



UPPSALA
UNIVERSITET

Vilken roll har miR-302 i humana
embryonala och inducerade pluripotenta
stamceller?

Stefan Bublic

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2017
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Vilken roll har miR-302 i humana embryonala och inducerade pluripotenta stamceller?

Stefan Public

Självständigt arbete i biologi 2017

Sammandrag

MikroRNA (miRNA) är små icke-kodande transkript som reglerar mRNA på posttranskriptionell nivå. De är vanligtvis negativa regulatorer av genuttrycket. En genklunga, miR-302/367, har visat sig uttrycka åtta olika miRNA speciellt i humana embryonala stamceller (hESC) och i inducerade pluripotenta stamceller (iPSC). hESC har förmågan att självförnyas samt att genomgå ett obegränsat antal celldelningar och differentieras till de tre groddbladen. Däremot så är iPSC somatiska celler som har omprogrammerats till stamceller genom en process som kallas dedifferentiering. Transkriptionsfaktorerna Oct3/4, Sox2, Nanog och Rex1 är regulatorer av miR-302/367 promotorn och är nödvändiga för bibehållandet av pluripotensen under embryogenesen. miR-302 ökar nivåerna av transforming growth factor beta (TGF- β) signaleringen genom att inhibera uttrycket av *Lefty1* och *Lefty2* som fungerar som inhibitorer av denna signalering. Detta i sin tur gynnar bildningen av mesoendodermet i hESC. Dessutom så reglerar miR-302 positivt bone morphogenetic protein (BMP) signaleringen vilket resulterar i cellernas förmåga att bibehålla pluripotensen samt att inhibera neurala induceringen. miR-302 reglerar också cellcykeln och apoptosen. Det är en negativ regulator av cellcykels G1 fas och gynnar övergången till S fasen och genom att förhindra transkriptionen av BNIP3L/Nix kan miR-302 negativt reglera apoptosen. Omprogrammeringen av somatiska celler till iPSCs kräver globala epigenetiska förändringar, såsom DNA-metylering och histonmetylering. Genom dessa förändringar gynnas aktiveringen av olika transkriptionsfaktorer som Oct3/4, Sox2 och Nanog. De stimulerar uttrycket av miR-302 och gynnar bibehållandet av pluripotensen samt är essentiella faktorer för omprogrammeringen av somatiska celler till iPSC. Den här uppsatsen fokuserar på vilken roll miR-302 har i hESC och i iPSC, samt hur det påverkar deras pluripotens och omprogrammering.

Inledning

Den mänskliga kroppen består av tusentals olika celler som utgör funktionella och strukturella enheter med varierande uppgifter. James Thomson och kollegor lyckades 1998 för första gången isolera humana embryonala stamceller (hESC) från den inre cellmassan (ICM) av den humana blastocysten. Deras forskning var ett stort steg för regenerativ medicin och läkemedelsscreening eftersom embryonala stamceller (ESC) utgör ett lovande verktyg som obegränsad källa för både klinisk och bioteknologisk forskning (Suh *et al.* 2004, Wade *et al.* 2015). Humana embryonala stamceller har två egenskaper som skiljer dem åt från andra celler; de är pluripotenta och de kan självförnyas. Dessa karaktärsdrag gör de möjligt för humana embryonala stamceller att odlas i odifferentierat tillstånd och ge upphov till alla differentierade celler och vävnader av de tre groddbladen (Ren *et al.* 2009).

Ytterligare en celltyp med många likheter med embryonala stamceller, som anses som en obegränsad cellkälla för regenerativ medicin, kallas för inducerade pluripotenta celler (iPSC)

(Hu *et al.* 2013). Inducerade pluripotenta celler induceras från somatiska celler genom ett påtvingat överuttryck av vissa transkriptionsfaktorer (TF) (Wilson *et al.* 2009). Dessa transkriptionsfaktorer har en essentiell roll i etableringen samt underhållet av det pluripotenta stadiet samt regleringen av uttrycket av vissa gener (Suh *et al.* 2004).

MikroRNA (miRNA) är små, 19-25 nukleotider långa, icke-kodande transkript som reglerar mRNA på posttranskriptionell nivå (Ren *et al.* 2009). miRNA är produkter av RNA polymeras II och binder genom basparning till 3' icke translaterade regionen (3'UTR) av mRNA:t och inhiberar på det sättet genuttrycket (Wade *et al.* 2015). miRNA sekvenser är konserverade mellan arter och 90 % av det nuvarande sekvenserade humana miRNA:t är identiska med möss (Lakshminpathy *et al.* 2007). På grund av deras förmåga att reglera flera gener samtidigt anses miRNA som bästa kandidater för att reglera förnyelsen och differentieringen av humana embryonala stamceller och omprogrammeringen av somatiska celler (Wade *et al.* 2015). De senaste studierna har visat att bland dessa miRNA är det miR-302 som uttrycks i höga nivåer i humana embryonala celler, och överuttrycket av miR-302 klungan kan reglera dessa processer (Suh *et al.* 2004). Bland processerna som miR-302 reglerar i humana embryonala stamceller är cellcykel- och apoptosvägar samt olika kromatinmodifierare som påverkar signaleringsvägar vilka är nödvändiga för normal utveckling av groddbladen (Wade *et al.* 2015).

Rollen som miR-302 har i regleringen av pluripotensen och differentieringen under cellulära programmeringen har upptäckts nyligen. Därför tycker jag att det är viktigt att presentera och förstå de mekanismer genom vilka miR-302 påverkar stamceller och deras förmågor. Syftet med den här uppsatsen är att undersöka i detalj hur miR-302 reglerar humana embryonala stamcellers differentiering samt hur miR-302 påverkar inducerade pluripotenta celler. Embryonala stamceller är väldigt viktiga för behandlingen av olika sjukdomar som bland annat Parkinsons, diabetes och ryggmärgsskador men alla mekanismer genom vilka miR-302 reglerar förnyelsen samt pluripotensen av dessa celler är inte helt klargjorda.

Stamceller

Ernest McCulloch och James Till publicerade 1961 deras studie om benmärgsceller som utgjorde grunden till forskning kring humana stamceller. Stamceller är odifferentierade celler som kan genomgå flera celldelningar samt differentiera till olika celltyper. Totipotenta celler som kommer från sammansmältningen av ägg- och spermieceller ger upphov till pluripotenta celler. Pluripotenta celler i sin tur kan bibehålla sin identitet genom självförnyelse och differentiera till alla andra celltyper (Greer Card *et al.* 2008). Två typer av pluripotenta celler interagerar med miRNA, embryonala stamceller och inducerade pluripotenta celler. Den inre cellmassan ger upphov till embryonala stamceller under däggdjurets blastocyst embryonala stadie medan somatiska celler gynnar bildning av inducerade stamceller (Greer Card *et al.* 2008, Hu *et al.* 2013).

Transkriptionsfaktorer som uttrycks under den embryonala utvecklingen har en avgörande roll i regleringsprocesser för cellens självförnyelse samt differentieringen (Hu *et al.* 2013). Den första faktorn, Oct4, uttrycks i blastocysten och undertrycker differentieringen i inre cellmassan. Den andra faktorn, Sox2, binder till Oct4 och tillsammans aktiverar de gener som behövs för tidig utveckling. Den sista faktorn, Nanog, förhindrar cellerna att differentieras till visceral och parietal endodermets celltyper (Greer Card *et al.* 2008). Dessa faktorer har stor

betydelse för att stamcellerna ska kunna upprätthålla sin pluripotens under tidiga stadier av utvecklingen och inte utvecklas för tidigt till andra celltyper (Lee *et al.* 2013).

Humana embryonala stamceller

Under utveckling av embryot, och mer specifikt under blastocyststadiet, produceras embryonala stamceller av embryots inre cellmassa (Hu *et al.* 2013). Den första isoleringen av embryonala stamceller skedde 1981 och deras ursprung var från mus (mESC) (Evans & Kaufman 1981). Thompson *et al.* (1998) lyckades för första gången isolera humana embryonala stamceller från den humana blastocysten. Deras forskning var ett stort framsteg inom utvecklingsbiologin, läkemedelsforskningen och transplantationsmedicin (Thomson *et al.* 1998).

ESC har två unika egenskaper som skiljer dem åt andra celltyper. Först kan de behålla sin identitet i en vävnadskultur utan att differentieras, det vill säga de kan självförnyas. Den andra egenskapen är att de kan genomgå ett obegränsat antal celledelningar och differentieras till de tre groddbladen: ektoderm, endoderm och mesoderm (Becker *et al.* 2006). ESC:nas två egenskaper, förnyelse och pluripotens, bibehålls genom ett regulatoriskt komplex som inkluderar epigenetiska mekanismer, exempelvis modifiering av kromatin, transkriptionsfaktorer och miRNA (Wade *et al.* 2015).

Inducerade pluripotenta celler

Vuxna stamceller kan inte differentieras till alla celltyper, då de har begränsad potens jämfört med ESC, och kallas därför multipotenta celler. Däremot lyckades Takahashi och Yamanaka (2006) att omprogrammera somatiska celler från möss till ett pluripotent stadium som de kallade för inducerade pluripotenta celler. Denna omprogrammering är möjlig genom överföring av kärninnehållet till oocyter eller genom fusion med embryonala stamceller. De demonstrerade att virala trasduktionen (genom användning av retrovirala eller lentivirala vektorer) av fyra transkriptionsfaktorer (OSKM eller Yamanaka faktorer) inducerar denna process: Oct4, Sox2, Klf4 och c-Myc (Takahashi & Yamanaka 2006, Lee *et al.* 2013).

Mikro-RNA

Upptäckt och terminologi

miRNA är korta, endogena, icke-kodande (nc)RNA molekyler som består av 19-25 nukleotider och reglerar post-transkriptionellt genuttryck samt är RNA-tystande (Ren *et al.* 2009). Victor Ambros och hans kollegor, Rosalind Lee och Rhonda Feinbaum, upptäckte det första miRNA:t i *Caenorhabditis elegans* 1993. De observerade att genen *Lin-4* som kontrollerar tidpunkten för larvutvecklingen hos *C. elegans* inte kodar för något protein men däremot producerar ett par korta RNA, ett RNA på 22 nukleotider och ett längre RNA på 61 nukleotider (Lee *et al.* 1993). Det kortare RNA:t har sekvenser som är partiellt komplementära till 3'UTR av mRNA:t som kodar för *Lin-14* genen. På grund av denna komplementaritet så kan produkten av *Lin-4* binda till 3'UTR av *Lin-14* vilket leder till negativ reglering av genen *Lin-14* och därmed en minskning i nivåerna av Lin-14 proteinet. Detta startar övergången från första larvstadiet till det andra larvstadiet (Lee *et al.* 1993, Wightman *et al.* 1993).

Trots att det första miRNA:t upptäcktes 1993 tog det ytterligare sju år för det andra miRNA:t att upptäckas. Genen *Let-7* kodar för en reglerande RNA molekyl 22 nukleotider långt, Let-7 RNA, och gynnar övergången från sent larvstadium till vuxna celler (Reinhart *et al.* 2000).

Dessutom identifierades *Let-7* genens homologer i människans ochflugans genom, och *Let-7* RNA upptäcktes hos människan och *Drosophila melanogaster* (Pasquinelli *et al.* 2000).

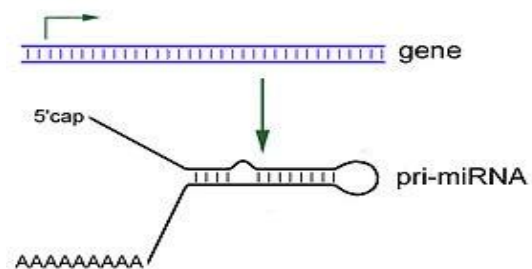
Sedan de första två miRNA:en, *Lin-4* och *Let-7* upptäcktes har mer än 17000 mogna miRNA sekvenser identifierats i över 140 organismer (Kozomara & Griffiths-Jones 2011). För att katalogisera och namnge alla miRNA har ett register inrättats, miRNA Registry som 2002 blev miRBase (Kozomara & Griffiths-Jones 2011). miRNA har tre olika stadier där alla betecknas på olika sätt: det primära transkriptet (pri-miRNA) vilket sedan bearbetas i cellkärnan för att ge en eller flera hårnålprekursor-sekvenser. Dessa sekvenser kallas för pre-miRNA och de innehåller det mogna miRNA:t (Griffiths-Jones 2004).

Alla miRNA är tilldelade numeriska identifierare som baseras på likheter mellan de 19-25 nukleotiderna som miRNA:t består av (Griffiths-Jones 2004). Homologer från olika organismer brukar få samma namn och ett prefix på tre eller fyra bokstäver används för att utse arterna. Exempelvis *hsa-miRNA-101* hänvisar till det mogna miRNA:t 101 som finns hos *Homo sapiens* och *mmu-miRNA-101* hänvisar till det mogna miRNA:t 101 hos mus (Griffiths-Jones 2004). Om två miRNA kommer ifrån samma organism men från olika loci så brukar ett numeriskt suffix anges som *mir-6-1* och *mir-6-2* från *D.melanogaster* (Griffiths-Jones *et al.* 2006). Sekvenser som skiljer sig åt i en eller två baser får samma namn med olika alfabetiska suffix, exempelvis *miR-181a* och *miR-181b*. Tack vare kloningen så har forskarna lyckats identifiera vilken arm av prekursorn som ger upphov till högre nivåer av den uttryckta miRNA:t i celler. miRNA:t med den mindre dominerande formen märks med en stjärna, *miRNA-101** (Griffiths-Jones *et al.* 2006). Slutligen finns ett annat sätt att beteckna om ett miRNA kommer från den 3'- eller 5'-ändan av prekursornsekvensen, till dess att man får tillräckligt med information för att se vilken är den dominanta formen, vilket är genom suffixen 5p och 3p, *miR-142-5p* och *miR-142-3p* (Griffiths-Jones 2004).

Biogenes

De flesta miRNA gener är placerade antingen i intergena regioner eller i antisense orientering till annoterade gener vilket innebär att miRNA generna kan bilda självständiga transkriptionenheter (Cai *et al.* 2004). Det finns emellertid miRNA gener belägna i intronregioner som kan transkriberas som en del av de annoterade generna (Lee *et al.* 2004). miRNA transkriberas i cellkärnan av RNA polymeras II (Pol II) som en del av långa primära transkript, pri-miRNA (Cai *et al.* 2004). Dessutom finns det miRNA som är arrangerade i klungor i genomet och transkriberas som en del av långa icke kodande RNA (lncRNA). Transkribering av dessa RNA leder till en lång pri-miRNA som sedan ger upphov till flera funktionella miRNA (Rodriguez *et al.* 2004).

Pri-miRNA som är en transkriberingsprodukt av RNA Pol II har en 5'kåpa (eller engelskans 5' cap) och en 3' poly-A-svans (Cai *et al.* 2004). Denna RNA molekyl innehåller det mogna miRNA:t och bildar stamsling-sturkturer (stem-loop structures) anslutna genom en kort



Figur 1. miRNAs transkribering av Pol II ger en lång primär transkript (pri-miRNA) med en 5'cap och en 3' poly-A-svans. (Modifierad bild, hämtad från: <https://en.wikipedia.org/wiki/MicroRNA#/media/File:MiRNA-biogenesis.jpg>)

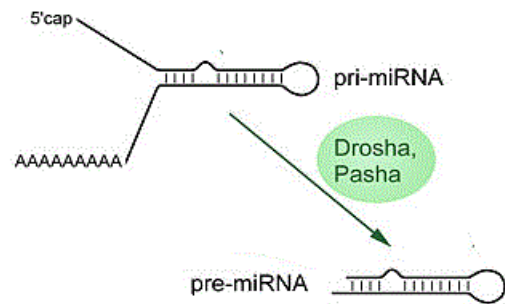
terminal slinga (Figur 1.). Dessa strukturer är resultatet av den ofullständigt parade dubbelsträngade stammen (Lee *et al.* 2004).

Stam-slingstrukturer känns igen av ett nukleärt protein, Di George Syndrome critical region gene 8 (DGCR8 eller Pasha) och enzymet Drosha som tillsammans bildar ett mikro-processorkomplex (Landthaler *et al.* 2004). DGCR8 känner igen pri-miRNA:t och binder till basen av stamslingstrukturen och styr placeringen av Drosha i molekylen. Drosha tillhör enzymfamiljen RNas III och klyver den dubbelsträngade stammen elva baspar (bp) från hårnåls bas (Han *et al.* 2006). RNA molekylen som har bildats har två nukleotider som hänger över vid 3' och en hårnålsform som består av 70-100 bp. Denna molekyl kallas för miRNA prekursor eller pre-miRNA (Figur 2.) (Landthaler *et al.* 2004, Han *et al.* 2006).

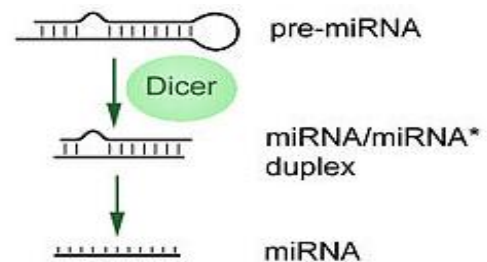
Pre-miRNA känns igen av ett nukleärt transportprotein, exportin-5 (Exp5), som exporterar pre-miRNA:t från cellkärnan till cytoplasman (Lee *et al.* 2004). I cytoplasman binder RNas III enzymet Dicer till 3'-änden av pre-miRNA:t med sin PAZ domän och klyver RNA molekylen (Zhang *et al.* 2004). Klyvningen av Dicer resulterar i en dubbelsträngad RNA molekyl, ~22 nukleotider lång med två nukleotider som överhänger vid 3'-änden (Zhang *et al.* 2004). Den ena strängen är det mogna miRNA:t som binder till RNA-induced silencing complex (RISC) och leder RISC till det komplementära mRNA målet medan den andra strängen degraderas (Figur 3.) (Cai *et al.* 2004).

miR-302

Suh *et al.* (2004) klonade små, mellan 19 och 24 nukleotider, RNA molekyler från humana embryonala stamceller för att, med hjälp av cDNA bibliotek, identifiera vilka miRNA som reglerar hESC. Ett av deras resultat påvisar att åtta miRNA loci är placerade i en 700 bp lång region, genklunga, på kromosom 4. Mer specifikt hittades miRNA-302/367 klungan i intronet i 4q25 regionen av den humana kromosom 4 som samtranskriberas av Pol II i ett polycistroniskt sätt (ger upphov till flera proteiner) (Barroso-delJesus *et al.* 2008). De sju första miRNA som är transkriptionsprodukter: miR-302b*, miR-302b, miR-302c*, miR-302c, miR-302a*, miR-302a och miR-302d utgör familjen miR-302 medan den sista miR-367 utgör en egen familj. Två mer miRNA som tillhör familjen miR-302 har upptäckts, miR-302e och miR-302f. Dessa miRNA är dock placerade på två olika kromosomer, 11 och 18 respektive och tillhör därmed inte miR-302/367 klungan, och reglerar andra gener (Morin *et al.* 2008).



Figur 2. Pasha känner igen och binder till pri-miRNA och Drosha klyver det så att en miRNA prekursor på 70-100 bp uppkommer. (Modifierad bild, hämtad från: <https://en.wikipedia.org/wiki/MicroRNA#/media/File:MiRNA-biogenesis.jpg>)



Figur 3. Dicer klyver pr-miRNA:t som resulterar i en ~22 nukleotider lång dubbelsträngad RNA molekyl. Den ena strängen är det mogna miRNA:t som binder till RISC och den andra strängen degraderas. (Modifierad bild, hämtad från: <https://en.wikipedia.org/wiki/MicroRNA#/media/File:MiRNA-biogenesis.jpg>)

Sekvensering av dessa miRNA har visat att fyra av dem (miR-302b, miR-302c, miR-302a och miR-302d) är homologa med varandra i stor grad. Deras sekvenser liknar varandra i 5' regionen, 5'-UAAGUGCUUCCAUGUUUNNGUNN-3', vilket överensstämmer med hypotesen att igenkännande av miRNA målet sker primärt genom 5' sekvenserna eftersom miRNA är komplementära till målets 3' UTR (Lai 2002).

Dessutom observerade Suh *et al.* (2004) att uttrycket av pri-miRNA minskar när hESC utvecklas till embryoida kroppar. På grund av detta resultat kunde de dra slutsatsen att klungmiRNA uttrycks i hESC och nedregleras under differentieringen. Slutligen klassificerade de produkterna av miR-302/367 klungan som en grupp av miRNA vilka uttrycks både i embryonala stamceller och i embryonala carcinomceller, elakartade tumörer som kommer från epitelceller.

Barroso-delJesus *et al.* (2011) utförde ett experiment som bekräftade att alla miRNA från miRNA-302/367 genklungan uttrycks i hög grad i humana embryonala stamceller, samt i humana embryonala carcinomceller medan de är frånvarande från humana vuxna stamceller och vuxna vävnader. Ytterligare observerade de att all miRNA från miRNA-302/367 klungan uttrycks i samma grad oavsett genomets stabilitet eller cellulära genetiska bakgrund.

Transkription av miR-302

Den kodande genen av humana miR-302/367 är belägen i den intergena regionen av kromosom 4. Genen innehåller tre exoner och två introner med alternativ splicing som kan eller inte kan innehålla exon 2. miR-302/367 klungan är placerad i första intronet av genen (Barroso-delJesus *et al.* 2011). Transkribering av genen ger ett primärt transkript 1974 nukleotider långt RNA. Pri-miRNA har 5'-ändan belägen 153 nukleotider uppströms från den första kodande miRNA molekylen, miR-302b*, och 3'-ändan belägen cirka tolv nukleotider nedströms från polyadelyneringssignalen (Barroso-delJesus *et al.* 2011).

Transkriptionsfaktorerna Oct3/4, Sox2, Nanog och Rex1 är uppströmsregulatorer av miR-302/367 promotorn. Det vill säga att dessa faktorer sätter i gång transkriptionen av miR-302 mot 5'-ändan av RNA molekylen (Jesus *et al.* 2009).

miR-302 i hESCs

miR-302 i cellulära signaleringen

Bildningen av de tre groddbladen under den tidiga embryoutvecklingen är en essentiell process för en organism. Transforming growth factor beta (TGF- β) superfamiljen spelar stor roll i cellens utveckling, differentiering samt apoptos (Onichtchouk *et al.* 1999). I däggdjursvävnader uttrycks tre isoformer av TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 och TGF- β 3) som fungerar genom samma receptorsignaleringvägar. TGF- β -signaleringen vidarebefordras av tre cellytproteiner, TGF- β receptor I (T β RI), II (T β RII) och III (T β RIII) (Cheifetz *et al.* 1987, Kang *et al.* 2012). De första två receptorerna är transmembrana serin- och treoninkinaser och förmedlar signaltransduktionen. Först binder liganden till T β RII som i sin tur fosforylerar T β RI och bildar ett TGF- β -receptorkomplex där protein SMAD Anchor for Receptor Activation (SARA) rekryterar SMAD (Kang *et al.* 2012). SMAD är intracellulära proteiner vilka omvandlar extracellulära signaler från TGF- β ligander till cellkärnan som i sin tur påverkar gentranskriptionen.

Reglering av mesendodermala utvecklingen i hESCs

För att mesendodermet ska utvecklas är regleringen av signaleringsnätverket och kontrollen av mekanismerna på transkriptions-, posttranskriptions- och posttranslationsnivå nödvändiga (Martello *et al.* 2007). miRNA har en avgörande roll för regleringen på posttranskriptionsnivån. miRNA familjen, miR-302, uttrycks speciellt i humana embryonala stamceller under tidiga stadier av embryogenesen. Rosa *et al.* (2009) påvisade att miR-302 uttrycks under gastrula och att de inte ingår i extraembryoniska strukturer. Deras reducering under differentieringen påpekar deras roll i bevarandet av pluripotens samt regleringen av embryonala stamcellers första linje beslut.

Proteinet Nodal tillhör familjen TGF- β och har en avgörande roll för inducering av mesodermet och endodermet (mesendoderm) samt för dorsoventrala, anter- och posteriorala mönstringen under embryots utveckling (Whitman 2001). Ytterligare ett protein som är en avvikande medlem av samma familj, och har en stor påverkan på embryonala celler, kallas för Lefty och fungerar som antagonist till Nodals signalväg. Uttrycket av Lefty följer Nodals uttryck och i de flesta vävnader så är Lefty beroende av Nodals signalväg då Lefty fungerar som en feedback-inhibitor (Sakuma *et al.* 2002). Hos människan finns det en Nodal ligand och två Lefties, Lefty1 och Lefty2 (Rosa *et al.* 2009).

Lewis *et al.* (2005) anger att miR-302 har mer än 500 gener som potentiella mål och bland dessa mål finns medlemmar av familjen TGF- β . Bioinformatiska analyser visar att de två Lefties som finns hos människan innehåller sekvenser i deras icke-konservade 3'UTR som motsvarar sekvenserna i miR-302. Rosa *et al.* (2009) utförde *in vivo* experiment för att bevisa att miR-302 reglerar de två Lefty ortologerna negativt. Genom att blockera uttrycket av miR-302 visade de att aktiviteten av Lefties ökade.

För forskning kring hESC och iPSC är användningen av stamcellsmarkörer nödvändig för att indikera cellernas pluripotensstatus; varje markör kan användas för att indikera i vilket av de tre groddbladen cellen har differentierats till. Kubo *et al.* (2004) såg att i humana embryonala stamceller leder en ökad aktivitet av Lefties till en ökad nivå av neuroektodermala markörer, en minskning av mesodermala markörer, Brachyury och FoxF1, och endodermala markörer såsom Mix11 och Sox17 α . Denna ökning av Lefties aktivitet påverkar inte pluripotensmarkörer, Oct4 och Nanog. Men däremot reducerar höga nivåer av miR-302 i hESC aktiviteten av Lefty1 och Lefty2, och inducerar uttrycket av mesodermala och endodermala markörer (Kubo *et al.* 2004, Tam & Loebel 2007). miR-302 siktar på Lefty endast på mRNA nivå och inhiberar dess translation. Detta har som konsekvens att bildningen av mesodermet och endodermet gynnas medan den neuroektodermala differentieringen försvagas (Rosa *et al.* 2009).

Den biologiska funktionen av miR-302 i humana embryonala stamceller är att negativt reglera uttrycket av de två Lefty liganderna. När aktiviteten av Lefties minskar så ökas aktiviteten av deras antagonist, Nodal. Nodals signalering i embryonala celler kommer att främja bildningen av mesodermet och endodermet och försvaga signaler som gynnar bildningen av neuroektodermet. Så, miR-302 är nödvändigt för att upprätthålla balansen mellan pluripotens och positivt Nodal signaleringen som har till uppgift att ombesörja en korrekt specifikation av groddbladen (Barroso-delJesus *et al.* 2011).

Reglering av mesodermets och trofektodermets utveckling i hESCs

Förutom TGF- β signaleringen så reglerar miR-302 bone morphogenetic protein signalering (BMP-signalering) i hESC (Lipchina *et al.* 2011). Ett annat protein av TGF- β superfamiljen som har en essentiell roll för den tidiga embryonala utvecklingen och upprätthållandet av homeostas är bone morphogenetic protein 4 (BMP4). Precis som andra TGF- β medlemmar binder det till receptor II som sedan fosforylerar receptor II kinasdomänen (Kang *et al.* 2012). Två fosforylerade SMAD, R-SMAD, bildar ett heterotrimert komplex med SMAD4 och Co-SMAD som sedan ska samverka med andra kofaktorer i cellkärnan och påverka genuttrycket (Zhang *et al.* 2008).

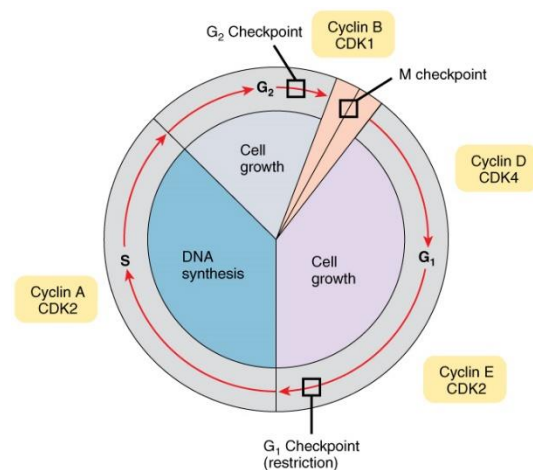
BMP-signaleringens vägen har flera biologiska funktioner som uppnås genom transkriptionsreglering av olika gener med hjälp av SMAD transducerer. I humana embryonala stamceller gynnar BMP-signalering differentieringen till mesodermet och trofektodermet, trofoblaster som ligger intill embryots ektoderm och som senare kommer att utvecklas till moderkakan (Zhang *et al.* 2008, Lipchina *et al.* 2011). Detta sker eftersom miR-302 inhiberar den neurala differentieringen samt gynnar BMP-signaleringen i icke differentierade humana embryonala stamceller (Lipchina *et al.* 2011).

Lipchina *et al.* (2011) visade att miR-302 gynnar BMP-signaleringen genom att inhibera uttrycket av *Tob2*, *Dazap2*, och *Slain1* vars produkter fungerar som BMP inhibitorer. *Tob2* som tillhör familjen Btg/Tob inhiberar BMP-signaleringen genom att påverka SMAD6/7 medan *Dazap2* kan påverka indirekt BMP. Mycket information om *Slain1* har inte hittats men genen uttrycks i hESC. Genom att tysta dessa gener undertrycker miR-302 den neurala induceringen och främjar pluripotens.

Sammanfattningsvis är en av mekanismerna, genom vilka miR-302 bibehåller pluripotens i humana embryonala stamceller, att öka BMP-signaleringen som inhiberar den neurala differentieringen. Den andra mekanismen involverar inhiberingen av BMP inhibitorer (Lipchina *et al.* 2011). Nivåerna av miR-302 i hESC under differentieringen av mesodermet måste vara höga nog för att förhindra den neurala induceringen samt låga nog för att förhindra induceringen av trofektodermet (Kang *et al.* 2012).

miR-302 i cellcykeln

Cellcykeln består av fyra faser som ansvarar för replikationen och överföringen av genetiskt material till dotterceller (Wang *et al.* 2008). Cellcykeln inleds med G1 fasen som förbereder cellerna inför celledelning och cellen blir större. Cellerna som inte ska delas, vanligtvis odifferentierade stamceller, går till en inaktiv fas, istället för att gå till nästa fas, G0. Nästa fas i cellcykeln är S-fasen där det genetiska materialet replikeras. G2 fasen som kommer sen förbereder cellen för mitosen som är den sista fasen. M fasen är en kort fas i cellcykeln där kromosomerna separeras i två nya cellkärnor (Savatier *et al.* 1996).



Figur 4. Cellcykelns faser och deras reglering av cykliner och CDK.
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:0332_Cell_Cycle_With_Cyclins_and_Checkpoints.jpg)

Cellcykelprogression regleras av cyklinproteiner som aktiverar och bildar komplex med cyklinberoende kinaser (CDK). Cyklin D1 är nödvändig för G1 fasen och det utgör en regulatorisk underenhet av CDK4,6 som reglerar övergången från G1 till S fas (Savatier *et al.* 1996). I figur 4 visas cellcykelns faser och vilka cyklin-CDK komplex som reglerar varje fas eller övergången från en fas till en annan. Däremot uttrycks inte alla cykliner i samma mängd i alla celler och tiden som celler spenderar i varje fas varierar bland celltyper. I embryonala stamceller är cyklin D1 nivåerna låga och G1 fasen väldigt kort, en till två timmar, medan i differentierade celler så är G1 den längsta fasen (Greer Card *et al.* 2008).

Greer Card *et al.* (2008) undersökte vilken roll miR-302 spelar i regleringen av cellcykeln. De antog att ju mer hESC differentierar desto fler cellcykelpopulationer som befinner sig i G1 fasen växlas från en kort G1 till en lång G1 fas. Detta skifte orsakas på grund av det dämpade uttrycket av miR-302 i pluripotenta celler. En anledning till denna hypotes var att en produkt av miR-302 klungan, miR-302a, har liknande sekvens med en del av cyklinets D1 3'UTR. De visade att en funktion av miR-302:s produkter, miR-302a, -b, -c, -d, är att inhibera uttrycket av cyklin D1 på posttranskriptionell nivå. Dessutom visade de att det exogena uttrycket av miR-302 ökade antalet celler som befann sig i S fasen. Mer specifikt, miR-302 är en negativ regulator av G1 fasen och gynnar övergången till S fasen. Ett sista resultat av deras experiment visade att proteinnivåer av CDK4 hade ökat när de undertryckte miR-302. Detta tyder på att CDK4 utgör ett mål för miR-302.

miR-302 i reglering av apoptosen

miR-302 förutom cellcykeln reglerar också apoptosvägar i humana embryonala stamceller genom att en negativ reglering av olika cellcykelregulatorer (Zhang *et al.* 2015). Ett exempel är regleringen av BH3-only proapoptiska faktorn, BNIP3L/Nix, som tillhör familjen Bcl-2. Överuttrycket av BNIP3L/Nix kan inducera apoptos i hESC, men miR-302 förhindrar dess transkription och reglerar på det sättet apoptosen. Butyrat är en karboxylsyra och histon-diacetylas inhibitor som gynnar den cellulära omprogrammeringen. Ett mitogen-aktiverande protein kinas (MAPK eller MAP-kinas), p38, reglerar cellulära processer som differentiering, celltillväxt och apoptos och därför kan utgöra ett potentiellt mål för butyrat. Witt *et al.* (2000) visar i sin studie att butyrat är involverat i regleringen av vissa signaleringsvägar, bland annat i signaleringen av p38 som är nära kopplad till apoptosen. Zhang *et al.* (2015) visade att butyrat kan inhibera apoptosen genom att reducera uttrycket av BNIP3L/Nix som i sin tur inducerar överuttrycket av miR-302.

Histondimetylas Jmjd1C reglerar epigenetiskt miR-302

Histonmetylering är en viktig process som leder till genaktivering, oftast i eukromatin eller genrepression i heterokromatin. Denna process regleras av två grupper enzymer som fungerar som antagonister, histonmetyltransferas och histondimetylas (Wang *et al.* 2014). Epigenetisk reglering genom histonmetylering och DNA metylering har visats vara väldigt viktiga i utvecklingen av tidiga embryon och differentieringen av embryonala stamceller (Pedersen *et al.* 2016). Exempelvis så leder hypermetylering av histon 3 på lysin 9 (H3K9) till deaktivering av vissa gener och har en essentiell roll för embryogenes och celldifferentiering. Till exempel så kan H3K9 dimetylaserna Jmjd1A och Jmjd2C reglera uttrycket av *Nanog* och *Tcl1* i möss (Wang *et al.* 2014).

Kim *et al.* (2010) kom fram till att H3K9 histondimetylas jumonji domain containing 1C, (Jmjd1C) (andra namn: TRIP8 eller KDM3c), kontrollerar transkriptionsreglering genom interaktion med histonmetyltransferas, Whistle. Wang *et al.* (2014) märkte att förekomsten av

Jmjd1C är väldigt hög i hESC och att det minskar under de embryonala stamcellernas differentiering. De påstår att minskningen av H3K9 histondimetylas Jmjd1C under differentieringen är en epigenetisk process som är nödvändig för initiering av det neurala programmet. Genom att utföra olika funktionsnedsättande (loss of function) experiment kom de fram till att tystandet av *Jmjd1C* gynnar den neurala differentieringen.

Uppgifterna som Wang *et al.* (2014) fick visade att den neurala differentieringen uppstår på grund av tystandet av *Jmjd1C* som är ansvarig för minskning i miR-302 uttrycket. Jmjd1C har också en effekt på den cellulära signaleringen: TGF- β signalering ökas samtidigt som BMP-signalering inhiberas. Deras forskning visade att Jmjd1C binder till proximala promotorsekvenser av *miR-302* i humana embryonala stamceller. Genom att binda till *miR-302*:s promotor och dimetylera H3K9 som finns på dess sekvens så gynnar Jmjd1C *miR-302* uttrycket. miR-302 som produceras kommer i sin tur att inhibera neurala differentieringen.

miR-302 reglerar Brg1 kromatinkomplexet

En av faktorerna som påverkar embryonala stamcellernas utveckling och bildningen av inducerade pluripotenta celler är Brg1 kromatinombyggnadskomplex, som är ATP-beroende (Wade *et al.* 2015). Komplexet består av en central ATPas, antingen Brm eller Brg1, och flera Brg1 associerade faktorer (BAF), och reglerar genuttrycket genom att öppna kromatinstrukturer och flytta på nukelosomerna (Chen & Archer 2005).

BAF53a och BAF170 utgör två ytterligare utvecklingsreglerade mål för miR-302. Wade *et al.* (2015) fokuserade deras forskning på miR-302-mål i humana embryonala celler som reglerar kromatinstrukturen och som är essentiella för cellens förnyelse samt differentiering. En sådan kromatinstruktur är Brg1 komplexet. Genom att leta efter miR-302 bindningsställen i alla sekvenser i 3'UTR av kända gener som kodar för BAF underenheter, visade de att miR-302 har som mål de gener som kodar för BAF45c, BAF53a, BAF170 och BAF180. Överuttryck av miR-302a i hESC hade som resultat att BAF53a:s och BAF170:s uttryck nedreglerades; repression av BAF53 skedde på proteinnivå medan repression av BAF170 skedde både på protein- och mRNA-nivå. Överuttrycket av miR-302a hade ingen effekt på BAF180 eller på andra komplex. Däremot så leder inhibering i miR-302 uttrycket till ökade nivåer av den neuroektodermala markören Pax6 samtidigt som den endodermala markörens Cer1 nivåer sjunker. Ytterligare en konsekvens av denna inhibering är att uttrycket av BAF53a och BAF170 ökar vilket tyder på att dessa miR-302-mål också är involverade i differentieringen (Wade *et al.* 2015).

Utvecklingen av nervsystemet inträffar vid utgången från mitosen samtidigt som cellen förlorar sin pluripotens. Denna övergång från stamcell till nervcell är beroende av växlingen i ATP-beroende kromatinmekanismen som innebär uttryck av BAF53b istället för BAF53a (Lessard *et al.* 2007). BAF53a:s roll i cellen är att gynna uttrycket av BAF53b som är essentiell för utvecklingen av dendritceller. När miR-302 binder till BAF53a hämmar det dess uttryck och därmed inhiberar neurala differentieringen (Yoo *et al.* 2009). Repression av BAF170 bidrar till variationerna som uppstår vid genuttrycket på grund av miR-302. Därtill gynnar uttrycket av BAF170 i stora mängder cellernas differentiering mot ektodermet och inhiberar mesendodermala differentieringen. miR-302:s roll som mesendodermals promotor kan även bekräftas i det här fallet; miR-302 inhiberar BAF53a och BAF170 för att inducera mesendodermala differentieringen (Wade *et al.* 2015).

miR-302 reglerar differentieringen av iPSC

Ett påtvingat uttryck av exogena transkriptionsfaktorer kan inducera omprogrammeringen av somatiska celler (SCR) till inducerande pluripotenta stamceller (Lee *et al.* 2013). Olika kombinationer av dessa transkriptionsfaktorer är involverade i processen och dessa variationer kan innehålla bland annat: Oct4, Sox2, Klf4 och c-Mys eller Oct4, Sox2, Nanog och Lin28 (Hu *et al.* 2013). Eftersom miRNA och mer specifikt miR-302 i stor grad reglerar pluripotensen och självförnyelse i humana embryonala stamceller väcks intresset för studier om vilken roll miR-302 har i somatiska cellers omprogrammering och i iPSC.

Inducering av miR-302 uttrycket reglerar SCR

Omprogrammering av somatiska till inducerande stamceller kräver globala epigenetiska förändringar såsom DNA-metylering och histonmetylering för att återställa cellernas stamförmågor (engelskans stemness) (Lin *et al.* 2011). Dessutom krävs en förskjutning i uttrycket av flera gener och reglering av deras aktivitet (Subramanyam *et al.* 2011). Under omprogrammeringen utgörs en stor del av cellpopulationen av partiellt dedifferentierade celler som uppstår på grund av ofullständig repression av transkriptionsfaktorerna, och DNA hypermetyleringen av specifika loci (Lee *et al.* 2013). Flera studier har visat att miR-302 är involverat i regleringen av vissa transkriptionsfaktorer samt att det kan tysta vissa epigenetiska regulatorer och reglera SCR på det sättet.

Två epigenetiska regulatorer, lysin-specifik histondimetylas (AOF) och metyl CpG-bindning proteiner (MECP), utgör målen för miR-302. AOF familjen har två enzymer, AOF1 och AOF2, som dimetylerar histon 3 på lysin 4 (H3K4) och detta resulterar i att gentranskriptionen undertrycks. Inhibering av antingen AOF1 eller AOF2 kan inducera globala dimetyleringen av DNA:t i ett genom. DNA metyltransferas 1 (DNMT1) är nödvändigt för den globala DNA metyleringen och dess aktivitet styrs av AOF2. miR-302 tystar ned AOF2 så att aktiviteten av DNMT1 minskas och samtidigt inhiberar MECP1/2 uttrycket (Lin *et al.* 2011). miR-302 inducerar omprogrammeringen av somatiska celler genom att undertrycka dessa två grupper av enzymer, AOF1/2 och MECP1/2. Detta leder till förekomsten av globala DNA metyleringen och H3K9 modifieringen som i sin tur gynnar aktiveringen av Oct4-Sox2-Nanog vilka stimulerar uttrycket av miR-302. På det sättet bildas det en positiv feedbackslina som är essentiell för bibehållandet av SCR (Lin *et al.* 2011).

Lee *et al.* (2013) presenterar i sina studier att uttrycket av Nanog är huvudhändelse i omprogrammeringen av somatiska celler till iPSC. Ett annat metyl DNA bindningsprotein, MBD2, reglerar epigenetiskt uttrycket av olika gener som till exempel *Nanog* och reglerar tystandet av DNA metyleringen. MBD2 utgör också ett mål för miR-302 och Lee *et al.* (2013) visade att nedtrycket av MBD2 ökade Nanog:s uttryck eftersom MBD2 binder till metylerade regioner av *Nanog*:s promotorer, men uttrycket av Oct4 var oförändrat. Det visar att å ena sidan är reglering av Oct4 oberoende av MBD2 men å andra sidan är regleringen av MBD2 essentiell för uttrycket av Nanog. Förutom detta visade de att MBD2 uttrycks i hög grad i somatiska celler och partiellt omprogrammerade celler men dess uttryck i helt omprogrammerade celler är väldigt låg. miR-302 uttrycks i omprogrammerade och andra pluripotenta stamceller och Lee *et al.* (2013) visade för första gången data som bekräftade att MBD2 utgör miR-302:s primära mål för att uppnå fullt SCR till iPSC.

Uttrycket av Oct4 i humana embryonala stamceller är beroende av nukleär receptor underfamilj 2, grupp F, medlem 2 (NR2F2). Hu *et al.* (2013) undersökte förhållandet mellan

miR-302 som uttrycks i hög grad i pluripotenta celler och NR2F2 som uppreglas i somatiska celler. Bioinformatiska analyser visade att NR2F2 innehåller bindningsställen i sin 3'UTR för miR-302. Deras forskning indikerar att miR-302 inhiberar uttrycket av NR2F2 genom att binda till två regulatoriska bindningsställen i 3'UTR vilket påverkar cellernas pluripotens och differentiering. Oct4 gynnar uttrycket av miR-302 genom att binda till dess promotorer och NR2F2 inhiberar uttrycket av Oct4 genom promotorbindningen. Alltså Oct4 uppreglar miR-302, miR-302 undertrycker NR2F2 och NR2F2 undertrycker Oct4. I differentierade celler så är nivåerna av miR-302 låga och påverkar inte transkriptionen av NR2F2 som resulterar till låga nivåer av Oct4. Hu *et al.* (2013) tror att inhiberingen av NR2F2, via miR-302, utgör en viktig mekanism för förståelse av pluripotensen samt induceringen av iPSC.

Diskussion

Sammanfattningsvis så är miR-302 en viktig regulator av humana embryonala och inducerade pluripotenta stamcellers differentiering och förnyelse. hESC och iPSC visar stora likheter, trots vissa skillnader. miR-302 utgör på grund av sin förmåga att reglera flera gener en regulator av hESC:s och iPSC:s cellulära processer relaterade till olika transkriptionsfaktorer som styr celldifferentieringen (Wilson *et al.* 2009). Dessutom är miR-302 en kromatinmodifierare som genom histon modifieringar, metyleringar av promotorer och regleringen av andra kontrollelement är essentiell för pluripotens och organismernas utveckling (Wade *et al.* 2015).

Suh *et al.* (2004) genomförde en omfattande forskning kring humana embryonala stamceller och de miRNA som påverkar dessa celler. Bland dessa miRNA fanns miR-302 klungan som producerar fem miRNA: miR-302a, -b, -c, -d och miR-367 vilka hade identifierats ett år innan hos embryonala stamceller i möss (Houbaviy *et al.* 2003). Suh *et al.* (2004) jämförde sin upptäck med Houbaviys *et al.* (2003) och visade att miR-302 från kromosom 4 hos människan är väldigt nära homolog med ESC från kromosom 3 i klonade möss. De klassificerade produkterna av miR-302 klungan som miRNA, som uttrycks i båda organismerna, och har en konserverad roll i deras pluripotenta celler. Denna studie är grunden för senare forskningar som försöker beskriva mekanismerna bakom vilka miR-302 reglerar pluripotensen.

Bland transkriptionsfaktorerna som utgör mål för miR-302 är Oct4, Sox2 och Nanog. De är ansvariga för initiering och bibehållandet av genuttrycket som positivt reglerar den pluripotenta fenotypen, och för nedregleringen av generna associerade med celldifferentieringen (Greer Card *et al.* 2008). Oct4 binds ihop med Sox2 under den tidiga embryonala utvecklingen och är essentiella för den transkriptionella aktiveringen av miR-302, medan Nanog uttrycks vid senare blastocyststadiet. Alla tre binder till promotorregioner av miR-302 klungan (Greer Card *et al.* 2008). Transkriptionsfaktorerna c-Myc och Klf4 är associerade med kontrollen av cellcykeln i omprogrammeringen av differentierade celler till pluripotenta celler (Hu *et al.* 2013). Däremot är mekanismerna bakom regleringen av cellcykeln via de två faktorerna inte helt utredda. Hu *et al.* (2013) visade att överuttrycket av Oct4, Sox2, Klf4 och c-Myc resulterar i högre omprogrammeringseffektivitet samt att inhibering av NR2F2 via miR-302 förbättrar induceringen av iPSC och ger en bättre förståelse av pluripotensen.

Inducering av miR-302 leder till en minskning av uttrycket av cyklin D1/D2 samt låga nivåer av CDK4 i humana embryonala stamceller (Greer Card *et al.* 2008, Lin *et al.* 2010). Genom att inhibera dessa två faktorer gynnar miR-302 cellerna i S-fasen medan cellerna i G1-fasen minskar. Detta tyder på att miR-302 är en negativ regulator av G1 och främjar övergången till S-fasen (Greer Card *et al.* 2008). Greer Card *et al.* (2008) påstår att inducering av miR-302 i hESC kan behålla cellerna i pluripotenta tillståndet medan inhibering av miR-302 leder till en omvandling av dessa celler till ett mer differentierat tillstånd.

miR-302 reglerar pluripotensen av hESC positivt genom att inducera TGF- β -signaleringen. Detta uppnås genom inhiberingen av *Lefty1* och *Lefty2* som fungerar som antagonister av Nodal proteinet. Genom att inhibera *Lefty1* och *Lefty2* förstärks signaleringen av Nodal och detta gynnar utvecklingen av endodermet och mesodermet samt inhiberar ektoderrets utveckling (Rosa *et al.* 2009). Dessutom inhiberar miR-302 den neurala induktionen genom att positivt reglera BMP-signaleringen (Lee *et al.* 2013). Detta betyder att miR-302 kan undertrycka den neurala differentieringen och bevara pluripotens som är essentiell för att förhindra differentieringen. Enligt Lipchina *et al.* (2012) så tyder detta på att miR-302 har två motsatta roller: positivt reglering av pluripotens och positiv reglering av BMP-signaleringen som resulterar till hESC differentiering mot mesendodermala linjer. I hESC måste nivåerna av miR-302 uttrycket vara så pass höga för att kunna förhindra den neurala induceringen och låga nog för att förhindra induceringen av trofektodermet (Lipchina *et al.* 2012).

Ytterligare en faktor som är viktig för mesendodermala differentieringen är Brg1 komplexet. miR-302 binder och nedreglerar dess två faktorer, BAF53a och BAF170. Inhibering av BAF53a leder till inhibering av den neurala differentieringen och BAF170 har en avgörande roll för cellernas förmåga att förnya sig själva. BAF170:s inhibering av miR-302 är nödvändig för den mesendodermala utvecklingen (Wade *et al.* 2015).

Slutligen så fokuserar forskarna mer och mer på att hitta hur miR-302 inducerar omprogrammeringen av somatiska celler till inducerade pluripotenta celler samt hur de behåller deras pluripotens. Mekanismerna bakom dessa två processer är inte helt klargjorda. Förutom detta så är mekanismerna bakom pluripotens bevarandet mellan hESC och iPSC inte heller tydliga än (Lipchina *et al.* 2012). Lee *et al.* (2013) är de första som gav en fullständig inblick i mekanismerna involverade i SCR. De bevisar att MBD2 utgör ett mål för miR-302 klungans produkter och att MBD2 i sin tur är essentiell för Nanog uttrycket vilket är viktigt för full omprogrammering av iPSC.

Även då iPSC är ett väldigt bra verktyg med stor potential för regenerativ medicin så finns det vissa begränsningar i deras bildning. Till exempel så har inducering av somatiska celler till iPSC väldigt låg effektivitet (0,2 %-1,0 %) och den är beroende av det påtvingade uttrycket av vissa transkriptionsfaktorer, bland annat Oct4 och Nanog (Anokye-Danso *et al.* 2011). Därför försöker forskarna hitta nya metoder genom vilka celldifferentieringen kan uppnås. En sådan process är transdifferentiering då redan en fullutvecklade somatisk cell omvandlas till en annan celltyp utan att genomgå det pluripotenta stadiet (Gruh & Martin 2009). De första studierna som utfördes fokuserade mest på hur olika transkriptionsfaktorer reglerar transdifferentieringen men Ambasudhan *et al.* (2011) visade att miRNA också utgör regulatorer av denna process. Mer specifikt visade de att miR-124 kan omprogrammera humana fibroblaster till funktionella neuroner. Adlakha och Seth (2017) skriver i sin

översiktsartikel om miRNA:s funktion i cellulära omprogrammeringen att inga bevis har hittats som kan koppla miR-302 med transdifferentieringen.

hESC och iPSC har en stor terapeutisk potential på grund av deras förmåga att bibehålla pluripotens och självförnyas. För att kunna använda dessa celler för behandling av olika sjukdomar i regenerativ medicin, är det viktigt att först förstå hur processer som transkriptionell kontroll och cellcykeln regleras samt vilka faktorer som förmedlar dem. Denna studie visar att miR-302 har en avgörande roll för reglering av dessa processer i hESC och iPSC men att mer forskning är nödvändig för att kunna få en klar inblick i mekanismerna som styr dessa processer.

Tack

Jag vill rikta ett stort tack till mina medstudenter, Sophia Försskåhl och Carolina Viman, för deras hjälpsamma muntliga och skriftliga kommentarer. Jag vill även tacka min handledare, Lage Cerenius, för handledningen och hans värdefulla kommentarer under skrivprocessen.

Referenser

- Adlakh YK, Seth P. 2017. The expanding horizon of MicroRNAs in cellular reprogramming. *Progress in Neurobiology* **148**: 21–39.
- Ambasudhan R, Talantova M, Coleman R, Yuan X, Zhu S, Lipton SA, Ding S. 2011. Direct Reprogramming of Adult Human Fibroblasts to Functional Neurons under Defined Conditions. *Cell Stem Cell* **9**: 113–118.
- Anokye-Danso F, Trivedi CM, Jühr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, Zhang Y, Yang W, Gruber PJ, Epstein JA, Morrissey EE. 2011. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* **8**: 376–388.
- Barroso-delJesus A, Lucena-Aguilar G, Sanchez L, Ligeró G, Gutierrez-Aranda I, Menendez P. 2011. The Nodal inhibitor Lefty is negatively modulated by the microRNA miR-302 in human embryonic stem cells. *The FASEB Journal* **25**: 1497–1508.
- Cai X, Hagedorn Ch, Cullen Br. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**: 1957–1966.
- Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang ML, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massagué J. 1987. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* **48**: 409–415.
- Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A. 2010. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Molecular Cell* **39**: 373–384.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154–156.
- Greer Card DA, Hebbar PB, Li L, Trotter KW, Komatsu Y, Mishina Y, Archer TK. 2008. Oct4/Sox2-Regulated miR-302 Targets Cyclin D1 in Human Embryonic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology* **28**: 6426–6438.

- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, Dongen S van, Bateman A, Enright AJ. 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research* **34**: D140.
- Griffiths-Jones S. 2004. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Research* **32**: D109.
- Gruh I, Martin U. 2009. Transdifferentiation of Stem Cells: A Critical View. I: Martin U (red.). *Engineering of Stem Cells*, s. 73–106. Springer Berlin Heidelberg
- Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, Sohn SY, Cho Y, Zhang B-T, Kim VN. 2006. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* **125**: 887–901.
- Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. 2003. Embryonic Stem Cell-Specific MicroRNAs. *Developmental Cell* **5**: 351–358.
- Hu S, Wilson KD, Ghosh Z, Han L, Wang Y, Lan F, Ransohoff KJ, Burridge P, Wu JC. 2013. MicroRNA-302 Increases Reprogramming Efficiency via Repression of NR2F2. *Stem Cells* **31**: 259–268.
- Jesus, Lucena-Aguilar G, Menendez P. 2009. The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. *Cell Cycle* **8**: 394–398.
- Kang H, Louie J, Weisman A, Sheu-Gruttaduria J, Davis-Dusenbery BN, Lagna G, Hata A. 2012. Inhibition of MicroRNA-302 (miR-302) by Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) Facilitates the BMP Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 38656–38664.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. 2011. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research* **39**: D152–D157.
- Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, Fehling HJ, Keller G. 2004. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development (Cambridge, England)* **131**: 1651–1662.
- Lakshmipathy U, Love B, Goff LA, Jörnsten R, Graichen R, Hart RP, Chesnut JD. 2007. Micro RNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells. *Stem cells and development* **16**: 1003–1016.
- Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. 2004. The Human DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8 and Its D. melanogaster Homolog Are Required for miRNA Biogenesis. *Current Biology* **14**: 2162–2167.
- Lee MR, Prasain N, Chae H-D, Kim Y-J, Mantel C, Yoder MC, Broxmeyer HE. 2013. Epigenetic Regulation of Nanog by MiR-302 Cluster-MBD2 Completes Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* **31**: 666–681.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**: 843–854.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, Kim VN. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* **23**: 4051–4060.

- Lessard J, Wu JI, Ranish JA, Wan M, Winslow MM, Stahl BT, Wu H, Aebersold R, Graef IA, Crabtree GR. 2007. An Essential Switch in Subunit Composition of a Chromatin Remodeling Complex during Neural Development. *Neuron* **55**: 201–215.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**: 15–20.
- Lipchina I, Elkabetz Y, Hafner M, Sheridan R, Mihailovic A, Tuschl T, Sander C, Studer L, Betel D. 2011. Genome-wide identification of microRNA targets in human ES cells reveals a role for miR-302 in modulating BMP response. *Genes & Development* **25**: 2173–2186.
- Martello G, Zacchigna L, Inui M, Montagner M, Adorno M, Mamidi A, Morsut L, Soligo S, Tran U, Dupont S, Cordenonsi M, Wessely O, Piccolo S. 2007. MicroRNA control of Nodal signalling. *Nature* **449**: 183–188
- Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massagué J, Niehrs C. 1999. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**: 480–485.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**: 86–89.
- Pedersen MT, Kooistra SM, Radziszewska A, Laugesen A, Johansen JV, Hayward DG, Nilsson J, Agger K, Helin K. 2016. Continual removal of H3K9 promoter methylation by Jmjd2 demethylases is vital for ESC self-renewal and early development. *The EMBO Journal*, doi 10.15252/embj.201593317.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**: 901–906.
- Ren J, Jin P, Wang E, Marincola FM, Stroncek DF. 2009. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells. *Journal of Translational Medicine* **7**: 20.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. 2004. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Research* **14**: 1902–1910.
- Rosa A, Spagnoli FM, Brivanlou AH. 2009. The miR-430/427/302 Family Controls Mesendodermal Fate Specification via Species-Specific Target Selection. *Developmental Cell* **16**: 517–527.
- Sakuma R, Ohnishi Yi Y, Meno C, Fujii H, Juan H, Takeuchi J, Ogura T, Li E, Miyazono K, Hamada H. 2002. Inhibition of Nodal signalling by Lefty mediated through interaction with common receptors and efficient diffusion. *Genes to Cells* **7**: 401–412.
- Savatier P, Lapillonne H, van Grunsven LA, Rudkin BB, Samarut J. 1996. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* **12**: 309–322.

- Suh M-R, Lee Y, Kim JY, Kim S-K, Moon S-H, Lee JY, Cha K-Y, Chung HM, Yoon HS, Moon SY, Kim VN, Kim K-S. 2004. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Developmental Biology* **270**: 488–498.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**: 663–676.
- Tam PPL, Loebel DAF. 2007. Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nature Reviews Genetics* **8**: 368–381.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **282**: 1145–1147.
- Till JE, McCulloch EA. 1961. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* **14**: 213–222.
- Wade SL, Langer LF, Ward JM, Archer TK. 2015. MiRNA-Mediated Regulation of the SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex Controls Pluripotency and Endodermal Differentiation in Human ESCs. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* **33**: 2925–2935.
- Wang J, Park JW, Drissi H, Wang X, Xu R-H. 2014. Epigenetic Regulation of miR-302 by JMJD1C Inhibits Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry* **289**: 2384–2395.
- Whitman M. 2001. Nodal signaling in early vertebrate embryos: themes and variations. *Developmental Cell* **1**: 605–617.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**: 855–862.
- Wilson KD, Venkatasubrahmanyam S, Jia F, Sun N, Butte AJ, Wu JC. 2009. MicroRNA Profiling of Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells and Development* **18**: 749–757.
- Witt O, Sand K, Pekrun A. 2000. Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood* **95**: 2391–2396.
- Yoo AS, Staahl BT, Chen L, Crabtree GR. 2009. MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature* **460**: 642–646.
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. 2004. Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell* **118**: 57–68.
- Zhang P, Li J, Tan Z, Wang C, Liu T, Chen L, Yong J, Jiang W, Sun X, Du L, Ding M, Deng H. 2008. Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood* **111**: 1933–1941.
- Zhang Z, Hong Y, Xiang D, Zhu P, Wu E, Li W, Mosenson J, Wu W-S. 2015. MicroRNA-302/367 Cluster Governs hESC Self-Renewal by Dually Regulating Cell Cycle and Apoptosis Pathways. *Stem Cell Reports* **4**: 645–657.

Vilken roll har miR-302 i humana embryonala och inducerade pluripotenta stamceller?: Etisk bilaga

Stefan Public

Självständigt arbete i biologi 2017

Är det etiskt rätt att använda humana embryon som källa för forskning kring embryonala stamceller?

Humana embryonala stamceller (hESC) har sitt ursprung från inre cellmassan av blastocysten som är det tidiga stadiet av embryots utveckling. De utvecklas vid femte dagen efter befruktningen av oocyten. hESC har förmåga att förnya sig själva samt att utvecklas till de tre groddbladen, endodermet, ektodermet och mesodermet. Därför är de bästa kandidater för regenerativ medicin och vävnadsersättning efter skada eller sjukdom. Forskningen kring humana embryonala stamceller involverar utveckling och användning av embryon samt deras destruktion. En av kärnfrågorna kring embryonala stamceller för forskning är om det är etiskt rätt att använda dessa celler.

Frågan ”när börjar livet?” är väldigt kontroversiell och nära kopplad till debatten om abort. Många människor tror att dessa embryon har en stor potential att utvecklas till människor och därför borde ett embryo i dessa stadier ha samma rättsliga och moraliska status som en vuxen individ eller ett barn. Religionens syn på frågan är att destruktionen av humana embryon är detsamma som att mörda en person.

Förespråkarna har en annan syn på saken och anser att embryonala stamceller inte är människor i egentlig mening. Dessa celler har sitt ursprung i inre cellmassan och även om de kan utvecklas till de flesta celltyper så är de inte i stånd att utvecklas till extraembryoniska membranet eller till moderkakan. Därför kan inte inre cellmassan utvecklas till foster och sedan till barn. Dessutom har inte dessa celler utvecklats till färdiga organ och de kan anses vara ekvivalenta som en somatisk cell.

Det mest känsliga ämnet i den här debatten är hur dessa celler isoleras. Jag tycker att dessa embryon inte har samma rättsliga och moraliska status som en fullutvecklad individ. Först och främst måste man förstå att hESC har sitt ursprung i embryon och inte i foster. Ett embryo utvecklas under det tidiga stadiet efter ägget har befruktats medan ett foster är det utvecklade embryot med armar och ben som har börjat växa. Det går enligt mig inte att likställa ett embryo med en vuxen individ och därmed heller inte med dess etiska rättigheter.

För att återgå till frågan ”när börjar livet?” kan man också resonera kring huruvida ett liv kan vara mer värt än ett annat. Syftet med den här typen av forskning är att med alternativa sätt kunna behandla olika sjukdomar som exempelvis cancer och Alzheimers. Det handlar alltså om att hjälpa människor som kämpar för sina liv på daglig basis. Den här typen av forskning kan alltså leda till att dessa människor som exempelvis lider av en kronisk sjukdom eller har dåligt fungerande organ kan få hjälp. Därför anser jag att den moraliska skyldigheten att hjälpa en människa som lider slår högre än att ge ett outvecklat embryo en förutsättning till ett eventuellt fortsatt liv.