

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MANCA ZUPANC (POTOČNIK)

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2018



UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MANCA ZUPANC (POTOČNIK)

**VZPOSTAVITEV METODE ZA DETEKCIJO INTERAKCIJ  
MED MOLEKULAMI RNA  
DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETECTION OF RNA-  
RNA INTERACTIONS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2018

Magistrsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča. Določitev nukleotidnih zaporedij molekul DNA so opravili v podjetju GATC Biotechnology, Konstanz, Nemčija.

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju doc. dr. Tomažu Bratkoviču za posredovano znanje in izkušnje, koristne nasvete in pomoč pri nastajanju te naloge.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in Bojanu za vso podporo in razumevanje tekom študija.

Tini, Neži, Leji in Sabini – hvala, da so bila študijska leta tako prijetna.

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Tomaža Bratkoviča.

Ljubljana, oktober 2018

Predsednica komisije: prof. dr. Lucija Peterlin Mašič

Mentor: doc. dr. Tomaž Bratkovič

Članica: asist. dr. Janja Zupan

# KAZALO VSEBINE

1 UVOD .....	1
1.1 Interakcije med molekulami RNA .....	1
1.2 Pomen interakcij .....	2
1.3 Primeri interakcij med molekulami RNA preko baznega parjenja .....	3
1.3.1 RNA-interferenca .....	3
1.3.2 Intronsko izrezovanje .....	3
1.3.3 Vodenje modifikacij na drugih molekulah RNA .....	4
1.4 Preučevanje interakcij med molekulami RNA .....	4
1.4.1 CLASH .....	7
1.4.2 MARIO .....	8
1.4.3 RAP .....	9
1.4.4 LIGR-seq .....	11
1.4.5 SPLASH .....	12
1.4.6 PARIS .....	13
1.4.7 hiCLIP .....	15
2 NAMEN DELA .....	17
3 MATERIALI IN METODE .....	18
3.1 Materiali .....	18
3.1.1 Kemikalije .....	18
3.1.2 Pripravljene raztopine in pufri .....	19
3.1.3 Biološki material .....	21
3.1.4 Elektroforezni material .....	24
3.1.5 Komercialni kompleti .....	26
3.1.6 Potrošni in laboratorijski material .....	26

3.2 Laboratorijska oprema .....	27
3.3 Eksperimentalni shemi.....	28
3.4 Metode .....	29
3.4.1 Gojenje celic .....	29
3.4.2 Izolacija RNA iz celic HEK FlpIn SNORD116 s kompletom <i>miRNAEasy Kit</i> . .....	29
3.4.3 Reverzna transkripcija (RT) .....	29
3.4.4 Reakcija PCR v realnem času (qPCR) .....	30
3.4.5 Ekstrakcija DNA/RNA s fenolom in kloroformom ter precipitacija z etanolom .....	31
3.4.6 Adenilacija oligonukleotida 3'-adapter IX.....	32
3.4.7 Obsevanje celic.....	32
3.4.8 Liza celic in izolacija molekul RNA iz celičnega lizata.....	33
3.4.9 Delna razgradnja molekul RNA .....	33
3.4.10 Dvodimenzionalna (2D) elektroforeza in ekstrakcija RNA iz gela.....	34
3.4.11 Proksimalna ligacija RNA v kompleksu in prekinitev kovalentne vezi, izzvane z AMT (t.i. »reverse crosslinking«) .....	35
3.4.12 Poliadenilacija .....	35
3.4.13A Sinteza knjižnice cDNA po Protokolu 1.....	35
3.4.13B Sinteza knjižnice cDNA po Protokolu 2.....	39
3.4.14 Bioanalyzer .....	39
3.4.15 PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (GS-PCR).....	39
3.4.16 TA-kloniranje, transformacija s toplotnim šokom, pomnožitev in izolacija plazmidov .....	41
3.4.17 PCR-analiza rezultatov in sekvenciranje.....	42
4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....	43
4.1 Kontrola izražanja SNORD116 v celični liniji HEK293 FlpIn SNORD116.....	43
4.2 Vzpostavitev metode za določanje interakcij med molekulami RNA .....	44

4.2.1 Obsevanje celic.....	44
4.2.2 Liza celic in izolacija molekul RNA iz celičnega lizata.....	44
4.2.3 Delna razgradnja molekul RNA .....	46
4.2.4 2D-elektroforeza.....	47
4.2.5 Proksimalna ligacija in prekinitev kovalentne povezave, posredovane z AMT (t.i. »reverse crosslinking«) ter poliadenilacija.....	49
4.2.6 Bioanalyzer.....	50
4.2.7 Sinteza knjižnice cDNA .....	51
4.2.8 PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (GS-PCR).....	55
4.2.9 TA-kloniranje, transformacija s toplotnim šokom, pomnožitev in izolacija plazmidov.....	57
4.2.10 PCR-analiza plazmidov in sekvenciranje .....	57
5 SKLEP.....	60
6 LITERATURA.....	61
PRILOGE.....	65
Priloga 1: Rezultati q-PCR.....	65
Priloga 2: Rezultati analize z Bioanalyzer-jem.....	66
Priloga 3: Spektri in koncentracije plazmidne DNA .....	68

## POVZETEK

Nekodirajoče molekule RNA opravljajo številne biološke funkcije. Regulirajo lahko izražanje genov na nivojih transkripcije, procesiranja RNA in translacije ali nadzirajo modifikacije RNA. Sodelujejo pri sintezi telomernih odsekov na DNA in metilaciji DNA ter histonov. Poleg tega tudi ščitijo genom pred tujimi nukleinskimi kislinami, kot so virusne nukleinske kisline in transpozoni. Svojo funkcijo večinoma opravljajo preko baznega parjenja s tarčnimi nukleinskimi kislinami, za njeno razumevanje pa je potrebno poznavanje njihovih interakcijskih partnerjev. V magistrski nalogi smo se osredotočili na vzpostavitev metode za detekcijo interakcij med molekulami RNA na treh človeških celičnih linijah (NTERA-2, HEK293 FlpIn z vstavljeno ekspresijsko kaseto za človeško malo nukleolarno RNA (snoRNA) SNORD116 in SH-SY5Y); eksperimentalni pristop smo osnovali na metodi, imenovani PARIS. Posebnost slednje sta stabilizacija interakcije med molekulama RNA s tvorbo reverzibilne kovalentne vezi preko molekule 4'-aminometiltrioksalena ob obsevanju z UV-svetlobo valovne dolžine 365 nm in proces 2D-elektroforeze, s katerim pomembno obogatimo premrežene dvoverižne RNA. Pripravo knjižnice hibridnih cDNA omogočita reakcija proksimalne ligacije, ki molekuli RNA v interakciji poveže v hibridno molekulo, in prekinitve reverzibilne prečne kovalentne vezi. Pri pripravi knjižnic cDNA smo preizkusili dva pristopa. Prvi je temeljil na reakciji reverzne transkripcije z začetnim oligonukleotidom oligo(dT), s katero smo uvedli univerzalni adapter na 5'-konec cDNA, *in vitro* transkripcije za linearno pomnožitev hibridnih molekul in sledeči ligaciji 3'-adapterja, drugi pa na uporabi komercialnega kompleta *SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit*. Slednji pristop se je izkazal za učinkovitega, saj smo z njim uspešno izvedli validacijo pripravljene knjižnice: s pari začetnih oligonukleotidov, specifičnih za znane pare snoRNA-rRNA, smo v reakciji PCR pomnožili hibridne konstrukte in potrdili njihovo identiteto s sekvenciranjem. Predvidevamo, da so za neuspeh prvega pristopa krivi njegova dolgotrajnost, več korakov čiščenja in posledično več možnih mest izgub materiala ter nizka diverzitetna knjižnice zaradi nekvantitativne ligacije adapterja. Kasneje smo s pomočjo konstantnih robnih zaporedij in poznane strukture molekule SNORD116 z metodo PCR skušali identificirati partnerske RNA te snoRNA-sirote, vendar smo bili pri tem neuspešni. Predvidevamo, da je razlog v nizki diverziteti knjižnice in neoptimalni izvedbi verižne reakcije s polimerazo s kratkimi začetnimi oligonukleotidi.

**Ključne besede:** interakcije med molekulami RNA, metoda PARIS, 4'-aminometiltrioksalen, snoRNA, SNORD116



## ABSTRACT

Noncoding RNA molecules accomplish a remarkable variety of biological functions. They regulate gene expression at the level of transcription, RNA-processing and translation, and guide RNA modifications. Furthermore, they participate in the synthesis of the telomeric DNA repeats and DNA and histone methylation. Noncoding RNAs also protect the genome from foreign nucleic acids such as viral nucleic acids and transposons. They usually perform their function by base-pairing with target nucleic acids, and to understand their role one must identify their interacting partners. The aim of this master's thesis was to develop a method for detection of RNA-RNA interactions, which we performed on three human cell lines (NTERA-2, HEK293 FlpIn stably transfected with an expression cassette for small nucleolar RNA (snoRNA) SNORD116, and SH-SY5Y); the experimental procedure was based on a method, called PARIS. The characteristic of this method is UV cross-linking (365 nm) in the presence of 4'-aminomethyltrioxalen, that captures interactions between RNAs, followed by a 2D electrophoresis that significantly enriches the sample for cross-linked RNAs. Proximity ligation, performed to ligate RNA molecules into hybrid RNAs, and reverse cross-linking enable cDNA library preparation. We have tested two approaches for library preparation. First was based on reverse transcription with oligo(dT) primer which introduced a universal 5' adapter on the cDNA molecules. Reverse transcription was followed by linear amplification by *in vitro* transcription and 3' adapter ligation. The second approach was based on a commercial SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit. The latter approach has proved to be more effective since we have successfully performed library validation: we used specific primers for known snoRNA-rRNA pairs, amplified hybrid molecules with PCR and confirmed their identity by sequencing. We assume the first approach was not successful because of its length and several gel purification steps that likely led to material loss. Furthermore, the library diversity could have been low due to the non-quantitative adapter ligation. Library, prepared with the second approach, was subsequently used in attempt to identify partner RNAs of the SNORD116, using constant flanking sequences and known structure of this snoRNA-orphan. However, the attempt was not successful. We assume the reason lies in low library diversity and non-optimal implementation of the polymerase chain reaction with short primers.

**Key words:** RNA-RNA interactions, PARIS method, 4'-aminomethyltrioxalen, snoRNA, SNORD116

## SEZNAM OKRAJŠAV

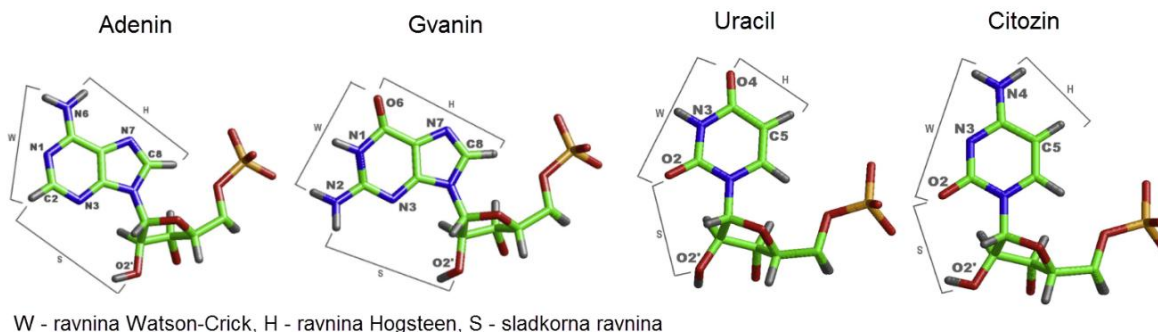
<b>AMT</b>	4'-aminometiltrioksalen
<b>CLASH</b>	metoda tvorbe prečne vezi, ligacije in sekvenciranja hibridov (angl. <i>Cross-linking, Ligation and Sequencing of Hybrids</i> )
<b>CLIP</b>	metoda tvorbe prečne vezi in imunoprecipitacije (angl. <i>Cross-linking and Immunoprecipitation</i> )
<b>GS-PCR</b>	PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (angl. <i>gene-specific PCR</i> )
<b>H</b>	ravnina Hogsteenovega baznega parjenja nukleotidov
<b>hiCLIP</b>	metoda tvorbe prečne vezi med hibridi molekul RNA z resolucijo posameznega nukleotida in imunoprecipitacije (angl. <i>RNA Hybrid and Individual-Nucleotide Resolution UV Cross-linking and Immunoprecipitation</i> )
<b>IVT</b>	<i>in vitro</i> transkripcija
<b>LD-PCR</b>	PCR na dolge razdalje (angl. <i>long-distance PCR</i> )
<b>LIGR-seq</b>	metoda ligacije molekul RNA v interakciji in visoko-zmogljivostnega sekvenciranja (angl. <i>Ligation of Interacting RNA and High-throughput Sequencing</i> )
<b>MARIO</b>	<i>in vivo</i> kartiranje interaktoma molekul RNA (angl. <i>Mapping RNA Interactome in vivo</i> )
<b>ncRNA</b>	nekodirajoča molekula RNA (angl. <i>non-coding RNA</i> )
<b>NF-H<sub>2</sub>O</b>	voda brez nukleaz (angl. <i>nuclease-free water</i> )
<b>PAGE</b>	poliakrilamidna gelska elektroforeza
<b>PARIS</b>	metoda analize interakcij in struktur RNA s pomočjo psoralena (angl. <i>Psoralen Analysis of RNA Interactions and Structures</i> )
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>qPCR</b>	reakcija PCR v realnem času (angl. <i>quantitative PCR, real-time PCR</i> )
<b>RAP</b>	metoda protismiselnega ujetja RNA (angl. <i>RNA Antisense Purification</i> )
<b>RAP-MS</b>	metoda protismiselnega ujetja RNA, združena z masno spektrometrijo (angl. <i>RNA Antisense Purification – Mass Spectrometry</i> )
<b>RBP</b>	RNA-vezavni protein
<b>RIP</b>	metoda imunoprecipitacije molekul RNA (angl. <i>RNA Immunoprecipitation</i> )
<b>RISC</b>	z RNA induciran utiševalni kompleks (angl. <i>RNA-induced silencing complex</i> )

<b>RNP</b>	ribonukleoproteinski kompleks
<b>RT</b>	reverzna transkripcija
<b>S</b>	sladkorna ravnina baznega parjenja nukleotidov
<b>sCLIP</b>	poenostavljena metoda tvorbe prečne vezi z imunoprecipitacijo (angl. <i>Simple Cross-linking and Immunoprecipitation</i> )
<b>snoRNA</b>	mala nukleolarna RNA (angl. <i>small nucleolar RNA</i> )
<b>SPLASH</b>	metoda sekvenciranja s psoralenom premreženih, ligiranih in izbranih hibridnih molekul (angl. <i>Sequencing of Psoralen-crosslinked, Ligated, and Selected Hybrids</i> )
<b>T<sub>m</sub></b>	talilna temperatura verige (angl. <i>Melting Temperature</i> )
<b>W</b>	Watson-Crickova ravnina baznega parjenja nukleotidov

# 1 UVOD

## 1.1 Interakcije med molekulami RNA

Osnovni gradniki nukleinskih kislin so nukleotidi, ki preko vodikovih vezi dušikovih baz (adenin (A), gvanin (G), uracil (U), timin (T) in citozin (C)) vstopajo v interakcije s komplementarnimi nukleotidi. Tvorijo se lahko intramolekularne vodikove vezi, ki vplivajo na zvitje polimera, ali intermolekularne vodikove vezi, ki so osnova interakcijam med molekulami nukleinskih kislin (DNA-DNA, RNA-RNA ali DNA-RNA). Za specifično interakcijo so običajno potrebne 1-3 vodikove vezi.<sup>1,2</sup> Purinske in pirimidinske baze v nukleotidih imajo tri ravnine, preko katerih lahko tvorijo vodikove vezi s svojimi partnerji. Te ravnine so: Watson-Crickova (W), Hoogsteenova (H) in sladkorna (S) ravnina (**Slika 1**). Hkrati so lahko bazni pari v *cis* ali *trans* obliki glede na usmeritev pentoze na vodikove vezi. Na podlagi teh razlik sta Leontis in Westhof bazne pare razdella v 12 družin: *cis* W:W, *trans* W:W, *cis* W:H, *trans* W:H, *cis* W:S, *trans* W:S, *cis* H:H, *trans* H:H, *cis* S:S, *trans* S:S, *cis* S:H in *trans* S:H.<sup>2,3</sup>



**Slika 1:** Ravnine baznega parjenja nukleotidov. Prirejeno po <sup>2</sup>.

V posamezni družini so si bazni pari med seboj izosterični, kar pomeni, da so položaji in razdalje med ogljikovim atomom C1 zelo podobne in je lahko bazni par zamenjan z drugim brez vpliva na zvitje in funkcijo nukleinske kisline.<sup>1</sup> V molekulah DNA prevladujejo kanonični oziroma Watson-Crickovi bazni pari, in sicer se A pari s T ter G s C. Molekule RNA imajo podobne kanonične bazne pare, in sicer A-U in G-C.<sup>2,3</sup> Poleg kanoničnih Watson-Crickovih parov pa se pri molekulah RNA pogosto srečamo tudi s številnimi nekanoničnimi, kar pomembno vpliva na raznolikost struktur in interakcij molekul RNA.<sup>2</sup>

Poleg baznega parjenja na strukturo in interakcije molekul RNA pomembno vplivajo tudi RNA-vezavni proteini (RBP). To so proteini, ki vežejo molekule RNA in z njimi tvorijo

ribonukleoproteinske komplekse (RNP). Prepoznavajo lahko tako primarno kot sekundarno strukturo in sodelujejo pri korakih posttranskripcijskih modifikacij molekul RNA, kot so alternativno izrezovanje, uravnavanje celičnih nivojev molekul mRNA, transport med celičnimi razdelki, alternativna poliadenilacija, nukleolitično procesiranje, modifikacija dušikovih baz (npr. deaminacija adenina) ali riboze (npr. metilacija), itd.<sup>4</sup> Vsi ti procesi odločajo o usodi posamezne molekule RNA, o njeni (de)stabilizaciji, celični lokalizaciji in (v primeru mRNA) posledično uravnavajo proces translacije.<sup>5</sup>

## 1.2 Pomen interakcij

Centralna dogma molekularne biologije trdi, da se genska informacija preko molekul RNA prevede v proteine. Vendar so analize so pokazale, da se prepíše veliko večji del genoma (do 90 %), kot se ga potem prevede v proteine (le 1,5-3 %).<sup>6-9</sup> Približno 98 % vseh prepisov pri ljudeh in drugih sesalcih tako predstavljajo molekule RNA, ki ne kodirajo proteinov in jih imenujemo nekodirajoče (ncRNA).<sup>8,9</sup> Včasih so mislili, da so nekodirajoča zaporedja odvečna in so se tekom evolucije obdržala pomotoma. Poleg tega je veljalo, da so takšne molekule RNA nestabilne.<sup>8</sup> Danes pa vemo, da je veliko nekodirajočih RNA stabilnih tako v evkariontskih kot prokariontskih celicah, kar nakazuje njihovo potencialno vlogo.<sup>8</sup>

ncRNA opravljajo številne biološke funkcije. Regulirajo lahko izražanje genov na nivojih transkripcije, procesiranja RNA in translacije ali nadzirajo modifikacije RNA. Sodelujejo pri sintezi telomernih odsekov na DNA in metilaciji DNA ter histonov. Nadalje ščitijo genom pred tujimi nukleinskimi kislinami.<sup>10</sup> Pri tem običajno delujejo kot adapterji, ki vežejo tarčno nukleinsko kislino in jo postavijo v prostoru tako, da lahko partnerski protein opravi svojo encimsko funkcijo.<sup>7</sup> Večina, vendar ne vse, pri svojem delovanju izkoriščajo moč baznega parjenja (običajno imamo opraviti z le kratkim območjem (nepopolne) komplementarnosti) in selektivno vežejo tarčne molekule.<sup>10</sup> Poleg baznega parjenja s svojo tarčo lahko regulatorne molekule RNA delujejo tudi preko vpliva na aktivnost partnerskega proteina. Čeprav natančnih mehanizmov v večini primerov še ne poznamo, predvidevajo, da takšne RNA delujejo s posnemanjem nukleinskih kislin, ki običajno vstopajo v interakcijo s proteinom.<sup>11</sup>

Proces translacije lahko porabi tudi do 40 % celične energije, zato mora biti izražanje genov natančno regulirano na več nivojih. Običajno gre za regulacijo z regulatornimi proteini in ncRNA.<sup>12</sup> Veliko do danes ovrednotenih regulatornih molekul RNA se prepisuje med specifičnimi razvojnimi

stopnjami ali pod stresnimi pogoji. Te molekule lahko predstavljajo prednost v pogojih, ko so viri omejeni, saj celica potrebuje manj energije in časa, da sintetizira kratko molekulo RNA kot pa enakovreden protein.<sup>13</sup> Ker je delovanje večine molekul RNA osnovano na baznem parjenju, tudi kratke molekule RNA vsebujejo zadostno informacijo za ciljanje specifične tarče, hkrati pa so bolj kompaktne in energijsko učinkovitejše kot proteinski regulatorji.<sup>8,13</sup> Poleg tega delujejo številne nekodirajoče RNA na postranskripcijskem nivoju, kar omogoča hitrejši odziv na spremembe v celičnem okolju.<sup>13</sup> Napisano govori v prid ncRNA kot regulatornim molekulam in najbrž odkriva globalno funkcijo ncRNA in vzrok za njihovo evolucijsko ohranitev.

### **1.3 Primeri interakcij med molekulami RNA preko baznega parjenja**

#### **1.3.1 RNA-interferenca**

RNA-interferenca je proces, pri katerem mala interferenčna RNA (siRNA) ali mikro RNA (miRNA) preko baznega parjenja s tarčno mRNA usmerja njeno razgradnjo ali ustavi translacijo.<sup>14,15</sup> Popolna komplementarnost vodi v razgradnjo mRNA, delna komplementarnost pa zaustavi translacijo.<sup>11,15,16</sup> Pri procesu RNA-interference encim Dicer (RNaza III, specifična za dvoverižno RNA) v citosolu razgradi dvoverižno RNA v 21-25 nukleotidov (nt) dolge fragmente. Proteinski kompleks RISC (z RNA induciran utiševalni kompleks, angl. *RNA-induced silencing complex*) loči verigi in sproži bazno parjenje s tarčnimi RNA. To privede do razgradnje tarčne RNA z Argonaut-om, enim od proteinov v kompleksu RISC, ali do zaustavitve translacije zaradi steričnega oviranja encima.<sup>8,11,17-19</sup> Proces RNA-interference celice ščiti pred tujo RNA (virusi in transpozoni) ter uravnava izražanje endogenih genov. Interakcije miRNA s tarčnimi molekulami mRNA poleg posttranskripcijske zaustavitve izražanja genov vodijo tudi do večje natančnosti pri izražanju genov, saj je omogočajo uravnavanje izražanja genov na dveh nivojih, najprej s transkripcijskim dejavnikom na nivoju transkripcije in nato še posttranskripcijsko z miRNA.<sup>14</sup> Nekatere miRNA tudi uravnavajo izražanje samih transkripcijskih dejavnikov.<sup>19</sup> Posamezna molekula miRNA lahko deluje na več tarčnih mRNA, hkrati pa lahko na eno tarčno molekulo mRNA deluje več različnih miRNA, kar vodi v nastanek obsežnih in zapletenih regulatornih mrež.<sup>19</sup>

#### **1.3.2 Intronsko izrezovanje**

Male jedrne RNA (snRNA) so majhna skupina ncRNA, ki jih najdemo v nukleoplazmi. Sodelujejo pri izrezovanju intronov iz pre-mRNA (t.i. primarnih transkriptov) na spajalnih telescih oziroma

spliceosomih.<sup>7</sup> Ti so veliki, dinamični kompleksi, sestavljeni iz petih snRNA (U1, U2, U4, U5 in U6 (t.i. *major spliceosome*) ali U11, U12, U4atac, U6atac in U5 (t.i. *minor spliceosome*)) ter številnih sodelujočih proteinov.<sup>20</sup> Natančno izrezovanje intronskih zaporedij v spliceosomu je vodeno z baznim parjenjem snRNA s tarčno pre-mRNA na spojih intronov z eksoni.<sup>7</sup>

### 1.3.3 Vodenje modifikacij na drugih molekulah RNA

Male nukleolarne RNA (snoRNA) so ncRNA, ki jih pretežno najdemo v jedrcu, področju jedra, kjer nastajajo ribosomske podenote. Sodelujejo pri procesiranju in kemijskih modifikacijah tarčnih molekul RNA, npr. v centru peptidil transferaze pri ribosomskih RNA (rRNA).<sup>7</sup> Razdelimo jih na C/D-snoRNA, ki vodijo metilacijo na 2'O-ribozi, in na H/ACA-snoRNA, ki vodijo pseudouridilacijo (izomerizacijo uridina do pseudouridina).<sup>7,8,21-24</sup> snoRNA z baznim parjenjem prepoznajo specifično zaporedje na tarčni molekuli in tvorijo kalup, kamor se nato vežejo partnerski proteini, ki izvedejo modifikacijo tarčne molekule.<sup>8,22,24</sup> So izjemnega pomena za normalno delovanje ribosomov in spliceosomov, saj delujejo na rRNA in snRNA ter vplivajo na njihovo zvitje in interakcije s partnerskimi proteini. Mnoge snoRNA se diferencialno izražajo glede na celični tip, razvojni status in okoljske dejavnike.<sup>8,24</sup> Pred kratkim so odkrili tkivno-specifične snoRNA, ki jih imenujemo sirote, saj ne izkazujejo komplementarnosti do konvencionalnih tarč, kot so rRNA in snRNA.<sup>22,24</sup> Vloge teh snoRNA še ne poznamo, a zanje predvidevajo številne nekanonične funkcije, kot so regulacija urejanja mRNA (angl. *RNA editing*, tj. posttranskripcijske modifikacije dušikovih baz RNA) in/ali alternativnega izrezovanja ter posttranskripcijsko utišanje tarčnih genov.<sup>24</sup> Vse več dokazov nakazuje tudi, da lahko iz molekul snoRNA nastajajo nove regulatorne vrste RNA, kot so miRNA in RNA, ki interagirajo s proteini Piwi (piRNA).<sup>22,24,25</sup>

### 1.4 Preučevanje interakcij med molekulami RNA

Za boljše razumevanje delovanja ncRNA je nujno poznavanje njihovih interakcijskih partnerjev, vendar kompleksnost struktur, velikost in dinamičnost molekul RNA otežujejo preučevanje.<sup>26,27</sup> Tako eksperimentalni kot bioinformatični pristopi preučevanja interakcij med molekulami RNA imajo svoje prednosti in slabosti. Prvi so dragi in zahtevni, drugi pa hitri in poceni. Pri tem pristopi *in silico* ponudijo le verjetne interakcije RNA-RNA, eksperimentalni pristopi pa jih lahko potrdijo, a so hkrati omejeni na že poznane molekule RNA (izjema so novejša tehnika za identifikacijo interakcij tipa RNA-RNA, opisane spodaj). Zaradi omenjenih omejitev nobenega od pristopov ne moremo uporabiti samega zase.<sup>11,15</sup>

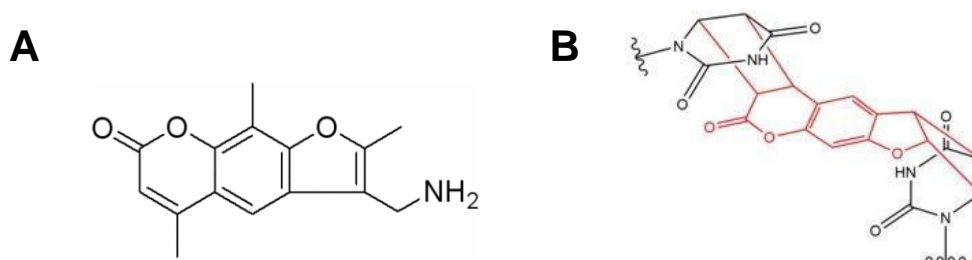
Za napoved interakcij med molekulami RNA pristopi *in silico* uporabijo podobne algoritme kot pri napovedi sekundarne strukture molekul RNA. Interakcije iščejo z naborom Watson-Crickovih baznih parov in najpogostejših nekanoničnih baznih parov, ki funkcionalno ustrezajo strukturi molekule oziroma interakciji, ki jo iščemo.<sup>21</sup> Slabost pristopov *in silico* je v tem, da so iz iskanja izključene »cis-kodirane« protismiselne RNA (tj. protismiselni transkripti tarčnih genov) in vrstno specifične ncRNA, ki so slabše ohranjene med različnimi vrstami, saj se te metode praviloma močno zanašajo na evolucijsko ohranitev zaporedij.<sup>11</sup> Bioinformatični algoritmi imajo dokaj visok delež lažno pozitivnih napovedi (v nekaterih primerih celo več kot 50 %).<sup>15</sup> Poleg tega je bioinformatična napoved interakcij dokaj nezanesljiva, saj so v baznem parjenju dovoljene določene »napake« (tj. nepopolna komplementarnost, angl. *mismatches*) in ker so odseki, ki so komplementarni s tarčno molekulo, običajno kratki. Posledično je eksperimentalna potrditev interakcij ncRNA s partnerskimi proteini in/ali tarčnimi molekulami RNA nujno potrebna za razumevanje njihovega delovanja.<sup>15,22,24</sup> Vendar tudi eksperimentalna določitev interakcij ncRNA ni enostavna. Do pred kratkim so bile ncRNA pogosto spregledane, predvsem zato, ker jih je bilo težko odkriti *de novo*. Težava je tudi v tem, da gre običajno za kratkotrajne in šibke interakcije, ki se med izolacijo hitro prekinejo, poleg tega pa se med izolacijo tvorijo številne nespecifične interakcije, ki dajo lažno pozitivne rezultate. Preučevanje dodatno otežujejo kompleksne in daljnosežne strukture, kot so npr. psevdovozli (angl. *pseudoknots*). Omenjene strukture se večinoma raztezajo preko 200 nt, lahko pa tudi preko 1000 nt.<sup>28</sup> To predstavlja dodatno omejitev, saj lahko večina eksperimentalnih in računalniških metod identificira interakcije le na ožjem območju (običajno gre za interakcije do 200 nt).<sup>28</sup>

Preučevanje interakcij med molekulami RNA se je začelo z iskanjem molekul RNA, ki se vežejo na določen protein, kasneje pa so se eksperimentalne tehnike specializirale tudi na iskanje (neposrednih) interakcij RNA-RNA. Prvi napredek pri razvoju eksperimentalnih tehnik za preučevanje interakcij med RNA je predstavljala uporaba imunoprecipitacije za identifikacijo na proteine vezanih RNA. Metoda se imenuje RIP (metoda imunoprecipitacije molekul RNA, angl. *RNA Immunoprecipitation*) in je združena z analizo izoliranih RNA na mikromrežah (oz. kasneje s sekvenciranji nove generacije (NGS)). Ena izmed omejitev je slaba resolucija rezultatov, saj izoliramo celotne RNA, ne določimo pa posameznih nukleotidov, ki vstopajo v interakcijo.<sup>29</sup> Poleg tega smo omejeni na stabilne ribonukleoproteinske delce, ki so nagnjeni h kontaminaciji z indirektnimi ali nefiziološkimi interakcijami. Glavna omejitev vseh metod z imunoprecipitacijo je odvisnost od poznavanja proteinskega partnerja, saj potrebujemo za izolacijo visoko specifična



protitelesa proti temu proteinu.<sup>29</sup> Pomemben preboj se je zgodil leta 2003, ko so Darnell in sodelavci razvili metodo CLIP (metoda tvorbe prečne vezi in imunoprecipitacije, angl. *Cross-linking and Immunoprecipitation*), ki izkorišča lastnost UV-svetlobe, da s kovalentno vezjo prečno poveže proteine in molekule RNA v živih celicah.<sup>30,31</sup> Tvorba kovalentne vezi omogoči ujetje interakcije med RNA in proteinom in izolacijo pod strožjimi pogoji, kar zmanjša delež nespecifičnih interakcij.<sup>30–32</sup> Slabost metode CLIP je slaba resolucija rezultatov, kar so skušale odpraviti številne kasnejše izpeljanke te metode.<sup>14</sup> Vse te tehnike detektirajo interakcije protein-RNA, vendar lahko njihovi rezultati pomagajo tudi pri bioinformatičnih napovedih interakcij med molekulami RNA (tj. interakcij RNA-RNA).<sup>14,31</sup> Ena od izpeljank metode CLIP, metoda hiCLIP, ki je opisana v nadaljevanju, pa je bila prirejena za detekcijo interakcij med molekulami RNA.

Poleg UV-svetlobe lahko za stabilizacijo interakcije v celici uporabimo različne premreževalne reagente, kot so formaldehid, disukcinimidil glutarat, psoralen in derivati.<sup>33</sup> Pri uporabi formaldehida se tvori kovalentna vez med proteini in med proteini ter nukleinskimi kislinami. Disukcinimidil glutarat poveže proteine v interakciji, psoralen in derivati pa so uporabni za detekcijo interakcij med molekulami RNA.<sup>33</sup> Psoralenske molekule se interkalirajo med verigi dvovertižne strukture in ob obsevanju z UV-svetlobo tvorijo reverzibilno kovalentno vez.<sup>26</sup> Eden od psoralenskih derivatov je vodotopni 4'-aminometiltrioksalen (AMT) (**Slika 2A**). Pri obsevanju z UV-svetlobo valovne dolžine 365 nm poveže nukleotida v baznem paru v svoji neposredni bližini (**Slika 2B**). Prednost tvorbe takšne kovalentne vezi je njena reverzibilnost ob obsevanju z UV-svetlobo valovne dožine 254 nm. Do tvorbe vezi pride predvsem pri pirimidinskih bazah (timin, uracil), kar vodi v pristranskost do analize interakcij med RNA, ki imajo v svojem zaporedju več uracilov.<sup>34–36</sup> AMT uporabljajo metode SPLASH, PARIS in LIGR-seq, ki so podrobneje opisane v nadaljevanju.<sup>34,37</sup>

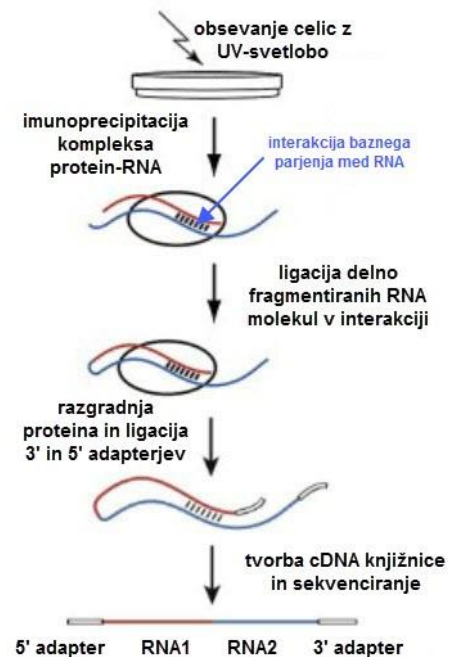


**Slika 2:** Struktura molekule 4'-aminometiltrioksalena (AMT), vodotopnega derivata psoralena (**A**), in dveh uracilov na nasprotnih verigah RNA, kovalentno povezanih s psoralenom (**B**). Prirejeno po<sup>38,39</sup>.

### 1.4.1 CLASH

Metoda CLASH (metoda tvorbe prečne vezi, ligacije in sekvenciranja hibridov, angl. *Crosslinking, Ligation, and Sequencing of Hybrids*) je osnovana na zgoraj omenjeni metodi CLIP, ki so ji dodali ligacijski korak. Ta omogoči izolacijo RNA molekul skupaj z njihovimi tarčami. Metoda je bila že uporabljena za izolacijo miRNA skupaj z njenim tarčami, kartiranje interakcij med snoRNA in rRNA ter analizo sekundarne strukture snRNA pri kvasovkah.<sup>27,31,40</sup> Združuje dve eksperimentalni strategiji: tvorbo prečne kovalentne vezi med proteinom in RNA z obsevanjem z UV-svetlobo in imunoprecipitacijo kompleksa ter ligacijo molekul RNA v interakciji znotraj RNP v hibridne RNA-molekule.<sup>41</sup> Ključni korak metode je ligacija, ki poveča učinkovitost protokola in delež hibridnih RNA v rezultatih.<sup>31</sup> Shematski prikaz metode je prikazan na **Sliki 3**.

**Slika 3:** Shematski prikaz metode CLASH. Celice obsevajo z UV-svetlobo valovne dolžine 254 nm, da se tvori kovalentna vez med proteini in RNA. Sledi imunoprecipitacija kompleksov in delna razgradnja RNA (RNaza A in RNaza T1) na krajše fragmente (deli RNA, vezani v kompleks RNP, niso dostopni za encimsko razgradnjo). Molekuli RNA v interakciji preko baznega parjenja povežejo skupaj v reakciji proksimalne ligacije (T4 RNA-ligaza). Protein v kompleksu razgradijo (proteinaza K) in na hibridne RNA ligirajo adapterja za sintezo knjižnice cDNA. Sledita sinteza knjižnice cDNA (reverzna transkripcija in pomnožitev s PCR) ter sekvenciranje. Prirejeno po<sup>40,42</sup>.



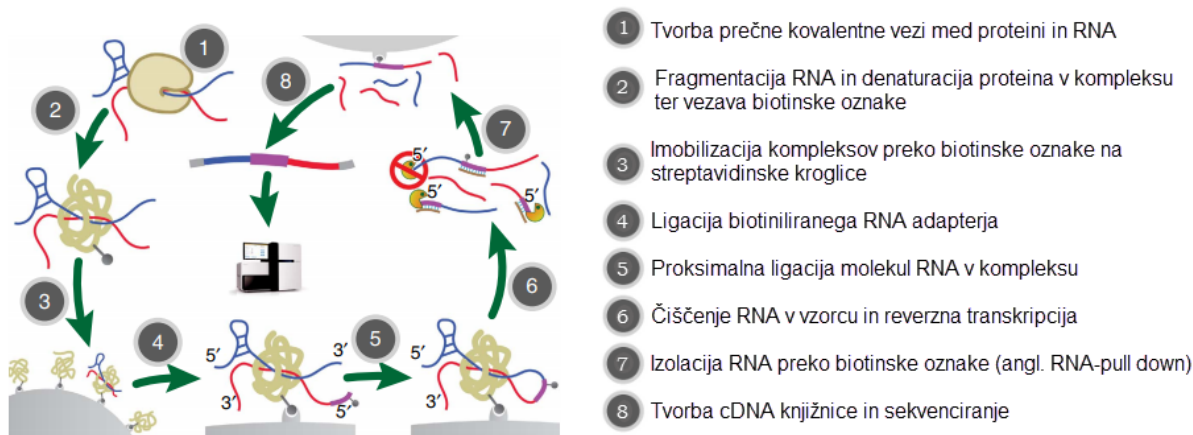
Prednosti metode CLASH so nizek signal ozadja zaradi ostrih pogojev izolacije kompleksov protein-RNA, nepristranskost določitve interakcij zaradi neodvisnosti od bioinformatičnih napovedi in možnost analize celotnega transkriptoma (npr. miRNA-interaktoma), kar zmanjša potrebna sredstva in čas.<sup>31,41</sup>

Slabosti metode sta vprašljivi učinkovitost tvorbe prečne vezi in stabilnost interakcij med partnerskima molekulama RNA preko baznega parjenja do reakcije ligacije. Hkrati se lahko po lizi celic tvorijo nespecifične interakcije.<sup>31</sup> Da bi zmanjšali ozadje, lahko uporabimo denuracijsko sredstvo (npr. 6 M gvanidinijev hidroklorid), vendar s tem žrtvujemo tudi del fizioloških interakcij in smo pristranski do bolj stabilnih interakcij.<sup>31</sup> Poleg tega je protokol metode CLASH dolgotrajen

in vsebuje malo korakov, v katerih lahko spremljamo potek.<sup>31,41</sup> Kot izpeljanka metode CLIP tudi metoda CLASH temelji na prisotnosti označenega proteina v celici (gre za ektopično izražen tarčni protein, označen s peptidnim zaporedjem FLAG-tag ali His-tag) in ne zazna molekul RNA, ki niso vezane na protein.<sup>31,37</sup> Slabost je tudi slaba učinkovitost ligacije molekul RNA v kompleksu, kar so skušale odpraviti kasnejše metode.<sup>31</sup>

#### 1.4.2 MARIO

MARIO (*in vivo* kartiranje interaktoma molekul RNA, angl. *Mapping RNA Interactome in vivo*) je metoda za detekcijo interakcij RNA-RNA, lahko pa jo uporabimo tudi za detekcijo prostorsko bližnjih interakcij, ki so ključne za zvitje molekul RNA. Pri detekciji interakcij med RNA nismo omejeni na poznavanje sodelujočega proteina, kot smo pri metodi CLIP in izpeljankah, kar omogoči povsem neodvisno preučevanje RNA-interaktoma.<sup>43</sup> Metoda temelji na tvorbi prečne kovalentne vezi preko (različnih) vezavnih proteinov z uporabo formaldehida in etilglikol bis(sukcimidil sukcinata). Molekuli RNA, ki sta v interakciji, povežemo z biotiniliranim povezovalcem in dobimo hibridno RNA. Biotinska oznaka omogoči stroge pogoje izolacije na streptavidinskih kroglicah.<sup>43</sup> Shematski prikaz metode je prikazan na **Sliki 4**.



**Slika 4:** Shematski prikaz metode MARIO. Med proteinom in molekulami RNA s pomočjo formaldehida in etilglikol bis(sukcimidil sukcinata) tvorijo prečno kovalentno vez, ki stabilizira interakcijo. Po lizi celic sledi delna razgradnja RNA na krajše fragmente (RNaza I – pusti 5'-hidroksilno in 3'-fosfatno skupino, ki preprečita neželene ligacije RNA). Po denaturaciji proteinov vežejo biotinsko oznako na cisteinske aminokislinske preostanke, kar omogoči vezavo kompleksov na streptavidinske kroglice in spiranje za odstranitev nespecifično vezanih RNA in proteinov. Na 5'-konec RNA vežejo biotinilirani RNA-adapter, ki bo omogočil kasnejšo obogatitev ligiranih RNA.

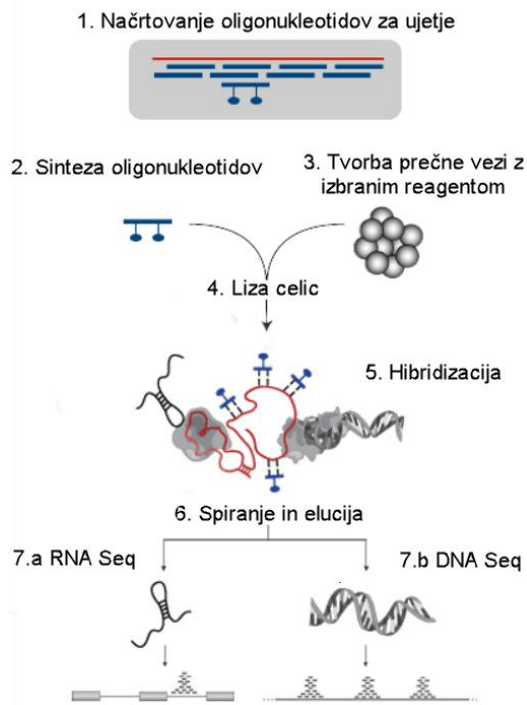
*Sledi proksimalna ligacija (T4 RNA-ligaza) molekul RNA v hibridne RNA-molekule. Po čiščenju in reverzni transkripciji sledi izolacija hibridnih molekul s pomočjo interakcije med biotiniliranim adapterjem in streptavidinom (angl. pull-down). Nato pripravijo knjižnico cDNA z uporabo cirkularizacije, ki omogoči sintezo knjižnice tudi za okrnjene molekule (nepopolno prepisane molekule zaradi nedokončanega procesa reverzne transkripcije zaradi ustavitve encima na vezanem polipeptidu) in jo sekvencirajo. Prirejeno po<sup>43</sup>.*

Prednosti metode MARIO so dobra občutljivost in specifičnost ter nizka stopnja lažnih rezultatov. Poleg tega metoda ni omejena na poznavanje sidrnih proteinov, ki sodelujejo v interakciji.<sup>43</sup>

Slabost metode je, da lahko premrežen proteinski kompleks zakrije molekulo RNA in jo naredi manj dostopno za RNA-ligazo, ki je potrebna za tvorbo hibridnega RNA-produkta. Posledično pa v rezultatih ne dobimo vseh interakcij.<sup>43</sup> Dodatna slabost je tudi, da lahko identificiramo pare molekul RNA, ki so v celici istočasno vezane na določen RBP, vendar med seboj ne vstopajo v neposredno interakcijo.

### **1.4.3 RAP**

RAP (metoda protismiselnega ujetja RNA, angl. *RNA Antisense Purification*) je metoda za detekcijo tudi manj zastopanih interakcij RNA-RNA, ki so jo najprej razvili za preučevanje interakcij DNA-RNA. Posebnost metode v primerjavi s podobnimi tehnikami je uporaba relativno dolgih, okrog 120 nt dolgih komplementarnih biotiniliranih oligonukleotidov, ki se raztezajo čez celotno tarčno RNA. To omogoči ostre pogoje čiščenja in visoko specifičnost metode.<sup>44,45</sup> Z uporabo različnih reagentov za tvorbo prečne kovalentne vezi lahko razlikujemo med direktnimi in indirektnimi interakcijami.<sup>46</sup> Za detekcijo direktnih interakcij uporabljamo psoralene, za detekcijo indirektnih interakcij pa je uporabljen formaldehid (omogoča tvorbo kovalentnih vezi med RNA in proteini).<sup>45,46</sup> V primeru da je v kompleksu RNP prisotnih več različnih proteinskih komponent in želimo detektirati indirektne interakcije RNA-RNA (takšne, posredovane s proteini) pa lahko kot premreževalec uporabimo tudi kombinacijo formaldehida in disukcinimidil glutarata.<sup>46</sup> Potek metode RAP je prikazan na **Sliki 5**.



**Slika 5:** Shematski prikaz metode RAP. Prvi korak metode je načrtovanje komplementarnih oligonukleotidov (90-120 nt), s katerimi »ujamejo« tarčne RNA. Oligonukleotidne sonde nosijo biotisko oznako. V celicah z izbranim reagentom (glede na interakcije, ki so predmet zanimanja) tvorijo prečno kovalentno vez in celice lizirajo. Vzorcem dodajo biotinizirane oligonukleotide in izolirajo iskano RNA na streptavidinskih kroglicah. Zaradi močne interakcije hibridizacije med molekulami RNA in sinteznimi oligonukleotidnimi sondami ter močne interakcije streptavidin-biotin lahko uporabijo strožje pogoje spiranja in s tem odstranijo nespecifične interakcije. Sledi analiza izoliranih molekul RNA (oziroma DNA) s sekvenciranjem. Prirejeno po <sup>45</sup>.

Prednosti metode RAP so visoka resolucija in specifičnost rezultatov, ki jo omogočijo že omenjeni dolgi oligonukleotidi za hibridizacijo. Poleg tega je metoda zmožna razlikovati med hibridizacijskimi (tj. neposrednimi) interakcijami in interakcijami, pri katerih sodelujejo proteini.<sup>44-46</sup>

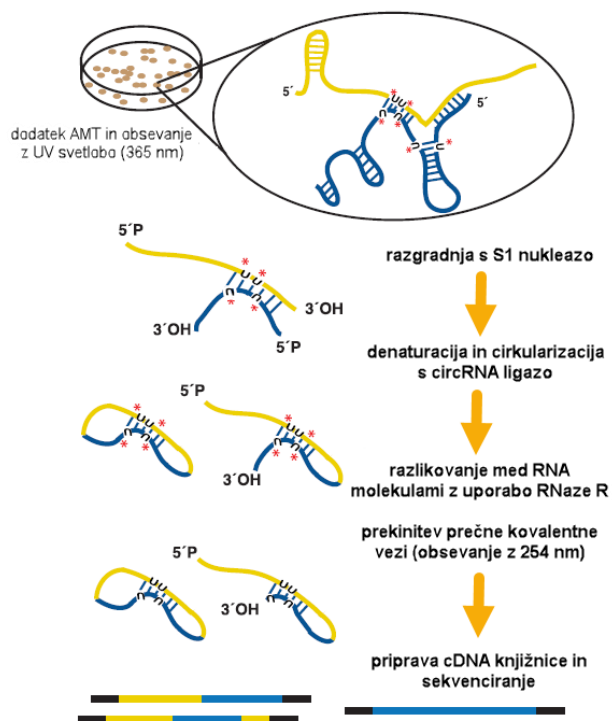
Slabost metode predstavlja potreba po poznavanju zaporedja tarčne RNA in sintezi ustreznih oligonukleotidnih sond.<sup>47</sup> Poleg tega metoda ni uporabna za kratke ncRNA, saj zaradi njihove dolžine ne moremo pripraviti komplementarnih oligonukleotidnih sond za uspešno ujetje RNA (angl. *RNA-pull down*).

Metodo lahko združimo z masno spektrometrijo (RAP-MS), kar nam omogoči identifikacijo direktnih in specifičnih proteinskih partnerjev določeni molekuli RNA. Pri tem za tvorbo prečne kovalentne vezi med RNA in proteinom uporabimo UV-svetlobo, nato pa RNA ujamemo z DNA-oligonukleotidi, označenimi z biotinom, kar omogoči ostre pogoje spiranja na streptavidinskih kroglicah.<sup>47</sup>

#### 1.4.4 LIGR-seq

LIGR-seq (metoda ligacije molekul RNA v interakciji in visoko-zmogljivostnega sekvenciranja, angl. *Ligation of Interacting RNA and High-throughput Sequencing*) je metoda za določanje interakcij RNA-RNA *in vivo*.<sup>48</sup> Temelji na tvorbi prečne kovalentne vezi z AMT in cirkularizaciji molekul RNA v dupleksu. Sledi razgradnja linearnih in višje strukturiranih RNA z encimom RNazo R, ki omogoči izolacijo le prečno povezanih RNA, kar pomembno obogati vzorec.<sup>48</sup> Omenjeni encim specifično razgradi linearne molekule RNA, ne pa tudi dvoverižnih ali cirkularnih molekul RNA. To omogoči razlikovanje med molekulami RNA, ki so bile v celici v interakciji, saj so se s circRNA-ligazo cirkularizirale, in preostalo RNA.<sup>48</sup> Potek metode je prikazan na **Sliki 6**.

**Slika 6:** Shematski prikaz metode LIGR-seq. Celice inkubirajo v prisotnosti AMT in obsevajo z UV-svetlobo valovne dolžine 365 nm, da se tvori prečna kovalentna vez med molekulama RNA v interakciji. Po lizi celic in izolaciji molekul RNA slednje delno razgradijo z encimom nukleazo S1, ki preferenčno razgradi enoverižne RNA in pusti primerne konce za kasnejšo ligacijo z encimom circRNA-ligazo. Po cirkularizaciji selektivno obogatijo iskane molekule RNA z encimom RNazo R. Sledi prekinitev reverzibilne kovalentne vezi preko AMT z obsevanjem z UV-svetlobo valovne dolžine 254 nm in priprava knjižnic cDNA za sekvenciranje. Prirejeno po<sup>48</sup>.



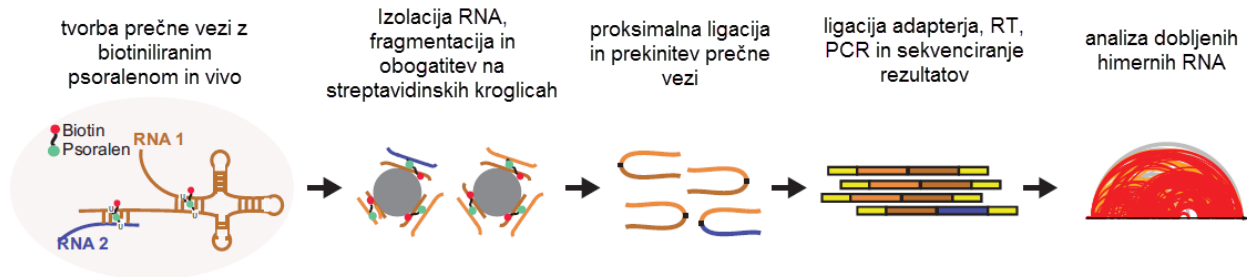
Prednosti metode LIGR-seq so njena hitrost, visoka specifičnost, nizka stopnja lažnih rezultatov in odsotnost potrebe po prehodnem poznavanju tarčne RNA ali proteina.<sup>48</sup>

Slabost metode je možna pristranskost pri tvorbi prečne kovalentne vezi z AMT in ligaciji, na kar lahko vplivajo dolžina fragmenta RNA, sestava in dostopnost duplesov ali prostih koncev razgrajenih RNA. Poleg tega metoda ni zmožna učinkovito detektirati kratkih ncRNA (npr. miRNA), saj nimajo dovolj dolgih prostih koncev za učinkovito ligacijo in jih je težko nedvoumno bioinformatično kartirati.<sup>48</sup>



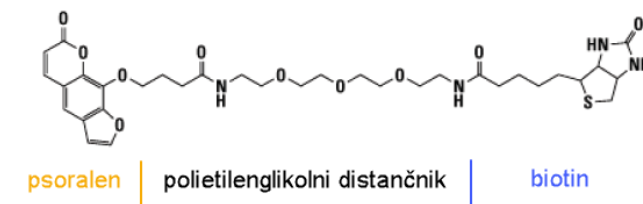
### 1.4.5 SPLASH

SPLASH (metoda sekvenciranja s psoralenom premreženih, ligiranih in izbranih hibridnih molekul, angl. *Sequencing of Psoralen-crosslinked, Ligated, and Selected Hybrids*) je visoko zmogljiva tehnika za detekcijo interakcij RNA-RNA v živih celicah. Značilnosti metode sta uporaba biotiniliranega psoralena za tvorbo kovalentne prečne vezi in proksimalna ligacija.<sup>36</sup> Ključni koraki metode SPLASH so prikazani na **Sliki 7**.



**Slika 7:** Shematski potek metode SPLASH. Interakcije med molekulami RNA stabilizirajo s tvorbo prečne kovalentne vezi preko molekule biotiniliranega psoralena ob obsevanju z UV-svetlobo valovne dolžine 365 nm. Po lizi celic izolirajo molekule RNA in jih (nespecifično, z uporabo fragmentacijskega pufra, ki vsebuje ione  $Mg^{2+}$ ) delno razgradijo v krajše fragmente. Sledi obogatitev prečno povezanih molekul RNA na streptavidinskih kroglicah. Molekuli RNA v interakciji povežejo med sabo v reakciji proksimalne ligacije (T4 RNA-ligaza), prekinejo reverzibilno prečno vez preko psoralena z obsevanjem z UV-svetlobo valovne dolžine 254 nm in jih po ligaciji 3'-adapterjev prepíšejo v cDNA v procesu reverzne transkripcije. Sledi sinteza knjižnice cDNA s pomočjo cirkularizacije (circligaza II) in reverzne transkripcije ter sekvenciranje. Prirejeno po<sup>36</sup>.

Biotiniliran psoralen (**Slika 8**) slabo prehaja v žive celice, zato je potrebno celice inkubirati v prisotnosti 0,01 % digitonina, ki poveča prehod v celice. Zaradi vezanega biotina lahko prečno povezano RNA v vzorcu obogatimo s pomočjo streptavidinskih kroglic.<sup>36</sup> Pomembno se je zavedati, da lahko prečna povezava dveh verig točkovno zaustavi reverzno transkripcijo, saj je na mestu interakcije vezan še biotiniliran psoralen, ki ovira reverzno transkriptazo.<sup>36</sup>



**Slika 8:** Molekula biotinizirane psoralena. Prirejeno po <sup>36</sup>.

Prednosti metode SPLASH so visoka občutljivost, specifičnost in ponovljivost rezultatov ter nizek delež lažnih rezultatov. Poleg tega za izvedbo metode ne potrebujemo predhodnega znanja o enem izmed partnerjev v interakciji.<sup>36</sup>

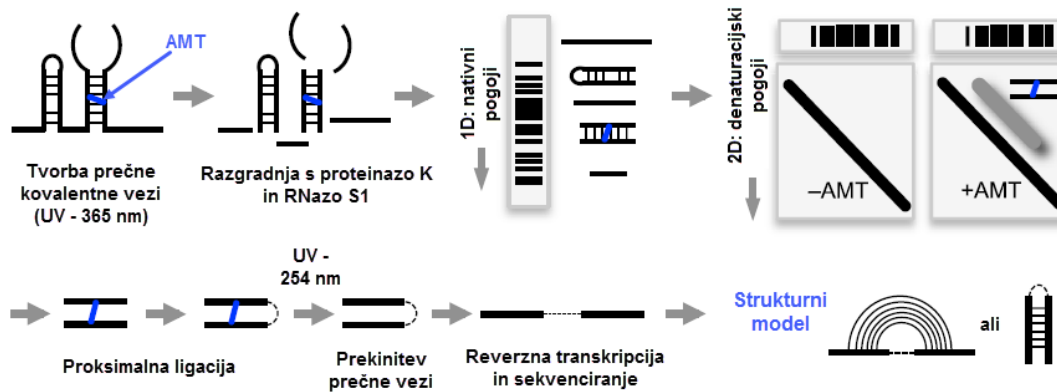
Slabosti metode sta možen vpliv uporabljenega digitonina na celice (in s tem posledično na fiziološke interakcije med RNA) in ustavitev reverzne transkriptaze zaradi steričnih ovir, ki jih povzroči vezan biotiniziran psoralen na mestu interakcije, kar lahko vodi v okrnjen nabor rezultatov.<sup>36</sup>

#### 1.4.6 PARIS

PARIS (metoda analize interakcij in struktur RNA s pomočjo psoralena, angl. *Psoralen Analysis of RNA Interactions and Structures*) je metoda za detekcijo interakcij RNA-RNA *in vivo*, osnovana na reverzibilni tvorbi prečne vezi z molekulo AMT. Značilna koraka sta še izolacija prečno povezanih RNA s pomočjo 2D-elektroforeze in proksimalna ligacija.<sup>26,28</sup> Shematski prikaz metode je prikazan na **Sliki 9**.

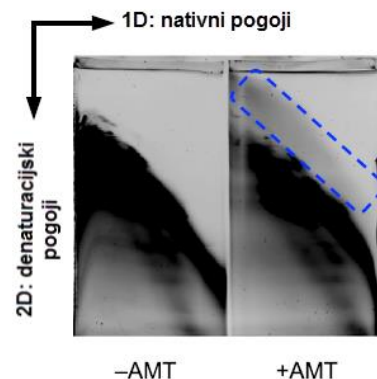
2D-elektroforeza je glavna posebnost metode PARIS. Omogoči izolacijo le RNA, ki je pri obsevanju v prisotnosti psoralena tvorila prečno kovalentno vez in se po končani elektroforezi v drugi dimenziji (pod denaturacijskimi pogoji) nahaja nad glavno diagonalo, kot prikazuje **Slika 10**. Delež prečno povezane RNA v vzorcu je majhen (0,2 - 0,5 % začetne RNA). Z 2D-elektroforezo in izolacijo le prečno povezane RNA pomembno obogatimo vzorec in odstranimo nevezano RNA.<sup>28</sup>





**Slika 9:** Shematski prikaz metode PARIS. Celice inkubirajo v prisotnosti AMT in obsevajo z UV-svetlobo valovne dolžine 365 nm, da se tvori prečna kovalentna vez med molekulama RNA v interakciji. Po lizi celic vzorce tretirajo z encimoma nukleazo S1 in proteinazo K, pri čemer RNaza omogoči izolacijo molekul RNA, ki so se ob obsevanju povezale v obširne mreže, in jih delno razgradi na krajše fragmente, proteinaza K pa razgradi proteine in tako zagotovi, da je prečna vez direktno med RNA molekulami. Sledi delna fragmentacija molekul RNA z RNazo ShortCut, ki na sliki ni prikazana. V tem koraku RNA dodatno cepijo na krajše fragmente, kar omogoči boljše in hitrejšo ločbo pri sledeči 2D-elektroforezi. V prvi dimenziji 2D-elektroforeze se molekule ločijo pod nativnimi pogoji (premežene partnerske RNA potujejo kot dvoverižne strukture), v drugi dimenziji pa se molekule ločijo pod denaturacijskimi pogoji (duplexi so v raztegnjeni konformaciji in se tako obnašajo kot daljše intaktne RNA). Po koncu 2D-elektroforeze se duplexi na gelu nahajajo nad zgornjo diagonalo, od koder jih izolirajo in povežejo med sabo v reakciji proksimalne ligacije (T4 RNA-ligaza). Sledijo prekinitve reverzibilne vezi preko AMT z obsevanjem z UV-svetlobo valovne dolžine 254 nm, ligacija adapterjev, reverzna transkripcija, sinteza knjižnice cDNA in sekvenciranje. Prirejeno po <sup>28</sup>.

**Slika 10:** Elektroforezni gel po končani 2D-elektroforezi. Na desnem delu (poskus z RNA, izolirano iz celic, inkubiranih v prisotnosti AMT; levo je analogen poskus, le da celicam niso dodali AMT) vidimo liso nad glavno diagonalo, ki predstavlja prečno povezane RNA, ki jih v naslednjem koraku izoliramo iz gela. Prirejeno po <sup>28</sup>.



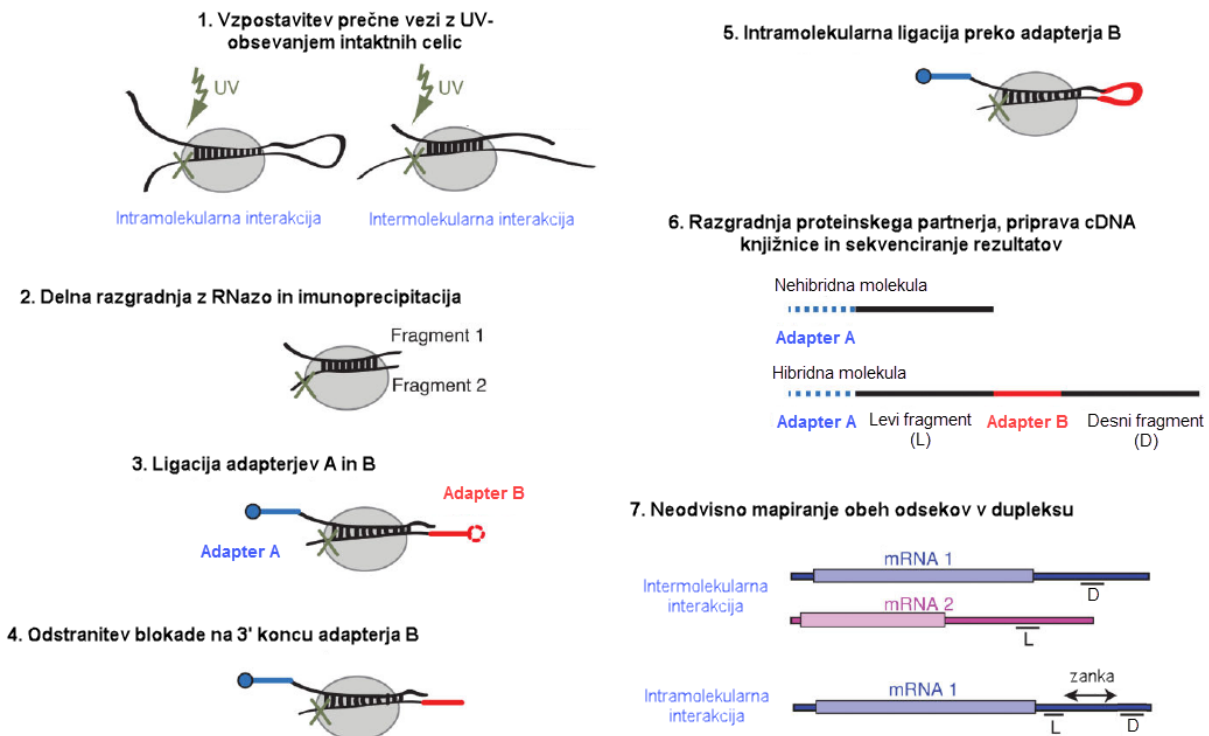
Prednosti metode PARIS so visoka specifičnost, občutljivost in ponovljivost, resolucija posameznega baznega para ter odsotnost potrebe po predhodnem znanju o sodelujočem proteinu

ali RNA, saj ne temelji na izolaciji z imunoprecipitacijo ali hibridizacijo. Tako nam ta metoda omogoča detekcijo povsem novih, še ne predvidenih RNA interakcij.<sup>26,28</sup>

Prednost odkritja povsem novih interakcij je hkrati tudi omejitev metode, saj oteži bioinformatično analizo rezultatov. Dodatno geni, ki se v genomu nahajajo v več kopijah, otežijo nedvoumno identifikacijo interakcij na genomski skali.<sup>28</sup> Kot pri drugih metodah, ki uporabljajo premreževalec AMT, ima tudi ta metoda določeno pristranskost tvorbe vezi glede na zaporedje.<sup>28</sup>

### 1.4.7 hiCLIP

hiCLIP (metoda tvorbe prečne vezi med hibridi molekul RNA z resolucijo posameznega nukleotida in imunoprecipitacije, angl. *RNA Hybrid and Individual-Nucleotide Resolution UV Cross-linking and Immunoprecipitation*) je še ena od izpeljank zgoraj omenjene metode CLIP. Njena posebnost je uporaba dodatnega adapterja v koraku proksimalne ligacije.<sup>37</sup> Shematski potek metode hiCLIP je prikazan na **Sliki 11**.



**Slika 11:** Shematski prikaz metode hiCLIP. V celicah tvorijo prečno kovalentno vez med proteini in RNA z obsevanjem z UV-svetlobo (UV-C). Po lizi celic dele molekul RNA, ki niso zaščitene s proteinskimi partnerji, razgradijo z encimom RNazo I. Sledi imunoprecipitacija kompleksov protein-RNA in nato ligacija posebnih adapterjev na molekuli RNA v dupleksu. Adapter A ima

*ireverzibilno blokado na 3' koncu (dideoksinukleotid), ki prepreči dodatnim molekulam, da bi se vezale nanj, in pri kasnejši reverzni transkripciji služi kot mesto vezave začetnega oligonukleotida. Adapter B ima encimsko odstranljivo blokado na 3' koncu (je fosforiliran) in služi kot povezovalca, s katerim povežemo obe molekuli v hibridno molekulo RNA.<sup>37,49</sup> Po ligaciji adapterjev sledi razgradnja proteina v kompleksu, priprava knjižnice cDNA in sekvenciranje. Prirejeno po <sup>49</sup>.*

Dodatni adapter omogoči učinkovito ligacijo obeh krakov RNA v dupleksu, saj s svojo fleksibilnostjo odstrani vpliv morebitnih fizičnih ovir. V okviru bioinformatične analize rezultatov sekvenciranja je zelo težko določiti posamezna kraka RNA v hibridni molekuli RNA. Vpeljava povezovalca pa omogoči nedvoumno določitev posameznih krakov ob kartiranju. To omogoči uporabo hiCLIP brez predhodne potrebe po poznavanju tarčnih duplesov.<sup>37</sup> Poleg naštetih prednosti, ki so posledica uporabe dodatnega adapterja, vsebuje metoda hiCLIP kar dve imunoprecipitaciji (najprej pod nativnimi in nato še denaturacijskimi pogoji), ki omogočita zelo ostre pogoje izolacije kompleksov in zagotovita visoko specifičnost metode.<sup>37</sup> Prednost metode hiCLIP pred »psoralenskimi« je tudi krajši čas, potreben za vzpostavitev prečne vezi. V primerjavi z metodo PARIS in SPLASH, kjer potrebujemo od pol ure do ene ure (če štejemo še predinkubacijo), ta metoda potrebuje manj kot minuto. Zato je metoda hiCLIP bolj primerna za študije dinamičnih sprememb v celicah.<sup>37</sup>

Slabost metode hiCLIP je omejitev na uporabo že znanih proteinov, proti katerim imamo na razpolago protitelesa za imunoprecipitacijo. Od specifičnosti in učinkovitosti vezave protiteles je odvisen uspeh metode.<sup>37</sup> Dodatno je protokol dokaj dolgotrajen in vsebuje potencialno neučinkovite vmesne korake, zaradi česar potrebujemo za izvedbo večjo količino začetnega materiala.

## 2 NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge bomo skušali vzpostaviti metodo za detekcijo interakcij med molekulami RNA v živih celicah. Iskali bomo interakcijske partnerje že znanih molekul RNA v treh človeških celičnih linijah, NTERA-2, HEK293 FlpIn z vstavljenim genom za SNORD116 in SH-SY5Y. Uporabili bomo pristop ujetja interakcije s tvorbo kovalentne vezi preko molekule AMT ob obsevanju z UV-svetlobo z valovno dolžino 365 nm in ločbo teh molekul RNA od ostalih s procesom 2D-elektroforeze, kot to naredijo pri metodi PARIS. Molekuli RNA v interakciji bomo z reakcijo proksimalne ligacije povezali v hibridno molekulo in prekinili reverzibilno vez preko molekule AMT z obsevanjem z UV-svetlobo valovne dolžine 254 nm. Poliadenilirane hibridne molekule RNA v vzorcu bomo analizirali s pomočjo naprave Bioanalyzer. Sledila bo priprava knjižnic cDNA iz poliadeniliranih molekul RNA, pri čemer bomo uporabili dva različna pristopa. Prvi pristop bo temeljil na reakciji *in vitro* transkripcije (IVT) za linearno pomnožitev materiala (hibridnih RNA) v vzorcih in sledeči ligaciji 3'-adapterja, drugi pa na uporabi komercialnega kompleta *SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit*. V pripravljenih knjižnicah bomo s pomočjo reakcije PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi iskali validirane interakcijske pare RNA (uporabili bomo kombinacije začetnih oligonukleotidov, specifičnih za znane pare snoRNA-rRNA). Če nam bo pri tem uspelo potrditi kakšno od interakcij, bomo hibridne molekule s pomočjo TA-kloniranja vstavili v plazmid *pGEM<sup>®</sup> T-Easy* in z njim transformirali celice *E. coli* ter hibride analizirali s sekvenciranjem.

Celična linija HEK293 FlpIn SNORD116 ima vstavljen gen za snoRNA SNORD116, zato bomo predhodno analizirali njeno izražanje v primerjavi z netransfecirano starševsko linijo HEK293. Celice NTERA-2 in SH-SY5Y endogeno izražajo SNORD116. V primeru uspešne konstrukcije knjižnic hibridne cDNA bomo s pomočjo konstantnih robnih zaporedij in poznane strukture SNORD116 skušali z metodo PCR identificirati partnerske RNA te snoRNA-sirote.

### 3 MATERIALI IN METODE

Molekule RNA so zelo občutljive na razgradnjo z RNazami, ki pa jih najdemo praktično povsod. Zato smo pri izvedbi eksperimentalnega dela zelo pazili na čistoto uporabljenih kemikalij in delovne površine. Pri svojem delu smo uporabljali kemikalije in materiale visoke kakovosti, ki niso vsebovali RNaz. Uporabljenih kemikalij pri tehtanju nismo prenašali z žličko, saj bi poseganje v vsebnik lahko pomenilo kontaminacijo, ampak smo potrebne količine presipali iz vsebnika v LAF-komori. Poleg tega smo vedno delali z rokavicami in pogosto uporabljali pršilo proti RNazam na delovnih površinah. Uporabljali smo poseben set pipet, namenjen le za delo z molekulami RNA, in vodne raztopine z molekulami RNA vedno hranili na ledu, da bi zmanjšali razgradnjo ob morebitni prisotnosti RNaz. Za raztapljanje vzorcev smo uporabljali posebno vodo (brez RNaz) ter v reakcijah, kjer je bilo to smiselno, uporabljali zaviralce RNaz. S temi ukrepi smo želeli zmanjšati razgradnjo molekul RNA v vzorcih.

#### 3.1 Materiali

##### 3.1.1 Kemikalije

<i>Kemikalija</i>	<i>Proizvajalec</i>
1 M magnezijev klorid ( $MgCl_2$ )	Sigma-Aldrich, ZDA
4'-aminometiltrioksalen hidroklorid (AMT)	Santa Cruz Biotechnology, ZDA
40 % akrilamid/bisakrilamid (29:1)	Sigma-Aldrich, ZDA
Agar	Sigma-Aldrich, ZDA
Agaroz	Sigma-Aldrich, ZDA
Amonijev persulfat (APS)	Sigma-Aldrich, ZDA
Ampicilin	Sigma-Aldrich, ZDA
Brezvodna očetna kislina (ledocet)	Sigma-Aldrich, ZDA
Dinatrijeva sol EDTA dihidrat ( $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ )	Sigma-Aldrich, ZDA
Ditiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, ZDA
Etanol, 96 %	Merck, Nemčija
Etilendiamin tetraočetna kislina (EDTA)	Sigma-Aldrich, ZDA
Fenol/kloroform/izoamilni alkohol (25:24:1), pH 4,5	Sigma-Aldrich, ZDA
Fetusni serum goveda (FBS)	Sigma-Aldrich, ZDA
Fosfatni pufer s soljo (10 $\times$ ) (10 $\times$ PBS)	Sigma-Aldrich, ZDA

<i>GlycoBlue</i> (15 mg/ml)	Thermo Fischer Scientific, ZDA
Higromicin B	Sigma-Aldrich, ZDA
Izopropanol	Merck, Nemčija
Kloroform	Sigma-Aldrich, ZDA
Koncentrirana klorovodikova kislina (HCl)	Sigma-Aldrich, ZDA
LB prah za pripravo LB gojišča	Sigma-Aldrich, ZDA
N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, ZDA
Natrijev dodecil sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, ZDA
Natrijev klorid (NaCl)	Merck, Nemčija
Penicilin-streptomycin (PS)	Sigma-Aldrich, ZDA
Polietilen glikol 400 (PEG400)	Sigma-Aldrich, ZDA
Pršilo proti RNazam <i>RNaseZap</i>	Thermo Fischer Scientific, ZDA
<i>RiboZol</i>	VWR International, ZDA
Tekoči dušik	Messer, Slovenija
Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris)	Sigma-Aldrich, ZDA
Tris-boratni-EDTA pufer (10×) (10× TBE)	Sigma-Aldrich, ZDA
Ultra čista voda za HPLC	Sigma-Aldrich, ZDA
Urea	Merck, Nemčija
Voda brez nukleaz (NF-H <sub>2</sub> O)	Thermo Fischer Scientific, ZDA

### 3.1.2 Pripravljene raztopine in pufri

- *4× ligacijski pufer (200 mM Tris-HCl, pH 7,8, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM DTT)*

Tris	484 mg
1 M MgCl <sub>2</sub>	800 µl
1 M DTT	80 µl
NF-H <sub>2</sub> O	Do 20 ml
0,1 M HCl	Za umerjanje pH

Tris smo raztopili v ~ 18 ml NF-H<sub>2</sub>O, dodali 1 M MgCl<sub>2</sub> in 1 M DTT ter premešali. pH raztopine smo uravnali na 7,8 z 0,1 M raztopino HCl. Volumen smo z NF-H<sub>2</sub>O dopolnili do končnih 20 ml. Raztopino smo filtrirali, da bi odstranili morebitne netopne delce, in naredili 500-µl alikvote, ki smo jih shranili pri -20 °C.

- *50× Tris-acetatni-EDTA pufer (TAE pufer)*

Tris	121 g
Na <sub>2</sub> EDTA	9,305 g
Ledocet	28,55 ml
Prečiščena voda	Do 500 ml

Tris in Na<sub>2</sub>EDTA smo raztopili v ~ 350 ml vode, dodali ledocet in dopolnili z vodo do 500 ml.

- *Pufer za ekstrakcijo RNA (500 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,05 % SDS)*

5 M NaCl	1 ml
0,5 M EDTA	20 µl
10 % SDS	50 µl
NF-H <sub>2</sub> O	do 10 ml, kar je enako 8,93 ml

- *Raztopina 0,5 % (m/m) agaroze v pufru 1x TBE*

Raztopino smo segrevali do vrenja v mikrovalovni pečici, da se je agarosa raztopila. Pripravljen gel smo hranili v hladilniku.

- *Raztopina 4 M uree/0,1 % SDS*

3,35 g uree smo raztopili v ~ 10 ml NF-H<sub>2</sub>O (po potrebi smo raztopino segreli). Dodali smo 140 µl 10 % SDS in dopolnili do 14 ml v 15-ml centrifugirki. Raztopino smo hranili v hladilniku in jo porabili v roku 1 tedna.

- *Raztopina 80 % (V/V) etanola*

- *Raztopina AMT (1 mg/ml)*

Ker je AMT občutljiv na svetlobo, smo pripravljeno raztopino zaščitili z aluminijevo folijo. Alikvote raztopine (1 ml) smo hranili pri -20 °C.

- *Raztopina AMT/PBS*

Raztopini AMT (1 mg/ml) smo tik pred uporabo dodali 10× PBS in NF-H<sub>2</sub>O v razmerju 5:1:4. Ker je AMT občutljiv na svetlobo, smo pripravljeno raztopino zaščitili z aluminijevo folijo.

- *Raztopina APS, 10 % (m/m)*

- *Raztopina higromicina B, 50 mg/ml*

Pripravljeno raztopino smo prefiltrirali (0,22 µm). Alikvote raztopine (0,5 ml) smo hranili v hladilniku.

- *Raztopina NaCl (5 M, 50 ml)*

Pripravljeno raztopino smo prefiltrirali (0,2 µm).

- *Raztopina SDS, 10 % (m/m)*
- *Raztopina uree (8 M, 15 ml)*

Pripravili smo nasičeno raztopino uree pri sobni temperaturi, saj je njena topnost pri sobni temperaturi okoli 8 M. Pri raztapljanju smo si pomagali s segrevanjem na 37 °C.

### 3.1.3 Biološki material

#### *Celične linije*

<i>Celična linija</i>	<i>Proizvajalec</i>
HEK 293 FlpIn SNORD 116 <sup>a</sup>	Thermo Fisher Scientific, ZDA
NTERA-2 (pluripotentne embrionalne karcinomske celice)	ATCC, ZDA
SH-SY5Y (nevroblastomske celice)	ATCC, ZDA
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Thermo Fisher Scientific, ZDA

<sup>a</sup> Celice vsebujejo gen za humano snoRNA SNORD116-1, vstavljen na specifično mesto v genomu, kar omogoča uporaba rekombinaze Flp (pripravljeno na Katedri za biokemijo, UL FKKT); ekspresijska kasetna je modificirana verzija tiste, objavljene v 25, le da je zaporedje za mišjo SNORD116-1 zamenjano s tistim za človeški ortolog (pripravil T. Bratkovič; zaporedje je vstavljeno med dve intronski regiji, katerih konca sta mutirana, da omogočata procesiranje SNORD116 tudi v nenevronske celicah)

#### *Celična gojišča*

*Celično gojišče za celične linije HEK 293 FlpIn SNORD116, NTERA-2 in SH-SY5Y:* Zmešali smo komercialno gojišče DMEM (Thermo Fischer Scientific, ZDA), FBS in PS v razmerju 89:10:1. Za celično linijo HEK 293 FlpIn SNORD 116 smo v končno gojišče dodali še antibiotik higromicin B v koncentraciji 200 µg/ml.

*Tekoče gojišče LB (Luria-Bertani):* 4 g LB v prahu smo raztopili v 200 ml prečiščene vode in avtoklavirali s programom za tekočine.

*Trdno gojišče LB – agar:* tekočemu gojišču LB smo dodali ustrezno količino agarja (3 g agarja/200 ml tekočega gojišča LB) in avtoklavirali s programom za tekočine. Po avtoklaviranju smo gojišču, ohlajenemu na ~ 65 °C, aseptično dodali ampicilin do koncentracije 100 µg/mL. Pripravljeno gojišče smo v LAF-komori nalili v 100-mm petrijevke. Ko se je gojišče strdilo, smo petrijevke shranili v hladilniku.



### Material za encimske reakcije

<b>Encim/encimski komplet</b>	<b>Proizvajalec</b>
5' DNA Adenylation Kit (RNA-ligaza <i>Mth</i> , reakcijski pufer (10×), 1 mM ATP, NF-H <sub>2</sub> O)	New England Biolabs, ZDA
<i>Antarctic Phosphatase</i> , reakcijski pufer (10×)	New England Biolabs, ZDA
<i>E. coli</i> poli(A) polimeraza, reakcijski pufer (10×), 10 mM ATP	New England Biolabs, ZDA
encimska mešanica <i>Second Strand Synthesis</i> , reakcijski pufer (10×)	New England Biolabs, ZDA
nukleaza S1 in reakcijski pufer (5×)	Thermo Fischer Scientific, ZDA
<i>PCR Master Mix</i> (2×)	Thermo Fischer Scientific, ZDA
<i>Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix</i>	New England Biolabs, ZDA
Proteinaza K	Roche, ZDA
<i>RevertAid RT Reverse Transcription Kit</i> (reverzna transkriptaza <i>RevertAid</i> , zaviralec RNaz <i>RiboLock</i> , reakcijski pufer (5×), mešanica dNTP, zmes naključnih heksamernih oligonukleotidov, NF-H <sub>2</sub> O)	Thermo Fischer Scientific, ZDA
Zaviralec RNaz <i>RNaseIn</i>	Promega, ZDA
<i>ShortCut RNase III Kit</i> (RNaza <i>ShortCut III</i> , reakcijski pufer (10×), MnCl <sub>2</sub> (10×), EDTA (10×))	New England Biolabs, ZDA
<i>SMART™ cDNA Library Construction Kit</i>	Clontech Laboratories, Inc.
Zaviralec RNaz <i>SUPERaseIn™</i>	Thermo Fischer Scientific, ZDA
T4 DNA-Ligaza, reakcijski pufer (10×), 10 mM ATP	New England Biolabs, ZDA
T4 RNA-Ligaza 1 ( <i>high conc.</i> ), reakcijski pufer (10×)	New England Biolabs, ZDA
<i>TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit</i> (encimska mešanica, reakcijski pufer (5×), ATP/CTP/GTP/UTP mix)	Thermo Fischer Scientific, ZDA

### Sintezni oligonukleotidi

<b>Oligonukleotid</b>	<b>Nukleotidno zaporedje</b>
3'-adapter IX	/5Phos/NNNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG/3ddc <sup>a</sup>
Anchor RT	CGATTGAGGCCGGTAAATACGACTCACTATAGGGGTTTCAGAGTTCTACAGT CCGACGATCNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV <sup>b,c</sup>

Par oligonukleotidov za PCR A	RPIX Short R-SNORD116a <sup>d</sup> : CTTTTCCAAGGAATG
Par oligonukleotidov za PCR B	RPIX Short R-SNORD116b <sup>d</sup> : AGAATGACGGTATG
Par oligonukleotidov za PCR C	RPIX Short R-SNORD116c <sup>d</sup> : AGCTTTTCCAAGG
Par oligonukleotidov za PCR D	RPIX Short R-SNORD116d <sup>d</sup> : TG TTCAGCTTTTCC
Par oligonukleotidov za PCR E	RPIX Short SNORD116e <sup>d</sup> : AGTTCCGATGAGAA
Par oligonukleotidov za qPCR Actb	F-Actb CATGTACGTTGCTATCCAGGC R-Actb CTCCTTAATGTCACGCACGAT
Par oligonukleotidov za qPCR SNORD116	F-116 GATGATGAGTCCCCTATAAAAAACATTCC R-116 GGACCTCAGTTCCGATGAG
Par oligonukleotidov za qPCR SNORD13	F-13 TTTGTAGTTCATGAGCGTGATG R-13 GGTCAGACGGGTAATGTG
Par oligonukleotidov za qPCR SNORD45A	F-45A GGTCAATGATGTGTTGGCATG R-45A AGGTCTCAGAGTAATTCTAGAGCTAAAG
Par oligonukleotidov za qPCR SNORD57	F-57 AGGTGATGAACTGTCTGAGC R-57 GGATCAGGCTCATTAAATCAGTTTTTTTTG
Par oligonukleotidov za validacijo knjižnice cDNA 1	F-SNORD13_2: ACCCTTGAACCTTGTTACGAC R-18S_1846: CCTACGGAAACCTTGTTACGAC
Par oligonukleotidov za validacijo knjižnice cDNA 2	F-18S_1815: AGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC R-SNORD13_2: CCACGTCGTAACAAGGTTCA
Par oligonukleotidov za validacijo knjižnice cDNA 3	F-rRNA28S_1325: ACCCGACCCGTCTTGAAAC R-21: CATCAGTCCCGTCTTGAAACAATTATCG
RPI Short	TTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC
RPIX Short	CCTTGGCACCCGAGAATTCCA
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

<sup>a</sup> podčrtani del 3'-adapterja IX je komplementaren oligonukleotidu RPIX Short.

<sup>b</sup> enkrat podčrtani del oligonukleotida anchor RT je identičen oligonukleotidu RPI Short.

<sup>c</sup> dvakrat podčrtani del oligonukleotida anchor RT je promotorska regija za reakcijo IVT (T7 promotor).

<sup>d</sup> označeni oligonukleotidi so komplementarni SNORD116

## ***Plazmid***

<b><i>Plazmid</i></b>	<b><i>Proizvajalec</i></b>
<i>pGEM<sup>®</sup> T-Easy</i> plazmid za TA-kloniranje	Promega, ZDA

### **3.1.4 Elektroforezni material**

#### ***Elektroforezni geli***

##### *X % agarozni gel*

Agarozna	X % × 40 g
1x TAE pufer	40 ml

Pri raztapljanju agaroze smo si pomagali s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Ohlajen gel (~ 60 °C) smo nalili v kadičko in dodali glavniček.

##### *12 % nativni TBE-PAGE gel*

40 % akrilamid/bisakrilamid	2,4 ml
10× TBE	0,8 ml
NF-H <sub>2</sub> O	4,8 ml
10 % APS	134 µl
TEMED	6,7 µl

Pripravljen gel smo odpipetirali v 1-mm kaseto in dodali glavniček.

##### *20 % denaturacijski TBE gel*

urea	2,40 g
40 % akrilamid/bisakrilamid	2,5 ml
10× TBE	0,5 ml
10 % APS	30 µl
TEMED	3 µl

Ureo smo raztopili v 10× TBE in 40 % akrilamid/bisakrilamidu pri 37 °C na stresalniku. Nato smo dodali še APS in TEMED, na hitro premešali s pipeto in odpipetirali v 1,5-mm kaseto z glavničkom.

Če smo delali elektroforezo v 2. dimenziji, smo gel naredili brez glavnička in na vrh gela odpipetirali 1 ml izopropanola. Po strditvi gela smo izopropanol odlili in gel sprali s pufrom  $1\times$  TBE. Na gel smo prenesli izrezane trakove iz gela v 1. dimenziji, in gel zatalili s prevreto raztopino 0,5 % agaroze.

#### *X % TBE-PAGE/urea gel*

Urea	3,2 g
40 % akrilamid/bisakrilamid	$8 \text{ ml} \times X \% / 40 \%$
$10\times$ TBE	800 $\mu\text{l}$
NF-H <sub>2</sub> O	do 8 ml
10 % APS	134 $\mu\text{l}$
TEMED	6,7 $\mu\text{l}$

Ureo smo raztopili v  $10\times$  TBE, 40 % akrilamid/bisakrilamidu in NF-H<sub>2</sub>O pri 37 °C na stresalniku. Po dodatku 10 % APS in TEMED-a smo raztopino na hitro premešali in odpipetirali v kaseto za elektroforezo ter dodali glavniček.

#### *Velikostni označevalci*

<b>Velikostni označevalec</b>	<b>Proizvajalec</b>
<i>GeneRuler Mix</i>	Thermo Fischer Scientific, ZDA
<i>GeneRuler ULR</i>	Thermo Fischer Scientific, ZDA

#### *Nanašalne raztopine*

<b>Nanašalne raztopine</b>	<b>Proizvajalec</b>
<i>All-Purpose Native Agarose Gel Loading Solution (10<math>\times</math>)</i>	Thermo Fischer Scientific, ZDA
<i>Gel Loading Dye Purple (6<math>\times</math>)</i>	New England Biolabs, ZDA

*Nanašalna raztopina 2 $\times$  TBE-urea:* 60  $\mu\text{l}$  8 M uree smo dodali 20  $\mu\text{l}$   $10\times$  TBE in 20  $\mu\text{l}$  nanašalne raztopine *All-Purpose Native Agarose Gel Loading Solution (10 $\times$ )* ter premešali.

#### *Barvila*

<b>Barvilo</b>	<b>Proizvajalec</b>
Etidijev bromid	Thermo Fischer Scientific, ZDA
<i>SYBR Gold</i>	Thermo Fischer Scientific, ZDA

### 3.1.5 Komerčni kompleti

<i>Komplet</i>	<i>Proizvajalec</i>
<i>Agilent Small RNA Kit (Bioanalyzer)</i>	Agilent Technologies, ZDA
<i>GenElute™ Plasmid Miniprep Kit</i>	Sigma-Aldrich, ZDA
<i>miRNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Nemčija
<i>RNA Clean &amp; Concentrator</i>	Zymo Research, ZDA

### 3.1.6 Potrošni in laboratorijski material

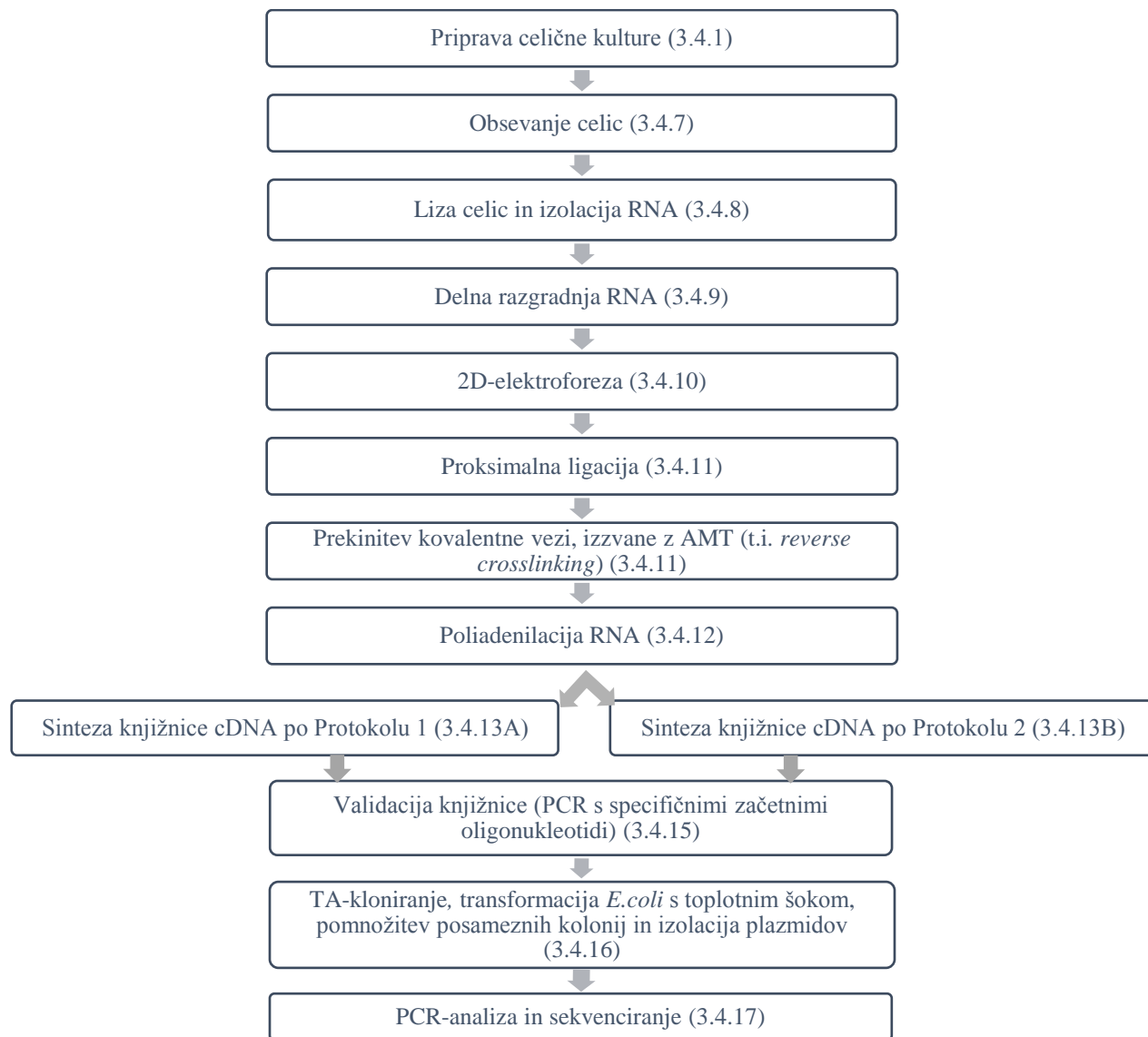
<i>Potrošni material</i>	<i>Proizvajalec</i>
10-ml brizge	BBraun, Nemčija
10- $\mu$ l, 200- $\mu$ l, 1000- $\mu$ l nastavki za pipete	SARSTEDT AG & Co, Nemčija
15-cm petrijevke	TPP®, Švica
15-ml in 50-ml centrifugirke	TPP®, Švica
1-mm in 1,5-mm kasete za PAGE-elektroforezo	Invitrogen, ZDA
200- $\mu$ l, 500- $\mu$ l, 1,5-ml in 2-ml mikrocentrifugirke	Eppendorf, Nemčija
20-ml in 50-ml serološke pipete	TPP®, Švica
Aluminijeva folija in prosojna folija za živila	Mercator, Slovenija
Britvice	Gillette, ZDA
Celična strgalca	TPP®, Švica
Filter <i>Spin-X</i> 0,45 $\mu$ m	Sigma Aldrich, ZDA
Filter za brizgo 0,22 $\mu$ m	TPP®, Švica
Injekcijske igle	BBraun, Nemčija
Mikrotitrne ploščice s 6 in 96 vdolbinicami za gojenje celic	TPP®, Švica
»Phase Lock Heavy Tube«, 2 ml	Eppendorf, Nemčija
Plastenke za gojenje celic (75 cm <sup>2</sup> )	TPP®, Švica
Sterilne pincete	Conrad Electronic, Nemčija
Števna stekelca za mikroskop	Thermo Fischer Scientific, ZDA

**Laboratorijska steklovina in ostali laboratorijski material:** erlenmajerice, čaše, steklene palčke, merilni valji, spatule, žličke za tehtanje, plinski gorilnik.

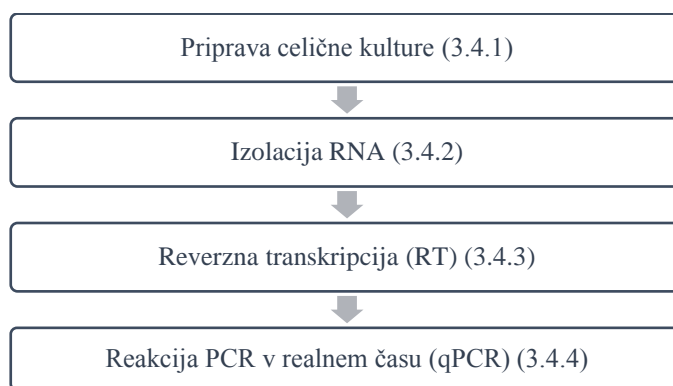
### 3.2 Laboratorijska oprema

<i>Aparatura</i>	<i>Tip opreme/ proizvajalec</i>
Analitska tehtnica	AB 104/ Mettler Toledo, Švica
Avtoklav	Systec 2540 EL/ Bel-Art products, ZDA
Bioanalizer	Agilent 2100 Bioanalizer/ Agilent, ZDA
Celica za horizontalno elektroforezo	Owl™ EasyCast™ B1A Mini Gel Electrophoresis Systems/ Thermo Scientific, ZDA
Celica za vertikalno elektroforezo	XCell SureLock™ Mini-Cell/ Invitrogen, ZDA
Centrifuge	5804 R in 5415 R/ Eppendorf, Nemčija IKA® mini G/ IKA Works, ZDA
Ciklični termostat (PCR)	AB GeneAmpR® PCR System 2700/ Applied Biosystems, ZDA
Crosslinker (254 nm)	UVP HL-2000 hybridisation oven/cross-linker/ Analytik Jena AG, Nemčija
Crosslinker (365 nm)	UVP™ CL-1000L Longwave Crosslinker/ Analytik Jena AG, Nemčija
Inkubatorja	WTC/ Binder GmbH, Nemčija Unihood RCS-650/ UniEquip, Nemčija
Invertni mikroskop	Nikon TMS, Japonska
LAF-komora	LFVP 12/ Iskra PIO, Slovenija
Magnetno mešalo	Rotamix 550 MMH/ Tehtnica, Slovenija
Mikrovalovna pečica	LG, Južna Koreja
pH-meter	691 pH meter/ Metronohm, Švica
Pipete	0,1-2,5; 0,5-10; 10-100; 100-1000 µl/ Eppendorf, Nemčija
Pipetor	Accu-jet® pro/ BRAND GMBH + CO KG, Nemčija
qPCR aparat	Lightcycler LC480/ Roche, Švica
Sistem za dokumentacijo gelov	Gbox/ Syngene, ZDA
Spektrofotometer	Nanodrop ND-1000/ NanoDrop Technologies, ZDA
Stresalniki	Vibromix 314 EVT/ Tehtnica, Slovenija IKA® MS3 digital/ IKA Works, ZDA
Termoblok	Eppendorf Thermomixer Comfort/ Eppendorf, Nemčija
Transiluminator (312 nm)	TFX-20M (312 nm)/ Vilber Lourmat, Francija
Vir napetosti za elektroforezo	PowerEase 500/ Novex, Nemčija
Vodna kopel	Kambič, Slovenija

### 3.3 Eksperimentalni shemi



**Shema I:** Shema metode za detekcijo interakcij med molekulami RNA (Protokol 1 in 2).



**Shema II:** Shematski prikaz kontrole izražanja vstavljene *SNORD116* na celični liniji HEK293 FlpIn *SNORD116*.

## 3.4 Metode

### 3.4.1 Gojenje celic

V vodni kopeli (37 °C) smo hitro odmrznili celice, shranjene v parah tekočega dušika, in jih suspendirali v ~ 10 ml gojišča. Suspenzijo smo centrifugirali (200 × g, 5 min) in odstranili gojišče z DMSO. Celice smo suspendirali v 1 ml svežega gojišča in jih prenesli v eno od vdolbin na mikrotitrski plošči s 6 vdolbinicami, kamor smo predhodno odpipetirali 2 ml gojišča (inkubirano pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

Celice smo gojili v inkubatorju (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) in po potrebi menjavali gojišče. Ob dosegu ~ 70 % konfluentnosti smo jih presajali v večje posode.

### 3.4.2 Izolacija RNA iz celic HEK FlpIn *SNORD116* s kompletom *miRNAEasy Kit*.

Sledili smo navodilom proizvajalca komercialnega kompleta. Celice, gojene v mikrotitrski plošči s 6 vdolbinicami, smo lizirali v dveh paralelah, da smo lahko izvedli primerjavo tudi med enakima vzorcema.

### 3.4.3 Reverzna transkripcija (RT)

Na spektrofotometru Nanodrop smo pomerili koncentracijo in čistoto izolirane RNA (3.4.2) ter nastavili RT; uporabili smo komplet *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*.



**Reakcijska zmes:**

1 µg RNA  
 0,5 µl zmesi naključnih heksamernih  
 oligonukleotidov  
 do 6 µl NF-H<sub>2</sub>O

**Dodali smo:**

2 µl reakcijskega pufra (5×)  
 0,5 µl raztopine zaviralca RNaz *RiboLock*  
 1 µl zmesi dNTP (10 mM)  
 0,5 µl reverzne transkriptaze *RevertAid*

**Denaturacija:**

65 °C, 5 min, nato prestavitev na led

**Temperaturni program RT:**

5 minut      25 °C  
 60 minut     42 °C  
 5 minut      70 °C

Shranitev vzorcev na -20 °C.

**3.4.4 Reakcija PCR v realnem času (qPCR)**

Pripravili smo si osnovno reakcijsko zmes v zadostni količini za vse vzorce in pripravili redčitve vzorcev. Napisane količine veljajo za en vzorec.

**Osnovna reakcijska zmes:**

2× qPCR MM	5 µl
zmes oligonukleotidov (5 µM)	0,6 µl
NF-H <sub>2</sub> O	3,4 µl

**Končna priprava:**

osnovna reakcijska zmes	9 µl
cDNA ustrezne redčitve	1 µl

**Redčitve:**

cDNA (1:20)	1 µl + 19 µl
cDNA (1:80)	2,5 µl ↑ + 7,5 µl
cDNA (1:320)	2,5 µl ↑ + 7,5 µl
cDNA (1:1280)	2,5 µl ↑ + 7,5 µl
cDNA (1:5120)	2,5 µl ↑ + 7,5 µl
RNA – redčena do 5 ng/µl	

**Temperaturni program:**

10 min	95 °C	
15 s	95 °C	
30 s	50 °C	45 ciklov
30 s	72 °C	
hitrost segrevanja/ohlajanja: 1 °C/s		
snemanje talilne krivulje: 95 °C → 40 °C		
(zajem fluorescenčnega signala: 5 /°C)		

Uporabljeni pari oligonukleotidov za qPCR: F/R-SNORD13, F/R-SNORD45A, F/R-SNORD57, F/R-SNORD116 in F/R-Actb. Vsako kombinacijo oligonukleotidov smo uporabili pri vsaki od koncentracij (**Slika 12**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
A																										1:20
B																										1:80
C																										1:320
D																										1:1280
E																										1:5120
F																										NTC
G																										RNA <sup>a</sup>
H																										
I																										
J																										
K																										
L																										
M																										
N																										
O																										
P																										
	SNORD13	SNORD45A	SNORD57	SNORD116	Actb	SNORD13	SNORD45A	SNORD57	SNORD116	Actb	<sup>a</sup> RNA (5 ng/μL) je ekvivalent 1:20 redčeni cDNA															
	HEK293 FlpIn SNORD116_1					HEK293 FlpIn SNORD116_2																				

**Slika 12:** Prikaz nanosa na mikrotitrsko ploščo s 384 vdolbinicami. NTC (angl. no-template control) – negativna kontrola.

### 3.4.5 Ekstrakcija DNA/RNA s fenolom in kloroformom ter precipitacija z etanolom

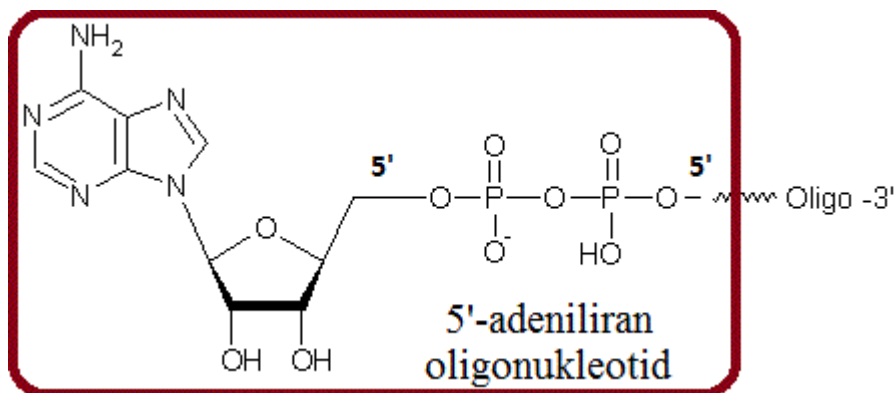
#### *Ekstrakcija DNA/RNA s fenolom in kloroformom*

Vzorcu smo v digestoriju dodali enak volumen fenola/kloroforma, premešali s pipetiranjem in prenesli v predhodno kratko centrifugirano (1 cikel na namizni centrifugi) »Phase Lock Heavy Tube«. Inkubirali smo 5 min pri 30 °C s stresanjem (1100 vrt./min) in nato centrifugirali (5 min, 12000 g, sobna temperatura). Dodali smo 500 μl kloroforma, nežno premešali z obračanjem in ponovno centrifugirali (5 min, 12000 g, sobna temperatura).

#### *Precipitacija z etanolom*

Zgornjo (vodno) fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko na ledu. Dodali smo 1/10 volumna 5 M NaCl in 0,5 μl raztopine glikogena *GlycoBlue* ter premešali s pipetiranjem. Dodali smo še 2,5 volumna etanola, premešali in inkubirali čez noč pri -20 °C. Naslednji dan smo vzorec centrifugirali (15 min, 16000 g, 4 °C) in previdno odstranili supernatant. Usedlino smo sprali z 900 μl 80 % etanola, ponovno centrifugirali (5 min, 16000 g, 4 °C) in odstranili supernatant. Usedlino smo posušili na zraku v LAF-komori (približno 5 min) in jo raztopili v potrebni količini NF-H<sub>2</sub>O.

### 3.4.6 Adenilacija oligonukleotida 3'-adapter IX



**Slika 13:** Slika 5'-adeniliranega oligonukleotida. Prirejeno po <sup>50</sup>.

Reakcijska zmes:

2,5  $\mu$ l oligonukleotida 3' adapter IX (100  $\mu$ M)

8,5  $\mu$ l NF-H<sub>2</sub>O

2  $\mu$ l 5' DNA Adenylation Reaction Buffer (10 $\times$ )

2  $\mu$ l 1 mM ATP

5  $\mu$ l RNA-ligaze *Mth*

Reakcijski pogoji:

65  $^{\circ}$ C, 1,5 h

Inaktivacija encima:

85  $^{\circ}$ C, 5 min, nato prestavitev na led

Iz reakcijske zmesi smo adapter izolirali z ekstrakcijo s fenolom in kloroformom (3.4.5). Adeniliran adapter (Slika 13) smo raztopili v NF-H<sub>2</sub>O do koncentracije 2  $\mu$ M (ocena glede na meritev na spektrofotometru Nanodrop) in alikvote shranili pri -20  $^{\circ}$ C.

Obseg adenilacije smo preverili z elektroforezo v 20 % denaturacijskem gelu TBE-PAGE. Nanesli smo po 5  $\mu$ l adapterja in 2  $\mu$ l velikostnega označevalca *GeneRuler ULR* v nanašalni raztopini 2 $\times$  TBE-urea. Pred nanosom smo raztopine denaturirali (80  $^{\circ}$ C, 3 min, nato led). Elektroforezo smo vodili najprej pri napetosti 100 V, potem pa povečali napetost na 300 V. Gel smo pobarvali z barvilom *SYBR Gold* (redčen 1:10000 v pufru TBE) med 15-minutnim nežnim stresanjem.

### 3.4.7 Obsevanje celic

Celicam na petrijevkah smo odstranili gojišče in jih nežno sprali s 6 ml hladnega 1 $\times$  PBS. Dodali smo 2 ml raztopine AMT/PBS na petrijevko in inkubirali 15 min na ledu v hladilniku. Sledilo je obsevanje z UV-svetlobo valovne dolžine 365 nm (6 $\times$  po 5 minut, na ledu, vmes smo nežno premešali). Po obsevanju smo celice postrgali s celičnim strgalcem in jih prenesli v dve 1,5-ml

mikrocentrifugirki. Celično suspenzijo smo centrifugirali (5 minut,  $200 \times g$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) in odstranili supernatant. Celice smo zamrznili v tekočem dušiku in jih shranili pri  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.4.8 Liza celic in izolacija molekul RNA iz celičnega lizata

#### *Liza celic*

Celice smo lizirali v 3 volumnih sveže pripravljene 4 M uree/0.1 % SDS z intenzivnim pipetiranjem. Dodali smo reakcijski pufer za nukleazo S1 (do končne koncentracije  $1\times$ , t.j.  $1/5$  končnega volumna) ter  $1 \mu\text{l}$  nukleaze S1. Lizat smo inkubirali 10 minut na sobni temperaturi, vmes pa večkrat intenzivno premešali s pipetiranjem. Dodali smo 10 % SDS (do končne koncentracije 1 %, t.j.  $1/10$  končnega volumna) in  $2 \mu\text{l}$  proteinaze K. Inkubirali smo 30 minut pri  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  in nato prenesli vzorec na led.

#### *Izolacija molekul RNA iz celičnega lizata*

Ekstrakcijo RNA iz celičnega lizata smo izvedli z reagentom *RiboZol* po navodilih proizvajalca. Za precipitacijo RNA iz vodne faze nismo uporabili izopropanola, ampak smo jo izvedli z etanolom preko noči, kot je opisano v **poglavju 3.4.5**. Izolirano RNA smo raztopili v  $22 \mu\text{l}$  NF- $\text{H}_2\text{O}$  in pomerili koncentracijo RNA s spektrofotometrom Nanodrop. Če je bila v vzorcu prisotna kontaminacija s fenolom, smo izvedli ekstrakcijo s fenolom/kloroformom in precipitacijo z etanolom (**3.4.5**) in vzorec ponovno raztopili v  $22 \mu\text{l}$  NF- $\text{H}_2\text{O}$ . Če smo se želeli izogniti prekonočni precipitaciji, smo vzorec alternativno očistili s kompletom *RNA Clean & Concentrator* po navodilih proizvajalca in ga eluirali v  $25 \mu\text{L}$  NF- $\text{H}_2\text{O}$ . Vzorec smo shranili pri  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  do nadaljnje uporabe.

### 3.4.9 Delna razgradnja molekul RNA

Reakcijska zmes:	Reakcijski pogoji:
<hr/> 20 $\mu\text{g}$ RNA ( <b>3.4.8</b> )	<hr/> 37 $^\circ\text{C}$ , 20 min
5 $\mu\text{l}$ reakcijskega pufera ( $10\times$ )	
5 $\mu\text{l}$ $\text{MnCl}_2$ ( $10\times$ )	
<hr/> 2,5 $\mu\text{l}$ RNaze <i>ShortCut III</i> NF- $\text{H}_2\text{O}$ do 50 $\mu\text{l}$	<hr/> Ustavitev reakcije s 5 $\mu\text{l}$ EDTA ( $10\times$ )

Dodali smo 5,5  $\mu\text{l}$  5 M NaCl, premešali in dodali 150  $\mu\text{l}$  etanola ter precipitirali preko noči (**3.4.5**). Usedlino smo raztopili v 9  $\mu\text{l}$  NF- $\text{H}_2\text{O}$  in RNA shranili pri  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.4.10 Dvodimenzionalna (2D) elektroforeza in ekstrakcija RNA iz gela

#### ***Elektroforeza v 1. dimenziji – 12 % nativni TBE-PAGE gel (1-mm kaseta)***

---

Vzorec: 9  $\mu$ l + 1  $\mu$ l nanašalne raztopine<sup>a</sup>

Velikostni označevalec *GeneRuler ULR*: 2  $\mu$ l + 7  $\mu$ l NF-H<sub>2</sub>O + 1  $\mu$ l nanašalne raztopine<sup>a</sup>

Slepi nanosi: 9  $\mu$ l NF-H<sub>2</sub>O + 1  $\mu$ l nanašalne raztopine<sup>a</sup>

---

Pogoji elektroforeze: 150 V, približno 1 uro

---

Barvanje: *SYBR Gold* (1:10000 v pufru TBE, 15 min, stresalnik)

---

<sup>a</sup> Nanašalna raztopina: *All-Purpose Native Agarose Gel Loading Solution* (10 $\times$ )

Gel smo si ogledali na prosojni foliji na transiluminatorju (312 nm) in s čisto britvico izrezali fragmente RNA, ki ustrezajo dvovertičnim RNA dolžin med 25 in 150 bp.

#### ***Elektroforeza v 2. dimenziji – 20 % denaturacijski TBE-PAGE gel (1,5-mm kaseta)***

---

Izrezane dele gela iz 1. dimenzije smo prenesli na vrh pripravljenih gelov (po dva trakova na en gel) in prelili s približno 1 ml raztaljene 0,5-% agaroze v pufru TBE.

---

Pogoji elektroforeze: 50 W (~ 500 V), približno pol ure. Vedno 2 gela naenkrat zaradi upora.

---

Barvanje: *SYBR Gold* (1:10000 v pufru TBE, 15 min, stresalnik)

---

Razbarvanje: NF-H<sub>2</sub>O (10 min, stresalnik)

---

Gel smo si ogledali na prosojni foliji na transiluminatorju (312 nm) ter s čisto britvico izrezali fragmente RNA nad glavno diagonalo.

#### ***Ekstrakcija RNA iz gela***

Izrezane dele gela smo razrezali na manjše koščke in jih s sterilno pinceto prenesli v 0,5-ml mikrocentrifugirko (v katere dno smo z razbeljeno iglo naredili drobno luknjico), postavljeno v 1,5-ml mikrocentrifugirko ter centrifugirali (2 min, 16000 g, sobna temperatura). Po potrebi smo postopek ponovili s prestavitvijo manjše mikrocentrifugirke v novo večjo mikrocentrifugirko.

Razdrobljen gel smo prekrili s pufrom za ekstrakcijo RNA in inkubirali 2 uri na stresalniku (25 °C, 1000 vrt./min). Suspenzijo smo filtrirali preko 0,45- $\mu$ m filtra *Spin-X* in izvedli ekstrakcijo s fenolom/kloroformom ter precipitacijo z etanolom (3.4.5). Usedlino smo raztopili v 10  $\mu$ l NF-H<sub>2</sub>O in RNA shranili pri -80 °C.

### 3.4.11 Proksimalna ligacija RNA v kompleksu in prekinitev kovalentne vezi, izzvane z AMT (t.i. »reverse crosslinking«)

Reakcijska zmes, dodana vzorcu (10 $\mu$ l; <b>3.4.10</b> ):	Reakcijski pogoji:
2 $\mu$ l reakcijskega pufra (10 $\times$ )	22 $^{\circ}$ C, 16-20 ur
1 $\mu$ l zaviralca RNaz <i>SuperaseIn</i>	
1 $\mu$ l 0.3 mM ATP	
1 $\mu$ l NF-H <sub>2</sub> O	Inaktivacija encima:
5 $\mu$ l T4 RNA-ligaze 1 ( <i>high conc.</i> )	100 $^{\circ}$ C, 2 min

Po končani reakciji smo vzorec centrifugirali (5 min, 16000 g, 4  $^{\circ}$ C) in supernatant prenesli v novo 1,5-ml mikrocentrifugirko, dopolnili do 400  $\mu$ l z NF-H<sub>2</sub>O ter RNA precipitirali z etanolom (**3.4.5**). Uredlino smo raztopili v 5  $\mu$ l NF-H<sub>2</sub>O in RNA zamrznili pri -80  $^{\circ}$ C.

Kapljico raztopine RNA smo prenesli na polistirenski pokrov mikrotitrne plošče na ledu in obsevali 15 min z UV-svetlobo valovne dolžine 254 nm. Kapljico smo prenesli v novo 1,5-ml mikrocentrifugirko, pokrov sprali z 2  $\mu$ l NF-H<sub>2</sub>O (končni volumen vzorca je 7  $\mu$ l) in vzorec shranili pri -80  $^{\circ}$ C.

### 3.4.12 Poliadenilacija

Reakcijska zmes, dodana vzorcu (7 $\mu$ L; <b>3.4.11</b> ):	Reakcijski pogoji:
0,52 $\mu$ l zaviralca RNaz <i>SuperaseIn</i>	37 $^{\circ}$ C, 30 min
2,14 $\mu$ l 10 mM ATP	
1,13 $\mu$ l reakcijskega pufra (10 $\times$ )	Inaktivacija encima:
0,52 $\mu$ l poli(A)-polimeraze	65 $^{\circ}$ C, 20 min

Po reakciji smo vzorec dopolnili do 400  $\mu$ l z NF-H<sub>2</sub>O in RNA precipitirali z etanolom (**3.4.5**).

### 3.4.13A Sinteza knjižnice cDNA po Protokolu 1

#### *Reverzna transkripcija*

Precipitirano RNA (**3.3.13**) smo suspendirali v 3  $\mu$ l 0,5  $\mu$ M oligonukleotida anchor RT in inkubirali 10 min pri 70  $^{\circ}$ C (tako j nato smo jo prestavili na led). Zmes za reverzno transkripcijo smo pripravili, kot je opisano v **poglavju 3.4.3**, le da smo količine komponent zmanjšali na polovico in da nismo uporabili naključnih heksanukleotidov. Reakcijsko zmes smo inkubirali 2 uri pri 42  $^{\circ}$ C, nato pa inaktivirali encim (5 min, 70  $^{\circ}$ C, nato na led).

Reakcijska zmes, dodana vzorcu:

12  $\mu$ l NF-H<sub>2</sub>O

2  $\mu$ l reakcijskega pufra (10 $\times$ )

1  $\mu$ l encimske mešanice *Second Strand Synthesis*

Reakcijski pogoji:

16 °C, 2 uri in pol

Vzorec smo dopolnili do 400  $\mu$ l z NF-H<sub>2</sub>O in izvedli ekstrakcijo s fenolom/kloroformom in precipitacijo z etanolom (3.4.5). Usedlino smo raztopili v 5  $\mu$ l NF-H<sub>2</sub>O.

### **Reakcija in vitro transkripcije (IVT)**

Reakcijska zmes, dodana vzorcu:

4  $\mu$ l reakcijskega pufra (5 $\times$ )

8  $\mu$ l NTP mix (aa 2  $\mu$ l ATP/CTP/GTP/UTP)

1  $\mu$ l zaviralca RNaz *SuperaseIn*

2  $\mu$ l encimske mešanice *TranscriptAid*

Reakcijski pogoji:

37 °C, 8-16 h

Shranitev vzorca na - 80 °C.

Na 10-% denaturacijskem TBE-PAGE gelu smo preverili distribucijo dolžin RNA, linearno namnožene v procesu transkripcije.

Vzorec: 5  $\mu$ l + 5  $\mu$ l nanašalne raztopine<sup>a</sup>

Velikostni označevalec *GeneRuler ULR*: 2  $\mu$ l + 3  $\mu$ l NF-H<sub>2</sub>O + 5  $\mu$ l nanašalne raztopine<sup>a</sup>

Denaturacija pred nanosom na gel: 70 °C, 5 min, nato na led

Pogoji elektroforeze: 180 V, približno 45 min

Barvanje: *SYBR Gold* (1:10000 v pufri TBE, 15 min, stresalnik)

Razbarvanje: NF-H<sub>2</sub>O (10 min, stresalnik)

<sup>a</sup> Nanašalna raztopina: nanašalna raztopina 2 $\times$  TBE-urea

Gel smo si ogledali na prosojni foliji na transiluminatorju (312 nm).

RNA iz preostalega vzorca (15  $\mu$ l) smo izolirali s kompletom *RNA Clean & Concentrator* po navodilih proizvajalca in jo eluirali v 25  $\mu$ l NF-H<sub>2</sub>O.

### ***Defosforilacija RNA in odstranitev presežnega adapterja***

Reakcijska zmes, dodana vzorcu:

3,13 µl reakcijskega pufra (10×)

1,56 µl zaviralca RNaz *RNaseIn*

1,56 µl encima *Antarctic phosphatase*

Reakcijski pogoji:

37 °C, 30 min, nato prestavitev na led

RNA smo izolirali s kompletom *miRNeasy Mini Kit* po navodilih proizvajalca in jo dodatno očistili z uporabo kompleta *RNA Clean & Concentrator*. Končni volumen vzorca je bil 10 µl. Dodali smo 2 µl adeniliranega oligonukleotida 3' adapter IX, inkubirali 2 min pri 70 °C in takoj nato prestavili na led.

Reakcijska zmes, dodana vzorcu:

10 µl 4× ligacijskega pufra

1 µl zaviralca RNaz *RNaseIn*

8 µl PEG400

7 µl NF-H<sub>2</sub>O

2 µl T4 RNA-ligaze 1 (*high conc.*)

Reakcijski pogoji:

16 °C, preko noči

Presežni adapter smo odstranili na 6 % denaturacijskem gelu TBE- PAGE.

Vzorec: redčen z nanašalno raztopino<sup>a</sup> v razmerju 1 : 1

Velikostni označevalec *GeneRuler ULR*: redčen z NF-H<sub>2</sub>O v razmerju 2 : 3, nato 1 : 1 z nanašalnimi pufrom<sup>a</sup>

Velikostni označevalec *GeneRuler Mix*: 30× redčen z NF-H<sub>2</sub>O, nato 1 : 1 z nanašalnimi pufrom<sup>a</sup>

Denaturacija pred nanosom na gel: 80 °C, 3 min, nato na led

Pogoji elektroforeze: 180 V, približno 40 min

<sup>a</sup> Nanašalna raztopina: nanašalna raztopina 2× TBE-urea

Del gela z velikostnima označevalcema smo izrezali, ga obarvali z barvilom *SYBR Gold* (1:10000 v pufri TBE) med nežnim stresanjem (15 min) in razbarvali z NF-H<sub>2</sub>O (10 min). S pomočjo fotografije tega dela gela, narejene na transiluminatorju, smo pripravili masko za izrez delov gela z vzorci. Izrezali smo fragmente RNA, večje od 135 nt, in jih ekstrahirali iz gela (**3.4.10**).



### **Reverzna transkripcija**

RNA smo raztopili v 10 µl NF-H<sub>2</sub>O in dodali 2 µl 20 µM oligonukleotida RPIX Short. Zmes smo inkubirali 10 min pri 70 °C, nato pa takoj prestavili na led. Zmes za reverzno transkripcijo smo pripravili, kot je opisano v **poglavju 3.4.3**, le da smo uporabili dvakrat večje količine komponent in da nismo uporabili naključnih heksanukleotidov. Reakcijsko zmes smo inkubirali 2 uri pri 42 °C, nato pa inaktivirali encim (5 min, 70 °C, nato na led).

### **Reakcija PCR za sintezo knjižnice cDNA**

Najprej smo pomnožili 1 µl (tj. 1/10) cDNA v 20 µl reakciji in analizirali amplikone na gelu.

Reakcijska zmes:	Temperaturni program PCR:
1 µl cDNA	98 °C 40 sec
1 µl zmesi oligonukleotidov RPI Short/RPIX Short (aa 10 µM)	98 °C 20 sec 70 °C 30 sec 25 ciklov
10 µl mešanice <i>Phusion HF Master mix</i>	72 °C 45 sec
8 µl NF-H <sub>2</sub> O	72 °C 3 min
Kot negativno kontrolo smo uporabili 1 µl NF-H <sub>2</sub> O.	25 °C ∞

Amplikone smo analizirali na 2-% agaroznem gelu.

---

Vzorec: 20 µl + 4 µl nanašalne raztopine<sup>a</sup>

Velikostni označevalec *GeneRuler Mix*: 10 µl redčenega v razmerju 1:9 z NF-H<sub>2</sub>O + 2 µl nanašalne raztopine<sup>a</sup>

---

Pogoji elektroforeze: 150 V, približno 1 h

---

Barvanje: etidijev bromid (1:10000 v pufri, 15 min, nežno stresanje)

---

Razbarvanje: ultra čista voda za HPLC (10 min, nežno stresanje)

---

<sup>a</sup> Nanašalna raztopina: *Gel Loading Dye Purple* (6×)

Gel smo slikali na transiluminatorju in pripravili večjo reakcijo PCR s 7 µl cDNA (v 70 µl reakciji, cDNA lahko predstavlja le 1/10 končnega volumna). Nastavili smo 1 cikel manj, saj smo tokrat imeli dvakrat višjo koncentracijo cDNA v primerjavi s prvo reakcijo PCR. Vzorec smo očistili na 6-% TBE-PAGE gelu.

---

Vzorec: redčen 9 : 1 z nanašalno raztopino<sup>a</sup>

Velikostni označevalec *GeneRuler ULR*: 9 µl 30× redčenega + 1 µl nanašalne raztopine<sup>a</sup>

Velikostni označevalec *GeneRuler Mix*: 5 µl 30× redčenega + 4 µl NF-H<sub>2</sub>O + 1 µl nanašalne raztopine<sup>a</sup>

---

Pogoji elektroforeze: 180 V, približno 1 h

---

Barvanje: *SYBR Gold* (1:10000 v pufru TBE, 15 min, nežno stresanje)

---

<sup>a</sup> Nanašalna raztopina: *All-Purpose Native Agarose Gel Loading Solution* (10×)

Gel smo si ogledali na transiluminatorju in izrezali fragmente DNA dolžin med 125 bp in 420 bp. Sledila je ekstrakcija cDNA iz gela (**3.4.10**; uporabili smo temperaturo 60 °C namesto 25 °C).

### 3.4.13B Sinteza knjižnice cDNA po Protokolu 2

Knjižnico smo sintetizirali s komercialnim kompletom *SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit* po navodilih proizvajalca (*First Strand cDNA Synthesis in LD-PCR Protocol*). Sledila je analiza 5 µL vzorca na 1,7 % agaroznem gelu.

---

Vzorec: 5 µl + 1 µl nanašalne raztopine<sup>a</sup>

Velikostni označevalec *GeneRuler Mix*: 5 µl 10× redčenega + 1 µl nanašalne raztopine<sup>a</sup>

---

Pogoji elektroforeze: 150 V, približno 40 min

---

Barvanje: etidijev bromid (1:10000 v pufru TAE, 15 min, nežno stresanje)

---

Razbarvanje: prečiščena voda (10 min, nežno stresanje)

---

<sup>a</sup> Nanašalna raztopina: *Gel Loading Dye Purple* (6×)

### 3.4.14 Bioanalyzer

Analizo poliadenilarnane RNA z Bioanalyzer-jem smo izvedli po navodilih proizvajalca s pomočjo kompleta *Agilent Small RNA Kit* (čip za male molekule RNA).

### 3.4.15 PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (GS-PCR)

Iz pripravljene knjižnice cDNA smo skušali pomnožiti validirane interakcijske pare SNORD113/rRNA 18S in SNORD21/rRNA 28S ter pare SNORD116/neznan tarčna RNA, bodisi s kombinacijami začetnih oligonukleotidov, specifičnih za snoRNA in rRNA, bodisi s kombinacijo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za SNORD116, in univerzalnega oligonukleotida RPIX Short.

**PCR s padajočo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov (angl. Touch-down PCR) (oligonukleotidni pari 1, 2 in 3)**

Reakcijska zmes:

---

5 µL mešanice 2× PCR MM  
 0,4 µL para oligonukleotidov za validacijo  
 knjižnice cDNA 1, 2 ali 3  
 3,6 µL NF-H<sub>2</sub>O  
 1 µL cDNA

---

Pozitivna kontrola:

---

1 µL pGEM Amp 3.4/4.4/16<sup>a</sup>

Negativna kontrola:

---

1 µL NF-H<sub>2</sub>O

PCR-program: par oligonukleotidov 1 in 2

---

95 °C	5 min	
95 °C	15 s	22 ciklov
61 °C	45 s	(- 0,5 °C /cikel)
95 °C	15 s	35 ciklov
50 °C	45 s	
72 °C	5 min	
25 °C	∞	

---

PCR-program: par oligonukleotidov 3

---

95 °C	5 min	
95 °C	15 s	22 ciklov
64 °C	45 s	(- 0,5 °C /cikel)
95 °C	15 s	35 ciklov
53 °C	45 s	
72 °C	5 min	
25 °C	∞	

---

<sup>a</sup> plazmidi pGEM<sup>®</sup> T-Easy s predhodno vstavljenim vstavkom, ki vključuje komplementarno zaporedje uporabljenim oligonukleotidom.

**Klasični PCR (oligonukleotidni pari RPIX Short in oligonukleotidi A, B, C, D ali E)**

Reakcijska zmes:

---

5 µL mešanice 2× PCR MM  
 2 µL par oligonukleotidov RPIX Short in A,  
 B, C, D ali E  
 2 µL NF-H<sub>2</sub>O  
 1 µL cDNA

---

Negativna kontrola: 1 µL NF-H<sub>2</sub>O

---

PCR program:

---

96 °C	5 min	
96 °C	20 s	
41 °C	30 s	33 ciklov
72 °C	45 s	
72 °C	5 min	
16 °C	∞	

---

### ***Analiza rezultatov na 2,5-% agaroznem gelu***

---

Vzorec: 10  $\mu$ l + 2  $\mu$ l nanašalne raztopine<sup>a</sup>

Velikostni označevalec *GeneRuler Mix*: 1  $\mu$ l + 10  $\mu$ l NF-H<sub>2</sub>O + 2  $\mu$ l nanašalne raztopine<sup>a</sup>

---

Pogoji elektroforeze: 150 V, približno 30 min

---

Barvanje: etidijev bromid (1:10000 v pufru TAE, 15 min, nežno stresanje)

---

Razbarvanje: ultra čista voda za HPLC (10 min, nežno stresanje)

---

<sup>a</sup> Nanašalna raztopina: *Gel Loading Dye Purple* (6 $\times$ )

### **3.4.16 TA-kloniranje, transformacija s toplotnim šokom, pomnožitev in izolacija plazmidov**

#### ***TA-kloniranje***

Dele gela z vzorcem smo izrezali s čisto spatulo in jih prenesli v stehtane mikrocentrifugirke ter jih ponovno stehali (masa gela mora biti manjša od 0,250 g na mikrocentrifugirko). cDNA smo iz gela ekstrahirali s pomočjo kompleta *QIAEX II*<sup>®</sup> *Extraction Kit* po navodilih proizvajalca. Z izolirano cDNA smo nastavili reakcijo ligacije v plazmid *pGEM*<sup>®</sup> *T-Easy*.

Reakcijska zmes:

---

1  $\mu$ L plazmida *pGEM*<sup>®</sup> *T-Easy* (50 ng)

1  $\mu$ L ligacijskega pufru (10 $\times$ )

7,5  $\mu$ L amplikona, izoliranega iz gela

0,5  $\mu$ L T4 DNA-ligaze

---

Reakcijski pogoji:

---

16 °C, 16 h

---

Shranitev vzorca na - 20 °C.

---

#### ***Transformacija s toplotnim šokom***

Kompetentne celice *E. coli* TOP10 (hranjene pri -80 °C) smo odmrznili na ledu (20-30 min). Celicam smo aseptično dodali ligacijsko zmes in vsebino mikrocentrifugirke nežno premešali s pipeto. Inkubirali smo 20 minut na ledu, nato pa izvedli transformacijo s toplotnim šokom v vodni kopeli (42 °C, 45 s) in mikrocentrifugirko takoj zatem prestavili na led (2 min). Bakterijskim celicam smo v LAF-komori dodali 800  $\mu$ L gojišča LB in jih stresali 1 uro pri 37 °C. Celice smo ob ognju razmazali na agarno gojišče LB z ampicilinom (100  $\mu$ L neposredno, ostanek smo centrifugirali pri 5700 vrt./min 2 minuti in odstranili toliko supernatanta, da je ostalo ~100  $\mu$ L koncentriranih celic, ki smo jih nanegli na nove petrijevke z agarim gojiščem LB z ampicilinom). Petrijevke smo inkubirali preko noči pri 37 °C, nato pa jih prestavili na 4 °C. Po 5 kolonij z vsake petrijevke smo precepili v tekoče gojišče LB z ampicilinom in jih stresali pri 37 °C čez noč.

### ***Izolacija plazmidov***

V 2-ml mikrocentrifugirke smo prenesli 2 ml prekonočnih bakterijskih kultur, jih centrifugirali (2 min, 10000 vrt./min, sobna temperatura), odstranili supernatant in postopek ponovili s še z 2 ml bakterijske kulture. Celice smo lizirali in izolirali namnožen plazmid s pomočjo kompleta *GenElute<sup>®</sup> HP Plasmid Miniprep Kit* po navodilih proizvajalca. Plazmid smo eluirali v 70 µL elucijske raztopine. S spektrofotometrom Nanodrop smo pomerili koncentracijo plazmida v vzorcu, pri čemer smo kot slepo raztopino uporabili elucijsko raztopino.

### **3.4.17 PCR-analiza rezultatov in sekvenciranje**

#### ***Reakcija PCR***

Z eluiranim plazmidom smo nastavili reakcijo PCR, da smo preverili prisotnost in ocenili dolžino vstavljenih amplikonov.

Reakcijska zmes:	PCR program:
5 µL mešanice 2× PCR MM	95 °C 5 min
0,8 µL zmesi oligonukleotidov SP6/T7 (aa 5 µM)	95 °C 30 s 45 °C 30 s 30 ciklov
0,5 µL izoliranega plazmida	72 °C 1 min
3,7 µL NF-H <sub>2</sub> O	72 °C 5 min
Negativna kontrola: NF-H <sub>2</sub> O	16 °C ∞
Pozitivna kontrola: 1:10 redčen plazmid z znanim vstavkom iz preliminarnih poskusov	

Amplikone smo analizirali na 2,5-% agaroznem gelu (**3.4.15**).

#### ***Sekvenciranje***

Zmesi za sekvenciranje:

5 µL začetnega oligonukleotida T7 ali SP6 (5 µM)

2,5 µL NF-H<sub>2</sub>O

2,5 µL raztopine plazmida (~ 200 ng/µl)

Posamezne zmesi smo označili z nalepkami za sekvenciranje in jih poslali podjetju GATC Biotechnology (Konstanz, Nemčija), kjer so izvedli sekvenciranje.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Kontrola izražanja SNORD116 v celični liniji HEK293 FlpIn SNORD116

Celična linija HEK293 FlpIn je celična linija za stabilno izražanje transgenov, ki izkorišča rekombinazo Flp za integracijo v tarčno mesto v genomu. Pri našem delu smo uporabili to celično linijo z vstavljenim konstruktom za SNORD116, zato smo pred pričetkom dela preverili, če in v kolikšni meri se vstavljen zapis za SNORD116 izraža. Celice smo lizirali, izolirali molekule RNA in jih z reverzno transkripcijo prepisali v cDNA. Delali smo v dveh paralelah, kar nam je omogočilo primerjavo vzorcev med izolacijo in kasneje med izvedbo qPCR, katere rezultati so prikazani v **Prilogi 1**. Pri izvedbi qPCR smo uporabili več redčitev vzorca, da bi ocenili učinkovitost pomnoževanja. V teoriji se v enem ciklu količina materiala podvoji, v praksi pa to zaradi omejenih virov, količine encima in morebitno prisotnih zaviralcev DNA-polimeraze ne drži popolnoma. Izračunane učinkovitosti pomnoževanja (prikazane v **Prilogi 1**) so v zelenem območju (90-105 %), z izjemo zaporedja SNORD13, in ponovljive med vzporednima vzorcema (cDNA 1 in cDNA 2, ni prikazano).

Na enak način kot cDNA smo analizirali tudi vzorce RNA v koncentraciji 5 ng/ $\mu$ L, ki smo jih prihranili pred korakom reverzne transkripcije. Ta vzorec predstavlja kontrolo kontaminacije z genomsko DNA v vzorcu in je merilo uspešnosti čiščenja ter izolacije RNA v prejšnjih korakih. Glede na prikazane rezultate v **Prilogi 1** je DNA v vzorcih cDNA nekaj tisočkrat več kot je genomske DNA v vzorcu RNA (tj. v vzorcu istega materiala, le da nismo izvedli reakcije reverzne transkripcije; uporabili smo redčitev RNA, ki je primerljiva z redčitvijo cDNA 1:20), kar pomeni, da lahko kontaminacijo z genomsko DNA zanemarimo.

Amplikonom smo tudi določili talilne temperature verig (angl. *melting temperature*,  $T_m$ ), kjer smo vzorce segreli do denaturacije in jih nato postopno ohlajali. Ob združitvi verig je prišlo do porasta fluorescence (interkalacija barvila med obe verigi). Temperaturo, pri kateri je razmerje med dvo- in enoverižno DNA (amplikona) 1:1, imenujemo  $T_m$ . Odvisna je od dolžine in zaporedja molekule DNA. Glede na določene  $T_m$  amplikonov (ni prikazano) lahko rečemo, da je prisoten en sam amplikon na analiziran vzorec in da je pomnoževanje poteklo specifično.

Rezultati so pokazali, da celice HEK293 FlpIn SNORD116 izražajo SNORD116 (za razliko od netransfecirane starševske linije, ki smo jo analizirali predhodno – ni prikazano) in da je stopnja

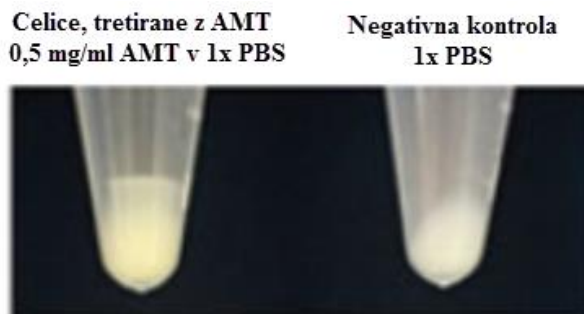
izražanja SNORD116 primerljiva z endogenimi snoRNA. Pri gojenju celic smo izpustili uporabo induktorja (doksiciklina), saj že FBS v gojišču vsebuje tetraciklin v nizkih koncentracijah.

## 4.2 Vzpostavitev metode za določanje interakcij med molekulami RNA

### 4.2.1 Obsevanje celic

Vse tri uporabljene celične linije so adherentne, zato smo tudi inkubacijo z AMT in obsevanje izvedli na pritrjenih celicah in na ledu, da bi zmanjšali stres na celice ter upočasnili celične procese. Dodaten stres je celicam predstavljala odstranitev gojišča, ki smo jo izvedli pred inkubacijo. Zaradi tega je bilo pomembno, da so bili koraki od odstranitve gojišča in do končne zamrznitve obsevanih celic izvedeni čim hitreje in je bil čas nefizioloških pogojev za celice čim krajši. Tako dosežemo, da so detektirane interakcije posledica interakcij, ki so normalno prisotne v celicah. Kot negativno kontrolo smo uporabili inkubacijo brez AMT (le PBS).

Pri obsevanju celic v prisotnosti AMT, je bila opazna blede-rumena fluorescenca, ki je bila odsotna pri celicah, inkubiranih le v PBS. Prav tako so bile usedline celic, tretiranih z AMT, rumenkasto obarvane za razliko od negativne kontrole (**Slika 14**).



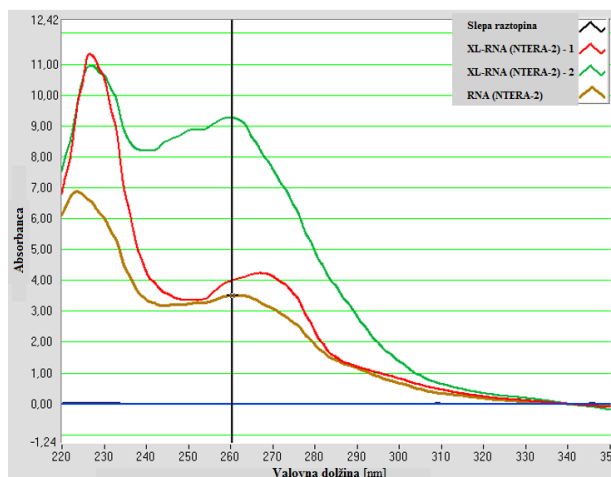
**Slika 14:** Razlika v barvi celic, ki so bile tretirane z AMT, in celic, ki so bile inkubirane le v PBS. Prirejeno po<sup>26</sup>.

### 4.2.2 Liza celic in izolacija molekul RNA iz celičnega lizata

Pri lizi celic in izolaciji molekul RNA smo sledili protokolu metode PARIS. Za lizo smo uporabili kombinacijo denaturanta (urea), detergenta (SDS) in mehanskega stresa (intenzivno pipetiranje), ki podre integriteto celičnih membran in denaturira proteine. Pri tem so zaradi obarjanja proteinov in prisotnosti kromosomske DNA vzorci postali zelo viskozni. Poleg tega je tvorba kovalentne vezi preko AMT molekule RNA povezala v obširne mreže, ki so netopne tudi v prisotnosti močnih denaturantov in kaotropnih reagentov. Zato smo pred nadaljevanjem uporabili encim nukleazo S1, ki delno razcepi takšne mreže (preferenčno hidrolizira enoverižne RNA, medtem ko so dvoverižne strukture odporne proti razgradnji) in omogoči izolacijo RNA iz lizata. Nukleaza S1 po cepitvi pusti fosfatno skupino na 5'-koncu in hidroksilno skupino na 3'-koncu molekul RNA, ki so zaradi tega neposredno uporabne za kasnejšo reakcijo proksimalne ligacije.<sup>28</sup> Pred izolacijo molekul RNA

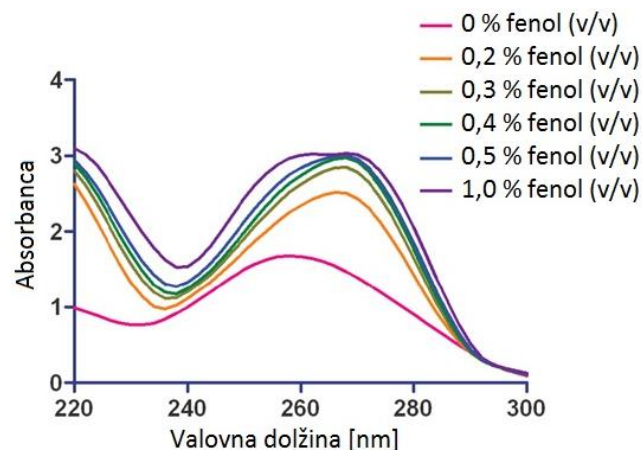
iz lizata smo z encimom proteinaza K še razgradili proteine, ki so lahko tudi vezani na molekule RNA.<sup>26</sup> Molekule RNA smo izolirali z reagentom *RiboZol*-om, ki omogoča izolacijo celotne celične RNA iz različnih celic in tkiv. Zavira tudi RNazno aktivnost in tako zmanjša razgradnjo molekul RNA med izolacijo. Po dodatku kloroforma in centrifugiranju so se molekule RNA nahajale v zgornji (vodni) fazi. Ker so molekule RNA slabo topne v etanolu, smo izvedli precipitacijo preko noči v etanolu, s čimer smo vzorec dodatno očistili in skoncentrirali. Za lažjo precipitacijo smo uporabili *GlycoBlue*, ki je modro obarvan glikogen. Njegove molekule služijo kot jedra, na katerih se oborijo molekule RNA. Po precipitaciji smo lahko prvič preverili potek metode z meritvijo koncentracije in čistote na spektrofotometru Nanodrop. Na tem mestu je bil spekter običajno nečist (**Slika 15**).

**Slika 15:** Primer spektrov treh kontaminiranih vzorcev. V spektrih je prisoten dodatni vrh pri 225 nm, ki je značilen za kontaminacijo s fenolom. Poleg tega je vrh pri 260 nm, značilen za molekule RNA, premaknjen v desno.



V spektrih kontaminiranih vzorcev smo opazili dodatni vrh pri 225 nm. Poleg tega je bil vrh pri 260 nm, ki je značilen za molekule RNA, premaknjen v desno. Obe spremembi sta kazali na kontaminacijo vzorcev s fenolom, kar je vodilo v odločitev, da izvedemo dodatni korak čiščenja z ekstrakcijo s fenolom/kloroformom, pri kateri se bo fenol bolje topil v organski fazi (kloroformu). Zaradi spremembe oblike spektra tudi nismo mogli zaupati izmerjenim koncentracijam RNA v vzorcu, kar je oteževalo nadaljnje delo. Kako vsebnost fenola vpliva na obliko spektra molekul RNA, je prikazano na **Sliki 16**.

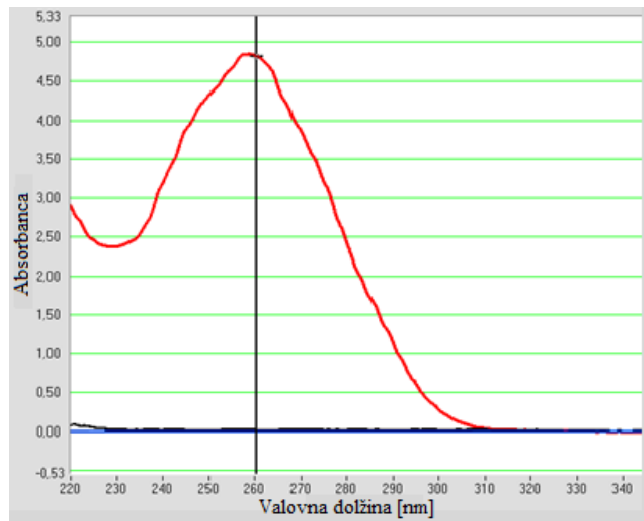
**Slika 16:** Prikaz vpliva naraščajočih koncentracij fenola v raztopini RNA na obliko absorpcijskega spektra. Prisotnost fenola v vzorcu povzroči pojav dodatnega vrha pri 225 nm in premik vrha pri 260 nm v desno. Prirejeno po<sup>51</sup>.





Da bi ob predstavitvi vodne faze po ekstrakciji zmanjšali možnost zajetja spodnje organske faze, smo uporabili mikrocentrifugirke »Phase Lock Heavy Tubes«, ki vsebujejo vosku podobno snov, ki po centrifugiranju ločuje obe fazi in preprečuje kontaminacijo. To lastnost smo skušali izkoristiti že pri sami izolaciji RNA iz vzorca z uporabo reagenta *RiboZol*-a, ampak smo po več neuspešnih poskusih takšno uporabo opustili. Ločevalni vosek se po centrifugiranju namreč ni nahajal med fazama, ampak je ostal na dnu ali po stenah mikrocentrifugirke. **Slika 17** prikazuje spekter vzorca po čiščenju z ekstrakcijo s fenol/kloroformom.

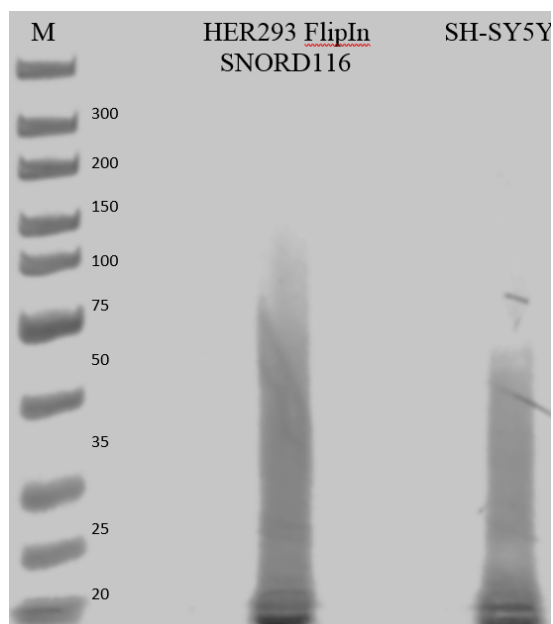
**Slika 17:** Spekter izolata RNA iz celic *NTERA-2* po dodatnem koraku čiščenja z ekstrakcijo s fenolom/kloroformom.



Namesto ekstrakcije s fenolom/kloroformom smo lahko vzorce očistili tudi s komercialnim kompletom *RNA Clean/Concentrator Kit*, katerega glavna prednost je, da se izognemo prekonočni precipitaciji v etanolu in v protokolu pridobimo en dan. Običajno smo pred dodatno ekstrakcijo več vzorcev iste celične linije združili, da smo zmanjšali izgube. Združitev več vzorcev je tudi olajšala nadaljevanje, saj za uspešno reakcijo z *RNazo ShortCut III* potrebujemo ~ 20 µg RNA v vzorcu, česar pogosto nismo dosegli zaradi izgub RNA med izolacijo in čiščenjem.

#### 4.2.3 Delna razgradnja molekul RNA

Razgradnja molekul RNA na krajše fragmente (običajno manj kot 150 nt) pospeši in izboljša ločbo molekul pri procesu 2D-elektroforeze in skrajša čas priprave knjižnice.<sup>26</sup> Poleg tega krajše fragmente lažje analiziramo pri sekvenciranju. Encim, ki ga pri tem koraku uporabimo, *RNaza ShortCut III*, tako kot nukleaza S1 po cepitvi pusti fosfatno skupino na 5'- in hidroksilno skupino na 3'-koncu molekule RNA, kar omogoči direktno proksimalno ligacijo v nadaljevanju.<sup>28</sup> V začetnih poskusih smo količino encima prilagajali glede na izmerjeno koncentracijo molekul RNA v vzorcu (3 µl encima za 20 µg RNA), vendar smo v naslednjem koraku opazili precej kratke fragmente na gelu v 1. dimenziji 2D-elektroforeze (nativni pogoji) (**Slika 18**). Prekratki fragmenti so spet težavni za analizo, saj jih je težko pomnožiti in nedvoumno kartirati. Zato smo v nadaljevanju dela pri tem koraku uporabili manjšo količino encima, in sicer 2,5 µl.

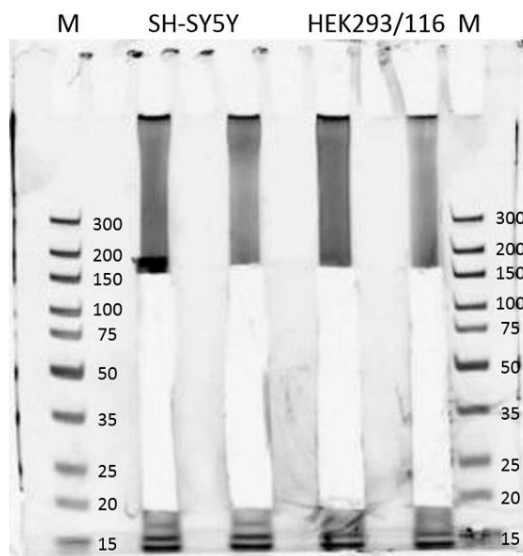


**Slika 18:** Fotografija gela po 1. dimenziji 2D-elektroforeze (nativni pogoji), kjer smo zaradi preobsežne razgradnje molekul RNA dobili prekratke fragmente. M – velikostni označevalec. Večina fragmentov je krajših od tistih, ki ustrezajo 35 bp.

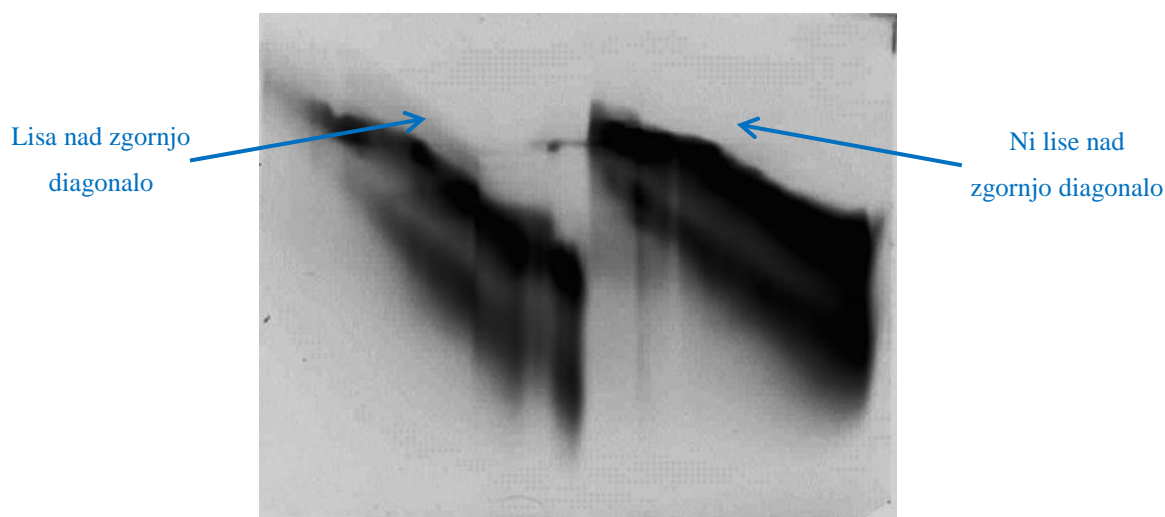
#### 4.2.4 2D-elektroforeza

Za ločitev prečno povezanih dupleksov od ostalih molekul RNA v vzorcu smo uporabili ločbo z 2D-elektroforezo, pri čemer smo sledili protokolu metode PARIS.<sup>26,28</sup> V prvi dimenziji so se molekule RNA pod nativnimi pogoji ločile po velikosti. Pri tem so premrežene partnerske RNA potovale kot dvoverižne strukture. Tu nismo uporabili visoke napetosti, saj bi ta lahko segrela gel in s tem delno denaturirala dvoverižne molekule RNA v vzorcu. Po ločbi v prvi dimenziji gel smo izrezali trakove vzorcev s fragmenti, ki ustrezajo dolžini med 25 in 150 bp, kot to prikazuje **Slika 19**. Glede na dolžino izrezanih trakov smo običajno lahko prestavili po dva trakova (vzorca) na posamezen gel za 2. dimenzijo. Pri tem smo pazili, da smo oba obrnili enako.

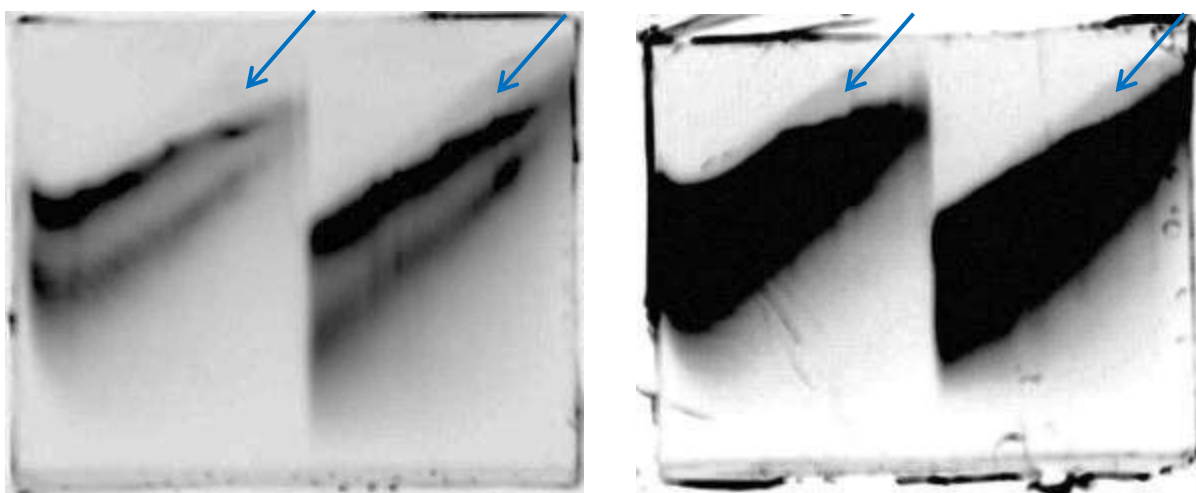
**Slika 19:** Izrez gela po prvi dimenziji. M – velikostni označevalec. Izrezali smo trakove z RNA, ki po dolžini ustrezajo ~ 20 in 150 bp.



Tekom dela smo ugotovili, da moramo elektroforezo v 2. dimenziji obvezno izvajati z 2 geloma naenkrat, saj z le enim gelom ne dosežemo zadostnega upora, posledično pa ne dovolj visoke napetosti. Elektroforeza v 2. dimenziji poteka pod denaturacijskimi pogoji in pri visoki napetosti (~ 500 V), ki povzroči segretje sistema, to pa dodatno prispeva k denaturaciji molekul RNA. Tako duplexi potujejo v raztegnjeni konformaciji in se obnašajo kot daljše intaktne RNA. Po koncu elektroforeze so se prečno povezane molekule RNA nahajale nad glavno diagonalo (**Sliki 20** in **21**). Z izrezom tega dela gela in ekstrakcijo molekul iz gela smo pomembno obogatili iskane molekule RNA (le med 0,2-0,5 % začetne RNA predstavljajo prečno povezane RNA)<sup>28</sup>. Do te stopnje smo vzporedno izvajali tudi negativno kontrolo z molekulami RNA, izoliranimi iz celic, ki niso bile inkubirane v prisotnosti 0,5 mg/ml AMT. Po končani 2D-elektroforezi je bila lisa nad zgornjo diagonalo pri tem vzorcu odsotna (**Slika 20**), zato smo na tej točki končali z izvajanjem protokola za ta vzorec. Negativna kontrola je pokazala, da je za tvorbo prečne kovalentne vezi med molekulama RNA v interakciji ključna molekula AMT in da tvorba vezi pomembno vpliva na stabilizacijo interakcije, saj brez nje po 2D-elektroforezi ne dobimo dvoverižnih molekul RNA nad zgornjo diagonalo.



**Slika 20:** Gel po 2. dimenziji 2D-elektroforeze molekul RNA iz vzorca NTERA-2 (levo) in negativne kontrole NTERA-2, kjer celice niso bile inkubirane v prisotnosti 0,5 mg/ml AMT (desno). Pri negativni kontroli lisa nad zgornjo diagonalno ni prisotna.



**Slika 21:** Gel po 2. dimenziji 2D-elektroforeze molekul RNA iz dveh vzorcev HEK293 FlpIn SNORD116 (levo) in dveh vzorcev SH-SY5Y (desno). Z modrimi puščicami so označene lise nad zgornjo diagonalo, kjer se nahajajo dupleksi molekul RNA.

Oba gela 2D-elektroforeze smo pogledali s transiluminatorjem, pri čemer smo pazili, da nismo uporabili UV-svetlobe z nizkimi valovnimi dolžinami (npr. 254 nm). Obsevanje s takšnimi valovnimi dolžinami namreč prekine reverzibilno prečno povezavo preko AMT, to pa izniči stabilizacijo interakcij, ki smo jo dosegli na začetku, saj na tem mestu molekuli RNA še nista povezani skupaj v hibridno molekulo (reakcija proksimalne ligacije).<sup>26,28</sup> Pri gelu 2. dimenzije smo po barvanju uporabili še razbarvanje s pufrom, saj poveča občutljivost in je priporočljivo glede na majhno količino prečno premrežene RNA v vzorcu.

Za ekstrakcijo molekul RNA smo izrezane dele gela zdrobili s centrifugiranjem preko z iglo narejene luknjice v mikrocentrifugirki. Centrifugalna sila je gel potisnila skozi luknjico in ga pri tem zdrobila v majhne delčke, kar je zagotovilo večjo površino za ekstrakcijo, jo pospešilo in izboljšalo njeno učinkovitost. Ekstrakcija iz gela je potekala 2 uri pri sobni temperaturi. V tem času bi se lahko del molekul RNA razgradil, saj pri ekstrakciji nismo uporabili zaviralcev RNaz. Ker je v elektroforeznem gelu prisotna urea, smo pred nadaljevanjem izvedli še ekstrakcijo s fenolom/kloroformom, pri kateri je le-ta ostala v organski fazi.

#### **4.2.5 Proksimalna ligacija in prekinitev kovalentne povezave, posredovane z AMT (t.i. »reverse crosslinking«) ter poliadenilacija**

Proksimalna ligacija je poleg tvorbe prečne vezi in 2D-elektroforeze eden ključnih korakov metode, saj omogoči nastanek hibridnih RNA. Po proksimalni ligaciji molekul RNA v interakciji

lahko prekinemo reverzibilno vez, posredovano z AMT, in pričnemo s pripravo knjižnice cDNA. Encim T4 RNA-ligaza 1 katalizira tvorbo fosfodiesterne vezi med fosfatno skupino na 5'-koncu in hidroksilno skupino na 3'-koncu, hkrati pa poteče hidroliza ATP do AMP in difosfata.<sup>52</sup> Pri izvedbi reakcije smo sledili protokolu prvotne metode PARIS, kjer pa uporabijo nižjo koncentracijo ATP v reakcijski zmesi, kot jo priporoča proizvajalec encima.<sup>53</sup> Po navodilih proizvajalca encima bi morala biti končna koncentracija ATP v ligacijski zmesi 1 mM, mi pa smo imeli kar 67× nižjo koncentracijo. To pomeni, da se med verigama prečno povezanih RNA fosfodiesterne vezi ni tvorila oziroma ni tvorila v zadostnem obsegu in smo morda po obsevanju z UV-svetlobo valovne dolžine 254 nm dobili večinoma fragmente RNA, ki so pripadali posameznim transkriptom in ne hibridov. V prihodnje zato priporočamo uporabo višje koncentracije ATP v ligacijski zmesi, saj je proksimalna ligacija eden ključnih korakov za uspeh metode. V novejšem članku metode PARIS so prav tako uporabili višjo koncentracijo ATP, in sicer je koncentracija v končni zmesi 0,5 mM, kar pa je še vedno nižje od proizvajalčevih navodil.<sup>26</sup>

Po reakciji proksimalne ligacije sta bili molekuli RNA povezani v hibridno RNA-molekulo, kar je pomenilo, da smo lahko prekinili reverzibilno vez preko AMT z obsevanjem z UV-svetlobo valovne dolžine 254 nm. Po prekinitvi prečne vezi smo molekule RNA poliadenilirali z encimom poli(A) polimerazo, ki na 3'-konce molekul RNA pripne več adeninov in s tem omogoči sidrišče za začetni oligonukleotid anchor RT pri reakciji reverzne transkripcije (anchor RT ima na 5'-koncu več timinov, ki se komplementarno vežejo na poli(A) rep molekul RNA).

#### 4.2.6 Bioanalyzer

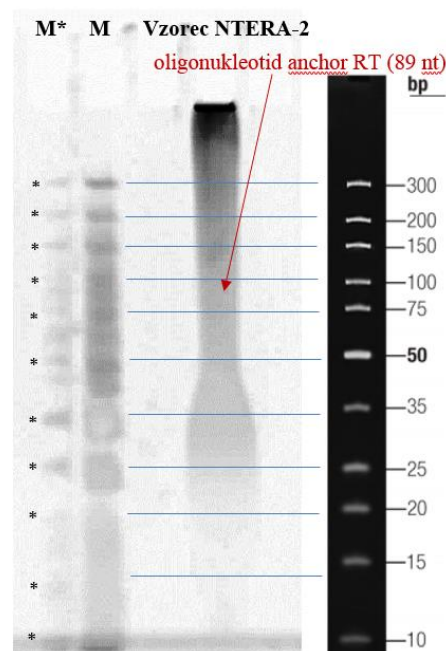
Poliadenilirane molekule RNA smo pred pripravo cDNA knjižnice analizirali z napravo Bioanalyzer, da bi kvantificirali molekule RNA v vzorcu in ocenili distribucijo dolžin molekul RNA. Rezultati, ki so prikazani v **Prilogi 2**, so pokazali precej kratke molekule RNA, kar malo odstopa od rezultatov po agarozni elektroforezi (**4.2.7**; **Slika 27**), ki prikazujejo isti vzorec po sintezi knjižnice. Možna razlaga bi bila v prenizki občutljivosti naprave Bioanalyzer, saj smo pred agarozno elektroforezo material v vzorcu pomnožili z reakcijo PCR. So pa dobljeni spektri po svoji obliki zelo podobni spektrom po razgradnji z RNazo *ShortCut III* iz publikacije o metodi PARIS.<sup>28</sup> Rezultati so tudi pokazali, da je molekul RNA največ v vzorcu iz celic NTERA-2, ki je prestal kasnejšo validacijo knjižnice cDNA (**4.2.8-4.2.10**; **Slika 32**). Izmerjene koncentracije molekul RNA v vzorcih so se gibale v območju nekaj ng/μL, kar ustreza pričakovanemu izplenu nekaj deset ng na 20 μg celotne izolirane RNA.<sup>28</sup>

## 4.2.7 Sinteza knjižnice cDNA

### Protokol 1

Poliadenilirane molekule RNA smo najprej reverzno prepisali v cDNA s pomočjo začetnega oligonukleotida anchor RT, s čimer smo hkrati uvedli adaptersko zaporedje na 5'-konec cDNA in promotorsko regijo za reakcijo IVT. Sledila je sinteza komplementarne verige s pomočjo encimske mešanice *Second Strand Synthesis Mix*, ki vsebuje 3 encime. RNaza H cepi odseke RNA, ki so ostali vezani na cDNA po reakciji reverzne transkripcije. Fragmenti RNA, ki ostanejo, postanejo začetni oligonukleotidi za DNA-polimerazo, ki je drugi encim v mešanici. DNA-polimeraza sintetizira komplementarno verigo in odcepi RNA-začetne oligonukleotide. Zadnji encim v mešanici je DNA-ligaza, ki poveže pomnožene fragmente v enotno verigo.

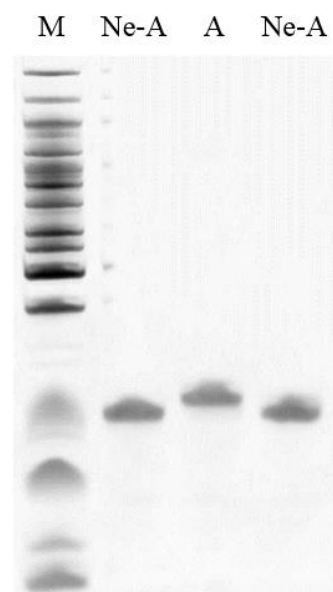
Sintezi druge verige je sledila reakcija *in vitro* transkripcije (IVT) za linearno pomnožitev materiala. Idejo zanjo smo dobili v protokolu metode sCLIP (poenostavljena metoda tvorbe prečne vezi z imunoprecipitacijo, angl. *Simple Cross-linking and Immunoprecipitation*), ki je še ena izmed izpeljank metode CLIP. IVT izboljša kompleksnost knjižnice, hkrati pa znatno zmanjša potrebno začetno količino materiala in potrebno število korakov čiščenja.<sup>54</sup> Hkrati lahko z reakcijo IVT že izberemo odseke željenih velikosti in se tako izognemo izgubam dragocenega materiala ob izolaciji iz gela po ločitvi fragmentov po velikosti.<sup>54</sup> Dodatno se zmanjša število kasnejših PCR-ciklov, potrebnih za pripravo knjižnice, kar zmanjša verjetnost nepravilnega (neproporcionalnega) podvojevanja.<sup>54</sup> Ker končani reakciji in precipitaciji z etanolom nismo več videli oborine RNA, smo se odločili, da izvedemo gelsko elektroforezo in preverimo, ali imamo v vzorcu še kakšno drugo RNA kot le presežni oligonukleotid anchor RT (89 nt) iz koraka reverzne transkripcije. Fotografija gela po končani elektroforezi je prikazana na **Sliki 22**. V vzorcu smo zaznali RNA s širokim razponom dolžin.



**Slika 22:** Fotografija 10-% denaturacijskega gela TBE-PAGE. Poleg oligonukleotida anchor RT, ki je dolg 89 nt, so prisotne tudi RNA različnih dolžin. Velikostni označevalec (M) je bil nanešen v preveliki koncentraciji, kar je razvidno iz zabrisanih in širokih pasov za posamezne velikosti. M\* je posledica razlitja nanosa M v sosednjo vdolbinico gela, kar nam je omogočilo določitev velikosti.

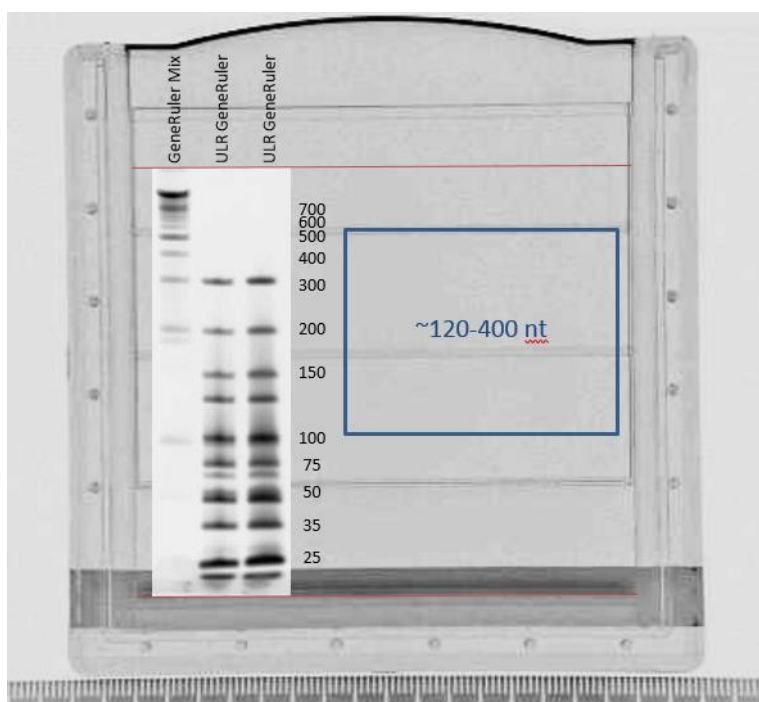


Po potrditvi prisotnosti molekul RNA v vzorcu smo nadaljevali s protokolom. Molekule smo defosforilirali (odcepili smo končne fosfate) in nanje ligirali adenilirani 3'-adapter IX. Adenilacija aktivira adapter in omogoči ligacijo z encimom T4 RNA-ligazo v odsotnosti ATP. Adenilacijo 3'-adapterja IX smo izvedli pred pričetkom protokola, njeno uspešnost pa preverili na visoko-resolucijskem 20-% denaturacijskem gelu TBE-PAGE (**Slika 23**), kjer se jasno vidi razlika v potovanju adeniliranega in neadeniliranega oligonukleotida.



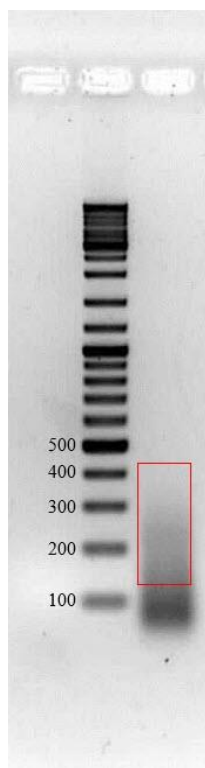
**Slika 23:** 20-% denaturacijski gel TBE-PAGE, ki prikazuje razliko v potovanju adeniliranega in neadeniliranega 3'-adapterja IX. Adenilirani adapter (A) je potoval počasneje kot neadenilirani kontrolni (Ne-A), čeprav se razlikujeta le v dolžini enega nukleotida.

Presežni adapter smo po ligaciji odstranili z ločbo na elektroforeznem gelu in izrezom iz gela. Pomagali smo si s t.i. masko (**Slika 24**), ki smo jo pripravili na računalniku s fotografijo obarvanega dela gela z velikostnima označevalcema.



**Slika 24:** Prikaz izdelane maske, ki nam je služila kot šablona za izrez pasov vzorcev. Zanimale so nas molekule RNA dolžine ~ 120-400 nt.

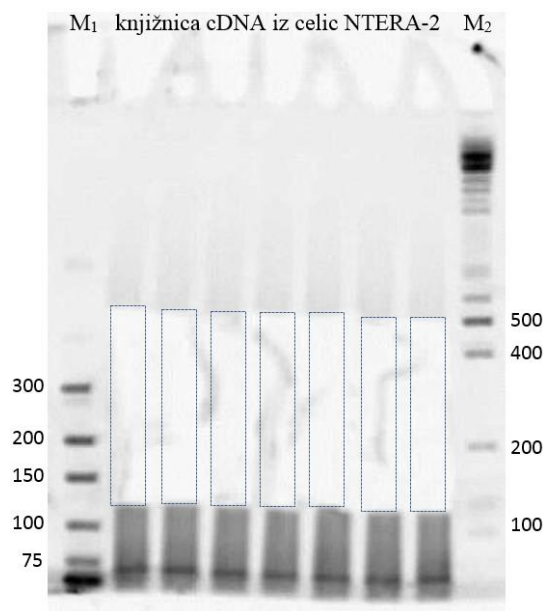
Izrezali smo pasove gela z RNA dolžine med ~ 120 in 400 nt. Spodnjo mejo smo določili glede na skupno dolžino obeh adapterjev (89 nt + 27 nt), zgornja meja pa je bila pogojena z izrezom iz gela 2. dimenzije pri 2D-elektroforezi. Takrat smo namreč izolirali fragmente dolge do 150 bp (tj. 300 nt), katerih dolžina skupaj z adapterji je zdaj do 400 nt. Molekule RNA smo ekstrahirali iz gela in jih reverzno prepisali v molekule cDNA z uporabo oligonukleotida RPIX Short. Sledila je reakcija PCR na manjšem delu vzorca (1  $\mu$ l cDNA), s katero smo določili primerno število ciklov PCR, optimalno za naš vzorec. Fotografija 2 % agaroznega gela, s katerim smo preverili ustreznost števila PCR ciklov, je prikazana na **Sliki 25**.



**Slika 25:** Fotografija 2-% agaroznega gela, s katerim smo preverili ustreznost števila ciklov PCR. Pomembno je določiti primerno število ciklov PCR za sintezo knjižnice. Z reakcijo PCR, ki ima premalo ciklov, dobimo šibek signal ter prenizko koncentracijo molekul DNA za uspešno sekvenciranje. Preveliko število ciklov PCR pa je lahko vzrok za pojav artefaktov PCR.<sup>55,56</sup> V našem vzorcu pričakujemo molekule dolžine med 125 in 420 bp, kar prikazuje rdeč pravokotnik na sliki. Na tem območju dobro vidimo molekule različnih velikosti, hkrati pa ne vidimo posameznih izrazitih lis, zato smo s številom ciklov reakcije PCR zadovoljni.

Ker smo bili s številom ciklov zadovoljni, smo reakcijo PCR izvedli še v večjem obsegu, pri čemer smo nastavili 1 cikel manj, saj smo imeli v vzorcu dvakrat višjo koncentracijo cDNA. Alikvote ampliconov smo očistili na 6-% gelu TBE-PAGE (izrezali in ekstrahirali smo DNA dolžine med 125 in 500 bp (**Slika 26**)). Pri ekstrakciji iz gela smo si lahko privoščili višjo temperaturo kot pri ekstrakciji molekul RNA iz gela po 2D-elektroforezi, saj smo imeli tu opravka z molekulami DNA, ki so bolj stabilne in odporne proti razgradnji kot molekule RNA. S tem korakom smo dobili knjižnico cDNA, izbranih velikosti cDNA, po Protokolu 1.





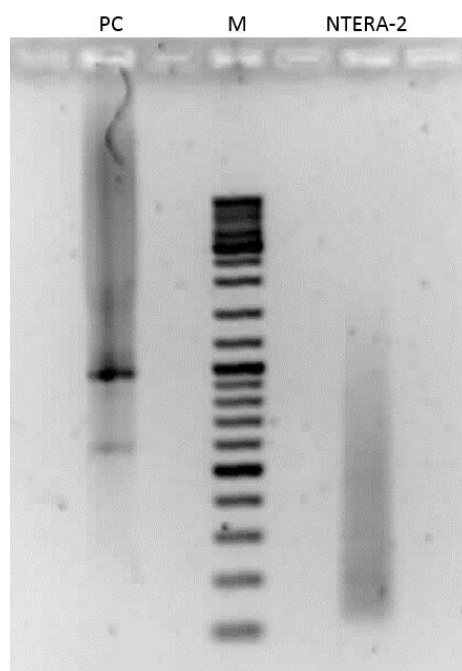
**Slika 26:** Fotografija 6-% gela TBE-PAGE po izrezu vzorcev. Vseh sedem nanosov predstavlja knjižnica cDNA iz celic NTERA-2. Velikostna označevalca:  $M_1$  – GeneRuler ULR,  $M_2$  – GeneRuler Mix

### **Protokol 2**

V tem protokolu smo pri sintezi knjižnice cDNA uporabili komercialni komplet *SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit*, katerega prednost je priprava knjižnic cDNA iz zelo majhnih količin RNA (npr. 50 ng RNA) z uporabo tehnike preskoka matrične verige (angl. *template switching*). Pomanjkljivost običajnih metod je, da encim reverzna transkriptaza pogosto ne prepíše celotnih molekul RNA, sploh kadar te vsebujejo številne sekundarne strukture. Ta metoda pa izkorišča terminalno transferazno aktivnost reverzne transkriptaze, ki doda nekaj nukleotidov C na 3'-konec verige cDNA.<sup>57</sup> Protokol sestoji iz sinteze prve verige (angl. *First-Strand cDNA Synthesis*) in pomnožitvene reakcije PCR na dolge razdalje (angl. *long-distance PCR*, LD-PCR). Značilnost kompleta je uporaba patentiranega oligonukleotida SMART IV (angl. *Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript*). Omenjeni oligonukleotid, ki ima na svojem 3'-koncu zaporedje gvanidinov, se pari s nastalim zaporedjem citozinov, kar ustvari podaljšano matrico in omogoči preskok reverzne transkriptaze, ki tako prepíše verigo vse do konca oligonukleotida.<sup>58</sup> Rezultat sinteze prve verige je enoverižna cDNA, prepisana v celoti, tj. vse do dela komplementarnega 5'-koncu molekule RNA, kar je pogost problem pri klasični reverzni transkripciji. Poleg tega je končno zaporedje takšne cDNA komplementarno oligonukleotidu SMART IV, ki ga lahko uporabimo kot začetni oligonukleotid v sledeči reakciji LD-PCR.<sup>58</sup> V tej reakciji se pomnožijo le molekule, ki vsebujejo komplementarno zaporedje oligonukleotidu SMART IV. Tako je preprečena kontaminacija knjižnice z genomsko DNA in ne v celoti prepisanimi cDNA.<sup>57,58</sup>

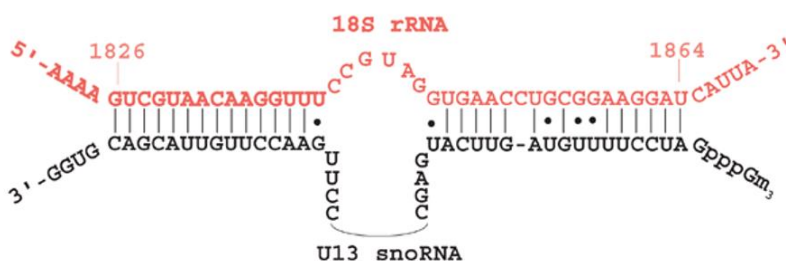
Po priporočilu proizvajalca smo pripravo knjižnice izvedli tudi s poliadenilirano RNA (iz mišjih jeter, sestavni del kompleta), ki je služila kot kontrola delovanja protokola. Pri pozitivni kontroli smo izvedli le 21 ciklov reakcije PCR, saj smo imeli več začetne DNA kot v knjižnicah cDNA. Pri slednjih pa smo izvedli 30 ciklov PCR. Na **Sliki 27** je prikazana fotografija gela, na katerem smo analizirali sintetizirano knjižnico cDNA. V vzorcu pozitivne kontrole sta opazni dve močnejši lisi, ki ustrežata obsežneje izraženim transkriptom; distribucija velikosti cDNA je primerljiva s sliko potovanja pozitivne kontrole v proizvajalčevem protokolu.<sup>58</sup>

**Slika 27:** Fotografija 1,7-% agaroznega gela po sintezi knjižnice cDNA s kompletom SMART™ Library Construction Kit. Levo je poliadenilirana RNA, ki je služila kot pozitivna kontrola (PC), na sredini velikostni označevalec (M), desno pa knjižnica cDNA, pripravljena iz celične linije NTERA-2.



#### 4.2.8 PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (GS-PCR)

Knjižnice cDNA smo najprej validirali z reakcijo GS-PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za znane pare snoRNA/rRNA (pari oligonukleotidov za validacijo knjižnice cDNA 1, 2 in 3). **Sliki 28** in **29** prikazujeta skici interakcij, ki smo ju skušali potrditi.



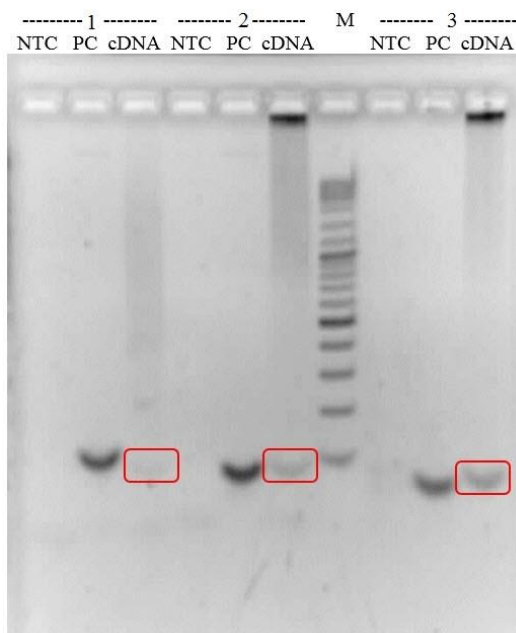
**Slika 28:** Skica baznega parjenja pri interakciji med rRNA 18S in snoRNA SNORD13 (tudi U13), ki smo jo poskusili potrditi s paroma oligonukleotidov za validacijo knjižnice cDNA 1 in 2. Prirejeno po<sup>59,60</sup>.

**Slika 29:** Skica baznega parjenja pri interakciji med rRNA 28S in snoRNA SNORD21 (U21), ki smo jo poskusili potrditi s parom oligonukleotidov za validacijo knjižnice cDNA 3. Prirejeno po <sup>60,61</sup>.



Uspešni smo bili pri validaciji knjižnice, pripravljene iz celic NTERA-2 po Protokolu 2 (**Slika 30**). Pri pozitivnih kontrolah reakcije GS-PCR smo uporabili v preliminarnih poskusih pomnožene in sekvencirane hibridne molekule cDNA (T. Bratkovič, ni prikazano). Uporabljena reakcijska mešanica 2× PCR MM vsebuje DNA-polimerazo *Taq*, ki na 3'-koncu molekule vedno doda en adenozin – takšne molekule DNA lahko neposredno uporabimo za TA-kloniranje v nadaljevanju.

**Slika 30:** Fotografija agaroznega gela po GS-PCR iz knjižnice cDNA, pripravljene iz celic NTERA-2 po Protokolu 2. V rdečih okvirčkih so označeni amplikoni, ki sovpadajo z lisami pozitivne kontrole (PC). Pri negativnih kontrolah (angl. no-template control, NTC) lise niso vidne, kar nakazuje specifičnost pomnoževanja (tj. da nimamo opraviti npr. z dimeri začetnih oligonukleotidov, ki bi utegnili biti podobnih dolžin).



Vzroki za neuspeh GS-PCR pri knjižnicah cDNA, pripravljenih po Protokolu 1, so lahko različni. Sam protokol je veliko bolj dolgotrajen kot Protokol 2 in vsebuje več korakov čiščenja, ki so lahko vir izgub. Prisotne so kar tri ekstrakcije iz gela (Protokol 2 ima le eno, in sicer po koncu 2D-elektroforeze), kar lahko predstavlja dodatne izgube. Zaradi dolgotrajnosti protokola in dodatni ekstrakciji molekul RNA iz gela pri sobni temperaturi je tudi večja možnost razgradnje molekul RNA v vzorcu. Poleg tega ligacije adapterjev ne potekajo kvantitativno, kar tudi (ob nizki vhodni količini RNA) lahko vodi do nizke diverzitete knjižnic cDNA.

Po uspešni validaciji knjižnice cDNA smo poskusili specifično pomnožiti pare SNORD116 – tarčna RNA s kombinacijami začetnih oligonukleotidov, specifičnih za SNORD116, in univerzalnega oligonukleotida (tj. RPIX Short). To nam ni uspelo, saj so bile na agaroznih gelih po končanih reakciji GS-PCR lise odsotne. Možni vzroki za neuspeh teh reakcij GS-PCR so lahko

nizka diverziteta knjižnice cDNA (potek proksimalne ligacije verjetno ni bil optimalen zaradi (pre)nizke koncentracije ATP v reakcijski zmesi), uporaba kratkih začetnih oligonukleotidov (velike razlike v  $T_m$ ) in neoptimalni pogoji reakcije PCR. Možen vzrok bi bilo tudi relativno nizko izražanje SNORD116 pri celični liniji HEK293 FlpIn SNORD116, čeprav smo s qPCR (**Priloga 1**) pokazali, da se SNORD116 izraža primerljivo kot endogene snoRNA, vključno z »validacijsko« SNORD13.

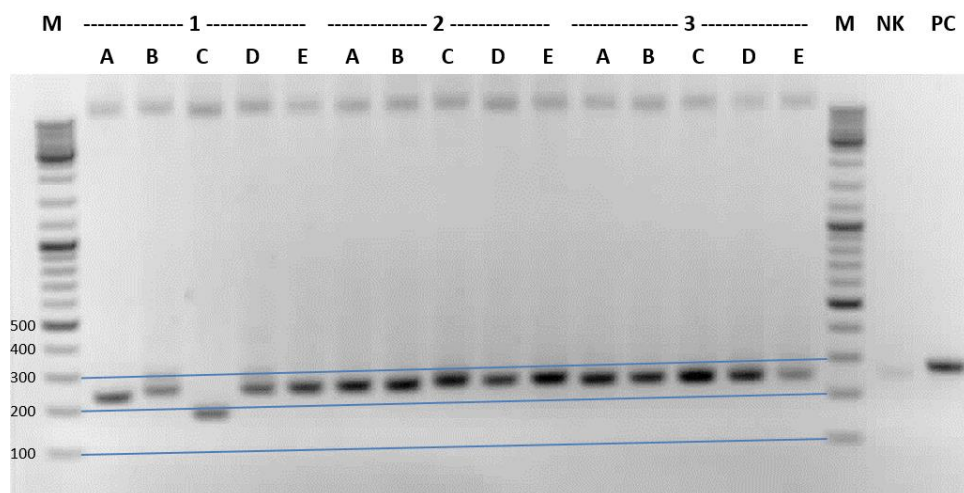
#### **4.2.9 TA-kloniranje, transformacija s toplotnim šokom, pomnožitev in izolacija plazmidov**

Pri TA-kloniranju smo v plazmid *pGEM<sup>®</sup> T-Easy* vstavili vstavke z adenozinoma na 3'-konicah verig, za kar je odgovorna DNA-polimeraza *Taq* v reakciji GS-PCR. *pGEM<sup>®</sup> T-Easy* je komercialni lineariziran vektor, ki ima na obeh koncih prost T. Prosti končni T na mestu vstavitve vstavkov močno povečajo učinkovitost ligacije, saj preprečujejo ponovno cirkularizacijo vektorja, hkrati pa nudijo kompatibilno prijemališče za amplikone, pomnožene s polimerazami, ki na koncu dodajo po en A.<sup>62</sup> Plazmide z vstavljenimi amplikoni smo s pomočjo transformacije s toplotnim šokom vnesli v bakterijski sev *E. coli* TOP10, kjer smo plazmide namnožili. Po pomnožitvi smo iz bakterijskih kultur izolirali plazmidno DNA, ki smo ji na spektrofotometru Nanodrop pomerili koncentracijo in ocenili čistoto. Rezultati so prikazani v **Prilogi 3**.

#### **4.2.10 PCR-analiza plazmidov in sekvenciranje**

##### ***PCR-analiza plazmidov***

S plazmidno DNA smo nastavili reakcijo PCR, da bi preverili uspešnost vstavitve vstavkov pri TA-kloniranju, pri čemer smo uporabili par univerzalnih oligonukleotidov, ki sta komplementarna vektorju *pGEM<sup>®</sup> T-Easy* neposredno pred in za mestom, kamor vstavljamo vstavke. Amplikone smo analizirali z gelsko elektroforezo (**Slika 31**). Amplikon iz vzorca 1C po velikosti odstopa od ostalih. Možno je, da v tem primeru ligacija amplikona v plazmid ni potekla (samo ogrodje plazmida med mestoma, kamor se prilegata uporabljena začetna oligonukleotida, je namreč dolgo 178 bp). Pri ostalih vzorcih pa se je glede na velikost amplikonov na gelu vstavek uspešno vstavil; dolžine vstavkov znašajo okvirno 70-100 bp.



**Slika 31:** Fotografija gela po reakciji PCR z namnoženimi plazmidi pGEM<sup>®</sup> T-Easy, s katero smo preverili uspešnost vstavitve vstavkov v plazmide.

### Sekvenciranje

S sekvenciranjem smo potrdili znano interakcijo med SNORD13 in rRNA18S, in sicer smo s parom začetnih oligonukleotidov za validacijo knjižnice cDNA 1 detektirali dve različni hibridni molekuli, s parom začetnih oligonukleotidov za validacijo knjižnice 2 pa smo detektirali le eno hibridno molekulo (**Slika 32**).

#### Vzorec 1A

ACCCTTGAACCTTGTTACGACGTGGG**GT**A444AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG

#### Vzorec 1D

ACCCTTGAACCTTGTTACGACGTGGG**CA**TATTACCC**GN**GAAGTAAAAGTCGTAAC**NGN**TTTCCGTAGG

#### Vzorec 1E

TCCCTTGAACCTTG**G**TACGACGTGGG**CA**TATTACCC**GT**GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAA**AG**

#### Vzorec 2A

AGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG**TGA**TGTGAGATGTG**CT**ACCCTTGAACCTTGTTACGACGTGG

#### Vzorec 2B

AGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG**TGA**TGTGAGATGTGCCACCCTTGAACCTTGTTACGACGT**GA**

#### Vzorec 2C

AGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG**TGA**TGTGAGATGTGCCACCCTTGA**NNN**TTGTTACGACGTGG

#### Vzorec 2D

AGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG**TGA**TGTGAGATGTG**CT**ACCCTTGAACCTTGTTACGACGT**G**

#### Vzorec 2E

AGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG**TGA**TGTGAGATGTGCCACCCTTGAACCTTGTTACGACGTGG

**Slika 32:** Rezultati sekvenciranja vzorcev, pomnoženih s parom začetnih oligonukleotidov za validacijo cDNA knjižnice 1 (1A, 1D in 1E) in 2 (2A-2E). Podčrtani deli zaporedja predstavljajo uporabljena začetna oligonukleotida, odebeleni pa vmesno hibridno zaporedje, s katerim smo

potrdili interakcijo. Del zaporedja, ki pripada SNORD13, je pobarvan z modro, del zaporedja, ki pripada rRNA 18S, pa z rdečo ali oranžno. Rdeče obarvani nukleotidi odstopajo od pričakovanega zaporedja ali pa jih ni bilo mogoče nedvoumno razbrati iz elektroferogramov (N). Rezultati za preostale vzorce niso prikazani, saj pri njih reakcija sekvenciranja ni potekla uspešno (vzorca 1B in 1C) oziroma smo s sekvenciranjem naleteli na artefakte reakcije PCR (vzorci 3A-3E).

Skupno število ciklov PCR je bilo veliko (skupaj 57), kar je lahko razlog, da smo po sekvenciranju videli le 3 različne hibride. Za validacijo knjižnice cDNA smo uporabili reakcijo PCR s padajočo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov (angl. *touch-down PCR*), ki ima večjo specifičnost pomnoževanja kot klasična reakcija PCR. Predvidevali smo, da so naši vzorci precej kompleksne mešanice, iz katerih smo želeli specifično pomnožiti znane pare snoRNA-rRNA. Posebnost te reakcije je zniževanje temperature prileganja začetnih oligonukleotidov z naraščanjem števila ciklov. Temperatura prileganja določa specifičnost vezave začetnih oligonukleotidov. Višja kot je, bolj specifična je vezava. Tako se na začetku reakcije pomnožijo le specifična zaporedja, ki se do znižanja temperature prileganja, ki omogoči tudi manj specifično hibridizacijo, pomnožijo že tolikokrat, da prevladajo nad morebitnimi nespecifičnimi zaporedji, ki se pomnožujejo ob nižjih temperaturah prileganja. Dodaten razlog za le tri različne hibride po sekvenciranju je lahko tudi nizka diverzitetna knjižnica cDNA. Na to nakazuje tudi dejstvo, da smo s parom začetnih oligonukleotidov za validacijo knjižnice 2 pri sekvenciranju vseh petih vzorcev (2A-2E) detektirali le eno hibridno molekulo. Najverjetneje smo iz reakcijske mešanice po končani reakciji GS-PCR v plazmide prenesli le eno vrsto hibrida (kar ustreza tudi prisotnosti ene same lise na **Sliki 30**).

Alternativno bi lahko interakcije analizirali tudi s sekvenciranjem nove generacije (angl. *new-generation sequencing*, NGS), s čimer bi se izognili (pre)obsežnemu pomnoževanju vzorca z reakcijo PCR in dobili vpogled v vse posamezne hibridne strukture v vzorcu.

## 5 SKLEP

V okviru magistrske naloge z namenom vzpostavitve metode za detekcijo interakcij med molekulami RNA nam je uspelo detektirati posamezne interakcije znanih molekul RNA. Protokol metode smo izvedli na treh človeških celičnih linijah, NTERA-2, HEK293 FlpIn z vstavljenim genom za SNORD116 in SH-SY5Y. Pri metodi smo za stabilizacijo interakcije uporabili tvorbo reverzibilne kovalentne prečne vezi preko molekule AMT in izolirali prečno povezane molekule RNA z 2D-elektroforezo. Ključna koraka za uspeh metode sta bila še reakcija proksimalne ligacije, ki je povezala molekuli RNA v hibridno molekulo, in priprava knjižnice cDNA. Pri prvi v prihodnjih poskusih predlagamo uporabo višje koncentracije molekule ATP, da bi zagotovili večjo učinkovitost ligacije. Pri pripravi knjižnic cDNA smo uporabili dva pristopa. Prvi pristop, ki se je izkazal za neučinkovitega, je temeljil na uporabi adapterjev za sintezo knjižnice cDNA (enega smo vnesli v koraku reverzne transkripcije, drugega pa z naknadno ligacijo na 3'-konec hibridnih RNA) in vmesni linearni pomnožitvi vzorca z reakcijo *in vitro* transkripcije. Pri validaciji knjižnice cDNA, pripravljene s tem pristopom, v reakciji PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi nismo uspeli specifično pomnožiti hibridnih cDNA. Drugi pristop priprave knjižnice, ki pa se je izkazal za učinkovitega, pa je temeljil na uporabi komercialnega kompleta *SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit*. Pri tej knjižnici, pripravljene iz celic NTERA-2, nam je uspelo potrditi validirane interakcijske pare s pari začetnih oligonukleotidov 1 in 2. Pomnožene hibride smo s pomočjo TA-kloniranja uspešno vstavili v plazmid *pGEM<sup>®</sup> T-Easy* in jih pomnožili z bakterijskim sevom *E. coli* TOP10. S sekvenciranjem hibridnih molekul smo uspeli detektirati eno interakcijo, tj. med SNORD13 in rRNA 18S.

Vzporedno z vzpostavitvijo metode smo tudi izvedli qPCR-analizo na celicah HEK293 FlpIn SNORD116, da smo preverili izražanje vstavljenega transgena za SNORD116. Z rezultati eksperimenta smo potrdili, da se SNORD116 v celični liniji izraža primerljivo z endogenimi molekulami C/D-snoRNA. Po uspešni validaciji knjižnic cDNA smo skušali z metodo PCR identificirati tarčne molekule SNORD116, vendar nis na gelu po agarozni elektroforezi, ki je sledila metodi PCR, nismo zaznali.

Alternativno bi lahko interakcije analizirali tudi s sekvenciranjem nove generacije (NGS), s čimer bi se izognili (pre)obsežnemu pomnoževanju vzorca pri reakciji PCR in dobili vpogled v vse posamezne hibridne strukture v vzorcu.



## 6 LITERATURA

1. Westhof, E. Isostericity and tautomerism of base pairs in nucleic acids. *FEBS Lett.* **588**, 2464–2469 (2014).
2. Halder, S. & Bhattacharyya, D. RNA structure and dynamics: A base pairing perspective. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **113**, 264–283 (2013).
3. Šponer, J. E., Špačková, N. D. A., Leszczynski, J. & Šponer, J. Principles of RNA base pairing: Structures and Energies of the Trans Watson-Crick/Sugar Edge Base Pairs. *J. Phys. Chem. B* **109**, 11399–11410 (2005).
4. Wang, T. *et al.* Design and bioinformatics analysis of genome-wide CLIP experiments. *Nucleic Acids Res.* **43**, 5263–5274 (2015).
5. Fernández Moya, S. M. & Kiebler, M. A. CLIPing Staufen to secondary RNA structures: Size and location matter! *BioEssays* **37**, 1062–1066 (2015).
6. Wu, P. *et al.* Roles of long noncoding RNAs in brain development, functional diversification and neurodegenerative diseases. *Brain Res. Bull.* **97**, 69–80 (2013).
7. Matera, A. G., Terns, R. M. & Terns, M. P. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 209–220 (2007).
8. Mattick, J. S. & Makunin, I. V. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 121–132 (2005).
9. Haque, F. *et al.* RNA versatility, flexibility, and thermostability for practice in RNA nanotechnology and biomedical applications. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **9**, 1–17 (2018).
10. Cech, T. R. & Steitz, J. A. The Noncoding RNA Revolution - Trashing Old Rules to Forge New Ones. *Cell* **157**, 77–94 (2014).
11. Storz, G., Altuvia, S. & Wassarman, K. M. An Abundance of RNA Regulators. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 199–217 (2005).
12. Hoernes, T. P. & Erlacher, M. D. Translating the epitranscriptome. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **8**, 1–18 (2017).
13. Hoernes, T. P., Hüttenhofer, A. & Erlacher, M. D. mRNA modifications: Dynamic regulators of gene expression? *RNA Biol.* **13**, 760–765 (2016).
14. Hausser, J. & Zavolan, M. Identification and consequences of miRNA-target interactions - beyond repression of gene expression. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 599–612 (2014).
15. Mato Prado, M. *et al.* Investigating miRNA-mRNA regulatory networks using crosslinking immunoprecipitation methods for biomarker and target discovery in cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **16**, 1155–1162 (2016).
16. Leung, R. K. M. & Whittaker, P. A. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol. Ther.* **107**, 222–239 (2005).
17. Kandeel, M. & Kitade, Y. Computational Analysis of siRNA Recognition by the Ago2 PAZ Domain and Identification of the Determinants of RNA-Induced Gene Silencing.



*PLoS One* **8**, 1–10 (2013).

18. Goyal, B. R., Patel, M. M., Soni, M. K. & Bhadada, S. V. Therapeutic opportunities of small interfering RNA. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **23**, 367–386 (2009).
19. Bratkovič, T., Glavan, G., Štrukelj, B., Živin, M. & Rogelj, B. Exploiting microRNAs for cell engineering and therapy. *Biotechnol. Adv.* **30**, 753–765 (2012).
20. Karijolich, J. & Yu, Y.-T. Spliceosomal snRNA modifications and their function. *RNA Biol.* **7**, 192–204 (2010).
21. Lai, D. & Meyer, I. M. A comprehensive comparison of general RNA-RNA interaction prediction methods. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1–13 (2016).
22. Bratkovič, T. & Rogelj, B. Biology and applications of small nucleolar RNAs. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3843–3851 (2011).
23. Pang, K. C., Frith, M. C. & Mattick, J. S. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends Genet.* **22**, 1–5 (2006).
24. Bratkovič, T. & Rogelj, B. The many faces of small nucleolar RNAs. *Biochim. Biophys. Acta* **1839**, 438–443 (2014).
25. Falaleeva, M., Surface, J., Shen, M., de la Grange, P. & Stamm, S. SNORD116 and SNORD115 change expression of multiple genes and modify each other's activity. *Gene* **572**, 266–273 (2015).
26. Lu, Z., Gong, J. & Zhang, Q. C. PARIS: Psoralen Analysis of RNA Interactions and Structures with High Throughput and Resolution. *RNA Detect. Methods Protoc. Methods Mol. Biol.* **1649**, 59–84 (2018).
27. Kudla, G., Granneman, S., Hahn, D., Beggs, J. D. & Tollervey, D. Cross-linking, ligation, and sequencing of hybrids reveals RNA-RNA interactions in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 10010–10015 (2011).
28. Lu, Z. *et al.* RNA Duplex Map in Living Cells Reveals Higher-Order Transcriptome Structure. *Cell* **165**, 1267–1279 (2016).
29. Kloetgen, A., Münch, P. C., Borkhardt, A., Hoell, J. I. & McHardy, A. C. Biochemical and bioinformatic methods for elucidating the role of RNA-protein interactions in posttranscriptional regulation. *Brief. Funct. Genomics* **14**, 102–114 (2014).
30. Milek, M., Wyler, E. & Landthaler, M. Transcriptome-wide analysis of protein-RNA interactions using high-throughput sequencing. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 206–212 (2012).
31. Helwak, A. & Tollervey, D. Mapping the miRNA interactome by crosslinking ligation and sequencing of hybrids (CLASH). *Nat. Protoc.* **9**, 711–728 (2014).
32. Li, X., Song, J. & Yi, C. Genome-wide Mapping of Cellular Protein-RNA Interactions Enabled by Chemical Crosslinking. *Genomics Proteomics Bioinforma.* **12**, 72–78 (2014).
33. Machyna, M. & Simon, M. D. Catching RNAs on chromatin using hybridization capture methods. *Brief. Funct. Genomics* 1–8 (2017). doi:10.1093/bfgp/elx038
34. Lustig, Y., Wachtel, C., Safro, M., Liu, L. & Michaeli, S. 'RNA walk' a novel approach to

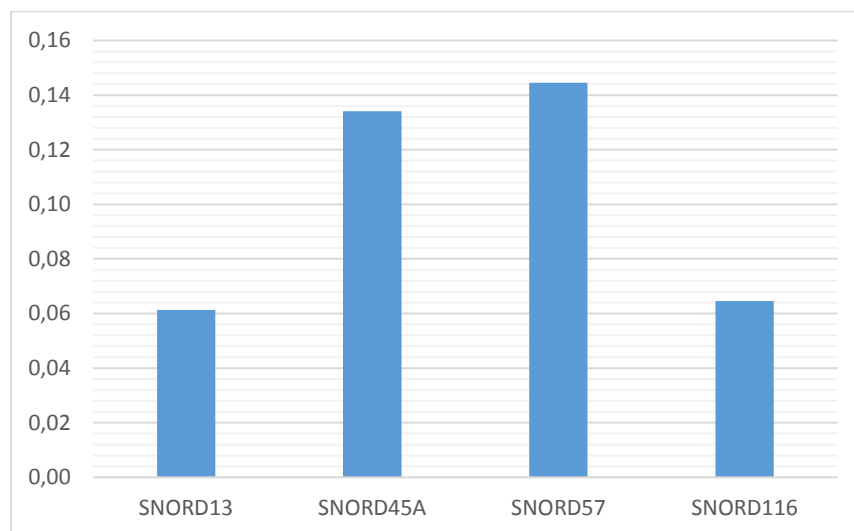
- study RNA-RNA interactions between a small RNA and its target. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1–15 (2009).
35. Wachtel, C. & Michaeli, S. Functional Analysis of Noncoding RNAs in Trypanosomes: RNA Walk, a Novel Approach to Study RNA-RNA Interactions Between Small RNA and Its Target. *RNA DNA Ed. Methods Protoc. Methods Mol. Biol.* **718**, 245–257 (2011).
  36. Aw, J. G. A. *et al.* In Vivo Mapping of Eukaryotic RNA Interactomes Reveals Principles of Higher-Order Organization and Regulation. *Mol. Cell* **62**, 603–617 (2016).
  37. Sugimoto, Y., Chakrabarti, A. M., Luscombe, N. M. & Ule, J. Using hiCLIP to identify RNA duplexes that interact with a specific RNA-binding protein. *Nat. Protoc.* **12**, 611–637 (2017).
  38. (Sigma Aldrich). 4'-Aminomethyltrioxsalen hydrochloride. Available at: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure0/103/mfcd00134837.png/\\_jcr\\_content/renditions/mfcd00134837-large.png](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure0/103/mfcd00134837.png/_jcr_content/renditions/mfcd00134837-large.png). (Accessed: 20th July 2018)
  39. Chemical structure of DNA crosslink induced by Psoralen. *Wikipedia* Available at: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/94/Psoralen\\_Crosslink.tiff/lossy-page1-1007px-Psoralen\\_Crosslink.tiff.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/94/Psoralen_Crosslink.tiff/lossy-page1-1007px-Psoralen_Crosslink.tiff.jpg). (Accessed: 23rd August 2018)
  40. Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T. & Tollervey, D. Mapping the Human miRNA Interactome by CLASH Reveals Frequent Noncanonical Binding. *Cell* **153**, 654–665 (2013).
  41. Helwak, A. & Tollervey, D. Identification of miRNA-Target RNA Interactions Using CLASH. *Post-Transcriptional Gene Regul. Methods Mol. Biol.* **1358**, 229–251 (2016).
  42. Travis, A. J., Moody, J., Helwak, A., Tollervey, D. & Kudla, G. Hyb: A bioinformatics pipeline for the analysis of CLASH (crosslinking, ligation and sequencing of hybrids) data. *Methods* **65**, 263–273 (2014).
  43. Nguyen, T. C. *et al.* Mapping RNA-RNA interactome and RNA structure in vivo by MARIO. *Nat. Commun.* **7**, 1–12 (2016).
  44. Engreitz, J., Lander, E. S. & Guttman, M. RNA Antisense Purification (RAP) for Mapping RNA Interactions with Chromatin. *Nucl. Bodies Noncoding RNAs Methods Protoc. Methods Mol. Biol.* **1262**, 183–197 (2015).
  45. Engreitz, J. RNA Antisense Purification (RAP): Experimental Protocols. *RAP Protocols* 1–12 (2014). Available at: <http://www.lncrna-test.caltech.edu/protocols/RAPDNARNA.pdf>.
  46. Engreitz, J. *et al.* RNA-RNA Interactions Enable Specific Targeting of Noncoding RNAs to Nascent Pre-mRNAs and Chromatin Sites. *Cell* **159**, 188–199 (2014).
  47. Mchugh, C. A. & Guttman, M. RAP-MS: A Method to Identify Proteins that Interact Directly with a Specific RNA Molecule in Cells. *RNA Detect. Methods Protoc. Methods Mol. Biol.* **1649**, 473–488 (2018).
  48. Sharma, E., Sterne-Weiler, T., O'Hanlon, D. & Blencowe, B. J. Global Mapping of Human RNA-RNA Interactions. *Mol. Cell* **62**, 618–626 (2016).

49. Sugimoto, Y. *et al.* hiCLIP reveals the in vivo atlas of mRNA secondary structures recognized by Staufen 1. *Nature* **519**, 491–494 (2015).
50. Adenylation-5' (rApp). *GeneLink* Available at: [http://www.genelink.com/newsite/products/images/modificationimages/Adenylation-5'\(rApp\).gif](http://www.genelink.com/newsite/products/images/modificationimages/Adenylation-5'(rApp).gif). (Accessed: 23rd August 2018)
51. Brescia, Peter (BioTek Instruments, Inc., Winooski, V. Micro-Volume Purity Assessment of Nucleic Acids using A260/A280 Ratio and Spectral Scanning. Available at: <https://www.biotek.com/resources/application-notes/micro-volume-purity-assessment-of-nucleic-acids-using-a-sub260/sub/asub280/sub-ratio-and-spectral-scanning/>. (Accessed: 8th August 2018)
52. (New England BioLabs, I. . T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase), High Concentration. Available at: [https://international.neb.com/products/m0437-t4-rna-ligase-1-ssrna-ligase-high-concentration#Protocols & Manuals](https://international.neb.com/products/m0437-t4-rna-ligase-1-ssrna-ligase-high-concentration#Protocols%20&%20Manuals). (Accessed: 18th August 2018)
53. (New England BioLabs, I. . Ligation of a DNA or RNA oligo to single stranded RNA using T4 RNA Ligase 1. Available at: <https://international.neb.com/protocols/2014/10/27/ligation-of-a-dna-or-rna-oligo-to-single-stranded-rna-using-t4-rna-ligase-1>. (Accessed: 18th August 2018)
54. Kargapolova, Y., Levin, M., Lackner, K. & Danckwardt, S. sCLIP-an integrated platform to study RNA-protein interactomes in biomedical research: identification of CSTF2tau in alternative processing of small nuclear RNAs. *Nucleic Acids Res.* **45**, 6074–6086 (2017).
55. Huppertz, I. *et al.* iCLIP: Protein-RNA interactions at nucleotide resolution. *Methods* **65**, 274–287 (2014).
56. Konig, J. *et al.* iCLIP - Transcriptome-wide Mapping of Protein-RNA Interactions with Individual Nucleotide Resolution. *J. Vis. Exp.* 1–7 (2011). doi:10.3791/2638
57. Ko, J. H. & Lee, Y. RNA-conjugated template-switching RT-PCR method for generating an Escherichia coli cDNA library for small RNAs. *J. Microbiol. Methods* **64**, 297–304 (2006).
58. (Clontech). SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit. *User Manual* (2010). Available at: [http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/PT3000-1\[1\].pdf](http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/PT3000-1[1].pdf). (Accessed: 18th August 2018)
59. SNORD13 (U13). *snoRNA Database* Available at: <https://www-snoRNA.biotoul.fr/snosync/images/snorna/U13.gif>. (Accessed: 25th August 2018)
60. Lestrade, L. & Weber, M. J. snoRNA-LBME-db, a comprehensive database of human H/ACA and C/D box snoRNAs. *Nucleic Acids Res.* **34**, D158–D162 (2006).
61. SNORD21 (U21). *snoRNA Database* Available at: <https://www-snoRNA.biotoul.fr/snosync/images/snorna/U21.gif>. (Accessed: 25th August 2018)
62. (Promega). pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. *Technical Manual* 1–28 Available at: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>. (Accessed: 18th August 2018)

# PRILOGE

## Priloga 1: Rezultati q-PCR

**1. Izražanje snoRNA (SNORD13, SNORD45A, SNORD57 in SNORD116) v celični liniji HEK293 FlpIn**  
**SNORD116 normirano na izražanje Actb.**



SNORD13, SNORD45A in SNORD57 se izražajo endogeno, SNORD116 pa ektopično. Prikazani rezultati predstavljajo povprečja dveh bioloških ponovitev.

**2. Izračunane povprečne učinkovitosti pomnoževanja posameznih genov za testirana vzorca (cDNA 1 in cDNA 2) (levo) in ocenjena raven kontaminacije z genomsko DNA (glede na amplikon SNORD116) (desno).**

	Učinkovitost pomnoževanja [%]
cDNA <sub>SNORD13</sub>	80,9 %
cDNA <sub>SNORD45A</sub>	90,3 %
cDNA <sub>SNORD57</sub>	94,4 %
cDNA <sub>SNORD116</sub>	90,9 %
cDNA <sub>Actb</sub>	88,5 %

	$\Delta C_p$	$E^{\Delta C_p}$
cDNA 1	11,56	2107
cDNA 2	13,83	6189

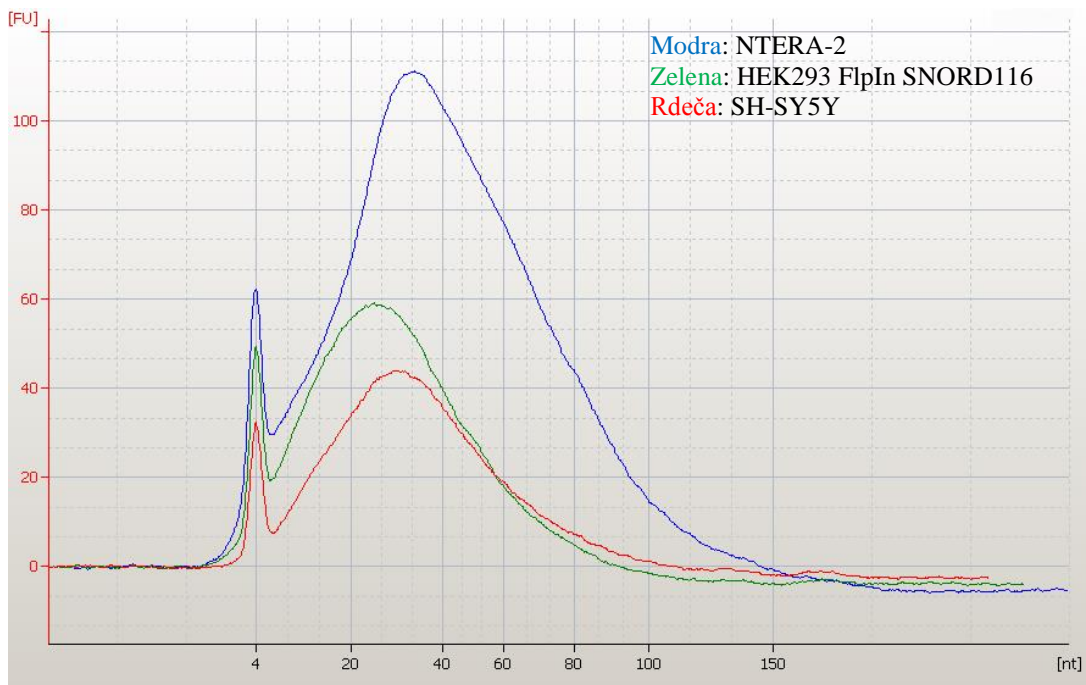
$$\Delta C_p = C_{p(cDNA)} - C_{p(RNA)}$$

$$E_{cDNA 1} = 1,94; E_{cDNA 2} = 1,88$$

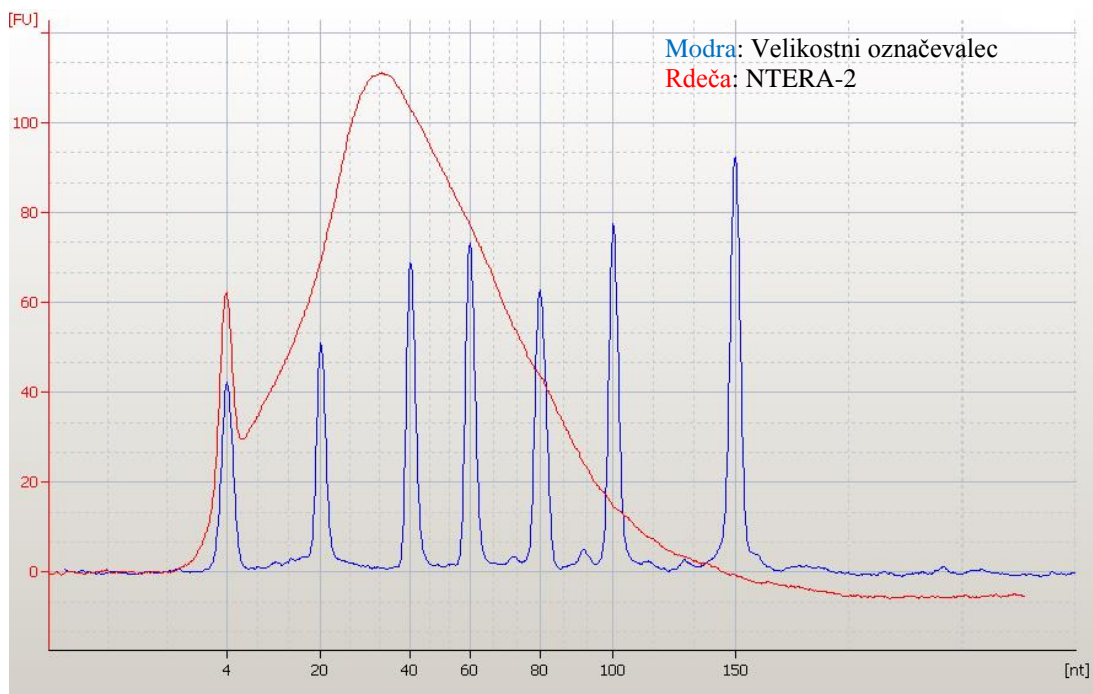
Razlika v prisotnosti gDNA v vzorcih RNA 1 in 2 in cDNA v ekvivalentno redčenih vzorcih cDNA 1 in 2 je nekaj tisočkratna, kar kaže na nizko raven kontaminacije z genomsko DNA (edini vir DNA v vzorcih RNA).

## Priloga 2: Rezultati analize z Bioanalyzer-jem

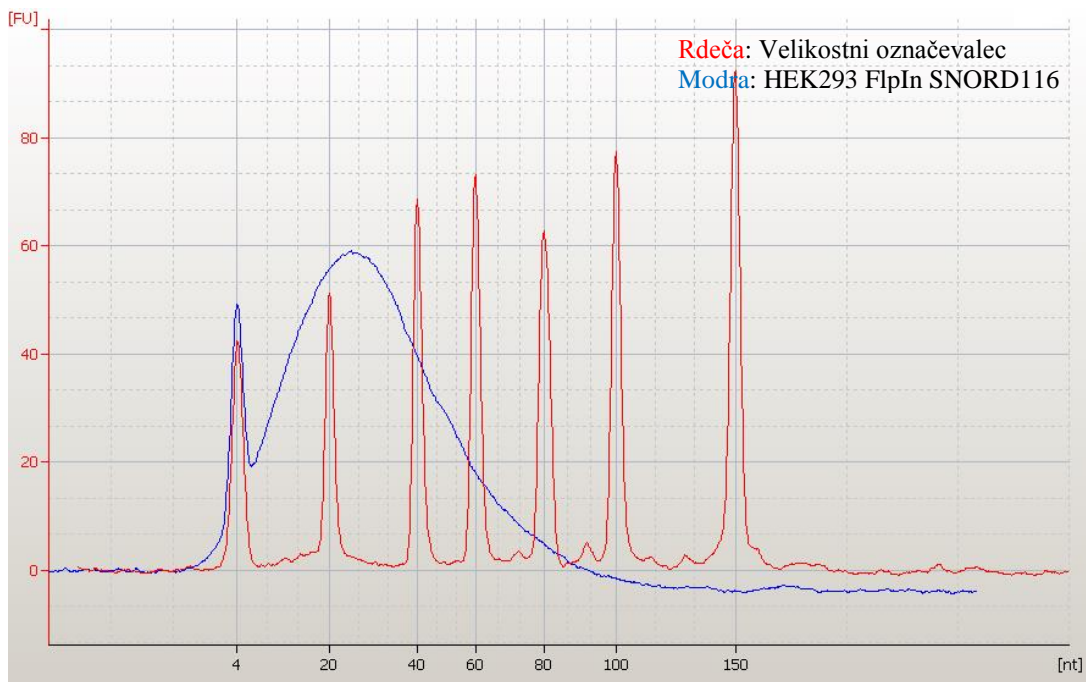
### 1. Spektri vseh treh vzorcev skupaj na istem grafu



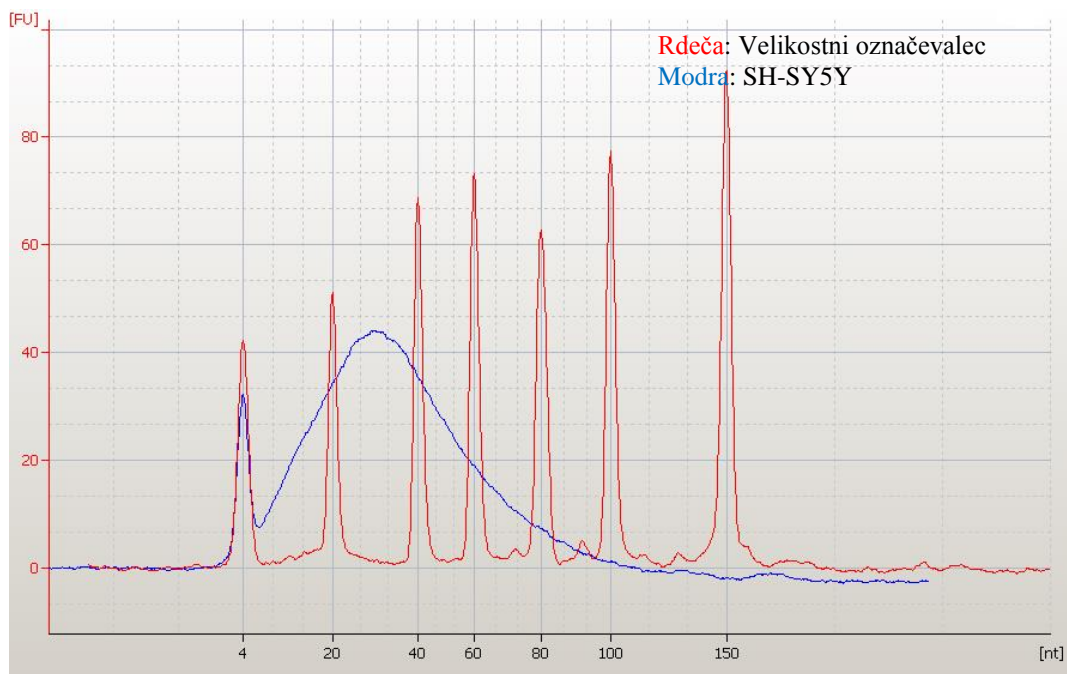
### 2. Spektri velikostnega označevalca in vzorca NTERA-2



### 3. Spekter velikostnega označevalca in vzorca HEK293 FlpIn SNORD116



### 4. Spekter velikostnega označevalca in vzorca SH-SY5Y



### Priloga 3: Spektri in koncentracije plazmidne DNA

Vzorec	c [ng/μl]	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
1A	195,70	1,90	2,13
1B	203,13	1,91	2,18
1C	228,91	1,92	2,15
1D	193,11	1,88	2,18
1E	141,80	1,89	2,17
2A	178,50	1,93	2,16
2B	203,42	1,89	2,11
2C	188,73	1,89	2,16
2D	204,99	1,87	2,16
2E	198,87	1,90	2,16
3A	149,78	1,89	2,16
3B	215,24	1,88	2,13
3C	186,96	1,88	2,11
3D	198,49	1,87	2,04
3E	157,55	1,90	2,15

