

Uporaba specifičnih siRNK molekula za sprječavanje izražaja ribosomskog proteina S6

Kajtazi, Ardiana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:865056>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ardiana Kajtazi

UPORABA SPECIFIČNIH siRNK MOLEKULA ZA SPRIJEČAVANJE
IZRAŽAJA RIBOSOMSKOG PROTEINA S6

Završni rad

Rijeka, 2018. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Ardiana Kajtazi

UPORABA SPECIFIČNIH siRNA MOLEKULA ZA SPRIJEČAVANJE
IZRAŽAJA RIBOSOMSKOG PROTEINA S6

Završni rad

Rijeka, 2018. godina

Mentor rada: Doc.dr.sc. Slađana Bursać, dipl.san.ing.

Završni rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima _____ stranica, _____ slika, _____ tablica, _____ literaturnih navoda.

ZAHVALA

Prvo bih se voljela zahvaliti svojoj obitelji koja je vjerovala u mene. Tati koji je bio najveća motivacija i podrška, mami koja me beskonačno voli te braći koja su davala najbolje savjete i bez kojih ne bih bila tu gdje jesam.

Zahvaljujem se mojoj kolegici, cimerici, prijateljici, Jasni-Tinei Jelinek koja je sve prošla sa mnom od prve godine studija te prijateljicama Niki i Kseniji, koje su vječita podrška u dugogodišnjem prijateljstvu.

I za kraj najveće hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Slađani Bursać, dipl. san. ing. koja je vjerovala u mene i pomagala u izradi ovog rada. Hvala na svom strpljenju i dragocjenom vremenu koje ste mi pružili. Hvala na konstruktivnim savjetima i profesionalnom odnosu. Neizmjereno sam Vam zahvalna!

SAŽETAK

Proučavanje gena i njihove funkcije vrlo je značajno kako bi se dobio uvid u molekularne mehanizme koji dovode do nastanka bolesti u ljudi. Upotreba malih interferirajućih RNK, siRNA, ima veliku važnost u proučavanju funkcije gena i vrlo se uspješno primjenjuje u postupcima manipulacije gena. One se uspješno koriste za sprječavanje izražaja gena na razini gRNK čime ometaju njenu translaciju u protein. U ovom radu testirana je učinkovitost utišavanja ribosomskog proteina S6 (RPS6) putem specifičnih siRNA molekula. Učinkovitost utišavanja određena je 48 sati nakon transfekcije s siRNA protiv RPS6 u staničnim linijama A549, a testirane su tri koncentracije kako bi se odredila ona koja najbolje sprječava izražaj ribosomskog proteina S6. Učinkovitost siRNA protiv RPS6 određena je upotrebom metode lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu određivanjem izražaja gRNK za RPS6 te upotrebom metode Western blot određivanjem izražaj proteina RPS6.

Dobiveni rezultati pokazuju da siRNA protiv RPS6, u koncentracijama 40 nM i 60 nM, vrlo uspješno dovodi do sniženja izražaja gRNK za RPS6 te posljedično smanjuje izražaj proteina RPS6. Stoga, testirana siRNA vrlo je učinkovita u sprječavanju izražaja RPS6 te se može koristiti u eksperimentalne svrhe za proučavanje funkcije ribosomskog proteina S6.

Ključne riječi: siRNA, ribosomski protein S6, gRNK, sprječavanje izražaja gena, lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

SUMMARY

The study of genes and their functions are very important in order to gain insight into the molecular mechanisms that lead to diseases in humans. The use of small interfering RNAs, siRNAs, has great importance in studying the gene function and it is very successfully applied in genetic manipulation procedures. They are successfully used to prevent gene expression in the level of mRNA blocking its translation into protein. In this study, it was tested the efficiency of suppressing expression of ribosomal protein S6 (RPS6) with specific siRNA molecules. The efficiency of silencing was determined 48 hours after transfection with siRNA against RPS6 in A549 cell lines and three concentrations were tested to determine the one that best prevents expression of ribosomal protein S6. The efficiency of siRNA against RPS6 was determined by using the method polymerase chain reaction in real-time to measure the expression of mRNA for RPS6 and using the Western blot method to analyse the expression of RPS6 protein.

The results show that siRNA against RPS6, at concentrations of 40 nM and 60 nM, very successfully leads to reduced expression of mRNA for RPS6 and consequently reduced expression of RPS6 protein. Therefore, the tested siRNA is highly effective in preventing expression of RPS6 and may be used for experimental purposes for the study of ribosomal protein S6 function.

Key words: siRNA, ribosomal protein S6, mRNA, inhibition of gene expression, polymerase chain reaction in real-time

SADRŽAJ

SAŽETAK	V
SUMMARY	VI
1. UVOD.....	1
1.1 SINTEZA RIBOSOMA.....	1
1.1.1. Ribosomski protein S6	4
1.1.2. Inhibicija sinteze ribosoma rezultira aktivacijom p53-ovisnog kontrolnog mekanizma	5
1.2. MALE INTERFERIRAJUĆE RNA (siRNA)	7
1.2.1. Mehanizam djelovanja RNA interferencije (RNAi).....	8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	11
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Kemikalije.....	13
3.1.2. Mediji i puferi za kulturu stanica	16
3.1.3. Otopine korištene za izolaciju RNA	16
3.1.4. Komponente za izradu 12% poliakrilamidnog gela za elektroforezu proteina.....	17
3.1.5. Puferi i otopine korištene za izolaciju, elektroforezu proteina i Western blot analizu.....	18
3.1.6. Protutijela za Western blot analizu	19
3.1.7. Uređaji i pribor.....	20
3.1.8. Laboratorijsko posuđe	21
3.1. METODE	22
3.1.1. Kultura stanica i unos nukleinskih kiselina u stanice	22

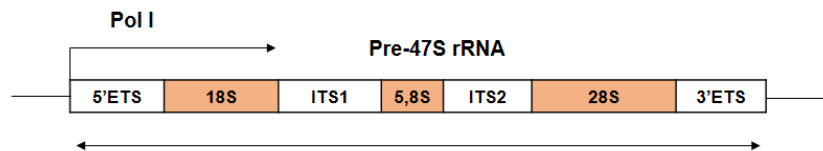
3.1.2.	Izolacija ukupne RNK.....	23
3.1.3.	Elektroforeza RNK	24
3.1.4	Sinteza komplementarne DNK.....	25
3.1.5.	Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	26
3.1.6.	Određivanje disocijacijske krivulje za produkt lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu	28
3.1.7.	Elektroforeza DNK u agaroznom gelu.....	29
3.1.8.	Izolacija ukupnih staničnih proteina i određivanje izražaja RPS6.....	29
4.	REZULTATI	32
5.	RASPRAVA	42
6.	ZAKLJUČAK	44
7.	LITERATURA.....	45
	POPIS KRATICA	51
	ŽIVOTOPIS	52

1. UVOD

Rast i dioba osnovni su biološki procesi u svakom živom organizmu. Rastom stanice povećava se njezina masa i volumen. Brojni signalni putevi reguliraju rast stanice te potiču sintezu makromolekula. S obzirom da 80 % suhe mase stanice čine proteini, sinteze proteina i inhibicija njihove razgradnje ključni su za rast stanice (1). Sintezom novih ribosoma povećava se kapacitet stanice za sintezu proteina (2).

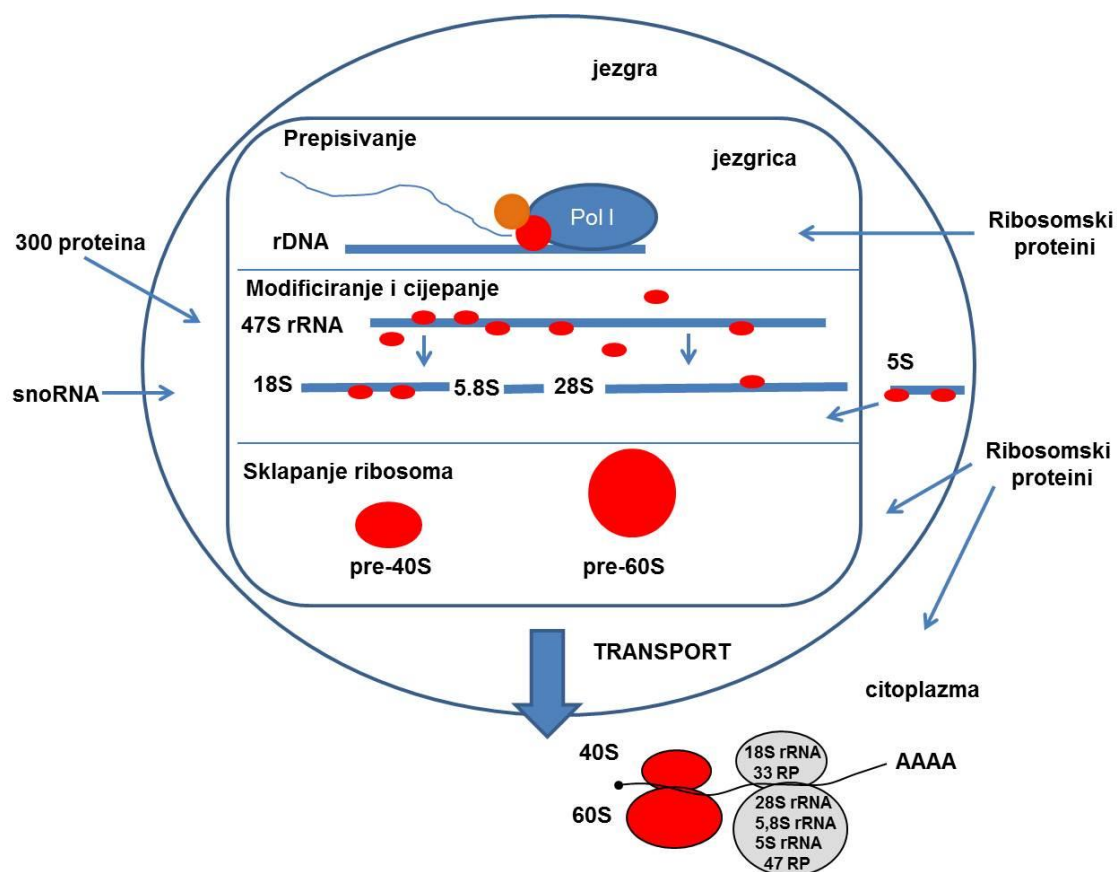
1.1 SINTEZA RIBOSOMA

Ribosomi su stanične strukture kojima je biološka uloga sinteza proteina. Sinteza ribosoma je složen i energetski zahtjevan proces. Proizvodnja ribosoma najvećim dijelom se odvija u jezgri, a manjim dijelom u jezgri i citoplazmi (3). Jedan od ključnih događaja u sintezi ribosoma je prepisivanje 47S ribosomske RNA (rRNA) putem RNA Polimeraze I (Pol I) (4). U jezgri Pol I sintetizira pre-47S rRNA koja sadrži gene koji kodiraju za 18S, 5,8S i 28S rRNA koji su međusobno odijeljeni s ITS1 i ITS2 (engl. *internal transcribed spacer*, ITS) nekodirajućim slijedovima (5). Na 5' i 3' kraju pre-47S rRNA nalaze se 5' ETS i 3'ETS (engl. *external transcribed spacer*, ETS) nekodirajući slijedovi. ITS i ETS slijedovi se izrezuju djelovanjem egzonukleaza i endonukleaza prilikom dozrijevanja rRNA do 28S, 18S i 5,8S. (**Slika 1**).



Slika 1. Sazrijevanje rRNK. Pol I sintetizira pre-47S rRNA koja sadrži gene koji kodiraju za 18S, 5,8S i 28S rRNA koji su međusobno odijeljeni s ITS1 i ITS2 nekodirajućim sljedovima. Na 5' i 3' kraju pre-47S rRNA nalaze se 5' ETS i 3' ETS nekodirajući slijedovi. ITS i ETS sljedovi se izrezuju prilikom dozrijevanja rRNA.

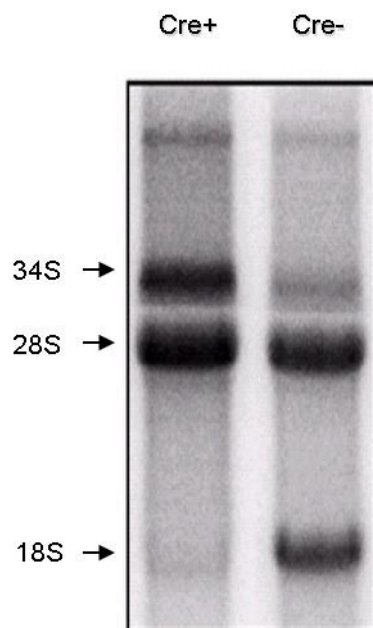
Dok traje sinteza, procesiranje i modificiranje, rRNK se udružuje s 80 ribosomskih proteina i 5S rRNK u 40S i 60S podjedinice te unosi u jezgru. Osim toga, u prekrajanju i modifikaciji rRNA sudjeluje 100 malih RNA iz jezgrice (engl. *small nucleolar RNA*, snoRNA) i 300 ne-ribosomskih proteina (6). Nezrela mala 40S i velika 60S podjedinice ribosoma transportiraju se iz jezgre u citoplazmu gdje formiraju funkcionalni 80S ribosom nakon vezanja glasničke RNK (engl. *messenger RNA*, mRNA) (**Slika 2**). 18S rRNA zajedno sa 33 ribosomska proteina izgrađuje malu podjedinicu ribosoma 40S dok 5S, 5,8S i 28S rRNA zajedno sa 47 različita ribosomskih proteina grade zrelu veliku podjedinicu ribosoma (60S) (7).



Slika 2. Shematski prikaz sinteze ribosoma. Pol I prepisuje pre- 47S rRNA iz koje nakon modifikacija i cijepanja djelovanjem endonukleaza i egzonukleaza nastaju 28S, 5,8S i 18S rRNA. U procesima modifikacije i prekrajanja rRNA sudjeluje 100 snoRNA i 300 ne-ribosomskih proteina. 80 različitih RP sintetizira se u citoplazmi i udružuje s rRNA u specifičnim koracima te tako sudjeluje u njenom dozrijevanju. 5S rRNA sintetizira se u jezgri pomoću Pol III koja se potom transportira u jezgricu. Nezrele podjedinice ribosoma transportiraju se u citoplazmu gdje se odvijaju završni koraci u dozrijevanju. Udruživanjem 40S i 60S podjedinice i mRNA formira se funkcionalni 80S ribosom.

1.1.1 Ribosomski protein S6

Ribosomski protein S6 (RPS6) smješten je u maloj podjedinici ribosoma 40S u blizini veznog mjesta gRNK-tRNK (8). Na tom mjestu je i dodirno područje sa velikom podjedinicom 60S, gdje S6 dolazi u kontakt sa 28S rRNK. Proces sinteze ribosoma je strogo reguliran i kontroliran te smanjena dostupnost pojedinih komponenti može značajno utjecati na ovaj proces. S obzirom da se ribosomski proteini vežu na rRNK na različitim koracima sinteze proteina, uslijed nedostatka specifičnih ribosomskih proteina inhibira se sinteza proteina na specifičnim koracima tijekom cijepanja (9). Upotrebom pokusnog miša u kojemu je jedan gen za RPS6 ograničen *lox* sljedovima omogućeno je njegovo izrezivanje upotrebom rekombinaze Cre in vivo (10). Dokazano je da izrezivanje oba alela RPS6 u potpunosti sprječava rani korak u sazrijevanju preteče 18S rRNA u jezgri te da heterozigotnost za RPS6 djelomično smanjuje proizvodnju zrelih ribosoma (10,11). Kao što je prikazano na **Slici 3.** smanjen izražaj ribosomskog proteina S6 zaustavlja cijepanje 34S preteče rRNA u 18S koja je ključna komponenta podjedinice 40S (10). Usprkos potpunoj inhibiciji sinteze novih ribosoma, inhibiciji 40S podjedinice i nakupljanju nenormalnog prekursora 34S rast hepatocita bio je normalan. Međutim, stanice jetre nisu se dijelile nakon djelomične hepatektomije što je ukazalo na postojanje kontrolnog mehanizma koji prepoznaje pogreške u sintezi ribosoma i zaustavlja diobu tih stanica.



Slika 3. Nakupljanje 34S prekursora nakon izrezivanja ribosmskog proteina S6 putem Cre rekombinaze u jetri odraslog miša. Uvjetna inaktivacija (engl. *conditional inactivation*) oba alela gena za *RPS6* u jetri odraslog miša dovodi do nakupljanje nenormalnog prekursora 34S. Slika je preuzeta iz Science, 2000, Volarevic et al. (10)

1.1.2 Inhibicija sinteze ribosoma rezultira aktivacijom p53-ovisnog kontrolnog mehanizma

Pojedini ribosomski proteini sudjeluju u regulaciji specifičnih koraka sinteze proteina, međutim njihove precizne uloge u tim procesima u stanicama sisavaca vrlo su slabo razjašnjene. Na važnu ulogu velikog broja ribosomskih proteina u sisavaca ukazuje činjenica da je njihova heterozigotnost povezana sa smrtnošću ili brojnim patološkim stanjima. Heterozigotne mutacije ili delecija nekoliko gena za ribosomske proteine uzrok su anemije Diamond-Blackfan (DBA), rijetke nasljedne bolesti koja je

karakterizirana smanjenom proizvodnjom eritrocita i brojnim kongenitalnim malformacijama (12,13). Pogreške u sintezi ribosoma dovode do razvoja brojnih bolesti i aktivacije kontrolnog mehanizma koji prepoznaju te pogreške i sprječava nastanak patoloških promjena. Postojanje tog kontrolnog mehanizma otkriveno je nakon uvjetne inaktivacije (engl. *conditional inactivation*) gena RPS6 u jetri odraslog miša. Iako je sinteza novih ribosoma bila potpuno inhibirana, rast hepatocita bio je normalan. Stanice nisu se dijelile nakon djelomične hepatektomije, što je ukazalo na postojanje kontrolnog mehanizma koji prepoznaje pogreške u sintezi ribosoma i zaustavlja diobu tih stanice, ali ne i njihov rast (10).

Daljnja istraživanja ribosomskog proteina S6 pokazala su da uvjetna inaktivacija jednog alela RPS6 u limfocitima T *in vivo* nije rezultirala poremećajem rast limfocita, ali je spriječila diobu stanica. Genetička inaktivacija p53 u tom mišu omogućila je normalnu diobu limfocita T (14). Nadalje, embriji heterozigotni za ribosomski protein S6 (RPS6) ugibaju tijekom gastrulacije zbog značajno povišene razine p53 koji dovodi do apoptoze i zaustavljanja staničnog diobenog ciklusa. Genetička inaktivacija p53 gena sprječava njihovo ugibanje u gastrulaciji i omogućuje im preživljavanje do embrionalnog dana E12.5 kada najvjerojatnije ugibaju zbog poremećaja u sintezi proteina (15). Navedeni pokusi u RPS6 heterozigotnim miševima *in vivo* nedvojbeno dokazuju postojanje p53-ovisnog kontrolnog mehanizma koji se aktivira pogreškom u sintezi ribosoma. Od izuzetne je važnosti razjasniti molekularne mehanizme putem kojih nasljedne i stečene heterozigotne mutacije velikog broja ribosomskih proteina rezultiraju nastankom zloćudnih tumora i drugih patoloških manifestacija. Najveće prepreke za razumijevanje molekularnih mehanizama putem kojih heterozigotne mutacije velikog broja ribosomskih proteina doprinose razvoju zloćudnih tumora nedostatak je genetičkih definiranih linija stanica

i životinjskih pokusnih modela. U zadnjih nekoliko godina, upotreba sintetičkih malih interferirajućih RNK, siRNA (engl. *silencing RNA*, utišavajuće RNK) u eksperimentalne svrhe, postala je jedna od izuzetno učinkovitih i široko primjenjivanih metoda za ometanje izražaja gena na razini gRNK. Primjena specifičnih siRNA molekula ima veliku važnost u proučavanju funkcije gena i vrlo se uspješno primjenjuje u postupcima manipulacije gena.

1.2 MALE INTERFERIRAJUĆE RNA (siRNA)

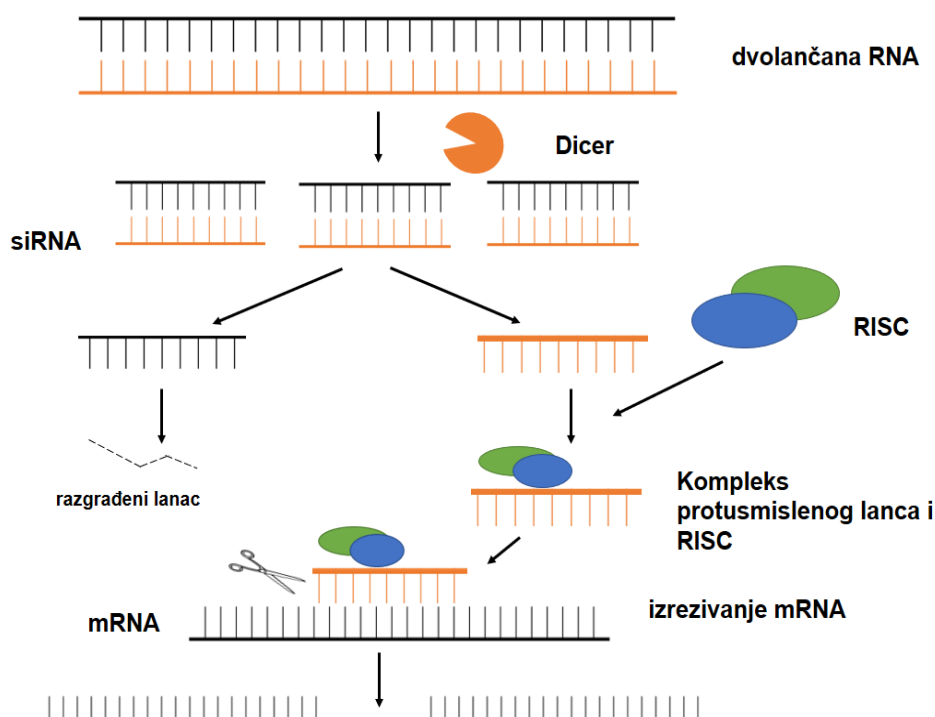
Jedno od najvažnijih otkrića u području molekularne biologiji bilo je otkriće da siRNA (mala interferirajuća RNK) može regulirati ekspresiju gena. siRNA se mogu koristiti *in vivo* i *in vitro* istraživanjima za proučavanje funkcije nekog gena te su atraktivna nova vrsta terapijika, posebno za liječenje raka i drugih bolesti. Ova regulacija može djelovati na najvažnije funkcije genoma, uključujući sintezu RNK, strukturu kromatina, stabilnost RNK, segregaciju kromosoma, transkripciju i translaciju (16,17).

RNA interferencija (RNAi) je biološki mehanizam kojim dvolančana RNA inducira gensko utišavanje ciljane komplementarne gRNK odnosno potiče njenu razgradnju. RNAi je prvi put otkrivena u oblicima *Caenorhabditis elegans*, organizmima u kojemu su izražaji gena smanjeni dugolančanom RNK (18,19). Unatoč visokom terapijskom potencijalu siRNA, primjena u kliničkim uvjetima još je uvijek ograničena uglavnom zbog nedostatka učinkovitog sustava dostave do ciljnog mjesta djelovanja (20-24). Ima važnu ulogu za funkcionalnu genetiku kod kulture tkiva sisavaca zbog velike efikasnosti utišavanja ciljnog gena pri niskim

koncentracijama siRNA, lako pronalazi ciljano mjesto, ima visoku specifičnost, izuzetnu stabilnost te malu cijenu sinteze siRNA. RNAi može sudjelovati u kontroli rasta i diobe stanice, diferencijaciji tkiva, formiranju heterokromatina kao i mnogim drugim ključnim procesima u stanici.

1.2.1 Mehanizam djelovanja RNA interferencije (RNAi)

Duže dvolančane molekule RNA koje su prekursori malih ometajućih RNA, siRNA (engl. *small interfering RNA*) mogu se u stanicu unijeti eksperimentalno ili nastaju unutar same stanice od preklapajućih transkripata. Prvi korak RNAi sustava obuhvaća obradu i cijepanje duže dvolančane RNA, izgrađene od približno 70 nukleotida, u kratke dvolančane molekule siRNA od oko 22 nukleotida. Enzim koji je odgovoran za cijepanje dugačkih prekursora u siRNA naziva nukleaza Dicer, enzim sličan RNAzi III (25-28). siRNA molekule se zatim vežu s kompleksom proteina, utišavajući kompleks induciran molekulom RNA, koji se naziva RISC (engl. *RNA-induced silencing complex*). Unutar kompleksa RISC, dva lanca siRNA molekule se razdvoje i lanac komplementaran s gRNK (protusmisleni lanac) na temelju komplementarnog sparivanja baza usmjeri kompleks do ciljne gRNK. Endonukleaza Ago, enzim RISC-siRNA kompleksa, kida molekulu smislene gRNK (29-32). Nakon razgradnje gRNK, RISC-siRNA kompleks se rasformira te dalje nastavlja sudjelovati u višestrukim ciklusima cijepanja ciljne gRNK pri čemu dovodi do učinkovite razgradnje ciljne gRNK molekule i inhibicije genske ekspresije proteina za kojeg je kodirala ta razgrađena gRNK. (**Slika 4**).



Slika 4. Mehanizam djelovanja RNA interferencije. Prvi korak uključuje cijepanje duge dvolančane RNA, približno 70 nukleotida, u kratke dvolančane molekule siRNA od oko 22 nukleotida pomoću nukleaze DICER-a. siRNA molekule se zatim vežu s kompleksom proteina, RISC, a unutar kompleksa RISC, dva lanca siRNA molekule se razdvoje i lanac komplementaran s gRNK (protusmisleni lanac) na temelju komplementarnog sparivanja baza usmjeri kompleks do ciljne gRNK (engl. *messenger RNA*, *mRNA*). Endonukleaza Ago, enzim RISC-siRNA kompleksa, kada molekulu ciljne gRNK ometajući njenu translaciju u protein.

Otkriće RNAi donijelo je veliki interes u znanstvenoj zajednici zbog mogućnosti primjene siRNA molekula u terapijske svrhe (32-37). Učinkovita farmakološka upotreba siRNA zahtijeva „nosače“ koji mogu isporučiti siRNA na ciljno mjesto djelovanja. Virusni vektori i ne-virusni vektori su dvije glavne kategorije sustava za isporuku siRNA. Peptidi, polimeri i lipidi opsežno su proučavani kao ne-

virusni nosači. Osim toga, posljednjih godina, siRNA molekule uspješno su korištene u eksperimentalne svrhe (38-48). Podatci iz predkliničkih studija dovode do rasta novih terapija temeljenih na siRNA u kliničkim ispitivanjima. Osim toga, uvođenje siRNA u stanicu može rezultirati negativnim djelovanjem tj. supresijom gena koji nisu željeni cilj unesene siRNA. Terapeutska siRNA mora biti pažljivo dizajnirana. Terapeutici na bazi siRNA imaju veliki potencijal za liječenje raka i liječenje drugih bolesti, ali prvo se moraju riješiti pitanja brže razgradnje, slabog staničnog unosa i učinka izvan cilja. Terapeutici siRNA imaju nekoliko prednosti u odnosu na tradicionalne farmaceutske lijekove iz razloga što je RNAi endogeni biološki proces. Identifikacija visoko selektivnih i inhibirajućih sekvenci mnogo je brža od otkrića novih kemikalija, a relativno je lako sintetizirati i proizvoditi siRNA u velikim količinama.

Prema tome, u zadnjih nekoliko godina, upotreba siRNA molekula u eksperimentalne svrhe, postala je jedna od izuzetno učinkovitih i široko primjenjivanih metoda za ometanje izražaja gena na razini gRNK. Sprječavanje izražaja gRNK za ciljani gen, a time i posljedično sprečavanje izražaja proteina upotrebom specifičnih siRNA molekula ima veliku važnost u proučavanju funkcije gena i vrlo se uspješno primjenjuje u postupcima manipulacije gena. U ovom završnom radu testirat ću učinkovitost utišavanja ribosomskog proteina S6 putem specifičnih siRNA molekula.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Proučavanje gena i njihove funkcije vrlo je značajno kako bi se dobio uvid u molekularne mehanizme koji dovode do nastanka bolesti u ljudi. Ukoliko je neki gen esencijalan za embrionalni razvoj, kao što je ribosomski protein S6 (RPS6), tada se životinjski modeli ne mogu koristiti za proučavanje funkcije toga gena. Genetička inaktivacija oba alela RPS6 je letalna. Jedna od metoda za inhibiciju izražaja ciljnog proteina je uvođenje protusmislenih nukleinskih kiselina u stanice u kulturi *in vitro*. Unesena molekula RNK ili jednolančane DNK komplementarne su smislenoj molekuli gRNK koju želimo inhibirati. Ona hibridizira s njom i blokira njenu translaciju u protein. U zadnjih nekoliko godina, upotreba siRNA molekula u eksperimentalne svrhe, postala je jedna od izuzetno učinkovitih i široko primjenjivanih metoda za ometanje izražaja gena na razini gRNK. Sprječavanje izražaja gRNK za ciljni gen, a time i posljedično sprečavanje izražaja proteina upotrebom specifičnih siRNA molekula ima veliku važnost u proučavanju funkcije gena i vrlo se uspješno primjenjuje u postupcima manipulacije gena.

Cilj ovog rada bio je testirati učinkovitost siRNA protiv ribosomskog proteina S6 u sprječavanju izražaja ribosomskog proteina S6.

U tu svrhu predlažem sljedeće specifične ciljeve:

1. Testirati učinkovitost siRNA za ribosomski protein S6 nakon transfekcije A549 stanica.
2. Odrediti izražaj gRNK za RPS6 nakon utišavanja sa siRNA molekulama upotrebom metode lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu.

3. Odrediti izražaj proteina RPS6 nakon utišavanja sa siRNA molekulama upotrebom metode Western blot.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Agaroz, Sigma

Akrilamid/bisakrilamid (29:1), 30%-tna otopina, Biorad laboratories GmbH

Albumin goveđeg seruma (BSA, *engl. bovine serum albumin*), Sigma

Amonij klorid (NH_4Cl), Kemika

Amonijev persulfat ($\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$), Sigma

Aprotinin, Fluka

Biorad protein assay, Biorad laboratories GmbH

Bromfenol modriilo (*engl. bromphenol blue*), Merck

Dietil pirokarbonat (DEPC), Sigma

Dimetilsulfoksid (DMSO), Kemika

ECL Prime Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences

Etidij bromid, Gibco BRL

Etilendiamintetraacetat- Na_2 (EDTA; Kompleksal III), Kemika

Etanol (CH_3OH), Kemika

Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF; $\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$), Sigma

Fenol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$), Kemika

Fetalni teleći serum (FCS, *engl. fetal calf serum*), Gibco BRL

Formaldehid (36%), Kemika

Formamid, deionizirani (CH_3NO), Sigma

L-Glutamin, Gibco BRL

GenMute siRNA transfection, SignaGen Laboratories

Glicerol, Sigma

Glicin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$), Sigma

Izoamilni alkohol ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$), Sigma

Kalcij klorid (CaCl_2), Kemika

Kalij dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), Kemika

Kalij hidrogenkarbonat (KHCO_3), Kemika

Kalij klorid (KCl), Kemika

KloriDNK kiselina (HCl), Kemika

Kloroform (CHCl_3), Kemika

Leupeptin, Sigma

Magnezij klorid heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), Kemika

Metanol (CH_3OH), Kemika

Metilensko plavilo, Merck

Natrij acetat (CH_3COONa), Kemika

Natrij deoksikolat (NaDOC), Sigma

Natrij hidroksid (NaOH), Kemika

Natrij fluorid (NaF), Sigma

Natrij klorid (NaCl), Kemika

Natrij ortovanadat (Na_3VO_4), Sigma

2-merkaptetanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$), Sigma

3-(N-morfolino-propansulfonska kiselina), MOPS, Sigma

Otopina penicilina i streptomicina, Gibco

PMSF, Sigma

Ponceau S, Sigma

Power Sybr Green, Applied Biosystems

2-propanol (izopropanol), Kemika

Proteinski markeri, obojeni, Biorad laboratories GmbH

Reverse transcription-PCR (RT-PCR) kit, Applied Biosystems

RNase inhibitor, Ambion

SDS (natrij dodecil sulfat), Sigma

TEMED ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$), Sigma

Tergitol (Nonidet P-40), Sigma

Trizma-baza, Sigma

Trizma-hidroklorid, Sigma

Trizol reagens, Invitrogen

Triton X-100, Pharmacia Biotech

Tween 20 (polioksietilen-sorbitan monolaureat), Sigma

3.1.2. Mediji i puferi za kulturu stanica

3.1.2.1. Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS, engl. *phosphate buffered saline*), pH 7,4

Natrij klorid (NaCl) 137 mM, kalij klorid (KCl) 2,7 mM, natrij-dihidrogenfosfat-2-hidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 4,3 mM, kalij-dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) 1,4 mM

3.1.2.2. Mediji za uzgoj stanica

Medij DMEM, L-glutamin 2mM, 2-merkaptetanol 50 μM , penicilin 105 U/L, streptomycin 0,1 g/L, gentamicin 0,035 g/L, FCS 12% (v/v)

3.1.3. Otopine korištene za izolaciju RNA

3.1.3.1. Organska otapala u izolaciji RNA

Smjesa kloroforma i izoamilnog alkohola 49:1 (v/v); izopropanol 100%; etanol 75% u destiliranoj vodi tretiranoj DEPC-om

3.1.3.2. Denaturirajući pufer za pripremu uzoraka RNA za elektroforezu

MOPS (pH 7,0) 40 mM, formaldehid 6,54% (v/v), deionizirani formamid 50% (v/v)

3.1.3.3. Pufer za nanošenje uzoraka RNA na gel

EDTA (pH 8,0) 1 mM, bromfenol modriilo 0,25% (w/v), ksilen cijanol 0,25% (w/v), glicerol 50% (v/v)

3.1.3.4. Voda tretirana s DEPC-om

DEPC 1% (v/v) u dH₂O

3.1.3.5. Pufer za elektroforezu RNA (10x)

3-(N-morfolino) propansulfonska kiselina (MOPS) (pH 7,0) 0,4 M, natrij acetat (CH₃COONa) 0,1 M, EDTA 0,01 M

3.1.4. Komponente za izradu 12% poliakrilamidnog gela za elektroforezu proteina

3.1.4.1. Gel za razdvajanje proteina (donji gel)

3.3 mL H₂O, 4.0 mL 30% otopine Akrlamid/Bis-akrlamid (37.5:1), 2.5 mL Tris-Cl 1.5 M (pH 8.8), 100 µL SDS 10%, 100 µL APS-a, 4 µL TEMED-a.

3.1.4.2. Gel za koncentriranje (gornji gel)

2.7 mL H₂O, 670 µL 30% otopine Akrlamid/Bis-akrlamid (37.5:1), 50 µL Tris-Cl 1 M (pH 6.8), 40 µL SDS 10% , 40 µL APS-a, 4 µL TEMED-a.

3.1.5. Puferi i otopine korištene za izolaciju, elektroforezu proteina i Western blot analizu

3.1.5.1. Pufer za izolaciju proteina (RIPA, engl. *radiation immunoprecipitation assay*)

Tris Cl (pH 8,0) 50mM, NP-40 1% (v/v), SDS 0,1% (w/v), natrij deoksikolat 0,5% (v/v), natrij klorid (NaCl) 150mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, aprotinin 1μg/mL, leupeptin 1μg/mL, natrij ortovanadat (Na₃VO₄) 1mM, natrij fluorid (NaF) 1mM

3.1.5.2. Otopina za ispiranje membrana

1XTBS Tween 20 0,05% (Tris baza 50mM, natrij klorid 150 mM), pH 7,6

3.1.5.3. Otopina za sprječavanje nespecifičnog vezanja protutijela

Albumin goveđeg seruma (BSA) 5% (w/v) u PBS-Tween 20

3.1.5.4. Otopina za vizualizaciju proteina vezanih na membranu

Ponceau S 0,5% (w/v) u 1%-tnoj (v/v) octenoj kiselini (CH₃COOH)

3.1.5.5. Pufer za nanošenje uzoraka proteina na gel (5x)

Tris Cl 300 mM (pH 6,8), glicerol 50% (v/v), SDS 10% (w/v), bromfenol modriilo (*engl. bromphenol blue*) 0,05% (w/v), 2-merkaptetanol 10% (v/v)

3.1.5.6. Pufer za elektroforezu proteina (Laemmli pufer) (5x)

Tris baza 12,5 mM, glicin 100 mM, SDS 0,5 % (w/v), pH 8,5

3.1.5.7. Pufer za prijenos proteina s gela na membranu

Tris baza 48 mM, glicin 390 mM, SDS 0,1% (w/v), metanol 20% (v/v)

3.1.6. Protutijela za Western blot analizu

3.1.6.1. Komercijalna protutijela za Western blot analizu

Protutijelo protiv aktina proizvedeno u mišu, Chemicon

Protutijelo na mišje IgG konjugirano s peroksidazom iz hrena (HRP, *engl. horse radish peroxidase*) i proizvedeno u kozi, Santa Cruz

3.1.6.2. Protutijela za Western blot analizu proizvedena na Zavodu za molekularnu medicinu i biotehnologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

Protutijelo protiv RPS6 proizvedeno u mišu

3.1.7. Uređaji i pribor

Biomax filmovi, Kodak

Bürker-Türk hemicitometar

Centrifuge, rashladne: Eppendorf , Chillspin, Sorvall

Igla za nanašanje uzoraka proteina na gel, Hamilton

Hladnjaci (+4°C, -20°C, -80°C, -140°C)

Horizontalna tresilica, Ika

Immobilon P (PVDF membrana za transfer proteina), Millipore

Inkubator, Jouan

Magneti i magnetska mješalica, Ika

pH metar, Mettler Toledo

Pipete, Eppendorf i Gilson

Pipetori, Gilson

Polaroid kamera, Hoefer

Razvijač i fiksir (otopine) za razvijanje filmova, Kodak

Sustav za elektroforezu RNA i proteina, Biorad laboratories

Uređaj za lančanu reakciju polimerazom, Applied Biosystems

Uređaj za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom ABI Prism 7300, Applied Biosystems

Transluminator, Hoefer

Vodena kupelj

Vibracijska mješalica

3 mm filter papir, Whatman

3.1.8. Laboratorijsko posuđe

Boce od 200 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL

Mikrocentrifugalne tubice od 1,5 mL i 2 mL, Greiner

Epruvete za centrifugiranje od 15 mL i 50 mL, Greiner

Nastavci za pipete, univerzalni (0,1-2, 2-20, 20-200 i 100-1000 μ L), Gilson

Nastavci za pipete, filter (0,1-2, 2-20, 20-200 i 100-1000 μ L), Gilson

Odmjerne menzure, tikvice i čaše

Plastični lijevci i kadice

Ploče za kulturu (6 cm, 10 cm, 15 cm), Greiner

Pasterove pipete

Plastične pipete (2, 5, 10 i 25mL), Orange Scientific

Predmetna i pokrovna stakalca

3.1.9. Stanične linije

Ulogu specifičnih malih interferirajućih RNK, siRNA (utišavajućih RNK, engl. *small interfering RNA*) u sprječavanju izražaja RPS6 istražila sam u staničnim linijama A549 (porijeklom iz alveolarnog adenokarcinoma, ATCC). A549 stanice su adherentne, uzgajala sam ih u DMEM mediju uz dodatak fetalnog telećeg seruma (10% v/v), glutamina, penicilin/streptomycinom (kompletni medij) na 37°C i atmosferi od 5 % CO₂. Za održavanje stanične linije potrebno je stanice isprati PBS-om i tretirati ih 5 minuta s tripsinom u inkubatoru na 37 °C i 5 % CO₂. Po završetku tripsinizacije, stanice su resuspendirane u kompletnom mediju i razdijeljene na nove ploče u razrjeđenju 1:3.

3.1 METODE

3.1.1 Kultura stanica i unos nukleinskih kiselina u stanice

U svrhu testiranja specifičnosti i učinkovitosti siRNA u sprječavanju izražaja RPS6, izražaj RPS6 utišala sam (engl. *silencing*) pomoću siRNA (Applied Biosystems) u stanicama A549. siRNA dizajnirala sam upotrebom kompjutorskog programa (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNA>). Za transfekciju stanica nasađeno je 600 000 stanica u 8 mL medija bez antibiotika na ploče promjera 100 mm. Broj stanica je određen pomoću bojila tripansko modrilo i komorice Fuchs-Rosenthal. Kod određivanja broja stanica u bunarčić mikrotitarske ploče pipetom sam dodala 90 µL bojila i 10 µL uzorka stanica. 10 µL suspenzije stanica i boje pažljivo sam prenijela ispod pokrovnice na komorici i stavila pod objektiv svjetlosnog mikroskopa. Izbrojila

sam stanice u 4 središnja kvadrata mrežice te odredila njihovu srednju vrijednost. Ukupni broj stanica izračunala sam prema formuli:

Broj stanica / mL suspenzije = srednja vrijednost izbrojenih stanica u 4 kvadratića * 10^5 .

Sljedeći dan, 30 minuta prije transfekcije stanica zamijenjen je medij i dodala sam 3 mL medija bez antibiotika. U GeneMute transfekcijski pufer dodala sam siRNA u koncentraciji 20 nM, 40 nM i 60 nM te GeneMute transfekcijski reagens u skladu s preporukama proizvođača. Smjesu sam inkubirala 15 minuta na sobnoj temperaturi te potom nakapala na stanice. Stanice su u tom mediju ostavljene preko noći na 37 °C i 5% CO₂. Sljedeći dan, stanicama sam promijenila medij i 48 sati nakon transfekcije testirala sam učinkovitost siRNA. Testirane su tri koncentracije siRNA kako bi se odredila koncentracija koja najbolje sprječava izražaj RPS6. U **Tablici 1.** naveden je ciljni slijed nukleotida za siRNA RPS6 koju sam koristila za sprječavanje izražaja RPS6.

Tablica 1. Ciljni slijed nukleotida siRNA molekule korištene za metodu utišavanja.

siRNA	CILJNI SLIJED NUKLEOTIDA
RPS6	5'-AAGAAAGCCCTTAAATAAAGA-3'

3.1.2 Izolacija ukupne RNK

U svrhu testiranja učinkovitosti utišavanja RPS6 upotrebom siRNA molekula izolirala sam ukupnu RNK iz stanica kako bi testirala izražaj gRNK za RPS6. Stanice

su tripsinizirane 48 sati nakon transfekcije, skupljene u PBS-u i centrifugirane 5 minuta na 1500 okretaja u minuti. Na talog stanica dodan je 1 mL TriReagenta te je dalje RNK izolirana prema uputama proizvođača. Nakon kratkog miješanja dodala sam 400 µL kloroforma i centrifugirala smjesu 15 minuta na 13 000 okretaja u minuti. Po završetku centrifugiranja, 500 µL vodene faze koja sadrži RNK prenijela sam u čistu tubicu te sam dodala jeDNKki volumen (500 µL) izopropanola, centrifugirala 10 minuta pri 10 000 okretaja u minuti te tako izdvojila ukupnu RNK. Dobiveni talog RNK isprala sam u 1 mL 75 % etanola (pripremljen u vodi tretiranoj s DEPC-om) te centrifugirala pri 10 000 okretaja u minuti 5 minuta. RNK sam otopila u 30 µL vode bez nukleaza. Koncentraciju RNK odredila sam spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 260 nm, izračunata prema formuli:

$$\text{koncentracija (RNK)/ } \mu\text{g/mL} = A_{260} \times 40 \times \text{faktor razrijeđenja}$$

Osim toga odredila sam i čistoću izolirane RNK koja određuje kvalitetu izolirane RNK, a dobije se iz omjera vrijednosti apsorbancija A_{260} i A_{280} pri čemu vrijednosti u rasponu 1.80-2.00 odgovaraju zadovoljavajućom čistoćom izolirane RNK.

3.1.3 Elektroforeza RNK

Nakon izolacije ukupne RNK provedena je elektroforeza RNK. Za tu svrhu pripremila sam 1.0 %-tni agarozni gel na način da sam 0,5 g agaroze otopila u 40 mL vode tretirane DEPC-om i zatim je zagrijala u mikrovalnoj pećnici do vrenja. Nakon djelomičnog hlađenja u još uvijek tekuću agaroznu otopinu, uz stalno miješanje, dodala sam 5 mL pufera 10x MOPS, 9 mL formaldehida i 5 µL etidijevog bromida koncentracije 10 mg/mL. Smjesu sam izlila u kadicu za elektroforezu s prethodno postavljenim češljicama koji omogućuju modeliranje bunarčića. Kadiku i

češljice isprala sam vodom tretiranom DEPC-om radi zaštite RNK. Za nanošenje na gel RNK pripremila sam u tubicama tretiranim DEPC-om sljedeće: 2 μ L RNK, 14 μ L SB pufera i 4 μ L LB pufera. Ovako pripremljena smjesa inkubira se 10 minuta na 60 °C u termobloku nakon čega se nanese na pripremljeni formaldehidni gel.

Elektroforeza je provedena u 1x MOPS puferu pod naponom od 60 V nakon čega se gel odbojavao ispiranjem u DEPC tretiranoj vodi. Uzorci se kasnije vizualiziraju pomoću UV- transluminatora i fotografiraju digitalnom kamerom.

3.1.4 Sinteza komplementarne DNK

Ukupnu izoliranu RNK (2 mikrograma) iz stanica prevela sam u cDNA pomoću kita High Capacity cDNK Reverse Transcription Kit. Postupak se radi na ledu. Reakcijsku smjesu za sintezu komplementarne DNK pripremila se prema sljedećem sastavu:

Tablica 2. Prikaz sastava reakcijske smjese za sintezu cDNA.

10x RT pufer	2 μ L
25x dNTP (100 mM)	0,8 μ L
10x RT nasumične početnice	2 μ L
reverzna transkriptaza	1 μ L
RNazi inhibitor	1 μ L
voda bez nukleaza	3,2 μ L
UKUPNI VOLUMEN	10 μ L

U 10 µL reakcijske smjese za sintezu komplementarne DNK dodala sam reakcijsku smjesu sastavljenu iz 2 µg izolirane RNK u 10 µL vode bez nukleaza. Sinteza komplementarne DNK odvijala se u uređaju za lančanu reakciju polimerazom prema slijedećem programu:

25 °C / 10 min.

37 °C / 120 min.

85 °C / 5 min.

4 °C / konstantno

3.1.5 Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Razinu gRNK za RPS6 odredila sam metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real time polymerase chain reaction*, RT PCR) pomoću uređaja ABI Prism 7300. cDNA sam koristila kao kalup za RT PCR uz upotrebu specifičnih početnica za RPS6 i GAPDH (engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). U **Tablici 3.** navela sam početnice koje sam koristila za određivanje izražaja RPS6 i GAPDH u stanicama.

Tablica 3. Sekvence početnica za qRT-PCR.

NAZIV POČETNICE		SEKVENCA
RPS6	F	5'-TGCTCTGAAGAAGCAGCGTA-3'
RPS6	R	5'-GGAAAGTCTGCGTCTCTTCG-3'
GAPDH	F	5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'
GAPDH	R	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'

Komplementarnu DNK (cDNA) razrijedila sam s vodom u omjeru 1:25 te sam potom pripremili reakcijsku smjesu kao što je prikazano prikazanom u **Tablici 4.**

Tablica 4. Prikaz sastava reakcijske smjese.

2x Sybr Green	12,5 µL
razrijeđena cDNA (1:25)	5 µL
2 µM početnice (F+R)	4 µL
Voda bez nukleaza	5,5 µL

U bunarčice mikrotitarske ploče unesena je reakcijska smjesa. Nakon nanošenja uzoraka ploču sam prekrila samoljepljivom folijom i centrifugirala 2 minute na 4 °C i 1200 okretaja/minuti. Ploču sam zatim stavila u uređaj za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu. Reakcija se odvijala po programu:

Tablica 5. Prikaz programa reakcije lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

Program reakcije:			
1.	94°C	10 min	
2.	94°C	15 s	
	60°C	60 s	40x

Za detekciju PCR produkta tijekom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu korištena je fluorescentna boja SYBR Green Tijekom 40 ciklusa mjeri se fluorescencija Syber Greena. Prvi ciklus na kojem je moguće odrediti nastajanje PCR fragmenta označen kao je prag, Ct (engl. *cycle threshold*). Za analizu podataka uspoređivane su vrijednosti Ct uz normalizaciju prema GAPDH, koji ima isti izražaj u svim stanicama organizma (engl. *housekeeping gene*), koristeći program Excel (Microsoft).

3.1.6 Određivanje disocijacijske krivulje za produkt lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

Nakon završetka programa za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu, mikrotitarsku ploču s reakcijskim smjesama podvrgla sam se sljedećem programu:

95°C / 15 sekundi

60°C / 30 sekundi

95°C / 15 sekundi

Flourescencija SYBR Greena provodi se za vrijeme postepenog snižavanja temperature s 95 °C na 60 °C.

3.1.7 Elektroforeza DNK u agaroznom gelu

Za elektroforezu produkata lančane reakcije polimerazom pripremila sam 1,5 %-ni agarozni gel otapanjem 1,5 g agaroze u 100 mL pufera 1x TBE. Smjesu agaroze i pufera zagrijala sam do vrenja u mikrovalnoj pećnici te sam je ohladila do 50 °C i potom dodala 5 µL etidij-bromida (10 mg/mL). Otopinu agaroze izlila sam u prethodno pripremljenu kadicu s pripadajućim češljem za formiranje bunarčića. Nakon polimerizacije na sobnoj temperaturi, gel sam prelila s 1x TBE puferom, a u bunarčiće sam unijela marker te uzorke lančane reakcije polimerazom. Za nanošenje na gel, uzorci DNK su pripremljeni dodavanjem 3 µL pufera za nanošenje uzoraka na gel, a od ukupno 25 µL reakcijske smjese na gel je nanešeno 10 µL. Elektroforeza je provedena pri naponu od 80 V u trajanju od 30 minuta. Po završetku elektroforeze gel je osvijetljen pomoću UV- transluminatora i fotografiran polaroidnom kamerom.

3.1.8 Izolacija ukupnih staničnih proteina i određivanje izražaja RPS6

Nakon transfekcije stanica A549 sa siRNA stanice sam lizirala i izolirala ukupne proteine pomoću pufera za lizu stanica, RIPA. Tijekom lize, stanice su bile na ledu 30 minuta. Nakon centrifugiranja pri brzini 14 000 okretaja/minuti supernatante koji sadrže proteine prebacila sam u čistu tubicu. Koncentraciju proteina u lizatu odredila sam upotrebom otopine Biorad Protein Assay prema

uputama proizvođača. Koncentraciju proteina odredila sam spektrofotometrijski određivanjem apsorbancije na 595 nm valne duljine. Nakon određivanja koncentracije proteina pripremila sam 20 µg staničnih lizata za nanošenje na poliakrilamidni gel. Elektroforeza proteina odvijala se pod utjecajem električnog polja jakosti 120 V u denaturirajućim uvjetima u prisutnosti detergenta (SDS). Ukupnu količinu proteina RPS6 i aktina odredila sam nakon razdvajanja proteina u 12 %-tnom poliakrilamidnom gelu te prijenosa proteina s gela na PVDF membranu uz korištenje specifičnih protutijela. Nakon prijenosa proteina s gela na membranu, membrana je inkubirana blokirajućom otopinom u trajanju od 30 minuta. Po završetku inkubacije membrane s blokirajućom otopinom, pripremila sam primarna protutijela (anti-RPS6 i anti-aktin) u odgovarajućim razrjeđenjima i inkubirala sam membranu s primarnim protutijelima preko noći na 4°C na tresilici. Sljedeći dan, isprala sam membrane tri puta po 5 minuta otopinom za ispiranje te sam zatim membrane inkubirala sa sekundarnim protutijelom pripremljenim u razrjeđenju 1:2000. Inkubacija sa sekundarnim protutijelom trajala je 45 minuta na tresilici na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije membrane sa sekundarnim protutijelom membrana je isprana otopinom za ispiranje, svako pranje u trajanju od 5 minuta. Budući da sekundarno protutijelo na sebi ima vezan enzim HRP (engl. *horse radish peroxidase*) dodaje se supstrat koji omogućuje enzimatsku reakciju i pojavu kemiluminiscencije. Pri dodatku supstrata enzim HRP oksidira supstrat pri čemu dolazi do kemiluminiscencije koja se registrira na filmu prislonjenom uz membranu. Kao supstrat za enzim HRP koristila sam ECL Prime, a nanijela sam ga na membranu prema uputama proizvođača. Nakon dodatka supstrata membranu sam prekrila prozirnom folijom, stavila u kazetu te na nju prislonila film za razvijanje. Razvijanje filma odvijalo se u tamnoj sobi u trajanju od nekoliko minuta. Za vizualizaciju signala na filmu, film sam položila u

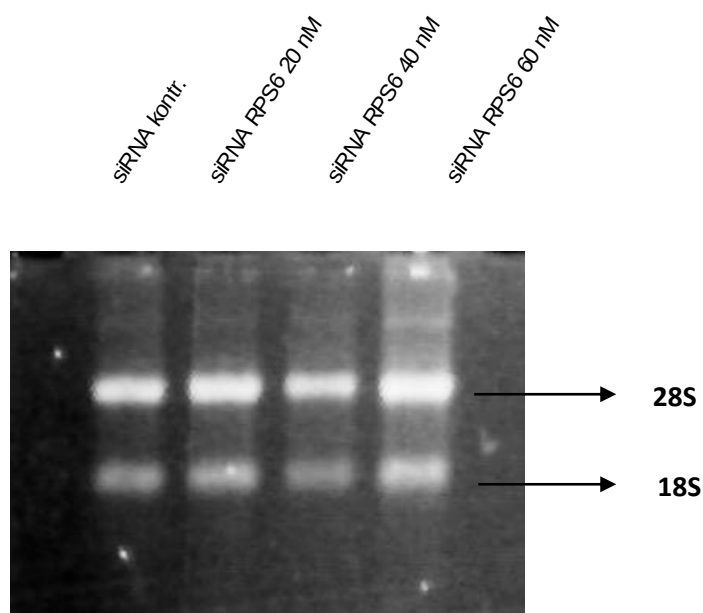
otopinu za razvijanje, zatim ispirala u vodi te položila u otopinu za fiksiranje i ponovno ispirala u vodi. Film je ostavljen da se osuši na sobnoj temperaturi i potom sam ga koristila za određivanje izražaja proteina RPS6 i aktina.

4. REZULTATI

Upotreba malih interferirajućih RNK, siRNA (engl. *small interfering RNA*, utišavajućih RNK) u sprječavanju izražaja gena danas ima veliku primjenu. One se uspješno koriste za sprječavanje izražaja ciljnog proteina ili nekog drugog genskog produkta te imaju veliku primjenu u istraživanju funkcije gena. U ovom radu testirala sam učinkovitost utišavanja ribosomskog proteina S6 (RPS6) putem specifičnih siRNA molekula. Kako bih odredila u kojoj koncentraciji siRNA za RPS6 najbolje smanjuje izražaj RPS6 testirala sam njenu učinkovitost u koncentracijama 20 nM, 40 nM i 60 nM.

U stanice A549 unesene su siRNA molekule protiv ribosomskog proteina S6 (RPS6) u koncentracijama 20 nM, 40 nM i 60 nM te kontrolna siRNA, a nakon 48 sati testirana je učinkovitost utišavanja RPS6. Učinkovitost utišavanja RPS6 nakon smanjenja izražaja sa specifičnim siRNA molekulama testirala sam metodama kvantitativne reakcije lančanom polimerazom (engl. *real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) i metodom Western blot.

Kako bi odredila izražaj gRNK za RPS6 prvo sam izolirala ukupnu RNK i provjerila sam njenu kvalitetu elektroforezom (**Slika 5.**).



Slika 5. Ukupna RNK izolirana iz A549 stanica nakon transfekcije sa siRNA protiv RPS6. Ukupna RNK razdvojena je elektroforezom na 1,2 %-tnom agaroznom gelu, a gel je obojan etidij bromidom. Strelicama su naznačene 28S i 18S rRNK.

Koncentraciju RNK odredila sam spektrofotometrijski, a izmjerene koncentracije prikazane su u **Tablici 6.**

Tablica 6. Koncentracija i čistoća ukupne izolirane RNK.

Uzorci	Koncentracija RNK ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	A260/A280
siRNA kontr.	3,8	1,9512
siRNA RPS6 20 nM	4,41	1,8572
siRNA RPS6 40 nM	5,16	1,9124
siRNA RPS6 60 nM	5,72	1,9025

Kao što je vidljivo iz **Tablice 6.** koncentracije izoliranih RNK bile su između 4.41 i 5.72. Omjeri absorbancija na valnim duljinama 260 nm i 280 nm bili su između 1.8 i 2.0, što ukazuje da je izolirana RNK dobre kvalitete.

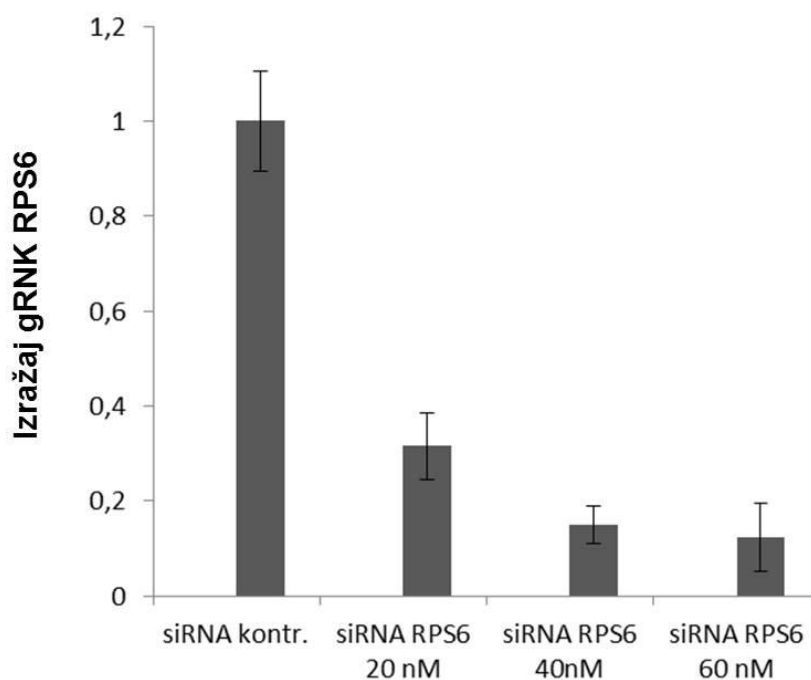
Slijedeći korak nakon izolacije RNK i provjere njene kvalitete bio je prevođenje ukupne RNK u cDNA. Dva mikrograma ukupne RNK za svaki uzorak prevela sam u cDNA upotrebom nasumičnih heksamera. Nakon sinteze cDNA testirala sam učinkovitost utišavanja RPS6 metodom kvantitativne reakcije lančanom polimerazom (engl. *real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR), a kao kalup za tu reakciju koristila sam cDNA. Pomoću qRT-PCR određen je izražaj gRNK za RPS6, a izražaj je normaliziran je prema količini gRNK za GAPDH (engl. *glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase*).

Ciklusi reakcije u kojima su zabilježene umnožene cDNA (Ct vrijednosti) prikazani su u **Tablici 7.** Raspon brojeva ciklusa u kojima su zabilježene amplifikacije za cDNA za RPS6 kretao se od 19 do 22, a za cDNA za GAPDH u rasponu od 15,2 do 15,3.

Tablica 7. Brojevi ciklusa (Ct) u kojima su umnažene cDNA za RPS6 i GAPDH pomoću RT-PCR-a.

	RPS6	Prosječna vrijednost	Standardna pogreška	GAPDH	Prosječna vrijednost	Standardna pogreška
siRNA	19,3542	19,31673	0,105894	15,51	15,37523	0,124398
kontr.	19,3988			15,3509		
	19,1972			15,2648		
siRNA	20,986	21,06767	0,070812	15,3348	15,26973	0,056378
RPS6	21,112			15,239		
20 nM	21,105			15,2354		
siRNA	22,4125	22,40223	0,039513	15,5047	15,4596	0,042498
RPS6	22,4356			15,4203		
40 nM	22,3586			15,4538		
siRNA	22,3345	22,41743	0,071822	15,1781	15,2552	0,098746
RPS6	22,4589			15,221		
60 nM	22,4589			15,3665		

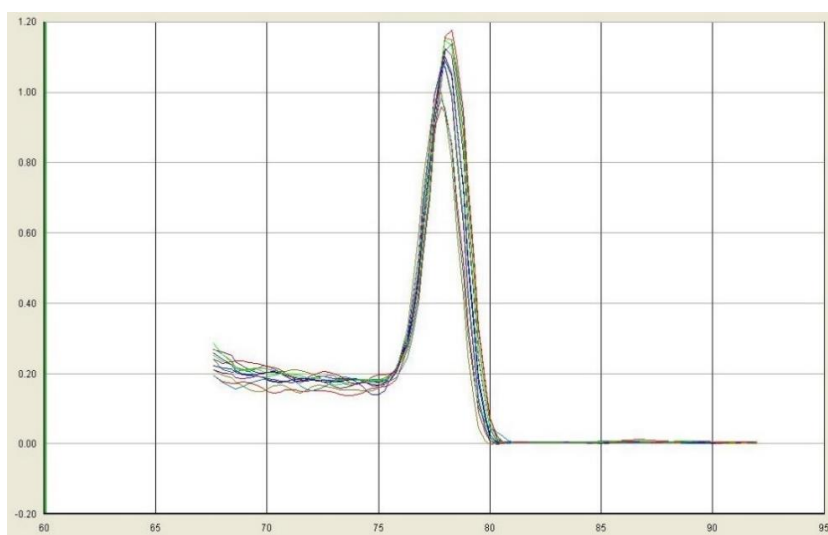
Primjenom relativne kvantifikacije uz upotrebu metode $\Delta\Delta C_t$ izražena je promjena u količini cDNA za RPS6 prema količini cDNA za GAPDH u i u odnosu na kontrolni uzorak (siRNA kontr.) (**Slika 6.**).



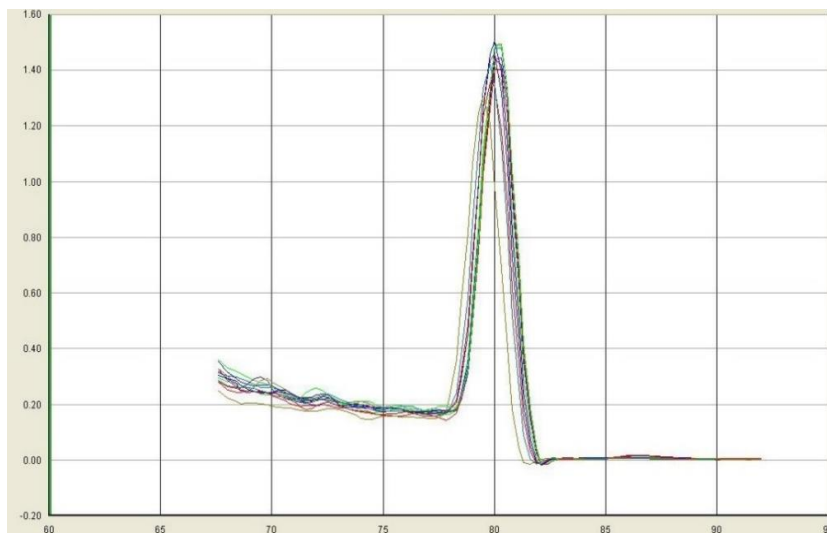
Slika 6. Inhibicija izražaja RPS6 siRNA molekulama. U stanice A549 unesene su siRNA molekule protiv specifičnih RPS6 u koncentracijama 20 nM, 40 nM i 60 nM , a nakon 48 sati testiran je njihov izražaj metodom kvantitativne reakcije lančanom polimerazom (qRT-PCR). Izražaj gRNK normaliziran je prema količini gRNK za GAPDH (engl. *glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase*). qRT-PCR provedena je za svaki uzorak u triplikatima. Oznake pogreške označavaju standardnu devijaciju.

Učinkovitost utišavanja RPS6 testirana 48 sati nakon transfekcije specifičnim siRNA u koncentracijama 20 nM, 40 nM i 60 nM. U stanicama A549 tretiranim siRNA protiv RPS6 u koncentraciji 20 nM smanjen je izražaj gRNK RPS6 za 69 %, u koncentraciji 40 nM za 85 % dok je koncentracija siRNA od 60 nM smanjila izražaj gRNK RPS6 za 88 % u odnosu na uzorak tretiran sa kontrolnom siRNA. Ovi rezultati ukazuju da siRNA u koncentracijama 40 nM i 60 nM učinkovito sprječavaju izražaj RPS6 te da se testirana siRNA za RPS6 može uspješno koristiti u eksperimentalne svrhe, u koncentracijama 40 nM i 60 nM, s ciljem sprječavanja izražaja RPS6.

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR) temelji se na signalu boje SYBR Green ugrađene u dvolančanu DNK. Preduvjet pouzdanosti za metodu RT-PCR je da nastaje samo jedan produkt na koji se veže boja SYBR Green. Nastali produkt daje signal koji se bilježi. Po završetku qRT-pCR reakcije, putem disocijacijske krivulje za sve produkte reakcije odredila sam je li nastao jedan ili više produkata. Kao što je prikazano na **Slikama 7. i 8.** prve derivacije disocijacijskih krivulja za sve produkte qRT-PCR rezultirale su pojavom jednog pika po reakciji što ukazuje da je u svakoj pojedinačnoj reakciji nastao samo jedan produkt.



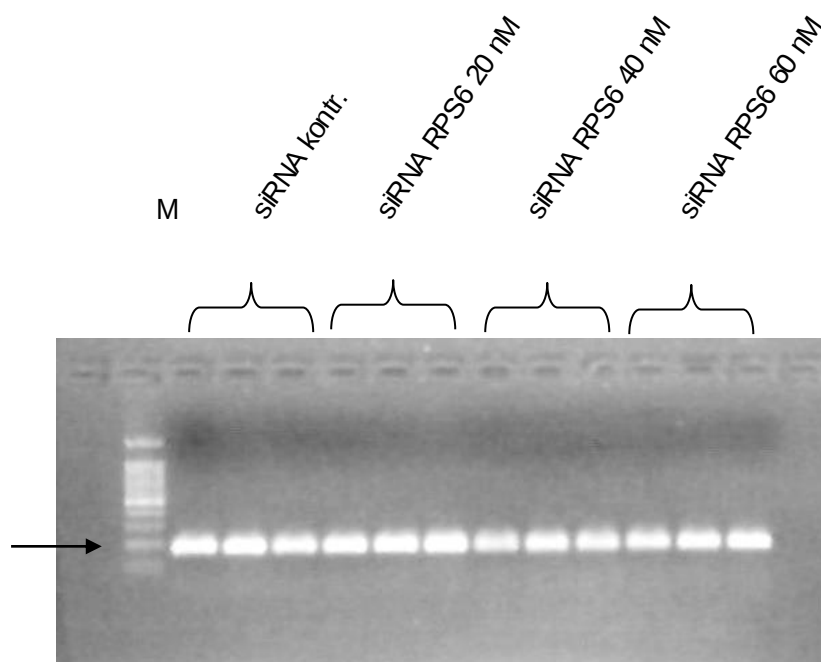
Slika 7. Disocijacijska krivulja za RPS6. Prva derivacija disocijacijskih krivulja za umnožene dijelove komplementarne DNK za RPS6.



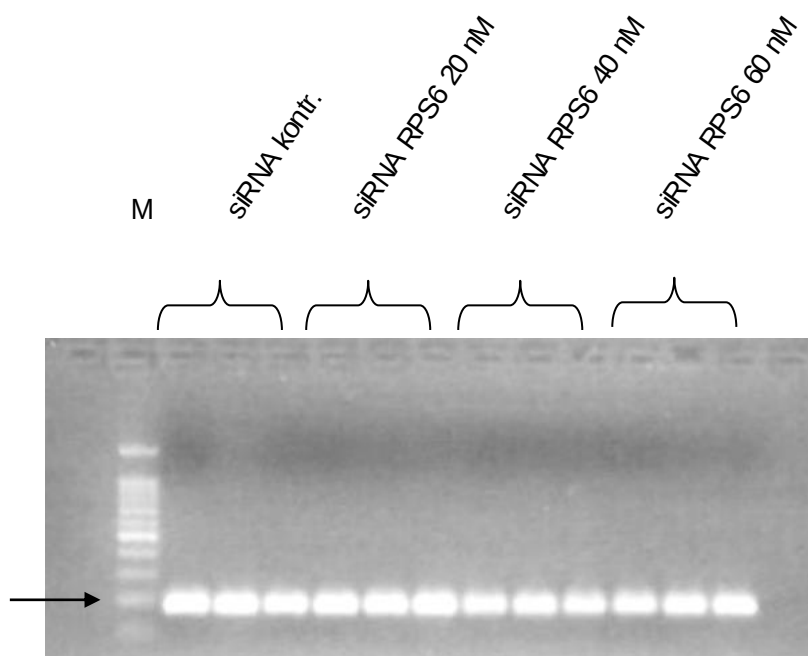
Slika 8. Disocijacijska krivulja za GAPDH. Prva derivacija disocijacijskih krivulja za umnožene dijelove komplementarne DNK za GAPDH.

Nakon što sam odredila disocijacijske krivulje za produkte qRT-PCR reakcije u slijedećem koraku sam nastale produkte još dodatno provjerila elektroforezom na agaroznom gelu. Na **Slici 9. A i B** prikazana je elektroforeza produkata qRT-PCR reakcije za RPS6 i GAPDH.

A)



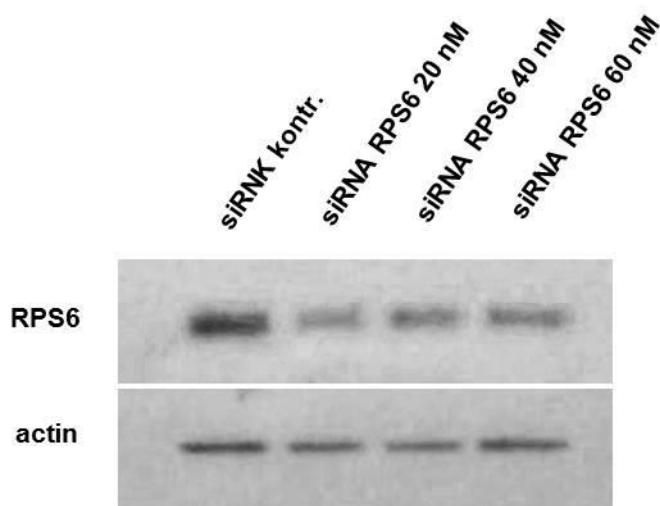
B)



Slika 9. Elektroforeza produkata qRT-PCR reakcije na 1,2 %-tnom agaroznom gelu. Gel je obojan etidij bromidom. Naneseni su triplikati umnožene cDNA za RPS6 (A) i GAPDH (B) te DNK marker. Veličine prikazanih fragmenata označene su strelicama.

Iz rezultata prikazanih na **Slici 9.** vidljivo je da je u svakoj reakciji nastao jedan produkt.

Učinkovitost utišavanja RPS6 s specifičnim molekulama siRNA, osim metodom RT-PCR, testirana je i metodom Western blot (**Slika 10.**)



Slika 10. Inhibicija izražaja RPS6 siRNA molekulama. U stanice A549 unesene su kontrolna siRNA i siRNA RPS6 u koncentracijama 20 nM, 40 nM i 60 nM. Metodom Western blot upotrebom protutijela anti-RPS6 određen je izražaj RPS6 u A549 stanicama 48 sati nakon transfekcije. Izražaj aktina koristio se kao kontrola nanosa ukupnih proteina.

Kao što je vidljivo iz **Slike 10.** siRNA RPS6 učinkovita je u smanjenju izražaja RPS6.

Prema rezultatima qRT-PCR i Western blot analize mogu zaključiti da je testirana siRNA za RPS6, u koncentracijama 40 nM i 60 nM, vrlo učinkovita u sprječavanju izražaja RPS6.

5. RASPRAVA

U *in vitro* i u *in vivo* istraživanjima sintetičke male interferirajuće RNK (siRNA) koriste se u eksperimentalne svrhe s ciljem utišavanja ekspresije ciljnog gena. Ovakve protusmislene RNK mogu biti unesene u stanicu izravno ili stanice mogu biti transfektirane s vektorom konstruiranim da eksprimira takvu protusmisleni RNA s mogućim terapijskim svojstvima.

U zadnjih nekoliko godina, ova metoda, tzv. RNA interferencija postala je jedna od izuzetno učinkovitih i široko primjenjivanih metoda za ometanje ekspresije gena na razini gRNK.

U ovom završnom radu testirala sam učinkovitost utišavanja ribosomskog proteina S6 upotrebom specifične siRNA dizajnirane tako da prepoznaje gRNK za RPS6. U stanice A549 unijela sam siRNA u koncentracijama 20 nM, 40 nM i 60 nM, a 48 sati nakon transfekcije testirala sam njihovu učinkovitost. Nakon transfekcije izolirala sam ukupnu RNK kako bih upotrebom metode qRT-PCR odredila izražaj gRNK za ribosomski protein S6. Rezultati dobiveni lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu pokazuju da se uspjelo postići sniženje izražaja gRNK za RPS6 za 88% što ukazuje da je ta siRNA učinkovita u snižavanju izražaja gRNK za RPS6. Testirana koncentracija siRNA od 20 nM dovodi do sniženja gRNK ribosomskog proteina S6 za 69% pa prema tome u eksperimentima treba koristiti veće koncentracije siRNA kako bi se postigla bolja učinkovitost utišavanja. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se sa siRNA u koncentracijama 40 nM i 60 nM postiže vrlo dobro utišavanje izražaja gRNK za RPS6.

Budući da se siRNA komplementarno vežu na ciljnu gRNK i blokira njenu translaciju u protein, metodom Western blot odredila sam izražaj proteina S6 nakon

transfekcije A549 stanica. Rezultati dobiveni Western blot analizom pokazuju da je izražaj proteina S6 snižen u stanicama nakon transfekcije sa siRNA za RPS6 u usporedbi sa stanicama nakon transfekcije s kontrolnom siRNA. Prema tome, testirana siRNA za RPS6 je vrlo učinkovita u snižavanju izražaja gRNK za RPS6 i proteina RPS6 te se može koristiti u eksperimentalne svrhe s ciljem proučavanja funkcije ribosomskog proteina S6.

6. ZAKLJUČAK

1. Testirana siRNA za ribosomski protein S6 u koncentracijama 40 nM i 60 nM učinkovito sprječava izražaj ribosomskog proteina S6 48 sati nakon transfekcije u humanoj staničnoj liniji A549.
2. Izražaj gRNK za RPS6 je smanjen nakon transfekcije s siRNA za RPS6.
3. Izražaj proteina RPS6 je smanjen nakon transfekcije s siRNA za RPS6.
4. Testirana siRNA vrlo je učinkovita u sprječavanju izražaja RPS6 te se može koristiti u eksperimentalne svrhe za proučavanje funkcije ribosomskog proteina S6.

7. LITERATURA

1. Warner JR. Nascent ribosomes. *Cell* 2001;107:133-6.
2. Thomas, G., (2000), An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation, *Nature Cell Biology*, 2(5), pp. E71–E72.
3. Fatica A and Tollervey D. Making ribosomes. *Current Opinion in Cell Biology* 2002;14:313–318.
4. Robledo S, Idol RA, Crimmins DL, Ladenson JH, Mason PJ, Bessler M. The role of human ribosomal proteins in maturation of rRNA and ribosome production. *RNA* 2008;14(9):1918-29.
5. Framont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F. Ribosome assembly in eucaryotes. 2003; 313:17-42.
6. Nazar RN. Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes. *IUBMB Life*. 2004 ;56(8):457-65.
7. Grabbeman S, Baserga SJ. Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp Cell Res*. 2004;296(1):43-50.
8. Hadjiolov AA. The nucleolus and ribosome biogenesis. Springer-VErlag, Wien, New York, 1985.
9. Leary DJ, Huang S. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS Lett*. 2001;509(2):145-50.
10. Volarevic, S., Steward, M., Ledermann, B., Zilberman, F., Terracciano, L., Montini, E., Grompe, M., Kozma, S., Thomas, G., (2000), Proliferation, but not

growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6, *Science*, 288(5473), pp. 2045-2047.

11. Panic, L., Tamarut, S., Sticker-Jantscheff, M., Barkic, M., Solter, D., Uzelac, M., Grabušić, K., Volarevic, S., (2006), Ribosomal protein S6 gene haploinsufficiency is associated with activation of a p53-dependent checkpoint during gastrulation, *Molecular and Cellular Biology*, 26(23), pp. 8880-8891.

12. Narla, A., Ebert, B.L., (2010), Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction, *Blood*, 115(16), 3196–3205.

13. Teng, T., Thomas, G., Mercer, C.A., (2013), Growth control and ribosomopathies, *Current Opinion in Genetics & Development*, 23(1), pp. 63–71.

14. Šulić S, Panić L, Barkić M, Merćep M, Uzelac M, Volarević S. Inactivation of S6 ribosomal protein gene in T lymphocytes activates a p53-dependent checkpoint response. *Genes Dev* 2005;19:3070-82.

15. Panić L, Tamarut S, Sticker-Jantscheff M i sur. Ribosomal protein S6 gene haploinsufficiency is associated with activation of a p53-dependent checkpoint during gastrulation. *Mol Cell Biol* 2006;26:8880-91.

16. Carthew RW, Sontheimer WJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136:642–655.

17. Wilson RC, Doudna JA. Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annu. Rev. Biophys.* 2013;42:217–239.

18. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391:806–811.

19. Endoh T, Ohtsuki T. Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009;61:704–709.
20. Jeong JH, Kim SW, Park TG. Molecular design of functional polymers for gene therapy. *Prog. Polym. Sc.* 2007;32:1239–1274.
21. Iorns EC, Lord J, Turner N, Ashworth A. Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007;6:556–568.
22. Guo P, Coban O, Snead NM, Trebley J, et al. Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(6):650–666.
23. Wang Y, Li Z, Han Y, Liang LH, et al. Nanoparticle-based delivery system for application of siRNA *in vivo* . *Curr. Drug Metab.* 2010;11(2):182–196.
24. Bumcrot D, Manoharan M, Koteliansky V, Sah DW. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat. Chem. Biol.* 2006;2:711–719.
25. Nishina K, Unno T, Uno Y, Kubodera T, et al. Efficient *in vivo* delivery of siRNA to the liver by conjugation of alpha tocopherol. *Mol. Ther.* 2008;16:734–740.
26. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409:363–366.
27. Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, et al. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat. Biotechnol.* 2005;23:222–226.
28. McNamara JO, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, et al. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamersiRNA chimeras. *Nat. Biotechnol.* 2006;24:1005–1015.

29. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404:293–296.
30. Chen PY, Weinmann L, Gaidatzis D, Pei Y, et al. Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. *RNA*. 2008;14:263–274.
31. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003;115:209–216.
32. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* 2003;21:635–637.
33. Schaffert D, Wagner E. Gene therapy progress and prospects: synthetic polymerbased systems. *Gene Ther.* 2008;15:1131–1138.
34. Kumar P, et al. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Cell*. 2008;134:577–586.
35. Zhang S, Zhao B, Jiang H, Wang B, et al. Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *J. Control Release*. 2007;123:1–10.
36. Kumar P, et al. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*. 2007;448:39–43.
37. Zuhorn IS, Engberts JB, Hoekstra D. Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. *Eur. Biophys. J.* 2007;36:349–362.
38. Verma V, Sangave P. REVIEW ON NON-VIRAL DELIVERY SYSTEMS FOR siRNA. *IJPSR*. 2014;5(2):294–301.

39. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet.* 2014;15(8):541–555.
40. Li W, Szoka FC., Jr Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm Res.* 2007;24(3):438–449.
41. Dorasamy S, Narainpersad N, Singh M, et al. Novel targeted liposomes deliver sirna to hepatocellular carcinoma cells *in vitro* . *Chem Biol Drug Des.* 2012;80:647–656.
42. Kim WJ, Kim SW. Efficient siRNA delivery with non-viral polymeric vehicles. *Pharm Res.* 2009;26:657–666.
43. Kunath K, von Harpe A, Fischer D, Petersen H, et al. Lowmolecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and *in vivo* distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J. Control Rel.* 2003;89(1):113–125.
44. Sato Y, Hatakeyama H, Sakurai Y, et al. A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity *in vitro* and *in vivo* . *J Control Release.* 2012;163:267–276.
45. Gomes-da-Silva LC, Fernandez Y, Abasolo I, et al. Efficient intracellular delivery of siRNA with a safe multitargeted lipid-based nanoplatfrom. *Nanomedicine (Lond)* 2013;8:1397–1413.
46. Guo J, Fisher KA, Darcy R, Cryan JF, et al. Therapeutic targeting in the silent era: advances in non-viral siRNA delivery. *Mol. Biosyst.* 2010;6(7):1143–1161.
47. Zhang XLi, Huang L. Non-viral nanocarriers for siRNA delivery in breast cancer. *J. Control. Release.* 2014;190:440–450.

48. Pulford B, Reim N, Bell A, et al. Liposome-siRNApeptide complexes cross the blood-brain barrier and significantly decrease PrP on neuronal cells and PrP in infected cell cultures. PLoS One. 2010;5:11085.

POPIS KRATICA

cDNK- komplementarna deoksiribonukleinska kiselina

DEPC- dietilpirokarbonat Pre-rRNK- prekursor rRNK

DNK- deoksiribonukleinska kiselina

EDTA- etilendiamintetraoctena kiselina

PBS- fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom

PCR, engl. Polimerase chain reaction- lančana reakcija polimerazom

qRT-PCR, engl. real-time polymerase chain reaction- lančana reakcija polimezarom
u stvarnom vremenu

RNK- ribonukleinska kiselina

rRNK- ribosomalna ribonukleinska kiselina

RP- ribosomalni proteini

tRNK- transportna ribonukleinska kiselina

SB, engl. Sample buffer- pufer za nanošenje RNK na gel

siRNA, engl. small interfering RNA- mala interferirajuća RNK

ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ardiana Kajtazi

Datum i mjesto rođenja: 12.12.1993., Sl. Brod

Adresa: Munida 2, Medulin 52203

Školovanje:

2000.-2001. Osnovna škola Ksavera Šandora Gjalskog, Zabok

2001.-2008. Osnovna škola dr. Mate Demarina, Medulin

2008.-2012. Jezična gimnazija Pula, Pula

2013.- Medicinski fakultet sveučilišta u Rijeci,
preddiplomski studij sanitarnog inženjerstva

Radno iskustvo:

2012.-2016. prodavačica (TRGO-DAVID d.o.o.)

2016.- voditelj prodaje (TRGO-DAVID d.o.o.)

2017.-2018. volonterski rad u sklopu stručne prakse, Island (WF Iceland)

2018.- rad na finalizaciji (JGL d.d.)

Osobne vještine:

Materinji jezik: hrvatski, albanski

Engleski jezik C1 (IELTS test)

Njemački jezik B2 (matura viša razina)

Vozačka: B razina