

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

Valmar Kasuk

**Rakku sisenevate peptiidide rakendatavus miRNA transpordiks inimese
embrüonaalsetesse tüvirakkudesse**

Magistritöö

Juhendajad: MSc Martin Pook
MSc Dmitri Lubenets

TARTU 2014

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Inimese embrüonaalsed tüvirakud	7
1.1.1 Embrüonaalsete tüvirakkude eraldamine	7
1.1.2 Embrüonaalsete tüvirakkude kultiveerimine koekultuuris	8
1.1.3 Rakkude pluripotentsus	9
1.1.4 Pluripotentsuse markerid	10
1.1.4.1 Transkriptsioonifaktor OCT4	11
1.1.4.2 Transkriptsioonifaktor NANOG	11
1.2 MikroRNA.....	12
1.2.1 MikroRNA-d embrüonaalsetes tüvirakkudes	14
1.3 Rakku sisenevad peptiidid	16
1.3.1 Lastmolekulide sidumine rakku sisenevate peptiididega	16
1.3.2 Komplekside sisenemine rakkudesse	17
1.3.3 RSP-de rakendusvõimalused miRNA transpordiks hES rakkudesse.....	17
1.3.4 CADY	18
1.3.5 PepFect6	19
1.3.6 PepFect14	19
2. EKSPERIMENTAALOSA	21
2.1. Töö eesmärgid	21
2.2. Materjal ja meetodika.....	21
2.2.1. Rakkude kasvatamine koekultuuris	21
2.2.2. Rakkude passeerimine transfekteerimiseks	21
2.2.3 Kasutatud miRNA, rakku sisenevad peptiidid, antikehad.....	22
2.2.4 Komplekside moodustamine ja lisamine rakkudele	22
2.2.5 Immunotsütokeemia ja immunofluorestsents-mikroskoopia	22
2.3 Tulemused ja arutelu	24
2.3.1 Tüvirakkude passeerimise meetodid	24
2.3.2 Transfekteerimiskomplekside mõju rakkude elulemusele	26
2.3.3 Transfekteerimiskomplekside mõju rakkude pluripotentsusele	26
2.3.4 MikroRNA transpordi efektiivsus PF6 ja CADY peptiidiga	30

KOKKUVÕTE	35
SUMMARY	37
TÄNUSÕNAD	39
KASUTATUD KIRJANDUS	40
LISAD	46
LIHTLITSENTS.....	53

KASUTATUD LÜHENDID

- 2i – MEK/ERK ja GSK3 raja inhibiitoreid sisaldav keskkond
- bFGF – aluseline fibroblasti kasvufaktor (*basic fibroblast growth factor*, ingl)
- DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool (*4',6-diamidino-2-phenylindole*, ingl)
- EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat (*ethylenediaminetetraacetic acid*, ingl)
- EpiS rakud – epiblasti tüvirakud (*epiblast stem cells*, ingl)
- ERK – ekstratsellulaarselt reguleeritav kinaas (*extracellular signal-regulated kinase*, ingl)
- ES rakud – embrüonaalsed tüvirakud (*embryonic stem cells*, ingl)
- FGF – fibroblasti kasvufaktor (*fibroblast growth factor*, ingl)
- GSK – glükogeeni süntaasi kinaas (*glycogen synthase kinase*, ingl)
- hES rakud – inimese embrüonaalsed tüvirakud (*human embryonic stem cells*, ingl)
- HESCO – inimese embrüonaalsete tüvirakkude söötmesegu (*hES Cells Cocktail*, ingl)
- HIV-1 – inimese immuunpuudulikkuse viirus 1 (*human immunodeficiency virus 1*, ingl)
- KLF4 – (*Kruppel-like factor 4*, ingl)
- LF2000 – lipofektamiin 2000 (*Lipofectamine 2000*, ingl)
- LIF – leukeemiat inhibeeriv faktor (*leukemia inhibitory factor*, ingl)
- LMWP – madala molekulmassiga protamiin (*low molecular weight protamine*, ingl)
- MEF – hiire embrüonaalsed fibroblastid (*mouse embryonic fibroblasts*, ingl)
- MEK – mitogeenaktiveeritud proteiinkinaas (*mitogen-activated protein kinase inhibitor*, ingl)
- mES rakud – hiire embrüonaalsed tüvirakud (*mouse embryonic stem cells*, ingl)
- miRNA – mikroRNA (*microRNA*, ingl)
- NGS – immuniseerimata kitse seerum (*normal goat serum*, ingl)
- OCT4 – oktameeri siduv transkriptsioonifaktor 4 (*octamer-binding transcription factor 4*, ingl)
- PDX1 – pankrease ja kaksteistsõrmiksoole homeoboks (*Pancreatic and duodenal homeobox 1*, ingl)
- PAS – peptiid-akrülaat pind (*peptide-acrylate surface*, ingl)
- PBS – fosfaat-puhverdatud soolalahus (*phosphate buffered saline*, ingl)
- pDNA – plasmiidne DNA
- PF6 – PepFect6
- PF14 – PepFect14
- PMO – fosforoamidaat morfoliino oligomeer (*phosphoroamidate morpholino oligomer*, ingl)
- PNA – peptiidne nukleiinhape (*peptide nucleic acid*, ingl)
- POU – kaheosaline DNA-d siduv domään. Nimi tuleneb valkudest Pit, Oct, Unc.

POU5F1 – POU domään, klass 5, transkriptsioonifaktor 1 (*POU domain, class 5, transcription factor*, ingl)

pre-miRNA – prekursor mikroRNA (*precursor miRNA*, ingl)

pri-miRNA – primaarne mikroRNA (*primary miRNA*, ingl)

RISC – RNA-indutseeritud vaigistuskompleks (*RNA-induced silencing complex*, ingl)

ROCK – Rho sõltuv proteiinkinaas (*Rho-associated protein kinase*, ingl)

RSP – rakku sisenevad peptiidid (*cell-penetrating peptides*, ingl)

siRNA – väike interfereeruv RNA (*small interfering RNA*, ingl)

SCO – splaissimist korrigeeriv oligonukleotiid (*splice correction oligonucleotide*, ingl)

siRNA – väike interfereeruv RNA (*small interfering RNA*, ingl)

TAT – transkriptsiooni transaktivaator (*trans-activator of transcription*, ingl)

TP10 – Transportaan10

SISSEJUHATUS

Inimese embrüonaalsed tüvirakud (hES rakud) on eraldatud 5-7 päeva vanuse embrüo sisemisest rakumassist. Nad on pluripotentsed ehk võimelised diferentseeruma kõikideks inimese rakkudeks. Lisaks suudavad nad ka piiramatult paljuneda. Selliste omadustega rakkude kultiveerimise võimalus on andnud lootuse ravida kõikvõimalikke koekahjustusi. Samas on suur arengupotentsiaal embrüonaalsetele tüvirakkudele ka ohtlik, sest võime moodustada erinevaid rakutüüpe ja piiramatult paljuneda võib viia ka kasvaja tekkeni. See on olnud ka üheks suurimaks takistuseks hES rakkude rakendamisel regeneratiivses meditsiinis. Tuumorite tekkimise vältimiseks tuleks seega enne hES rakkude transplanteerimist vähendada nende arengupotentsiaali läbi diferentseerimise soovitud rakutüüpide suunas. Üheks võimaluseks oleks kasutada selleks mikroRNA-sid (miRNA), mille puhul on täheldatud suurt rolli tüvirakkude diferentseerumisel ja geeniekspressioonimustrite muutmisel. Kliinilisel rakendamisel on vaja aga mikroRNA transpordiks turvalisi ja efektiivseid meetodeid. Kuigi viirusvektorid on efektiivsed, võivad nad põhjustada insertsioonilist mutageneesi. Seega on suurt rõhku pandud mitteviraalsete meetodite arendamisele. Üheks selliseks meetodiks on rakku sisenevate peptiidide kasutamine, mis on üha enam kinnitanud oma efektiivsust ning ohutust. Kuna varasemalt pole avaldatud ühtegi tööd, kus oleks miRNA-sid rakku sisenevate peptiidide abil hES rakkudesse viidud, otsustati nende meetodite potentsiaali arvestades seda võimalust uurida. Teemaga tutvumiseks antakse kirjanduse osas ülevaade inimese embrüonaalsete tüvirakkude omadustest ja kasvatamisest, teadaolevatest miRNA funktsioonidest tüvirakkudes ning miRNA transporti võimaldavatest rakku sisenevatest peptiididest. Antud töö eksperimentaalses osas uuriti miRNA transpordi võimalust kolme erineva rakku siseneva peptiidi abil. Transpordi efektiivsust hinnati visuaalselt konfokaalmikroskoobi abil. Kuna inimese embrüonaalsed tüvirakud on tundlikud erinevatele mõjutustele, on oluline uute meetodite rakendamisel jälgida mõju rakkude elulemusele ja pluripotentsusele. Selleks hinnati rakkude elulemust valgusmikroskoobi ning pluripotentsusmarkerite olemasolu fluorestsentsmikroskoobi abil. Kokkuvõttes oli seega eesmärgiks uurida, kas töös kasutatud rakku sisenevate peptiididega on võimalik miRNA-sid inimese embrüonaalsetesse tüvirakkudesse viia nii, et see meetod iseenesest tüvirakkude elulemust ja pluripotentsust märgatavalt ei vähendaks. Seejuures sooviti välja selgitada, milline kolmest peptiidist võiks olla kõige sobilikum. Käesolev töö on ka üks osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on koostöös mitmete Tartu Ülikooli laborite, Solis BioDyne OÜ ja Tartu Ülikooli kliinikumiga leida erinevaid meetodeid miRNA põhisteks rakuteraapiateks.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Inimese embrüonaalsed tüvirakud

Inimese embrüonaalne eluiga algab viljastatud munaraku lõigustumisega ning blastotsüsti moodustumisega. Blastotsüsti tekkega on toimunud esimene diferentseerumine kahte tüüpi rakkudeks. Välimine kiht, trofoblast, on eellaseks lootevälistele, embrüo arengut toetavatele kudedele, nagu näiteks platsenta. Sisemine rakumass on aga aluseks kõikidele loote rakkudele. Blastotsüsti sisemist rakumassi on võimalik eraldada ja koekultuuri tingimustes kultiveerida. Neid rakke ongi hakatud nimetama embrüonaalseteks tüvirakkudeks (ES rakkudeks). Olles *in vivo* sisemise rakumassina eellasrakkudeks kõidele loote rakutüüpidele, on nende rakkude *in vitro* kasvatamise võimalus andnud lootuse ravida kõikvõimalikke koekahjustusi. Seda enam, et erinevalt kõikidest muudest inimese normaalsetest rakkudest, on embrüonaalsed tüvirakud võimelised teatud tingimustes piiramatult paljunema. Seega on teoreetiliselt võimalik kasvatada piisav hulk rakke ka suuremate kudede taastamiseks. Kuigi eesmärk rakendada inimese embrüonaalseid tüvirakke regeneratiivses meditsiinis on eksisteerinud juba pikka aega, ei ole ühegi kliinilisi katseid läbinud ravimeetodini veel jõutud.

1.1.1 Embrüonaalsete tüvirakkude eraldamine

Kui esimene hiire embrüonaalne tüvirakuliin loodi 1981. aastal (Evans ja Kaufman, 1981), siis inimese embrüonaalsed tüvirakud suudeti esimest korda eraldada alles 17 aastat hiljem (Thomson jt., 1998). See oli tingitud peamiselt kahest põhjusest: inimese embrüod ei ole teaduslikel eesmärkidel niivõrd kättesaadavad ning tüvirakkude eraldamise meetodid ei ole liigilt liigile üks-üheselt ülekantavad. Näiteks kulus mitmeid aastaid selliste söötmete väljatöötamiseks, mis toetaksid inimese embrüo arengut blastotsüsti staadiumini (Polak, 2008). Kuigi inimese embrüonaalsed tüvirakud eraldati 1998. aastal, on nüüdseks selgunud, et hiire ES rakkudega samaväärsete rakkude eraldamiseks kulus veel 15 aastat (Gafni jt., 2013; Ware jt., 2014). Nimelt eristatakse tänapäeval kahte embrüonaalsete tüvirakkude staadiumit: naiivsed (*naive*) (hiire ES rakud ja hiljuti eraldatud inimese naiivsed ES rakud) ning diferentseerumiseks valmistuvad (*primed*) (hiire implantatsioonijärgsest epiblastist eraldatud EpiS rakud ja inimese ES rakud) (Nichols ja Smith, 2009) (vt ka tabel 1). Seega, kui varem põhjendati erinevusi hiire ja inimese ES rakkude vahel sellega, et liigid ongi erinevad (Ginis jt., 2004), on tänaseks mitmed erinevused seletatavad staadiumite erinevustega. Näiteks on nii hiire kui ka inimese naiivsed ES rakud võrreldes diferentseerumiseks valmistuvate rakkudega klonogeensemad, vähesema DNA metüleeritusega, suurema arengupotentsiaaliga, kimääre

lihtsamini moodustavad, omapärase mikroRNA profiiliga, mõlema aktiivse X kromosoomiga (XX karüotüübi puhul). Naiivsete rakkude kultiveerimiseks on vaja söötmesse lisada leukeemiat inhibeerivat faktorit (LIF) ning MEK/ERK ja GSK3 raja inhibiitoreid, seevastu kui diferentseerumiseks valmistuvatel rakkudel on vajalik fibroblasti kasvufaktorite ja aktiviini juuresolek. Vastavate söötme komponentide vahetamisel ning lisafaktorite lisamisel on võimalik ka rakkude staadiumit muuta ja seda mõlemas suunas. (Gafni jt., 2013; Nichols ja Smith, 2009; Ware jt., 2014) Seega on embrüonaalsed tüvirakud plastilised ja nende omadused sõltuvad suuresti kasvatamise tingimustest. Kuna uurimisel tehtavad manipulatsioonid ei pruugi mõjuda erinevalt kasvatatud rakkudele ühtemoodi, teeb see keeruliseks tüvirakkude uurimisel saadud tulemuste võrdlemise ja mõtestamise. Seepärast oleks hea leida ühtsed sobivad meetodid tüvirakkude kultiveerimiseks. Hetkel on aga kasutusel ja arendusel veel väga erinevaid meetodeid, millest räägib ka järgnev peatükk. Kuigi tulevikus on oodata suurt naiivsete inimese ES rakkude kasutuselevõttu nende suurema arengupotentsiaali ja lihtsamate kultiveerimisvõimaluste tõttu (Ware jt., 2014), põhinevad senised katsed, kaasaarvatud antud magistritöö eksperimentaalosa, diferentseerumiseks valmistuvate inimese ES rakkude uurimisel. Seetõttu keskendutakse käesolevas töös peamiselt selle staadiumi rakkudele.

Tabel 1. Hiire ja inimese embrüonaalsed tüvirakud. Tabelis on välja toodud erinevate hiire ja inimese ES rakkude tüübid ning nende eraldamise aastad, staadiumid ja tingimused. 2i - MEK/ERK ja GSK3 raja inhibiitorid, FGF - fibroblasti kasvufaktor, LIF - leukeemiat inhibeeriv faktor. (Gafni jt., 2013; Nichols ja Smith, 2009; Ware jt., 2014)

	Hiir	Inimene	Hiir	Inimene
Nimetus	mES	hES	EpiS	naiivne hES
Eraldamise aasta	1981	1998	2009	2013
Pluripotentsuse staadium	Naiivne	Diferentseerumiseks valmistuv	Diferentseerumiseks valmistuv	Naiivne
Embrüo staadium	Blastotsüst	Blastotsüst	Implantatsioonijärgne epiblast	Blastotsüst
Vajalikud söötme lisakomponendid	2i + LIF	FGF + Aktiviin	FGF + Aktiviin	2i + LIF

1.1.2 Embrüonaalsete tüvirakkude kultiveerimine koekultuuris

Inimese embrüonaalseid tüvirakke ei saa kasvatada tavalise koekultuuri plastiku peal, nagu saab hiire ES rakke LIF-i juuresolekul (Xu jt., 2001) ning seetõttu on vajalik spetsiifiliste kasvupindade kasutamine. Üks levinuimaid meetodeid on olnud toiterakkude kasutamine. Selleks on tavaliselt kasutatud hiire või inimese fibroblaste (Richards jt., 2002; Tecirlioglu jt.,

2010; Thomson jt., 1998). Üheks miinuseks nende puhul on aga rakkude omaduste varieeruvus partiidena (Brafman jt., 2010). Laialdaselt on kasutatud ka hiire tuumori rakkudest saadud ekstratsellulaarsete maatriksvalkude segu ehk Matrigeli (Kibbey, 1994; Tsai jt., 2010; Xu jt., 2001). Loomset päritolu valke sisaldavate kasvupindade ja söötmete kasutamine ei sobi aga rakendamiseks regeneratiivses meditsiinis inimeste puhul, kuna sellega võib kaasneda immuunvastuse teke (Martin jt., 2005) ning loomapatogeenide edasikandumine (Cobo jt., 2005). Seepärast on suurt rõhku pandud kunstlike, defineeritud koostisega kasvusüsteemide väljatöötamisel. Näiteks on hiire embrüonaalsete fibroblastide (MEF) poolt konditsioneeritud söötme asemel hakatud kasutama mTeSR1 ning HESCO (*hES Cells Cocktail*) söötmeid, mis sisaldavad albumiini, transferriini, insuliini, aluselist fibroblasti kasvufaktorit (bFGF) ning mitmeid muid defineeritud komponente (Lu jt., 2006). Lisaks on kasutatud ka mitmeid kunstlikke kasvumaatrikseid. Näiteks on katsetatud bioloogiliselt aktiivsetest peptiididest valmistatud peptiid-akrülaat pindu (PAS) (Melkounian jt., 2010) ning polü(metüülvinüüleeter-alt-maleiinanhydriid) polümeere (Brafman jt., 2010). Lisaks on inimese ES rakke suudetud kasvatada fibronektiiniga kaetud pinnal, kui söötmesse oli lisatud ROCK, GSK ja MEK inhibiitorid ning bFGF. Sellise keskkonnaga suudeti teostada ka üksikrakulist passeerimist, mis tavaliselt põhjustab inimese ES rakkude puhul suurt suremust. (Tsutsui jt., 2011) Arvestades, et neid samu komponente on kasutatud ka naiivsete ES rakkude saamiseks, mis on samuti üksirakuliselt passeeritavad (Gafni jt., 2013; Ware jt., 2014), on tõenäoline, et antud keskkonna abil oli saavutatud tüvirakkude naiivsem vorm. Kui arengupotentsiaali suurenemiseks on vaja konkreetsete faktorite koosmõju, siis selle vähenemiseks piisab väga väikestest mõjutustest. Seda eriti diferentseerumiseks valmistuvate ES rakkude puhul. Seepärast on oluline pidevalt jälgida, et nende pluripotentsus säiluks ning et nad ei oleks läinud diferentseeruma.

1.1.3 Rakkude pluripotentsus

Tüvirakud võivad olla väga erineva arengupotentsiaaliga. Suures skaalas jaotatakse nad toti-, multi-, pluri- ja unipotentseteks. Mida rohkemateks rakkudeks on tüvirakk võimeline diferentseeruma, seda suurem on potentsus. Näiteks on viljastatud munarakk totipotentne, sest ta suudab anda alusele tervele organismile, kaasa arvatud lootevälistele kudedele. Inimese puhul on täheldatud, et ka neljarakustaadiumis olev rakk on suuteline arenema veel blastotsüstiks, kus eristuvad trofoblast ja sisemine rakumass ning seega on tegemist veel totipotentse rakuga (Van de Velde jt., 2008). Pluripotentsed rakud (nii naiivsed kui ka diferentseerumiseks valmistuvad) ei suuda enam kõikideks lootevälisteks kudedeks üldjuhul areneda. Küll on neil aga võime diferentseeruda kõikvõimalikeks inimese rakutüüpideks.

Selle funktsionaalseks tõestuseks saab hiirte puhul süstida ES rakke implanteeritavasse blastotsüsti ning vaadata, kas nad suudavad panustada kimääri erinevatesse kudedesse (Wolf jt., 1994). Seejuures piisab kolme erineva lootelehe rakkude kontrollimisest. Nimelt toimub *in vivo* sisemise rakumassi diferentseerumisel jaotumine kolmeks looteleheks (endoderm, ektoderm ning mesoderm), millest igäühelst arenevad teatud tüüpi koed: näiteks endodermist kopsud ja seedekulgla, mesodermist luud ja lihased, ektodermist nahk ja närvisüsteem. Kuna eelnevalt mainitud pluripotentsuse kontroll kimäärilise abil ei ole inimese puhul mõistagi eetilise, kasutatakse meetodikat, kus hES rakud sisestatakse immuunpuudulikesse hiirtesse ning tekkivad endo-, ekto- ja mesodermaalse päritoluga rakutüüpe sisaldavad kasvajakud ehk teratoomid näitavad algrakkude pluripotentsust (Przyborski, 2005). Siinkohal tasub ära märkida, et mainitud pluripotentsuse test iseloomustab samas hästi ka hES rakkudele omast võimet moodustada kasvajakud, mis on olnud üheks suurimaks takistuseks tüvirakkude rakendamisel regeneratiivses meditsiinis (Fong jt., 2010). Teise võimalusena saab hES rakke kasvatada *in vitro* suspensiooni vedelkultuuris, rippuva tilga kultuurina või metüültselluloosi poolvedelas söötmes, mille tagajärjel moodustuvad kolmemõõtmelised rakuagregaadid. Need embrüonaalseteks kehadeks (*embryoid body*) kutsutavad moodustised hõlmavad samuti pluripotentsete rakkude diferentseerumisel rakutüüpe kolmest lootelehest. (Kurosawa, 2007) Kuna funktsionaalsed tõestused on aeganõudvad ning limiteeritud võimalustega (näiteks ei võimalda hinnata rakkude olekut konkreetses ajaetapis), eelistatakse tihtipeale rakkude pluripotentsust kontrollida teatud markerite olemasoluga.

1.1.4 Pluripotentsuse markerid

On mitmeid molekule, mille ekspressioon on omane ainult teatud arengupotentsiaaliga rakkudele. Selliseid molekule, mis on pluripotentsetes rakkudes detekteeritavad, kuid mille tootmine rakkude edasisel diferentseerumisel lakkab, kasutataksegi pluripotentsuse markeritena. Ühtedeks sellistest on pinnaantigeenid SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 ja TRA-1-81 (Draper jt., 2002). Nende eeliseks on võrdlemisi lihtne tuvastamise viis, kuna erinevalt raku sees olevatest markeritest on nad detekteerimiseks kasutatavatele antikehadele hästi ligipääsetavad. Lisaks saab nende abil iseloomustada ka elusaid kultuure. Kuigi nende ekspressioon on pluripotentsetes rakkudes tavaliselt kõrge, ei pruugi nad kõik olla pluripotentsuse ja eneseuundamise (*self-renewal*) võime hoidmiseks tingimata vajalikud. Näiteks on nähtud SSEA-3 ja SSEA-4 mahareguleerimisel, et rakud suudavad jätkuvalt säilitada muid pluripotentsuse markereid (Brimble jt., 2007). Seepärast kasutatakse markeritena tihtipeale transkriptsioonifaktoreid OCT4 (*octamer-binding transcription factor 4*), NANOG ja SOX2, mis on ühed põhilised tüvirakkude pluripotentsust tagavad

regulaatormolekulid (Pei, 2008). Teadaolevaid sihtmärkgeene on neil palju, millest suur osa kattuvad. Lisaks reguleerivad nad ka üksteise ekspressiooni (Boyer jt., 2005). Kuna SOX2 ekspressioon on kõrge ka mitmetes neuraalse raja rakkudes (Episkopou, 2005), kasutatakse pluripotentsuse markeritena rohkem OCT4 ja NANOG transkriptsioonifaktorit. Ka antud magistritöö eksperimentaalses osas on kasutatud neid kahte markerit ja seega kirjeldatakse neid järgnevatel peatükkidel lähemalt.

1.1.4.1 Transkriptsioonifaktor OCT4

OCT4, tuntud ka kui POU5F1 (*POU domain, class 5, transcription factor 1*) on oktameeri siduv ja homeodomääni sisaldav POU perekonna valk. Ta on üks olulisemaid regulaatoreid hES rakkude pluripotentsust ja eneseuundamist võimaldavas võrgustikus (Boyer jt., 2005). Pluripotentsuse tagamiseks peab OCT4 ekspressioon olema kindlas vahemikus, kuna selle liiga madal või kõrge tase viib rakkude diferentseerumisele vastavalt kas mesodermaalses ja endodermaalses või ainult mesodermaalses suunas (Rodriguez jt., 2007). Seega ei näita tugev ekspressioon alati pluripotentsust. Segadust lisab ka asjaolu, et *OCT4* geenilt on võimalik saada erinevaid transkripte. Nimelt, lisaks pluripotentsust tagavale *OCT4A* mRNA-le on tuvastatud ka *OCT4B* ja *OCT4BI* mRNA-de olemasolu. Kui *OCT4B* valguprodukt on hES rakkudes madalalt ekspresseeritud, kuid mõnedes somaatilistes rakkudes kõrgelt ekspresseeritud, siis *OCT4BI* on hES rakkudes kõrgelt ekspresseeritud ning diferentseerumisel maha reguleeritud. (Atlasi jt., 2008) Mõlema puhul on täheldatud peamiselt tsütoplasmaatilist lokatsiooni ning arvatakse, et nende funktsioon on oluline stressi vastuses (Farashahi Yazd jt., 2011). Seega on pluripotentsuse määramisel oluline lisaks OCT4 ekspressioonitaseme hindamisele eristada ka OCT4A varianti teistest isovormidest.

1.1.4.2 Transkriptsioonifaktor NANOG

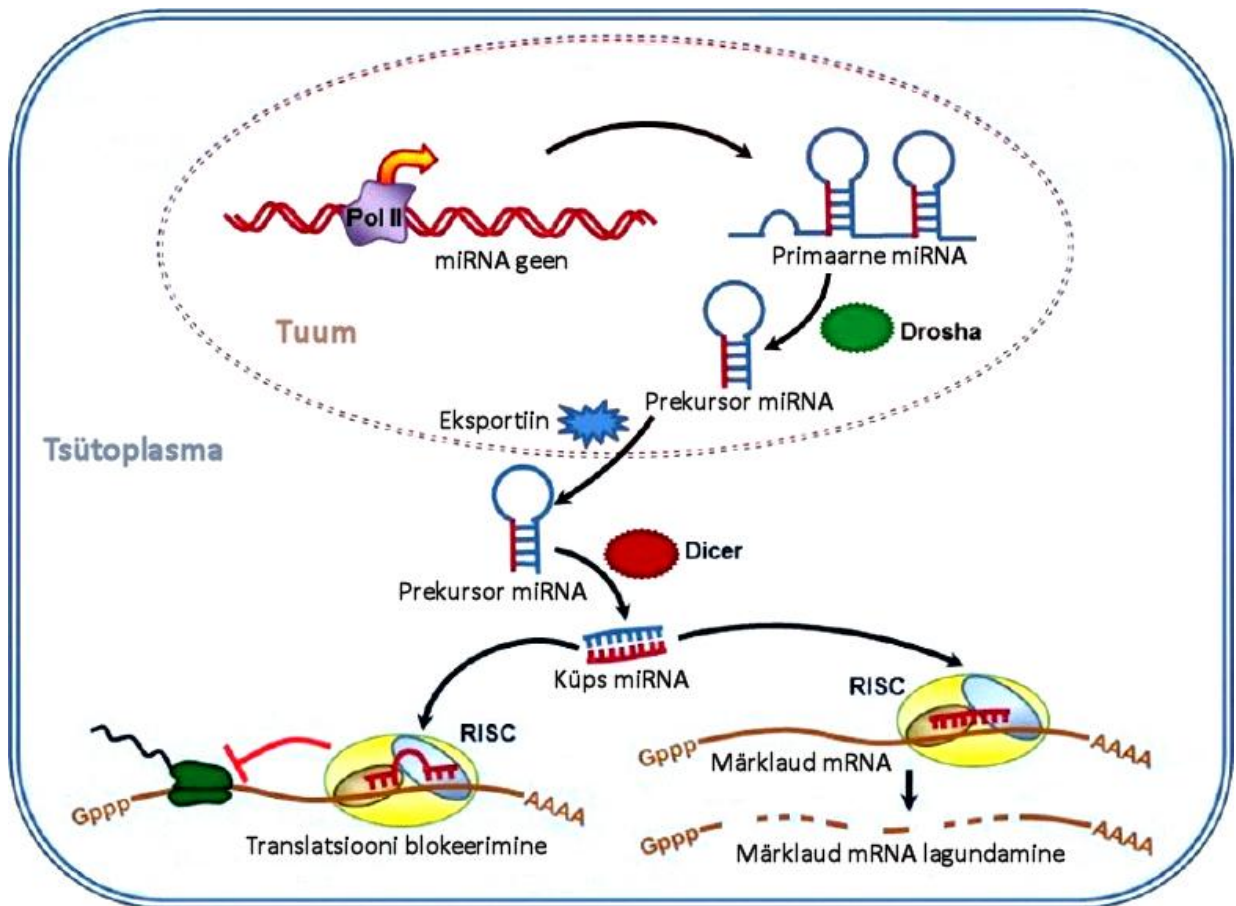
NANOG (ka NANOG1) on homeobox perekonda kuuluv transkriptsioonifaktor, mis sarnaselt OCT4 valguga sisaldab DNA-d siduvat homeodomääni (Mitsui jt., 2003). HES rakud diferentseeruvad *NANOG* mRNA mahareguleerimisel endodermaalses ja trofektodermaalses suunas (Zaehres jt., 2005) ning üleekspressioonil primitiivse ektodermi suunas. Kõrge ekspressioon võimaldab aga kasvada toiterakkude ja nende poolt konditsioneeritud söötme abita (Darr jt., 2006). Lisaks pluripotentsust tagavale *NANOG1* geenile on inimesel teadaolevalt 10 protsessitud pseudogeeni ning üks tandemne duplikaat (*NANOG2*). Valguprodukti on teadaolevalt võimalik saada *NANOG1*, *NANOG2* ja *NANOGP8* järjestustelt. *NANOG2* ja *NANOGP8* geenil on ka *NANOG1* kodeeriva järjestusega kõige

suurem homoloogsus, vastavalt 97% ja 99,5% (Booth ja Holland, 2004). Seetõttu on näiteks NANOG1 ja NANOGP8 305 aminohappe pikkustel valkudel erinevust ainult kolme aminohappe osas (Ambady jt., 2010). Seega on sarnaselt OCT4 transkriptsioonifaktoriga NANOG valgu detekteerimine ja pluripotentsuse määramine komplekseeritud ja vajab tehnilisi arendusi. Küll aga lisab kindlasti usaldusväärust juurde mitme markeri detekteerimine korraga.

Kuigi hES rakkude uurimiseks ja rakumassi tootmiseks on esiteks vajalik pluripotentsuse ja eneseuundamise säilitamine, on regeneratiivses meditsiinis rakendamiseks vajalik ka osata tüvirakke efektiivselt diferentseerida. Eriti oluline on jälgida, et transplanteeritavas kultuuris ei esineks pluripotentsid rakke, kuna neile on omane kasvajate moodustamise võime (Fong jt., 2010). Lisaks NANOG, OCT4 ja SOX2 regulatsioonimehhanismide tundma õppimisele on diferentseerumismehhanismide mõistmiseks oluline uurida ka teisi olulisi regulaatormolekule. Ühtedeks sellisteks on näiteks mikroRNA-d.

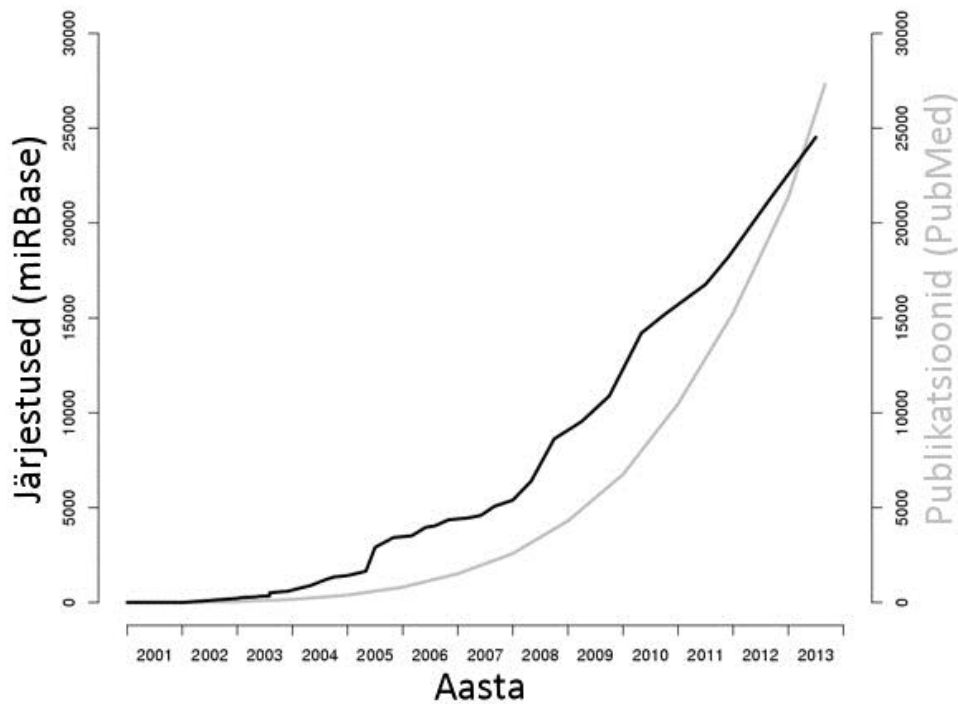
1.2 MikroRNA

MikroRNA-d (miRNA) on lühikesed, keskmiselt 22 aluspaari pikkused mittekodeerivad RNA molekulid, mille funktsiooniks on geenide ekspressiooni reguleerimine (Ambros, 2001). Küpsed miRNA-d tulenevad sadade või tuhandete nukleotiidide pikkustest primaarsetest transkriptidest ehk pri-miRNA-dest (joonis 1). Pri-miRNA-d sisaldavad 60-120 nukleotiidi pikkuseid RNA juuksenõelastruktuure, mis lõigatakse ühekaupa raku tuumas Drosha ribonukleaasi poolt välja (Lee jt., 2002). Drosha stabiilset seostumist aitab teostada Pasha (ka DGCR8) nimeline valk, mis koos Droshaga moodustavad mikroprotsessorkompleksi (Gregory jt., 2004). Väljalõigatud juuksenõelastruktuur ehk pre-miRNA transporditakse eksportiin-5 vahendusel tsütoplasmasse (Yi jt., 2003) ning lõigatakse Dicer ribonukleaasi poolt kaheaheelaliseks 18-25 nukleotiidi pikkuseks küpseks miRNA-ks (Lee jt., 2003). Saadud miRNA seostub RNA indutseeritud vaigistamise kompleksi (RISC) ning juhatab selle sihtmärk-mRNA-ni (Hutvagner ja Zamore, 2002). Vastava mRNA ekspressiooni vaigistamine toimub Argonaut valkude vahendusel kas transkriptsiooni repressiooni, mRNA degradatsiooni või translatsiooni blokeerimisega (Cenik ja Zamore, 2011).



Joonis 1. MikroRNA biogenees ja RNA-indutseeritud geeni vaigistamine. Primaarsete miRNA-de transkriptsioonile miRNA geenidest järgneb lõhustumine prekursor miRNA-deks Drosha ribonukleaasi poolt. Prekursor miRNA transporditakse eksportiini vahendusel tsütoplasmasse ning lõigatakse Dicer nukleaasi poolt küpseteks miRNA dupleksiteks. Üks miRNA ahelatest seondub RISC kompleksi ning vahendab RNA vaigistamist kas mRNA lagundamisega või translatsiooni blokeerimisega. (Joshi jt., 2011)

Esmakordselt avastati miRNA olemasolu ümarussis *C.elegans* (Lee jt., 1993). Pärast seda on ilmnud, et tegemist on väga laialdaselt levinud regulaatormolekulidega. Tänu kiirele tehnika arengule ning ülegenoomsete meetodite kasutusele võtmisele on andmemaht kasvanud eksponentsiaalselt (joonis 2) ning 2013 juuni seisuga on MiRBase andmebaasi järgi inimesel teada 1872 prekursor järjestust, millest tehakse 2578 küpset miRNA-d. Hiljuti avastati aga innovaatilisi meetodeid kasutades üle tuhande uue miRNA, mis näitab, et nende koguarv ulatub inimesel üle 3000 ja on seega palju suurem, kui varem arvati (Friedlander jt., 2014).



Joonis 2. MikroRNA andmete kasv. Joonisel on näha miRBase andmebaasis olevate järjestuste arvu kasv (must joon) ning „microRNA“ sõna sisaldavate publikatsioonide arvu kasv (hall joon) aastate jooksul. (Kozomara ja Griffiths-Jones, 2011)

Genoomsed uuringud on näidanud, et igal miRNA prekursoril võib olla sadu sihtmärkgeene (Lewis jt., 2005) ning kokku on miRNA-de poolt reguleeritud üle 60% inimese geenidest (Friedman jt., 2009). Suure hulga erinevate geenide reguleerimist võimaldab asjaolu, et miRNA-d ei paardu täielikult. On teada, et mRNA efektiivseks vaigistamiseks on täielik komplementaarsus vajalik vaid miRNA 5' otsas oleva seitsme nukleotiidi pikkuse järjestusega (positsioonis 2-8) (Lewis jt., 2003; Wang, 2014). See on ka üks olulisemaid erinevusi võrreldes siRNA-dega (*small interfering RNA*), mis seonduvad märklaud mRNA-ga täieliku komplementaarsuse alusel (Mack, 2007).

Kuigi tänapäevaks on teada suur hulk miRNA-de järjestusi ning nende sihtmärke, puudub veel sügavam arusaamine nende bioloogilistest funktsioonidest (Ameres ja Zamore, 2013). Järgnevalt on välja toodud mõningaid teadmisi miRNA-de funktsiooni kohta embrüonaalsetes tüvirakkudes.

1.2.1 MikroRNA-d embrüonaalsetes tüvirakkudes

MikroRNA-de olulisuse uurimiseks on kasutatud rakke, kus küpseid miRNA-sid ei toodeta. Selliselt on loodud nii Drosha, Dgcr8 kui ka Dicer defitsiitseid rakke, kus miRNA-de biogenees on teatud etappides takistatud. Tulemustest on selgunud, et nende valkude

puudumisel ei suuda embrüonaalsed tüvirakud diferentseerumise radadele ümber lülituda. (Kanellopoulou jt., 2005; Wang jt., 2007) Kui varem arvati, et Drosha, Dgcr8 ja Dicer osalevad ainult miRNA-de protsessimisel, siis viimastel aastatel on aga selgunud, et neil kõigil on veel teisi sihtmärke, nagu näiteks erinevad mRNA-d, pikad mittekodeerivad RNA-d (*long noncoding RNA*) ning väikesed tuumakese RNA-d (*small nucleolar RNA*) (Chong jt., 2010; Ender jt., 2008; Macias jt., 2012). Sellegipoolest võib tulemustest järeldada, et erinevad väikesed RNA-d, sealhulgas miRNA-d, võiksid olla olulised embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumiseks vajaliku ekspressioonimustri muutmisel. Sellele viitavad ka mitmed eksperimentaalsed tulemused. Näiteks suureneb hES rakkude diferentseerumisel miR-145 ekspressioon, mis repressseerib otseste sihtmärkidena pluripotentsusfaktorid OCT4, SOX2 ning KLF4. Siinkohal tekib tagasisidestuslik regulatsioon. Nimelt seondub OCT4 omakorda miR-145 promootorile ja repressseerib selle. (Xu jt., 2009) MikroRNA-de reguleerimine transkriptsioonifaktorite poolt tundub olevat ka levinud, kuna nii OCT4, SOX2 kui ka NANOG puhul on täheldatud seondumist paljude miRNA-de promootoritega. Seda nii ES rakkudes kõrgelt ekspresseeritud miRNA-dega, mis reguleeritakse diferentseerumisel alla kui ka ES rakkudes repressseeritud miRNA-dega, mida ekspresseeritakse diferentseerumisel valikuliselt teatud rakutüüpides. (Marson jt., 2008)

Lisaks ES rakkude suunamisele erinevatele diferentseerumisradadele suudavad miRNA-d rakke ka dediferentseerida. Näiteks on mir-302 kunstlikul ekspressioonil reprogrammeeritud inimese karvafolliikuli rakke pluripotentseteks tüvirakkudeks (Lin jt., 2011). Kuna miRNA-sid saab rakkudesse viia kaheaahelaliste RNA-dena, on selline meetod ohutum kui viiruse või DNA vektori kasutamine, millega kaasneb oht lülitada genoomi (Guo jt., 2014). Seega on potentsiaal kasutada miRNA-sid nii embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerimiseks kui ka somaatiliste rakkude dediferentseerimiseks teraapiaks vajalike rakutüüpide suunas.

Lisaks regulatsioonimehhanismide tundmaõppimisele on miRNA-de terapeutiliseks rakendamiseks oluline leida ja välja töötada meetodid, mis võimaldavad miRNA-d efektiivselt ja ohutult rakkudesse transportida. Kuigi viraalsed meetodid on efektiivsed, võivad need põhjustada insertsioonilist mutageneesi ning kontrollimatut geeniekspressiooni, mis võivad omakorda põhjustada tuumorite teket (Thomas jt., 2003). Seepärast on suurt rõhku pööratud erinevate mitteviraalsete meetodite väljatöötamisele. Näiteks on hiire embrüonaalsete tüvirakkude peal edukalt rakendatud elektroporatsiooni ja liposoomidel põhinevaid meetodeid. Inimese embrüonaalsed tüvirakud on aga palju tundlikumad ja raskemini transfekteeritavad ning nii elektroporatsioon kui lipofektsioon on osutunud nende peal

ebaefektiivseks, toksiliseks ning elulemust vähendavaks (Cao jt., 2010). Üheks võrdlemisi efektiivseks, mittetoksiliseks ja ohutuks meetodiks peetakse aga rakku sisenevate peptiidide kasutamist (Heitz jt., 2009).

1.3 Rakku sisenevad peptiidid

Rakku sisenevad peptiidid (RSP) on lühikesed, tavaliselt 10 kuni 30 aminohappe pikkused molekulid, mis on võimelised läbima raku plasmamembraani ning transportima mitmesuguseid molekule raku sisemusse. Esmakordselt avastati translokeeruvate valkude olemasolu 1988. aastal, kui nähti, et inimese immuunpuudulikkust põhjustava viiruse (HIV-1) transaktivatsiooni valk Tat (*trans-activator of transcription*) on võimeline läbima rakumembraani (Frankel ja Pabo, 1988; Green ja Loewenstein, 1988). Peagi leiti üles nii Tat kui ka teiste plasmamembraane läbivate valkude translokeerumist võimaldavad domäänid, millest loodigi esimesed rakku sisenevad peptiidid (Derossi jt., 1996; Schwarze jt., 2000; Vivès jt., 1997). Lisaks on avastatud, et selliste omadustega peptiidide on võimalik saada ka nii erinevate RSP-de osi kombineerides (Pooga jt., 1998; Soomets jt., 2000) kui ka täiesti uusi järjestusi sünteesides (Tezgel jt., 2011). Uute järjestuste disainimist ning olemasolevate täiustamist aitasid esiteks RSP-de võrdlemisel leitud sarnasused. Näiteks täheldati, et suur hulk RSP-de aminohappeid on positiivselt laetud, ning rakkudesse sisenemise efektiivsust suurendab just arginiinide lisamine peptiidide järjestusse (Mitchell jt., 2000). Lisaks on leitud, et efektiivsusele avaldab mõju erinevate sekundaarstruktuuride olemasolu (Oehlke jt., 1998), mittestandardsete aminohapete lisamine (Farrera-Sinfreu jt., 2005) ning mitmed muud modifikatsioonid (Copolovici jt., 2014).

1.3.1 Lastmolekulide sidumine rakku sisenevate peptiididega

Lastmolekulide sidumine rakku sisenevate peptiididega toimub kas kovalentselt või mittekovalentselt. Kovalentset seondumist läbi disulfiid- ning amiidsidemete kasutatakse neutraalsete lastmolekulide nagu morfoliino oligomeeride (PMO) ning peptiidsete nukleiinhapete (PNA) sidumiseks. Mittekovalentsed kompleksid moodustatakse elektrostaatiliste ning hüdrofoobsete interaktsioonidega positiivselt laetud RSP-de ja negatiivselt laetud molekulide, näiteks nukleiinhapete (siRNA, miRNA, pDNA) vahel (Copolovici jt., 2014).

1.3.2 Komplekside sisenemine rakkudesse

Rakkudesse sisenemine pärast komplekside interaktsiooni rakumembraaniga võib toimuda nii endotsütoosi teel kui ka läbi plasmamembraani otseselt translokeerudes (Guterstam jt., 2009). Sisenemisviisi mõjutavad mitmed faktorid nagu näiteks peptiidide järjestus, membraanide koostis, lastmolekulide suurus, RSP-de kontsentratsioon (Jiao jt., 2009; Walrant jt., 2012). Lisaks efektiivsele sisenemisele peab bioloogilise efekti esilekutsumiseks toimuma ka endosomaalsetest vesiikulitest vabanemine (endotsütoosi korral) ning peptiidide ja lastmolekulide eraldumine üksteisest tsütosoolis, mida on peptiidide järjestust modifitseerides võimalik veelgi parandada. Seega mõjutavad RSP-de ja lastmolekulide vaheliste komplekside sisenemist ning transporditud molekuli jõudmist sihtmärgini väga paljud faktorid. See on teinud erinevate katsete võrdlemine keerukaks ning tekitanud ka palju vastuolusid. (Copolovici jt., 2014)

1.3.3 RSP-de rakendusvõimalused miRNA transpordiks hES rakkudesse

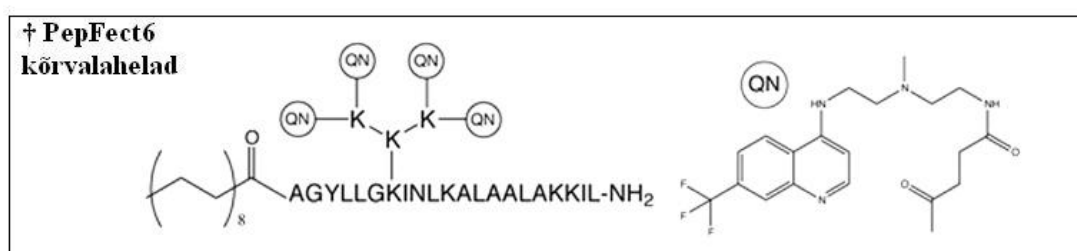
Teadaovalt pole seni avaldatud ühtegi tööd, kus miRNA transportimiseks inimese või hiire embrüonaalsetesse tüvirakkudesse oleks kasutatud rakku sisenevaid peptiidide. Peptiididega on miRNA-d viidud aga näiteks inimese mesenhümaalsetesse tüvirakkudesse (arengupotentsiaalilt multipotentsed). Nimelt kasutati LMWP peptiidi miR-29b transportimiseks ja selle tulemusel diferentseerusid mesenhümaalsed tüvirakud osteoblastilises suunas. (Suh jt., 2013) Inimese embrüonaalsetesse tüvirakkudesse on peptiididega suudetud viia aga näiteks miRNA-ga omadustelt sarnast oligonukleotiidi, siRNA-d (Wang jt., 2010). Selleks kombineeriti transduktsioonidomään ja kaheahelalist RNA-d siduv domään. Kasutatud siRNA abil suudeti terves rakupopulatsioonis vähendada nii NANOG kui ka OCT4 mRNA taset, ilma et meetod ise oleks pluripotentsust mõjutanud. (Eguchi jt., 2009) Rakku sisenevate peptiidide abil on viidud hES rakkudesse ka mitmeid valke. Näiteks on suudetud TAT peptiidiga viia hES rakkudesse pankrease arengus olulist transkriptsioonifaktorit PDX1 (*Pancreatic and duodenal homeobox*), mis sisenemise järgselt aktiveeris sihtmärkgeenid ja indutseeris insuliini tootmist (Kwon jt., 2005). PDX1 transkriptsioonifaktorist on loodud ka rekombinantne transduktsioonidomääni sisaldav valk, mis suudab iseseisvalt rakkudesse siseneda ja samuti insuliini tootmist indutseerida (Liang jt., 2013). Seega on rakku sisenevaid peptiide juba mitmeti rakendatud ning edukat miRNA transporti hES rakkudesse võiks võimaldada nii mõnigi juba kasutusel olev peptiid. Järgnevalt ongi kirjeldatud kolme juba laialdaselt kasutusel olevat rakku sisenevat peptiidi, CADY,

PepFect6, PepFect14 (joonis 3), mida kasutati antud magistritöö eksperimentaalosas miRNA-de transpordiks inimese embrüonaalsetesse tüvirakkudesse.

CADY	atsetüül-GLWRALWLLRSLWLLWRA-tsüsteamiid
ppTG1	GLFKALLKLLKSLWLLLLKA-NH ₂

PepFect6	stearüül-AGYLLGK†INLKALAALAKKIL-NH ₂
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂

PepFect14	stearüül-AGYLLGKLLLOOLAAAALLOOLL-NH ₂
Stearüül-TP10	stearüül-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂



Joonis 3. CADY, PepFect6 ja PepFect14 raku sisenevad peptiidid ning nende eelkäiad. Joonisel on toodud raku sisenevate peptiidide, CADY, PepFect6, PepFect14 ja nende eelkäiate ppTG1, TP10, Stearüül-TP10 järjestused. Näidatud on ka PepFect6 kõrvalahelad. QN - klorokviin. (Ezzat jt., 2011; Helmfors, 2012; Rittner jt., 2002)

1.3.4 CADY

CADY on 20 aminohappe pikkune raku sisenev peptiid, mis on loodud ppTG1 peptiidi põhjal (joonis3) (Crombez jt., 2009). Kui ppTG1 on efektiivne plasmidse DNA transportimiseks (Rittner jt., 2002), siis CADY disainimise eesmärgiks oli suurendada siRNA transpordivõimalusi. Spetsiifiliseks seondumiseks väikeste nukleiinhapetega ning peptiidi ja siRNA vaheliste sidemete stabiliseerimiseks asendati mitmed aminohapped aromaatsete trüptofaani ja katioonsete arginiini jääkidega. Selle tulemusena suudab CADY transportida siRNA-d lisaks tavalistele rakuliinidele ka primaarsetesse ja suspensioonina kasvavatesse rakkudesse. Sisenemise mehhanismi uurides leiti, et endosomaalsete radade inhibiitorid ei peatanud komplekside rakkudesse sisenemist. (Crombez jt., 2009) Peatselt pakuti välja, et tänu CADY võimele interatkeeruda membraanisestest fosfolipiididega, sisenevad selle kompleksid põhiliselt otsese translokatsiooni teel (Konate jt., 2010; Rydström jt., 2011).

Kuna CADY ei ole toksiline ning suudab vagistada sihtmärke väikestes kontsentratsioonides, tõotab antud peptiid olla sobilik ka terapeutilistel eesmärkidel. (Crombez jt., 2009) Rakendatud on seda ka siRNA transpordiks hiire embrüonaalsetesse tüvirakkudesse (Deshayes ja Divita, 2013).

1.3.5 PepFect6

PepFect6 on TP10 (Transportaan10) põhjal loodud peptiid, mis on sarnaselt CADY-le mõeldud siRNA transportimiseks. Selle disainimisel sooviti lahendada kahte TP10 puhul esinenud probleemi: komplekside ebastabiilsus seerumiga keskkonnas ning kinnijäämine rakkude endosoomidesse (Andaloussi jt., 2011). Esimesele probleemile leiti lahendus stearüülrühma lisamisega, millel on ka eelnevalt nähtud akvtiivsust ja stabiilsust suurendavat mõju (Mäe jt., 2009). Tänu sellele modifikatsioonile ei agregeeru vees moodustunud PepFect6 ja siRNA kompleksid seerumi juuresolekul ja seega on osakeste suurused sobivamad kasutamaks neid *in vivo* tingimustes (Andaloussi jt., 2011). Teise probleemi lahendamiseks on PepFect6 peptiidile kõrvalahelana juurde lisatud prootoneid liitvad klorokviini analoogid, mis pH-d puhverdades suurendavad osmootset rõhku kuni vesiikulite lõhkumiseni ja ainete vabanemiseni (Cheng jt., 2006). PepFect6 segamisel siRNA-ga on nähtud, et kompleksid tekivad minutite jooksul ning säilivad stabiilsena nädalaid. PepFect6 võimaldab viia siRNA-d rakupopulatsioonidesse rakkude konfluentsusest sõltumata ning ilma märgatavate toksiliste mõjutusteta. Lisaks võimaldab PepFect6 viia siRNA-d edukalt ka hiire embrüonaalsetesse tüvirakkudesse, ilma et meetod iseenesest pluripotentsust mõjutaks (Andaloussi jt., 2011).

1.3.6 PepFect14

PepFect14 on stearüül-TP10 põhjal loodud peptiid, mis oli algselt mõeldud splaissingut korrigeerivate oligonukleotiidide (SCO-de) transportimiseks (Ezzat jt., 2011), kuid hilisemalt on kasutatud ka näiteks siRNA transportimiseks (Ezzat jt., 2012). PepFect14 peptiidil on võrreldes eelkäija järjestusega vahetatud mitmed lüsiinid ornitiinidega, mis võimaldavad tugevamaid sidemeid nukleiinhapetega ning seeläbi stabiilsemaid komplekse väiksemate laengute vahekorra puhul (Ramsay ja Gumbleton, 2002). Kuna ornitiin on mittestandardne aminohape, on see ka vähem aldis lagundamisele seerumi proteaaside poolt. PF14 ja SCO komplekse on suudetud viia ka tahkesse vormi, mis on kuid stabiilsed. See tehniline edusamm suurendab RSP-del põhinevate ravimite rakendamise- ning manustamisvõimalusi. Huvitav on see, et klorokviini lisamine transfekteerimissegusse ei suurendanud komplekside sisenemist,

kuid sellegipoolest paranes funktsionaalne efektiivsus. Kuna efektiivsus paranes tänu suurenenud endosoomidest vabanemisele, viitab see endotsütoosete vesiikulite osalemisele komplekside sisenemisel. Sellist transporti kinnitab ka vähenenud funktsionaalne efektiivsus 4°C juures (madal temperatuur inhibeerib energiast-sõltuvat sisenemist, nagu seda on endotsütoos). PepFect14 on võimeline transfekteerima peaaegu 100% rakupopulatsioonist ning võrreldes LF2000 (*Lipofectamine 2000*) liposoomi meetodika kasutamisega, ei sõltu transfektsiooni efektiivsus nii palju rakkude konfluentsusest, mõjutab vähe rakkude elulemust ning on märgatavalt vähem toksiline. Need omadused on olulised rakendamisel *in vivo* tingimustes. (Ezzat jt., 2011)

Kirjanduses toodud faktide põhjal võib kokkuvõtlikult öelda, et CADY, PepFect6 ja PepFect14 puhul on tegemist suhteliselt efektiivsete, vähetoksiliste, siRNA-de transporti võimaldavate peptiididega. Nende sobilikkust miRNA-de transpordiks inimese embrüonaalsetesse tüvirakkudesse näidatakse aga esmakordselt antud töö eksperimentaalselt.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Antud magistritöö eksperimentaalosa eesmärgiks oli välja selgitada, milline rakku sisenevatest peptiididest, CADY, PepFect6 või PepFect14, on kõige sobilikum mikroRNA transportija inimese embrüonaalsetesse tüvirakkudesse. Seejuures peeti oluliseks, et meetod oleks kõrge transfektsiooniefektiivsusega ning hES rakkude elulemust ja pluripotentsust võimalikult vähe mõjutav.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Rakkude kasvatamine koekultuuris

Töös kasutati inimese embrüonaalsete tüvirakkude liini H9 (WA09) (XX karüotüüp; WiCell Research Institute, National Stem Cell Bank, USA). Rakke kasvatati 5% süsinikdioksiidi ja veeauruga küllastatud inkubaatoris, mille temperatuuri hoiti 37 °C juures. Kasvupinnana kasutati Matrigeliga (BD Matrigel hESC-qualified, BD Biosciences, USA) kaetud 6-kannulisi (kannu kasvupindala 9,6 cm²) koekultuuri plaate (Greiner Bio-One, Austria). Rakkude kasvatamiseks kasutati defineeritud koostisega mTeSR1 söödet (STEMCELL Technologies, USA), mida vahetati iga 24 tunni järel. Rakke passeeriti iga 3-4 päeva järel mehaaniliselt, kasutades kolooniate tükeldamiseks ja eemaldamiseks mikropipeti otsikut (mahutavusega 200 µl). Töös kasutatud rakkude passaaži numbrid jäid vahemikku 44-63. Rakkude igapäevase kasvatamisega tegeles Tartu Ülikooli rakubioloogia õppetooli laborant.

2.2.2. Rakkude passeerimine transfekteamiseks

Üks päev enne transfekteamimist passeeriti rakke nii mehaaniliselt koloonia tükkidena (eelnevalt kirjeldatud) kui ka EDTA-ga üksikrakulisena (joonis 4). Üksikrakususpensiooni saamiseks pesti rakke kõigepealt PBS-iga ning seejärel inkubeeriti 0,5 mM EDTA/PBS lahusega 20 min 37 °C juures. Rakkude plaadilt eemaldamiseks ja suspendeerimiseks kasutati 1 ml mahuga mikropipetti (Gilson, USA) (suspendeeriti keskmiselt 10 korda). Rakud koguti kokku ning tsentrifugeeriti 5 min 200 g juures toatemperatuuril (4K15C, Sigma, Saksamaa). Supernatant aspireeriti ning rakud suspendeeriti mTeSR1 söötmes. Rakkude lugemiseks kasutati hemotsütomeetri kambrit (Marienfeld, Saksamaa). Tüvirakud passeeriti kas 4-kannulistele (kasvupindala 1,4 cm²) plaatidele (Becton, Dickinson and Company; USA) või 24-kannulistele (kasvupindala 1,9 cm²) plaatidele (Greiner Bio-One, Austria). Enne rakkude lisamist asetati kannudesse ümmargune katteklaas (diameetriga 12 mm) (Marienfeld,

Saksamaa), mis kaeti Matrigeliga. Üksirakulise passeerimise puhul lisati iga kannu kohta 44 000 rakku. Koloonia tükkidena passeerimise puhul lisati iga kannu kohta umbes kaks korda rohkem rakke. Tüvirakkude elulemuse suurendamiseks lisati söötmesse ROCK inhibiitorit Y-27632 (Tocris Bioscience, UK) 10 mM lõppkontsentratsiooniga. ROCK inhibiitoriga sööde jäi rakkudele kuni järgmise söötme vahetuseni (umbes 24-ks tunniks). Üksirakulise passeerimise ja ROCK inhibiitori kasutamise meetodika optimeerimist on kirjeldatud antud töö autori bakalaureusetöös (Kasuk, 2011).

2.2.3 Kasutatud miRNA, rakku sisenevad peptiidid, antikehad.

Antud töös kasutati Dy547 märgisega mimikeerivat (põhineb *C. elegans*'i cel-miR-67 järjestusel) kontroll-miRNA-d (Thermo Fisher Scientific, USA), mida transporditi rakku kolme erineva rakku siseneva peptiidiga: PepFect6, Pepfect14, CADY. Antud peptiidid on saadud Kent Langeli käest. Tüvirakkude pluripotentsuse kontrollimiseks kasutati inimese OCT4A vastast hiire monoklonaalset antikeha sc-5279 (Santa Cruz Biotechnology, USA) ning inimese NANOG vastast küüliku polükloonaalset antikeha sc-33759 (Santa Cruz Biotechnology, USA). Eelmainitud primaarseid antikehi lisati rakkudele lahjendusega 1:50. Sekundaarseteks antikehadeks olid hiire immunoglobuliinide vastane kitse polükloonaalne antikeha, mis oli seotud Alexa Fluor 647-ga (A21237, Invitrogen, USA) ning küüliku immunoglobuliinide vastane kana polükloonaalne antikeha, mis oli seotud Alexa Fluor 488-ga (A21441, Invitrogen, USA). Sekundaarseid antikehi lisati lahjendusega 1:500.

2.2.4 Komplekside moodustamine ja lisamine rakkudele

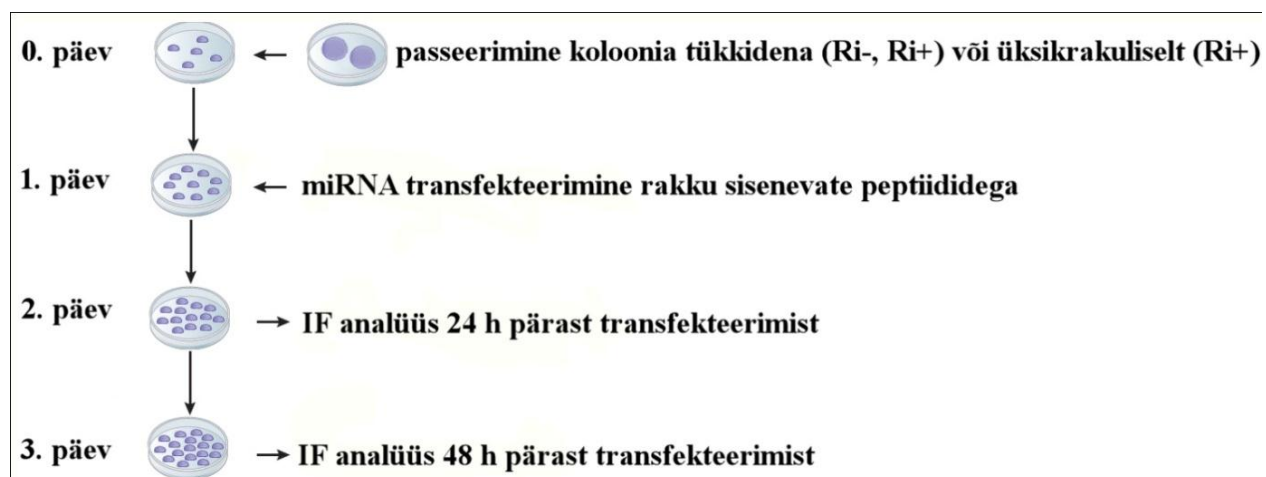
Rakku sisenevate peptiidide ja miRNA kompleksidel lasti moodustuda MQ vees (mahus 50 µl proovi kohta) 1 tunni jooksul toatemperatuuril. Seejärel lisati söödelt ruumalani 500 µl proovi kohta ning moodustunud kompleksid kanti koos söötmega rakkudele (surnud rakkudest vabanemiseks pesti kanne eelnevalt söötmega). MikroRNA lõppkontsentratsioon oli 0,03 µM. Peptiidide lõppkontsentratsioon oli PepFect6 puhul 0,853 µM ning PepFect14 ja CADY puhul 0,512 µM. Komplekse sisaldavat söödelt hoiti rakkudel 24 tundi.

2.2.5 Immunotsütokeemia ja immunofluorestsents-mikroskoopia

Fluorestsentsmikroskoopia abil analüüsiti rakke, mis olid fikseeritud 24 ja 48 tundi pärast transfekteerimist (joonis 4). Esiteks vahetati rakkudel sööde ning kannudest tehti Nikon SMZ800 valgusmikroskoobi abil (2x ja 6,3x objektiiviga) Nikon DS-Fi1 kaameraga pilti (Nikon Corporation, Jaapan). Järgneva töö jooksul hoiti rakke toatemperatuuril ning hämaras.

Rakke pesti töötluste vahel 3 korda PBS-iga (v.a enne fikseerimist ning enne primaarsete antikehadega inkubeerimist, kui pesti ühe korra). Reagendid lahjendati PBS-is (v.a primaarsed antikehad, mis lahjendati 4% NGS/PBS lahuses). Rakud fikseeriti 4% paraformaldehüüdiga 12 minutit, permeabiliseeriti 0,2% Triton X-100-ga 10 minutit ning blokeeriti 4% NGS-ga 60 minutit. Pärast blokeerimist inkubeeriti rakke 60 minutit primaarsete antikehadega ning 30 minutit sekundaarsete antikehadega. Rakutuumade visualiseerimiseks inkubeeriti rakke 10 minutit DAPI lahuses lõppkontsentratsiooniga 0,5 µl /ml (Sigma-Aldrich, Iisrael). Rakkudega katteklaas sulundati alusklaasile 30% glütserooliga. Preparaatide vaatamiseks kasutati kahte erinevat fluorestsentsmikroskoopi: IX81 (Olympus Corporation, Jaapan) ning konfokaalmikroskoop Olympus FluoView FV1000 (Olympus Corporation, Jaapan). Piltide töötlemiseks kasutati programmi Imaris 7.6.5 (Bitplane, Šveits). Fluorestsentsmikroskoopiat kasutati rakkude analüüsimiseks 24 ja 48 tundi pärasttransfekteeerimist.

Antud eksperimentaalosa põhineb ühel eelkatsel (ilma pluripotentsusmarkerite kontrollimiseta) ning kahel põhikatsel. Seega on kõiki proove korratud vähemalt kaks korda, v.a kolooniatena passeerimine ROCK inhibiitorita, mida on tehtud ühel korral.

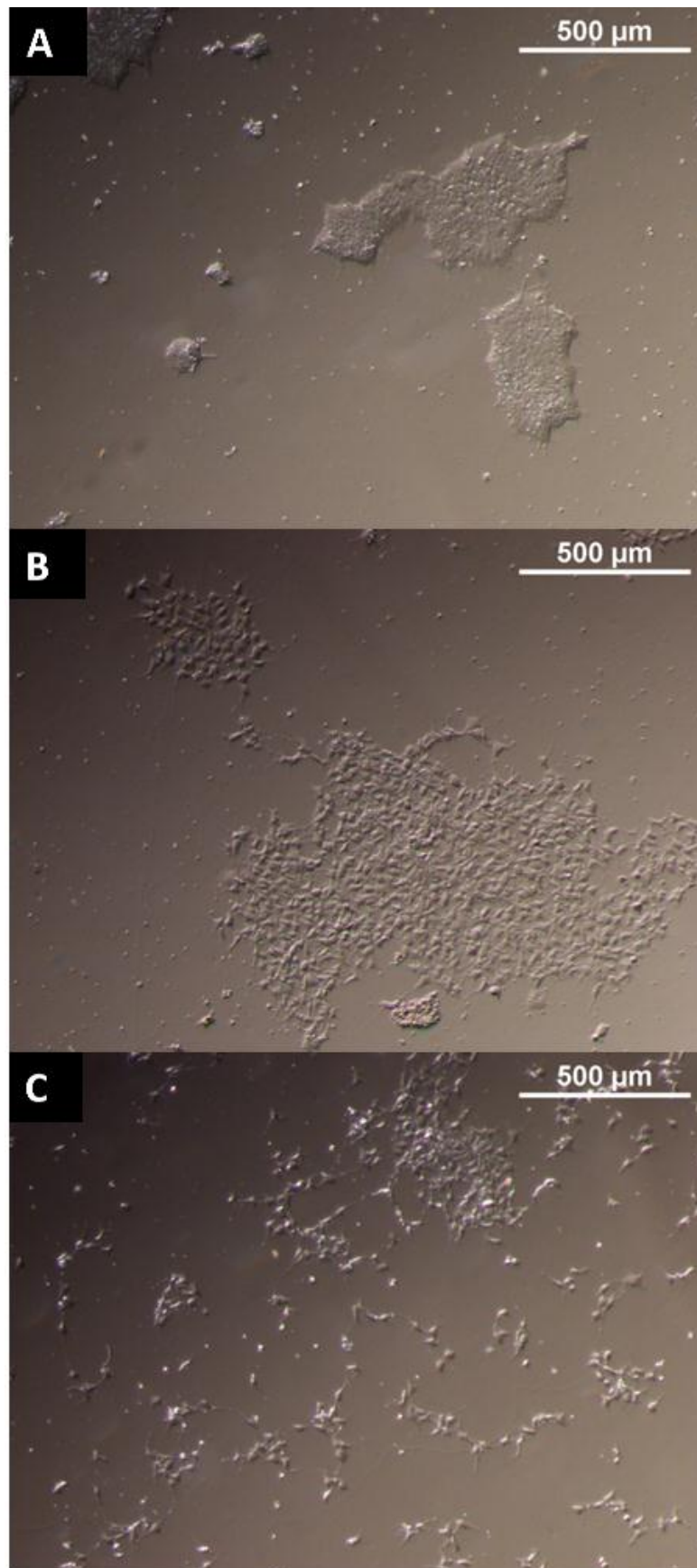


Joonis 4. Katse skeem. Rakke passeeriti transfekteeerimiseks nii kolooniatena (ROCK inhibiitorita (Ri-) ja ROCK inhibiitoriga(Ri+)) kui ka üksikrakuliselt (ainult ROCK inhibiitoriga). Üks päev pärast passeerimist lisati rakkudele miRNA ja rakku sisenevate peptiidide kompleksid. Pluripotentsusmarkerite ekspressiooni ja transfektsiooni efektiivsust analüüsiti immunofluorestsents-mikroskoopia abil 24 ja 48 tundi pärast transfekteeerimist.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Tüvirakkude passeerimise meetodid

Inimese embrüonaalseid tüvirakke passeeritakse ühelt kasvuplaadilt järgmisele tavaliselt mehaaniliselt koloonia tükkidena, kuna üksikrakuliseks tegemisel nende elulemus väheneb märgatavalt (Ellerstrom jt., 2010) ning seda eriti trüpsiini kasutamisel (Bajpai jt., 2008). Koloonia tükkidena passeerides moodustavad aga hES rakud suuri kolooniaid, milles on rakud tihedalt koos ning kaetud hES rakkude endi poolt toodetud ekstratsellulaarse maatriksiga. See võib aga takistada rakku sisenevate peptiidide ja miRNA komplekside juurdepääsu koloonia sees olevatesse rakkudesse. Üksikrakulise passeerimise puhul on rakkude elulemuse suurendamiseks võimalik kasutada ROCK inhibiitorit, mis suurendab rakkude vahelisi interaktsioone, võimaldades neil paremini agregeeruda. Lisaks takistab ka antud reagentiga töötlus ekstratsellulaarseid signaale, mis indutseeriksid rakkude dissotsiatsioonil apoptoosi. (Krawetz jt., 2009) Seega otsustati sobiva meetodi leidmiseks kasutada võrdlusena nii passeerimist koloonia tükkidena (ROCK inhibiitorita ja ROCK inhibiitoriga) kui ka üksikrakuliselt (ainult ROCK inhibiitoriga) (joonis 5). Võrreldes erinevalt passeeritud rakke üks päev pärast passeerimist, on näha, et koloonia tükkidena ja ROCK inhibiitorita (tavaline meetod) passeeritud rakud on tihedalt koos ning koloonias üksteisest mitte eristatavad (joonis 5A). Seevastu on ROCK inhibiitori mõjul rakud koloonias hõredalt ning üksteisest eristatavad (joonis 5B). Võrdlusest on ka näha, et kui koloonia tükkidena passeerides moodustavad rakud suuremaid kolooniaid (joonis 5A ja 5B), siis üksikrakuliselt passeerides on rakud väiksemates kogumites (joonis 5C). Üksikrakulist passeerimist ilma ROCK inhibiitorita ei tehtud, kuna rakkude elulemus oleks sel juhul liiga madal (Kasuk, 2011).



Joonis 5. Passeerimise meetodid. Joonisel on näha rakukolooniad esimesel päeval pärast passeerimist. (A) Passeerimine koloonia tükkidena ja ROCK inhibiitorita. Rakud on tihedalt koos ning pole koloonias eristatavad. (B) Passeerimine koloonia tükkidena ja ROCK inhibiitoriga. Rakud on koloonias hõredalt ning üksteisest eristatavad. (C) Passeerimine üksikrakuliselt ja ROCK inhibiitoriga. Rakud on väiksemates kogumites.

2.3.2 Transfekterimiskomplekside mõju rakkude elulemusele

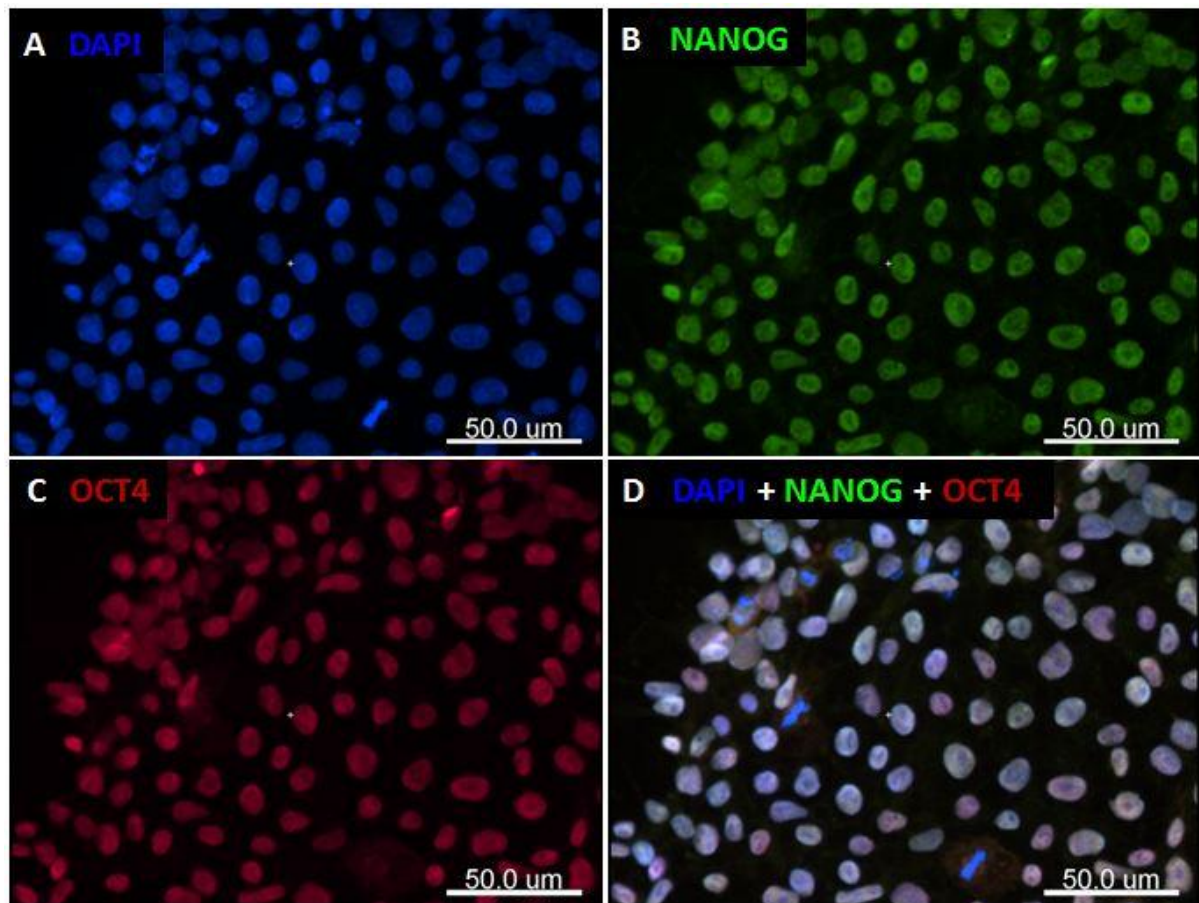
MikroRNA ja vastavate raku sisenevate peptiidide komplekside mõju hindamiseks rakkude elulemusele vaadeldi rakke valgusmikroskoobiga. Vaadates rakkude hulka plaadil vahetult enne ning 24 tundi pärast komplekside lisamist (lisa 2) ning võrreldes neid transfekterimata rakkudega (lisa 1), on näha, et PF14 on mõjunud rakkudele toksiliselt ning rakkude arv plaadil on märgatavalt vähenenud. Sellist efekti oli näha kõigi kolme passeerimise meetodi puhul (lisa 2D, 3D ja 4D). Mõningast rakkude vähenemist oli märgata ka PF6 puhul (lisa 3B ja 4B). On võimalik, et seda võis põhjustada ROCK inhibiitori töötlus, kuna tavalisel passeerimisel mõjutusi rakkude elulemusele märgata ei olnud (lisa 2B). Antud mõju oli sel juhul aga siiski kaudne, kuna enne rakkude transfekterimist pesti ROCK inhibiitor välja.

Varieeruvust esines üksikrakulisel passeerimisel erinevate katsete vahel. Nimelt oli esimesel põhikatsel PF6 kasutamisel ainult vähene rakkude kadu (lisa 5B) ning PF14 kasutamisel suur rakkude kadu (lisa 5D). Vastupidiselt oli teisel põhikatsel PF6 kasutamisel näha palju plaadilt lahti lasknud ja surnuid rakke (lisa 4B ja 6), samas kui PF14 puhul oli märgata ka mõningast elulemust (lisa 4D ja 7). Sellised tulemused võivad osaliselt olla tingitud katsete algmaterjali erinevusest. Nimelt oli kasutatud rakkude passaaži arv esimesel katsel 47 ning teisel katsel 63 ja seega võisid rakud olla kauaaegsemal kasvatamisel tundlikumaks läinud. Sellegi poolest ei olnud CADY kasutamisel märgata toksilist mõju ühegi passeerimismeetodiga (lisa 2F, 3F, 4F). Kokkuvõtvalt võib valgusmikroskoobi piltide põhjal järeldada, et PF14 pole hES rakkude peal kasutatav, PF6 võib mõningal määral mõjuda toksiliselt ning kõige vähem mõjutab elulemust CADY. Seega uuriti edasiselt rakke, mille puhul oli miRNA transportimiseks kasutatud PF6 ja CADY peptiidi.

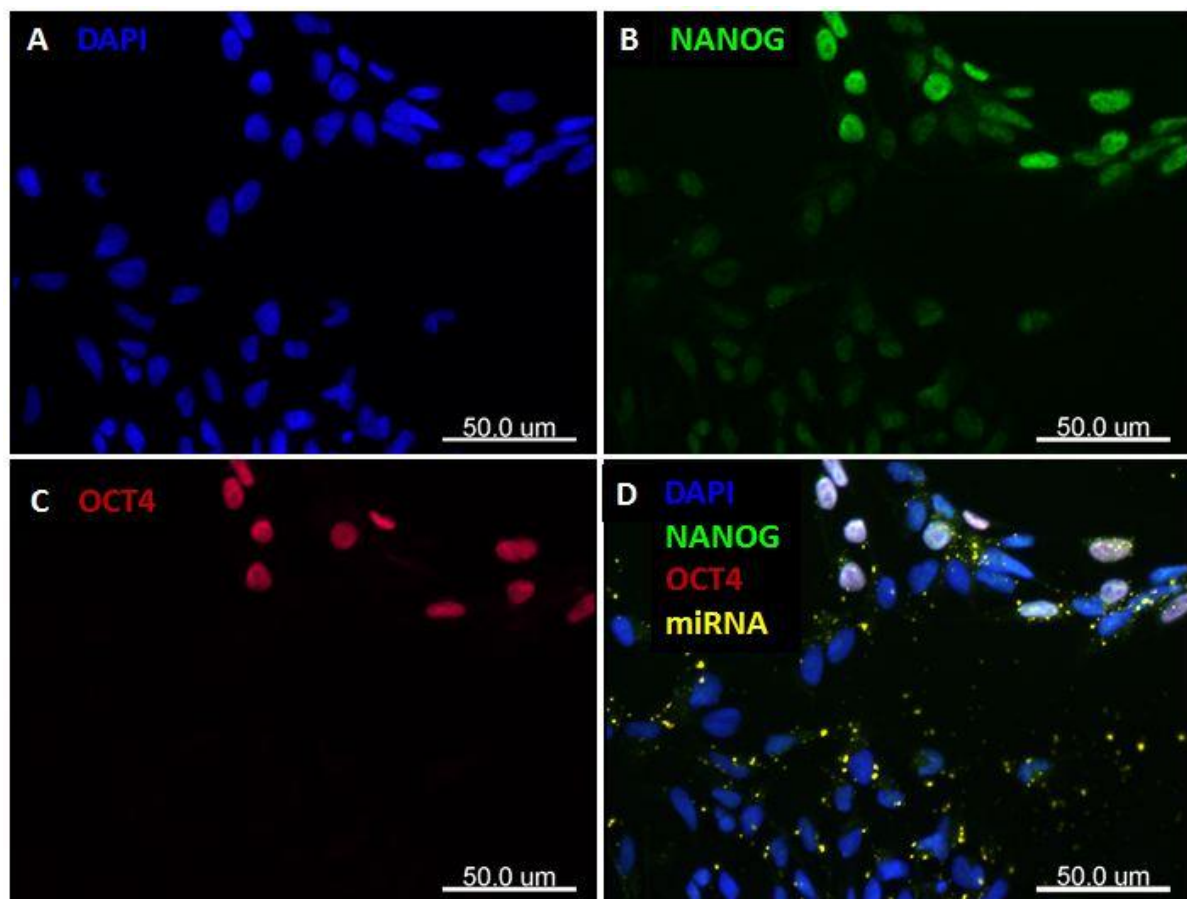
2.3.3 Transfekterimiskomplekside mõju rakkude pluripotentsusele

Kontrollimaks, kas rakud säilitavad miRNA ja peptiidide komplekside (PF6, CADY) lisamisel pluripotentsuse, hinnati OCT4 ja NANOG transkriptsioonifaktorite olemasolu fluorestsentsmikroskoobi abil. Vaadates esmalt transfekterimata rakke (joonis 6), on näha, et normaalses tüvirakupopulatsioonis esineb ka heterogeenseid rakke, kus OCT4 ja NANOG markerite ekspressiooni tase on mõnevõrra erinev. Samas võivad värvumiste intensiivsused sõltuda teatud määral ka tuuma suurusest rakkudes ning antikehade seondumise hulgast ja efektiivsusest. Sellegipoolest eristuvad pluripotentsed ja mõnevõrra heterogeensed rakud selgelt diferentseerunud rakkudest (joonis 7), kus nii OCT4 kui ka NANOG (mõnevõrra hiline misega) ekspressioon on alla reguleeritud. Kuna joonisel 7 on kollasena nähtav miRNA

nii pluripotentsete kui ka diferentseerunud rakkude lähedal, on tõenäoline, et diferentseerumine ei olnud põhjustatud miRNA transpordist. Rakkude pluripotensuse hindamisel tuleb ka tähele panna, et mitoosi faasis on transkriptsioonifaktorid OCT4 ja NANOG DNA küljest eemaldunud ning paigutuvad tsütoplasmas (joonis 6D, 12) ja seega on nende markerite intensiivsus paljunevate rakkude puhul hajutatud.

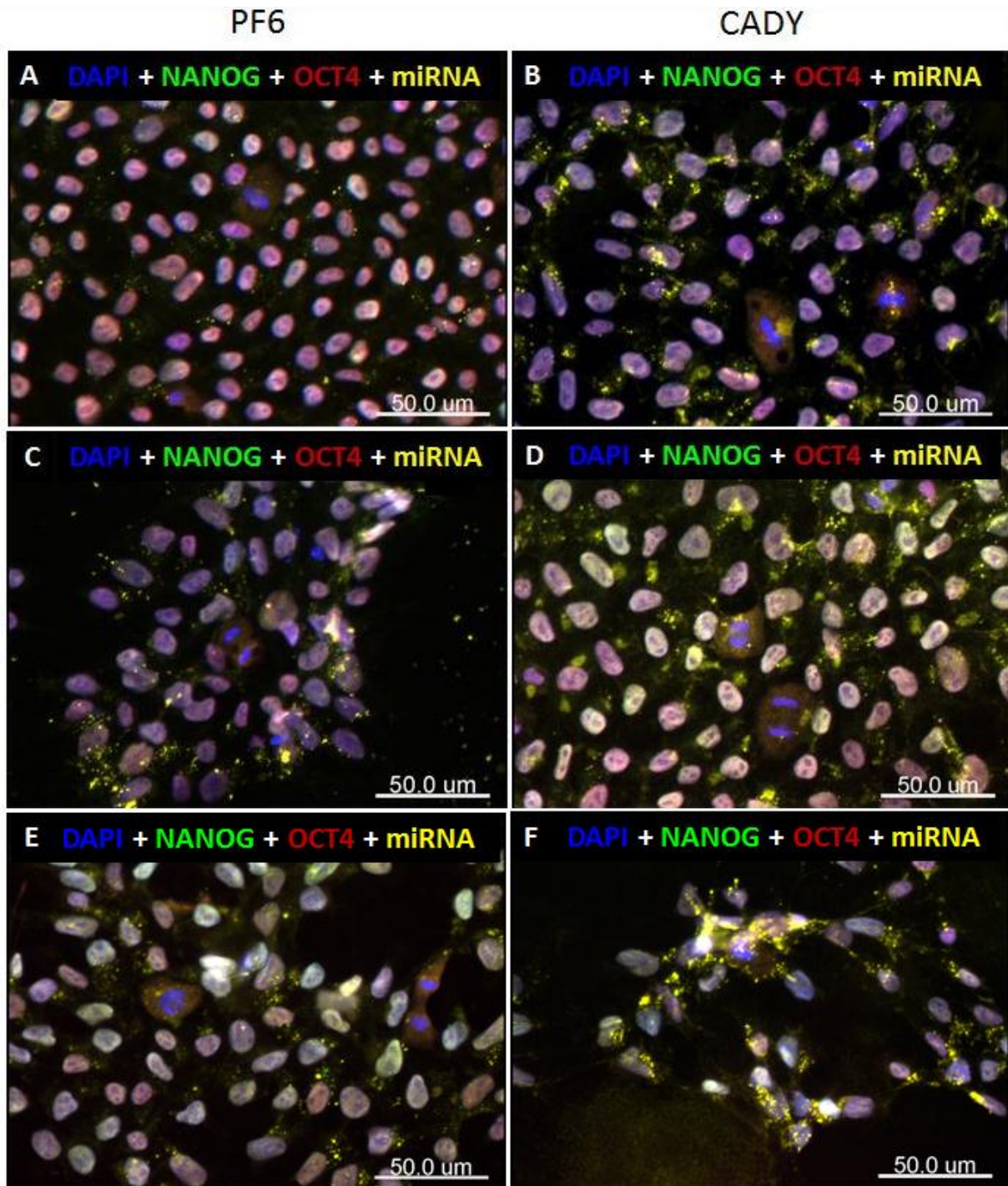


Joonis 6. Pluripotentsusmarkerite ekspressioon transfekteerimata rakkudes. (A) DNA (DAPI) on näha sinisena, (B) NANOG on näha rohelisena, (C) OCT4 on näha punasena. (D) OCT4 ja NANOG transkriptsioonifaktorid on seotud DNA-ga ja seega piltide liitmisel ülekattuvad ning nähtavad valgena. Heterogeensus koloonnias on nähtav rakkude lilla (sinise ja punase ülekattumisel) või tsüaano (sinise ja rohelise ülekattumisel) värvitooniga. DNA on nähtav sinisena ka rakkudes, mis on mitoosi faasis, kus DNA on kondenseerunud ning OCT4 ja NANOG asuvad tsütoplasmas. Piltide tegemiseks on kasutatud IX81 fluorestsentsmikroskoopi.

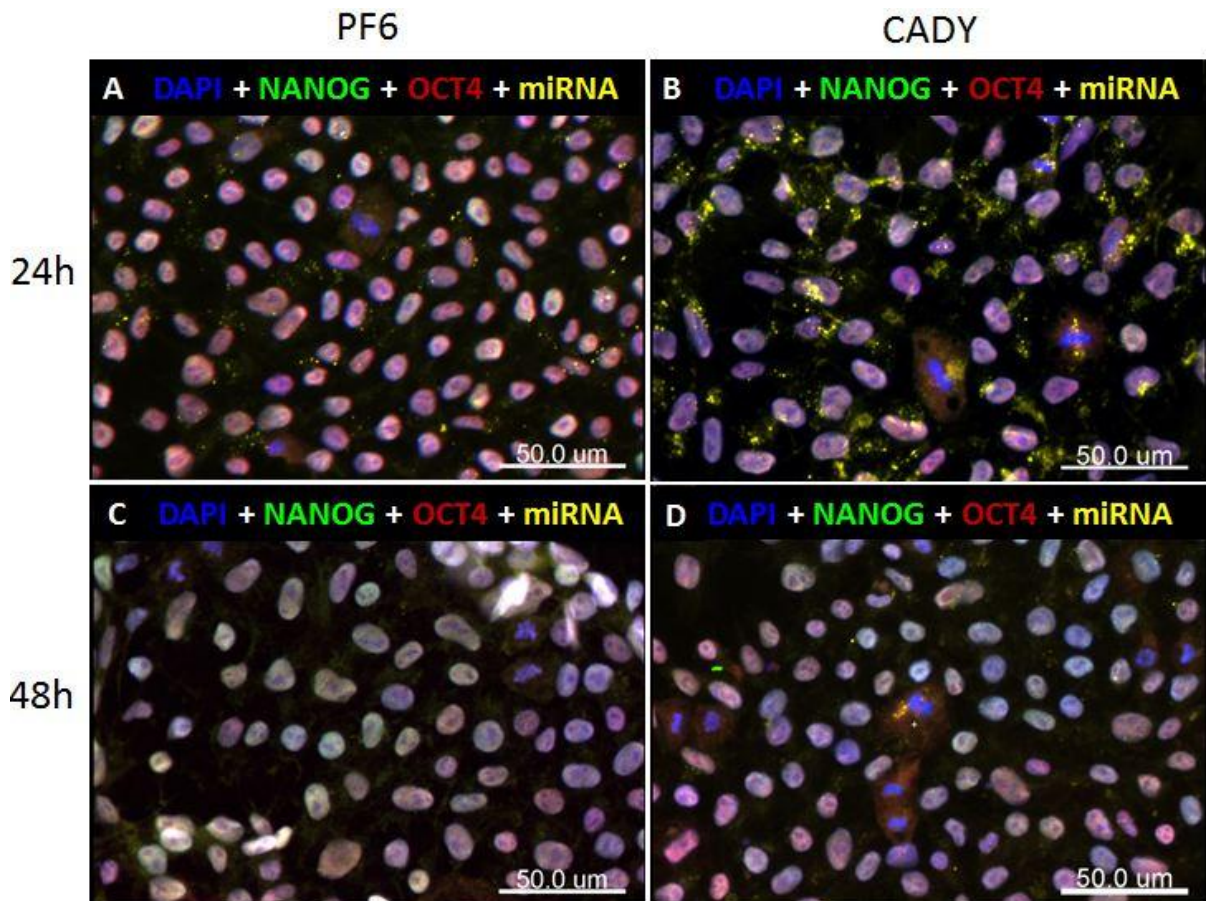


Joonis 7. Spontaanselt diferentseerunud rakud. Joonisel on PF6 abil transfekteeeritud ning üksikrakuliselt ja ROCK inhibiitoriga passeeritud rakkude koloonia, millest suur osa on läinud diferentseeruma. (A) DNA (DAPI) on nähtav sinisena, (B) NANOG on nähtav rohelisena, (C) OCT4 on nähtav punasena, (D) DAPI, NANOG ja OCT4 ülekattuv pilt, kus on näha ka miRNA (kollasena). DNA, OCT4 ja NANOG kattumisel on tuumad nähtavad valgena ning antud rakud on seega pluripotentsed. Sinisena on nähtavad diferentseerunud rakud. Kollasena nähtav miRNA on nii pluripotentsete kui ka diferentseerunud rakkude lähedal ja seega ei ole diferentseerumine põhjustatud miRNA transpordist. Piltide tegemiseks on kasutatud IX81 fluorestsentsmikroskoopi.

Hinnates rakku sisenevate peptiidide ja inimeses funktsiooni mitte omava miRNA mõju hES rakkude pluripotentsustele, on näha, et nii PF6 kui ka CADY peptiidide kasutamisel on rakud säilitanud oma pluripotentsuse ja seda kõigi kolme passeerimismeetodiga (joonis 8). Lisaks on pluripotentsusmarkerite ekspressioon kõrgel tasemel ka 48 tundi pärast transfekteeerimist (joonis 9), mis näitab, et diferentseerumise indutseerimist ei ole toimunud. Antud jooniselt on ka näha, et miRNA hulk rakkudes on 48ndaks tunniks märgatavalt vähenenud. See võib olla tingitud tüvirakkude kiirest paljunemisest või ka miRNA eksotsütoosist. Kuna tavaline fluorestsentsmikroskoop ei võimalda täpselt näha, kas kompleksid on sisenenud rakku või kinnitunud membraanile, kasutati selleks järgnevalt konfokaalmikroskoopi.



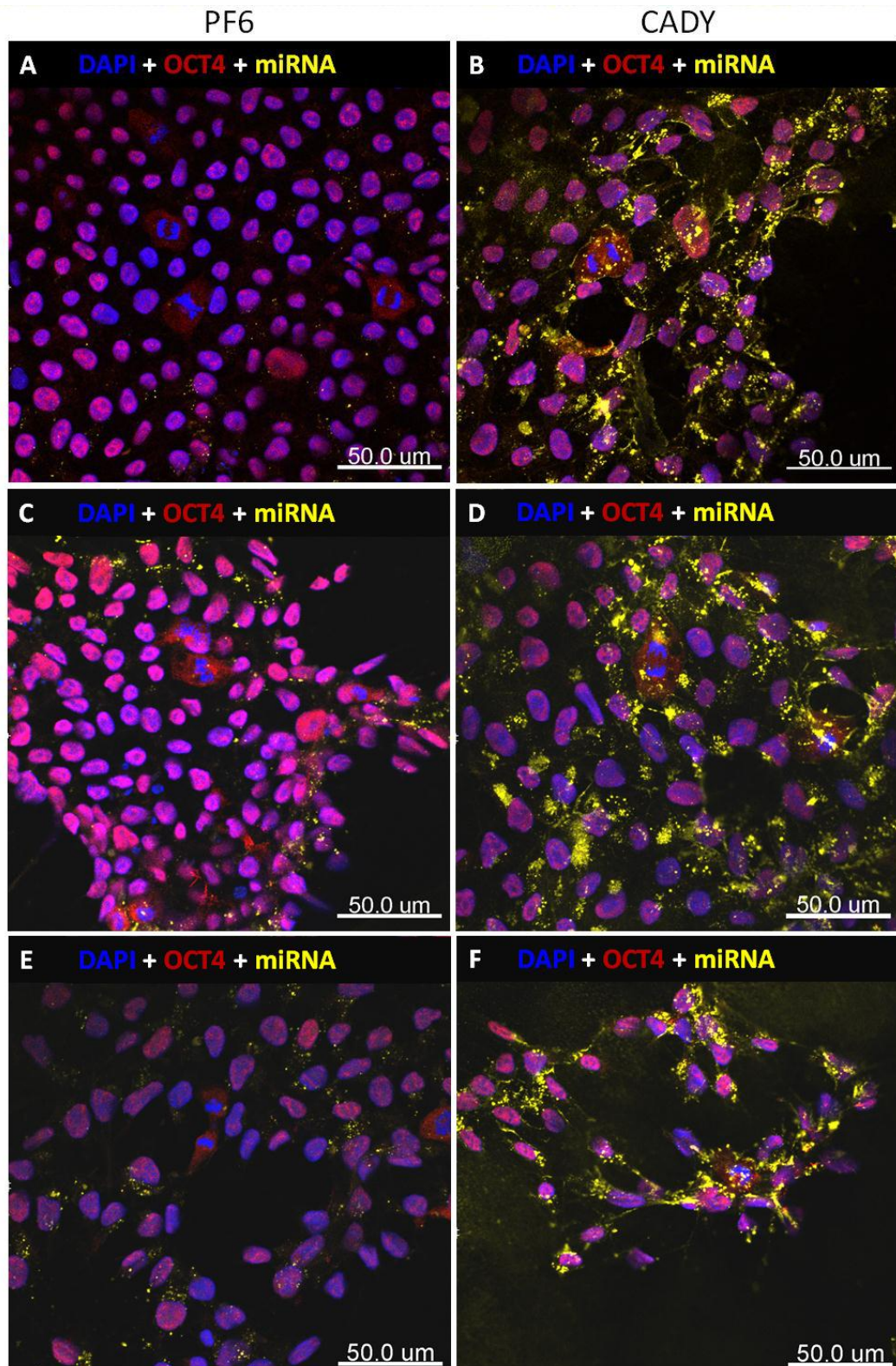
Joonis 8. Pluripotentsusmarkerite detekteerimine transfekteeritud rakkudes. Joonisel on detekteeritud DAPI, NANOG, OCT4 ja miRNA rakkudes, mille transfekteerimiseks miRNA-ga kasutati kas PF6 peptiidi (A, C, E) või CADY peptiidi (B, D, F). (A, B) Koloonia tükkena ja ROCK inhibiitorita passeeritud rakud. (C, D) Koloonia tükkena ja ROCK inhibiitoriga passeeritud rakud. (E, F) Üksikrakuliselt ja ROCK inhibiitoriga passeeritud rakud. Rakud on valdavalt pluripotentsed (valgena) kuid on näha ka heterogeense ekspressiooniga (lilla ja tsüaano värvitooniga) rakke. Intensiivse sinisega on näha mitosis olevate rakkude kondenseerunud DNA. Piltide tegemiseks on kasutatud IX81 fluorestsentsmikroskoopi.



Joonis 9. Pluripotentsusmarkerite ekspressioon 24 ja 48 tundi pärast transfektsiooni. Joonisel on näha DAPI, NANOG, OCT4 ja miRNA detektsiooni koloonia tükkidena ja ROCK inhibiitoriga passeeritud rakkudes, mille transfektsiooniks miRNA-ga oli kasutatud kas PF6 (A, C) või CADY (B, D) peptiidi. Rakud on valdavalt pluripotentsed (valgena) või heterogeense ekspressiooniga (lilla ja tsüaano värvitooniga). Intensiivse sinisega on näha mitosis olevate rakkude kondenseerunud DNA. Piltidelt on näha, et pluripotentsusmarkerite ekspressioon on püsinud ka 48 tundi pärast transfektsiooni. Piltide tegemiseks on kasutatud IX81 fluorestsentsmikroskoopi.

2.3.4 MikroRNA transpordi efektiivsus PF6 ja CADY peptiidiga

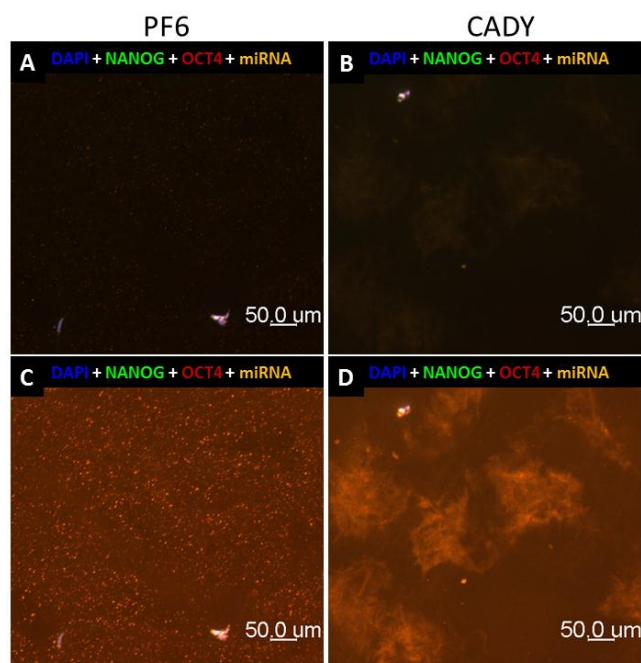
Transfektsiooni efektiivsust hinnati konfokaalmikroskoobiga. Antud meetod võimaldab näha kujutisi kindlal tasapinnal ja seega on miRNA-de asukohta lihtsam tuvastada. Võrreldes PF6 ja CADY efektiivsust miRNA-de transportimisel, on näha, et CADY kasutamisel on miRNA-d rakkude ümbruses märgatavalt rohkem ning seda kõigi kolme passeerimismeetodi puhul (joonis 10). Selle tulemuse põhjal ei saa aga välistada PF6 sobilikkust, kuna funktsionaalse miRNA katse korral ei pruugi nii suur transporditud miRNA kogus olla vajalik või isegi kasulik. Nimelt konkureerib liigne rakkudesse transporditud miRNA endogeense miRNA-ga RISC kompleksi seondumisel, mis võib kaasa tuua mittesihetmärgipäraseid efekte (Nagata jt., 2013). Seega on võimalik, et teatud funktsiooni täimiseks võiks piisata PF6 poolt transporditud miRNA



Joonis 10. Transfektiooni efektiivsuse hindamine konfokaalmikroskoobiga. Joonisel on DAPI, OCT4 ja miRNA detektsiooni pildid rakkudest, mille transfekteerimiseks miRNA-ga oli kasutatud kas PF6 (A, C, E) või CADY peptiidi (B, D, F). (A, B) Koloonia tükkidena ja ROCK inhibiitorita passeeritud rakud. (C, D) Koloonia tükkidena ja ROCK inhibiitoriga passeeritud rakud. (E, F) Üksikrakuliselt ja ROCK inhibiitoriga passeeritud rakud. Piltide võrdlusena on näha, et CADY proovide puhul on miRNA-d rakkude ümbruses märgatavalt rohkem ning seda kõigi kolme passeerimise meetodi puhul. PF6 kasutamisel paikneb miRNA põhiliselt koloonia ääres. Piltide tegemiseks on kasutatud FV1000 konfokaalmikroskoopi.

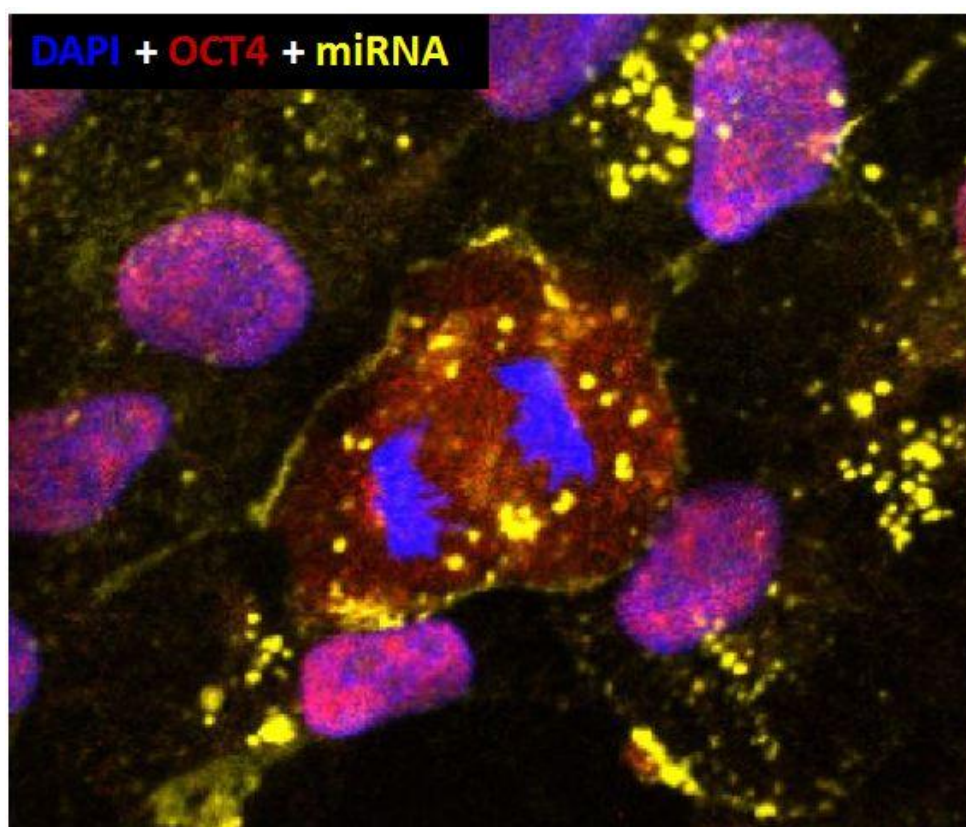
kogusest. Küll aga on näha, et kui koloonia tükkidena passeerimisel pääseb CADY peptiidiga miRNA enamasti kõikide koloonia rakkude lähedale, paikneb miRNA PF6 kasutamisel põhiliselt koloonia äärtes. Seega tuleks transfektiivse efektiivsust arvestades PF6 kasutamisel passeerida rakke üksikrakuliselt. Nagu valgusmikroskoobi piltidelt aga selgus, ei pruugi see meetod rakkude elulemust arvestades PF6 puhul alati sobida. CADY kasutamiseks sobib aga nii koloonia tükkidena (joonis 10B ja 10D) kui ka üksikrakuline passeerimine (joonis 10F) ning nii ROCK inhibiitori kasutamine (joonis 10D) kui ka mitte kasutamine (joonis 10B) Sellisel juhul on koloonia tükkidena passeerimisel mõistlik kasutada pigem ROCK inhibiitorita passeerimist.

Eelnevad tulemused näitavad, et kasutatud peptiidide poolt moodustatud kompleksid erinevad üksteisest märkimisväärselt. Seda iseloomustab hästi ka joonis 11, mis annab ülevaate komplekside seondumisest rakkude kasvupinnale. Nimelt on fluorestsentsmikroskoobiga tehtud ja kunstlikult üleeksponeeritud piltidel näha, et mõningal määral kinnituvad kompleksid matrigeliga kaetud plaadile. Seejuures on erinevus PF6 ja CADY poolt moodustatud mustri osas: PF6 kinnitub täppidena ning CADY pilvi meenutava struktuurina. Kuna normaalintensiivsusel Matrigelile kinni jäänud komplekse praktiliselt näha ei ole, võib järeldada, et suur osa kompleksidest seondub siiski pigem rakkudega.

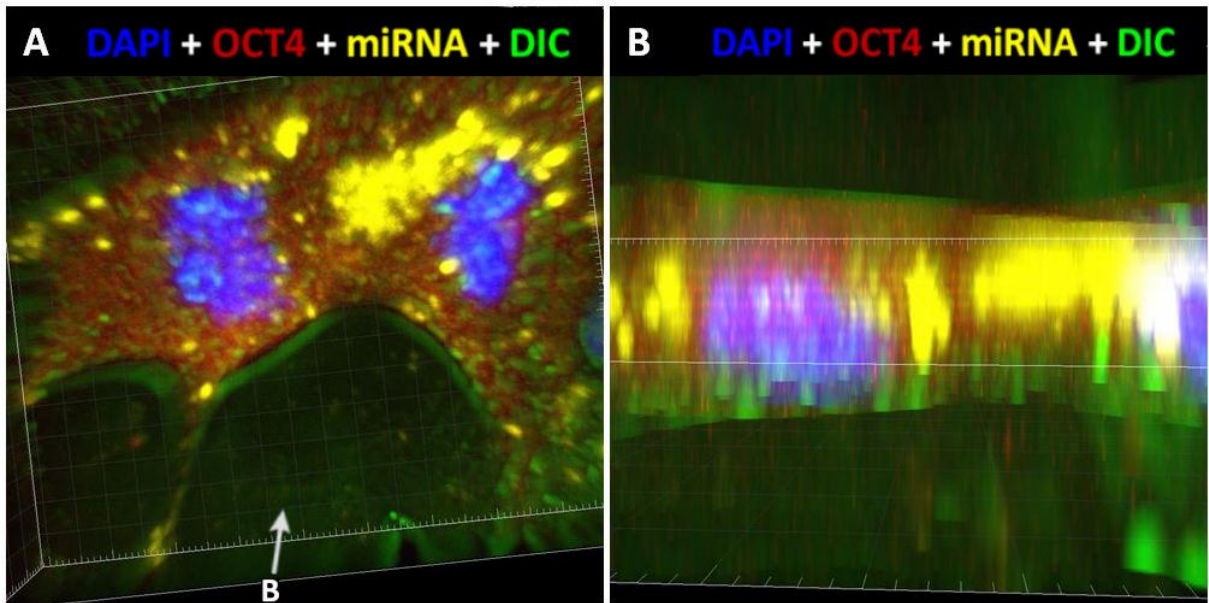


Joonis 11. Rakku sisenevate peptiidide ja miRNA komplekside kleepumine Matrigelile. Joonisel on DAPI, NANOG, OCT4 ja miRNA detektsiooni liidetud pildid alast, kus rakke on väga vähe kinnitunud. (A,C) MikroRNA kompleksid PF6 peptiidiga. (B, D) MikroRNA kompleksid CADY peptiidiga. (A, B) Tavaintensiivsus. (C, D) üleeksponeeritud signaal. Kunstlikult üleeksponeeritud piltidel on näha, et kompleksid on kinnitunud Matrigeliga kaetud plaadile. Seejuures on erinevus PF6 ja CADY poolt moodustatud mustri osas: PF6 kinnitub täppidena ning CADY pilvi meenutava struktuurina.

Kuigi miRNA pääseb rakkude lähedale, ei ole selgelt aru saada, kas see pääseb rakkudesse sisse või kleepub rakkude pinnale. Vaadates suurendatud pilti mitoosis olevast rakust, kus OCT4 (punasena) on detekteeritav ka tsütoplasmas, on näha, et rakku ümbritsevad kollase piirjoonena miRNA kompleksid (joonis 12). Seega on antud kohas miRNA nähtavasti kleepunud raku pinnale. Vaadates aga 3D kujutist mitoosis olevast rakust, on näha, et kollasena nähtavat miRNA-d on võimalik detekteerida ka rakkudes sees (joonis 13A ja 13B). Seega võib antud piltide põhjal järeldada, et miRNA pääseb nii rakkudesse sisse kui ka kleepub rakkude pinnale. Küsimusele, kas sissepääsenud miRNA-d suudavad ka mRNA ekspressiooni piisaval määral muuta, saab vastata aga alles tulevaste funktsionaalsete katsetega.



Joonis 12. Komplekside kleepumine raku pinnale. Jooniselt 10B väljalõigatud ja suurendatud pilt mitoosis olevast rakust. DNA on nähtav sinisena, OCT4 punasena, miRNA kollasena. Pildil on näha OCT4 ekspressiooni tsütoplasmas, mida ümbritsevad kollase piirjoonena raku pinnale kleepunud miRNA kompleksid CADY peptiidiga. Piltide tegemiseks on kasutatud FV1000 konfokaalmikroskoopi.



Joonis 13. MikroRNA paiknemine rakus. 3D pildid mitosis olevast rakust pealtvaates (A) ja kõrvaltvaates (B). DNA on nähtav sinisena, OCT4 punasena, miRNA kollasena rakumembraan (DIC) rohelisena. Joonisel on näha, et kollasena nähtav miRNA on CADY peptiidi abil rakku sisse pääsenud. Piltide tegemiseks on kasutatud FV1000 konfokaalmikroskoopi.

KOKKUVÕTE

Kasvajate tekkimise ohu vältimiseks tüvirakuteraapias on oluline leida meetodeid, kuidas transplantatsiooniks mõeldud hES rakkude arengupotentsiaali vähendada ning neid soovitud rakutüüpide suunas diferentseerida. Üheks võimaluseks võiks olla miRNA regulaatormolekulide kasutamine. Nende transportimiseks rakkudesse oleks vaja aga leida efektiivseid ja turvalisi meetodeid. Antud magistritöös uuriti rakku sisenevate peptiidide kasutamise võimalust ning eksperimentaalselt katsetati selleks kolme erinevat peptiidi: PF6, PF14 ja CADY. Meetodi ohutuse ja efektiivsuse hindamiseks kasutati inimeses funktsiooni mitte omavat fluorestseeruva märgisega miRNA-d. Rakkude elulemust hinnati valgusmikroskoobi abil ning pluripotentsust ja transfektsiooni efektiivsust fluorestsentsmikroskoobi abil. Rakke passeeriti transfekteamiseks kolme erineva meetodiga: koloonia tükkidena ROCK inhibiitorita, koloonia tükkidena ROCK inhibiitoriga ning üksikrakulisena ROCK inhibiitoriga.

Eksperimentaalse töö tulemusena selgus, et kasutatud peptiidid erinesid üksteisest märkimisväärselt nii rakkude elulemuse mõjutamises kui ka miRNA transpordi efektiivsuses. Näiteks täheldati, et PF14 peptiidi kasutamisel oli kõrge toksiline mõju ja seega ei saa seda hES rakkude peal rakendada. Mõnevõrra vähendas rakkude elulemust ka PF6, kuid CADY peptiidi puhul toksilisi mõjutusi ei täheldatud. Ühtlasemad tulemused olid vaid pluripotentsuse kontrollimisel: nii PF6 kui ka CADY kasutamisel säilis pluripotentsusmarkerite OCT4 ja NANOG ekspressioon ja seda nii 24 kui ka 48 tundi pärast transfekteamist. Erinevusi esines veel nende kahe peptiidi miRNA transpordi efektiivsuses. Nimelt suutis CADY võrreldes PF6 peptiidiga miRNA-d rohkem rakkudeni transportida. CADY efektiivsus ei sõltunud ka passeerimistehnikast ja seega oleks selle peptiidi puhul mõistlik passeerida rakke koloonia tükkidena ja ROCK inhibiitorita. PF6 puhul oli aga märgata mõjutusi kasutatud tehnikast. Näiteks paiknes koloonia tükkidena passeerides miRNA suuresti koloonia äärtes. Seega tuleks transfektsiooni efektiivsust arvestades PF6 kasutamisel passeerida rakke pigem üksikrakuliselt. Elulemust arvestades ei pruugi see aga olla sobiv meetod, kuna just üksikrakulisel passeerimisel ROCK inhibiitoriga võis täheldada mõningast toksilist mõju.

Kuigi CADY transportis miRNA-d edukalt rakkude lähedale, on oluline ka jälgida, kas miRNA pääseb rakkudesse sisse või kleepub membraani pinnale. Vaadates lähemalt mitoosis olevaid rakke, kus OCT4 on detekteeritav tsütoplasmas, selgus, et miRNA pääseb arvatavasti nii rakkudesse sisse kui ka kleepub rakkude pinnale. Seega on kasutatud kolmest peptiidist

kõige sobilikum CADY, mis suudab miRNA-d transportida hES rakkudesse, mõjutamata seejuures nende elulemust ja pluripotentsust. Küsimusele, kas sissepääsenud miRNA-d suudavad ka mRNA ekspressiooni piisaval määral muuta, saab vastata aga alles tulevaste funktsionaalsete katsetega.

Application of cell penetrating peptides for miRNA delivery into human embryonic stem cells

Valmar Kasuk

SUMMARY

Human embryonic stem cells (hES cells) are derived from the inner cell mass of the 5-7 days old embryo. They can self-renew and differentiate into any cell type of the human body. The ability to cultivate these cells has given hope to cure any kind of tissue damage. At the same time the huge potential of hES cells has also given them the capacity to form tumors. This has also been one of the biggest obstacles for application of hES cells in regenerative medicine. One solution would be to reduce the potential for development before transplantation through direct differentiation. This could be done using miRNA regulatory molecules. However for miRNA transport, effective and safe methods should be found. The aim of the current master thesis was to apply cell penetrating peptides for miRNA delivery. For this, three different cell penetrating peptides were experimentally tested: PF6, PF14 and CADY. To assess the safety and efficiency of this method, fluorescently labeled miRNA with no function in human was used. Although hES cells are generally passaged mechanically as cell clumps due to low viability when dissociated, single cell passage with ROCK inhibitor was also used for comparison to increase the accessibility of the miRNA. Therefore, for comparison, cells were passaged by three methods: as cell clumps without ROCK inhibitor and as cell clumps or as single cells with ROCK inhibitor.

Experimental work revealed that the used peptides differed considerably in terms of influence on cell viability as well as in miRNA transport efficiency. For example, while PF14 peptide had significant toxic effects and thus can not be used on hES cells, PF6 had only mild effects and CADY didn't have any negative influence on cell viability. When applying new methods on human embryonic stem cells, it is necessary to verify whether the cells are retained in pluripotent state. For this, immunofluorescence microscopy method was used to detect the expression of OCT4 and NANOG pluripotency markers. The results showed that the cells retained pluripotency with CADY and PF6 with all three passaging methods and both 24 and 48 hours after transfection. Difference was again seen from assessing the efficiency of the microRNA transport. Namely, compared to PF6, CADY could deliver miRNA to the cells more efficiently. When comparing the passaging techniques, CADY did not depend on the method used, and therefore it would be wise with this peptide to passage cells as clumps and

without ROCK inhibitor. However, the passaging techniques had noticeable effects with PF6 usage. For example, with cell passaging as cell clumps, the delivered miRNA was located more on the edges of the colony. Therefore, considering the efficacy of transfection it would be wise to passage PF6 cells as single cells. Considering survival of stem cells, however, it may not be a suitable method as the single cell passage with ROCK inhibitor showed some toxic effects with PF6 peptide.

While CADY transported miRNA close to the cells, it is important also to monitor whether miRNA can get in the cells, or sticks to the surface of the membrane. Looking more closely at the cells in mitosis, in which OCT4 is detectable in the cytoplasm, it was found that the miRNA both got in the cells and also adhered to the cell surface. Thus, from the three peptides used, CADY was the most efficient and could be used on hES without loss of their viability and pluripotency. Can the delivered miRNA mediate sufficient downregulation of mRNA expression, however, can be answered only in the future with functional experiments.

TÄNUSÕNAD

Kõige rohkem tahan tänada enda juhendajaid Martin Pooki ja Dmitri Lubenetsi pühendatud aja ja heade nõuannete eest. Soovin tänada ka Annika Treid igapäevase rakkude kasvatamise eest, miRNA projekti liikmeid heade soovitude eest ning ka kõiki rakubioloogia õppetooli inimesi abivalmiduse ning meeldiva seltskonna eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Ambady, S., Malcuit, C., Kashpur, O., Kole, D., Holmes, W.F., Hedblom, E., Page, R.L. and Dominko, T., 2010. Expression of NANOG and NANOGP8 in a variety of undifferentiated and differentiated human cells. *Int J Dev Biol.* 54, 1743-54.
- Ambros, V., 2001. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell.* 107, 823-826.
- Ameres, S. and Zamore, P., 2013. Diversifying microRNA sequence and function. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 14, 475-488.
- Andalousi, S., Lehto, T., Mäger, I., Rosenthal-Aizman, K., Oprea, I., Simonson, O., Sork, H., Ezzat, K., Copolovici, D., Kurrikoff, K., Viola, J., Zaghoul, E., Sillard, R., Johansson, H., Said Hassane, F., Guterstam, P., Suhorutšenko, J., Moreno, P., Oskolkov, N., Hälldin, J., Tedebark, U., Metspalu, A., Lebleu, B., Lehtiö, J., Smith, C. and Langel, U., 2011. Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic acids research.* 39, 3972-3987.
- Atlasi, Y., Mowla, S.J., Ziaee, S.A., Gokhale, P.J. and Andrews, P.W., 2008. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells.* 26, 3068-74.
- Bajpai, R., Lesperance, J., Kim, M. and Terskikh, A.V., 2008. Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev.* 75, 818-27.
- Booth, H.A.F. and Holland, P.W.H., 2004. Eleven daughters of NANOG. *Genomics.* 84, 229-238.
- 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., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R. and Young, R.A., 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 122, 947-56.
- Brafman, D.A., Chang, C.W., Fernandez, A., Willert, K., Varghese, S. and Chien, S., 2010. Long-term human pluripotent stem cell self-renewal on synthetic polymer surfaces. *Biomaterials.* 31, 9135-44.
- Brimble, S.N., Sherrer, E.S., Uhl, E.W., Wang, E., Kelly, S., Merrill, A.H., Jr., Robins, A.J. and Schulz, T.C., 2007. The cell surface glycosphingolipids SSEA-3 and SSEA-4 are not essential for human ESC pluripotency. *Stem Cells.* 25, 54-62.
- Cao, F., Xie, X., Gollan, T., Zhao, L., Narsinh, K., Lee, R. and Wu, J., 2010. Comparison of gene-transfer efficiency in human embryonic stem cells. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging.* 12, 15-24.
- Cenik, E.S. and Zamore, P.D., 2011. Argonaute proteins. *Current Biology.* 21, R446-R449.
- Cheng, J., Zeidan, R., Mishra, S., Liu, A., Pun, S., Kulkarni, R., Jensen, G., Bellocq, N. and Davis, M., 2006. Structure-function correlation of chloroquine and analogues as transgene expression enhancers in nonviral gene delivery. *Journal of medicinal chemistry.* 49, 6522-6531.
- Chong, M.M., Zhang, G., Cheloufi, S., Neubert, T.A., Hannon, G.J. and Littman, D.R., 2010. Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. *Genes Dev.* 24, 1951-60.
- Cobo, F., Stacey, G., Hunt, C., Cabrera, C., Nieto, A., Montes, R., Cortés, J., Catalina, P., Barne, A. and Concha, A., 2005. Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardisation. *Applied microbiology and biotechnology.* 68, 456-466.
- Copolovici, D., Langel, K., Eriste, E. and Langel, U., 2014. Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS nano.* 8, 1972-1994.
- Crombez, L., Aldrian-Herrada, G., Konate, K., Nguyen, Q., McMaster, G., Bresseur, R., Heitz, F. and Divita, G., 2009. A new potent secondary amphipathic cell-penetrating

- peptide for siRNA delivery into mammalian cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 17, 95-103.
- Darr, H., Mayshar, Y. and Benvenisty, N., 2006. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development*. 133, 1193-201.
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G. and Prochiantz, A., 1996. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *The Journal of biological chemistry*. 271, 18188-18193.
- Deshayes, S. and Divita, G., 2013. Peptide-based nanoparticles for delivery of siRNA: "Raspberry flavour". *Chimica Oggi - Chemistry Today*. 31, 4-7.
- Draper, J.S., Pigott, C., Thomson, J.A. and Andrews, P.W., 2002. Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J Anat*. 200, 249-58.
- Eguchi, A., Meade, B., Chang, Y.-C., Fredrickson, C., Willert, K., Puri, N. and Dowdy, S., 2009. Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain- dsRNA binding domain fusion protein. *Nature biotechnology*. 27, 567-571.
- Ellerstrom, C., Hyllner, J. and Strehl, R., 2010. Single cell enzymatic dissociation of human embryonic stem cells: a straightforward, robust, and standardized culture method. *Methods Mol Biol*. 584, 121-34.
- Ender, C., Krek, A., Friedlander, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N. and Meister, G., 2008. A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell*. 32, 519-28.
- Episkopou, V., 2005. SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci*. 28, 219-21.
- Ezzat, K., Andaloussi, S., Zaghoul, E., Lehto, T., Lindberg, S., Moreno, P., Viola, J., Magdy, T., Abdo, R., Guterstam, P., Sillard, R., Hammond, S., Wood, M., Arzumanov, A., Gait, M., Smith, C., Hällbrink, M. and Langel, Ü., 2011. PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic acids research*. 39, 5284-5298.
- Ezzat, K., Zaghoul, E.M., El Andaloussi, S., Lehto, T., El-Sayed, R., Magdy, T., Smith, C.I. and Langel, U., 2012. Solid formulation of cell-penetrating peptide nanocomplexes with siRNA and their stability in simulated gastric conditions. *J Control Release*. 162, 1-8.
- Evans, M.J. and Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292, 154-6.
- Farashahi Yazd, E., Rafiee, M.R., Soleimani, M., Tavallaei, M., Salmani, M.K. and Mowla, S.J., 2011. OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, generates a stable truncated protein with a potential role in stress response. *Cancer Lett*. 309, 170-5.
- Farrera-Sinfreu, J., Giralt, E., Castel, S., Albericio, F. and Royo, M., 2005. Cell-penetrating cis-gamma-amino-l-proline-derived peptides. *Journal of the American Chemical Society*. 127, 9459-9468.
- Fong, C.-Y., Gauthaman, K. and Bongso, A., 2010. Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle. *Journal of Cellular Biochemistry*. 111, 769-781.
- Frankel, A.D. and Pabo, C.O., 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. 55, 1189-1193.
- Friedlander, M.R., Lizano, E., Houben, A.J., Bezdan, D., Banez-Coronel, M., Kudla, G., Mateu-Huertas, E., Kagerbauer, B., Gonzalez, J., Chen, K.C., Leproust, E.M., Marti, E. and Estivill, X., 2014. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biol*. 15, R57.
- Friedman, R., Farh, K., Burge, C. and Bartel, D., 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 19, 92-105.
- Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A., Manor, Y., Chomsky, E., Ben-Yosef, D., Kalma, Y., Viukov, S., Maza, I., Zviran, A., Rais, Y., Shipony, Z., Mukamel, Z., Krupalnik, V., Zerbib, M., Geula, S., Caspi, I., Schneir, D., Shwartz, T., Gilad, S., Amann-

- Zalcenstein, D., Benjamin, S., Amit, I., Tanay, A., Massarwa, R., Novershtern, N. and Hanna, J., 2013. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*. 504, 282-286.
- Ginis, I., Luo, Y., Miura, T., Thies, S., Brandenberger, R., Gerecht-Nir, S., Amit, M., Hoke, A., Carpenter, M.K., Itskovitz-Eldor, J. and Rao, M.S., 2004. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*. 269, 360-80.
- Green, M. and Loewenstein, P.M., 1988. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*. 55, 1179-1188.
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. and Shiekhattar, R., 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 432, 235-40.
- Guo, W.T., Wang, X.W. and Wang, Y., 2014. Micro-management of pluripotent stem cells. *Protein Cell*. 5, 36-47.
- Guterstam, P., Madani, F., Hirose, H., Takeuchi, T., Futaki, S., El Andaloussi, S., Gräslund, A. and Langel, U., 2009. Elucidating cell-penetrating peptide mechanisms of action for membrane interaction, cellular uptake, and translocation utilizing the hydrophobic counter-anion pyrenebutyrate. *Biochimica et biophysica acta*. 1788, 2509-2517.
- Heitz, F., Morris, M. and Divita, G., 2009. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British journal of pharmacology*. 157, 195-206.
- Helmfors, H., 2012. Recent developments in applications of cell-penetrating peptides - Uptake mechanisms and oligonucleotide delivery. *Chemistry Today*. 30, 10-13.
- Hutvagner, G. and Zamore, P.D., 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 297, 2056-60.
- Jiao, C.-Y., Delaroche, D., Burlina, F., Alves, I., Chassaing, G. and Sagan, S., 2009. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *The Journal of biological chemistry*. 284, 33957-33965.
- Joshi, S., McLendon, J., Comer, B. and Gerthoffer, W., 2011. MicroRNAs-control of essential genes: Implications for pulmonary vascular disease. *Pulmonary circulation*. 1, 357-364.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S., Kung, A., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D. and Rajewsky, K., 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes & development*. 19, 489-501.
- Kibbey, M.C., 1994. Maintenance of the EHS sarcoma and Matrigel preparation. *Methods in Cell Science*. 16, 227-230.
- Konate, K., Crombez, L., Deshayes, S., Decaffmeyer, M., Thomas, A., Brasseur, R., Aldrian, G., Heitz, F. and Divita, G., 2010. Insight into the cellular uptake mechanism of a secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery. *Biochemistry*. 49, 3393-3402.
- Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S., 2011. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 39, D152-7.
- Krawetz, R.J., Li, X. and Rancourt, D.E., 2009. Human embryonic stem cells: caught between a ROCK inhibitor and a hard place. *Bioessays*. 31, 336-43.
- Kurosawa, H., 2007. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng*. 103, 389-98.
- Kwon, Y., Oh, S., Kim, H., Ku, S.-Y., Kim, S., Choi, Y. and Moon, S., 2005. Cellular manipulation of human embryonic stem cells by TAT-PDX1 protein transduction. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 12, 28-32.
- Lee, R., Feinbaum, R. and Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75, 843-854.

- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S. and Kim, V., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 425, 415-419.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S. and Kim, V., 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*. 21, 4663-4670.
- Lewis, B.P., Burge, C.B. and Bartel, D.P., 2005. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell*. 120, 15-20.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Burge, C.B., 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 115, 787-98.
- Liang, Q.L., Mo, Z., Li, X.F., Wang, X.X. and Li, R.M., 2013. Pdx1 protein induces human embryonic stem cells into the pancreatic endocrine lineage. *Cell Biol Int*. 37, 2-10.
- Lin, S.L., Chang, D.C., Lin, C.H., Ying, S.Y., Leu, D. and Wu, D.T., 2011. Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res*. 39, 1054-65.
- Lu, J., Hou, R., Booth, C., Yang, S.-H. and Snyder, M., 2006. Defined culture conditions of human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103, 5688-5693.
- Macias, S., Plass, M., Stajuda, A., Michlewski, G., Eyras, E. and Caceres, J.F., 2012. DGCR8 HITS-CLIP reveals novel functions for the Microprocessor. *Nat Struct Mol Biol*. 19, 760-6.
- Mack, G.S., 2007. MicroRNA gets down to business. *Nat Biotechnol*. 25, 631-8.
- Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., Calabrese, J.M., Dennis, L.M., Volkert, T.L., Gupta, S., Love, J., Hannett, N., Sharp, P.A., Bartel, D.P., Jaenisch, R. and Young, R.A., 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*. 134, 521-33.
- Martin, M., Muotri, A., Gage, F. and Varki, A., 2005. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature medicine*. 11, 228-232.
- Melkounian, Z., Weber, J.L., Weber, D.M., Fadeev, A.G., Zhou, Y., Dolley-Sonneville, P., Yang, J., Qiu, L., Priest, C.A., Shogbon, C., Martin, A.W., Nelson, J., West, P., Beltzer, J.P., Pal, S. and Brandenberger, R., 2010. Synthetic peptide-acrylate surfaces for long-term self-renewal and cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*. 28, 606-610.
- Mitchell, D., Kim, D., Steinman, L., Fathman, C. and Rothbard, J., 2000. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society*. 56, 318-325.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. and Yamanaka, S., 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 113, 631-42.
- Mäe, M., El Andaloussi, S., Lundin, P., Oskolkov, N., Johansson, H., Guterstam, P. and Langel, U., 2009. A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 134, 221-227.
- Nagata, Y., Shimizu, E., Hibio, N. and Ui-Tei, K., 2013. Fluctuation of Global Gene Expression by Endogenous miRNA Response to the Introduction of an Exogenous miRNA. *Int J Mol Sci*. 14, 11171-89.
- Nichols, J. and Smith, A., 2009. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*. 4, 487-92.
- Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschen, E., Melzig, M. and Bienert, M., 1998. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide

- with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochimica et biophysica acta*. 1414, 127-139.
- Pei, D., 2008. Regulation of Pluripotency and Reprogramming by Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry*. 284, 3365-3369.
- Polak, J.M., 2008. *Advances in tissue engineering*. Imperial College Press.
- Pooga, M., Hallbrink, M., Zorko, M. and Langel, U., 1998. Cell penetration by transportan. *Faseb j*. 12, 67-77.
- Przyborski, S., 2005. Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 23, 1242-1250.
- Ramsay, E. and Gumbleton, M., 2002. Polylysine and polyornithine gene transfer complexes: a study of complex stability and cellular uptake as a basis for their differential in-vitro transfection efficiency. *Journal of drug targeting*. 10, 1-9.
- Richards, M., Fong, C.Y., Chan, W.K., Wong, P.C. and Bongso, A., 2002. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 20, 933-6.
- Rittner, K., Benavente, A., Bompard-Sorlet, A., Heitz, F., Divita, G., Brasseur, R. and Jacobs, E., 2002. New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 5, 104-114.
- Rodriguez, R.T., Velkey, J.M., Lutzko, C., Seerke, R., Kohn, D.B., O'Shea, K.S. and Firpo, M.T., 2007. Manipulation of OCT4 levels in human embryonic stem cells results in induction of differential cell types. *Exp Biol Med (Maywood)*. 232, 1368-80.
- Rydström, A., Deshayes, S., Konate, K., Crombez, L., Padari, K., Boukhaddaoui, H., Aldrian, G., Pooga, M. and Divita, G., 2011. Direct translocation as major cellular uptake for CADY self-assembling peptide-based nanoparticles. *PloS one*. 6.
- Schwarze, S., Hruska, K. and Dowdy, S., 2000. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends in cell biology*. 10, 290-295.
- Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hällbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R. and Langel, U., 2000. Deletion analogues of transportan. *Biochimica et biophysica acta*. 1467, 165-176.
- Suh, J.S., Lee, J.Y., Choi, Y.S., Chong, P.C. and Park, Y.J., 2013. Peptide-mediated intracellular delivery of miRNA-29b for osteogenic stem cell differentiation. *Biomaterials*. 34, 4347-4359.
- Zaehres, H., Lensch, M.W., Daheron, L., Stewart, S.A., Itskovitz-Eldor, J. and Daley, G.Q., 2005. High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 23, 299-305.
- Tecirlioglu, R.T., Nguyen, L., Koh, K., Trounson, A.O. and Michalska, A.E., 2010. Derivation and maintenance of human embryonic stem cell line on human adult skin fibroblast feeder cells in serum replacement medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 46, 231-235.
- Tezgel, A.O., Telfer, J.C. and Tew, G.N., 2011. De novo designed protein transduction domain mimics from simple synthetic polymers. *Biomacromolecules*. 12, 3078-83.
- Thomas, C., Ehrhardt, A. and Kay, M., 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature reviews. Genetics*. 4, 346-358.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S. and Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282, 1145-7.
- Tsai, Z.Y., Singh, S., Yu, S.L., Chou, C.H. and Li, S.S., 2010. A feeder-free culture using autogeneic conditioned medium for undifferentiated growth of human embryonic stem cells: comparative expression profiles of mRNAs, microRNAs and proteins among different feeders and conditioned media. *BMC Cell Biol*. 11, 76.

- Tsutsui, H., Valamehr, B., Hindoyan, A., Qiao, R., Ding, X., Guo, S., Witte, O., Liu, X., Ho, C.-M. and Wu, H., 2011. An optimized small molecule inhibitor cocktail supports long-term maintenance of human embryonic stem cells. *Nature communications*. 2, 167.
- Walrant, A., Bechara, C., Alves, I. and Sagan, S., 2012. Molecular partners for interaction and cell internalization of cell-penetrating peptides: how identical are they? *Nanomedicine (London, England)*. 7, 133-143.
- Van de Velde, H., Cauffman, G., Tournaye, H., Devroey, P. and Liebaers, I., 2008. The four blastomeres of a 4-cell stage human embryo are able to develop individually into blastocysts with inner cell mass and trophectoderm. *Hum Reprod*. 23, 1742-7.
- Wang, J., Lu, Z., Wientjes, M.G. and Au, J.L., 2010. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. *Aaps j*. 12, 492-503.
- Wang, X., 2014. Composition of seed sequence is a major determinant of microRNA targeting patterns. *Bioinformatics*.
- Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R. and Blelloch, R., 2007. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*. 39, 380-5.
- Ware, C., Nelson, A., Mechem, B., Hesson, J., Zhou, W., Jonlin, E., Jimenez-Caliani, A., Deng, X., Cavanaugh, C., Cook, S., Tesar, P., Okada, J., Margaretha, L., Sperber, H., Choi, M., Blau, C., Treuting, P., Hawkins, R., Cirulli, V. and Ruohola-Baker, H., 2014. Derivation of naive human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111, 4484-4489.
- Vivès, E., Brodin, P. and Lebleu, B., 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *The Journal of biological chemistry*. 272, 16010-16017.
- Wolf, E., Kramer, R., Polejaeva, I., Thoenen, H. and Brem, G., 1994. Efficient generation of chimaeric mice using embryonic stem cells after long-term culture in the presence of ciliary neurotrophic factor. *Transgenic Res*. 3, 152-8.
- Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D. and Carpenter, M.K., 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 19, 971-4.
- Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J.A. and Kosik, K.S., 2009. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*. 137, 647-58.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. and Cullen, B., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*. 17, 3011-3016.

KASUTATUD BAKALAUREUSETÖÖ

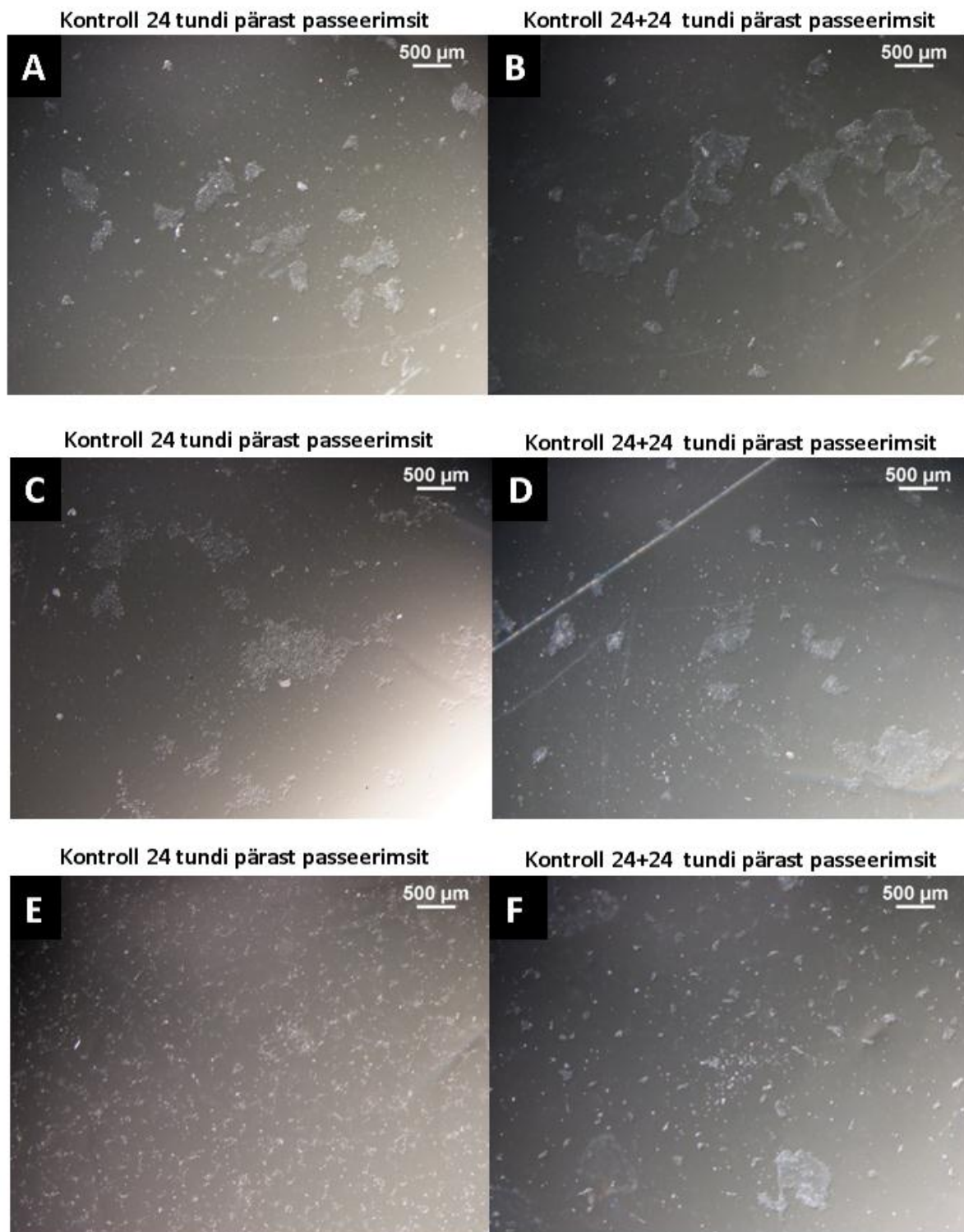
Kasuk, V., 2011. Inimese embrüonaalsete tüvirakkude passeerimise optimeerimine transfektsiooniks siRNA-ga. Rakubioloogia õppetool, Molekulaar- ja rakubioloogia instituut, Tartu, Eesti.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

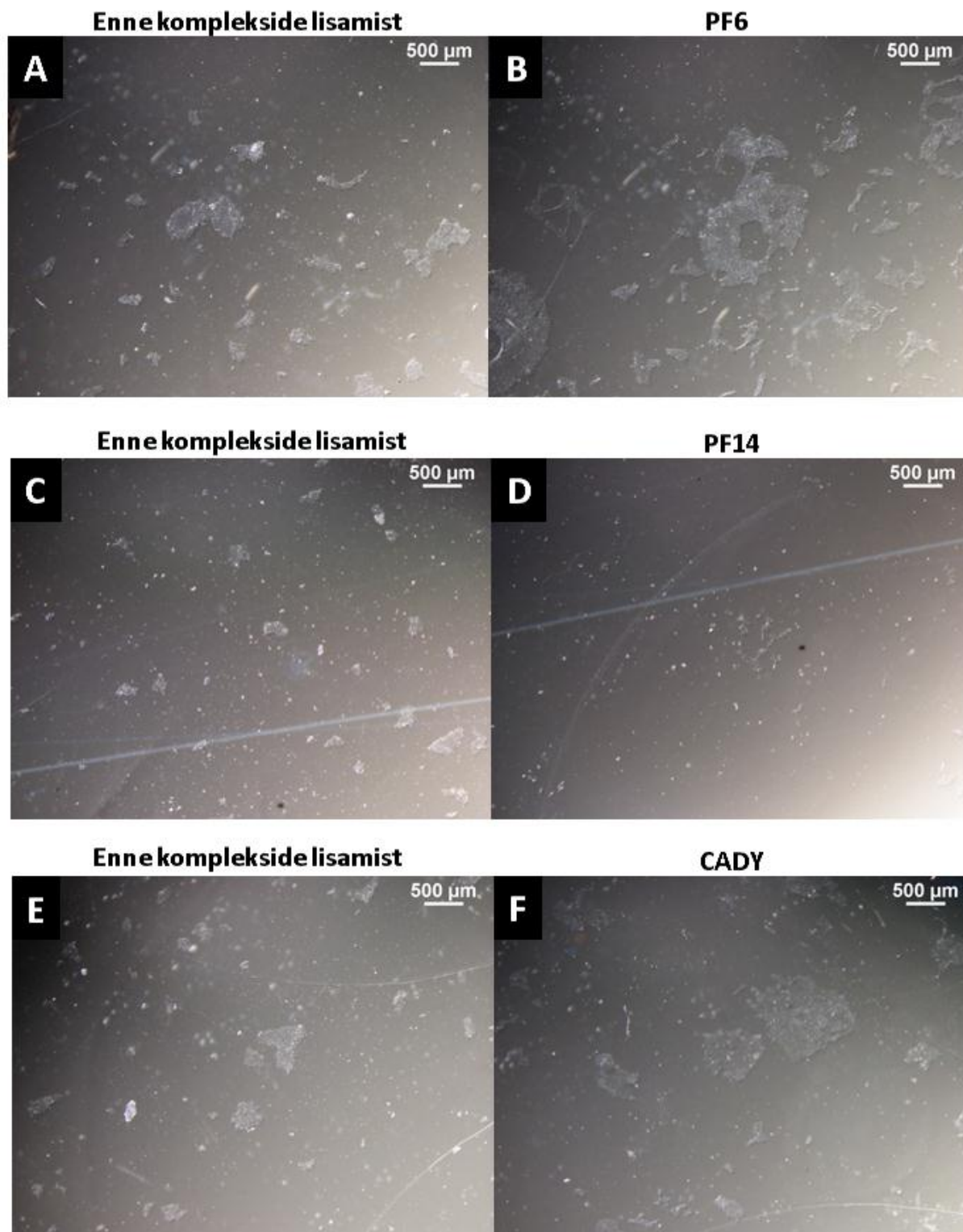
MiRBase andmebaas. [ftp://mirbase.org/pub/mirbase/CURRENT/README](http://mirbase.org/pub/mirbase/CURRENT/README) (25.05.14)

LISAD

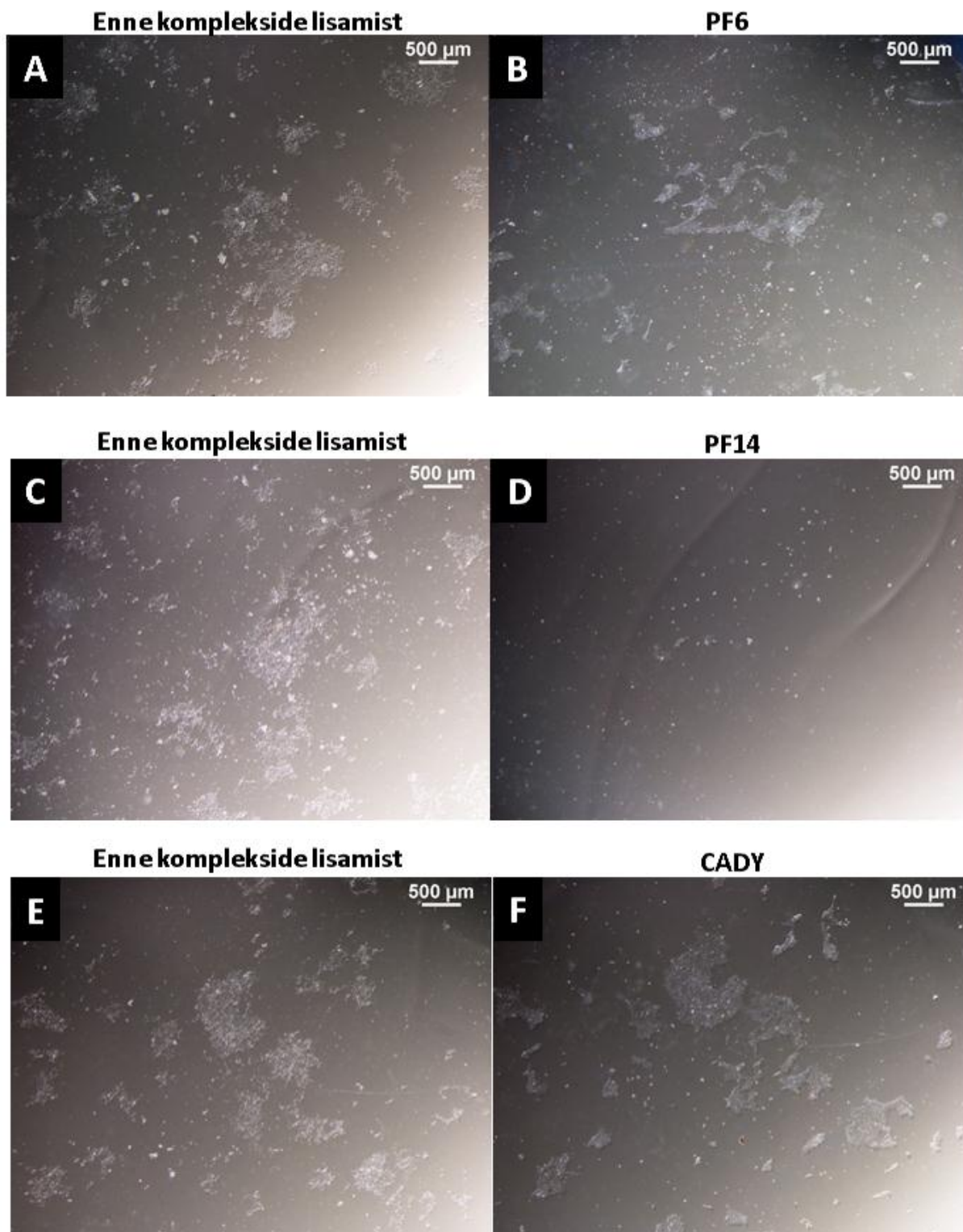
Lisa 1



Joonis 14. Kolme erineva meetodiga passeeritud transfekteeerimata rakud. Joonisel on kontrollrakud 24 tundi pärast passeerimist (mil põhikatsetel lisati kompleksid) (A, C, E) ning 24+24 tundi pärast passeerimist (mil põhikatsetel hinnati komplekside mõju) (B, D, F). (A, B) Koloonia tükkidena ja ROCK inhibiitorita passeeritud rakud. (C, D) Koloonia tükkidena ja ROCK inhibiitoriga passeeritud rakud. (E, F) Üksikrakuliselt ja ROCK inhibiitoriga passeeritud rakud.

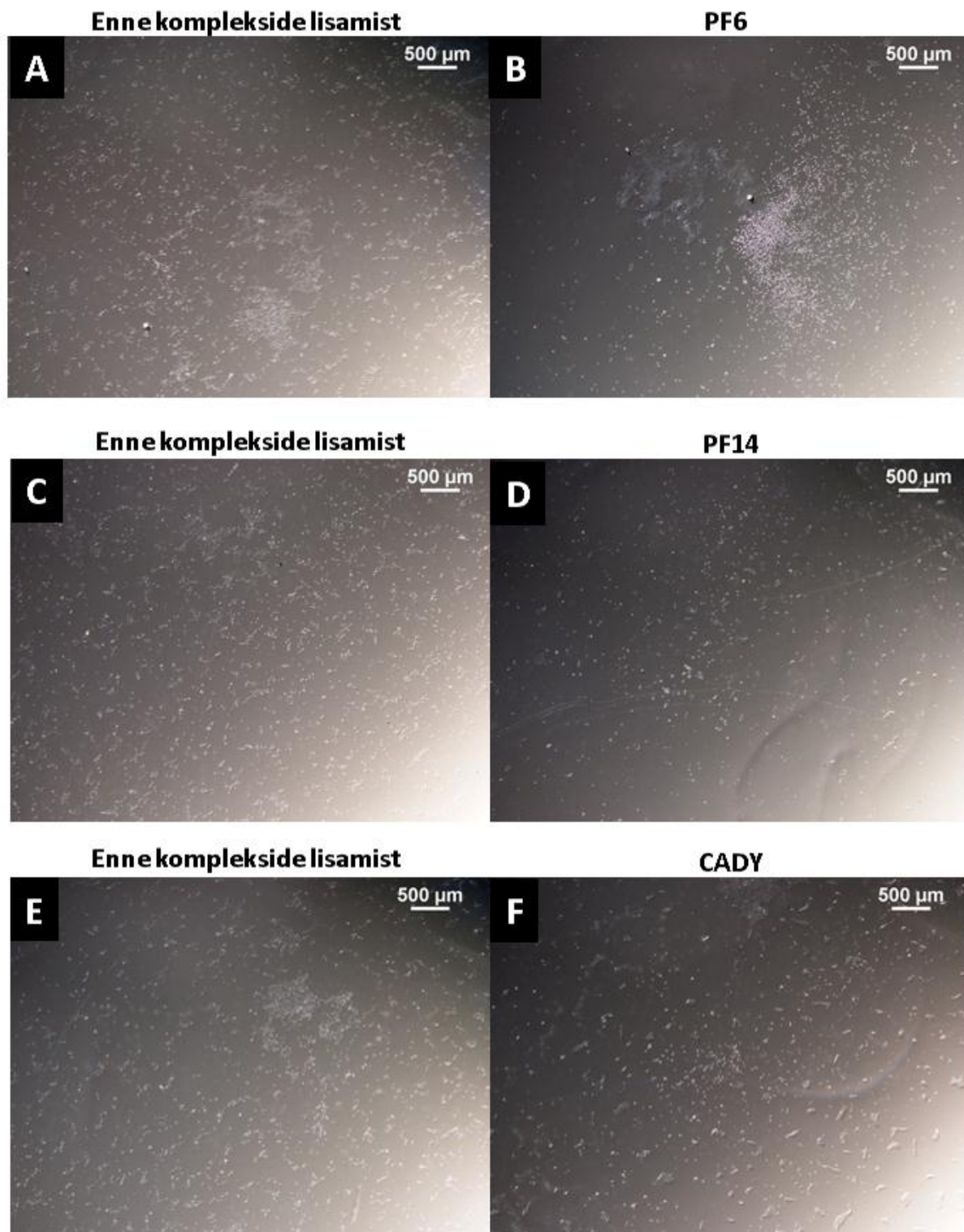


Joonis 15. Komplekside mõju koloonia tükkidena ja ROCK inhibiitorita passeeritud rakkudele. Joonisel on rakud vahetult enne komplekside lisamist (A, C, E) ning 24 tundi pärast miRNA ja vastavate raku sisenevate peptiidide lisamist: (B) PF6, (D) PF14, (F) CADY. PF14 on mõjunud toksiliselt ning rakkude arv plaadil on märgatavalt vähenenud.

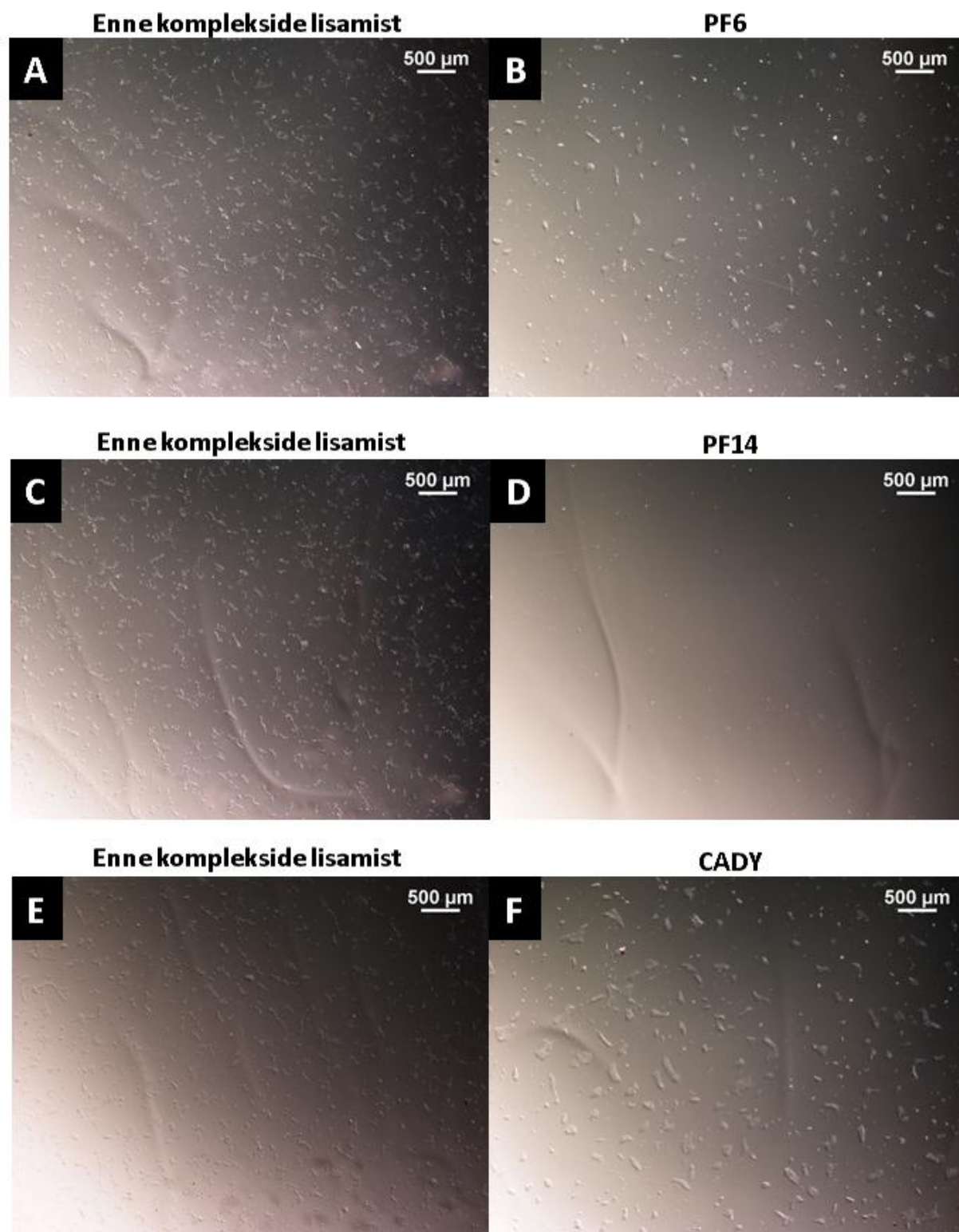


Joonis 16. Komplekside mõju koloonia tükkidena ja ROCK inhibiitoriga passeeritud rakkudele. Joonisel on rakud vahetult enne komplekside lisamist (A, C, E) ning 24 tundi pärast miRNA ja vastavate rakku sisenevate peptiidide lisamist: (B) PF6, (D) PF14, (F) CADY. PF14 on mõjunud toksiliselt ning rakkude arv plaadil on märgatavalt vähenenud. Mõningal määral on vähenenud ka rakkude arv PF6 kasutamisel.

Lisa 4



Joonis 17. Komplekside mõju üksikrakuliselt passeeritud ja ROCK inhibiitoriga inkubeeritud rakkudele (katse 2). Joonisel on rakud vahetult enne komplekside lisamist (A, C, E) ning 24 tundi pärast miRNA ja vastavate rakku sisenevate peptiidide lisamist: (B) PF6, (D) PF14, (F) CADY. PF6 ja PF14 on mõjunud toksiliselt ning rakkude arv plaadil on märgatavalt vähenenud.



Joonis 18. Komplekside mõju üksikrakuliselt passeeritud ja ROCK inhibiitoriga inkubeeritud rakkudele (katse 1). Joonisel on rakud enne komplekside lisamist (A, C, D) ning 24 tundi pärast miRNA ja vastavate raku sisenevate peptiidide lisamist: (B) PF6, (D) PF14, (F) CADY. PF14 on mõjunud toksiliselt ning rakkude arv plaadil on märgatavalt vähenenud. Mõningal määral on vähenenud ka rakkude arv PF6 kasutamisel.



Joonis 19. PF6 mõju üksirakuliselt passeeritud ja ROCK inhibiitoriga inkubeeritud rakkudele. Pildil on näha rakud 24 tundi pärast miRNA ja PF6 peptiidi lisamist. Tegemist on lisa 3B pildi suurendusega, millel on paremini näha PF6 toksilisel mõjul plaadilt lahti lasknud ja surnud rakke.



Joonis 20. PF14 mõju üksirakuliselt passeeritud ja ROCK inhibiitoriga inkubeeritud rakkudele. Pildil on näha rakud 24 tundi pärast miRNA ja PF14 peptiidi lisamist. Tegemist on lisa 3D pildi suurendusega, millel on paremini näha mõningate rakuklompide olemasolu plaadil vaatamata PF14 toksilisele mõjule.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Valmar Kasuk,

(autori nimi)

(sünnikuupäev: 05.01.1988)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Penetreeruvate peptiidide rakendatavus miRNA transpordiks inimese embrüonaalsetesse tüvirakkudesse,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on Martin Pook ja Dmitri Lubenets,

(juhendajate nimed)

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

üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 05.26.2015 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, 26.05.2014 *(kuupäev)*