

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLEMEN ČAMERNIK

MAGISTRSKA NALOGA

**PREOBLIKOVANJE PLAZMIDA pGL3 ZA FUNKCIJSKO
TESTIRANJE PODROČIJ 3'-UTR V mRNA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

KLEMEN ČAMERNIK

**PREOBLIKOVANJE PLAZMIDA pGL3 ZA FUNKCIJSKO
TESTIRANJE PODROČIJ 3'-UTR V mRNA**

**MODIFICATION OF pGL3 PLASMID FOR FUNCTIONAL
TESTING OF 3'-UTR REGIONS IN mRNA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično kemijo in biokemijo pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Vida Mlakarja, univ. dipl. mikrobiol. Vse meritve sem opravljal v laboratoriju za molekularno diagnostiko na Fakulteti za farmacijo

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Janji Marc mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvu asist. dr. Vidu Mlakarju, univ. dipl. mikrobiol. za vodenje in vso pomoč pri eksperimentalnem delu in pisanju magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Vida Mlakarja, univ. dipl. mikrobiol.

Vsebina

Povzetek	vi
Abstract	vii
1. Uvod	1
1.1 Sinteza, zorenje in razgradnja mRNA	1
1.1.1 Prepisovanje DNA.....	1
1.1.2 Zorenje mRNA	2
1.1.3 Razgradnja mRNA.....	3
1.2 Regija 3'- UTR	4
1.2.1 Cis elementi	4
1.2.2 Trans - elementi	5
1.3 Molekulsko kloniranje	7
1.3.1 Izbira in priprava vektorja	7
1.3.2 Priprava Inserta	8
1.3.3 Ligacija in transformacija.....	10
1.3.4 Selekcija rekombinantnih bakterij.....	11
2. Namen	13
3. Materiali in metode.....	14
3.1 Vzorec.....	14
3.2 Točkovna mutageneza	14
3.3 Elektroforeza na agaroznem gelu	16
3.4 Izolacija DNA iz gela.....	17
3.5 Restriksijska analiza.....	19
3.6 Ligacija	20
3.7 Bakterijska transformacija.....	21
3.8 Izolacija plazmida	23
3.9 Verižna reakcija s polimerazo.....	25
3.10 Čiščenje produktov PCR reakcije.....	27
3.11 Spektrofotometrična določitev koncentracije in čistosti DNA.....	28
3.12 Sekvenčna analiza z metodo DTCS.....	29
4. Rezultati in razprava.....	34
4.1 Računalniška analiza genoma	34
4.2 Točkovna mutageneza	35

4.3 Uvedba AhdI restrikcijskega mesta	38
.....	41
4.4 Uvedba citomegalovirusnega promotorja	41
4.5 Preizkus funkcionalnosti vektorja	43
4.6 Opis delovanja molekularnega orodja	46
5. Sklep	48
Viri	49

SEZNAM SLIK

<i>Slika 1: Shematski prikaz sistema za prepisovanje DNA</i>	1
<i>Slika 2: Proces zorenja mRNA</i>	2
<i>Slika 3: Primer lepljivih in topih koncev</i>	8
<i>Slika 4: Proces selekcije rekombinantnih plazmidov z metodo insercijske inaktivacije gena za rezistenco proti tetraciklinu</i>	12
<i>Slika 5: postopek DNA sekvenciranja z metodo DTCS</i>	29
<i>Slika 6: Analiza restrikcijskih mest osnovnega plazmida pGL3 s programom SnapGene</i>	34
<i>Slika 7: Nukleotidno zaporedje gena Amp^r, kjer se nahaja AhdI cepitveno mesto</i>	35
<i>Slika 8: Gelska elektroforeza restrikcijske reakcije produktov točkovne mutageneze</i>	37
<i>Slika 9: Rezultat sekvenčne analize produktov točkovne mutageneze</i>	38
<i>Slika 10: MCS_Ahd insert z označenima AhdI restrikcijskima mestoma in delom, ki ostane po restrikciji</i>	38
<i>Slika 11: Rezultat restrikcijske analize ligacije MCS_Ahd</i>	40
<i>Slika 12: Rezultat sekvenčne analize plazmida pGL3m_Ahd</i>	41
<i>Slika 13: Rezultat restrikcijske analize ligacije promotorja CMV</i>	42
<i>Slika 14: Rezultat sekvenčne analize plazmida pGL3m_Ahd_pCMV4 skupaj z nukleotidnim zaporedjem začetnega dela promotorja CMV</i>	42
<i>Slika 15: Rezultat elektroforeze ligacije odseka gena UGT1A1</i>	46
<i>Slika 16: Princip delovanja molekularnega orodja pGL3m_Ahd_pCMV</i>	47

SEZNAM PREGLEDNIC

<i>Preglednica I: Sestava reakcijske zmesi za točkovno mutagenozo</i>	15
<i>Preglednica II: Pogoji PCR reakcije I. stopnje točkovne mutageneze</i>	15
<i>Preglednica III: Pogoji PCR reakcije II. stopnje točkovne mutageneze</i>	15
<i>Preglednica IV: Reakcijska zmes za restrikcijo z DpnI restriktazo</i>	16
<i>Preglednica V: Reakcijska zmes za restrikcijsko reakcijo</i>	20
<i>Preglednica VI: Restrikcijski encimi ter njihova aktivnost v uporabljenih pufrih</i>	20
<i>Preglednica VII: Reakcijska zmes za reakcijo ligacije</i>	21
<i>Preglednica VIII: Sestava reakcijske zmesi za PCR reakcijo</i>	26
<i>Preglednica IX: Pogoji za PCR reakcijo pomnoževanja odseka gena UGT1A1</i>	26
<i>Preglednica X: Priporočena koncentracija DNA za uporabo pri DNA sekveniranju</i>	30
<i>Preglednica XI: Ocena količine dvoverižne DNA</i>	31
<i>Preglednica XII: Sestava reakcijske zmesi za DNA sekveniranje</i>	31
<i>Preglednica XIII: Pogoji PCR reakcije za DTCS sekveniranje</i>	32
<i>Preglednica XIV: Sestava reakcijske zmesi za ustavitev reakcije sekveniranja.....</i>	32
<i>Preglednica XV: Pogoji kapilarne elektroforeze</i>	33
<i>Preglednica XVI: Sestava reakcijske zmesi za restrikcijsko analizo produktov mutageneze.....</i>	37
<i>Preglednica XVII: Sestava reakcijske mešanice za restrikcijsko reakcijo z XbaI restriktazo.....</i>	39
<i>Preglednica XVIII: Sestava reakcijskih mešanic za reakcije ligacije odseka gena UGT1A1</i>	44

SEZNAM OKRAJŠAV

3'-UTR	3'-untranslated region
A	adenin
AhdI	restriktaza izolirana iz <i>Aeromonas hydrophila</i>
ARE	adenylate-uridylate-rich element
AUF-1	AU-rich RNA-binding protein
BAC	bacterial artificial chromosome
BglII	restriktaza izolirana iz <i>Bacillus globigii</i>
bp	bazni par
BSA	bovine serum albumine
C	citozin
CIP	calf intestinal phosphatase
CMV	citomegalovirus
CPSF	cleavage and polyadenylation specificity factor
ddNTP	dideoxy nucleoside triphosphate
dNTP	deoxy nucleoside triphosphate
DTCS	dye terminator cycle sequencing
E.coli	Escherichia coli
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
ELAV	embryonic lethal abnormal vision
G	gvanin
GMP	guanosine monophosphate
HindIII	restriktaza izolirana iz <i>Haemophilus influenzae</i> Rd
iNOS	inducible nitric oxide synthase
kb	kilobazni par (tisoč baznih parov)
KSRP	KH-type splicing regulatory protein
MAC	mammalian artificial chromosome
MCS	multiple cloning site
mRNA	messenger ribonucleic acid
NGD	no-go decay
NMD	nonsense-mediated decay
NSD	non-stop decay
ORI	origin of replication
PABP	poly(A) binding protein
PARN	poly(A)-specific ribonuclease
PCR	polymerase chain reaction
Pu	purine
RRM	RNA recognition motif
SDS	sodium dodecyl sulfate
T	timin
TAE	tris-acetat-EDTA
TBP	TATA binding protein
TFII	transcription factor II
TNF α	tumor necrosis factor alpha
TTP	tristetraprolin
U	uracil
UGT1A1	uridin difosfat glukuroniltransferaza 1A1
XbaI	restriktaza izolirana iz <i>Xanthomonas badrii</i>
YAC	yeast artificial chromosome

Povzetek

3'-neprevedene regije mRNA vsebujejo z adeninom in uracilom bogate elemente (ARE). Ti elementi delujejo kot regulatorne regije in nadzirajo izražanje genov. Določeni proteini se lahko vežejo na te regije in s tem stabilizirajo ali destabilizirajo molekulo mRNA. Za proučevanje teh regij smo želeli osnovni luciferazni reporterski vektor pGL3 preoblikovati v vektor za TA kloniranje. V vektor smo navzdol od gena *Luc*⁺ vstavili posebno izdelan insert. Ta je vseboval dve AhdI mesti, ki si sledita eno za drugim. Po cepitvi z AhdI na obeh koncih vektorja ostane T previs. Da bi povečali ekspresijo luciferaze smo navzgor od gena *Luc*⁺ vstavili še CMV promotor. Delo je obsegalo:

- bioinformacijsko analizo genoma izbranega plazmida
- odstranitev prisotnih AhdI restrikcijskih mest z metodo točkovne mutageneze
- subkloniranje promotorja CMV iz plazmida pcDNA3 v plazmid pGL3
- ligacijo insertov v pripravljene vektorje in transformacijo v bakterije *E. coli* DH5 α

Rezultate posameznih stopenj konstrukcije smo preverili s sekvenčno analizo z metodo DTCS ter restrikcijsko analizo in elektroforezo na agaroznem gelu. Na koncu smo funkcionalnost orodja dokazali tako, da smo vanj uspešno vstavili odsek gena UGT1A1 pomnoženega s PCR.

Ključne besede: 3'-UTR, z A+U bogati elementi, molekulska kloniranje, točkovna mutageneza, TA kloniranje

Abstract

3' untranslated regions (3'-UTR) of mRNA contain A+U rich elements (ARE), that act as regulatory sequences which control gene expression. Certain proteins can bind to these regions and either stabilize or destabilize the mRNA molecule. In order to study these regions and the proteins that bind to them, we modified a luciferase reporting vector pGL3 basic into a TA cloning vector. We inserted a special insert downstream of the luciferase gene (*Luc*⁺). The insert contained two adjacent AhdI restriction sites. Digesting the insert using AhdI restriction enzyme results in T overhangs on both ends of the vector. In order to increase expression of the luciferase enzyme in mammalian cells, we also added a CMV promoter region upstream of the *Luc*⁺ gene. Our work consisted of:

- bioinformatic analysis of the genome of the selected plasmid
- elimination of AhdI restriction sites already present in the plasmid using site-directed mutagenesis
- subcloning of pCMV fragment from pcDNA3 plasmid to pGL3
- ligation of prepared inserts and transformation into *E. coli* DH5 α

We analyzed each stage of vector construction using DTCS sequencing and restriction analysis followed by agarose gel electrophoresis. We proved the functionality of the TA vector by successfully inserting a segment of UGT1A1 gene which we first multiplied using PCR.

Keywords: 3'UTR, A+U rich elements, molecular cloning, site directed mutagenesis, TA cloning

1. Uvod

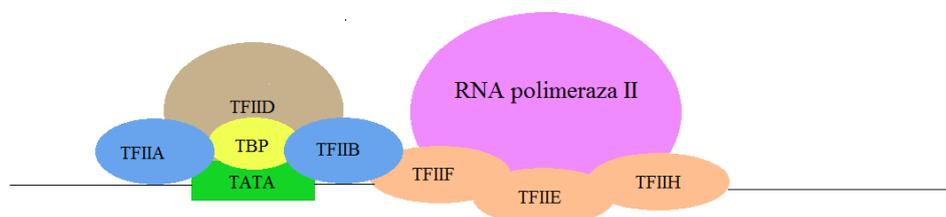
1.1 Sinteza, zorenje in razgradnja mRNA

Človeška DNA je sestavljena iz treh milijard baznih parov in nosi informacijo za več kot dvajset tisoč genov. Posamezen gen znotraj DNA sestavljajo kodirajoča zaporedja (eksoni), med katera so vrinjena nekodirajoča zaporedja (introni). Preden se gen lahko izrazi, se mora informacija zapisana v DNA prepisati v bolj strnjeno obliko. Nekodirajoče regije se izrežejo, kodirajoče regije pa se spojijo skupaj v molekulo, ki ji pravimo informacijska ribonukleinska kislina. (mRNA; ang. Messenger ribonucleic acid). Prepisovanju DNA v mRNA pravimo transkripcija in obsega tri stopnje: začetek prepisovanja (iniciacija), podaljševanje (elongacija) in konec prepisovanja (terminacija).

1.1.1 Prepisovanje DNA

Iniciacija

DNA v promotorskih regijah gena vsebuje določeno prepoznavno zaporedje, kamor se vežejo dejavniki iniciacije. Najpogosteje je to zaporedje sestavljeno iz nukleotidov TATA. Na TATA zaporedje se veže TBP, ki k sebi pritegne kompleks RNA polimeraze II in transkripcijskih dejavnikov TFII (*slika 1*). Podenote tega kompleksa imajo helikazno ter kinazno aktivnost. Helikazna aktivnost omogoča razvitje dvoverižne DNA, kinazna aktivnost pa fosforilacijo serinskih ostankov C-končne domene RNA polimeraze. Fosforilacija povzroči spremembo konformacije kompleksa in začetek prepisovanja.



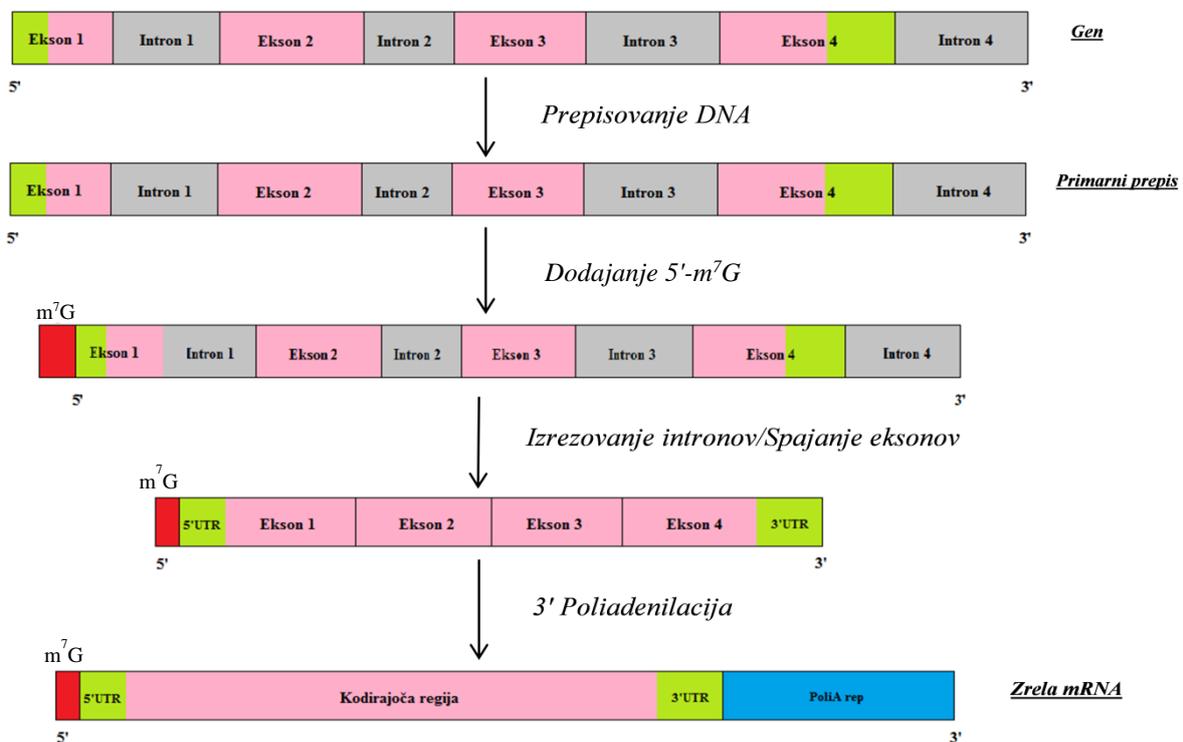
Slika 1: Shematski prikaz sistema za prepisovanje DNA

Elongacija in terminacija

Pred elongacijo se s kompleksa odcepita transkripcijska dejavnika TFIIE in TFIIH. Polimeraza nato s pomočjo dejavnikov podaljševanja prične dodajati komplementarne nukleotide. Gvanin se poveže s citozinom, adenin pa z uracilom. Prepiše se celotna informacija gena, torej tako eksoni kot tudi introni. Ko se podaljševanje konča, se RNA polimeraza defosforilira, odcepi in reciklira (1,2).

1.1.2 Zorenje mRNA

Po končani transkripciji dobimo tako imenovani primarni transkript. To je predhodnik mRNA (pre-mRNA), ki še vedno vsebuje nekodirajoče regije. V naslednjem koraku pre-mRNA vstopi v proces zorenja. Med procesom zorenja se na 5'-konec pripne 7-metil gvanozin, introni se izrežejo, na 3'-koncu pa poteče poliadenilacija (slika 2).



Slika 2: Proces zorenja mRNA

Sinteza 5'-7-metil gvanozina

Hkrati s transkripcijo se začne tudi sinteza 5'-7-metil gvanozina (m⁷G). Fosfohidrolaze odstranijo končno fosfatno skupino začetnega 5' trifosfonukleotida. Na nastali 5' difosfat se nato s pomočjo encima gvanilil transferaze veže GMP tako, da nastane 5'-5'-trifosfatna povezava. Na koncu metiltransferaze dodajo metilno skupino na N7 mesto gvanina. m⁷G

skupini na 5'-koncu mRNA pravimo tudi 5'-kapa. Odvisno od vrste kape se lahko metilirajo tudi drugi atomi (1). 5'-kapa veže dejavnike iniciacije (eIF) in je nujna za učinkovito translacijo. Poleg tega ima vlogo tudi pri stabilizaciji mRNA, saj prepreči dostop eksonukleazam, ki katalizirajo 5'-3' razgradnjo (3).

Izrezovanje nekodirajočih regij

Izrezovalno-povezovalni kompleks (ang. Spliceosome) s pomočjo *cis*-regulatornih elementov (utiševalci/ojačevalci izrezovanja) izreže introne in spoji eksone. Introni so definirani s tremi specifičnimi zaporedji. 5'-GU, 3'-AG ter mesto razvejitve, ki vsebuje z AT bogate regije. Proces izrezovanja poteka v treh korakih. Najprej pride do cepitve na mestu 5'-GU. Sledi tvorba zanke na mestu razvejitve ter na koncu še cepitev na mestu 3'-GU. Intron se nato razgradi, eksona pa se spojita skupaj. Včasih se lahko poleg intronov izreže tudi en ali več eksonov. Temu procesu pravimo alternativno izrezovanje. Tako dobimo mRNA, ki kodira drugačno obliko proteina – *izooblika*. (1,4).

Sinteza Poli(A) repa

Večina pre-mRNA molekul vsebuje zaporedje AAUAAA na katerega se veže encim CPSF. Ta s pomočjo drugih dejavnikov cepi pre-mRNA na mestu, ki se nahaja 10-30 nukleotidov navzdol od prepoznavnega zaporedja. Encim poliadenilat polimeraza nato doda do 200 adenin ribonukleotidov na 3'konec pre-mRNA. Poli(A) rep sodeluje pri translaciji, tako da preko interakcije s PABP in eIF4E povzroči zvitje mRNA v krožno strukturo. Vpliva tudi na stabilnost mRNA ter regulira prehod mRNA v citoplazmo (5,6).

1.1.3 Razgradnja mRNA

Razgradnja mRNA je pomembna za regulacijo izražanja genov. Nanjo vplivajo tako endogeni signali kot tudi eksogeni signali. Razgradnja se ponavadi prične s postopnim krajšanjem poli(A) repa - **deadenilacija**. Po deadenilaciji se mRNA razgradi po enem izmed dveh mehanizmov. Po prvem mehanizmu, deadenilaciji sledi odstranitev 5'-kape. Eksonukleaze nato razgradijo ostalo mRNA v smeri 5'-3'. Pri drugem mehanizmu, po deadenilaciji sledi razgradnja s kompleksom eksonukleaz, ki režejo v smeri 3'-5'. Temu kompleksu pravimo eksosom. Pri sesalcih se največ mRNA razgradi po eksosomalni poti (7). Razgradnja mRNA lahko poteče tudi neodvisno od deadenilacije. Če mRNA vsebuje nesmiselne kodone, neizrezane introne ali podaljšane 3'-utr regije, se med prepisovanjem sproži signal za razgradnjo 5'-kape. Tako se prepreči prepisovanje pokvarjenega transkripta in tvorbo nepopolnih proteinov (8). Tak tip razgradnje so na primer:

- Razgradnja nesmiselne mRNA (NMD): do nje pride, če se v mRNA pojavi pre zgodnji STOP kodon (7,8).
- Non-stop razgradnja (NSD): do nje pride, če v mRNA ni STOP kodona (7,8,9).
- No-go razgradnja (NGD): do nje pride če se ribosom med translacijo ustavi. Do tega lahko pride zaradi sekundarnih struktur na mRNA, ki onemogočajo prevajanje. (7,8,9).

1.2 Regija 3'- UTR

3'-UTR regija mRNA se nahaja na 3' koncu kodirajoče regije, takoj za terminalnim kodonom. Dolžina 3'-UTR regije se med posameznimi vrstami razlikuje. Pri glivah in rastlinah je povprečna dolžina okoli 200 nukleotidov, pri ljudeh in drugih sesalcih pa okoli 800 nukleotidov. Različne dolžine lahko opazimo tudi znotraj posamezne vrste. Znotraj 3'-UTR regij se nahajajo posebna regulatorna zaporedja (*cis*-elementi), ki vplivajo na stabilnost mRNA, translacijo, poliadenilacijo in lokalizacijo mRNA v celici (10).

1.2.1 Cis elementi

ZA+U bogata zaporedja

ARE so 50-150 nukleotidov dolga zaporedja znotraj 3'-UTR regij mRNA. Bogata so z adeninom in uracilom. Največkrat jih sestavljajo eden ali več AUUUA zaporedij znotraj regij z uracilom. Glede na razporeditev AUUUA zaporedij, lahko ARE razdelimo v tri razrede (11):

- ARE razreda I: vsebujejo večje število kopij pentamernega zaporedja AUUUA.
- ARE razreda II: vsebujejo najmanj dve prekrivajoči se zaporedji UUAUUUA(U/A)(U/A), ki sta obdani z U- bogato regijo (12).
- ARE razreda III: ne vsebujejo AUUUA motiva, temveč druge regulatorne elemente, kot na primer poli(U) regije (13).

Vezava proteinov (*trans*-elementi) na ARE lahko povzroči stabilizacijo mRNA in s tem povečano prevajanje in posledično večjo količino končnega produkta. Lahko pa pride do destabilizacije in pospešene razgradnje mRNA. Napake v uravnavanju stabilnosti mRNA lahko vodijo do raznih bolezenskih stanj.

1.2.2 Trans - elementi

AUF1 - Heterogeni jedrni ribonukleoprotein D0

AUF1 spada v podskupino heterogenih jedrnih ribonukleoproteinov (hnRNP). Sestavljata ga dve RRM domeni in kratka glutaminska veriga na C- koncu. Za vezavo na ARE regije je potrebna še z alaninom bogata regija, ki se nahaja na N- koncu. Primarni transkript vsebuje 10 eksonov. Med zorenjem mRNA z alternativnim izrezovanjem dobimo mRNA, ki kodirajo 4 izoforme proteina: p37, p40, p42 in p45. Ti proteini so različno izraženi v različnih celicah in v različnih stopnjah razvoja. Prav tako se njihovo izražanje lahko spremeni pod vplivom drugih celičnih signalov. Različne izoforme imajo različno afiniteto za ARE vezavna mesta. Na afiniteto in specifičnost vezave pa vplivajo tudi post-translacijske modifikacije proteina (14,15,16). AUF-1 se veže le na ARE razreda I in II. AUF-1 protein destabilizira mRNA in povzroči njeno razgradnjo. Natančen mehanizem delovanja še ni poznan, a vključuje kompleksno interakcijo s PABP, faktorji iniciacije in proteasomom. Eden izmed predlaganih mehanizmov je naslednji: Ko se ribosom veže na mRNA, njegova vezava povzroči spremembo strukture mRNA in razkritje ARE domene. AUF-1 protein tvori homodimere in heterodimere s svojimi izoformami. Dimeri se nato vežejo na ARE zaporedje. V nadaljevanju se tvori kompleks še z drugimi proteini, kot so iniciacijski faktor eIF4G, šaperoni hsp27 in hsp70, protein toplotnega šoka hsc70, laktat dehidrogenaza in PABP. Nato pride do ubikvitiniranja in proteasomalne razgradnje AUF-1. Hkrati se rekrutira eksosom, ki eksonukleolitično razgradi mRNA (17).

AUF-1 se veže na ARE regije beta adrenergičnih receptorjev. Pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem najdemo povišane koncentracije AUF-1 proteina, kar povzroči znižanje števila teh receptorjev (16,17). Prav tako ima AUF-1 vlogo pri kontroli proteinov celičnega cikla (ciklin D1, Myc, p16, p21), nadzoru apoptoze, aktivaciji izražanja telomeraze ter celičnem staranju (18).

Proteini družine Hu

Proteini družine Hu spadajo med proteine podobne ELAV (ang. Embryonic lethal abnormal visual). Pri sesalcih poznamo štiri izoforme, HuR, HuB, HuC, HuD, ki so izražene v različnih celicah. Protein HuR je prisoten povsod. Proteina HuC, HuD sta izražena specifično v nevronih. Protein HuB pa je izražen v nevronih in adipocitih. Hu proteini imajo skupne strukturne značilnosti. Vse izoforme vsebujejo tri RRM domene. Vsaka RRM sestavlja približno 80 aminokislinskih ostankov. Domeni 1 in 2 sta od domene 3 ločeni z zanko, ki jo

sestavlja 60–90 aminokislinskih ostankov. Število aminokislin v zanki je pomembno, saj vpliva na vzorec izražanja proteina. Domene se razlikujejo po tem, katera vezavna zaporedja prepoznajo. Pri proteinu HuR domeni 1 in 2 prepoznata AUUUA ponovitve, pri čimer imata najvišjo afiniteto za sekvenco (AUUUA)₄. Pri proteinu HuC domeni 1 in 2 prepoznata zaporedje Pu(U)₂₋₅(Pu)₁₋₂(U)₂₋₅Pu (Pu-purin), pri proteinu HuD pa domeni 1 in 2 prepoznata zaporedje UU(AUUU)₃AUU. Domena 3 proteinov HuR, HuC in HuD se veže na poli(A) rep. Pri proteinu HuB se vse tri domene vežejo na devet nukleotidov dolgo zaporedje UUAUUUA(U/A)(U/A) znotraj 3'-UTR regije. Hu proteini stabilizirajo mRNA in s tem podaljšajo njen razpolovni čas. Za učinkovito vezavo na mRNA so potrebne vse tri domene. Pri vseh Hu proteinih obstaja v zanki določeno zaporedje, ki jim omogoča prehod iz citoplazme v jedro in nazaj. To omogoča Hu proteinom, da se v jedru vežejo na mRNA in jo ščitijo med transportom v citoplazmo. Eden izmed mehanizmov stabilizacije je verjetno tudi tekmovanje za vezavna mesta med proteini, ki destabilizirajo mRNA. Prekomerno izražanje HuR proteina je povezano z več vrstami raka (13,14,19).

Tristetraprolin

TTP spada v skupino proteinov cinkovega prsta tipa CCCH. Je destabilizirajoči protein, ki se veže predvsem na ARE razreda II (20). Deluje tako, da spodbuja deadenilacijo in razgradnjo mRNA (21). Miši, ki imajo genom spremenjen tako, da ne izražajo TTP, trpijo za hudimi vnetnimi boleznimi kot so artritis, dermatitis, kaheksija. Sistemski znaki so najverjetneje posledica podaljšane razpolovne dobe mRNA, ki kodira TNF α . (13)

MicroRNA

MikroRNA so kratke molekule nekodirajoče RNA. Dolge so okoli 21 nukleotidov in imajo največkrat vlogo pri posttranskripcijskem nadzoru izražanja genov. Nadzirajo translacijo mRNA in njeno stabilnost. Vpletene so v večino fizioloških procesov v telesu, spremembe v njihovem izražanju pa lahko opazimo pri marsikaterem bolezenskem stanju, vključno z rakom. Molekule miRNA nastanejo iz miRNA prekurzorskih molekul, ki se zvijejo v lasnicam podobno strukturo. Iz njih se miRNA izreže v dveh korakih. Oba koraka katalizirata encima iz družine RNaz III (Drosha in dicer). Vezava miRNA na specifična regulatorna zaporedja znotraj 3'-UTR povzroči rekrutment Argonaut proteina in inhibicijo translacije oziroma razpad mRNA (22,23).

KSRP

KSRP protein vsebuje štiri KH domene, ki se vežejo na RNA. Za minimalno aktivnost sta potrebni najmanj domeni 3 in 4. Domena 3 je odgovorna za vezavo na poli(A) ribonukleazo (PARN) in vezavo na eksosom. KSRP stimulira razgradnjo mRNA tako, da z eksosomom poveže tiste ARE vezavne proteine, ki normalno ne rekrutirajo eksosoma. Nekatere mRNA, na katere se veže KSRP, so c-fos, p21, iNOS, TNF α . TTP lahko veže KSRP in tako prepreči eksosomalno razgradnjo (24,25).

1.3 Molekulsko kloniranje

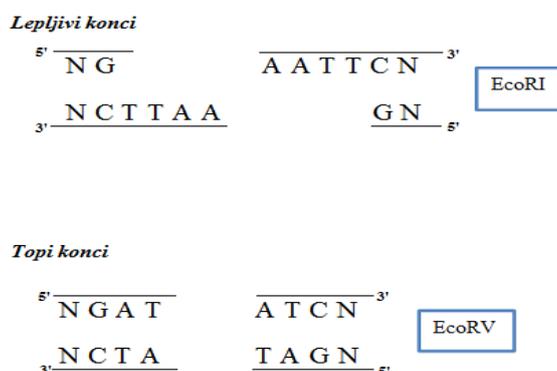
Molekulsko kloniranje sestavlja skupek laboratorijskih metod, s katerimi ustvarimo rekombinantne molekule DNA, ki jih nato v izbranem gostiteljskem organizmu pomnožimo. Tako dobimo veliko populacijo celic, ki vsebujejo identične molekule rekombinantne DNA (kloni). Proces molekularnega kloniranja se začne z izbiro gostiteljskega organizma, pripravo odseka DNA, ki ga želimo klonirati - *insert*, ter pripravo vektorja v katerega bomo ta insert vstavili. V naslednjem koraku z uporabo encima DNA-ligaze insert vstavimo v vektor - *ligacija*. Rekombinantni vektor nato transformiramo v gostiteljski organizem. Na koncu ločimo organizme, ki so vektor sprejeli od tistih, ki ga niso – *selekcija*.

1.3.1 Izbira in priprava vektorja

Vektor mora imeti številna prepoznavna mesta za restrikcijske encime, ki so le enkrat prisotna. Sposoben mora biti razmnoževanja sebe in tuje DNA. Ko vektor vnesemo v celico, moramo biti sposobni te celice ločiti od tistih, ki vektorja nimajo. Vektorji zato ponavadi vsebujejo gene za rezistenco na določen antibiotik ali pa gene za encime, ki jih v gostiteljski celici ni. Vektor se mora na relativno lahek način izolirati iz gostiteljske celice. Najbolj pogosti vektorji so plazmidi, fagi in kozmidi. Izbira vektorja je odvisna od velikosti inserta, ki ga lahko sprejmejo. Plazmidi lahko sprejmejo inserte do velikosti 10kb, fagi med 5kb in 20 kb, kozmidi pa med 35 kb in 45 kb. Obstajajo tudi različni umetni vektorji, kot na primer BAC, YAC in MAC, ki lahko sprejmejo od 75 kb do tudi več kot 1 Mb. Ko izberemo primeren vektor, ga z izbranim restrikcijskim encimom lineariziramo in vanj vstavimo pripravljen insert (26).

1.3.2 Priprava Inserta

DNA, katero želimo klonirati, lahko pripravimo na več načinov. Lahko jo izrežemo iz plazmida ali genomske DNA z uporabo restrikcijskih encimov. Restrikcijski encimi režejo DNA znotraj točno določenih prepoznavnih zaporedij. DNA lahko režejo tako, da nastanejo ali topi ali lepljivi konci (*slika 3*). Insert lahko dobimo tudi tako, da izbrani odsek DNA pomnožimo s PCR reakcijo. Ti inserti imajo ponavadi tope konce. Nekatere polimeraze dodajo na koncu PCR produktov en sam A nukleotid. Tako z uporabo takšnih polimeraz dobimo PCR produkte z A previsi. Krajše inserte pa lahko pripravimo tako, da sintetiziramo oligonukleotidne začetnike ter jih s segrevanjem na 95 °C in postopnim ohlajanjem rehibridiziramo v dvoverižno DNA. Prednost te metode je, da lahko sami načrtujemo konce insertov in s tem zagotovimo ligacijo v točno določeno restrikcijsko mesto (26,27,28). Inserte vstavimo v vektor tako, da vektor predhodno režemo z istim restrikcijskim encimom.



Slika 3: Primer lepljivih in topih koncev

Pri ligaciji gre za naključne trke koncev vektorja in inserta. Ko se konca združita DNA ligaza tvori fosfodiestersko vez. Ligacija lepljivih koncev poteče dokaj učinkovito, saj komplementarni konci vektorja in inserta med seboj tvorijo vodikove vezi. Tako nastane relativno stabilna prehodna struktura, ki močno poveča verjetnost tvorbe fosfodiesterske vezi. Pri ligaciji topih koncev te prehodne strukture ni, zato mora DNA ligaza »počakati«, da pride do naključnega srečanja dveh koncev. Ligacijo topih koncev olajšamo tako, da jih pretvorimo v lepljive konce (28).

Linkerji

Molekule DNA s topim koncem lahko pretvorimo v lepljive konce tako, da nanje pripravimo povezovalno oligonukleotidno zaporedje – **linker**. Linker oblikujemo tako, da znotraj oligonukleotidnega zaporedja vključuje določeno prepoznavno mesto za restrikcijski encim, ki po cepitvi ustvari lepljive konce. Oligonukleotidni linker z DNA ligazo pripravimo na topi konec DNA. Po restrikciji dobimo DNA z lepljivimi konci. Vektor nato cepimo z isto restriktazo in vanj vstavimo insert. Linkerjev ne moremo uporabiti, če insert vsebuje ista prepoznavna mesta. V tem primeru uporabimo prilagojevalno oligonukleotidno zaporedje – **adapter** (28)

Adapterji

Adapterji so kratka zaporedja nukleotidov, ki so zgrajena tako, da imajo na eni strani topi konec na drugi pa lepljivega. 5'-konec lepljivega dela adapterja ima namesto fosfatne skupine hidroksilno. S tem preprečimo kovalentno vezavo med adapterskimi molekulami. DNA ligaza nato spoji topi konec adapterja s topim koncem inserta. V zadnjem koraku dodamo encim polinukleotidil kinaza, ki pretvori 5' hidroksilno skupino nazaj v 5'-fosfat. Vektor nato cepimo z restriktazo, ki pusti konce, ki so komplementarni z lepljivim koncem adapterja (28).

Dodajanje homopolimernega repa

Tope konce vektorjev lahko spremenimo v lepljive tudi tako, da nanje prilepimo homopolimerni rep. Pri tej metodi z encimom terminalna deoksinukleotid transferaza dodamo na 3'-OH konec serijo nukleotidov. Če izvedemo reakcijo samo z enim nukleotidom, dobimo homopolimer. Na vektor pripravimo polideoksicitozin (poli(dC)), na DNA insert pa polideoksigvanozin (poli(dG)). Ker ponavadi ne dobimo enakih dolžin poli(dC) in poli(dG) repa, se insert in vektor ne prilegata popolno. Zato moramo napraviti še dva dodatna koraka, in sicer reakcija s Klenow polimerazo, ki doda manjkajoče nukleotide in reakcija z DNA ligazo, ki tvori končno fosfodiesterko vez. Reakcija s Klenow polimerazo ni vedno nujna. Pri dovolj dolgih homopolimerih (>20 bp), se ustvarijo dokaj stabilne povezave med komplementarnimi bazami in tak vektor lahko vnesemo v gostiteljsko celico. Ko je enkrat vektor v celici, celične polimeraze in ligaze popravijo manjkajoče dele (28)

TA-kloniranje

Pri TA kloniranju je vektor oblikovan tako, da vsebuje T previs, insert pa tako, da vsebuje A previs. Ko vektor in insert združimo, adenin in timin hibridizirata. DNA ligaza nato tvori kovalentno vez med vektorjem in insertom. Vektor s T previsom ponavadi oblikujemo tako, da plazmid lineariziramo z restriktazo, ki tvori tope konce. Sledi reakcija s terminalno deoksinukleotidil transferazo in dideoksitimidin trifosfatom (ddTTP). Pomembno je, da uporabimo ddTTP, saj s tem zagotovimo dodatek le enega T nukleotida. Dobimo lineariziran vektor s T previsom.

Insert pripravimo tako, da željen fragment DNA pomnožimo s PCR reakcijo. Pri PCR reakciji moramo uporabiti Taq DNA polimerazo. Taq polimeraza na 3' konec PCR produkta doda en sam A nukleotid. Tako dobimo inserte z A previsom. Prednosti te metode v primerjavi z drugimi sta hitrost in enostavna izvedba. Največja slabost pa je, da ni možno zagotoviti smeri kloniranja. Tako obstaja 50 % verjetnost, da bo insert vstavljen v napačno smer. (28,29)

1.3.3 Ligacija in transformacija

Ko vektor in insert ustrezno pripravimo, ju zmešamo skupaj in dodamo DNA ligazo. DNA ligaza je encim, ki katalizira tvorbo kovalentne fosfodiesterske vezi med sosednjo 5'-fosfatno in 3'-hidroksilno skupino. Najpogosteje se v molekularni biologiji uporablja ligaza izolirana iz bakteriofaga T4, saj je sposobna je tvoriti fosfodiestersko vez tako med lepljivimi konci, kot tudi med topimi konci. (30,31)

Po ligaciji sledi vnos rekombinantnih plazmidov v gostiteljsko celico – **transformacija**. Najpogosteje se kot gostiteljske celice uporabljajo bakterije. Vendar vse bakterije niso sposobne sprejeti genetskega materiala iz okolice, oziroma ga lahko sprejemjo le manjše količine. Preden celice lahko transformiramo, jih moramo na poseben način fizikalno-kemijsko obdelati. Take celice pravimo, da so **kompetentne**. Osnovna metoda, s katero naredimo celice kompetentne je obdelava s 50 mM raztopino CaCl₂, kateremu sledi hiter dvig temperature na okoli 42 °C – toplotni šok (32). Natančen mehanizem te metode ni znan. Poleg toplotnega šoka lahko uporabimo tudi metodo elektroporacije, kjer skozi raztopino celic spustimo električni tok in s tem povečamo permeabilnost celic (33).

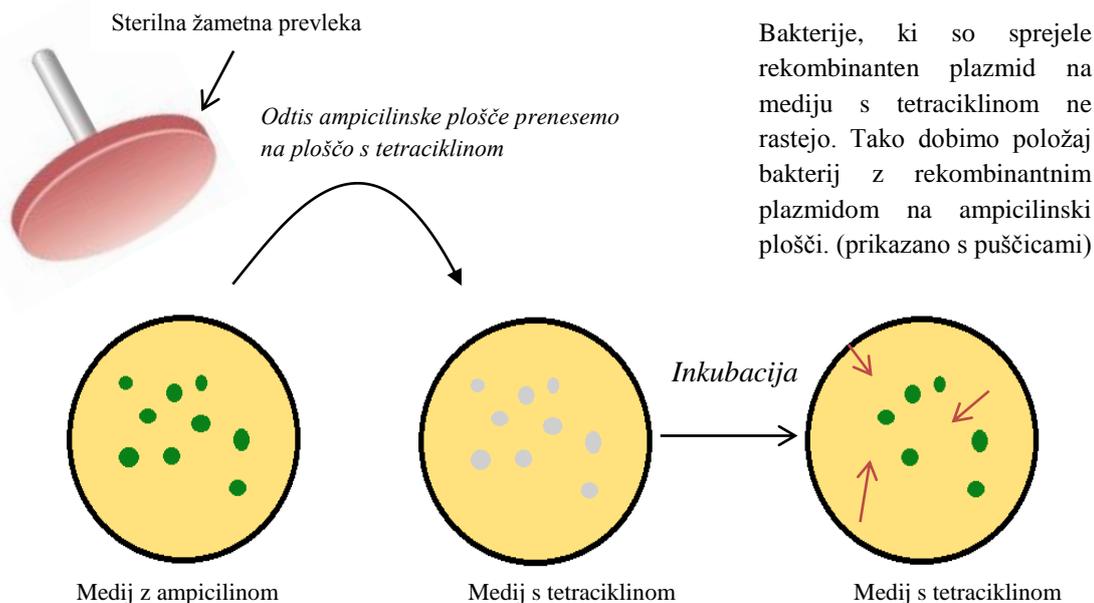
1.3.4 Selekcija rekombinantnih bakterij

Transformacija je relativno neučinkovit proces, zato moramo biti sposobni ločiti celice, ki so se uspešno transformirale od tistih, ki se niso. Bakterije *E. coli*, ki se najpogosteje uporabljajo za transformacijo, so ponavadi občutljive na antibiotike kot sta ampicilin in kanamicin. Na mediju, ki vsebuje na primer antibiotik ampicilin, tako ne rastejo. Zato so plazmidni vektorji oblikovani na tak način, da vsebujejo gen za beta laktamazo. Beta laktamaza je encim, ki cepi beta laktamski obroč ampicilina in s tem prepreči njegovo delovanje. Celice, ki sprejmejo tak vektor, na mediju z ampicilinom lahko normalno rastejo (26,28,34).

Med ligacijo se lahko zgodi, da vektor ne sprejme inserta, temveč se konca vektorja ponovno združita – samoligacija. Med transformacijo tako nekatere celice sprejmejo prazne vektorje. Take celice bodo pridobile rezistenco proti antibiotiku, vendar ne vsebujejo inserta in niso uporabne za nadaljnje delo. Zato moramo biti sposobni ločiti bakterije, ki so sprejele rekombinanten plazmid, od tistih, ki so sprejele prazen vektor. To lahko naredimo z metodo insercijske inaktivacije. Pri tej metodi insert vstavimo znotraj določenega gena in ga s tem inaktiviramo (26,28).

Insercijska inaktivacija gena za rezistenco proti antibiotikom

Nekateri plazmidni vektorji vsebujejo poleg gena za rezistenco proti ampicilinu tudi gen za rezistenco proti tetraciklinu. Znotraj gena za tetraciklin se nahaja prepoznavno mesto za določeno restriktivno endonukleazo. Če v to mesto vstavimo insert, gen za rezistenco proti tetraciklinu inaktiviramo. Bakterije nato najprej cepimo na agar, ki vsebuje ampicilin. Na agarju zrastejo le bakterije, ki so vektor sprejele. Na sterilno žametno tkanino nato naredimo odtis plošče ter ga prenesemo na medij s tetraciklinom. Bakterije, ki vsebujejo rekombinanten plazmid, nimajo rezistence proti tetraciklinu in na takem mediju ne bodo rasle. Ko primerjamo tetraciklinsko ploščo z osnovno ampicilinsko, dobimo bakterijske kolonije, ki vsebujejo rekombinanten plazmid (26,28)(slika 4).



Slika 4: Proces selekcije rekombinantnih plazmidov z metodo insercijske inaktivacije gena za rezistenco proti tetraciklinu.

Insercijska inaktivacija gena LacZ

Gen *LacZ* kodira encim β -galaktozidazo, ki katalizira razgradnjo laktoze in njenih analogov. Nekateri plazmidni vektorji vsebujejo poleg gena *Amp^r* še gen *LacZ'*. Gen *LacZ'* kodira le N-končni del encima β -galaktozidaza. Nekateri sevi *E.coli* (npr. DH5a), nosijo spremenjen genski zapis za sekvenco *LacZ*, tako da ta kodira samo C-končni del β -galaktozidaze. Take celice lahko sintetizirajo le del proteina. Ko takšne celice sprejmejo plazmid z genom *LacZ'*, se preko alfa-komplementacije oba dela proteina združita v funkcionalen protein. Če v *LacZ'* gen na plazmidu vstavimo insert, s tem gen inaktiviramo in bakterija ne more sintetizirati funkcionalnega proteina. Če v medij poleg ampilina dodamo analog laktoze X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -galaktopiranozid) skupaj z IPTG (izopropiltiogalaktozid), ki inducira encim, se kolonije, katerih celice proizvajajo β -galaktozidazo obarvajo modro. Kolonije, ki vsebujejo celice z rekombinantnim plazmidom pa encima β -galaktozidaze ne morejo sintetizirati in so obarvane belo (26,28,35).

Nekateri plazmidi vsebujejo le en gen za rezistenco proti antibiotikom in ne vsebujejo gena *LacZ*. V tem primeru za iskanje rekombinantnih plazmidov uporabljamo druge metode, kot sta restrikcijska analiza z elektroforezo na agaroznem gelu in DNA sekveniranje.

2. Namen

3'-neprevedene regije mRNA vsebujejo z adeninom in uracilom bogate elemente (ARE). Ti elementi delujejo kot regulatorne regije in nadzirajo izražanje genov. Določeni proteini se lahko vežejo na te regije in s tem stabilizirajo ali destabilizirajo molekulo mRNA. Za proučevanje teh regij smo želeli osnovni luciferazni reporterski vektor pGL3 preoblikovati v vektor za TA kloniranje.

V okviru magistrske naloge, bo naš namen pripraviti in zgraditi molekularno orodje za TA-kloniranje in proučevanje regij 3'UTR mRNA, tako da bomo v luciferazni reporterski plazmid pGL3, na mesto pred luciferazni gen vstavili promotor CMV, na mesto za luciferazni gen pa posebno oblikovan sintezni insert. Insert po cepitvi z AhdI restrikcijskim encimom na obeh verigah DNA pusti previs, sestavljen iz enega samega T nukleotida. Delo bo obsegalo računalniški pregled genoma plazmida pGL3 in določitev potencialnih restrikcijskih mest. Sledila bo odstranitev že obstoječih AhdI prepoznavnih mest z metodo točkovne mutageneze. V nadaljevanju bomo v plazmid vstavili še CMV promotor ter sintezni insert, ki omogoča TA kloniranje.

Pripravljeni konstrukt bo pomembno orodje za poznejše raziskave izražanja genov v kostnih in drugih celicah.

3. Materiali in metode

3.1 Vzorec

Plazmid, katerega smo se odločili preoblikovati je luciferazni reporterski vektor pGL3 basic. Plazmid je velik 4818 baznih parov in vsebuje modificiran gen za luciferazo (*luc*⁺), ki je optimizirana za opazovanje transkripcijske aktivnosti v transfektiranih evkariontskih celicah. Poleg gena *luc*⁺, vsebuje še multiklonalno mesto, kjer se nahajajo prepoznavna mesta različnih restriktaz, fl ORI ter gen za beta laktamazo *Amp*^r. Plazmid ne vsebuje promotorskih ali ojačevalnih zaporedij (36).

3.2 Točkovna mutageneza

Material

- Vzorec (plazmid pGL3basic)
- Mutageni oligonukleotidni začetnik pGL3_mut_Ahd_F (100 μM)
 - 5'-CCATAGTTGCCTGGCTCCCCGTCGTGAG-3'
- Mutageni oligonukleotidni začetnik pGL3_mut_Ahd_R (100 μM)
 - 5'-CTACACGACGGGGAGCCAGGCAACTATGG-3'
- 5 x LR PCR Buffer (QIAGEN)
- DNA polymerase LR Qiagen (QIAGEN)
- Ultra čista voda
- Biorad C1000 Thermal cycler

Postopek dela

1. Preden se lotimo dela v komori, ves plastičen pribor v avtoklavu steriliziramo.
2. V PCR komoro damo avtoklaviran pribor, ki ga očistimo s 3 % raztopino hipoklorita. Prav tako očistimo delovno površino ter za 20 minut prižgemo UV luč. Reagente, ki jih uporabimo za PCR reakcijo vzamemo iz zmrzovalnika tik pred uporabo in pri tem pazimo, da niso izpostavljeni UV-svetlobi. Pred uporabo reagente premešamo na stresalniku.
3. Pripravimo dve reakcijski mešanici po shemi, ki je predstavljena v *preglednici I*.

Preglednica I: Sestava reakcijske zmesi za točkovno mutagenozo

Mešanica	1x volumen	1x volumen
dH ₂ O	33,6 µL	33,6 µL
5x pufer	10 µL	10 µL
pGL3_mut-Ahd-F (100 µM)	0,4 µL	/
pGL3_mut_Ahd_R (100 µM)	/	0,4 µL
DNA polymerase (RL qiagen)	2 µL	2 µL
DNA (pGL3 basic)	4 µL (50 ng)	4 µL (50 ng)

4. Mešanici nato postavimo v ciklični termostat in cikliramo po shemi prikazani v *preglednici II*

Preglednica II: Pogoji PCR reakcije I. stopnje točkovne mutagenoze

Stopnja	Čas	Temperatura	Število ciklov
Začetna denaturacija	5 minut	95 °C	} 10 x
Denaturacija	30 sekund	94 °C	
Prileganje	1 minuta	55 °C	
Podaljševanje	12 minut	68 °C	

5. Ko program konča, prenesemo vzorce nazaj v PCR komoro in v novo tubico odpipetiramo 25 µl vsake mešanice ter dodamo 0,75 µl DNA polimeraze. Pripravljeno mešanico nato ponovno postavimo v ciklični termostat in cikliramo po programu prikazanem v *preglednici III*

Preglednica III: Pogoji PCR reakcije II. stopnje točkovne mutagenoze

Stopnja	Čas	Temperatura	Število ciklov
Začetna denaturacija	5 minut	95 °C	} 18 x
Denaturacija	30 sekund	94 °C	
Prileganje	1 minuta	55 °C	
Podaljševanje	12 minut	68 °C	

6. Po končani PCR reakciji opravimo restrikcijo z encimom DpnI. Pripravimo reakcijsko mešanico (*preglednica IV*) in inkubiramo pri 37 °C 3-4 ure.

Preglednica IV: Reakcijska zmes za restrikcijo z DpnI restriktazo

Mešanica	Volumen
PCR produkt	17 µL
Pufer DpnI	2 µL
Encim DpnI	1 µL

7. Mutiran plazmid nato transformiramo v bakterije E. Coli DH5α.

3.3 Elektroforeza na agaroznem gelu

Material

- Agarozna-Agarose for routine use (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- Barvilo Midori green (Nippon Genetics EUROPE GmbH, Nemčija)
- Kadička za elektroforezo in vir napetosti (Bio-Rad, ZDA)
- Snemalnik gela z UV svetilko G:BOX (Syngene, VB)
- Računalnik s programsko opremo Gene Snap (Syngene, VB)
- 1x TAE pufer (tris acetat EDTA)
- Vzorec
- Nanašalni pufer ksilencianol
- Označevalec velikosti DNA; odseki velikosti 50, 150, 300, 500, 700, 1000 bp (promega, ZDA)
- Ultra čista voda

Postopek dela

Priprava 2 % agaroznega dela

1. V erlenmajerici zmešamo 1,5 g agaroze in 75 mL 1xTAE pufra.
2. Erlenmajerico postavimo na tehtnico in tehtnico nastavimo na 0.
3. V mikrovalovni pečici segrejemo raztopino agaroze do vrelišča, zmešamo dokler se ne raztopi vsa agarozna.

4. Tekočino, ki je izparela, nadomestimo z destilirano vodo (erlenmajerico postavimo na tehtnico in dopolnimo do 0).
5. Erlenmajerico prenesemo v digestorij, počakamo da se ohladi in dodamo 3 μL barvila Midori Green. Zmes dobro premešamo.
6. V digestoriju zmes previdno prelijemo v nosilce za gel (če so v raztopini prisotni mehurčki zraka jih prebodemo s pipetnim nastavkom).
7. Nastavke za gel zaščitimo pred svetlobo in počakamo da se gel strdi (30-60 minut).
8. Narejen gel vzamemo iz nosilca in ga shranimo na hladnem.

Postopek elektroforeze

1. S sterilnim skalpelom odrežemo gel potrebne velikosti (upoštevamo število žepkov glede na število vzorcev, kontrolnih vzorcev in označevalec velikosti DNA).
2. V kadičko za elektroforezo nalijemo 1x TAE pufer do oznake. Agarozni gel prenesemo na nosilec in ga skupaj z nosilcem popolnoma potopimo v kadičko za elektroforezo.
3. V prvi žepk gela nanese mešanico nanašalnega pufru ksilencianol (2 μL) in označevalca DNA (2,5 μL).
4. Vzorcem, ki jih želimo analizirati, dodamo 2 μL nanašalnega pufru ksilencianol in jih prenesemo na agarozni gel, vsakega v svoj žepk.
5. Kadičko pokrijemo in izvedemo elektroforezo pri pogojih 400 A, 100 V, 20 minut.
6. Po končani elektroforezi gel vzamemo iz nosilca, ga prenesemo v Gbox snemalnik in posnamemo sliko.

3.4 Izolacija DNA iz gela

DNA smo iz gela izolirali po protokolu QIAquick spin z uporabo pribora QIAquick Gel Extraction Kit (37).

Material

- QIAquick Gel extraction kit
 - a. Qiaquick Spin kolone 50x
 - b. Pufer QG 2x50 mL
 - c. Pufer PE 2x10 mL
 - d. Pufer EB 15 mL
 - e. Zbiralne tubice (2 mL) 50x

f. Barvilo Loading Dye 110 μ L

- Ultra čista voda
- 3M Natrijev acetat pH 5.0
- Etanol 96 %
- Izopropanol 100 %

Potek dela

1. Pod UV lučjo s sterilnim skalpelom iz gela izrežemo DNA .
2. Izrezan kos gela damo v mikrocentrifugirno tubico in ga stehtamo. Maso gela si zapišemo. V mikrocentrifugirko odpipetiramo 300 μ L pufra QG za vsakih 100 mg gela.
3. Inkubiramo pri 50 °C 10 minut, oziroma toliko časa, da se ves gel raztopi. Vmes vsake 2-3 minute premešamo na vibracijskem stresalniku.
4. Ko se ves gel raztopi, se prepričamo, da je raztopina rumene barve. Če je raztopina vijolične ali oranžne barve, dodamo 10 μ L 3M natrijevega acetata in premešamo.
5. Dodamo 100 μ L izopropanola za vsakih 100 mg gela.
6. V 2 ml zbiralno tubico damo QIAquick kolono in nanjo nanesemo pripravljen vzorec. Centrifugiramo 1 minuto pri 13000 rpm.
7. Kolono speremo s 500 μ L pufra QG in centrifugiramo 1 minuto pri 13000 rpm.
8. Na kolono nanesemo 750 μ L pufra PE in pustimo stati 2-5 minut, nato centrifugiramo 1 minuto pri 13000 rpm.
9. Po spiranju kolono ponovno centrifugiramo 1 minuto pri 13000 rpm, da se znebimo preostalega etanola iz pufra PE.
10. Kolono nato prenesemo v čisto 1,5 mL tubico in DNA eluiramo s 50 μ L pufra EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.0) ali 50 μ L ultra čiste vode. Centrifugiramo 1 minuto.

3.5 Restriksijska analiza

Restriksijske reakcije smo izvedli po protokolu proizvajalca New England Biolabs (38)

Material

- Restriksijski encimi NEB (New England Biolabs)
 - AhdI 10000 U/mL
 - XbaI 20000 U/mL
 - BglIII 10000 U/mL
 - HindIII 20000 U/mL
- Restriksijski pufri New England Biolabs
 - 1x CutSmart (50 mM kalijev acetat, 20 mM Tris-acetat, 10 mM magnezijev acetat, 100 µg/mL BSA; pH 7,9)
 - NEB 3.1 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 µg/mL BSA; pH 7,9)
- Ultra čista voda
- Ciklični termostat Biorad C1000 Thermal cycler

Postopek dela

1. Pred začetkom dela ves plastičen pribor avtoklaviramo, delovne površine in pipete prebršemo s 70 % raztopino etanola. Vsi encimi morajo med delom stati na ledu. Pufre pred uporabo odtalimo in jih zmešamo na vibracijskem stresalniku.
2. Pripravimo reakcijsko zmes po shemi (*preglednica V*) in inkubiramo pri 37 °C. BSA prepreči adhezijo encima na površino tubic in pipetnih nastavkov ter stabilizira nekatere encime. Tako pufer Cutsmart kot NEB 3.1 že vsebujeta BSA, zato tega ni treba posebej dodajati v reakcijsko mešanico. Vsak encim za delovanje potrebuje ustrezen pufer. Od sestavine pufra je odvisna aktivnost encima. Pri uporabi več različnih encimov hkrati uporabimo, pufer v katerem imajo vsi encimi čim večjo aktivnost. Encimi ter njihove aktivnosti v uporabljenih pufrih so prikazani v *preglednici VI*.
3. Čas inkubacije je odvisen od količine DNA, ki jo uporabimo za reakcijo. Na splošno velja, da v 50 µL reakciji 1U restriksijskega encima reže 1µg DNA v 1 uri. New England Biolabs v svojem protokolu priporoča uporabo 5-10 enot encima za vsak mikrogram DNA.

Preglednica V: Reakcijska zmes za restrikcijsko reakcijo

DNA	0,5-1 µg
Restrikcijski pufer	2-5 µL
BSA	100 µg/mL
Restrikcijski encim	5-10 enot
dH2O	do 20 µL
Celotni volumen	20 µL

Preglednica VI: Restrikcijski encimi ter njihova aktivnost v uporabljenih pufrih

Restrikcijski encim	Pufer	Aktivnost v pufru
AhdI	CutSmart	100 %
XbaI	CutSmart	100 %
HindIII	CutSmart	50 %
BglII	NEB 3.1	100 %

3.6 Ligacija

Ligacijo smo izvedli po protokolu TransformAid Bacterial Transformation z uporabo pribora Rapid DNA ligation Kit (39).

Material

- Rapid DNA ligation Kit (Thermo Scientific)
 - T4 DNA Ligase, 5 U/µL; 50 µl
 - 5x Rapid Ligation Buffer 1 mL
 - Water, nuclease free 1,25 mL
- Etanol 70 %
- Ultra čista voda

Postopek dela

1. Pred začetkom dela plastični pribor avtoklaviramo in delovne površine prebrišemo s 70 % etanolom.
2. Po navodilih iz Thermo Scientific Rapid DNA Ligation kit pripravimo reakcijsko mešanico (*preglednica VII*).

Preglednica VII: Reakcijska zmes za reakcijo ligacije

Komponenta	Lepljivi konci	Topi konci
Lineariziran vektor	20-100 ng	
Insert	Molarno razmerje insert:vektor 1:1 do 5:1	
10x T4 DNA ligazni pufer	2 μ L	
50% PEG 4000	/	2 μ L
T4 DNA ligaza	0,2 μ L (1U)	1 μ L (5U)
dH ₂ O	Do 20 μ L	
Celotni volumen	20 μ L	20 μ L

3. Inkubacija 10-60 minut pri 22 °C.

3.7 Bakterijska transformacija

Transformacijo plazmidov v bakterije *E. coli* DH5 α smo izvedli po protokolu TransformAid Bacterial Transformation z uporabo pribora TransformAid Bacterial Transformation Kit (39)

Material

- TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Scientific)
 - C-medij 35 mL
 - T-raztopina (A) 2x1,25 mL
 - T-Raztopina (B) 2x1,25 mL
- Tekoče gojišče LB
- Agar
- Ampicilin 100 mg/ml (Sigma-Aldrich GmbH, Nemčija)
- Etanol 70 %
- Bakterije *E.coli* DH5 α

Priprava gojišča

Priprava tekočega gojišča

V literski steklenici smo zmešali 16 g LB medija in 800 mL ultra čiste vode. Pripravljeno gojišče smo nato prinesli v štiri 200 mL steklenice in jih avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Gojišče smo hranili na sobni temperaturi.

Priprava trdnega gojišča

V literski steklenici smo zmešali 16 g LB medija, 12 g agarja in 800 mL ultra čiste vode. Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu 15 minut pri 121 °C. Po sterilizaciji smo pustili, da se je mešanica ohladila do 55 °C. Nato smo dodali 800 µL ampicilina in premešali. Gojišče smo prelili v petrijevke in pustili, da se je gel strdil. Tako pripravljena gojišča smo shranili v hladilniku.

Postopek dela

Priprava prekončne bakterijske kulture

1. Nad plamenskim gorilnikom v 10 mL falkonko odpipetiramo 2 mL C-medija.
2. Iz trdnega gojišča nato prenesemo v C medij eno bakterijsko kolonijo.
3. Na stresalniku nato inkubiramo preko noči pri 37 °C.

Transformacija

Vse korake izvajamo ob plamenskem gorilniku. Reagenti, ki jih uporabimo pri transformaciji morajo biti med celotnim postopkom na ledu.

1. V 10 mL falkonko odpipetiramo potrebno količino C-medija (1,5 mL za 2 transformaciji) in najmanj 20 minut segrevamo na 37 °C. Prav tako predhodno segrejemo petrijevke z agarjem in antibiotikom.
2. V 1,5 mL tubico zmešamo 250 µL T-raztopine (A) in 250µL T-raztopine (B). Pustimo stati na ledu.
3. V predhodno segreti C-medij odpipetiramo 150 µL prekončne bakterijske kulture in na stresalniku inkubiramo 1 uro pri 37 °C.
4. Bakterijske celice 1 minuto centrifugiramo. Supernatant odlijemo.
5. Celicam dodamo 300 µL T-raztopine in 5 minut inkubiramo na ledu.

6. Centrifugiramo 1 minuto. Supernatant odlijemo.
7. Celice resuspendiramo s 120 μ L T-raztopine in 5 minut inkubiramo na ledu.
8. V nove tubice dodamo do 5 μ L ligacijske mešanice (10-100 ng vektorja) in 2 minuti ohlajamo na ledu.
9. V vsako tubico z vektorjem dodamo 50 μ L pripravljenih celic in 5 minut inkubiramo na ledu.
10. Celotno vsebino vsake tubice odpipetiramo na agarne plošče z dodanim antibiotikom in enakomerno razmažemo po celotni površini. Plošče inkubiramo preko noči pri 37 $^{\circ}$ C.

3.8 Izolacija plazmida

Plazmide smo izolirali po protokolu QIAprep Miniprep z uporabo pribora QIAprep Spin Miniprep Kit (40).

Materiali

- QIAprep Spin Miniprep Kit
 - QIAprep Spin kolone 50x
 - Pufer P1 20 mL
 - Pufer P2 20 mL
 - Pufer N3 30 mL
 - Pufer PB 30 mL
 - Pufer EB 15 mL
 - LyseBlue 20 μ L
 - RNase A⁺ 2 mg
 - Zbiralne tubice (2 mL) 50x
- LB tekoče gojišče

Postopek dela

Namnožitev bakterij v tekočem gojišču

1. S trdnega gojišča izberemo eno samo bakterijsko kolonijo in jo inokuliramo v 1-5 mL LB tekočega gojišča. Dodamo ampicilin (1 μ L ampicilina na 1 mL gojišča). Inkubiramo 12-16 ur pri 37 °C na stresalniku.
2. Po inkubaciji bakterije centrifugiramo na sobni temperaturi, 3 minute pri > 8000 rpm.
3. Ves supernatant odlijemo, če je potrebno si pomagamo s pipeto.

Izolacija plazmida iz bakterijskih celic

1. Pred začetkom dela pripravimo potrebne raztopine:
 - a. 20 mililitrom pufra P1 dodamo 1 vialo RNaze do končne koncentracije 100 μ g/mL
 - b. Pufra PE dodamo 96 % etanol
2. Bakterijam dodamo 250 μ L pufra P1 in na vibracijskem stresalniku premešamo, da se bakterije popolnoma resuspendirajo.
3. Dodamo 250 μ L pufra P2 in nežno zmešamo tako, da tubico 4-6 krat obrnemo. Za mešanje ne uporabljamo vibracijskega stresalnika, saj s tem lahko pretrgamo genomsko DNA. Reakcija lize ne sme potekati več kot 5 minut.
4. Dodamo 350 μ L pufra N3 in takoj zmešamo tako, da tubico obrnemo 4-6 krat.
5. V namizni mikrocentrifugirki bakterije centrifugiramo 10 minut pri 13000 rpm.
6. QIAprep kolono prenesemo v čisto 1,5 mL tubico. Supernatant iz točke 5 s pipeto prenesemo na kolono in centrifugiramo 30-60 sekund.
7. QIAprep kolono speremo z 0,5 mL pufra PB in centrifugiramo 30-60 sekund.
8. QIAprep kolono speremo z 0,5 mL pufra PE in ponovno centrifugiramo 30-60 sekund. Vsebino tubice odlijemo ter ponovno centrifugiramo 1 minuto, da odstranimo ostanke pufra. Pomembno je, da pufer temeljito odstranimo, saj lahko etanol iz pufra PE inhibira nadaljnje encimske reakcije.
9. QIAprep kolono postavimo v novo 1,5 mL tubico. Za elucijo DNA na center kolone odpipetiramo 50 μ L pufra EB (10 mM Tris-cl, pH 8.5). Namesto pufra lahko uporabimo vodo ustrezne čistosti in pH. Kolono pustimo stati 1 minuto in nato 1 minuto centrifugiramo.

3.9 Verižna reakcija s polimerazo

Odsek gena UGT1A1 smo pomnožili po protokolu laboratorija za molekularno diagnostiko, Fakultete za farmacijo (41).

Materiali

- Vzorec (DNA izolirana iz vzorca venske krvi)
- AmpliTaqGold™ PCR kit (Applied Biosystems, ZDA)
 - AmpliTaqGold™ polimeraza (5 U/μL)
 - GeneAmp™ 10 x PCR Gold Buffer; 500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl, pH=8.3
 - 25 mmol/L MgCl₂
- Oligonukleotidni začetnik UGT1A1-at6-F
 - 5'-GGCACGGCTGTCCAAG-3' (Qiagen GmbH, Nemčija)
- Oligonukleotidni začetnik UGT1A1-at6-R
 - 5'-CCCGGCCTGGTACTG-3' (Qiagen GmbH, Nemčija)
- Raztopina dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, vsakega v koncentraciji 2 mM)
- Ultra čista voda
- Biorad C1000 Thermal Cycler

Postopek dela

1. Pred začetkom dela v komori, ves plastičen pribor v avtoklavu steriliziramo.
2. V PCR komoro vnesemo avtoklaviran pribor, ki ga očistimo s 3 % raztopino hipoklorita. Prav tako očistimo delovno površino ter za 20 minut prižgemo UV luč. Reagente, ki jih uporabimo za PCR reakcijo vzamemo iz zmrzovalnika tik pred uporabo in pri tem pazimo, da niso izpostavljeni UV-svetlobi. Pred uporabo reagente premešamo na stresalniku.
3. Pripravimo reakcijske zmesi. Sestava zmesi je podana v *preglednici VIII*.

Preglednica VIII: Sestava reakcijske zmesi za PCR reakcijo

Komponenta	1x Volumen	n x Volumen	Slepa raztopina
10x Gold pufer	2,5 µL	n x 2,5 µL	2,5 µL
Raztopina dNTP (2 mmol/L)	2,5 µL	n x 2,5 µL	2,5 µL
Raztopina MgCl ₂	2,0 µL	n x 2,0 µL	2,0 µL
UGT1A1-at6-F (5 µmol/L)	1,0 µL	n x 1,0 µL	1,0 µL
UGT1A1-at6-R (5 µmol/L)	1,0 µL	n x 1,0 µL	1,0 µL
Taq – polimeraza (5 U/ µL)	0,1 µL	n x 0,1 µL	0,1 µL
DNA (10 ng/µl)	1,0 µL	n x 1,0 µL	/
Ultra čista voda	Do 25 µL	Do n x 25 µL	Do 25 µL

4. Tubice z vzorci in tubico s slepo raztopino vložimo v ciklični termostat in zaženemo program po shemi prikazani v *preglednici IX*.

Preglednica IX: Pogoji za PCR reakcijo pomnoževanja odseka gena UGT1A1

stopnja	čas	temperatura	število ciklov
začetna denaturacija	12 minut	95 °C	1
denaturacija	30 sekund	94 °C	} 40 x
prileganje	30 sekund	65.5 °C	
podaljševanje	30 sekund	72 °C	
zaključno podaljševanje	7 minut	72 °C	1
shranjevanje	∞	4 °C	

5. Po končani PCR reakciji vzorce in slepo raztopino centrifugiramo 30 sekund v mikrocentrifugi. Uspešnost PCR preverimo z elektroforezo.

3.10 Čiščenje produktov PCR reakcije

PCR produkte ter nekatere plazmidne vektorje smo očistili po protokolu QIAquick PCR purification z uporabo pribora QIAquick PCR purification kit (34)

Material

- QIAquick PCR Purification Kit
 - QIAquick Spin kolone 50x
 - Pufer PBI 30 mL
 - Pufer PE 2 x 6 mL
 - Pufer EB 15 mL
 - Zbiralne tubice 2 mL 50x
 - Loading Dye 110 μ L
- 96 % Etanol
- 3M Natrijev acetat, pH 5.0
- Ultra čista voda

Postopek dela

1. Enemu volumnu PCR produktov dodamo 5 volumnov pufra PBI. (na primer 100 μ l PCR dodamo 500 μ l pufra).
2. Če je barva mešanice oranžna ali vijolična, dodamo 10 μ l 3M natrijevega acetata in premešamo, da se obarva rumeno.
3. Raztopino nanesimo na QIAquick kolono in centrifugiramo 1 minuto pri 13000 rpm.
4. Kolono speremo z 750 μ l pufra PE in centrifugiramo 1 minuto pri 13000 rpm.
5. Po spiranju kolono ponovno 1 minuto centrifugiramo pri 13000 rpm, da se znebimo ostankov etanola iz pufra PE.
6. DNA eluiramo s dodatkom 50 μ l pufra EB ali vode.

3.11 Spektrofotometrična določitev koncentracije in čistosti DNA

Material

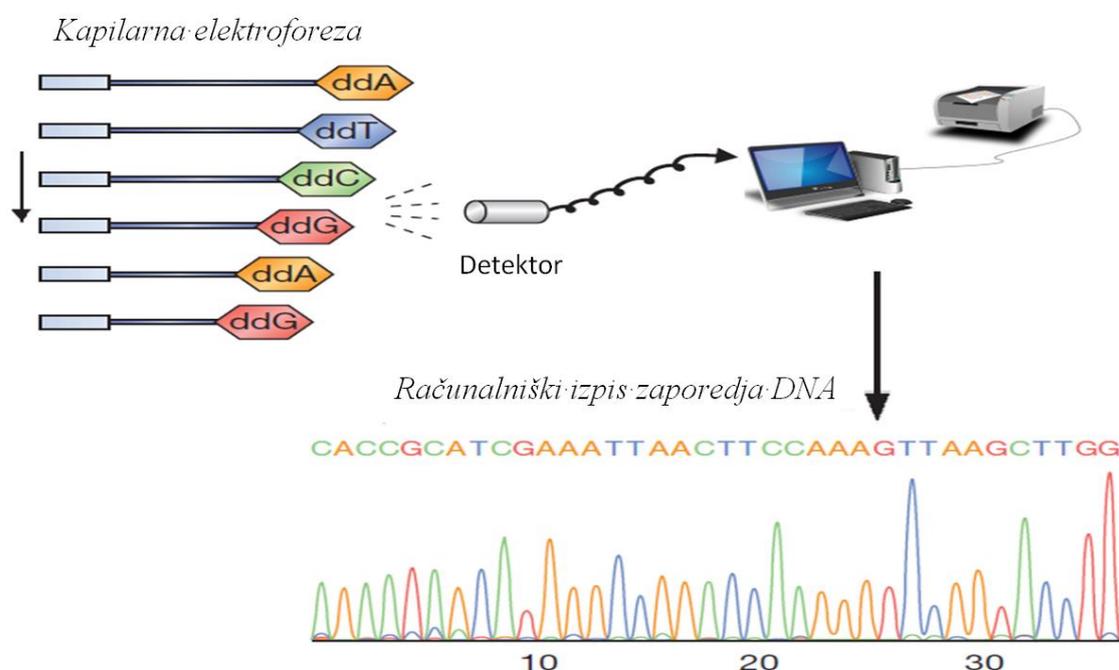
- Vzorec DNA
- Ultra čista voda
- Spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, ZDA)

Postopek dela

Najprej izmerimo absorbanco slepe raztopine, tako da na nosilec naneseemo 1-2 μl destilirane vode in izmerimo absorbanco (če namesto vode uporabljamo drugo topilo, naneseemo tega). Merilno roko približamo kapljici vzorca in v programu zaženemo meritev slepe raztopine. Nato na nosilec naneseemo 1-2 μl vzorca in zaženemo meritev. Za merjenje z NanoDrop spektrofotometrom ne potrebujemo kivet, saj posebna retencijska tehnologija drži vzorec na mestu s pomočjo površinske napetosti. Ko se merilna roka dotakne vzorca, se ustvari stebriček tekočine skozi katero potuje svetloba. Računalniški program nato izračuna koncentracije na podlagi Beer-Lambertovega zakona. Pri tem upošteva ekstinkcijski koeficient 50 $\text{ngcm}/\mu\text{L}$ za dsDNA in 33 $\text{ngcm}/\mu\text{l}$ za ssDNA ter pot potovanja svetlobe 0.2 mm. Program poda tudi razmerja absorbanca 260/280, ki nam podajo informacijo o čistosti DNA. Vrednosti okoli 1.8 veljajo za čisto DNA. Če so vrednosti razmerja absorbanca 260/280 občutno nižje, to kaže na prisotnost nečistot, kot so proteini, fenoli, ali druge snovi, ki absorbirajo pri ali blizu 280 nm (42).

3.12 Sekvenčna analiza z metodo DTCS

Sekvenčno analizo smo izvedli po protokolu DTCS Quick Start protocol z uporabo pribora Dye terminator cycle sequencing (DTCS) Quick start kit. Metoda temelji na PCR reakciji. Reakcijski zmesi za PCR dodamo poleg deoksinukleotidov (dNTP) še dideoksinukleotide (ddNTP). Vsak ddNTP je označen s fluorescentnim barvilom različne valovne dolžine. DNA polimeraza ne loči med dNTP in ddNTP in jih tekom podaljševanja vgradi v podaljšujočo verigo. Ker imajo ddNTP na 3' mestu namesto OH skupine vezan H, se podaljševanje tu ustavi. Po določenem številu ciklov tako dobimo fragmente DNA vseh velikost. Te fragmente nato analiziramo v DNA sekvenatorju z metodo kapilarne elektroforeze (28,43) (slika 5).



Slika 5: postopek DNA sekvenciranja z metodo DTCS

Material

- Dye terminator cycle sequencing (DTCS) Quick start kit (Beckman Coulter, ZDA):
 - DTCS Quick Start Master Mix 880 μ L
 - dATP, dCTP, dTTP, dITP
 - ddUTP, ddGTP, ddCTP, ddATP (WellRED label)
 - Tris-HCl, MgCl₂, reakcijski pufer pH 8.9
 - Thermo Sequenase DNA polymerase I

- Pyrophosphatase
- Glycogen (20 mg/mL) 110 µL
- Mineralno olje 5 mL
- Sample loading solution (SLS) 6 mL
- Oligonukleotidni začetnik
 - AhdI_seq: 5'-GCGAACTACTTACTCTAGCTTC
 - pGL3_seq_F: 5'-TACTAACATACGCTCTCCATCA
- 3M Natrijev acetat pH 5.2
- 100 mM Na₂-EDTA pH 8.0
- Ultra čista voda
- 95 % raztopina Etanol/dH₂O
- 70 % raztopina Etanol/dH₂O
- Ciklični termostat Biorad C1000 Thermal Cycler
- DNA sekvenator (Beckman Coulter, ZDA)

Postopek dela

Priprava vzorca DNA

Vzorec DNA, kateremu želimo določiti nukleotidno zaporedje, izoliramo iz celic po protokolu QIAprep spin. Količina DNA, ki jo uporabimo za sekveniranje, je odvisna od tega, v kakšni obliki se nahaja DNA (dvoverižna plazmidna DNA, enoverižna DNA, PCR produkti ...). *Preglednica X* in *preglednica XI* prikazujeta priporočeno količino DNA za uporabo pri reakciji sekveniranja po protokolu DTCS Quick Start.

Preglednica X: Priporočena koncentracija DNA za uporabo pri DNA sekveniranju po protokolu DTCS Quick Start

Oblika DNA	Količina DNA (mol)
dsDNA	50-100 fmol
ssDNA	25-50 fmol
Očiščeni PCR produkti	25-100 fmol

Preglednica XI: Ocena količine dvoverižne DNA

Velikost DNA (kilobazni pari)	ng za 25 fmol	ng za 50 fmol	ng za 100 fmol
2,0	33	65	130
3,0	50	100	195
4,0	65	130	260
5,0	80	165	325
6,0	100	195	390
8,0	130	260	520
<i>Če uporabimo ssDNA vrednosti (ng) delimo z 2</i>			

Priprava reakcijske mešanice za DNA sekveniranje

1. Pipetne nastavke in 0,2 mL mikrocentrifugirne tubice pred začetkom dela avtoklaviramo. PCR komoro prebiršemo z 0,3 % hipokloritom in za 20 minut prižgemo UV luč. Ves pribor pred vnosom v komoro prebrišemo z 0,3 % raztopino hipoklorita.
2. V 0,2 mL tubicah pripravimo reakcijsko zmes. Sestava zmesi je podana v *preglednici XII*. Reagente pustimo med pripravo na ledu in jih reakcijski zmesi dodajamo v zaporedju kot je napisan v tabeli. Pri sekveniranju daljših nukleotidnih zaporedji dH₂O in vzorčno DNA segrevamo v cikličnem termostatu 5 minut pri 65°C in nato, pred dodatkom ostalih reagentov, ohladimo do sobne temperature.

Preglednica XII: Sestava reakcijske zmesi za DNA sekveniranje

dH₂O	0-9,5 µl
Vzorčna DNA	0,5 - 10 µl
Oligonukleotidni začetnik	2,0 µl
DTCS Quick Start Master Mix	8,0 µl
Celotni volumen	20,0 µl

3. Reakcijsko zmes prenesemo v ciklični termostat in cikliramo po programu prikazanem v *preglednici XIII*.

Preglednica XIII: Pogoji PCR reakcije za DTCS sekveniranje

stopnja	čas	temperatura	število ciklov
denaturacija	20 sekund	96 °C	} 30 x
prileganje	20 sekund	50 °C	
podaljševanje	4 minute	60 °C	

Obarjanje z etanolom

1. Za vsak vzorec pripravimo označene, sterilne 0,5 mL mikrocentrifugirne tubice.
2. Nato sveže pripravimo raztopino za ustavitev reakcije. Sestava je podana v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Sestava reakcijske zmesi za ustavitev reakcije sekveniranja

Reagent	1*Volumen (µL)	n*Volumen (µL)
3M natrijev acetat	2	2*n
100 mM Na₂-EDTA	2	2*n
Glikogen	1	1*n
<i>*n – število vzorcev</i>		

3. V vsako označeno 0,5 ml tubico odpipetiramo 5 µL raztopine za ustavitev reakcije.
4. V vsako tubico nato odpipetiramo ustrezno sekvenčno reakcijo in premešamo.
5. Dodamo 60 µL 95 % raztopine etanol/dH₂O ohlajene na -20 °C, premešamo in centrifugiramo 15 minut pri 14.000 rpm in 4 °C. Supernatant previdno odlijemo.
6. DNA dvakrat speremo s 70 % raztopino etanol/dH₂O ohlajeno na -20 °C in po vsakem spiranju centrifugiramo 2 minuti pri 14000 rpm in 4 °C. Po vsakem centrifugiranju supernatant temeljito odstranimo.
7. Vzorce posušimo do suhega in resuspendiramo v 40 µL SLS.

Priprava vzorca za kapilarno elektroforezo

1. Resuspendiran vzorec prenesemo v vdolbinice vzorčne ploščice.
2. Na vsak vzorec naneseemo kapljico mineralnega olja.
3. Vzorec vložimo v sekvenator in začnemo program LFRa. Pogoji so prikazani v preglednici XV.

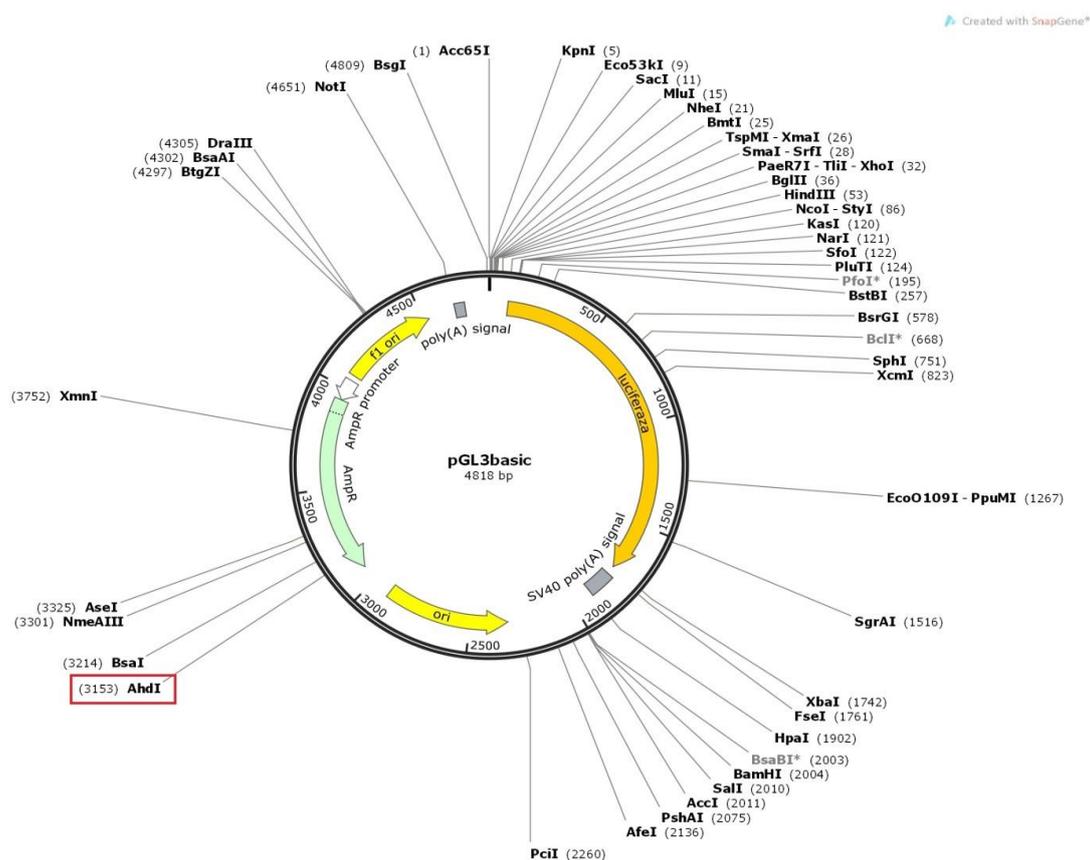
Preglednica XV: Pogoji kapilarne elektroforeze

Denaturacija (denature)	90°C	120 sekund
injekcija (inject)	2,0 kV	15 sekund
Ločevanje (separate)	4,0 kV	110 minut
Temperatura kapilare	50°C	

4. Rezultati in razprava

4.1 Računalniška analiza genoma

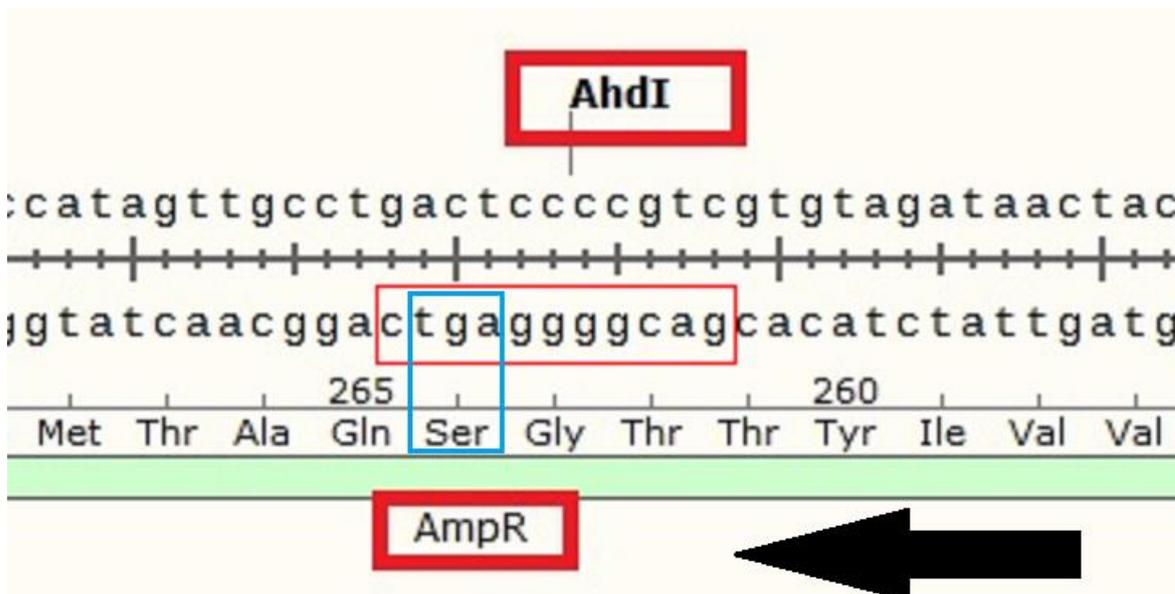
Vektor za TA kloniranje smo želeli zgraditi tako, da bi v izbran plazmid vstavili posebno zgrajen insert, ki bi po cepitvi z AhdI restriktazo pustil na vektorju T-previse. Dela smo se lotili tako, da smo s programom *SnapGene* analizirali genom osnovnega plazmida pGL3 basic (slika 6). Analiza je pokazala, da plazmid že vsebuje AhdI restriktcijsko mesto, in sicer v genu za beta laktamazo (*Amp^r*). Dodatno AhdI mesto bi naredilo tak vektor neuporaben, zato smo morali najti način kako to mesto odstraniti. Z istim programom smo določili aminokislinsko zaporedje gena in ugotovili, da končni del AhdI prepoznavnega zaporedja kodira aminokislino serin (slika 7). Z zamenjavo zadnjega nukleotida v kodonu bi lahko AhdI prepoznavno mesto uničili, ne da bi s tem vplivali na aminokislinsko zaporedje gena *Amp^r*. To smo naredili z uporabo metode točkovne mutageneze.



Slika 6: Analiza restriktcijskih mest osnovnega plazmida pGL3 s programom *SnapGene*

4.2 Točkovna mutageneza

Metodo točkovne mutageneze lahko uporabimo zaradi posebne lastnosti genetskega koda. Genetski kod sestavljajo kodoni. Kodoni so zaporedja treh nukleotidov in kodirajo aminokislino. Eno aminokislino lahko kodira več različnih kodonov. Te se ponavadi med seboj razlikujejo le v zadnjem nukleotidu. Če ta nukleotid zamenjamo z drugim, lahko še vedno dobimo isto aminokislino. Na *sliki 7* je prikazano nukleotidno zaporedje gena za beta laktamazo, kjer se nahaja prepoznavno mesto za AhdI restriktazo. AhdI prepoznavno mesto je definirano z nukleotidnim zaporedjem 5'-GACNNNNNGTC-3'. 5'-končno zaporedje GAC in 3'-končno zaporedje GTC sta nujna za uspešno cepitev DNA, N pa predstavlja poljubni nukleotid. Če hočemo odstraniti prepoznavno mesto, moramo torej zamenjati nukleotid bodisi v zaporedju GAC bodisi v zaporedju GTC. Če na sliki gledamo v smeri translacije (označeno s puščico), lahko na matrični verigi vidimo, da se kodon AGT, ki kodira aminokislino serin prekriva z zaporedjem GTC. Če kodon AGT spremenimo v kodon AGC, ohranimo serin ter odstranimo AhdI restrikcijsko mesto.

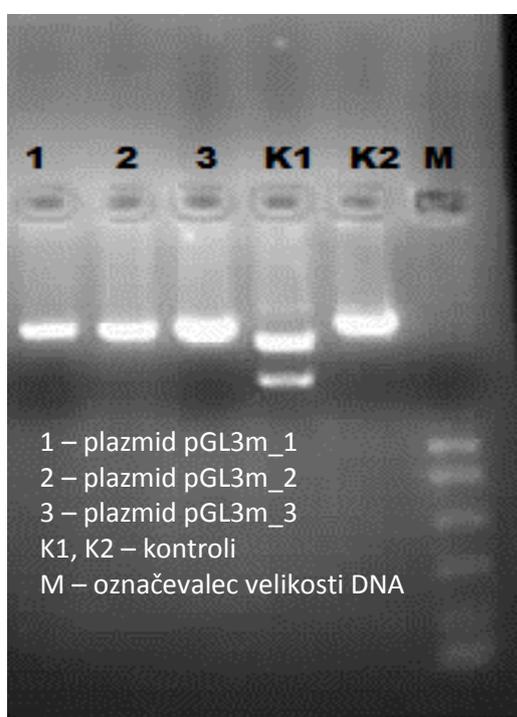


Slika 7: Nukleotidno zaporedje gena Amp^r, kjer se nahaja AhdI cepitveno mesto

Točkovna mutageneza temelji na PCR reakciji. Oligonukleotidni začetnik mora biti komplementaren mestu kamor želimo uvesti mutacijo. Načrtujemo ga tako, da vsebuje 10-15 komplementarnih baznih parov, mutacijo in še dodatnih 10-15 baznih parov. Po mutagenesi smo nastalem produktu dodali restrikcijski encim DpnI in inkubirali 2 uri pri 37 °C. Encim DpnI selektivno cepi metilirane in semimetilirane plazmide na mestu 5'-Gm6ATC-3'. S tem smo odstranili osnovni, nemutiran plazmid. Po inkubaciji smo produkte transformirali v *E. coli* DH5 α , bakterije cepili na trdno gojišče z ampicilinom in inkubirali preko noči pri 37 °C. Prisotnost mutacije smo preverili z restrikcijsko analizo. S trdnega gojišča smo v tekoče gojišče z ampicilinom prenesli tri naključne kolonije in inkubirali 6 ur. Plazmid smo nato izolirali s postopkom alkalne lize po protokolu Qiaprep spin. Metoda temelji na alkalni lizi bakterijskih celic. Bakterije liziramo z raztopino NaOH/SDS. Pri tem moramo paziti, da čas izpostavitve alkalnim pogojem ni predolg, saj v tem primeru lahko pride do ireverzibilne denaturacije plazmida. Takega plazmida ne moremo uporabiti za nadaljnjo restrikcijsko reakcijo. Lizat nato nevtraliziramo s kalijevim acetatom. Tako ustvarimo okolje z visoko koncentracijo soli, kar omogoča, da se denaturirani proteini, kromosomska DNA, ostanki celic ter SDS oborijo. Manjša plazmidna DNA se renaturira in ostane v raztopini. Raztopino plazmida nato prenesemo na QIAprep spin kolono, ki vsebuje silikatno membrano. Plazmidna DNA se v prisotnosti kaotropnih soli na kolono selektivno veže. DNA nato eluiramo s pufrom Tris-Cl ali vodo. Koncentracije in čistost izoliranih plazmidov smo nato določili spektrofotometrično z uporabo NanoDrop spektrofotometra. Za restrikcijsko reakcijo smo uporabili 500 ng plazmidne DNA, restrikcijska encima AhdI in XbaI ter puffer CutSmart. Kot kontrolo 1 smo uporabili nemutiran plazmid pGL3, ki smo mu dodali restiktazi XbaI in AhdI. Za kontrolo 2 pa smo uporabili nemutiran encim pGL3, ki smo mu dodali le restiktazo XbaI. Reakcijsko zmes smo nato inkubirali 2 uri pri 37 °C (*preglednica XVI*).

Preglednica XVI: Sestava reakcijske zmesi za restriksijsko analizo produktov točkovne mutageneze

Reagent	pGL3m_1	pGL3m_2	pGL3m_3	Kontrola 1	Kontrola 2
Pufer CutSmart	2	2	2	2	2
Restriktaza AhdI	0,5	0,5	0,5	0,5	/
Restriktaza XbaI	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
DNA	1,6	5,2	10,6	16	16
dH ₂ O	13,4	9,8	4,4	4,5	4
Celotni volumen	20	20	20	25	25



Slika 8: Gelska elektroforeza restriksijske reakcije produktov točkovne mutageneze

Produkte restriksijske reakcije smo nato analizirali z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu. Na elektroforeznem gelu (slika 8) vidimo pri kontroli 1(K1) dva fragmenta, ki sta posledica cepitve plazmida z restriktazama XbaI in AhdI. Liso pri kontroli 2 (K2) predstavlja plazmid pGL3, rezan samo z restriktazo XbaI. Pri naših vzorcih (1, 2, 3) vidimo samo en fragment enake velikosti kot kontrola 2. Rezultati kažejo na to, da je mutacija gena *Amp^r* uspela, saj encim AhdI DNA več ne reže. Prisotnost mutacije smo nato potrdili še s sekvenčno analizo. Za reakcijo sekveniranja smo uporabili oligonukleotidni začetnik *AhdI_seq.* (slika 9). Vidimo lahko zaporedje GACGGGGAGCC. Kodon AGT smo uspešno zamenjali s kodonom AGC.

verigi DNA. Začetni in končni del zaporedja sta komplementarna zaporedju CTAG. To zaporedje ostane po cepitvi DNA z XbaI restriktazo in omogoča vstavljanje MCS_Ahd inserta v XbaI restriksijsko mesto izbranega plazmida.

Bakterije s plazmidom pGLm_3 smo ponovno namnožili v tekočem gojišču, kateremu smo dodali ampicilin in preko noči inkubirali na 37 °C. Plazmid smo izolirali ter spektrofotometrično določili koncentracije. Po izolaciji smo pripravili restriksijsko reakcijo (*preglednica XVII*) in inkubirali 3 ure na 37 °C. Plazmide smo po restriksijski reakciji očistili z uporabo pribora QIAquick PCR purification kit.

Preglednica XVII: Sestava reakcijske mešanice za restriksijsko reakcijo z XbaI restriktazo

Reagent	Volumen (μL)
Restriksijski pufer Cutsmart	2
Restriktaza XbaI	2
DNA (pGL3m)	6,8
dH2O	8,2

Ko DNA cepimo z enim restriksijskim encimom, lahko dobimo linearen plazmid z dvema komplementarnima koncema. Ta konca lahko med seboj rehibridizirata. Da bi preprečili rehibridizacijo, smo 5'-konec plazmida defosforilirali z dodatkom 10 enot encima alkalna fosfataza (CIP; ang.: calf intestinal phosphatase) in inkubirali 60 minut pri 37 °C. S tem preprečimo tvorbo fosfodiesterne vezi med 5'-fosfatno skupino in 3'-hidroksilno skupino. Med inkubacijo smo pripravili insert MCS_Ahd. 5 μ L oligonukleotidnega začetnika MCS_1F (5'-P-CTAGAGAATTCGACCTTGAGTCGACAGATGGTCGAATTCT) smo zmešali s 5 μ L nukleotidnega začetnika MCS_1R (5'-P-CTAGAGAATTCGACCATCTGTGCTCAAGGTCGAATTCT). Mešanico smo segreli na 95 °C in pustili, da se je postopoma ohladila na sobno temperaturo. Med ohlajanjem pride do rehibridizacije obeh oligonukleotidnih začetnikov in tvorbe dvoverižne DNA. Po končani inkubaciji smo plazmid očistili po protokolu Qiagen PCR purification in se lotili ligacije. Za ligacijo smo uporabili 100 ng vektorske DNA in 2,5 ng inserta. Vektor in insert smo zmešali v molskem razmerju 1:3. Potrebno količino inserta smo ocenili s pomočjo *enačbe 1*.

$$m_i = \frac{m_v \times N_i}{N_v} \times \left(\text{molski delež} \frac{\text{insert}}{\text{vektor}} \right)$$

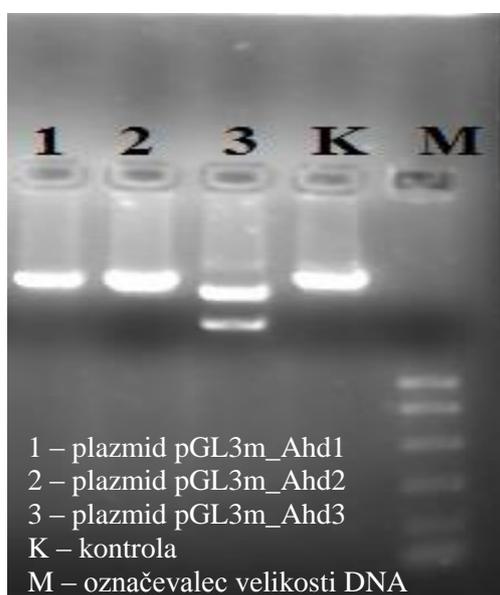
m_i – masa inserta

m_v – masa vektorja

N_i – število baznih parov inserta

N_v – število baznih parov vektorja

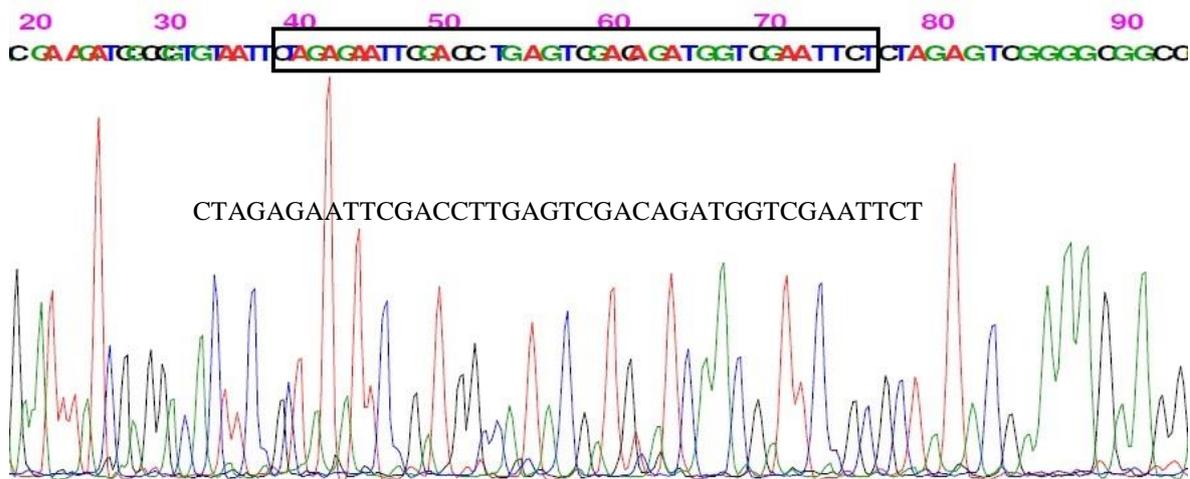
Enačba 1 Ocena količine inserta za ligacijo v vektor



Slika 11: Rezultat restrikcijske analize ligacije MCS_Ahd

Po ligaciji smo vektor transformirali v bakterije *E. Coli* DH5 α . Transformirane bakterije smo cepili na petrijevke z agarjem in ampicilinom in jih preko noči inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo izbrali tri naključne kolonije in vsako prenesli v 5 mL LB tekočega gojišča z ampicilinom in inkubirali še dodatnih 6ur. Po končani inkubaciji smo plazmide izolirali in spektrofotometrično izmerili njihove koncentracije. Plazmide, ki smo jih poimenovali pGL3m_Ahd1-3, smo nato analizirali z restrikcijsko analizo in elektroforezo na agaroznem gelu. Za restrikcijsko reakcijo smo uporabili restrikcijska encima AhdI in HindIII. Prvi reže DNA znotraj našega inserta, drugi pa

1689 bp stran. Če se je insert uspešno vključil, bi morali pod posameznim vzorcem na agaroznem gelu videti dve lisi. Kot kontrolo smo uporabili plazmid pGL3m brez vstavljenega inserta. Slika 11 prikazuje agarozni gel po končani elektroforezi. Pri vzorcu 3 vidimo dve lisi, kar kaže na to, da sta oba encima rezala DNA. Rezultat smo nato še dodatno preverili s sekvenčno analizo. Za sekveniranje smo uporabili oligonukleotidni začetnik pGL3_seq_F. Slika 12 prikazuje rezultat sekveniranja, kjer lahko jasno vidimo zaporedje MCS_Ahd inserta znotraj XbaI restrikcijskega mesta.



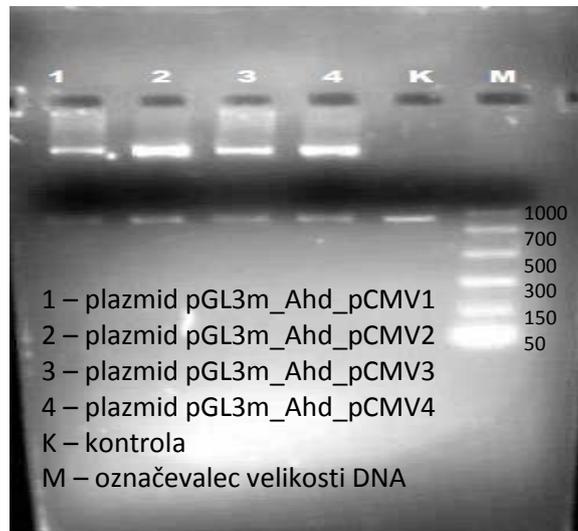
Slika 12: Rezultat sekvenčne analize plazmida pGL3m_Ahd

4.4 Uvedba citomegalovirusnega promotorja

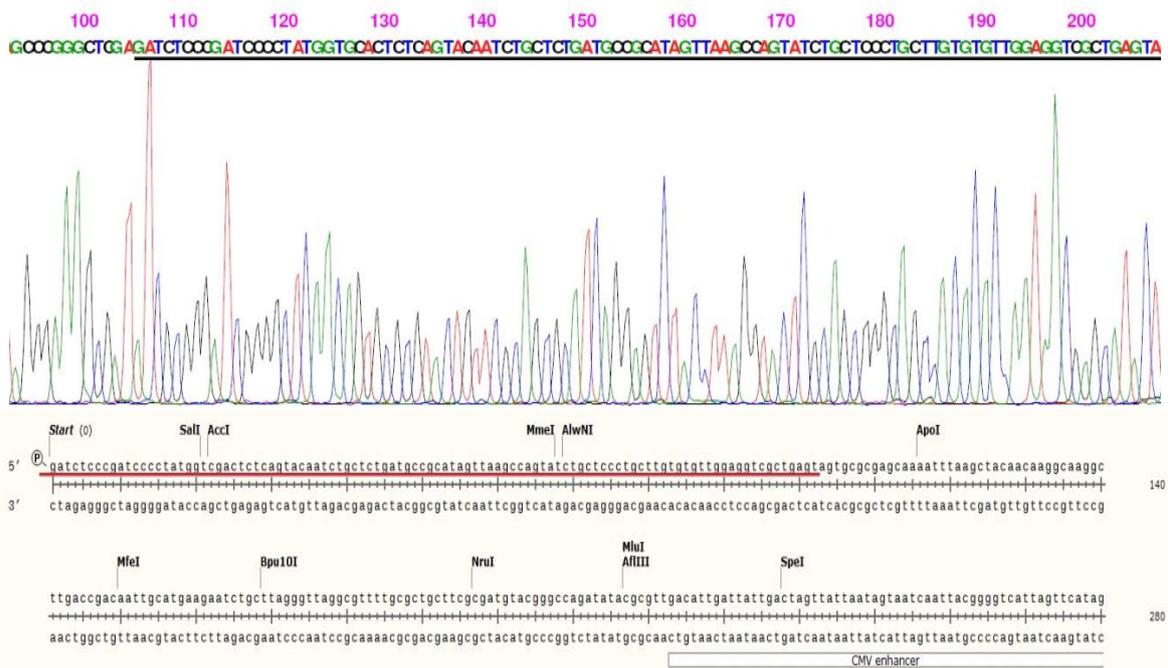
Citomegalovirusni (CMV) promotor smo izrezali iz plazmida pcDNA3. Izrezan odsek DNA je dolg 877 bp in je sestavljen iz CMV ojačevalnega zaporedja in CMV promotorja. Za restrikcijsko reakcijo smo uporabili 1 µg plazmida pcDNA3, restriktazi BglIII in HindIII ter pufer NEB 3.1. Reakcijsko zmes smo inkubirali 3 ure pri 37 °C. Po inkubaciji smo celotno raztopino odpipetirali na agarozni gel in fragmente med seboj ločili z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu. Manjši fragment smo pod UV-lučjo izrezali iz gela in ga očistili po protokolu Qiagen gel extraction. Hkrati smo z istimi encimi naredili tudi restrikcijo plazmida pGLm_Ahd. Po restrikciji smo plazmid očistili in vstavili vanj promotor CMV. Rekombinantne plazmide pGL3m_Ahd_pCMV smo nato transformirali v *E.coli* DH5α in bakterije nanesli na trdno gojišče z ampicilinom ter preko noči inkubirali pri 37 °C.

Po inkubaciji smo naključno izbrali štiri bakterijske kolonije in jih prenesli v tekoče gojišče, kateremu smo dodali ampicilin. Bakterije smo inkubirali 8 ur na 37 °C in nato izolirali plazmide. Izolirane plazmide smo zmešali z restriktazama BglIII in HindIII ter inkubirali 1 uro pri 37 °C. Nato smo reakcijsko zmes nanesli na agarozni gel in naredili elektroforezo. Kot kontrolo smo na gel nanesli izoliran odsek promotorja CMV. Na sliki elektroforeznega gela (*slika 13*) lahko pri vseh štirih vzorcih vidimo liso, ki ustreza promotorju CMV. Uspešnost ligacije smo potrdili še s sekvenčno analizo (*slika 14*). Za sekveniranje smo

uporabili oligonukleotidni začetnik pGL3_seq_F. Na sliki lahko vidimo zaporedje BglII restrikcijskega mesta (AGATCT) in začetno zaporedje izrezanega odseka promotorja CMV.



Slika 13: Rezultat restrikcijske analize ligacije promotorja CMV



Slika 14: Rezultat sekvenčne analize plazmida pGL3m_Ahd_pCMV4 skupaj z nukleotidnim zaporedjem začetnega dela promotorja CMV

4.5 Preizkus funkcionalnosti vektorja

Da bi preverili funkcionalnost molekularnega orodja, smo v AhdI mesto vstavili odsek gena UGT1A1. Za ta odsek smo se odločili, ker se rutinsko uporablja v laboratoriju za molekularno diagnostiko fakultete za farmacijo in smo zanj že imeli optimizirano PCR reakcijo. Za pomnožitev smo uporabili človeško DNA izolirano iz vzorca venske krvi. Produkta PCR smo izolirali in očistili z gelsko ekstrakcijo pod UV-lučjo po protokolu Qiagen gel extraction.

Vzporedno s PCR reakcijo smo pripravili vektor. Plazmid pGL3mAhd_pCMV smo linearizirali z restrikcijskim encimom AhdI. Reakcijsko zmes smo inkubirali 1 uro pri 37 °C in nato z elektroforezo na agaroznem gelu ločili izrezani fragment DNA ter s tem preprečili ponovno ligacijo. Lineariziran plazmid smo pod UV-lučjo izrezali iz gela in ga očistili po protokolu Qiagen gel extraction. Nato smo opravili ligacijo z UGT1A1 v razmerju 1:5. Ligacijsko mešanico smo inkubirali preko noči pri 4 °C in naslednji dan transformirali v bakterije *E. Coli* DH5 α . Vzporedno smo naredili tudi kontrolo samo-ligacije. To smo naredili tako, da smo v ligacijsko mešanico dodali samo vektor, brez inserta. Rast na kontrolni plošči kaže stopnjo samoligacije vektorja. Bakterije smo nato cepili na trdno gojišče z ampicilinom in inkubirali preko noči pri 37 °C. Na obeh ploščah smo lahko opazili nekaj kolonij. Iz plošč smo vzeli 3 naključne kolonije in jih prenesli v tekoče gojišče, kateremu smo dodali ampicilin. Inkubirali smo 8 ur pri 37 °C ter izolirali plazmid. Uspešnost ligacije smo nato preverili z restrikcijsko analizo. Plazmide smo cepili z restriktazo XbaI. XbaI reže DNA na mejah inserta MCS_Ahd, znotraj katerega bi moral v primeru uspešne ligacije ležati odsek gena UGT1A1. Kot kontrolo smo vzeli s PCR pomnoženi odsek gena UGT1A1. Če se je insert uspešno vstavil, bi morali na gelu videti dve lisi. Rezultati so pokazali le eno liso pri vseh analiziranih plazmidih. To kaže, da potek ligacije ni bil uspešen. Tako T-previsi kot tudi A-previsi so relativno krhki, zato sumimo, da je med obdelavo DNA z gelsko elektroforezo pod UV lučjo prišlo do poškodb, ki so onemogočile TA-ligacijo. Vektor je zaradi izgube T- previsov dobil tope konce kar je privedlo do samoligacije. To pojasni, zakaj je prišlo do rasti kolonij tako na vzorčni kot tudi na kontrolni plošči.

V nadaljevanju smo se zato odločili, da bomo ligacijo izvedli vzporedno na več plazmidih, z uporabo različnih metod čiščenja. Odsek gena UGT1a1 smo ponovno pomnožili s PCR reakcijo. Tokrat smo naredili 12 vzorcev. Prve 4 vzorce smo združili in očistili z gelsko ekstrakcijo. Te vzorce smo označili s črko **G**. Naslednje 4 vzorce smo združili in očistili po

protokolu Qiagen PCR purification. Te vzorce smo označili s črko **P**. Zadnje 4 vzorce pa smo združili in pustili neočiščene. Te smo označili s črko **D**.

Prav tako smo ponovno naredili restrikcijo plazmida pGL3mAhd_pCMV. Pripravili smo 3 vzporedne restrikcijske reakcije in vse inkubirali 2 uri pri 37 °C. Za vse tri restrikcijske reakcije smo uporabili 1 µg plazmidne DNA. Po inkubaciji smo en vzorec očistili z gelsko ekstrakcijo in ga označili z malo črko **g**. Drugi plazmid smo očistili po Qiagen PCR purification protokolu in ga označili z malo črko **p**. Zadnji plazmid pa smo pustili neočiščen in ga označili z malo črko **d**.

V nadaljevanju smo pripravili 3 ligacijske reakcije (*preglednica XVIII*). V prvo ligacijsko mešanico smo dali insert in plazmid očiščena z gelsko ekstrakcijo (**G+g**). V drugo ligacijsko mešanico smo dali plazmid in insert očiščena po protokolu Qiagen PCR purification (**P+p**). V tretjo ligacijsko mešanico pa smo dali neočiščen plazmid in insert (**D+d**). Pri tem smo plazmid D najprej 20 minut inkubirali pri 65 °C. S tem smo inaktivirali restrikcijske encime. Z inaktivacijo preprečimo restrikcijsko cepitev potencialnih AhdI mest znotraj gena UGT1A1.

Za ligacijo smo uporabili 100 ng vektorske DNA ter 3,5 ng inserta. Pri ligaciji neočiščenih komponent (D+d) smo inserta dodali 1 µL, saj zaradi prisotnosti ostalih sestavin PCR reakcije, spektrofotometrično ne morem natančno določiti koncentracije PCR produktov. Vse ligacije smo izvedli v molarnem razmerju vektor:insert – 1:1. Za vsako ligacijo smo naredili še kontrolo samoligacije. Inkubacijo smo izvedli preko noči pri 16 °C.

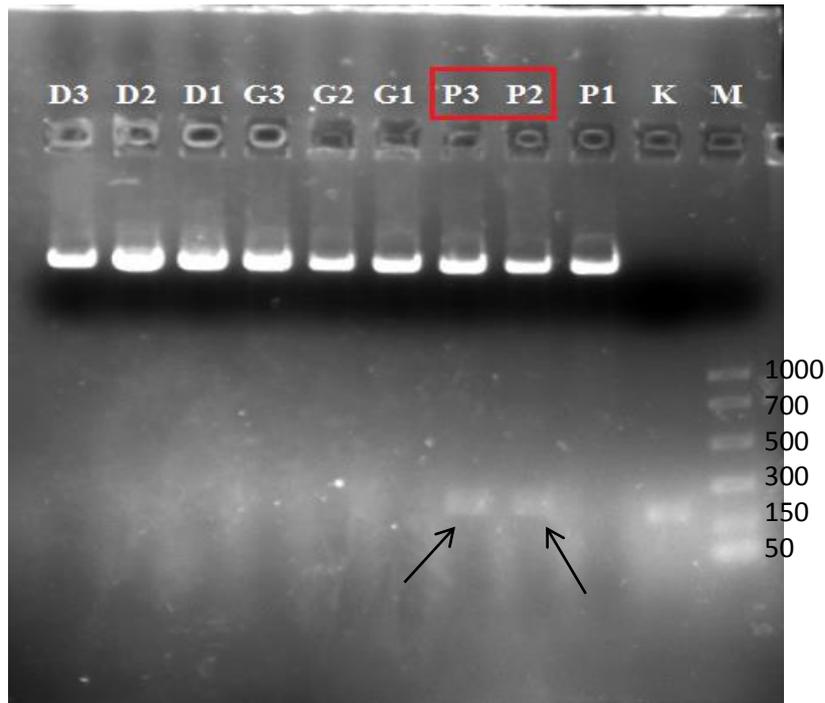
Preglednica XVIII: Sestava reakcijskih mešanic za reakcije ligacije odseka gena UGT1A1

Komponenta	G+g	P+p	D+d
Lineariziran vektor	100 ng	100 ng	100 ng
Insert (1:1)	3,5 ng	3,5 ng	1 µL
10x T4 DNA ligazni pufer	2 µL	2 µL	2 µL
T4 DNA ligaza	1U	1U	1U
ultra čista voda	Do 20 µL	Do 20 µL	Do 20 µL

Po inkubaciji smo vektorje transformirali v *E. coli* DH5α in inkubirali preko noči pri 37 °C. Po inkubaciji je bilo opaziti rast na vseh ploščah. Največ kolonij smo videli na plošči, kamor smo cepili bakterije s **P+p** plazmidom, najmanj pa na ploščah, z bakterijami z **G+g** plazmidom. Prav tako je bilo rast opaziti na kontrolnih ploščah.

Na **P+p** kontrolni plošči, je rast kolonij posledica ponovne ligacije vektorja z izrezanim odsekom. Med čiščenjem s QIAprep kolono je najverjetneje skupaj z lineariziranim vektorjem prišel tudi 11 bp velik fragment, katerega AhdI restriktaza izreže iz MCS_Ahd inserta. Ta fragment se nato ponovno ligira v vektor. Prav tako je možno, da je med čiščenjem vektorja prišlo do izgube T previsov in tako do samoligacije topih koncev vektorja. Rast bakterij na **D+d** plošči je prav tako posledica samoligacije vektorja, kar smo pričakovali, saj vektorja po restrikciji nismo očistili. Plazmid in vektor na **G+g** plošči smo očistili z gelsko ekstrakcijo pod UV lučjo. Kot pri prvem poizkusu, je tudi tokrat verjetno med postopkom čiščenja prišlo do izgub T previsov, kar je povzročilo samoligacijo topih koncev vektorja.

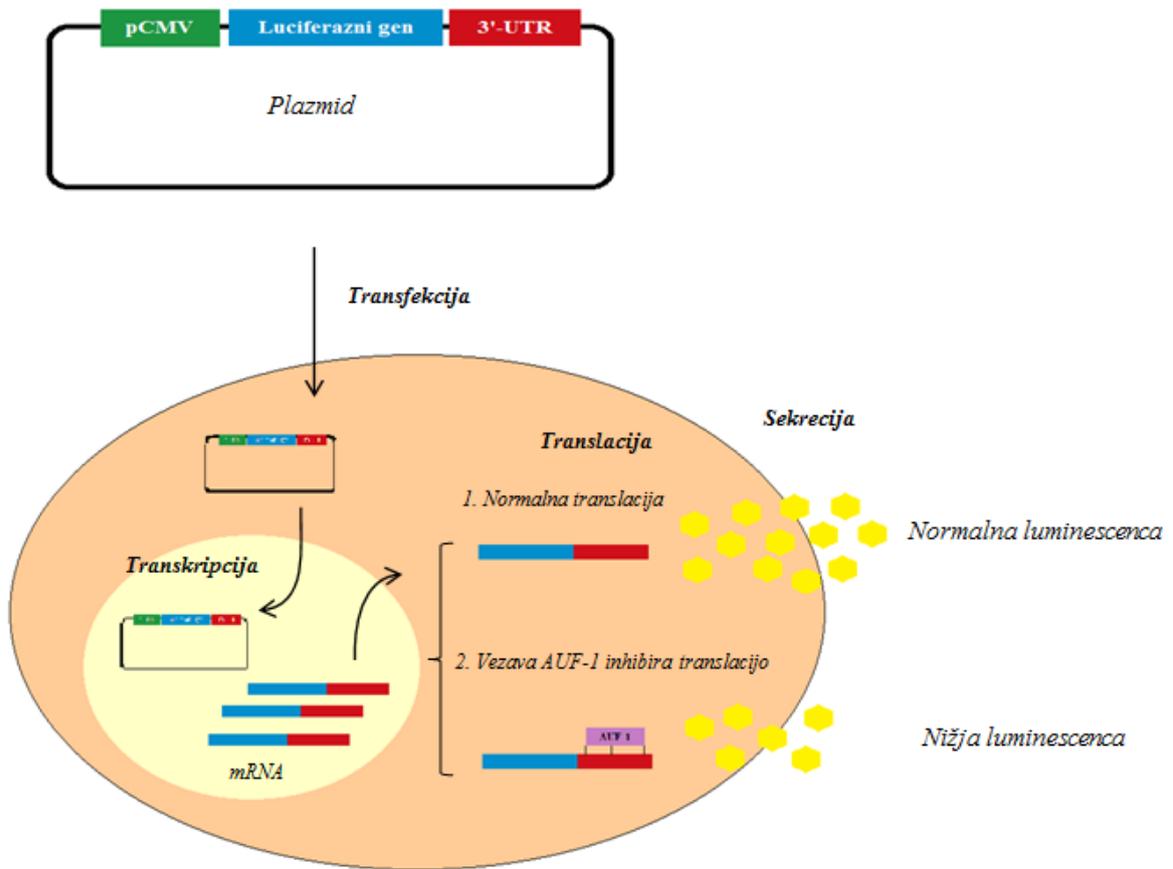
V nadaljevanju smo iz vsake plošče vzeli po 3 naključne kolonije in jih prenesli v tekoče LB gojišče, kateremu smo dodali ampicilin. Po 8 urni inkubaciji pri 37 °C smo plazmide izolirali. Analizo ligacije smo opravili z restrikcijsko reakcijo in elektroforezo. Za restrikcijo smo uporabili restriktazo XbaI. *Slika 15* prikazuje rezultat elektroforeze. Pri vzorcih, kjer vektorja in inserta nismo očistili z nobeno metodo (vzorci D1-D3), vidimo samo eno liso. Ligacija ni uspela. Razlog za to je najverjetneje previsoka koncentracija soli in drugih komponent v zmesi PCR produktov, kar močno otežuje ligacijo. Pri vzorcih, kjer sta bila vektor in insert očiščena z gelsko ekstrakcijo (vzorci G1-G3), ponovno vidimo samo eno liso. Pri dveh vzorcih plazmidov, ki smo jih očistili po protokolu PCR purification (vzorec P2 in P3) lahko vidimo dve lisi. Druga lisa se nahaja pri velikosti med 150 in 300 bp, kar ustreza velikosti inserta. Razlog, zakaj je lisa inserta na elektroforeznem gelu malo višja od kontrolne lise je, da se XbaI restrikcijski mesti nahajata nekaj nukleotidov stran od mesta, kamor se je vključil insert. Izrezan fragment je zato nekoliko večji, kot je insert sam.



Slika 15: Rezultat elektroforeze ligacije odseka gena UGT1A1

4.6 Opis delovanja molekularnega orodja

Izbrano 3'-UTR regijo vstavimo v plazmidni vektor in transformiramo v bakterije. Plazmide nato izoliramo in jih vnesemo v človeško celično linijo (transfekcija). Orodje je narejeno tako, da se 3'-UTR regija vstavi takoj za luciferazni gen in služi kot njegova regulatorna regija. Ko plazmid vstopi v jedro celice, se luciferazni gen skupaj z regijo 3'-UTR prepíše v mRNA. Ta nato preide v citoplazmo, kjer se začne translacija in sinteza luciferaze. Če v celici ni prisotnih inhibitornih elementov, oziroma se ti elementi ne vežejo na izbrano 3'-UTR, potem translacija mRNA poteče normalno. Luciferaza se izloči iz celic in njeno koncentracijo lahko zaznamo z luciferaznim testom. Če v celico uvedemo regulatorne proteine, ki preko vezave na 3'-UTR regijo stabilizirajo mRNA (Hu proteini), se sinteza luciferaze poveča. Takrat bomo z luciferaznim testom zaznali večje koncentracije. Obratno pa se zgodi, če v celico uvedemo proteine, ki destabilizirajo mRNA (AUF1). Tokrat bo sinteza proteina manjša in zaznali bomo manjše koncentracije luciferaze (*slika 16*).



Slika 16: Princip delovanja molekularnega orodja pGL3m_Ahd_pCMV

5. Sklep

Tekom dela smo iz osnovnega luciferaznega reporterskega vektorja pGL3 uspešno naredili molekularno orodje za hitro kloniranje produktov reakcije PCR. Prav tako smo s kloniranjem odseka gena UGT1A1 dokazali, da je orodje funkcionalno. Največ težav je predstavljala ligacija odseka gena UGT1A1 v orodje. Ugotovili smo, da nekatere metode čiščenja produktov PCR in vektorja lahko poškodujejo krhke T in A previse in da najboljše rezultate dobimo, če produkte PCR pred ligacijo očistimo s kolono. Če se lotimo čiščenja z gelom, pa naj bo gel čim krajši čas izpostavljen UV svetlobi, da preprečimo poškodbe DNA. Prav tako moramo tekom celotnega postopka kloniranja vedno delati s topili, ki ne vsebujejo nukleaz. V nadaljevanju, bi lahko preučevali različne pogoje ligacije in s tem optimizirali proces kloniranja s tem vektorjem. Preiskusili bi lahko ligacijo pri različnih molarnih razmerjih ter različnih temperaturah in časih ligacije.

V nadaljnjih raziskavah bi lahko naše orodje uporabili za proučevanje regulatornih zaporedji znotraj 3'-UTR in proteinov, ki se vežejo nanje. Pokazali smo, da je točkovna mutageneza relativno preprosta, a zelo učinkovita in natančna metoda za uvajanje mutacij v DNA. V nadaljevanju bi s to metodo lahko mutirali znana regulatorna zaporedja in proučevali, kako te mutacije vplivajo na vezavo regulatornih proteinov. Prav tako bi lahko proučevali vlogo 3'-UTR regij v patološko spremenjenih tkivih. Če bi našli definitivno povezavo med določeno boleznijo in elementi, ki se vežejo na ARE regije 3'-UTR, pa bi orodje uporabljali tudi kot pomoč pri diagnostiki teh bolezni.

Viri

1. Boyer, R., M. (2005). *Temelji biokemije*. Ljubljana: Študentska založba.
2. Barrett W. L., Fletcher S., Wilton D. S.: Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell. Mol. Life Sci.* (2012); 69:3613-3634
3. Jackson R., Hellen C., Pestova T. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), pp.113-127.
4. Chen M., Manley J. (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
5. Wells E. S., Hillner E.P., Vale D. R., Sachs B. A.: Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Molecular Cell*, Vol 2, 135-140, 1998
6. Colgan F. D., Manley L. J.: Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev*, 1997 (11): 2755-2766
7. Van Hoof A., Parker R. (2002). Messenger RNA Degradation: Beginning at the End. *Current Biology*, 12(8), pp.R285-R287.
8. Beelman C., Parker R. (1995). Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell*, 81(2), pp.179-183.
9. Houseley J., Tollervey D. (2009). The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell*, 136(4), pp.763-776.
10. Mignone F., Gissi C., Liuni S., Pesole G.: Untranslated regions of mRNA; *Genome Biology* 2002, **3(3)**:reviews 0004.1–0004.10
11. Chen C., Gherzi R., Ong S., Chan E., Rajmakers R., Pruijn G., Stoecklin G., Moroni C., Mann M., Karin M.: AU Binding Proteins Recruit the Exosome to Degrade ARE-Containing mRNAs. *Cell*. 2001; 107(4), pp.451-464.
12. Bolognani F., Perrone-Bizzozero N. (2008). RNA-protein interactions and control of mRNA stability in neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 86(3), pp.481-489.
13. Eberhardt W., Doller A., Akool E., Pfeilschifter J. (2007). Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacology & Therapeutics*, 114(1), pp.56-73.
14. Misquitta C., Chen T., Grover A. (2006). Control of protein expression through

- mRNA stability in calcium signalling. *Cell Calcium*, 40(4), pp.329-346.
15. Wu X., Brewer G. (2012). The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene*, 500(1), pp.10-21.
 16. Misquitta M. C., Iyer R. V., Werstiuk S. E., Grover K. A.: The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology; *Molecular and Cellular Biochemistry* **224**: 53–67, 2001
 17. Grataco M. F., Brewer G.: The role of AUF1 in regulated mRNA decay; *Wiley interdiscip Rev RNA*. 2010; 1(3): 457-473
 18. Pont R. A., Sadri N., Hsiao J. S., Smith S., Schneider J. R.: mRNA decay factor AUF1 maintains normal aging, telomere maintenance and suppression of senescence by activation of telomerase transcription; *Mol Cell*. 2012; 47(1): 5-15
 19. Lopez de Silanes I., Paz Quesada M., Esteller M.: Aberrant regulation of messenger RNA 3-untranslated region in human cancer, *Cellular Oncology*. 2007; 29:1–17
 20. Lai W., Carrick D., Blackshear, P. (2005). Influence of Nonameric AU-rich Tristetraprolin-binding Sites on mRNA Deadenylation and Turnover. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), pp.34365-34377.
 21. Su Y., Wang S., Chiang P., Lin N., Shen Y., Chang G., Chang C. (2012). Tristetraprolin Inhibits Poly(A)-Tail Synthesis in Nuclear mRNA that Contains AU-Rich Elements by Interacting with Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1. *PLoS ONE*, 7(7), p.e41313.
 22. Filipowicz W., Bhattacharyya S., Sonenberg N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nat Rev Genet*, 2008(2), pp.102-114.
 23. Brodersen P., Voinnet O. (2009). Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), pp.141-148.
 24. Gherzi R., Lee K., Briat P., Wegmueller D., Moroni C., Karin M., Chen C. (2004). A KH Domain RNA Binding Protein, KSRP, Promotes ARE-Directed mRNA Turnover by Recruiting the Degradation Machinery. *Molecular Cell*, 14(5), pp.571-583.
 25. Linker K., Pautz, A., Fehrer, M., Hubrich, T., Greeve, J., Kleinert, H. (2005). Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. *Nucleic Acids Research*,

- 33(15), pp.4813-4827.
26. Allison L.: *Fundamental molecular biology*. Malden, MA: Blackwell Pub. 2007
 27. <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-preparation>
 28. Brown T.: *Gene cloning and DNA analysis*. Oxford: Wiley-Blackwell. 2010
 29. TA cloning kit manual; Invitrogen 2004
 30. Ligases, *Enzyme resources guide*, Promega corporation; pp 8-14
 31. DNA Ligacija: <https://www.addgene.org/plasmid-protocols/dna-ligation/>
 32. Bakterijska transformacija: <https://www.addgene.org/plasmid-protocols/bacterial-transformation/>.
 33. <https://www.lifetechnologies.com/si/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/electroporation.html>
 34. <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/antibiotics/>
 35. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/blue-white-screening.html>
 36. pGL3 Luciferase Reporter Vectors, Technical Manual; Promega (2008)
 37. QIAquick Spin Handbook, QIAGEN (2012)
 38. <https://www.neb.com/protocols/2012/12/07/optimizing-restriction-endonuclease-reactions>
 39. TransformAid Bacterial Transformation Kit; Thermo Scientific
 40. QIAprep Miniprep Handbook, QIAGEN (2012)
 41. Karas Kuželički, Cedilnik; SOP250: DNA – gen za UGT1A1 (polimorfizem (TA)_n); Laboratorij za molekularno diagnostiko, Fakulteta za farmacijo (2008)
 42. NanoDrop 1000 spectrophotometer V3.7 User's Manual; ThermoScientific (2008)
 43. GenomeLabtm; Dye termination sequencing with Quick Start Kit (Beckman Coulter 2009)