

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Aleksei Brjalin

MikroRNA transfektsioonimeetodite võrdlus A549 ja PPC-1 rakkudes

Magistritöö

Juhendajad: Tarmo Annilo, PhD

Ana Rebane, PhD

Kaasjuhendaja: Egon Urgard, MSc

Tartu 2015

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 MikroRNAd	7
1.2 MiRNAd biogenees	7
1.3 MiRNAd bioloogilised funktsioonid	9
1.4 MiRNAd kasutamine terapeutilistel eesmärkidel	10
1.5 MiRNA asendusteraapia	11
1.6 MiRNAd aktiivsuse mahasurumine	14
1.7 MiRNAd rakkudesse toimetamise võimalused	18
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	23
2.1 Töö eesmärgid	23
2.2 Materjal ja meetodika	23
2.2.1 Kasutatud rakuliinid, söötmed ja lahused	23
2.2.2 Rakukultuuride transfektsioon	24
2.2.3 Rakkude fluorestsentsvärvimine ja visualiseerimine	25
2.2.4 RNA eraldamine	26
2.2.5 RNA kontsentratsiooni ja kvaliteedi mõõtmine	26
2.2.6 RNA mikrokiibi analüüs	26
2.2.6.1 Ekspressiooniandmete töötlus, normaliseerimine ja statistiline analüüs	27
2.2.7 <i>MiR-34a</i> transfektsiooni kontroll	28
2.2.7.1 cDNA süntees	28
2.2.7.2 Kvantitatiivne reaal-aja PCR (qRT-PCR)	29
2.2.8 <i>MiR-34a</i> sihtmärkgeenide ekspressiooni uurimine	30
2.2.8.1 <i>MiR-34a</i> sihtmärkgeenide valimine ekspressiooni kiibi põhjal ja praimerite disain	30
2.2.8.2 cDNA süntees	31
2.2.8.3 <i>MiR-34a</i> sihtmärkgeenide qRT-PCR	32
2.2.8.4 qRT-PCRi andmete statistiline analüüs	33
3. TULEMUSED JA ARUTELU	34
3.1 Transfektsioonisüsteemide võrdlus	34
3.2 <i>MiR-34a</i> miimiku transfektsiooni kontroll	34
3.3 <i>MiR-34a</i> sihtmärkgeenide ekspressiooni analüüs	37

3.4 RNA mikrokiibi analüüs.....	40
3.5 Kandidaatgeenide kontroll qRT-PCRi abil	45
3.6 Järeldused	48
Kokkuvõte	49
Summary	50
TÄNUAVALDUSED	51
Kasutatud kirjandus	52

Kasutatud lühendid

Ago – *Argonaute* valk

AMO – anti-miRNA oligonukleotiid, *anti-miRNA oligonucleotide*

CDK6 – tsükliin-sõltuv kinaas 6, *cyclin-dependent kinase 6*

C_t – lävitsükkel, *cycle threshold*

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool dihidrokloriid, *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DGCR8 – *DiGeorge syndrome critical region gene 8*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

dsRBP – kaksikahelalise RNAga-seonduv valk, *double-stranded RNA-binding protein*

dsRNA – kaksikahelaline RNA, *double-stranded RNA*

FBS – veise loote seerum, *fetal bovine serum*

HCC – hepatotsellulaarne kartsinoom, *hepatocellular carcinoma*

HCV – viiruslik C-hepatiit, *hepatitis C virus*

LNK – lipiidsed nanokandjad

miRISC – *miRNA-induced silencing complex*

miR-NC – miRNA negatiivse kontrolli miimik, *miRNA negative control mimic*

NSCLC – mitteväikerakuline kopsuvähk (*non-small cell lung cancer*)

NTC – ilma sihtmärk-järjestuseta qPCRi kontrollreaktsioon, *no template control*

nt – nukleotiid

ON – oligonukleotiid, *oligonucleotide*

PAMAM – polüamidoamiin, *polyamidoamine*

PBS – *phosphate buffered saline*

PEI – polüetüleenimiin, *polyethylenimine*

PFA – paraformaldehüüd, *paraformaldehyde*

PLGA – polülaktiid-ko-glükoliid, *polylactide-co-glycolide*

PPC-1 – eesnäärmevähi rakuliin, *primary prostatic carcinoma-1*

PS – fosforotioaat, *phosphorothioate*

qRT-PCR – kvantitatiivne reaal-aja PCR, *quantitative real-time PCR*

RAS – *Rat sarcoma viral oncogene homolog*

RBP – RNA-seonduv valk, *RNA-binding protein*

RIN – RNA terviklikkuse number, *RNA integrity number*

RSP – rakku sisenevad peptiidid, *CPP, cell-penetrating peptides*

SNALP – stabiilsed nukleiinhappeid kandvad lipiidsed partiklid, *stable nucleic acid lipid particles*

UTR – mittetransleeriv ala, *untranslated region*

Sissejuhatus

Arusaamine mikroRNAde (miRNAde) rollist geenide ekspressiooni regulatsioonis on viimastel aastatel märkimisväärselt laienenud. Uuringud näitavad, et need väikesed mittekodeerivad RNAd osalevad post-transkriptsiooniliselt rakkude differentseerumise ja proliferatsiooni kontrollis (Mendell ja Olson, 2012) ning mängivad olulist rolli loomade ja taimede kasvu, arengu ja paljunemise reguleerimisel. Kõrvalekalded miRNAde normaalsest ekspressioonist on seotud tumorigeneesiga (Zhu *et al.*, 2014). Mitmed kõrgeenenud ekspressiooniga miRNAd inhibeerivad tuumorsupressorgeenide ekspressiooni ja on seetõttu tuntud kui onkogeensed miRNAd (onkomiRid), allareguleeritud miRNAd toimivad aga tihti tuumorsupressoritena.

Alates esmasest miRNAde ja kasvajakatte seoste kirjeldusest 2002. aastal (Calin *et al.*, 2002) on miRNAsid põhjalikult uuritud ning paljud uurimisgrupid on tegelenud miRNAdel põhineva teraapia arendamisega. Selle tulemusena on mõned miRNAdel põhinevad ravimid jõudnud ka kliiniliste katseteni.

Üks vähkkasvajates sageli allareguleeritud miRNA on *miR-34a*. Käesoleva töö eesmärgiks oli testida *miR-34a* sünteetilise analoogi rakkudesse viimise meetodikat ja leida sobivad sihtmärkgeenid selliste katsete efektiivsuse hindamiseks.

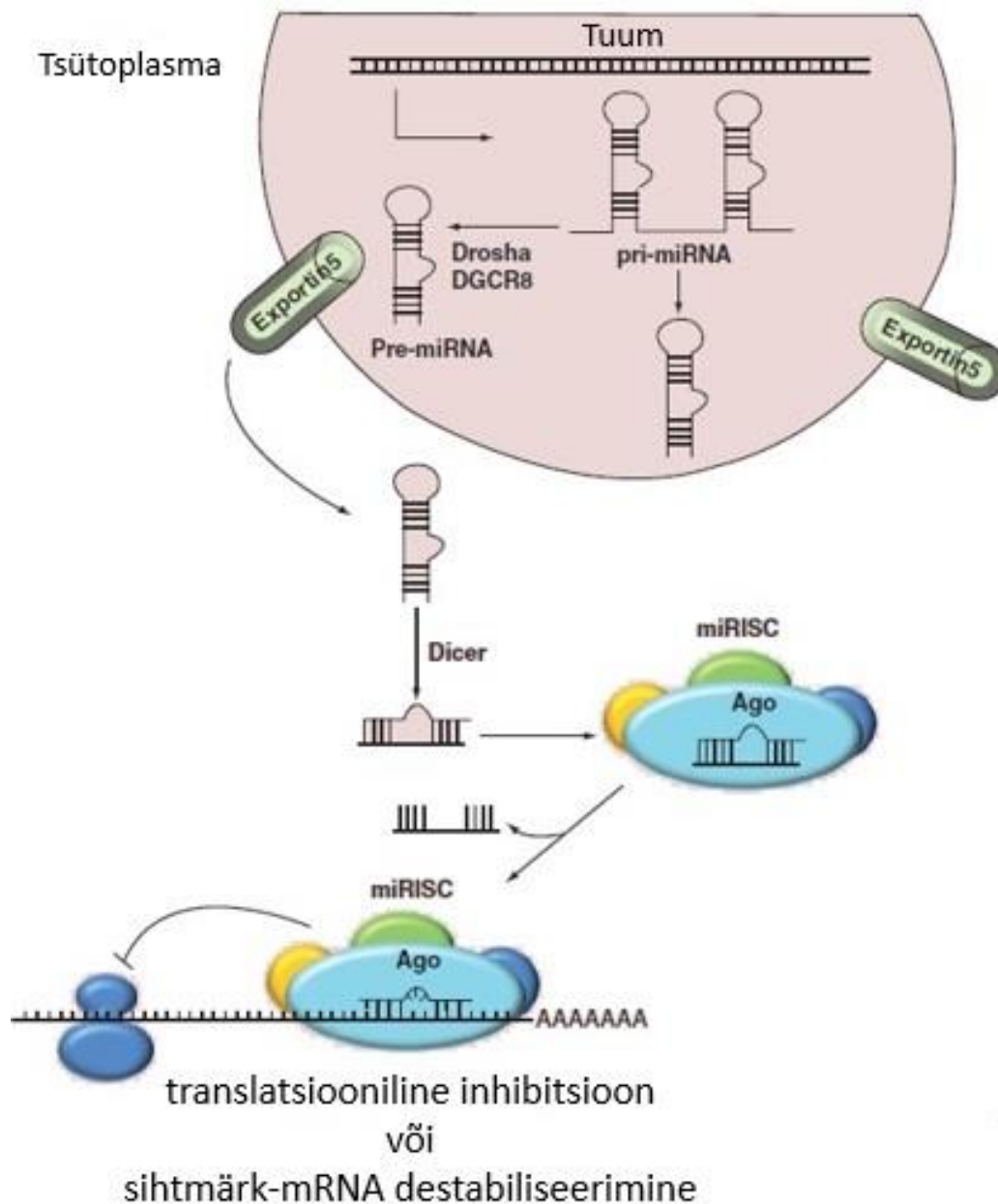
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 MikroRNAd

MiRNAd on endogeensed, mittekodeerivad ja kõrgelt konserveerunud, tavaliselt 18-25 nukleotiidi (nt) pikad RNA molekulid, mis reguleerivad post-transkriptsiooniliselt geenide ekspressiooni (Bartel, 2004; Bartel ja Chen, 2004). Praeguseks on teada üle 1000 inimese miRNA, mis hinnanguliselt kontrollivad üle 50% kõigist valke kodeerivaist geenidest (Simonson ja Das, 2015). See kontroll saavutatakse miRNA ja mRNA omavahelise seondumise kaudu, kusjuures ühel miRNAl võib olla mitu sihtmärk-mRNAd (Kasinski *et al.*, 2014). Seondumine toimub enamasti mRNA 3' mitte-transleeriva ala (UTR, *untranslated region*) ja miRNA 5' otsas paikneva mRNAga komplementaarse nn *seed* regiooni vahel (Pasquinelli, 2012). Tulemuseks on sihtmärkgeeni translatsiooniline inhibitsioon või sihtmärk-mRNA destabiliseerimine. Mõlemad protsessid on omavahel seotud (Pasquinelli, 2012; Agostini ja Knight, 2014). Lisaks klassikalisele seondumisele 3' UTRi piirkonnas on kirjeldatud ka sihtmärkide ekspressiooni ülesreguleerimist 5' UTRi kaudu (Orom *et al.*, 2008). MiRNAd võivad toimida ka RNA-seonduvate valkude (RBP, *RNA-binding protein*,) inhibiitoritena ja seetõttu mõjutada geenide regulatsiooni ka kaudselt. MiRNA seondumine mRNA RBP saitidega või otseselt RBPga reguleerib samaaegselt mitmete geenide ekspressiooni (Eiring *et al.*, 2010). Seega on miRNAd regulatsioonirajad keerulised ja kindlasti vajavad täiendavat uurimist.

1.2 MiRNAd biogenees

Küpsed miRNAd on ainult 18-25 nt pikad (Wang *et al.*, 2014), kuid neid kodeerivad geenid võivad genoomis katta tuhandeid aluspaare ning nende sünteesirada on mitmeastmeline protsess (Joonis 1). Esimese etapina transkribeeritakse miRNA geen RNA polümeraasi II (RNA Pol II) abil primaarseks miRNAks (pri-miRNA) (Zhang *et al.*, 2007). Seejärel toimub pri-miRNA töötlemine juuksenõela sarnaseks struktuuriks ehk prekursor-miRNAks (pre-miRNA), mille viib läbi RNAas III perekonda kuuluv ensüüm Drosha, kaasates selleks dsRNA-seonduva valgu DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) (Misso *et al.*, 2014). Pre-miRNA transporditakse tuumamembraani valgu ekspordiin-5 (XPO5) abil tsütoplasmasse, kus Dicer ensüüm lõikab kaksikahelalise pre-miRNA kaheks 18-25 nt pikkuseks RNAks. Kanoonilise mudeli järgi on üks nendest nn. "küps" (*mature*) miRNA ahel ja teine temaga osaliselt komplementaarne vastasahel ehk *passenger* ahel (Kouwenhove *et al.*, 2011).



Joonis 1. MiRNA biogenees. MiRNA sünteesirada koosneb kahest etapist. Esimene etapp toimub tuumas, kus miRNA geenilt transkribeeritakse RNA Pol II abil pri-miRNA, mis töödeldakse ensüümkompleksi DGCR8/Drosha abil pre-miRNAks. Teises etapis viiakse Exportin 5 abil pre-miRNA tuumast tsütoplasmasse, kus Dicer lõikab dsRNA 18-25 nt pikkuseks RNAks. Küps ahel ühineb Ago valgu abil miRISC kompleksiga, mis tunneb ära komplementaarsed saidid sihtmärkgeenide 3' UTRides ning surub maha valgu ekspressiooni translatsioonilise inhibitsiooni või mRNA degradatsiooni kaudu (kohandatud Baigude ja Rana, 2014 järgi).

Küps miRNA sisestatakse Argonaut (Ago) perekonda kuuluvate valkude abil miRISC kompleksi (*miRNA-induced silencing complex*) (Diederichs ja Haber, 2007). Kui miRISC kompleks on moodustatud, inhibeeritakse valgu ekspressioon translatsiooni mahasurumise või mRNA degradatsiooni kaudu (Pasquinelli, 2012). Kuna viimasel ajal on selgunud, et mõlemad miRNA ahelad võivad olla funktsionaalsed, on uuemates miRNA andmebaasi versioonides loobutud *mature* ja *passenger* ahela eristamisest ning räägitakse pigem 5' (-5p) ja 3' (-3p) ahelast.

1.3 MiRNAde bioloogilised funktsioonid

Alates esimeste miRNAde *lin-4* ja *let-7* avastamisest *Caenorhabditis elegans*'is 1990. aastal (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993) on nüüdseks leitud üle 30000 küpse miRNA järjestuse 206 erinevas liigis (*miRBase*, v21, Juuni 2014) (Kozomara ja Griffiths-Jones, 2013). Arvutuslike ennustusmeetodite tulemuste põhjal moodustavad miRNA geenid umbes 1-5% inimese genoomist (Ando ja Leung, 2015), mis viitab sellele, et miRNAd osalevad paljudes bioloogilistes radades. Nad on võimelised reguleerima paljude geenide ekspressiooni nii otseselt kui ka kaudselt ja seeläbi mõjutavad nادرakkude differentseerumist, proliferatsiooni, migratsiooni ja apoptoosi (Dong *et al.*, 2014).

Palju on kogunenud ka andmeid miRNAde osaluse kohta vähi arengus. Mitmed uuringud näitavad, et miRNAde ekspressioon on koespetsiifiline, nad võivad olla bifunktsionaalsed ning nende normist kõrvalekalduv ekspressioonitase on iseloomulik erinevatele vähitüüpidele. Näiteks on *miR-128* tugevalt ülesreguleeritud osteosarkoomi koes, kuid ajukasvajates hoopis allareguleeritud. On ka leitud, et *miR-128* surub maha rakkude proliferatsiooni rakutsükli aresti kaudu soole ja eesnäärme kasvajates (Tian *et al.*, 2014). *MiR-26a* ekspressioon on maha surutud maksavähi rakkudes (Kota *et al.*, 2009), kuid ülesreguleeritud ajuvähis (Huse *et al.*, 2009).

Samuti mängivad miRNAd olulist rolli hulkraksete loomade arengus. Näiteks reguleerivad *lin-4* ja *let-7* *C.elegans*'i vastse arengut rakkude differentseerumise kaudu (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000) ning nende funktsiooni kadu (*loss-of-function*) viib arengu mahajäämusele (Lee *et al.*, 1993). *MiR-196* ja *miR-181*, mis reguleerivad *HOX* geenide ekspressiooni, on samuti seotud arenguliste protsessidega ning nende mahasurumine viib normaalse arengu häireteni (Yekta *et al.*, 2004; Naguibneva *et al.*, 2006).

Paljud miRNA-d osalevad immuunsüsteemi regulatsioonis ja on seotud leukeemia tekkega. Näiteks reguleerib *miR-17~92* klaster nii T-abistajarakkude (*T-helper cells*) kui ka B-rakkude arengut ja funktsioone (Raisch *et al.*, 2013). Selle klatri ülesregulatsioon põhjustab B-rakulist lümfoomi (Olive *et al.*, 2010), vähi hilisemates etappides ka angiogeneesi (Raisch *et al.*, 2013). Olulist rolli B-rakkude küpsemises mängib ka *miR-155*, mille üles- või allaregulatsioon on nähtav põletikulistes protsessides ja verevähis (Davidson-Moncada *et al.*, 2010).

1.4 MiRNAde kasutamine terapeutilistel eesmärkidel

Nagu eelpool mainitud, kaasnevad muutused miRNAde ekspressioonis paljude haigustega, millest suurema osa moodustavad erinevad vähkkasvajad (Zhang *et al.*, 2007). Enamus kasvajatest diagnoositakse hilistes staadiumites, mistõttu on nende ravi sageli kehva prognoosiga. Selleks, et tõsta ravi kvaliteeti, on vaja tuvastada uusi biomarkereid ja leida terapeutilisi sihtmärke ning üheks lahenduseks on võrrelda geeniekspressiooni profiili vähikudede ja normaalsete kudede vahel (Guan *et al.*, 2012). Tänu profileerimisuuringutele on võimalik tuvastada uusi potentsiaalseid miRNA sihtmärkgeene. Järgmise etapina saab kontrollida nende seost miRNAdega *in vitro* ja/või *in vivo* katsetes ning eristada üles- või allareguleeritud miRNAsid. Käimasolevate uuringute põhjal võib öelda, et on olemas suur huvi miRNAde kasutamise vastu biomarkeritena vähi diagnoosimises ja ravis. Kuna ühel miRNA-l võib olla mitu sihtmärki ja üks geen võib olla reguleeritud mitme miRNA poolt, pakuvad nad ka huvi teraapia arendamisel (Kasinski *et al.*, 2014).

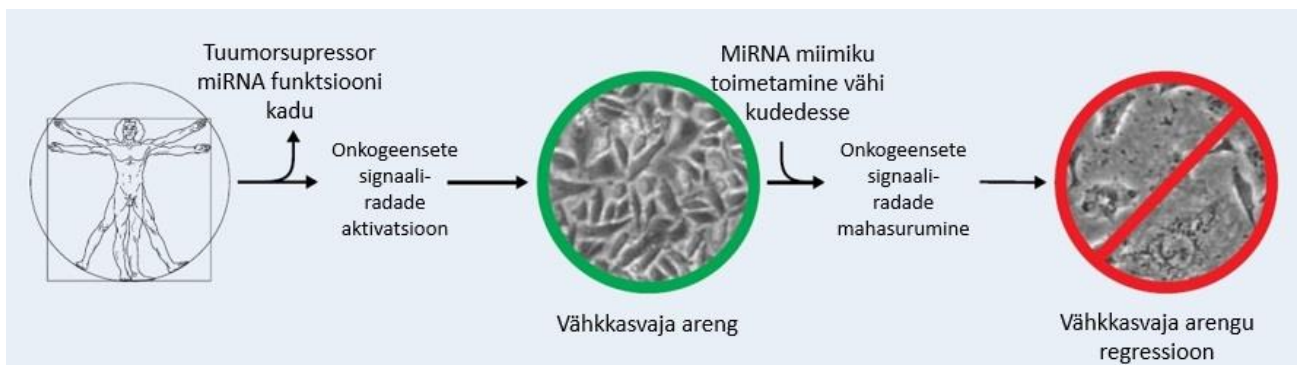
MiRNAde kasutamine terapeutilistel eesmärkidel hõlmab kahte võimalikku strateegiat. Üks nendest põhineb vähirakkudes allareguleeritud miRNAde funktsiooni taastamisel sünteetiliste miRNA oligonukleotiidide (ON) või miimikute abil, mille tulemusena taasaktiveeritakse vastavad signaalirajad (Wiggins *et al.*, 2010). Teine strateegia põhineb onkogeensete omadustega miRNAde toime blokeerimisel ja selle saavutamiseks surutakse ülesreguleeritud miRNAde ekspressioon maha keemiliselt modifitseeritud miRNA inhibiitorite ehk antagomiRide abil (Pramanik *et al.*, 2011). Mõlemad strateegiad on kirjeldatud allpool, nende eelised ja puudused on toodud välja tabelina (Tabel 1, lk 17).

1.5 MiRNA asendusteraapia

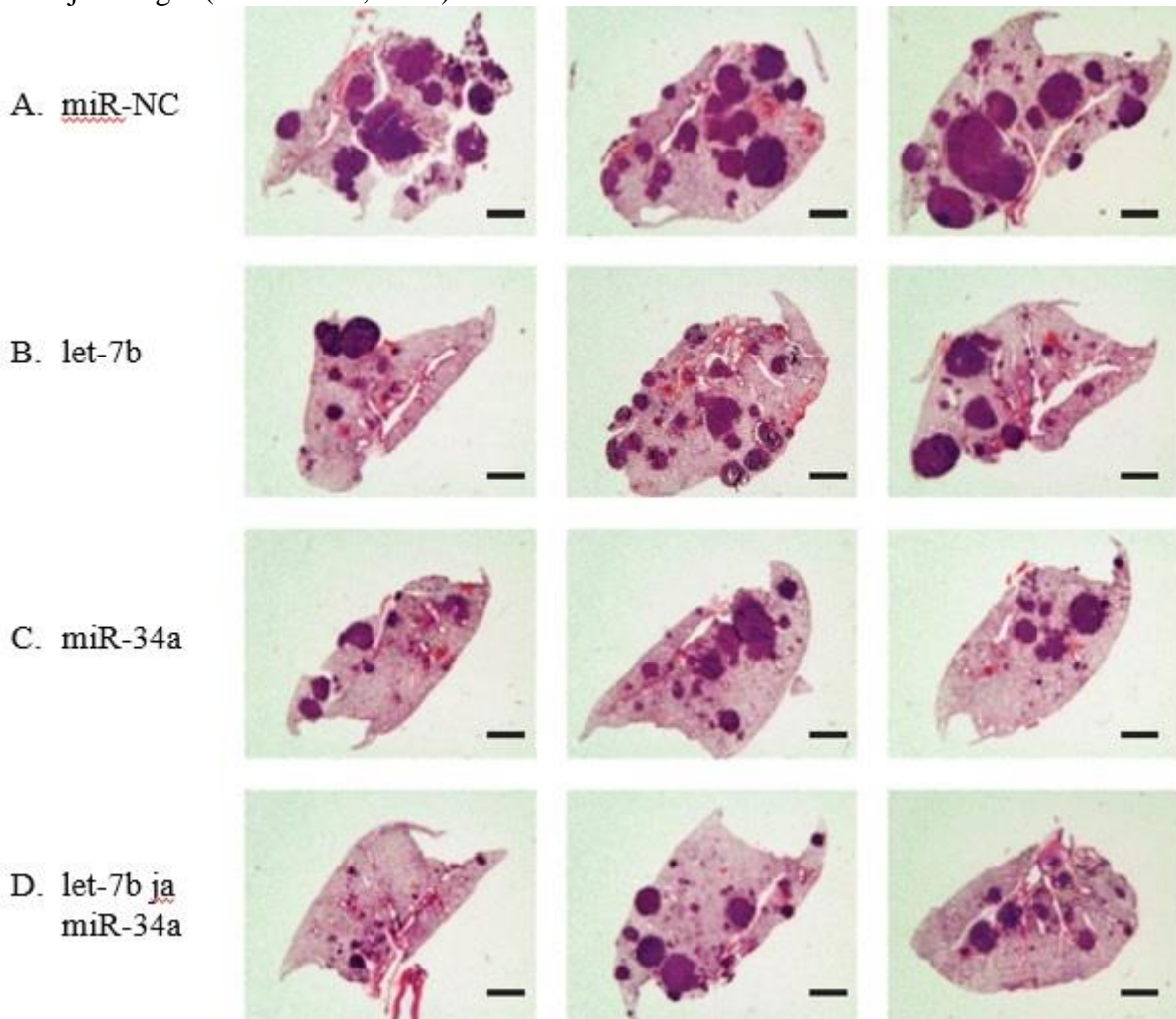
Termin „miRNA asendusteraapia“ tähistab haiges koes (vähkkasvajas) allareguleeritud miRNA asendamist sünteetilise miRNA miimikuga eesmärgiga inhibeerida tumorigeneesi (Joonis 2) (Bader *et al.*, 2010). Sellisel moel miRNA funktsiooni taastamisega võivad kaasnedä proapoptoetilised ja proliferatsioonivastased efektid (Pramanik *et al.*, 2011) ning kasvaja progressiooni inhibitsioon *in vivo* (Joonis 3) (Kasinski *et al.*, 2014).

Selleks, et saavutada tuumorsupressor miRNA funktsiooni, peavad miimikud olema võimelised sisenema RISC kompleksi ja avaldama mõju sihtmärk-mRNAle. On näidatud, et kaheahelalistel miRNA miimikutel on saja- kuni tuhandekordselt kõrgem võime siseneda RISC kompleksi võrreldes üheaahelaliste miimikutega (Bader *et al.*, 2011). *Guide* ahela järjestus on küpse miRNAga sarnane ning *passenger* ahel on talle komplementaarne. Lisaks miRNA miimikutele on hakatud asendusteraapias kasutama sünteetilisi miRNA prekursoritel põhinevaid molekule, mille pikkus varieerub mõnest üksikust lisanukleotiidist pri-miRNA täispikkuseni. Arvatakse, et sellised molekulid on võimelised sisenema RISC kompleksi kõrgema efektiivsusega võrreldes miRNA miimikutega, kuid nende toimetamine rakkudesse on keerulisem, sest normaalselt transkribeeritakse pri-miRNA rakutuumas (Terasawa *et al.*, 2011). Kuna miRNA prekursorid on kaheahelalised molekulid, peab nende disainimisel jälgima reeglit, et vähemalt üks ahel on endogeense pri-miRNA järjestusega sarnane.

Tänaseks on avastatud ja kirjeldatud palju tuumorsupressor miRNAsid, kuid nende abil *in vivo* asendusteraapia meetodite arendamine on alles algusjärgus. Siiski on mõned miRNAd, nagu näiteks *let-7* ja *miR-34a*, mille puhul uuritakse intensiivselt asendusteraapia võimalusi. Näiteks blokeerib *let-7* miimiku süstimine mitteväikerakulise kopsuvähi (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) hiire mudelis vähirakkude proliferatsiooni ja kasvaja progressiooni (Trang *et al.*, 2009). Seda võib seletada *let-7* toimega, kus ta surub maha *RAS* (*Rat sarcoma viral oncogene homolog*) perekonda kuuluvaid onkogeene ning seega põhjustab *let-7* ekspressioonitaseme langus *RAS* valkude ülesekspressiooni. Lisaks sellele surub *let-7* maha tsükliine cyclin D ja CDK6 (*cyclin-dependent kinase 6*) ja selle kaudu kontrollib rakkude normaalset paljunemist (Johnson *et al.*, 2005).



Joonis 2. MiRNA asendusteraapia. Tuumorsupressor miRNA allregulatsioon viib tumorigeneesini. MiRNA miimiku toimetamine vähirakkudesse surub maha onkogeensed signaalirajad ja inhibeerib kasvaja arengut (Bader *et al.*, 2010).



Joonis 3. Vähkkasvaja arengu inhibeerimine *in vivo*. Biopsiad NSCLC hiiremudeli kopsu vasaku sagara koest, värvitud hematoksüliin-eosiniga. Hiired olid eelnevalt transfekteeritud kas negatiivse miRNA miimikuga (miR-NC, A), *let-7b* (B), *miR-34a* (C) või mõlemate (*let-7b* ja *miR-34a*) miimikutega sabaveeni kaudu. On näha, et *let-7b* ja *miR-34a* miimikute süstimisel vähirakkude arv langeb ning kasvaja areng on inhibeeritud (kohandatud Kasinski *et al.*, 2014 järgi).

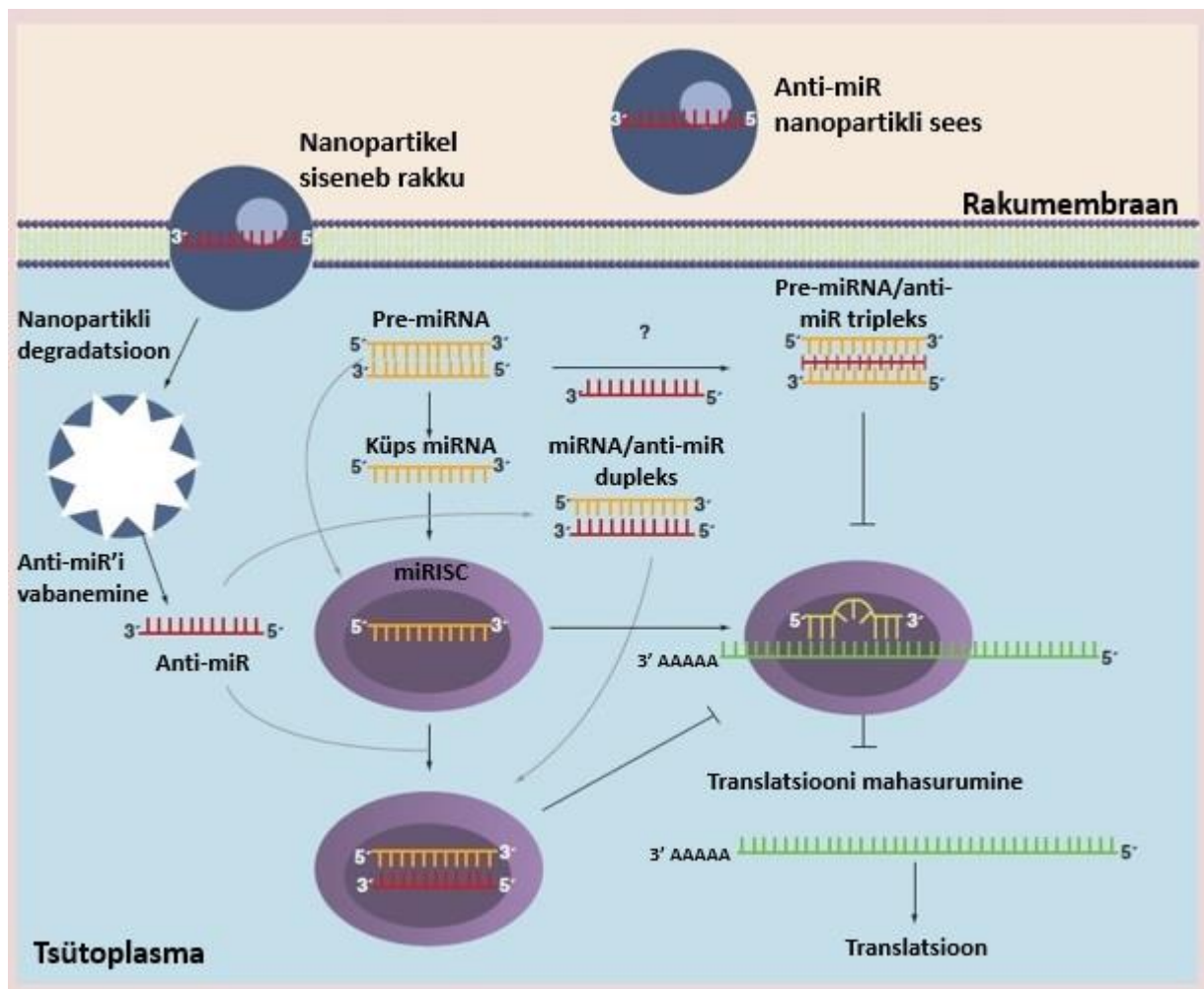
Teine lootustantev kandidaat asendusteraapias on *miR-34a*, mis on allareguleeritud aju- (Welch *et al.*, 2007), kopsu- (Wiggins *et al.*, 2010), rinna- (Kang *et al.*, 2015), maksa- (Zhao *et al.*, 2014), neeru- (Vogt *et al.*, 2011), kusepõie- (Vogt *et al.*, 2011), eesnäärme- (Fujita *et al.*, 2008), soole- (Lodygin *et al.*, 2008), emakakaela- (Li *et al.*, 2010), munasarjavähis (Vogt *et al.*, 2011) ja teistes vähitüüpides (Bang, 2012). Uuringud näitavad, et *miR-34a* miimiku mõju pidurdab kasvaja arengut *in vitro* ja *in vivo* (Agostini ja Knight, 2014) ning nende tulemuste põhjal alustas 2013. aasta mais firma miRNA Therapeutics MRX34 I faasi kliinilisi katsetamisi maksavähi patsientidel (Misso *et al.*, 2014). MRX34 tehnoloogia põhimõte seisneb liposoomi kapseldatud *miR-34a* miimiku viimisel vähirakkudesse firmas Marina Biotech välja töötatud tehnoloogia NOV340 SMARTICLE abil. NOV340 kujutab endast partiklit moodustava liposoomi diameetriga 120 nm, mida nimetatakse ka lipopleksiks. Liposoom sisaldab amfoteerseid lipiide, mis on katioonsed madala pH korral ning anioonsed neutraalse ja kõrgema pH korral. Lipopleksi moodustumine toimub happelistes tingimustes, et tagada lipiidide ja miimiku tõhusama kapseldamist. Bioloogilistes vedelikes, mille pH on 7-7,5, muutuvad nanopartiklid kergelt anioonseteks ega ole võimelised interakteeruma negatiivselt laetud rakumembraaniga endoteelis ja teistes kudedes. Kuna kasvajakoe on enamasti madalama pH tasemega, muutuvad NOV340 partiklid sinna jõudes katioonseteks ja seega kinnituvad vähirakkudele (Bader, 2012). Peale MRX34 tegeleb miRNA Therapeutics ka teiste miimikute rakkudesse viimise mehhanismide uurimisega. Praegu on katsetusjärgus 15 erinevat kandidaati¹.

Lisaks klassikalisele viisile, kus rakkudesse viiakse korraga üks miRNA miimik, on võimalik kasutada korraga ka kahte või rohkem erinevat miimikuid (näiteks, *miR-34a* ja *let-7b*) (Joonis 3) (Kasinski *et al.*, 2014; Rokavec *et al.*, 2014). On näidatud, et selline lähenemine võimaldab ravieffekti märkimisväärselt tõsta. MiRNA asendusteraapiat on proovitud kombineerida ka keemiliste ravimitega. Näiteks, NSCLC rakkude mõjutamine erlotinib'iga eraldi ei andnud positiivseid tulemusi, kuid *miR-34a* miimiku koostoimel oli näha, et tundlikkus ravimi vastu suurenes (Zhao *et al.*, 2014).

¹ <http://www.mirnarx.com/technology/mirna-intellectual-property.html>

1.6 MiRNAde aktiivsuse mahasurumine

Ülesreguleeritud miRNAde ekspressiooni on võimalik blokeerida anti-miRNA ONide (AMODE) abil (Zhang *et al.*, 2013). AMOD, tuntud ka kui miRNA antagonistid ehk antagomiRID, on sünteetilised antisense ONid, mis moodustavad miRNA kúpse ahelaga dupleksi ning seekaudu inaktiveerivad onkogeense miRNA (Joonis 4) (Lennox *et al.*, 2013). Arvatakse, et AMOD mõjutavad miRISC valkude ja miRNA omavahelisi interaktsioone ning selle tagajärjel endogeenne miRNA degradeeritakse (Bader *et al.*, 2010).

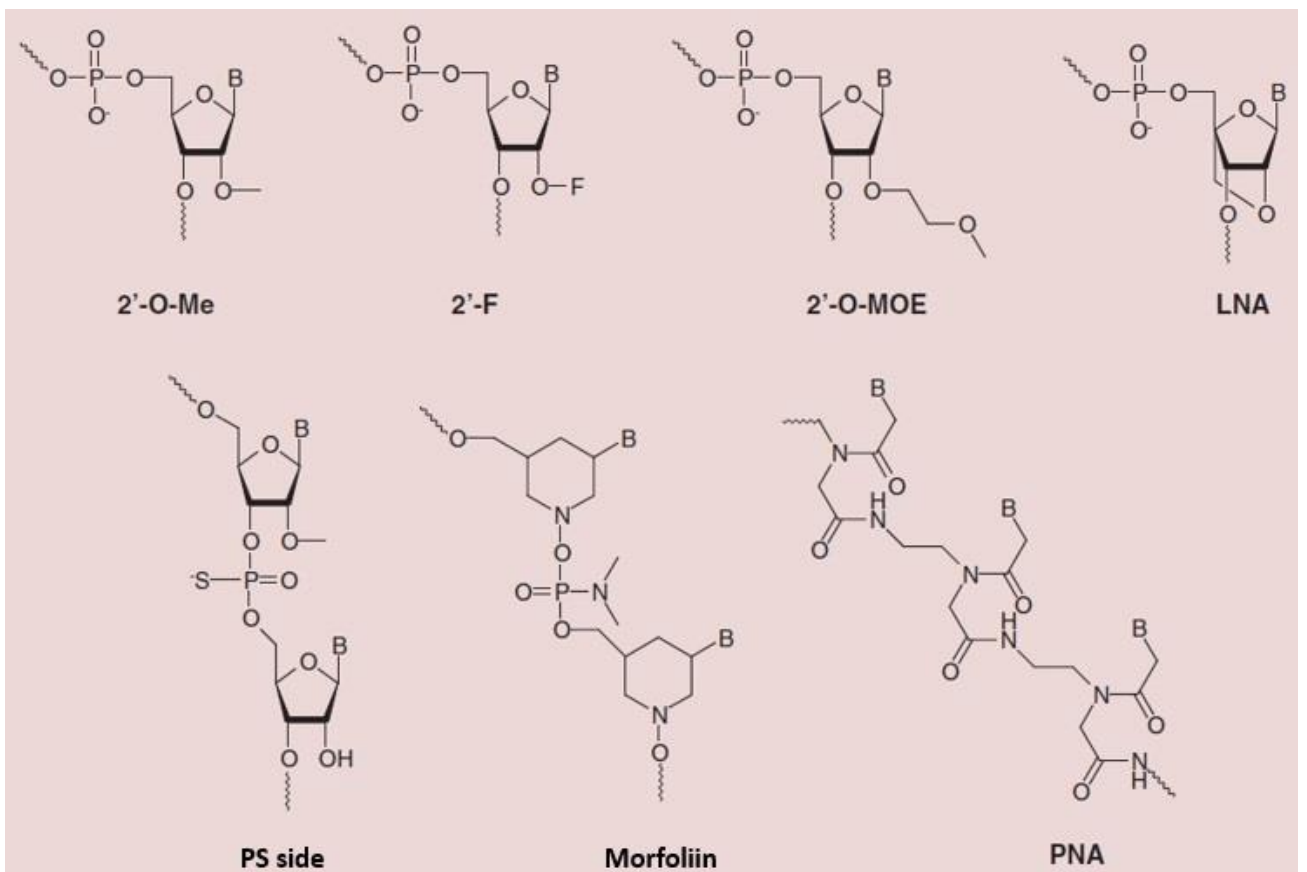


Joonis 4. Anti-miRNA vahendatud miRNA aktiivsuse mahasurumine. Anti-miRNA ehk AMO transporditakse rakkudesse nanopartiklite abil, mis läbivad rakumembraani otseselt või endotsütoosi teel. Seejärel toimub AMO vabanemine nanopartiklist valkude (näiteks fusioonvalkude) abil. AMO moodustab miRNAga komplementaarsuse alusel dupleksi, mille kaudu surub maha miRISC kompleksi funktsioneerimise. Selle tulemusena jätkub normaalne märklaud-mRNA ekspressioon (Baigude ja Rana, 2014).

Selleks, et saavutada efektiivset inaktivatsiooni, peab AMO ja miRNA interaktsiooni afiinsus olema tunduvalt kõrgem kui loomulik miRNA *guide* ja *passenger* ahelate interaktsioon. Ideaalne AMO peab olema kõrge afiinsusega sihtmärk-miRNA suhtes, ta on kaitstud ekso- ja endonukleaaside toime eest, ei põhjusta toksilisust ja on madala hinnaga. Lisaks peab AMO olema võimeline seonduma miRNaga sõltumata sellest, kas miRNA on ühe- või kaheaahelalises vormis või hoopis seotud Ago valkudega miRISC kompleksis. (Lennox *et al.*, 2013).

Kõrge afiinsus miRNA suhtes saavutatakse aluspaaride ja/või riboosi keemiliste modifikatsioonide abil (Joonis 5), mis lisaks kaitsevad AMO-d nukleaaside eest ja vähendavad kõrvalekaldeid (Bader *et al.*, 2010; Lennox *et al.*, 2013; Baigude ja Rana, 2014). Kõige sagedamini esinevate modifikatsioonide hulka kuuluvad riboosi 2' positsioonis tehtud muudatused nagu 2'-O-metüül (2'-O-Me), 2'-O-metoksümetüül (2'-O-MOE), 2'-fluor (2'-F) ja 2'-O,4'-C metüleensillaga LNA (*locked nucleic acid*), mida saab teha kõikides nukleotiidides kogu AMO järjestuse ulatuses (Baigude ja Rana, 2014). Siiski ei piisa riboosi 2' modifikatsioonidest, et kaitsta AMO-d eksonukleaaside toime eest. Lisaks asendatakse fosfodietersidemed fosforotioaat (PS) sidemetega (Lennox *et al.*, 2013), mis lisaks tõstavad AMO stabiilsust seerumis ega põhjusta olulist toksilisust (Baigude ja Rana, 2014).

Uuringud näitavad, et kõige efektiivsem anti-miRNA teraapia kandidaat on *miR-122* (Mendell ja Olson, 2012). *MiR-122* on kõrgelt ekspresseeritud maksas, kus ta reguleerib rasvhapete ja kolesterooli metabolismi, madal *miR-122* ekspressioonitase on tuvastatud hepatotsellulaarses kartsinoomis (HCC, *hepatocellular carcinoma*). On huvitav, et *miR-122* osaleb C-hepatiiti (HCV) põhjustava viiruse replikatsioonis. Firma Santaris Pharma arendas LNA-põhineva AMO antimiR-122, mida katsetas primaatidel. LNA-antimiR-122 süstimine loomudelitesse põhjustas kolesterooli taseme langust 30% võrra ja HCV replikatsiooni inhibitsiooni (Elmen *et al.*, 2008). Välja arendatud preparaat, millele anti nimeks miravirsen on jätkuvalt kliiniliste uuringute faasis (Ottosen *et al.*, 2014).



Joonis 5. AMOde keemilised modifikatsioonid. Riboosi 2' positsioonis tehtud muudatused tõstavad AMOde afiinsust miRNA suhtes, PS sidemed kaitsevad nukleaaside eest. Samuti on võimalik asendada riboos morfoliini või peptiidahelaga, mistõttu tõuseb AMO-miRNA dupleksi stabiilsus veelgi, kuid sellised modifikatsioonid võivad põhjustada kõrget toksilisust (Baigude ja Rana, 2014).

Tabel 1. MiRNAd kasutamine terapeutilistel eesmärkidel. Tabelis on toodud kahe strateegia eelised ja puudused.

	Eelised	Puudused
MiRNA miimikud	<p>Järjestuse poolest sarnased endogeensete miRNAdega ja seonduvad nende sihtmärk-miRNAdega (Bader <i>et al.</i>, 2010);</p> <p>On võimelised reguleerima mitmeid onkogeene korruga ja seega ka terveid signaaliradasid (Kasinski <i>et al.</i>, 2014);</p> <p>Väikesi molekule, saab rakkudesse toimetada erinevatel viisidel (Bader <i>et al.</i>, 2010)</p>	<p>Kergesti degradeeritavad endonukleaaside poolt (Mendell ja Olson, 2012);</p> <p>Mõju sihtmärkide ekspressioonile ei pruugi alati olla kõrge efektiivsusega (Bader <i>et al.</i>, 2010);</p> <p>Kaheaheelaliste miimikute <i>passenger</i> ahel võib toimida antimiRina ning blokeerida <i>guide</i> ahela sisenemist RISC kompleksi (Mendell ja Olson, 2012);</p> <p>Võivad põhjustada tsütotoksilisust ja immuunvastust (Zhang <i>et al.</i>, 2013)</p>
Anti-miRNA oligonukleotiidid	<p>Komplementaarsed endogeense miRNA <i>seed</i> regiooniga (Obad <i>et al.</i>, 2011);</p> <p>Sisenevad RISC kompleksi ja blokeerivad onkogeense miRNA toimet sihtmärk-miRNAle (Mendell ja Olson, 2012);</p>	<p>Kergesti degradeeritavad endonukleaaside poolt (Mendell ja Olson, 2012);</p> <p>Ei jõua alati sihtmärgini, sest väljutatakse organismist maksa ja/või neerude kaudu (Mendell ja Olson, 2012);</p> <p>Võivad põhjustada immuunvastust (Zhang <i>et al.</i>, 2013)</p>

1.7 MiRNAde rakkudesse toimetamise võimalused

Sünteetiliste miRNA ONide rakkudesse viimiseks kasutatakse erinevaid süsteeme (*delivery system*) (Tabel 2), mida pidevalt täiendatakse. Ideaalne süsteem peab olema stabiilne, efektiivne, tuumorspetsiifiline ja ohutu, mis tähendab, et ta ei põhjusta toksilisi efekte ja immuunvastust ning ON jõuab alati vajalikku koeni. (Misso *et al.*, 2014).

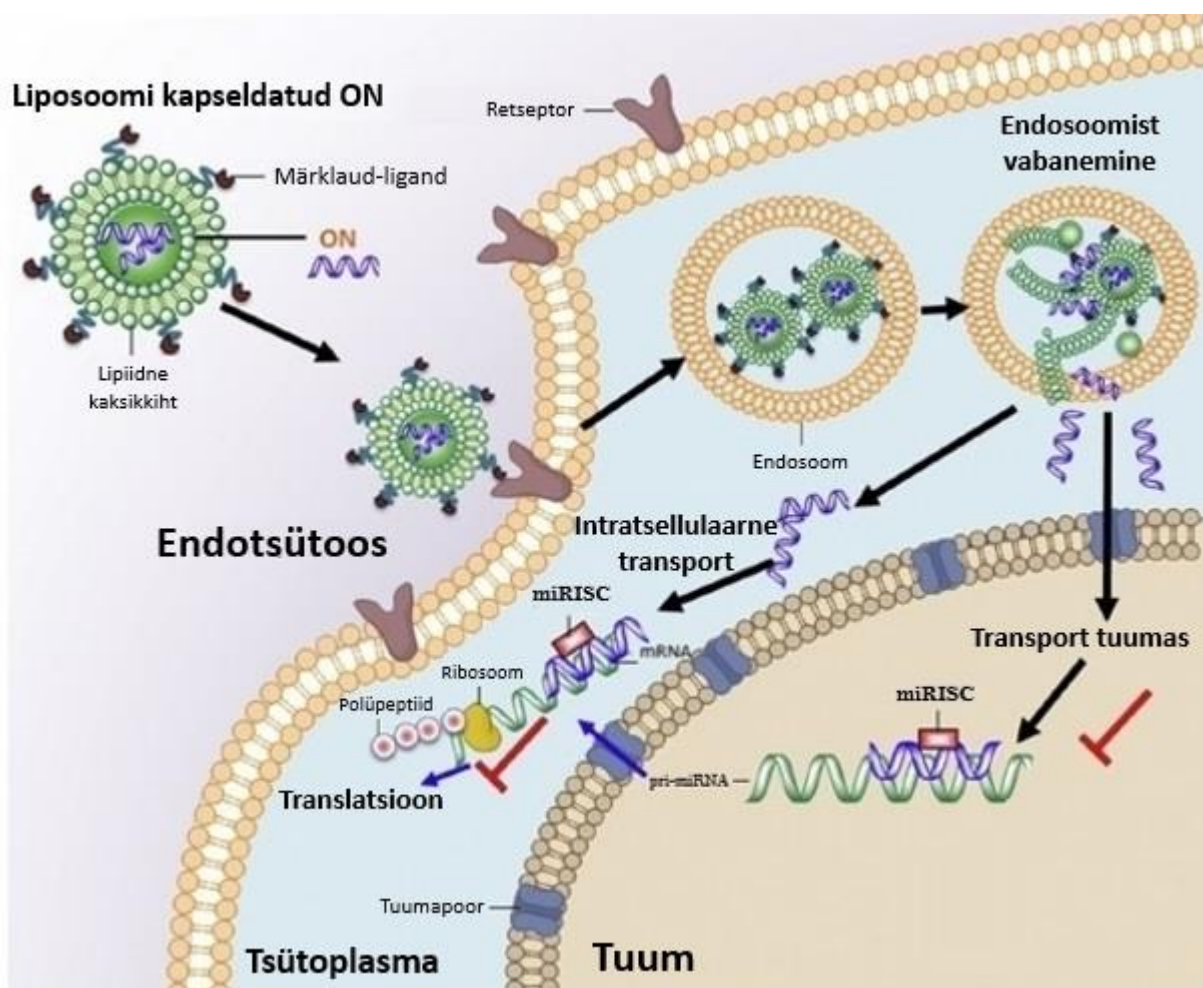
Paljad miRNA ONid (*naked oligonucleotides*) on võimalik viia otse vähkkasvajasse süstimise või viirusvektorite abil (Trang *et al.*, 2011). Klassikaliste geeniteraapia meetodite kõrvale on tekkinud ka sünteetilistel materjalidel põhinevad kandjad. Oma iseloomult on sünteetilised materjalid katioonsed, seepärast on neil võime siduda negatiivselt laetud miRNAsid tänu elektrostaatilistele interaktsioonidele, moodustades nanopartikleid (Zhang *et al.*, 2013; Misso *et al.*, 2014). Võrreldes viirusvektoritega, on nende tootmine lihtsam ja nende molekulaarset koostist saab kontrollida erinevate modifikatsioonide abil. Samuti on neil madalam immunogeensus ja kõrgem ravimi kandevõime (Park *et al.*, 2006). Siiski ei ole sünteetiliste materjalide efektiivsus *in vivo* piisavalt kõrge, kuid seda piirangut on püütud kõrvaldada muutes partikli suurust ja pinnaomadusi (Zhang *et al.*, 2013).

Lipiidsed nanokandjad (LNK) on enim uuritud ja katsetatud orgaaniline vektorsüsteem miRNAde transportimiseks *in vitro* ja *in vivo*. LNK põhimõte seisneb miRNA kapseldamises liposoomi, mis tavaliselt koosneb katioonsetest lipiidest (Zhang *et al.*, 2013). Liposoom võib koosneda ka neutraalsetest (Wang *et al.*, 2015), anioonsetest (Guo ja Lee, 2000) või amfoteersetest (NOV340) (Bader, 2012) lipiididest. MiRNA kapseldamise käigus moodustuvad kolloidsed nanopartiklid, mida nimetatakse lipopleksideks (*lipoplex*) (Zhang *et al.*, 2013). Nad sisenevad rakku endotsütoosi teel, mille järel toimub miRNA vabanemine endosomaalsest vesiikulist tsütoplasmasse ja mRNA funktsiooni blokeerimine (Joonis 6) (Wang *et al.*, 2015). Üldkasutatavate LNK hulka kuuluvad kommertsiaalsed reagentid nagu siPORT NeoFX² ja Lipofectamine®³. Kahjuks esinevad LNKdel mõned piirangud. Lipopleksid võivad seerumis agregeeruda tänu interaktsioonidele seerumivalkudega, seega nõuab nende kasutamine *in vitro* rakukultuurides seerumivaba keskkonda. Lisaks esinevad sageli tsütotoksilised efektid ja soovimatu immunogeensus (Zhang *et al.*, 2013). Hiljuti on pakutud nende piirangute kõrvaldamiseks stabiilseid nukleiinhappeid kandvaid lipiidseid partikleid (SNALP, *stable nucleic acid lipid particles*). SNALPid koosnevad ioniseeritud lipiididest,

² http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_056634.pdf

³ <https://www.lifetechnologies.com/ee/en/home/brands/product-brand/lipofectamine.html>

mis on protoneeritud vormis ja seovad negatiivselt laetud miRNAsid. See tõstab partiklite stabiilsust seerumis tänu laengute neutraliseerimisele. SNALPe kasutati edukalt *miR-34a* transportimiseks medulloblastoomi ja hulgrimüeloomi (*multiple myeloma*) rakkudesse *in vitro* (Di Martino *et al.*, 2014). Lisaks lipiidsetele vektorsüsteemidele on laialt kasutusel polümeeridel põhinevad kandjad. Nende põhiesindaja on polüetüleenimiin (PEI, *polyethylenimine*), mille protoneeritud kujul olevad aminorühmad võimaldavad siduda enda külge negatiivseid miRNAsid. PEI ja miRNAd moodustavad omavahel komplekse, mida nimetatakse polüpleksideks (Zhang *et al.*, 2013), kuid võrreldes lipopleksidega ei ole polüpleksid võimelised vabastama miRNAd tsütoplasmasse ilma endosoomi lüüsvate komponentideta (Tros de Ilarduya *et al.*, 2010). Kahjuks pole neid mehhanisme siiani piisavalt kirjeldatud (Adil *et al.*, 2014).



Joonis 6. MiRNA viimine raku lipiidse nanopartikli abil. Kahekihilistesse liposoomidesse kapseldatud miRNA ONid sisenevad rakkudesse endotsütoosi teel. Seejärel toimub endosoomist vabanemine ja sihtmärk-mRNA post-transkriptsiooniline inhibeerimine miRISC kompleksi kaudu. MiRNA prekursoritega seundumiseks on vaja täiendavaid modifikatsioone, mis võimaldaksid ONide liikumist tsütoplasmast tuuma (kohandatud Wang *et al.*, 2015 järgi).

Tabel 2. Üldkasutatavad nanokandjad miRNAde transportimisel

Materjal	Haigus	Sihtmärk-miRNA	Mehhanism	Viide
Paljad ON	Metabolismi häired	<i>miR-122</i>	Inhibeerimine	Lanford <i>et al.</i> , 2010
Aptamer-ON	Munasarjavähk	<i>let-7i</i>	Asendus	Liu <i>et al.</i> , 2012
LNK: siPORT NOV340 SNALP	NSCLC Maksavähk Medulloblastoom, hulgimüeloom	<i>miR-34a</i> <i>miR-34a</i> <i>miR-34a</i>	Asendus Asendus Asendus	Wu <i>et al.</i> , 2011 Bader, 2012 Di Martino <i>et al.</i> , 2014
Polümeerid: PEI	Käärsoolevähk	<i>miR-145</i> , <i>miR-33a</i>	Asendus	Ibrahim <i>et al.</i> , 2011
PLGA	B-rakkude lümfoom	<i>miR-155</i>	Asendus	Babar <i>et al.</i> , 2012
Dendrimeerid: PAMAM	Glioblastoom	<i>miR-21</i>	Inhibeerimine	Ren <i>et al.</i> , 2010
Looduslikud polümeerid: Atellokollageen	Soolevähk Lümfoom Eesnäärmevähk	<i>miR-34a</i> <i>miR-135b</i> <i>miR-16</i>	Asendus Inhibeerimine Asendus	Tazawa <i>et al.</i> , 2007 Matsuyama <i>et al.</i> , 2011 Takeshita <i>et al.</i> , 2010
Anorgaanilised kandjad: Kullapartiklid Ränipartiklid	Hulgimüeloom Neuroblastoom	<i>miR-130b</i> <i>miR-34a</i>	Inhibeerimine Asendus	Crew <i>et al.</i> , 2012 Tivnan <i>et al.</i> , 2012

Polümeersete nanokandjate hulka kuuluvad ka hargneva iseloomuga polüamidoamiini (PAMAM, *polyamidoamine*) molekulid (Zhang *et al.*, 2013). Nende südamikus paiknevad tavaliselt ammoonium (NH_3) või etüleendiamiin (EDA), mis annavad PAMAMile positiivset laengut ning lisaks võimaldavad miRNAde vabanemist endosoomist tänu oma puhverdusvõimele (Wu *et al.*, 2013). PAMAMi kasutati edukalt anti-*miR-21* ja 5-fluorouratsiili (5-FU) viimiseks U251 glioblastoomi rakkudesse, mille tulemusena käivitus vähirakkude apoptoos (Ren *et al.*, 2010). Rakkude transfekterimiseks kasutatakse PAMAMi erinevaid modifikatsioone ning kommertsiaalselt saadavaid dendrimeeridel põhinevad *kit'*e nagu PolyFect ja SuperFect (Wu *et al.*, 2013).

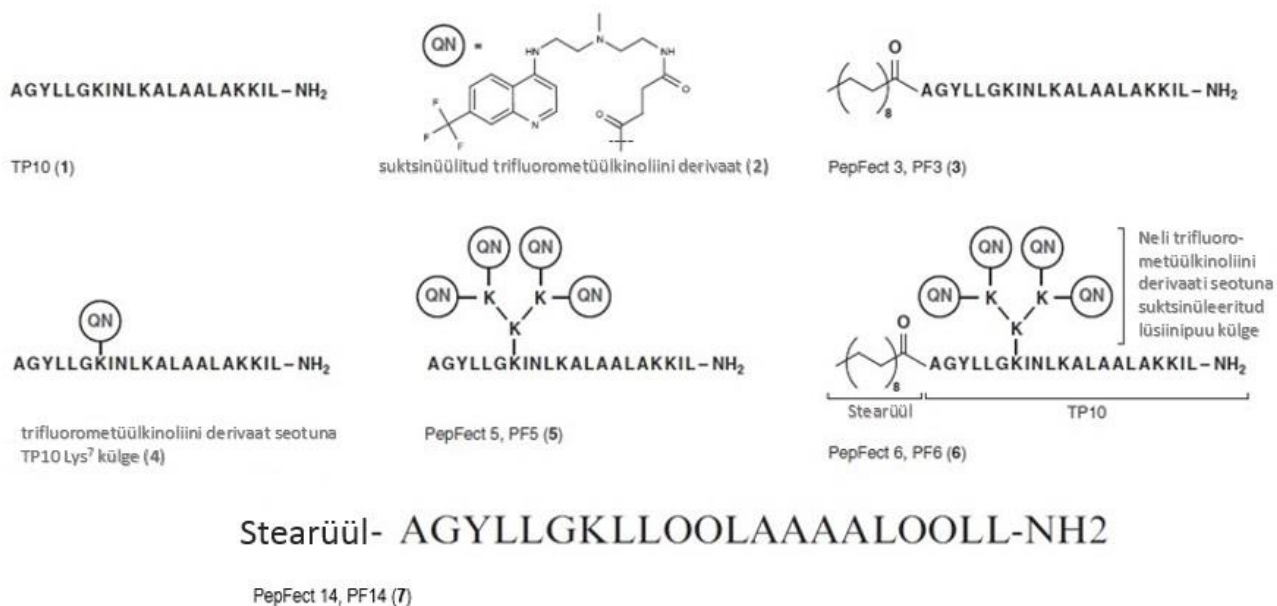
Oluline läbimurre miRNAde transportimisel saavutati polülaktiid-ko-glükoliidide (PLGA, *polylactide-co-glycolide*) kasutuselevõttuga (Zhang *et al.*, 2013). PLGAd kuuluvad vees mittelahustuvate polümeeride hulka, mis on sarnaselt teistele polümeersetele nanokandjatele katioonsed (Uchegbu, 2006). PLGAde suurim eelis on see, et nad võimaldavad miRNAde vabanemist endosoomist teatud aja möödudes, mis tõstab oluliselt partikli vajaliku koeni jõudmise tõenäosust. Samas võivad PLGAd siduda mitu erinevat oligonukleotiidi korraga ning neid on lihtne modifitseerida (Zhang *et al.*, 2013).

Lisaks sünteetilistele polümeersetele nanokandjatele kasutatakse miRNA transportimisel ka looduslike polümeere nagu kitosaan, protamiin, atelokollageen ja valkude translokatsiooni domäänidest pärit peptiidid (Dang ja Leong, 2006). Sarnaselt teistele nanokandjatele on looduslikud polümeerid katioonsed, järelikult moodustavad nad negatiivselt laetud miRNAdega nanopartikleid. Kahjuks on nende oluliseks puuduseks soovimatu immunogeensus (Zhang *et al.*, 2013).

On näidatud, et mitmed anorgaanilised ühendid moodustavad miRNAdega nanopartikleid. Nii näiteks kinnitati *miR-130b* kulla partiklitele oligoetüleenglükoolitooli kaasabil ja transfekteriti hulgmüeloomi rakkudesse ilma toksiliste kõrvalnähtudeta (Crew *et al.*, 2012). Nende seas on ka uudsed ränipartiklid (*silica-based particles*), mis on oluliselt odavamad ja madalama toksilisusega kui orgaanilised kandjad (Bitar *et al.*, 2012).

Hiljuti on hakatud terapeutilistel eesmärkidel kasutama rakku sisenevaid peptiide (RSP, CPP, *cell-penetrating peptides*) mis suudavad toksilisust põhjustamata viia rakkudesse erinevaid bioloogilisi ühendeid, sealhulgas nukleiinhappeid (Andaloussi *et al.*, 2011; Ezzat *et al.*, 2011). RSPd on amfipaatsed, tavaliselt kuni 40 aminohapet pikad molekulid, mis sisenevad rakkudesse enamasti endotsütoosi teel (Ezzat *et al.*, 2011). Nende eeliseks on see, et bioloogilise vastuse saamiseks pole vaja suurt ON kontsentratsiooni (Ezzat *et al.*, 2011), kuid sarnaselt eelpool mainitud kandjatega on põhiliseks piiravaks teguriks madala efektiivsusega endosomaalsetest vesiikulitest vabanemine, mis

viib enamuse RSP ja transportitavate molekulide lagundamiseni lüsoosoomides. Seda püütakse vältida olemasolevatele peptiididele (tavaliselt transportan 10, TP10) keemiliste modifikatsioonide lisamisega (Joonis 7), mis lisaks endosomaalsele vabanemisele tõstavad ka RSPde aktiivsust seerumis (Andaloussi *et al.*, 2011; Ezzat *et al.*, 2011). On teada, et klorokiini (CQ) lisamine seitsmenda lüsiinjäägile (Lys⁷) parandab endosomaalset vabanemist, steariinhappe lisamine TP10 N-terminaalsele otsale tõstab RSPde aktiivsust seerumis (Andaloussi *et al.*, 2011), lüsiini- ja isoleutsiinijääkide asendamine TP10 ahelas ornitiini- ja leutsiinijääkidega kaitseb RSPsid seerumi proteaaside toime eest (Ezzat *et al.*, 2011), klorokiini derivaadi 4-kloro-7-(trifluorometüül)kinoliini (QN) lisamine Lys⁷ külge suksinüülhappe kaudu tõstab RSPde biosaadavust rakudes (Andaloussi *et al.*, 2011). Need modifikatsioonid viisid uudsete peptiidide PepFect 6 ja PepFect 14 kasutuselevõtuni. Katsed on näidanud, et nende näol on tegemist efektiivsete transfektsioonireagentidega geneetilise materjali transportimiseks erinevatesse rakkuliinidesse (Andaloussi *et al.*, 2011; Ezzat *et al.*, 2011). Käesolevas töös kasutatakse miRNAde transportimiseks rakkudesse lipofektsioonireagenti siPORT NeoFX ja kaks TP10 põhjal arendatud RSP modifikatsiooni PepFect 6 ja PepFect14.



Joonis 7. RSPde keemiliste modifikatsioonide struktuur PepFect 6 ja PepFect14 näitel. (1) Üks esimeseid RSPsid – TP10. (2) suksinüülitud trifluorometüülkinoliini derivaat – QN. (3) PepFect 3 saadakse steariinhape lisamisega TP10 N-terminaalsesse otsa. (4) trifluorometüülkinoliini derivaat seotuna TP10 Lys⁷ külge. (5) PepFect 5 saadakse nelja QN molekuli kinnitamise kaudu nn lüsiinipuu külge. (6) PepFect 6 struktuuris on N-terminaalsele otsale lisatud veel steariinhapejääk – stearüül. (7) PepFect 14 struktuuris on lüsiini- ja isoleutsiinijäägid asendatud ornitiini- ja leutsiinijääkidega (kohandatud Andaloussi *et al.*, 2011 ja Ezzat *et al.*, 2011 järgi).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli võrrelda kahe transfektsioonisüsteemi (peptiidkandjad ja lipofektsioonireagent) sobivust *miR-34a* asendusravi arendamisel ning leida *miR-34a* uued potentsiaalsed sihtmärgid A549 ja PPC-1 rakuliinis.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud rakuliinid, söötmed ja lahused

Katsetes kasutati inimese kopsu adenokartsinoomist pärinevat rakuliini A549 ja eesnäärmevähi rakuliini PPC-1 (*primary prostatic carcinoma*). Rakke kasvatati 10 cm koekultuuri tassidel SANYO inkubaatoris DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) söötmes, millele oli lisatud 10% veise loote seerumit (FBS, *fetal bovine serum*) ja 2% penitsilliini ja streptomütsiini lahust (PAA Cell Culture Company) (T=37°C, CO₂ 5%, O₂ 20%).

Rakkude paljundamiseks aspireeriti sööde, lisati 1,5 ml 0,1% trüpsiini lahust ja inkubeeriti termostaadis pool minutit. Seejärel lisati 3,5 ml söödet trüpsiini inhibeerimiseks, rakud suspendeeriti ja kanti ~10 korda lahjendatult uuele tassile.

Rakkude transfektsiooni katsetes kasutati 20 µM *miR-34a* miimiku ja 1 mM RSPde *stock* lahuseid. Rakud värviti Rathmell Lab protokollil põhjal⁴ ja selleks kasutati tabelis 3 toodud lahuseid ja nende lahjendusi.

⁴ <http://www.unc.edu/~rathmell/protocols.html> (Actin Staining (Phalloidin): Immunofluorescence)

Tabel 3. Rakkude värvimiseks kasutatud lahused ja nende lahjendused. Kõik lahused lahjendati PBS puhvris (*phosphate buffered saline*) (Lonza).

Algne lahus	Lahjendus või lõppkonsentratsioon
37% paraformaldehüüd (PFA) (Applichem)	4%
10% Triton X-100 (Rohm & Haas Co)	0,5%
1 mg/ml Alexa Fluor® 488 (A488) phalloidin (Invitrogen)	1:125, oli konjugeeritud phalloidiiniga
5 mg/ml 4',6-diamidino-2-fenüülindool dihidrokloriid (DAPI) (Roche)	1:4000
<i>Mounting Dye – EverBrite</i> (Biotium) ⁵	-

2.2.2 Rakukultuuride transfektsioon

Rakkude transfekterimiseks kasutati peptiidkandjaid (RSPd) PepFect 6 (PF6) ja PepFect 14 (PF14), siPORT™ NeoFX™ lipofektsioonireagenti (Invitrogen), ja miRIDIAN™ miRNA miimikuid: *miR-34a* miimik, *C. elegans*'i *cel-miR-67* negatiivne kontroll-miimik ja fluorestsentsmärgisega *cel-miR-67-Dy547* miimik.

Transfektsiooniks kasvatati rakke 24 tundi 12-kannulisel koekultuuri plaadil kolmes korduses. Transfektsiooni kontrolliks kasutati lisaks *cel-miR-67* negatiivsele kontroll-miimikule ka fluorestsentsmärgisega *cel-miR-67-Dy547* miimikut. Optimaalne rakkude arv kannu kohta oli ~20000 rakku. Rakkude arvutamiseks segati kokku spetsiaalsel alusel 10 µl rakususpensiooni ja 10 µl trüpaansinist ning kasutati TC20™ automaatloendajat (Bio-Rad). Ühe kannu lõppmaht oli 1 ml, millest 38 µl moodustas rakususpensioon ja 962 µl DMEM.

Miimikud segati PF6 ja PF14ga mittekovalentsete peptiidkomplekside moodustamiseks kolmes paralleelis DMEMis lõppruumalani 1 ml.

Ühe paralleeli kohta kasutati järgmiseid lahuste koguseid:

0,75 µl miRNA miimik (20 µM) + 4,25 µl PF6 + 45 µl MQ vesi + DMEM (lõppruumalani);

0,75 µl miRNA miimik (20 µM) + 2,56 µl PF14 + 46,69 µl MQ vesi + DMEM.

⁵ <https://biotium.com/product/everbrite-hardset-mounting-medium/>

Peptiidkompleksite moodustumiseks inkubeeriti lahuseid 1 tund toatemperatuuril ja seejärel tilgutati lahus 12-kannulisele koekultuuri plaadile kolmes korduses ning inkubeeriti 48 tundi 37°C juures. *Cel-miR-67-Dy547* miimiku inkubeerimise kestuseks oli 4 tundi 37°C juures.

Lipoplekside moodustamiseks lahjendati 3 µl siPORT NeoFX transfektsioonireagenti 50 µl Opti-MEM® söötmes ja inkubeeriti toatemperatuuril 10 min. Seejärel lahjendati 3 µl (20 µM) *miR-34a* miimikut 50 µl Opti-MEMis ja segati siPORT-Opti-MEM lahusega ning inkubeeriti 10 min. Samamoodi lahjendati ka *cel-miR-67* negatiivne kontroll-miimik ja *cel-miR-67-Dy547* miimik. Saadud lipopleksid tilgutati 12-kannulisele koekultuuri plaadile kolmes korduses. Ühe reaktsiooni lõppruumala oli 1 ml ja miimiku lõppkonsentratsioon 30 nM. Inkubeerimise kestuseks oli 48 tundi ja 4 tundi *cel-miR-67-Dy547* miimiku jaoks 37°C juures.

Iga rakuliini kohta olid ühes transfektsioonikatses järgmised katsepunktid:

- 3 kannu: *miR-34a* miimiku ja PF6ga transfekteeeritud rakud,
- 3 kannu: *miR-34a* miimiku ja PF14ga transfekteeeritud rakud,
- 3 kannu: *miR-34a* miimiku ja siPORTiga transfekteeeritud rakud,
- 3 kannu: *cel-miR-67* ja PF6ga transfekteeeritud rakud,
- 3 kannu: *cel-miR-67* ja PF14ga transfekteeeritud rakud,
- 3 kannu: *cel-miR-67* ja siPORTiga transfekteeeritud rakud,
- 3 kannu: *cel-miR-67-Dy547* ja PF6ga transfekteeeritud rakud,
- 3 kannu: *cel-miR-67-Dy547* ja PF14ga transfekteeeritud rakud,
- 3 kannu: *cel-miR-67-Dy547* ja siPORTiga transfekteeeritud rakud,
- 3 kannu: transfekteeerimata rakud,
- 3 kannu: transfekteeerimata rakud, värvitud A488 ja DAPIga

2.2.3 Rakkude fluorestsentsvärvimine ja visualiseerimine

12-kannulisel koekultuuri plaadil 24 tundi kasvanud rakke pesti kaks korda 500 µl 1X PBSga ning fikseeriti 30 min lisades 500 µl 4% PFA-d. Pärast fikseerimist pesti rakke üks kord 1X PBSga ning inkubeeriti 10 min lisades 500 µl 0,5% Triton X-100. Seejärel pesti kaks korda 1X PBSga ja inkubeeriti 10 min lisades 30 µl A488 konjugeeritud phalloidiiniga. Pärast seda pesti rakke kaks korda 1X PBSga ja inkubeeriti 10 min lisades 50 µl 40X DAPI. Seejärel pesti rakke kaks korda 1X PBSga ja sulundati klaasile lisades 20 µl *EverBrite* lahust.

Edaspidi vaadeldi rakke fluorestsentsmikroskoobis ning visualiseeriti Imaris tarkvara abil.

2.2.4 RNA eraldamine

Totaalse RNA eraldamiseks kasutati *miRNeasy Mini kit*'i (QIAGEN). RNA eraldamine toimus tootja protokoll järgi. Rakud lüüsi QIAzol® lüüsireagentiga. Selleks lisati igasse kannu 700 µl QIAzol'i, inkubeeriti toatemperatuuril 5 min ning tõsteti lüüsitud rakud uude tuubi. Igasse tuubi lisati 140 µl kloroformi, raputati 15 sek, inkubeeriti toatemperatuuril 2 min ja tsentrifugeeriti (12000 x g, 15 min 4 °C). Ülemine vedeliku faas tõsteti uude tuubi, lisati 525 µl 96% etanooli ja segati hoolikalt. Seejärel tõsteti 700 µl proovi *RNeasyMini spin* kolonni ja tsentrifugeeriti (8000 x g, 15 sek). Kolonni lisati 700 µl RWT puhvrit ning tsentrifugeeriti 8000 x g juures 15 sek. Siis lisati 500 µl RPE puhvrit ning tsentrifugeeriti uuesti (8000 x g). Seda etappi korrati 2 korda: esimene kord tsentrifugeeriti 15 sek ja teine kord 2 min. Seejärel tõsteti kolonnid uuesse tuubi ja kuivatati proovid tsentrifugeerides neid 13000 x g juures 1 min. RNA elueeriti 50 µl MQ veega tsentrifugeerides 8000 x g juures 1 min. Eraldatud totaalne RNA säilitati 1,5 ml tuubides -80°C juures.

2.2.5 RNA kontsentratsiooni ja kvaliteedi mõõtmine

Totaalse RNA kontsentratsiooni mõõdeti Nanodrop-1000 (Thermo Scientific) spektrofotomeetriga. Mõõtmiseks võeti 1 µl vees lahustatud totaalset RNAd. Transfekteeritud rakukultuuri RNAd keskmine kontsentratsioon oli 35,1 ng/µl.

RNA kvaliteeti kontrolliti Agilent 2200 TapeStation süsteemiga. Transfekteeritud rakukultuuri RNA terviklikkuse väärtused (RIN, *RNA integrity number*) jäid vahemikku 5,5-7,2.

2.2.6 RNA mikrokiibi analüüs

PF14 ja siPORT NeoFX abil transfekteeritud PPC-1 rakkude ekspresiooniprofiile uuriti IlluminaHT-12 kiibi abil. Kiibikatses kasutati *miR-34a* ja negatiivset kontrollmiimikut. Iga katsepunkt oli esindatud kolme bioloogilise kordusena. Kvaliteedikontrolli läbinud RNAd (RIN>6,5) ekspresioonianalüüs viidi läbi TÜ EGV tuumiklaboris vastavalt tootja (Illumina) protokollile. Antisense RNA sünteesimiseks kasutati Illumina® *TotalPrep™ Amplification kit*'i (Ambion, USA) ning algmaterjalina 200 ng RNAd, mis amplifitseeriti ja biotinüleeriti vastavalt tootja protokollile.

Kiibid skaneeriti HiScanSQ skanneriga ning töötlemata signaalid eksporditi Illumina Genome Studio'sse™ (Illumina, USA).

2.2.6.1 Ekspressiooniandmete töötlus, normaliseerimine ja statistiline analüüs

Esmane andmete töötlemine toimus programmiga Genome Studio™ (Illumina). Et vähendada mitte-bioloogilistest faktoritest tulenevat variatsiooni, ekspressiooniandmed kvantiil-normaliseeriti. Kokku olid kiibil andmed 34 693 geeni kohta. Andmete edasine analüüs toimus R tarkvara (R Language and Environment for Statistical Computing 3.0.3) abil. Esiteks filtreeriti välja liiga madala (ebausaldusväärse) ekspressioonitasemega geenid (signaali detekteerimise p-väärtus>0,05). Selle tulemusena jäi edasisse analüüsi 12602 geeni PF14 ja 12618 geeni siPORT'iga tehtud katsetes. Ekspressiooni väärtused viidi logaritmilisele skaalale ja tsentreeriti, teisendades andmed keskväärtuste lähedale. *MiR-34a* miimiku toimel muutunud ekspressiooniga geenid tuvastati t-testi abil kasutades Bioconductor Limma paketti.

2.2.7 MiR-34a transfektsiooni kontroll

2.2.7.1 cDNA süntees

Proovidest eraldatud totaalse RNA põhjal sünteesiti cDNA *First Strand Synthesis Kit*'i (Thermo Scientific) ja komertsiaalsete TaqMan miRNA praimerite abil vastavalt tootja protokollile (Applied Biosystems) (Tabel 4). Paralleelselt viidi läbi RT- kontrollreaktsioon, kuhu ei lisatud revertaasi. Kõik reaktsioonid inkubeeriti kõigepealt 30 min 16°C, siis 30 min 42°C, seejärel 5 min 85°C ja säilitati 4°C juures (Tabel 5). Reaktsiooni lõppruumalaks oli 10 µl, millest 1 µl moodustas RNA.

Tabel 4. cDNA sünteesi reaktsiooni segu

Reagent	Maht (µl)
5X reaktsiooni puhver 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT	2
RiboLock Rnaasi inhibiitor (20 U/µl)	0,5
10 mM dNTP mix	1
M-MuLV pöördtranskriptaas (20 U/µl)	1
RT praimer	1
RNA	1
MQ vesi	3,5
Kogumaht	10

Tabel 5. cDNA sünteesi reaktsiooni programm

Temperatuur (°C)	Aeg (min)
16	30
42	30
85	5
4	∞

2.2.7.2 Kvantitatiivne reaala-aja PCR (qRT-PCR)

MiR-34a miimiku ekspressiooni mõõtmiseks kasutati kvantitatiivset reaala-aja PCRi masinat (ABI Prism 7900HT, Applied Biosystems) ja kommertsiaalseid TaqMan miRNA sonde: *miR-34a*, *let-7a* ja *RNU48* (Applied Biosystems) ning universaalset qPCR reaktsiooni segu (Solis BioDyne) (Tabel 4). Negatiivse kontrollreaktsioonina (NTC) kasutati ilma cDNAta reaktsioonisegu potentsiaalse saastuse tuvastamiseks. Kõik reaktsioonid tehti kolmes korduses ja inkubeeriti kasutades 384 optilist plaati (MicroAmp, Applied Biosystems) 15 min 95°C juures, millele järgnesid 40 tsüklit 15 sek 95°C ja 1 min 60°C juures (Tabel 5). Iga reaktsiooni lõppruumalaks oli 10 µl.

Tabel 4. qRT-PCRi reaktsiooni segu

Reagent	Maht (µl)
5X Hot Firepol probe qPCR mix	2
TaqMan miR assay	0,3
cDNA	1
MQ vesi	6,7
Kogumaht	10

Tabel 5. qRT-PCRi reaktsiooni programm

Temperatuur (°C)	Aeg	Tsüklite arv
95	15 min	1
95	15 sek	40
60	1 min	40
4	∞	-

2.2.8 *MiR-34a* sihtmärkgeenide ekspressiooni uurimine

2.2.8.1 *MiR-34a* sihtmärkgeenide valimine ekspressioonikiibi põhjal ja praimerite disain

Lisaks varem eksperimentaalselt kinnitatud *miR-34a* sihtmärkgeenidele (*BCL2*, *CDK6*, *E2F3*, *MET* ja *SIRT1*) valiti RNA mikrokiibi tulemuste põhjal välja 5 geeni (*ARHGAP1*, *AXL*, *CDC25A*, *FOSL1* ja *PDGFRA*). Valiku kriteeriumid olid järgmised:

- 1) ekspressioon alla surutud vähemalt 2 korda nii PF14 kui ka siPORT katses
- 2) allaregulatsiooni p-väärtuse järgi top 50 hulgas (erandiks on *PDGFRA* PF14 katses)
- 3) kirjanduse põhjal osalevad *miR-34a* regulatsioonirajas või on otsesed sihtmärgid

Nende geenide suhtes disainiti praimerid *Primer3*⁶ programmi abil vastavalt järgmistele parameetritele:

- Optimaalne sulamistemperatuur: 60°C
- PCRi produkti pikkus alla 250 ap

Saadud praimerite järjestused on toodud eraldi tabelis (Tabel 6). Endogeense kontrollina kasutati järgmiseid geene: *18S*, *ACTB* ja *GAPDH*.

Tabel 6. *MiR-34a* sihtmärkgeenide ekspressiooni kontrolliks kasutatud praimerite järjestused

Geen	<i>Forward-praimer</i>	<i>Reverse-praimer</i>
<i>ARHGAP1</i>	5'-TGCAGGATGATCTGACCTTG-3'	5'-GGTCATCCCCTTCAGGTGT-3'
<i>AXL</i>	5'-AGCATCCTGGAGCCAGAGTA-3'	5'-GGATAGTGGTCAGCCAGCTC-3'
<i>CDC25A</i>	5'-GAGATCGCCTGGGTAATGAA-3'	5'-TGCGGAACTTCTTCAGGTCT-3'
<i>FOSL1</i>	5'-CGGCCAAGTGCAGGAACC-3'	5'-GGAGGGTGTGGTCATGAGTG-3'
<i>PDGFRA</i>	5'-GAAGCTGTCAACCTGCATGA-3'	5'-CTTCCTTAGCACGGATCAGC-3'

⁶ <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

2.2.8.2 cDNA süntees

Proovidest eraldatud totaalse RNA põhjal sünteesiti cDNA *Maxima First Strand Synthesis Kit*'i abil vastavalt tootja protokollile (Thermo Scientific) (Tabel 7). Paralleelselt viidi läbi RT-kontrollreaktsioon, kuhu ei lisatud *MaximaMix*'i ning potentsiaalse saastuse tuvastamiseks NTC reaktsiooni, kuhu ei lisatud RNAd. Kõik reaktsioonid inkubeeriti kõigepealt 10 min 25°C, siis 30 min 50°C, seejärel 5 min 85°C ja säilitati 4°C juures (Tabel 8). Reaktsiooni lõppruumalaks oli 20 µl, millest 1 µl moodustas RNA.

Tabel 7. *Maxima* cDNA sünteesi reaktsioonisegu

Reagent	Maht (µl)
5X reaktsiooni puhver	4
<i>MaximaMix</i>	2
RNA	1
MQ vesi	13
Kogumaht	20

Tabel 8. *Maxima* cDNA sünteesi reaktsiooni programm

Temperatuur (°C)	Aeg (min)
25	10
50	30
85	5
4	∞

2.2.8.3 *MiR-34a* sihtmärkgeenide qRT-PCR

MiR-34a miimiku sihtmärkgeenide ekspressiooni mõõtmiseks kasutati kvantitatiivset reaal-aja PCRi masinat (ABI Prism 7900HT, Applied Biosystems) ja kommertsiaalseid *EvaGreen*® reagente (Solis BioDyne) ning eelnevalt disainitud praimereid (Tabel 6) vastavalt tootja protokollile (Solis BioDyne) (Tabel 9). Kõik reaktsioonid tehti kolmes korduses ja inkubeeriti kasutades 384 optilist plaati (MicroAmp, Applied Biosystems) 15 min 95°C juures, millele järgnesid 40 tsüklit 15 sek 95°C, 20 sek 62°C ja 20 sek 72°C juures (Tabel 10). Paralleelselt viidi läbi RT- ja NTC kontrollreaktsioonid. Iga reaktsiooni lõppruumalaks oli 20 µl.

Tabel 9. qRT-PCRi reaktsioonisegu

Reagent	Maht (µl)
5X Hot Firepol EvaGreen qPCR Mix Plus	4
Forward-praimer	0,5
Reverse-praimer	0,5
cDNA	1
MQ vesi	14
Kogumaht	20

Tabel 10. qRT-PCRi reaktsiooni programm

Temperatuur (°C)	Aeg	Tsüklite arv
95	15 min	1
95	15 sek	40
62	20 sek	40
72	20 sek	40
4	∞	-

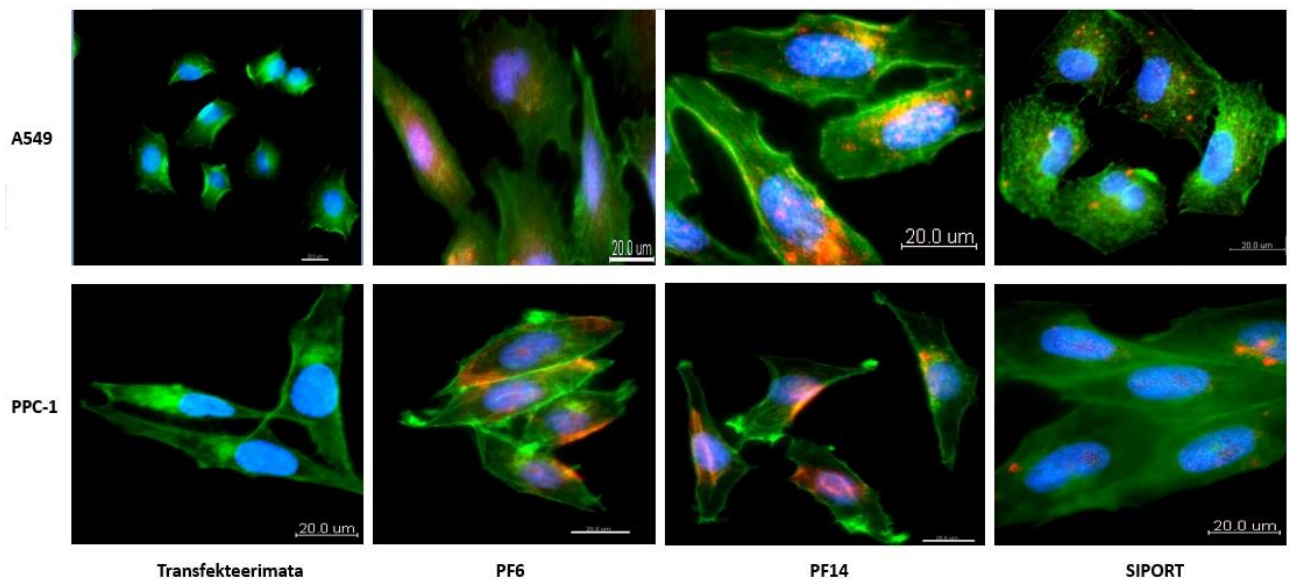
2.2.8.4 qRT-PCRi andmete statistiline analüüs

Reaal-aja qPCRi transfektsiooni ja sihtmärkgeenide ekspressiooni andmeid analüüsi SDS 2.2.2. ja RQ Manager (Applied Biosystems) programmide abil. Et hinnata ekspressioonitasemete muutusi kasutati võrdleva lävitsükli (C_t - *cycle threshold*) meetodit, mis põhineb fluorestsentsi intensiivsuste erinevustel kontroll- ja uuritava proovi vahel. C_t on tsüklite arv, mis on vajalik kindla signaalitugevuse läve saavutamiseks. qRT-PCRi andmeid vaadeldi RQ Manager'i poolt pakutud lävitasemete suhtes.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Transfektsioonisüsteemide võrdlus

Käesoleva töö üheks eesmärgiks oli võrrelda kahe transfektsioonisüsteemi (peptiidkandjad ja lipofektsioonireagent) sobivust *miR-34a* asendusravi arendamisel. Selleks viidi fluorestsentsmärgisega *cel-miR-67-Dy547* miimik kopsuvähi- (A549) ja eesnäärmevähirakkudesse (PPC-1) kasutades RSPd (PF6 ja PF14) ja lipofektsioonireagenti (siPORT). Neli tundi pärast transfektsiooni vaadeldi rakke fluorestsentsmikroskoobis (Joonis 8). Leiti, et kõige efektiivsem transfektsioonireagent on PF14, kuigi sünteetiliste ONide efektiivseks transportimisel rakkudesse töötasid ka PF6 ja siPORT.



Joonis 8. *Cel-miR-67-Dy547* miimiku transfektsiooni A549 ja PPC-1 rakkudesse ja analüüs fluorestsentsmikroskoobis. Rakud värviti DAPI ja Alexa Fluor 488 konjugeeritud phalloidin värvidega. *Cel-miR-67-Dy547* miimiku signaal tuvastati TexasRed (TxRed) filtriga. Suurendus: 40x. Pildid visualiseeriti Imaris programmi abil.

3.2 *MiR-34a* miimiku transfektsiooni kontroll

Kontrollimaks *MiR-34a* miimiku transfektsiooni, mõõdeti *miR-34a* ekspressioonitaset transfekteeeritud A549 ja PPC-1 rakkudes qRT-PCRi abil. Andmete normaliseerimiseks kasutati endogeense kontrollina *let-7a* ja *RNU48* ekspressiooni ja kontrollkatsena transfekteeeriti mõlemad

rakuliinid negatiivse kontrollmiimikuga. Omavahel võrreldi *miR-34a* miimiku ja negatiivse kontrollmiimikuga transfekteeritud rakkudes *miR-34a* taset võrdleva lävitsükli meetodi abil.

qRT-PCRi tulemuste analüüs näitas, et 48 tundi peale transfektsiooni on *miR-34a* ekspressioonitase mõlemas rakuliinis märkimisväärselt tõusnud (Joonis 9). RQ Manager'i abil arvutati välja, et võrreldes negatiivse kontrollmiimikuga muutus transfekteeritud rakkudes *miR-34a* ekspressioon sõltuvalt kasutatavast transfektsioonireagendist järgmiselt:

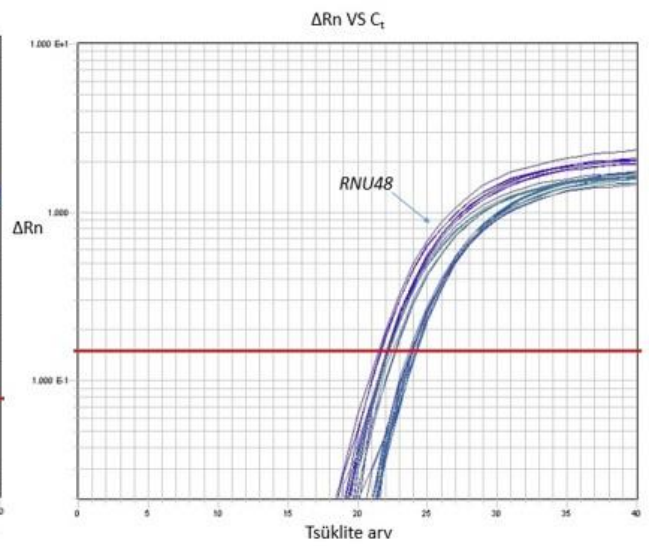
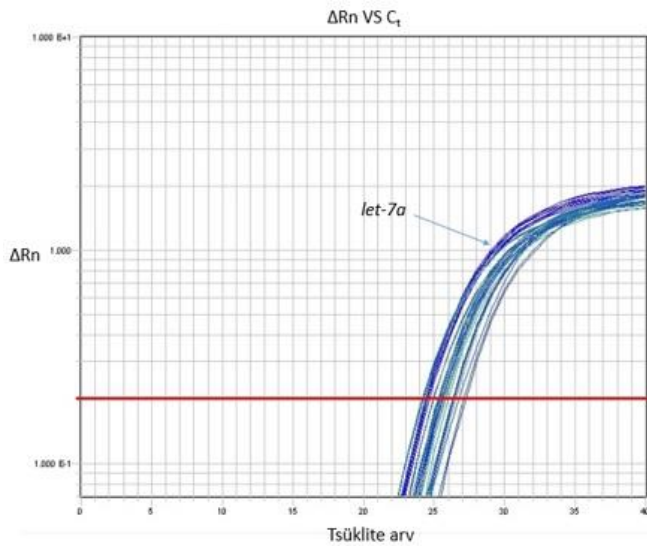
A549 rakuliinis:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 3690 korda kõrgem ekspressioon
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 6310 korda kõrgem ekspressioon
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 2600 korda kõrgem ekspressioon

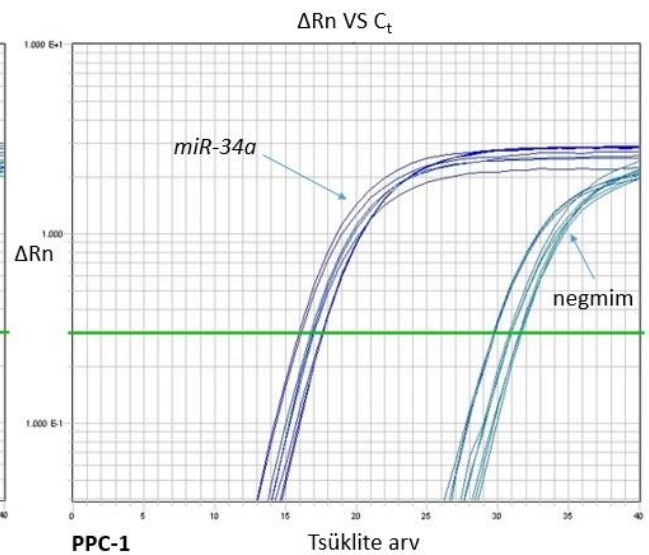
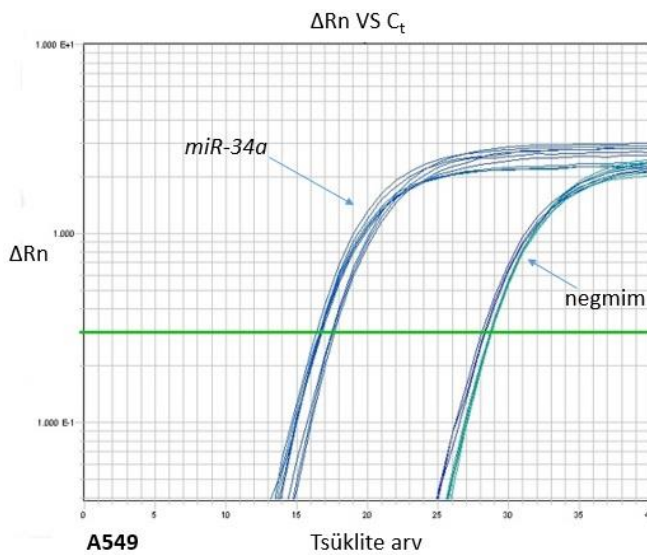
PPC-1 rakuliinis:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 8470 korda kõrgem ekspressioon
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 28960 korda kõrgem ekspressioon
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 5280 korda kõrgem ekspressioon

Need tulemused on kooskõlas *cel-miR-67-Dy547* miimiku transfektsioonikatsetega. Järelikult sobivad ka *miR-34a* miimiku transpordiks A549 ja PPC-1 rakkudesse nii lipofektsioonireagent siPORT kui ka peptiidkandjad PF6 ja PF14. Nendest kõige efektiivsem transfektsioonireagendiks osutus PF14.



Endogeensed kontrollid



Joonis 9. Amplifikatsiooni diagramm. PF6, PF14 ja siPORTiga transfekteeeritud A549 ja PPC-1 rakkudes on näha suurt *miR-34a* ekspressioonitaseme tõusu. Roheline ja punane horisontaaljooned tähistavad lävitaset. Näidatud on kolme erineva katse tulemused. Negmim – negatiivne kontrollmiimik.

3.3 *MiR-34a* sihtmärkgeenide ekspressiooni analüüs

Antud töö teiseks eesmärgiks oli leida *miR-34a* uued potentsiaalsed sihtmärgid A549 ja PPC-1 rakuliinis. Seda osa uuringust teostati kahes etappis. Kõigepealt kontrolliti *miR-34a* miimiku toimet varem eksperimentaalselt kinnitatud sihtmärkgeenide (*BCL2*, *CDK6*, *E2F3*, *MET* ja *SIRT1*) ekspressioonile. Selleks määrati PF6, PF14 ja siPORTiga transfekteeritud A549 ja PPC-1 rakkudes qRT-PCRi abil *miR-34a* sihtmärkgeenide ekspressioonisignaale. Võrdluseks määrati ekspressioonitasemete muutusi negatiivse kontrollmiimikuga transfekteeritud rakkudes. Sihtmärkgeenide ekspressiooni hindamiseks valiti välja kolm erinevat endogeenset kontrolli (*18S*, *ACTB* ja *GAPDH*), mille puhul on varem näidatud kõrge ja stabiilne ekspressioonitase (Pérez *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2005; Vajda *et al.*, 2013, Ohl *et al.*, 2005).

Kasutades kolme endogeense kontrolli keskmist leiti, et võrreldes negatiivse kontrollmiimikuga transfekteeritud rakkudega muutus 48 tundi peale transfektsiooni sihtmärkgeenide ekspressioon järgmiselt (Joonis 10):

A549 rakuliinis:

1. *BCL2*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 2,03 korda madalam ekspressioon
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 3,75 korda madalam ekspressioon
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 1,33 korda kõrgem ekspressioon*

2. *CDK6*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 1,18 korda kõrgem ekspressioon*
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 7,14 korda madalam ekspressioon
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 2,94 korda kõrgem ekspressioon*

3. *E2F3*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 3,23 korda kõrgem ekspressioon*
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 1,72 korda madalam ekspressioon
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 1,16 korda madalam ekspressioon

4. *MET*:

Andmed puuduvad

5. *SIRT1*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 1,32 korda madalam ekspressioon
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 1,26 korda madalam ekspressioon

- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 2,18 korda madalam ekspressioon

PPC-1 rakuliinis:

1. *BCL2*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 4,44 korda madalam ekspressioon
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 4,65 korda madalam ekspressioon
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 1,24 korda madalam ekspressioon

2. *CDK6*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 2,67 korda madalam ekspressioon
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 5,68 korda madalam ekspressioon
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 1,32 korda madalam ekspressioon

3. *E2F3*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 8,33 korda madalam ekspressioon
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 4,52 korda madalam ekspressioon
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 1,27 korda madalam ekspressioon

4. *MET*:

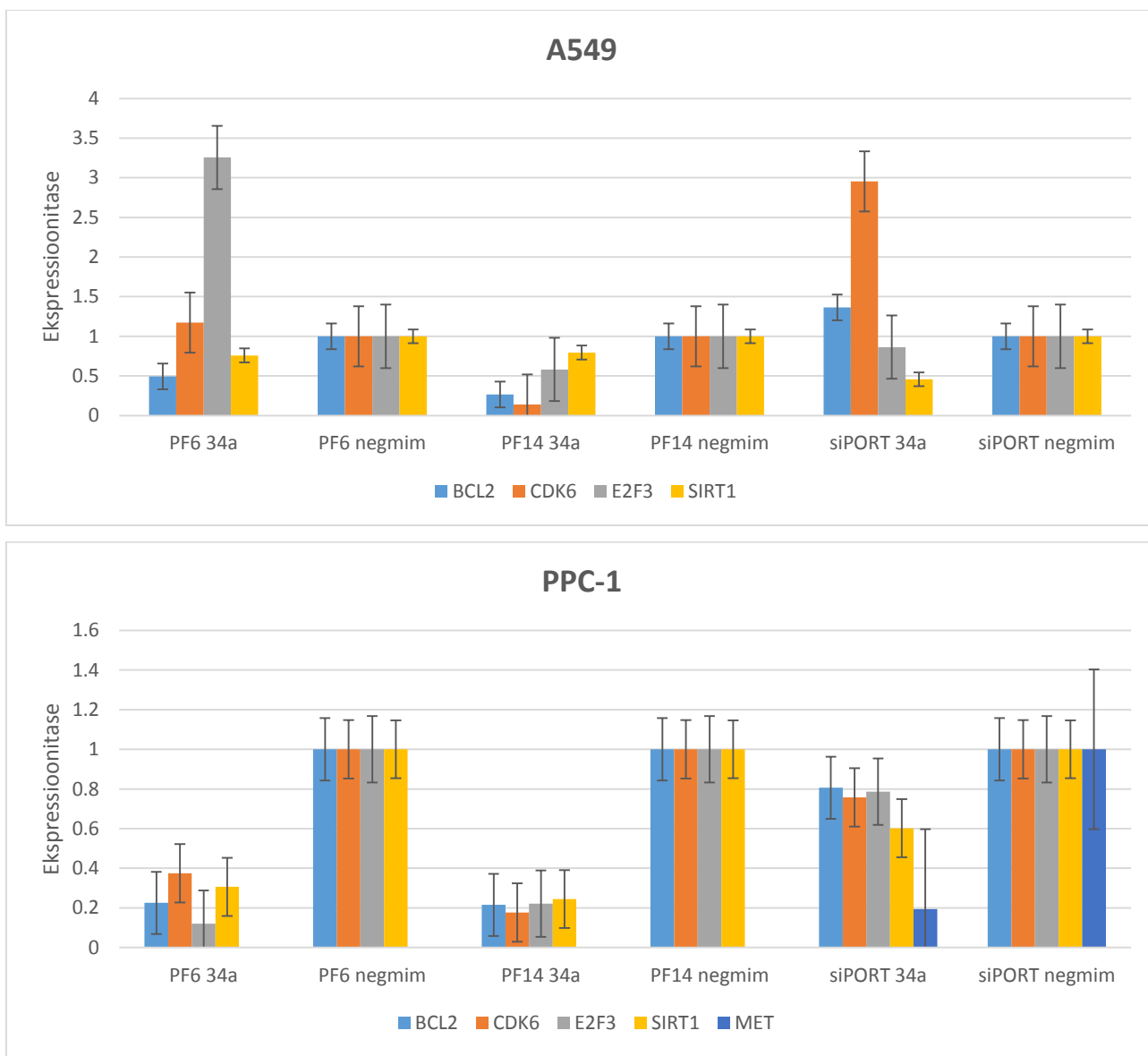
PF6 ja PF14 kohta andmed puuduvad

- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 5,15 korda madalam ekspressioon

5. *SIRT1*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 3,27 korda madalam ekspressioon
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 4,1 korda madalam ekspressioon
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 1,66 korda madalam ekspressioon

Lahknevused geenide ekspressioonis (tähistatud tärniga) ja andmete puudus *MET* geeni kohta võivad olla seotud A549 rakuliini omapära (näiteks oli endogeense *miR-34a* tase A549 rakkudes kõrgem kui PPC-1 rakkudes), *MET* geeni väga madala ekspressioonitaseme ja endogeense kontrolli valikuga.

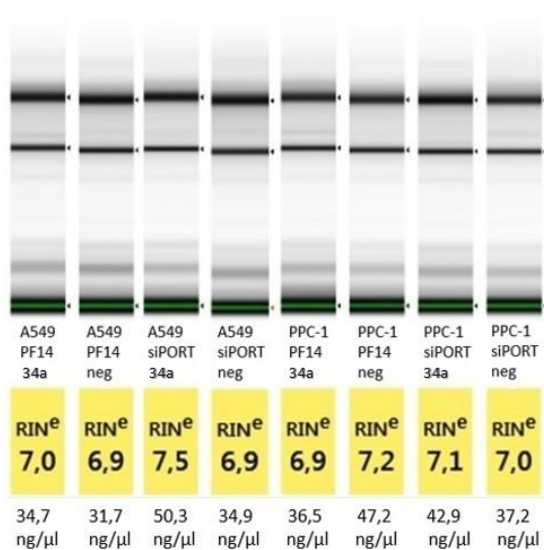


Joonis 10. Sihtmärkgeenide suhteline ekspressiooni tase miR-34a miimiku ja kontrollmiimikuga transfekteeerimisel A549 ja PPC-1 rakuliinis. Ekspressioonitasemed määrati 48 tundi peale transfektsiooni. Joonisel on näidatud kolme erineva transfektsiooni keskmine. Veapiirid tähistavad standardhälvet 34a – *miR-34a* miimik; negmim – negatiivne kontrollmiimik.

Need tulemused näitavad, et *miR-34a* miimikuga transfekteeeritud A549 ja PPC-1 rakkudes on *miR-34a* ekspressioonitase tõusnud ja sihtmärkgeenide ekspressioonitase enamasti alla surutud.

3.4 RNA mikrokiibi analüüs

MiR-34a sihtmärkgeenide uuringu teises etapis teostati mikrokiibi analüüs eesmärgiga leida uued sobivad sihtmärkgeenid *miR-34a* toime hindamiseks ja kontrollida nende ekspressiooni qRT-PCRiga. Selleks teostati hüpoteesivaba ekspressiooniuuring, kus uuriti kõikide geenide ekspressiooni muutust Illumina kiibi abil. Kiibikatses kasutati PF14 ja siPORTiga transfekteeritud PPC-1 rakkude RNA proove, mis olid läbinud kvaliteedikontrolli (RIN>6,5) (Joonis 11).



Joonis 11. RNA kvaliteedikontrolli tulemused. 34a – *miR-34a* miimik; neg – negatiivne kontrollmiimik.

MiR-34a miimiku toimel muutunud ekspressiooniga geenide hulgast (p-väärtus<0,05) (Tabel 11) valiti välja viis geeni (*ARHGAP1*, *AXL*, *CDC25A*, *FOSL1* ja *PDGFRA*), mille ekspressiooni kontrolliti qRT-PCRiga. Valiku kriteeriumid olid järgmised:

- ekspressioon alla surutud vähemalt 2 korda nii PF14 kui ka siPORTiga transfekteeritud rakkudes
- allaregulatsiooni p-väärtuse järgi top 50 hulgas (erandiks on *PDGFRA* PF14 katses)
- kirjanduse põhjal osalevad *miR-34a* signaaliradades või on otsesed sihtmärgid

Geenide ekspressiooni muutused on näidatud *heat map*'ina (Joonis 12, lk 43, 44).

Tabel 11. *MiR-34a* toimet enimmuutunud ekspressiooniga geenid. Tabelis on toodud 30 statistiliselt olulisima ekspressioonitaseme muutusega geeni. logFC tähistab geenide ekspressiooni muutust kordades logaritmilisel (\log_2) skaalal. Punasega on tähistatud edaspidiseks analüüsiks välja valitud geenid (kandidaatgeenid). P-väärtus on mitmese testimise suhtes korrigeeritud FDR (*False Discovery Rate*) meetodil.

A. PF14ga transfekteeritud rakud

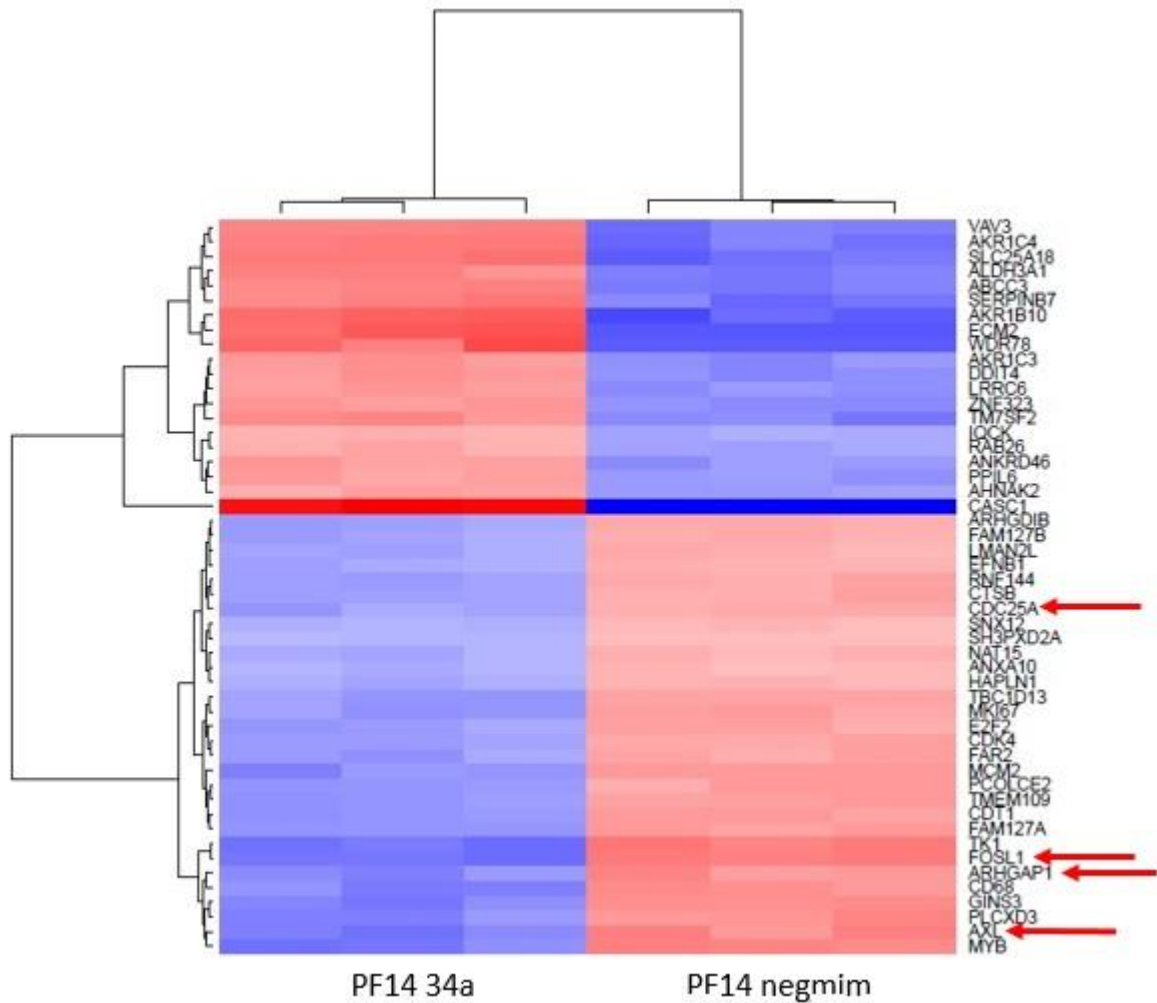
#	logFC	Korrigeeritud p-väärtus
CASC1	4.35	0.000127
FOSL1	-2.31	0.000820
TK1	-2.32	0.000946
ECM2	2.84	0.000946
CDT1	-1.76	0.000946
ZNF323	1.84	0.000946
AKR1C4	2.30	0.000946
AKR1B10	2.72	0.000946
DDIT4	1.85	0.000946
TBC1D13	-1.66	0.000946
AKR1C3	1.84	0.000946
CDK4	-1.59	0.000946
ALDH3A1	2.13	0.000946
EFNB1	-1.41	0.000946
CD68	-1.98	0.000946
PCOLCE2	-1.70	0.000951
ARHGDIB	-1.51	0.000951
MCM2	-1.80	0.000951
SERPINB7	2.24	0.001008
SNX12	-1.28	0.001008
CDC25A	-1.52	0.001008
HAPLN1	-1.36	0.001008
ANKRD46	1.71	0.001008
E2F2	-1.62	0.001008
MYB	-2.16	0.001008
ARHGAP1	-1.88	0.001023
FAR2	-1.61	0.001065
NAT15	-1.36	0.001065
FAM127B	-1.48	0.001065
AXL	-2.10	0.001065

Tabel 11 (jätkub).

B. siPORTiga transfekteritud rakud

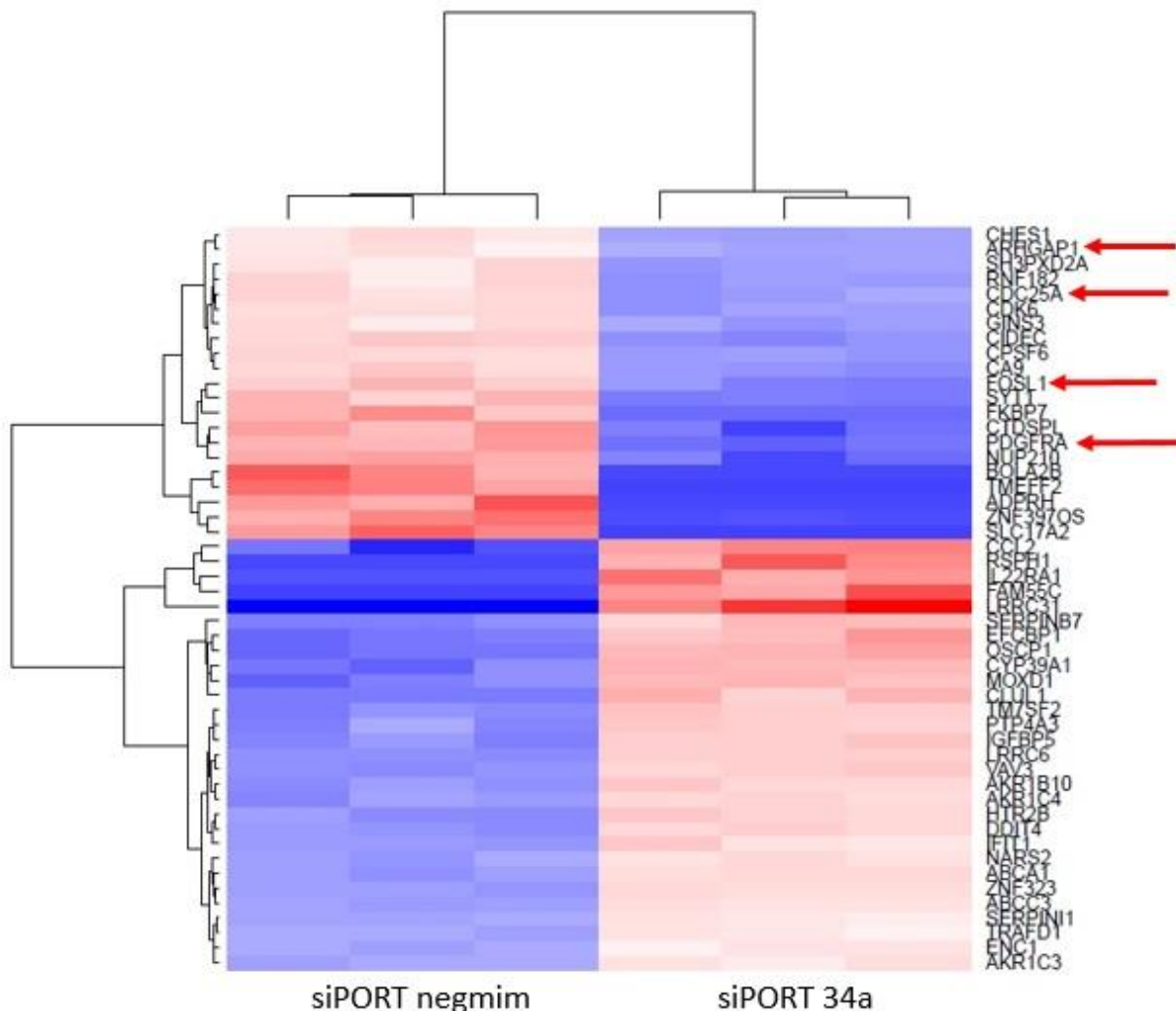
#	logFC	Korrigeeritud p-väärtus
LRRC6	1.52	0.008277
TMEFF2	-2.89	0.008277
PDGFRA	-2.13	0.008277
VAV3	1.48	0.008277
SYT1	-1.83	0.008277
ZNF323	1.28	0.008277
IL22RA1	2.67	0.008277
ZNF397OS	-2.74	0.008277
CDK6	-1.26	0.008277
CLUL1	1.86	0.008277
IGFBP5	1.57	0.008277
CA9	-1.40	0.008277
HTR2B	1.44	0.008277
SERPINI1	1.04	0.009732
NUP210	-2.23	0.010601
AKR1C3	1.08	0.011369
FOSL1	-1.66	0.011369
NARS2	1.20	0.011369
CDC25A	-1.27	0.011369
LRRC31	4.25	0.011369
ARHGAP1	-1.03	0.011369
ENC1	1.03	0.011369
BOLA2B	-2.87	0.011369
EFCBP1	1.98	0.011369
FAM55C	2.89	0.011758
ADPRH	-2.84	0.011758
RSPH1	2.85	0.011758
GINS3	-1.21	0.011758
PTP4A3	1.50	0.011947
SH3PXD2A	-1.19	0.012162

A.



Joonis 12. Geenide ekspressiooni muutused PF14ga (A) ja siPORTiga (B) transfekteritud rakkudes. Sinise värv tähistab iga geeni puhul keskmisest madalamat ja punane värv kõrgemat ekspressiooni. Punaste nooltega on näidatud kandidaatgeenid. 34a – *miR-34a* miimik; negmim – negatiivne kontrollmiimik. Joonisel on näidatud 50 statistiliselt kõige olulisema muutusega geeni.

B.



Joonis 12 (jätkub). Geenide ekspressiooni muutused PF14ga (A) ja siPORTiga (B) transfekteeritud rakkudes. Sinise värv tähistab iga geeni puhul keskmisest madalamat ja punane värv kõrgemat ekspressiooni. Punaste nooltega on näidatud kandidaatgeenid. 34a – *miR-34a* miimik; negmim – negatiivne kontrollmiimik. Joonisel on näidatud 50 statistiliselt kõige olulisema muutusega geeni.

Need tulemused näitavad, et *miR-34a* võib osaleda paljudes signaaliradades ja reguleerida otseselt või kaudselt nii onkogeene kui ka tuumorsupressorgeene. *MiR-34a* miimiku toimetamine A549 ja PPC-1 rakkudes mõjutab oluliselt paljude geenide ekspressiooni, mille hulgas on lisaks varem eksperimentaalselt kinnitatud *miR-34a* sihtmärkidele (*CDK6* jt) ka uued potentsiaalsed sihtmärkgeenid.

3.5 Kandidaatgeenide kontroll qRT-PCRi abil

RNA mikrokiibi tulemuste põhjal valiti välja viis geeni (*ARHGAP1*, *AXL*, *CDC25A*, *FOSL1* ja *PDGFRA*), mille ekspressiooni muutust valideeriti qRT-PCRi abil PF6, PF14 ja siPORTiga transfekteeritud A549 ja PPC-1 rakkudes. Võrdluskatseks kasutati negatiivse kontrollmiimikuga transfekteeritud rakke ning endogeensete kontrollidena *18S*, *ACTB* ja *GAPDH* geene. Leiti, et 48 tundi pärast transfektsiooni oli sihtmärkgeenide ekspressioon võrreldes negatiivse kontrollmiimikuga muutunud järgmiselt (Joonis 13):

A549 rakuliinis:

1. *ARHGAP1*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 1,44 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 3,85 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 1,72 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)

2. *AXL*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 1,2 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 4,67 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 1,48 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)

3. *CDC25A*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 2,29 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 2,26 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 2,1 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)

4. *FOSL1*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 1,49 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 2,08 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 2,61 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)

5. *PDGFRA*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 1,48 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 1,001 korda madalam ekspressioon (p-väärtus=0,5016)
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 1,47 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)

PPC-1 rakuliinis:

1. *ARHGAP1*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 1,19 korda madalam ekspressioon (p-väärtus=0,3581)
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 3,66 korda madalam ekspressioon (p-väärtus=0,0085)
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 1,72 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)

2. *AXL*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 2,00 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 3,56 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 6,58 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)

3. *CDC25A*:

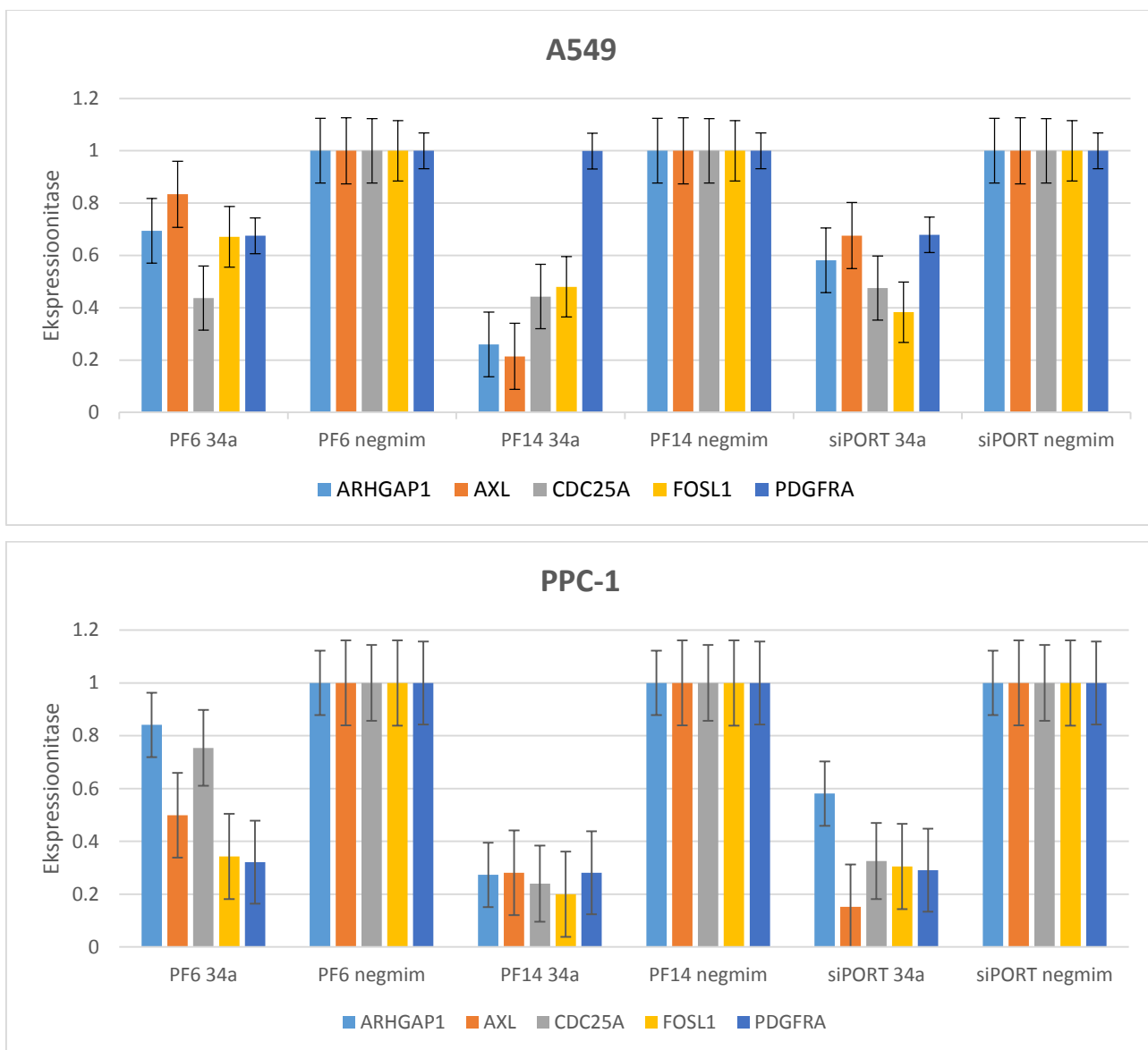
- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 1,33 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 4,17 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 3,08 korda madalam ekspressioon (p-väärtus=0,0135)

4. *FOSL1*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 2,92 korda madalam ekspressioon (p-väärtus=0,1354)
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 5 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 3,28 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)

5. *PDGFRA*:

- PF6ga transfekteeritud rakkudes – 3,12 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- PF14ga transfekteeritud rakkudes – 3,56 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)
- siPORTiga transfekteeritud rakkudes – 3,44 korda madalam ekspressioon (p-väärtus<0,0001)



Joonis 13. Kandidaatgeenide ekspressiooni muutus A549 ja PPC-1 rakuliinis. Ekspressioonitasemed määrati 48 tundi peale transfektsiooni. Iga katse teostati kolmes korduses ning graafikul on näidatud katsete keskmine. Veapiirid tähistavad standardhälvet. 34a – *miR-34a* miimik; negmim – negatiivne kontrollmiimik.

Peaaegu kõikide geenide puhul õnnestus kiibil nähtud allaregulatsiooni efekt valideerida. Ainsaks erandiks oli *PDGFRA* PF14'ga transfekteeeritud A549 rakkudes, mille tase jäi praktiliselt muutumatuks.

3.6 Järeldused

1. *MiR-34a* miimiku toimetamiseks vähirakkudesse sobivad nii lipofektsioonireagent siPORT kui ka peptiidkandjad PF6 ja PF14. Nendest kõige efektiivsem transfektsioonireagent on PF14.
2. *MiR-34a* miimiku transfektsioon tõstab *miR-34a* kontsentratsiooni mitu suurusjärku, mistõttu mõjutab oluliselt sihtmärkgeenide ekspressiooni. Hüpoteesivaba RNA mikrokiibikatse ja qRT-PCRi abil kontrollitud sihtmärkgeenide ekspressiooni muutuste tulemused on omavahel kooskõlas. A549 ja PPC-1 erinev *miR-34a* ekspressioonitase ja endogeense referentskontrolli valik võib mõjutada sihtmärkide arvutatud ekspressioonitaset, kuid enamasti on sihtmärkgeenide ekspressioonitaseme muutus samasuunaline.

Kokkuvõte

MiRNAd on endogeensed, mittekodeerivad ja kõrgelt konserveerunud, tavaliselt 18-25 nukleotiidi (nt) pikad RNA molekulid, mis reguleerivad post-transkriptsiooniliselt geenide ekspressiooni. Uuringud näitavad, et need väikesed RNAd reguleerivad rakkude differentseerumist ja proliferatsiooni ning kõrvalekalded miRNAde normaalsest ekspressioonist on seotud tumorigeneesiga. Seetõttu pakkuvad nad huvi terapeutiliste meetodite arendamisel ja mõned miRNAdele põhinevad ravimid on jõudnud ka kliiniliste katseteni.

Käesoleva töö eesmärgiks oli võrrelda kahe transfektsioonisüsteemi (peptiidkandjad ja lipofektsioonireagent) sobivust *miR-34a* asendusravi arendamisel ning leida *miR-34a* uued potentsiaalsed sihtmärgid A549 ja PPC-1 rakuliinis.

RNA mikrokiibi abil leiti *miR-34a* uued potentsiaalsed sihtmärgid ning kasutades kvantitatiivset reaalaaja PCRi hinnati *miR-34a* miimikuga transfekteeritud rakkudes sihtmärkgeenide (*ARHGAP1*, *AXL*, *CDC25A*, *FOSL1* ja *PDGFRA*) ekspressioonitaseme muutusi. Tulemuste analüüsimise käigus leiti, et lipofektsioonireagent siPORT ning peptiidkandjad PF6 ja PF14 sobivad *miR-34a* efektiivseks transpordiks vähirakkudesse. Nendest kõige efektiivsem transfektsioonireagent on PF14. Samuti leiti, et *miR-34a* miimiku transfektsioon tõstab märkimisväärselt *miR-34a* kontsentratsiooni ja vähendab sihtmärkgeenide ekspressioonitasemeid vähemalt kaks korda.

Saadud tulemuste põhjal võib väita, et leitud sihtmärkgeenide suhtes on võimalik kasutada mõlemaid transfektsioonisüsteeme edasises töös asendusteraapia arendamisel.

The comparison of microRNA delivery systems in A549 and PPC-1 cells.

Alex Brjalin

Summary

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs, which regulate gene expression at the post-transcriptional level and may play a key role in tumorigenesis. Studies have shown that thousands of protein-coding genes are regulated by miRNAs, indicating that miRNAs are master regulators of many important biological processes, such as cell cycle regulation, cell differentiation and apoptosis. In cancer, hundreds of miRNAs are known to have dysregulated expression. The discovery of many miRNA targets and their relevant oncogenic pathways has contributed to the development of miRNA-based therapeutics.

The aim of this thesis was to analyze the compatibility of miRNA delivery systems (cell-penetrating peptides and lipofection agent) in the context of the development of miRNA replacement therapy as well as to find novel *miR-34a* targets in A549 and PPC-1 cells.

A RNA microarray was performed in order to find novel *miR-34a* targets in both cell lines. As a result a significant change in expression was detected in five genes (*ARHGAP1*, *AXL*, *CDC25A*, *FOSL1* and *PDGFRA*). This discovery was later reconfirmed with a qRT-PCR analysis, which showed a considerable manyfold change of candidate gene expression after the transfection with *miR-34a* mimic. Moreover, it turned out that both delivery systems are suitable for efficient miRNA transfection, although CPP PF14 results prove higher efficacy.

Altogether these results indicate that CPPs (PF6 and PF14) and lipofection agent (siPORT) can be used in the development of miRNA replacement therapy as *miR-34a* carriers.

TÄNUAVALDUSED

Avaldan tänu oma juhendajatele, vanemteaduritele Tarmo Annilo ja Ana Rebane hea juhendamise eest. Tänan kaasjuhendajat, laborispetsialisti Egon Urgardi koekultuuri ja fluorestsentsmikroskoobiga töötamise õpetamise eest.

Eraldi soovin tänada EGV tuumiklaborist Viljo Soo'd, kes viis läbi mRNA ekspresioonianalüüsi Illumina kiibi abil. Ekspresioonikiibi andmete analüüsiks kasutatud skript oli algselt koostatud Raivo Kolde poolt.

Käesolev uuring on tehtud SA Archimedes poolt finantseeritava projekti "Development of miRNA replacement therapy methods" raames.

Kasutatud kirjandus

Adil MM, Erdman ZS, Kokkoli E. (2014). Transfection mechanisms of polyplexes, lipoplexes, and stealth liposomes in $\alpha_5\beta_1$ integrin bearing DLD-1 colorectal cancer cells. *Langmuir*. 2014 Apr 8;30(13):3802-10. doi: 10.1021/la5001396.

Agostini M and Knight RA. (2014). miR-34: from bench to bedside. *Oncotarget*, Vol. 5, No. 4.

Andaloussi S EL, Lehto T, Mäger I, Rosenthal-Aizman K, Oprea I I, Simonson OE, Sork H, Ezzat K, Copolovici DM, Kurrikoff K, Viola JR, Zaghoul EM, Sillard R, Johansson HJ, Hassane FS, Guterstam P, Suhorutsenko J, Moreno P M D, Oskolkov N, Hälldin J, Tedebark U, Metspalu A, Lebleu B, Lehtiö J, Edvard Smith C I E and Langel Ü. (2011). Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 9; doi:10.1093/nar/gkq1299

Babar, I.A., C.J. Cheng, et al., Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) E1695–E1704.

Bader AG, Brown D and Winkler M. (2010). The Promise of MicroRNA Replacement Therapy. *Cancer Res*; 70(18); 7027–30; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2010

Bader AG, Brown D, Stoudemire J and Lammers P. (2011). Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Therapy* (2011) 18, 1121–1126; doi:10.1038/gt.2011.79

Bader AG. (2012). miR-34- a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front Genet*. 2012 Jul 2;3:120. doi: 10.3389/fgene.2012.00120

Baigude H and Rana TM. (2014). Strategies to antagonize miRNA functions in vitro and in vivo. *Nanomedicine (Lond.)* (2014) 9(16); 10.2217/NNM.14.162 © 2014 Future Medicine Ltd; 2545–2555 ISSN 1743-5889

Bartel DP and Chen CZ. (2004). Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat. Rev. Genet.* 5, 396–400.

Bartel DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004 Jan 23;116(2):281-97.

Bitar, A., N.M. Ahmad, et al., Silica-based nanoparticles for biomedical applications. (2012). *Drug Discov. Today* 17 1147–1154.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524-9.

Crew, E., S. Rahman, et al., MicroRNA conjugated gold nanoparticles and cell transfection. (2012). *Anal. Chem.* 84 26–29.

Dang, J.M., K.W. Leong, Natural polymers for gene delivery and tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 487–499.

Davidson-Moncada J, Papavasiliou FN, Tam W. (2010). MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Jan;1183:183-94. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05121.x.

Di Martino, MT, Campani, V, Misso, G, Gallo Cantafio, ME, Gulla, A, Foresta, U. (2014). In vivo activity of miR-34a mimics delivered by stable nucleic acid lipid particles (SNALPs) against multiple myeloma. *PLoS ONE* 9: e90005.

Diederichs S and Haber DA. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131, 1097–1108

Dong Y, Yu J and Simon SM Ng. (2014). MicroRNA dysregulation as a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Cancer Management and Research* 2014;6 405–422

Eiring AM, Harb JG, Neviani P, Garton C, Oaks JJ, Spizzo R, Liu S, Schwind S, Santhanam R, Hickey CJ, Becker H, Chandler JC, Andino R, Cortes J, Hokland P, Huettner CS, Bhatia R, Roy DC, Liebhaber SA, Caligiuri MA, Marcucci G, Garzon R, Croce CM, Calin GA, Perrotti D. (2010). miR-328 Functions as an RNA Decoy to Modulate hnRNP E2 Regulation of mRNA Translation in Leukemic Blasts. *Cell.* 2010 Mar 5;140(5):652-65. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.007

Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjärn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S. (2008). Nature. 2008 Apr 17;452(7189):896-9. doi: 10.1038/nature06783.

Ezzat K, Andaloussi SE, Zaghoul EM, Lehto T, Lindberg S, Moreno PM, Viola JR, Magdy T, Abdo R, Guterstam P, Sillard R, Hammond SM, Wood MJ, Arzumanov AA, Gait MJ, Smith CI, Hällbrink M, Langel Ü. (2011). PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 12; doi:10.1093/nar/gkr072

Fujita, Y., Kojima, K., Hamada, N., Ohhashi, R., Akao, Y., Nozawa, Y., Deguchi, T. and Ito, M. (2008). Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. Biochem.Biophys.Res. Commun. 377, 114–119.

Guan, P., Yin, Z., Li, X., Wu, W., Zhou, B. (2012). Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. J. Exp. Clin. Cancer Res. 31, 54.

Guo W and Lee RJ. (2000). Efficient Gene Delivery Using Anionic Liposome-Complexed Polyplexes (LPDII). Biosci Rep. 2000 Oct;20(5):419-32.

Huse, J.T., Brennan, C., Hambarzumyan, D., Wee, B., Pena, J., Rouhanifard, S.H., Sohn-Lee, C., le Sage, C., Agami, R., Tuschl, T., and Holland, E.C. (2009). The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in highgrade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. Genes Dev. 23, 1327–1337.

Ibrahim, A.F., U. Weirauch, et al., MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma, Cancer Res. 71 (2011) 5214–5224.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell;120:635–47.

Kang L, Mao J, Tao Y, Song B, Ma W, Lu Y, Zhao L, Li J, Yang B, Li L. (2015). MiR-34a Suppresses the Breast Cancer Stem Cell-like Characteristics by Downregulating Notch1 Pathway. Cancer Sci. 2015 Mar 17. doi: 10.1111/cas.12656.

Kasinski AL, Kelnar K, Stahlhut C, Orellana E, Zhao J, Shimer E, Dysart S, Chen X, Bader AG and Slack FJ. (2014). A combinatorial microRNA therapeutics approach to suppressing non-small cell lung cancer. *Oncogene advance online publication*, 1 September 2014; doi:10.1038/onc.2014.282

Kota, J., Chivukula, R.R., O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Montgomery, C.L., Hwang, H.W., Chang, T.C., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K.R., et al. (2009). Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 137, 1005–1017.

Kouwenhove van M, Kedde M and Agami R. (2011). MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nat Rev Cancer* 2011 Aug 5;11(9):644-56; doi: 10.1038/nrc3107

Kozomara Ana and Griffiths-Jones Sam. (2013). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *NAR* 2014 42:D68-D73.

Lanford, R.E., E.S. Hildebrandt-Eriksen. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection, *Science* 327 (2010) 198–201.

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

Lennox KA, Owczarzy R, Thomas DM, Walder JA, Behlke MA. (2013). Improved Performance of Anti-miRNA Oligonucleotides. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013 Aug 27;2:e117. doi: 10.1038/mtna.2013.46.

Li, B., Hu, Y., Ye, F., Li, Y., Lv, W. and Xie, X. (2010). Reduced miR-34a expression in normal cervical tissues and cervical lesions with high risk human papilloma virus infection. *Int. J. Gynecol.Cancer* 20, 597–604.

Liu DW, Chen ST, Liu HP. (2005). Choice of endogenous control for gene expression in non-small cell lung cancer. *Eur Respir J*. 2005 Dec;26(6):1002-8.

Liu N, Zhou C, Zhao J, Chen Y. (2012). Reversal of paclitaxel resistance in epithelial ovarian carcinoma cells by an MUC1 aptamer-let-7i chimera. (2012). *Cancer Invest*. 30 (2012) 577–582.

Lodygin,D., Tarasov,V., Epanchintsev, A., Berking,C., Knyazeva,T., Korner, H., Knyazev,P., Diebold,J. and Hermeking,H. (2008). Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* 7, 2591–2600.

Matsuyama, H., H.I. Suzuki, et al., miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma. (2011). *Blood* 118 (2011) 6881–6892.

Mendell JT and Olson EN. (2012). *MicroRNAs in Stress Signaling and Human Disease*. *Cell* 148, March 16, 2012 ©2012 Elsevier Inc; DOI 10.1016/j.cell.2012.02.005

Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, Ammad Ahmad Farooqi, Angela Lombardi, Virginia Campani, Mayra Rachele Zarone1, Annamaria Gulla, Pierosandro Tagliaferri, Pierfrancesco Tassone and Michele Caraglia. (2014). Mir-34: A New Weapon Against Cancer? *Molecular Therapy—Nucleic Acids* (2014) 3, e194; doi:10.1038/mtna.2014.47

Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Poleskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, Cuvellier S, Harel-Bellan A. (2006). The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol* 8:278–284.

Obad S, dos Santos CO, Petri A, Heidenblad M, Broom O, Ruse C, Fu C, Lindow M, Stenvang J, Straarup EM, Hansen HF, Koch T, Pappin D, Hannon GJ, Kauppinen S. (2011). Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nat Genet*. 2011 Mar 20;43(4):371-8. doi: 10.1038/ng.786.

Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, Nitsche A, Kristiansen G, Loening SA, Radonić A, Jung K. (2005). Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med (Berl)*. 2005 Dec;83(12):1014-24.

Olive V, Jiang I, He L. (2010). mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. Calin, GA and Croce, CM (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6: 857–866

Orom UA, Nielsen FC and Lund AH. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*. 2008; 30(4):460-471

Ottosen Søren, Todd B. Parsley, Lu Yang, Karin Zeh, Leen-Jan van Doorn, Eva van der Veer, Anneke K. Raney, Michael R. Hodges and Amy K. Patick. (2014). In Vitro Antiviral Activity and Preclinical and Clinical Resistance Profile of Miravirsen, a Novel Anti-Hepatitis C Virus Therapeutic Targeting the Human Factor miR-122. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jan;59(1):599-608. doi: 10.1128/AAC.04220-14. Epub 2014 Nov 10.

Park, T.G., J.H. Jeong, S.W. Kim, Current status of polymeric gene delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 467–486.

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

Pérez S, Royo L, Astudillo A, Escudero D, Álvarez F, Rodríguez A, Gómez E, Otero J. (2007). Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors. *BMC Molecular Biology* 2007, 8:114, doi:10.1186/1471-2199-8-114

Pramanik D, Campbell NR, Karikari C, Chivukula R, Kent OA, Mendell JT, Maitra A. (2011). Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Mol Cancer Ther.* 2011 Aug;10(8):1470-80. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0152. Epub 2011 May 27.

Raisch J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HT. (2013). Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J Gastroenterol.* 2013 May 28;19(20):2985-96. doi: 10.3748/wjg.v19.i20.2985.

Ren, Y., C.S. Kang, et al., Co-delivery of as-miR-21 and 5-FU by poly(amidoamine) dendrimer attenuates human glioma cell growth in vitro, *J. Biomater.* (2010). *Sci. Polym. Ed.* 21 303–314.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and 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 and Hermeking H. (2014). The p53/miR-34 axis in development and disease. *Journal of Molecular Cell Biology* (2014), 6, 214–230; doi:10.1093/jmcb/mju003

Rokavec M, Li H, Jiang L and Hermeking H. (2014). The p53-microRNA connection in gastrointestinal cancer. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014 Sep 30;7:395-413. doi: 10.2147/CEG.S43738. eCollection 2014.

Takeshita, F., L. Patrawala, et al., Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18 (2010) 181–187.

Tazawa, H., N. Tsuchiya, et al., Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. (2007). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 15472–15477.

Terasawa, K., K. Shimizu, G. Tsujimoto. (2011). Synthetic pre-miRNA-based shRNA as potent RNAi triggers, *J. Nucleic Acids* 2011 131579.

Tian Zheng, Bin Guo, Mei Yu, Chong Wang, Haoshaqiang Zhang, Qingfu Liang, Kunli Jiang, Li Cao. (2014). Upregulation of micro-ribonucleic acid-128 cooperating with downregulation of PTEN confers metastatic potential and unfavorable prognosis in patients with primary osteosarcoma. *OncoTargets and Therapy* 2014;7 1601–1608

Tivnan A, W.S. Orr, et al., Inhibition of neuroblastoma tumor growth by targeted delivery of microRNA-34a using anti-disialogangliosideGD(2) coated nanoparticles, *PLoS One* 7 (2012) e38129.

Trang P, Medina PP, Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Homer R, Brown D, Bader AG, Weidhaas JB, Slack FJ. (2009). Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* 2009;29:1580–7.

Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, Weidhaas JB, Bader AG, Slack FJ. (2011). Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther.* 2011 Jun;19(6):1116-22. doi: 10.1038/mt.2011.48.

Tros de Ilarduya C, Sun Y, Düzgüneş N. (2010). Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur J Pharm Sci.* 2010 Jun 14;40(3):159-70. doi: 10.1016/j.ejps.2010.03.019.

Uchegbu, I.F. (2006). Pharmaceutical nanotechnology: polymeric vesicles for drug and gene delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 3 629–640.

Vajda A, Marignol L, Barrett C, Madden SF, Lynch TH, Hollywood D, Perry AS. (2013). Gene expression analysis in prostate cancer: the importance of the endogenous control. *Prostate.* 2013 Mar;73(4):382-90. doi: 10.1002/pros.22578.

Vogt, M., Munding, J., Gruner, M., Liffers, S.T, Verdoodt, B., Hauk, J., Steinstraesser, L., Tannapfel, A. and Hermeking, H. (2011). Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas. *VirchowsArch.* 458, 313–322.

Wang L, Yu J, Xu J, Zheng C, Li X, Du J. (2014). The analysis of microRNA-34 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with corresponding pericarcinoma tissues. Elsevier B.V.; .doi.org/10.1016/j.gene.2014.10.032

Wang Y, Miao L, Satterlee A, Huang L. (2015). Delivery of oligonucleotides with lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Feb 27. pii: S0169-409X(15)00018-6. doi: 10.1016/j.addr.2015.02.007.

Welch, C., Chen, Y. and Stallings, R.L. (2007). MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 26, 5017–5022.

Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Patrawala L, Brown D, Bader AG. (2010). Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res.* 2010 Jul 15;70(14):5923-30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0655. Epub 2010 Jun 22.

Wightman, B., Ha, I., and 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.

Wu J, Huang W and He Z. (2013). Dendrimers as Carriers for siRNA Delivery and Gene Silencing: A Review. Hindawi Publishing Corporation, *The ScientificWorld Journal*, Volume 2013.

Wu Y, Crawford M, Yu B, Mao Y, Nana-Sinkam SP, Lee LJ. (2011). MicroRNA delivery by cationic lipoplexes for lung cancer therapy, *Mol. Pharm.* 8 (2011) 1381–1389.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304:594–596.

Zhang B, Wang Q and Pan X. (2007). MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Animals and Plants. *Journal of Cellular Physiology* 210:279–289

Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. (2013). Progress in microRNA delivery. *J Control Release*. 2013 Dec 28;172(3):962-74. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.09.015.

Zhao J, Kelnar K, Bader AG. (2014). In-Depth Analysis Shows Synergy between Erlotinib and miR-34a. *PLoS One*. 2014 Feb 14;9(2):e89105. doi: 10.1371/journal.pone.0089105. eCollection 2014.

Zhu Z, Zhang X, Wang G, Zheng H. (2014). Role of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma. *Hepat Mon*. 2014 August; 14(8): e18672; DOI: 10.5812/hepatmon.18672

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Aleksei Brjalin

(sünnikuupäev: 31.05.1990.)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
„MikroRNA transfektsioonimeetodite võrdlus A549 ja PPC-1 rakkudes“

mille juhendajad on Tarmo Annilo, PhD; Ana Rebane, PhD
ja kaasjuhendaja on Egon Urgard, MSc

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015.