

# Kloniranje sekvenca DNA za mikroRNA i analiza njihove biološke aktivnosti u staničnoj liniji glioblastoma

---

Kolić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:103791>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno-matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

Dora Kolić

**Kloniranje sekvenca DNA za mikroRNA i analiza njihove  
biološke aktivnosti u staničnoj liniji glioblastoma**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka, pod vodstvom mentorice izv. prof. dr. sc. Maje Matulić. Rad je izrađen u okviru projekta HRZZ “Notch in hematopoietic stem cell differentiation and leukaemia development (voditelj dr. sc. M. Antica, IP-2013-11-7140). Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

# **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## **Kloniranje sekvenca DNA za mikroRNA i analiza njihove biološke aktivnosti u staničnoj liniji glioblastoma**

Dora Kolić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nekodirajuće RNA (ncRNA) važna su skupina regulatornih molekula koja se sastoji od transkripata dijelova genoma koji ne kodiraju za proteine. Sudjeluju u brojnim procesima u eukariotskim stanicama, poput regulacije ekspresije gena i interferencije s RNA. Jedna skupina malih jednolančanih ncRNA su mikroRNA (miRNA). Geni miRNA uobičajeno se nalaze unutar introna i transkribira ih RNA polimeraza II, nakon čega se transkript cijepa RNazama Drosha i Dicer. Novonastala jednolančana RNA, duga 19 do 25 nukleotida, u citoplazmi formira kompleks s proteinima zvan miRISC (kompleks za utišavanje induciran s miRNA). miRISC regulira ekspresiju gena tako što se veže na ciljnu mRNA koja ima sekvencu komplementarnu miRNA koja se nalazi u kompleksu, čime vodi do degradacije mRNA ili sprječavanja inicijacije translacije. Mnoge miRNA imaju ulogu tumorskih supresora ili onkogeni, te se pokazalo da su miR-34a i miR-7 važni tumorski supresori čija je ekspresija utišana u brojnim tumorima čovjeka. Cilj diplomskog rada bio je konstrukcija plazmidnih vektora koji su ekspimirali sekvencu za prekursore miR-34a i miR-7 te proučavanje bioloških promjena u staničnoj liniji glioblastoma A1235 transficiranoj plazmidnim konstruktima. Uzgojene su stanične linije s povećanom ekspresijom miR-34a i miR-7, te je praćena njihova sposobnost proliferacije, otpornost na citostatike i ekspresija proteina koji su potencijalna meta miRNA.

(46 stranica, 10 slika, 4 tablice, 68 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: ncRNA, miR-7, miR-34a, glioblastom A1235, MNNG, CX-4945

Voditelj: Dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.; dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv. prof.; dr. sc. Vesna Benković, red. prof.

Rad prihvaćen: 13.02.2019.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### **Cloning of microRNA DNA sequence and analysis of their biological activity in glioblastoma cell line**

Dora Kolić

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Non-coding RNAs (ncRNA) belong to an important group of regulatory molecules which consist of transcripts from non-protein coding genomic regions. They have a role in many biological processes in eukariotic cells, such as gene expression regulation and RNA interference. One group of small single stranded ncRNAs are microRNAs (miRNA). miRNA genes are usually located inside introns and are transcribed by RNA polymerase II, after which the transcript is processed by Drosha and Dicer RNase. Newly formed single stranded RNA, 19 to 25 nucleotides long, forms a complex with proteins called miRISC (miRNA induced silencing complex) in the cytoplasm. miRISC regulates gene expression by binding with the target mRNA which has a sequence complementary to the miRNA in the complex, leading to mRNA degradation or translation initiation inhibition. Many miRNAs act as tumor suppressors or oncogenes, and it was shown that miR-7 and miR-34a are important tumor suppressors whose expression is silenced in multiple human cancers. The aim of this thesis was to construct plasmid vectors which expressed precursor sequences of miR-34a and miR-7, and to study biological changes in glioblastoma A1235 cell line transfected with plasmid constructs. Cell lines overexpressing miR-7 and miR-34a were produced, and cell proliferation, resistance to cytostatics and expression of potential protein targets were analyzed.

(46 pages, 10 figures, 4 tables, 68 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: ncRNA, miR-7, miR-34a, glioblastoma A1235, MNNG, CX-4945

Supervisor: Dr. sc. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Maja Matulić, Assoc. Prof.; dr. sc. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.; dr. sc. Vesna Benković, Prof.

Thesis accepted: 13th of February, 2019

## ZAHVALE

Veliko hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Maji Matulić na ukazanom povjerenju, prenesenom znanju i vještinama, poticanju diskusije, strpljenju, podršci, trudu i svim savjetima tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela i pisanja ovog diplomskog rada.

Veliko hvala dr.sc. Luki Horvatu na svojoj pomoći, savjetima, idejama, uvažavanju mišljenja i zabavnim trenucima koji su sve ovo skupa uljepšali.

Posebno hvala mojoj najboljoj prijateljici Maji koja je uvijek tu za mene s velikom ljubavi, podrškom, šalama i uhom za slušanje.

Naposlijetku, ali ne i manje važno, zahvaljujem mojim roditeljima i sestri na pruženoj ljubavi, razumijevanju i najvećoj potpori tijekom cijelog života.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Svojstva i klasifikacija nekodirajućih RNA .....	1
1.1.1. Otkriće nekodirajućih RNA.....	1
1.1.2. Podjela nekodirajućih RNA.....	2
1.2. mikroRNA .....	3
1.2.1. Biogeneza miRNA .....	4
1.2.2. Mehanizmi djelovanja miRNA.....	7
1.2.3. Načini regulacije djelovanja miRNA .....	8
1.2.4. Uloge miRNA.....	9
1.3. miR-7.....	9
1.4. miR-34a .....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	12
3. MATERIJALI I METODE .....	13
3.1. Umnažanje sekvence DNA koja kodira za miRNA .....	13
3.2. Elektroforeza na agaroznom gelu .....	14
3.3. Pročišćavanje fragmenata DNA .....	14
3.4. TA kloniranje .....	14
3.5. Plavo-bijela selekcija bakterijskih kolonija .....	15
3.6. Izolacija plazmida .....	16
3.7. Restriksijska digestija plazmidne DNA.....	16
3.8. Defosforilacija plazmida i ligacija.....	17
3.9. Reakcija PCR uzoraka kolonija bakterija .....	17
3.10. Transfekcija stanica .....	18
3.11. Izolacija DNA.....	19
3.12. Krivulja rasta stanica .....	19
3.13. Izolacija staničnih proteina.....	20
3.14. Analiza <i>Western blot</i> i imunodetekcija.....	20
3.15. Izolacija RNA .....	22
3.16. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR).....	23
3.17. Statistička obrada podataka .....	24

4. REZULTATI.....	25
4.1. Konstrukcija plazmida pcDNA3-miR-34a i pcDNA3-miR-7 .....	25
4.2. Potvrda transfekcije stanica A1235 konstruiranim plazmidnim vektorima .....	28
4.3. Utvrđivanje ekspresije kloniranih mikroRNA u stanicama A1235 .....	28
4.4. Utjecaj mutagena MNNG i citostatika CX-4945 na proliferaciju stanica A1235 ...	29
4.5. Analiza ekspresije proteina u transficiranim stanicama A1235.....	32
5. RASPRAVA.....	34
6. ZAKLJUČAK .....	40
7. LITERATURA .....	41
ŽIVOTOPIS	



# 1. UVOD

## *1.1. Svojstva i klasifikacija nekodirajućih RNA*

### *1.1.1. Otkriće nekodirajućih RNA*

Prije otprilike sto godina pod vodstvom Phoebusa Levene i Jeana Bracheta, pionirskih istraživača strukture i funkcije nukleinskih kiselina, provedena su prva ključna istraživanja o strukturi molekule pod nazivom kvaščevo nukleinska kiselina, zimonukleinska kiselina, pentozo nukleinska kiselina (PNA) i naposljetku ribonukleinska kiselina. Između kasnih pedesetih i ranih šezdesetih godina 20. stoljeća otkriveno je da se većina staničnih ribonukleinskih kiselina sintetizira iz kalupa DNA enzimatskim procesima, te da mikrosomalna RNA (rRNA) i citoplazmatske RNA (mRNA i tRNA) sudjeluju u biosintezi proteina. U šezdesetim i sedamdesetim godinama otkrivene su i karakterizirane mnoge druge molekule RNA, uključujući i prve članove obitelji RNA koje danas klasificiramo kao male jezgrine i jezgrične RNA. Ribonukleinske kiseline koje se nisu mogle svrstati u mRNA nazvane su strukturne RNA, budući da se očekivalo kako imaju strukturnu ulogu u stanici poput rRNA, koje su smatrane kalupom za dotada jedine poznate funkcionalne molekule, proteine (Brosius i sur., 2016). No hipoteza „RNA svijeta“ koju je predložio Gilbert (1986) izazvala je „centralnu dogmu“ pogleda na biološku ulogu RNA, u kojoj je predloženo da je izvor života baziran na RNA koja može nositi i genetičku informaciju i vršiti funkcije poput katalize. Iako se o hipotezi svijeta RNA još uvijek raspravlja, pomogla je otkriti dotada skriveni „regulatorni svijet RNA“ (Qu i Adelson, 2012).

Svaka ribonukleinska kiselina započinje svoj stanični život kao transkript DNA. Ako transkript ili produkt njegovog procesiranja ima funkciju smatra se molekulom RNA. Intenzivna istraživanja RNA i potraga za novim funkcionalnim ulogama potpomognuta su otkrićima da se transkribira puno veći dio intergenskih sekvencija nego što se smatralo. Pokazano je da se transkribira 85% genoma vinske mušice, 62% genoma miša i čak 93% genoma čovjeka (Childs i sur., 2009). Međutim, vode se rasprave oko točnog postotka transkripata koji vrši neku funkciju. Dok jedna skupina istraživača predlaže da su gotovo svi transkripti funkcionalne molekule RNA, drugi tvrde da iako genomi većine organizama uz mRNA kodiraju i desetke tisuća funkcionalnih RNA koje ne kodiraju za proteine, veliki postotak transkripata niske zastupljenosti predstavlja samo transkripcijsku buku. Neki istraživači stoga predlažu poboljšani način klasifikacije molekula RNA, kako bi se riješio problem kategorizacije transkripata koji nemaju funkciju (Brosius i sur., 2016).

Za razliku od malog postotka genoma sisavaca koji se transkribira u mRNA, većina genoma transkribira se u RNA koja se smatra nekodirajućom RNA (ncRNA), funkcionalnim molekulama RNA koje se ne transliraju u proteine. Analize genoma su otkrile da iako otprilike 1,5% genoma kodira za proteine, čak 90% genoma se transkribira u ncRNA. Kako se povećava složenost organizma, tako se povećava količina nekodirajućih regija u intergenskim

sekvencama i intronima, vjerojatno zbog njihove uloge u regulaciji. (Morceau i sur., 2013). U posljednja dva desetljeća prepoznat je veliki značaj ncRNA u brojnim biološkim, fiziološkim i patološkim procesima. Proučavanje strukture molekula ncRNA dalo je važan uvid u njihovu biološku funkciju i utjecaj u kompleksnim regulatornim mrežama. Prilikom procesa smatanja molekula RNA, karakteristična sparivanja nukleotidnih baza i interakcije slaganja igraju važnu ulogu u sposobnosti RNA da vrši određenu funkciju. Nastali oblici i načini smatanja mogu biti vrlo kompleksni i omogućuju vezanje metabolita i proteina visokom specifičnošću. RNA je osobito prikladna za hibridizaciju sa sekvencama nukleotida, što omogućava visoko specifično ciljanje gena i regija genoma. Nadalje, neka istraživanja pokazuju da dvije molekule ncRNA mogu imati sasvim drugačiji sastav nukleotida i svejedno se smotati u istu strukturu i vršiti istu funkciju (Childs i sur., 2009).

### ***1.1.2. Podjela nekodirajućih RNA***

ncRNA se sastoje od transkripata koji, za razliku od mRNA, sadrže visoku količinu STOP kodona i nemaju otvoreni okvir čitanja (ORF). Široko je prihvaćena definicija ncRNA kao molekule RNA koja nije samo posrednik između DNA i proteina, nego je biološki funkcionalna. ncRNA su heterogena skupina, poput gena koji kodiraju za proteine, i klasificirane su prema funkciji, veličini i strukturi. Prema veličini ncRNA mogu biti duge od 19 do 25 nukleotida i dijele se na mikroRNA (miRNA), Piwi-vezujuće RNA (piRNA) i male interferirajuće RNA (siRNA). U drugu skupinu spadaju ncRNA duge 20 do 300 nukleotida koje uobičajeno funkcioniraju kao transkripcijski i translacijski regulatori, te treću skupinu čine ncRNA duge 300 do 10000 nukleotida, koje imaju razne funkcije. ncRNA sudjeluju u brojnim procesima u eukariotskim stanicama, poput utišavanja ekspresije gena, regulacije transkripcije, demetilacije DNA, promjene strukture kromatina, stanične diferencijacije i RNA interferencije (Costa, 2007).

Jedna od najpoznatijih ncRNA je transfer RNA (tRNA), koja služi kao fizička poveznica sekvence nukleotida (mRNA) i aminokiselinske sekvence proteina. Ribosomska RNA (rRNA) nužna je za sintezu proteina i služi kao funkcionalna komponenta ribosoma u svim živim bićima. Male jezgrine RNA (snRNA) čine skupinu molekula RNA prosječne duljine od 150 nukleotida, lokaliziranih u jezgri eukariotskih stanica. Njihova primarna funkcija je procesiranje pre-mRNA, koju vrše sa setom specifičnih proteina u kompleksima zvanima mali jezgrini ribonukleoproteini (snRNP). Podvrsta snRNA su male jezgrične RNA (snoRNA) koje se nalaze u jezgricama i uključene su u sazrijevanje molekula RNA vršenjem kemijskih modifikacija većinom na rRNA, tRNA i snRNA. Piwi-vezujuće RNA (piRNA) su najmnogobrojnija skupina malih ncRNA (19 do 25 nukleotida) eksprimiranih u stanicama životinja. Formiraju komplekse s Piwi proteinima i sudjeluju u epigenetskom i posttranskripcijskom utišavanju retrotranspozona i drugih genetskih elemenata u

primordijalnim germinativnim stanicama, pogotovo tijekom spermatogeneze (Morceau i sur., 2013).

Male interferirajuće RNA (siRNA) su skupina kratkih dvolančanih molekula RNA (20-25 pb) koje imaju ulogu u putevima RNA interferencije. One su posrednici u posttranskripcijskoj supresiji transkripata i retrotranspozona tako što sprječavaju translaciju komplementarnim sparivanjem sa sekvencama nukleotida, te pridonose obrani od virusa. Duge nekodirajuće RNA (lncRNA) čine najnoviju i najmanje opisanu skupinu ncRNA. lncRNA uključuju sve ncRNA veće od 200 nukleotida te one koje nisu kategorizirane u druge obitelji RNA. Za razliku od malih ncRNA, koje su među vrstama visoko konzervirane i uključene u transkripcijsko i translacijsko utišavanje gena, lncRNA su slabo konzervirane i njihovi načini regulacije su različiti i nedovoljno istraženi. Također, lncRNA imaju male otvorene okvire čitanja bez potencijala za kodiranje proteina i mogu biti povezane s ribosomima, što otkriva nove uloge u metabolizmu mRNA. Neke lncRNA reguliraju ekspresiju gena tako što modificiraju strukturu kromatina. Brojna istraživanja otkrivaju široki spektar mehanizama kojima lncRNA reguliraju kromatin pojedinog promotora, skupine gena ili cijelog kromosoma kako bi aktivirale ili utišale gene (Morceau i sur., 2013).

Vanstanične ili egzosomske RNA (exRNA) predstavljaju skupinu RNA koje se nalaze u tjelesnim tekućinama (venskoj krvi, slini, urinu, majčinom mlijeku, menstrualnoj krvi, te sjemenoj i vaginalnoj tekućini). Sastoje se od mRNA, tRNA, miRNA, lncRNA i siRNA koje su zatvorene u vezikularnim tijelima koja sprječavaju njihovu razgradnju. Biokemijski dokazi podupiru tvrdnje da je unos exRNA uobičajen stanični proces, otkrivajući nove puteve međustanične komunikacije. Relativna količina određenih exRNA može se povezati sa staničnom signalizacijom ili specifičnim stanjima bolesti (Morceau i sur., 2013). U istraživanju koje su proveli Huang i suradnici (2013) visokoprotočnim sekvenciranjem određena je populacija RNA u ljudskoj plazmi, te je otkriveno kako većinu RNA čine miRNA (42,32%), zatim rRNA (9,16%), duge nekodirajuće RNA (3,36%), Piwi-vezujuće RNA (1,31%), tRNA (1,24%), snRNA (0,18%), i snoRNA (0,01%).

## ***1.2. mikroRNA***

mikroRNA (miRNA) su male ncRNA koje sudjeluju u procesu RNA interferencije tako što se vežu za ciljne sekvence na mRNA, što uobičajeno rezultira utišavanjem genske ekspresije. miRNA su uključene u gotovo sve razvojne i patološke procese u životinjama. Biogeneza miRNA nalazi se pod strogom vremenskom i prostornom kontrolom, te je njihova deregulacija povezana s puno ljudskih bolesti, uključujući tumorigenezu i poremećaje u neuralnom razvoju. Istraživanje obrasca ekspresije raznih tipova stanica i tkiva pokazalo je da je uzorak ekspresije miRNA specifičan za tip stanice i tkiva, te je čvrsto povezan s diferencijacijom stanica i razvojem (Iorio i Croce, 2009).

Prije 30 godina pronađena je prva miRNA, *lin-4*, koja regulira embrionalni razvoj *Caenorhabditis elegans* (Lee i sur., 1993; Wightman i sur., 1993.). No tek je otkriće miRNA *let-7* i njenog očuvanja od oblića do čovjeka pokazalo opseg i funkcionalnu važnost regulacije gena ovisne o miRNA. *lin-4* i *let-7* se obje vežu za 3' netranslantiranu regiju (engl. *untranslated region*, UTR) određenih mRNA i sprječavaju njihovu translaciju u pojedinim razvojnim fazama *C. elegans*. Nakon nekoliko godina otkriveno je kako su ove male molekule RNA (18 do 22 nukleotida) eksprimirane u više organizama, evolucijski visoko očuvane, specifične za određena tkiva i razvojne stadije, te da imaju presudne uloge u proliferaciji, diferencijaciji, apoptozi i odgovoru na stres (Iorio i Croce, 2009).

Geni za miRNA čine jednu od najbrojnije porodice gena, te su široko rasprostranjeni u životinjama, biljkama, protistima i virusima. U genomima mnogih vrsta postoje višestruki lokusi DNA koji kodiraju za miRNA sa srodnim sekvencama, koje su većinom nastale duplikacijom gena. Pravila klasifikacije miRNA još nisu ujedinjena, no općenito se smatra da miRNA koje imaju identične sekvence na nukleotidima od pozicije 2 do 8 zrele miRNA pripadaju istoj porodici miRNA. Na primjer, genom čovjeka sadrži 14 paralognih lokusa, takozvane „sestrinske miRNA“, koji pripadaju porodici *let-7*. Čak 34 porodice miRNA su filogenetski očuvane od *C. elegans* do čovjeka, a 136 porodica je očuvano među sisavcima (Ha i Kim, 2014).

Nomenklatura miRNA još nije jedinstvena. Geni otkriveni u ranijim genetičkim istraživanjima imenovani su prema fenotipu (npr. *lin-4* i *let-7*), dok je većina gena miRNA pronađena kloniranjem ili sekvenciranjem dobila numerirana imena (npr. *miR-7*). Geni koji kodiraju za sestrinske miRNA označavaju se slovima (npr. *miR-34a* i *miR-34b*). Ako ista zrele miRNA nastaje iz više lokusa, dodaju se brojevi na kraj imena (npr. *miR-125b-1* i *miR-125b-2*). Svaki lokus stvara dvije zrele miRNA: jednu s 5' i drugu s 3' lanca prekursorske molekule (npr. *mir-125a-5p* and *mir-125a-3p*). Ipak, jedan lanac (zvan vodeći lanac) je uobičajeno 96-99% češći i biološki aktivniji od drugog pratećeg lanca (miRNA\*) (Ha i Kim, 2014). Jedan vodeći lanac miRNA može regulirati nekoliko ciljanih mRNA i više miRNA može kooperativno djelovati na jednu mRNA (Bartel, 2004).

### **1.2.1. Biogeneza miRNA**

Sekvence DNA za miRNA nalaze se u raznim dijelovima genoma. U čovjeku je većina kanonskih miRNA kodirana u intronima i nekodirajućih i kodirajućih transkriptata, no neke miRNA su kodirane u regijama egzona. Često se nekoliko lokusa miRNA nalazi blizu jedni drugima, čime tvore policistronsku transkripcijsku jedinicu; individualne miRNA se dodatno reguliraju na posttranskripcijskoj razini. Precizne lokacije promotora miRNA još nisu pronađene za većinu gena miRNA, no mogu se naslutiti iz kolektivne analize otoka CpG, podataka sekvenciranja RNA i podataka CHIP sekvenciranja (sekvenciranje nakon

imunoprecipitacije kromatina). Neki geni miRNA koji se nalaze u intronima gena koji kodiraju za proteine koriste promotor svog domaćinskog gena. Otkriveno je i kako geni miRNA često imaju više mjesta za početak transkripcije te da su promotori intronskih miRNA ponekad različiti od promotora domaćinskog gena (Ha i Kim, 2014).

Transkripciju miRNA vrši RNA polimeraza II pod kontrolom transkripcijskih faktora i epigenetskih regulatora (Slika 1.). Otkriveno je da ponekad i RNA polimeraza III transkribira neke virusne gene za miRNA, te da su neke endogene RNA nalik na miRNA transkribirane istom polimerazom (Babiarz i sur., 2008). Nakon transkripcije, primarna miRNA (pri-miRNA) prolazi nekoliko koraka sazrijevanja. pri-miRNA je uobičajeno duga 1 kb i sadrži strukturu ukosnice u kojoj se nalazi zrela sekvenca miRNA. Tipična miRNA se sastoji od peteljke-omče duge 33 do 35 nukleotida, terminalne omče i jednolančanih segmenata na 5' i 3' krajevima molekule. Jezgrina Rnaza III Drosha započinje proces sazrijevanja tako što cijepa peteljku-omču i otpušta ukosnicu RNA dugu oko 65 nukleotida (pre-miRNA). Zajedno sa esencijalnim kofaktorom DGCR8, Drosha čini kompleks zvan Mikroprocesor. Drosha i DGCR8 su očuvani u životinjama, dok biljke koriste enzime slične Diceru za sve korake procesiranja miRNA (Ha i Kim, 2014).

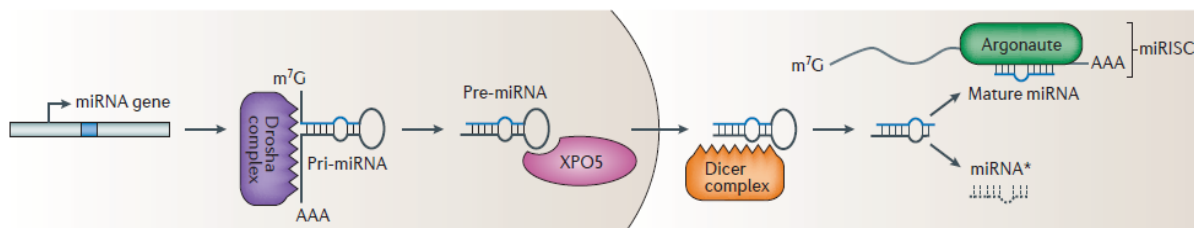
pre-miRNA se eksportira u citoplazmu gdje se dovršava sazrijevanje. Protein eksportin 5 (EXP5, kodiran genom *XPO5*) stvara kompleks za transport s jezgrinim proteinom Ran koji veže GTP i pre-miRNA. Nakon translokacije kroz kompleks jezgrine pore, GTP se hidrolizira, što rezultira raspadanjem kompleksa eksportina 5 i proteina Ran te otpuštanjem pre-miRNA u citosol. Nakon toga pre-miRNA se cijepa proteinom Dicer blizu terminalne omče, otpuštajući mali dupleks RNA. Dicer se veže za pre-miRNA, preferencijalno za 3' stršeće krajeve duge dva nukleotida koje je stvorio enzim Drosha. Općenito se mjesta za cijepanje enzimom Dicer nalaze na fiksnoj udaljenosti od 3' kraja. Stvara se dsRNA duga 21-25 nukleotida, a duljina ovisi o vrsti i tipu enzima Dicer (Ha i Kim, 2014).

Mala dsRNA se sklapa s proteinom Argonaut (AGO) kako bi se formirao kompleks za utišavanje induciran s RNA (miRISC). Stvaranje miRISC uključuje dva koraka; nanošenje dupleksa RNA i njegova odmatanje. Nakon procesiranja enzimom Dicer, dupleksi RNA se preferencijalno nanose na određeni tip proteina AGO. Proteini su podijeljeni u tri grupe: AGO, PIWI i proteini AGO specifični za oblike (engl. *worm-specific AGO*, WAGO). Proteini AGO su eksprimirani u svim vrstama i vežu miRNA i siRNA, dok su PIWI specifični za primordijalne germinativne stanice i vežu piRNA. Sva četiri ljudska proteina AGO (AGO1-4) mogu inkorporirati duplekse siRNA i miRNA (Ha i Kim, 2014).

Nakon nanošenja dupleksa miRNA, pre-RISC brzo uklanja prateći lanac kako bi se stvorio zreli RISC. Proteini AGO koji imaju sposobnost cijepanja (AGO2 u čovjeka) mogu pocijepati prateći lanac ako je dupleks komplementarno spojen u sredini sekvence. Endonukleaza C3PO pomaže u uklanjanju pocijepanog lanca. No ovaj mehanizam se rijetko

koristi u sazrijevanju RISC budući da većina duplekasa ima središnje dijelove gdje sekvence nisu spojene, te AGO1, AGO3 i AGO4 nemaju sposobnost cijepanja. Stoga je najčešći proces uklanjanja pratećeg lanca odmatanjem duplekasa miRNA. Neslaganje sekvenci na pozicijama nukleotida 2-8 i 12-15 promovira odmatanje duplekasa. Nanošenje duplekasa miRNA na RISC je aktivan proces koji zahtijeva ATP, dok je odmatanje pratećeg lanca proces neovisan o ATP (Ha i Kim, 2014).

Na temelju relativne termodinamičke stabilnosti dvaju krajeva duplekasa RNA izabire se lanac koji će biti vodeći. Tijekom nanošenja duplekasa RNA na protein AGO uobičajeno se kao vodeći izabire onaj lanac koji ima relativno nestabilan 5' kraj. Dodatan je uvjet za izbor lanca prvi nukleotid u sekvenci: AGO proteini kao vodeći lanac odabiru onaj koji ima uracil kao prvi nukleotid. Prateći lanac se brzo razgrađuje, što rezultira velikim prevladavanjem vodećih lanaca u uzorku svih zrelih miRNA (Ha i Kim, 2014).



**Slika 1. Biogeneza miRNA.** U životinjama, geni miRNA tipično se transkribiraju u primarne transkripte RNA (pri-miRNA) koji se procesiraju kompleksom koji sadrži enzim Drosha. Dobivena ukosnica prekursorske miRNA (pre-miRNA) transportira se u citoplazmu eksportinom 5 (XPO5). Kompleks Dicer uklanja omču iz pre-miRNA, te Argonaut veže jedan lanac dvolančane RNA kako bi se formirao kompleks za utišavanje induciran s miRNA (miRISC), koji ciljano regulira mRNA. Drugi, prateći lanac (miRNA\*) se razgrađuje (preuzeto iz Pasquinelli, 2012).

Za razliku od kanonskog puta sinteze miRNA, postoje i razni alternativni mehanizmi koji mogu stvoriti miRNA ili male RNA nalik na miRNA. Visokoprotočno sekvenciranje malih RNA izoliranih iz stanica koje ne eksprimiraju *Dgcr8*, *Drosha* ili *Dicer* pokazalo je da postoje nekonvencionalne miRNA koje mogu nastati neovisno o kompleksu Mikroprocesor ili enzimu Dicer. Prvi takav put je opisan u istraživanju sinteze mirtrona, skupine miRNA koje se transkribiraju iz introna gena koji kodiraju za proteine, gdje se umjesto procesiranja enzimom Drosha prekursor miRNA dobiva alternativnim prekrajanjem mRNA. Procesiranje enzimom Drosha zaobilazi se i u slučaju sinteze malih RNA nalik na miRNA iz kratkih ukosnica RNA, koje se dobivaju transkripcijom gena. Kratke ukosnice RNA sadrže kratke omče koje se mogu direktno procesirati enzimom Dicer, bez potrebe cijepanja enzimom Drosha. Neke male RNA se također mogu formirati enzimom Dicer iz drugih ncRNA poput

tRNA ili prekursora tRNA, snoRNA ili virusnih RNA nalik na snRNA. Iako većina alternativnih puteva ovisi o Dicer, biogeneza nekih mRNA, na primjer miR-451, ovisi o katalitičkoj aktivnosti AGO2. Postojanje alternativnih puteva ukazuje na evolucijsku fleksibilnost biogeneze miRNA. Ipak, velika većina funkcionalnih miRNA slijedi kanonski put biogeneze; tek 1% evolucijski očuvanih miRNA u kralježnjacima nastaje neovisno o enzimima Dicer i Drosha. miRNA koje nastaju alternativnim putevima su malobrojne i slabo evolucijski očuvane (Ha i Kim, 2014).

### **1.2.2. Mehanizmi djelovanja miRNA**

U životinjama većina miRNA stvara samo djelomične dvostruke lance s netranslantiranom regijom 3' kraja mRNA (3'-UTR). Rijetko dolazi do savršenog komplementarnog sparivanja između miRNA i ciljane molekule; većinom nastaju dvostruki lanci koji imaju nesporene nukleotide i stršeće omče. Najčešći motiv je komplementarno sparivanje od nukleotida 2 do 7 na 5' kraju miRNA (engl. „*seed sequence*“) (Pasquinelli, 2012). Dio sekvence mRNA koji je komplementaran tim nukleotidima naziva se „kanonska regija“; prema mnogim istraživanjima ta se regija evolucijski selektira i većinom je ključna kao signal za degradaciju ovisnu o miRNA. Najjače evolucijsko očuvanje na 5' kraju miRNA pokazale su sekvence duge 7-8 nukleotida (Hausser i Zavolan, 2014).

Mehanizmi koje miRNA koriste za regulaciju ekspresije ciljanog gena kontroverzna su tema budući da postoje razni ishodi regulacije: inhibicija translacije, destabilizacija ili degradacija mRNA, čak i aktivacija ekspresije gena. U biljkama i životinjama miRNA mogu utišati ekspresiju degradacijom RNA ili inhibicijom translacije. Većinom u biljkama savršeno komplementarno sparivanje s ciljanom mRNA dovodi do endonukleolitičke razgradnje enzimom Argonaut; ovaj je ishod u životinjama puno rjeđi (Pasquinelli, 2012). Od četiri proteina AGO prisutna u čovjeku (AGO1-4) samo AGO2 može pocijepati ciljanu mRNA, dok svi proteini AGO mogu inducirati inhibiciju translacije i razgradnju mRNA interakcijama s translacijskom mašinerijom i faktorima za razgradnju mRNA (Ha i Kim, 2014). Najčešći mehanizam degradacije ciljanih mRNA u životinjama je deadenilacija poli(A) repa, što uzrokuje otpuštanje PABPC s mRNA (protein koji veže poli(A) rep), čime ona postaje podložna razgradnji egzonukleazama. Inhibicija translacije proteina postiže se sprječavanjem vezanja faktora za inicijaciju translacije na mRNA, a može doći i do stimulacije razgradnje peptida koji se sintetizira ili otpuštanja vezanih ribosoma. Otkriveni su i slučajevi aktivacije translacije pomoću miRNA, no ti su slučajevi izolirani i nedovoljno istraženi (Pasquinelli, 2012).

### ***1.2.3. Načini regulacije djelovanja miRNA***

Sposobnost miRISC da prepozna i regulira ciljanu mRNA pod utjecajem je više faktora. Najvažniji je pozicija ciljane sekvence u mRNA; sekvence u 3'-UTR regiji se mogu efektivnije vezati i regulirati nego sekvence u kodirajućim regijama gdje ribosomi mogu destabilizirati komplekse djelomično sparenih miRNA. Također i sekvence bogate parovima baza AU i regije bez sekundarnih struktura poboljšavaju sposobnost vezanja miRISC. Proteini koji vežu RNA, poput Deadend1 (DND1), mogu pak prekriti vezna mjesta miRNA i na taj način modulirati njihovu regulaciju. Faktori koji asociraju s miRISC mogu inhibirati njegovu sposobnost vezanja i regulaciju mRNA; ubikvitinacija AGO označava ga za razgradnju proteasomom, dok fosforilacija i poli-ADP ribozilacija interferiraju s vezanjem mRNA. Druge pak modifikacije AGO mogu poboljšati sposobnost vezanja mRNA, poput prolil-4 hidrosilacije koja stabilizira kompleks miRISC (Pasquinelli, 2012).

miRNA se mogu regulirati i specifičnim kompetirajućim molekulama RNA zvanim mikroRNA spužve, čija je glavna funkcija vezanje miRNA kako ne bi stvarale komplekse sa svojim mRNA metama (Ebert i sur., 2007). Ovu funkciju najčešće vrše cirkularne RNA (circRNA) koje nastaju prekrajanjem 3' egzona na 5' egzone, no otkriveni su i pseudogeni, lncRNA, i razne mRNA koje također služe kao mamci za miRNA (Hausser i Zavolan, 2014). Ekspresija mikroRNA može biti kontrolirana i raznim transkripcijskim faktorima. Otkrivene su regulatorne mreže genske ekspresije (engl. *feed-forward loops*) u kojima miRNA i transkripcijski faktori kontroliraju zajedničku metu, te je transkripcija same miRNA pod kontrolom istog transkripcijskog faktora (Hausser i Zavolan, 2014).

Ekspresija i regulacija aktivnosti miRNA promijenjena je u tumorskim stanicama, te one imaju važnu ulogu u razvoju, progresiji i prognozi raznih tumora. miRNA koje sudjeluju u putevima tumorigeneze nazivaju se onkomiR zbog njihove uloge u razvoju i progresiji malignih bolesti. Regije kromosoma koje kodiraju za miRNA s potencijalnom onkogenom funkcijom mogu biti amplificirane u neoplastičnim stanicama, što rezultira njihovom povećanom ekspresijom i utišavanjem tumor supresorskih gena. S druge strane, miRNA koje utišavaju ekspresiju onkogeno mogu se nalaziti na regijama gdje se događaju česte delecije ili mutacije, što dovodi do smanjenja ili gubitka miRNA i povećane ekspresije onkogeno čiju ekspresiju kontroliraju (Takahashi i sur., 2014). Promjena regulacije ekspresije miRNA može biti uzrokovana i nedostatkom mašinerije za sintezu miRNA; otkrivene su promjene u razini ekspresije miRNA kao posljedica promijenjene aktivnosti enzima Drosha i Dicer, te epigenetskih promjena uzrokovanih metilacijom DNA i histonskim modifikacijama u raznim tumorskim tkivima (Iorio i Croce, 2009).



#### **1.2.4. Uloge miRNA**

miRNA su ključni regulatori raznih bioloških puteva. Identificirano je oko 2500 miRNA u genomu čovjeka, te svaka može potencijalno kontrolirati stotine ciljanih gena. Program ekspresije miRNA ovisi o tipu stanica i tkiva, te imaju brojne važne uloge u staničnoj proliferaciji, apoptozi, metabolizmu i diferencijaciji tijekom razvoja sisavaca. Neke regulatorne uloge u razvoju uključuju ekspresiju neuronskih gena, morfogenezu mozga, diferencijaciju mišića i diobu matičnih stanica (Saito i sur., 2015; Ardekani i Naeini, 2010). Presudnu važnost miRNA imaju u imunološkom sustavu i procesu hematopoeze, gdje podešavaju diferencijaciju i sazrijevanje granulocita (Morceau i sur., 2013). Do i sur. (2017) otkrili su ključnu ulogu miRNA kao posrednika u vremenskoj i fiziološkoj regulaciji laktacije. Čak petnaest prekomjerno eksprimiranih miRNA u raznim stadijima laktacije utječe na metaboličku, staničnu i imunološku funkciju. Identificirane su i miRNA koje utječu na starenje beskralješnjaka na razini cijelog organizma, a karakterizirane su i brojne miRNA koje imaju tkivno specifični obrazac ekspresije tijekom starenja sisavaca (Smith-Vikos i Slack, 2012).

MikroRNA su uključene u neoplastični razvoj stanica, progresiju tumora i metastazu. Brojne su studije pokazale kako svaki tip tumora ima različit obrazac ekspresije miRNA u odnosu na zdravo tkivo (Krutovskikh i Herceg, 2010). Promjena regulacije ekspresije miRNA utječe na procese povezane s razvojem tumora, antiapoptotičku aktivnost, otpornost na lijekove, angiogenezu, invaziju tkiva i metastazu (Iorio i Croce, 2009). Uključene su u epitelno-mezenhimsku tranziciju (EMT) i inicijaciju tumora tako što reguliraju sposobnost matičnih stanica raka na samoobnovu i otpornost na lijekove (Park i sur., 2008; Takahashi i sur., 2014). Epi-miRNA mogu regulirati ekspresiju enzima i drugih molekula koje epigenetički mijenjaju DNA, poput DNA metiltransferaze, histonske acetiltransferaze, histonske metiltransferaze i histonske deacetilaze (Krutovskikh i Herceg, 2010).

#### **1.3. miR-7**

miR-7 se u čovjeku nalazi na tri genska lokusa: 9q21, 15q26 i 19q13. Transkripti ovih triju sekvenci, pri-miR-7-1, pri-miR-7-2 i pri-miR-7-3, procesiraju se u jednu zrelu miR-7 sekvencu koja ima 23 nukleotida (Zhao i sur., 2015). No ekspresija pri-miR-7-2 i pri-miR-7-3 u odnosu na pri-miR-7-1 je oko 100 puta manja. pri-miR-7-1 se nalazi u intronu 15 pre-mRNA za hnRNP (engl. *human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*, lokus 9q21) (Choudhury i sur., 2013). miR-7 se nalazi u raznim tkivima i uključena je u razvoj mnogih organa i biološke funkcije stanica.

Sekvenca RNA zrele miR-7 savršeno je evolucijski očuvana u svim vrstama od kolutićavaca do čovjeka; eksprimirana je u neurosekretornim stanicama mozga kralješnjaka i živčanom sustavu kolutićavaca. U vinskoj mušici miR-7 je eksprimirana u retinalnim

fotoreceptorima tijekom postembrionalnog razvoja. Drugi osjetni organi vinske mušice također eksprimiraju miR-7, uključujući proprioceptor i olfaktorne organe locirane na antenama, nogama i krilima. miR-7 nije detektirana u homolognim senzornim organima čovjeka, te se pretpostavlja da je funkcija miR-7 drugačije evoluirala (Li i sur., 2009).

miR-7 je uključena u brojne biološke puteve i bolesti, a posebno je značajna u živčanom sustavu gdje regulira diferencijaciju, sazrijevanje i preživljenje neurona. Inhibicija aktivnosti miR-7 u beta stanicama gušterače inducira signalizaciju mTOR, što ima stimulatívni utjecaj na staničnu proliferaciju. miR-7 direktno regulira ekspresiju centralnih onkogenih faktora u signalnim putevima povezanim s razvojem tumora, poput receptora EGF (EGFR), IRS-1, IRS-2, Pak1, Raf1, Ack1 i PIK3CD, što upućuje na ulogu miR-7 kao supresora tumora (Hansen i sur., 2013). Također, miR-7 je mikroRNA koja je najviše utišana u matičnim stanicama raka, koje su glavni faktor u progresiji tumora i metastazi (Okuda i sur., 2013). miR-7 indirektno utječe na ekspresiju kadherina E ciljajući receptor 1 faktora rasta nalik na inzulin (IGF-R1) i kinazu fokalne adhezije, rezultirajući smanjenom epitelno-mezenhimskom tranzicijom, smanjenim rastom stanica neovisnih o adheziji i supresijom metastaze. Također, u kolorektalnom tumoru miR-7 je jedna od miRNA s najmanjom ekspresijom te se pokazalo da cilja onkogeni transkripcijski faktor YY1 čime se smanjuje inhibicija p53. Unatoč mnogim dokazima uloge miR-7 kao supresora tumorigeneze, u stanicama raka pluća ekspresija miR-7 je povećana u odnosu na zdrave stanice, što je povezano s lošom zdravstvenom prognozom (Hansen i sur., 2013). Povećana ekspresija miR-7 u stanicama melanoma indirektno smanjuje transkripcijsku aktivnost NF- $\kappa$ B, čime suprimira rast, migraciju i metastazu melanoma u pluća (Giles i sur., 2016). Mnoga istraživanja su pokazala kako miR-7 suprimira rast, metastazu i invaziju glioblastoma (Zhao i sur., 2015).

#### ***1.4. miR-34a***

Gen za miR-34 prvi je put identificiran u *C. elegans* i kodira za jednu zrelu miRNA koja je evolucijski očuvana sve do čovjeka. U sisavcima se obitelj miR-34 sastoji od tri homologna transkripta, miR-34a, miR-34b i miR-34c. Sekvenca za miR-34a nalazi se u drugom egzonu gena na lokusu 1p36.22, dok su sekvence za miR-34b i miR-34c u intronu 1 i egzonu 2 istog primarnog transkripta na lokusu 11q23.1 (Agostini i Knight, 2014). Oba gena kodiraju samo za navedene miRNA.

Analiza distribucije obitelji miR-34 u tkivima miša pokazala je da je miR-34a eksprimirana u svim stanicama, s najvećim razinama ekspresije u mozgu, dok su miR-34b/c većinom eksprimirane u plućima. Bazalna razina ekspresije miR-34a je općenito veća od miR-34b/c. U čovjeku je miR-34a također eksprimirana u svim stanicama, a najveće razine ekspresije detektirane su u jajnicima, prostati i testisima. Srednje razine ekspresije pronađene

su u mozgu, plućima, timusu i bubrežima, dok jetra i srce imaju nisku razinu ekspresije. miR-34b/c su eksprimirane u jajnicima, testisima, dušniku i plućima (Agostini i Knight, 2014).

Obitelj miR-34 privukla je puno pozornosti budući da su direktna meta tumor-supresorskog gena p53. Oba gena miR-34 sadrže nekoliko regija za vezanje p53 koji se na regije veže direktno i aktivira njihovu transkripciju (Rokavec i sur., 2014). Kada se poveća razina ekspresije obitelji miR-34 kao odgovor na oštećenja na DNA, dolazi do apoptoze, zaustavljanja staničnog ciklusa i senescencije. Povećanje ekspresije obitelji miR-34 također utječe na vijabilnost matičnih stanica raka i inhibira EMT i metastaziranje. Obitelj miR-34 djeluje na put apoptoze i stanični ciklus smanjenjem ekspresije proteina CDK4, CDK6, Bcl-2, SNAIL i CD44. Ekspresija miR34-a je pak utišana u stanicama melanoma i tumorima pluća, dojke, bubrega, mjehura i gušterače zbog promijenjene metilacije CpG na regiji promotora. Nadalje, miR-34a ima smanjenu ekspresiju u stanicama neuroblastoma, glioblastoma i melanoma te tumoru prostate i jajnika (Agostini i Knight, 2014). Povećanje ekspresije u mnogim tumorskim stanicama inducira senescenciju i zaustavljanje staničnog ciklusa radi utjecaja miR-34a na kinazu 6 ovisnu o ciklinima (CDK6), pokazujući da je miR-34a važan tumor-supresorski gen koji je inaktiviran metilacijom CpG u više tipova tumora (Saito i sur., 2015).

Osim funkcije kao tumor-supresora, članovi obitelji miR-34 imaju važne uloge u razvoju tkiva i mnogim bolestima. Uloga miR-34 u matičnim stanicama raka navodi na zaključak da imaju ulogu i u diferencijaciji zdravih matičnih stanica; miR-34a je uz miR-145, drugu miRNA čiju ekspresiju inducira p53, smanjila ekspresiju faktora matičnih stanica OCT4, KLF4, LIN28A i SOX2, te prevenirala odlazak u pluripotentno stanje (Jain i sur., 2012). Istraživanja pokazuju da miR-34a sudjeluje u neuralnom razvoju, rastu neurita, spermatogenezi te formiranju kralježnice, te se povezuje s metaboličkim bolestima poput pretilosti i dijabetesa (Rokavec i sur., 2014).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

MikroRNA (miRNA) su male nekodirajuće molekule RNA, duge 19 do 25 nukleotida, koje sudjeluju u procesu RNA interferencije. miRNA kontroliraju ekspresiju gena tako što se vežu za mRNA ciljanih gena i na razne načine reguliraju njihovu translaciju, te su se pokazale kao ključni tumorski supresori čija je ekspresija utišana u brojnim tumorima čovjeka. Ekspresija miR-7 i miR-34a smanjena je u tumorima živčanog sustava poput neuroblastoma i glioblastoma, te su brojna istraživanja pokazala kako povećanje njihove ekspresije smanjuje proliferaciju stanica te progresiju tumora i metastazu.

Cilj ovog istraživanja bio je proučiti biološku funkciju miR-7 i miR-34a u staničnoj liniji humanog glioblastoma A1235 nakon transfekcije plazmidnim vektorima koji ekspimiraju miRNA od interesa. Prvi cilj istraživanja bila je konstrukcija plazmidnih vektora za ekspresiju kloniranih miR-7 i miR-34a. Drugi cilj istraživanja bio je analiza bioloških promjena u transficiranoj staničnoj liniji glioblastoma A1235 nastalih kao posljedica transkripcije miR-34a i miR-7.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Umnažanje sekvence DNA koja kodira za miRNA

Kao kalup za umnažanje sekvence DNA koja kodira za miR-34a i miR-7 odabrana je prethodno izolirana genomska DNA stanične linije humanog glioblastoma A1235 (Brdar, 1986). MikroRNA su sekvence duge dvadesetak nukleotida, no u stanici nastaju procesiranjem pri-miRNA (Pasquinelli, 2012). Zato je pomoću specifičnih početnica umnožen fragment DNA koji uz središnju sekvencu za miRNA sadržava još nekoliko stotina nukleotida ispred i iza nje. Početnice za umnažanje miR-7 odabrane su prema radu prema radu Kefasa i sur. (2008), a početnice za umnažanje miR-34a prema bazi podataka NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sekvence DNA umnažale su se lančanom reakcijom polimerazom (PCR) pomoću specifičnih početnica i polimeraze *Q5 High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs).

Reakcijska smjesa za umnažanje fragmenta miR-34a sadržavala je 1X reakcijski pufer (New England Biolabs), 1X *Q5 High GC Enhancer* (New England Biolabs), 200  $\mu$ M dNTP, 0,5  $\mu$ M specifičnih početnica (Tablica 1.), 100 ng kalupa DNA, 0,02 U/ $\mu$ L *Q5 High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs) i dH<sub>2</sub>O do 25  $\mu$ L. Reakcija je tekla prema programu: 98 °C kroz 45s, 38 ciklusa (98 °C 15 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min/kb), 72 °C 2 min.

Reakcijska smjesa za umnažanje fragmenta miR-7 bila je jednaka, samo što je sadržavala početnice specifične za miR-7. Reakcija je tekla prema programu: 98 °C kroz 30s, 38 ciklusa uz gradijent temperature prijanjanja od 55 do 60 °C (98 °C 15 s, 55 do 60 °C 30 s, 72 °C 1 min/kb), 72 °C 2 min. Gradijent temperature prijanjanja postupno je povećavan trajanjem reakcije: 55 °C 3 ciklusa, 56 °C 5 ciklusa, 57 °C 5 ciklusa, 58 °C 5 ciklusa, 59 °C 10 ciklusa, 60 °C 10 ciklusa.

**Tablica 1.** Korištene početnice u reakcijskim smjesama za umnažanje fragmenata pomoću lančane reakcije polimerazom, pripadajuće temperature denaturacije početnica i duljine umnoženih fragmenata.

Gen	Slijed početnica u smjeru 5' → 3'	Tm/ °C	Duljina fragmenta/pb
miR-34a	F: CTCAAGTGATCCTCCTGTCTTG	58	975
	R: GGAAGAGAGAAATGAGCCACTTGC	58	
miR-7	F: GGAAGAGAGAAATGAGCCACTTGC	55-60	1293
	R: GTATTCCTGCCACAGTGGGGGATG	55-60	
Promotor CMV	F: CGTCAATGGGTGGAGTATTT	58	242
	R: CGTGAGTCAAACCGCTATC	58	

### **3.2. Elektroforeza na agaroznom gelu**

Uspješnost umnožavanja fragmenata lančanom reakcijom polimerazom provjerena je elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem 500 mg agaroze u 50 mL 1X TAE pufera (40 mM Tris, 2 mM EDTA, 20 mM octena kiselina), nakon čega je dodano 2,5 µL etidij bromida (10 mg/mL). Uzorci su pripremljeni tako što se u 1 µL umnoženog fragmenta dodalo 0,5 µL 6X pufera za nanošenje na gel (0,02% bromfenol-plavo, 20% glicerol). U prvu je jažicu stavljeno 3 µL markera *1 kb DNA Ladder* (New England Biolabs). Elektroforeza je trajala 25 minuta uz 80 V u 1X TAE puferu.

### **3.3. Pročišćavanje fragmenata DNA**

Prije početka postupka kloniranja fragmente je potrebno pročistiti od komponenata reakcije PCR, za što je korišten komplet *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Produkti umnažanja DNA reakcijom PCR razdvojeni su od ostalih komponenti smjese elektroforezom u 0,8% agaroznom gelu. Vrpce s fragmentima izrezane su pod UV lampom, komadi gela izvagani i stavljeni u čiste epruvete, te je na svakih 10 mg gela dodano 10 µL otopine *Membrane Binding Solution* iz kompleta. Smjesa je inkubirana na 55 °C u termobloku dok se gel nije istopio. Otopljeni je gel prebačen u kolonicu za pročišćavanje (engl. *Wizard SV Minicolumn* i *Collection Tube*, Promega), inkubiran 1 min i zatim centrifugiran na sobnoj temperaturi 1 minutu na 16000 x g. Filtrat je uklonjen i dodano je 700 µL *Membrane Wash Solution* (Promega), te se zatim ponovio prijašnji korak centrifugiranja. Ponovno je uklonjen filtrat i u kolonice je dodano novih 500 µL *Membrane Wash Solution* (Promega), te je epruveta centrifugirana na 16000 x g kroz 5 minuta. Filtrat je uklonjen i centrifugiranje je ponovljeno 1 minutu kako bi ispario etanol koji je mogao zaostati. Kolonica je prebačena u čistu epruvetu od 1,5 mL, dodano je 25 µL vode bez nukleaza (Promega) i inkubirano na sobnoj temperaturi 1 minutu. Zatim je ponovljen korak centrifugiranja (5 min, 16000 x g), čime je eluirana DNA. Uzorci su pohranjeni na -20 °C.

Kako bi se provjerila točnost izolacije fragmenata iz gela, uzorci su analizirani elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu. Uzorcima je uz pomoć uređaja *NanoVue* (GE Life Sciences) spektrofotometrijski određena koncentracija i čistoća iz omjera apsorbancija  $A_{260}/A_{280}$  i  $A_{260}/A_{230}$ .

### **3.4. TA kloniranje**

TA kloniranje jedno je od najjednostavnijih i najefikasnijih metoda kloniranja produkata reakcije PCR. Prvi korak čini dodavanje jedne molekule adenzina na 3' krajeve produkata uz pomoć polimeraze *Taq*, čija je terminalna transferazna aktivnost neovisna o kalupu i preferencijalno dodaje adenozin na tupe krajeve dvostrukih lanaca DNA. U drugom

koraku kloniranja koristi se linearizirani „T-vektor“ koji pak sadrži timidin na 3' krajevima, što omogućava direktnu i visoko efikasnu ligaciju produkata reakcije PCR i vektora koja je potpomognuta komplementarnošću adenzina i timidina na 3' krajevima (Zhou i Gomez-Sanchez, 2000). Za TA kloniranje korištena je polimeraza *Taq* (Sigma Aldrich) i komplet *pGEM-T Easy Vector Systems* (Promega, 3015 pb) prema protokolu proizvođača.

Reakcijska smjesa za korak dodavanja stršećeg 3' adenzina sadržavala je 1X standardnog *Taq* reakcijskog pufera (Sigma Aldrich), 200  $\mu$ M dATP, oko 500 ng pojedinog pročišćenog produkta, 0,1 U/  $\mu$ L *Taq* polimeraze (Sigma Aldrich) i dH<sub>2</sub>O do 10  $\mu$ L. Reakcija je trajala 25 minuta na 70 °C.

Reakcijska smjesa za korak ligacije sadržavala je 1  $\mu$ L pGEM-T Easy vektora (5 ng/ $\mu$ L, Promega), 1  $\mu$ L 10x pufera za ligaciju (Promega), 1  $\mu$ L T4 DNA ligaze (Promega), 500  $\mu$ M dATP, pročišćeni fragment u omjeru s vektorom 3:1 (omjer broja krajeva DNA) i deH<sub>2</sub>O do 10  $\mu$ L. Ligacijska je smjesa inkubirana na 15 °C preko noći.

### **3.5. Plavo-bijela selekcija bakterijskih kolonija**

Plavo-bijela selekcija je metoda koja omogućava detekciju bakterija koje su tijekom postupka transformacije ligacijskom smjesom primile vektor s genom od interesa i razlučuje ih od bakterija koje su transformirane praznim vektorima. Preduvjet je da vektor sadrži mogućnost ugradnje inserta unutar operona lacZ, čime se sprječava ekspresija gena za enzim  $\beta$ -galaktozidazu, te će kolonije s pravilno ugrađenim insertom biti bijele boje. Za postupak transformacije odabran je kemijski kompetentni soj bakterija *Escherichia coli* XL10-Gold.

Kompetentne bakterije *E. coli* čuvaju se na -80 °C. Nakon otapanja, u 50  $\mu$ L dodano je po 2  $\mu$ L odgovarajuće ligacijske smjese, te su inkubirane 10 minuta na ledu. Bakterije su potom 35 sekundi uronjene u vodenu kupelj zagrijanu na 42 °C i odmah vraćene na led još 2 minute, nakon čega je dodano 450  $\mu$ L tekućeg medija LB (Carl Roth). Bakterije su inkubirane 30 minuta pri 37 °C i trešenje. Pripremljene su selektivne podloge od agara (Carl Roth) otopljenog u tekućem mediju LB (15 g agara/1 L medija) kojemu je dodano 100  $\mu$ g/mL ampicilina. Agarozne ploče su premazane s 80  $\mu$ L 0,1 M IPTG-a (izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid, Sigma-Aldrich) i 45  $\mu$ L X-Gal u dimetil sulfoksidu (DMSO) koncentracije 20 mg/mL (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranozid, Sigma-Aldrich). Nakon što su se podloge posušile nasadeno je 200  $\mu$ L transformiranih bakterija i inkubirane su na 37 °C preko noći. Bijele kolonije su se zatim uzgajale u prekonoćnoj kulturi u 3 mL tekućeg medija LB sa 100  $\mu$ g/mL ampicilina.

### **3.6. Izolacija plazmida**

Plazmidi su izolirani iz bakterija uzgojenih u 1,5 mL medija LB (Sambrook i sur., 1989). Talog bakterija resuspendiran je u 100  $\mu$ L ledeno hladne otopine glukoze i EDTA (50 mM glukoza, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH = 8,0). Nakon inkubacije od 5 minuta pri sobnoj temperaturi dodano je 200  $\mu$ L otopine NaOH/SDS (1% SDS, 0,2 M NaOH) i inkubirano na ledu 5 min. Zatim je dodano 150  $\mu$ L ledeno hladne otopine kalijevog acetata (5M kalijev acetat, 11,5% octena kiselina), smjesa je promiješana inverzijom 3-4 puta i inkubirana na ledu 5 minuta. Uzorci su zatim centrifugirani (5 min, 20000 x g, od 4 °C) i na supernatant su dodana 2 volumena 96% etanola. Uzorci su inkubirani na -20 °C 10 minuta kako bi se plazmidi uspješnije istaložili i zatim su centrifugirani (15 min, 20000 x g, od 4 °C). Talog je ispran s 300  $\mu$ L 70% etanola, posušen na sobnoj temperaturi te otopljen u 25  $\mu$ L deH<sub>2</sub>O. Plazmidi su pohranjeni na -20 °C.

Za izolaciju plazmida korišten je i komplet *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) prema protokolu proizvođača. Talog bakterija dobivenih iz 3 mL prekonocne kulture resuspendiran je u 250  $\mu$ L otopine za resuspendiranje stanica (engl. *Cell Resuspension Solution*), 250  $\mu$ L pufera za lizu (engl. *Cell Lysis Solution*) i 10  $\mu$ L alkalne proteaze. Nakon inkubacije od 5 minuta pri sobnoj temperaturi dodano je 350  $\mu$ L otopine za neutralizaciju (engl. *Neutralization Solution*). Nakon centrifugiranja (4 °C, 20000 x g, 10 min) supernatant je prebačen u kolonicu za pročišćavanje plazmida (engl. *Wizard SV Minicolumn i Collection Tube*, Promega), ponovljeno je centrifugiranje (4 °C, 20000 x g, 1 min), te je kolonica isprana s ukupno 1 mL otopine za ispiranje (engl. *Column Wash Solution*). DNA je eluirana tako što je dodano 80  $\mu$ L deH<sub>2</sub>O, ponovljen je postupak centrifugiranja (4 °C, 20000 x g, 1 min), te su plazmidi pohranjeni na -20 °C.

### **3.7. Restriksijska digestija plazmidne DNA**

Restriksijske endonukleaze cijepaju molekulu DNA na specifičnim sekvencama zvanim restriksijska mjesta. Kako bi se utvrdilo da plazmidi izolirani iz bijelih kolonija imaju ugrađene sekvencije DNA miR-34a i miR-7, pocijepani su restriksijskom endonukleazom *EcoRI* kako bi nastali fragmenti određenih duljina.

Digestija restriksijskim enzimima korištena je i za preciznu ugradnju inserta od interesa u ekspresijski vektor pcDNA3 tako što su obje sekvence pocijepane istim enzimom, te su komplementarni krajevi spojeni pomoću DNA ligaze. Digestija je također poslužila za provjeru orijentacije inserta nakon ugradnje tako što je plazmid pocijepan enzimom koji nije korišten za ugradnju inserta. Svi korišteni enzimi odabrani su prema podacima restriksijske analize vektora pomoću softvera *NEBcutter* (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2>). Analizom veličine fragmenata utvrđena je orijentacija inserta.



Reakcijska smjesa za digestiju sadržavala je 1X pufer i 1  $\mu\text{L}$  specifičnog restriksijskog enzima (New England Biolabs, Tablica 2.), plazmid ili insert, 1  $\mu\text{L}$  RNAze i deH<sub>2</sub>O do 15  $\mu\text{L}$  volumena, te je inkubirana 2 sata na 37 °C. Fragmentima su duljine određene elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu.

**Tablica 2.** Korišteni restriksijski enzimi za digestiju i pripadajući puferi.

<b>Restriksijski enzim</b>	<b>pufer</b>
<i>EcoRI</i> High-Fidelity <i>NotI</i> High-Fidelity	CutSmart
<i>PstI</i> <i>XhoI</i>	NEBuffer 3

### **3.8. Defosforilacija plazmida i ligacija**

Nakon što je plazmid pcDNA3 pocijepan restriksijskim enzimom, uklonjene su fosfatne skupine na 5' krajevima kako se linearizirani vektor tijekom ligacije ne bi cirkularizirao bez ugradnje inserta. Reakcija defosforilacije plazmida odvijala se 5 minuta na 37 °C uz dodatak 1 U/ $\mu\text{L}$  goveđe crijevne alkalne fosfataze (engl. CIAP, TaKaRa), nakon čega je defosforilacija inhibirana dodatkom 0,2  $\mu\text{L}$  EDTA i zamrzavanjem plazmida na -20 °C. Linearizirani plazmid pročišćen je kompletom *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Za ligaciju inserta od interesa i defosforiliranog plazmida korištena je T4 DNA ligaza iz kompleta *pGEM-T Easy Vector Systems* (Promega) prema protokolu proizvođača. Ligacijska je smjesa sadržavala pročišćeni insert u omjeru s vektorom pcDNA3 5:1.

### **3.9. Reakcija PCR uzoraka kolonija bakterija**

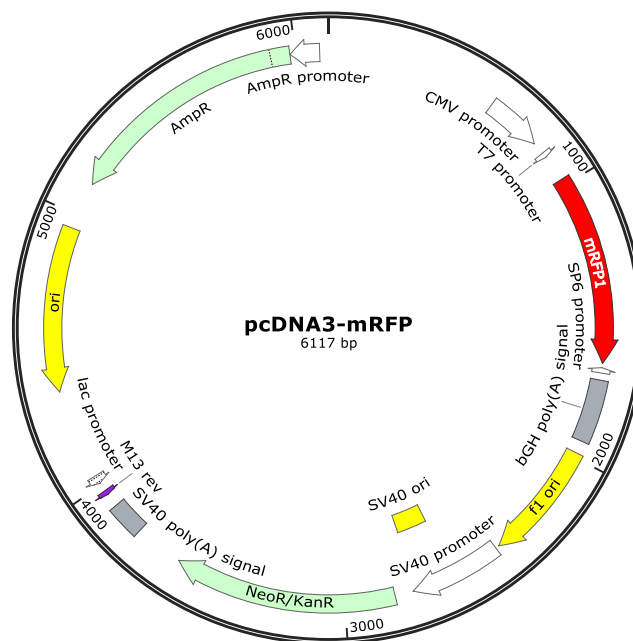
Reakcija PCR uzoraka kolonija bakterija metoda je kojom se ispituje prisutnost inserta od interesa u velikom broju kolonija bakterija. Kao kalup za reakciju korištena je smjesa dobivena liziranjem uzoraka 10 kolonija. Uzgojene su pojedine kolonije onih skupina u kojima su detektirani umnoženi inserti, te su izolirani plazmidi podvrgnuti restriksijskoj digestiji kako bi se detektirale kolonije s insertom pravilne orijentacije.

U 70  $\mu\text{L}$  pufera za lizu bakterija (2 mM EDTA, 1% Triton, 20 mM Tris, pH = 8,0) resuspendirano je po 10 kolonija uzetih sterilnim tipsom ili čačkalicama. Uzorci su inkubirani 15 minuta na 95 °C i zatim centrifugirani na sobnoj temperaturi (2 min, 900 x g). Reakcijska smjesa za PCR sadržavala je 1X standardnog reakcijskog pufera *Taq* (Sigma-Aldrich), 25  $\mu\text{M}$

MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTP, 0,5 μM specifičnih početnica (Tablica 1.), 2 μL supernatanta uzorka, 0,1 U/μL polimeraze *Taq* (Sigma-Aldrich) i dH<sub>2</sub>O do 15 μL. Reakcija je tekla prema programu: 94 °C kroz 5 min, 40 ciklusa (94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min/kb), 72 °C kroz 7 min.

### 3.10. Transfekcija stanica

U istraživanju je korištena adherentna stanična linija humanog glioblastoma A1235 (Brdar, 1986). Stanice su uzgajane u mediju DMEM (Sigma-Aldrich) s dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (Sigma-Aldrich) pri 37 °C uz 5% CO<sub>2</sub> i vlagu. Transfekcija stanica napravljena je pomoću kompleta *Lipofectamine 3000 Reagent* (Thermo Fisher Scientific) i konstruiranih plazmidnih vektora pcDNA3-miR-34a ili pcDNA3-miR-7. Za kontrolu postupka transfekcije poslužio je plazmid koji nosi sekvenciju za crveni fluorescentni protein, pcDNA3-mRFP (Slika 2.).



**Slika 2.** Mapa plazmida pcDNA3-mRFP.

U pločicama za kulturu stanica s 24 bunarčića uzgojene su 70-90% konfluentne stanice u 1 mL medija. Pripremljen je reagens (1,5 μL reagensa Lipofectamine 3000 i 25 μL Opti-MEM medija po bunarčiću) i plazmidna DNA (300 ng plazmida, 50 μL Opti-MEM medija i 2 μL reagensa P3000 po bunarčiću). Pomiješano je po 25 μL reagensa i plazmidne DNA, smjesa je inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi i zatim nakapana u bunarčić sa stanicama. Nakon 24 sata stanice su presađene pomoću tripsina (0,25%, Sigma-Aldrich) u

bočice površine 25 cm<sup>2</sup>. 48 sati nakon transfekcije, stanicama je dodan antibiotik geneticin (G418, Calbiochem) do konačne koncentracije 40 µg/mL. Stanice su uzgajane u selekcijskom mediju kroz dva tjedna da bi se formirale kolonije transficiranih stanica. Pojedinačne kolonije i skupni uzorak stanica iz bočice nasadeni su na pločicu s 96 bunarčića u 100 µL medija DMEM sa serumom.

### **3.11. Izolacija DNA**

Kako bi se utvrdilo da se u selektiranim stanicama nalaze ugrađeni plazmidi, izolirana je cjelokupna DNA i sekvenca promotora CMV plazmida umnožena je lančanom reakcijom polimerazom i specifičnim početnicama (Tablica 1.).

Iz stanica je izolirana DNA tako što je talog stanica inkubiran u 100 µL pufera za digestiju (1 mM EDTA, 0,5% Tween 20, 50 mM Tris, pH = 8,5) i 2 µL proteinaze K (20 mg/mL, Thermo Fisher Scientific) preko noći na 37 °C uz protresanje (300 rpm). Zatim je uslijedila inkubacija na 95 °C 8 minuta kako bi se inaktivirala proteinaza K, nakon čega je lizat centrifugiran na sobnoj temperaturi (900 x g, 5 min) i supernatant odvojen od taloga.

### **3.12. Krivulja rasta stanica**

Da bi se usporedila sposobnost proliferacije stanica dobivenih transfekcijom sekvenci miRNA i roditeljske linije, praćen je rast stanica bez i uz tretman citostaticima. Stanice su nasadene u pločicu s 96 jažica, 5 x 10<sup>3</sup>/ jažici. Sljedeći su dan tretirane alkilirajućim agensom N-metil-N'-nitro-N-nitrozo-gvanidinom (MNNG) ili Silmitasertibom (CX-4945), inhibitorom kazein kinaze 2 (MedChem Express). CX-4945 uzokuje zaustavljanje staničnog ciklusa i inducira apoptozu u tumorskim stanicama.

Svaka je skupina stanica nasadena 3 puta u pet redova triplikata kako bi se kroz 5 dana pratilo preživljenje netretiranih stanica (kontrolna grupa) i onih tretiranih MNNG-om ili s CX-4945. Nakon 24 sata stanice su se prihvatile za podlogu, te su fiksirane u 70 µL 100% metanola. Zatim su stanice isprane sa 70 µL PBS-a (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). U ostale jažice dodan je MNNG (10 µM) i CX-4945 (3 µM) ili su ostavljene kao netretirane kontrolne stanice. Svakih 24 sata fiksiran je niz od 3 jažice s tretiranim i netretiranim stanicama.

Kad su sve stanice fiksirane metanolom u svaki bunarčić je dodano 50 µL otopine kristal ljubičastog (0,2% kristal ljubičasto, 2% etanol) i stanice su inkubirane 10 minuta na tresilici na sobnoj temperaturi. Pločica je pažljivo isprana u deH<sub>2</sub>O i zatim posušena 10 minuta. U bunarčiće je nakapano 100 µL 1% SDS-a i inkubacija je trajala 15 minuta kako bi stanice lizirale. Izmjerena je apsorbancija na 600 nm uređajem *Glomax* (Promega) i podatci su analizirani računalnim programom Microsoft Excel.

### **3.13. Izolacija staničnih proteina**

Da bi se iz stanica izolirali proteini, stanicama je dodan 1 mL hladnog PBS-a (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), sastrugane su petrijevke pomoću plastične strugalice i centrifugirane (900 x g, 4 °C, 5 min). Supernatant je odsisan i talog je resuspendiran u 100 µL pufera za lizu stanica (137 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 20 mM Tris, pH = 7,5, 2 mM EDTA, pH = 8, 1 µL) uz dodatak 1 µL inhibitora proteaza (100 µg/mL Inhibitor Cocktail Plus, Carl Roth) i 2 µL PMSF (100 µg/mL, engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*, Sigma-Aldrich). Lizat stanica inkubiran je na ledu 10 minuta, smrznut u tekućem dušiku i pohranjen na -80 °C. Nakon odmrzavanja proteini su centrifugirani (15 min, 4 °C, 12000 rpm), supernatant je odvojen i proteinima je određena koncentracija metodom po Bradfordu.

Bradfordova se metoda temelji na mjerenju pomaka maksimuma apsorbancije proteina od 465 nm na 595 nm pri vezanju boje Coomassie briljant plavo (CBB, Carl Roth) u kiseloj otopini, pri čemu nastaje plavo obojenje. Kako bi se proteinima odredila koncentracija potrebno je izraditi baždarnu krivulju pomoću albumina goveđeg seruma (BSA od engl. Bovine serum albumin, New England Biolabs). Napravljen je raspon koncentracija BSA od 0 do 10 µg/µL i razrijeđeni su proteini (2 µL proteina i 38 µL deH<sub>2</sub>O), te je dodano po 10 µL na pločicu s 96 bunarčića u duplikatima. Zatim je dodano 100 µL 1X Bradfordovog reagensa (10X: 100 mg CBB G-250, 50 mL 95% etanola, 100 mL 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, deH<sub>2</sub>O do 1 L) u svaki bunarčić i izmjerena je apsorbancija na 600 nm uređajem *Glomax* (Promega). Podatci su analizirani računalnim programom Microsoft Excel.

### **3.14. Analiza Western blot i imunodetekcija**

Metoda analize proteina Western blot zasniva se na razdvajanju proteina na temelju razlike u molekularnoj masi pomoću SDS-elektroforeze u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE), njihovom prijenosu na membranu i detekciji antitijelima specifičnima za pojedine proteine.

25 µg proteina je pomiješano s odgovarajućim volumenom 6X pufera za nanošenje na gel (1% β-merkaptetanol, 0,02% bromfenol-plavo, 20% glicerol, 2 mM SDS, 225 mM Tris-HCl), te su denaturirani 5 minuta na 95 °C. Napravljen je vertikalni poliakrilamidni gel od donjeg dijela za razdvajanje proteina (10%) i gornjeg dijela za sabijanje (4%) (Tablica 3.). Nakon što se gel polimerizirao stavljen je u sustav za elektroforezu *Biometra Eco-Mini* (Biometra) i u pufer za elektroforezu (250 mM glicin, 0,1% SDS, 25 mM Tris-HCL, pH = 8,3). U jažice su stavljene uzorci, a kao marker za određivanje molekularne mase korišten je *Roti-Mark 10-150* (Carl Roth). Elektroforeza je tekla 30 min pri naponu od 140 V do početka donjeg gela, a zatim je napon povišen na 180 V do kraja razdvajanja.

**Tablica 3.** Sastav poliakrilamidnog gela za razdvajanje proteina elektroforezom.

	10% gel za razdvajanje	4% gel za sabijanje
deH <sub>2</sub> O	2,95 mL	4,1 mL
30% AA/Bis	2,5 mL	1 mL
1,5 M Tris-HCl, pH = 8,8	1,9 mL	0,75 mL
10% SDS	75 $\mu$ L	60 $\mu$ L
10% APS	75 $\mu$ L	60 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L

AA: akrilamid (Acros Organics); Bis: bisakrilamid (Sigma-Aldrich); SDS: natrij dodecil sulfat (Carl Roth); APS: amonijev persulfat (Acros Organics); TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilenediamin (Acros Organics), deH<sub>2</sub>O: destilirana voda.

Nakon elektroforeze u kazeti za prijenos složen je „sendvič“ za prijenos proteina na membranu: donja spužvica, 2 komada filter papira navlaženog u puferu za prijenos, gel, membrana PVDF (Roche) izrezana na veličinu gela, 2 komada navlaženog filter papira i gornja spužvica. Složena kazeta uronjena je pufer za prijenos (39 mM glicin, 0,037% SDS, 20% metanol, 48 mM Tris-HCl, pH = 8,3) i transfer se odvijao u uređaju *Eco-Mini Tankblot* (Biometra) 120 minuta uz konstantnu jakost struje od 380 mA na 4 °C. Poliakrilamidni gel je nakon prijenosa proteina na membranu obojan bojom Coomassie briljant plavo (CBB, Carl Roth) kako bi se utvrdila uspješnost prijenosa. Gel je uronjen u boju (0,5 mg CBB R-250, 90 mL metanol, 20 mL octena kiselina, deH<sub>2</sub>O do 200 mL) preko noći i idući dan ispran u otopini za odbojavanje (25 mL metanol, 35 mL octena kiselina, deH<sub>2</sub>O do 500 mL) 3-4 puta po 15 minuta na tresilici.

Membrana je nakon prijenosa blokirana 1 sat u 3% otopini nemasnog mlijeka (Carl Roth) u puferu TBST (150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 20 mM Tris-HCl, pH = 7,5), kratko je isprana puferom TBST i inkubirana preko noći u primarnom antitijelu. Primarna antitijela (Tablica 4.) razrijeđena su prema uputama proizvođača u 0,5% nemasnom mlijeku u puferu TBST. Idući dan membrana je isprana 3 x po 15 minuta u puferu TBST te inkubirana 1 sat u otopini odgovarajućeg sekundarnog antitijela s konjugiranim enzimom peroksidazom hrena. Sekundarna antitijela bila su porijeklom iz kože (protumišja, Sigma-Aldrich), magarca (protukunićja, Sigma-Aldrich) i zeca (protukožja, Sigma-Aldrich) te su razrijeđena prema uputama proizvođača u omjeru 1:30000 u 0,5% nemasnom mlijeku u puferu TBST. Nakon inkubacije u mraku membrana je isprana 3 x 15 minuta u puferu TBST.

**Tablica 4.** Korištena primarna antitijela.

Antigen	Molekularna masa (kDa)	Domaćin	Razrjeđenje	Proizvođač
HES1	30	zec	1:1000	Cell signalling technology
PARP1	116	koza	1:1000	Santa Cruz Technology
JAGGED1	180	koza	1:750	Santa Cruz Technology
IKAROS	50-70	zec	1:1000	Cell signalling technology
$\beta$ -CATENIN	92	zec	1:1000	Cell signalling technology
$\beta$ -ACTIN	43	miš	1:1000	Santa Cruz Technology

Proteini su detektirani reakcijom kemiluminiscencije tako što je membrana inkubirana s kemiluminiscentnim supstratom *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad) koji je dobiven miješanjem po 100  $\mu$ L otopina iz kompleta. Membrana je inkubirana 3 minute i zatim stavljena u kazetu između dvije prozirne folije. Izrezan je rendgenski film *Super HR-U30* (Fujifilm), stavljen na foliju iznad membrane i inkubiran u mraku 5-30 minuta. Film je zatim razvijen u razvijaju (10 mL razvijaju i 35 mL vodovodne vode, Sigma-Aldrich), kratko ispran vodovodnom vodom i fiksiran u fiksiru (10 mL fiksira i 45 mL vodovodne vode, Efke Fotokemika). Filmovi su denzitometriрани u računalnom programu ImageJ.

Antitijela su nakon detekcije skinuta s PVDF membrane i detekcija je ponovljena s drugim antitijelima. Jedan od načina skidanja bila je inkubacija 2 x 10 minuta u blagom puferu za skidanje (7,5 g glicin, 0,5 g SDS, 5 mL Tween 20, deH<sub>2</sub>O do 500 mL, pH = 2,2), zatim 2 x 10 minuta u PBS-u i 2 x 10 minuta u puferu TBST. Drugi način bila je inkubacija u jakom puferu za skidanje (20 mL 10% SDS, 800  $\mu$ L  $\beta$ -merkaptetanola, 12,5 mL 0,5 M Tris-HCl, pH = 6,8 i deH<sub>2</sub>O do 100 mL) zagrijanom na 50 °C. Membrana je inkubirana 1 sat na 50 °C, zatim dobro isprana pod vodovodnom vodom i 3 x 10 min u puferu TBST. Membrana je blokirana mlijekom i vezana su antitijela prema već opisanom protokolu.

### 3.15. Izolacija RNA

Ukupna RNA izolirana je uz pomoć *TRI reagent* (Sigma-Aldrich) prema uputama proizvođača. Stanice uzgojene u srednjim petrijevkama ( $\varnothing$  50 mm) isprane su fiziološkom otopinom (0,9% NaCl) i tripsinizirane. Na talog stanica (max 4 x 10<sup>6</sup> stanica) sakupljen centrifugiranjem dodano je 400  $\mu$ L TRI reagensa i inkubacija je trajala 5 minuta na ledu.

Zatim je dodano 100  $\mu\text{L}$  hladnog kloroforma (Kemika) i smjesa je protresana 15 sekundi. Nakon inkubacije 15 minuta na ledu i centrifugiranja (14000 x g, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min) gornja vodena faza je odvojena i na nju dodano 250  $\mu\text{L}$  hladnog izopropanola (Kemika). Taloženje RNA odvijalo se 30 minuta na -80  $^{\circ}\text{C}$ . Nakon centrifugiranja (14000 x g, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min) talog je ispran s 500  $\mu\text{L}$  75% etanola, ponovno centrifugiran (14000 x g, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min), osušen i otopljen u vodi bez RNAza. Uzorcima RNA spektrofotometrijski je određena koncentracija i čistoća iz omjera apsorbancija  $A_{260}/A_{280}$  i  $A_{260}/A_{230}$  uz pomoć uređaja *NanoVue* (GE Life Sciences).

### **3.16. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)**

Lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu može se relativno kvantificirati ekspresija mikroRNA korišćenje specifične početnice i fluorescencijski obilježene sonde čije se emitiranje mjeri. Pomoću dobivenih vrijednosti izračuna se faktor promjene ekspresije gena (engl. *fold change*), tj. koliko se puta međusobno razlikuju razine ekspresije ispitivanih mikroRNA. Za reverznu transkripciju i lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu korišten je komplet *TaqMan Advanced miRNA Assays* (Applied Biosystems) prema protokolu proizviđača. Da bi se mikroRNA mogle detektirati, prvo se izolira RNA i ligiraju adaptori, a zatim reverznom transkripcijom prevodi u cDNA koja se umnožava klasičnom reakcijom PCR.

Za reakciju dodavanja poli(A) proba smjesa je sadržavala 0,5  $\mu\text{L}$  poli(A) pufera, 0,5  $\mu\text{L}$  ATP, 0,3  $\mu\text{L}$  poli(A) enzima, 1,7  $\mu\text{L}$  vode bez RNAza i 2  $\mu\text{L}$  izolirane RNA (10 ng po reakciji). Smjesa je inkubirana na 37  $^{\circ}\text{C}$  kroz 45 minuta i 65  $^{\circ}\text{C}$  kroz 7 minuta.

Reakcijska smjesa za ligaciju adaptora sadržavala je 3  $\mu\text{L}$  5X pufera za ligazu DNA, 4,5  $\mu\text{L}$  50% PEG 8000, 0,6  $\mu\text{L}$  25X adaptora, 1,5  $\mu\text{L}$  ligaze RNA, 0,4  $\mu\text{L}$  vode bez RNAza i 5  $\mu\text{L}$  produkta reakcije poliadenilacije. Ligacija se odvijala 60 minuta na 16  $^{\circ}\text{C}$ .

Reakcija reverzne transkripcije je sadržavala 6  $\mu\text{L}$  5X pufera RT, 1,2  $\mu\text{L}$  dNTP, 1,5  $\mu\text{L}$  20X univerzalne početnice RT, 3  $\mu\text{L}$  10X mješavine enzima RT, 3,3  $\mu\text{L}$  vode bez RNAza i 15  $\mu\text{L}$  produkta reakcije ligacije adaptora. Reverzna transkripcija se odvijala na 42  $^{\circ}\text{C}$  kroz 15 minuta i zatim 5 minuta na 85  $^{\circ}\text{C}$ .

Umnožavanje mikroRNA odvijalo se u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala 25  $\mu\text{L}$  otopine 2X *miR-Amp Master Mix*, 2,5  $\mu\text{L}$  20X mješavine početnica *miR-Amp*, 17,5  $\mu\text{L}$  vode bez RNAza i 5  $\mu\text{L}$  produkta reakcije reverzne transkripcije. Reakcija je tekla prema programu: 95  $^{\circ}\text{C}$  kroz 5 min, 14 ciklusa (95  $^{\circ}\text{C}$  3 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s), 99  $^{\circ}\text{C}$  kroz 10 min.

Kalup cDNA je zatim razrijeđen u omjeru 1:10. Reakcijska smjesa za umnažanje polimerazom u stvarnom vremenu sadržavala je 10  $\mu\text{L}$  otopine 2X *Universal TaqMan Master Mix*, 1  $\mu\text{L}$  otopine 20X *TaqMan Advanced miRNA Assay*, 4  $\mu\text{L}$  vode bez RNAza i 5  $\mu\text{L}$

razrijeđenog kalupa cDNA. Reakcija qRT-PCR odvijala se prema programu: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 40 ciklusa (95 °C 15 s i 60 °C 1 min). Za qRT-PCR korišten je uređaj *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Ovu analizu napravili su suradnici na projektu HRZZ "Notch in hematopoietic stem cell differentiation and leukaemia development". Dobiveni podatci analizirani su računalnim programom Microsoft Excel.

### ***3.17. Statistička obrada podataka***

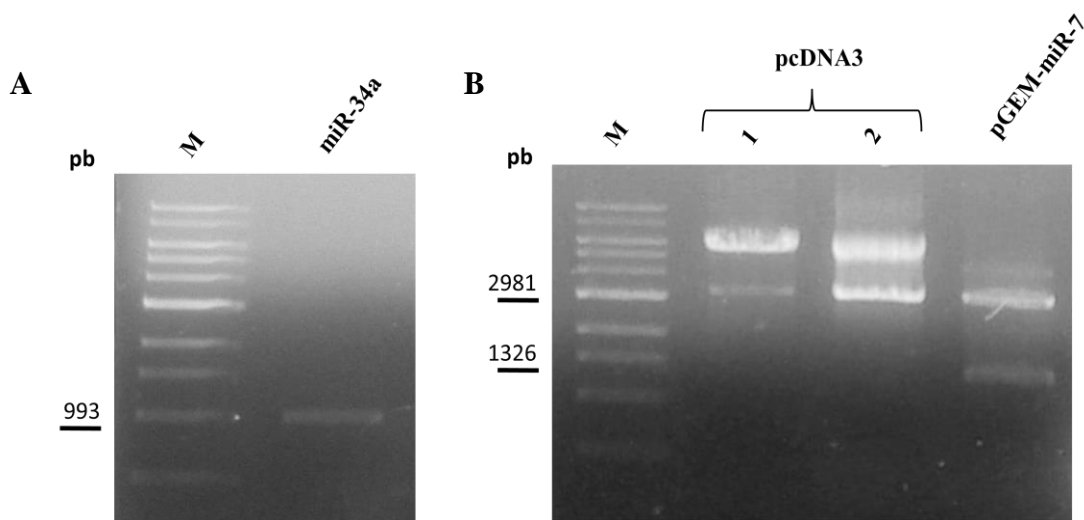
Statistička analiza podataka provedena je pomoću programa Microsoft Excel. Usporedba kontrole i tretmana napravljena je pomoću studentovog T-testa (nejednake varijance dvaju uzoraka). Kao statistički značajne razlike uzete su vrijednosti koje su se razlikovale na razini  $p \leq 0,05$ .



## 4. REZULTATI

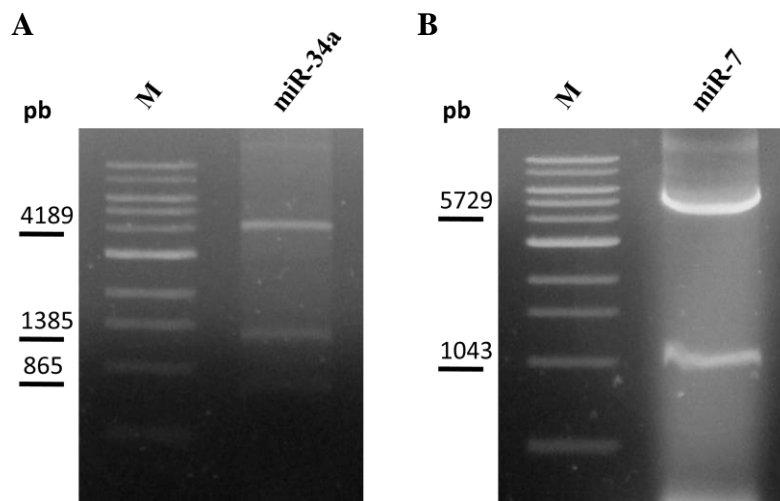
### 4.1. Konstrukcija plazmida *pcDNA3-miR-34a* i *pcDNA3-miR-7*

Kako bismo istražili utjecaj miR-34a i miR-7 na staničnu liniju glioblastoma A1235, konstruirali smo dva ekspresijska plazmida sa sekvencama DNA svake od miRNA. Sekvence DNA umnožili smo reakcijom PCR iz genoma stanične linije A1235 pomoću specifičnih početnica i ugradili u plazmid pGEM metodom kloniranja *TA*. Transformirali smo bakterije *E. coli* i metodom plavo-bijele selekcije detektirali uspješno transformirane kolonije. Zatim smo iz kolonija izolirali plazmide i pocijepali restriksijskim enzimima kako bismo fragmente sa sekvencijama za miRNA mogli ugraditi u ekspresijski plazmid pcDNA3. Za digestiju fragmenta sa sekvencom za miR-34 korišten je enzim *EcoRI*, a za digestiju fragmenta sa sekvencom za miR-7 enzim *NotI* (Slika 3.). Istim restriksijskim enzimima pocijepali smo i plazmid pcDNA3, te lineariziranim plazmidima uklonili fosfatne skupine na 5' krajevima. Pocijepane fragmente ugradili smo u plazmide ligazom DNA, te ligacijskom smjesom transformirali bakterije *E. coli*. Reakcijom PCR uzoraka kolonija bakterija detektirali smo kolonije koje su sadržavale konstruirane plazmide.



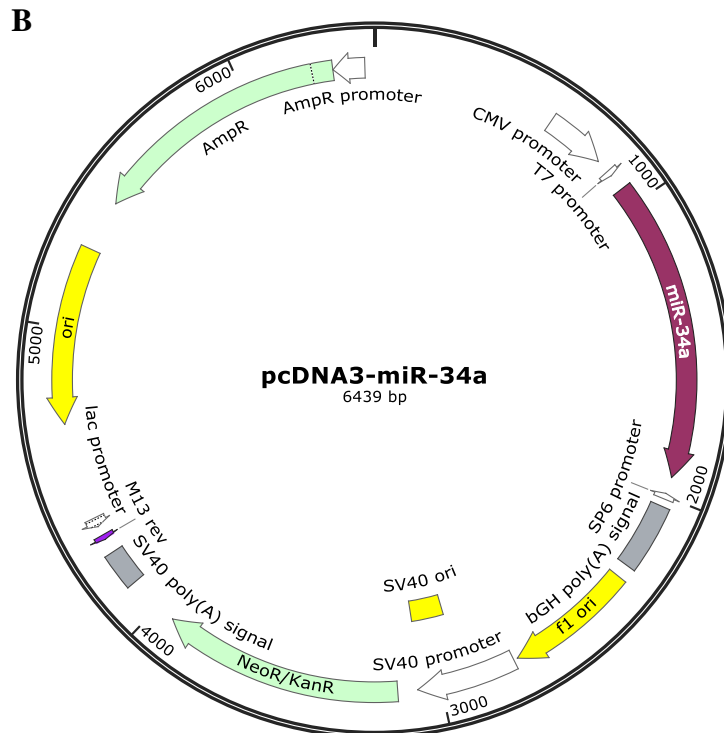
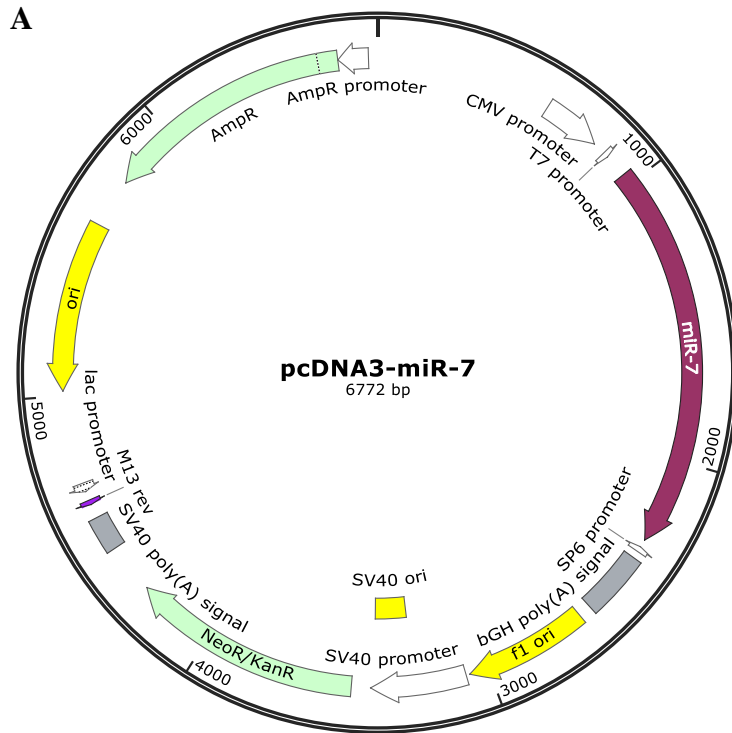
**Slika 3. Restriksijska digestija konstrukata pGEM-miR-34a (A) i pGEM-miR-7 (B).** Plazmidi su konstruirani ligacijom lineariziranog plazmida pGEM i fragmenata dobivenih umnažanjem specifičnih sekvenci DNA koje kodiraju za miR-34a i miR-7. Iz selektiranih bakterijskih kolonija izolirani su plazmidi i pocijepani restriksijskim enzimima kako bi se fragmenti mogli ugraditi u ekspresijski plazmid pcDNA3. Plazmid pGEM-miR-34a pocijepan je enzimom *EcoRI* i pročišćeni je fragment iznosio 993 pb. Plazmid pGEM-miR-7 pocijepan je enzimom *NotI* i dao je fragmenete od 2981 pb i 1326 pb. **M:** 1 kb DNA Marker (New England Biolabs); **miR-34a:** fragment koji nosi sekvenciju DNA za miR-34a; **pcDNA3 1 i 2:** cirkularni ekspresijski plazmid; **pGEM-miR-7:** pocijepani plazmid koji nosi sekvenciju DNA za miR-7.

Prije transfekcije stanične linije A1235 konstruiranim plazmidima provjerili smo ispravnost orijentacije inserta restrikcijom digestijom enzimima koji nisu korišteni za ugradnju inserta. Plazmide smo izolirali iz selektiranih bakterijskih kolonija i pocijepali određenim enzimima; pcDNA3-miR-34a pocijepan je s *PstI*, a pcDNA3-miR-7 s *XhoI*. Digestijom su dobivene veličine fragmenata koje odgovaraju ispravnoj orijentaciji inserta u plazmidima: 865 pb, 1385 pb i 4189 pb za pcDNA3-miR-34a, te 1043 pb i 5729 pb za pcDNA3-miR-7 (Slika 4.).



**Slika 4. Restrikcijaska digestija konstrukata pcDNA3-miR-34a (A) i pcDNA3-miR-7 (B).** Plazmidi su konstruirani ligacijom lineariziranog plazmida pcDNA3 i fragmenata dobivenih umnažanjem specifičnih sekvenci DNA koje kodiraju za miR-34a i miR-7. Iz selektiranih bakterijskih kolonija izolirani su plazmidi i pocijepani restrikcijom enzimima kako bi se utvrdila ispravnost orijentacije fragmenta u plazmidu. Plazmid pcDNA3-miR-34a pocijepan je enzimom *PstI* i ispravna je orijentacija dala fragmente od 865 pb, 1385 pb i 4189 pb, dok je plazmid pcDNA3-miR-7 pocijepan s *XhoI* i dao je fragmente od 1043 pb i 5729 pb. **M:** 1 kb DNA Marker (New England Biolabs); **miR-34a:** plazmidni vektor koji nosi sekvenciju DNA za miR-34a; **miR-7:** plazmidni vektor koji nosi sekvenciju DNA za miR-7.

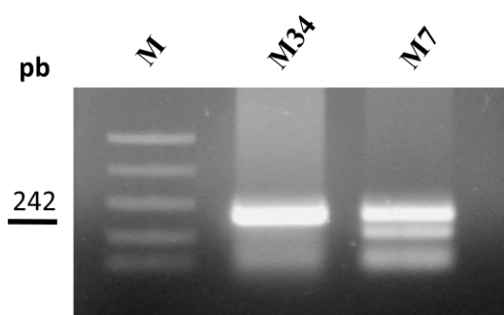
Kao dodatnu provjeru, konstruirane plazmide poslali smo i na sekvenciranje u *Macrogen* (<https://dna.macrogen.com/eng/>). Analizom rezultata sekvenciranja potvrdili smo da plazmidi sadrže sekvencije DNA za miR-34a i miR-7 (Slika 5.).



**Slika 5.** Mape plazmida pcDNA3-miR-7 (A) i pcDNA3-miR-34a (B).

#### 4.2. Potvrda transfekcije stanica A1235 konstruiranim plazmidnim vektorima

Kako bismo mogli istražiti utjecaj kloniranih mikroRNA u stanicama humanog glioblastoma A1235, stanice smo transficirali konstruiranim plazmidima i uzgojili kolonije nakon dvotjedne selekcije geneticinom. Nakon umnažanja pojedinih kolonija ispitali smo sadrže li DNA konstruiranih vektora. Iz stanica smo izolirali DNA i reakcijom PCR umnožili sekvencu promotora CMV na plazmidima. Dobiveni fragmenti imali su veličinu od oko 200 pb, što je odgovaralo predviđenoj veličini fragmenta od 242 pb (Slika 6.).

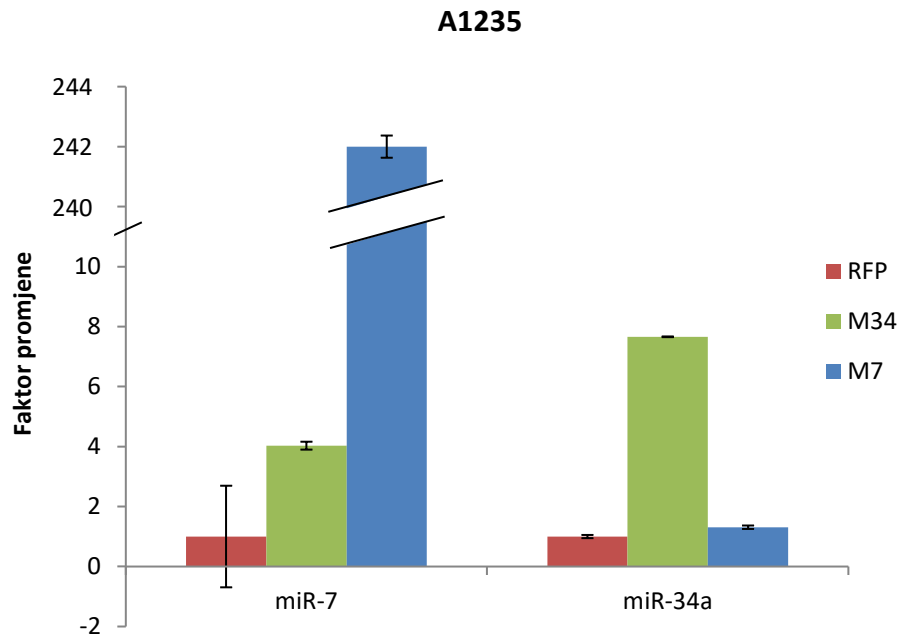


**Slika 6. Analiza prisutnosti sekvencija DNA transficiranih plazmida u stanicama A1235.** Nakon transfekcije plazmidima pcDNA3-miR-34a i pcDNA3-miR-7, izolirana je DNA iz stanične linije A1235 i umnožena reakcijom PCR. Korištena je *Taq* polimeraza i početnice za promotor CMV na plazmidima. **M**: PCR Marker (New England Biolabs); **M34**: stanice transficirane plazmidom pcDNA3-miR-34a; **M7**: stanice transficirane plazmidom pcDNA3-miR-7.

#### 4.3. Utvrđivanje ekspresije kloniranih mikroRNA u stanicama A1235

Kako bismo kvantificirali ekspresiju kloniranih sekvencija mikroRNA u transficiranim staničnim linijama M34 i M7, iz uzgojenih stanica izolirana je RNA i pomoću posebnog kompleta s obje strane miRNA ligirane su specifične sekvence kako bi se miRNA reakcijom reverzne transkripcije mogla prepisati u cDNA. Metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) uz specifične početnice analizirana je razina ekspresije miR-34a i miR-7, te su kao kontrola poslužile stanice A1235 transficirane plazmidom pcDNA3-mRFP. Reakcija qRT-PCR napravljena je u sklopu eksperimenata detekcije miRNA u okviru projekta HRZZ.

Stanična linija M34 imala je 7,6 puta veću razinu ekspresije miR-34a i 4 puta veću razinu ekspresije miR-7 u odnosu na kontrolne stanice RFP. Izrazito povećanje ekspresije bilo je u staničnoj liniji M7, gdje je razina ekspresije miR-7 bila povećana 242 puta u odnosu na kontrolu (Slika 7.).



**Slika 7. Analiza ekspresije miR-34a i miR-7 u transficiranim stanicama A1235.** Stanice su transficirane vektorima pcDNA3-mRFP, pcDNA3-miR-34a i pcDNA3-miR-7. Izolirana je ukupna RNA i nakon reverzne transkripcije u cDNA analizirana razina ekspresije miR-34a i miR-7 metodom qRT-PCR. Kao endogena kontrola korištena je ekspresija miRNA koja ima stabilnu ekspresiju (miR-423-5p). Relativna ekspresija miR-34a i miR-7 predstavljena je kao faktor promjene u usporedbi s vrijednostima kontrolnog uzorka. **RFP**: stanice A1235 transficirane plazmidom koji nosi sekvenciju za crveni fluorescentni protein; **M34**: stanice A1235 transficirane plazmidom pcDNA3-miR-34a; **M7**: stanice A1235 transficirane plazmidom pcDNA3-miR-7.

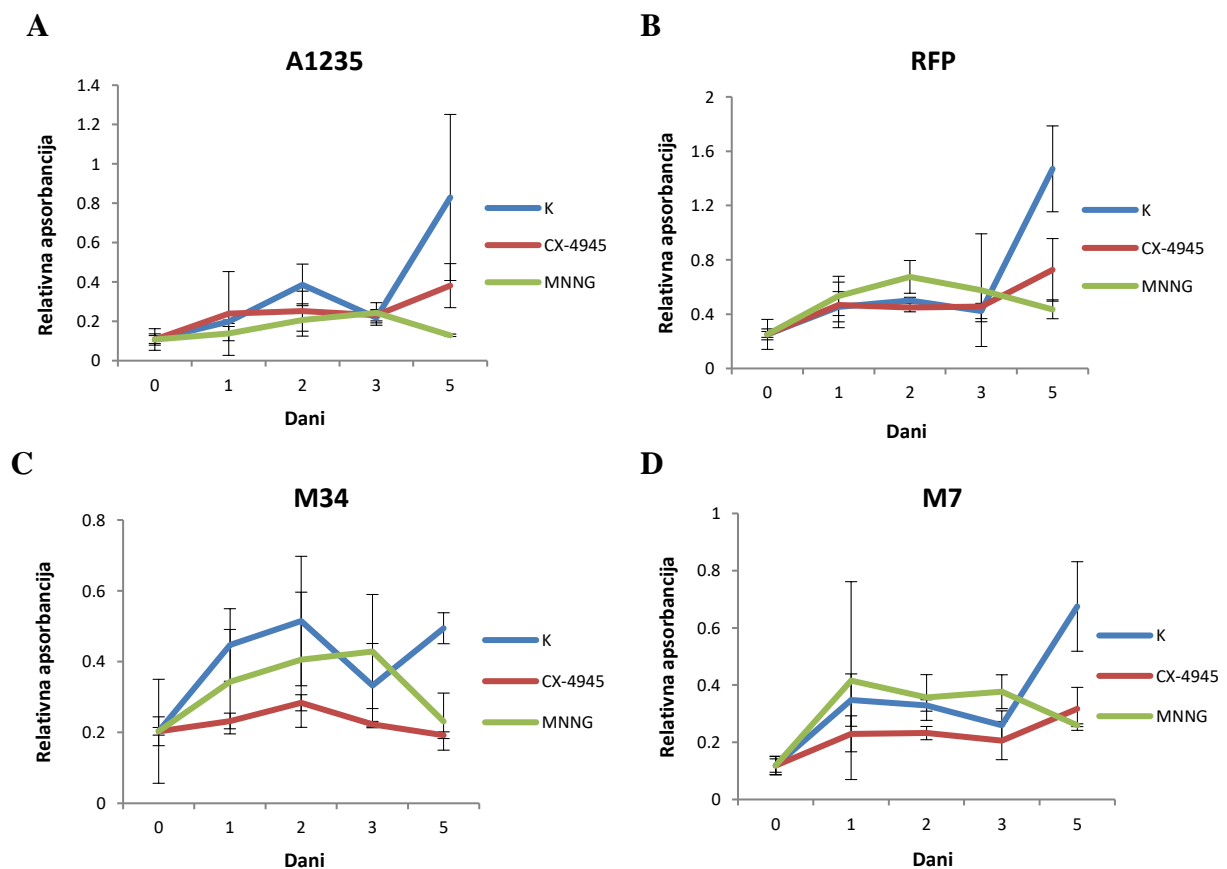
#### ***4.4. Utjecaj mutagena MNNG i citostatika CX-4945 na proliferaciju stanica A1235***

Kako bismo istražili postoji li aktivnost kloniranih mikroRNA u stanicama A1235, usporedili smo sposobnost proliferacije transficiranih stanica i roditeljske linije uz tretman alkilirajućim agensom MNNG (N-metil-N'-nitro-N-nitrozo-gvanidin) i citostatikom Silmitasertib (CX-4945). MNNG dodaje alkilnu skupinu na O<sup>6</sup> gvanina i O<sup>4</sup> timina što uzrokuje prijelaznu mutaciju para baza GC u AT, dok je CX-4945 inhibitor kazein kinaze 2, enzima koji sudjeluje u održavanju staničnog ciklusa i popravku DNA. Stanice A1235 nemaju enzim metilgvanin-DNA metiltransferazu (MGMT) koji sudjeluje u popravku O<sup>6</sup>-MeG i osjetljive su na tretman alkilirajućim agensom (MNNG) (Brdar, 1986; Bian i sur., 2015). Prema pregledu literature nađeno je da miR-7 može regulirati ekspresiju PARP-1 koji je uključen u popravak jednolančanih lomova DNA, te da je ekspresija miR-34 pod regulacijom p53, koji također sudjeluje u staničnom odgovoru na oštećenje DNA (Rokavec i sur., 2014; Luo i sur., 2018). Budući da CX-4945 zaustavlja stanični ciklus i inducira apoptozu, utječe na

brojne proteine poput c-Myc, Notch 1 i 2, CDK4/6 i Ikaros. Ekspresija ovih i drugih proteina povezanih sa staničnim ciklusom i apoptozom pod regulacijom je miR-34 i miR-7 (Zhao i sur., 2015; Hermeking, 2010). Zbog ovih smo razloga istražili proliferaciju transficiranih stanica u normalnim uvjetima i pod tretmanom navedenim spojevima.

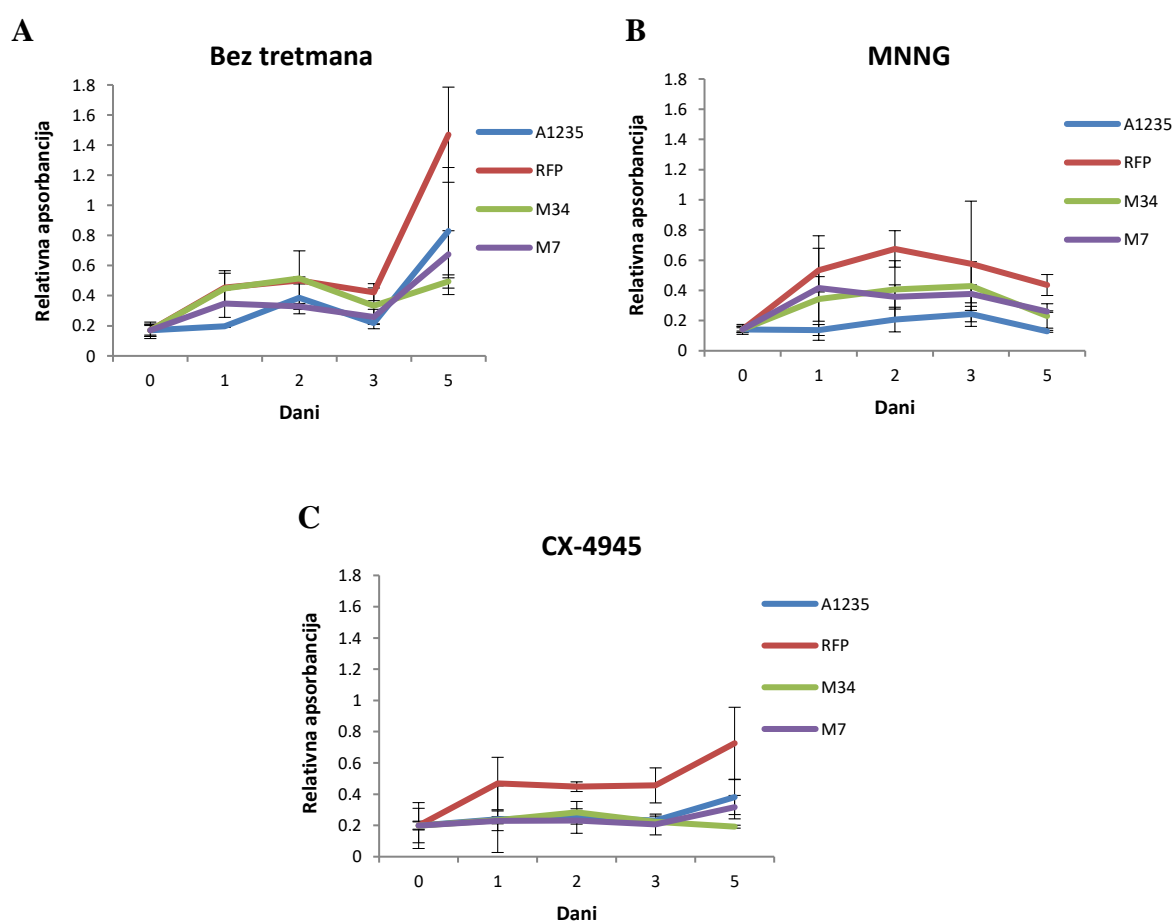
Uzgojene su stanice roditeljske linije A1235, stanice A1235 transficirane plazmidom pcDNA3-mRFP, te stanice A1235 transficirane plazmidima pcDNA3-miR-34a i pcDNA3-miR-7. Stanice su 24 sata nakon nasađivanja tretirane 10  $\mu$ M MNNG-om ili 3  $\mu$ M inhibitorom CX-4945 i fiksirane metanolom tijekom 5 dana. Netretirane stanice svake skupine poslužile su kao negativna kontrola. Nakon kraja tretmana stanice su obojane kristal ljubičastim i izmjerena je apsorbancija.

Rezultati su pokazali kako nije bilo značajnih razlika u proliferaciji tretiranih i netretiranih stanica. Iz krivulja rasta je vidljivo da MNNG i CX-4945 u svim staničnim linijama tek peti dan utječu na proliferaciju (Slika 8.). Promatranjem stanica pod invertnim mikroskopom nije primijećena značajna citotoksičnost, te su CX-4945 i MNNG inducirali zaustavljanje rasta, a ne staničnu smrt.



**Slika 8. Krivulje proliferacije normalnih i transficiranih stanica A1235 nakon tretmana inhibitorima rasta.** Stanice A1235 (A) transficirane su vektorima pcDNA3-mRFP (B), pcDNA3-miR-34a (C) i pcDNA3-miR-7 (D) i uzgojene u kulturi. Dio stanica je nakon 24 sata tretiran alkilirajućim agensom MNNG (10  $\mu$ M) ili inhibitorom kazein kinaze 2 (CX-4945, 3  $\mu$ M), te su fiksirane svaki dan tijekom 5 dana. Nakon tretmana obojane su kristal ljubičastim i određena je relativna apsorbancija. **A1235**: roditeljska stanična linija; **RFP**: stanice A1235 transficirane plazmidom koji nosi sekvenciju za crveni fluorescentni protein; **M34**: stanice A1235 transficirane plazmidom pcDNA3-miR-34a; **M7**: stanice A1235 transficirane plazmidom pcDNA3-miR-7; **K**: kontrolne stanice bez tretmana; **CX-4945**: stanice tretirane citostatikom CX-4945; **MNNG**: stanice tretirane s MNNG.

Kada smo usporedili postotke inhibicije rasta stanica koje su imale jednaki tretman, rezultati su pokazali da nema značajnih razlika između tretiranih roditeljskih i transficiranih stanica. Nije bilo ni značajnih razlika linija M34 i M7 u usporedbi s linijom RFP. Iz krivulja rasta je vidljivo da je linija RFP bila najotpornija na CX-4945 u usporedbi s ostalim linijama. Roditeljska linija A1235 bila je najosjetljivija na mutagen MNNG, dok se linija RFP pokazala najotpornijom pod istim tretmanom (Slika 9.).

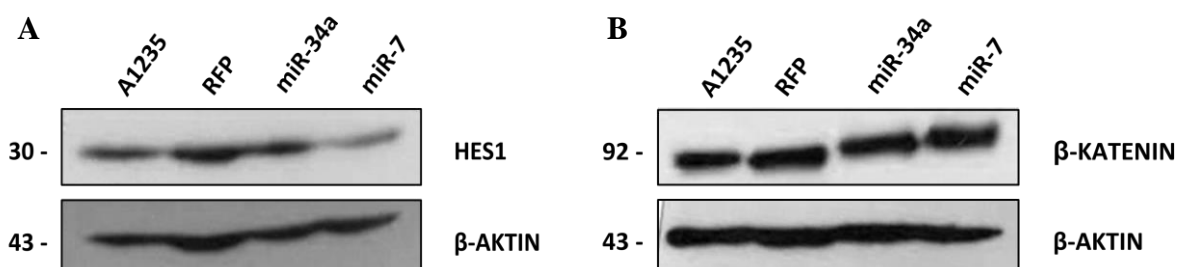


**Slika 9. Krivulje proliferacije normalnih i transficiranih stanica A1235 nakon tretmana inhibitorima rasta.** Stanice A1235 transficirane su vektorima pcDNA3-mRFP, pcDNA3-miR-34a i pcDNA3-miR-7 i uzgojene u kulturi. Stanice nisu tretirane (A) ili su nakon 24 sata tretirane alkilirajućim agensom MNNG (10  $\mu$ M) (B) ili inhibitorom kazein kinaze 2 (CX-4945, 3  $\mu$ M) (C), te su fiksirane tijekom 5 dana. Nakon tretmana obojane su kristal ljubičastim i određena je relativna apsorbancija. **A1235:** roditeljska stanična linija; **RFP:** stanice A1235 transficirane plazmidom koji nosi sekvenciju za crveni fluorescentni protein; **M34:** stanice A1235 transficirane plazmidom koji nosi sekvenciju DNA za miR-34a; **M7:** stanice A1235 transficirane plazmidom koji nosi sekvenciju DNA za miR-7.

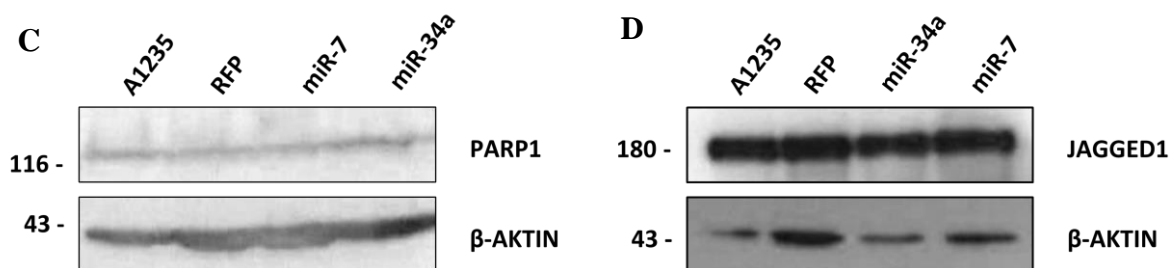
#### 4.5. Analiza ekspresije proteina u transficiranim stanicama A1235

Proteine za čiju je ekspresiju u drugim eksperimentalnim sustavima ili kompjuterskom analizom sekvence programima *Targetscan* ([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/)) i *mirDIP* (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) pokazano da bi mogli potencijalno biti reguliranim s miR-34a i miR-7 analizirali smo westernskom metodom otiska. Pratila se ekspresija proteina: PARP1, liganda JAGGED1, IKAROS, HES1 i  $\beta$ -KATENIN. Analizirani su proteini stanica roditeljske linije A1235 i stanica transficiranih plazmidima pcDNA3-mRFP, pcDNA3-miR-34a i pcDNA3-miR-7. Kao mjera količine proteina, za normalizaciju je korištena ekspresija  $\beta$ -aktina.

Ekspresija proteina HES1 bila je podjednaka u svim staničnim linijama, osim u liniji M7 gdje je bila smanjena. Nije bilo statistički značajnih razlika u ekspresiji proteina PARP1 i  $\beta$ -KATENIN. Kod analize ekspresije proteina JAGGED1 bilo je razlika u ekspresiji kontrolnog proteina  $\beta$ -aktina između roditeljskih i transficiranih linija, pa se ne može zaključiti da je došlo do bitnih promjena u ekspresiji proteina JAGGED1 (Slika 10.). Protein IKAROS nije bio detektiran kod stanica A1235.







**Slika 10. Analiza ekspresije proteina u transficiranim stanicama A1235.** Ukupni proteini izolirani su iz stanica transficiranih plazmidima pcDNA3-mRFP, pcDNA3-miR-34a i pcDNA3-miR-7, te analizirani imunodetekcijom. Ekspresija  $\beta$ -aktina korištena je kao endogena kontrola. Za detekciju proteina korištena su antitijela za antigene HES1 (A),  $\beta$ -KATENIN (B), PARP1 (C) i JAGGED1 (D). **A1235**: roditeljska stanična linija; **RFP**: stanice A1235 transficirane plazmidom koji nosi sekvenciju za crveni fluorescentni protein; **miR-34a**: stanice A1235 transficirane plazmidom koji nosi sekvenciju DNA za miR-34a; **miR-7**: stanice A1235 transficirane plazmidom koji nosi sekvenciju DNA za miR-7. Brojevi s lijeve strane označavaju molekulsku masu proteina u kDa.

## 5. RASPRAVA

MikroRNA (miRNA) su male nekodirajuće molekule RNA, duge 19 do 25 nukleotida, koje sudjeluju u procesu RNA interferencije. miRNA kontroliraju ekspresiju gena tako što se vežu za mRNA ciljanih gena i na razne načine reguliraju njihovu translaciju. MikroRNA su važni regulatori brojnih bioloških procesa, od diferencijacije stanica tijekom embrionalnog razvoja do procesa starenja na razini cijelog organizma. Mnoge miRNA imaju ulogu tumorskih supresora ili onkogeni, te se pokazalo da njihova razina u tumorima čovjeka može biti smanjena ili pojačana, ovisno o tipu tkiva (Krutovskikh i Herceg, 2010). miR-34a i miR-7 važni su regulatori diferencijacije i razvoja živčanog sustava u čovjeku, te su se pokazale kao ključni tumorski supresori čija je ekspresija utišana u brojnim tumorima čovjeka. Mnoga su istraživanja otkrila kako je ekspresija miR-7 i miR-34a smanjena u tumorima živčanog sustava poput neuroblastoma i glioblastoma, te da je povećanje njihove ekspresije smanjilo proliferaciju stanica i spriječilo stvaranje metastaza (Kefas i sur., 2008; Agostini i Knight, 2014). Budući da su se miR-7 i miR-34a pokazale kao važni tumorski supresori u stanicama glioblastoma, u ovom istraživanju htjeli smo proučiti njihovu biološku funkciju u staničnoj liniji humanog glioblastoma A1235 nakon transfekcije plazmidnim vektorima koji ekspimiraju miRNA od interesa.

Kako bismo ostvarili ciljeve rada najprije smo konstruirali dva ekspresijska plazmida sa sekvencama DNA svake od miRNA: pcDNA3-miR-34a i pcDNA3-miR-7. Konstruirani plazmidi imali su sekvence DNA koje su uz središnju sekvencu za zrelu miRNA sadržavale još nekoliko stotina nukleotida ispred i iza nje, kako bi se prvo prepisala pri-miRNA i zatim u stanicama procesirala u pre-miRNA i naposljetku u miRNA. Ovaj način kloniranja miRNA oslanja se na procesiranje i stvaranje zrele miRNA uz pomoć stanične mašinerije. Koristio se u nizu istraživanja (Kefas i sur., 2008; Bofill-De Ross i sur., 2014). Ključno je klonirati regiju DNA koja uključuje 5' i 3' krajeve sekvence za pri-miRNA, kako bi se formirala pravilna struktura peteljke-omče sa jednonančanim krajevima koju cijepa enzim Drosha. Osim ove metode često se koriste i vektori koji imaju unaprijed ugrađene sekvence nužne za procesiranje pri-miRNA, te se u vektor uklonira samo sekvencu zrele miRNA ili siRNA (Chung i sur., 2006). Mogu se ugrađivati i dizajnirane sekvence siRNA za precizno utišavanje ekspresije pojedinih ciljanih gena, zvane amiRNA (engl. *artificial miRNA*) (Boudreau i sur., 2013). Kao ekspresijski vektori u takvim se slučajevima mogu koristiti plazmidi koji umjesto promotora za RNA polimerazu II koriste promotore RNA polimeraze III. Ti promotori imaju kraću sekvencu i veći kapacitet transkripcijske aktivnosti od promotora RNA polimeraze II, te se može sintetizirati više transkripata u istom vremenskom periodu. Ipak, imaju manji kapacitet sinteze dugih sekvenci od promotora koje koristi RNA polimeraza II, te tijekom kloniranja treba paziti na optimalnu duljinu sekvence pri-miRNA ako se žele koristiti promotori RNA polimeraze III (Zhou i sur., 2008). Također se često koristi direktna

transfekcija malih RNA, na primjer siRNA, za kratkotrajno ciljano utišavanje ekspresije gena (McNaughton i sur., 2009; Utku i sur., 2006).

Nakon transfekcije stanica A1235 plazmidima sa sekvencama za miR-7 i miR-34a ispitali smo dolazi li do ekspresije kloniranih sekvencija miRNA. Metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu uz specifične početnice analizirana je razina ekspresije miR-34a i miR-7. Kao kontrolu koristili smo stanice A1235 transficirane plazmidom pcDNA3-mRFP kako bismo mogli kvantificirati razinu ekspresije u odnosu na vrijednosti kontrolnih stanica koje su također transficirane. Na taj smo način eliminirali mogućnost da sam čin transfekcije stanica utječe na konačne rezultate mjerenja razlike u ekspresiji istraživanih miRNA. Rezultati su pokazali izrazito povećanje ekspresije miR-7 u staničnoj liniji M7, gdje je razina ekspresije bila povećana 242 puta u odnosu na kontrolu. Stanična linija M34 imala je 7,6 puta veću razinu ekspresije miR-34a i 4 puta veću razinu ekspresije miR-7 u odnosu na kontrolne stanice RFP. Ovi rezultati su u skladu s brojnim istraživanjima u kojima se transfekcija stanica plazmidom koji eksprimira miRNA koristi za promatranje njihovih funkcija u mnogim staničnim linijama glioblastoma (Kefas i sur., 2008; Guessous i sur., 2009). Glioblastomi imaju slabije ekspimirane miR-7 i miR-34a u odnosu na zdrave stanice, te je povećanje ekspresije uobičajen ishod nakon transfekcije stanica (Choudhury i sur., 2013; Wang i sur., 2014). Povećana razina ekspresije miR-7 u staničnoj liniji M34 bila je neočekivana, no kako miRNA mogu djelovati na više ciljnih molekula istog ili različitih signalnih puteva, stvaraju mrežu signalnih puteva u kojima promjena u razini jedne miRNA može utjecati na razinu druge miRNA mehanizmima povratne sprege (Reddy i sur., 2008).

Budući da su miR-7 i miR-34a važni tumor-supresori koji inhibiraju proliferaciju i zaustavljaju stanični ciklus u brojnim malignim stanicama (Hansen i sur., 2013; Agostini i Knight, 2014), htjeli smo istražiti postoji li razlika u proliferaciji transficiranih stanica A1235 u odnosu na normalne stanice. Stanice smo također kroz 5 dana tretirali mutagenom MNNG (N-metil-N'-nitro-N-nitroso-gvanidin) i citostatikom CX-4945 (Silmisartib). Stanice A1235 nemaju enzim metilgvanin-DNA metiltransferazu (MGMT) koji sudjeluje u popravku O<sup>6</sup>-MeG, stoga su osjetljive na tretman alkilirajućim agensom MNNG (Brdar, 1986). CX-4945 pak inhibira kazein kinazu 2 (CK2), vrlo konzerviranu serin/treoninsku proteinsku kinazu koja fosforilacijom brojnih proteina regulira procese staničnog rasta, proliferacije i preživljenja. CK2 je nužna za prolazak svih stadija u staničnom ciklusu tako što regulira proteine poput p34, cdc34 i topoizomeraze II, te se povezuje s pravilnom funkcijom mitotskog vretena i centrosoma. Fosforilacija pak štiti specifične proteine od razgradnje kaspazama u procesu apoptoze, čime kontrolira stanično preživljenje. Uključena je i u stanični odgovor na stres; na primjer, fosforilira tumor-supresor p53 kao odgovor na oštećenje UV zrakama te potiče popravak DNA (Litchfield, 2003). Rezultati proliferacije stanica su pokazali kako nije bilo značajnih razlika između tretiranih i netretiranih stanica svih skupina tijekom 5 dana tretmana. Razlike u proliferaciji počele su se pojavljivati tek zadnji dan (Slika 8.). Moguće je

da su stanice nasađene rijetko, te da je bilo potrebno neko vrijeme da bi kontrolne stanice počele proliferirati u optimalnim uvjetima, to jest ušle iz lag u eksponencijalnu fazu rasta.

Brojna istraživanja su pokazala kako povećana ekspresija miR-7 i miR-34a suprimira proliferaciju staničnih linija glioblastoma. Wang i sur. (2014) su staničnu liniju glioblastoma U87 transficirali vektorom koji je ekspimirao miR-7, što je rezultiralo smanjenom ekspresijom receptora 1 faktora rasta nalik na inzulin (IGF-R1) čija mRNA ima vezna mjesta za miR-7. Inhibiran je rast i metabolizam stanica glioblastoma budući da je smanjena ekspresija IGF-R1 smanjila signalizaciju puta Akt, koji sudjeluje u kontroli staničnog ciklusa. Kefas i sur. (2008) su pokazali kako miR-7 smanjuje ekspresiju receptora EGF (EGFR) i time neposredno smanjuje aktivaciju signalnog puta Akt, koji je u glioblastomu nužan za proliferaciju i inhibiciju apoptoze. miR-7 također smanjuje razinu ekspresije proteina uključenih u održavanje staničnog ciklusa, poput CDK4/6 i TGF- $\beta$  (Zhao i sur., 2015). Guessous i sur. (2009) su dokazali kako je ekspresija pre-miR-34a u tkivima glioblastoma niža nego u zdravom tkivu. Transfekcijom linije glioblastoma U87 vektorom pGL3 koji ekspimirao miR-34a otkrili su kako povećana razina ekspresije miR-34a smanjuje ekspresiju Notch-1, Notch-2, CDK6 i c-Met, što mijenja signalne puteve u koje su uključeni ovi proteini. miR-34a je time uzrokovala inhibiciju proliferacije i preživljenja stanica, te zaustavila stanični ciklus. miR-34a također djeluje na put apoptoze i stanični ciklus smanjenjem ekspresije proteina CDK4, Bcl-2 i CD44 u drugim tipovima tkiva (Agostini i Knight, 2014). Rezultati su pokazali kako nije bilo značajnih razlika u proliferaciji i postotcima inhibicije između tretiranih roditeljskih i transficiranih stanica (Slika 9.). Iz krivulja rasta je također vidljivo da je linija RFP bila najotpornija na CX-4945 i MNNG u usporedbi s ostalim linijama. Očekivali smo da bi stanične linije M34 i M7 tretirane inhibitorima rasta imale slabiju razinu proliferacije od tretirane roditeljske linije i linije RFP zbog kombiniranog utjecaja inhibitora rasta i ekspimiranih miRNA na staničnu proliferaciju i apoptozu, međutim stanice su pokazale stopu proliferacije i otpornosti na citostatike sličnu kontrolnim stanicama. Također, svaki tip stanica ima specifičan obrazac aktivnosti signalnih puteva i miRNA koji reguliraju proliferaciju, te je moguće da stanice A1235 imaju poremećen i stalno aktivan put preživljenja na koji miR-7 i miR-34a nisu mogle utjecati.

Metodom imunodetekcije analizirali smo razinu ekspresije proteina za koje je u drugim eksperimentalnim sustavima ili kompjuterskom analizom sekvence pokazano da bi mogli potencijalno biti regulirani s miR-34a i miR-7. JAGGED1 i HES1 (engl. *hairy enhancer of split*) uključeni su u signalizaciju puta Notch koji se aktivira vezanjem liganda DLL ili Jagged na jedan od četiri receptora Notch. Receptori Notch su transmembranske molekule na staničnoj membrani, a vezanje liganda, koji je također transmembranska molekula na susjednoj stanici, uzrokuje cijepanje unutarstanične domene receptora i njenu translokaciju u jezgru. Tamo tzv. intracelularna domena Notch (NICD) djeluje kao transkripcijski faktor koji aktivira ekspresiju gena nužnih za diferencijaciju, proliferaciju,

apoptozu i staničnu adheziju. Jedan od gena koji je nizvodna meta signalnog puta Notch je *Hes1*. Ligand JAGGED1 je uključen u razvoj više organskih sustava, te se može pronaći u srcu, posteljici, jetri, gušterači i plućima. Ekspresija mu je povećana u tumoru dojke gdje potiče proliferaciju i služi kao marker za lošu prognozu bolesti (Grochowski i sur., 2016). Pang i sur. (2010) su otkrili kako se miR-34a veže na 3'-UTR regiju mRNA gena *Jagged1* i *Notch1*, te da prekomjerna ekspresija miR-34a u stanicama HeLa smanjuje njihovu razinu ekspresije. Također su pokazali kako je smanjena i ekspresija proteina HES1 koji funkcionira kao transkripcijski represor mnogih gena, a posebno je važan u razvoju probavnog i živčanog sustava gdje regulira diobu matičnih stanica i sudjeluje u diferencijaciji astrocita, neurona i hepatocita. Njegova povećana ekspresija potiče proliferaciju i invazivnu sposobnost stanica raka dojke (Kageyama i sur., 2000; Li i sur., 2018). U ovom smo radu stoga analizirali ekspresiju proteina JAGGED1 i HES1 u stanicama s povećanom ekspresijom miR-7 i miR-34a. HES1 smo analizirali kao moguću metu puta Notch koja bi mogla odražavati promjene u ekspresiji receptora. HES1 je imao sličnu razinu ekspresije u linijama A1235 i M34, a ekspresija mu je trebala biti snižena u stanicama koje imaju povećanu ekspresiju miR-34a, kao što su pokazali Pang i sur. (2010). Međutim, ekspresija proteina HES1 bila je smanjena u liniji M7, a njegova mRNA sadrži vezno mjesto za miR-7. Vjerojatno je povećana razina ekspresije miR-7 u liniji M7 smanjila aktivaciju puta Notch i time utjecala na ekspresiju HES1. Kod analize ekspresije proteina JAGGED1 bilo je razlika u ekspresiji kontrolnog proteina  $\beta$ -aktina između roditeljskih i transficiranih linija, stoga ne možemo zaključiti da li je došlo do bitnih promjena u ekspresiji proteina JAGGED1.

Protein IKAROS (engl. *Ikaros family zinc fingerprotein 1*, IKZF1) važan je transkripcijski faktor koji sudjeluje u diferencijaciji hematopoetskih stanica i eksprimiran je u brojnim tkivima, uključujući i mozak. Delecije i mutacije proteina IKAROS povezane su s razvojem više tipova leukemija, stoga mu se pripisuje uloga tumor-supresora. Promotor *IKZF1* je hipermetiliran u stanicama glioblastoma, te je otkriveno kako povećanje ekspresije IKAROS u stanicama inhibira njihovu proliferaciju i migraciju (Agarwal i sur., 2013). IKAROS se veže na isto vezno mjesto kao i protein CSL, transkripcijski faktor koji je dio kompleksa s NICD (aktiviranom domenom Notch), te moguće kompetira s tim signalnim putem (Fan i Lu, 2016). Analiza mRNA gena *IKZF1* programom *mirDIP* je pokazala kako sekvenca sadrži vezna mjesta i za miR-7 i miR-34a, no protein nije bio detektiran kod stanica A1235. Porodica Ikaros je najviše povezana s regulacijom hematopoetskog sustava, iako pojedine proteine nalazimo i u živčanom sustavu (Fan i Lu, 2016). Moguće je, međutim, da stanična linija glioblastoma nije imala ekspresiju ovog proteina koji može djelovati kao tumorski supresor.

Rathod i sur. (2014) u matičnim su stanicama glioma demonstrirali kako se miR-34a veže na Rictor, integralnu komponentu kompleksa mTORC2. Rictor i mTORC2 uzrokuju fosforilaciju AKT čime nastaje p-AKT, koji zauzvrat fosforilira GSK-3 $\beta$ ; GSK-3 $\beta$  je

negativni regulator  $\beta$ -katenina i njegova fosforilacija uzrokuje akumulaciju  $\beta$ -katenina u stanici čime dolazi do aktivacije signalnog puta Wnt i proliferacije stanica glioma. Povećana ekspresija miR-34a u gliomu uzrokuje degradaciju Rictora, što vodi do smanjenja aktivacije ovog signalnog puta i degradacije  $\beta$ -katenina. Otkriveno je i kako miR-7 u stanicama raka jetre inhibira signalni put KLF4/PI3K/Akt smanjenjem ekspresije KLF4, što uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa (Chang i sur., 2015). U stanicama glioblastoma A1235 ekspresija  $\beta$ -katenina bila je podjednaka u svim staničnim linijama, bez obzira na povećanje ekspresije miR-7 i miR-34a.

Poli(ADP-ribozil) polimeraza 1 (PARP1) je enzim koji vrši većinu staničnih reakcija poli(ADP) ribozilacije. Sudjeluje u popravku jednolančanih i dvolančanih lomova DNA, regulira ekspresiju gena kao modifikator transkripcijskih faktora i može utjecati na promjenu strukture kromatina preko regulacije enzima koji u tome sudjeluju. Kod velikog oštećenja DNA aktivirani PARP1 djeluje na translokaciju proteina AIF u jezgru, čime potiče proces apoptoze. S druge strane, nedostatak stanične energije za dovršavanje apoptoze može dovesti do nekroze (Ko i Ren, 2012; Krishnakumar i Kraus, 2010). Luo i sur. (2018) su pokazali kako je povećana ekspresija miR-7 u stanicama TK6 transficiranim vektorom s miR-7 smanjila proliferaciju i promovirala apoptozu nakon tretmana hidrokinonom (HQ). Sposobnost poravka oštećenja DNA je inhibirana radi smanjene ekspresije PARP1 pod utjecajem miR-7. miR-34a također smanjuje ekspresiju PARP1 u ljudskim mezenhimskim matičnim stanicama (Ghasemzadeh i sur., 2018). Ekspresija proteina PARP1 bila je podjednaka u svim linijama glioblastoma A1235, što prema analizi literature nismo očekivali. Moguće je da stanice glioblastoma imaju drugačiju regulaciju signalnih puteva pa zato nije bilo promjene u ekspresiji PARP1.

miR-7 i miR-34a mogu regulirati niz drugih proteina na razini translacije. Jedan od njih je transkripcijski faktor YY1, uključen u procese diferencijacije, embriogeneze i proliferacije. Njegova prekomjerna ekspresija vodi k razvoju tumora u mnogim tkivima stoga što YY1 utječe na ekspresiju p53, *c-myc*, NF- $\kappa$ B i PARP, koji su ključni regulatori proliferacije i preživljenja stanica (Gordon i sur., 2005). Otkriveno je kako je miR-7 inhibitor YY1 u kolorektalnim stanicama raka (Zhang i sur., 2013). miR-7 negativno regulira i EGFR, MAPK, PAK1, IGF-R1, mTOR i KLF4 koji su ključni onkogeni u brojnim tkivima i organima, poput jajnika, želuca, jetre, dojke i pluća (Zhao i sur., 2015). Identificirana su čak 982 gena u raznim tipovima tumora koji su direktne mete miR-34a. Većinom ih čine geni povezani s progresijom staničnog ciklusa i staničnim rastom i proliferacijom. Neke od meta koje sudjeluju u nastanku i progresiji tumora su TGF- $\beta$ , WNT, MAPK, CD44, Notch-2, Sirt1 i c-met, koji imaju glavne uloge u stvaranju tumora prostate i dojke, kolorektalnog tumora, glioma i mjehura (Saito i sur., 2015).

Daljnje proučavanje funkcije i aktivnosti miR-34a i miR-7, a i brojnih drugih miRNA, važno je radi otkrivanja primarnih procesa u nastanku tumora. miRNA su se pokazale kao

precizni markeri za dijagnozu i prognozu bolesti i imaju izniman potencijal kao protutumorski lijekovi zbog širokog spektra djelovanja u brojnim malignim stanicama. Iako se mnogo toga otkrilo o mehanizmima sinteze miRNA i regulacije translacije, još uvijek nije jasno na koje se načine stvara specifičan obrazac ekspresije miRNA u pojedinim tipovima stanica i kako se regulira ekspresija određenih ciljanih gena budući da svaka miRNA može potencijalno kontrolirati stotine gena. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se otkrila potpuna slika biološke aktivnosti miRNA.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Konstruirali smo plazmidne vektore pcDNA3-miR-7 i pcDNA3-miR-34a koji kodiraju za mikroRNA miR-7 i miR-34a.
2. Staničnu liniju glioblastoma A1235 transficirali smo plazmidima sa sekvencama DNA za miR-7 i miR-34a, te su uzgojeni klonovi M7 i M34 koji su imali veću razinu ekspresije miR-7 i miR-34a u odnosu na razinu ekspresije u kontrolnim stanicama.
3. Proliferacija stanica M7 i M34 s povećanom ekspresijom miRNA bila je na kontrolnoj razini. Inhibicija rasta stanica M7 i M34 nakon obrade alikilirajućim agensom MNNG i inhibitorom kazeinske kinaze 2 nije se bitno razlikovala od inhibicije rasta kontrolnih stanica.
4. Kod stanica M7 i M34 analizirana je ekspresija proteina HES1, PARP1, JAGGED1,  $\beta$ -KATENIN i IKAROS. Ekspresija proteina PARP1 i  $\beta$ -KATENIN nije bila značajno promijenjena u odnosu na ekspresiju kod kontrolnih stanica. Ekspresija proteina HES1 bila je smanjena u liniji M7. Protein IKAROS nije detektiran u stanicama glioblastoma A1235.



## 7. LITERATURA

Agarwal M, Nitta R, Dovat S i Li G (2013) Ikaros expression inhibits gbm tumorigenesis and correlates with a positive prognosis. *Neuro Oncol.* 15:12-31

Agostini M i Knight RA (2014) miR-34: from bench to bedside. *Oncotarget.* 5:872-881

Ardekani AM i Naeini MM (2010) The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2:161-179

Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP i Blelloch R (2008) Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* 22:2773-2785

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116:281-297

Bian Y, Han J, Kannabiran V, Mohan S, Cheng H, Friedman J, Zhang L, VanWaes C i Chen Z (2015) MEK inhibitor PD-0325901 overcomes resistance to CK2 inhibitor CX-4945 and exhibits anti-tumor activity in head and neck cancer. *Int J Biol Sci.* 11:411-22

Bofill-De Ros X, Gironella M i Fillat C (2014) miR-148a- and miR-216a-regulated Oncolytic Adenoviruses Targeting Pancreatic Tumors Attenuate Tissue Damage Without Perturbation of miRNA Activity. *Mol Ther.* 22:1665-1677

Boudreau RL, Spengler RM, Hylock RH, Kusenda BJ, Davis HA, Eichmann DA i Davidson BL (2013) siSPOTR: a tool for designing highly specific and potent siRNAs for human and mouse. *Nucleic Acids Res.* 41:e9

Brdar B (1986) Induction of plasminogen activator by alkylating agents in a repair defective human glioblastoma cell strain. *Cancer Res.* 46:2282-2284

Brosius J i Raabe CA (2016) What is an RNA? A top layer for RNA classification. *RNA Biol.* 13:140-144

Chang YL, Zhou PJ, Wei L, Li W, Fang YX i Gao WQ (2015) MicroRNA-7 inhibits the stemness of prostate cancer stem-like cells and tumorigenesis by repressing KLF4/PI3K/Akt/p21 pathway. *Oncotarget.* 6:24017-24031

Childs L, Nikoloski Z, May P i Walther D (2009) Identification and classification of ncRNA molecules using graph properties. *Nucleic Acids Res.* 37:e66

Choudhury NR, de Lima Alves F, de Andrés-Aguayo L, Graf T, Cáceres JF, Rappsilber J i Michlewski G (2013) Tissue-specific control of brain-enriched miR-7 biogenesis. *Genes Dev.* 27:24-38

Chung KH, Hart CC, Al-Bassam S, Avery A, Taylor J, Patel PD, Vojtek AB i Turner DL (2006) Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acids Res.* 34:e53.

Costa FF (2007) Non-coding RNAs: Lost in translation. *Gene.* 386:1-10

Do DN, Li R, Dudemaine PL i Ibeagha-Awemu EM (2017) MicroRNA roles in signalling during lactation: an insight from differential expression, time course and pathway analyses of deep sequence data. *Scientific Reports.* 7:44605

Ebert MS, Neilson JR i Sharp PA (2007) MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods.* 4:721-726

Fan Y i Lu D (2016) The Ikaros family of zinc-finger proteins. *Acta Pharm Sin B.* 6:513–521

Ghasemzadeh N, Pourrajab F, Dehghani Firoozabadi A, Hekmatimoghaddam S i Haghirsadat F (2018) Ectopic microRNAs used to preserve human mesenchymal stem cell potency and epigenetics. *Excli J.* 17:576-589

Giles KM, Brown RA, Ganda C, Podgorny MJ, Candy PA, Wintle LC, Richardson KL, Kalinowski FC, Stuart LM, Epis MR, Haass NK, Herlyn M i Leedman PJ (2016) microRNA-7-5p inhibits melanoma cell proliferation and metastasis by suppressing RelA/NF- $\kappa$ B. *Oncotarget.* 7:31663-31680

Gilbert W (1986) Origin of life: the RNA world. *Nature.* 319:618

Gordon S, Akopyan G, Garban H i Bonavida B (2005) Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene.* 25:1125-1142

Grochowski CM, Loomes KM i Spinner NB (2016) Jagged1 (JAG1): Structure, Expression, and Disease Associations. *Gene.* 576:381-384

Guessous F, Li Y, Zhang Y, Dipierro C, Kefas B, Johnson E, Marcinkiewicz L, Jiang J, Yang Y, Schmittgen TD, Lopes B, Schiff D, Purow B i Abounader R (2009) MicroRNA-34a Inhibits Glioblastoma Growth by Targeting Multiple Oncogenes. *Cancer Res.* 69:7569-7576

Ha M i Kim VN (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15:509-24

Hansen TB, Kjems J i Damgaard CK (2013) Circular RNA and miR-7 in Cancer. *Cancer Res.* 73:1-4

Hausser J i Zavolan M (2014) Identification and consequences of miRNA-target interactions--beyond repression of gene expression. *Nat Rev Genet.* 15:599-612

Hermeking H (2010) The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ.* 17:193-199

Horwich MD i Zamore PD (2008) Design and Delivery of Antisense Oligonucleotides to Block microRNA Function in Cultured Drosophila and Human Cells. *Nat Protoc.* 3:1537-1549

Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, Liang M, Dittmar RL, Liu Y, Liang M, Kohli M, Thibodeau SN, Boardman L i Wang L (2013) Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics.* 14:319

Iorio MV i Croce CM (2009) MicroRNAs in Cancer: Small Molecules With a Huge Impact. *J Clin Oncol.* 27:5848-5856

Jain AK, Allton K, Iacovino M, Mahen E, Milczarek RJ, Zwaka TP, Kyba M i Barton MC (2012) p53 regulate cell cycle and microRNAs to promote differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS Biol.* 10:e1001268

Kageyama R, Ohtsuka T i Tomita K (2000) The bHLH gene Hes1 regulates differentiation of multiple cell types. *Mol Cells.* 10:1-7

Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, Lee J, Fine H, Chiocca EA, Lawler S i Purow B. (2008) microRNA-7 Inhibits the Epidermal Growth Factor Receptor and the Akt Pathway and Is Down-regulated in Glioblastoma. *Cancer Res.* 68:3566-3572

Ko HL i Ren EC (2012) Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. *Biomolecules.* 2:524-548

Krishnakumar R i Kraus WL (2010) The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell.* 39:8-24

Krutovskikh VA i Herceg Z (2010) Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers. *Bioessays.* 32:894-904

Lawler S i Chiocca EA (2009) Emerging functions of microRNAs in glioblastoma. *J Neurooncol.* 92:297-306

Lee RC, Feinbaum RL i Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75:843-854

Li X, Cassidy JJ, Reinke CA, Fischboeck S i Carthew RW (2009) A microRNA Imparts Robustness Against Environmental Fluctuation During Development. *Cell.* 137:273-282

Li X, Cao Y i Li M (2018) Upregulation of HES1 Promotes Cell Proliferation and Invasion in Breast Cancer as a Prognosis Marker and Therapy Target via the AKT Pathway and EMT Process. *J Cancer.* 9:757-766

Litchfield DW (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J.* 369:1-15

Luo H, Liang H, Chen Y, Chen S, Xu Y, Xu L, Liu J, Zhou K, Peng J, Guo G, Lai B, Song L, Yang H, Liu L, Peng J, Liu Z, Tang L, Chen W i Tang H (2018) miR-7-5p overexpression suppresses cell proliferation and promotes apoptosis through inhibiting the ability of DNA damage repair of PARP-1 and BRCA1 in TK6 cells exposed to hydroquinone. *Chem Biol Interact.* 283:84-90

McNaughton BR, Cronican JJ, Thompson DB i Liu DR (2009) Mammalian cell penetration, siRNA transfection, and DNA transfection by supercharged proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:6111-6116

Morceau F, Chateauvieux S, Gaigneaux A, Dicato M i Diederich M (2013) Long and short non-coding RNAs as regulators of hematopoietic differentiation. *Int J Mol Sci.* 14:14744-70

Okuda H, Xing F, Pandey PR, Sharma S, Watabe M, Pai SK, Mo YY, Iizumi-Gairani M, Hirota S, Liu Y, Wu K, Pochampally R i Watabe K (2013) miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4. *Cancer Res.* 73:1434-1444

Pang RT, Leung CO, Ye TM, Liu W, Chiu PCN, Lam KKW, Lee KF i Yeung WSB (2010) MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells. *Carcinogenesis.* 31:1037-1044

Park SM, Gaur AB, Lengyel E i Peter ME (2008) The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 22:894-907

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E i Ruvkun G (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 408:86–89

Pasquinelli AE (2012) MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev.* 13:271-282

Qu Z i Adelson DL (2012) Evolutionary conservation and functional roles of ncRNA. *Front Genet.* 3:205

Rathod SS, Rani SB, Khan M, Muzumdar D i Shiras A (2014) Tumor suppressive miRNA-34a suppresses cell proliferation and tumor growth of glioma stem cells by targeting Akt and Wnt signaling pathways. *FEBS Open Bio.* 4:485-495

Reddy SD, Ohshiro K, Rayala SK i Kumar R (2008) MicroRNA-7, a Homeobox D10 Target, Inhibits the p21-Aactivated Kinase 1 and Regulates its Functions. *Cancer Res.* 68:8195-8200

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR i Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 403:901-906

- Rokavec M, Li H, Jiang L i Hermeking H (2014) The p53/miR-34 axis in development and disease. *J Mol Cell Biol.* 6:214-230
- Saito Y, Nakaoka T i Saito H (2015) microRNA-34a as a Therapeutic Agent against Human Cancer. *J Clin Med.* 4:1951-1959
- Sambrook JF i Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. izdanje. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Smith-Vikos T i Slack FJ (2012) MicroRNAs and their roles in aging. *J Cell Sci.* 125:7-17
- Takahashi R, Miyazaki H i Ochiya T (2014) The role of micro RNAs in the regulation of cancer stem cells. *Front Genet.* 4:295
- Utku Y, Dehan E, Ouerfelli O, Piano F, Zuckermann RN, Pagano M i Kirshenbaum K (2006) A peptidomimetic siRNA transfection reagent for highly effective gene silencing. *Mol Biosyst.* 2:312-317
- Vincze T, Posfai J i Roberts RJ (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 31:3688-3691
- Wang B, Dong N, Sun F, Sun Z, Diao Y, Zheng C, Sun J, Yang Y i Jiang D (2014) MicroRNA-7 directly targets insulin-like growth factor 1 receptor to inhibit cellular growth and glucose metabolism in gliomas. *Diagn Pathol.* 19:211
- Wightman B, Ha I i Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 75:855–862
- Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Leiter A, Ham M, Li D, Doan NB, Said JW, Black KL i Phillip Koeffler H (2013) miR-34a functions as a tumor suppressor modulating EGFR in glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 32:1155-1163
- Zhao J, Tao Y, Zhou Y, Qin N, Chen C, Tian D i Xu L (2015) MicroRNA-7: a promising new target in cancer therapy. *Cancer Cell Int.* 15:103
- Zhang N, Li X, Wu CW, Dong Y, Cai M, Mok MT, Wang H, Chen J, Ng SS, Chen M, Sung JJ i Yu J (2013) microRNA-7 is a novel inhibitor of YY1 contributing to colorectal tumorigenesis. *Oncogene.* 32:5078-5088
- Zhou H, Huang C i Xia XG (2008) A tightly regulated Pol III promoter for synthesis of miRNA genes in tandem. *Biochim Biophys Acta.* 1779:773-779
- Zhou MY i Gomez-Sanchez CE (2000) Universal TA cloning. *Curr Issues Mol Biol.* 2:1-7

**Internetske stranice:**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno ožujak-lipanj 2018.g

<http://nc2.neb.com/NEBcutter2>, pristupljeno ožujak-lipanj 2018.g.

<https://dna.macrogen.com/eng/>, pristupljeno srpanj 2018.g.

[http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/)

<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 22.03.1995. godine u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu Malešnica, a potom i jezični smjer Gimnazije Lucijana Vranjanina. Preddiplomski studij molekularne biologije završila sam na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu 2016. godine s temom „Funkcije biogenih amina kao neurotransmitera u središnjem živčanom sustavu“.

Laboratorijsku stručnu praksu odradila sam tijekom ljetnog semestra akademske godine 2015./2016. na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka. Diplomski studij molekularne biologije upisala sam 2016. godine na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

Zimski semestar akademske godine 2017./2018. provela sam na studijskom boravku u Beču u sklopu međunarodne razmjene studenata ERASMUS, gdje sam pohađala diplomski studij razvojne biologije i genetike na Fakultetu prirodnih znanosti Sveučilišta u Beču, Austrija. U manifestaciji „Noć biologije“ sudjelovala sam i kreirala radionice na Botaničkom zavodu u akademskoj godini 2014./2015. i na Zavodu za molekularnu biologiju akademskih godina 2016./2017 i 2017./2018.