrskega dela smo na primeru mRNA, izolirane iz mišje celične linije P19 v različnih časovnih obdobjih med nevrodiferenciacijo, preučevali dve takšni modifikaciji - alternativno izrezovanje intronov in urejanje A v I. Obe modifikaciji potekata na pre-mRNA, ki kodira serotoninski receptor 5-HT_{2c}, od njiju pa sta odvisni specifičnost in funkcionalnost receptorja. Ker potekata na istem odseku pre-mRNA, sta verjetno medsebojno povezani. Prva modifikacija, alternativno povezovanje eksonov, je domnevno regulirana z izražanjem male nukleolarne RNA (snoRNA), imenovane SNORD115. Njen genski zapis se nahaja na lokusu, na katerem poteka gensko vtisnjenje, zaradi katerega se izrazi le alel, dedovan po očetovi strani, delecija tega lokusa pa je zelo verjetno vzrok mnogih simptomov Prader-Willijevega sindroma. Drugo modifikacijo, urejanje A v I, katalizirajo encimi, imenovani ADAR (na RNA delujoče adenzinske deaminaze), poteka pa lahko na petih različnih mestih na pre-mRNA receptorja 5-HT_{2c}. Spremljanje izražanja SNORD115 ter mRNA HTR2c med nevrodiferenciacijo smo preučevali z metodo qPCR (verižna reakcija s polimerazo v realnem času, angl. *quantitative polymerase chain reaction, real-time PCR*), obseg urejanja A v I na posameznih mestih pa s Sangerjevo metodo sekvenciranja. Obseg alternativnega povezovanja eksonov smo analizirali z metodo RT-PCR (obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (angl. *reverse transcription-polymerase chain reaction*). Ker je urejanje A v I težko ločiti od polimorfizma posameznega nukleotida oz. SNP (angl. *single nucleotide polymorphism*) ali naključnih mutacij, smo dodatno uporabili še metodo ICE (angl. *inosine chemical erasing*), s katero smo vzporedno potrdili, da na omenjenih petih mestih res poteka urejanje A v I. Ugotovili smo, da se med nevrodiferenciacijo poveča izražanje snoRNA SNORD115 in ADAR. Obseg urejanja A v I mRNA HTR2c se poveča predvsem na mestih, na katere se ne veže SNORD115, kar bi lahko pomenilo, da SNORD115 na teh mestih onemogoča to modifikacijo. Med nevrodiferenciacijo narašča tudi izražanje dolge in kratke izooblike receptorja 5-HT_{2c}, razmerje med njima pa nekoliko presenetljivo ostaja enako, kar pa bi morali še potrditi z nadaljnjimi raziskavami.

Ključne besede: serotoninski receptor 5-HT_{2c}, alternativno spajanje eksonov, SNORD 115, urejanje A v I, Prader-Willijev sindrom

ABSTRACT

In eukaryotes, posttranscriptional modifications of different types of cellular RNA are very common, and their main consequence is the increase in the number of transcripts and proteins that can be produced from a single gene. This thesis covers two such modifications, namely alternative splicing and A-to-I RNA editing, which were studied on a single pre-mRNA that was isolated from pluripotent murine cell line P19 at different time points during retinoic acid-induced neuronal differentiation. Specifically, both modifications take place on the pre-mRNA encoding serotonin receptor 5-HT_{2c}, and affect its specificity as well as functionality. Since they occur in the same segment of the pre-mRNA, they are probably connected. The first modification, i.e. alternative splicing, is regulated by a snoRNA (Small Nucleolar RNA) called SNORD 115, whose gene cluster is located at the paternally imprinted locus, which means that only the paternal allele is expressed, and the deletion of this locus likely augments many of the Prader-Willi syndrome symptoms. The second modification, i.e. A-to-I RNA editing, is catalysed by enzymes called ADAR (Adenosine Deaminases Acting on RNA) and can occur at five different positions on the pre-mRNA encoding the 5-HT_{2c} receptor. We have studied both posttranscriptional modifications by analyzing the samples isolated from the P19 cell line undergoing neuronal differentiation at different time points. We quantitative polymerase chain reaction (qPCR or real-time PCR) to monitor the expression of SNORD115 and HTR2c mRNA during neuronal differentiation, and the Sanger sequencing method to determine the extent of A-to-I editing at individual positions. Since it is difficult to distinguish A-to-I editing from SNP (Single Nucleotide Polymorphism), we used a method called ICE (Inosine Chemical Erasing), to confirm that the process taking place at those five positions is in fact A-to-I editing. We established that both snoRNA SNORD115 and ADAR enzymes are upregulated during neuronal differentiation. The scope of A-to-I editing mainly increases in the positions to which SNORD115 does not bind, which could indicate that SNORD115 inhibits A-to-I editing at these positions. During neuronal differentiation, the expression of both, long and short splice isoforms of 5-HT_{2c} receptor increases, while the ratio between them remains the same, which is somewhat unexpected. This result should be further verified in future studies.

Keywords: serotonin 5-HT_{2c} receptor, alternative splicing, SNORD 115, A-to-I editing, Prader-Willi syndrome

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

5-HT _{2c} R	serotoninški receptor 2c
A	adenozin
ADAR	na RNA delujoča adenozińska deaminaza (<i>angl. <u>a</u>denosine <u>d</u>eaminase <u>a</u>cting on <u>R</u>NA</i>)
ADAT	na tRNA delujoča adenozińska deaminaza (<i>angl. <u>a</u>denosine <u>d</u>eaminase <u>a</u>cting on <u>t</u>RNA</i>)
amp	ampicilin
C	citozin
cDNA	komplementarna veriga DNA
ddH ₂ O	ultra čista voda
ddNTP	2',3'-dideoksinukleotid trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina (<i>angl. <u>d</u>eoxyribo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>)
dNTP	2'-deoksinukleotid trifosfat
G	gvanozin
I	inozin
ICE	metoda kemijskega izbrisa inozina (<i>angl. <u>i</u>nosine <u>c</u>hemical <u>e</u>rasing</i>)
LB	gojišče Luria-Bertani
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>polyme<u>r</u>ase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction</i>)
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (<i>q<u>u</u>antitative <u>p</u>olimerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction, <u>r</u>eal-time PCR</i>)
RNA	ribonukleinska kislina (<i>angl. <u>r</u>ibo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>)
RT-PCR	obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (<i>angl. <u>r</u>everse <u>t</u>ranscription-<u>p</u>olimerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction</i>)
scaRNA	nekodirajoča RNA iz družine snoRNA, ki se zadržuje v Cajalovih telescih (<i>angl. <u>s</u>mall <u>C</u>ajal <u>b</u>ody-<u>s</u>pecific <u>s</u>no<u>R</u>NA</i>)
SDS	natrijev lavrilsulfat (<i>sodium lauril sulphate</i>)
snoRNA	mala jedrčna RNA ali mala nukleolarna RNA (<i>angl. <u>s</u>mall <u>n</u>ucleolar <u>R</u>NA</i>)
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (<i>angl. <u>s</u>ingle <u>n</u>ucleotide <u>p</u>olymorphism</i>)
T	timin
Tris	tris(hidroksimetil)-aminometan
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid, kromogeni substrat za β-galaktozidazo
bp	bazni par DNA ali RNA

1 UVOD

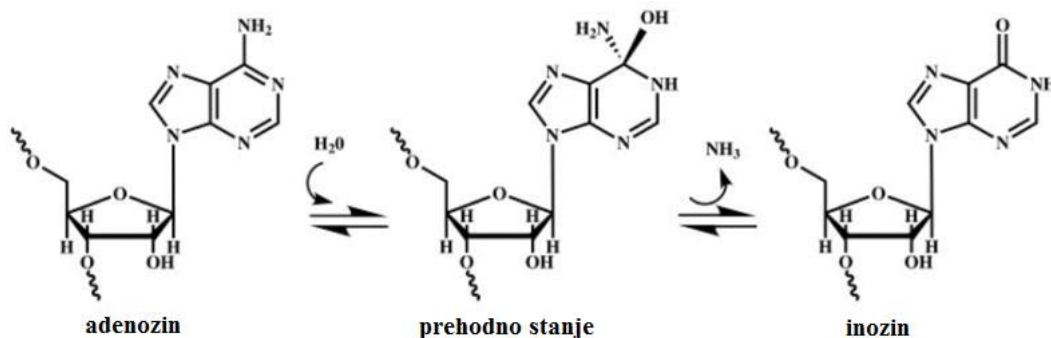
1.1 Urejanje RNA

Za razumevanje procesa urejanja RNA (angl. *RNA editing*) je ključno poznavanje procesov transkripcije in translacije v različnih vrstah celic ter modifikacij, ki sledijo temu procesu. Pri prokariotih transkripcija in translacija potekata sočasno, kar pomeni, da je protein, ki je končni produkt translacije, določen z zaporedjem na DNA. Nasprotno pri evkariontih transkripcija in translacija potekata na različnih mestih v celici, in sicer prva poteka v jedru celice, druga pa v citoplazmi. Evkariontskim celicam to omogoča, da so lahko molekule RNA, ki nastanejo v procesu transkripcije, pred translacijo podvržene tudi različnim posttranskripcijskim modifikacijam, kot so dodajanje kape na 5'-koncu, poliadenilacija 3'-konca, alternativno povezovanje eksonov ter urejanje RNA (1). Ena izmed posledic vseh teh posttranskripcijskih modifikacij je, da lahko pri evkariontih iz enega gena po prepisovanju DNA in prevajanju RNA nastane več različnih proteinov, kar močno poveča število različnih proteinov, ki lahko nastanejo v evkariontskem organizmu (1, 2). Za razliko od alternativnega povezovanja eksonov, pri katerem se na RNA na drugačen način poveže večji sklop nukleotidov, je za urejanje značilna sprememba v zaporedju RNA na ravni enega ali največ nekaj posamičnih nukleotidov (2, 3). Urejanje RNA ne poteka le na mRNA, temveč tudi na drugih vrstah RNA, kot sta tRNA ali rRNA (4). Izraz urejanje RNA je sicer skupno ime za več različnih mehanizmov, ki potekajo po različnih poteh. Med urejanjem RNA se nukleotid lahko doda, izreže ali encimsko modificira, za vse vrste urejanja pa so značilne tri glavne komponente: 1. molekula RNA, na kateri poteka urejanje, mora vsebovati zaporedje nukleotidov in/ali strukturno informacijo (npr. lokalno zvitje), ki določata mesto, na katerem bo potekalo urejanje, 2. molekulo RNA prepoznajo in se nanjo vežejo proteinski ali RNA-dejavniki (t.i. *trans-acting factors*), ki določajo vrsto in lokacijo modifikacije, 3. na mesto urejanja mora biti usmerjena encimska aktivnost, ki katalizira reakcijo (3). Urejanje RNA z dodajanjem ali odstranjevanjem nukleotidov poteka redkeje, primer je npr. dodajanje in odstranjevanje uracila v mitohondrijski RNA različnih vrst tripanosom (5). Pogostejša so urejanja RNA s spreminjanjem nukleotida – manj raziskana tovrstna mehanizma sta urejanje gvanina (G) v adenin (A) in urejanje uracila (U) v citozin (C) (6), bolj raziskana pa sta urejanje C v U ter predvsem urejanje A v inozin (I), ki sta tudi najpogostejša. Težko je sicer natančno oceniti, kako pogosto poteka urejanje RNA, saj je tudi v literaturi mogoče najti precej različnih

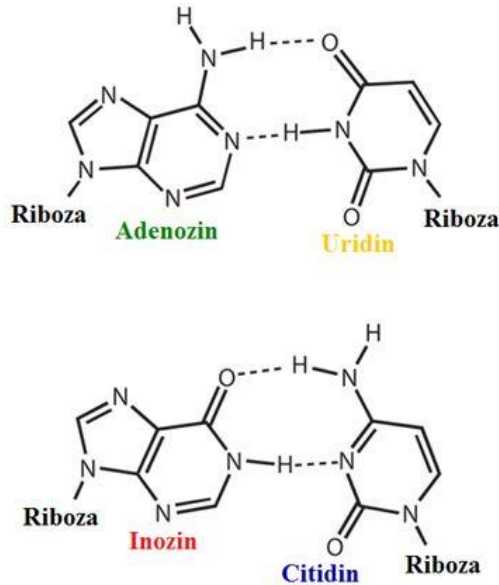
podatkov. Če namreč primerjamo le razlike v genomu in transkriptomu evkariontskega organizma, nam lažno pozitivne rezultate dajejo tako napake pri podvajanju DNA in prepisovanju RNA kot tudi polimorfizmi posameznih nukleotidov (angl. *single nucleotide polymorphisms* oz. SNPs) ter napake pri določanju nukleotidnih zaporedij. Vseeno iz dosedanjih raziskav jasno izhaja, da je urejanje RNA precej obsežen pojav. Po podatkih študije, v kateri so primerjali genom in transkriptom pri istem posamezniku, hkrati pa so precej omejili možnost lažno pozitivnih rezultatov iz prej navedenih vzrokov, so namreč našli preko 22.000 mest, na katerih poteka urejanje RNA, kar nakazuje na to, kako pomembno vlogo ima ta mehanizem. Kar 93 % odkritih mest urejanja RNA po tej raziskavi pripada urejanju A v I (7, 8).

1.1.1 Urejanje A v I

Urejanje A v I je najpogostejši mehanizem urejanja RNA, pri katerem se adozin s pomočjo encimske deaminacije na atomu C6 pretvori v inozin. Translacijski mehanizem inozin prepozna kot gvanozin (inozin namreč tvori bazni par s citozinom (slika 2)), zaradi česar pride do spremembe kodona, kar lahko vodi do vgradnje druge aminokisljine v nastajajoči protein. Reakcije deaminacij adozinov (slika 1) katalizirajo encimi iz družine ADAR (angl. *adenosine deaminase that act on RNA*) (2).



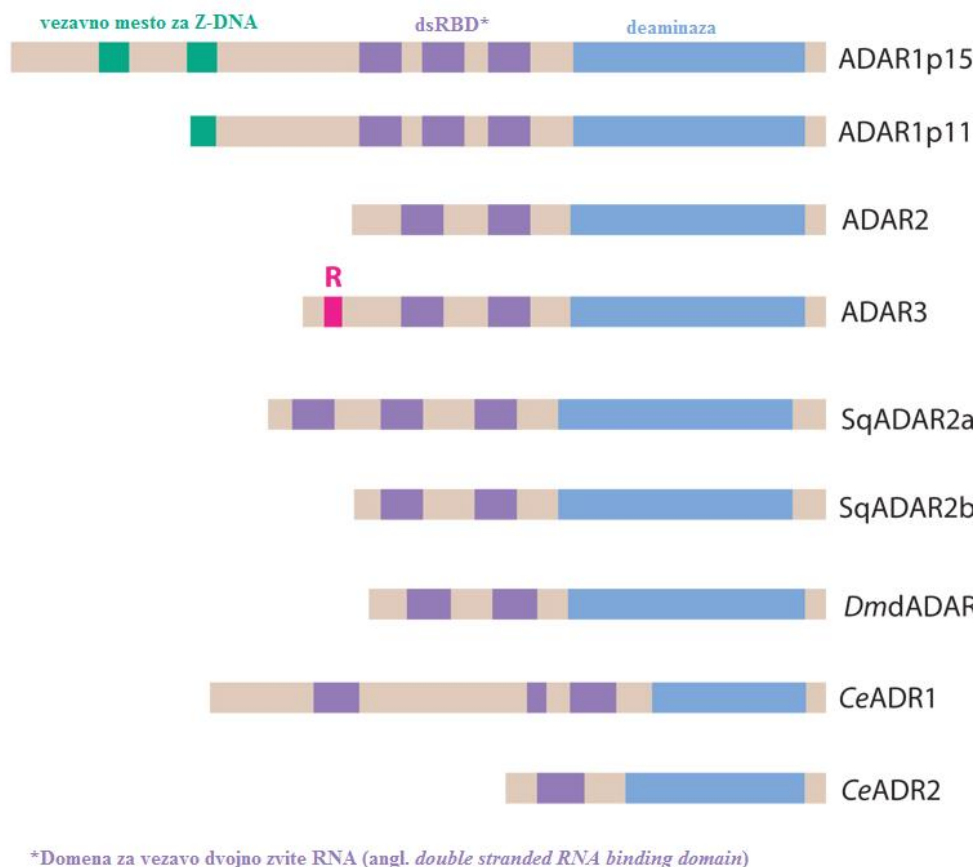
Slika 1: Reakcija urejanja A v I, ki jo katalizirajo encimi iz družine ADAR (prirejeno po 2).



Slika 2: Bazna para A-U in I-C (prirejeno po 9).

ADAR je skupina encimov, za katero domnevamo, da je evolucijsko nastala iz encimov ADAT (na tRNA delujoča adenozinska deaminaza, *angl. adenosine deaminaze acting on tRNA*), ki enako funkcijo, torej posttranskripcijsko pretvorbo adenozina v inozin, opravljajo na tRNA (2, 10). V človeškem genomu so prisotni geni za tri različne ADAR. ADAR1 in ADAR2, ki se nahajata v številnih tkivih, najbolj pa se izražata v možganih, sta aktivni obliki (11, 12), ADAR3 se izraža le v določenih živčnih tkivih in ni dokazano aktiven encim (12, 13). Tako encim ADAR1 kot ADAR2 lahko reakcijo urejanja A v I izvajata samo na dvoverižni RNA. Za razliko od njiju ima ADAR3 v svoji strukturi sicer tako domeno za vezavo na dvoverižno RNA kot tudi domeno za vezavo na enoverižno RNA, a zanj ni znanega nobenega substrata. Možno je, da z vezavo na RNA ADAR3 zgolj zavira urejanje A v I ostalih dveh encimov, kar so potrdili *in vitro* (13). Za encima ADAR1 in ADAR2 je sprva veljalo prepričanje, da je njuna glavna naloga urejanje mRNA, ki kodira proteine, kar je tudi funkcija, ki smo jo preučevali v okviru te naloge. Kasneje se je izkazalo, da večji del urejanja RNA, ki ga katalizirata ta encima, poteka na nekodirajočih regijah, v intronih ipd., pa tudi na neprevedljivih regijah mRNA na 5'- in 3'-koncu (*angl. 5'/3' untranslated regions, UTRs*) (9,14). ADAR1 in ADAR2 na substratih v nekodirajočih regijah navadno ne delujeta na iste substrate, saj imata različna mehanizma za izbiro substrata, pa tudi struktura njunih domen za vezavo na dvoverižno RNA ni enaka. Če delujeta na isti substrat, je to v glavnem takrat, kadar urejanje A v I poteka na kodirajoči regiji. Kljub temu oba izkazujeta afiniteto do podobnih mest, vežeta se zlasti na

dvoverižno RNA z nepopolnim parjenjem nukleotidov (predvsem na področja z ohlapnimi (angl. *wobble*) baznimi pari) (14). Razlika med encimoma je tudi ta, da ADAR1 katalizira urejanje A v I le v citoplazmi, ADAR2 pa je aktiven v citoplazmi in v jedru (12). Vsi trije encimi so strukturno dobro ohranjeni pri vseh sesalcih. Pri naši raziskavi je pomembno predvsem to, da sta aktivna encima pri človeku podobna mišjim, saj je laboratorijsko delo potekalo na RNA, izolirani iz mišjih možganov, ter na RNA, izolirani iz mišje celične linije P19. Tudi na splošno so vsaj nekatere oblike encima ADAR prisotne pri vseh živalih (slika 3), kar poleg ohranjenosti nukleotidnega zaporedja jasno kaže na njegovo pomembnost. Genov za ADAR po drugi strani ne najdemo pri rastlinah, kvasovkah ali glivah (10).



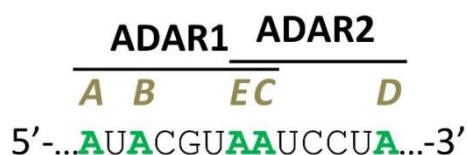
Slika 3: Prikaz funkcijskih mest na proteinih ADAR. Z modro barvo je označen del proteina, ki opravlja funkcijo deaminaze, z vijolično so označene domene, ki se povezujejo z dvoverižno RNA, z zeleno pa mesta, ki se povezujejo z alternativno zvito dvoverižno DNA (Z-DNA). Prvi trije proteini, izmed katerih ima prvi dve izoobliki, ki sta posledica alternativnega povezovanja eksonov, so prisotni pri vretenčarjih. Ostali so predstavniki drugih vrst (SqADAR2a in SqADAR2b sta izoformi alternativnega spajanja eksonov pri lignju, *DmdADAR* je encim vinske mušice (*Drosophila melanogaster*), *CeADR1* in *CeADR2* pa sta dva encima gliste *C. elegans*. Regije v proteinih vseh organizmov so podobne in dobro ohranjene (prirejeno po 9).

Oba aktivna encima (ADAR1 in 2) se v največjem obsegu izražata v možganih, iz česar lahko sklepamo, da sta pomembna za njihovo normalno delovanje. Za večino znanih mest, na katerih poteka selektivno urejanje A v I, namreč velja, da urejanje povzroči nastanek več izooblik proteinov, ki sodelujejo pri nevrottransmisiji. Urejanje teh mest je med razvojem možganov regulirano – pri zarodku je urejanja malo, po rojstvu pa se količina urejanja A v I zelo poveča. Obenem je tudi nivo encima ADAR2 v jedru nezrelih nevronov nižji od tistega v zrelih nevronih. Miši, ki nimajo aktivnih encimov ADAR1 ali ADAR2, ne preživijo do odrasle dobe (15). Tudi pri ostalih sesalcih, vključno z ljudmi, velja, da je ADAR1 nujen za normalen nevrološki razvoj. Urejanje A v I na nekodirajočih regijah lahko vpliva na izražanje proteinov, hkrati pa je ADAR1 udeležen tudi pri prepoznavi telesu nelastnih dvoverižnih RNA, zaradi česar ima določeno vlogo pri prepoznavi virusnih dvoverižnih RNA in imunskem odzivu. Dokazano je tudi, da preveliko ali premajhno izražanje ADAR1 lahko vodi v nastanek različnih vrst raka (14). Tudi ADAR2 igra pomembno vlogo pri nevrološkem razvoju, znižanje ravni izražanja tega proteina pa naj bi bilo povezano s propadom motoričnih nevronov pri pacientih z amiotrofično lateralno sklerozo (16).

1.2 Serotoninski receptor 5-HT_{2c} ter posttranskripcijske modifikacije njegove mRNA

Serotoninski receptorji oz. receptorji 5-HT obsegajo 7 skupin receptorjev, na katere se veže živčni prenašalec serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT). Ta lahko z aktivacijo posameznih receptorjev 5-HT izzove širok nabor fizioloških učinkov. Serotonin poleg vpliva na krvni tlak, motiliteto črevesja in druge procese povezujejo tudi s psihičnimi motnjami in urejanjem razpoloženja, posledično pa tudi z urejanjem spanja oz. s cirkadianim ritmom, agresivnim vedenjem, apetitom in učenjem (17). Motnje v delovanju serotoninergičnega sistema so zelo verjetno povezane s shizofrenijo, depresijo in debelostjo (18). Receptor 5-HT₃ je ionski kanal, vsi ostali receptorji, vključno z receptorjem 5-HT_{2c}, pa so sklopljeni z G-proteinom. Receptor 5-HT_{2c} skupaj z receptorjema 5-HT_{2a} in 5-HT_{2b} po klasifikaciji spada med receptorje 5-HT₂, ki so transmembranski proteini s sedmimi transmembranskimi domenami. Receptorji so povezani s fosfolipazo C, njihov končni učinek pa je dvig znotrajceličnega nivoja inozitol 1,4,5-trisfosfata (IP₃) ter diacilglicerola (DAG) (19). Receptor 5-HT_{2c} se sicer izraža v večini tkiv, a je njegovo izražanje najmočnejše v centralnem živčnem sistemu. V manjši meri ga lahko najdemo v večini

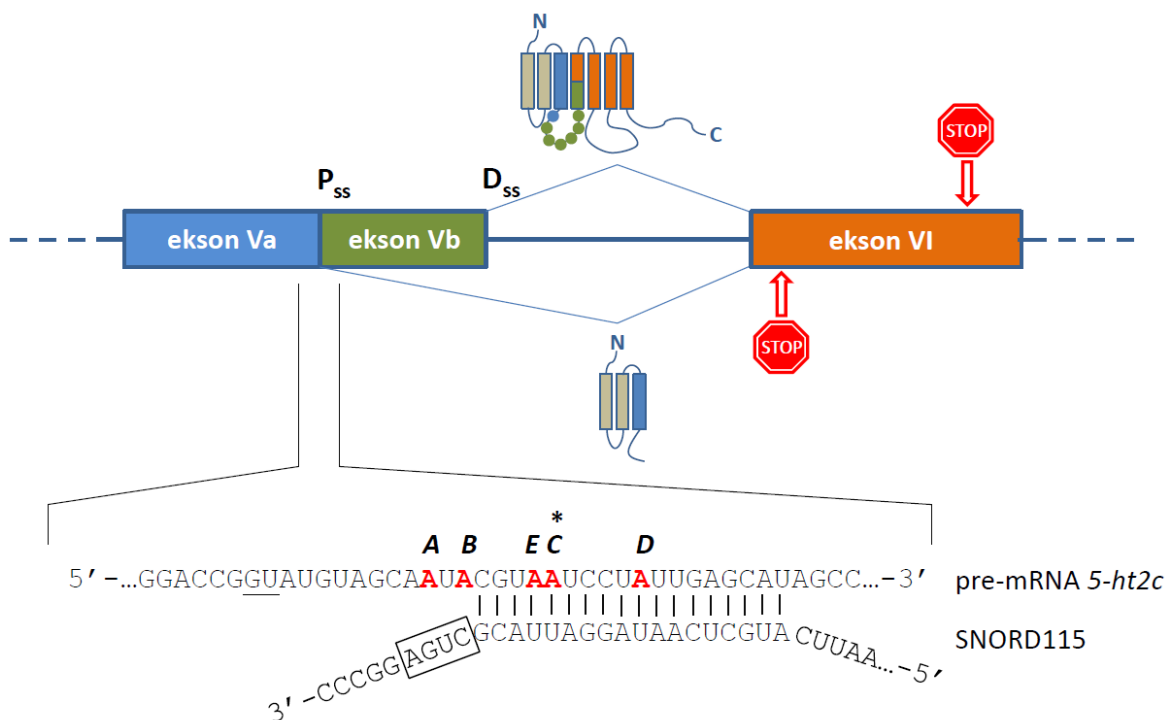
delov možganov, večja koncentracija je prisotna v možganski skorji, malih možganih in substanci nigri, največ pa ga je v epitelijskih celicah horoidnega pleksusa (preplet žil možganske pie, prekritih z endotelijem; nahaja se v steni možganskega ventrikla in izloča likvor) (20). Gen za receptorj 5-HT_{2c} se tako pri človeku kot pri miših nahaja na kromosomu X, in sicer pri človeku na lokusu q24, pri miših pa v regiji d-F4 (20). Mišji in človeški receptor sta si zelo podobna (Priloga 4), kar je pomembno za sklepanje o tem, da procesi, ki jih opisujemo v rezultatih raziskovalnega dela naloge, pri ljudeh potekajo na podoben način. Na molekuli mRNA, ki kodira receptor 5-HT_{2c}, lahko potekata dve različni posttranskripcijski modifikaciji. Prva je alternativno povezovanje eksonov, ki jo domnevno koordinira majhna nukleolarna RNA (snoRNA), imenovana SNORD115. Vključitev alternativnega eksona Vb vodi do aktivnega receptorja s sedmimi transmembranskimi domenami. Če ekson Vb ni vključen v zrelo mRNA (kadar SNORD115 ni prisotna), nastane krajša izooblika receptorja z le tremi transmembranskimi domenami, ki ni sposobna znotrajcelične signalizacije. Krajša izooblika ima kljub temu svojo funkcijo, in sicer tvori heterodimere z daljšo izoobliko, jo zadrži (sekvestrira) v endoplazemskem retikulumu in ji tako preprečuje, da bi prišla do membrane (21) (več o snoRNA ter alternativnem izrezovanju v poglavju 1.4). Druga posttranslacijska modifikacija je urejanje A v I, ki lahko poteče na petih bližnjih mestih (A, B, C, D in E) na alternativnem eksonu Vb (slika 5). Urejanje na teh mestih lahko katalizirata oba encima, ADAR1 in ADAR2 (urejanje v tem primeru poteka na kodirajoči regiji), vendar imata različno afiniteto do teh petih mest – ADAR1 preferira mesti A in B, ADAR2 pa mesto D (slika 4). Urejanje A v I na mestih C in E katalizirata oba encima, toda prav na teh dveh mestih, ki najbolj vplivata na končno aktivnost receptorja 5-HT_{2c}, urejanje kljub temu poteka redkeje kot na ostalih.



Slika 4: Encima ADAR katalizirata pretvorbno adenoзина v inozin le na določenih mestih – ADAR 1 na mestih A, B in E, ADAR2 pa na E, C in D. Slika je izrisal Tomaž Bratkovič.

ADAR2 lahko urejanje A v I izvaja tudi v jedru, a tam inozin v intronu nastane le na mestu D (12) Urejanje je na teh mestih selektivno, encima pa za vezavo potrebujeta dvoverižno RNA, zato na tem mestu pre-mRNA tvori lasnico (intron V se nepopolno pari z eksonom

Vb). SNORD115 verjetno vpliva na urejanje adenozina na položaju C, kar je ena izmed hipotez, ki jo bomo poskušali preveriti v eksperimentalnem delu.



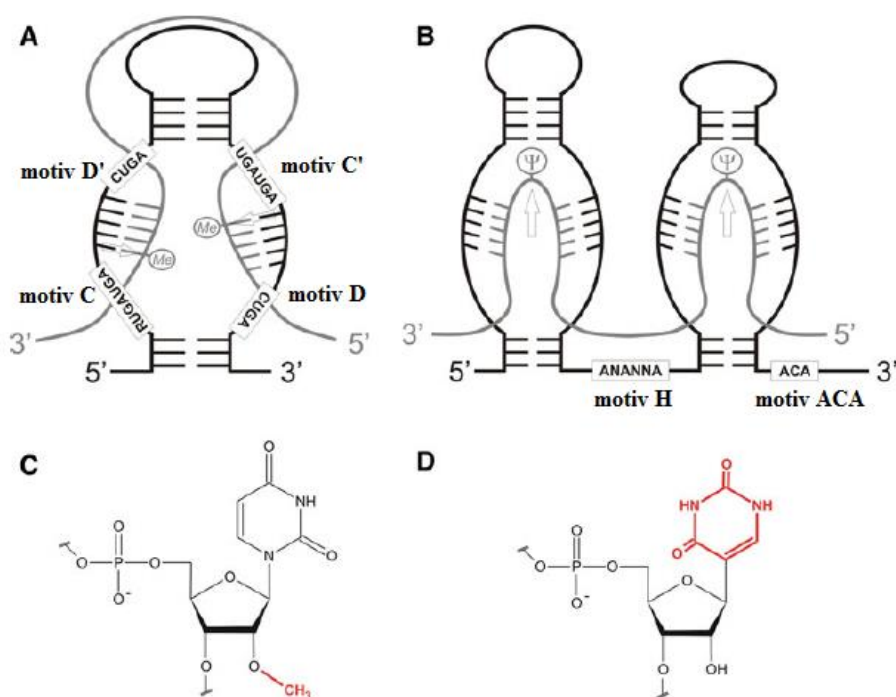
Slika 5: Prikaz alternativnega spajanja eksonov na pre-mRNA, ki kodira serotoninski receptor 5-HT2c. V primeru vezave SNORD 115 na mRNA nastane aktivna izooblika z vključenim eksonom Vb in sedmimi transmembranskimi domenami. Če do tega ne pride, nastane neaktivna oblika receptorja s tremi transmembranskimi domenami. A, B, C, D in E so mesta, na katerih pod vplivom encimov ADAR poteče urejanje A v I. Mesto C je hkrati tudi mesto, kjer ob vezavi SNORD115 domnevno poteče metilacija riboze na položaju 2'-O (označeno z zvezdico). Motiv CUGA je značilen motiv D snoRNA iz družine C/D (Slika je izrisal Tomaž Bratkovič po predlogi 22).

1.3 Majhne nukleolarne RNA - snoRNA

Že dolgo je znano, da poleg regij, ki se na DNA prepisejo v mRNA in se potem prevedejo v proteine, na DNA obstajajo tudi regije, ki vsebujejo zapis za nekodirajoče RNA. To pomeni, da te RNA ne nosijo kode za sintezo proteinov, vendar kljub temu opravljajo bistvene funkcije v celicah. Ena izmed skupin nekodirajočih RNA so tudi majhne nukleolarne RNA (snoRNA; angl. *small nucleolar RNAs*). To je skupina enoverižnih nekodirajočih RNA, dolgih med 60 in 300 nukleotidov, glavna vloga večine preučevanih snoRNA pa je povezana s posttranskripcijskimi modifikacijami ribosomskih RNA (rRNA) ter malih jedrnih RNA (snRNA) (23). Verjetno so snoRNA evolucijsko zelo ohranjene prav zaradi svoje funkcije modificiranja rRNA, poleg tega pa lahko njihove homologe najdemo celo pri prokariontih (24,25). Nastanejo iz intronov, izrezanih iz kodirajočih ali nekodirajočih prepisov. Geni za snoRNA so lahko posamični (monocistranski), kar je

pravilo pri večini sesalskih snoRNA, ali pa tvorijo policistronske grozde, kar pomeni, da se gen za določeno specifično snoRNA na nekem odseku DNA večkrat ponovi, do česar pride pogosto npr. pri muhah in rastlinah (26, 27). Tudi pri sesalskih snoRNA obstajajo izjeme – tako se zapis za snoRNA, imenovano SNORD115 (staro poimenovanje HBII-52), pri človeku v obliki intronskih gruč ponovi kar 47-krat (več o tej snoRNA v poglavju 1.4.1.), zapis za SNORD116 pa 27-krat. Po prepisu iz DNA se prekursorji snoRNA iz primarnih transkriptov sprostijo v procesu izrezovanja intronov/povezovanja eksonov, nato eksonukleaze odcepijo 5'- in 3'-končna nukleotidna zaporedja, ki niso zaščitena s partnerskimi proteini. V procesu zorenja snoRNA prehajajo skozi Cajalova telesca, kjer doživljajo dodatne encimske modifikacije, preden se zberejo v jedru, kjer tudi opravljajo svojo funkcijo (28). Molekule snoRNA glede na ohranjenost strukturnih motivov, ki definirajo izbiro partnerskih proteinov in specifično funkcijo ribonukleoproteinskih kompleksov, razdelimo v dve družini. Prve so snoRNA, ki imajo ohranjen motiv H/ACA (imenovane SNORA), druge pa imajo motiv C/D in se imenujejo SNORD, temu imenu pa nato sledi še zaporedna številka določene snoRNA (23, 29). Molekule družine snoRNA skupaj z efekorskimi proteini tvorijo funkcionalne snoRNA-ribonukleoproteinske komplekse (snoRNP), ki skrbijo za posttranskripcijske modifikacije tarčnih RNA. Pri tem snoRNA s tvorbo Watson-Crickovih baznih parov s tarčnimi RNA usmerjajo partnerske encime na specifične nukleotide. V večini primerov so tarče snoRNA rRNA in snRNA. Funkcija, ki jo opravljajo snoRNA iz družine SNORD, je usmerjanje metilacije na 2'-O mestu na ribozi, tiste iz družine SNORA pa sodelujejo pri spremembi uridinov v psevdouridinske izomere (psevdouridilacija) (23, 29). Obe družini imata za opravljanje funkcije oz. za vezavo na tarčno RNA ohranjene določene motive –krajše dele nukleotidnega zaporedja in tridimenzionalno strukturo, ki so odgovorni za nastajanje snoRNP in za njihovo lokalizacijo v celici. Družina SNORD (motiv C/D) ima tako oster zavo v obliki steblo-izboklina-steblo, na vsakem steblo pa se nahaja po eno zaporedje C (RUGAUGA, pri čemer je R lahko A ali G) in D (CUGA). Motiv zaporedja C se navadno nahaja v bližini 5'-konca, motiv D pa v bližini 3'-konca. Metilacija na 2'-O mestu riboze, ki jo običajno usmejujejo SNORD, se nahaja pet nukleotidov navzgor od motiva CUGA. Encim, ki opravlja metilacijo na substratu, je fibrilarin (pri kvasovkah imenovan Nop1), poleg tega pa so za delujoč C/D snoRNP pri evkariontih potrebni še trije proteini, Nop56, Nop58 ter manjši protein 15.5K (pri kvasovkah poznan kot Snu13) (23,30). snoRNA iz družine SNORA (motiv H/ACA) so navadno večje kot tiste iz družine SNORD. Njihova

sekundarna struktura je sestavljena iz dveh ostrih zavojev oblike steblo-izboklina-steblo, ki sta ločena z linkerjem (angl. *hinge region*), ki vsebuje zaporedje ANANNA (zaporedje H), kjer je N lahko katerikoli nukleotid, drugo ohranjeno zaporedje/motiv pa je motiv ACA, ki se nahaja tri nukleotide navzgor od 3'-konca. Na eni ali obeh zankah se nahaja motiv, ki vsebuje notranji motiv z 9 do 13 nukleotidi (slika 6). Ta motiv je protismiselni element, ki se poveže s substratom, psevdouridilacija pa poteče 14 do 16 nukleotidov navzgor od motiva H in/ali ACA. Encim, ki opravlja psevdouridilacijo, je diskerin (pri kvasovkah znan kot Cbf5), dodatni proteini, ki sestavljajo H/ACA-snoRNP, pa so Gar1, Nhp2 in Nop10 (23, 30).



Slika 6: Značilna sekundarna struktura obeh družin snoRNA - C/D (A) in H/ACA (B) - in reakciji, ki ju ti družini katalizirata – metilacija riboze na 2'-O mestu (C) ter psevdouridilacija (D) (Prirejeno po 23).

Obstaja tudi posebna podskupina snoRNA, ki se imenuje scaRNA (angl. *small cajal RNA*) in svojo funkcijo, ki je verjetno modifikacija snRNA, opravlja v Cajalovih telescih. Motivi na scaRNA so enaki tistim na snoRNA (C/D ali H/ACA), toda s to razliko, da imajo scaRNA še svoj lasten motiv, ki je pogoj za lokalizacijo v Cajalova telesa (23, 28, 29). Domnevajo, da imajo snoRNA in scaRNA skupen izvor, saj so pri glisti *C. elegans* odkrili H/ACA snoRNA, imenovano ΨCeU5-48, ki je deloma homologna scaRNA U85 in U89 pri človeku in muhi (31).

1.3.1 snoRNA sirote (angl. *orphan snoRNA*)

snoRNA sirote so nekatere snoRNA, ki strukturno sicer spadajo v to družino, vendar nimajo komplementarnih regij na rRNA ali snRNA, in se pogosto izražajo le v posameznih tkivih, zlasti v možganih. Njihova funkcija tako še ni znana, za večino pa domnevamo, da prepoznavajo in vodijo modifikacije na drugih vrstah RNA (23,29). SNORD115 (v starejši literaturi poimenovana tudi HBII-52) je snoRNA, ki spada med snoRNA sirote, saj nima komplementarnega zaporedja na rRNA ali snRNA, temveč domnevno prepozna in veže mRNA 5-HT2c. Ta snoRNA je zanimiva iz več razlogov. Kljub temu da je prisotna v evkariontih, pri katerih ima posamezna snoRNA navadno le eno kopijo gena (27), imamo namreč ljudje kar 47 kopij gena za SNORD115, ki pa niso popolnoma identične (različne oblike (paralogi) so navedene v prilogi 1). Nahaja se na 15. kromosomu, na lokusu 15q11-q13, ki vsebuje še 27 ponovitev gena za SNORD116, 2 ponovitvi gena za SNORD9 ter gena za SNORD64 in SNORD10, ki prav tako spadajo med snoRNA sirote, ter nekaj genov, ki kodirajo proteine. Celoten lokus je predmet genetskega vtisnjenja – to je pojav, kjer se zaradi metilacije ali modifikacije histonov na alelu enega starša gen tega starša ne izrazi (32). Tu poteče genetsko vtisnjenje po materini strani, tako da se vsi geni tega lokusa izrazijo le po očetovi. Delecija dela 15. kromosoma na alelu po očetovi strani (ker se materin alel kljub intaktnosti ne izrazi) vodi do Prader-Willijevega sindroma. To je redka genska bolezen, katere simptomi so ob rojstvu slabša mišična moč oz. hipotonija ter težave pri hranjenju in posledično podhranjenost, ki jo še v zgodnjem otroštvu zamenja prenašanje (hiperfagija) ter s časom morbidna debelost. Pacienti s tem sindromom so ponavadi tudi nižje rasti, imajo majhna stopala in dlani, težave z vedenjem in so blago umsko zaostali (33). Večino teh simptomov sicer pripisujejo izgubi genov za SNORD116 (34, 35), čeprav je verjetno pri nekaterih fenotipskih značilnostih vsaj delni vzrok tudi izguba SNORD115.

1.4 SNORD115, alternativno povezovanje eksonov pre-mRNA receptorja 5-HT2c ter urejanje A v I

SNORD115 nima komplementarnega zaporedja na snRNA ali rRNA, ima pa evolucijsko ohranjeno komplementarno zaporedje alternativnemu eksonu Vb na mRNA serotoninškega receptorja 5-HT2c (slika 5). Mesto, na katerega se veže SNORD115, je na alternativnem eksonu, kot že omenjeno v poglavju 1.2. Če se SNORD115 ne veže na to mesto, se izrazi krajša oblika receptorja 5-HT2c, saj se ekson Vb ne vključi v mRNA. To povzroči premik

bralnega okvirja in s tem konec prevajanja že po treh transmembranskih domenah. Kishore in Stamm sta pokazala, da SNORD115 z vezavo na utiševalno zaporedje neposredno zavira izrez eksona Vb (oz. promovira njegovo vključitev v zrelo mRNA) (36). Vitali in sod. so nasprotno pokazali, da SNORD115 z usmerjanjem 2'-O metilacije na ribozi adenzina na položaju C vpliva na proces alternativnega povezovanja eksonov (spodbujena je vključitev eksona Vb, končni rezultat pa je aktiven receptor) (12). 2'-O metilacija adenzina C morda zavira urejanje A v I na tem položaju (kot so Yi-Brunozzi et al. pokazali v *in vitro*-poskusih z encimi ADAR na sinteznih substratih RNA) (37) in tako posredno vpliva na izbiro izrezovalnega mesta.

Urejanje A v I ima še eno pomembno posledico za aktivnost receptorja 5-HT_{2c}: znano je, da sprememba adenzina v inozin spremeni zaporedje aminokislin na znotrajcelični zanki receptorja (slika 5), ki interagira s proteinom G, kar zmanjša učinkovitost receptorja – večji kot je obseg modifikacij, manj učinkovita je sklopitev receptorja s proteinom G. Najbolj učinkovita izooblika receptorja 5-HT_{2c} torej nastane iz mRNA, na katero se je vezala SNORD115, hkrati pa na njej ni poteklo urejanje A v I. Ker urejanje A v I lahko poteče na petih različnih mestih, bi teoretično lahko nastalo 32 izooblik encima z različnim zaporedjem aminokislin v drugi znotrajcelični zanki, a obstoj vseh še ni bil dokazan. Glede medsebojnega vpliva urejanja A v I ter vezave SNORD115 lahko v literaturi najdemo precej različnih podatkov, od tega, da sta urejanje A v I in alternativno izrezovanje povezana procesa, do tega, da sta popolnoma neodvisna. Nekateri predvidevajo, da mora urejanje A v I (ki zahteva dvoverižno strukturo pre-mRNA, v katero sta vključena ekson Vb in intron V) poteči še pred alternativnim izrezovanjem intronov oz. da vezava snoRNA na mRNA onemogoča urejanje A v I (36).

2. NAMEN NALOGE

Posttranskripcijske modifikacije so pomembni mehanizmi, ki vplivajo na raznolikost transkriptoma pri evkariontih. Številne izmed njih so že podrobno raziskane, nekatere, kot je npr. urejanje RNA, pa imajo še precej neznank. V okviru naloge bomo spremljali dve različni posttranskripcijski modifikaciji – alternativno povezovanje eksonov ter urejanje RNA – na primeru izražanja gena za serotoninški receptor 5-HT_{2c}. V vzorcih RNA, ki so bili izolirani iz mišje celične linije P19 ob različnih časovnih točkah med nevrodiferenciacijo, bomo spremljali, kako se s časom spreminja nivo izražanja mRNA, ki kodira izooblike receptorja 5-HT_{2c}, in majhne nukleolarne RNA SNORD115. Z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času bomo ocenili razmerje med dolgo in kratko izoobliko mRNA *HTR2c*, rezultat pa preverili še z denzitometrično kvantifikacijo amplikonov v agaroznem gelu po verižni reakciji s polimerazo.

S pomočjo metode ICE (angl. *inozine chemical erasing method*) bomo preverili, ali na posameznih nukleotidih dejansko poteka urejanje A v I, s pomočjo določanja zaporedja nukleotidov s Sangerjevo dideoksi terminacijsko metodo pa bomo ugotovili delež urejanja A v I na posameznih mestih in spreminjanje tega deleža med nevrodiferenciacijo. Delež urejanja A v I bomo ugotovili iz razmerja višin vrhov gvanina (G) in adenzina (A) na mestih, na katerih poteka to urejanje. Pristop bomo validirali s subkloniranjem različic amplikonov segmentov gena za 5-HTR_{2c} v plazmid. V različnih razmerjih bomo pomešali plazmida z insertoma, ki pripadata mRNA, na katerih je ali ni prišlo do urejanja A v I na posameznih položajih. Vsaki taki zmesi plazmidov bomo analizirali nukleotidno zaporedje insertov in primerjali delež inozinov, ki smo ga določili na posameznih položajih, z dejanskim (tj. definiranim vnaprej). Tako bomo dobili umeritveno krivuljo, s katero bomo lahko ocenili občutljivost in natančnost metode analize nukleotidnega zaporedja v primerih, ko na analiziranem delu poteka urejanje A v I.

Z načrtovanimi analizami bomo dobili vpogled v posttranskripcijske modifikacije mRNA *HTR2c* v korelaciji z izražanjem SNORD115.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije

<i>Kemikalija</i>	<i>Proizvajalec</i>
agaroza	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
akrilonitril	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
barvilo etidijev bromid	ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, ZDA
ddH ₂ O	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
EtOH	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
ledocet	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Na ₂ -EDTA	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
nanašalno barvilo za gelsko elektroforezo DNA Loading Dye (6×)	ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, ZDA
NaOAc	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
trietilamin	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
tris(hidroksimetil)aminometan (Tris)	Riedel-de Haën AG, Nemčija

3.1.2 Začetni oligonukleotidi, kompleti, označevalci, reagenti

<i>Oligonukleotid, komplet, označevalec, reagent</i>	<i>Proizvajalec</i>
začetni oligonukleotid F1 (mRNA 5-HT2cR) TGGACGCTTGTTTCAATTC	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid R1 (mRNA 5-HT2cR) GGATAGGAAGTAACTCCTATTG	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid F2 (mRNA 5-HT2cR) CAATGCTACCAATTATTCTTAATGTC	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid R2 (mRNA 5-HT2cR) AACGATGGCAATCTTCATG	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid F-Actb (Actb) GGCTGTATTCCCCTCCATCG	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid R-Actb (Actb) CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid F-HPRT (HPRT) TCAGTCAACGGGGGACATAAA	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid R-HPRT (HPRT) GGGGCTGTAAGTCTTAACCAG	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid F-35a (SNORA35) CAAGTGACCCATTGGACTTTTTCTTG	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid R-35a (SNORA35) TGTGACTCTCCCATCTTTCGG	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid F-45a (SNORD 45) ATGGCATGTATTAGCTGAATGCTAACC	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA

začetni oligonukleotid R-45a (SNORD 45) AAGGTCTCAGTGTAATTTGTAACCTTGC	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid F-115a (SNORD115) AATGTCATGAAGAAAGGTGATGAC	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid R-115a (SNORD115) CTCAGCGTAATCCTATTGAGCAT	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid F-115b (SNORD115) TCAATGATGACAACCCAATGTC	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid R-115b (SNORD115) CTCAGTGTAATCCTATTGAGCATG	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid F-116a (SNORD116) ATCTATGATGATCCAGTCAAACATTC	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid R-116a (SNORD116) TCACTCATTTTGTTCAGCTTTTCC	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid F-116b (SNORD116) CCAGTCAAACATTCCTTGGAAG	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid R-116b (SNORD116) GATGAGAGTGGCGGTACAG	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid F-ADAR2 (ADAR2) GTGACAAGATAGCACGCTGGAAC	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid R-ADAR2 (ADAR2) TATGTTGGAGATCCGCTGGTACATG	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid F-ADAR1 (ADAR1) CAGAGGCACTGTGGATGGAC	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid R-ADAR1 (ADAR1) CATAGTCACGGGCAGCTTTCTTG	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid F1-m5HTR2c (5-HT2cR) CTAGATATTTGTGCCCGTCTG	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
začetni oligonukleotid R1-m5HTR2c (5-HT2cR) GTCATTGAGCACGCAGGTAGTA	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
2×PCR Master Mix	ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, ZDA
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, ZDA
označevalec velikosti Gene Ruler™ DNA Ladder	ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, ZDA
DNA-polimeraza Pfu	ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, ZDA
zmes dNTP (aa 2mM)	ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, ZDA
komplet za reverzno transkripcijo OmniScript	Qiagen, Hilden, Nemčija
komplet za reverzno transkripcijo Superscript VILO	ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, ZDA
komplet za izolacijo amplikonov QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Nemčija
komplet za izolacijo plazmidov GeneElute	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, ZDA

3.1.3 Pufri in raztopine

<i>Pufer ali raztopina</i>	<i>Sestava in predpis</i>
pufer TAE	242 g Tris 18,61 g Na ₂ -EDTA 57,1 ml ledocet Voda (ddH ₂ O) do 1L
cianoetilacijski pufer	Sestava: 50 % EtOH 1,1 M trietilamin × acetat (pH 8,6) Predpis: 100 % EtOH 5 ml Trietilamin 1,534 ml Ledocet ~ 550 µl NF dH ₂ O 2,916 ml

3.1.4 Biološki material

<i>Bakterije</i>	<i>Proizvajalec</i>
bakterijski sev <i>E. coli</i> TOP10 (kompetentne celice)	ThermoFisher Scientific

3.1.5 Gojišča

<i>Gojišče,</i>	<i>Sestava in predpis</i>
gojišče LB	Sestava: 10 g tripton 5 g kvasni ekstrakt 10 g NaCL - sestavine raztopimo v ~800 ml deionizirane vode, nato dodamo še vodo do 1 l, - pred uporabo gojišče avtoklaviramo 20 min pri temperaturi 121 °C
LBA-Amp/IPTG/X-gal	Sestava: 1000 ml gojišča LB 15 g agar 1 ml ampicilin (100 mg/ml) 2 ml 2 % X-gal (v DMF) 1 mL 1M IPTG

3.1.6 Plazmidi

<i>Plazmid</i>	<i>Proizvajalec</i>
plazmid pGEM-T Easy	Promega, Madison, WI, ZDA

3.1.7 Laboratorijska oprema

<i>Oprema</i>	<i>Proizvajalec</i>
avtoklav Systec 2540 EL	Bel-Art Products, Pequannock, NJ, ZDA
pipete (0,5-10, 10-100, 100-1000, 1000-5000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
mikrotitrne ploščice	TPP
elektroforezna kadička B1A Easy cast mini gel	Owl, Portsmouth, NH, ZDA
vir napetosti elektroforezne kadičke powerEase 500	Novex, Frankfurt, Nemčija
precizna tehtnica Exacta 610 EB	Tehtnica, Železniki, Slovenija
analitska tehtnica AB104	Mettler-Toledo, Küssnacht, Švica
centrifuga centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
stresalnik Vibromix 104 EV	Tehtnica, Železniki, Slovenija
spektrofotometer NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, ZDA
sistem za analizo in dokumentacijo gelov ter membrane G-box	Syngene, Frederick, MD, ZDA
Lightcycler 480	Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, ZDA
ciklični termostat AB GeneAmp® PCR System 2700	Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA
sistem za analizo in dokumentacijo gelov G-box	Syngene, Frederick, MD, ZDA

3.2 Eksperimentalne sheme

3.2.1 Spremljanje nivojev izražanja izbranih genov v vzorcih miške celične linije P19 med nevrodiferenciacijo

Reverzna transkripcija, (3.3.2.2)

redčenje vzorcev,

qPCR v mikrotitrskih ploščicah (3.3.3.1)

↓

Gelska elektroforeza (3.3.4)

3.2.2 Optimizacija metode ICE

3.2.2.1 Preverjanje koncentracije RNA v vzorcih, testiranje začetnih oligonukleotidov za metodo ICE

Spektrofotometrična določitev koncentracije RNA v vzorcih iz mišjih možganov (3.3.1)

↓

reverzna transkripcija s kompletoma Omniscript ali Superscript VILO (3.3.1.1 in 3.3.1.2)

Testiranje začetnih oligonukleotidov – dve ločeni verižni reakciji s polimerazo (R1 in F1, R2 in F2) (3.3.3)

↓

Gelska elektroforeza (3.3.4)

↓

Ponovno testiranje začetnih oligonukleotidov (drugačna temperatura prileganja, Pfu DNA-polimeraza) (3.3.3)

↓

Gelska elektroforeza (3.3.4)

3.2.2.2 Testiranje učinka cianoetilacije na reverzno transkripcijo na vzorcu, izoliranem iz mišjih možganov

Cianoetilacija RNA v testnem vzorcu (cca. 600 ng) (3.3.5),

čiščenje/koncentriranje RNA s kompletom RNA Clean/Concentration Kit,

spektrofotometrična ocena koncentracije RNA (3.3.1)

↓

RT-PCR a) s Superscript VILO b) z OmniScript (3.3.2.1 in 3.3.2.2)

↓

Verižna reakcija s polimerazo – PCR št. 1 (Pfu DNA-polimeraza, F1+R1) (3.3.3),
vgnezdena verižna reakcija s polimerazo – PCR št. 2 (Pfu DNA-polimeraza, F2+R2)
(3.3.3.2)

↓

Gelska elektroforeza (3.3.4),
spektrofotometrična določitev absorpcijskega profila (3.3.1) po izolaciji ampliconov s
kompletom QIAquick PCR Purification Kit

↓

Priprava vzorcev za določanje nukleotidnega zaporedja z začetnima oligonukleotidoma F2
ali R2 (3.3.6)

3.2.2.3 Ponovitev postopka z drugačnimi pogoji cianoetilacije na testnem vzorcu (cca. 600 ng)

Ponovitev cianoetilacije pri milejših in ostrejših pogojih (CE in CE++) (3.3.5)

↓

Izolacija RNA s kompletom RNA Clean/Concentration Kit,
spektrofotometrična določitev koncentracije (3.3.1)

↓

Reverzna transkripcija s SuperScript VILO s po 100 ng RNA (3.3.2.2)

↓

Verižna reakcija s polimerazo (R1+F1) ter vgnezdene verižne reakcije s polimerazo
(R2+F2) (3.3.3.2),

čiščenje ampliconov s kompletom QIAquick PCR Purification Kit,
spektrofotometrična določitev koncentracije (3.3.1)

↓

Določanje nukleotidnega zaporedja z začetnim oligonukleotidom F2 (3.3.6)

3.2.3 Dokaz urejanja A v I z metodo »Inosine Chemical Erasing« (ICE) na vzorcu celične linije P19 št. 13

Cianoetilacija RNA na delu testnega vzorca št.13 (cca. 600 ng) (3.3.5),

↓

Reverzna transkripcija s kompletom SuperScript VILO (3.3.2.2)

↓

Redčenje cDNA (vzorci št. 7–18),
verižna reakcija s polimerazo (3.3.3)

↓

Gelska elektroforeza (3.3.4) in spektrofotometrično določanje koncentracije (3.3.1)

↓

PCR1, redčenje, PCR2 (3.3.3.2)

↓

Gelska elektroforeza (CE+, CE-), čiščenje vzorca PCR2 (3.3.4)

↓

Določanje nukleotidnega zaporedja vzorcu št. 13 po cianoetilaciji ali brez z začetnim oligonukleotidom F2 (3.3.6)

3.2.4 Spremljanje obsega urejanja A v I pri vzorcih RNA iz mišje celične linije P19, nevrodiferencirane z retinojsko kislino z določanjem zaporedja nukleotidov

redčenje cDNA (vzorci št. 7–18),
verižna reakcija s polimerazo (3.3.3)

↓

Gelska elektroforeza (3.3.4) in spektrofotometrično določanje koncentracije (3.3.1)

↓

PCR1, redčenje, PCR2 (3.3.3.2)

↓

Gelska elektroforeza, čiščenje vzorca PCR2 (3.3.4)

↓

Določanje nukleotidnega zaporedja cDNA 12 vzorcev po 0, 2, 4 oz. 6 dneh
nevrodiferenciacije z začetnim oligonukleotidom F2 (3.3.6)

3.2.5 Določanje razmerja med kratko in dolgo izoobliko mRNA receptorja 5-HT_{2c} na 12 vzorcih celične linije P19 med nevrodiferenciacijo

Redčenje cDNA,

reverzna transkripcija (3.3.2),

↓

»Touchdown« verižna reakcija s polimerazo (3.3.3.3)

↓

Gelska elektroforeza (3.3.4),

denzitometrična analiza razmerja amplikonov (3.3.3.3)

3.2.6 Validacija kvantitativne analize urejanja A v I s Sangerjevo metodo določanja zaporedja nukleotidov

RT vzorca RNA iz mišjih možganov s Superscript VILO (3.3.1.2)

↓

Verižna reakcija s polimerazo (začetna oligonukleotida F2 in R2) (3.3.3)

↓

Agarozna elektroforeza (3.3.4), izolacija amplikona (280bp) iz gela (3.3.7),
spektrofotometrično določanje koncentracije (3.3.1)

↓

Ligacija amplikona v plazmid pGEM T-Easy (3.3.8)

↓

Transformacija bakterijskih celic *E. coli* TOP10 z metodo toplotnega šoka (3.3.9)

in prenos na agarno gojišče LB (3.3.10)

↓

Precep 10 kolonij *E. coli* TOP10/pGEM T-Easy-amplikon v gojišče LB,
izolacija plazmidne DNA (3.3.11),
spektrofotometrična ocena koncentracije (3.3.1),
redčitev plazmidne DNA (3.3.11)



Določanje nukleotidnega zaporedja vzorcem desetih naključnih kolonij,
izbor vzorcev, ki sta bila najbolj oz. najmanj podvržena urejanju A v I,
mešanje teh dveh vzorcev v različnih razmerjih ter ponovno določanje nukleotidnega
zaporedja zmesem (3.3.6.1)

3.3 Metode

3.3.1 Spektrofotometrična ocena koncentracije nukleinskih kislin v vzorcu

Z aparatom NanoDrop smo spektrofotometrično (z merjenjem absorbance pri 260 nm) določili koncentracijo nukleinskih kislin ter ocenili prisotnost morebitnih nečistot v vzorcih iz razmerja vrednosti A_{260}/A_{230} ter A_{260}/A_{280} .

3.3.2 Reverzna transkripcija (RT-PCR)

Reverzna transkripcija je reakcija, pri kateri se RNA, ki je prisotna v vzorcu, s pomočjo encima reverzne transkriptaze prepíše v komplementarno DNA (cDNA). Zaradi vseprisotnih RNaz, ki nam lahko razgradijo RNA v vzorcu, je reakcija zelo občutljiva na čistočo, uspešnost prepisa pa je odvisna tudi od kvalitete in kvantitete RNA v vzorcu. V okviru eksperimentalnega dela smo reverzno transkripcijo izvajali z dvema različnima kompletoma, OmniScript ter SuperScript VILO. V cDNA smo prepisali RNA, izolirano iz mišjih možganov (vzorec hipotalamusa pridobljen skladno z dovoljenjem etične komisije – vezano na projekt *Funkcionalna analiza nekodirajočih RNA pri Parkinsonovi bolezni*; J3-0488 (ARRS)), ter RNA, izolirano iz mišje pluripotentne celične linije P19, pri kateri smo z retinojsko kislino izzvali proces nevrodiferenciacije (38). Celično diferenciacijo in izolacijo RNA je opravil Miha Modic (Institute of Stem Cell Research, German Research Center for Environmental Health, Helmholtz Center Munich, 85764 Neuherberg, Nemčija).

3.3.2.1 OmniScript

Reverzno transkripcijo z OmniScript smo izvajali po navodilih proizvajalca, s predhodno toplotno denaturacijo RNA ali brez (39) V cDNA smo prepisali mRNA *HTR2c*, izolirano v mišjih možganov, pri čemer smo uporabili začetni oligonukleotid Fx.

3.3.2.2 SuperScript VILO

Reverzno transkripcijo s SuperScript VILO smo izvedli po navodilih proizvajalca (40). V cDNA smo s pomočjo naključnih heksanukleotidov prepisali celotno populacijo RNA, izolirano iz celične linije P19 ali mišjih možganov.

3.3.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) ter njene različice

Verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction* oz. PCR) je osnovna metoda molekularne biologije, ki nam omogoča ciklično podvajanje tarčnega odseka DNA,

kar omogoča analizo prisotnosti določenega odseka DNA v vzorcu, njegovo pomnoževanje ipd. Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (angl. *quantitative polymerase chain reaction* oz. qPCR) je nadgradnja te metode, ki nam je z dodatkom barvila na temelju fluorescence omogočila določanje količine produkta že med reakcijo po vsakem posameznem ciklu. V reakcijo smo poleg vzorca cDNA, ki nam predstavlja matrico, dodali par specifičnih začetnih oligonukleotidov, termostabilno DNA-polimerazo (Taq ali Pfu), ddH₂O ter pufer in deoksinukleotid trifosfate (dNTP). Reakcija je potekala v treh fazah, ki so potekle v več ciklih – v prvi se je dvoverižna DNA pri visoki temperaturi denaturirala oz. razklenila, v drugi je potekalo prileganje začetnih nukleotidov na DNA, v zadnji pa podaljševanje verig DNA (41, 42). Pri qPCR zaključno podaljševanje verig ni potrebno. Pomnoženo DNA smo nato analizirali z agarozno gelsko elektroforezo.

3.3.3.1 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo

Za začetek smo analizirali izražanje izbranih genov v 12 vzorcih celične linije P19 med nevrodiferenciacijo (odvzeti so bili po trije vzorci na posamezno časovno točko, v času 0 (vzorci 7–9), po dveh (vzorci 10–12), štirih (vzorci 13–15) ali šestih dneh tretiranja z retinojsko kislino (vzorci 16–18)) z metodo qPCR. Vzorce cDNA (po 625 pg) smo v treh ponovitvah v 10- μ l reakcijah nanegli na mikrotitrsko ploščico ter izvedli qPCR-analizo. Reakcijske zmesi ter temperaturni pogoji so navedeni v preglednici 1.

Preglednica 1: Temperaturni program in ostali pogoji reakcije qPCR

Pari oligonukleotidov	F-115a/R-115a	F-115b/R-115a F-115b/R-115b F-116b/R-116b F-116a/R-116b F-45a/R-45a	F-5HTR2c_L/ R-5HTR2c_L F-5HTR2c_S/ R-5HTR2c_S	F-116a/R-116a F-35a/R-35a
Koncentracija začetnih oligonukleotidov	300 nM	300 nM	200 nM	200 nM (F-116a/R-116a), 300 nM (F-35a/R-35a)
aktivacija DNA polimeraze	95 °C (10 min)			
denaturacija DNA	95 °C (20 s)	95 °C (20 s)	95 °C (20 s)	95 °C (20 s)
prileganje začetnih oligonukleotidov	48 °C (45 s)	50 °C (30 s)	55 °C (30 s)	52 °C (30 s)
podaljševanje verig s polimerazo (45 ciklov)	72 °C (30 s)	72 °C (30 s)	72 °C (30 s)	72 °C (30 s)
snemanje talilne krivulje amplikonov	reakcijska zmes segreta do 90 °C, nato postopoma ohlajena do 40 °C; kontinuirano spremljanje fluorescence med ohlajanjem			

Analizo izražanja različnih genov smo opravili tako, da smo izražanje normalizirali na predhodno izbrana referenčna gena *Actb* in *HPRT* (T. Bratkovič). Izračun smo izvedli po sledeči formuli:

$$relativno\ izražanje = \frac{GEOMEAN(E_{Actb}^{Cp(Actb)}, E_{HPRT}^{Cp(HPRT)})}{E_{ig}^{Cp(ig)}}$$

pri čemer E označuje učinkovitost pomnoževanja gena med verižno reakcijo s polimerazo (angl. *efficiency*; ocenjeno s preliminarnimi analizami (T. Bratkovič)), GEOMEAN je geometrijska sredina vrednosti v oklepaju, *ig* pa označuje posamezen izbran gen (oz. kombinacijo začetnih oligonukleotidov) v istem vzorcu.

3.3.3.2 Vgnezdena verižna reakcija s polimerazo

Posebnost vgnezdene verižne reakcije s polimerazo je, da reakcijo izvedemo dvakrat zapored z dvema različnima paroma začetnih oligonukleotidov, pri čemer mora imeti par oligonukleotidov, uporabljen pri drugi reakciji, komplementarno zaporedje znotraj amplikona iz prve reakcije (primer je v prilogi 4). V prvi reakciji, ki ima ponavadi manj ciklov, prvi par oligonukleotidov iz DNA pomnoži želeni amplikon, v drugi reakciji pa

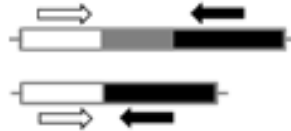
drugi par pomnoži del amplikona iz prve reakcije. Rezultat tega je večja specifičnost reakcije in posledično manjša verjetnost nastanka stranskih produktov, saj lahko en par začetnih oligonukleotidov slučajno pomnoži še kakšen drug del osnovne verige DNA, da bi dva para oligonukleotidov po naključju zaporedoma pomnoževala isti odsek, pa je zelo malo verjetno. Pri laboratorijskem delu za magistrsko nalogo smo vgnezdene verižno reakcijo uporabili pri metodi ICE. Pri pomnoževanju mRNA za 5-HT_{2c}R pri prvi reakciji smo uporabili par začetnih oligonukleotidov F1/R1, pri drugi reakciji pa par F2/R2, ki pomnoži odsek amplikona iz prve reakcije. Prvo reakcijo smo izvajali s 25 ng cDNA, pri drugi smo uporabili amplikon prve, ki smo ga redčili v razmerju 1:79. Temperaturni program je naveden v preglednici 2.

Preglednica 2: Pogoji vgnezdene verižne reakcije s polimerazo.

			PCR1 (oligonukleotida F1/R1)	PCR2 (oligonukleotida F2/R2)
Proces	Čas	T	Število ciklov	Število ciklov
aktivacija DNA polimeraze	3 min	95 °C	/	/
denaturacija DNA	30 s	95 °C	30	25
prileganje začetnih oligonukleotidov	30 s	51 °C		
podaljševanje verig s polimerazo	60 s	72 °C		
zaključno podaljšanje verig DNA	4 min	72 °C	/	/

3.3.3.3 »Touchdown« verižna reakcija s polimerazo

To je variacija verižne reakcije s polimerazo, pri kateri postopoma znižujemo temperaturo prileganja. Navadno je temperatura pri začetnih ciklih nekaj (3–5) °C nad T_m začetnih oligonukleotidov, pri kasnejših ciklih pa 3–5 °C pod to temperaturo. Cilj te metode je omejitev verjetnosti nastajanja nespecifičnih produktov – višje temperature prileganja v prvih ciklih omogočajo boljšo specifičnost začetnih oligonukleotidov, nižje temperature v kasnejših ciklih pa bolj učinkovito podvajanje verig DNA (43). V našem primeru smo to reakcijo uporabili za določanje razmerja koncentracij izooblik gena za receptor 5-HTR_{2c}. 22 ng cDNA smo uporabili v 15 µL reakciji z začetnima oligonukleotidoma F1-m5HTR_{2c} ter R1-m5HTR_{2c} (slika 7).



Slika 7: Pri tej reakciji smo pare uporabili oligonukleotidov F1-m5HTR2c ter R1-m5HTR2c., ki imajo mesta prileganja izbrana tako, da se med verižno reakcijo s polimerazo pomnožita mRNA obeh izooblik receptorja 5-HT_{2c}. Bel pravokotnik označuje ekson Va, siv alternativni ekson Vb, črn pa ekson VI. Bela puščica predstavlja oligonukleotid F1-m5HTR2c, črna pa R1-m5HTR2c. (Slika je izrisal T. Bratkovič).

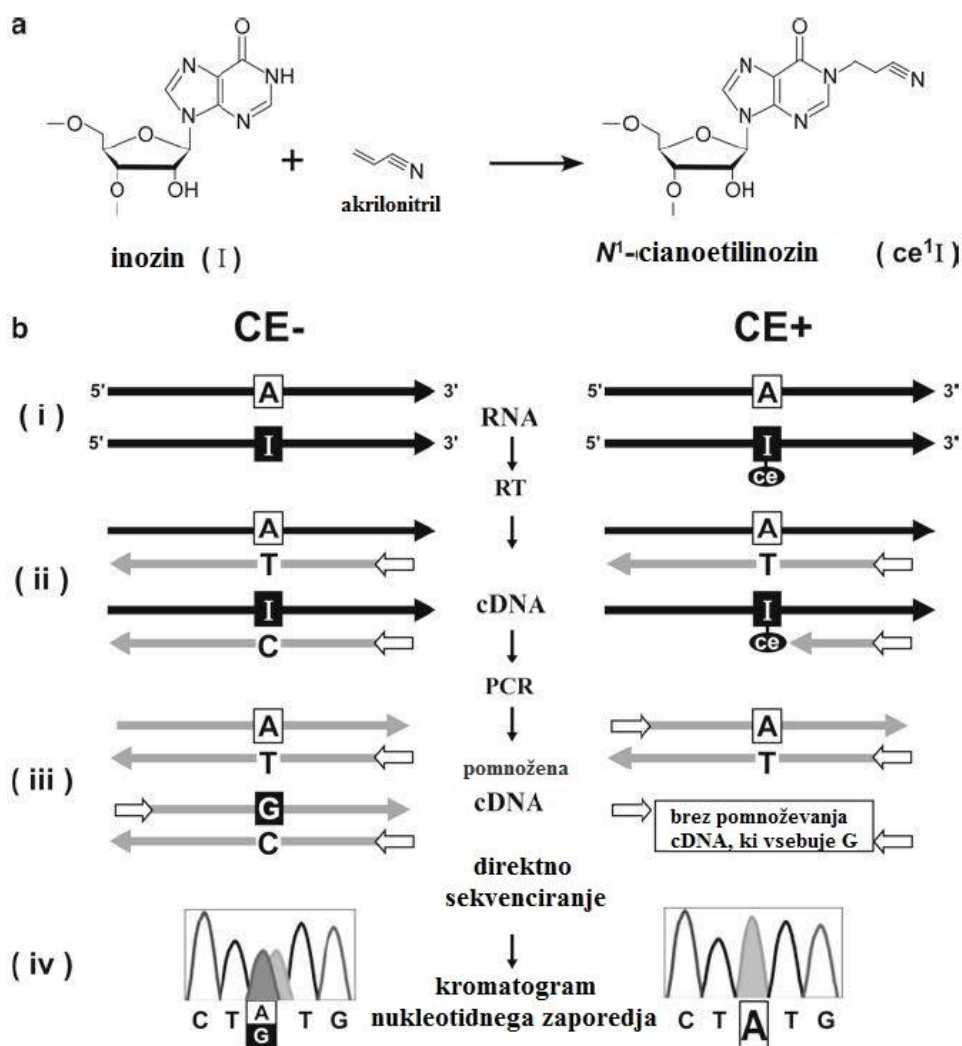
Reakcijo smo izvajali s Taq-polimerazo. Temperaturni program je bil sledeč: 30 ciklov, dolgih 30 sekund pri 95 °C, 2 minuti pri 60 °C, pri čemer se je temperatura vsak cikel znižala za 0,5 °C, nato 2 minuti pri 72 °C, ki jima je sledilo 15 ciklov, dolgih 30 sekund pri 95 °C, 1 minuta na 45 °C ter 1 minuta pri 72 °C. Končno podaljševanje je potekalo 7 minut pri temperaturi 72 °C. Amplikone smo nato ločili z gelsko elektroforezo v 2,5% agaroznem gelu, obarvanim z etidijevim bromidom, intenziteto fluorescence pa smo izmerili s sistemom za analizo in dokumentacijo gelov G-Box ter dodatno analizirali s programom GeneTools, pri čemer smo signale normalizirali glede na dolžino ampliconov.

3.3.4 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je metoda ločevanja nukleinskih kislin glede na njihovo velikost. Manjše nukleinske kisline po gelu potujejo hitreje, večje pa počasneje. Splošna hitrost potovanja nukleinskih kislin je odvisna od zamreženosti gela oz. od velikosti por, ta pa od koncentracije agaroze, ki smo jo zato prilagajali velikosti ampliconov. S to metodo smo po reakciji verižne reakcije s polimerazo preverjali uspešnost pomnoževanja ampliconov. S primerjavo velikosti ampliconov z velikostnimi označevalci (GeneRuler Mix) smo preverjali, ali so ampliconi ustrezno veliki, hkrati pa smo analizirali tudi prisotnost morebitnih neželenih produktov. Priprava agaroznega gela je potekala tako, da smo natehtali ustrezno količino agaroze glede na želeno gostoto gela, ji dodali ustrezno količino pufera TAE ter zmes segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se ni raztopila vsa agarozna. Raztopini smo dodali barvilo etidijev bromid, nato pa jo nalili v elektroforezno kadičko, vstavili glavniček za žepke ter počakali, da raztopina gelira. Po ohladitvi in zgostitvi gela smo v kadičko do oznake nalili pufer TAE, nato pa v žepke nanесли vzorce, ki smo jim predhodno dodali nanašalni pufer v količini 1/6 volumna vzorca. Elektroforeza je nato potekala pri napetosti cca. 100 V, in sicer od 45 minut do 1 ure – konec smo izbrali glede na to, kdaj je barvilo bromfenol modro prepotovalo ustrezno razdaljo. Na koncu smo gel analizirali na transiluminatorju, ki gel presvetli z UV-svetlobo.

3.3.5 Metoda »Inozine Chemical Erasing« (ICE)

ICE je relativno nova metoda, ki nam je omogočila ugotavljanje mest, kjer je med nevrodiferenciacijo celične linije P19 z retinojsko kislino poteklo urejanje A v I. Osnovna ideja metode je bila, da smo na delu vzorca RNA najprej izvedli reakcijo cianoetilacije. Pri tej reakciji smo 600 ng RNA dodali akrilonitril, zato je na vseh inozinih na RNA (ti so rezultat urejanja A v I) potekla Michaelova adicija, pri čemer smo na teh mestih dobili N-cianoetilinozine. Reakcijo smo pustili teči 20 minut pri temperaturi 70 °C, nato smo jo ustavili s prestavitvijo na led in dodatkom NF dH₂O, RNA pa smo očistili s kompletom RNA clean/concentration kit. Nato smo ločeno izvedli naslednje korake pri cianoetiliranem (CE+) in netretiranem (CE-) vzorcu (slika 8). Najprej smo izvedli reverzno transkripcijo, pri kateri polimeraza inozin zazna kot gvanozin (in posledično na cDNA dobimo citozin), N-cianoetilinozin pa ovira nadaljnje prepisovanje. V vzorcu, na katerem smo izvedli reakcijo cianoetilacije, je po reverzni transkripciji prisotna v polni dolžini le cDNA, ki ni bila tarča urejanja A v I. Za tem smo izvedli vgnezdene verižne reakcije s polimerazo ter amplikonoma določili nukleotidno zaporedje.



Slika 8: Reakcija cianoetilacije inozina (a) ter potek metode ICE (b), kot je opisan v tem poglavju. Potek reakcij vodimo na dveh alikvotih vzorca, pri čemer na enem od njiju predhodno izvedemo reakcijo cianoetilacije (i). Na obeh alikvotih nato izvedemo reverzno transkripcijo (RT) (ii), nastalo cDNA pomnožimo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) (iii), amplikonoma pa določimo zaporedje nukleotidov (iv). Na mestih, na katerih poteka urejanje A v I in so torej prisotni inozini, bo pri cianoetiliranem alikvotu prisoten le vrh A, pri netretiranem alikvotu pa bosta deloma prisotna tako G kot A. Ta rezultat nam kvalitativno potrди, da na teh mestih res poteka urejanje A v I (prirejeno po 44).

Rezultat sekvenciranja obeh alikvotov istega vzorca je ta, da v netretiranem opazimo na nekaterih mestih prekrivanje signalov (vrhov) A in G, razmerje med višino vrhov pa poda informacijo o obsegu deaminacije adenzinov. Alikvot vzorca, na katerem smo prej izvedli reakcijo cianoetilacije, pa ima na mestih, kjer je poteklo urejanje A v I, le vrhove A, saj se RNA, na kateri je poteklo urejanje A v I, pri reverzni transkripciji ni mogla prepisati. Iz razmerja vrhov prvega vzorca smo torej razbrali odstotek urejanja A v I na posameznih mestih, cianoetiliran vzorec pa nam je, če so na teh mestih prisotni le vrhovi A, samo

kvalitativno potrdil, da je razmerje A in G na tem mestu res lahko le rezultat urejanja A v I in ne posledica kakšnih drugih dejavnikov, kot je npr. genski polimorfizem (44).

3.3.6 Določanje nukleotidnega zaporedja amplikonov

Določitev nukleotidnega zaporedja smo naročili pri podjetju GATC Biotech (Konstanz, Nemčija), kjer so uporabili metodo po Sangerju, ki zaporedje določi s pomočjo dodajanja fluorescenčno označenih dideoksinukleotidov. Z vključitvijo slednjih v verigo DNA se zaključijo podaljševanje, tako da dobimo zmes verig DNA vseh mogočih dolžin, s pomočjo katerih lahko potem na osnovi dolžine posamezne verige in njenega zadnjega nukleotida določimo nukleotidno zaporedje analiziranega vzorca. Vzorce smo pripravili v skladu z navodili izvajalca. Za sekvenciranje smo med testiranjem optimalnih pogojev metode ICE uporabili začetna oligonukleotida F2 in R2, nato pa za določanje zaporedja uporabljali le začetni oligonukleotid F2, ki se je izkazal za boljšo izbiro.

3.3.6.1 Določanje nukleotidnega zaporedja v plazmidih

Plazmide desetih kolonij smo redčili do 100 ng/ μ l. 5 μ l vsakega od desetih vzorcev smo poslali na sekvenciranje z začetnim oligonukleotidom F2. Nato smo izbrali plazmida z insertoma, ki pripadata RNA z največ in najmanj deaminiranimi adenozi, ter ju zmešali v naslednjih razmerjih: 9:1, 7:3, 5:5, 3:7 ter 1:9. Dobljenim petim vzorcem smo ponovno določili nukleotidna zaporedja (začetni oligonukleotid F2).

3.3.7 Izolacija amplikona iz elektroforeznega gela

Iz agaroznega gela, ki smo ga uporabili pri elektroforezi, smo s kompletom QIAquick Gel Extraction Kit izolirali amplikon DNA. Iz gela smo izrezali košček, v katerem se je nahajal amplikon. Proces izolacije temelji na raztapljanju agaroze ter na selektivni in kvantitativni adsorpciji DNA na silikagel v prisotnosti visoke koncentracije soli. V okviru tega procesa se od DNA odcepijo tudi proteini, ki so vezani nanjo, tako da nečistote (proteini, soli in agaroz) ostanejo v raztopini, DNA, ki se veže na silikagel, pa nato eluiramo z bazičnim pufrom, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5. Po eluciji izvedemo še centrifugiranje, pri čemer DNA ostane v supernatantu.

3.3.8 Ligacija

Za vstavljanje fragmentov DNA v plazmidni vektor uporabljamo reakcijo ligacije. Ta poteka pod vplivom encima DNA-ligaze, ki katalizira nastanek fosfodiesterne vezi med 5'-fosfatnim koncem enega nukleotida in 3'-hidroksilno skupino drugega, s čimer omogoča

povezovanje dveh koncev DNA. Pri ligaciji je ponavadi del DNA, ki ga vstavljamo v vektor, v prebitku. V našem primeru smo v 10 μ l reakciji uporabili 0,5 μ l encima NEB T4 DNA-ligaze, 50 ng plazmida pGem-T Easy, 1 μ l pufru za ligacijo, 5 \times množinski prebitek amplikona ter ddH₂O.

3.3.9 Transformacija

Bakterijske celice imajo lastnost, da lahko privzamejo DNA, kar imenujemo kompetenca. Z metodo transformacije lahko v gostiteljske celice vnašamo rekombinantno DNA, ki smo jo predhodno vgradili v plazmidni vektor. Transformacijo smo v našem primeru izvedli s toplotnim šokom, mogoči pa so tudi drugi načini, in sicer jo lahko sprožimo denimo z nekaterimi kemikalijami ali s kratkotrajno izpostavitvijo močnemu električnemu polju (elektroporacija).

Transformirali smo bakterijske celice seva *E. coli* TOP10. Ligacijski zmesi smo v mikrocentrifugirki dodali 200 μ l kompetentnih celic, ki smo jih predhodno odtalili na ledu, nato pa smo zmes 20 minut inkubirali pri 0 °C. Potem smo zmes za 45 sekund potopili v vodno kopel s temperaturo 42 °C ter jo za tem ponovno nekaj minut inkubirali na ledu. Dodali smo še 800 μ l gojišča LB ter med stresanjem inkubirali 1 h pri 37 °C. 100 μ l suspenzije smo po tem razmazali po gojišču LB/amp/IPTG/X-gal. Preostanek smo najprej centrifugirali, nato pa odstranili supernatant, bakterijske celice suspendirali v 100 μ l gojišča LB in jih nanесли na enako gojišče. Petrijevke smo preko noči inkubirali na 37 °C, naslednji dan pa jih shranili pri 4 °C.

3.3.10 Precep kolonij *E. coli*

Izmed tako pridobljenih kolonij *E. coli* TOP10/pGEM-T Easy z vstavljenim amplikonom 5HTR2c, pomnoženim z oligonukleotidnima začetnikoma F2 in R2, smo jih naključno izbrali 10, ki smo jih precepili v 5 mL gojišča LB, ki je vsebovalo 100 μ g/ml ampicilina. Bakterije kulture smo močno stresali pri 37 °C 18 ur.

3.3.11 Izolacija plazmidne DNA

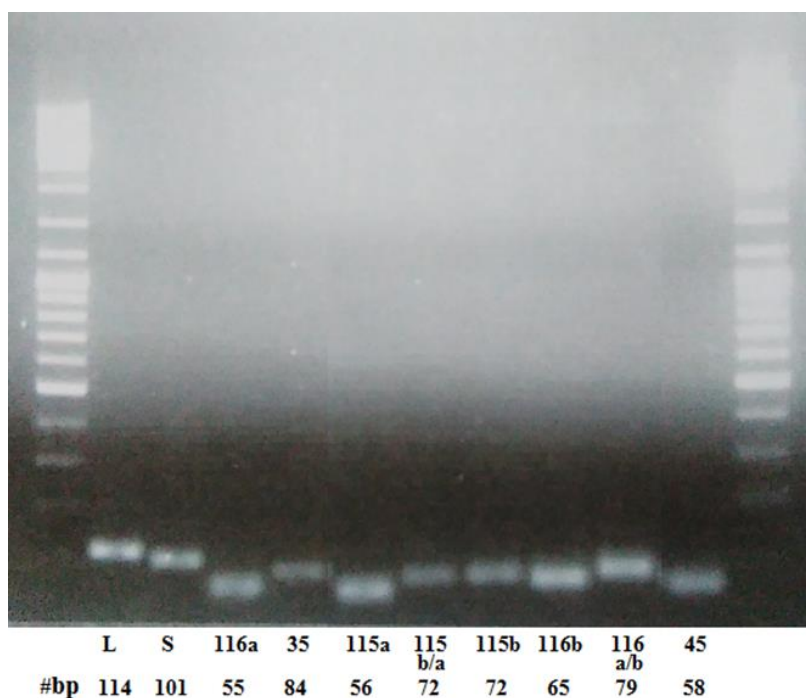
Plazmidno DNA smo iz bakterij *E. coli*/pGem-T Easy_HTR2c izolirali s kompletom GeneElute Plasmid Miniprep Kit po priporočilih proizvajalca. Postopek temelji na alkalni lizi bakterijskih celic v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS). Pri tem se bakterijska DNA in proteini denaturirajo. Plazmidna DNA se po nevtralizaciji lizata povrne v nativno obliko in ostane topna, medtem ko se genomsko DNA in proteini oborijo in jih odstranimo

s centrifugiranjem. Plazmidno DNA v supernatantu nato vežemo na silikagelno membrano, s katere jo eluiramo v 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Analiza izražanja izbranih genov med diferenciacijo celične linije P19 do nevronov

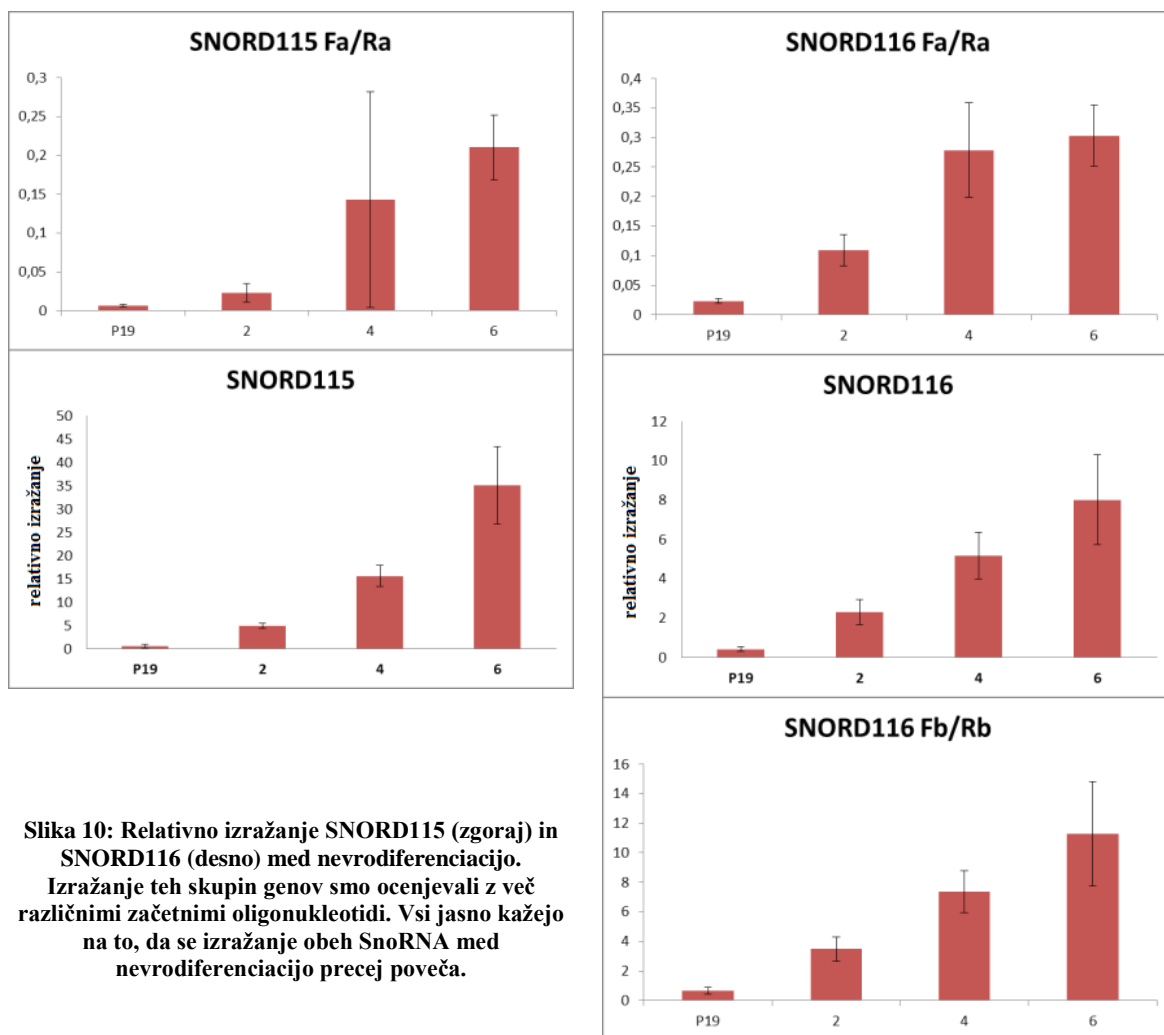
Vzorci RNA, izolirane iz celic P19, ki so bile tretirane z retinojsko kislino 0 dni (vzorci 7–9), 2 dneva (vzorci 10–12), 4 dni (vzorci 13–15) oz. 6 dni (vzorci 16–18), smo v reakciji reverzne transkripcije prepisali cDNA. Z metodo qPCR smo analizirali spremembe v izražanju izbranih genov med diferenciacijo pluripotentnih celic do nevronov. Rezultate smo normalizirali glede na nivo izražanja dveh referenčnih genov, *Actb* in *HPRT* (slike 8–11). Z analizo talilne krivulje ampliconov smo potrdili, da je pri pomnoževanju nastal en sam produkt (ni prikazano). Dodatno smo z gelsko elektroforezo na vzorcu št. 18 preverili, ali so ampliconi, ki so bile rezultat qPCR, ustrezne velikosti glede na uporabljen par začetnih oligonukleotidov (slika 9).



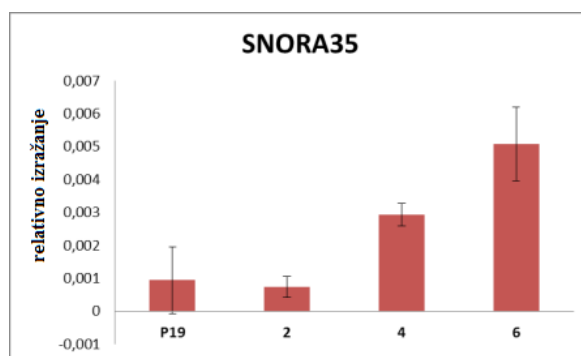
Slika 9: Analiza ampliconov, pomnoženih v reakcijah qPCR vzorca št. 18, z gelsko elektroforezo. L – amplicon dela dolge (long) izooblike cDNA receptorja 5-HT_{2c}. S – amplicon dela kratke izooblike tega receptorja. Ostale lise predstavljajo amplicone snoRNA (SNORD115, SNORD116, SNORA35 ter SNORD45), pomnožene z različnimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov. #bp je število baznih parov posameznega amplicona.

Izražanje večine analiziranih genov se je med nevrodiferenciacijo zvišalo. Precej se je zvišalo izražanje SNORD115 (slika 10), ki je domnevno odgovorna za alternativno spajanje eksonov receptorja 5-HT_{2c}, na osnovi česar bi pričakovali, da se poveča tudi delež dolge izooblike receptorja, a tega nismo uspeli potrditi (poglavji 4.2.1 in 4.2.2).

Povečalo se je tudi izražanje SNORD 116, kar je smiselno, saj se gruči genov obeh snoRNA nahajata na istem lokusu, ki se med nevrodiferenciacijo očitno zelo aktivira.



Slika 10: Relativno izražanje SNORD115 (zgoraj) in SNORD116 (desno) med nevrodiferenciacijo. Izražanje teh skupin genov smo ocenjevali z več različnimi začetnimi oligonukleotidi. Vsi jasno kažejo na to, da se izražanje obeh SnoRNA med nevrodiferenciacijo precej poveča.

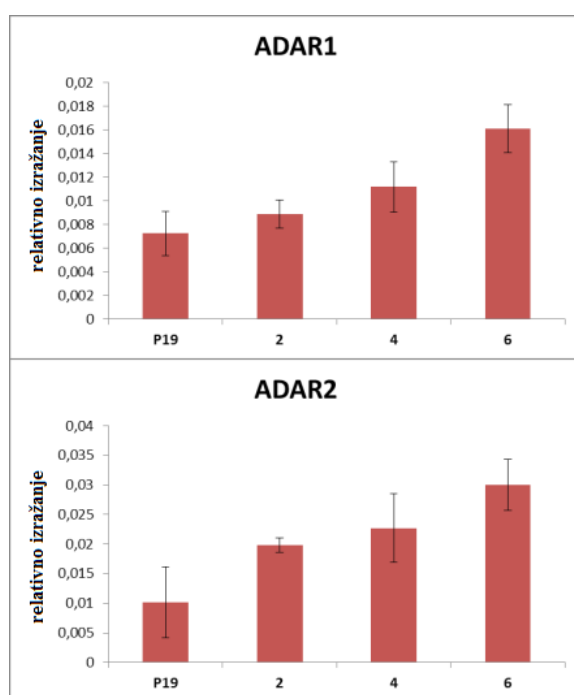


Slika 11: Relativno izražanje SNORA35 med nevrodiferenciacijo.

Med nevrodiferenciacijo se poveča tudi ekspresija snoRNA SNORA35 (staro poimenovanje HBI-36) (slika 11), kar je prav tako pričakovano, saj se ta snoRNA izraža

specifično v možganih, predvsem v horoidnem pleksusu (45). Izbrali smo jo zato, ker se njen gen nahaja na drugem intronu mRNA receptorja 5-HT_{2c} (45), zato sklepamo, da je njeno izražanje podobno izražanju receptorja 5-HT_{2c}. Dejstvo, da je SNORA35 prisotna v intronu gena *HTR2c*, nakazuje na možnost, da celoten primarni transkript med zorenjem prepotuje nukleolus, kjer pride v stik s SNORD115.

Relativno se poveča tudi izražanje proteinov ADAR1 in ADAR2 (slika 12), zaradi česar smo pričakovali, da se bo med nevrodiferenciacijo povečal obseg urejanja A v I na mestih A, B, C, D in E na mRNA receptorja 5-HT_{2c}R, kar smo naknadno tudi potrdili (več v poglavjih 4.3 in 4.4).



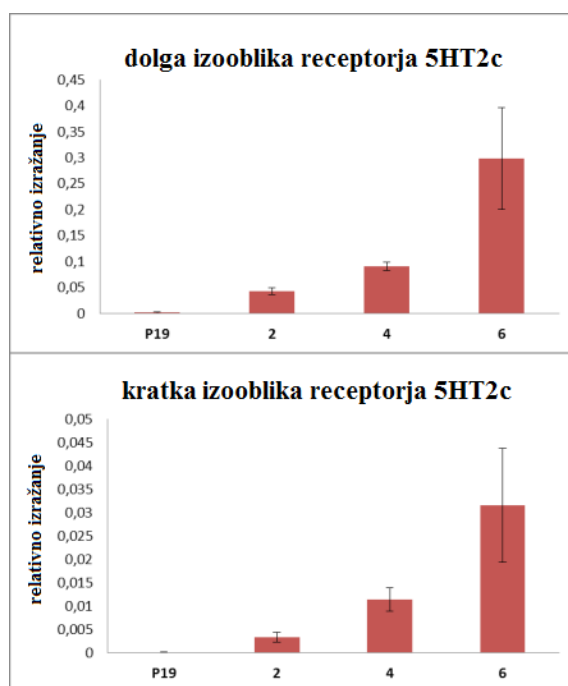
Slika 12: Izražanje genov, ki kodirata encima ADAR1 in ADAR2, med nevrodiferenciacijo. Izražanje ADAR2 je nekoliko večje od ADAR1, se pa izražanje obeh poveča med nevrodiferenciacijo.

4.2 Rezultati analize alternativnega povezovanja eksonov receptorja 5-HT_{2c} med nevrodiferenciacijo z dvema različnima metodama

4.2.1 Analiza razmerja izooblik receptorja 5-HT_{2c} s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo

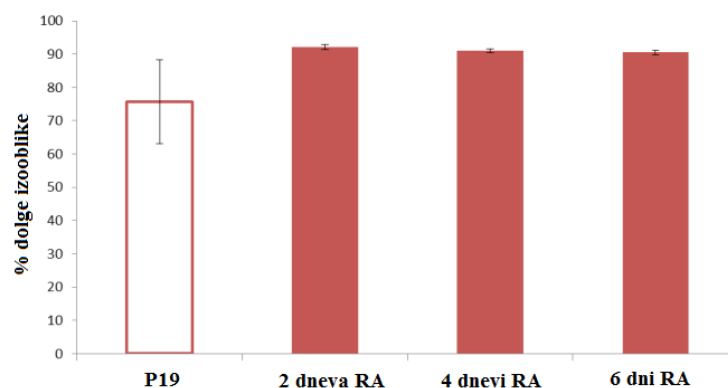
Z metodo qPCR smo določili tudi relativno izražanje obeh izooblik receptorja transkripta *HTR2c*. Glede na to, da se receptor 5-HT_{2c} izraža pretežno v možganih in da smo že ugotovili, da med nevrodiferenciacijo naraste izražanje SNORA35, ki se nahaja na intronu

tega receptorja, smo tudi v primeru receptorja pričakovali postopen porast izražanja. Izkazalo se je, da med nevrodiferenciacijo naraste izražanje obeh izooblik receptorja, tako kratke kot dolge (slika 13). Bolj presenetljivo je, da je kljub naraščanju izražanja SNORD115 (slika 10), ki je domnevno odgovorna za regulacijo alternativnega spajanja eksonov (spodbujala naj bi vključitev alternativnega eksona Vb) (slika 5), razmerje med kratko in dolgo izoobliko receptorja ostalo praktično enako.



Slika 13: Relativno izražanje mRNA dolge in kratke izooblike receptorja 5HT2c. Dolga izooblika se izraža precej močnejše.

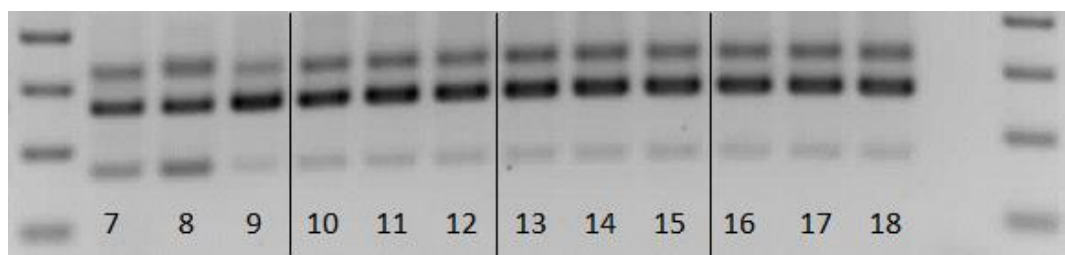
Če primerjamo izražanje ene in druge izooblike v odstotkih (slika 14), jasnih razlik v rabi eksona Vb med nevrodiferenciacijo ni. Potrebno je sicer izpostaviti, da je v pluripotentnih celicah P19 (tj. pred indukcijo nevrodiferenciacije) izražanje *HRT2c*, zlasti kratke izooblike transkripta, izjemno nizko, kar onemogoča zanesljivo kvantifikacijo ekspresije.



Slika 14: Razmerje med dolgo in kratko izoobliko transkripta *HTR2c* med nevrodiferenciacijo ostaja približno enako.

4.2.2 Analiza koncentracije izooblik receptorja 5-HT_{2c} s »touchdown« RT-PCR

S pomočjo »touchdown« RT-PCR in denzitometrične ocene količine ampliconov, ki pripadata posameznima izooblikama transkripta smo na še en način analizirali potencialne razlike v rabi alternativnega eksona Vb transkripta receptorja 5-HT_{2c} med nevrodiferenciacijo (slika 15). Prednost te metode pred qPCR je v tem, da ohrani prvotno razmerje ampliconov obeh izooblik ne glede na uporabljeno količino cDNA. Po končni analizi z gelsko elektroforezo so bili na gelu prisotni trije ampliconi – dva pripadata kratki in dolgi izoobliki receptorja *HTR2c*, zgornja lisa pa je hibrid obeh ampliconov, katerega nastanek pri večjem številu ciklov PCR je znan in tudi že opisan v literaturi (46).



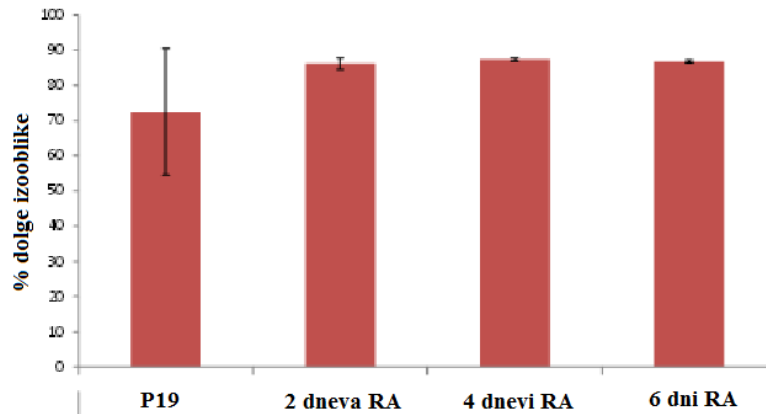
Slika 15: Analiza ampliconov *HTR2c*, pomnoženih v »touchdown« verižni reakciji s polimerazo, z gelsko elektroforezo – spodnje lise pripadajo kratki izoobliki receptorja, srednja dolgi izoobliki, zgornja pa je neželeni hibridni amplicon. Po tri paralele predstavljajo cDNA iz miške celične linije P19 med nevrodiferenciacijo – vzorci 7–9 po 0 dneh, 10–12 po dveh, 13–15 po štirih in 16–18 po šestih. Amplicon dolge izooblike je velik 266 bp, kratke pa 171.

Denzitometrično smo ocenili količino posameznega amplicona, jo normalizirali glede na dolžino amplicona in izračunali odstotek posameznega amplicona v vsakem vzorcu (preglednica 3), zanemarili smo nastajanje hibridnega amplicona, ki je povsod prisoten v približno enakem obsegu. Na koncu smo izračunali razmerje med kratko in dolgo izoobliko transkripta receptorja med nevrodiferenciacijo.

Preglednica 3: Denzitometrično merjenje koncentracije amplikonov s slike 14, izračun razmerja med kratko in dolgo izoobliko ter standardne deviacije.

Vzorec št.	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
dolga izooblika	37180,61	39219,68	48897,15	41738,92	46987,52	43032,35	46527,08	46617,21	46094,6	43683,95	43354,7	43911,12
kratka izooblika	17279,68	29635,44	4194,777	7779,548	6862,582	6430,135	6578,469	6550,485	7038,952	6464,092	6893,482	6691,304
% hibridne izooblake	26,47	24,40	20,03	26,70	28,22	27,61	29,67	29,92	28,74	29,43	30,50	30,23
% dolge izooblake	50,20	43,06	73,65	61,78	62,63	62,98	61,62	61,45	61,82	61,47	59,97	60,55
% kratke izooblake	23,33	32,54	6,32	11,52	9,15	9,41	8,71	8,63	9,44	9,10	9,53	9,23
delež dolge izooblake v %	68,27	56,96	92,10	84,29	87,26	87,00	87,61	87,68	86,75	87,11	86,28	86,78
povprečje treh paralel	72,44		86,18			87,35			86,72			
standardna deviacija	17,94		1,64			0,52			0,42			

Tako kot v primeru qPCR je iz rezultatov (slika 16) razvidno, da razmerje obeh izooblik ostaja približno enako. Glede na to, da smo analizo izvedli le s tremi biološkimi ponovitvami in da je pri pluripotentni celični liniji P19 (pred indukcijo diferenciacije z retinojsko kislino; v času 0) sipanje precej veliko (v vzorcu 9 znaša delež kratke izooblake le 6 %, medtem ko je v vzorcih 7 in 8 bistveno višji (23 oz. 33 %)), bi bilo poskus smiselno izvesti ponovno z več paralelami. Tako bi glede na opaženo višje razmerje med kratko in dolgo izoobliko v vzorcih 7 in 8 morda lahko potrdili, da se vključevanje alternativnega eksona Vb povečuje s stopnjo diferenciacije celic P19 do nevronov (vzporedno z naraščanjem izražanja SNORD115). To bi bil posreden dokaz, da je snoRNA SNORD115 res odgovorna za promocijo vključevanja alternativnega eksona Vb v mRNA *HRT2c*.

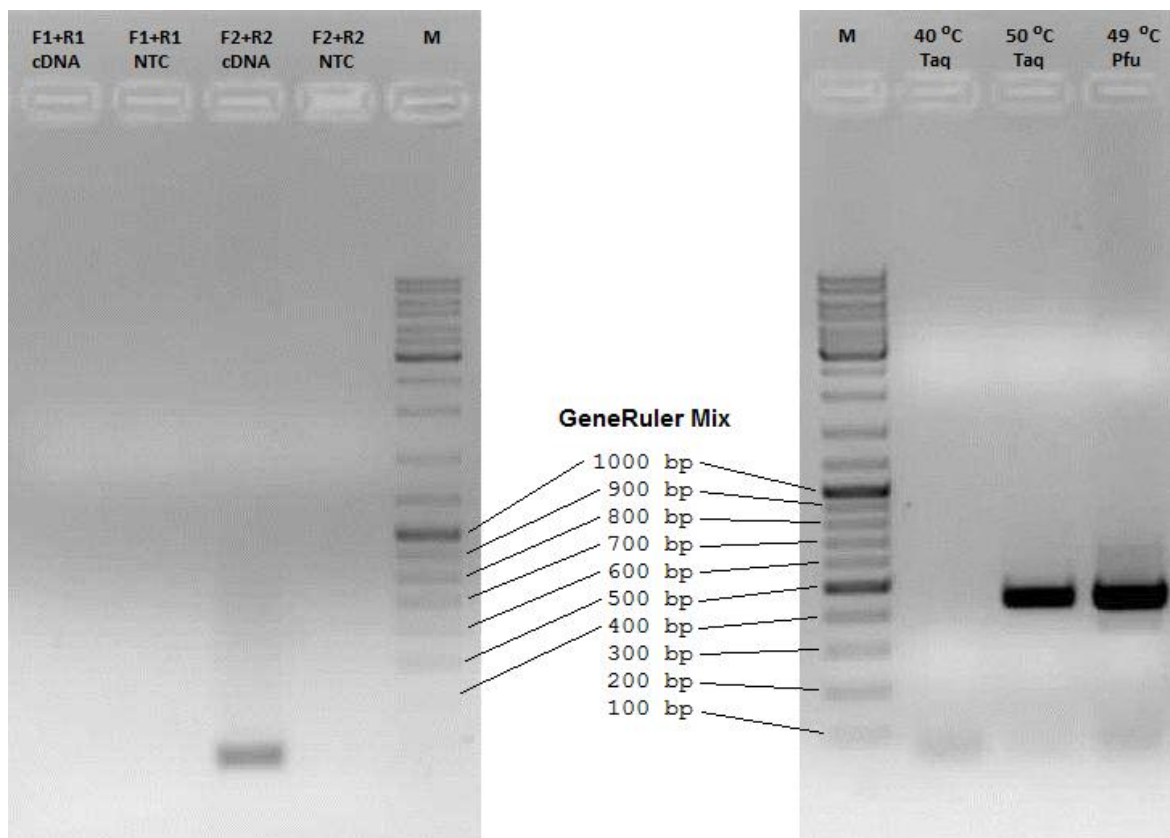


Slika 16: Delež dolge izooblike mRNA *HTR2c* med nevrodiferenciacijo celic P19 z retinojsko kislino (RA). Pri prvi časovni točki je rezultat precej nezanesljiv, pri ostalih pa se vidi, da razmerje med kratko in dolgo izoobliko ostaja enako.

4.3 Optimizacija metode ICE

4.3.1 Optimizacija pogojev PCR s paroma začetnih oligonukleotidov F1/R1 in F2/R2

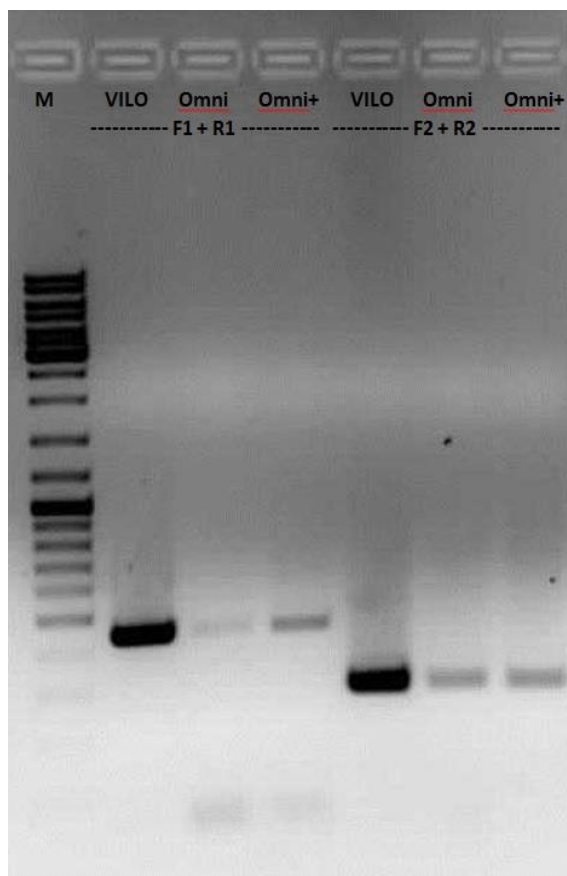
Za pomnoževanje cDNA, ki kodira receptor 5-HT_{2c}, smo zasnovali tudi para začetnih oligonukleotidov F1/R1 ter F2/R2, ki smo ju uporabljali pri različnih metodah. Ustreznost začetnih oligonukleotidov smo testirali tako, da smo preverili njihovo učinkovitost pri podvajanju cDNA s Taq DNA-polimerazo vzorca iz celične linije P19 (vzorec št. 17). Za temperaturo prileganja vgnezdene PCR smo najprej izbrali 45 °C in 43 °C, a pri F1/R1 ni prišlo do pomnoževanja amplicona (slika 17 levo), zato smo najprej poskušali temperaturo znižati na 40 °C, kar se je ravno tako izkazalo za neuspešno. Amplikon smo uspeli pomnožiti šele pri zvišanju temperature prileganja na 50 °C, še večjo koncentracijo amplicona pa smo dobili pri reakciji s Pfu DNA-polimerazo, pri kateri je prileganje potekalo pri 49 °C (slika 17 desno). Razlog, zakaj pri nižjih temperaturah reakcija ni potekla, ni povsem jasen, ena izmed možnosti pa je ta, da se lahko pri nižji temperaturi začetni oligonukleotidi zvijejo v lasnico, zaradi česar potem ne more priti do vezave na matrično DNA, posledično pa tudi ne do pomnoževanja amplicona, je pa izbira prave temperature precej bolj ključna kot izbira polimeraze.



Slika 17: Testiranje začetnih oligonukleotidov (R1 in F1, R2 in F2) – PCR s Taq-polimerazo (levo, temperatura prileganja 45 °C, zato ni amplikona pri paru F1/R1) ter ponovno testiranje para začetnih oligonukleotidov F1/R1 pri drugačni temperaturi prileganja in s Pfu DNA-polimerazo) (desno). NTC je slepa reakcija, ki ne vsebuje cDNA, vsebuje pa vse ostale sestavine in oba začetna oligonukleotida. Kot je opisano pri metodi vgnezdene verižne reakcije s polimerazo, pri podvajanju s parom F2/R2 nastane manjši amplikon (260 bp) kot pri podvajanju s prvim parom (443 bp).

4.3.2 Testiranje dveh različnih kompletov za reverzno transkripcijo

Na vzorcih RNA iz mišjih možganov smo testirali potek reverzne transkripcije z dvema različnima kompletoma, in sicer OmniScript, pri katerem smo uporabili začetni oligonukleotid R1, ter SuperScript VILO, pri katerem smo kot začetne nukleotide uporabili mešanico naključnih heksanukleotidov (N_6). Pri prvem smo kot dodatno spremenljivko izvedli še en korak, v katerem smo smo pri enem vzorcu pred izvedbo reverzne transkripcije izvedli še denaturacijo RNA. Pri tem se z dvigom temperature na RNA porušijo morebitne sekundarne strukture, kar omogoči učinkovitejše prileganje začetnih oligonukleotidov. Rezultat agarozne gelske elektroforeze po vgnezdni verižni reakciji s polimerazo je pokazal, da sta oba kompleta uspešno izvedla reverzno transkripcijo (slika 18). Večjo koncentracijo produkta smo dobili po reverzni transkripciji s kompletom SuperScript VILO, pri kompletu OmniScript pa se je kot uspešnejša izkazala varianta s predhodno denaturacijo.

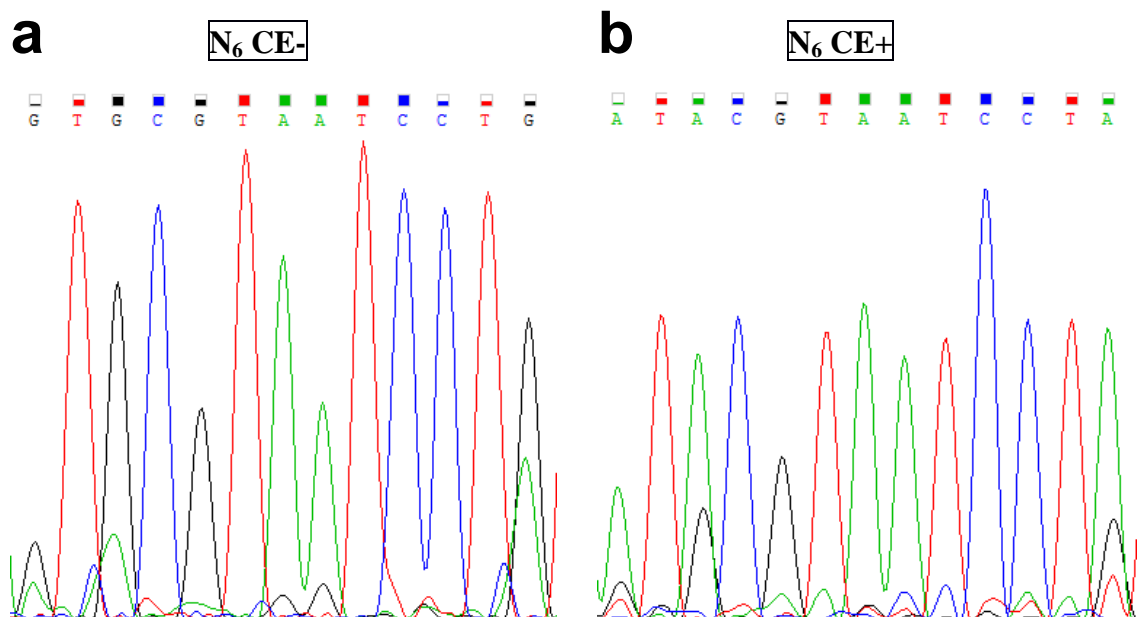


Slika 18: Testiranje kompletov za reverzno transkripcijo (Superscript VILO, Omniscript ter Omniscript s predhodno denaturacijo RNA, ki je potekala 5 min pri 65 °C – Omni+) v kombinaciji s pomnoževanjem z obema paroma oligonukleotidov (F1/R1 ter F2/R2).

4.3.3 Testiranje metode ICE na vzorcih, izoliranih iz mišjih možganov

V sklopu testiranja te metode za določanje mest in deleža urejanja A v I smo vzorec razdelili na dva dela, pri čemer pri enem nismo izvedli reakcije cianoetilacije, pri drugem pa je smo cianoetilacijo pustili potekati 20 minut pri temperaturi 70°C. Po reverzni transkripciji ter dveh zaporednih verižnih reakcijah s polimerazo (pri prvi z začetnima oligonukleotidoma F1 in R1, pri drugi pa z F2 in R2) smo vzorce analizirali z gelsko elektroforezo, jih prečistili ter jim določili nukleotidna zaporedja. Variirali smo tretiranje (s cianoetilacijo ali brez) in pogoje reverzne transkripcije (komplet Omniscript s specifičnim oligonukleotidom z ali brez predhodne denaturacije RNA ali komplet SuperScript VILO z naključnimi heksanukleotidi). Dva primera rezultatov sta prikazana na sliki 19, vsi so zbrani v Prilogi 2.

A B E C D položaj
A T A C G T A A T C C T A T T G A G C A T nukleotidno zaporedje



Slika 19: Določanje nukleotidnega zaporedja po cianoetilaciji RNA v vzorcu št. 17 ali brez. Na adenozinih, zgoraj označenih z rdečo, je predvsem na prvih dveh (mesti A in B) ter na zadnjem (mesto D) lepo vidna mešanica nukleotidov A in G. Pri primeru zgoraj je bila reverzna transkripcija opravljena s kompletom Superscript VILO z naključnimi heksaoligonukleotidi (N₆). Na vzorcu b (desno) smo izvedli cianoetilacijo (CE+), na vzorcu a (levo) pa ne (CE-), začetni oligonukleotid pri sekvenciranju je bil F2. Pri netretiranem vzorcu se na mestih A, B in D nahaja več gvanozina, pri tretiranem pa adenina, kar je dokaz, da tu poteče urejanje A v I. Na mestih C in E se prav tako zmanjša količina gvanozina pri cianoetilaciji, a ga je že v začetku tako malo, da to težko signifikantno dokažemo. Z rumeno je označeno nukleotidno zaporedje *HTR2c*, komplementarno SNORD115.

Postopek smo ponovili še enkrat z ostrejšimi (30 minut) in milejšimi pogoji (15 minut) cianoetilacije (CE++ in CE) in tudi tem amplikonom določili nukleotidno zaporedje. Rezultata sta bila podobna kot pri prvi cianoetilaciji, kar kaže na to, da z metodo ICE lahko mesta urejanja A v I določimo le kvalitativno, za kvantitativno oceno urejanja pa lahko uporabimo metodo določanja nukleotidnega zaporedja.

4.3.4 Končna optimizacija metode ICE

Rezultat opisanega testiranja je bila postavitve optimalnih pogojev za izvedbo metode ICE. Ugotovili smo, da je za sekvenciranje boljše predhodna reverzna transkripcija s kompletom OmniScript, ki poteka 45 min pri 37 °C. Rezultat je boljši tudi, če RNA pred reverzno transkripcijo 5 minut denaturiramo pri 65 °C. Najprimernejša temperatura prileganja prve verižne reakcije s polimerazo je 50 °C. Optimalno je še, da pri reakciji cianoetilacije uporabimo več kot 600 ng RNA in da cianoetilacijo pustimo teči 20 minut. Pri milejših in ostrejših pogoji cianoetilacije sicer ni bistvenih razlik, zato je obseg cianoetilacije bolj

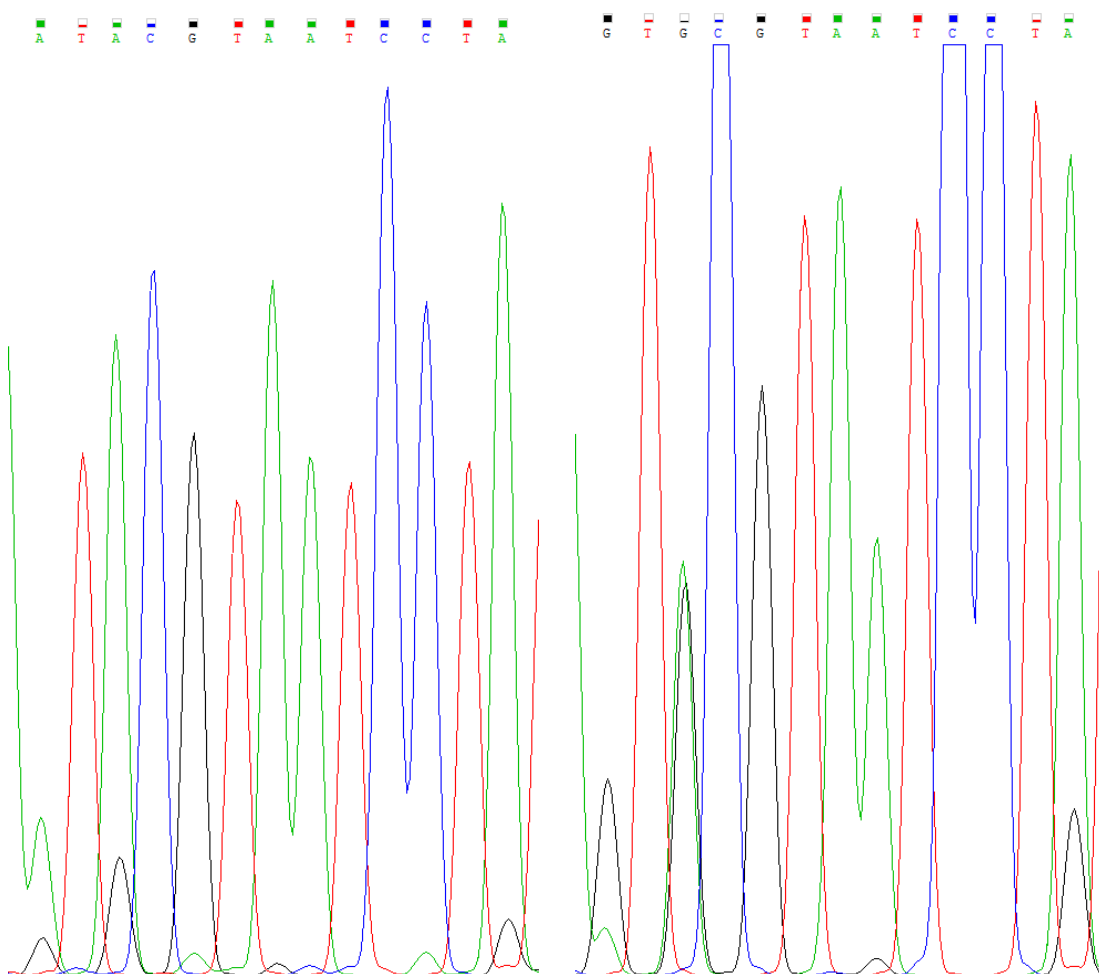
semikvantitativen, ključno pa je, da ta reakcija poteče, saj nas zanima predvsem razmerje med adenozinom in gvaninom na mestih, kjer poteka urejanje A v I pri vzorcu, ki ni bil cianoetiliran, s cianoetilacijo pa le kvalitativno dokažemo, da na teh mestih poteka urejanje A v I.

4.4 Dokazovanje urejanja A v I na mestih A-E z metodo ICE

Za dokaz, da na mestih A, B, C, D in E mRNA receptorja 5-HT_{2c} res poteka urejanje A v I in da to ni le rezultat naključne mutacije ali genskega polimorfizma, smo uporabili predhodno optimizirano metodo ICE. Uporabili smo del vzorca mišje celične linije P19 št. 13, na katerem je nevrodiferenciacija potekala 4 dni, in ga razdelili na dva dela. Prvi del smo cianoetilirali (CE+), drugega pa ne (CE-). Nato smo po reverzni transkripciji, čiščenju produkta po izvedbi vgnezdene PCR, kot so te reakcije opisane v poglavju 4.3.4, vzorca sekvencirali z oligonukleotidom F2 (slika 20). Iz slike lahko razberemo, da so na mestih urejanja A v I v cianoetiliranem delu vzorca prisotni le adenini, pri drugem delu pa je vsaj na mestih A, B in D prisoten velik delež gvanozina, kar je kvalitativen dokaz, da na teh mestih poteka urejanje A v I, kvantitativno pa smo obseg tega urejanja med nevrodiferenciacijo določili s sekvenciranjem vseh vzorcev mišje celične linije P19 – opis je v poglavju 4.5.

CE+ (13)

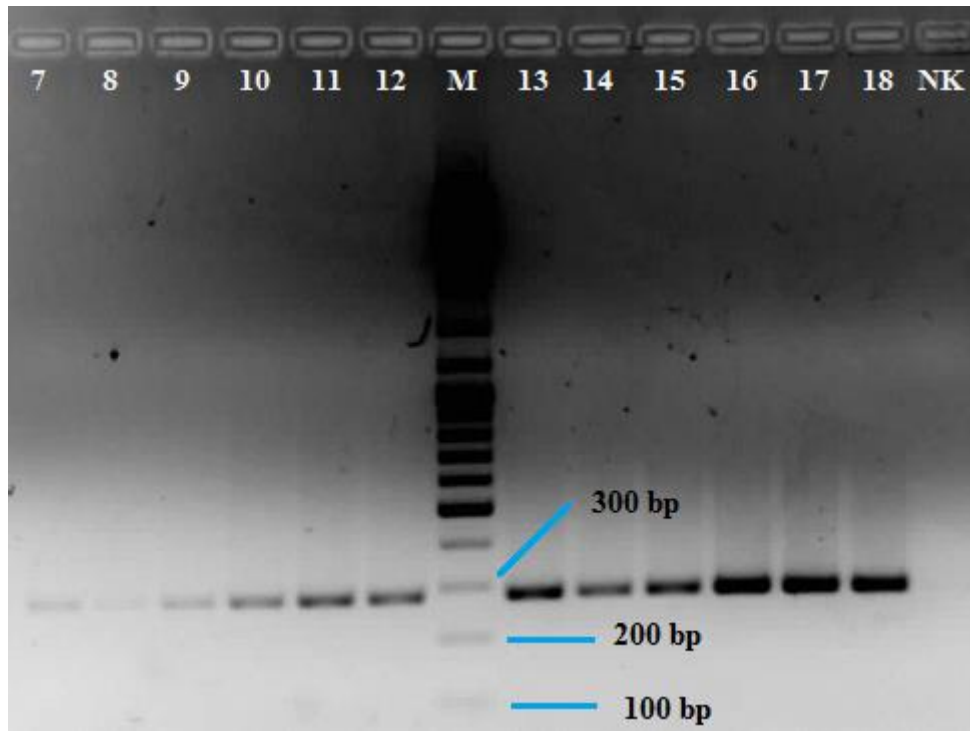
CE- (13)



Slika 20: Sekvenciranje vzorca 13 mišje celične linije P19, na katerem je nevrodiferenciacija potekala 4 dni, po cianoetilaciji (CE+) ali brez nje (CE-). Razmerje adenozinov in gvanozinov jasno kaže na to, da na določenih mestih mRNA receptorja 5-HT_{2c} poteka urejanje A v I.

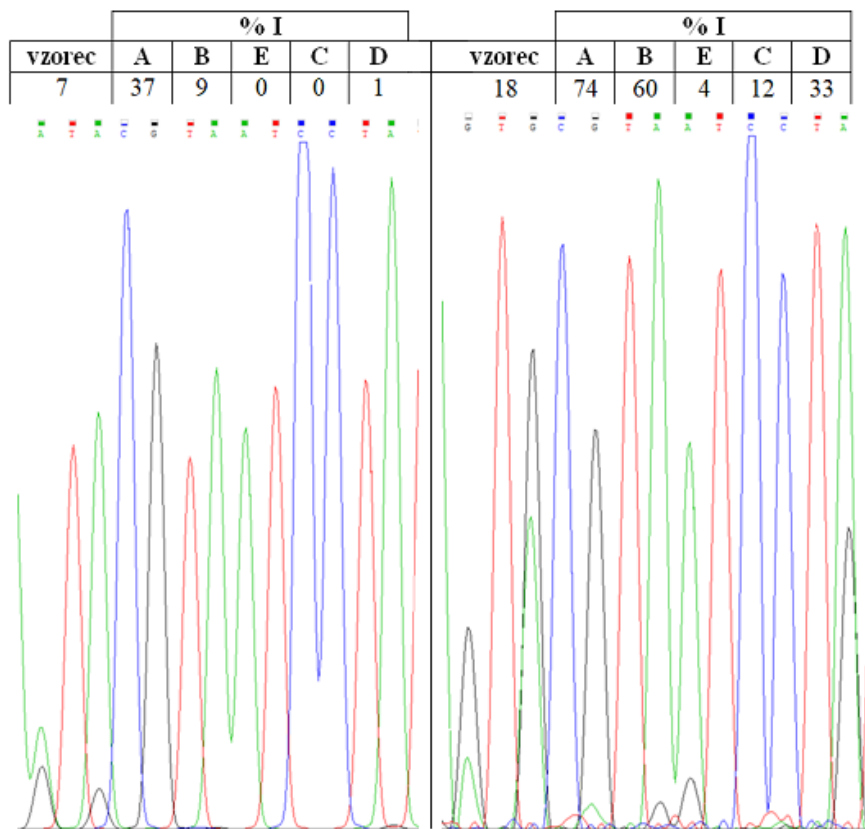
4.5 Spremljanje posttranskripcijskih modifikacij pri vzorcih RNA iz mišjih celic, nevrodiferenciranih z retinojsko kislino

Za sekvenciranje smo pripravili vzorce iz mišjih celic P19, pri katerih je bila izvedena nevrodiferenciacija z retinojsko kislino in ki so bili odvzeti po različnem času poteka nevrodiferenciacije – vzorci 7–9 po nič dneh, 10–12 po dveh, 13–15 po štirih ter 16–18 po šestih dneh, torej po tri paralele za vsako analizirano časovno točko. Po reverzni transkripciji s kompletom Omniscript smo izvedli verižno reakcijo s polimerazo z začetnima oligonukleotidoma F2 in R2. Amplikone smo pred sekvenciranjem še analizirali z agarozno gelsko elektroforezo (slika 21) ter jih izolirali in prečistili.



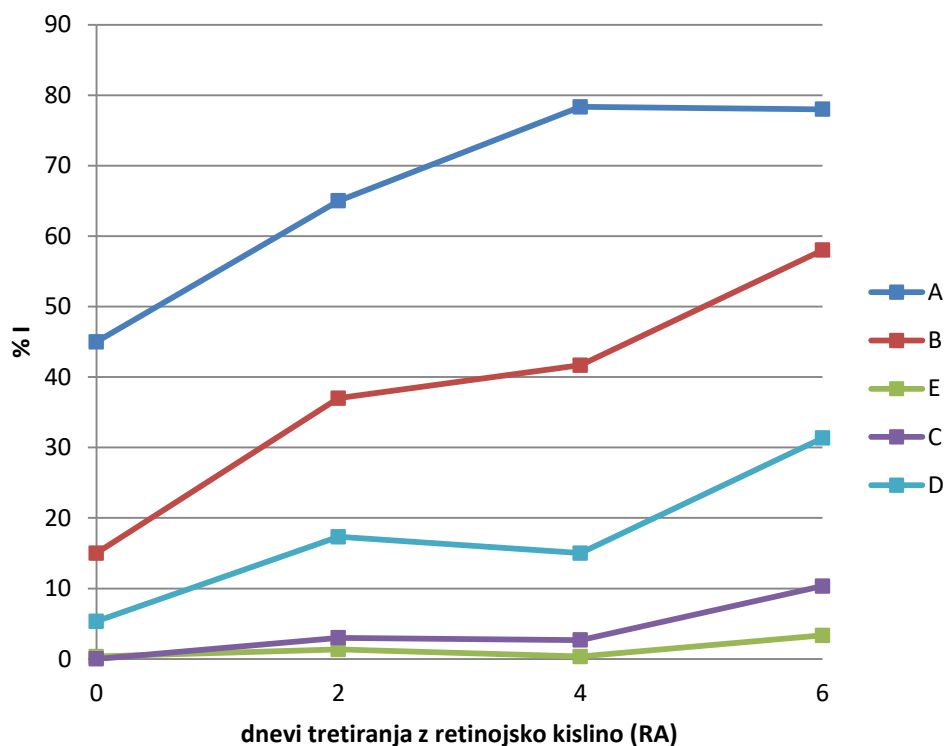
Slika 21: Analiza specifičnosti PCR – pomnoževanje segmenta transkripta HTR2c. Petino volumna reakcije smo analizirali z gelsko elektroforezo, da smo potrdili prisotnost enega samega amplicona pričakovane dolžine, iz preostanka pa smo izolirali amplikone s kompletom QIAquick PCR Purification Kit.

Sekvenciranje smo izvedli z začetnim oligonukleotidom F2. Iz razmerja višin vrhov gvanozina in adenzina (primeri na sliki 22, vsi vzorci so v prilogi 3) lahko razberemo, da je urejanje A v I na vseh petih potencialnih mestih večje pri vzorcu št. 18, pri katerem je nevrodiferenciacija potekala 6 dni (slika 23).



Slika 22: Rezultati določanja zaporedja nukleotidov vzorcev med nevrodiferenciacijo. Na sliki se vidi, da odstotek inozina na mestih, na katerih poteka urejanje A v I, med nevrodiferenciacijo precej naraste (vzorec 7 je bil odvzet pred indukcijo nevrodiferenciacije, pri vzorcu 18 pa je ta potekala 6 dni). Rezultati ostalih vzorcev so zbrani v prilogi 3.

Naraščanje deleža inozinov na posameznih položajih, podvrženih deaminaciji adenozinov, smo nato še analizirali glede na stopnjo nevrodiferenciacije (tj. po času) ter izračunali povprečje paralel vseh vzorcev 7-18. Ugotovili smo, da na mestih A in B urejanje A v I močno naraste, precej naraste tudi na mestu D, na mestih C in E pa sicer tudi naraste, a zelo šibko. Mogoča razlaga je, da SNORD115 onemogoča dostop encimoma ADAR1 in ADAR2 do tega mesta.



Slika 23: Naraščanje deleža inozinov na mestih urejanja A v I med nevrodiferenciacijo mišje celične linije P19. Urejanje A v I najbolj narašča na mestih A in B, delno tudi na mestu D, na mestih C in E pa narašča zelo počasi.

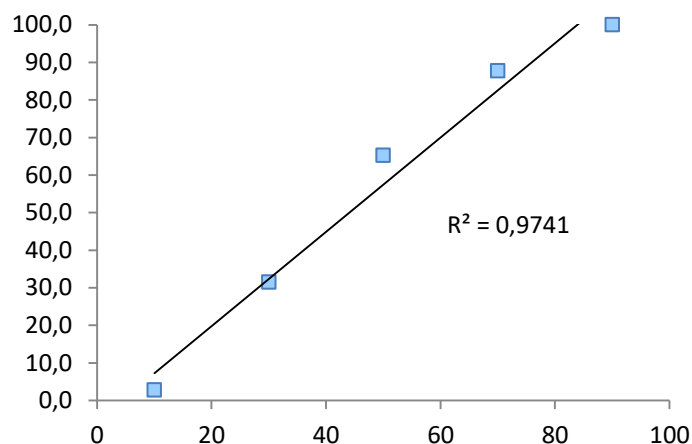
4.6 Preverjanje ustreznosti metode sekvenciranja za določanje obsega urejanja A v I

Na koncu smo še preverili, kako natančna je metoda sekvenciranja DNA pri določanju razmerja adenzinov in gvanozinov na znanih mestih urejanja A v I.

Najprej smo na vzorcu RNA, izolirane iz mišjih možganov, izvedli reverzno transkripcijo. Nato smo izvedli verižno reakcijo s polimerazo z začetnima nukleotidoma F2 in R2 in amplikon subklonirali v plazmid pGEM-T Easy. S tem smo transformirali bakterijo *E. coli* TOP 10. Gostiteljske celice smo uporabili za pomnoževanje plazmidov s posameznimi variantami inserta, ki so pripadali različno modificiranim transkriptom: na agarjem gojišču so se razvile kolonije bakterij, vsaka posamezna kolonija pa je posledično vsebovala eno samo verzijo plazmida, ki je imel določeno shemo urejanja A v I na mestih A, B, C, D in E. Izbrali smo 10 naključnih kolonij ter jih precepili v tekoče gojišče. Izolirali smo plazmide iz posameznih kultur in določili nukleotidna zaporedja insertov (Priloga 5).

Izmed teh vzorcev smo potem izbrali najbolj skrajna vzorca, torej tistega z največ mesti, ki so bila podvržena urejanju A v I (pGEM7, pri katerem je urejanje A v I poteklo na mestih A, B, C ter E), ter tistega z najmanj takšnimi mesti (pGEM10, pri katerem urejanje ni poteklo na nobenem mestu). Omenjena vzorca smo zmešali v različnih razmerjih, s čimer smo dobili vzorce z znanim razmerjem med gvanozini in adenzini na mestih A, B, C in E. Mešanicam teh dveh vzorcev smo nato ponovno določili nukleotidna zaporedja (Priloga 6).

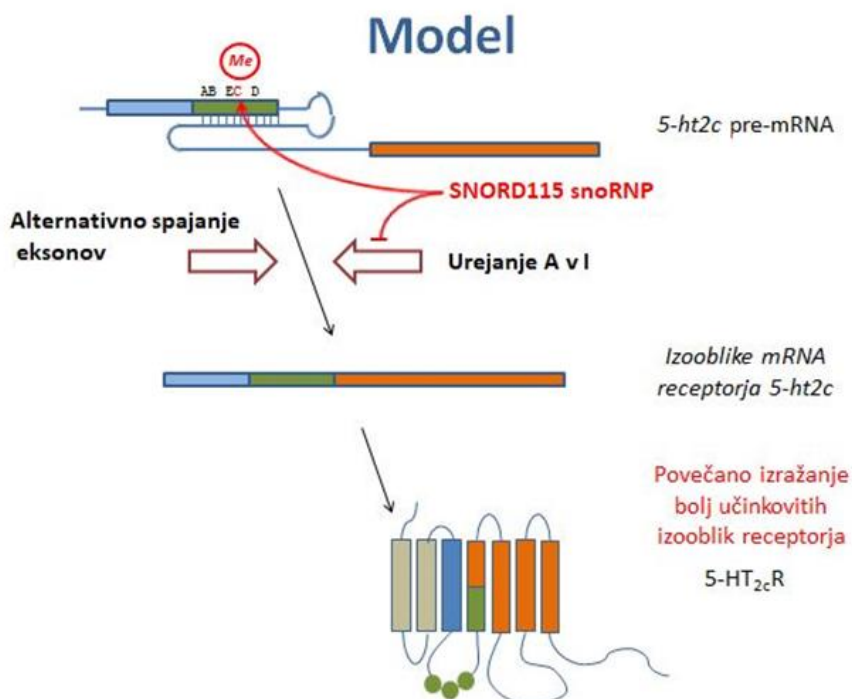
Iz rezultata smo lahko razbrali, kako zanesljivo metoda sekvenciranja določi razmerja adenzinov in gvanozinov na mestih urejanja A v I (slika 24, analiza posameznih mest urejanja v Prilogi 7). Ugotovili smo, da je metoda zanesljiva predvsem takrat, kadar sta A in G prisotna v podobnih razmerjih, medtem ko je v vzorcih, v katerih je bil A ali G na določenem mestu v zelo majhnem odstotku (razmerje 1:9 oz. 9:1), zaradi nizkega deleža enega ali drugega težko kvantitativno oceniti obseg modifikacije.



Slika 24: Analiza razmerja A in G na mestih urejanja A v I, ki smo ga dobili z določanjem nukleotidnega zaporedja mešanic plazmidne DNA pGEM7 in pGEM10 z znanim razmerjem A in G.

4.7 Model posttranslacijskih modifikacij mRNA 5-HT_{2c}

Glede na ugotovitve iz raziskovalnega dela lahko postavimo potencialni model interakcij med SNORD115, ADAR ter pre-mRNA receptorja 5-HT_{2c} (slika 22).



Slika 25: Potencialni model interakcij mRNA 5-HT_{2c} s SNORD115 ter posledice teh interakcij. SNORD115 s proteini tvori ribonukleoprotein (snoRNP), ki nato usmerja 2'-O-metilacijo riboze (sliko izrisal T. Bratkovič).

Mogoče je, da SNORD115, ki zelo verjetno usmerja 2'-O-metilacijo na ribozi adenzina na položaju C pre-mRNA receptorja 5-HT_{2c}, s tem zavira deaminacijo adenzinskega

ostanka C (in E). Vezava SNORD115 sicer domnevno vodi v nastanek dolge izooblike receptorja (zaradi nje poteče vključevanje alternativnega eksona Vb, brez katerega receptor ni aktiven, v zrelo mRNA). Naši rezultati nakazujejo, da SNORD115 primarno zavira obseg urejanja mRNA *5HT2c* na ključnih adenzinskih ostankih (na položajih C in E), kar vodi v nastanek bolj aktivne izooblike receptorja (katerega sklopitev z G-proteinom je bolj učinkovita). Vpliva SNORD115 na regulacijo alternativnega povezovanja eksonov nismo mogli potrditi zaradi navidezne heterogenosti rabe eksona Vb v transkriptih *HTR2c* v pluripotentni celični liniji P19 in zaradi nizke stopnje izražanja gena, čeprav je moč zaznati trend povišanja deleža dolge izooblike receptorja po indukciji nevrodiferenciacije (sliki 12 in 14). Za dokaz, da dejansko pride do povišanja tega deleža, bi bila potrebna ponovna analiza na večjem številu bioloških ponovitev poskusa.

5. SKLEP

V okviru naloge smo na primeru mišje celične linije P19 preučevali vpliv izražanja snoRNA SNORD115 ter izražanja encima ADAR na posttranskripcijske modifikacije pre-mRNA *HTR2c*.

Z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo smo dokazali, da se izražanje izbranih genov, ki smo jih spremljali v tej nalogi, med nevrodiferenciacijo poveča. Zviša se tako izražanje mRNA serotoninskega receptorja 5-HT_{2c}, kot encimov ADAR ter snoRNA SNORD115, -116 in SNORA35. Glede na to, da se gen za SNORA35 nahaja na drugem intronu mRNA receptorja 5-HT_{2c}, hkrati pa se snoRNA koncentrirajo v nukleolusu, bi lahko iz tega sklepali, da nezrela pre-mRNA vsaj za nekaj časa pride v nukleolus in bi takrat lahko prišla v stik s SNORD115, ki vsebuje komplementarno zaporedje ključni regiji transkripta *HTR2c*. Malo presenetljivo smo ugotovili, da se razmerje kratke in dolge izooblike receptorja med nevrodiferenciacijo ne spreminja, kar pa bi morali še dodatno potrditi – to razmerje smo sicer določili z dvema metodama, qPCR ter RT-PCR, a so bili rezultati obeh zaradi nizkih koncentracij mRNA receptorja precej nezanesljivi.

Z metodo ICE smo potrdili, da na mestih A, B, C, D in E res poteka urejanje A v I pod vplivom encimov ADAR in da spremembe niso plod naključnih mutacij ali polimorfizmov, s sekvenciranjem pa smo nato urejanje A v I na posameznih mestih tudi kvantitativno ovrednotili. Urejanje poteka na vseh mestih, predvsem na mestih A, B in D, kar je zanimivo predvsem zaradi tega, ker so to mesta, ki so najbolj oddaljena od mesta, kamor se veže SNORD115. To bi potencialno lahko pomenilo, da vezava SNORD115 zavira urejanje A v I na teh mestih in da sta torej obe posttranskripcijski modifikaciji morda med seboj povezani.

Za konec smo s sekvenciranjem mešanic plazmidne DNA z znanimi profili urejanja A v I še validirali metodo sekvenciranja za določanje obsega urejanja. Izkazalo se je, da je pri srednjih vrednostih urejanja metoda zelo uspešna, pri nizkih koncentracijah adenzina ali gvanozina pa je obseg urejanja s to metodo težko natančno določiti – kljub temu pa je kombinacija metode ICE ter sekvenciranja relativno dobra metoda za kvantitativno določanje novih mest urejanja A v I.

6. VIRI IN LITERATURA

1. Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G: RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* 2008; 582(14): 1977–86.
2. Bass BL: RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 2002; 71(1): 817–46.
3. Homann M: Editing Reactions from the Perspective of RNA Structure. Göringer HU [ur.], RNA editing, Springer, Heidelberg, 2008: 12–17.
4. Gott JM, Emeson RB: Functions and mechanisms of RNA editing. *Annu. Rev. Genet.* 2000; 34: 499–531.
5. Benne R: RNA editing in trypanosomes. *Eur. J. Biochem.* 1994; 221(1): 9–23.
6. Niavarani A, Currie E, Reyal Y, Anjos-Afonso F, Horswell S, Griessinger E, Sardina JL, Bonnet D. APOBEC3A is implicated in a novel class of G-to-A mRNA editing in WT1 transcripts. *PLoS One.* 2015; 10(3): e0120089.
7. Peng Z, Cheng Y, Tan BC-M, Kang L, Tian Z, Zhu Y, idr.: Comprehensive analysis of RNA-Seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome. *Nat. Biotechnol.* 2012; 30(3): 253–60.
8. Pachter L: A closer look at RNA editing. *Nat. Biotechnol.* Nature Publishing Group; 2012; 30(3): 246–7.
9. Nishikura K: Functions and Regulation of RNA Editing by ADAR Deaminases. *Annu. Rev. Biochem.* 2010; 79: 321–49.
10. Jin Y, Zhang W, Li Q: Origins and evolution of ADAR-mediated RNA editing. *IUBMB Life.* 2009; 61(6): 572–8.
11. Wagner RW, Yoo C, Wrabetz L, Kamholz J, Buchhalter J, Hassan NF, idr.: Double-stranded RNA unwinding and modifying activity is detected ubiquitously in primary tissues and cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 1990; 10(10): 5586–90.
12. Vitali P, Basyuk E, Le Meur E, Bertrand E, Muscatelli F, Cavallé J, idr.: ADAR2-mediated editing of RNA substrates in the nucleolus is inhibited by C/D small nucleolar RNAs. *J. Cell Biol.* 2005; 169(5): 745–53.
13. Chen CX, Cho DS, Wang Q, Lai F, Carter KC, Nishikura K: A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both single- and double-stranded RNA binding domains. *RNA.* 2000; 6(5): 755–67.
14. Song C, Sakurai M, Shiromoto Y, Nishikura K: Functions of the RNA Editing Enzyme ADAR1 and Their Relevance to Human Diseases. Göringer HU, urednik. *Genes (Basel).* MDPI; 2016; 7(12): 129.
15. Behm M, Wahlstedt H, Widmark A, Eriksson M, Öhman M: Accumulation of nuclear ADAR2 regulates adenosine-to-inosine RNA editing during neuronal development.

- J. Cell Sci. 2017; 130(4): 745–53.
16. Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Tsuji S, Kakita A, Takahashi H, idr.: Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons. *Neurobiol. Dis.* Elsevier Inc.; 2012; 45(3): 1121–8.
 17. Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM: Serotonin: a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* Blackwell Publishing Ltd; 2008; 31(3): 187–99.
 18. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR: Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 71(4): 533–54.
 19. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, idr.: International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* 1994; 46(2): 157–203.
 20. Chagraoui A, Thibaut F, Skiba M, Thuillez C, Bourin M: 5-HT_{2C} receptors in psychiatric disorders: A review. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* Elsevier Inc.; 2016; 66: 120–35.
 21. Zhang Z, Shen M, Gresch PJ, Ghamari-Langroudi M, Rabchevsky AG, Emeson RB, idr.: Oligonucleotide-induced alternative splicing of serotonin 2C receptor reduces food intake. *EMBO Mol. Med.* 2016; 8(8): 878–894.
 22. Garfield AS, Davies JR, Burke LK, Furby H V., Wilkinson LS, Heisler LK, idr.: Increased alternate splicing of Htr2c in a mouse model for Prader-Willi syndrome leads disruption of 5HT_{2C} receptor mediated appetite. *Mol. Brain.* 2016; 9(1): 95.
 23. Bratkovič T, Rogelj B: Biology and applications of small nucleolar RNAs. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011; 68(23): 3843–51.
 24. Omer AD, Lowe TM, Russell AG, Ebhardt H, Eddy SR, Dennis PP: Homologs of small nucleolar RNAs in Archaea. *Science.* 2000; 288(5465): 517–22.
 25. Gaspin C, Cavailé J, Erauso G, Bachellerie JP: Archaeal homologs of eukaryotic methylation guide small nucleolar RNAs: lessons from the *Pyrococcus* genomes. *J. Mol. Biol.* 2000; 297(4): 895–906.
 26. Tycowski KT, Steitz JA: Non-coding snoRNA host genes in *Drosophila*: expression strategies for modification guide snoRNAs. *Eur. J. Cell Biol.* 2001; 80(2): 119–25.
 27. Dieci G, Preti M, Montanini B: Eukaryotic snoRNAs: A paradigm for gene expression flexibility. *Genomics.* 2009; 94(2): 83–8.
 28. Richard P, Darzacq X, Bertrand E, Jány BE, Verheggen C, Kiss T: A common sequence motif determines the Cajal body-specific localization of box H/ACA scaRNAs. *EMBO J.* 2003; 22(16): 4283–93.
 29. Bratkovič T, Rogelj B: The many faces of small nucleolar RNAs. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 2014; 1839(6): 438–43.

30. Reichow SL, Hamma T, Ferré-D'Amaré AR, Varani G: The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(5): 1452–64.
31. Huang ZP, Chen CJ, Zhou H, Li BB, Qu LH: A combined computational and experimental analysis of two families of snoRNA genes from *Caenorhabditis elegans*, revealing the expression and evolution pattern of snoRNAs in nematodes. *Genomics.* 2007; 89(4): 490–501.
32. Feil R, Berger F: Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends Genet. Elsevier* 2017; 23(4): 192–9.
33. Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ, Schwartz S: Prader-Willi syndrome. *Genet. Med.* 2012; 14(1): 10–26.
34. Fontana P, Grasso M, Acquaviva F, Gennaro E, Galli ML, Falco M, Scarano F, Scarano G, Lonardo F: SNORD116 deletions cause Prader-Willi syndrome with a mild phenotype and macrocephaly. *Clin. Genet. Blackwell Publishing Ltd;* 2017; <https://doi.org/10.1111/cge.13005>.
35. Purtell L, Qi Y, Campbell L, Sainsbury A, Herzog H: Adult-onset deletion of the Prader-Willi syndrome susceptibility gene Snord116 in mice results in reduced feeding and increased fat mass. *Transl. Pediatr. AME Publishing Company;* 2017; 6(2): 88–97.
36. Kishore S, Stamm S: The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science.* 2006; 311(5758): 230–2.
37. Yi-Brunozzi HY, Easterwood LM, Kamilar GM, Beal PA: Synthetic substrate analogs for the RNA-editing adenosine deaminase ADAR-2. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(14): 2912–7.
38. McBurney MW: P19 embryonal carcinoma cells. *Int. J. Dev. Biol.* 1993; 37: 135-40
39. Omniscript[®] Reverse Transcription Handbook. 2010: <https://www.qiagen.com/us-/resources/download.aspx?id=7f8feb09-5115-40cd-a6a7-cf72149e172a&lang=en>.
40. Invitrogen. SuperScript[®] VILO[™] MasterMix. 2011: <http://ulab360.com/files/product/manuals/201508/12/551113001.pdf>
41. Štrukelj B, Kos J [ur.], Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 55–58.
42. Boyer RF, Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 349–352.
43. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. „Touchdown“ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(14): 4008.
44. Sakurai M, Suzuki T: Biochemical Identification of A-to-I RNA Editing Sites by the Inosine Chemical Erasing (ICE) Method. Aphasizhev R [ur.], RNA and DNA Editing: Methods and Protocols, Springer 2011: 89–99.

45. Cavaillé J, Buiting K, Kiefmann M, Lalande M, Brannan CI, Horsthemke B, idr.: Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. The National Academy of Sciences* 2000; 97(26): 14311–6.
46. Wang Q, O'Brien PJ, Chen C-X, Cho D-SC, Murray JM, Nishikura K: Altered G Protein-Coupling Functions of RNA Editing Isoform and Splicing Variant Serotonin_{2C} Receptors. *J. Neurochem. Blackwell Science Ltd.* 2000; 74(3): 1290–300.

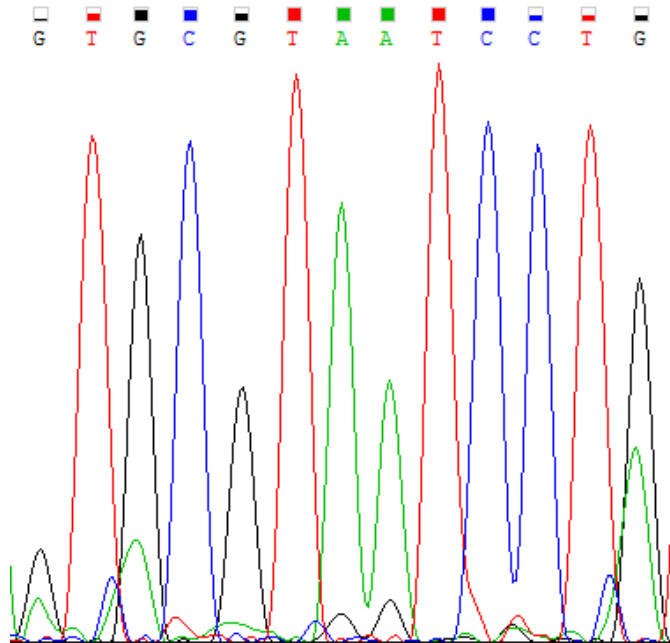
Začetni oligonukleotidi:

ime	zaporedje	# nukleotidov	% GC	Tm [°C]	Tm lasnice [°C] (ΔG [kcal/mol])	homodimer ΔG [kcal/mol]	heterodimer ΔG [kcal/mol]	# nukleotidov amplicona
F-115a	AAATGTCATGAAGAAAGGTGATGAC	24	37,5	53,4	38,2 (-1,64)	-8,53	-4,67	56
R-115a	CTCAGCGTAATCCTATTGAGCA	23	43,5	54,6	29,1 (-0,33)	-5,13		
F-115b	TCAATGATGACAACCCAATGTC	22	40,9	53,3	39,3 (-1,58)	-4,87	-6,95	72
R-115a	CTCAGCGTAATCCTATTGAGCA	23	43,5	54,6	29,1 (-0,33)	-5,13		
F-115c	GAAGAAAGTTGATGACATAAAATTCATGC	29	31,0	53,9	29,1 (-0,35)	-5,38	-8,52	48
R-115b	CTCAGTGTAAATCCTATTGAGCA	24	41,7	53,2	26,8 (-0,17)	-5,38		
F-115b	TCAATGATGACAACCCAATGTC	22	40,9	53,3	39,3 (-1,58)	-4,87	-6,95	72
R-115b	CTCAGTGTAAATCCTATTGAGCA	24	41,7	53,2	26,8 (-0,17)	-5,38		

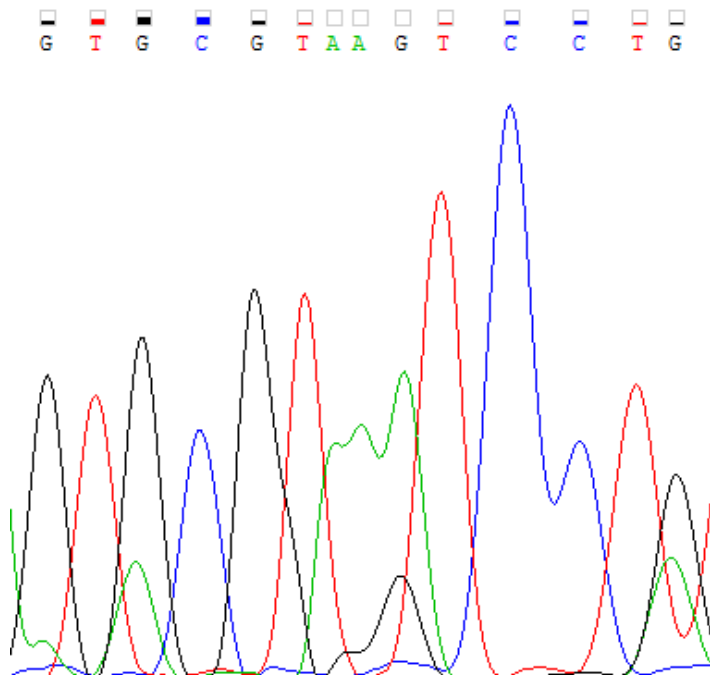
Priloga 2: Rezultati sekvenciranja amplikonov N₆ CE+/- (testiranje mest urejanja A v I z metodo ICE)

A T A C G T A A T C C T A T T G A G C A T

N₆ CE-, začetni oligonukleotid F2



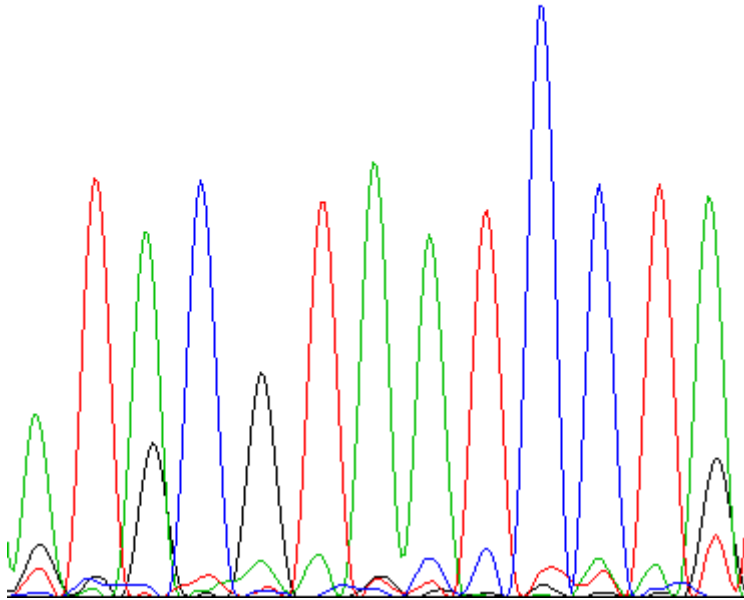
N₆ CE-, začetni oligonukleotid R2



A T A C G T A A T C C T A T T G A G C A T

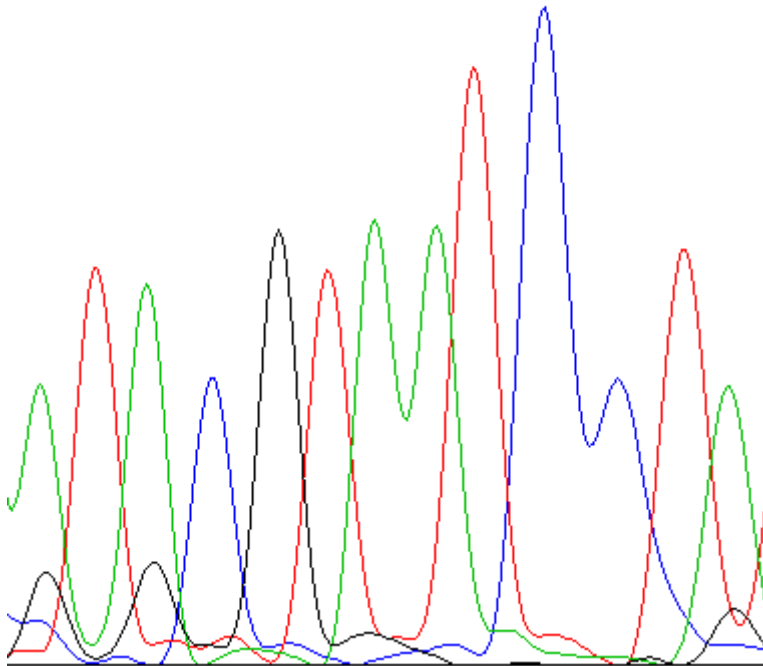
N₆ CE+, začetni oligonukleotid F2

A T A C G T A A T C C T A



N₆ CE+, začetni oligonukleotid R2

A T A C G T A A T C C T A



Priloga 3: Delež inozinov na mestih urejanja A v I med nevrodiferenciacijo mišjih celic P19 v vzorcih 7 do 18

vzorec	% I					zaporedje
	A	B	E	C	D	
7	37	9	0	0	1	
8	48	25	0	0	11	

vzorec	% I					zaporedje
	A	B	E	C	D	
9	50	11	1	0	4	
10	50	41	4	6	27	

vzorec	% I					zaporedje
	A	B	E	C	D	
11	66	28	0	1	10	
12	79	42	0	2	15	

vzorec	% I					zaporedje
	A	B	E	C	D	
13	82	43	0	3	13	<p> G T A C G T A A T C C T A </p>
14	71	37	0	1	13	<p> G T A C G T A A T C C T A </p>

vzorec	% I					zaporedje
	A	B	E	C	D	
15	82	45	1	4	19	
16	71	61	5	14	34	

vzorec	% I					zaporedje
	A	B	E	C	D	
17	89	53	1	5	27	
18	74	60	4	12	33	

Priloga 4: Poravnava cDNA mišjega in humanega *HTR2c* v območju alternativnega spajanja eksonov

```

Mmu_5HTR2c_var1      GCGTCCATCATGCACCTCTGCGCCATATCGCTGGACCGGTATGTAGCAATACGTAATCCT
Hsa_5HTR2c_var1      gcgtccatcatgcacctctgcgccatatacgctggatcggtatgtagcaatacgtaatcct
*****

Mmu_5HTR2c_var1      ATTGAGCATAGCCGGTTCAATTCGCGGACTAAGGCCATCATGAAGATTGCCATCGTTTGG
Hsa_5HTR2c_var1      attgagcatagccggttcaattcgcggaactaaggccatcatgaagattgctattgtttgg
*****

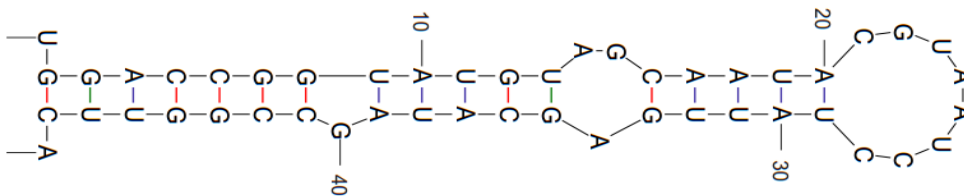
Mmu_5HTR2c_var1      GCAATATCAATAGGAGTTTCAGTTCCTATCCCTGTGATTGGACTGAGGGACGAAAGCAA
Hsa_5HTR2c_var1      gcaatttctatagggtatcaattcctatccctgtgattggactgagggacgaagaaaag
*****

Mmu_5HTR2c_var1      ASIMHLCAISLDRYVAIRNPIEHSRFNSRTKAIMKIAIVWAISIGVSVPIPIVIGLRDESK
Hsa_5HTR2c_var1      ASIMHLCAISLDRYVAIRNPIEHSRFNSRTKAIMKIAIVWAISIGVSVPIPIVIGLRDEEK
*****

```

Izoobliki Mmu_5HTR2c (mišji 5-HTR2c v območju alternativnega spajanja eksonov)

-regija, komplementarna SNORD115 ASE
- modra.....odsek, skupen obema izooblikama na 5'-koncu
- oranžna.....odsek, skupen obema izooblikama na 3'-koncu
- podčrtano...alternativni ekson Vb
- rdeči **A**.....adenozin, ki je podvržen deaminaciji (*A-to-I editing*)
- ležeče.....sekundarna struktura – lasnica
-prijemališči začetnih oligonukleotidov F1 in R1
-prijemališči začetnih oligonukleotidov F2 in R2

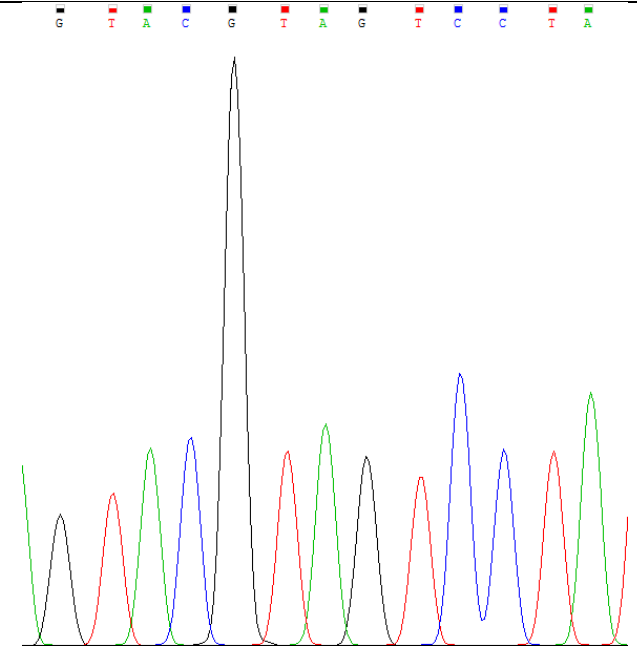
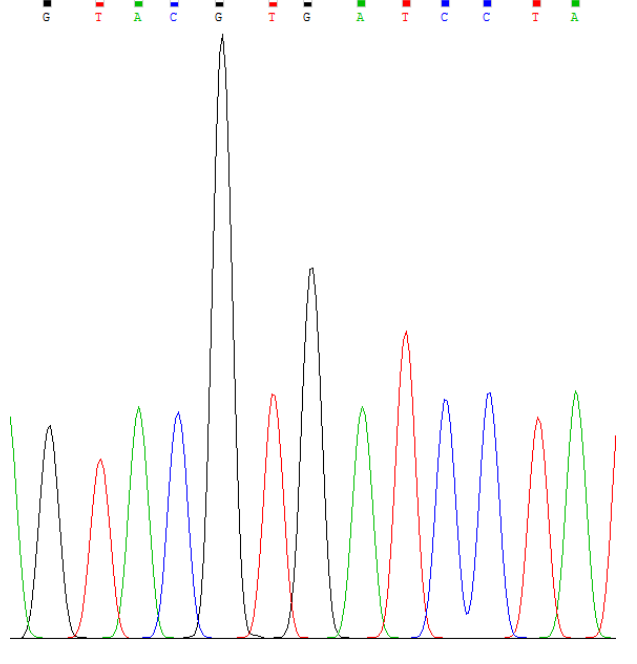


```

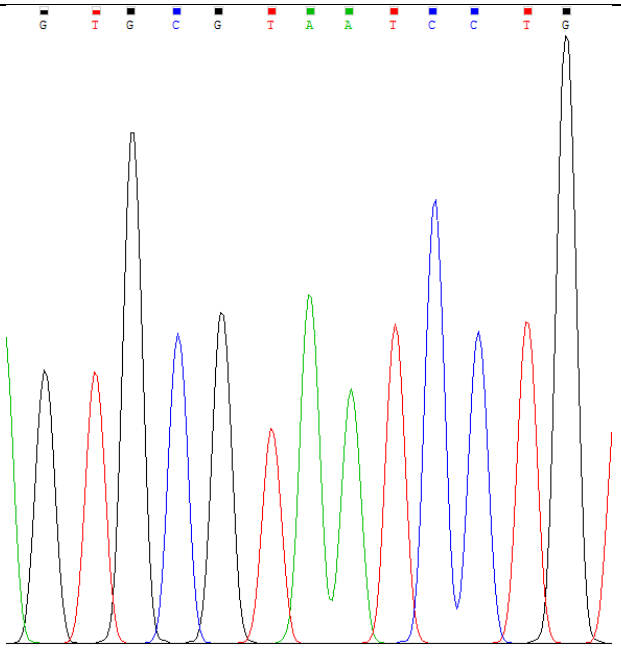
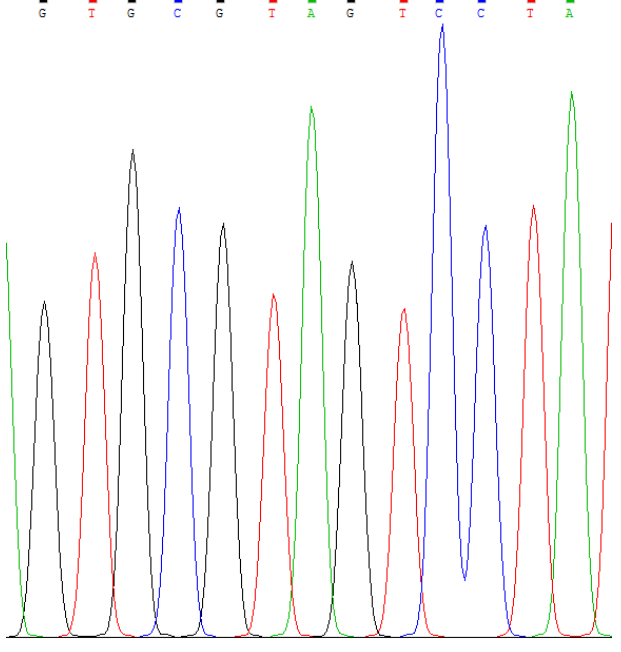
...ATGGTGAACCTGGGCACTGCGGTGCGCTCACTCCTTGTGCACCTAATTGGCCATTGGTTTGGCAGTTTCG
ATATTTCCATAAGTCCAGTAGCAGCTATAGTAACTGACACTTTTAAATTCCTCCGATGGTGGACGCTTGTTC
ATTCCGGACGGGTACAAAACCTGGCCAGCACCTTCAATAGTCGTGATTATAATCATGACAATAGGGGGCAAC
ATTCTCGTTATCATGGCAGTAAGCATGGAGAAGAACTGCACAATGCTACCAATTTCTTAAATGTCCTTAG
CCATTGCTGATATGCTGGTGGGACTACTTGTTCATGCCCTGTCTCTGCTTGCAATTCCTTATGATTATGCTG
GCCTTACCTAGATATTTGTGCCCGTCTGGATTCACCTAGATGTGCTATTTTCAACTGCGTCCATCATGCAC
CTCTGCGCCATATCGCTGGACCGGTATGTAGCAATACGTAATCCTATTGAGCATAGCCGGTTCAATTCGCGGA
CTAAGGCCATCATGAAGATTGCCATCGTTTGGGCAATATCAATAGGAGTTTCAGTTCCCTATCCCTGTGATTGG
ACTGAGGGACGAAAGCAAAGTGTTCGTGAATAATACTACCTGCGTGCCTCAATGACCCGAACCTTCGTTCTCATC
GGGTCTTCGTGGCATTCTTCATCCCGTTGACAAATATGGTGATCACCTACTTCTTAACGATCTACGTCCTAC
GCCGTCAAACCTGATGTTACTTCGAGGTACACCGGAGGAACTGCGTAATATCAGCCTGAACCTTCTAAA
GTGCTGCTGCAAGAAGGGTGATGAGGAAGAGAACGCTCCCAACCCCAATCCAGATCAGAAGCCACGTCGAAAG
AAGAAAGAAAAGCGGCTAGAGGCACCATGCAAGCTATCAACAATGAGAAGAAAGCTTCCAAAGTCTTTGGCA
TTGTATTCTTTGTGTTTCTGATCATGTGGTGGCCGTTTTTCATCACCAATATCCTGTCGGTGCCTTTGTGGAA
GGCCTGTAACCAAGCTAATGGAGAACTTCTCAATGTGTTTTGTTTTGGATTGGCTATGTGTGTTCTCAGGCATC
AATCCTCTGGTGTACACTCTCTTCAACAAAATTTACCGAAGGGCTTTCTCTAAATATTTGCGCTGCGATTATA
AGCCAGACAAAAGCCTCCTGTTCGACAGATTCCTAGGGTTGCTGCCACTGCTTTGTCTGGGAGGGAGCTCAA
TGTTAACATTTATCGGCATACCAATGAACGTGTAGTTAGGAAAGCTAATGACACAGAGCCTGGCATAGAGATG
CAGGTAGAGAATTTAGAGCTGCCGGTCAATCCCTCTAATGTGGTACGCGAGAGGATTAGTAGTGTGTAA...

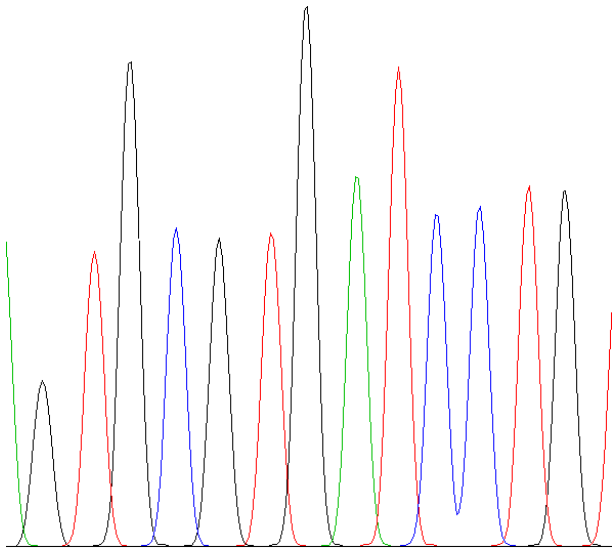
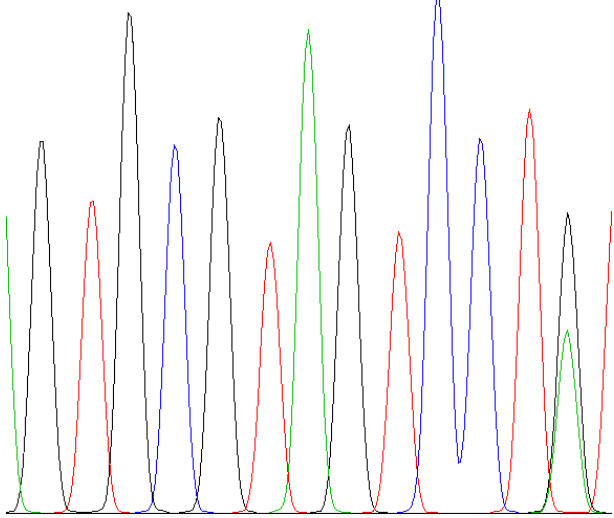
```

Priloga 5: Določitev nukleotidnega zaporedja 10 naključnim plazmidom
pGEM-T Easy

Plazmid	A	B	E	C	D	zaporedje
pGEM1	G	A	A	G	A	<div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> GTACGTAGTCCTA </div> 
pGEM2	G	A	G	A	A	<div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> GTACGTGATCCTA </div> 

Plazmid	A	B	E	C	D	zaporedje
pGEM3	G	G	A	A	G	<div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> G T G C G T A A T C C T G </div>
pGEM4	G	A	A	A	A	<div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> G T A C G T A A T C C T A </div>

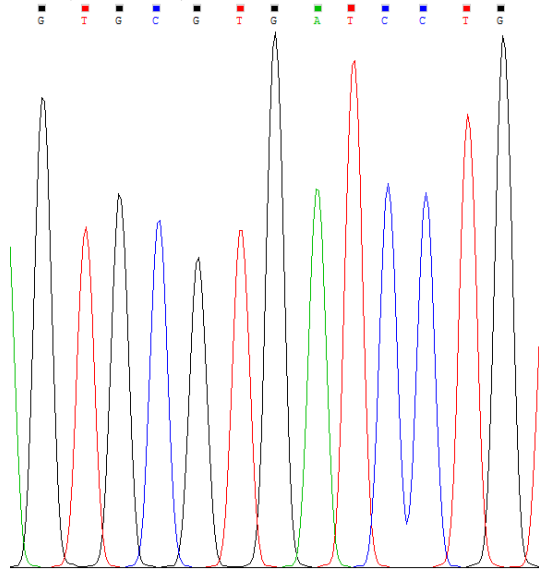
Plazmid	A	B	E	C	D	zaporedje
pGEM5	G	G	A	A	G	<div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> GTGCGTAATCCTG </div> 
pGEM6	G	G	A	G	A	<div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> GTGCGTAGTCCTA </div> 

Plazmid	A	B	E	C	D	zaporedje
pGEM7	G	G	G	A	G	<div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> G T G C G T G A T C C T G </div> 
pGEM8	G	G	A	G	? (G/A)	<div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> G T G C G T A G T C C T G </div> 

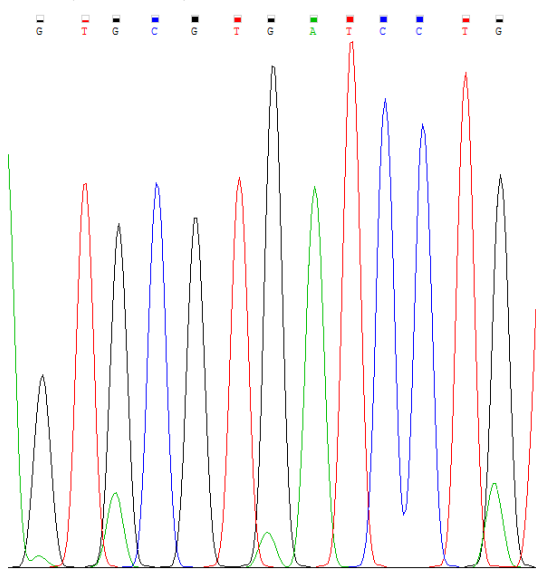
Plazmid	A	B	E	C	D	zaporedje
pGEM9	G	G	A	A	G	
pGEM10	A	A	A	A	A	

Priloga 6: Testiranje ustreznosti metode določanja nukleotidnega zaporedja za določanje obsega urejanja A v I na znanih mestih urejanja – sekvenciranje mešanice plazmidov pGEM7 in pGEM10

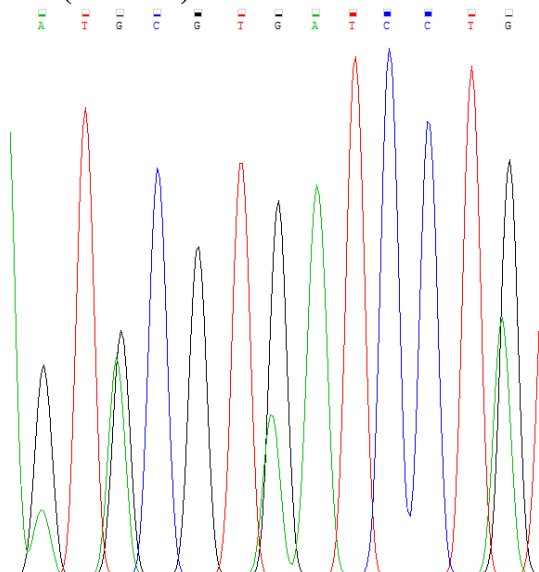
1:9 (49FH84)



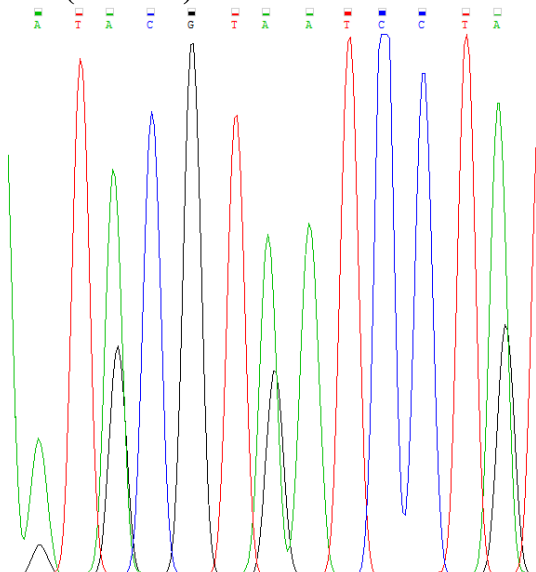
3:7 (49FH85)



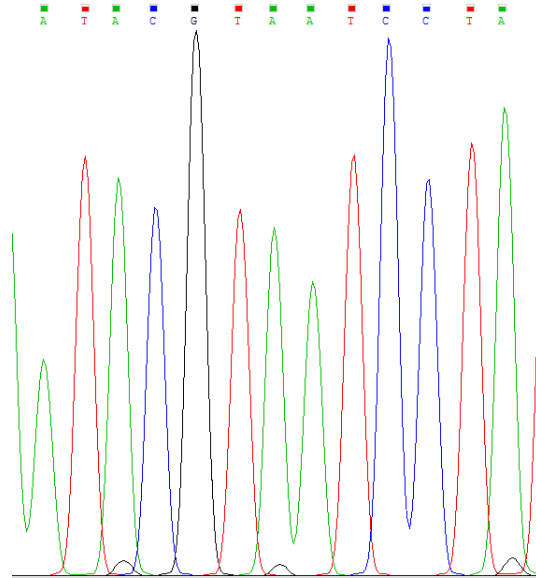
5:5 (49FH86)



7:3 (49FH87)



9:1 (49FH88)



Priloga 7: Validacija sekvenciranja po pozameznih položajih urejanja A v I - rdeče črte prikazuje znana razmerja plazmidne cDNA pGEM7 in 10

