

Subproject 17: The role of miRNAs associated to AGO2 during differentiation of bovine stem cells

Principal Investigator: *Flávio Vieira Meirelles*

Abstract

Cell-secreted vesicles (exosomes and microvesicles) have emerged in recent years as mediators of cell communication in different tissues and cellular processes. Exosomes and microvesicles are secreted by different cells in the body and are capable to carry information from a donor to a target cell. Exosomes (30-100nm) and microvesicles (100-1000nm) can transport bioactive material such as miRNAs, mRNAs, DNA and proteins. Thus, vesicular contents can be used as diagnostic and therapeutical tools to detect and treat different diseases. Argonaute 2 (AGO2) protein is part of silencing complex, responsible for driving the base pairing between miRNA and target mRNA. AGO2 protein is present in exosomes and microvesicles, thus facilitating the delivery of miRNA-AGO2 complex to target cells and then promote the silencing of mRNAs. Recently, was suggested that cell-secreted vesicles mediated the paracrine effects of cardiac stem cells transfer. Indeed, transfers of cell-secreted vesicles achieved similar results as transferring cardiac stem cells.

Hypothesis: Cell-secreted vesicles derived from fetal mice fibroblast monolayer exposed to differentiating medium are capable to induce cell differentiation through the transfer of miRNAs associated to AGO2 protein.

Specific Goals

- 1- Identify the profile of miRNAs associated to AGO2 in extracellular vesicles secreted by fetal mice fibroblasts after culture in Stem Cells differentiation media.*
- 2- Determine the miRNA-target mRNA interaction after treatment of bovine IPS cells with extracellular vesicles isolated from fetal mice fibroblasts using co-immunoprecipitation.*
- 3- Determine the effects of inhibitors of miRNAs associated to AGO2 following treatment of Stem Cells with extracellular vesicles secreted by fetal mice fibroblasts.*

Expectation

Our goal is to determine the function of miRNAs associated to AGO2 protein, and present in extracellular vesicles. Initially, we will perform miRNA analysis to identify miRNA-mRNA complexes associated to AGO2. Using bioinformatics tools we will identify targets related to epigenetic control and pluripotency factors. Following miRNAs identification, we will use miRNAs inhibitors to knockdown the effects of the AGO2-miRNA transfer, in order to investigate the effects on cell nuclear reprogramming. Therefore, this subproject is innovative and is investigating a possible new mechanism involved during cell reprogramming events.

Implementation schedule

	2015 (Jan-Dec)	2016 (Jan-Dec)	2017 (Jan-Dec)	2018 (Jan-Dec)	2019 (Jan-Dec)	2020 (Jan-Dec)
Goal 1	Experiments	Experiments	Experiments	Experiments Article preparation		
Goal 2	Experiments	Experiments	Experiments	Experiments	Experiments	Experiments Article preparation
Goal 3			Experiments	Experiments	Experiments	Experiments Article preparation

Researchers

Fabiana Fernandes Bressan

Flávio Vieira Meirelles

Juliano Rodrigues Sangalli

Felipe Percin

Juliano Coelho da Silveira

Rafael Vilar Sampaio

Collaboration:

George Seidel

Gerrit J. Bouma

Quinton A. Winger

References

Sarkies, P; and Miska, E. **Small RNAs Break Out: The Molecular Cell Biology of Small RNAs.** Nature Reviews, August, 2014

Lai, R.C; Chen, T. S; Lim, S.K. **Mesenchymal stem cell exosomes: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease.** *Regen. Med.* (2011) 6(4), 481–492

Zhiyuan, Lv; Wei, Y; Wang, D; Zhang, C; Zen, K; Li, L. **Argonaute 2 in Cell-Secreted Microvesicles Guides the Function of Secreted miRNAs in Recipient Cells.** Plos One, July, 2014

Mulcahy, L.A.; Pink, R.C.; Carter, D.R.F. **Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake.** *Journal of Extracellular Vesicles.* August, 2014

Da Silveira, J.C.; Rao Veeramachaneni, D.N.; Winger, Q.A., Carnevale, E.M.; Bouma, G.J. **Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain Proteins: A Possible New Form of Cell Communication Within the Ovarian Follicle.** *Biology of Reproduction,* November, 2011

SUBPROJETO 17: Estudo da função de miRNAs associados a AGO2 no processo de diferenciação em cultivo de células tronco de bovino

Pesquisador Responsável: *Flávio Vieira Meirelles*

Vesículas secretadas por células (exossomos e microvesículas) emergiram nos últimos anos como mediadores da comunicação celular em diferentes tecidos e processos celulares. Estas vesículas secretadas por diferentes células do organismo são capazes de mediar a comunicação celular entregando os conteúdos de uma célula doadora para uma célula alvo receptora. Exossomos (30-150nm) e microvesículas (100-1000nm) são carreadores de miRNA, mRNAs, DNA e proteínas. Seus conteúdos podem ser usados para o diagnóstico assim como uma nova ferramenta terapêutica para o tratamento de doenças. A proteína Argonauta 2 (AGO2) é parte de um complexo proteico responsável pelo pareamento de bases entre o miRNA e o mRNA alvo. A proteína AGO2 é presente em exossomos e microvesículas, portanto facilitando a entrega de miRNAs prontos para atuar silenciando os mRNAs alvos. Recentemente, foi hipotetizado que os efeitos parácrinos da transferência de células tronco cardíacas são mediados por vesículas secretadas por células. Como esperado, estas vesículas uma vez transferidas para o paciente foram capazes de causar os mesmos efeitos obtidos pela transferências das células tronco geradoras das mesmas.

Hipótese: *Vesículas secretadas por monocamadas de fibroblastos de fetos de camundongo expostas a meio de diferenciação induzem a diferenciação celular através da transferência de miRNAs ligados a proteína AGO2.*

Objetivos

- 1.** Identificar o perfil de miRNAs associados a AGO2 em vesículas secretadas por fibroblastos de camundongos após o cultivo em meios de diferenciação.
- 2.** Determinar a interação miRNA-mRNA alvo utilizando co-imunoprecipitação.
- 3.** Determinar os efeitos do knockdown de miRNAs associados a AGO2 após o tratamento com vesículas secretadas por fibroblastos de fetos de camundongos.

Metas

Este subprojeto busca determinar a função de miRNAs associados a proteína AGO2 presentes em vesículas extracelulares. Inicialmente serão determinados quais miRNAs estão em associação e em segundo lugar quais os alvos, baseados em bioinformática. A procura por moduladores epigenéticos e de fatores de pluripotência serão os principais alvos deste subprojeto. Por fim a meta será o knockdown dos miRNAs transportados entre células associado a proteína AGO2, bloqueando assim o evento de reprogramação causado pelo tratamento destas células com vesículas carreadoras de miRNAs-AGO2.

Cronograma de execução referente a seis anos de projeto

	2015 (Jan-Jun)	2016 (Jul-Dez)	2017 (Jan-Jun)	2018 (Jan-Dez)	2019 (Jan-Dez)	2020 (Jul-Dez)
Objetivo 1	Experimentos	Experimentos	Experimentos	Experimentos Redação de artigos		
Objetivo 2	Experimentos	Experimentos	Experimentos	Experimentos	Experimentos	Experimentos Redação de artigos
Objetivo 3			Experimentos	Experimentos	Experimentos	Experimentos Redação de artigos

PESQUISADORES

Fabiana Fernandes Bressan

Flávio Vieira Meirelles

Juliano Rodrigues Sangalli

Felipe Percin

Juliano Coelho da Silveira

Rafael Vilar Sampaio

PESQUISADORES COLABORADORES:

George Seidel

Quinton A. Winger

Gerrit J. Bouma

Referências

Sarkies, P; and Miska, E. **Small RNAs Break Out: The Molecular Cell Biology of Small RNAs.** Nature Reviews, August, 2014

Lai, R.C; Chen, T. S; Lim, S.K. **Mesenchimal stemm cell exosoms: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease.** *Regen. Med.* (2011) 6(4), 481–492

Zhiyuan, Lv; Wei, Y; Wang, D; Zhang, C; Zen, K; Li, L. **Argonaute 2 in Cell-Secreted Microvesicles Guides the Function of Secreted miRNAs in Recipient Cells.** Plos One, July, 2014

Mulcahy, L.A.; Pink, R.C.; Carter, D.R.F. **Routes and mechanisms of extracelular vesicle uptake.** *Journal of Extracellular Vesicles.* August, 2014

Da Silveira, J.C.; Rao Veeramachaneni, D.N.; Winger, Q.A., Carnevale, E.M.; Bouma, G.J. **Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain Proteins: A Possible New Form of Cell Communication Within the Ovarian Follicle.** *Biology of Reproduction,* November, 2011