

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

**Inimese embrüonaalsete tüvirakkude transfekterimine siRNA-ga kasutades
rakku sisenevat peptiidi PepFect 14**

Magistritöö (30 EAP)

Egle-Helene Ervin

Juhendajad PhD Martin Pook
MSc Indrek Teino
prof Toivo Maimets

TARTU 2018

Inimese embrüonaalsete tüvirakkude transfekteerimine siRNA-ga kasutades rakku sisenevat peptiidi PepFect 14

Inimese embrüonaalsete tüvirakkude (hES rakud, ingl k *human embryonic stem cells*) potentsiaali rakendamine teaduses ja meditsiinis on osaliselt raskendatud seetõttu, et puudub efektiivne transfektsioonimeetod, mis ei mõjuks rakkude elulemusele ega pluripotentsusele. Käesolevas töös loodi uudne meetoodika hES rakkude transfekteerimiseks siRNA-ga kasutades rakku sisenevat peptiidi PepFect 14 (PF14). Meetodi sobivuse ja spetsiifilisuse testimiseks kasutati sihtmärkidenä pluripotentsusfaktorit OCT4 ning rakumembraanil paiknevat β -2-mikroglobuliini (B2M). Seejuures näidati, et PF14 vahendusel on võimalik vaigistada OCT4 ekspressioon vähemalt 70% rakkudest ja indutseerida mRNA taseme 10-kordne vähenemine. Lisaks selgus, et siRNA/PF14 kompleksid sobivad ka B2M ekspressiooni vaigistamiseks. Antud meetodi rakendatavust hES rakkudega seotud uuringutes kinnitab töös tuvastatud neuroektodermaalne diferentseerumine OCT4-siRNA transfektsiooni järgselt ning B2M ekspressiooni vähenemine antud diferentseerumise varajastel etappidel.

Märksõnad: hES rakud, PepFect 14, siRNA, OCT4, B2M

B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia

siRNA transfection of human embryonic stem cells using cell penetrating peptide PepFect 14

Implementation of human embryonic stem (hES) cells in science and medicine has been challenging to date at least in part due to the lack of transfection method with high efficiency and low cytotoxicity. As a result of this study, a novel method based on cell penetrating peptide PepFect 14 (PF14) and siRNA for transfection of hES cells was created. To evaluate the suitability and specificity of the method, pluripotency factor OCT4 and membrane associated β -2-microglobulin (B2M) were chosen as targets. Consequently, OCT4 downregulation in at least 70% of transfected cells and 10-fold decline in mRNA level was achieved. Furthermore, PF14 proved to be suitable for silencing of genes not related to developmental potential as transient and modest downregulation of B2M was attained. Neuroectodermal differentiation upon OCT4-siRNA transfection further verified PF14 applicability in hES cells related studies.

Keywords: hES cells, PepFect 14, siRNA, OCT4, B2M

B200 Cytology, oncology, cancerology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Inimese embrüonaalsed tüvirakud.....	7
1.1.1 hES rakkude pluripotentsus ja diferentseerumine	8
1.2 RNA interferents.....	11
1.3 hES rakkude transfekteeerimine	13
1.3.1 Rakku sisenevad peptiidid ja PepFect 14.....	18
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	20
2.1 Töö eesmärk.....	20
2.2 Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1 Rakkude kasvatamine koekultuuris.....	20
2.2.2 Passeerimine transfekteeerimiseks.....	20
2.2.3 Transfektsioonikomplekside komponendid ja moodustumine	21
2.2.4 Transfekteeerimine	22
2.2.5 Valgusmikroskoopia	24
2.2.6 Rakkude elulemuse hindamine	24
2.2.7 Läbivoolutsütomeetria	24
2.2.8 Immunofluorestsentsmikroskoopia	26
2.2.9 RNA isoleerimine, cDNA süntees ja kvantitatiivne PCR.....	27
2.2.10 Diferentseerimine neuraalses suunas	29
2.2.11 Statistiline analüüs	30
2.3 Tulemused ja arutelu.....	31
2.3.1 PF14 transpordib siRNA hES rakkudesse väga efektiivselt	31
2.3.2 Protokollide optimeerimine rakkude elulemusest ning transfektsiooniefektiivsusest lähtudes.....	34
2.3.3 Kõrgem siRNA ning PF14 kontsentratsioon mõjub rakkude elulemusele	36
2.3.4 OCT4-siRNA põhjustab nii valgu kui ka mRNA taseme alanemise.....	40
2.3.5 siRNA ja PF14 on sobilikud ka β -2-mikroglobuliini ekspressiooni vaigistamiseks	43
2.3.6 OCT4 vaigistamine indutseerib diferentseerumise neuroektodermaalses suunas	45
2.3.7 B2M ekspressioon väheneb varasel neuroektodermaalsel diferentseerumisel	49
KOKKUVÕTE	51
SUMMARY	53
TÄNUSÖNAD	55
KASUTATUD KIRJANDUS.....	56
KASUTATUD VEEBILEHED	62
LISAD	63
Lisa 1.....	63
Lisa 2.....	64
Lisa 3.....	65
LIHTLITSENTS.....	66

KASUTATUD LÜHENDID

B2M	β-2-mikroglobuliin
bFGF	aluseline fibroblasti kasvufaktor (ingl k <i>basic fibroblast growth factor</i>)
BSA	veise seerumi albumiin (ingl <i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementaarne DNA (ingl k <i>complementary DNA</i>)
CR	laengute suhe (ingl k <i>charge ratio</i>), tuntud ka kui N/P
Ct	lävitsükkel (ingl k <i>threshold cycle</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenüülindool (ingl <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
ES rakud	embrüonaalsed tüvirakud (ingl <i>embryonic stem cells</i>)
FBS	veise loote seerum (ingl <i>fetal bovine serum</i>)
FC	muutus kordades (ingl k <i>fold change</i>)
FCM	läbivoolutsütomeetria (ingl k <i>flow cytometry</i>)
FSC	valguse otsehajuvust iseloomustav parameeter (ingl k <i>forward scatter</i>)
gMFI	fluorestsentsi intensiivsuse geomeetiline keskväärtus (ingl <i>geometric mean fluorescence intensity</i>)
hES rakud	inimese embrüonaalsed tüvirakud (ingl <i>human embryonic stem cells</i>)
ICM	sisemine rakumass (ingl <i>inner cell mass</i>)
MEF	hiire embrüonaalsed fibroblastid (ingl k <i>mouse embryonic fibroblasts</i>)
MHC I	peamine koosobivuskompleks I (ingl k <i>major histocompatibility complex I</i>)
miRNA	mikro-RNA
NANOG	transkriptsioonifaktor, mis on nime saanud liri mütoloogia Nooruse maa järgi (iiri <i>Tir na nOg</i>)
NGS	preimmuunse kitse seerum (ingl <i>normal goat serum</i>)
NIM sööde	sööde, mis indutseerib diferentseerumise neuraalses suunas (ingl k <i>neural induction medium</i>)
N/P	lämmastiku (N) ja fosfori (P) suhe

OCT4	oktameeriga seonduv transkriptsioonifaktor 4 (ingl <i>octamer-binding transcription factor 4</i>)
PBS	fosfaat-puhverdatud soolalahus (ingl <i>phosphate buffered saline</i>)
PE	fükoerütriin (ingl k <i>phycoerythrin</i>)
PF14	rakku sisenev peptiid PepFect 14
PFA	paraformaldehüüd
POLR2A	RNA polümeraas II subühik A
qPCR	kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (ingl k <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RISC	RNA poolt indutseeritud vaigistamise kompleks (ingl k <i>RNA induced silencing complex</i>)
RNAi	RNA interferents
RPL13A	ribosoomi valk L13a (ingl k <i>Ribosomal Protein L13a</i>)
ROCK	Rho sõltuv proteiinkinaas (ingl <i>Rho-associated protein kinase</i>)
RT	pöördtranskriptsioon (ingl k <i>reverse transcription</i>)
siRNA	lühike vaigistav RNA (ingl k <i>short interfering RNA</i>)
SOX2	SRY valgule omast domääni sisaldav transkriptsioonifaktor 2 (ingl k <i>SRY-box 2</i>)
SSC	valguse külghajuvust iseloomustav parameeter (ingl k <i>side scatter</i>)
T	transfekteerimata rakkudega proov
TBP	TATA-järjestusele seonduv valk (ingl k <i>TATA-binding protein</i>)

SISSEJUHATUS

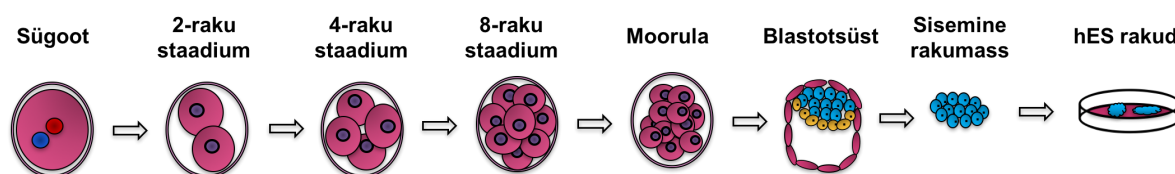
Inimese organismis on 200 erinevat rakutüüpi. Iga rakutüübi olulisust näitab see, et kui mõni neist on puudu või defektne, siis see takistab organismi korrektset funktsioneerimist ja on seotud haiguse kujunemisega. Näiteks diabeet on tingitud pankrease Langerhansi saarte β -rakkude puudulikust talitlusest või hävimisest ning neurodegeneratiivsed haigused on seotud närvisüsteemi rakkude kahjustumise ja surmaga. Lisaks mainitud patoloogiatele, millest viimased avalduvad valdavalt täiskasvanu eas, on mitmed tõsised sündroomid põhjustatud väärengutest embrüonaalse arengu käigus. Kõikide mainitud probleemide lahendamiseks on hindamatu väärtusega inimese embrüonaalsed tüvirakud. Need on saadud organismi varases arengus esinevast blastotsüsti staadiumis embrüost ning neid iseloomustab piiramatu jagunemisevõime ja potentsiaal anda kõiki organismi rakutüüpe. Seeläbi on inimese embrüonaalseid tüvirakke võimalik rakendada regeneratiivmeditsiinis soovitud rakutüüpide tekitamiseks ning arengubioloogias varases arengus toimuvate protsesside mõistmiseks. Veelgi enam, tüvirakkudest saadud derivaate on võimalik kasutada ka ravimiuuringutes ning haigusmodelite loomisel. Inimese embrüonaalsete tüvirakkude potentsiaali rakendamiseks on vajalik aga mõista molekulaarseid mehhanisme, mis reguleerivad nende arengupotentsiaali ja jagunemisevõimet. Käesoleva magistritöö eesmärk oligi luua transfektsioonimetoodika, mille abil uurida erinevate geenide rolli inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes, kasutades RNA interferentsi mehhanismi, ning seeläbi aidata kaasa pluripotentsete rakkude laialdasemale kasutamisele teaduses ja meditsiinis.

Antud töö teooriaosas antakse ülevaade nii inimese embrüonaalsetest tüvirakkudest, nende pluripotentsusest ja transfekteeerimisest kui ka RNA interferentsist. Eksperimentaalselt näidatakse esmakordselt, et rakku sisenev peptiid PepFect 14 sobib eelkõige tänu kõrgele transfektsiooniefektiivsusele ja madalale tsütotoksilisusele inimese embrüonaalsete tüvirakkude transfekteeerimiseks siRNA-ga.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Inimese embrüonaalsed tüvirakud

Inimorganismi areng algab viljastatud munaraku ehk sügooti tekkimisega (Joonis 1). Ühest rakust hulkrakse organismi moodustumiseks hakkab sügoot jagunema, mille tulemuseks on ühetaolistest rakkudest koosnev kobarloode ehk moorula. Järgnev esimene diferentseerumine tekitab blastotsüsti, milles on eristunud trofektoderm ja sisemine rakumass (ICM, ingl k *inner cell mass*). Trofektodermi rakud on eellaseks lootepoolsetele ekstraembrüonaalsetele kudedele (nt platsenta) ning ICM rakkudest moodustub uus organism. Blastotsüsti staadiumis oleva embrüo ICM-ist eraldatud rakke, mida kasvatatakse koekultuuris, nimetataksegi inimese embrüonaalseteks tüvirakkudeks (hES rakud, ingl *human embryonic stem cells*). (Thomson *et al.*, 1998)



Joonis 1. Inimorganismi varane areng ja embrüonaalsed tüvirakud. Inimorganismi areng algab viljastatud munaraku ehk sügooti tekkimisega, mille lõigustumise tulemusel moodustub 4-st rakust koosnev rakukogum. Rakkude järgneva jagunemise tulemusel läbib embrüo 8-raku ning kobarloote ehk moorula staadiumi. Peale esimest diferentseerumist tekib blastotsüst, milles on eristunud trofektoderm ning sisemine rakumass ehk ICM (joonisel siniselt). ICM rakkude kultiveerimisel saadakse hES rakud. (Winslow ja Duckwall järgi)

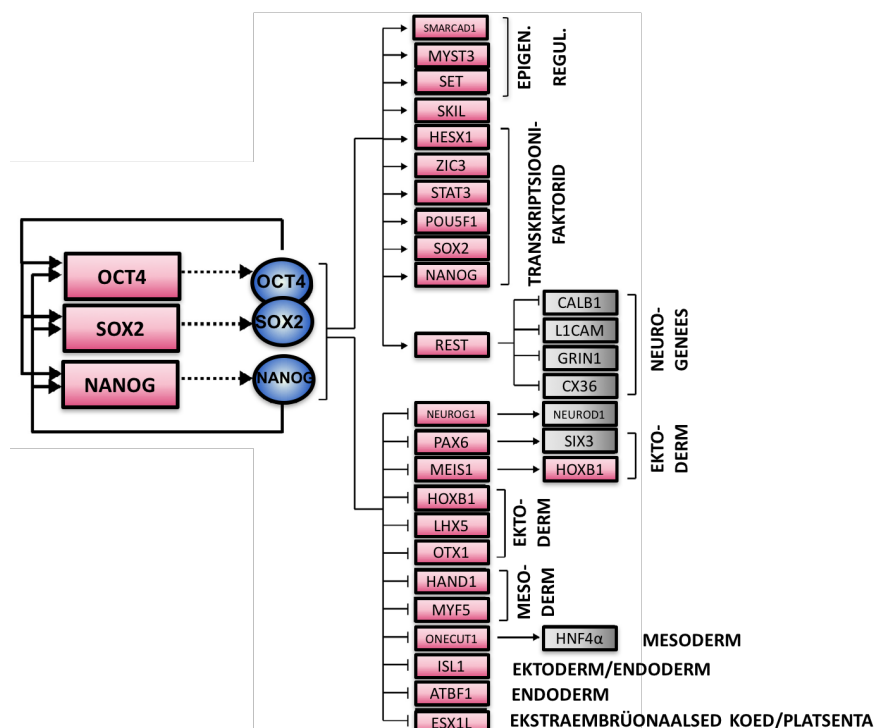
hES rakud on võimelised andma kõiki organismis leiduvaid rakutüüpe ehk kõigi kolme lootelehe (ekto-, meso- ja endodermi) derivaate. Seetõttu nimetatakse neid pluripotentseteks. Lisaks märkimisväärsele arengupotentsiaalile iseloomustab hES rakke piiramatult jagunemisvõime (Thomson *et al.*, 1998). Nende omaduste tulemusel on hES rakud võimelised andma soovitud rakutüüpe lõpmatul hulgal. Seeläbi on need hindamatu väärtusega arengubioloogias varase arengu mõistmisel, regeneratiivmeditsiinis rakuteraapias kasutamiseks ning ravimiuuringutes haigusmodelite loomisel. hES rakkude baasil loodud reetina pigmentepiteeli rakke ja kardiomyotsüüte on juba edukalt kasutatud vastavalt maakuli degeneratsiooniga haigete ravis ning südameravimi kandidaatide testimisel (Shiba *et al.*, 2009). Lisaks on proovitud leevendada diabeediga seotud sümptomeid siirdades organismi hES rakkude baasil loodud insuliini tootvaid pankrease β -rakke ning taastada motoorset võimekust seljaajukahjustusega patsientidel (Ilic *et al.*, 2015).

hES rakkude potentsiaali täielikuks rakendamiseks teaduses ja meditsiinis on oluline mõista, milliste molekulaarsete mehhanismide abil on reguleeritud pluripotentsuse säilimine ning diferentseerumine kindla funktsiooniga rakuks.

1.1.1 hES rakkude pluripotentsus ja diferentseerumine

On selge, et oleku tagamiseks, mis võimaldab iseennast taastoota või diferentseeruda ükskõik milliseks inimorganismis leiduvaks rakutüübiks, on vajalik väga täpselt toimiva regulatsiooni olemasolu. Seejuures on leitud, et hES rakkude identiteedi säilitamisel on põhiroll transkriptsioonifaktoritel OCT4 (tuntud ka kui POU5F1, POU domään, klass 5, transkriptsioonifaktor 1), SOX2 ja NANOG (Boyer *et al.*, 2005).

OCT4, SOX2 ja NANOG on põhilised pluripotentsusfaktorid, mis toimivad koos teiste transkriptsioonifaktorite ja kofaktoritega, et säilitada rakkude märkimisväärne arengupotentsiaal. Nimetatud valgud seonduvad reguleerivatele DNA järjestustele ning indutseerivad pluripotentsuseks vajalike ja represseerivad diferentseerunud rakkudele omaste geenide ekspressiooni (Joonis 2). Lisaks mitmete arengus oluliste geenide ekspressiooni reguleerimisele seonduvad OCT4, SOX2 ja NANOG ka iseenda ning üksteise promootoritele ja kasutavad autoregulaatorset tagasisidet pluripotentsuse säilitamiseks (Boyer *et al.*, 2005; Li ja Belmonte, 2017). Selline regulatsioon võimaldab stabiilset pluripotentsusfaktorite avaldumist, mis on vajalik märkimisväärse arengupotentsiaali tagamisel. Nimelt ei tohi regulaatorvalgu tase liialt palju varieeruda, sest nii OCT4 kui ka SOX2 liiga kõrge või liiga madal tase põhjustab hES rakkude diferentseerumise (Boer *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2007). Lisaks on tagasisidel põhinev mehhanism eelistatud, sest tagab kiire ja pöördumatu reageerimise keskkonnast tulevatele diferentseerumist indutseerivatele signaalidele (Alon, 2007). Kohene ulatuslik vastus on saavutatud sellega, et ühe faktori ekspressiooni vähenemisega kaasneb ka teise regulaatorvalgu taseme langus (Boyer *et al.*, 2005; Fong *et al.*, 2008). Selle heaks näiteks on OCT4 ekspressiooni vaigistamisel toimuv NANOG taseme alanemine ning rakkude kiire diferentseerumine neuroektodermaalses suunas, mis muidu on takistatud NANOG-i poolt (Boyer *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012). Seejuures on aga ka näidatud, et NANOG ja OCT4 on tihedalt koreguleeritud, kuid SOX2 ekspressioon võib säilida olenemata teiste pluripotentsusfaktorite tasemest (Boyer *et al.*, 2005). Kokkuvõttes on põhiliste faktorite mõõdukas ekspressioon ja väga täpne regulatsioon pluripotentsuse aluseks.



Joonis 2. Pluripotentsusvõrgustik. Põhilised pluripotentsusfaktorid OCT4, SOX2 ja NANOG indutseerivad nii iseenda kui ka eneseuundamisvõime ja märkimisväärse arengupotentsiaali säilitamiseks vajalike geenide ekspressiooni ning represseerivad diferentseerunud rakkudele omaste geenide avaldumist. Joonisel on esitatud protsessid ja diferentseerumissuunad ning vaid osa sihtmärkidest, mida põhilised pluripotentsusfaktorid reguleerivad. Lühendid: epigen. regul. – epigeneetiline regulatsioon. (Boyer *et al.*, 2005 järgi)

Lisaks on varasemate tööde tulemusel leitud, et rakkude pluripotentsus ja diferentseerumine on reguleeritud väliskeskkonnast tulevate signaalide poolt. Näiteks ekstratsellulaarsed faktorid WNT, ACTIVIN/NODAL ja aluseline fibroblasti kasvufaktor (bFGF, ingl k *basic fibroblast growth factor*) mõjutavad signaaliradade, kofaktorite ja korepressorite kaudu OCT4, SOX2 ja NANOG-i seondumist genoomsetele elementidele ning nende funktsioneerimist transkriptsiooni regulaatoritena (Babaie *et al.*, 2007). Kui Wnt signaalirada ei aktiveerita, on transkriptsioonifaktor TCF3 seondunud pluripotentsusgeenide regulaatoraladele ja ei võimalda OCT4, SOX2 ja NANOG-il nende ekspressiooni indutseerida. Wnt raja aktiveerituse korral moodustab β -kateniin kompleksi TCF3-ga ja takistab viimase represseerivat toimet ehk võimaldab pluripotentsusgeenide avaldumist (Cole *et al.*, 2008). Seejuures on genoomiüleste meetodite abil selgunud, et enamik sihtmärkgeene on kõigile kolmele põhilisele pluripotentsufaktorile ühised ning promootoril või võimendaval elemendil (ingl k *enhancer*) moodustunud kompleksi toime sõltub selles sisalduvatest komponentidest ja nende stöhhiomeetriast. On oluline mõista, et regulaatorkompleks ei moodustu ainult

OCT4, SOX2 ja NANOG osalusel, vaid sisaldab ka efektorvalke (näiteks kromatiini remodelleerijaid) ning regulatoorseid RNA-sid (Boyer *et al.*, 2005). Selline kombinatoorikal põhinev regulatsioon tagab väga peene kontrolli raku seisundi ja saatuse üle ning tulemusena saab pluripotentsusfaktorite sihtmärkgeenid jaotada kahte rühma. Nendest esimesse kuuluvad pluripotentsetes rakkudes ekspresseeritud geenid ja teise vaigistatud geenid, mis on olekus, mis võimaldab nende kiiret avaldumist diferentseerumise käigus. Näiteks indutseeritakse transkriptsioonifaktorite, signaaliradade komponentide ja kromatiini modifitseerivate ensüümide avaldumist, mis on vajalikud hES rakkude eneseuuendamiseks. Nende alla kuuluvad muu hulgas transkriptsiooni aktivaator STAT3 ning raku jagunemist kontrolliv proto-onkogeen SKIL. (Boyer *et al.*, 2005)

Transkriptsiooniliselt aktiivsed geenid moodustavad aga vaid poole OCT4, SOX2 ja NANOG sihtmärkidest. Ülejäänud geenide produktid on omased diferentseerunud rakkudele ja nende avaldumine hES rakkudes peab olema takistatud. Selliste hulka kuulub näiteks transkriptsioonifaktor MyoD, mis indutseerib lihasrakkudele omaste geenide ekspressiooni. OCT4, SOX2 ja NANOG-i vaigistav toime saavutatakse koostöös *Polycomb*-i repressiivsete kompleksidega (PRC, ingl k *Polycomb repressive complex*), mis seonduvad samuti DNA regulatoorsetele järjestustele, mõjutavad epigeneetilist seisundit ja põhjustavad kromatiini vaigistamist (Jaenisch ja Young, 2008). Näiteks katalüüsib PRC2 histoon H3 lüsiin 27 metüleerimist (H3K27me). H3K27me on seondumissaidiks PRC1-le, mis indutseerib kromatiini kondenseerumise (Stock *et al.*, 2007). Pluripotentsusfaktorite ja PRC poolt kontrollitud arenguliselt olulised geenid ei ole aga tavapäraselt vaigistatud. Nimelt toimub nendelt geenidelt transkriptsiooni initsiatsioon, kuid produktiivne elongatsioon on takistatud. Transkriptsioon algatatakse, sest vastavates piirkondades on olemas histoon H3 lüsiin 4 metülatsioon (H3K4me), mis toob kohale RNA polümeraasi. Seega on diferentseerumisel oluliste geenide regulaatorid bivalentses olekus ehk neil on olemas nii aktiveeritud kui repressiivsed kromatiinile omased märgid, mis võimaldab vastavate geenide väga kiiret avaldumist vastusena diferentseerumissignaalile (Bernstein *et al.*, 2006). Samuti on leitud, et diferentseerudes eemaldatakse kujunevale rakutüübile oluliste geenide järjestustelt PRC ja H3K27me, mis võimaldab nende täielikku transkribeerimist (Bernstein *et al.*, 2006). Samal ajal vaigistatakse OCT4 ekspressioon läbi repressorvalkude (nt ARP-1) seondumise, histoonide modifitseerimise ja DNA metüleerimise (Feldman *et al.*, 2006; Jaenisch ja Young, 2008). OCT4 taseme kiire languse põhjustab ka selle post-translatsiooniline modifitseerimine, näiteks ubikvitinüleerimine või fosforüleerimine, mis

takistavad seondumist DNA-le, mõjutavad valgu stabiilsust ja põhjustavad selle degradatsiooni (Cai *et al.*, 2012; Saxe *et al.*, 2009).

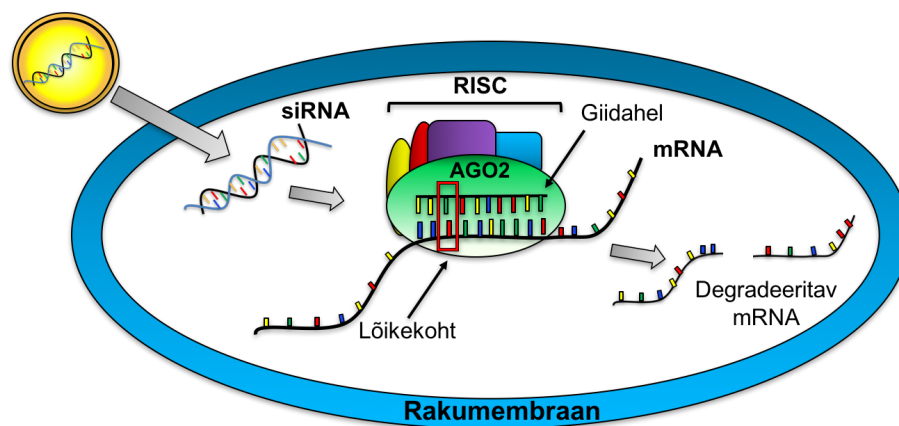
Seega on selge, et hES rakkude identiteedi määramisel on olulised transkriptsioonifaktorid OCT4, SOX2 ja NANOG, mis aktiveerivad pluripotentsusgeene ja represseerivad diferentseerumisel oluliste geenide avaldumist. Viimaste bivalentne seisund võimaldab aga väga kiiret spetsialiseerumist ja võib olla üheks põhjuseks, miks on hES rakke keeruline pluripotentsetena kultiveerida. Lisaks on teada mõningad rakuvälised regulaatorid, signaalirajad ja kofaktorid, mis mõjutavad arengupotentsiaali, kuid siiani ei ole täpselt selge paljude hES rakkudele spetsiifiliste geenide roll ning diferentseerumist kontrollivad molekulaarsed mehhanismid. Vastav teadmine oleks oluline, et mõista inimorganismi varast arengut ning suunata rakkude diferentseerumist regeneratiivmeditsiinis ning ravimiuuringutes kasutamiseks. Tuvastamaks geeni rolli bioloogilistes protsessides saab ära kasutada RNA interferentsi.

1.2 RNA interferents

RNA interferents (RNAi) ehk vaigistamine on post-transkriptsiooniline geeniekspressiooni regulatsiooni mehhanism, milles osalevad lühikesed (20-25 aluspaari pikkused) kaheaheelised RNA molekulid (Fire *et al.*, 1998). Tänu komplementaarse järjestusega seonduvate RNA-de osalusele on tegemist järjestusspetsiifilise protsessiga, mis võimaldab konkreetse geeni ekspressiooni vaigistada. Tekkinud tagajärgede uurimise kaudu saab informatsiooni vaigistatud geeni funktsioonide kohta.

RNAi toimimiseks vajalikud efektor-RNA-d võivad olla nii endogeenset kui ka eksogeenset päritolu. Raku sees toodetakse näiteks mikro-RNA-sid (miRNA-sid), mis ekspresseeruvad genoomis sisalduvatelt mitte-kodeerivate RNA-de geenidelt (Ambros, 2001; Piatek ja Werner, 2014). Lisaks on võimalik lühikesi oligonukleotiide luua keemilise sünteesi meetodil. Viimast kasutatakse laialdaselt lühikeste vaigistavate RNA-de (siRNA, ingl k *short interfering RNA*) tootmiseks. Olenemata päritolust toimivad nii miRNA kui ka siRNA RNA poolt indutseeritud vaigistamise kompleksi (RISC, ingl k *RNA induced silencing complex*) kaudu (Joonis 3). siRNA lülitatakse RISC-i koosseisu RISC laadimiskompleksi abil, millele järgneb ühe, nn kaasreisija (ingl k *passenger*) ahela lagundamine. Funktsionaalne ahel jääb aga seotuks RISC-i katalüütilise subühiku Argonaut perekonna valguga (AGO2) ning juhib RISC-i homoloogilise järjestusega sihtmärk mRNA-ni (Rand *et al.*, 2005). Sellise omaduse tõttu

nimetatakse antud RNA ahelat ka giidahelaks. siRNA funktsioneerimiseks on vajalik täielik komplementaarsus giidahela ja sihtmärkjärjestuse vahel, mis tähendab, et ühtegi valepaardumist ei ole lubatud (Hutvagner ja Zamore, 2002). Selline seondumine tagab väga spetsiifilise toimimise ning aktiveerib AGO2 valgu, mis on RNAas ja teeb katke mRNA-sse (Rand *et al.*, 2005). Katkenud mRNA on raku jaoks võõras ja lagundatakse. Seejuures toimib RISC nagu tõeline ensüüm ehk katke tekitamise järgselt vabaneb kompleksist mRNA ning sama RISC on võimeline indutseerima veel mitme mRNA lagundamise (Hutvagner ja Zamore, 2002). Erinevalt siRNA-st juhib miRNA RISC-i ka osaliselt komplementaarsetele järjestustele, mistõttu üks miRNA võib mõjutada mitme geeni ekspressiooni. Täiusliku komplementaarsuse puudumise tõttu ei aktiveeru ka AGO2 valk ja miRNA blokeerib mRNA translatsiooni, mitte ei indutseeri selle lagundamist. (Ambros, 2001; Doench ja Sharp, 2004)



Joonis 3. RNA interferents. Negatiivsete laengute tõttu ei ole siRNA võimeline iseseisvalt rakumembraani läbima ning vajab selleks näiteks transfektsioonireagendi abi. Tsütoplasmasse jõudnuna vabaneb kaheahelaline siRNA transporti vahendanud kapslist ning lülitatakse RISC koosseisu, milles kaasreisija ahel lagundatakse. RISC-iga assotsieerunud giidahel juhib efektor kompleksi täielikult komplementaarse järjestusega mRNA-ni ning indutseerib mRNA-sse katke tegemise AGO2 valgu poolt. mRNA, millesse löige tehti, lagundatakse, sihtmärkvalgu sünteesi ei toimu ja geeniekspressioon ongi vaigistatud. (Winslow ja Duckwall järgi)

Tänu siRNA suuremale spetsiifilisusele ja efektiivsusele on see eelistatud ekspressiooni vaigistamiseks ning seeläbi geeni funktsiooni uurimiseks. siRNA spetsiifilisuse tagamiseks on oluline aga sihtmärkgeeni järjestuse teadmine ja sellele vastava siRNA disain. Nimelt on näidatud, et siRNA võib seonduda ka osaliselt komplementaarsetele järjestustele ja toimida nagu miRNA (Doench *et al.*, 2003). Mitte-sihtmärkgeenide vaigistamine translatsiooni blokeerimise kaudu põhjustab ebasoovitavaid kõrvaltoimeid (Birmingham *et al.*, 2006). Seetõttu on eelistatud siRNA-de kasutamine, mis on loodud kasutades uusimaid *off-target* efekte ennustavaid algoritme ning mille koosseisu on lülitatud erilisi keemilisi

modifikatsioone ja nõ lukustatud nukleotiide (LNA, ingl k *locked nucleic acid*). LNA on ribonukleotiid, mille erisuseks on side riboosi 2'-hapniku ja 4'-süsiniku vahel (Lisa 1, Joonis 1). siRNA, mille koosseisus on LNA, on vastupidavam nukleaaaside suhtes ning spetsiifilisem ja efektiivsem geeniekspressiooni vaigistamisel (Elmén *et al.*, 2005). Selliselt loodud efektormolekulide hulka kuuluvad näiteks Ambion Silencer® Select sarja siRNA-d.

Keemiliselt sünteesitud siRNA-sid ja rakusisest RNAi masinavärki ära kasutades on võimalik lihtsalt ja efektiivselt takistada uuritava geeni avaldumist. Geeni vaigistamise tagajärjel aset leidvad muutused annavad teavet sihtmärkgeeni funktsioonide kohta. Seega on RNAi potentsiaalne tööriist tuvastamiseks molekulaarseid mehhanisme, mis reguleerivad hES rakkude pluripotentsust ja diferentseerumist. (Behnam Rassouli ja Matin, 2009)

1.3 hES rakkude transfekteeerimine

Tuvastamiseks RNAi abil geeni rolli hES rakkudes on vajalik siRNA või seda kodeeriv konstrukt rakku viia. Nimelt on võimalik näiteks viirusvektori abil sisestada järjestus, mis kodeerib lühikest juuksenõela struktuuri sisaldavat RNA-d (shRNA, ingl k *short hairpin RNA*) (Paddison *et al.*, 2002). shRNA protsessimisel saadakse siRNA, mis on võimeline RISC-iga seonduma ja geeniekspressiooni vaigistama. Kuigi loodeti, et rakus pidevalt sünteesitav shRNA tagab stabiilse ja kauakestva vaigistamise, on täheldatud, et hES rakkudes toimub transkriptsioon sisestatud järjestuselt vaid lühiaegselt. Võttes veel arvesse viirusvektori konstrueerimisega seotud bioohutuse probleeme ning protsessi aja- ja töömahukuse, on eelistatud keemiliselt sünteesitud valmis siRNA-de rakku viimine. (Ma *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2008)

Nukleiinhappele omased negatiivsed laengud ei võimalda siRNA-l iseseisvalt rakumembraani läbida ning seetõttu on vajalik spetsiaalsete transfektsioonimeetodite kasutamine (Joonis 3). Transfektsiooniks nimetatakse võõra nukleiinhappe (DNA või RNA) viimist eukarüotsesse rakku. Üheks levinuimaks transfektsioonimeetodiks on elektroporatsioon, mis seisneb rakumembraani läbilaskvuse suurendamises välise elektrivälja toimet. Nii hES rakkude elulemus kui ka transfektsiooniefektiivsus elektroporatsiooni kasutamisel on aga võrdlemisi madalad (Luft ja Ketteler, 2015). Imetajarakkude puhul on laialdaselt kasutatud ka lipiididel põhinevaid transfektsioonireagente, mis tänu oma positiivsetele laengutele ümbritsevad siRNA lipiidse kapsliga ja võimaldavad tekkinud partiklil raku sisemusse jõuda (Behnam Rassouli ja Matin, 2009). Lipiididel põhinev transfektsioon ehk lipofektsioon ei vaja spetsiaalse aparatuuri olemasolu ning on eelistatud just oma lihtsuse, odavuse, kiiruse ja

efektiivsuse tõttu. Kuigi lipofektsioon on andnud suurepäraseid tulemusi erinevatel rakuliinidel, ei sobi standardprotokollid keeruliselt manipuleeritavate hES rakkude geeniekspressiooni mõjutamiseks (Liu *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2008). Seetõttu on mitmed töörühmad proovinud leida metoodikat, mille abil hES rakke transfekteerida (Tabel 1). Seejuures on oluline tähelepanu pöörata mitmetele rakkude kultiveerimise ja transfekteerimisega seotud aspektidele, mis meetodi efektiivsust mõjutavad.

Kasvupind. hES rakud ei suuda kinnituda koekultuuri plastikule ning seetõttu kaetakse kasvupind toiterakkudega (ingl k *feeder cells*) või ekstratsellulaarse maatriksi komponentidega (näiteks kollageen IV, laminiin, proteoglükaanid). Esmalt kasutati hES rakkude kultiveerimiseks hiire kiiritatud embrüonaalseid fibroblaste (MEF, ingl k *mouse embryonic fibroblasts*), mis ei ole jagunemisvõimelised, kuid sekreteerivad keskkonda kasvufaktoreid ja tsütokiine (Thomson *et al.*, 1998). Toiterakkude kasutamine on aga töömahukas ning nende populatsioonid on varieeruvate omadustega. Viimane võib põhjustada muutusi ka tüvirakkudes ning ei võimalda seetõttu omavahel võrreldavate eksperimentide sooritamist. (Desai *et al.*, 2015) Veelgi enam, hES rakkude transfekteerimisel jõuavad siRNA-ga kompleksid ka toiterakkudesse ning seeläbi uuritavate rakkude transfekteerimise efektiivsus langeb (Denning *et al.*, 2006). Nimetatud puuduste tõttu on teaduses kõige laialdasemalt levinud hES rakkude kasvupinnaks Matrigel (Desai *et al.*, 2015). Tegemist on hiire teratokartsinoomi rakkude poolt sekreteeritud ekstratsellulaarse maatriksi komponentide seguga, mis on želatiini sarnase konsistentsiga ning sisaldab nii kollageen IV, laminiini, proteoglükaane, entaktiini kui ka mitmeid kasvufaktoreid (Kleinman, 2001).

Passeerimisviis. Lisaks sellele, et hES rakud ei suuda kinnituda plastikule, vajavad need ka üksteise lähedust (Eiges *et al.*, 2001; Phadnis *et al.*, 2015). Nimelt kasvavad hES rakud kolooniatena ja rakk-rakk kontaktide puudumisel aktiveerivad apoptoosiraja (Li *et al.*, 2012; Pyle *et al.*, 2006). Imetajarakkude kultiveerimise oluliseks osaks on aga ka passeerimine ehk protsess, mille käigus vabastatakse pinnale kinnitunud rakud kasvusubstraadilt ja külvatakse hõredamalt uuele tassile. See on vajalik, et võimaldada rakkude jagunemine. Arvestades rakk-rakk kontaktide olulisust, on hES rakkude puhul eelistatud kolooniatükkide vabastamine ja edasi kandmine uuele kasvupinnale (Thomson *et al.*, 1998; Zaehres *et al.*, 2005). Passeerimine suuremate raku agregaatidena tagab kõrge elulemuse, kuid ei sobi hES rakkudega manipuleerimiseks, sest kogumiku sisemuses olevate rakkudeni mõjutus ei jõua

(Ma *et al.*, 2010). Seetõttu on vajalik rakk-rakk kontaktide lõhkumine ning tekkinud üksikrakkude külvamine uuele kasvupinnale. Rakkude elulemuse parandamiseks üksikrakulisel passeerimisel kasutatakse Rho valgu poolt reguleeritud kinaasi (ROCK, ingl k *Rho-associated protein kinase*) inhibiitorit, mis takistab rakkudel apoptoosi programmi läbimist (Watanabe *et al.*, 2007). Lisaks tuleb arvestada, et hES rakud on tundlikud trüpsiini suhtes ja seetõttu kasutatakse leebemaid dissotsiatsioonireagente ning ühendeid (näiteks kollageenaas IV, akutaas, EDTA) (Bajpai *et al.*, 2008; Kim, 2008; Ma *et al.*, 2010; Schatten *et al.*, 2005).

Passeerimisaeg. Rakkude passeerimise juures on oluline ka antud protseduuri toimumise aeg. Lipofektsiooni läbiviimiseks külvatakse rakud tavaliselt 1 päev enne transfektsiooni komplekside lisamist (Braam *et al.*, 2008; Hay *et al.*, 2004). Selline metoodika on vajalik, sest hES rakud on tundlikud nii passeerimise kui ka transfektsioonireagentide suhtes ja topeltmõjutuse tulemusel väheneb rakkude elulemus drastiliselt (Liu *et al.*, 2016). Samas on leitud, et rakkude külvamine vahetult enne transfekteerimist suurendab komplekside ligipääsetavust rakkudele ja/või rakkude vastuvõtlikkust komplekside suhtes (Villa-Diaz *et al.*, 2010). Siiani on näidatud, et viimase strateegia rakendamiseks on hädavajalik hES rakkude inkubeerimine ROCK inhibiitoriga söötmes nii enne kui ka peale transfekteerimist, kuid isegi sellisel juhul ei õnnestu täielikult vältida meetodi toksilist mõju (Liu *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2010).

Külvatavate rakkude arv. Varasemate uuringute tulemusel on leitud, et meetodi efektiivsus sõltub rakkude konfluentsusest ehk tihedusest kasvupinnal komplekside lisamise hetkel (Braam *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2004; Veldhoen *et al.*, 2006). Tõenäoliselt on see seotud nii rakkudele ligipääsetavusega kui ka komplekside arvuga ühe raku kohta, mis ei tohiks olla ei liiga suur ega ka liiga väike (Liu *et al.*, 2016). Kui rakke on palju, siis igasse rakku komplekse ei jätku ning siRNA puudumisel geeniekspressiooni ei vaigistata. See on kriitiline pluripotentsusfaktorite rolli uurimisel, et vältida transfekteerumata ning seetõttu diferentseerumata ja kiiremini jagunevate rakkude muutumist populatsioonis valdavaks (Ma *et al.*, 2010; Zaehres *et al.*, 2005). Üldiselt on rakku jõudvate komplekside hulk eriti oluline just kiiresti jagunevate rakkude (näiteks hES rakkude) puhul, milles siRNA lahjeneb tekkinud tütarakkude vahel jaotudes (Bartlett ja Davis, 2006). Samal ajal tuleb aga ka silmas pidada, et liiga hõredalt paiknevad rakud ei ole võimelised omavahel ühendusi looma ning liiga suur

hulk komplekse raku kohta võib olla toksiline ja põhjustada membraani ebastabiilsust (Parhamifar *et al.*, 2010).

Eelnevalt käsitletud faktorid on märkimisväärse tähtsusega eksperimendi õnnestumise seisukohalt, kuid lõpliku lähenemise ja efektiivsuse määrab ära transfektsioonireagent (hES rakkudel peamiselt kasutatud Oligofectamine, Lipofectamine 2000 ja Lipofectamine RNAiMAX). Seejuures mõjutab lipiididel põhinevate reagentide toksilisus (Chernousova ja Epple, 2017; Parhamifar *et al.*, 2010) ja madal efektiivsus peamiselt läbiviidavate **transfektsioonide kestust ja arvu** (Braam *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008). Vähendamaks transfektsioonil kasutatava ühendi mõju rakkude elulemusele, on lühendatud transfekteerimise aega (Hay *et al.*, 2004) või lisatud 4 tundi peale transfektsiooni algust reagenti lahjendamiseks täiendav kogus söödet (Braam *et al.*, 2008). Lipofektsiooni madala efektiivsuse tõttu tuleb aga geeniekspressiooni vaigistamiseks ja selle taastumise vältimiseks läbi viia mitu transfektsiooni (tavaliselt 2) (Hay *et al.*, 2004; Hyslop *et al.*, 2005). Lisaks peab silmas pidama, et kasutatava ühendi toksilisusest, efektiivsusest ja laengust sõltub, milline on optimaalne reagenti ja siRNA suhe ning kontsentratsioon (Ma *et al.*, 2010). Tuvastatud fenotüübi interpreteerimise seisukohast on oluline mõista, et mida kõrgem on kasutatav **siRNA kontsentratsioon**, seda suurem on tõenäosus ebaspetsiifiliste efektide esinemiseks (Caffrey *et al.*, 2011).

Varasemate tööde analüüsil selgub, et lipofektsiooni abil ning topeltransfektsiooni, kõrge siRNA kontsentratsiooni ja mõningatel juhtudel ka täiendavate manipulatsioonide tulemusel on saavutatud arvestatavaid tulemusi hES rakkude geeniekspressiooni mõjutamisel. Näiteks OCT4 vaigistamisele suunatud tööde võrdlemisel selgub, et kõige sobivam reagent on spetsiaalselt siRNA transpordiks disainitud Lipofectamine RNAiMAX, mille abil on saavutatud ekspressiooni vähenemine kuni 95%. Antud tulemuseni jõudmiseks kasutasid Liu ja kaastöötajad üksikrakulist passeerimist koos ROCK inhibiitoriga ning näljutasid rakke transfekteerimise eel (Liu *et al.*, 2016). Seejuures tuleb arvestada, et iga täiendav manipulatsioon võib potentsiaalselt mõjutada hES rakkude omadusi. Seega puudub siiani meetod, mis ei mõjuks rakkude elulemusele ja pluripotentsusele ning oleks sobilik hES rakkude lihtsaks, kiireks ja efektiivseks transfekteerimiseks. Potentsiaalseks, kuid seni hES rakkudel rakendamata lahenduseks võiks olla rakku sisenevate peptiidide kasutamine.

Tabel 1. Varasemad uurimistööd, milles on kasutatud lipofektsiooni reagente ja siRNA-sid hES rakkude transfekteeerimiseks. Tulbas “Tulemus” on esitatud ekspressiooni vähenemine valgu või mRNA (tähistatud: ^{RNA}) tasemel protsentides võrrelduna kontrollprooviga. Seejuures on erinevates töodes vaigistamise efektiivsust hinnatud erinevatel ajapunktidel kasutades erinevaid meetodikaid ning erinevaid kontrollproove. Tulbas “siRNA” on esitatud siRNA kontsentratsioon nanomolaarsena (nM). Sümbolid: –, informatsioon või kvantitatiivne tulemus puudub. Lühendid: LF, Lipofectamine; MEF, hiire embrüonaalsed fibroblastid; OF, Oligofectamine.

Reagent	Sihtmärk	Kasvupind	Transfekteeerimine		siRNA (nM)	Tulemus	Publikatsioon
			Arv	Kestus			
LF 2000	OCT4	Matrigel	2	6 h	80	70%	Hay <i>et al.</i> , 2004
			2	–	80	70%	Babaie <i>et al.</i> , 2007
			2	–	100	43% ^{RNA}	Zhao <i>et al.</i> , 2008
			2	24 h	90 - 360	80%	Ma <i>et al.</i> , 2010
	NANOG	Matrigel	2	24 h	100	65%	Hyslop <i>et al.</i> , 2005
	SOX2	Matrigel	1	24 h	100	–	Braam <i>et al.</i> , 2008
	Lin28	Matrigel	2	24 h	90 - 360	100%	Ma <i>et al.</i> , 2010
OF	OCT4	MEF	1	24 h	167	–	Matin <i>et al.</i> , 2004
		Matrigel	2	–	100	58% ^{RNA}	Zhao <i>et al.</i> , 2008
		Matrigel	2	6-8 h	–	55%	Liu <i>et al.</i> , 2016
	B2M	MEF	1	24 h	167	70%	Matin <i>et al.</i> , 2004
RNAiMAX	OCT4	Matrigel	2	–	100	90% ^{RNA}	Zhao <i>et al.</i> , 2008
		Matrigel	2	24 h	50	–	Adachi <i>et al.</i> , 2010
		Matrigel	2	6-8 h	–	95%	Liu <i>et al.</i> , 2016
	SOX2	Matrigel	2	24 h	50	75% ^{RNA}	Adachi <i>et al.</i> , 2010

1.3.1 Rakku sisenevad peptiidid ja PepFect 14

Rakku sisenevad peptiidid (CPP-d, ingl k *cell penetrating peptides*) on lühikesed, vähem kui 30 aminohappe pikkused järjestused, mis on võimelised läbima bioloogilisi membraane ja seeläbi vahendama mitmete lastmolekulide transporti rakku (Zorko ja Langel, 2005).

siRNA transpordiks kasutatavad CPP-d koosnevad peamiselt positiivselt laetud aminohapetest (näiteks lüsiin ja arginiin) tänu millele moodustub mittekovalentne kompleks negatiivselt laetud nukleiinhappega. Selliste CPP-de hulka kuuluvad spetsiaalselt nukleiinhapete transpordiks disainitud peptiidide perekonna PepFect liikmed. Kõik PepFectid on amfipaatseid ja loodud transportaani 10 (TP10) baasil, kuid erinevad üksteisest lisatud modifikatsioonide poolest (Andaloussi *et al.*, 2011; Ezzat *et al.*, 2011). TP10 on peptiid, mille N-terminaalne järjestus on pärit neuropeptiid galaniinist ning C-terminaalne mastorpaanist. Vastavad järjestused on omavahel ühendatud lüsiini jäägi abil (Pooga *et al.*, 1998). Galaniin on nii inimeste kui ka teiste imetajate ajus ja soolestikus toodetav G-valk retseptori kaudu toimiv neuropeptiid ning mastorpaan on herilase mürgis leiduv ühend. Seega põhinevad mitmed teaduses kasutatavad CPP-d looduses leiduvate järjestuste omavahelisel kombineerimisel ning nende järgneval modifitseerimisel. (Said Hassane *et al.*, 2010)

Sellisel on loodud PepFect 14 (PF14), mille N-terminusse lisatud stearüüljääk suurendab võimet nanokomplekse moodustada ja hiljem kompleksidel endosoomist vabaneda (Ezzat *et al.*, 2011). Viimane on oluline, sest on näidatud, et amfipaatse CPP osalusel moodustunud kompleksid sisenevad rakkudesse peamiselt endotsütoosi teel (Deshayes *et al.*, 2005). Endotsütoos on protsess, kus rakk võtab sisse väliskeskkonnas olevaid makromolekule, ümbritsedes need rakumembraaniga. Tekkinud endosoom võib tsütoplasmas liituda lüsoosoomiga, mille tulemusena vesiikulis sisalduvad siRNA ja CPP degradeeritakse. Seetõttu on soovitava efekti saavutamiseks oluline, et CPP aitaks nanokompleksil endosoomist vabaneda ja lastmolekul jõuaks raku kompartmenti, kus oma funktsiooni täita. Lisaks on PF14 puhul lüsiinid ja isoleutsiinid asendatud vastavalt ornitiinide ja leutsiinidega. On näidatud, et ornitiinide kasutamine peamise positiivselt laetud aminohappena suurendab peptiidi afiinsust nukleiinhappe suhtes ja seeläbi on võimalik stabiilsete komplekside moodustumine madalama DNA või RNA kontsentratsiooni juures. Modifikatsioonide tulemusel on PF14 suureks eeliseks vähene või puuduv tsütotoksilisus ning kõrge

transfektsiooniefektiivsus, mis ei sõltu rakkude tihedusest kasvupinnal ehk konfluentsusest (Ezzat *et al.*, 2011). Seejuures on PF14 edukalt kasutatud splaissimist korrigeerivate oligonukleotiidide (SCO, ingl *splice-correcting oligonucleotides*), siRNA ja plasmiidse DNA transpordil *in vitro* ja *in vivo*. Lisaks on PF14 vahendusel viidud valke indutseeritud pluripotentsetesse tüvirakkudesse (iPS rakud, ingl *induced pluripotent stem cells*) ning plasmiidset DNA-d hiire embrüonaalsetesse tüvirakkudesse. (Van Asbeck *et al.*, 2013; Ezzat *et al.*, 2011; Veiman *et al.*, 2013)

Võttes arvesse, et tsütotoksilisus ja madal efektiivsus on peamiseks takistuseks lipofektsiooni reagentide kasutamisel ning lähtudes CPP-dega saavutatud positiivsetest tulemustest, on PF14 potentsiaalne vahend hES rakkude geeniekspressiooni mõjutamiseks. Käesolevas magistritöös uuritigi PF14 rakendatavust hES rakkude transfekkeerimisel siRNA-ga, et välja töötada meetod, mis võimaldaks RNAi protessi ära kasutades uurida nii pluripotentsuse, diferentseerumise kui ka üldisemalt hES rakkude funktsioneerimisega seotud molekulaarseid mehhanisme.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärk

Käesoleva magistritöö põhieesmärk oli uurida ja arendada rakku siseneva peptiidi PepFect 14 (PF14) rakendatavust hES rakkude transfekteerimisel siRNA-ga. Põhieesmärki toetavad vahe-eesmärgid olid järgmised:

1. hinnata transfektsiooni- ja vaigistamise efektiivsust;
2. töötada välja optimaalne protokoll ja kasutada seda hES rakkudes geeniekspressiooni vaigistamiseks.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Rakkude kasvatamine koekultuuris

Töös kasutati inimese embrüonaalsete tüvirakkude (hES rakkude) liini H9 (46, XX; WA09, National Stem Cell Bank). hES rakke kasvatati 37°C juures veeauruga küllastatud inkubaatoris, milles CO₂ sisaldus oli 5%. Kasvupinnana kasutati Matrigeliga (BD Biosciences) kaetud 6-kannulisi koekultuuri plaate (kasvupindala 9,6 cm²). Kultiveerimiseks kasutati defineeritud koostisega mTeSR1 (STEMCELL Technologies) söödet, mida vahetati iga päev. Rutiinsel kasvatamisel passeeriti rakke mehhaaniliselt iga 3-4 päeva järel vabastades kolooniatükid kasvupinnalt plastikust pipetiotniku abil. Töös kasutatud hES rakkude passaažiarv jäi vahemikku 40-55. hES rakkude igapäevase kultiveerimisega tegeles Tartu Ülikooli rakubioloogia õppetooli laborant.

2.2.2 Passeerimine transfekteerimiseks

hES rakkude transfekteerimiseks passeeriti neid vahetult enne transfektsioonikomplekside lisamist kasutades 0,5 mM EDTA-PBS lahust. Esmalt eemaldati rakkudelt sööde, pesti 0,5 mM EDTA-PBS lahusega ning seejärel inkubeeriti rakke 0,5 mM EDTA-PBS lahusega 8-10 min hoides plaati soojal (37°C) pinnal. Mikropipetti kasutades suspendeeriti rakke EDTA-PBS lahuses ja saadud rakususpensioon kanti üle 15 ml mahuga tsentrifuugi tuubi. Kasvupinda pesti täiendavalt PBS-iga ning EDTA eemaldamiseks rakkude kasvukeskkonnast tsentrifuugiti 200g juures 5 min kasutades tsentrifuugi 4K15C (Sigma-Aldrich). Supernatant aspireeriti ja rakud suspendeeriti värskes mTeSR1 söötmes. Rakkude loendamiseks kasutati hemotsütomeetria kambrit ja automatiseeritud rakuloendurit

Countess II (ThermoFisher). Saadud andmete põhjal valmistati vajaliku rakkude tihedusega (valdavalt 450 000 rakku/ml) suspensioon ning igasse eelnevalt Matrigeliga kaetud kasvuplaadi kannu viidi 1 ml rakkudega söödet.

2.2.3 Transfektsioonikomplekside komponendid ja moodustumine

Transfekteerimiseks kasutati kahekomponendilisi nanokomplekse, mis koosnesid omavahel mittekovalentselt seotud rakku sisenevast peptiidist PepFect 14 (PF14) ning siRNA-st. PF14 sünteesiti firma Pepscan poolt eritellimuse alusel ning oli järgneva järjestusega: stearyül-AGYLLGKLLLOOLAAAALOOLL-NH₂. Alexa Fluor 647 märgisega konjugeeritud AllStars Negative Control siRNA-d (siRNA-Alexa 647, Qiagen) ja Eurofins Genomics poolt sünteesitud Alexa Fluor 568 märgisega siRNA-d (siRNA-Alexa 568, sense: 5'-ACGCCAAAAACAUAAGAAAG; antisense: 5'-UUCUUUAUGUUUUUGGCGUCU) kasutati transfektsiooniefektiivsuse mõõtmisel. Geeniekspressiooni vaigistamiseks kasutati Ambion Silencer® Select (ThermoFisher) eeldisainitud OCT4 (OCT4-siRNA, ID: s10872) ning B2M (B2M-siRNA, ID: s1854) vastaseid siRNA-sid ja negatiivse kontrollina Ambion Negative control #1 siRNA-d (kontroll siRNA, ThermoFisher). Nii ilma märgiseta kontroll siRNA-l kui ka fluorestseeruva märgisega siRNA-del puudub hES rakkudes märklaud.

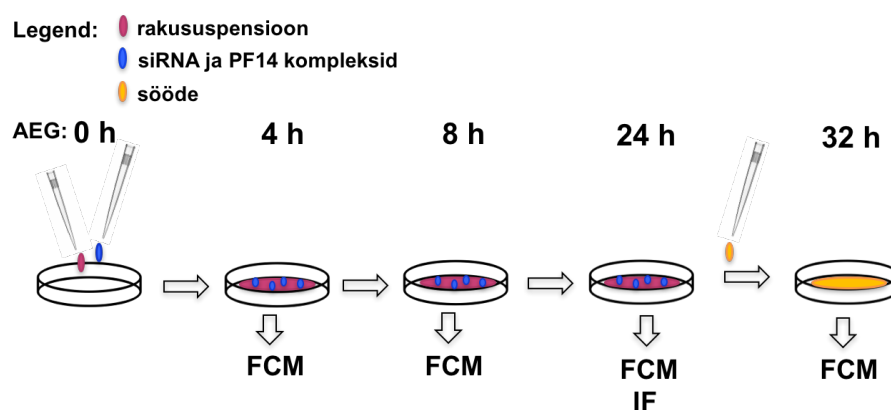
Töös kasutatud siRNA lõppkontsentratsioon jäi vahemikku 10 nM-30 nM. Seejuures muudeti siRNA kontsentratsiooniga proportsionaalselt ka PF14 sisaldust, et saavutada molaarsuste suhe 16:1 (PF14:siRNA, näiteks PF14 ja siRNA lõppkontsentratsioonid vastavalt 480 nM ja 30 nM) ja laengute suhe (CR, ingl k *charge ratio*) 2:1. CR on tuntud ka kui N/P ehk aminorühmade sisalduvate lämmastike (N) ja fosfaatrühmade koostises olevate fosforite (P) suhe. Õige CR on vajalik optimaalse stabiilsusega komplekside moodustumiseks, sest liiga tugevad interaktsioonid takistavad lastmolekuli vabanemist ja funktsioneerimist rakus. Varasemalt on näidatud, et CR 2:1 tagab efektiivse transfektsiooni (Pärnaste *et al.*, 2017; Veiman *et al.*, 2013).

PF14 lahustati 1 mM trifluoroäädikhappes ning saadud 1 mM alikvoote säilitati -20°C juures. Transfekteerimiseks tehti PF14 alikvoodist 100 µM lahendus MQ vees ning lahendust säilitati 4°C juures ja kasutati maksimaalselt kolme järjestikuse eksperimendi raames (ehk maksimaalselt 3 nädala jooksul). siRNA lahustati nukleaaside vabas vees ning 20 µM kontsentratsiooniga alikvoote säilitati -20°C juures. Transfektsioonikomplekside moodustamiseks suspendeeriti siRNA MQ vees, lisati PF14 ning suspendeeriti veelkord. Saadud lahuse kogumaht oli 200 µl ehk 1/10 rakkudele lisatava vedeliku lõppmahust (2 ml).

Kompleksid moodustusid 1,5 ml mahuga Eppendorfi tuubis 60 min toatemperatuuril. Ühetunnise inkubatsiooni järel lisati kompleksidele 800 µl ROCK inhibiitoriga (Y-27632, lõppkontsentratsiooniga 10 µM, Tocris Bioscience) mTeSR1 söödet ning saadud lahus lisati rakkudele.

2.2.4 Transfekteerimine

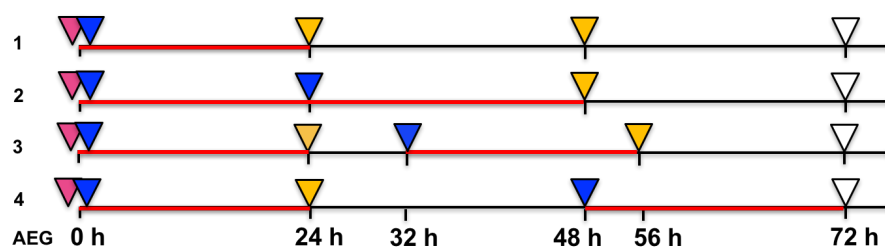
Transfektsiooniefektiivsuse mõõtmiseks kasutati fluorestseeruva märgisega siRNA-sid (siRNA-Alexa 568 ja siRNA-Alexa 647), mida sisaldavad kompleksid lisati rakkudele vahetult peale passeerimist (0 h) ja millega transfekteerimine kestis kuni 24 tundi (Joonis 4). Transfekteerunud rakkude hulka mõõdeti 4 h, 8 h ja 24 h möödudes läbivoolutsütomeetrilisel analüüsil. Transfektsioonikompleksid eemaldati rakkude kasvukeskkonnast 24 tunni möödudes söötmevahetusega ning 8 tundi hiljem (32 h) analüüsiti rakke läbivoolutsütomeetril. siRNA-Alexa 568 lokalisatsioon tuvastati 24 h ajapunktis konfokaalmikroskoobiga. Transfektsiooniefektiivsuse hindamiseks viidi läbi 3 sõltumatut katset.



Joonis 4. Fluorestseeruva märgisega siRNA-ga läbiviidud katse skeem. 0 h ajapunktis külvati rakud uuele kasvupinnale ja lisati neile siRNA/PF14 kompleksid, millega transfektsioon kestis kuni 24 tundi. Transfekteerunud rakkude hulka mõõdeti 4 h, 8 h, 24 h ja 32 h (8 tundi peale söötmevahetust) möödudes. Lühendid: FCM, läbivoolutsütomeetria (ingl k *flow cytometry*); IF, immunofluorestsentsmikroskoopia.

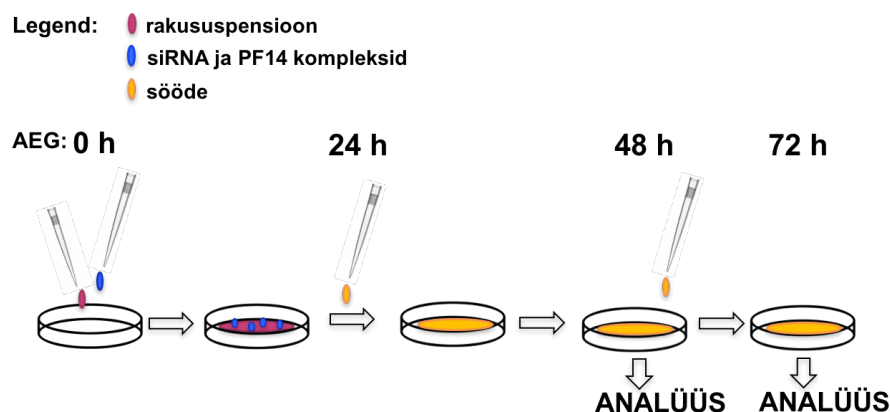
Optimaalse protokolliga välja töötamiseks transfekteeriti rakke üks või kaks korda (Joonis 5). Mõlemal juhul toimus esimene inkubatsioon siRNA/PF14 kompleksidega vahetult peale 450 000 raku (ligikaudu 50 000 rakku/cm²) külvamist (0 h ajapunkt) ning kestis 24 tundi. Topelttransfektsiooni läbiviimiseks toimus teine töötlus vahetult peale esimese lõppu (alates 24 h ajapunktist), 8 tundi (alates 32 h ajapunktist) või 24 tundi (alates 48 h ajapunktist) peale

esimese mõjutuse lõppu. Kõiki proove analüüsi 72 h ajapunktis läbivoolutsütomeetriliselt. Transfektsiooniprotokolli optimeerimiseks viidi katseid läbi 1-3 korda.



Joonis 5. Transfektsiooniprotokolli optimeerimiseks läbiviidud katsete skeem. Optimaalse transfektsiooni arvu ja ajapunkti leidmiseks katsetati nelja erinevat strateegiat. Sümbolid: roosa kolmnurk – rakkude külvamine, sinine kolmnurk – transfektsioonikomplekside lisamine, oranž kolmnurk – söötmevahetus, valge kolmnurk – läbivoolutsütomeetriline analüüs, punane joon – transfektsiooni kestus.

Optimaalse protokoll järgi kestis transfektsioon funktsionaalse ehk geeniekspressiooni vaigistava siRNA-ga (OCT4-siRNA, B2M-siRNA) 24 tundi ning lõpetati söötmevahetusega (Joonis 5 (strateegia 1) ja Joonis 6). 48 h ajapunktis teostati läbivoolutsütomeetriline analüüs või vahetati rakkudel sööde, et võimaldada analüüs 72 h ajapunktis. 72 tunni möödudes tuvastati ka sihtmärkvalkude, OCT4 ja B2M, lokaliseerimine kasutades immunofluorestsentsmikroskoopia. Optimaalset protokoll kasutades viidi läbi 3 sõltumatut katset.



Joonis 6. Funktsionaalse siRNA-ga läbiviidud optimaalse katse skeem. 0 h ajapunktis külvati rakud uuele kasvupinnale ja lisati neile siRNA/PF14 kompleksid, millega transfektsioon kestis 24 tundi. Söötmevahetus viidi läbi 24 h ja 48 h ajapunktides ning sihtmärkgeeni ekspressiooni mõõdeti 48 h ja 72 h ajapunktides. Joonisel kasutatud väljend “analüüs” viitab nii läbivoolutsütomeetrilisele kui ka RT-qPCR analüüsile ja immunofluorestsentsmikroskoopia.

Kõik töös esitatud ajapunktid käsitlevad rakkude külvamist ja transfektsioonikomplekside lisamist eksperimendi algusena (0 h). Kõikides eksperimentides kasutati kontrollidena nii

ilma rakusisese sihtmärgita kontroll siRNA ja PF14 kompleksidega inkubeeritud rakke kui ka rakke, millele komplekse ei lisatud (transfekteerimata, T). T proovile lisati 0 h ajapunktis siRNA/PF14 komplekside asemel 200 µl MQ vett. Järgnevad söötmevahetused ja analüüs toimusid vastavalt katseskeemile.

2.2.5 Valgusmikroskoopia

Transfekteerimise mõju esmaseks visuaalseks hindamiseks vaadeldi rakke 24 h, 48 h ja 72 h möödudes valgusmikroskoobiga Nikon SMZ800 (Nikon Corporation). Rakke pildistati Nikon DS-Fi1 kaamera 6,3x objektiiviga (Nikon Corporation).

2.2.6 Rakkude elulemuse hindamine

Rakkude elulemuse hindamiseks 24-tunnise transfektsiooni järgselt kasutati fikseerimata rakkude värvimist DAPI-ga. Meetodi põhimõte seisneb selles, et membraani terviklikkuse säilitanud elusatesse rakkudesse DAPI ei pääse. Seeläbi loeti läbivoolutsütomeetrilisel analüüsil tuvastatud DAPI-ga mitte värvunud (ehk DAPI negatiivsed rakud) elusateks ja DAPI-ga värvunud (ehk DAPI positiivsed rakud) surnuteks. Selline analüüs viidi läbi peale fluorestseeruva siRNA-ga transfekteerimist.

Funktsionaalse siRNA-ga transfekteerimisel anti rakkude elulemusele kaudne hinnang. Selle jaoks loendati töötuse järel alles jäänud rakud läbivoolutsütomeetrilise analüüsi eel (48 h ja 72 h) kasutades automatiseeritud rakuloendurit Countess II (ThermoFisher).

2.2.7 Läbivoolutsütomeetria

Transfeksiooniefektiivsuse kvantitatiivseks hindamiseks transfekteeriti rakke fluorestseeruva märgisega konjugeeritud siRNA-ga 4-24 h ja analüüsiti saadud rakke läbivoolutsütomeetriliselt. Selle jaoks eemaldati rakkudelt sööde, pesti rakke PBS-iga ja inkubeeriti 3 min 0,05% trüpsiin-PBS lahusega (Corning). Rakkude vabastamiseks kasvupinnalt suspendeeriti rakke trüpsiin-PBS lahuses mikropipetti kasutades. Saadud suspensioon kanti üle 15 ml mahuga tsentrifuugituubi, mis sisaldas 10% FBS-PBS lahust (veise loote seerum, ingl k *fetal bovine serum*, Corning) ja tsentrifuugiti 300g juures 5 min. Supernatant aspireeriti ning rakud suspendeeriti PBS-is, mis sisaldas 1% BSA (veise seerumi albumiin, ingl k *bovine serum albumin*, Capricorn), 2 mM EDTA ja DNA-ga seonduvat värvi DAPI (lõppkontsentratsioon 0,5 µg/ml, Sigma-Aldrich). Rakkudega lahust hoiti jääl ja analüüsiti 5 min möödudes läbivoolutsütomeetril FACSria. Andmete analüüsil kasutati

FACSDiva ja FlowJo tarkvara (mõlemad BD Biosciences). Transfekteerunud ja transfekteerumata rakkude eristamiseks kasutati kontroll siRNA ja PF14 kompleksidega inkubeeritud proovi, mille abil määrati fluorestsentsi intensiivsuse läviväärtus selliselt, et 1% kontrollproovi rakkudest loeti transfekteerunuks (ehk lubatud valepositiivsete määr oli 1%).

OCT4, NANOG, SOX2 ja B2M valgu taseme määramiseks eemaldati rakkudelt 48 h või 72 h ajapunktis sööde, pesti rakke PBS-iga ning inkubeeriti 0,5 mM EDTA-PBS-iga 8-10 min. EDTA kasutamine oli eelistatud, sest varasemalt tuvastati, et B2M on trüpsiini suhtes tundlik. Rakkude vabastamiseks kasvupinnalt suspendeeriti rakke EDTA-PBS lahuses mikropipetti kasutades. Saadud suspensioon kanti üle 15 ml mahuga tsentrifuugituubi, mis sisaldas 1% BSA ja 2 mM EDTA-PBS lahust, ning tsentrifuugiti 300g juures 5 min. Rakusade suspendeeriti 1% BSA ja 2 mM EDTA-PBS lahuses ning rakud loendati kasutades automatiseeritud rakuloendurit Countess II. Saadud andmete põhjal lisati läbivoolutsütomeetrituubi 300 000 rakku, tsentrifuugiti 300g juures 5 min ning fikseeriti 1,6% PFA-PBS (paraformaldehüüd, Sigma-Aldrich) lahuses. 10-minutilise inkubeerimise järel pesti rakke PBS-iga ja seejärel permeabiliseerimispuhvriga (eBioscience) ning inkubeeriti fluorestseeruva märgisega konjugeeritud antikehadega 45 min (detailne informatsioon kasutatud antikehade ja lahjenduste kohta Tabel 2). Seejärel pesti rakke 2 korda permeabiliseerimispuhvriga ja värviti DAPI-ga (lahjendus permeabiliseerimispuhvril, lõppkontsentratsioon 0,5 µg/ml) 10 min. Kõik inkubeerimised viidi läbi toatemperatuuril ja pimedas. Seejärel proovid filtreeriti ning iga proovi kohta analüüsiti 30 000 sündmust kasutades läbivoolutsütomeetrit FACSAria või FACSMelody (BD Biosciences).

Andmete analüüsil kasutati FACSDiva ja FlowJo tarkvara (mõlemad BD Biosciences). Kompensatsiooni parameetrite määramiseks kasutati spetsiaalseid kerakesi (ingl *k compensation beads*, BD Biosciences), mis olid värvitud vaid ühe isotüübikontroll antikehaga. Määratud parameetrite kinnitamiseks kasutati rakke, mis olid värvitud vastava sihtmärgi spetsiifilise antikehaga. NANOG negatiivsete rakkude eristamiseks kasutati kolme sihtmärgi spetsiifilise antikehaga (FMO, ingl *k fluorescence minus one*) märgistatud proovi ning NANOG antikehale vastava isotüübikontroll antikehaga märgistatud proovi. Seeläbi määrati fluorestsentsi intensiivsuse läviväärtus selliselt, et vähemalt 99,5% isotüübikontroll proovi rakkudest kuulus negatiivsesse populatsiooni. OCT4-siRNA töötluse tulemusel moodustusid OCT4 positiivsete ja OCT4 negatiivsete rakkude populatsioonid ning seetõttu määrati populatsioone eristav fluorestsentsi intensiivsuse läviväärtus antud proovi põhjal. Statistilisel

analüüsil kasutati nii kogu populatsiooni kui ka spetsiifilist populatsiooni iseloomustavat fluorestsentsi intensiivsuse geomeetrilist keskväärtust (gMFI, ingl k *geometric mean fluorescence intensity*) ja positiivsete rakkude osakaalu. Suhteline valgu tase arvutati jagades uuritavale proovile vastav gMFI kontrollproovile vastava gMFI väärtusega.

Tabel 2. Töös kasutatud antikehad. Tabelis on esitatud immunofluorestsentsmikroskoopias ja läbivoolutsütomeetrilisel analüüsil kasutatud antikehad, vastavad isotüübikontrollid ning lahjendused. Isotüübikontrollide lõppkontsentratsioon oli võrdne vastava spetsiifilise antikeha lõppkontsentratsiooniga. NANOG ja SOX2 vastaseid antikehasid kasutati vaid läbivoolutsütomeetrilisel analüüsil. Tulbas “Sihtmärk” on valgu nimetuse järel sulgudes fluorestseeruv märgis, mis antud antikehale on liidetud ehk konjugeeritud. Lühendid: PE, fukoerütriin (ingl k *phycoerythrin*); monok, monoklonaalne.

Sihtmärk	Nimi (kloon)	Lahjendus	Päritolu ja klonaalsus	Tootja
OCT4 (Alexa 647)	653710 (3A2A20)	1:100	Hiire monok. IgG2b	BioLegend
NANOG (PE)	560483 (N31-355)	1:5	Hiire monok. IgG1	BD Biosciences
SOX2 (PerCp-Cy5.5)	561506 (030-678)	1:20	Hiire monok. IgG1	BD Biosciences
B2M (Alexa 488)	FAB8248G (883028)	1:20	Hiire monok. IgG1	R&D Systems
Isotüübikontroll				
Alexa 647 konjugaat	400330	1:100	Hiire IgG2b	BioLegend
PE konjugaat	554680	1:80	Hiire IgG1	BD Biosciences
PerCp-Cy5.5 konjugaat	552834	1:5	Hiire IgG1	BD Biosciences
Alexa 488 konjugaat	557702	1:25	Hiire IgG1	BD Biosciences

2.2.8 Immunofluorestsentsmikroskoopia

Fluorestseeruva märgisega siRNA-Alexa 568 lokaliseerimiseks rakus külvati rakud enne transfektsiooni 12 mm diameetriga ümaratele katteklaasidele (Marienfeld), mis olid kaetud Matrigeliga. 24 tundi peale transfektsiooni algust eemaldati rakkudelt sööde, pesti PBS-iga ja fikseeriti 3,7% PFA-PBS (paraformaldehüüd, Sigma-Aldrich) lahusega 10 min toatemperatuuril. Seejärel pesti rakke 3 korda PBS-iga ning blokeeriti 1% BSA (veise seerumi albumiin, ingl k *bovine serum albumin*, Capricorn) ja 0,1% saponiin (Sigma-Aldrich) PBS lahusega 20 min toatemperatuuril. Peale kolme pesu 0,1% saponiin-PBS lahusega värviti raku tsütoskelett kasutades aktiiniga seonduvat Alexa Fluor 488 märgisega falloidiini (lõppkontsentratsioon 165 nM, ThermoFisher) ning rakkude tuumad mägistati DNA-ga seonduva värviga DAPI (lõppkontsentratsioon 0,5 µg/ml, Sigma-Aldrich). Falloidiini ja

DAPI-ga inkubeerimine toatemperatuuril kestis 15 minutit. Seejärel pesti rakke 0,1% saponiin-PBS lahusega 3 korda ja preparaadid valmistati kasutades sulundusvedelikku Fluorescence Mounting Medium (Dako). Preparaatide vaatamiseks kasutati konfokaalmikroskoopi LSM710 (Zeiss) ning pilte analüüsiti kasutades tarkvara Imaris (Bitplane AG).

OCT4 ning B2M olemasolu ning lokalisatsiooni tuvastamiseks külvati rakud enne transfekteerimist õhukestele 12 mm diameetriga ümaratele katteklaasidele (Marienfeld), mis olid kaetud Matrigeliga. 72 h ajapunktis eemaldati rakkudelt sööde, rakke pesti PBS-iga ja fikseeriti 4% PFA-PBS lahusega 10 min. Rakke pesti 3 korda PBS-iga ning blokeeriti 4% NGS (preimmuunse kitse seerum, ingl k *normal goat serum*, Capricorn) ja 0,1% saponiin-PBS lahusega 60 min toatemperatuuril. Seejärel inkubeeriti rakke fluorestseeruva märgisega konjugeeritud antikehadega 60 min (detailne informatsioon kasutatud antikehade ja lahjenduste kohta Tabel 2). Peale kolme pesu 0,1% saponiin-PBS-iga märgistati rakkude tuumad inkubeerides DAPI (lõppkontsentratsioon 0,5 µg/ml) ja 0,1% saponiin-PBS lahusega 15 min. Kõik inkubeerimised viidi läbi toatemperatuuril niiskes kambris ja pimedas. Seejärel pesti rakke 0,1% saponiin-PBS lahusega 3 korda ja preparaadid valmistati kasutades sulundusvedelikku Fluorescence Mounting Medium (Dako). Preparaatide vaatamiseks kasutati konfokaalmikroskoopi LSM710 (Zeiss) ning pilte analüüsiti kasutades tarkvara Imaris (Bitplane AG).

2.2.9 RNA isoleerimine, cDNA süntees ja kvantitatiivne PCR

mRNA taseme kvantitatiivseks analüüsiks kasutati pöördtranskriptsioon kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni (RT-qPCR, ingl k *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*). Selleks rakud lüüsi FARB puhvris (Favorgen), millele oli lisatud β-merkaptotetanooli (lõppkontsentratsioon 1%, Sigma-Aldrich). Rakud vabastati kasvupinnalt kummist kraabitsa abil ja lüsaat kanti 1,5 ml Eppendorfi tuubi kasutades mikropipetti. RNA eraldati FavorPrep Blood/Cultured Cell Total RNA Mini Kit (Favorgen) abil järgides tootja juhiseid ning RNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriga NanoDrop 1000 (ThermoFisher). Edasisel analüüsil töötati 1 µg RNA-ga ning genoomne DNA degradeeriti RNAaside vaba DNAas I (ThermoFisher) abil. Komplementaarne DNA (cDNA, ingl k *complementary DNA*) sünteesiti RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-i (ThermoFisher) ja mittespetsiifilisi heksameerseid praimereid kasutades ning tootja juhiseid järgides. cDNA-d kasutati matriitsina kvantitatiivsel polümeraasi ahelreaktsioonil

(qPCR, ingl k *quantitative polymerase chain reaction*), mille läbi viimiseks kasutati Maxima SYBR Green qPCR Master Mix-i (ThermoFisher), spetsiifilisi praimereid (detailne informatsioon Tabel 3) ning LightCycler 480 II Real-Time PCR süsteemi (Roche). Reaktsiooni protokoll koosnes esialgsest denaturatsiooni etapist (95°C 10 min), millele järgnes 40 tsüklit 95°C juures 10 sekundit ning 60°C juures 1 min. Iga proovi kohta viidi läbi 3 reaktsiooni (triplikaadid). Tulemuste analüüsil kasutati programmi LightCycler 480 versiooni 1.5 (Roche). Sihtmärkgeeni suhteline ekspressiooni tase arvutati kasutades $\Delta\Delta Ct$ meetodit (Joonis 7, kirjeldatud Livak ja Schmittgen, 2001). Selle raames keskmistati ühele proovile vastavate reaktsioonide lävitsükli (Ct , ingl k *threshold cycle*) väärtused ($Ct_u^{sihtmärk}$) ja normaliseeriti kasutades endogeenset referentsgeeni *TBP* (TATA järjestusele seonduv valk, ingl k *TATA-binding protein*). Saadud uuritava proovi ΔCt väärtust ($\Delta Ct^{uuritav}$) võrreldi kontrollproovi ΔCt väärtusega ($\Delta Ct^{kontroll}$). Saadud $\Delta\Delta Ct$ kasutamise tulemusel on töös esitatud väärtused suhtelised kontrollproovi suhtes (ehk kontrollproovile vastav väärtus on 1). Sobiva referentsgeeni leidmiseks võrreldi kolme koduhoidjageeni, *TBP*, *RPL13A* (ribosoomi valk L13a, ingl k *Ribosomal Protein L13a*) ja *POLR2A* (RNA polümeraas II subühik A), ekspressiooni. Nii *TBP* kui ka *RPL13A* ekspressioon käesoleva töö erinevates proovides oli stabiilne ja seetõttu valiti edasisel analüüsil kasutamiseks *TBP*. Kontrollproovidena kasutati negatiivse kontroll siRNA ja PF14-ga töödeldud või diferentseerumata (neuraalse diferentseerimise eksperimentides) hES rakke.

$$\Delta Ct^{uuritav} = Ct_u^{sihtmärk} - Ct_u^{referents}$$

$$\Delta Ct^{kontroll} = Ct_k^{sihtmärk} - Ct_k^{referents}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct^{kontroll} - \Delta Ct^{uuritav}$$

$$\text{Suhteline} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

Joonis 7. $\Delta\Delta Ct$ meetod suhtelise mRNA taseme arvutamiseks. Suuruse Ct alaindeksid näitavad, kas arv väärtus vastab uuritavale proovile(_u) või kontrollproovile(_k). Sümbolid: $Ct^{sihtmärk}$ – sihtmärkgeeni keskmistatud läviväärtused, $Ct^{referents}$ – referentsgeeni keskmistatud läviväärtused.

Tabel 3. Kvantitatiivsel polümeraasi ahelreaktsioonil (qPCR) kasutatud praimerid. Tabeli vasakpoolne tulp kirjeldab, mis eesmärgil uuritava geeni ekspressiooni detekteeriti.

Geeni nimi		Praimeri järjestus	
REFERENTS	<i>RPL13A</i>	Päripidine 5'-CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA-3' Äraspidine 5'-TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA-3'	
	<i>TBP</i>	Päripidine 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3' Äraspidine 5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'	
	PLURIPOTENTUS	<i>NANOG</i>	Päripidine 5'-CCTGTGATTGTGGGCCTG-3' Äraspidine 5'-GACAGTCTCCGTGTGAGGCAT-3'
		<i>POU5F1 (OCT4)</i>	Päripidine 5'-CTGGAGCAAACCCGGAGG-3' Äraspidine 5'-CCTCAAAGCGGCAGATGGTC-3'
<i>SOX2</i>		Päripidine 5'-GTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG-3' Äraspidine 5'-TCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCAAAC-3'	
EKTODERM		<i>OTX2</i>	Päripidine 5'-GCTGGCTATTTGGAATTTAAAGG-3' Äraspidine 5'-GGGTTTGGAGCAGTGGAAC-3'
		<i>PAX6</i>	Päripidine 5'-AACAGACACAGCCCTCACAAAC-3' Äraspidine 5'-CGGGAAGTTGAACTGGAAGTAC-3'
		<i>SOX1</i>	Päripidine 5'-CAGCAGTGTCTGCTCCAATTCA-3' Äraspidine 5'-GCCAAGCACCGAATTCACAG-3'
	MESODERM	<i>BRA</i>	Päripidine 5'-ATGACAATTGGTCCAGCCTT-3' Äraspidine 5'-CGTTGCTCACAGACCACAG-3'
		<i>HAND1</i>	Päripidine 5'-TGCCTGAGAAAGAGAACCAG-3' Äraspidine 5'-ATGGCAGGATGAACAAACAC -3'
		ENDODERM	<i>GATA4</i>
<i>SOX17</i>			Päripidine 5'-GGCGCAGCAGAATCCAGA-3' Äraspidine 5'-CCACGACTTGCCCAGCAT-3'
	<i>B2M</i>		Päripidine 5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3' Äraspidine 5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3'

2.2.10 Diferentseerimine neuraalses suunas

Neuraalses suunas diferentseerumine indutseeriti kasutades STEMdiff™ Neural Induction Medium (NIM) söödet (STEMCELL Technologies) ja järgides tootja juhiseid. Töö autor ei

indutseerinud neuraalses suunas diferentseerumist, kuid analüüsis muutusi geeniekspressioonis RT-qPCR meetodil.

2.2.11 Statistiline analüüs

Tulpdiagrammidel on esitatud keskväärtus $\pm$ SEM (keskväärtuse standardviga, ingl k *standard error of the mean*). Tulemuste statistilist olulisust testiti kasutades kolme sõltumatu bioloogilise katse andmeid ja kahepoolset sõltumatut Studenti t-testi. P-väärtusel alla 0,05 loeti tulemus statistiliselt oluliseks ja tähistati joonisel sümboliga *.

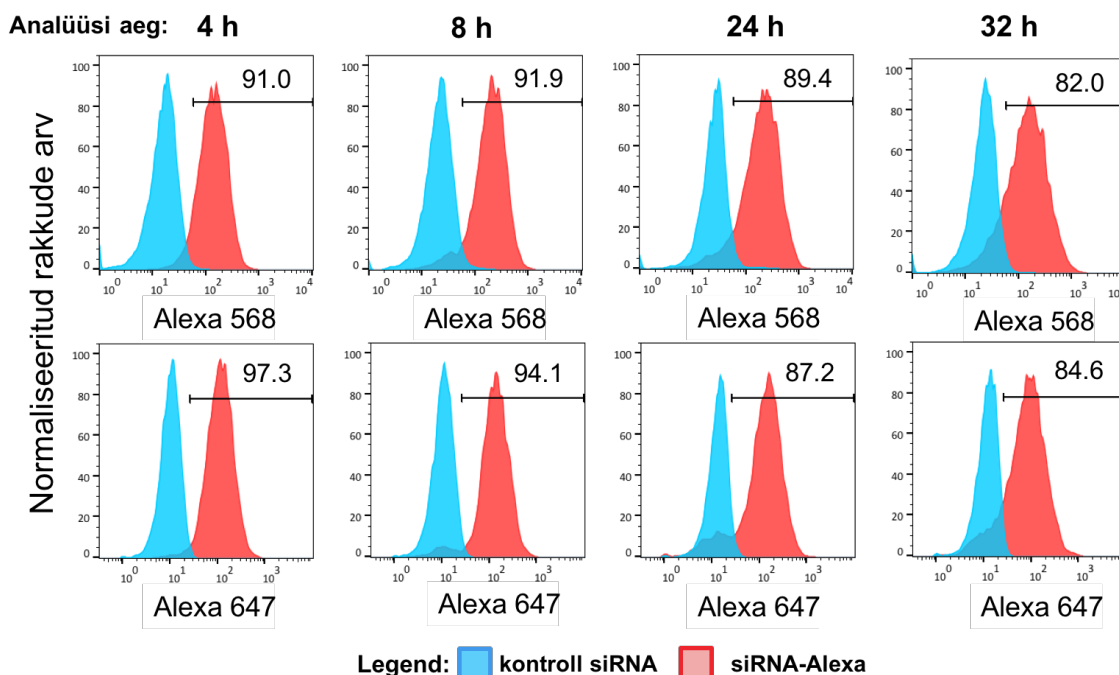
2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 PF14 transpordib siRNA hES rakkudesse väga efektiivselt

Uurimaks, kas PF14 on võimeline lastmolekuli hES rakku viima, kasutati fluorestseeruva märgisega siRNA-sid (siRNA-Alexa 568 ja siRNA-Alexa 647), mille lõppkontsentratsioon oli 30 nM. Antud kontsentratsiooni oli eelnevalt Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi tüvirakkude töörühmas kasutatud teiste transfektsioonireagentidega läbiviidud eksperimentides. Tagamaks maksimaalset efektiivsust rakendati varasemalt lipofektsiooni reagentide kasutamisel tuvastatud transfekteeerimise edukust parandavaid võtteid. Näiteks passeeriti rakke väikeste agregaatidena (2-5 rakku), et võimaldada komplekside ligipääs võimalikult suurele hulgale rakkudest. Seejuures kasutati elulemise parandamiseks ROCK inhibiitorit, mis aitab vältida rakk-rakk kontaktide puudumisel indutseeritud apoptoosi (Watanabe *et al.*, 2007). Erinevalt traditsioonilistest transfektsiooniprotokollidest lisati siRNA/PF14 kompleksid rakkudele vahetult peale rakkude külvamist uuele kasvupinnale (0 h ajapunkt), mis võiks efektiivsust veelgi suurendada. Uurimaks, kas ja kui kiiresti siRNA rakku jõuab ning kui stabiilselt rakus püsib, teostati läbivoolutsütomeetriline analüüs nii 4, 8 kui ka 24 tundi peale transfektsiooni algust ja 8 tundi peale transfektsiooni lõppu (32 h ajapunkt). Olemaks kindel, et detekteeritud signaal pärineb raku sisse jõudnud siRNA-lt, mitte membraaniga assotsieerunud kompleksidelt, vabastati rakud analüüsi eel kasvupinnalt kasutades trüpsiini. Varasemalt on näidatud, et trüpsiin lõikab membraanis olevaid valgulisi komponente ning eemaldab seeläbi ka membraaniga seotud peptiidid ja lastmolekuli (Richard *et al.*, 2003).

Analüüsi tulemusel selgus, et PF14 vahendusel on siRNA jõudnud rohkem kui 90% elus rakkudesse juba 4 tunniga (Joonis 8). Seejuures ei ole tegemist vaid ühele siRNA-le spetsiifilise efektiga, sest nii siRNA-Alexa 568 kui ka siRNA-Alexa 647 transporditakse rakkudesse väga efektiivselt (transfekteeerunuid vastavalt 91% ja 97,3%). Lisaks püsib siRNA sisaldus rakkudes stabiilsena seni kuni rakke ümbritsevas keskkonnas on transfektsioonikompleksid (kuni 24 h ajapunkt). See viitab pidevale siRNA transpordile rakku (Hällbrink *et al.*, 2004). Samas väheneb transfekteeerunute hulk, kui rakud kasvavad söötmes, mis enam siRNA/PF14 partikleid ei sisalda. Selle tõestuseks on siRNA-ga rakkude osakaal 32 h ajapunktis vähenenud ligikaudu 80%-ni ning rakkude jaotust iseloomustav piik nihkunud madalamate fluorestsentsi intensiivsuste suunas. Muutuste võimalikuks põhjuseks on

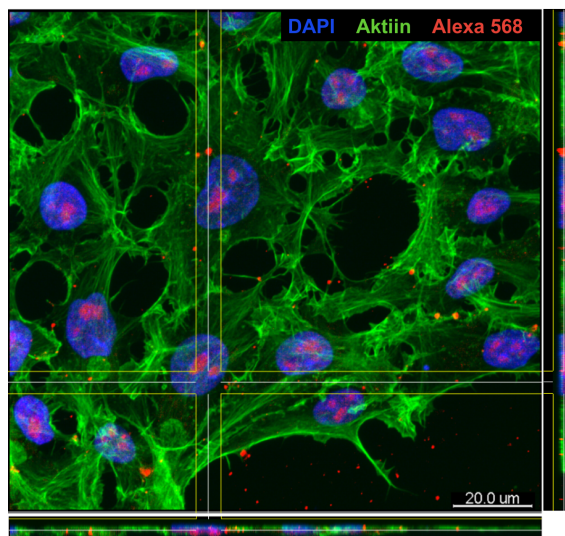
rakkude jagunemisel toimuv siRNA jaotumine tütarakkude vahel, mille tulemusel ühest rakust pärit signaal väheneb (Bartlett ja Davis, 2006).



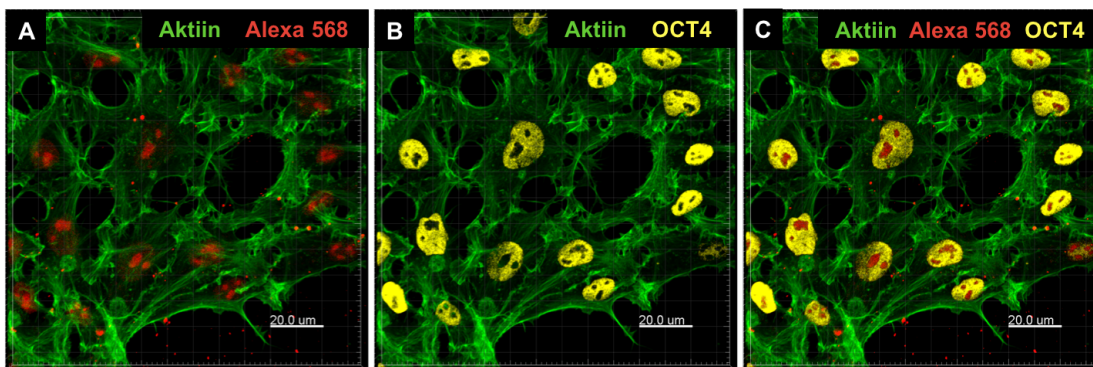
Joonis 8. Fluorestseeruva märgisega siRNA-ga transfecteerunud rakkude osakaal erinevates ajapunktides. Lävivoolutsütomeetrilise analüüsi tulemused esitatud histogrammidena, mille Y-teljel on mood väärtusele vastava rakkude arvu suhtes normaliseeritud rakkude arv ning X-teljel Alexa 568 või Alexa 647 fluorokroomile vastava signaali intensiivsus. Sinisega on kujutatud kontroll siRNA-ga ja punasega fluorestseeruva märgisega siRNA-ga transfecteeritud proovidele iseloomulik rakkude jaotus. Joonisel esitatud arväärtused vastavad transfecteerunud rakkude hulgale (%) siRNA-Alexa proovis. Rakk loeti transfecteerunuks, kui sellele vastav fluorestsentsi intensiivsus ületas kontrollproovi põhjal paika pandud läviväärtuse ehk jäi graafikutel esitatud vahemikku kujutava joone piiridesse. Vastav analüüsi ajapunkt on esitatud joonise ülemisel paneelil. Kasutatud siRNA kontsentratsioon: 30 nM. Külvatud rakkude arv: 450 000 kannu kohta (ligikaudu 50 000 rakku/cm²).

Kinnitamaks, et lävivoolutsütomeetrilisel analüüsil detekteeritud signaal on pärit raku seest, ning uurimaks siRNA lokalisatsiooni rakus, kasutati konfokaalmikroskoopi. Selgus, et siRNA-Alexa 568 on 24 tunni möödudes detekteeritav nii tsütoplasmas kui ka tuumas (Joonis 9). Leidumine tsütoplasmas on oluline, sest geeniekspressiooni vaigistamine RISC-i kaudu leiab aset just selles raku kompartendis (Fire *et al.*, 1998; McManus ja Sharp, 2002). Tuumas ei paikne siRNA aga hajusalt, vaid on koondunud kindlatesse piirkondadesse, kus puudub transkriptsioonifaktor OCT4 ning tõenäoliselt on tegu tuumakestega (Joonis 10)(Ohrt *et al.*, 2006). Selline lokaliseerumine on kooskõlas varasema tööga, mis näitas, et ilma rakusiseses sihtmärkjärjestuseta siRNA paikneb nii tuumas kui ka tsütoplasmas (Berezina *et al.*, 2006).

Lisaks näitab OCT4 ja siRNA olemasolu ühes ja samas rakus, et 24-tunnine transfektsioon ning siRNA/PF14 komplekside jõudmine rakku ei mõjuta pluripotentsusfaktori ekspressiooni.



Joonis 9. siRNA-Alexa 568 jõuab peaaegu iga raku tuuma ja tsütoplasmasse. Mikroskoobi pildil on roheliselt kujutatud raku tsütoskeleti komponent aktiin, siniselt rakutuum (värvitud DNA-ga seonduva värviga DAPI) ning punaselt siRNA-Alexa 568. Selle tulemusel on võimalik eristada rakuvälist ja -sisest keskkonda, tuuma ja tsütoplasmat ning tuvastada siRNA asukohta. Joonise alumises ja paremas servas asuval paneelil on ristlõik põhipildil joontega piiritletud alast. Paneelidel nähtav punane signaal rohelise või sinise ala sees kujutab siRNA-d, mis paikneb vastavalt tsütoplasmas või tuumas. Kasutatud siRNA kontsentratsioon: 30 nM. Analüüsi ajapunkt: 24 h. Külvatud rakkude arv: 450 000 kannu kohta (ligikaudu 50 000 rakku/cm²).



Joonis 10. siRNA paikneb tuumas OCT4-vaestes regioonides. Mikroskoobi piltidel on roheliselt kujutatud raku tsütoskeleti komponent aktiin (**A, B, C**), punaselt siRNA-Alexa 568 (**A, C**) ning kollaselt tuumas paiknev pluripotentsusfaktor OCT4 (**B, C**). Kasutatud siRNA kontsentratsioon: 30 nM. Analüüsi ajapunkt: 24 h. Külvatud rakkude arv: 450 000 kannu kohta (ligikaudu 50 000 rakku/cm²).

Läbivoolutsütomeetria ja mikroskoopia kasutamisel saadud tulemused näitavad, et PF14 on väga efektiivne transfektsioonireagent siRNA transpordil hES rakkudesse.

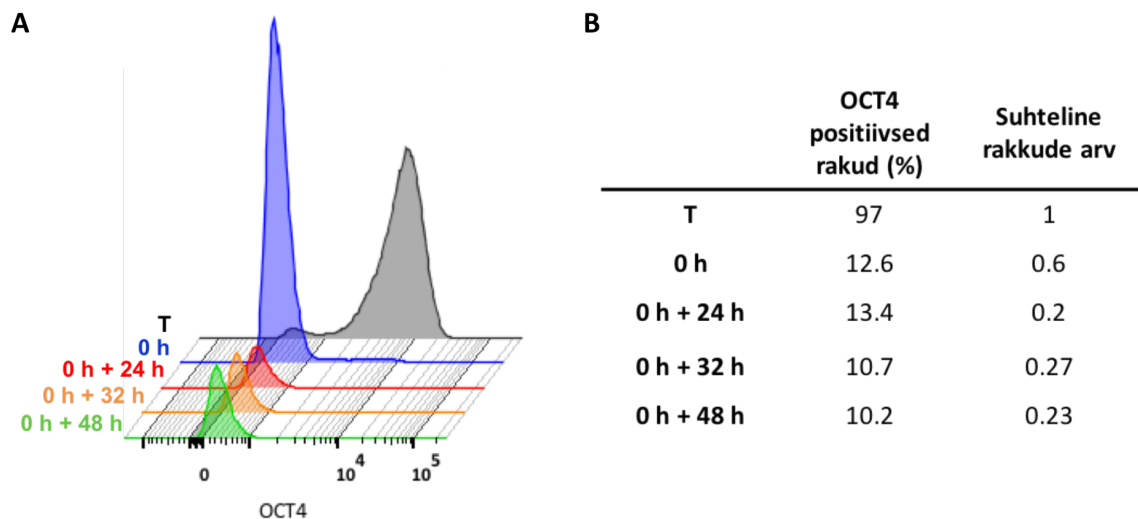
2.3.2 Protokoll optimeerimine rakkude elulemusest ning transfektsiooniefektiivsusest lähtudes

siRNA jõudmine rakku ja lokaliseerumine tsütoplasmas ei tähenda veel, et siRNA suudaks efektiivselt geeniekspressiooni vaigistada. Nimelt, mitmete reagentide vahendusel toimub lastmolekulide sisenemine rakku endotsütoosi abil (Deshayes *et al.*, 2005). Endotsütoosil tekkinud endosoom võib tsütoplasmas liituda lüsoosoomiga, mille tulemusel kogu vesiikulis sisalduv materjal degradeeritakse. Sellisel juhul lagundatakse ka rakku jõudnud siRNA ning geeniekspressiooni ei vaigista. Uurimaks, kas PF14 suudab lastmolekuli ka efektiivselt endosoomist vabastada, kasutati siRNA-d, mis on komplementaarne OCT4 mRNA järjestusele ning takistab vastava pluripotentsusfaktori avaldumist.

Saavutamaks võimalikult efektiivset geeniekspressiooni vaigistamist viidi läbi transfektsiooniprotokoll optimeerimine. On teada, et vaigistamine ja selle ulatus sõltub peamiselt transfektsioonide arvust, kestusest ja sagedusest. Sellest lähtuvalt transfekteeeriti rakke üks või kaks korda ning viimasel juhul varieeriti ka teise transfektsiooni alguspunkti (24 h, 32 h või 48 h)(Joonis 5).

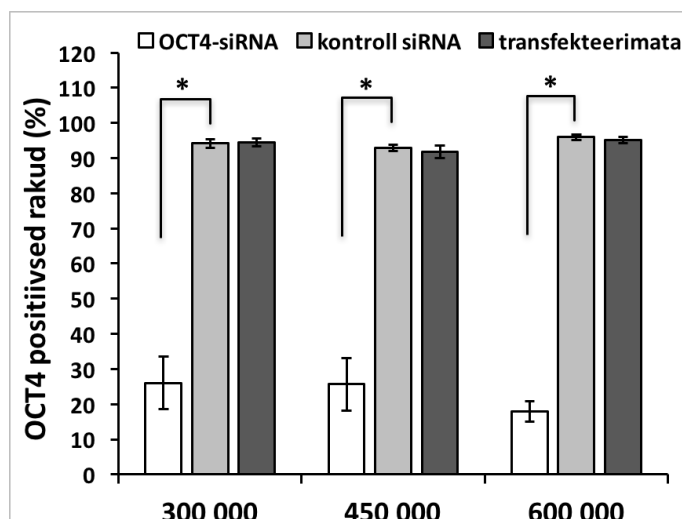
Läbivoolutsütomeetrilisel analüüsil selgus, et OCT4-siRNA töötamise tulemusel eristub 2 rakupopulatsiooni, millest ühes on OCT4 ekspressioon säilinud ja teises vaigistatud (Joonis 17A). Võttes arvesse, et bimodaalse jaotuse iseloomustamisel ei kirjelda kogu populatsioonile vastavad keskmised väärtused täielikult aset leidnud muutusi, otsustati vaigistamise efektiivsuse hindamiseks kasutada OCT4 positiivsete rakkude osakaalu uuritavates proovides.

72 h ajapunktis läbiviidud analüüsil selgus, et kõikide kasutatud transfekteeerimise strateegiate puhul oli OCT4 positiivsete rakkude osakaal OCT4-siRNA-ga töödeldud proovides langenud alla 15% võrreldes 97%-ga transfekteeerimata rakkudega proovis (Joonis 11). Kahe transfektsiooni tulemusel oli aga alles jäänud märkimisväärselt vähem rakke, kui ühe korra mõjutatud või mõjutamata proovis. Seega, pidades silmas, et üksiktransfektsioon on sama efektiivne, madalama tsütotoksilisusega ja lisaks ka vähem ajakulukas kui topelttöötlus, järeldati, et optimaalne on ühekordne mõjutus (Joonis 5 (strateegia 1) ja Joonis 6). Vastavat protokoll kasutati kõikide järgnevate katsete raames.



Joonis 11. Üksiktransfektsioon on efektiivne ja mõjutab vähem rakkude elulemust. A. Transfektsiooniprotokolli optimeerimise eksperimendi läbivoolutsütomeetrilise analüüsi tulemused esitatud histogrammidena, mille X-teljel on OCT4 valgu taset iseloomustav fluorestsentsi intensiivsus. Proovi nimi sisaldab transfektsiooni(-de) alguspunkti(-e). Ühe korra transfekteeeritud (0 h) ning transfekteeerimata proovidest analüüsiti 30 000 rakku, kuid madala elulemuse tõttu kasutati topelttransfektsiooni proovide analüüsiks maksimaalne võimalik arv rakke, mis jäi kõigil juhtudel alla 30 000. **B.** Tabel arvväärtustega, mis vastavad histogrammidel kirjeldatud proovidele. Suhteline rakkude arv on leitud transfekteeerimata proovi suhtes. Kasutatud siRNA kontsentratsioon: 30 nM. Lühendid: T, transfekteeerimata.

Varasemad tööd on näidanud, et mitmete reagentide efektiivsus sõltub rakkude konfluentsusest kasvupinnal transfekteeerimise hetkel (Braam *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2004). Uurimaks, kuidas mõjutab rakkude tihedus PF14 toimet, külvati 300 000, 450 000 (kasutatud eelnevates katsetes) või 600 000 rakku 6-kannuse koekultuuriplaadi kannu kohta. Tulemustest selgub, et kõikide kasutatud rakuarvude puhul on OCT4 positiivsete rakkude osakaal vähenenud ligikaudu 70% võrreldes kontrollproovidega (Joonis 12). Seejuures on täheldatav veidi efektiivsem toime 600 000 raku kasutamisel, kuid tõenäoliselt on see tingitud spontaansest diferentseerumisest, mis on indutseeritud kontakthinhibitsiooni tulemusel (Ouyang *et al.*, 2007). Kontakthinhibitsiooni ei esine aga madalamatel tihedustel, sest rakud paiknevad hõredamalt ning saavad vabalt kasvada. Saadud tulemused on kooskõlas eelneva tööga, milles näidati, et PF14 toime ei sõltu rakkude konfluentsusest (Ezzat *et al.*, 2011).



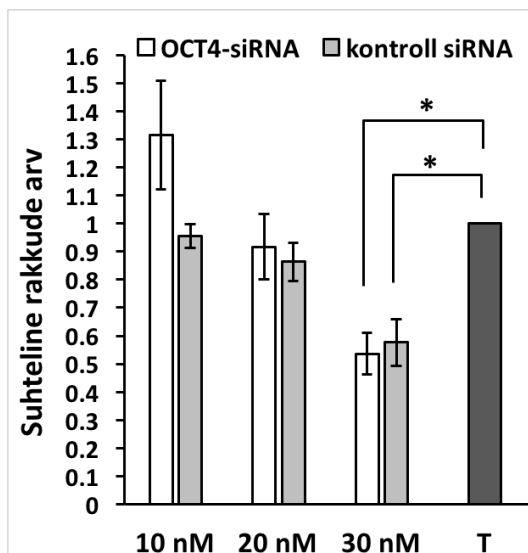
Joonis 12. PF14 transfektsiooniefektiivsus ei sõltu külvatud rakkude arvust. Y-teljel on OCT4 positiivsete rakkude osakaal (%) uuritavas proovis. X-teljel on ühte 6-kannuse koekultuuri plaadi kannu külvatud rakkude hulk. Joonisel on esitatud kolme sõltumatu katse keskväärtus $\pm$ SEM ja statistiliselt olulised erinevused (P-väärtus väiksem kui 0,05) on tähistatud sümboliga *. Kasutatud siRNA kontsentratsioon: 30 nM. Analüüsi ajapunkt: 72 h.

Sobiva lähenemise väljatöötamiseks läbiviidud katsete tulemusel leiti, et optimaalne protokoll seisneb 450 000 raku ühekordses transfekteerimises vahetult peale nende külvamist uuele kasvupinnale (Joonis 6).

2.3.3 Kõrgem siRNA ning PF14 kontsentratsioon mõjub rakkude elulemusele

Nii fluorestseeruva siRNA rakendamisel kui ka optimaalse protokolliga väljatöötamisel kasutati siRNA lõppkontsentratsiooni 30 nM. Tegemist on varasemalt Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi tüvirakkude töörühmas kasutusel olnud efektiivse kontsentratsiooniga erinevate transfektsioonireagentide testimisel. 72 h ajapunktis teostatud rakkude loendamisel avastati aga, et nii OCT4-siRNA-ga kui ka kontroll siRNA-ga töödeldud proovides on rakke märkimisväärselt vähem kui transfekteerimata proovis (Joonis 13). Sellest lähtuvalt uuriti, kas madalama siRNA kontsentratsiooni kasutamisel rakkude elulemus paraneb. siRNA kontsentratsiooni alandamisel vähendati proportsionaalselt ka PF14 sisaldust, et saavutada optimaalse stabiilsusega kompleksid. Seejuures tagati sama komplekseerumiseefektiivsus seeläbi, et ei muudetud midagi komplekside formeerumise protsessis, vaid moodustunud komplekse lisati vähem rakkudele. Antud lähenemine on oluline, sest liialt nõrkadel interaktsioonidel baseeruvad kompleksid võivad põhjustada siRNA vabanemise partikli koosseisust enne rakku sisenemist. Liiga tugevad interaktsioonid takistavad aga siRNA efektiivset vabastamist endosoomist ning interakteerumist RISC-iga

(Pärnaste *et al.*, 2017). Rakkude loendamise tulemusel selgus, et madalamad siRNA ja PF14 kontsentratsioonid mõjutavad vähem rakkude elulemust. Selle tõestuseks on 10 nM või 20 nM siRNA ja PF14 kompleksidega töödeldud proovides rakkude arv ligikaudu võrdne või isegi suurem kui transfekteeerimata proovis (Joonis 13).

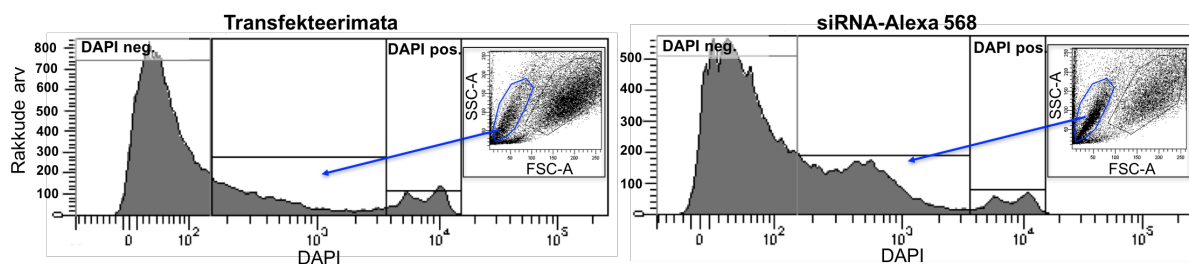


Joonis 13. Rakkude elulemus sõltub siRNA ja/või PF14 kontsentratsioonist. Suhteline rakkude arv 10 nM, 20 nM või 30 nM OCT4-siRNA või kontroll siRNA-ga töödeldud proovis 72 h ajapunktis. Y-teljel on suhteline rakkude arv transfekteeerimata rakkudega proovi suhtes. X-teljel on kasutatud siRNA kontsentratsioon. Joonisel on esitatud kolme sõltumatu katse keskväärtus $\pm$ SEM ja statistiliselt olulised erinevused (P-väärtus väiksem kui 0,05) on tähistatud sümboliga *. Lühendid: T, transfekteeerimata.

Varasemalt on näidatud, et rakkude suremine lipofektsiooni tagajärjel on peamiselt põhjustatud kompleksidest, mis sisenemise käigus destabiliseerivad membraane ning tsütoplasmasse jõudnuna mõjutavad rakutsükli ja metabolismi ning indutseerivad seeläbi apoptoosi (Omidi *et al.*, 2003; Parhamifar *et al.*, 2010). Uurimaks täpsemalt, kuidas avaldub kõrgemate siRNA/PF14 kontsentratsioonide tsütotoksiline toime, kasutati 30 nM fluorestseeruva märgisega siRNA-ga läbiviidud eksperimenti (Joonis 4). Seejuures keskenduti kõige hilisemale ehk 32 h ajapunktile, et võimaldada 24-tunnisest transfektsioonist tingitud muutuste avaldumise. Antud katses analüüsiti fikseerimata rakke, mis teeb võimalikuks elus ja surnud rakkude eristamise DAPI-ga värvumise järgi, sest vaid viimaste membraan on värvimolekulile hästi läbitav.

Selgus, et 32 h ajapunktis on DAPI positiivsete ehk surnud rakkude osakaal transfekteeeritud (siRNA-Alexa 568, -Alexa 647 või kontroll siRNA) proovis isegi väiksem kui transfekteeerimata proovis (vastavalt ~ 5% ja 10%), kuid siRNA/PF14 komplekside toimel on suurenenud apoptootiliste kehade hulk (vastavalt ~ 17% ja 9%) (Joonis 14). Programmeeritud rakusurma

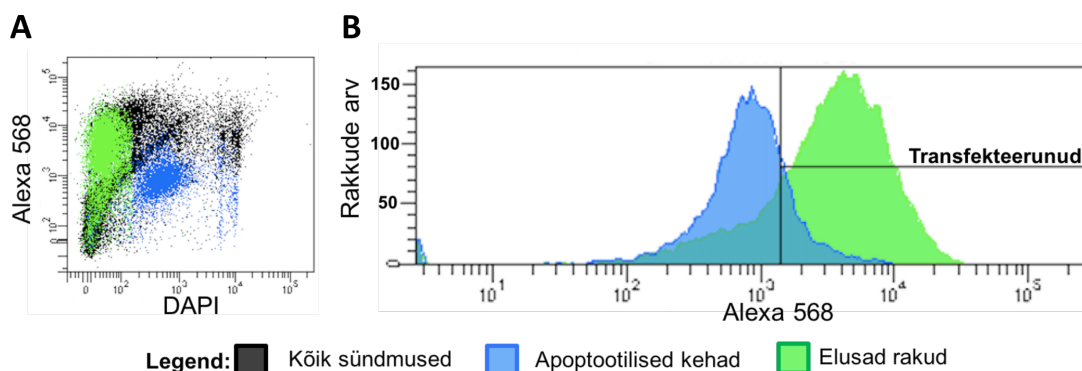
iseloomustab muu hulgas tsütoplasma ja tuuma kondenseerumine, raku mõõtmete vähenemine ning DNA ja lõpuks ka raku fragmenteerumine (Elmore, 2007). Tänu muutustele raku struktuuris ja suuruses on apoptootilised partiklid selgelt eristatavad läbivoolutsütomeetrilise analüüsi punktjoonisel, millel on esitatud uuritavaid objekte iseloomustavad valguse otse- (FSC, ingl k *forward scatter*) ja külghajuvuse (SSC, ingl k *side scatter*) näitajad (Joonis 14)(Jiang *et al.*, 2016, 2017). Seejuures on näha, et siRNA-Alexa 568 proovis on suurenenud sündmuste hulk, millele on iseloomulikud nii väiksemad mõõtmed (väiksem FSC väärtus) kui ka vähenenud granulaarsus (väiksem SSC väärtus). Lisaks on antud osakeste membraan DAPI suhtes läbilaskev ning tuuma fragmenteerumisest tingitult sisaldavad vähem DNA-d kui tavapärane rakk (Elmore, 2007). Viimase asjaolu tõttu jääb apoptootilistele kehadele vastav DAPI signaali intensiivsus DAPI positiivseid ja DAPI negatiivseid iseloomustavate väärtuste vahele (Joonis 14) (Jiang *et al.*, 2016).



Joonis 14. siRNA/PF14 komplekside toimel suureneb apoptootiliste kehade hulk. Histogrammid iseloomustavad DAPI positiivsete (ehk surnud) ja negatiivsete (ehk elus) ning nn mõõduka DAPI värvinguga (ehk apoptootiliste) rakkude/kehade arvu (Y-teljel) transfekteerimata ja 30 nM siRNA-Alexa 568-ga transfekteeritud proovis. Histogrammide X-teljel on DAPI-le vastav fluorestsentsi intensiivsus. Punktjoonise X- ja Y-teljel on valguse hajuvuse parameetrid, mis iseloomustavad vastavalt osakese suurust (FSC-A, ingl k *forward scatter area*) ja struktuuri (SSC-A, ingl k *side scatter area*). Sinisega piiritletud sündmused vastavad väikestele, vähese granulaarsusega ning tuuma fragmenti sisaldavatele apoptootilistele kehadele, mille asukoht histogrammil on viidatud noolega. Analüüsi ajapunkt: 32 h. Lühendid: DAPI neg, DAPI negatiivsed; DAPI pos, DAPI positiivsed.

Seejuures ei ole programmeeritud rakusurma indutseerimise põhjuseks rakku jõudnud siRNA/PF14 kompleksid, sest valdavalt apoptootilised kehad fluorestseeruva märgisega siRNA-d ei sisalda (Joonis 15). Seega on üheks võimaluseks, et rakkude elulemusele mõjuvad nõ vabad peptiidid ehk PF14 molekulid, mis ei ole siRNA-ga komplekseerunud. Selle kinnituseks on varasemalt näidatud, et lastmolekuli lisamisel osade CPP-de toksilisus väheneb (El-Andaloussi *et al.*, 2010). Transfekteeritud ja transfekteerimata proovides erineval määral esinev apoptoos võib olla seotud ka üksikrakulise passeerimise ehk protsessiga, mille käigus rakkude vahelised sidemed lõhutakse (Li *et al.*, 2012). Seejuures on

näidatud, et hES rakkude elulemuse ning prolifereerumis- ja diferentseerumisvõime tagamisel on kriitilise tähtsusega kontaktide olemasolu teiste rakkude ja kasvupinnaga. Näiteks on teada, et E-kadheriini või integriinide vahendatud interaktsioonide puudumisel indutseeritakse programmeeritud rakusurm (Chen *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2007). Seejuures võivad söötmes sisalduvad transfektsioonikompleksid elektrostaatiliste tõmbejõudude abil interakteeruda nii ekstratsellulaarse matriksi (Matrigel) kui ka raku välismembraaniga ning olla seeläbi täiendavaks takistuseks rakk-rakk ja rakk-matriksi ühenduste taasloomisel üksikrakulise passeerimise järgselt (Richard *et al.*, 2003). Komplekside seondumist Matrigeliga kinnitab fluorestsentsmikroskoopia analüüs, mille abil on tuvastatav siRNA-Alexa 568 seondumine kasvupinnale rakuvabal alal (Joonis 9). Varasemates PF14-ga seotud uuringutes on kasutatud rakutüüpe, mille elulemuseks ei ole hädavajalik rakk-rakk kontaktide olemasolu ning on näidatud, et tegemist on madala tsütotoksilisusega reagentiga, mis ei põhjusta märkimisväärsed muutusi raku funktsioneerimises (va autofaagia indutseerimine) (Dowaidar *et al.*, 2017; Ezzat *et al.*, 2011; Juks *et al.*, 2015; Veiman *et al.*, 2013). Kuigi on selge, et sama ühend võib mõjuda erinevatele rakutüüpidele erinevalt, on nii käesoleva töö raames kui ka eelnevalt saadud tulemuste põhjal tõenäoline, et vähenenud elulemus kõrgemate siRNA ja PF14 kontsentratsioonide kasutamisel ei ole tingitud rakusiseste protsesside häirumisest.



Joonis 15. siRNA-Alexa 568-ga transfekteeeritud proovi apoptootilised kehad valdavalt siRNA-d ei sisalda. A. Punktjoonise Y-teljel on Alexa 568 fluorokroomile ja X-teljel DAPI-le vastav fluorestsentsi intensiivsus. Mustad punktid vastavad kõikidele detekteeritud sündmustele (sh rakud, apoptootilised kehad ja raku fragmendid), rohelised punktid vastavad elusatele rakkudele ja sinised punktid apoptootilistele kehadele. **B.** Histogrammi Y-teljel on rakkude arv ja X-teljel Alexa 568 fluorokroomile vastav fluorestsentsi intensiivsus. Joonise keskpaigas asuv püstkriips tähistab läviväärtust, millest alates loeti rakk/keha transfekteeerunuks. Kasutatud siRNA kontsentratsioon: 30 nM. Analüüsi ajapunkt: 32 h.

Eelnevast analüüsist on selge, et kui vähendada nii PF14 kui ka siRNA kontsentratsiooni, paraneb rakkude elulemus. Seejuures ei ole siRNA/PF14 tsütotoksilisus tõenäoliselt seotud mitte rakku jõudnud, vaid keskkonnas sisalduvate kompleksidega, mis takistavad rakkude kinnitumist kasvupinnale ja rakk-rakk kontaktide taasloomist passeerimise järgselt.

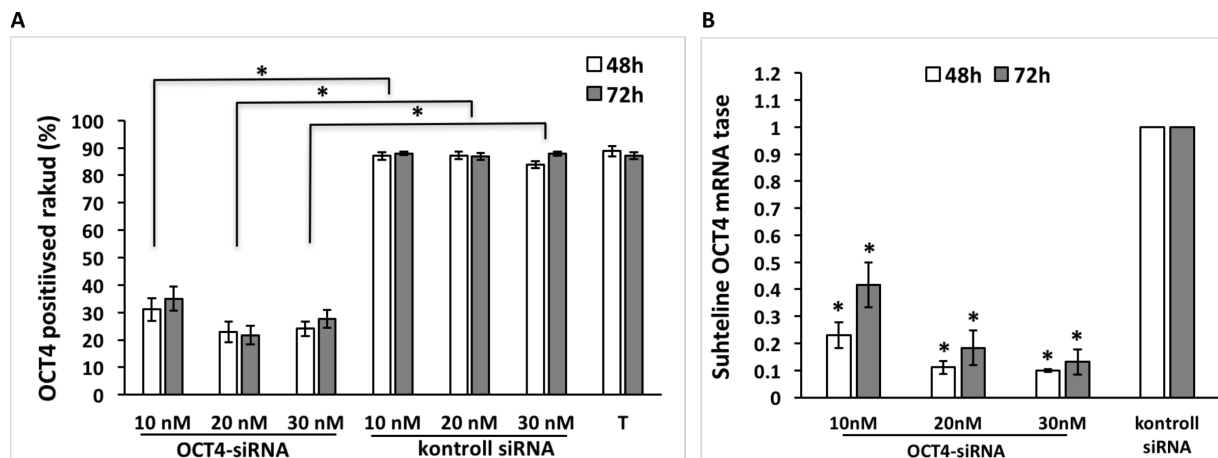
2.3.4 OCT4-siRNA põhjustab nii valgu kui ka mRNA taseme alanemise

Saadud tulemused näitavad, et madalamad siRNA ja PF14 kontsentratsioonid ei mõjuta oluliselt rakkude elulemust. Soovides kasutada antud komponente geeni funktsiooni uurimisel, tuleb veenduda, et vastavad kontsentratsioonid oleksid sobilikud ka geeniekspressiooni vaigistamiseks. Sellest lähtuvalt kasutati kõikides järgnevates eksperimentides paralleelselt nii 10 nM, 20 nM kui ka 30 nM siRNA kontsentratsiooni. Lisaks analüüsiti rakke nii 48 h kui ka 72 h ajapunktis, et uurida, kui kiire ja stabiilne on sihtmärkgeeni ekspressiooni vaigistamine.

Tulemusena leiti, et nii 10 nM, 20 nM kui ka 30 nM OCT4-siRNA toime on OCT4 positiivsete rakkude osakaal märkimisväärselt langenud võrreldes kontroll siRNA-ga töödeldud või transfekteeerimata proovidega (Joonis 16A). Seejuures on OCT4 vaigistamine täheldatav nii 48 h kui ka 72 h möödudes. Selle tõestuseks on 20 nM OCT4-siRNA-ga töötamise tulemusel OCT4 positiivsete rakkude osakaal vastavates ajapunktides 23% ja 22%. Samal ajal on kontrollides keskmiselt 87% rakkudest säilitanud OCT4 ekspressiooni. Lisaks ei põhjusta kontroll siRNA muutusi OCT4 tasemes, mis on esmaseks kinnituseks selle kohta, et transfektsioonimeetod iseenesest ei mõjuta rakkude pluripotensust ning näitab, et OCT4 vaigistamine on OCT4-siRNA järjestusspetsiifiline efekt.

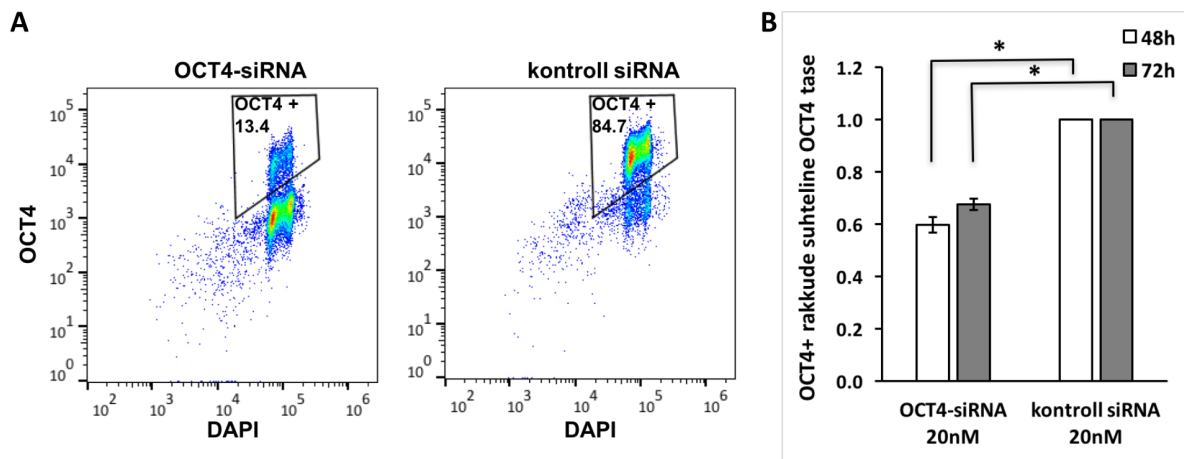
Kontrollimaks, kas täheldatud OCT4 negatiivsete rakkude osakaalu suurenemine on tingitud OCT4-siRNA poolt indutseeritud mRNA lagundamisest, kasutati RT-qPCR meetodit mRNA taseme detekteerimiseks. Seejuures tuvastati kogu populatsioonile vastav keskmine mRNA tase, sest RNA eraldamiseks ja järgnevas analüüsiks lüüsi kõik ühes kannus kasvanud rakud (nii OCT4 positiivsed kui ka negatiivsed). Kvantitatiivse analüüsi tulemusel leiti, et 48 h ajapunktis on 20 nM ja 30 nM siRNA kasutamisel OCT4 mRNA tase vähenenud ligi 90% võrreldes kontroll siRNA-ga töödeldud prooviga (Joonis 16B). Suhteline OCT4 mRNA tase antud ajapunktis 20 nM ja 30 nM OCT4-siRNA toime on vastavalt 0,11 ja 0,10. Erinevalt kõrgematest kontsentratsioonidest oli 10 nM OCT4-siRNA kasutamisel täheldatav ekspressiooni taastumine, kui võrrelda 48 h ja 72 h ajapunktide proove (OCT4 mRNA

suhteline tase vastavalt 0,23 ja 0,42). Suhtelise mRNA taseme tõus on tingitud tõenäoliselt nendest rakkudest, millesse siRNA ei jõudnud ning mis säilitasid kõrge OCT4 taseme. Sellised diferentseerumata rakud jagunevad kiiremini ja saavad kultuuris valdavaks (Zaehres *et al.*, 2005). Seega, võttes arvesse rakkude elulemust ning OCT4 vaigistamise efektiivsust, on eelistatud 20 nM lõppkontsentratsiooniga siRNA kasutamine.



Joonis 16. OCT4-siRNA põhjustab nii OCT4 valgu kui ka mRNA taseme vähenemise 48 h ja 72 h ajapunktides. A. OCT4 positiivsete rakkude osakaal (%) erineva kontsentratsiooniga (10 nM, 20 nM või 30 nM) OCT4-siRNA või kontroll siRNA-ga töödeldud proovides. **B.** Suhteline OCT4 mRNA tase 10 nM, 20 nM või 30 nM OCT4-siRNA-ga töödeldud proovis vastava kontsentratsiooniga kontroll siRNA-ga töödeldud proovi suhtes. Joonisel on esitatud kolme sõltumatu katse keskväärtsus $\pm$ SEM ja statistiliselt olulised erinevused (P-väärtus väiksem kui 0,05) on tähistatud sümboliga *. Lühendid: T, transfekteeimata.

Võrreldes vaigistamise efektiivsust mRNA ja valgu tasemel, selgub, et mRNA tase on OCT4-siRNA toimet vähenenud kuni 90%, kuid valgu ekspresseerivate rakkude hulk kuni 70% võrreldes kontroll siRNA prooviga. Tuvastatud väiksem tõhusus valgu tasemel on näiline, sest läbivoolutsütomeetrias analüüsitakse rakke ühe kaupa, kuid RT-qPCR meetodil mõõdetakse kogu rakupopulatsiooni keskmist. Mõnes rakus võib OCT4 valgu tase siRNA toimet alaneda vaid vähesel määral ja sellisel juhul madalama ekspressiooniga rakk loetakse siiski OCT4 positiivsete hulka (Joonis 17A). Sellised rakud on aga osa kogu populatsioonist ja seeläbi panustavad tuvastatud mRNA taseme vähenemisesse. Antud hüpoteesi kinnitamiseks mõõdeti, milline on suhteline OCT4 valgu tase OCT4 positiivsete rakkude hulgas. Selgus, et 20 nM OCT4-siRNA-ga töödeldud proovides on keskmine OCT4 valgu tase OCT4 positiivsete rakkude hulgas madalam kui 20 nM kontroll siRNA-ga mõjutatud proovides (Joonis 17B). See tõestab püstitatud hüpoteesi, et kõik vähenenud OCT4 ekspressiooniga rakud ei kuulu OCT4 negatiivsete populatsiooni.



Joonis 17. OCT4-siRNA põhjustab OCT4 valgu taseme vähenemise ka OCT4 positiivsetes rakkudes. **A.** Läbivoolutsütomeetrilise analüüsi representatiivsed punktjoonised, mis kirjeldavad OCT4 positiivsete rakkude osakaalu vähenemist OCT4-siRNA toimel. Y-teljel on OCT4 valgu tasemele vastav fluorestsentsi intensiivsus ning X-teljel DNA-ga seonduva värvi DAPI fluorestsentsi intensiivsus. Joonisel esitatud arvvaartused vastavad OCT4 positiivsete rakkude osakaalule (%) vastavates proovides. Kasutatud siRNA kontsentratsioon: 20 nM. Analüüsi ajapunkt: 72 h. **B.** OCT4 positiivsete rakkude keskmine suhteline OCT4 valgu tase väheneb OCT4-siRNA toimel. Joonisel on esitatud väärtused suhtelisena vastava ajapunkti 20 nM kontroll siRNA proovi suhtes. Joonisel on esitatud kolme sõltumatu katse keskväärtus $\pm$ SEM ja statistiliselt olulised erinevused (P-väärtus väiksem kui 0,05) on tähistatud sümboliga *. Lühendid: OCT4+, OCT4 positiivsed.

Lisaks uuriti, kas saavutatud väga efektiivne geeniekspressiooni vaigistamine on tingitud peamiselt kasutatud transfektsioonistrateegiast või -reagendist. Selle jaoks kontrolliti, kas PF14 on võimeline OCT4-siRNA transportima ka rakkudesse, mis on passeeritud üksikrakulisena või kolooniatükkidena ja külvatud 24 tundi enne transfekkeerimist. Seeläbi rakendati nõ traditsioonilist lipofektsioonireagentide puhul kasutatavat protokollit, mis seisneb rakkude külvamises transfektsioonile eelneval päeval. Tulemusena leiti, et rakkude passeerimine 24 tundi enne mõjutamist tagab nende kõrge elulemuse, kuid madala transfektsiooniefektiivsuse. Nimelt oli 30 nM OCT4-siRNA töötluse tulemusel OCT4 positiivsete rakkude osakaal vähenenud vaid 16% võrra kolooniatükkide ja 46% võrra üksikrakkude kasutamisel (Lisa 2, Joonis 1). Saadud tulemused näitavad, et komplekside jõudmine rakkudeni ja/või rakkude vastuvõtlikkus komplekside suhtes väheneb, kui rakud külvata kasvupinnale 24 tundi enne mõjutamist. Seega on PF14 eeliseks lipofektsioonireagentide ees madal tsütotoksilisus, mis võimaldab 24-tunnist transfektsiooni vahetult peale passeerimist. Selle aja jooksul transpordib PF14 lastmolekuli efektiivselt rakkudesse, mis teeb võimalikuks madalate siRNA kontsentratsioonide kasutamise ja vähendab seeläbi potentsiaalsete ebaspetsiifiliste toimete hulka. Nimelt on näidatud, et liiga suurel hulgal siRNA olemasolul juhib see RISC-i ka osaliselt komplementaarsetele

järjestustele ja põhjustab vastava geeni ekspressiooni alanemise miRNA funktsioneerimisele sarnaste mehhanismide abil (Caffrey *et al.*, 2011). Vähendamaks võimalike kõrvalmõjude esinemise tõenäosust veelgi, on antud magistritöös kasutatud Ambion Silencer® Select siRNA-sid, mille disainimisel ja sünteesil on vastavalt kasutatud spetsiifilisust suurendavaid algoritme ja nukleotiide.

Kokkuvõttes kinnitavad saadud tulemused, et optimaalset protokoll järgides on PF14 ja siRNA kasutamisel võimalik indutseerida efektiivne ja stabiilne OCT4 geeniekspressiooni vaigistamine vaid ühe transfektsiooni tulemusel. Seejuures tuleb meeles pidada, et OCT4 on pluripotentsusfaktor, mis tagab iseenda ja teiste arengupotentsiaali säilitamisel oluliste valkude ekspressiooni ning on diferentseerumisel väga kiiresti alla reguleeritud (Boyer *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2012; Hay *et al.*, 2004; Li ja Belmonte, 2017; Saxe *et al.*, 2009). Seega võib eeldada, et esmane OCT4 ekspressiooni alandamine indutseerib rakusisesed mehhanismid, mis viivad täiendava vaigistamiseni.

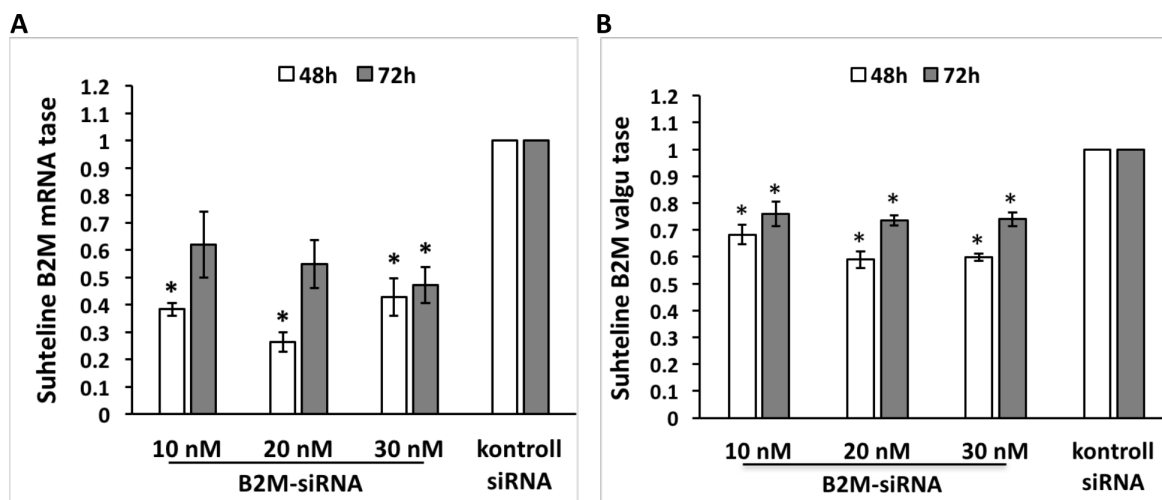
2.3.5 siRNA ja PF14 on sobilikud ka β -2-mikroglobuliini ekspressiooni vaigistamiseks

Veendumaks, et PF14 ei sobi ainult OCT4 ekspressiooni vaigistamiseks, vaid on rakendatav ka teiste (sh pluripotentsusega mitte seotud) geenide funktsiooni uurimisel, kasutati sihtmärgina β -2-mikroglobuliini (B2M). B2M on kõikide tuumaga rakkude membraanis paikneva peamise koosobivuskompleksi I (MHC I, ingl k *major histocompatibility complex I*) kerge ahel (Güssow *et al.*, 1987; Snell, 1948). MHC I abil tuvastab organism võõraid rakke ning indutseerib nende hävitamise tsütotoksiliste T-lümfotsüütide poolt (Lombardi *et al.*, 1991). Seetõttu on MHC I peamiseks transplantaadi äratõukereaktsioonide allikaks regeneratiivmeditsiinis. Lähtudes eesmärgist vältida organismi siirdatud rakukogumi hävitamist, on loodud B2M *knock-out* hES rakuliine ning näidatud, et B2M puudumine ei mõjuta hES rakkude eneseuundamis- ega diferentseerumisvõimet (Lu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Seega leiti varasemate tulemuste põhjal, et B2M võiks olla sobilik märklaud, mis ei ole seotud pluripotentsusvõrgustikuga.

B2M geeniekspressiooni vaigistamiseks transfekteeeriti rakke vastava siRNA-ga üks kord ning analüüs viidi läbi 48 h ja 72 h ajapunktides (Joonis 6). Läbivoolutsütomeetrilisel analüüsil leiti, et B2M-siRNA toimel ei moodustu kahte selgelt eristuvat populatsiooni ning seetõttu kasutati B2M valgu taseme hindamiseks kogu populatsioonile vastavat fluorestsentsi intensiivsuse geomeetrilist keskväärtust (gMFI, ingl k *geometric mean fluorescence*

intensity). Lisaks valgu taseme detekteerimisele tuvastati ka B2M mRNA tase RT-qPCR meetodil.

Selgus, et B2M-siRNA toimetel on vähenenud nii B2M mRNA kui ka valgu tase mõlemas vaadeldud ajapunktis (Joonis 18). Näiteks, 48 tunni möödudes transfektsiooni algusest on B2M mRNA ja valgu tase 20 nM B2M-siRNA proovis vastavalt 74% ja 59% võrra madalam kui sama kontsentratsiooniga kontroll siRNA proovis. Võrreldes vaigistamise ulatust 48 h ja 72 h ajapunktides, täheldati, et sihtmärkgeeni ekspressioon on hilisemas ajapunktis hakanud taastuma. Selle kinnituseks on 20 nM B2M-siRNA puhul suhtelised mRNA tasemed vastavalt 0,26 ja 0,54. Samasugust efekti on ka varasemalt täheldatud (Zafarana *et al.*, 2009) ning dünaamika on seletatav olemasoleva siRNA metaboliseerimisega raku elutegevuse ning lahjenemisega raku jagunemise käigus (Bartlett ja Davis, 2006). Rakusisese siRNA hulga vähenemise tulemusel sünteesitud B2M mRNA-d enam ei lagundata ning vastava molekuli tase rakkudes tõuseb. Lisaks leiti, et B2M mRNA taseme vähenemine on tunduvalt ulatuslikum, kui valgu tasemel detekteeritud muutus. Tõenäoliselt on see seotud B2M valgu stabiilsusega. Isegi juhul, kui täiendavat translatsiooni ei toimu, on juba varasemalt sünteesitud valk piisavalt pika elueaga, et B2M olemasolu membraanis teatud määral säilitada. Samasugust efekti ei täheldatud OCT4 puhul, sest tegemist on transkriptsioonifaktoriga, mis peab tagama raku kohese vastuse keskkonnast tulnud signaalile. Seetõttu on selle degradatsioon ja süntees väga kiiresti toimuvad protsessid, mida tõestab OCT4 reguleeritud lagundamine post-translatsiooniliste modifikatsioonide vahendusel (Cai *et al.*, 2012; Saxe *et al.*, 2009). Samuti märgati, et B2M mRNA tase tõusis ligikaudu 30% kui võrrelda 48 h ja 72 h ajapunkte, kuid valgu tasemel oli vastav muutus vaid 20%. See on tõenäoliselt tingitud olukorrast, kus mRNA on juba sünteesitud, kuid translatsiooni sellelt pole jõudnud veel toimuda. Võrreldes veel B2M ja OCT4 vaigistamist on näha, et B2M-siRNA ei indutseeri nii ulatuslikku sihtmärkgeeni vaigistamist kui OCT4-siRNA. See kinnitab varasemalt püstitatud hüpoteesi, mille kohaselt on osa pluripotentsusfaktori puhul täheldatud muutusest saavutatud tänu rakusisestele regulatsioonimehhanismidele, mis esialgse vaigistamise järgselt põhjustavad täiendava OCT4 languse.



Joonis 18. B2M-siRNA põhjustab mõõduka ja lühiaegse B2M ekspressiooni vaigistamise. Suhteline B2M mRNA (A) ja valgu (B) tase erineva kontsentratsiooniga (10 nM, 20 nM, 30 nM) B2M-siRNA-ga töödeldud proovides 48 h ja 72 h ajapunktides. Y-teljel on suhteline B2M tase vastava kontsentratsiooniga kontroll siRNA proovi suhtes. Joonisel on esitatud kolme sõltumatu katse keskvärtus $\pm$ SEM ja statistiliselt olulised erinevused (P-väärtus väiksem kui 0,05) on tähistatud sümboliga *.

Kokkuvõttes näitavad saadud tulemused, et PF14 ja siRNA-l põhinev meetod sobib ka B2M ekspressiooni vaigistamiseks. Samuti selgus, et vaigistamise efektiivsus ja kestus sõltub sihtmärgist, selle avaldumise regulatsioonist ning valgu stabiilsusest. Väljatöötatud meetodika lihtsus võimaldab seda aga kerge vaevaga modifitseerida (muuta transfekteeerimiste arvu, kestust ja sagedust) lähtudes märklauast ja uurimisküsimusest. Seeläbi on võimalik uurida nii ajutise kui ka stabiilse vaigistamise tagajärgi. Näiteks, üksiktransfektsioonist piisab lühiaegseks vaigistamiseks, kuid transfekteeerimine iga 72 h järel võiks tagada püsivalt madala B2M ekspressiooni. Lisaks saab reguleerida vaigistamise ulatust, mis on oluline rakkudele eluks hädavajalike geenide puhul. Näiteks tuumas ja ka teistes raku kompartmentides leiduva ning transkriptsiooni ja ribosoomide biogeneesi regulatsioonis osaleva nukleoliini täielik puudumine on rakkudele letaalne ja ei võimalda edasisi analüüse (Ugrinova *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). Selliste sihtmärkide puhul võiks olla lahenduseks madalamate siRNA kontsentratsioonide ja lühema transfektsiooni kasutamine, millest piisaks vaid geeniekspressiooni mõõdukaks vaigistamiseks.

2.3.6 OCT4 vaigistamine indutseerib diferentseerumise neuroektodermaalses suunas

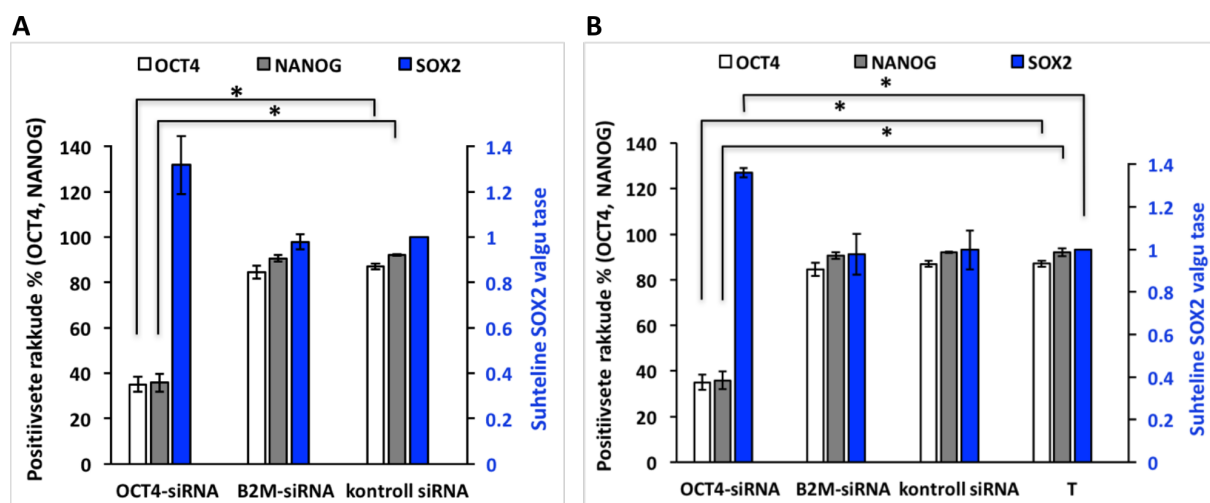
Eelnevate tulemuste põhjal on selge, et PF14 ja siRNA sobivad geeniekspressiooni vaigistamiseks hES rakkudes. RNAi kasutamise põhjuseks on aga sihtmärkgeeni funktsiooni

mõistmine. Sellest lähtuvalt uuriti, millist mõju avaldab OCT4 ekspressiooni vaigistamine hES rakkudele.

Varasemalt on teada, et OCT4 taseme alanemisel toimub hES rakkude diferentseerumine, kuid seejuures sõltub spetsialiseerumise suund kasutatavast rakuliinist (Wang *et al.*, 2012). Käesoleva töö raames kasutati hES rakuliini H9 (WA09, National Stem Cell Bank) ja OCT4 vaigistamisel toimuvate sündmuste esmaseks hindamiseks jälgiti rakkude morfoloogia muutusi valgusmikroskoobi abil 24 h, 48 h ja 72 h ajapunktides. Kuigi väikesed erinevused võrreldes B2M-siRNA, kontroll siRNA ja transfekteerimata proovide rakkudega olid OCT4-siRNA proovis täheldatavad juba 24 h möödudes, tuvastati drastilised muutused 48 h ajapunktis (Lisa 3, Joonis 1). Seejuures ei moodustanud OCT4-siRNA-ga mõjutatud rakud kolooniaid, mis on muidu iseloomulikud hES rakkudele, ning olid lamendunud ja väljavenitatud fenotüübiga, meenutades fibroblaste. Täheldatud muutused on iseloomulikud diferentseeruvatele hES rakkudele (Fong *et al.*, 2008; Hyslop *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2010; Zaehres *et al.*, 2005; Zafarana *et al.*, 2009).

Veendumaks, et OCT4 vaigistamine toob kaasa hES rakkude diferentseerumise, detekteeriti esmalt peamiste pluripotentsusfaktorite hulka kuuluvate valkude SOX2 ja NANOG ekspressiooni. Analüüsil tuvastati, et OCT4-siRNA toimetel on vähenenud ka NANOG ekspressioon, kuid SOX2 avaldumine võrreldes kontroll siRNA prooviga märkimisväärselt ei muutunud (Joonis 19A)(Wang *et al.*, 2012). Antud tähelepanekud on kooskõlas varasemate uuringutega, mis näitasid, et pluripotentsusvõrgustiku tagasiside mehhanismidest tingitult põhjustab OCT4 taseme alanemine ka NANOG-i ekspressiooni vähenemise (Babaie *et al.*, 2007; Bernstein *et al.*, 2006; Boyer *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012; Zaehres *et al.*, 2005). Seejuures ei täheldatud muutusi OCT4, NANOG ega SOX2 tasemes B2M-siRNA või kontroll siRNA-ga töödeldud proovides võrreldes transfekteerimata rakkudega (Joonis 19B). See kinnitab, et kasutatav transfektsioonimeetod iseenesest pluripotentsusfaktorite avaldumist ja seeläbi tõenäoliselt ka hES rakkude arengupotentsiaali ei mõjuta. Seejuures tuleb meeles pidada, et kuigi kõige kiirem ja lihtsam viis hES rakkude diferentseerumisvõimet hinnata on pluripotentsusfaktorite (sh ka rakupinna antigeenide SSEA3 (ingl k *stage-specific embryonic antigen 3*), SSEA4, Tra-1-81 (ingl k *tumor rejection antigen 1-81*) ja Tra-1-60 (Martí *et al.*, 2013)) ekspressiooni tuvastamine, ei kinnita see, et uuritavad rakud on võimelised andma nii ekto-, endo- kui ka mesodermi derivaate. Täiendava analüüsina kontrollitakse kolme lootelehe derivaatide olemasolu embrüonaalsetes kehaosades või teratoomides, mis on

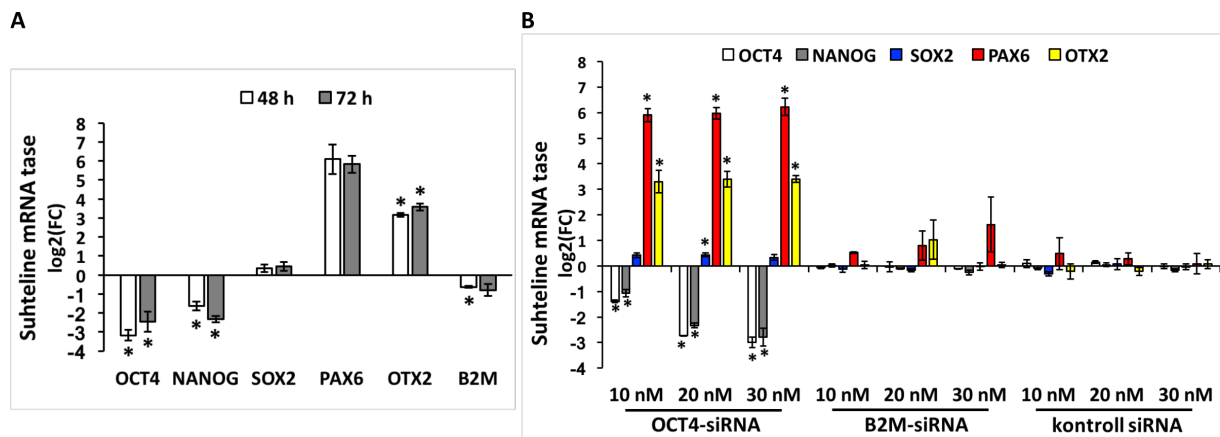
moodustunud peale uuritavate hES rakkude transplanteerimist immuundefitsiitsesse hiirde (Martí *et al.*, 2013). Embrüonaalsed kehad on diferentseerunud hES rakkude kogumikud, mis tekivad, kui rakkudel puudub võimalus kinnituda kasvupinnale ja keskkonnas ei ole pluripotentsust tagavaid faktoreid (Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000). Kliiniliselt defineeritakse teratoome kui pluripotentsetest sugurakkude eellastest alguse saanud kasvajak, mis sisaldavad väga erinevaid koetüüpe ja struktuure (nt lihaskude, karvu, hambaid) (Stevens *et al.*, 1954). Võttes arvesse, et käesoleva töö eesmärgiks oli transfektsioonimetoodika väljatöötamine piirduti antud magistritöö raames vaid pluripotentsusfaktorite ekspressiooni detekteerimisega.



Joonis 19. Ainult OCT4-siRNA toimel langeb peamiste pluripotentsusfaktorite OCT4 ja NANOG ekspressioon. OCT4 ning NANOG positiivsete rakkude osakaal (%) ja suhteline SOX2 tase kontroll siRNA (**A**) või transfekteeimata (**B**) rakkudega proovi suhtes. Kasutatud siRNA kontsentratsioon: 20 nM. Analüüsi ajapunkt: 72 h. Joonisel on esitatud kolme sõltumatu katse keskväärtsus $\pm$ SEM ja statistiliselt olulised erinevused (P-väärtus väiksem kui 0,05) on tähistatud sümboliga *. Lühendid: T, transfekteeimata.

Blastotsüsti sisemisest rakumassist saavad alguse kõik organismi rakutüübid. Seetõttu peab pluripotentsetest rakkudest erinevate derivaatide tekkimine olema väga täpselt reguleeritud protsess, et kõik vajalikud funktsioonid tulevases organismis saaksid täidetud. Uurimaks, millises suunas toimub spetsialiseerumine OCT4 vaigistamisel, detekteeriti ekto-, meso- ja endodermile iseloomulike markerite ekspressiooni mRNA tasemel (Tabel 3). RT-qPCR meetodil kinnitati, et *NANOG* ja *SOX2* mRNA tase on kooskõlas valgu tasemel täheldatud muutustega (Joonis 20A). Analüüsi tulemusel leiti veel, et 20 nM OCT4-siRNA toimel on märkimisväärselt tõusnud ektodermaalsete markerite, *OTX2* ja *PAX6*, ekspressioon, mis iseloomustavad diferentseerumist neuroektodermaalses suunas. Samasuguste järeldusteni on jõudnud ka Wang ja kaastöötajad, kes näitasid, et OCT4 vaigistamisel toimub

diferentseerumine neuraalses suunas, millele on iseloomulik SOX2 ekspressiooni säilimine (Dhara ja Stice, 2008; Fong *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). Seejuures leiti käesolevas töös, et meeelundite ning aju arengus olulise transkriptsioonifaktori *OTX2* (ingl k *Orthodenticle Homeobox 2*) ning kesknärvisüsteemi, aju, silmade ja kõhunäärme arengut reguleeriva transkriptsioonifaktori *PAX6* (ingl k *Paired box 6*) tase on märkimisväärselt tõusnud vähem kui 48 tunniga (Larsen *et al.*, 2009). Lühikese ajaga toimuv diferentseerumine on tõenäoliselt OCT4 kiire degradatsiooni ja sellele järgneva NANOG-i ekspressiooni vaigistamise tagajärg (Cai *et al.*, 2012; Saxe *et al.*, 2009). Muidu neuraalses suunas diferentseerumist blokeeriva NANOG-i puudumine võimaldab hES rakkude spetsialiseerumist (Wang *et al.*, 2012). Lisaks leiti, et B2M-siRNA ja kontroll siRNA ei indutseeri muutusi ühegi diferentseerumismarkeri ekspressioonis, mis kinnitab täiendavalt, et kasutatud nanokompleksid ei mõjuta hES rakkude omadusi (Joonis 20B).

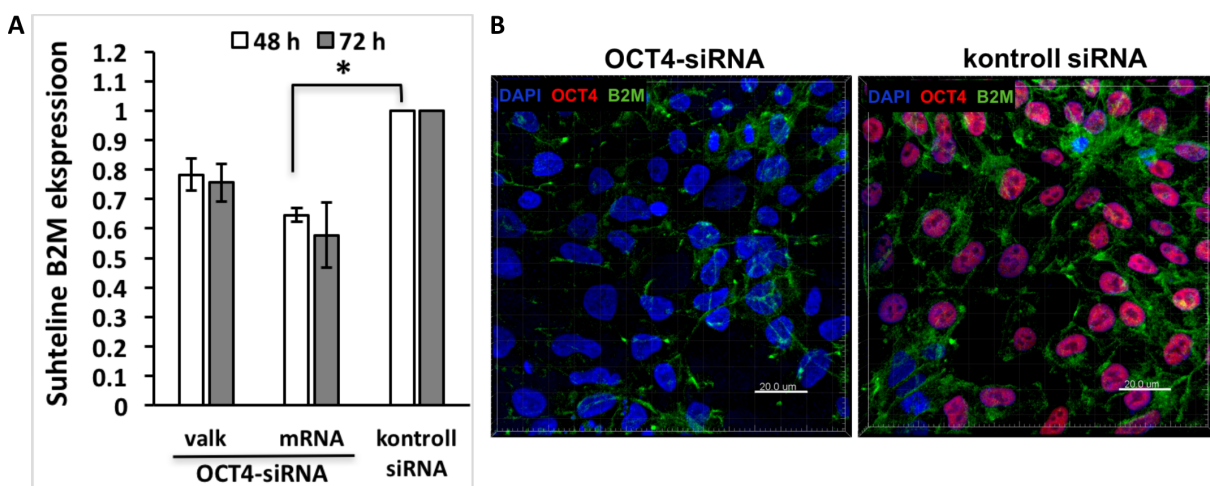


Joonis 20. OCT4 vaigistamine põhjustab OTX2 ja PAX6 ekspressiooni tõusu ehk diferentseerumist neuroektodermaalses suunas. A. Pluripotentsus- (*NANOG*, *SOX2*) ja diferentseerumismarkerite (*PAX6*, *OTX2*) ekspressioon mRNA tasemel 20 nM OCT4-siRNA proovis 48 h ja 72 h ajapunktides võrreldes 20 nM kontroll siRNA prooviga. Joonise Y-teljel on logaritm mRNA taseme muutusest kordades alusel 2 ($\log_2FC$). Seejuures on arvatud mitu korda on OCT4-siRNA-ga töödeldud rakkudes uuritava mRNA tase kõrgem või madalam kui kontroll siRNA-ga töödeldud rakkudes. Negatiivse väärtuse korral on OCT4 vaigistamisel vastava mRNA tase vähenenud ning positiivse väärtuse korral tõusnud. **B.** Pluripotentsus- ja diferentseerumismarkerite ekspressioon mRNA tasemel OCT4-siRNA, B2M-siRNA või kontroll siRNA töötamise tulemusel 72 h ajapunktis võrrelduna transfekteeerimata rakkudega. Joonisel on esitatud kolme sõltumatu katse keskvärtus $\pm$ SEM ja statistiliselt olulised erinevused (P-väärtus väiksem kui 0,05) on tähistatud sümboliga *. Lühendid: FC, muutus kordades (ingl k *fold change*).

Saadud tulemused näitavad, et PF14 ja siRNA abil on võimalik uurida geeni funktsiooni hES rakkudes ning saavutada usaldusväärseid tulemusi.

2.3.7 B2M ekspressioon väheneb varasel neuroektodermaalsel diferentseerumisel

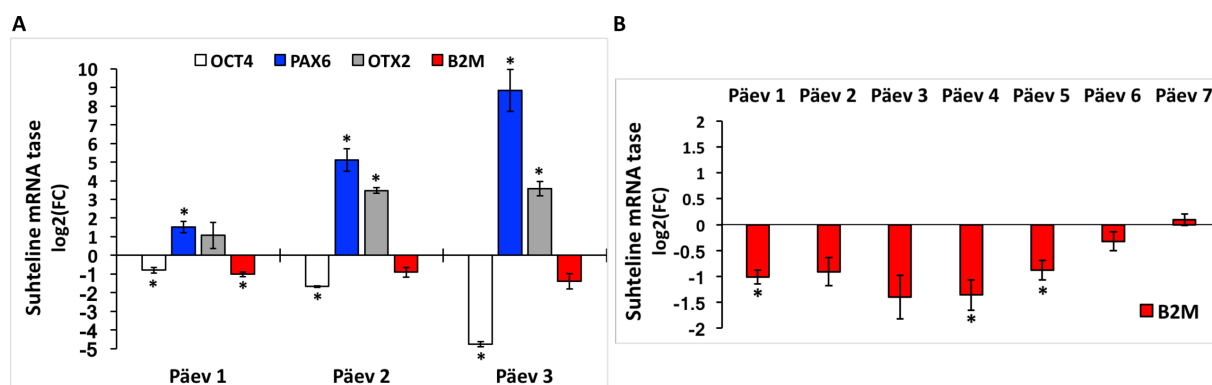
Käesoleva töö eksperimentides detekteeriti kõikides proovides nii OCT4 kui ka B2M ekspressiooni. Selle tulemusel selgus, et OCT4 vaigistamisel väheneb ka B2M ekspressioon nii valgu kui ka mRNA tasemel (Joonis 21A). Seejuures ei toimu B2M ekspressiooni taastumist 72 h ajapunktis, mis tõestab, et tegemist ei ole OCT4-siRNA ebaspetsiifilise toimega, vaid rakkude diferentseerumisel aset leidva reguleeritud protsessiga. Kinnitamaks, et B2M ekspressioon on vähenenud just nendes rakkudes, mida iseloomustab alanenud OCT4 tase, kasutati immunofluorestsentsmikroskoopiat. Tulemusena nähti, et OCT4 negatiivsetes rakkudes puudub OCT4 ekspressioon täielikult ning samuti on vähenenud membraanis paikneva B2M hulk võrreldes kontroll siRNA prooviga (Joonis 21B).



Joonis 21. OCT4 vaigistamisel väheneb B2M mRNA ja valgu tase. **A.** Suhteline B2M mRNA ja valgu tase 20 nM OCT4-siRNA proovis 48 h ja 72 h ajapunktides 20 nM kontroll siRNA proovi suhtes. Joonisel on esitatud kolme sõltumatu katse keskväärus $\pm$ SEM ja statistiliselt olulised erinevused (P -väärtus väiksem kui 0,05) on tähistatud sümboliga *. **B.** Immunofluorestsentsmikroskoopia pildid 20 nM OCT4-siRNA või 20 nM kontroll siRNA-ga töödeldud rakkudest kinnitamaks OCT4 vaigistamisega kaasnevat B2M ekspressiooni vähenemist. Rakutuum on nähtav sinisena (värvitud DNA-ga seonduva värviga DAPI) ja tuumas paiknev transkriptsioonifaktor OCT4 punasena, mis kattudes annavad roosaka värvitooni. Valdavalt rakumembraanis paiknev B2M on nähtav rohelisena. Analüüsi ajapunkt: 72 h.

Varasemalt on aga täheldatud, et hES rakkude diferentseerimisel embrüonaalsete kehadena B2M ekspressiooni tase hoopis tõuseb (Drukker *et al.*, 2002). Selgitamaks, millest on tingitud vastandlikud tulemused, indutseeriti hES rakkude spetsialiseerumine kasutades komertsiaalset söödet, milles sisalduvad faktorid põhjustavad diferentseerumise neuraaalses suunas (NIM, ingl k *neural induction medium*). Saadud rakkude analüüsil tuvastati OTX2 ja PAX6 mRNA taseme tõus, mis kinnitab spetsialiseerumist närvirakkude eellasteks

(Joonis 22A). Lisaks täheldati *OCT4* ekspressiooni vähenemist, mis on kooskõlas *OCT4*-siRNA toimel aset leidva neuroektodermaalse diferentseerumisega. Veelgi enam, 3. päeval oli detekteeritav ligi 3-kordne *B2M* taseme langus võrreldes diferentseerumata hES rakkudega. Tegemist on sama ulatusliku muutusega, kui *OCT4* vaigistamisel indutseeritud *B2M* taseme alanemine 72 h ajapunktis (Joonis 20A). Kommertsiaalse söötme abil diferentseeritud rakkude edasisel analüüsil selgus aga, et alates 5. päevast hakkab *B2M*-i ekspressioon tõusma. Võttes arvesse *B2M* muutuse suunda ja seda, et embrüonaalseid kehasid analüüsiti varasemalt avaldatud artiklis 10-20. päeva ajapunktides, on esialgu tuvastatud vastuolu lahendatud. Kokkuvõttes näitab esmakordselt tuvastatud *B2M* ekspressiooni vähenemine varasel neuroektodermaalsel diferentseerumisel, et käesolevas töös väljatöötatud meetoodika sobib hES rakkude spetsialiseerumise uurimiseks.



Joonis 22. Varasel neuraalsel diferentseerumisel tõuseb *OTX2* ja *PAX6* ning väheneb *OCT4* ja *B2M* mRNA tase. **A.** Pluripotentsusfaktori *OCT4*, neuroektodermaalsete markerite *PAX6* ja *OTX2* ning MHC I komponendi *B2M* mRNA tase rakkudes, mis on kasvanud neuraalset diferentseerumist indutseerivas (NIM) söötmes 1-3 päeva võrreldes diferentseerumata hES rakkudega. **B.** *B2M* mRNA tase rakkudes, mis on kasvanud NIM söötmes 1-7 päeva võrreldes diferentseerumata hES rakkudega. Joonise Y-teljel on logaritmi mRNA taseme muutusest kordades alusel 2 ($\log_2FC$). Seejuures on arvutatud mitu korda on NIM söötmes kasvanud rakkudes uuritava mRNA tase kõrgem või madalam kui diferentseerumata rakkudes. Negatiivse väärtuse korral on NIM söötmes vastava mRNA tase vähenenud ning positiivse väärtuse korral tõusnud. Joonisel on esitatud kolme sõltumatu katse keskväärtsus $\pm$ SEM ja statistiliselt olulised erinevused (P-väärtus väiksem kui 0,05) on tähistatud sümboliga *. Lühendid: FC, muutus kordades (ingl *fold change*).

KOKKUVÕTE

Blastotsüsti staadiumis embrüo sisemisest rakumassist pärit inimese embrüonaalsed tüvirakud (hES rakud, ingl k *human embryonic stem cells*) on võimelised piiramatult jagunema ja diferentseeruma igaks organismis leiduvaks rakutüübiks. Tänu nendele omadustele on hES rakud hindamatu väärtusega nii arengubioloogias, regeneratiivmeditsiinis kui ka ravimiuuringutes. hES rakkude potentsiaali täielikuks rakendamiseks teaduses ja meditsiinis on vajalik transfektsioonimeetodi olemasolu, mis oleks lihtne ja efektiivne ning ei mõjuks rakkude elulemusele ja pluripotentsusele. Sellest lähtuvalt uuriti käesolevas magistritöös rakku siseneva peptiidi PepFect 14 (PF14) rakendatavust siRNA transpordil hES rakkudesse eesmärgiga töötada välja meetoodika, mis võimaldaks tuvastada geeni funktsiooni antud rakkudes.

Töö esimeses osas kasutati fluorestseeruva märgisega siRNA-sid ning läbivoolutsütomeetrilise analüüsi tulemusel leiti, et PF14 vahendusel on siRNA jõudnud rohkem kui 90% rakkudest. Suurepäraselt transfektsiooniefektiivsust ning siRNA jõudmist rakku kinnitas ka immunofluorestsentsmikroskoopia, mille abil tuvastati lühikese RNA paiknemine nii tsütoplasmas kui ka tuumas. Kontrollimaks, kas PF14 vahendusel rakku jõudnud siRNA on võimeline ka geeniekspressiooni vaigistama, kasutati OCT4 mRNA-le komplementaarse järjestusega siRNA-d. Transfektsiooniprotokolli optimeerimise tulemusel välja töötatud strateegia kasutamisel oli OCT4 positiivsete rakkude osakaal vähenenud 70% võrra kontrollprooviga võrreldes. Seejuures indutseerib võrdlemisi madal ja rakkude elulemusele mittemõjuv siRNA kontsentratsioon (20 nM) ka 10-kordse OCT4 mRNA taseme alanemise. Kinnitamaks, et PF14 sobib ka pluripotentsusega mitteseotud geenide uurimiseks, kasutati sihtmärgina rakumembraanil paiknevat peamise koosobivuskompleksi I (MHC I, ingl k *major histocompatibility complex I*) kerget ahelat β -2-mikroglobuliini (B2M). B2M-siRNA põhjustas sihtmärkgeeni mõõduka ja lühiaegse vaigistamise, mis näitab, et nii kasutatava siRNA järjestus, geeniekspressiooni reguleerivad tagasiside mehhanismid kui ka erinev sihtmärkvalgu stabiilsus võivad mõjutada vaigistamise efektiivsust ja kestust. Seejuures on tänu väljatöötatud protokolli lihtsusele võimalik selle kohandamine uurimisobjektist ja –küsimusest lähtudes. Lisaks näitavad saadud tulemused, et PF14 on universaalne transfektsioonireagent, mis sobib nii transkriptsioonifaktori (OCT4) kui ka membraaniga seotud valgu (B2M) ning tõenäoliselt veel mitmete teiste efektormolekulide ekspressiooni vaigistamiseks.

Viimaks kontrolliti, kas siRNA ning PF14 abil saavutatud geeniekspressiooni vaigistamine võimaldab uurida antud geeni rolli hES rakkudes. Leiti, et OCT4 vaigistamisega kaasneb pluripotentsusfaktor NANOG ekspressiooni vähenemine ning neuroektodermaalsele diferentseerumisele viitavate markerite *PAX6* ja *OTX2* mRNA taseme tõus. Saadud tulemused on kooskõlas varasemate uurimistöödega ning seeläbi kinnitavad, et PF14 ja siRNA kasutamine annab usaldusväärseid tulemusi geenide funktsioonide kohta. Lisaks leiti, et varast neuroektodermaalset diferentseerumist iseloomustab nii OCT4 taseme alanemine kui ka B2M ekspressiooni lühiaegne vaigistamine.

Kokkuvõttes näitavad käesolevas töös saadud tulemused, et rakku sisenev peptiid PF14 on kõrge efektiivsuse ja madala tsütotoksilisusega reagent, mis ei mõju rakkude pluripotentsusele ja sobib seeläbi hES rakkude transfekkeerimiseks siRNA-ga. Võttes arvesse, et varem ei ole ükski tööühm avaldanud tööd, mis kirjeldaks rakku sisenevate peptiidide sobivust hES rakkudesse nukleiinhappe transpordil, on tegemist täiesti uudse lähenemisega. Töö raames loodud baasmetoodika on aluseks geneetiliste regulaatormehhanismide ja geenide funktsioonide uurimisel ning tüvirakkude potentsiaali rakendamisel teaduses ja meditsiinis.

siRNA transfection of human embryonic stem cells using cell penetrating peptide PepFect 14

Egle-Helene Ervin

SUMMARY

Pluripotent and self-renewing human embryonic stem (hES) cells, derived from blastocyst stage embryo, hold great promise in developmental biology, regenerative medicine and drug discovery. Although the components of core pluripotency network and numerous signaling pathways regulating developmental potential have been identified, additional understanding of molecular mechanisms controlling differentiation is required. For that reason, small interfering RNAs (siRNAs) utilizing cellular RNA interference (RNAi) pathway have been used to dissect the functions of genes expressed in hES cells. However, high cytotoxicity and low efficiency of lipofection reagents have limited the success of RNAi studies on hES cells. Therefore, the aim of this study was to investigate the potential of cell penetrating peptide PepFect 14 (PF14) to transfect hES cells with siRNA.

First of all, experiments with fluorescently labeled siRNA and quantitative analysis at single cell level by flow cytometry revealed that 90% of the cells were siRNA positive after transfection with siRNA/PF14 complexes. The localization of siRNA was confirmed by immunofluorescence microscopy which indicated the presence of siRNA in the cytoplasm and nucleus. Next, OCT4 targeting siRNA was used to test PF14 ability to effectively release siRNA from endosome and permit the following gene silencing. As a result, OCT4 was downregulated in 70% of transfected cells and mRNA level was decreased by 10-fold. These results were attained with optimal strategy of passaging as small cell clumps and transfecting only once right after cell plating. This approach was made possible by low cytotoxicity and high efficiency of PF14. To confirm PF14 applicability, light chain of major histocompatibility complex I (MHC I), β -2-microglobulin (B2M), as target not related to pluripotency network was chosen. Short term and modest silencing of B2M verified PF14 as universal tool for transfecting hES cells with siRNA and indicated that transfection protocol could be further optimized for specific target and objective of the experiment.

Finally, PF14 suitability for the analysis of gene function was tested by detecting the expression of pluripotency factors and differentiation markers upon OCT4-siRNA

transfection. In concordance with a previous study, OCT4 silencing resulted in differentiation towards neuroectodermal lineage illustrated by downregulation of NANOG and increase in *PAX6* and *OTX2* mRNA levels with no significant change in SOX2 expression. Interestingly, B2M silencing during early neuroectodermal differentiation was discovered. Although the finding was confirmed by experiments with neural induction medium, further analysis must be performed to shed light on the functional background of this regulation.

In conclusion, PF14 proved to be highly efficient siRNA delivery vector with low cytotoxicity and no effects on expression of pluripotency factors. Therefore, as a result of this study, a novel method was created which will enable advancements in studies related to hES cell, i.e in developmental biology, regenerative medicine and drug discovery.

TÄNUSÕNAD

Täna oma juhendajaid Martin Pooki, Indrek Teinot ja Toivo Maimetsa jagatud õpetussõnade, panustatud aja ja toetava suhtumise eest. Olen tänulik Annika Treile, kes hoolitses nii rakkude kui ka meeldiva õhkkonna eest, ning Dmitri Lubenetsile, kes läbivoolutsütomeetrilised analüüsid võimalikuks tegi. Veel soovin tänada Valmar Kasukit, Margus Poogat ja Annely Lorentsit katsete planeerimisel antud nõu ning reagentidega seotud näpunäidete eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adachi, K., Suemori, H., Yasuda, S., Nakatsuji, N., ja Kawase, E. (2010). Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes to Cells* 15: 455–470.
- Alon, U. (2007). Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat. Rev. Genet.* 8: 450–461.
- Ambros, V. (2001). microRNAs. Tiny Regulators with Great Potential. *Cell* 107: 823–826.
- Andaloussi, S.E.L., Lehto, T., Mäger, I., Rosenthal-Aizman, K., Oprea, I.I., Simonson, O.E., Sork, H., Ezzat, K., Copolovici, D.M., Kurrikoff, K., *et al.* (2011). Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Res.* 39: 3972–3987.
- Van Asbeck, A.H., Beyerle, A., McNeill, H., Bovee-Geurts, P.H.M., Lindberg, S., Verdurmen, W.P.R., Hä, M., Langel, U., Heidenreich, O., ja Brock, R. (2013). Molecular Parameters of siRNA-Cell Penetrating Peptide Nanocomplexes for Efficient Cellular Delivery. *7*: 3797–3807.
- Babaie, Y., Herwig, R., Greber, B., Brink, T.C., Wruck, W., Groth, D., Lehrach, H., Burdon, T., ja Adjaye, J. (2007). Analysis of Oct4-Dependent Transcriptional Networks Regulating Self-Renewal and Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 25: 500–510.
- Bajpai, R., Lesperance, J., Kim, M., ja Terskikh, A. V. (2008). Efficient propagation of single cells accutase-dissociated human embryonic stem cells. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 818–827.
- Bartlett, D.W., ja Davis, M.E. (2006). Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res.*
- Behnam Rassouli, F., ja Matin, M.M. (2009). Gene silencing in human embryonic stem cells by RNA interference.
- Berezhna, S.Y., Supekova, L., Supek, F., Schultz, P.G., ja Deniz, A.A. (2006). siRNA in human cells selectively localizes to target RNA sites.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell* 125: 315–326.
- Birmingham, A., Anderson, E.M., Reynolds, A., Ilsley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J., *et al.* (2006). 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat. Methods* 3: 199–204.
- Boer, B., Kopp, J., Mallanna, S., Desler, M., Chakravarthy, H., Wilder, P.J., Bernadt, C., ja Rizzino, A. (2007). Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2:Oct-3/4 target genes. *Nucleic Acids Res.* 35: 1773–1786.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., *et al.* (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 122: 947–956.
- Braam, S.R., Denning, C., van den Brink, S., Kats, P., Hochstenbach, R., Passier, R., ja Mummery, C.L. (2008). Improved genetic manipulation of human embryonic stem cells. *Nat. Methods* 5: 389–392.
- Caffrey, D.R., Zhao, J., Song, Z., Schaffer, M.E., Haney, S.A., Subramanian, R.R., Seymour,

- A.B., ja Hughes, J.D. (2011). siRNA off-target effects can be reduced at concentrations that match their individual potency. *PLoS One* 6: e21503.
- Cai, N., Li, M., Qu, J., Liu, G.-H., ja Izpisua Belmonte, J.C. (2012). Post-translational modulation of pluripotency. *J. Mol. Cell Biol.* 4: 262–265.
- Chen, G., Hou, Z., Gulbranson, D.R., ja Thomson, J.A. (2010). Actin-Myosin Contractility Is Responsible for the Reduced Viability of Dissociated Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 7: 240–248.
- Chernousova, S., ja Epple, M. (2017). Live-cell imaging to compare the transfection and gene silencing efficiency of calcium phosphate nanoparticles and a liposomal transfection agent. *Gene Ther.* 24: 282–289.
- Cole, M.F., Johnstone, S.E., Newman, J.J., Kagey, M.H., ja Young, R.A. (2008). Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev.* 22: 746–755.
- Denning, C., Allegrucci, C., Priddle, H., Barbadillo-Muñoz, M.D., Anderson, D., Self, T., Smith, N.M., Parkin, C.T., ja Young, L.E. (2006). Common culture conditions for maintenance and cardiomyocyte differentiation of the human embryonic stem cell lines, BG01 and HUES-7. *Int. J. Dev. Biol.* 50: 27–37.
- Desai, N., Rambhia, P., ja Gishto, A. (2015). Human embryonic stem cell cultivation: historical perspective and evolution of xeno-free culture systems. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13: 5.
- Deshayes, S., Morris, M.C., Divita, G., ja Heitz, F. (2005). Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *C. Cell. Mol. Life Sci* 6205: 1839–1849.
- Dhara, S.K., ja Stice, S.L. (2008). Neural differentiation of human embryonic stem cells. *J. Cell. Biochem.* 105: 633–640.
- Doench, J.G., ja Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18: 504–511.
- Doench, J.G., Petersen, C.P., ja Sharp, P.A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* 17: 438–442.
- Dowaidar, M., Gestin, M., Cerrato, C.P., Jafferli, M.H., Margus, H., Kivistik, P.A., Ezzat, K., Hallberg, E., Pooga, M., Hällbrink, M., *et al.* (2017). Role of autophagy in cell-penetrating peptide transfection model. *Sci. Rep.* 7: 12635.
- Drukker, M., Katz, G., Urbach, A., Schuldiner, M., Markel, G., Itskovitz-Eldor, J., Reubinoff, B., Mandelboim, O., ja Benvenisty, N. (2002). Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 9864–9869.
- Eiges, R., Schuldiner, M., Drukker, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., ja Benvenisty, N. (2001). Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells. *Curr. Biol.* 11: 514–518.
- El-Andaloussi, S., Järver, P., Johansson, H.J., ja Langel, Ü. (2010). Cargo dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell- penetrating peptides-a comparative study. *Biochem. J. Immed. Publ.*
- Elmén, J., Thonberg, H., Ljungberg, K., Frieden, M., Westergaard, M., Xu, Y., Wahren, B., Liang, Z., Ørum, H., Koch, T., *et al.* (2005). Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res.* 33: 439–447.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35: 495–

- Ezzat, K., EL Andaloussi, S., Zaghloul, E.M., Lehto, T., Lindberg, S., Moreno, P.M.D., Viola, J.R., Magdy, T., Abdo, R., Guterstam, P., *et al.* (2011). PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Res.* 39: 5284–5298.
- Feldman, N., Gerson, A., Fang, J., Li, E., Zhang, Y., Shinkai, Y., Cedar, H., ja Bergman, Y. (2006). G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* 8: 188–194.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., ja Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811.
- Fong, H., Hohenstein, K.A., ja Donovan, P.J. (2008). Regulation of Self-Renewal and Pluripotency by Sox2 in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 26: 1931–1938.
- Güssow, D., Rein, R., Ginjaar, I., Hochstenbach, F., Seemann, G., Kottman, A., ja Ploegh, H.L. (1987). The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J. Immunol.* 139: 3132–3138.
- Hällbrink, M., Oehlke, J., Papsdorf, G., ja Bienert, M. (2004). Uptake of cell-penetrating peptides is dependent on peptide-to-cell ratio rather than on peptide concentration. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1667: 222–228.
- Hay, D.C., Sutherland, L., Clark, J., ja Burdon, T. (2004). Oct-4 Knockdown Induces Similar Patterns of Endoderm and Trophoblast Differentiation Markers in Human and Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 22: 225–235.
- Hutvagner, G., ja Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex. *Science* (80-). 297: 2056–2060.
- Hyslop, L., Stojkovic, M., Armstrong, L., Walter, T., Stojkovic, P., Przyborski, S., Herbert, M., Murdoch, A., Strachan, T., ja Lako, M. (2005). Downregulation of NANOG Induces Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Extraembryonic Lineages. *Stem Cells* 23: 1035–1043.
- Ilic, D., Devito, L., Miere, C., ja Codognotto, S. (2015). Human embryonic and induced pluripotent stem cells in clinical trials. *Br. Med. Bull.* 116: ldv045.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, a, Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., ja Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 6: 88–95.
- Jaenisch, R., ja Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132: 567–582.
- Jiang, L., Tixeira, R., Caruso, S., Atkin-Smith, G.K., Baxter, A.A., Paone, S., Hulett, M.D., ja Poon, I.K.H. (2016). Monitoring the progression of cell death and the disassembly of dying cells by flow cytometry. *Nat. Protoc.* 11: 655–663.
- Jiang, L., Paone, S., Caruso, S., Atkin-Smith, G.K., Phan, T.K., Hulett, M.D., ja Poon, I.K.H. (2017). Determining the contents and cell origins of apoptotic bodies by flow cytometry. *Sci. Rep.* 7: 14444.
- Juks, C., Padari, K., Margus, H., Kriiska, A., Etverk, I., Arukuusk, P., Koppel, K., Ezzat, K., Langel, Ü., ja Pooga, M. (2015). The role of endocytosis in the uptake and intracellular

trafficking of PepFect14–nucleic acid nanocomplexes via class A scavenger receptors. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848: 3205–3216.

Kim, H. (2008). Splitting hESC/hiPSC lines on MEF using Accutase (Harvard Stem Cell Institute).

Kleinman, H.K. (2001). Preparation of Basement Membrane Components from EHS Tumors. In *Current Protocols in Cell Biology*, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 1k Unit 10.2.

Kubota, K., Ohashi, A., Imachi, H., ja Harada, H. (2006). Improved in situ hybridization efficiency with locked-nucleic-acid-incorporated DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5311–5317.

Larsen, K.B., Lutterodt, M., Rath, M.F., ja Møller, M. (2009). Expression of the homeobox genes PAX6, OTX2, and OTX1 in the early human fetal retina. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27: 485–492.

Li, M., ja Belmonte, J.C.I. (2017). Ground rules of the pluripotency gene regulatory network. *Nat. Rev. Genet.* 18: 180–191.

Li, L., Bennett, S.A.L., ja Wang, L. (2012). Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adh. Migr.* 6: 59–70.

Liu, H., Ren, C., Zhu, B., Wang, L., Liu, W., Shi, J., Lin, J., Xia, X., Zeng, F., Chen, J., *et al.* (2016). High-efficient transfection of human embryonic stem cells by single cell-plating and starvation. *Stem Cells Dev.* 1–46.

Livak, K.J., ja Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *METHODS* 25: 402–408.

Lombardi, G., Barber, L., Sidhu, S., Batchelor, J.R., ja Lechler, R.I. (1991). The specificity of alloreactive T cells is determined by MHC polymorphisms which contact the T cell receptor and which influence peptide binding. *Int. Immunol.* 3: 769–775.

Lu, P., Chen, J., He, L., Ren, J., Chen, H., Rao, L., Zhuang, Q., Li, H., Li, L., Bao, L., *et al.* (2013). Generating Hypoimmunogenic Human Embryonic Stem Cells by the Disruption of Beta 2-Microglobulin. *Stem Cell Rev. Reports* 9: 806–813.

Luft, C., ja Ketteler, R. (2015). Electroporation Knows No Boundaries. *J. Biomol. Screen.* 20: 932–942.

Ma, Y., Jin, J., Dong, C., Cheng, E.-C., Lin, H., Huang, Y., ja Qiu, C. (2010). High-efficiency siRNA-based gene knockdown in human embryonic stem cells. *RNA* 16: 2564–2569.

Martí, M., Mulero, L., Pardo, C., Morera, C., Carrió, M., Laricchia-Robbio, L., Esteban, C.R., ja Belmonte, J.C.I. (2013). Characterization of pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 8: 223–253.

Matin, M.M., Walsh, J.R., Gokhale, P.J., Draper, J.S., Bahrami, A.R., Morton, I., Moore, H.D., ja Andrews, P.W. (2004). Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells* 22: 659–668.

McManus, M.T., ja Sharp, P.A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 3: 737–747.

Ohrt, T., Merkle, D., Birkenfeld, K., Echeverri, C.J., ja Schwill, P. (2006). In situ fluorescence analysis demonstrates active siRNA exclusion from the nucleus by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* 34: 1369–1380.

- Omidi, Y., Hollins, A.J., Benboubetra, M., Drayton, R., Benter, I.F., ja Akhtar, S. (2003). Toxicogenomics of Non-viral Vectors for Gene Therapy: A Microarray Study of Lipofectin- and Oligofectamine-induced Gene Expression Changes in Human Epithelial Cells. *J. Drug Target*. 11: 311–323.
- Ouyang, A., Ng, R., ja Yang, S.-T. (2007). Long-Term Culturing of Undifferentiated Embryonic Stem Cells in Conditioned Media and Three-Dimensional Fibrous Matrices Without Extracellular Matrix Coating. *Stem Cells* 25: 447–454.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J., ja Conklin, D.S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16: 948–958.
- Parhamifar, L., Larsen, A.K., Hunter, A.C., Andresen, T.L., ja Moghimi, S.M. (2010). Polycation cytotoxicity: a delicate matter for nucleic acid therapy—focus on polyethylenimine. *Soft Matter* 6: 4001.
- Pärnaste, L., Arukuusk, P., Langel, K., Tenson, T., ja Langel, Ü. (2017). The Formation of Nanoparticles between Small Interfering RNA and Amphipathic Cell-Penetrating Peptides.
- Phadnis, S.M., Loewke, N.O., Dimov, I.K., Pai, S., Amwake, C.E., Solgaard, O., Baer, T.M., Chen, B., ja Pera, R.A.R. (2015). Dynamic and social behaviors of human pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 5: 14209.
- Piatek, M.J., ja Werner, A. (2014). Endogenous siRNAs: regulators of internal affairs. *Biochem. Soc. Trans.* 42: 1174–1179.
- Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., ja Langel, U. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB J.* 12: 67–77.
- Pyle, A.D., Lock, L.F., ja Donovan, P.J. (2006). Neurotrophins mediate human embryonic stem cell survival. *Nat. Biotechnol.* 24: 344–350.
- Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., ja Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123: 621–629.
- Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L. V, ja Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* 278: 585–590.
- Rodriguez, R.T., Velkey, J.M., Lutzko, C., Seerke, R., Kohn, D.B., Shea, K.S.O., ja Firpo, M.T. (2007). Manipulation of OCT4 Levels in Human Embryonic Stem Cells Results in Induction of Differential Cell Types. *Exp. Biol. Med.*
- Said Hassane, F., Saleh, A.F., Abes, R., Gait, M.J., ja Lebleu, B. (2010). Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: 715–726.
- Saxe, J.P., Tomilin, A., Schöler, H.R., Plath, K., ja Huang, J. (2009). Post-Translational Regulation of Oct4 Transcriptional Activity. *PLoS One* 4: e4467.
- Schatten, G., Smith, J., Navara, C., Park, J.-H., ja Pedersen, R. (2005). Culture of human embryonic stem cells. *Nat. Methods* 2: 455–463.
- Shiba, Y., Hauch, K.D., ja Laflamme, M.A. (2009). Cardiac applications for human pluripotent stem cells. *Curr. Pharm. Des.* 15: 2791–2806.
- Snell, G.D. (1948). Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genet.* 49: 87–108.

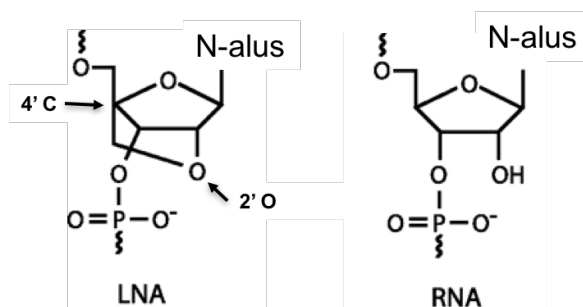
- Stevens, L.C., Little, C.C., ja Little, C.C. (1954). Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 40: 1080–1087.
- Stock, J.K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, H., Brockdorff, N., Fisher, A.G., ja Pombo, A. (2007). Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat. Cell Biol.* 9: 1428–1435.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., ja Jones, J.M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* (80-). 282: 1145 LP-1147.
- Ugrinova, I., Monier, K., Ivaldi, C., Thiry, M., Storck, S., Mongelard, F., ja Bouvet, P. (2007). Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Mol. Biol.* 8: 66.
- Veiman, K.-L., Mäger, I., Ezzat, K., Margus, H., Lehto, T., Langel, K., Kurrikoff, K., Arukuusk, P., Suhorutš, J., Padari, K., *et al.* (2013). PepFect14 Peptide Vector for Efficient Gene Delivery in Cell Cultures. *Mol. Pharm.* 199–210.
- Veldhoen, S., Laufer, S.D., Trampe, A., ja Restle, T. (2006). Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect. *Nucleic Acids Res.* 34: 6561–6573.
- Villa-Diaz, L.G., Garcia-Perez, J.L., ja Krebsbach, P.H. (2010). Enhanced transfection efficiency of human embryonic stem cells by the incorporation of DNA liposomes in extracellular matrix. *Stem Cells Dev.* 19: 1949–1957.
- Wang, D., Quan, Y., Yan, Q., Morales, J.E., ja Wetsel, R.A. (2015). Targeted Disruption of the β 2-Microglobulin Gene Minimizes the Immunogenicity of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Transl. Med.* 4: 1234–1245.
- Wang, Z., Oron, E., Nelson, B., Razis, S., ja Ivanova, N. (2012). Distinct Lineage Specification Roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 10: 440–454.
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K., *et al.* (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 25: 681–686.
- Winslow, T., ja Duckwall, C. NIH Stem Cell Information koduleht.
- Yang, A., Shi, G., Zhou, C., Lu, R., Li, H., Sun, L., ja Jin, Y. (2011). Nucleolin maintains embryonic stem cell self-renewal by suppression of p53 protein-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 286: 43370–43382.
- Zaehres, H., Lensch, M.W., Daheron, L., Stewart, S. a, Itskovitz-Eldor, J., ja Daley, G.Q. (2005). High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23: 299–305.
- Zafarana, G., Avery, S.R., Avery, K., Moore, H.D., ja Andrews, P.W. (2009). Specific Knockdown of OCT4 in Human Embryonic Stem Cells by Inducible Short Hairpin RNA Interference. *Stem Cells* 776–782.
- Zhao, M., Yang, H., Jiang, X., Zhou, W., Bin, A., Ae, Z., Zeng, Y., Kaitai, A., Ae, Y., ja Ren, C. (2008). Lipofectamine RNAiMAX: An Efficient siRNA Transfection Reagent in Human Embryonic Stem Cells.
- Zorko, M., ja Langel, Ü. (2005). Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57: 529–545.

KASUTATUD VEEBILEHED

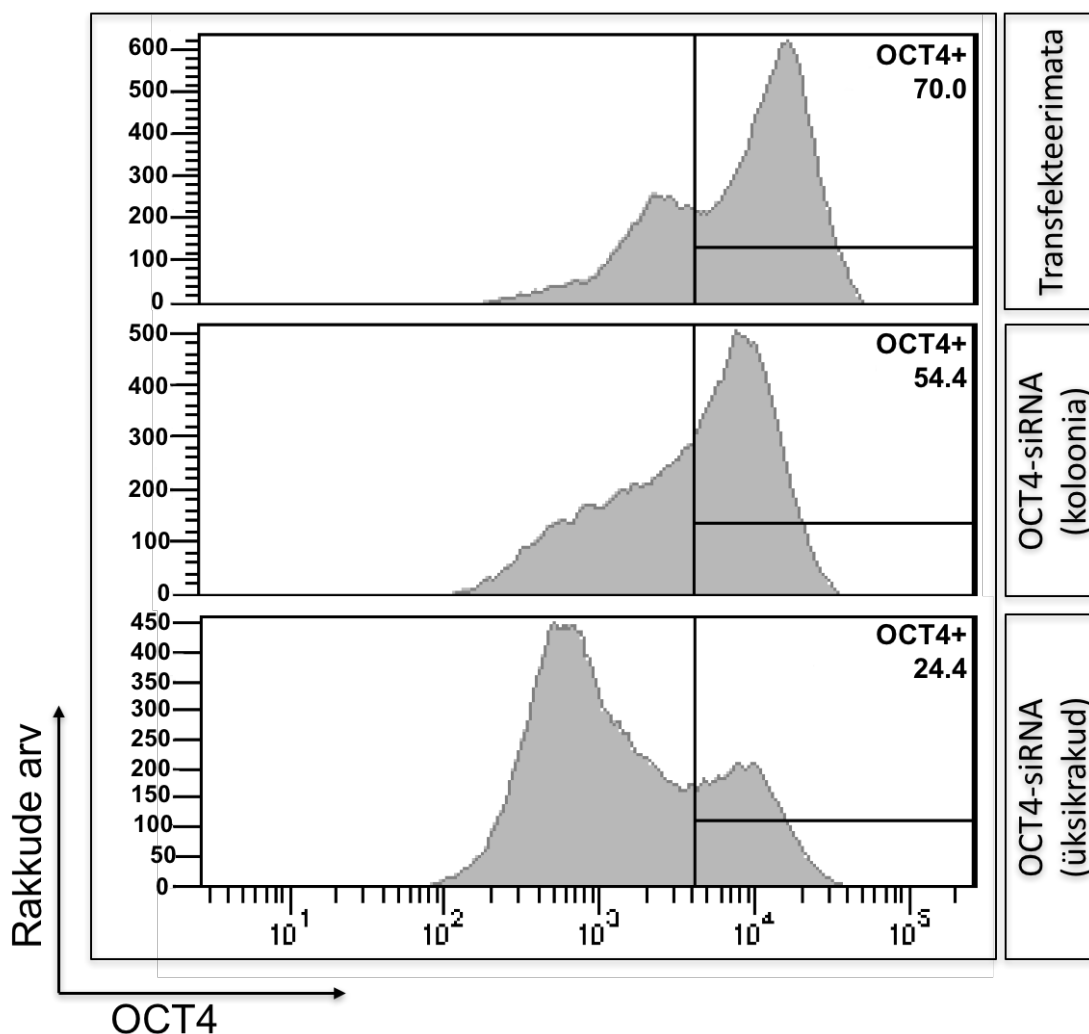
1. Winslow, T., ja Duckwall, C. NIH Stem Cell Information koduleht.
<https://stemcells.nih.gov/info/2001report/appendixC.htm> [24.05.2018]

LISAD

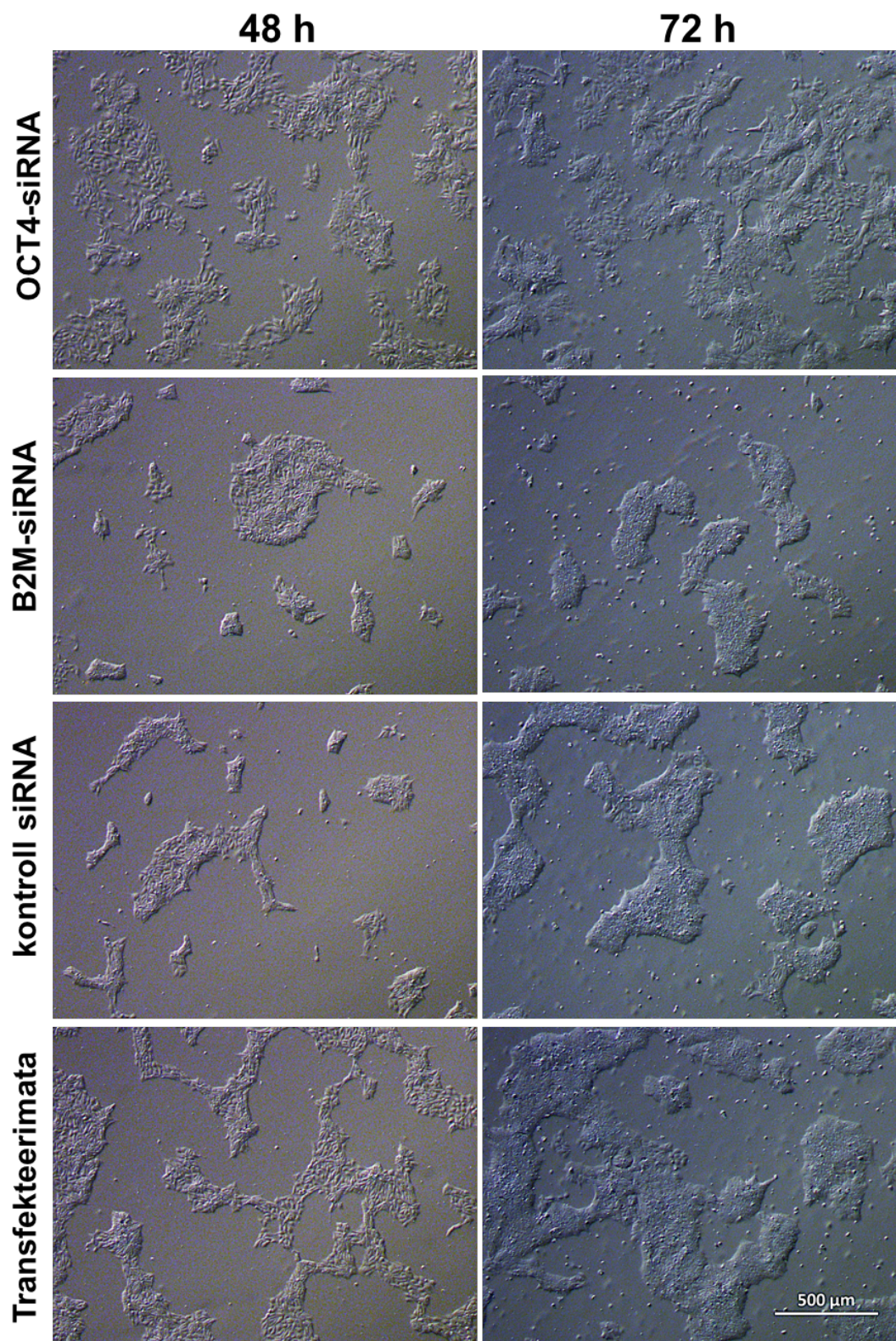
Lisa 1



Joonis 1. LNA ja RNA. Joonisel vasakul on kujutatud lukustatud nukleotiidi, millel on võrreldes tavalise ribonukleotiidiga täiendav side riboosi 2'-hapniku (2'O) ja 4'-süsiniku (4'C) vahel. siRNA, mille koosseisu on lülitatud ka LNA, vaigistab geeniekspressiooni efektiivsemalt ja spetsiifilisemalt. Lühendid: N-alus, lämmastikalus. (Kubota *et al.*, 2006 järgi)



Joonis 1. hES rakkude transfekteeimine 24 tundi peale passeerimist on võrdlemisi vähe efektiivne. Histogrammid, mis kirjeldavad OCT4 ekspressiooni transfekteeimata proovis ja proovides, mida on transfekteeitud OCT4-siRNA-ga 24 tundi peale rakkude passeerimist kolooniatükkidena või üksikrakulisena. Y-teljel on rakkude arv ja X-teljel OCT4 valgutasemele vastav fluorestsentsi intensiivsus. Joonise keskaigas asuv püstkriips tähistab läviväärtust, millest alates loeti rakk OCT4 positiivseks. Joonisel esitatud arvvaartused vastavad OCT4 positiivsete rakkude osakaalule (%) vastavates proovides. Kasutatud siRNA kontsentratsioon: 30 nM. Lühendid: OCT4+, OCT4 positiivsed.



Joonis 1. siRNA/PF14 kompleksidega transfekteeritud või transfekteerimata hES rakkude morfoloogia 48 h ja 72 h ajapunktides. OCT4-siRNA toimetel muutub hES rakkude morfoloogia võrreldes B2M-siRNA või kontroll siRNA-ga töödeldud ning transfekteerimata rakkudega. Kasutatud siRNA kontsentratsioon: 20 nM. Külvatud rakkude arv: 450 000 raku.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Egle-Helene Ervin (sünnikuupäev: 26.10.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “Inimese embrüonaalsete tüvirakkude transfekterimine siRNA-ga kasutades rakku sisenevat peptiidi PepFect 14“, mille juhendajateks on Martin Pook, Indrek Teino ja Toivo Maimets
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-i lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-i kaudu alates 28.05.2019 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, 28.05.2018