

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA GRKMAN

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA GRKMAN

**IZDELAVA KONSTUKTA cDNA ZA PREVERJANJE AKTIVNOSTI mikroRNA
21 V SESALSKIH CELICAH**

**DESIGN OF THE cDNA CONSTRUCT FOR TESTING THE ACTIVITIY OF
micro RNA 21 IN MAMMALIAN CELLS**

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

ZAHVALA

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorju asist. dr. Tilnu Kranjcu, mag. farm. za strokovne nasvete, potrpežljivost, spodbudo in pomoč pri nastajanju magistrskega dela. Hvala tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo.

Posebna zahvala za vso podporo in potrpežljivost pa gre tudi mojim domačim.

IZJAVA

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo. Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Tilna Kranjca, mag. farm.

Ljubljana, december 2016

Barbara Grkman

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK.....	III
KAZALO PREGLEDNIC.....	III
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 Osteoporoza.....	1
1.1 Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze.....	1
1.2 Geni vpleteni v nastanek osteoporoze.....	2
1.1.1 Mehanizmi nastanka osteoporoze.....	3
1.1.2 Celični modeli kostnih celic	8
1.2 MikroRNA.....	9
1.2.1 Biogeneza miRNA.....	10
1.2.2 miRNA v povezavi z osteoporozo.....	11
1.2.3 Vloga miR-195-5p in miR-204-5p pri človeku	11
1.2.4 Pomen in vloga alkalne fosfataze in dejavnika c-MYB pri človeku.....	12
1.3 Analizni postopki za testiranje miRNA.....	14
1.1.2 Luciferazni test s plazmidnim vektorjem pmirGLO.....	14
2 NAMEN DELA	17
3 METODE IN MATERIALI	18
3.1 Konstrukti pmirGLO	18
3.2 Priprava kontrolnega konstrukta DNA z vezavnim mestom za miR-21	18
3.2.1 Načrtovanje oligonukleotidov	19
3.2.2 Sinteza oligonukleotidov	20
3.2.3 Restrikcija plazmida	20
3.2.4 Elektroforeza na agaroznem gelu	21
3.2.5 Izolacija plazmida iz agaroznega gela.....	22
3.2.6 Ligacija.....	22
3.2.7 Transformacija.....	25
3.2.8 Kontrola ligacije	26
3.2.9 Priprava večje količine plazmida – Midiprep.....	30

3.2.10	Merjenje koncentracije DNA.....	31
3.3	Merjenje vezave miRNA na DNA konstrukte v celičnih linijah.....	31
3.3.1	Delo s celičnimi kulturami	31
3.3.2	Kultiviranje celičnih linij.....	32
3.3.3	Štetje celic.....	33
3.3.4	Transfekcija	34
3.3.5	Merjenje luminiscence.....	36
3.3.6	Statistična obdelava podatkov	37
4	REZULTATI	38
4.1	Priprava kontrolnega konstrukta DNA z vezavnim mestom za miRNA-21	38
4.1.1	Načrtovanje in sinteza oligonukleotidov	38
4.1.2	Restrikcija plazmida	39
4.1.3	Kontrola ligacije in transformacije.....	40
4.2	Merjenje vezave miRNA na konstrukte DNA v celičnih linijah.....	45
4.2.1	Merjenje luminescence	46
4.2.2	Statistična analiza podatkov	49
5	RAZPRAVA.....	51
5.1	Vloga konstrukta miR-21 kot interne kontrole.....	51
5.2	Priprava konstrukta miR-21 s postopkom molekulskega kloniranja.....	52
5.3	Uporabnost konstrukta miR-21	54
6	SKLEP	57
7	LITERATURA	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema procesa kostne remodelacije.....	3
Slika 2: RANK-RANKL-OPG sistem.....	6
Slika 3: WNT signalna pot.	7
Slika 4: BMP signalna pot.	8
Slika 5: Celične linije Saos-2, MG-63 in HOS.....	9
Slika 6: Biogeneza miRNA.....	10
Slika 7: Plazmidni vektor pmirGLO.....	15
Slika 8: Mehanizem aktivacije vektorja pmirGLO.....	15
Slika 9: Shema priprave rekombinantnega konstrukta.	19
Slika 10: Mreža kvadrantov za štetje celic v Neubauerjevi komori.....	34
Slika 11: Priprava plošče za 8 transfekcij.....	35
Slika 13: Rezultat elektroforeze na agaroznem gelu po sintezi komplementarnih oligonukleotidov.....	39
Slika 14: Rezultat elektroforeze na agaroznem gelu po restrikciji plazmida.	40
Slika 15: Pomnoževanje DNA s PCR.	42
Slika 16: Rezultat elektroforeze na agaroznem gelu po PCR na osnovi kolonije.	42
Slika 17: Shema plazmidnega konstrukta miR-21 z restrikcijskima mestoma za encim ApaI.....	43
Slika 18: Rezultat elektroforeze na agaroznem gelu po restrikciji konstrukta z encimom ApaI.....	44
Slika 19: Odsek zaporedja konstrukta miR-21 in miR-21_mut.	45
Slika 20: Grafični prikaz endogenega izražanja preiskovanih miRNA v osteosarkomskih celičnih linijah.....	46
Slika 21: Grafični prikaz relativne luciferazne aktivnosti v HOS celicah.....	47
Slika 22: Grafični prikaz relativne luciferazne aktivnosti v MG-63 celicah.....	48
Slika 23: Grafični prikaz relativne luciferazne aktivnosti v Saos-2 celicah.....	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Lokusi povezani z MKG, ki so jih odkrili v različnih GWAS študijah.	2
Preglednica II: Sekvence naročenih oligonukleotidov.	20
Preglednica III: Restrikcijska zmes za restrikcijo plazmida pmirGLO.....	21
Preglednica IV: Reakcijska zmes za ligacijo.....	23

Preglednica V: Začetna zmes za PCR.	28
Preglednica VI: Sekvence oligonukleotidnih začetnikov za PCR.	28
Preglednica VII: Program PCR pomnoževanja.	28
Preglednica VIII: Reakcijska zmes za restrikcijsko reakcijo.	29
Preglednica IX: Sekvenca univerzalnega oligonukleotidnega začetnika EBV-RP.	30
Preglednica X: Celične linije in rastni mediji uporabljeni pri eksperimentalnem delu.	32
Preglednica XI: Redčitve.	33
Preglednica XII: Mešanica za transfekcijo.	36
Preglednica XIII: Sekvence oligonukleotidov.	39
Preglednica XIV: Število kolonij na plošči.	41
Preglednica XV: Vezavni mesti za miRNA v konstruktih.	45
Preglednica XVI: Relativna luciferazna aktivnost v HOS celicah.	47
Preglednica XVIII: Relativna luciferazna aktivnost v MG-63 celicah.	48
Preglednica XIX: Relativna luciferazna aktivnost v Saos-2 celicah.	49
Preglednica XX: Izračunane p-vrednosti.	50

POVZETEK

Osteoporoza je s starostjo povezana kostna bolezen, za katero sta značilni zmanjšana kostna masa in porušena mikroarhitektura kosti. V mehanizme nastanka bolezni so vpleteni številni geni, večinoma tistih proteinov (regulatorjev), ki so odgovorni za uravnavanje procesov kostne razgradnje in izgradnje. Pri uravnavanju izražanja genov teh regulatorjev sodelujejo tudi mikroRNA (miRNA). Te uravnavajo izražanje genov post-translacijsko na nivoju mRNA tako, da se komplementarno vežejo z mRNA in upočasnijo njeno translacijo ali pa pospešijo njeno razgradnjo. V preliminarnih študijah na Katedri za klinično biokemijo so s pomočjo tehnologije Nanostring določili izražanje 800 miRNA v osteoporoznih kostnih vzorcih ter nato izbrali miR-204-5p in miR-195-5p kot obetavni miRNA za preučevanje kostnega metabolizma. Namen magistrske naloge je bil dokazati prisotnost vezavnih mest za miR-204-5p in miR-195-5p na tarčnih genih ALPL in cMYB, ki sta vpletena v razvoj osteoporoze. Z dvojnimi luciferaznimi testom smo preverjali aktivnost vezavnega mesta za miRNA. Za testiranje smo uporabili že narejena konstrukta z omenjenima vezavnima mestoma v plazmidu pmirGLO. Plazmid pmirGLO vsebuje gen za luciferazo sklopljen z vezavnim mestom za miRNA v 3'UTR regiji gena. Vezava miRNA na to vezavno mesto tako prepreči izražanje luciferaze. Pred samim začetkom testiranja vezavnih mest smo za preverjanje ustreznosti merilnega sistema s postopkom molekulskega kloniranja pripravili kontrolni konstrukt z vezavnim mestom za miR-21-5p. miR-21 se dobro izraža v vseh sesalskih celicah ter se zato uporablja kot pozitivna kontrola. Konstrukte z vezavnimi mesti za miRNA 21-5p, 204-5p in 195-5p smo izrazili v osteosarkomskih celičnih linijah HOS, Saos-2 in MG-63 in preverili vezavo miRNA na vezavna mesta. V vseh treh celičnih linijah je aktivnost miR-21-5p zmanjšala izražanje luciferaze, kar pomeni, da se miR-21-5p verjetno veže z vstavljenim vezavnim mestom ter na ta način inhibira izražanje luciferaze. Tako smo s tem potrdili ustreznost merilnega sistema. V nadaljevanju pa vezavi miR-204-5p in miR-195-5p na tarčna gena v nobeni od celičnih linij nista dovolj zmanjšali izražanja luciferaze, na osnovi česar smo zaključili, da vezavni mesti za miR-204-5p v genu ALPL in miR-195-5p v genu cMYB nista prisotni. Zaključimo lahko, da smo tekom naloge uspešno izdelali kontrolni konstrukt z vezavnim mestom za miR-21-5p in potrdili pravilno delovanje testnega sistema. Z luciferaznim testom prisotnosti vezavnega mesta za miR-204-5p in miR-195-5p nismo dokazali in sklepamo, da proučevani miRNA ne sodelujeta v uravnavanju izražanja genov za ALPL in cMYB.

ABSTRACT

Osteoporosis is among the most prevalent diseases, caused by the decrease in the amount of bone mass, and the degeneration of bone microarchitecture. The disease is maintained by several signalling pathways, involving multiple genes. One such important class of molecules in bone remodeling is microRNAs (miRNAs). miRNAs are important post-translational regulators of RNA, which are complementary binding with mRNA. They negatively regulate gene expression by either translational repression or mRNA degradation. Preliminary studies with the Nanostring technology identified miR-204-5p and miR-195-5p as a promising miRNA tool to study bone metabolism. Genes ALPL and cMYB were found as potential targets of above mentioned miRNA molecules. In this research work we tried to prove the presence of the predicted binding sites for miRNA molecules miR-204-5p and miR-195-5p on the target genes ALPL and cMYB, which are involved in the development of osteoporosis. We used a dual luciferase test to confirm the activity of the binding site for miRNA: we used the two previously designed constructs, miR-204-5p and miR-195-5p, and tested their binding onto the binding sites of the plasmid pmirGLO. As a control, we used a control construct with the binding site for miR-21-5p. The pmirGLO plasmid contains a luciferase gene linked to the binding site for miRNA at the 3'UTR region of the gene: binding of the miRNA to this specific site therefore prevents luciferase expression. First we validated the measuring system by using a control construct with miR-21-5p binding site. miR-21-5p is ubiquitously expressed in all mammalian cells and is therefore a good positive control. We expressed the constructs with binding sites for miRNA 21-5p, 204-5p and 195-5p in the osteosarcoma cell lines HOS, Saos-2 and MG-63 and measured the binding of miRNA to the binding sites. The transfection with the miR-21-5p construct reduced the luciferase expression in all three cell lines, which suggests that the miR-21-5p did reduce the expression by binding to its binding site on the construct. With this we validated our experimental setup and continued with the other experiments. miR-204-5p and miR-195-5p failed to decrease luciferase expression in all three cell lines, suggesting that the predicted binding sites for miR-204-5p in the ALPL gene and miR-195-5p in the cMYB gene are not present. We can conclude that we managed to create a control construct with a miR-21-5p binding site. But we did not prove the presence of the binding site for miR-204-5p and miR-195-5p. We can presume that studied miRNAs do not regulate the expression of genes ALPL and cMYB.

KLJUČNE BESEDE

osteoporoza, mikroRNA, kontrola, molekularno kloniranje, luciferaza

KEY WORDS

osteoporosis, microRNA, control, molecular cloning, luciferase

SEZNAM OKRAJŠAV

1,25-D3	1,25-dihidroksiholekalciferol
3'UTR	3' neprevedena regija
ALP	alkalna fosfataza
BMP	kostni morfogenski protein
BMPR	BMP receptor
BSP	sialoprotein
bp	bazni par
CT	kalcitonin
DLR	dvojni luciferazni reporter (ang. dual luciferase reporter)
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
FGF	fibroblastni rastni dejavnik
GWAS	vsegenomske študije povezanosti (ang. genome-wide association study)
IGF	inzulinu podobni rastni dejavnik
LARII	luciferazni reagent II (ang. Luciferase Assay Reagent II)
LB	Lauria Bertani
Luc	kresničkina luciferaza
miRNA	mikroRNA
MKG	mineralna kostna gostota
mRNA	informacijska RNA (ang. messenger RNA)
MSC	mezenhimske matične celice
MSC	poliklonsko mesto (ang. multiple cloning site)

OCN	osteokalcin
OPG	osteoprotegerin
OPN	osteopontin
Osx	osteriks
PBS	fosfatni pufer
PLB	pufer za pasivno lizo (ang. Passive Lysis Buffer)
pre-miRNA	prekurzorska mikroRNA
pri-miRNA	primarna mikroRNA
PTH	paratiroidni hormon
RANK	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B
RANKL	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B
RISC	RNA-induciran utiševalni kompleks
RLA	relativna luciferazna aktivnost
RLU	relativna luciferazna enota
Rluc	renilina luciferaza
RNA	ribonukleinska kislina
RU	relativna enota
RUNX2	osteoblastno specifični transkripcijski dejavnik 2
SD	standardna deviacija
SE	standardna napaka
SZO	Svetovna zdravstvena organizacija
TGF- β	transformirajoči rastni dejavnik β

1 UVOD

1.1 Osteoporoza

Osteoporoza je kronična, metabolična, sistemska skeletna bolezen, za katero je značilna zmanjšana količina kostne mase in porušena mikroarhitektura kostnega tkiva [1], kar vodi v povečano krhkost kosti in posledično večje tveganje za zlom kosti [2], predvsem vretenc, kolka in zapestja. Po definiciji Svetovne zdravstvene organizacije (SZO), ki je osteoporozo definirala na osnovi merjenja mineralne kostne gostote (MKG), je osteoporoza zmanjšanje MKG za 2,5 ali več standardne deviacije (SD) od največje MKG, dosežene v zgodnji odrasli dobi, z upoštevanjem spola in rase. O nizki kostni gostoti ali osteopeniji govorimo, kadar se MKG zmanjša med 1 SD in 2,5 SD od največje MKG ter o hudi osteoporozi, kadar je MKG manjša več kot 2,5 SD od največje MKG in je zraven prisoten en ali več zlomov. [1–3]

Definicija pa ni popolna, kajti ne zajema večine ljudi, ki so izpostavljeni tveganju za zlom kosti. Zato so pri SZO kasneje ponovno ovrednotili oceno tveganja za nastanek osteoporoze, pri čemer so uporabili računalniško orodje FRAX, ki izračuna 10-letno tveganje za osteoporozni zlom in vključuje merjenje MKG skupaj z izbranimi dejavniki tveganja, ki niso odvisni od MKG. Dogovorjeni prag za zdravljenje z zdravili je vsaj 20% tveganje za katerikoli zlom in/ali vaj 3% tveganje za zlom kolka. [4]

1.1 Dejavniki tveganja za nastanek osteoporoze

Osteoporoza je kompleksna bolezen, na katero vplivajo tako številni genetski kot tudi negenetski – okoljski dejavniki. Največje tveganje za razvoj osteoporoze in zlomov predstavlja nizka MKG, poleg tega pa večje tveganje predstavljajo še ostali genetski dejavniki, kot so: starost, spol (ženski), rasa (bela), zgodnja menopavza (pred 45. letom starosti), stopnja kostne premene in družinska anamneza osteoporoze. Med negenetske vplive pa uvrščamo kajenje, fizično neaktivnost, pitje alkohola, nezadosten vnos kalcija in vitamina D, nizko telesno maso, uživanje nekaterih zdravil (glukokortikoidi, heparin, antiepileptiki) in dodatne kronične bolezni (bolezni ledvic in jeter, revmatoidni artritis). Na večino negenetskih dejavnikov tveganja lahko vplivamo z zdravim načinom življenja predvsem z zadostno telesno aktivnostjo, uravnoteženo prehrano, neuživanjem alkohola ter brez kajenja. [1, 3, 5, 6]

1.2 Geni vpleteni v nastanek osteoporoze

Genetsko tveganje za osteoporozo se prenaša iz generacije v generacijo, izražanje genotipov v končnem fenotipu pa je odvisno od interakcij med posameznimi genskimi variantami in z okoljskimi dejavniki [7]. V zvezi z iskanjem genov, vpletenih v patogenezo osteoporoze, so bile narejene številne raziskave (vsegenomske študije povezanosti - GWAS), v katerih so bili odkriti geni, povezani z osteoporozo. V Preglednica I so predstavljeni lokusi povezani z MKG, ki so jih odkrili v različnih GWAS študijah. Večina teh genov, je vključena v kodiranje proteinov iz signalne poti RANK-RANKL-OPG (npr. *TNFRSF11A*, *TNFSF11*, *TNFRSF11B*) in Wnt (npr. *SOST*, *LRP5*, *WLS (GPR177)*, *CTNNB1*, *RSPO3*, *DKK1*, *LRP4*, *AXINI*, *WNT3*, *JAG1*) ter diferenciacije mezenhimskih matičnih celic (MSC) ter endohondralne osifikacije (npr. *SPP1*, *IBSP*, *RUNX2*, *SOX6*, *PTH1H*, *SP7*, *SOX9*). [5, 8]

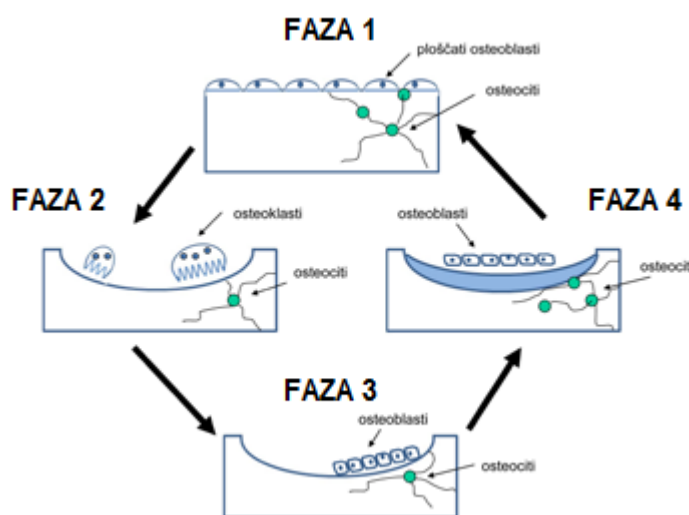
Preglednica I: Lokusi povezani z MKG, ki so jih odkrili v različnih GWAS študijah [8].

lokus	gen	lokus	gen	lokus	gen
1p31.3	<i>WLS (GPR177)</i>	7q21.3	<i>FLJ42280</i> in <i>SHFM1</i>	12q23.3	<i>C12ORF23</i>
1p36	<i>ZBTB40</i>	7q21.3	<i>SLC25A13</i>	13q14	<i>RANKL</i>
1p36.12	<i>WNT4</i>	7q31.31	<i>WNT16</i> in <i>FAM3C</i>	14q32	<i>MARK3</i>
1q24.3	<i>DNM3</i>	7q36.1	<i>ABCF2</i>	14q32.12	<i>RPS6KA5</i>
2p16	<i>SPTBN1</i>	8q13.3	<i>XKR9</i> in <i>LACTB2</i>	16p13.11	<i>NTAN1</i>
2p21	<i>PKDCC</i>	8q24	<i>OPG (TNFRSF11B)</i>	16p13.3	<i>AXINI</i>
2q13	<i>ANAPC1</i>	9q34.11	<i>FUBP3</i>	16p13.3	<i>C16ORF38</i> in <i>CLCN7</i>
2q14.2	<i>INSIG2</i>	10p11.23	<i>MPP7</i>	16q12.1	<i>CYLD</i>
2q24	<i>GALNT3</i>	10q21.1	<i>MBL2</i> in <i>DKK1</i>	16q23	<i>ADAMTS18</i>
3p22	<i>CTNNB1</i>	10q22.3	<i>KCNMA1</i>	16q24	<i>FOXL1</i> in <i>FOXC2</i>
3q13.2	<i>KIAA2018</i>	10q24.2	<i>CPN1</i>	17p13.3	<i>SMG6</i>
3q25.31	<i>LEKR1</i>	11p12	<i>LRP4</i> , <i>ARHGAP1</i> in <i>F2</i>	17q12	<i>CRHR1</i>
4p16.3	<i>IDUA</i>	11p14.1	<i>DCDC5</i>	17q21	<i>SOST</i>
4q21.1	<i>MEPE</i> , <i>SPP1</i> in <i>IBSP</i>	11p14.1	<i>LIN7C</i> in <i>DCDC5</i>	17q21	<i>HDAC5</i>

5q14	<i>MEF2C</i>	11p15	<i>SOX6</i>	17q24.3	<i>SOX9</i>
5q31	<i>ALDH7A1</i>	11q13.2	<i>LRP5</i>	18p11.21	<i>C18ORF19</i> in <i>FAM210A</i>
6p21.1	<i>SUPT3H</i> in <i>RUNX2</i>	12p11.22	<i>KLHDC5</i> in <i>PTHLH</i>	18q21.33	<i>RANK</i> (<i>TNFRSF11A</i>)
6p22.3	<i>CDKAL1</i> in <i>SOX4</i>	12p13.33	<i>ERC1</i> in <i>WNT5B</i>	19q13.11	<i>GPATCH1</i>
6q22	<i>RSPO3</i>	12q13	<i>SP7</i>	20p12	<i>JAG1</i>
6q25	<i>C6ORF97</i> in <i>ESR1</i>	12q13.12	<i>DHH</i>	Xp22.31	<i>FAM9B</i> in <i>KAL1</i>
7p14.1	<i>STARD3NL</i>				

1.1.1 Mehanizmi nastanka osteoporoze

Osteoporoza se odraža z zmanjšano kostno maso, ki je posledica neuravnovešenega procesa kostne prenove – razgradnje kostnine z osteoklasti in gradnje kostnine z osteoblasti (Slika 1). Ta proces je sistemsko uravnavan s hormoni, kot so paratiroidni hormon (PTH), kalcitonin (CT), 1,25-dihidroksiholekalciferol (1,25-D₃), insulin, kortizol, rastni hormon, tiroksin, epinefrin, estrogen in testosteron ter lokalno s citokini, rastnimi in diferenciacijskimi dejavniki, kot so ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (RANKL), osteoprotegerin (OPG), inzulinu podobni rastni dejavnik (IGF), transformirajoči rastni dejavnik β (TGF- β), fibroblastni rastni dejavnik (FGF), kostni morfogenetski proteini (BMPs). [6]



Slika 1: Shema procesa kostne remodelacije [prirejeno po 5]. Kostna remodelacija poteka v štirih faza: 1) Faza mirovanja in aktivacija – neaktivni ploščati osteoklasti prekrivajo površino kosti in čakajo na ustrezen dražljaj, ki jih razmakne tako, da se izpostavi kostna površina. 2) Faza privabljanja osteoklastov in razgradnja kosti –

razgaljena kostna površina kemotaktično privabi osteoklaste, ki razkrajajo kost in ustvarijo erozijsko lakuno. 3) Faza preobrata in privabljanja osteoblastov – osteoklasti se umaknejo iz lakune, makrofagne celice lakuno očistijo in jo pripravijo za naselitev osteoblastov, ki se diferencirajo ter aktivirajo. 4) Faza gradnje kosti in mineralizacija – aktivirani osteoblasti začnejo proizvajati nov osteoid, čemur sledi mineralizacija. [5]

Poznamo več mehanizmov uravnavanja kostne remodelacije, ki se med seboj prepletajo in lahko vplivajo direktno na MSC ali pa kontrolirajo delovanje in komunikacijo med osteoblasti in osteoklasti. Najpomembnejši mehanizmi so: signalne poti RANK-RANKL-OPG, WNT in BMP. Okvare teh poti vodijo v nastanek bolezni kosti, kot je na primer osteoporoza.

1.1.1.1 RANK-RANKL-OPG signalna pot

Sistem RANK-RANKL-OPG je eden ključnih regulatorjev osteoklastov in kostne razgradnje.

RANKL

Ligand receptorja za aktivacijo jedrnega aktivatorja κ B (ang. receptor activator of nuclear factor κ B ligand – RANKL) spada v naddružino ligandov tumorje nekrotizirajočih dejavnikov. Gen *TNFSF11*, ki kodira RANKL protein, se nahaja na kromosomu 13q14. Izraža se v tkivih, kot so limfociti T, osteoblasti in osteociti, kostni mozeg, pljuča, srce, skeletne mišice, ščitnica in placenta. Protein je sestavljen iz treh podenot: transmembranske, citoplazemske in zunajcelične domene. Na zunajcelični domeni se nahaja vezavno mesto za receptor. V človeškem telesu ga najdemo tako vezanega na membrano kot v topni obliki. Topna oblika ima manjši vpliv na proces osteoklastogeneze. [9, 10]

RANK

Receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κ B (ang. receptor activator of nuclear factor κ B –RANK) spada v naddružino receptorjev tumorje nekrotizirajočih dejavnikov. Gen *TNFRSF11A* se nahaja na kromosomu 18q22.1 in vsebuje zapis za protein RANK. Njegovo izražanje je v manjši meri moč zaznati v timusu, jetrih, kolonu, prostati, trebušni slinavki, kostnem mozgu, pljučih, možganih, srcu, skeletnih mišicah, ledvicah in koži, močno pa se izraža v osteoklastnih prekurzorskih celicah. Gre za trimerni transmembranski protein, sestavljen iz signalnega peptida, N-terminalne zunajcelične domene,

transmembranske domene in C-terminalne citoplazemske domene. Zunajcelična domena vsebuje štiri s cisteinom bogate psevdoponovitve, ki interagirajo z RANKL-om. [9, 10]

OPG

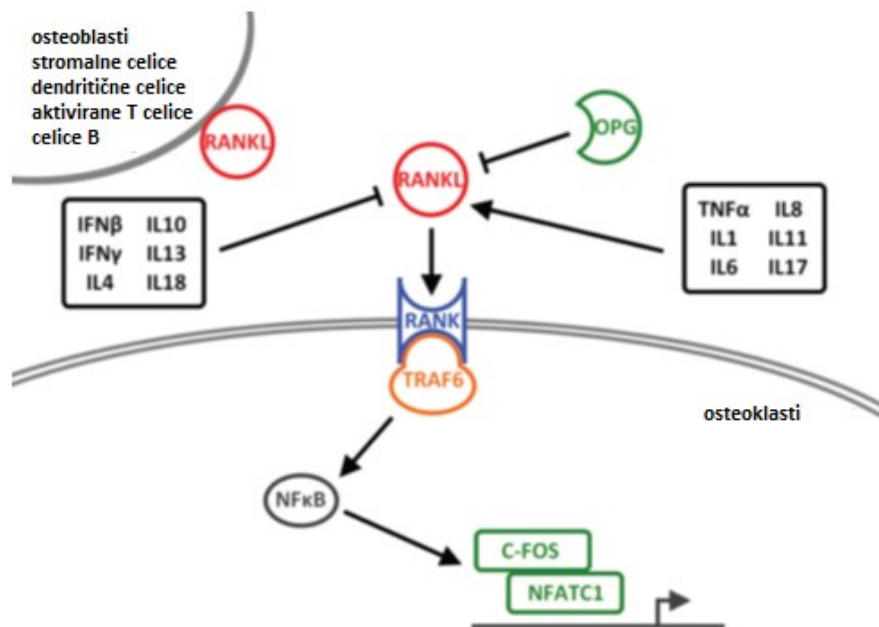
Osteoprotegerin (OPG) tako kot RANK spada v naddružino receptorjev tumorje nekrotizirajočih dejavnikov. Gen *TNFRSF11B* za zapis proteina OPG se nahaja na kromosomu 8q24.12 [11]. Izvorno se izraža v stromalnih celicah kostnega mozga, nastaja pa tudi v limfocitih B, kostnem mozgu, dendritičnih celicah in folikularnih dendritičnih celicah ter koži, jetrih, ledvicah, pljučih in srcu. Od celotnega proteina, ki je dolg 401 aminokislino, se odcepi signalni peptid in nastane 380 aminokislinski dolg protein. Ta je stavljen iz štirih s cisteinom bogatih N-terminalnih domen ter dveh mrtvih homolognih domen in ene C-terminalne domene, ki se glikozilirajo in kot homodimerni OPG izločijo iz celice. RANKL se veže na s cisteinom bogate domene. [9, 10]

Mehanizem delovanja

Osteoblasti izločajo liganda RANKL in OPG. RANKL se ob pomoči spodbujevalnega dejavnika rasti kolonij (M-CSF) veže na transmembranski receptor RANK na površini prekurzorjev osteoklastov. Ob vezavi liganda na receptor na njegovi intracelularni domeni pride do interakcije z receptorjem TRAF6 (dejavnik tumorske nekroze povezani faktor), ki aktivira kinazo NF- κ B. Ta preide v jedro in regulira izražanje c-fos, ki kasneje interagirira z NFATc1 in povzroči prepisovanje osteoklastnih genov. RANKL je nujen dejavnik za proliferacijo in diferenciacijo prekurzorskih celic do zrelih osteoklastov, stimulira njihovo preživetje in zlitje do večjedrnih osteoklastov, aktivira zrele osteoklaste in upočasnjuje njihovo apoptozo. Ti procesi vodijo do povečane razgradnje kosti in zmanjšanje kostne mase. OPG je topni receptor za RANKL in tekmuje z RANK-om za vezavo na RANKL. S tem onemogoča aktivacijo in učinke RANK-a ter tako preprečuje prekomerno razgradnjo kosti in povečuje kostno maso. Mehanizem delovanja sistema RANK-RANKL-OPG je predstavljen na Slika 2. [9, 10, 12]

V smeri povečane razgradnje kosti je RANK-RANKL-OPG sistem uravnavan z vnetnimi citokini TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17, ki pospešujejo osteoklastno diferenciacijo in aktivacijo. V tej smeri delujeta tudi PTH, ki vzpodbuja produkcijo RANKL-a in 1,25-D₃, ki vzpodbuja izražanje RANKL-a. Ravno obratno pa vneti citokini IFN β , IFN γ , IL-4, IL-

10, IL-13, IL-18 ter estrogeni inhibirajo osteoklaste preko RANK-RANKL-OPG sistema. Tudi nekateri ligandi iz Wnt signalne poti se kompetitivno vežejo na RANKL in tako zmanjšujejo kostno razgradnjo. [5, 9, 12]

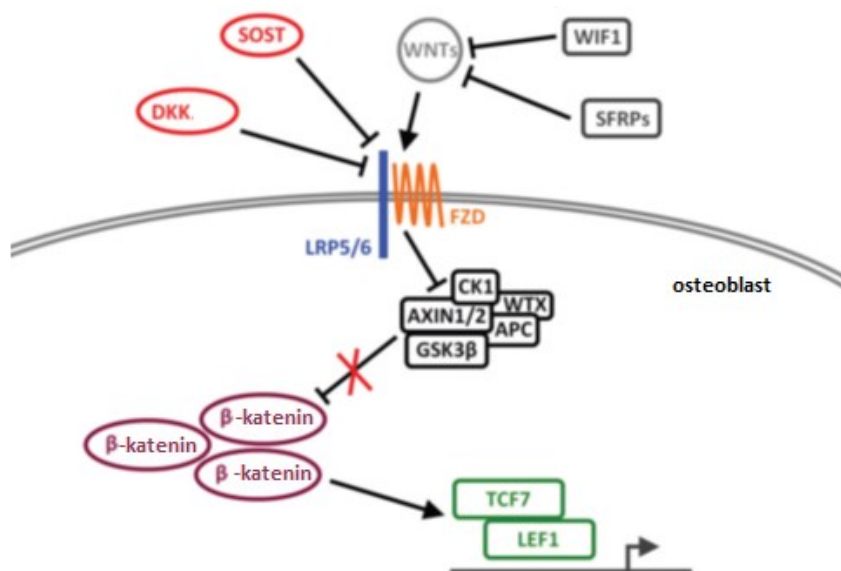


Slika 2: RANK-RANKL-OPG sistem [prirejeno po 12]. RANK-RANKL-OPG sistem je glavni mehanizem uravnavanja osteoklastogeneze. Osteoblasti, stromalne celice, dendritične celice ter aktivirane celice T in B izločajo RANKL, ki se veže na njegov receptor - RANK, na površini osteoklastov. Pri vezavi liganda z receptorjem pride do interakcije intracelularne domene RANK-a z receptorjem TRAF6, ki aktivira kinazo NF- κ B. Le ta preide v jedro in regulira izražanje protoonkogenega c-fos. C-fos nadaljnje interregira z NFATc1, ki povzroči prepisovanje osteoklastnih genov. OPG z vezavo na RANKL prepreči aktivacijo RANK-a. Tudi vnetni citokini IFN β , IFN γ , IL-4, IL-10, IL-13, IL-18 delujejo v smeri zaviranja aktivacije RANK-a. Ravno nasprotno pa TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17 delujejo osteoklastogeno ter vzpodbujajo delovanje RANK-a.

1.1.1.2 WNT signalna pot

WNT signalna pot je ključnega pomena za regulacijo osteoblastov in kostno izgradnjo. WNT so sekrecijski proteini, ki so vpleteni v proliferacijo, diferenciacijo in apoptozo kostnih celic. WNT signalna pot se aktivira z vezavo WNT na membranski receptorski kompleks FZD (Frizzled) in LRP5/6 (ang. low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6), ki povzroči razdor večproteinskega kompleksa (AXIN1/2, APC, CK1, GSK3 β in WTX). Fosforilacija β -katenina je zavrta in ta se kopiči v citoplazmi, zato začne prehajati v jedro, kjer se veže na transkripcijska dejavnika TCF7 in LEF1. Aktivira se prepisovanje tarčnih genov. Poglavitni transkripcijski dejavnik za osteoblastogenezo je osteoblastno specifični dejavnik 2 (Runx2). WNT pot lahko inhibiramo na 3 načine in tako preprečimo

njene učinke: 1) preko proteina Dickkopf (DKK) in 2) preko sklerostina (SOST), ki se vežeta na LRP5/6 ter 3) z dejavnikoma WIF1 (ang. Wnt inhibitory factor 1) in SFRP (ang. secreted frizzled-related protein). Slika 3 predstavlja mehanizem delovanja Wnt signalne poti. [5, 6, 12]

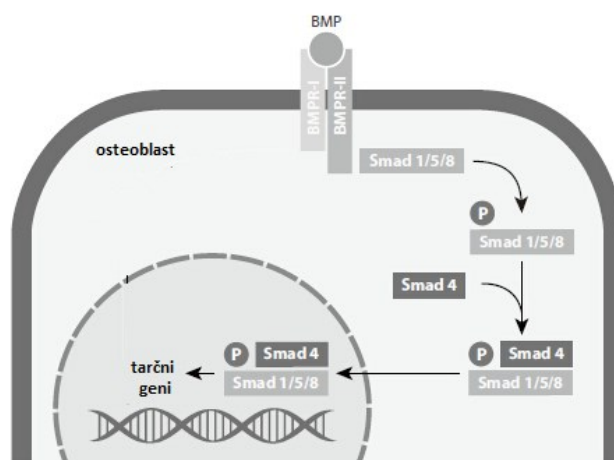


Slika 3: WNT signalna pot [prirejeno po 12]. WNT signalna pot je najpomembnejši mehanizem osteoblastogeneze. WNT se veže na membranski receptor FZD in koreceptor LRP5/6, ki se nahajata na osteoblastni površini. Pride do razpada večproteinskega kompleksa (AXIN1/2, APC, CK1, GSK3 β in WTX) in inhibicije fosforilacije β -katenina. Zaradi povečane količine β -katenina v citoplazmi, ta začne prehajati v jedro, kjer se veže na transkripcijska dejavnika TCF7 in LEF1. Pride do aktivacije prepisovanja WNT tarčnih genov. Proteina DKK in SOST z vezavo na LRP5/6 preprečita aktivacijo WNT. Dejavnika WIF1 in SFRPs pa se direktno vežeta na WNT ter preprečujeta njegovo vezavo na FZD-LRP5/6 kompleks.

1.1.1.3 BMP signalna pot

Osteoblastna diferenciacija in aktivacija je regulirana tudi preko BMP signalne poti. BMPs so citokini, ki jih uvrščamo v naddružino TGF- β . Vežejo se na BMP receptor, in povzročijo fosforilacijo Smad1/5/8. Fosforilirani Smad1/5/8 tvorijo kompleks s Smad4 in skupaj vstopita v jedro celice, kjer uravnata izražanje transkripcijskih dejavnikov in koaktivatorjev (*Runx2* in *Osx*), ki so pomembni za razvoj osteoblastov. Runx2 spodbuja izražanje genov za osteopontin (OPN), kostni sialoprotein (BSP) in osteokalcin (OCN),

medtem ko osteriks (Osx) deluje ravno obratno in zavira vplive Runx2. Mehanizem BMP signalne poti prikazuje Slika 4. [13, 14]



Slika 4: BMP signalna pot [prirejeno po 15]. Signalizacija preko BMP je še eden od mehanizmov regulacije osteoblastogeneze. BMPs se vežejo na heterodimerni BMP receptor (BMPRI in BMPRII) na površini osteoblastov. Vezava liganda na receptor povzroči fosforilacijo proteina Smad1/5/8, ki se veže skupaj s Smad4 ter skupaj vstopata v jedro, kjer regulirata izražanje tarčnih genov.

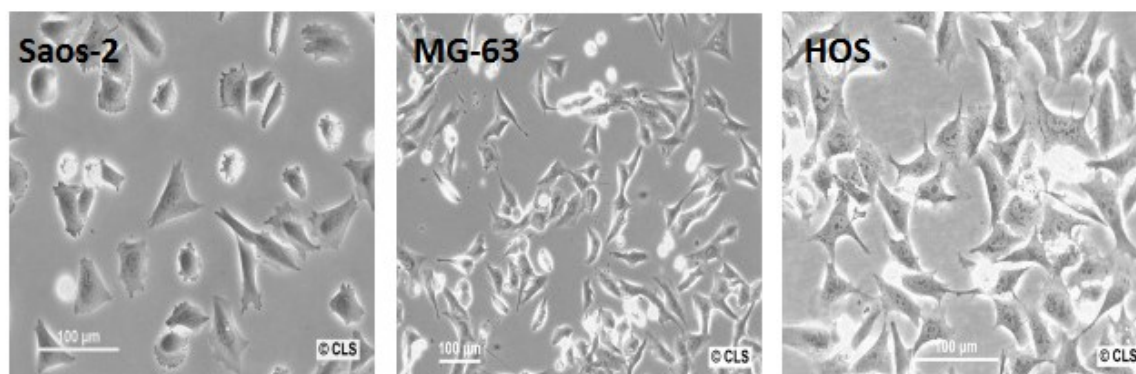
1.1.2 Celični modeli kostnih celic

Celični modeli predstavljajo uporabno orodje za *in vitro* preučevanje molekularskih in bioloških mehanizmov (diferenciacije, proliferacije in metabolizma) celic kot tudi za identifikacijo različnih tarč v celici. Model sestoji iz podpornega materiala, hranilnega medija in celične kulture. Za preučevanje mehanizmov povezanih z osteoporozo se uporabljajo celične linije kostnega izvora, ki so izolirane iz človeškega oziroma živalskega tkiva ali organa. V magistrski nalogi bomo uporabili tri človeške celične kulture (Slika 5):

- **Saos-2** je kultura človeških celic kostnega izvora, izolirane iz osteosarkoma 11-letne kavkaške deklice. Gre za človeškim osteoblastom podobne celice, ki podobno kot osteoblasti, izražajo osteoblastne markerje (OCN, BSP, dekorin, kolagen I in II, OPG), alkalno fosfatazo (ALP) ter številne citokine in rastne dejavnike. Fenotipso so celice najbolj podobne zrelim osteoblastom. Morfološko gre za epiteljske celice, ki se v enem sloju priraščajo na površino kulture. Izmed vseh treh celičnih kultur Saos-2 rastejo najpočasneje. [16–18]
- **MG-63** je celična kultura človeških kostnih celic, izoliranih iz jukstakortikalnega osteosarkoma 14-letne kavkaške deklice. Celice v manjši meri kot Saos-2 izražajo

osteoblastne markerje in ALP ter kažejo fenotip nezrelih osteoblastov. Morfološko so celice fibroblasti, ki se pritrjajo na površino kulture v enem sloju. [16, 17, 19]

- **HOS** je celična kultura človeških celic kostnega izvora, ki so izolirane iz osteosarkoma 13-letne kavkaške deklice. Celice izražajo osteoblastne lastnosti (izražanje ALP je večje kot pri MG-63). Morfološko gre za mešane celice fibroblastov in epitelijskih celic, ki se adherentno priraščajo na površino in rastejo v enem sloju. HOS celice v primerjavi z ostalima dvema kulturama rastejo najhitreje. [20]



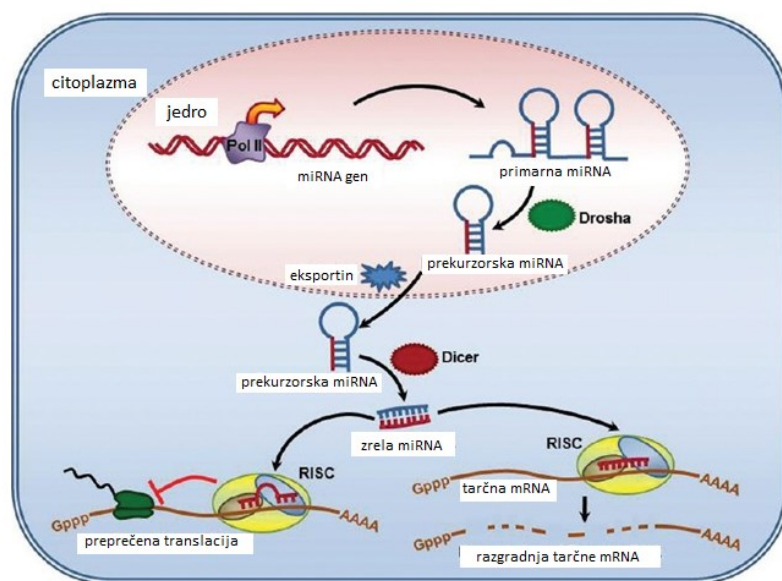
Slika 5: Celične linije Saos-2, MG-63 in HOS [21].

1.2 MikroRNA

MikroRNA (miRNA) so majhne enoverižne nekodirajoče molekule RNA, dolge 20-25 nukleotidov. Vežejo se na tarčno mRNA v 3' nekodirajočo regijo (3'UTR) in regulirajo posttranskripcijsko izražanje genov. Ena miRNA lahko regulira večje število genov in posamezna tarča je lahko regulirana z več miRNA molekulami. Prvo miRNA so odkrili leta 1993 pri glisti *Caenorhabditis elegans*, leta 2000 pa tudi pri človeku. Do danes je bilo pri človeku odkritih preko 3000 miRNA [22] in le te regulirajo eno tretjino vseh genov, ki kodirajo proteine. miRNA imajo poleg regulacije izražanja genov še vlogo v diferenciaciji, proliferaciji in apoptozi, sodelujejo pri razvoju in uravnavanju metabolizma, embriogenezi in vzdrževanju matičnih celic ter tumorigenezi. Izražanje značilnosti posameznih miRNA profilov je vpleteno v kontrolo različnih razvojnih in bolezenskih stanj, kot so kardiovaskularna, nevrološka, mišična, endokrinogena, imunološka in rakava obolenja. [23]

1.2.1 Biogeneza miRNA

Biogeneza miRNA je večstopenjski proces in je poenostavljeno predstavljena v nadaljevanju (Slika 6). Geni, ki vsebujejo zapis za miRNA, se v jedru prepisujejo s pomočjo RNA polimeraze II. Nastane nekaj tisoč nukleotidov dolga primarna miRNA (pri-miRNA), ki v svoji strukturi vsebuje veliko lasničnih zank. Encim Drosha, katerega uvrščamo med endonukleazne RNaze tipa III, razreže pri-miRNA na krajše fragmente (60 – 100 nukleotidov), ki jih imenujemo prekurzorska miRNA (pre-miRNA). pre-miRNA se s pomočjo encima eksportin 5 prenese v citoplazmo, kjer RNazo aktivni encimski kompleks Dicer povzroči njeno cepitev tako, da odreže zanko na začetku molekule. Nastane komplementarni dvovijačni dupleks - miRNA:miRNA*. Verigi se nato ločita in iz miRNA nastane zrela miRNA, ki se vključi v RNA-induciran utiševalni kompleks (RISC), medtem ko miRNA* običajno razpade. RISC prepozna specifične tarčne mRNA in odvisno od stopnje ujemanja nukleotidov med miRNA ter tarčnim zaporedjem na mRNA lahko prepreči translacijo proteina ali povzroči razgradnjo tarčne mRNA. [23, 24]



Slika 6: Biogeneza miRNA [prirejeno po 25]. Biogeneza miRNA se začne v celičnem jedru, kjer se gen za miRNA s pomočjo RNA polimeraze II prepisuje v primarno miRNA. Ta v svoji strukturi vsebuje veliko lasničnih zank. Endonukleazni encim Drosha razreže primarno miRNA na krajše fragmente, ki ohranjajo lasnično strukturo in jih imenujemo prekurzorska miRNA. Ta se s pomočjo encima eksportin prenese v citoplazmo celice, kjer encim Dicer povzroči, da se zanka na začetku molekule odcepi od preostale verige, iz katere nastane zrela miRNA. Zrela miRNA se vključi v RISC, ki prepozna specifične tarčne mRNA ter v primeru nepopolnega ujemanja miRNA s tarčno mRNA pride do

preprečitve translacije proteina (levo) oziroma v primeru popolnega ujemanja pride do razgradnje tarčne mRNA (desno).

1.2.2 miRNA v povezavi z osteoporozo

miRNA igrajo vlogo tudi v procesu kostne remodelacije in pri razvoju številnih kostnih bolezni kot so osteoporozo, osteoartritis in revmatoidni artritis. Za vzdrževanje normalne kostne mase je potrebno uravnoteženo razmerje med kostno izgradnjo in razgradnjo. Pri osteoporozi pa se to ravnotežje poruši, kajti običajno kostna razgradnja nadvlada nad izgradnjo. miRNA imajo tako pozitivne kot negativne vplive na diferenciacijo in aktivacijo kostnih celic. miR-503 zavira osteoklastogenezo v CD14+ PBMCs (mononuklearne celice periferne krvi) preko zmanjšane izražanja RANK-a. Medtem ko miR-148a in miR-133a vzpodbujata proces diferenciacije osteoklastov. Raziskave pri bolnikih z osteoporozo pa so pokazale opazno znižanje miR-503 ter povišanje miR-133a in miR-148a. miR-21 in miR-2861 vzpodbujata osteoblastogenezo, njuno izražanje pa je pri osteoporoznih bolnikih zmanjšano. Medtem ko miR-705, miR-3077-5p in miR-214 zavirajo diferenciacijo osteoblastov in delujejo v smeri manjše kostne izgradnje in kostne mase. [12, 13]

1.2.3 Vloga miR-195-5p in miR-204-5p pri človeku

V preliminarnih študijah na Katedri za klinično biokemijo so na podlagi analize izražanja 800 različnih miRNA v osteoporoznih kostnih vzorcih izbrali miR-204-5p in miR-195-5p kot obetavni miRNA, za preučevanje kostnega metabolizma. Ugotovili so tudi, da sta gena ALPL in cMYB potencialni tarči za ti dve miRNA. Oba gena pa sta povezana z nastankom osteoporoze.

miR-195-5p

miR-195-5p spada v družino miR-15, kateri je skupna sekvenca nukleotidov AGCAGCA v 3'UTR regiji [26]. Gen za miR-195 se nahaja na kromosomu 17p13.1. Prvotno je bil odkrit pri miših, kasneje pa tudi pri človeku. Regulira tarčne proteine, ki so vpleteni v celični cikel, apoptozo in proliferacijo [27]. Deluje kot tumorski zaviralec pri številnih rakavih obolenjih (rak dojk, pljuč, debelega črevesja, jeter, mehurja in jajčnikov). Dokazana pa je tudi njena vloga tumorskega zaviralca pri osteosarkomu [28]. Izražanje miR-195 je poleg rakavih obolenj povezano še s srčnimi boleznimi in shizofrenijo [27].

Vloga miR-195 v povezavi z osteoporozo je še dokaj neraziskana. Raziskava na primarnih mišjih lobanjskih osteoblastih je pokazala, da miR-195 spremeni regulacijo genov *Runx2*, *Osx*, odgovornih za diferenciacijo osteoblastov preko BMP signalne poti. Hkrati pa miR-195 inhibira tudi mineralizacijo osteoblastov tako, da zniža raven ALP. [26]

miR-204-5p

miR-204-5p spada v družino miR-204. Gen za miR-204-5p se nahaja na kromosomu 9q21.12 [29]. Njeno izražanje je bilo dokazano v različnih tkivih: ledvicah, mrežnici, možganih, živčnih tkivih, skeletnih mišicah, tkivih prebavnega in urinarnega trakta, sekretornih žlez in reproduktivnih organov [29, 30]. miR-204 deluje kot tumorski zaviralec in je vpletena v razvoj raka pljuč, gastrointestinalnega trakta, ledvic, dojk, jajčnikov in prostate [31–33]. Vpletena je tudi v proces kostne premene, kjer deluje kot negativni regulator diferenciacije osteoblastov iz MSC. miR-204 inhibira izražanje genov za *Runx2*, *OPN* in *OCN* ter zmanjša aktivnost ALP v osteoblastih in posledično s tem se zmanjša tudi izgradnja kostnega matriksa [13]. MSC pa se lahko diferencirajo tudi v adipocite in raziskave kažejo na to, da sta procesa adipogeneze in osteoblastogeneze pri bolnikih z osteoporozo obratno sorazmerna. Hkrati z inhibicijo diferenciacije osteoblastov se preko *Runx2* in receptorja aktiviranega s proliferatorjem peroksisomov γ (*PPAR γ*) vzajemno stimulira adipogeneza MSC [34].

1.2.4 Pomen in vloga alkalne fosfataze in dejavnika c-MYB pri človeku

ALPL

Zapis za gen ALPL (*ALPL*) se nahaja na kromosomu 1p36.12. Gre za gen, ki vsebuje zapis za tkivno nespecifično (jetrno/kostno/ledvično) alkalno fosfatazo (TNAP) [35]. Gen in njegove posttranskripcijske modifikacije v kostno-specifično ALP so bistvene za mineralizacijo ekstracelularnega matriksa kosti. ALP pospešuje mineralizacijo s hidrolizo pirofosfata (PPi) v anorganski fosfat (Pi) [36]. Mutacije, ki povzročijo izgubo funkcije gena, vodijo v hipofosfatazijo, bolezensko motnjo s hiperkalcemijo in skeletnimi poškodbami [35].

Raziskave na miših z genetskim pomanjkanjem *Alpl* (mišji homolog *ALPL*), pri katerih so se pojavili osteopenija in zlomi, kažejo na to, da ima TNAP ključno vlogo v razvoju in mineralizaciji mišjega skeleta, kar bi lahko veljalo tudi za človeka. [36]

cMYB

cMYB spada v družino myb proto-onkogenov. Zapis za gen cMYB (*MYB*) se nahaja na kromosomu 6q22-q23 [37]. Kot transkripcijski dejavnik ima glavno vlogo v regulaciji hematopoeze pri odraslem človeku. Močno se izraža v hematopoetskih in zarodnih celicah, kjer zavira zorenje in diferenciacijo krvnih in imunskih celic (limfocitov B in T). Pri številnih neoplazmah, kot so akutna mieloična levkemija, melanom ter rak dojk, črevesja in pankreasa, se poveča izražanje cMYB. Novejši rezultati kažejo, da izražanje cMYB regulirajo tudi specifične miRNA, npr. miR-155, miR-150. [38]

1.3 Analizni postopki za testiranje miRNA

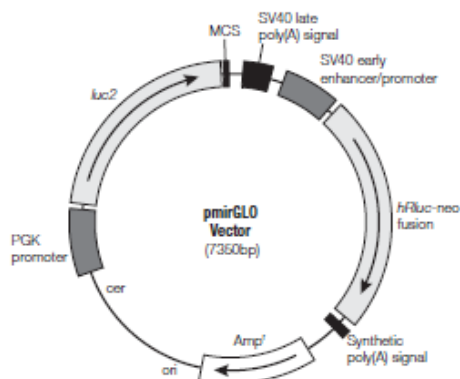
Detekcija miRNA je pomembna za raziskovanje funkcij miRNA in za diagnostiko bolezni. miRNA so v vzorcih po navadi prisotne v zelo majhnih količinah in glede na veliko število le teh, njihova detekcija predstavlja velik izziv. Profile izražanja veliko različnih miRNA lahko merimo z miRNA mikromrežami, medtem ko količino posamezne miRNA določamo s PCR v realnem času, prenosom northern ali z *in situ* hibridizacijo (ISH) [23].

Vezavna mesta za specifično miRNA na tarčnih mRNA lahko iščemo s pomočjo bioinformatičnih orodij, ki so dosegljiva na spletu (miRanda, microCosm, TargetScan, RicTar). Ta domnevna tarčna mesta lahko eksperimentalno preverimo s pripravo DNA konstrukta, ki vsebuje luciferazni reporter sklopljen s 3'UTR regijo predvidene mRNA tarče. Potrebujemo dva konstrukta, enega z nemutiranim vezavnim mestom za želeno miRNA v 3'UTR regiji ter drugega z mutiranim vezavnim mestom za to isto miRNA. miRNA se endogeno izražajo v skoraj vseh evkariontskih celicah in ob vezavi preiskovane miRNA na nemutirano 3'UTR regijo sklopljeno z luciferaznim reporterjem se zniža raven izražanja luciferaze. Medtem ko pri mutiranem konstrukt ne pride do vezave miRNA na 3'UTR regijo, zato se raven izražanja luciferaze ne zniža. Na podlagi zmanjšanja izražanja luciferaze ugotovimo ali se miRNA veže na 3'UTR in s tem regulira izražanje gena. [23]

1.1.2 Luciferazni test s plazmidnim vektorjem pmirGLO

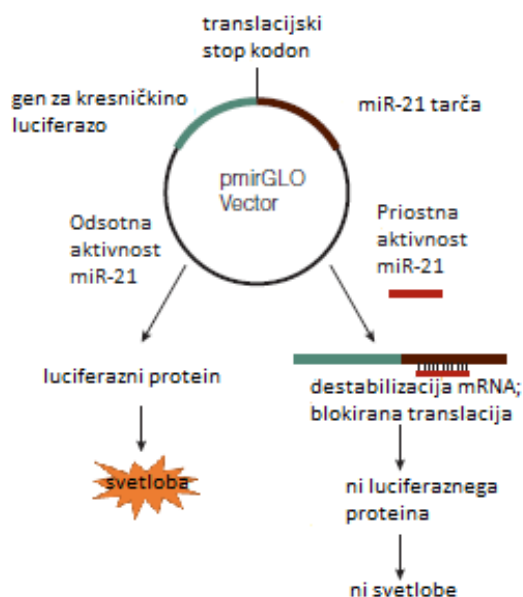
Pri eksperimentalnem delu bomo uporabili ekspresijski sistem pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (proizvajalec Promega) (Slika 7). Vektor temelji na Promegini tehnologiji dvojne luciferaze. Vsebuje gen za kresničkino luciferazo (*luc2*), ki deluje kot primarni reporter in je reguliran z miRNA ter gen za renilino luciferazo (*hRulc-*

neo), ki ima konstitutivno izražanje in se uporabi za kalibracijo sistema. Na 3' koncu *luc2* gena se nahaja poliklonsko mesto (MCS), kjer najdemo številna restrikcijska mesta in kamor lahko s tehnologijo rekombinantne DNA vstavimo fragmente DNA. V vektorju se nahaja tudi gen za rezistenco na ampicilin (Amp^r), ki služi kot selekcijski marker.



Slika 7: Plazmidni vektor pmirGLO [39].

Z vstavitvijo tarčnih mest za vezavo miRNA na 3' konec *luc2* gena nam pmirGLO omogoča kvantitativno vrednotenje aktivnosti miRNA, ki je obratno sorazmerna z aktivnostjo primarnega reporterja. Mehanizem aktivacije vektorja je predstavljen na Slika



8.

Slika 8: Mehanizem aktivacije vektorja pmirGLO [prirejeno po 39]. Na 3' konec gena za kresničkino luciferazo (zelena) je v vektor pmirGLO vstavljeno vezavno mesto za miR-21 (rjava). V primeru odsotnosti miR-21 se luciferazni protein normalno sintetizira in v reakcij s substratom pride do nastanka svetlobe. V prisotnosti miR-21 (rdeča) se ta veže na njeno tarčno mesto v plazmidu ter povzroči destabilizacijo tarčne mRNA oziroma prepreči

translacijo luciferaznega proteina in ne pride do sinteze luciferaznega proteina, zato ne vidimo luminescenčne svetlobe.

2 NAMEN DELA

miRNA so kratke molekule RNA, ki se komplementarno vežejo s tarčnimi molekulami mRNA in povzročijo razgradnjo mRNA. miRNA na ta način regulirajo izražanje genov ter so neposredno udeležene v praktično vse biološke procese v celicah. V magistrski nalogi želimo ugotoviti, ali se v izražanje gena za tkivno nespecifično alkalno fosfatazo (*ALPL*) vpleta miR-204-5p in ali na izražanje proto-onkogenega cMYB vpliva miR-195-5p. Za testiranje bomo uporabili že narejena konstrukta s 3'UTR regijo gena *ALPL* za vezavo miR-204-5p in s 3'UTR regijo gena *cMYB* za eventualno vezavo miR-195-5p, vsako vključeno v plazmid pmirGLO. Na novo želimo v magistrski nalogi pripraviti kontrolni konstrukt z vezavnim mestom za miR-21 5p. V vseh primerih bo plazmid pmirGLO vseboval gen za luciferazo sklopljen s 3'UTR regijo gena, ki vsebuje vezavno mesto za miRNA. Vezava miRNA na to vezavno mesto tako prepreči izražanje luciferaze. Konstrukte bomo izrazili v osteosarkomskih celičnih linijah HOS, Saos-2 in MG-63, ki predstavljajo različno zrele osteoblastne linije ter preverili vezavo miRNA. Z raziskavo torej želimo potrditi vezavo miR-204-5p na gen *ALPL* oziroma vezavo miR-195-5p na gen za *cMYB* ter tako potrditi regulatorno vlogo miR-204-5p in miR-195-5p na izražanje obeh tarčnih genov, za katera smo v predhodnih raziskavah ugotovili, da sta pomembna pri razvoju osteoporoze.

Namen magistrske naloge bo:

- izdelati konstrukt pmirGLO z vezavnim mestom za miR-21-5p, ki bo služil kot interna kontrola v prihodnjih raziskavah,
- testirati kontrolni konstrukt miR-21 na sesalskih celicah in
- ugotoviti ali se miR-204-5p veže na tarčno mRNA v 3'UTR delu gena *ALPL* in s tem regulira njegovo izražanje ter ali se miR-195-5p veže na tarčno mRNA v 3'UTR delu gena *cMYB* in s tem regulira njegovo izražanje.

3 METODE IN MATERIALI

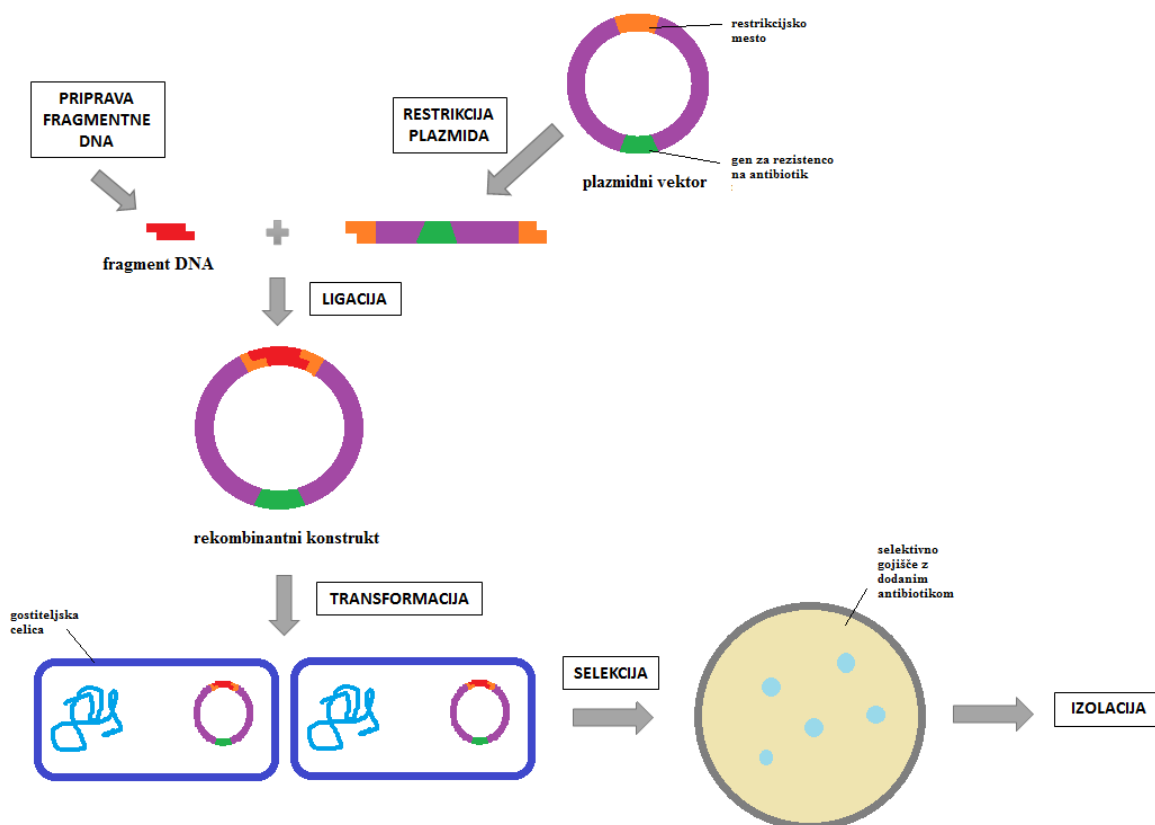
3.1 Konstrukti pmirGLO

Za testiranje vezave miR-204-5p na gen ALPL smo uporabili predhodno pripravljena konstrukta plazmida pmirGLO, poimenovana ALPL in ALPL_mut, za testiranje vezave za miR-195-5p na gen cMYB pa predhodno pripravljena konstrukta plazmida pmirGLO, poimenovana cMYB in cMYB_mut. Omenjeni konstrukti so bili pripravljene z enakim postopkom (opisanem v nadaljevanju) kot smo v tej nalogi pripravili konstrukta z vezavnim mestom za miR-21-5p.

3.2 Priprava kontrolnega konstrukta DNA z vezavnim mestom za miR-21

Pri testiranju vezave miRNA na tarčno mRNA z dvojnimi luciferaznimi testi smo uporabili konstrukte plazmida pmirGLO, ki smo jih že predhodno pripravili s tehnologijo rekombinantne DNA. Na novo smo v tej nalogi pripravili »kontrolni« konstrukta DNA. Za preverjanje pravilnosti delovanja Dual-Luciferase Reporter (DLR) analiznega sistema smo pripravili konstrukta z nemutiranim in mutiranim vezavnim mestom za miR-21-5p, ki ima konstitutivno izražanje v skoraj vseh tkivih [40]. Priprava konstruktov pmirGLO vključuje naslednje stopnje (Slika 9):

- 1) priprava fragmentne DNA, katero želimo vstaviti v plazmidni vektor,
- 2) restrikcija plazmida pmirGLO, da dobimo linearni plazmid, kamor lahko vstavimo fragmentno DNA,
- 3) ligacija, s katero vstavimo fragmentno DNA v plazmidni vektor,
- 4) transformacija, katere namen je vnos rekombinantne DNA v gostiteljsko celico in pomnoževanje le te,
- 5) selekcija, ki omogoča selektivno rast gostiteljskih celic, ki vsebujejo celične klone z enakimi rekombinantnimi konstrukti in
- 6) izolacija plazmidne DNA iz gostiteljskih celic, ki omogoča uporabo plazmidne DNA v nadaljnjih eksperimentih.



Slika 9: Shema priprave rekombinantnega konstrukta. Najprej s kemijsko sintezo pripravimo fragmentno DNA, ki jo želimo vstaviti v vektor. Nato plazmidni vektor razrežemo z restriksijskimi encimi, da dobimo take konce, ki se komplementarno prilegajo na fragment DNA. Sledi ligacija, kjer s pomočjo encima ligaze vstavimo fragment DNA v plazmidni vektor. Nastane rekombinantni konstrukt, ki ga s transformacijo vnesemo v gostiteljsko celico. Na selektivnem gojišču zrastejo le tiste bakterije, ki vsebujejo gen za rezistenco na antibiotik. Na koncu rekombinantno DNA še izoliramo iz bakterijskih celic.

1.1.1 Načrtovanje oligonukleotidov

Sekvenco DNA, ki smo jo želeli vstaviti v plazmidni vektor, smo pripravili s kemijsko sintezo. Pri podjetju Sigma-Aldrich smo naročili komplementarne pare oligonukleotidov (Preglednica II), ki so vsebovali nemutirano oziroma mutirano tarčno sekvenco za miR-21 (miR21 in mirR21mut) in so se komplementarno prilegali plazmidu pmirGLO po restrikciji z restriksijskima encimoma XhoI in XbaI. V insert smo dodali še eno restriksijsko mesto za encim ApaI, ki ima eno restriksijsko mesto tudi v samem plazmidu. To mesto je pomembno za kontrolo ligacije.

Preglednica II: Sekvence naročenih oligonukleotidov.

ime	sekvenca
miR21_F – istosmerni	5'TCGAGTAGGGCCCTAGTTCAACATCAGTCTGATAAGCTAT
miR21_R – protismerni	3'CATCCCGGGATCAAGTTGTAGTCAGACTATTCGATAGATC
miR21mut_F – istosmerni	5'TCGAGTAGGGCCCTAGTTCAACATCAGAAGATAAGCTAT
miR21mut_R – protismerni	3'CATCCCGGGATCAAGTTGTAGTCTTCTATTCGATAGATC

1.1.2 Sinteza oligonukleotidov

Oligonukleotide smo najprej resuspendirali v pufru za prileganje (10 mM Tris, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 – 8,0) do končne koncentracije 100 μ M. Nato smo sintetizirali dvoverižne fragmente miR21 in miR21mut, ki smo jih kasneje vstavili v plazmidni vektor. Sintezo smo izvedli po protokolu proizvajalca Sigma-Aldrich.

V 200 μ L mikrocentrifugirki smo zmešali 50 μ L obeh komplementarnih oligonukleotidov (miR21_F in miR21_R ter miR21mut_F in miR21mut_R). Mikrocentrifugirki smo prenesli v ciklični pomnoževalnik, kjer smo nastavili program: 1) segrevanje na 95 °C za 3 minute, 2) 45 minutno ohlajanje do 25 °C in 3) končno ohlajanje na 4 °C. Vzorce dvoverižnih fragmentov miR21 in miR21mut smo shranili na -20 °C.

1.1.3 Restrikcija plazmida

Restrikcijo ali cepitev izvedemo z encimi, imenovanimi restriksijske endonukleaze oziroma restriktaze. Restriktaze prepoznajo specifično zaporedje 4-6 nukleotidov na molekuli DNA in jo razrežejo tako, da na koncu dobimo tope ali lepljive konce. Za restrikcijo plazmida izberemo take encime, ki samo enkrat cepijo plazmid v poliklonskem mestu in nikjer drugje ter s tem omogočajo linearizacijo plazmida. Encimi morajo biti enaki kot tisti, s katerimi smo cepili insertno DNA.

Za restrikcijo plazmida pmirGLO smo pripravili restriksijsko zmes, kot prikazuje Preglednica III. Zmes smo premešali s pipetiranjem in jo čez noč inkubirali v vodni kopeli

na 37 °C. Izbrali smo encima XhoI in XbaI (proizvajalec NEB), ki imata restrikcijsko mesto v poliklonskem mestu in cepita tako, da dobimo lepljive konce, ki so komplementarni fragmentom, ki jih bomo kasneje vstavili v vektor.

Preglednica III: Restrikcijska zmes za restrikcijo plazmida pmirGLO.

komponenta	volumen
plazmidna DNA	10 µL
encim XhoI	1 µL
encim XbaI	1 µL
puffer CutSmart 10x (proizvajalec NEB)	2 µL
dH₂O	do 20 µL
celokupni volumen	20 µL

1.1.4 Elektroforeza na agaroznem gelu

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Negativno nabite molekule DNA oz. RNA potujejo k pozitivno nabiti elektrodi. Z elektroforezo na agaroznem gelu ločujemo molekule DNA predvsem glede na velikost (manjše molekule potujejo hitreje). [41, 42]

Priprava 2% agaroznega gela

V čašo smo natehtali 1,5 g agaroze in jo raztopili v 75 mL TAE (Tris-EDTA) pufra ter zmes segrevali v mikrovalovni pečici. Segrevali smo do vretja in vmes nekajkrat premešali. Ko se je zmes nekoliko ohladila, smo vanjo dodali 3 µL barvila Midori Green (proizvajalec Nippon Genetics) in jo rahlo premešali. Nato smo zmes vlili v model za gel z glavničkoma za 20 žepkov in pustili 20 minut, da se je gel strdil. Po 20 minutah smo odstranili glavniček ter gel prenesli v elektroforezno kadičko.

Postopek elektroforeze

V elektroforezno kadičko smo nalili toliko TAE pufra, da je bil gel popolnoma potopljen v pufri. Na parafilmu smo pripravili vzorce in označevalce velikosti tako, da smo jim dodali 2 µL nanašalnega barvila in nato vse skupaj prenesli v žepke na gelu. V prvi žepki smo nanesti 5 µL označevalca velikosti, v ostale žepke pa naše vzorce. Kadičko smo pokrili s

pokrovom in zagnali elektroforezo. Ta je potekala 40 minut pri konstantni napetosti 100 V in električnem toku 400 mA.

Po končani elektroforezi smo posneli fotografijo gela z UV transiluminacijo z uporabo G:Box sistema za dokumentiranje gelov.

1.1.5 Izolacija plazmida iz agaroznega gela

Za izolacijo razrezanega lineariziranega plazmida smo uporabili reagenčni komplet QIAquick Gel Extraction Kit proizvajalca Qiagen.

Plazmidno DNA smo pod UV lučjo izrezali iz gela. Košček gela smo prenesli v prozorno mikrocentrifugirko in stehali. Maksimalna količina gela je bila lahko 400 mg. Koščku gela smo dodali pufer QG v razmerju pufer : gel = 3 : 1 in inkubirali 10 minut na 50 °C. Pufer QG skrbi, da se gel raztopi in zagotavlja, da se DNA veže na silika membrano. Med inkubacijo smo mikrocentrifugirko večkrat vorteksirali. Dodali smo 100 µL izopropanola v razmerju izopropanol : gel = 1 : 1 in zmešali. Vzorec smo prenesli na QIAquick kolono in centrifugirali 1 minuto pri 17900 g. Filtrat smo zavrgli, kolono pa smo sprali s 750 µL pufru PE in centrifugirali 1 minuto pri 17900 g. Da smo odstranili ves etanol iz pufru PE, smo ponovili korak centrifugiranja in zavrgli filtrat. Za elucijo DNA smo na sredino kolone nanесли 30 µL destilirane vode, kolono pustili stati 1 minuto, nato pa centrifugirali 1 minuto pri 17900 g. V eluatu smo z NanoDrop-om spektrofotometrično izmerili koncentracijo DNA. Do nadaljnje uporabe smo vzorec shranili na -20 °C.

1.1.6 Ligacija

V procesu ligacije smo fragmentno DNA vstavili v lineariziran plazmid, s pomočjo DNA-ligaze. DNA-ligaza je encim, ki kovalentno poveže komplementarne konce fragmentov DNA in lineariziranega plazmida ter dobimo rekombinantno molekulo DNA.

Pripravili smo več reakcijskih zmesi za ligacijo (Preglednica IV) z različnimi molarnimi razmerji med insertom in plazmidom (9 : 1, 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3, 1 : 9). Za vsako od teh razmerij smo enkrat kot insert uporabili nemutiran fragment miR21, drugič pa mutiran fragment miR21mut. Končni volumen zmesi je bil 10 µL, masa celokupne DNA pa 90 ng. Ustrezen volumen inserta in plazmida smo izračunali preko molarnih razmerji iz mase teh dveh komponent tako, kot prikazuje primer v nadaljevanju. Delo je potekalo na ledu, s

čimer smo znižali encimsko aktivnost DNaz. Vse komponente smo napipetirali v mikrocentrifugirko, premešali s pipetiranjem in zmes inkubirali čez noč na sobni temperaturi.

Preglednica IV: Reakcijska zmes za ligacijo.

komponenta	količina za en vzorec
insert	celokupna masa 90 ng
lineariziran plazmid	molarno razmerje insert : plazmid = 9 : 1, 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3, 1 : 9
dH ₂ O	do 10 µL
10x T4 DNA ligazni pufer (proizvajalec NEB)	1 µL
T4 DNA ligaza (proizvajalec NEB)	1 µL
celokupni volumen	10 µL

Poleg vzorcev smo pod enakimi pogoji pripravili še negativno kontrolo, ki ni vsebovala inserta. V mikrocentrifugirko smo napipetirali 2 µL lineariziranega plazmida, 6 µL dH₂O, 1 µL T4 DNA ligaznega pufera in 1 µL T4 DNA ligaze, premešali in inkubirali.

Primer izračuna mase inserta in volumna iz molarne razmerja

Iz podatkov o koncentraciji inserta miR21 ($c_i = 24 \text{ ng}/\mu\text{L}$), koncentraciji plazmida pmirGLO ($c_p = 37,4 \text{ ng}/\mu\text{L}$), dolžini inserta ($L_i = 41 \text{ bp}$), dolžini plazmida ($L_p = 7390 \text{ bp}$) in masi celokupne DNA ($m_t = m_i + m_p = 90 \text{ ng}$) smo za razmerje $insetr : plazmid = n_i : n_p = 3 : 1$ s pomočjo spodnjih enačb (Enačba 1, Enačba 2) izračunali maso inserta ($m_i = 1,41 \text{ ng}$) in maso plazmida ($m_p = 88,53 \text{ ng}$) ter volumen inserta ($V_i = 0,06 \mu\text{L}$) in volumen plazmida ($V_p = 2,37 \mu\text{L}$).

Enačba 1: Izračun molarne razmerja med insertom in plazmidom.

$$n = \frac{m}{M} = \frac{m}{L} ; L \approx M * konst.$$

$$\frac{3}{1} = \frac{n_i}{n_p} = \frac{m_i * L_p * konst.}{L_i * m_p * konst.} \rightarrow \frac{m_i * L_p}{m_p * L_i} = \frac{3}{1}$$

Enačba 2: Izračun volumna inserta in plazmida.

$$V_i = \frac{m_i}{c_i} \text{ in } V_p = \frac{m_p}{c_p}$$

1.1.7 Transformacija

S transformacijo smo vnesli rekombinantno DNA v gostiteljsko celico, kjer se rekombinantna DNA lahko pomnožuje. Za gostiteljske celice smo izbrali kompetentne celice bakterije *Escherichia coli*, ki so bile pripravljene s kalcijevim kloridom.

Postopek transformacije

Na ledu smo počasi odtalili 50 μ L-ski alikvot kompetentnih celic, ki je bil shranjen na -80 $^{\circ}$ C, mu dodali 5 μ L DNA, pripravljene z ligazno reakcijo, premešali s pipetiranjem in inkubirali na ledu 20 minut. Inkubaciji je sledilo kratko segretje (45 sekund) transformacijske zmesi na 42 $^{\circ}$ C v termobloku in takojšnja nekaj minutna inkubacija na ledu. Postopek hitrega segretja ledeno mrzlih celic imenujemo toplotni šok, ki povzroči odprtje por v celični membrani ter omogoča vstop DNA v celico. Celicam smo nato dodali 200 μ L Lauria Bertani (LB) medija in jih 1 uro inkubirali s stresanjem na 37 $^{\circ}$ C. Po eni uri smo zmes centrifugirali 5 minut pri 6800 g, odstranili 200 μ L supernatanta, peleto pa resuspendirali v preostanku supernatanta. Celice smo nanegli na vnaprej pripravljeno ogreto selekcijsko trdo gojišče (LB plošče z ampicilinom). Ko so bile plošče suhe, smo jih oblepili z eno plastjo parafilma, jih ovili v alu-folijo ter obrnjene navzdol čez noč inkubirali na 37 $^{\circ}$ C.

Priprava LB agar plošč

LB agar plošče smo pripravili tako, da smo natehtali 8 g LB praška (proizvajalec Sigma-Aldrich) in 6 g agarja v prahu (proizvajalec Sigma-Aldrich) ter ju zmešali s 400 mL destilirane vode. Mešanico smo avtoklavirali po programu za tekočine (121 $^{\circ}$ C, 1,3 bar, 15 minut). Ko se je mešanica nekoliko ohladila, smo ji dodali antibiotik ampicilin (proizvajalec Sigma-Aldrich) (100 μ g/mL), premešali in prelili v plastične sterilne petrijevke.

Priprava LB medija

LB medij smo pripravili tako, da smo natehtali 5 g LB praška in ga zmešali z 250 mL destilirane vode ter mešanico avtoklavirali pri enakih pogojih kot zgoraj.

1.1.8 Kontrola ligacije

3.2.1.1 PCR

Uspešnost ligacije smo najprej preverili z vizualnim pregledom plošč po transformaciji. V primeru uspešne ligacije in transformacije so na agar plošči zrasle kolonije bakterij. Kolonije smo prešteli in jih nadaljnje uporabili za analizo z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR).

Princip PCR

PCR je *in vitro* metoda za pomnoževanje molekul DNA z uporabo termostabilne polimeraze ter dveh začetnih oligonukleotidov. Reakcija poteka v treh korakih: 1) denaturacija, 2) prileganje oligonukleotidnih začetnikov ter 3) podaljševanje in izgradnja komplementarne verige s polimerazo. Najprej s segrevanjem na 94 °C pride do denaturacija dvoverižne matrične DNA in dobimo dve enoverižni molekuli DNA. Za prileganje oligonukleotidnih začetnikov na enoverižno molekulo DNA znižamo temperaturo na 50-60 °C. V zadnjem koraku za optimalno delovanje polimeraze temperaturo dvignemo na 72 °C. Vsi trije koraki skupaj predstavljajo en cikel, ki se večkrat ponovi in v vsakem ciklu se količina DNA podvoji. [42, 43]

Postopek PCR

Za PCR smo uporabili reagenčni komplet AptaTaq Fast PCR Master proizvajalca Roche. Pripravili smo začetno zmes (Preglednica V). Izbrali smo taka oligonukleotidna začetnika (Preglednica VI), ki sta se komplementarno prilegala začetku in koncu odseka DNA, ki smo ga želeli pomnožiti. Istosmerni začetnik je bil komplementaren delu plazmidne DNA, protismerni začetnik pa je bil komplementaren vstavljenemu DNA fragmentu. V izogib delovanja DNaz je delo potekalo na ledu. Najprej smo v 0,2 mL mikrocentrifugirko v predpisanih volumnih napipetirali ultra čisto vodo, oba oligonukleotidna začetnika in AptaTaq Master 5x ter premešali s pipetiranjem. Na koncu smo dodali DNA iz bakterijskih kolonij tako, da smo s pipetnim nastavkom postrgali malo bakterijske kolonije in jo prenesli direktno v začetno zmes. Vse skupaj smo premešali s pipetiranjem in prenesli v

ciklični pomnoževalnik. Nastavili smo program pomnoževanja, ki je predstavljen v Preglednica VII.

Preglednica V: Začetna zmes za PCR.

komponenta	volumen
istosmerni oligonukleotidni začetnik [10 μ M]	1 μ L
protismerni oligonukleotidni začetnik [10 μ M]	1 μ L
AptaTaq Master 5x	2 μ L
dH ₂ O	4 μ L

Preglednica VI: Sekvence oligonukleotidnih začetnikov za PCR.

ime	sekvenca
Primer_TargetGeneTest_pmirGLO – istosmerni (proizvajalec Sigma-Aldrich)	5' CGAGATTCTCATTAAGGCCAAG 3'
miR21_R – protismerni*	3' CATCCCGGGATCAAGTTGTAGTCAGACTATTCGATAGATC 5'
miR21mut_R – protismerni**	3' CATCCCGGGATCAAGTTGTAGTCTTCTATTCGATAGATC 5'

*miR21_R smo uporabili za kolonije z nemutiranim konstruktom; **miR21mut_R smo uporabili za kolonije z mutiranim konstruktom.

Preglednica VII: Program PCR pomnoževanja.

stopnja	temperatura [°C]	čas [s]	število ciklov
začetna denaturacija	95	180	1
denaturacija	95	1	} 34
prileganje in podaljševanje	60	15	
ohlajanje	4	∞	∞

Po končanem pomnoževanju smo prisotnost oziroma odsotnost želenega pomnožka preverili z elektroforezo na agaroznem gelu. PCR produkte smo nanесли na agarozni gel in zagnali elektroforezo po že prej opisanem postopku.

3.2.1.2 Restriksijska reakcija

Restriksijsko reakcijo smo nastavili z encimom ApaI (proizvajalec NEB), ki ima eno restriksijsko mesto v plazmidu (zunaj MCS), drugo pa v insertu, ki smo ga vstavili v MCS. Pripravili smo reakcijsko zmes (Preglednica VIII). Vse komponente smo v predpisanih volumnih napipetirali v mikrocentrifugirko, jih premešali s pipetiranjem ter zmes 1 uro inkubirali v vodni kopeli na 37 °C. Za plazmidno DNA smo uporabili rekombinantno DNA, ki smo jo izolirali iz bakterijske kolonije po navodilih proizvajalca (Qiagen) z reagenčnim kompletom QIAprep Spin Miniprep Kit (princip izolacije je enak kot pri Mididiprep-u, opisanem v poglavju Priprava večje količine plazmida). Po končani inkubaciji je sledila analiza dolžine fragmentov z elektroforezo na agaroznem gelu in vizualizacija rezultata z G:Box.

Preglednica VIII: Reakcijska zmes za restriksijsko reakcijo.

komponenta	volumen
plazmidna DNA	8 µL
encim ApaI	0,5 µL
puffer CutSmart 10x	1 µL
dH₂O	0,5 µL
celokupni volumen	10 µL

3.2.1.3 Sekvenciranje

Sekvenciranje je metoda za identifikacijo in določitev zaporedja nukleotidov v molekuli DNA [42]. V prisotnosti dideoksinukleotidov (ddNTP) se na osnovi matrične DNA s polimerazo in specifičnim oligonukleotidnim začetnikom sintetizirajo različno dolgi fragmenti DNA. Vsak od štirih ddNTP-jev je označen s specifičnim fluorescenčnim barvilom, ki ga zaznamo s fluorescenčnim detektorjem. ddNTP-ji se naključno vgrajujejo v novo nastalo verigo in z vključitvijo le teh se prekine sinteza DNA. Fragmenti se ločijo glede na velikost (z elektroforezo) in fluorescenco. [41]

Vzorci smo poslali na sekvenciranje podjetju MacroGen. Za sekvenčno reakcijo so potrebovali 20 µL vzorca plazmidne DNA s končno koncentracijo 100 ng/µL in ustrezen oligonukleotidni začetnik. Plazmidno DNA smo ustrezno redčili in jo poslali po pošti, za

oligonukleotidni začetnik pa smo na njihovi spletni strani izbrali univerzalni oligonukleotidni začetnik EBV-RP (sekvenca predstavljena v Preglednica IX).

Preglednica IX: Sekvenca univerzalnega oligonukleotidnega začetnika EBV-RP.

ime	sekvenca
EBV-RP	5' GTGGTTTGTCCAAACTCATC 3'

1.1.9 Priprava večje količine plazmida – Midiprep

Z reagenčnim kompletom PureYield Plasmid Midiprep System proizvajalca Promega smo iz bakterijskih celic izolirali večjo količino plazmida. Sistem je zasnovan tako, da najprej liziramo bakterijske celice, da iz njih izstopi plazmidna DNA. V naslednjem koraku se DNA veže na kolono, ki vsebuje silika membrano. Na koncu pa plazmid speremo in eluiramo.

Priprava prekonočne kulture za izolacijo plazmida

Za prekonočno kulturo smo najprej v 15 mL centrifugirki pripravili 5 mL LB medija z dodanim ampicilinom. Vanj smo z ezo sterilno prenesli eno kolonijo bakterij, ki so zrastle na agar plošči po transformaciji in kulturo inkubirali 6-8 ur s stresanjem na 37 °C. Nato smo kulturo prelili v stresalno erlenmajerico, kamor smo dodali še 95 mL LB medija z ampicilinom in jo čez noč inkubirali s stresanjem na 37 °C.

Postopek izolacije plazmida

100 mL prekonočne kulture smo prelili v 50 mL centrifugirki in ju centrifugirali 10 minut pri 5000 g v centrifugi z rotorjem s spremenljivim nagibom. Supernatant smo zavrgli, peleto s celicami pa resuspendirali v 3 mL Cell Resuspension Solution. Celice smo lizirali z dodatkom 3 mL Cell Lysis Solution, raztopino premešali z obračanjem centrifugirke in inkubirali 3 minute pri sobni temperaturi. Liziranim celicam smo dodali 5 mL Neutralization Solution, premešali z obračanjem in nato 15 minut centrifugirali pri 5000 g.

Čistilno kolono smo nastavili na vrh vezavne kolone in ju skupaj nastavili na vakuumsko črpalko. V čistilno kolono smo prelili očiščen lizat (supernatant po centrifugiranju) in vklopili vakuumsko črpalko na 400 barov, da je vsa tekočina stekla skozi obe koloni. Čistilno kolono smo odstranili, na vezavno kolono pa smo dodali 5 mL Endotoxin

Removal Wash in priključili vakuumsko črpalko. Kolono smo sprali še z 20 mL Column Wash Solution in pustili vakuumsko črpalko priključeno še 1 minuto, da se je membrana popolnoma posušila.

Elucijo smo izvedli z eluatorjem. Vezavno kolono smo nastavili na eluator, tega pa smo priklopili na vakuumsko črpalko. Na kolono smo nanесли 400 μL Nuclease-Free Water in zagnali vakuumsko črpalko. Koncentracijo DNA v eluatu smo izmerili spektrofotometrično z NanoDrop-om.

1.1.10 Merjenje koncentracije DNA

Koncentracijo in čistost DNA smo merili na spektrofotometru NanoDrop, ki omogoča merjenje absorbance v kapljici (1-2 μL) vzorca. Princip merjenja temelji na površinski napetosti med dvema optičnima vlaknoma, med katerima se tvori tekočinski valj. Fotometer (detektor s CCD kamero) meri svetlobo, ki gre skozi tekočinski most (vzorec), pri valovnih dolžinah 230, 260 in 280 nm. [44]

Na začetku merjenja smo NanoDrop očistili z ultra čisto vodo in papirjem, med vsakim merjenjem vzorcev pa smo ga obrisali s papirjem. Poleg vzorcev DNA smo najprej izmerili slepi vzorec, za katerega smo uporabili ultra čisto vodo. Po vsaki meritvi smo si zapisali koncentracijo v $\text{ng}/\mu\text{L}$, ki temelji na izmerjeni absorbanci pri 260 nm ter podatke o čistosti DNA, ki nam jih povesta razmerji absorbanc 260/280 in 260/230.

3.3 Merjenje vezave miRNA na konstrukte DNA v celičnih linijah

1.1.11 Delo s celičnimi kulturami

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali tri različne celične linije (HOS, MG-63 in Saos-2), ki za svojo rast potrebujejo ustrezen rastni medij (Preglednica X). Celice smo gojili v inkubatorju na 37 °C in 5% CO_2 , v 10 centimetrskih petrijevkah za gojenje celic oziroma na ploščah s 24 luknjicami. Vse delo s celicami je potekalo v aseptičnem okolju, ki ga zagotavlja komora z laminarnim pretokom zraka (LAF komora). Zrak v komori se filtrira skozi HEPA filtre in tako zagotavlja čist prostor. Pred pričetkom dela v komori za 20 -30 minut vklopimo UV luč, da steriliziramo delovne površine. Komoro dodatno dezinficiramo s 70% etanolom in enako storimo z vsem materialom in opremo, ki jo vnesemo v komoro. Po končanem delu komoro ponovno prebrišemo s 70% etanolom. Pri

delu obvezno uporabljamo rokavice, ki jih razkužujemo s 70% etanolom in nosimo zaščitni plašč ter zaščito za čevlje, ki ju uporabljamo le v celičnem laboratoriju. [45]

Preglednica X: Celične linije in rastni mediji uporabljeni pri eksperimentalnem delu.

celična linija	rastni medij
HOS	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (proizvajalec Sigma-Aldrich) z dodatkom 10% FBS (proizvajalec Gibco) in 1% L-glutamina (proizvajalec Sigma-Aldrich)
MG-63	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) z dodatkom 10% FBS in 1% L-glutamina
Saos-2	McCoy's 5A Modified Medium (proizvajalec Sigma-Aldrich) z dodatkom 15% FBS in 1% L-glutamina

1.1.12 Kultiviranje celičnih linij

3.3.1.1 Odmrznitev celic

Celice so bile zamrznjene s 5% dimetil sulfoksidom (DMSO) in shranjene v tekočem dušiku (-196 °C). Viale s celicami smo hitro odtalili v vodni kopeli na 37 °C. V petrijevko za gojenje celic smo predhodno pripravili 11 mL ustreznega medija in mu dodali 1 mL odmrznjenih celic, rahlo premešali z vrtinčenjem petrijevke in postavili v inkubator. Naslednji dan smo medij, ki je vseboval citotoksični DMSO zamenjali s svežim medijem in celice pustili rasti do ustrezne konfluentnosti.

3.3.1.2 Precepljanje

Celice v gojiščni kulturi sprva rastejo nekoliko počasneje, ko se prilagodijo kulturi, pa se njihova rast močno pospeši. V primeru, da celice prerastejo celotno površino gojiščne posode in nimajo več manevrskega prostora za širitev, se celična rast in razmnoževanje močno upočasni ali celo ustavi, iztroši pa se tudi samo gojišče [45]. Za ohranitev zdrave celične linije in njeno uspešno razmnoževanje je potrebno celice precepljati preden dosežejo 100% konfluentnost.

Postopek

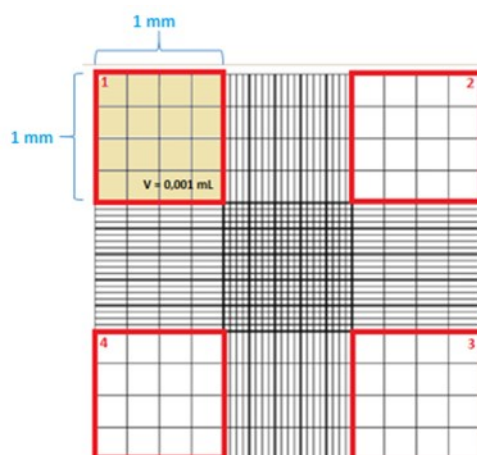
Ko so celice dosegle 70-80% konfluentnost, smo jih precepili v sveže gojišče. S pipeto smo odstranili medij in celice sprali z 2 mL fosfatnega pufra (PBS). Dodali smo 3 mL 0,25% tripsin EDTA (proizvajalec Gibco) in krožnik postavili v inkubator za 3 minute. Krožnik smo nežno potresli in pod invertnim svetlobnim mikroskopom preverili ali so se celice odlepili od podlage. Med inkubacijo smo označili (celična linija, številka pasaže, redčitev, datum) nov krožnik in vanj glede na redčitev (Preglednica XI) dodali ustrezen volumen svežega medija. Tripsiniziranim celicam smo dodali 7 mL medija in s pipetiranjem razbili skupke. Ustrezen volumen celične suspenzije smo prenesli v predhodno pripravljen nov krožnik. Le tega smo zavrteli v obliki osmice, da smo prerazporedili celice po celotni površini krožnika in ga nato postavili v inkubator. Ostanek celične suspenzije smo porabili za nadaljnji eksperiment.

Preglednica XI: Redčitve.

redčitev	volumen celične suspenzije [mL]	volumen medija [mL]	celokupni volumen [mL]
1 : 2	6	6	12
1 : 3	4	8	12
1 : 4	3	9	12
1 : 5	2	10	12
1 : 10	1,2	10,8	12
1 : 15	0,8	11,2	12
1 : 20	0,6	11,4	12

1.1.13 Štetje celic

Za določitev koncentracije celic v celični suspenziji smo celice ročno prešteli v Neubauerjevi komori za štetje celice. Komora je narejena iz specialnega stekla, na katerega je vgravirana mreža kvadrantov za štetje (Slika 10). Dimenzije kvadrantov so specifične, kar omogoča določitev števila celic v specifičnem volumnu raztopine.



Slika 10: Mreža kvadrantov za štetje celic v Neubauerjevi komori.

V čisto komoro smo nanegli približno 20 μL suspenzije celic in pod svetlobnim mikroskopom prešteli število celic v vsakem od štirih zunanjih kvadrantov ter izračunali povprečno število celic n v enem kvadrantu. Koncentracijo celic v enem mililitru celične suspenzije smo izračunali po Enačba 3.

Enačba 3: Izračun koncentracije celic na mililiter.

$$\text{koncentracija celic} = \frac{n * 10^4}{\text{mL}}$$

1.1.14 Transfekcija

Transfekcija je tehnika, s katero vnesemo plazmidno DNA v evkariontsko celico. Glavni namen transfekcije je proučevanje funkcij in izražanja genov oziroma genskih produktov, s povečanjem oziroma inhibicijo izražanja določenega gena v celici [46].

Klonirane gene in kontrolo brez inserta smo v celico vnesli s pomočjo X-tremeGENE HD DNA transfection reagent (proizvajalec Roche), ki se veže na DNA in z njo tvori komplekse, ti pa lahko vstopajo v celico. X-tremeGENE HD omogoča visoko učinkovito transfekcijo DNA v različne celice z nizko citotoksičnostjo in je hkrati enostaven za uporabo. [47]

Dan pred transfekcijo smo nacepili celice na ploščo za gojenje celic s 24 luknjicami. Potrebovali smo N celic (15 000 celic za HOS in MG-63 oziroma 30 000 celic za Saos-2) na luknjico, končni volumen celic in medija na eno luknjico pa je bil 0,5 mL. Prešteli smo celice po zgoraj opisanem postopku in izračunali volumen celic po Enačba 4, dodali ustrezen volumen medija in nanegli 0,5 mL suspenzije v luknjico na plošči tako, kot je

opisano pri primeru priprave plošče za 8 transfekcij (Slika 11). Ploščo smo za 24 ur postavili v inkubator.

Enačba 4: Izračun volumna.

$$c_z * V_z = c_k * V_k$$

V_z ...volumen celic
 c_z ...začetna koncentracija celic
 $(c_z = n * 10^4 / mL)$
 V_k ...končni volumen
 c_k ... končna koncentracija celic ($c_k = N / V_k$).

Primer priprave plošče za 8 transfekcij:

1) Izračun potrebnih koncentracij in volumnov:

končni volumen suspenzije celic in medija: $V_k = 8 * 0,5 \text{ mL} = 4 \text{ mL}$

potrebno število celic na luknjico: $N = 15\ 000 * 8$

število celic v zunanjih kvadrantih hemocitometra: 15, 15, 10, 13

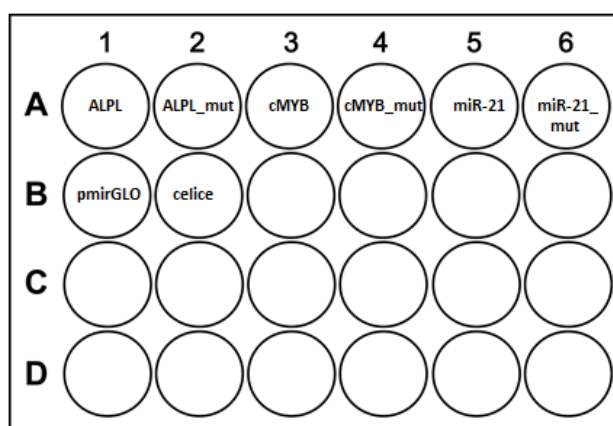
povprečno število celic v enem kvadrantu: $n = 1325$

začetna koncentracija celic na mL: $c_z = 13,25 * 10^4 / mL$

volumen celic: $V_z = \frac{c_k * V_k}{c_z} = \frac{N * V_k}{V_k * c_z} = \frac{N}{c_z} = \frac{15000 * 8 \text{ mL}}{13,25 * 10^4} = 0,91 \text{ mL}$

volumen medija: $V_m = V_k - V_z = 4 \text{ mL} - 0,91 \text{ mL} = 3,09 \text{ mL}$.

2) V centrifugi Irki zmešamo V_z in V_m ter 0,5 mL suspenzije naneseemo v vsako luknjico na plošči.



Slika 11: Priprava plošče za 8 transfekcij.

Na dan transfekcije smo pripravili mešanico za transfekcijo (Preglednica XII). Najprej smo v mikrocentrifugirke pripravili ustrezne količine plazmidne DNA. Nato smo pripravili

mešanico X-tremeGENE – OptiMEM in jo inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Mešanico smo dodali k prej pripravljeni plazmidni DNA, dobro premešali s pipetiranjem in inkubirali 15 minut na sobni temperaturi. Mešanico DNA - X-tremeGENE - OptiMEM smo nato po kapljicah dodali celicam na plošči, ploščo smo premešali z vrtinčenjem in jo postavili v inkubator za 24 ur.

Preglednica XII: Mešanica za transfekcijo.

komponenta	količina na luknjico za ploščo s 24 luknjicami
Plazmidna DNA	0,25 µg
X-tremeGENE HD	0,75 µL
OptiMEM (proizvajalec Sigma-Aldrich)	50 µL

1.1.15 Merjenje luminiscence

Vežavo miRNA na konstrukte DNA v celičnih linijah smo merili z dvojnimi luciferaznimi testom. Uporabili smo reagenčni komplet Dual-Luciferase Reporter Assay System proizvajalca Promega, ki omogoča hkratno izražanje in merjenje dveh reporterskih encimov (kresničkina (Luc) in renilina (Rluc) luciferaza) v enem vzorcu.

Predpriprava

Po navodilih proizvajalca smo pripravili reagente:

- pufer za pasivno lizo (Passive Lysis Buffer = PLB),
- luciferazni reagent (Luciferase Assay Reagent II = LARII) – aktivira Luc,
- Stop & Glo Reagent – deaktivira reakcijo z Luc in aktivira Rluc.

Sledila je liza transfeciranih celic. Odstrani smo medij in celice sprali z 1 mL PBS. Dodali smo 100 µL PLB na luknjico in ploščo stresali 15 minut.

Merjenje luminiscence

S pomočjo računalniškega programa Magellan smo na čitalcu mikrotitrskih plošč Tecan Safire II izmerili luminescenco. Nastavili smo program tako, da je aparat ploščo najprej

pretresel, nato pa v vsakem vzorcu meril luminescenco 10 sekund, s premorom 2 sekund med vsakim merjenjem. Na mikrotitrsko ploščo smo nanесли 100 μL LARII reagenta, dodali 20 μL celičnega lizata, ploščo vstavili v aparat in izmerili aktivnost Luc. Po končanem merjenju smo podatke shranili, vzeli ploščo ven, nanесли 100 μL Stop&GLO reagenta v vsako luknjico in enako ponovili merjenje še za Rluc. Dobljene podatke o aktivnosti Luc in Rluc smo normalizirali (aktivnost Luc/aktivnost Rluc).

1.1.16 Statistična obdelava podatkov

Statistično obdelavo podatkov smo naredili z računalniškim programom R. Z ustreznimi statističnimi testi smo testirali hipoteze (ničelno in alternativno) pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$. V primeru, da je bila p-vrednost večja od α , smo sprejeli ničelno hipotezo. V primeru, da je bila p-vrednost manjša od α , smo ničelno hipotezo zavrnili in sprejeli alternativno hipotezo. Najprej smo s Shapiro-Wilk testom preveril normalnost porazdelitve. Spremenljivke se niso porazdeljevale normalno, zato smo naredili neparametrični Kruskal-Wallis test, ki primerja tri ali več neodvisnih vzorcev in testira razlike med njimi. Da smo ugotovili, med katerima vzorcema obstaja značilna razlika, smo naredili Post-hoc test. Uporabili smo Wilcoxon neparametrični test vsote rangov s FDR korekcijo za večkratno testiranje [48].

2 REZULTATI

3.4 Priprava kontrolnega konstrukta DNA z vezavnim mestom za miRNA-21

Aktivnost vezavnega mesta za miRNA smo preverjali z luciferaznim testom s pomočjo plazmida pmirGLO. Ta plazmid vsebuje gen za luciferazo, ki ima na 3'UTR regiji poliklonsko mesto, v katerega lahko vstavimo zaporedje DNA, ki bo omogočilo vezavo poljubne miRNA. Tudi za tovrstna testiranja potrebujemo dobro pozitivno in negativno kontrolo. Za negativno kontrolo običajno uporabimo kar plazmid pmirGLO brez vezavnega mesta za miRNA. Pozitivne kontrole za testiranja miRNA pa še ni bilo. Zato smo se odločili, da pripravimo za pozitivno kontrolo konstrukt z vezavnim mestom za miR-21-5p.

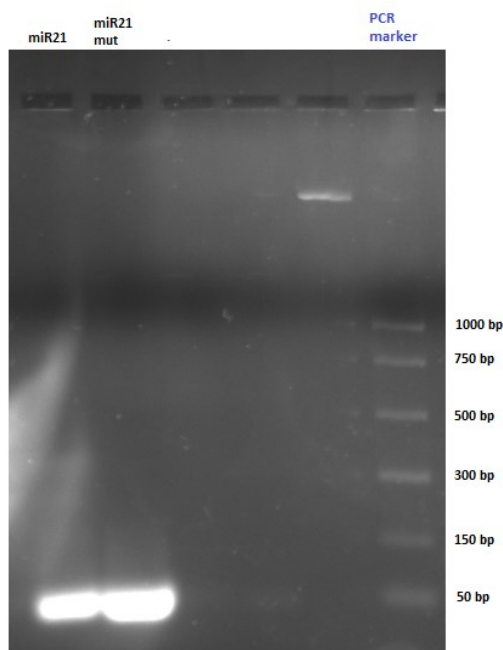
2.1.1 Načrtovanje in sinteza oligonukleotidov

Za pripravo konstrukta pozitivne kontrole smo kemijsko sintetizirali obe verigi DNA z vezavnim mestom za miR-21-5p, kot je določeno v navodilu proizvajalca plazmida pmirGLO. Sekvenco smo omejili z restrikcijskima mestoma za encima XhoI in XbaI, ki režeta DNA tako, da dobimo lepljive konce in se komplementarno prilegajo koncem razrezanega plazmida. V sekvenco smo vstavili še dodatno restrikcijsko mesto ApaI, ki služi preverjanju uspešnosti ligacije. Sekvence oligonukleotidov, ki smo jih naročili pri podjetju Sigma-Aldrich, so prikazane v Preglednica XIII (smerni in protismerni oligonukleotid se komplementarno ujemata). Pripravili smo dva kontrolna konstrukta: prvi vsebuje vezavno mesto za miR-21-5p, pri čemer smo po navodilih proizvajalca oligonukleotidov sintetizirali enoverižna fragmenta miR21_F in miR21_R v dvoverižni fragment miR21, drugi konstrukt pa vsebuje mutirano vezavno mesto za miR-21-5p, kjer smo enoverižna fragmenta miR21mut_F in miR21mut_R sintetizirali v dvoverižni fragment miR21_mut. Z nanosom na agarozni gel smo preverili kvaliteto DNA v dvoverižnih fragmentih. Rezultat elektroforeze prikazuje Slika 12, kjer vidimo, da smo za oba vzorca, miR21 in miR21mut, na gelu dobili močne lise pri dolžini ~ 40 bp.

Preglednica XIII: Sekvence oligonukleotidov.

ime	sekvenca	št. baz
miR21_F – istosmerni	5' TCGAGTA GGGCCC TAGTTCAACATCAG TCTGATAAGCTA T	40
miR21_R – protismerni	3' CAT CCCGGG ATCAAGTTGTAGTC AGACTATTTCGAT AGATC	40
miR21mut_F – istosmerni	5' TCGAGTA GGGCCC TAGTTCAACATCAG AA GATAAGCTA T	39
miR21mut_R – protismerni	3' CAT CCCGGG ATCAAGTTGTAGTC TTCTATTTCGAT AGATC	39

Legenda: restrikcijsko mesto za XhoI, restrikcijsko mesto za XbaI, restrikcijsko mesto za ApaI, ___ tarčna sekvenca za miR-21-5p, neujemanje med nemutiranim in mutiranim zaporedjem.

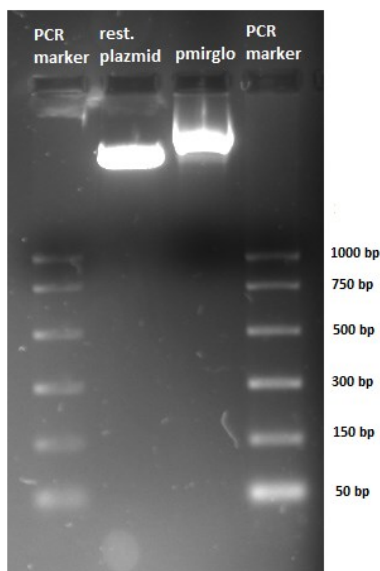


Slika 12: Rezultat elektroforeze na agaroznem gelu po sintezi komplementarnih oligonukleotidov. PCR marker (desno) označuje lestvico šestih DNA fragmentov z znanimi dolžinami (50, 150, 300, 500, 750, 1000 bp). Na podlagi standarda določimo velikost vzorcev – sintetiziranih komplementarnih parov oligonukleotidov (levo): oba vzorca, miR21 in miR21mut, sta dolga ~ 40 bp.

2.1.2 Restrikcija plazmida

Plazmid pmirGLO smo pred ligacijo linearizirali z uporabo restrikcijskih endonukleaz XhoI in XbaI. Tako smo dobili restrikcijska mesta, ki ustrezajo restrikcijskim mestom na DNA fragmentih z vezavnimi mesti za miRNA. Uspešnost restrikcije smo preverili z

elektroforezo na agaroznem gelu. Na gel smo nanesti vzorec razrezanega plazmida in vzorec nerazrezanega plazmida pmirGLO. Slednji nam je služil kot kontrola. Rezultat elektroforeze prikazuje Slika 13. Kljub isti molekularni masi in dolžini obeh plazmidov smo na gelu dobili lise pri različnih dolžinah, kar je posledica različnih oblik plazmida. Lineariziran plazmid je bolj hidrodinamske oblike kot krožni plazmid in lažje ter hitreje potuje skozi pore agaroznega gela.



Slika 13: Rezultat elektroforeze na agaroznem gelu po restrikciji plazmida. Lineariziran plazmid (rest. plazmid) je na gelu prepotoval večjo razdaljo kot krožni plazmid (pmirGLO), kar pomeni, da linearizirana oblika potuje hitreje kot krožna oblika.

2.1.3 Kontrola ligacije in transformacije

Z ligacijo smo v različnih molarnih razmerjih insert : plazmid (prikazanih v Preglednica XIV) pripravili dva rekombinantna konstrukta:

- miR-21: v razrezan pmirGLO smo vstavili insert miR21 in
- miR-21_mut: v razrezan pmirGLO smo vstavili insert miR21mut.

Konstrukt smo s postopkom transformacije vnesli v bakterijske celice, kjer se je plazmidna DNA neodvisno pomnoževala. Na selektivnem gojišču z dodanim ampicilinom so zrastle samo kolonije bakterijskih celic (Preglednica XIV), ki so vsebovale celične klone z enakimi rekombinantnimi konstrukti, kajti naš konstrukt je bil zasnovan tako, da omogoča rast bakterij, ki so rezistentne na ampicilin.

Preglednica XIV: Število kolonij na plošči.

konstrukt	molarno razmerje insert : plazmid	število kolonij
miR-21	9 : 1	3
	3 : 1	3
	1 : 1	3
	1 : 3	0
	1 : 9	0
miR-21mut_mut	9 : 1	1
	3 : 1	0
	1 : 1	0
	1 : 3	0
	1 : 9	0

3.4.1.1 Kontrola DNA v plazmidnem konstrukt v bakterijskih kolonijah s PCR

Z reakcijo PCR (ang. colony PCR) smo preverili prisotnost oziroma odsotnost insertne DNA v plazmidnem konstrukt. DNA iz vsake kolonije smo pomnožili s PCR. Z oligonukleotidnima začetnikoma Primer_TargetGeneTest_pmirGLO in miR21_R oziroma miR21mut_R smo omejili območje pomnoževanja na 120 bp za miR-21 oziroma 119 bp za miR-21_mut (Slika 14). Istosmerni začetni nukleotid se je lahko vezal na plazmidno DNA v vsakem primeru, medtem ko se je protismerni začetnik komplementarno vezal samo, če je bil v plazmidu vstavljen naš fragment DNA z vezavnim mestom. PCR produkte smo analizirali z elektroforezo na agaroznem gelu (Slika 15). Za vzorce 5-9 se lise nahajajo pri dolžini ~ 50 bp, kar ne ustreza dolžini našega območja pomnoževanja. Medtem ko se lise pri vzorcih 1, 2, 3, 4 in 10 nahajajo pri dolžini ~120 bp, kar kaže na to, da bi v plazmidnih konstruktih lahko bili prisotni naši inserti. Potrebno je bilo nadaljnje preverjanje vzorcev 1, 2, 3, 4 in 10 z restrikcijsko reakcijo in sekvenciranjem, za kar smo morali najprej plazmide izolirati iz bakterij z Miniprep-om.

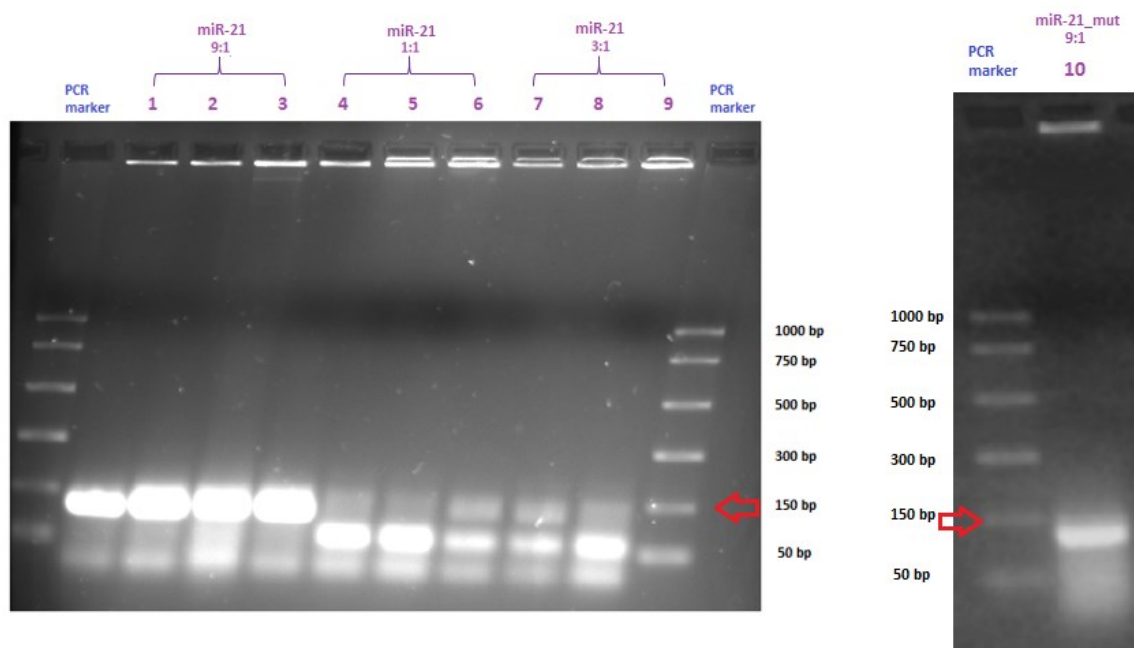
Nemutiran konstrukt miR-21

```
5'...GATTTCGCGAGATTCTCATTAAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGA  
TCGCCGTGTAATTCTAGTTGTTTAAACGAGCTCGCTAGCCTCGA  
GTAGGGCCCTAGTTCAACATCAGTCTGATAAGCTATCTAGAGTC  
GAC...3'
```

Mutiran konstrukt miR-21_mut

```
5'...GATTTCGCGAGATTCTCATTAAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGA  
TCGCCGTGTAATTCTAGTTGTTTAAACGAGCTCGCTAGCCTCGA  
GTAGGGCCCTAGTTCAACATCAGAAGATAAGCTATCTAGAGTCG  
AC...3'
```

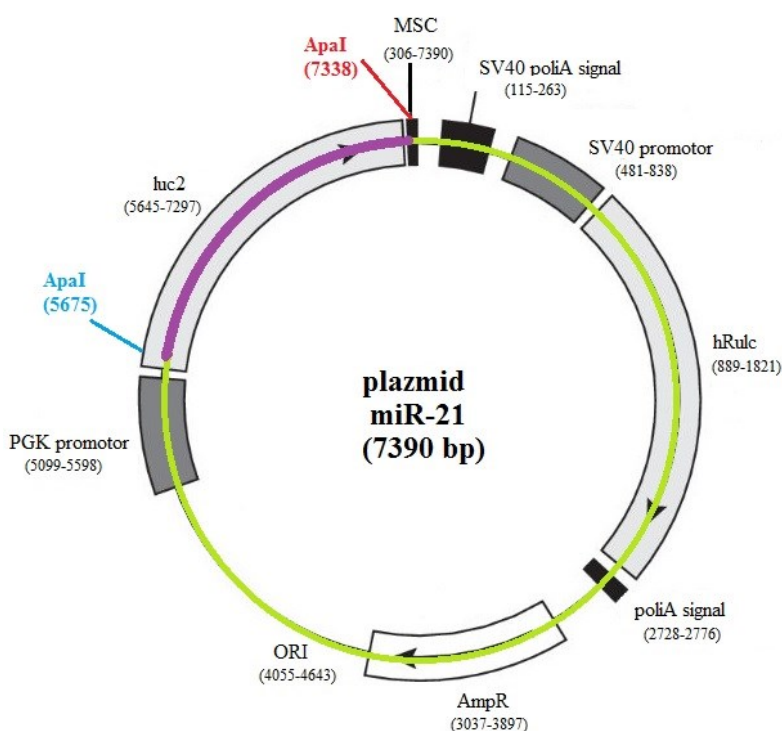
Slika 14: Pomnoževanje DNA s PCR. Siva barva označuje sekvenco oligonukleotidnega začetnika Primer_TargetGeneTest_pmirGLO, rumena barva označuje sekvenco vstavljenega inserta, z modro je označeno restrikcijsko mesto za XhoI in z zeleno restrikcijsko mesto za XbaI. Območje pomnoževanja DNA je podčrtano in je za nemutiran konstrukt miR-21 dolgo 120 bp, za mutiran konstrukt miR-21_mut pa 119 bp.



Slika 15: Rezultat elektroforeze na agaroznem gelu po PCR na osnovi kolonije. Vzorci 1-9 so za nemutiran konstrukt miR-21, vzorec 10 pa za mutiran konstrukt miR-21_mut. Pri vzorcih 1-3 in 10 smo kot DNA vzeli del kolonije, pri kateri je bilo razmerje insert : plazmid 9 : 1, pri vzorcih 4-6 je bilo razmerje 1 : 1 in pri vzorcih 7-9 je bilo razmerje 3 : 1. Glede na standard (PCR marker) je dolžina vzorcev 1-4 in 10 ~120 bp ter vzorcev 5-9 ~50 bp. Puščica označuje PCR marker pri dolžini 150 bp.

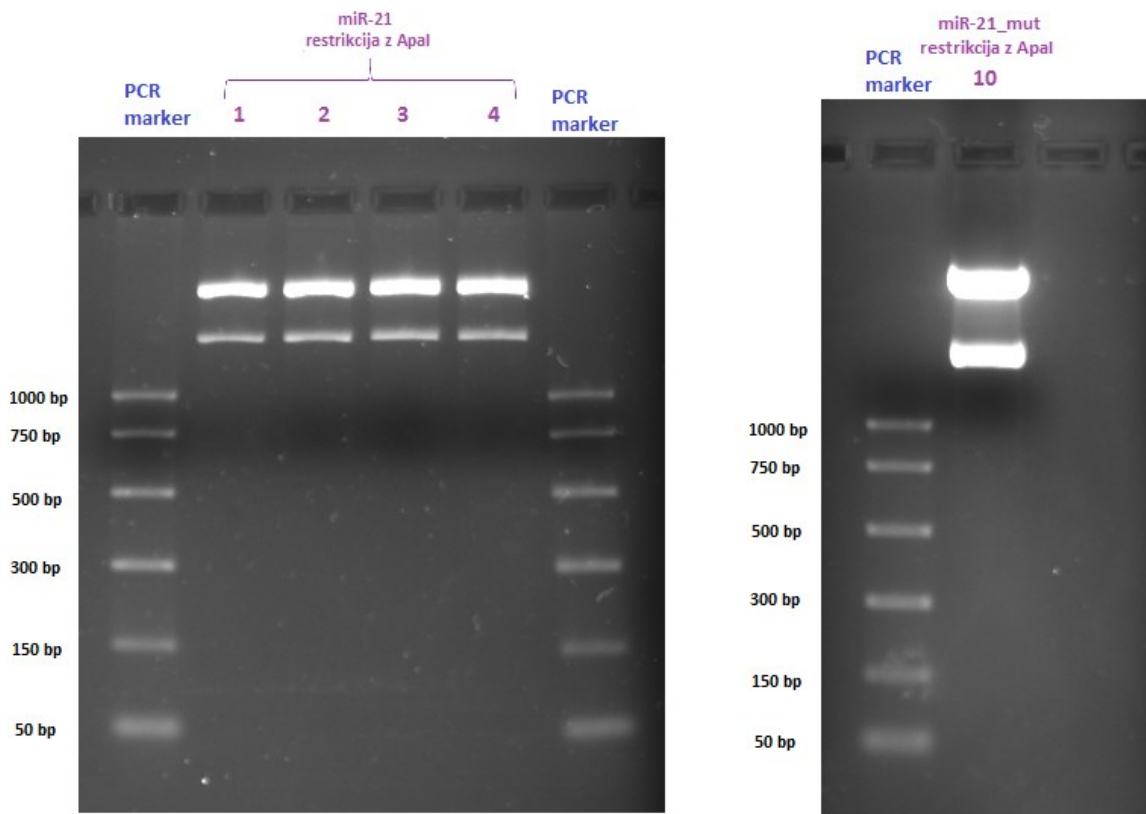
2.1.3.1 Restriksijska reakcija

Z restriksijsko reakcijo, kateri je sledila elektroforeza na agaroznem gelu, smo preverili ali izoliran plazmid vsebuje naš insert in če je le-ta vstavljen na pravo mesto. Izolirane plazmide iz bakterijskih kolonij (po Miniprep-u) (vzorci 1, 2, 3, 4 in 10 iz poglavja Kontrola DNA v plazmidnem konstrukt v bakterijskih kolonijah s PCR) smo cepili z encimom *ApaI*, ki ima eno restriksijsko mesto v plazmidu na mestu 5675, drugo restriksijsko mesto pa se nahaja v insertu na mestu 7338. Encim *ApaI* razreže plazmid z insertom na dva fragmenta dolga 1663 in 5727 bp (Slika 16). Plazmid brez inserta pa se linearizira in ga vidimo na gelu kot en fragment. Na gelu (Slika 17) smo pri vseh vzorcih dobili dve lisi, kar kaže na to, da je bila ligacija uspešna ter se je fragment uspešno vstavil



v plazmid.

Slika 16: Shema plazmidnega konstrukta miR-21 z restriksijskima mestoma za encim *ApaI*. Plazmid miR-21 je dolg 7390 bp. Z modro barvo je na mestu 5675 označeno endogeno restriksijsko mesto za encim *ApaI*, z rdečo barvo pa je na mestu 7338 označeno dodatno restriksijsko mesto za encim *ApaI*, ki smo ga vstavili v naš insert. Zelena barva označuje daljši fragment dolg 5727 bp, vijolična barva pa krajši fragment dolg 1663 bp, ki smo ju dobili po restrikciji plazmida z encimom *ApaI*.



Slika 17: Rezultat elektroforeze na agaroznem gelu po restrikciji konstrukta z encimom *Apal*. Vzorci 1-4 so za nemutiran konstrukt miR-21, vzorec 10 pa za mutiran konstrukt miR-21_mut. Oba konstrukta smo razrezali z restrikcijskim encimom *Apal*, ki razreže konstrukt na dva fragmenta dolga 1663 in 5727 bp. Pri vseh vzorcih (1 -4 in 10) smo na gelu dobili dve lisi, ki ustrezata tem dolžinam.

3.4.1.2 Sekvenciranje

Sekvenčna analiza je dokončno potrdila, da je naš insert uspešno vstavljen v plazmid, na želeno mesto med *XhoI* in *XbaI*. Na Slika 18 je predstavljen rezultat sekvenciranja. Prikazani sta zaporedji odsekov plazmida miR-21 in miR-21_mut, ki vsebujeta zaporedje nukleotidov inserta miR21 oziroma miR21mut.

miR-21

5'...TTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGATAGCTTATCAGACTGATGTTGAACTAG
GGCCCTACTCGAGGCTAGCGAGCTCGTTTAAAC...3'

miR-21_mut

5'...TTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGATAGCTTATCTTCTGATGTTGAACTAGG
GCCCTACTCGAGGCTAGCGAGCTCGTTTAAAC...3'

Slika 18: Odsek zaporedja konstrukta miR-21 in miR-21_mut. Zaporedje inserta, ki smo ga vstavili v plazmidni vektor, je podčrtano z ravno črto, sekvenca plazmida pa je podčrtana z vijugasto črto. Modra barva označuje zaporedje, kjer reže encim XhoI, zelena pa zaporedje, kjer reže encim XbaI.

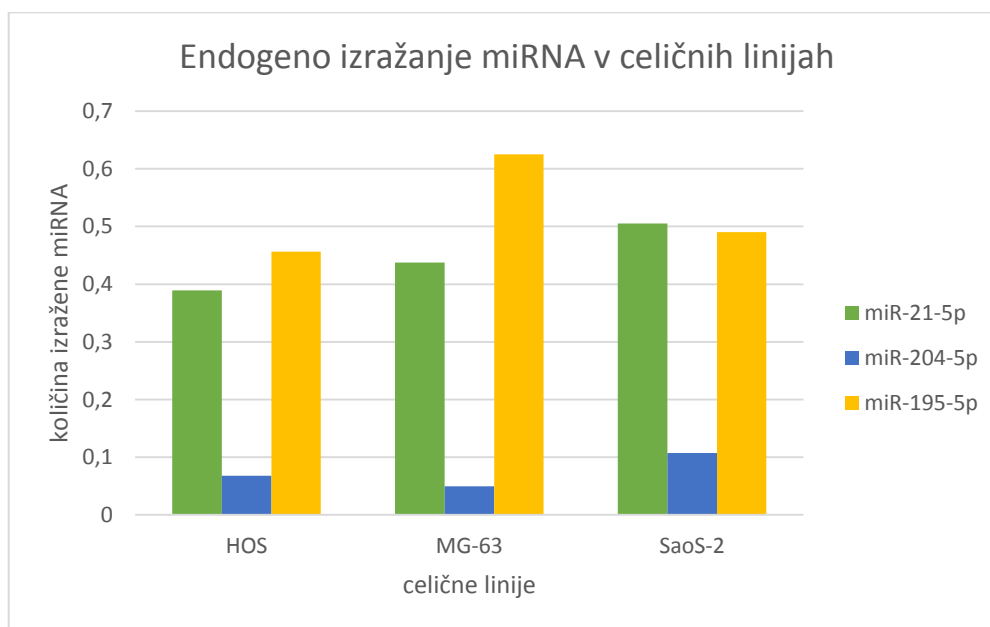
3.5 Merjenje vezave miRNA na konstrukte DNA v celičnih linijah

Pripravljene kontrolne plazmide smo uporabili za testiranje vezave miRNA na vezavna mesta v plazmidu v sesalskih celicah. Vezava miRNA na 3'UTR regijo gena za luciferazo prepreči sintezo luciferaze ter v luciferaznem testu zniža odziv. Preverjali smo vezavni mesti za miR-204-5p, ki smo jo povzeli iz 3'UTR gena za ALPL in miR-195-5p, ki smo jo povzeli iz gena za cMYB. Za vsako vezavno mesto smo imeli na razpolago tudi konstrukt z mutiranim vezanim mestom. Ti konstrukti so bili že predhodno pripravljene. Sekvenci vezavnih mest za miRNA sta predstavljeni v Preglednica XV. Konstrukte smo vstavili v tri celične linije (HOS, MG-63 in Saos-2) in naredili dvojni luciferazni test. Poleg konstruktov smo v eksperimentu (transfekcija in luciferazni test) uporabili še plazmid pmirGLO brez inserta za negativno kontrolo in celice brez vektorja. Vsak eksperiment smo za vsako celično linijo izvedli trikrat v duplikatih.

Preglednica XV: Vezavni mesti za miRNA v konstruktih.

konstrukt	miRNA	sekvenca
ALPL	miR-204-5p	5' AAAGGGAA 3'
cMYB	miR-195-5p	5' TGCTGCTA 3'

Podatke o endogenem izražanju preiskovanih miRNA v osteosarkomskih celičnih linijah smo pridobili iz GEO (Gene Expression Omnibus) baze podatkov (GSE70415 [49]) in so grafično prikazani na Slika 19. V vseh treh celičnih linijah se zelo dobro izražata miR-195-5p in miR-21-5p, slabše pa se izraža miR-204-5p.



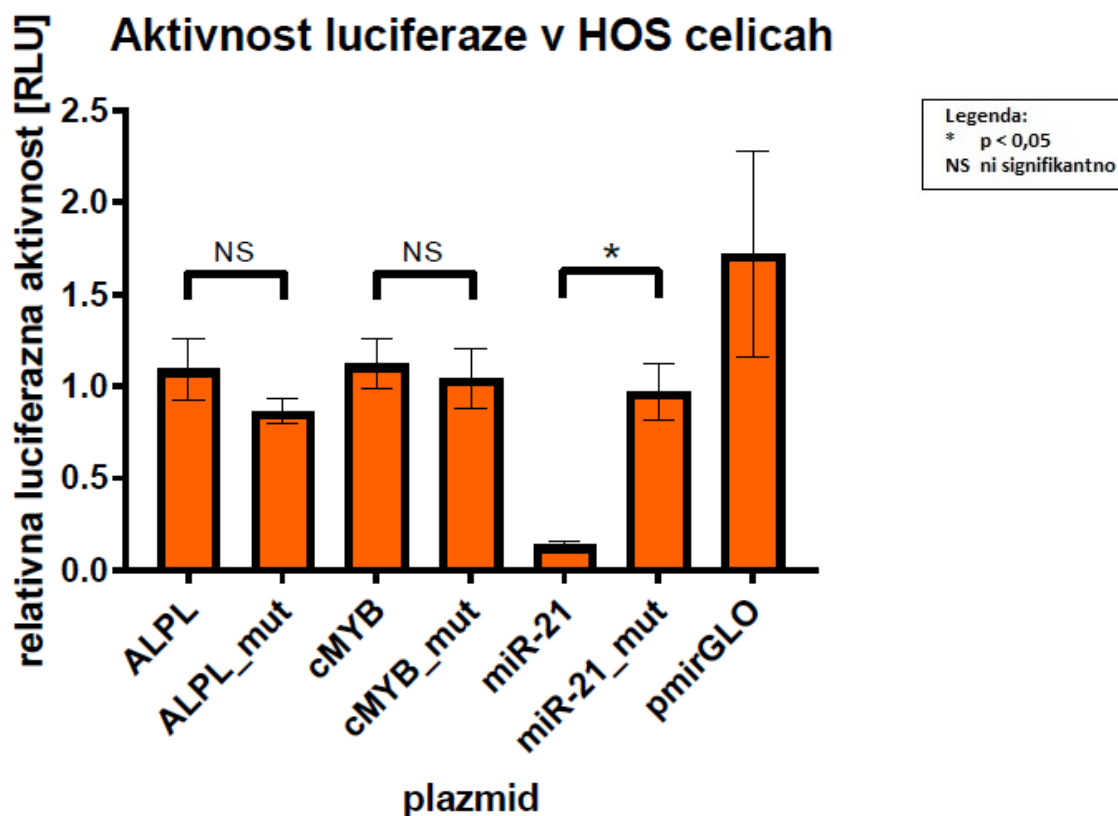
Slika 19: Grafični prikaz endogenega izražanja preiskovanih miRNA v osteosarkomskih celičnih linijah. Na x-osi so predstavljene posamezne celične linije (HOS, MG-63 in Saos-2), y-os pa predstavlja količino izražene miRNA, pri čemer 0 pomeni, da se miRNA ne izraža, 1 pa pomeni, da se miRNA izraža 100%.

2.1.4 Merjenje luminescence

Izmerjene vrednosti aktivnosti Luc in Rluc v posameznih plazmidih (ALPL, ALPL_mut, cMYB, cMYB_mut, miR-21, miR-21_mut, pmirGLO) in netretiranih celicah smo normalizirali in dobili relativno luciferazno aktivnost (RLA). RLA vrednosti netretiranih celic so bile pri vseh treh celičnih linijah zelo nizke, zato lahko ugotovimo, da plazmid z luciferazo deluje pravilno. Iz normaliziranih vrednosti posameznih plazmidov smo izračunali povprečje, SD in standardno napako (SE) (Preglednica XVI, Preglednica XVII, Preglednica XVIII) ter izrisali grafe (Slika 20, Slika 21, Slika 22).

Preglednica XVI: Relativna luciferazna aktivnost v HOS celicah.

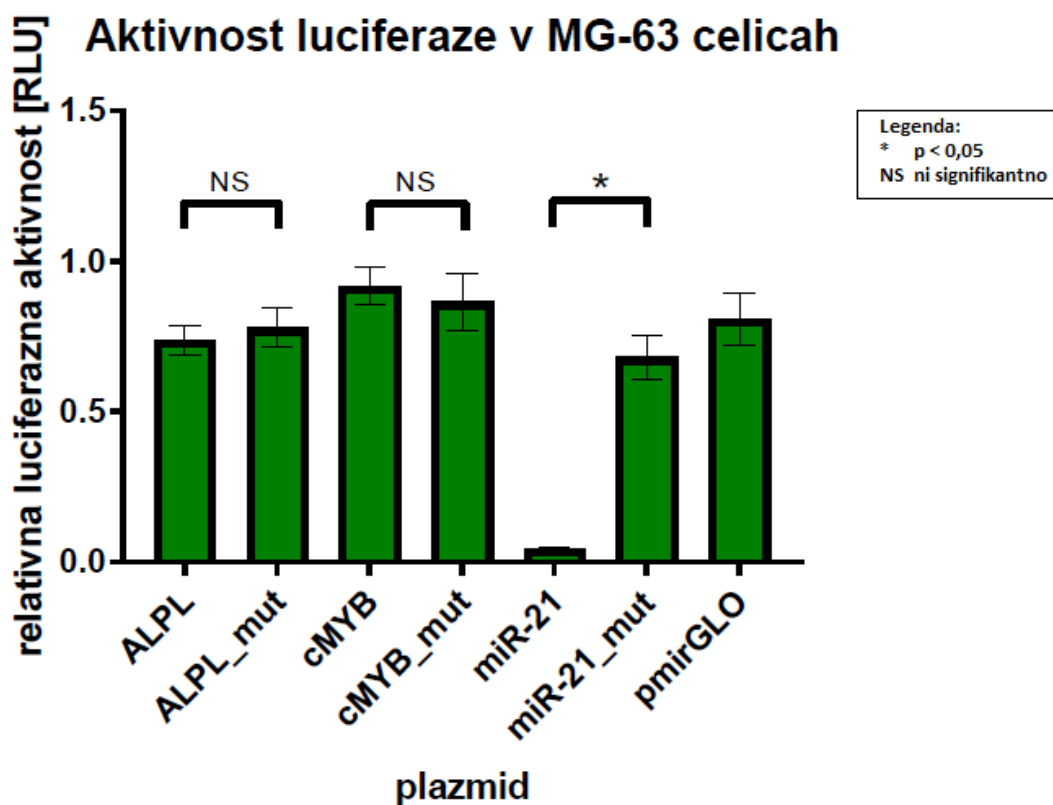
	vzorec	ALPL	ALPL_mut	cMYB	cMYB_mut	miR-21	miR-21_mut	pmirGLO
Luc/Rluc	1-r1	1,05523	0,85022	1,13504	0,90177	0,15531	0,99508	1,80492
	1-r2	0,9386	0,75389	1,05388	0,72039	0,1247	0,87833	1,60837
	2-r1	0,68765	0,75752	0,7552	0,74717	0,07997	0,59636	4,35714
	2-r2	0,71583	0,68726	0,77773	0,79987	0,08594	0,57095	0,61576
	3-r1	1,53836	1,04004	1,41572	1,62199	0,18589	1,39858	0,96341
	3-r2	1,61584	1,10855	1,5809	1,44837	0,18434	1,38998	0,9639
povprečje		1,09192	0,86625	1,11975	1,03993	0,13603	0,97155	1,71892
SD		0,40088	0,17068	0,33308	0,39246	0,04684	0,36549	1,36658
SE		0,16366	0,06968	0,13598	0,16022	0,01912	0,14921	0,5579



Slika 20: Grafični prikaz relativne luciferazne aktivnosti v HOS celicah. Na x-osi so predstavljeni posamezni plazmidi, ki smo jih vstavili v celice, y-os pa predstavlja povprečja RLA izražena v relativnih luciferaznih enotah (RLU).

Preglednica XVII: Relativna luciferazna aktivnost v MG-63 celicah.

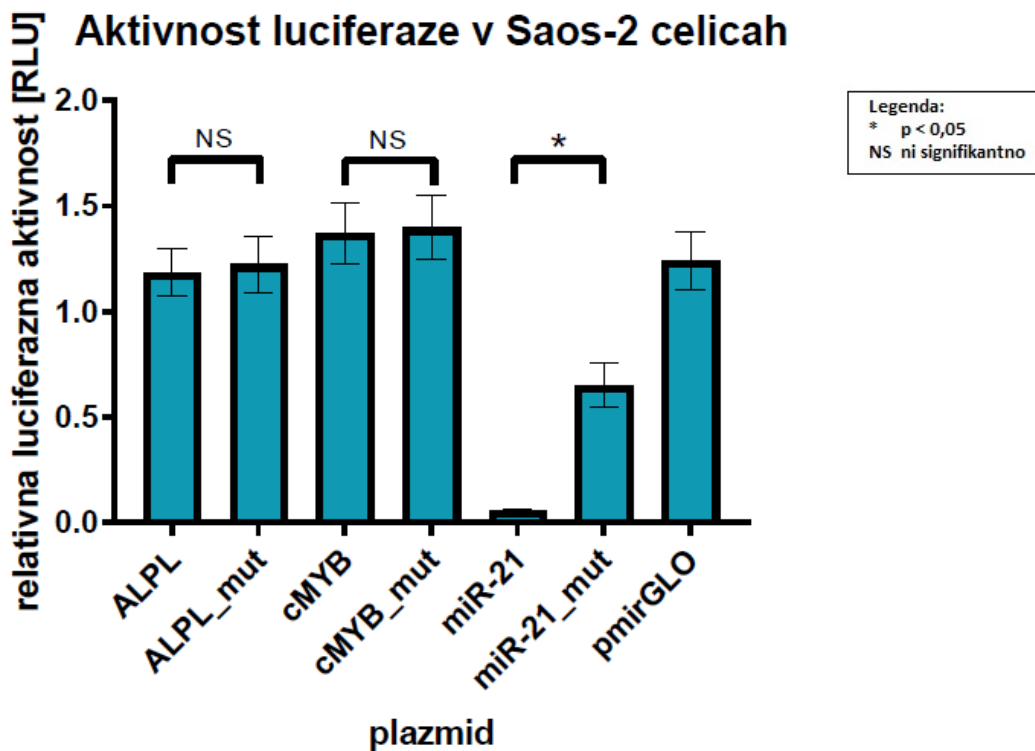
	vzorec	ALPL	ALPL_mut	cMYB	cMYB_mut	miR-21	miR-21_mut	pmirGLO
Luc/Rluc	1-r1	0,832247	0,923653	0,998086	1,188601	0,06687	0,811708	0,779412
	1-r2	0,873609	0,963912	1,140599	1,126768	0,062727	0,896205	0,804774
	2-r1	0,664242	0,762689	0,818251	0,757069	0,02791	0,722251	1,120061
	2-r2	0,752646	0,753755	0,934908	0,773276	0,039138	0,610791	0,818769
	3-r1	0,538395	0,517532	0,711442	0,640381	0,03319	0,397654	0,865195
	3-r2	0,768183	0,745705	0,901801	0,697093	0,03258	0,644592	0,452391
povprečje		0,73822	0,777875	0,917515	0,863865	0,043736	0,680534	0,806767
SD		0,121392	0,158422	0,147734	0,233213	0,016752	0,174148	0,213563
SE		0,049558	0,064675	0,060312	0,095209	0,006839	0,071096	0,087187



Slika 21: Grafični prikaz relativne luciferazne aktivnosti v MG-63 celicah. Na x-osi so predstavljeni posamezni plazmidi, ki smo jih vstavili v celice, y-os pa predstavlja povprečja RLA izražena v relativnih luciferaznih enotah (RLU).

Preglednica XVIII: Relativna luciferazna aktivnost v Saos-2 celicah.

	vzorec	ALPL	ALPL_mut	cMYB	cMYB_mut	miR-21	miR-21_mut	pmirGLO
Luc/RLuc	1-r1	1,33651	1,50253	1,592549	1,409814	0,049126	0,679112	1,266745
	1-r2	1,304953	1,299392	1,351857	1,367758	0,048874	0,786337	1,310044
	2-r1	0,800788	0,790216	0,942878	0,935597	0,034687	0,276497	0,825024
	2-r2	0,859782	0,844271	0,95475	1,038104	0,034743	0,40173	0,876299
	3-r1	1,393384	1,400979	1,681683	1,781584	0,082669	0,885607	1,549206
	3-r2	1,41972	1,502198	1,70646	1,840573	0,085635	0,877518	1,626317
povprečje		1,185856	1,223264	1,371696	1,395572	0,055956	0,651134	1,242273
SD		0,279013	0,323833	0,35073	0,370774	0,022775	0,256065	0,333144
SE		0,113907	0,132204	0,143185	0,151368	0,009298	0,104538	0,136005



Slika 22: Grafični prikaz relativne luciferazne aktivnosti v Saos-2 celicah. Na x-osi so predstavljeni posamezni plazmidi, ki smo jih vstavili v celice, y-os pa so predstavljajo povprečja RLA izražena v relativnih luciferaznih enotah (RLU).

2.1.5 Statistična analiza podatkov

Nadaljnja statistična analiza je potekala na osnovi podatkov o RLA. S Shapiro-Wilk testom normalnosti smo ugotovili, da se podatki ne porazdeljujejo normalno. Zato smo v nadaljevanju uporabili neparametrični Kruskal-Wallis test, s katerim smo ugotavljali razlike med plazmidi v celični liniji in med celičnimi linijami. Na koncu smo z Wilcoxon

testom vsote rangov preverili, ali se nemutirana in mutirana oblika plazmida statistično razlikujeta. Dobljene p-vrednosti so predstavljene v Preglednica XIX.

Preglednica XIX: Izračunane p-vrednosti.

celična linija	primerjana plazmida	p-vrednost
HOS	ALPL, ALPL_mut	0,602785
HOS	cMYB, cMYB_mut	0,794078
HOS	miR-21, miR-21_mut	0,009793
MG-63	ALPL, ALPL_mut	0,875264
MG-63	cMYB, cMYB_mut	0,602785
MG-63	miR-21, miR-21_mut	0,009793
Saos-2	ALPL, ALPL_mut	0,875264
Saos-2	cMYB, cMYB_mut	0,875264
Saos-2	miR-21, miR-21_mut	0,009793

Plazmidna konstrukta miR-21 in miR-21_mut smo uporabili kot pozitivno kontrolo. V vseh treh celičnih linijah je bila p-vrednost manjša od α , kar pomeni, da se aktivnosti med seboj dovolj statistično razlikujeta (Slika 20, Slika 21, Slika 22). Aktivnost miR-21-5p je zmanjšala izražanje luciferaze, kar pomeni, da se miR-21-5p verjetno veže z vstavljenim vezavnim mestom ter na ta način inhibira izražanje luciferaze. Tako smo tudi potrdili ustreznost merilnega sistema.

Pri plazmidih ALPL in ALPL_mut smo v vseh treh celičnih linijah dobili p-vrednost večjo od α , kar pomeni, da se plazmida statistično ne razlikujeta dovolj. Aktivnost miR-204-5p ni dovolj zmanjšala izražanja luciferaze (Slika 20, Slika 21, Slika 22). Kar po vsej verjetnosti pomeni, da vezavno mesto za mirR-204-5p v genu ALPL ni pravo. Tudi pri konstruktih cMYB in cMYB_mut smo v vseh treh celičnih linijah dobili p-vrednost večjo od α , kar pomeni, da se plazmida statistično ne razlikujeta dovolj (Slika 20, Slika 21, Slika 22). Torej tudi vezavno mesto za miR-195-5p v genu cMYB verjetno ni pravo.

4 RAZPRAVA

4.1 Vloga konstrukta miR-21 kot interne kontrole

Na potek in rezultate znanstvenega eksperimenta lahko vplivajo številni dejavniki, katerih vpliv skušamo minimalizirati z uporabo kontrol. Kontrolni vzorci se v analiznem postopku obravnavajo enako kot testni vzorci. Poznamo več vrst kontrol, s katerimi lahko kontroliramo eksperiment, najpogostejši in najenostavnejši za uporabo pa sta pozitivna in negativna kontrola. Pri analizi pozitivne kontrole vnaprej pričakujemo odziv in nam v nekaterih primerih celo omogoča primerjavo tega odziva z neznanim odzivom v istem eksperimentalnem sestavu oziroma semikvantifikacijo naših meritev. Obratno pa se za negativno kontrolo pričakuje, da ne da odziva pri enakih pogojih. V primerih, ko pri kontrolnih vzorcih ne dobimo pričakovanega rezultata, vemo, da je šlo pri eksperimentu nekaj narobe in je potrebno le tega ponoviti [50]. Za potrebe naše magistrske naloge smo sami pripravili konstrukt pmirGLO, ki je vseboval vezavno mesto za miR-21-5p in nam je v nadaljnjih raziskavah služil kot interna kontrola pri ocenjevanju vezave drugih miRNA. V našem primeru je šlo za pozitivno kontrolo, ki je bila namenjena interni uporabi in s katero smo želeli zagotoviti pravilno delovanje DLR analitskega sistema ter zanesljivost naših rezultatov. V literaturi smo našli podatke, da se miR-21 konstruktivno izraža v skoraj vseh tkivih [40] in da ob vezavi na ustrezno vezavno mesto v plazmidnem konstrukt pmirGLO zatre izražanje luciferaze [51], kar je v skladu s samim mehanizmom delovanja tega plazmida.

Pripravili smo dva konstrukta, enega z nemutiranim in enega z mutiranim zaporedjem za vezavno mesto za miR-21-5p, ju vnesli v osteosarkomske celične linije HOS, MG-63 in Saos-2 ter izmerili aktivnost luciferaze. Iz literature vemo, da je nivo miR-21 v osteosarkomskih celicah dokazano povišan in njeno prekomerno izražanje korelira s povečano celično invazijo ter migracijo tumorskih celic [52]. Pri nemutiranem konstrukt se je po pričakovanih povečalo izražanje miR-21-5p in povzročilo znižanje aktivnosti luciferaze v vseh treh celičnih linijah, v primerjavi z mutiranim konstruktom, kjer se luciferazna aktivnost ni znižala. Razlika med obema plazmidoma je bila statistično gledano dovolj velika (glej p vrednosti v Preglednica XIX), da lahko rečemo, da se miR-21-5p v testiranih celicah verjetno veže na izbrano vezavno mesto v plazmidnem konstrukt. S tem smo tudi potrdili ustreznost našega testnega sistema (Slika 20, Slika 21, Slika 22).

4.2 Priprava konstrukta miR-21 s postopkom molekulskega kloniranja

Kontrolna konstrukta miR-21 in miR-21_mut smo pripravili s postopkom molekulskega kloniranja. Molekulsko kloniranje je skupek metod, s katerimi vstavimo rekombinantno DNA v gostiteljski organizem, kjer se ta pomnožuje in tako dobimo veliko število kopij določenega odseka. Sam proces kloniranja je dolgotrajen in je razdeljen v več stopenj:

1. Izbira vektorja

Kot klonirni vektorji se uporabljajo majhne krožne dvoverižne molekule DNA, imenovane plazmidi, ki so sposobni samostojnega podvajanja v gostiteljskih celicah [53]. Za pripravo konstrukta miR-21 in miR-21_mut smo izbrali plazmidni vektor pmirGLO, ki temelji na Promegini tehnologiji izražanja in merjenja dveh reporterskih encimov - kresničkine in reniline luciferaze ter omogoča enostavno vrednotenje aktivnosti miRNA preko vstavitve tarčnih vezavnih mest na 3' konec luiferaznega gena, ki je sestavni del plazmida.

2. Restrikcija plazmida in njegovo čiščenje

V naslednjem koraku plazmid lineariziramo z uporabo dveh restriksijskih endonukleaz, ki razrežeta plazmid tako, da dobimo lepljive konce, in omogočata, da se fragmenta, ki ju želimo združiti, povežeta med seboj v samo eni orientaciji [54]. Na osnovi plazmide karte smo izbrali encima XbaI in XhoI, s katerima smo cepili naš plazmid pmirGLO. Uspešnost restrikcije preverimo z elektroforezo na agaroznem gelu, kjer mora linearizirana oblika plazmida zaradi večje hidrodinamske oblike prepotovati daljšo razdaljo kot krožna oblika (Slika 13). Lineariziran plazmid nato izoliramo iz gela in očistimo.

3. Priprava fragmentne DNA in vstavev fragmenta v vektor

Fragment DNA, ki ga želimo vstaviti v vektor, pripravimo z enakimi restriksijskimi encimi, kot smo predhodno razrezali plazmid. Za konstrukta miR-21 in miR-21_mut smo umetno pripravili 40 baz dolge enoverižne komplementarne fragmente, ki smo jih sintetizirali v dvoverižne fragmente z lepljivimi konci (Preglednica XIII) in le te povezali s plazmidom. Komplementarni lepljivi konci omogočajo večjo učinkovitost povezave fragmenta in plazmida kot topi konci [55], vendar pri tej povezavi nastane le nekaj baz dolga regija, ki ni stabilna. Stabilnost povezave pa povečamo z uporabo DNA-ligaze [53]. Proces ligacije je izredno neučinkovit, kajti od milijona vektorjev in insertov se jih samo 1-100 uspešno poveže med seboj in v nadaljevanju po

transformaciji iz njih zrastejo kolonije [55]. Zato skušamo pripraviti čim bolj optimalno ligacijsko zmes v različnih molarnih razmerjih inserta in plazmida. Volumen posamezne komponente je odvisen od velikosti obeh komponent in njunih koncentracij [54]. Protokoli za ligacijo priporočajo, da se pri standardnih kloniranjih, kjer je insert manjši od plazmida, uporabljajo razmerja insert : plazmid med 1 : 1 in 10 : 1, najbolj optimalno razmerje pa naj bi bilo 3 : 1 [54]. Da bi povečali učinkovitosti samega procesa naše ligacije, smo mi to razmerje povečali na 9 : 1, pripravili pa smo tudi ligacijske zmesi v nižjih razmerjih (3 : 1, 1 : 1, 1 : 3, 1 : 9).

4. Vnos rekombinantne DNA v gostiteljsko celico

Ligaciji sledi vnos rekombinantne DNA v gostiteljsko celico, kjer se le ta pomnožuje. Naša metoda izbora je bila transformacija s toplotnim šokom, ki pa je tako kot ostale metode vnosa precej neučinkovita. Kljub optimalizaciji transformacije z uporabo ustreznih kompetentnih celic, pripravljenih s kalcijevim kloridom in strogo določenimi eksperimentalnimi pogoji, se v gostiteljsko celico vključi samo vsaka desetisoča molekula DNA. Vendar na koncu vseeno dobimo dovolj rekombinantne DNA za nadaljnje poskuse [53, 55], saj iz kolonije lahko s postopkom Midiprep-a izoliramo večjo količino plazmidne DNA. V našem eksperimentalnem sestavu smo dobili uspešne ligacije pri molarnih razmerjih 9 : 1, 3 : 1 in 1 : 1 za konstrukt miR-21 ter 9 : 1 za konstrukt miR-21mut.

5. Identifikacija klonov

Prvi korak pri identifikaciji je vizualni pregled plošč. Zaradi nizke uspešnosti prenosa in podvojevanja rekombinantne DNA je potrebna umetna selekcija celic, ki so se uspešno podvojile, kar omogočajo selekcijski označevalci v plazmidu [53] in ustrezna selekcijska gojišča. V našem primeru je bil selekcijski označevalec gen za rezistenco na ampicilin, bakterijske celice pa smo nanесли na gojišče z dodanim ampicilinom. Na gojišču so zrasle samo tiste celice, ki so se uspešno transformirale, torej so vsebovale gen za rezistenco na ampicilin.

V nadaljevanju je potrebno preveriti ali zrasle kolonije vsebujejo insertno DNA in če je ta vstavljena na pravo mesto v plazmidnem konstrukt. To storimo v treh stopnjah: 1) s PCR na osnovi kolonije, 2) z restrikcijsko reakcijo in 3) s sekvenciranjem.

Najprej smo s PCR na osnovi kolonije namnožili DNA iz celic ter z elektroforezo preverili dolžino namnoženih PCR produktov. Glede na uporabljena oligonukleotidna začetnika, bi morali biti odseki dolgi ~120 bp, kar obsega regijo okrog poliklonskega mesta ter naš pričakovani DNA fragment z vezavnim mestom. Iz Slika 15 je razvidno, da vzorci 5-9 ne ustrezajo tej dolžini, zato jih nismo uporabili v nadaljnji analizi. Pri teh vzorcih ni prišlo do pravilne ligacije, zato ne dobimo ustreznega produkta PCR. Vidimo pa, da vzorci 1, 2, 3, 4 in 10 ustrezajo dolžini ~120 bp in bi torej lahko vsebovali naš vstavljen fragment, zato smo izolirali in očistili plazmidne konstrukte iz teh kolonij (vzorec 1, 2, 3, 4 in 10) ter z restrikcijsko reakcijo preverili, če je insert vstavljen na pravo mesto. Naša konstrukta sta vsebovala dve restrikcijski mesti za encim ApaI, eno mesto je v samem plazmidu, drugega pa smo uvedli v insert (Slika 16). Po cepitvi z encimom ApaI in elektroforezi smo po pričakovanjih na gelu dobili dve lisi, pri dolžini 1663 in 5727 bp (Slika 17). S tem smo potrdili uspešnost ligacije in vstavitve inserta v plazmid, toda za dokončno potrditev je treba narediti še sekvenčno analizo. Z njo smo potrdili, da je naš insert resnično pravilno vstavljen v plazmid, na želeno mesto med XhoI in XbaI (Slika 18). Za nadaljnje eksperimente je potrebna večja količina konstruktne plazmida, ki jo pripravimo z izolacijo plazmidne DNA iz kulture večjega volumna.

4.3 Uporabnost konstrukta miR-21

Konstrukta miR-21 in miR-21_mut smo uporabili kot kontrolna konstrukta pri preverjanju predvidenih vezavnih mest za miR-204-5p in miR-195-5p in njihov potencialni vplivov na izražanje genov ALPL in cMYB, ki sta povezana z nastankom osteoporoze. V predhodnih študijah na Katedri za klinično biokemijo so v 3'UTR regiji gena ALPL določili vezavno mesto za miR-204-5p in v 3'UTR regiji gena cMYB vezavno mesto za miR-195-5p.

Iz literature lahko ugotovimo, da miRNA regulirajo različne tarče in posamezne 3'UTR vsebujejo vezavna mesta za številne miRNA, zato so interakcije med miRNA in njihovimi tarčami na mRNA zapletene. Računalniško lahko predvidemo domnevna območja na mRNA, ki jih prepoznajo specifične miRNA, vendar pa je ta mesta potrebno eksperimentalno preveriti [56]. Tako smo mi z dvojnimi luciferaznim testom (Dual – Luciferase Reporter Assay System, Promega) preverili domnevni vezavni mesti za miR-204-5p in miR-195-5p. Kljub temu, da ta metoda ni visoko zmogljiva, je ena najpogosteje uporabljenih metod za identifikacijo miRNA-mRNA interakcij, saj je njena izvedba hitra

in relativno preprosta [56]. Metoda temelji na merjenju aktivnosti luciferaznega reporterja sklopljenega s 3'UTR regijo predvidene mRNA tarče. Vezava miRNA na to vezavno mesto tako prepreči izražanje luciferaze.

Že pripravljene rekombinantne konstrukte (ALPL, ALPL_mut, cMYB in cMYB_mut) in kontrolna konstrukta (miR-21, miR_21_mut) smo izrazili v osteosarkomskih celičnih linijah HOS, Saos-2 in MG-63. V literaturi smo zasledili, da je nivo izražanja miR-195 v osteosarkomskih celicah povečan in prekomerno izražanje miR-195 zavira invazijo in migracijo tumorskih celic [57]. Izražanje miR-204 pa je v osteosarkomskih celicah znižano, ravno tako pa miR-204 deluje zaviralno na proliferacijo, migracijo in invazijo teh celic [58]. Za celične linije HOS, Saos-2 in MG-63 smo iz GEO baze podatkov pridobili podatke o njihovem endogenem izražanju miR-21-5p, miR-204-5p in miR-195-5p (Slika 19). Najbolje se v vseh treh celičnih linijah izraža miR-195-5p, malo slabše, vendar še vedno zelo dobro se izraža miR-21-5p, najslabše pa se izraža miR-204-5p, kar je tudi v skladu s podatki iz literature. Glede na visoko izražanje miR-195-5p v celicah bi pričakovali, da bo pri vezavi le te na predvideno vezavno mesto v nemutiranem konstrukt prišlo do destabilizacije luciferaznega gena. Toda izmerjena RLA pri nemutiranem konstrukt je bila zelo podobna tisti pri mutiranem konstrukt, kjer ni prišlo do vezave miRNA (Slika 20, Slika 21, Slika 22). Statistično gledano se aktivnosti luciferaze pri obeh konstruktih med seboj niso razlikovale dovolj, da bi lahko potrdili vezavo miR-195-5p na gen cMYB. Tudi med konstruktoma z mutiranim in nemutiranim vezavnim mestom za miR-204-5p ni bilo statistično dovolj velike razlike v izražanju luciferazne aktivnosti, da bi lahko potrdili vezavo miR-204-5p na gen ALPL. Kar bi lahko bila posledica nizkega endogenega izražanja miR-204-5p, ki lahko povzroči, da ne pride do ustrezne inhibicije luciferazne aktivnosti.

Vsaka miRNA na 5' koncu vsebuje regijo dolgo nekaj nukleotidov (ang. seed sequence), ki je bistvenega pomena za vezavo miRNA na mRNA. V tej regiji se morata miRNA in mRNA popolnoma komplementarno prilegati, da pride do želenih interakcij med njima. Vendar dokazi kažejo na to, da tudi popolno ujemanje v tej regiji ni zanesljiv napovedovalec teh interakcij, kar lahko pojasni nefunkcionalnost nekaterih predvidenih tarč [57]. S tem bi lahko pojasnili tudi naše negativne rezultate. Rezultati pa so lahko lažni tudi zaradi same transfekcije, kjer se v supra fizioloških koncentracijah ustvarijo razmere,

v katerih pride do nefizioloških interakcij med miRNA in mRNA [57]. Toda glede na rezultate kontrolnega konstrukta, je verjetnost tega artefakta v našem primeru majhna.

Naša vezavna mesta za miRNA, predvsem za miR-204-5p, bi lahko dodatno preverili z uporabo mimetikov in antagonistov miRNA. miR-204-5p se endogeno slabo izraža v celicah, z uporabo mimetikov miRNA pa lahko funkcijo endogene miRNA povečamo. Mimetiki miRNA so kemijsko sintetizirane dvoverižne molekule RNA, ki po vstavitvi v celico s transfekcijo posnemajo endogeno miRNA in se lahko specifično vežejo na njen tarčni gen ter povzročijo posttranslacijsko inhibicijo gena. Ravno obratno pa delujejo antagonisti miRNA, ki so kratke enoverižne oligonukleotidne molekule in se delno ali popolnoma komplementarno vežejo na tarčno endogeno miRNA, preden ta doseže svojo ciljno miRNA. Endogena miRNA razpade in izražanje tarčnih genov je normalno oziroma povišano. [58]

Za eksperimentalno potrditev miRNA tarč se uporabljajo še druge metode, ki so bolj zanesljive od naše metode, vendar je njihova izvedba zahtevnejša in dražja, npr. analiza z mikromrežami, analiza proteoma in imunoprecipitacija [56].

5 SKLEP

V okviru naloge smo z metodo molekulskega kloniranja uspešno izdelali kontrolna konstrukta z vezavnim mestom za miR-21-5p v plazmidu pmirGLO (miR-21 in miR-21_mut).

Kontrolna konstrukta miR-21 in miR-21_mut smo uporabili za preverjanje delovanja DLR merilnega sistema v celičnih linijah HOS, Saos-2 in MG-63 ter ugotovili, da se izražanje luciferaze sklopljene z vezavnim mestom za miR-21-5p statistično razlikuje od izražanja luciferaze sklopljene z mutiranim vezanim mestom za miR-21-5p ter s tem potrdili ustreznost kontrolnega konstrukta in merilnega sistema DLR.

Nadalje smo z DLR sistemom ob uporabi kontrolnega konstrukta miR-21 preverjali vezavo miR-204-5p in miR-195-5p na 3'UTR dele genov ALPL in cMYB v celičnih linijah HOS, Saos-2 in MG-63. Naši rezultati so pri vseh treh celičnih linijah pokazali, da se miR-204-5p ne veže na gen ALPL, prav tako kot se tudi miR-195-5p ne veže na gen cMYB. Ob tem so bile meritve kontrolnih konstruktov zmeraj ustrezne.

S tem smo ovrgli hipotezo o potencialnem delovanju miR-204-5p in miR-195-5p na izražanje genov APLP in cMYB.

3 LITERATURA

1. Košnik M, Mravlje F, Štrajcar D, Koželj M, Černelč P: Interna medicina, četrta izdaja, Littera Picta, d.o.o., Ljubljana, 2011: 991-1001.
2. World Health Organization: Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/39142/1/WHO_TRS_843_eng.pdf, dostopno: maj 2016.
3. World Health Organization: Who scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level.
<http://www.who.int/chp/topics/Osteoporosis.pdf>, dostopno: april 2016.
4. Bone Health, Expert Insights on Osteoporosis.
<http://www.4bonehealth.org/education/world-health-organization-criteria-diagnosis-osteoporosis>, dostopano oktober 2016.
5. Mencej Bedrač S, Ostanek B, Mlakar V, Zupan J, Kocjan T, Preželj J, Marc J: Sodobni pogled na nastanek osteoporoze. *Farm Vestn*, 2012; 63: 269–278.
6. Rivadeneira F and Mäkitie O: Osteoporosis and Bone Mass Disorders: From Gene Pathways to Treatments. *Trends Endocrinol Metab*, 2016; 27: 262–281.
7. Uitterlinden A. G, van Meurs J. B. J, Rivadeneira F, Pols H. A. P: Identifying genetic risk factors for osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2006; 6: 16–26.
8. Richards J. B, Zheng H. F, Spector T. D: Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nat Rev Genet*, 2012; 13: 576–588.
9. Walsh M. C, Choi Y: Biology of the RANKL–RANK–OPG system in immunity, bone, and beyond. *Front Immunol*, 2014; 5: 1-11.
10. Mencej Bedrač S, Marc J: Sistem RANKL/RANK/OPG - nova tarča za zdravila za zdravljenje osteoporoze. *Farm Vestn*, 2000; 59: 157–178.
11. TNFRSF11B Gene - GeneCards.
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNFRSF11B>, dostopno: maj 2016.
12. Vrtačnik P, Marc J, Ostanek B: Epigenetic mechanisms in bone. *Clin Chem Lab Med*, 2013; 52: 589–608.
13. Sun M, Zhou X, Chen L, Huang S, Leung V, Wu N, Pan H, Zhen W, Lu W, Peng S: The Regulatory Roles of MicroRNAs in Bone Remodeling and Perspectives as Biomarkers in Osteoporosis. *BioMed Res Int*, 2016; 2016: 1-11.
14. Chen G, Deng C, Li Y. P: TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Int J Biol Sci*, 2012; 8: 272–288.

15. Nguyen A, Nguyen V, Pham D, Mravic M, Scott M. A, James A. W: Novel Signaling Pathways in Osteosarcoma. *Int J Orthop*, 2014; 1: 73–84.
16. Pautke C, Schieker M., Tischer, T., Kolk, A., Neth, P, Mutschler W, Milz S: Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts. *Anticancer Res*, 2014; 24: 3743–3748.
17. Ruosi C, Querques F, Granata F, Colella G, Liccardo S, Lombardo B, Pastore L: Cellular and Animal Models for the Identification of Osteoporosis Determinants Increasing Vertebral Compression Fractures Risk. *J Osteoporos Phys Act*, 2015; 3,: 1-9.
18. Saos-2 ATCC ® HTB-85TM.
http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-85.aspx?geo_country=si,
dostopno: maj 2016.
19. MG-63 ATCC ® CRL-1427TM.
http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1427.aspx?geo_country=si,
dostopno: maj 2016.
20. HOS ATCC ® CRL-1543TM.
http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1543.aspx?geo_country=si,
dostopno: maj 2016.
21. CLS Cell lines service.
<http://www.clsgmbh.de/index.php?sid=3s71ohdjkoa50d9m9ehjfhq0e7>, dostopno: maj 2016.
22. GEN Genetic Engineering & Biotechnology News.
<http://www.genengnews.com/gen-news-highlights/number-of-micrnas-in-human-genome-skyrockets/81250958/>, dostopno: maj 2016.
23. van Rooij E: The Art of MicroRNA Research. *Circ Res*, 2011; 108: 219–234.
24. Burtis A. C, Ashwood R. E, Bruns E. D: *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Elsevier Saunders, cop., fifth edition, St. Louis (Missouri), 2012: 1219.
25. Joshi S. R, McLendon J. M, Comer B. S, Gerthoffer W. T: MicroRNAs-control of essential genes: Implications for pulmonary vascular disease. *Pulm Circ*, 2011; 1: 357–364.
26. Grünhagen J, Bhushan R, Degenkolbe E, Jäger M, Knaus P, Mundlos S, Robinson P. N, Ott C. E: MiR-497~195 cluster microRNAs regulate osteoblast differentiation by targeting BMP signaling. *J Bone Miner Res*, 2015; 30: 796–808.
27. He J. F, Luo Y. M, Wan X.H, Jiang D: Biogenesis of MiRNA-195 and its role in biogenesis, the cell cycle, and apoptosis. *J Biochem Mol Toxicol*, 2011; 25: 404–408.
28. Cai H, Zhao H, Tang J, Wu H: Serum miR-195 is a diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma. *J Surg Res*, 2015; 194: 505–510.

29. MIR204 Gene – GeneCards.
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR204>, dostopno: maj 2016.
30. OMIM Micro RNA 204.
<http://www.omim.org/entry/610942#5>, dostopno: maj 2016.
31. Imam J. S, Plyler J. R, Bansal H, Prajapati S, Bansal S, Rebeles J, Chen H. I. H, Chang Y. F, Panneerdoss S, Zoghi B, Buddavarapu K. C, Broaddus R, Hornsby P, Tomlinson G, Dome J, Vadlamudi R. K, Pertsemlidis A, Chen Y, Rao M. K: Genomic Loss of Tumor Suppressor miRNA-204 Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Activating AKT/mTOR/Rac1 Signaling and Actin Reorganization. *PLOS ONE*, 2012; 7: 1-11.
32. Xia Y, Zhu Y, Ma T, Pan C, Wang J, He Z, Li Z, Qi X, Chen Y: miR-204 functions as a tumor suppressor by regulating SIX1 in NSCLC. *FEBS Lett*, 2014; 588: 3703–3712.
33. Zhang B, Yin Y, Hu Y, Zhang J, Bian Z, Song M, Hua D, Huang Z: MicroRNA-204-5p inhibits gastric cancer cell proliferation by downregulating USP47 and RAB22A. *Med Oncol*, 2016; 32: 1-8.
34. Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D: MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells*, 2010; 28: 357–364.
35. ALPL Gene - GeneCards.
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ALPL>, dostopno: maj 2016.
36. Nielson C. M, Zmuda J. M, Carlos A. S, Wagoner W. J, Larson E. A, Orwoll E. S, Klein R. F: Rare coding variants in ALPL are associated with low serum alkaline phosphatase and low bone mineral density. *J Bone Miner Res*, 2012; 27: 93–103.
37. MYB Gene - GeneCards.
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYB>, dostopno: maj 2016.
38. Bengtsen M, Klepper K, Gundersen S, Cuervo I, Drabløs F, Hovig E, Sandve G. K, Gabrielsen O. S, Eskeland R: c-Myb Binding Sites in Haematopoietic Chromatin Landscapes. *PLoS ONE*, 2015; 10: 1-25.
39. pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector Protokol, PROMEGA. <https://worldwide.promega.com/~-/media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/a/pmirglo%20dual-luciferase%20mirna%20target%20expression%20vector%20protocol.pdf>, dostopno: marec 2016.
40. Sonkoly E, Wei T, Janson P. C. J, Sääf A, Lundeberg L, Tengvall-Linder M, Norstedt G, Alenius H, Homey B, Scheynius A, Stähle M, Pivarcsi A: MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis?. *PloS One*, 2007; 2: 1-8.

41. Bishop L. M, Fody P. E, Schoeff E.L: Clinical chemistry: techniques, principles, correlations, sixth edition. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, Baltimore, Philadelphia, 2010: 145-6, 205.
42. Burtis A. C, Ashwood R. E, Bruns E.D: Tietz fundamentals of clinical chemistry, sixth edition. Saunders, Elsevier, St. Louis, 2008: 102-3, 265, 274-6.
43. Solanki G: Polymerase Chain Reaction. *Int J Pharmacol Res*, 2012; 2: 98-102.
44. NanoDrop 1000 Spektrofotometer V 3.7 User's Manual, Thermo Scientific. <https://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v.3.7-users-manual-8.5x11.pdf>, dostopno: februar 2016.
45. Cell Culture Basics Handbook, Invitrogen. <http://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>, dostopno: februar 2016.
46. Wurm F. M: Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2004; 22: 1393–1398.
47. X-tremeGENETM HP DNA Transfection Reagent, Sigma-Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/xtghpro?lang=en®ion=SI#>, dostopno: junij 2016.
48. Benjamini Y, Hochberg Y: Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc*, 1995; 57: 289–300.
49. GEO Gene Expression Omnibus. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=gse70415>, dostopno: julij 2016.
50. Johnson P. D, Besselsen D.G: Practical Aspects of Experimental Design in Animal Research. *ILAR J*, 2002; 43: 202–206.
51. Zeng Y, Cullen B. R: Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*, 2003; 9: 112–123.
52. Weilner S, Grillari-Voglauer R, Redl H, Grillari J, Nau T: The role of microRNAs in cellular senescence and age-related conditions of cartilage and bone. *Acta Orthop*, 2015; 86: 92–99.
53. Boyer R: Temelji biokemije. Študentska založba, Ljubljana, 2005: 338-348.
54. Addgene: DNA Ligation. <https://www.addgene.org/plasmid-protocols/dna-ligation/>, dostopno: junij 2016.
55. Complete Cloning and Sequencing Explorer Series Curriculum Manual, Biorad. http://users.stlcc.edu/Departments/fvbio/Genetic_Analyzer_ABI_Biorad_Complete%20Cloning%20and%20Sequencing%20Explorer%20Series%20Curriculum%20Manual.pdf, dostopno: julij 2016.
56. Witkos T. M, Koscianska E, Krzyzosiak W. J: Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr Mol Med*, 2011; 11: 93–109.

57. Kuhn D. E, Martin M. M, Feldman D. S, Terry A. V, Nuovo G. J, Elton T. S: Experimental Validation of miRNA Targets. *Methods*, 2008;. 44: 47–54.
58. Das N, Tripathi N, Khurana S: Micro RNA Mimics And Antagonists. *Int J Sci Technol Res*, 2015; 4: 176–180.