



Hanna Kukkonen

Indusoitujen pluripotenttien kantasolujen erilaistaminen ruskeiksi rasvasoluiksi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

10.05.2022

Tekijä	Kukkonen Hanna
Otsikko	Indusoitujen pluripotenttien kantasolujen erilaistaminen ruskeiksi rasvasoluiksi
Sivumäärä	33 sivua + 5 liitettä
Aika	10.05.2022
Tutkinto	Sosiaali- ja terveystieteiden ammattikorkeakoulututkinto
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaajat	Merja Ojala, lehtori Henna Tyynismaa, professori Riitta Lehtinen, laboratoriomanageri Jana Pennonen, laboratoriomanageri Jayasimman Rajendran, tutkijatohtori
<p>Ruskea rasvakudos on puhututtanut paljon mahdollisena terapeuttisen hoitokeinona liikalihavuuden hoidossa. Adipogeneesi eli rasvasolujen erilaistuminen, niiden tarkan alkuperän ymmärtäminen sekä toimivan erilaistamisen protokollan luominen on ollut kuitenkin haastavaa. Mitokondriot ovat suuressa osassa ruskeiden rasvasolujen toimintaa, sillä ne kuluttavat energiaa luomalla lämpöä termogeneesiksi kutsutun reaktion avulla. Mitokondrioiden aktiivisuuden mahdollinen lisääminen voisi edesauttaa energian kulutuksen merkittävää lisäämistä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli luoda indusoiduista pluripotentteista kantasoluista aktiivisia ruskeita rasvasoluja mukailemalla Vidal-Puig laboratorion hiljattain julkaisemaa protokollaa.</p> <p>Opinnäytetyön aihe saatiin Helsingin yliopiston Henna Tyynismaan metabolian ja kantasolujen tutkimusryhmältä. Opinnäytetyö on tehty yhteistyössä heidän kanssaan sekä tutkimuksellinen osio on suoritettu heidän laboratoriossaan.</p> <p>Tutkimuksessa käytetyt indusoidut pluripotentit kantasolut olivat terveitä 24.3 kontrollisolulinjan indusoituja pluripotentteja kantasoluja. Soluja lähdettiin erilaistamaan kohti ruskeita rasvasoluja soluviljelymenetelmän avulla. Soluja ohjattiin kasvatusliuosten komponentteja vaihtamalla kohti ruskeita rasvasoluja. Solujen transkriptiotekijöitä ja ruskeille rasvasoluille ominaisia markkereita tutkittiin reaaliaikaisen kvantitatiivisen polymeerasiketjureaktion avulla. Markkereina käytettiin MYF5, PDGFRα, PLIN1, EBF2, ADRβ3, DIO2, UCP1 ja PRDM16 geenejä. Oil red -O värjäyksen avulla tarkasteltiin rasvan muodostumista soluihin sekä rasvan määrää. Solujen morfologiaa, määrää ja aktiivisuutta tarkasteltiin mikroskoopilla päivittäin.</p> <p>Tuloksien perusteella ei voitu varmistua solujen olevan ruskeita rasvasoluja. Solujen lipidien muodostuminen olivat ruskeille rasvasoluille ominaisesti pieniä ja runsaslukuisia, mutta UCP1 ekspressio ei ollut lisääntynyt RT-qPCR tuloksissa. Tämä viittaa siihen, että erilaistuneet solut olivat rasvasoluja, mutta eivät aktiivisia ruskeita rasvasoluja, jotka kykenevät termogeneesiin ja energiankulutuksen lisäämiseen.</p>	
Avainsanat	Ruskeat rasvasolut, mitokondriot, soluviljely, indusoidut pluripotentit kantasolut, adipogeneesi, UCP1

Author	Kukkonen Hanna
Title	Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells to Brown Adipocytes
Number of Pages	33 pages + 5 appendices
Date	10.05.2022
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Program	Biomedical laboratory scientist
Instructors	Merja Ojala, Senior Lecturer Henna Tynismaa, Professor Riitta Lehtinen, Laboratory Manager Jana Pennonen, Laboratory Manager Jayasimman Rajendran, Postdoctoral Researcher
<p>Brown adipose tissue has been a major interest in the field to help the battle against obesity and its various comorbidities. One example being type 2 diabetes mellitus. Brown adipose tissue has uniquely multiple mitochondria which not only act as the power house of the cell but dissipate energy in form of heat in reaction called thermogenesis. This unique character could act as a therapeutic treatment for obesity by activating the mitochondria and its UCP1 proteins. However, adipogenesis needs to be studied and characterized so we are able to verify fully working protocol for brown adipose differentiation and later on verify the link between brown adipocytes in obesity treatment.</p> <p>Aim of this study was to differentiate induced pluripotent stem cells to mature brown adipocytes. In this study was used Vidal-Puig laboratory's freshly published protocol for brown adipocyte differentiation. Stem cells that were used in this study were healthy control cell line cells 24.3. Cells were derived towards brown adipocytes by different chemically induced medias using basic cell culturing methods. This study was conducted in a collaboration with University of Helsinki in the laboratory of Henna Tynismaa at the Research Program of Stem Cells and Metabolism.</p> <p>Reverse transcriptase polymerase chain reaction was used to compare the brown adipocyte markers between differentiated and nondifferentiated cells. Gene markers that were used were MYF5, PDGFRα, PLIN1, EBF2, ADRβ3, DIO2, UCP1 and PRDM16. Also, the fully differentiated cells were dyed using Oil red O staining which was meant to dye neutral lipids and triglycerides in the cells. The cells were viewed daily by the microscope. The differentiation protocol was carried out only once because the time limitations of this study.</p> <p>The results indicated that some adipogenesis was occurring based on the Oil red O staining and lipid accumulation seen by microscope. However, the reverse transcriptase polymerase chain reaction did not have any difference between iPS-cells and mature brown adipocytes in UCP1. Therefore, it is safe to assume that the differentiated cells were adipocytes but not active brown adipocytes which would be able to carry out thermogenesis and increase energy expenditure.</p>	
Keywords	Brown adipocytes, mitochondria, cell culture, induced pluripotent stem cells, adipogenesis, UCP1

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Ruskea rasvakudos	2
2.1	Adipogeneesi	2
2.2	Mitokondriot	3
2.3	Termogeneesi	4
2.4	Insuliiniresistenssi	5
3	Kantasolut	6
3.1	Alkioperäiset kantasolut	6
3.2	Kudoskantasolut	6
3.3	Indusoidut pluripotentit kantasolut	7
4	Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	7
5	Opinnäytetyön tiedonkerääminen ja aikataulu	8
6	Opinnäytetyön menetelmät	9
6.1	Soluviljely	9
6.1.1	Solujen viljeleminen maljoille	10
6.1.2	Solujen jakaminen	11
6.1.3	Solujen pakastus	11
6.2	Ruskeiden rasvasolujen erilaistaminen	12
6.3	Visuaalinen analysointi	16
6.4	Solujen värjäys	16
6.5	RT-qPCR	17
6.5.1	RNA-eristys	18
6.5.2	RNA:n käntö cDNA:ksi	19
6.5.3	qPCR	19
7	Tulokset	20
7.1	RT-qPCR tulokset	20
7.2	Mikroskopointi tulokset	22
7.3	Solujen värjäyksen tulokset	23
8	Pohdinta	23
8.1	Tulosten tarkastelu	23
8.2	Eettisyys	24

8.3	Luotettavuus	25
8.4	Johtopäätökset	26
8.5	Kehittämisehdotukset	27
8.6	Ammatillinen kasvu	27

Liitteet

Liite 1. Käytetyt reagenssit

Liite 2. CDM Base valmistus

Liite 3. Pakastusliuos I & II valmistus

Liite 4. Alukkeet / Kohdegeenit

Liite. 5 Laskukaavat

Lyhenteet ja suomennokset

ADP	adenosine diphosphate, adenosiinidifosfaatti
ADRB3	3 Adrenoceptor Beta 3, Beta-adrenerginen reseptori
ATP	adenosine triphosphate, adenosiinitrifosfaatti
BMI	Bodymassindex, kehon paino indeksi
BMP7	Bone morphogenetic protein 7, Luun morfogeneettinen proteiini 7
CDM	Chemically modified medium, Kemiallisesti muunneltu kasvatusliuos
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid, Komplementaarinen DNA
cMyc	Cellular myelocytomatosis oncogene. c- myelosytomatoosi onkogeeni
CoA	Coenzyme A, Koentsyymi A
DIO2	Iodothyronine Deiodinase 2, dejodinaasientsyymi 2
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium.
DMEM/F12	Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12.
DMSO	Dimethyl sulfoxide, dimetyylisulfoksidi.
DNA	Deoxyribonucleic acid, deoksiribonukleiinihappo
EBF2	aikainen B solu tekijä 2, early B cell factor 2.
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, etyleenidiamiinitetraetikkahappo
FBS	fetal bovine serum, naudansikiön seerumi, reagenssi
FADH ₂	Dihydroflavine-adenine dinucleotide, flaviiniadeniininukleotidi, elektroni
FGF2	Fibroblast growth factor 2, fibroblasti kasvutekijä 2
GAPDH	Glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi.
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
IMDM	Iscove's modified dulbecco's medium
IPS	Induced pluripotent stem cell
KLF4	Kruppel-like factor 4, kruppelin kaltainen tekijä 4.
LDN	Dihydrochloride, dihydrokloridi
MtDNA	Mitochondrial DNA, Mitokondriaalinen DNA
MYF5	Myogenic factor 5, myogeeninen tekijä 5
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide, nikotiiniamidiadeniininukleotidi.
OCT-4	Octamer-binding transcription factor 4.
ORO	Oil red O, rasvasolujen lipidien värjäys
PBS	Phosphate buffered saline, Fosfaatti purskuroitu saliini
PFA	Paraformaldehyde, Paraformaldehydi
PDGFR α	Platelet-derived growth factor receptor alpha.
pH	Potential hydrogen

PLIN1	Perilipin 1, perilipiini 1
PPAR- γ	peroksisome proliferation receptor gamma, peroksisomiproliferaattorin aktivoima reseptori gamma.
PRDM16	PR domain containing 16, pr domainin sisältäen 16
RA	Retinoic acid, retinoiinihappo
RNA	Ribonucleid acid, ribonukleiinihappo
RT-qPCR	Reverse transcription polymerase chainreaction, Käänteiskopiointi polymeraasi ketjureaktio
ROCK	Rho-kinase, Rho-kinaasi
SOX2	Sex determining region- γ box 2.
SYBR	Synergy brands
T3	Triiodothyronine, trijodityroniini
UCP1	Uncoupling protein 1, irtikytkentäproteiini-1

1 Johdanto

Yleisimpiä kuolinsyitä maailmalla ovat liikalihavuus ja sen aiheuttamat sairaudet kuten diabetes sekä sydän- ja verisuonitaudit (WHO 2020). Tutkimukset ovat todistaneet, että ruskean rasvan aktiivisuus ja sen kyky kuluttaa energiaa lämmöntuotannon avulla voisivat olla merkittävä terapeuttiivinen hoito liikalihavuudessa. Ruskean rasvan kyky kuluttaa energiaa perustuu sen suureen määrään mitokondrioita sekä niiden kykyyn tuottaa lämpöä kylmäältistuksen aikana. Ruskean rasvan hyödyt painonhallinnassa eivät jää vain energian kuluttamiseen vaan on myös näyttöä sen osuudesta ruokahalun hillinnässä sekä rasva-aineenvaihdunnassa. Ruskean rasvan aktiivisuus korreloi alhaisen painoindeksin (BMI) sekä alhaisen rasvaprosentin kanssa. Kiinnostus ruskeaa rasvaa ja sen aktiivisuutta kohtaan on ollut viime vuosina nousussa. Kuitenkin ruskean rasvan tutkiminen on ollut haastavaa sen vähäisen määrän sekä usein sen vaikean sijainnin takia ihmiselimistössä. Tämän seurauksena ruskean rasvan kehittymisestä sekä erilaistumisesta on vain rajoitetusti tietoa nykypäivänä. Lisäksi suurin osa tutkimuksista käsittelee hiirillä tehtyjä tutkimuksia. (Laurila 2021: 19; Carobbio & Rosen & Vidal-Puig 2013: 75.)

Indusoitujen pluripotenttien kantasolujen (iPS-solut) avulla pystytään tutkimaan solujen erilaistumista, mallintamaan tauteja sekä testaamaan uusia hoitomuotoja. Kyky tuottaa ja kasvattaa suuria solumääriä suhteellisen lyhyessä ajassa antaa tehokkaan mahdollisuuden päästä käsiksi ruskean rasvan alkuperään, erilaistumiseen sekä aktiivisuuden säätelyyn. (Carobbio ym. 2013: 75; Brown 2019: 4.) IPS-solut on luotu uudelleenohjelmoimalla jo erilaistuneita somaattisia soluja takaisin pluripotentiin eli erilaistumiskykyiseen tilaan (Wartiovaara & Partanen & Heino 2015: 77). IPS-solut mallintavat alkion soluja, joilla on kyky muuttua miksi tahansa elimistön soluiksi. Tämän teknologian johdosta pystytään luomaan vaikeastikin saatavien solutyypin verrokkeja esimerkiksi sydänlihassoluja. IPS-solujen käyttö on uutta teknologiaa, mutta sen hyödyllisyys ja toimivuus on osoitettu jo useiden tutkimusten kautta. (Kilpinen & Trokovic & Loukola & Otonkoski 2021: 4.)

Tässä opinnäytetyössä oli tarkoituksena perehtyä indusoitujen pluripotenttien kantasolujen viljelyyn ja niiden erilaistamiseen ruskeiksi rasvasoluiksi. Englantilaisen Vidal-Puig tutkimusryhmän ruskean rasvan erilaistamisprotokolla pyrittiin toistamaan sekä varmistamaan toimivaksi. Opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä Helsingin yliopiston kantasolujen

ja metabolian tutkimusohjelman Tynnismaan tutkimusryhmän kanssa. Opinnäytetyöstä toivotaan olevan hyötyä tutkimusryhmän ruskean rasvakudoksen ja mitokondrioiden tutkimuksessa.

2 Ruskea rasvakudos

Ruskeaa rasvakudosta tavataan useimmiten talviunta viettävillä nisäkkäillä. Ihmisillä sitä esiintyy eniten vastasyntyneillä. Aikuisiällä ruskeiden rasvasolujen määrä kuitenkin vähenee, mutta niitä voidaan havaita mm. solisluiden seudulla kaulalla sekä selkärangan vieressä. (Orava 2014: 13.)

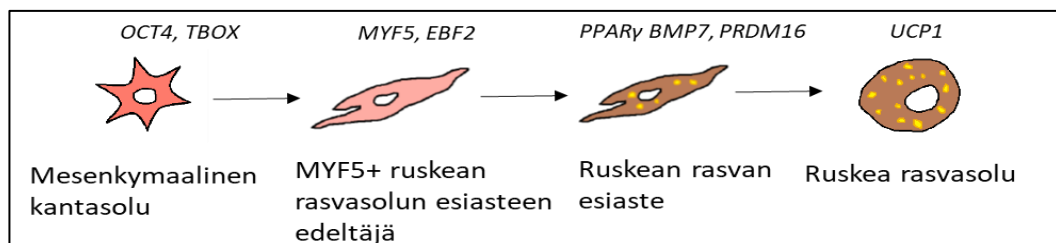
Ruskea rasvakudos on energiaa kuluttavaa ja sille tyypillisiä ovat merkittävä mitokondrioiden määrä, pienet lipidipisarot sekä runsas verisuonisto ja hermosto. Ruskean rasvan pääasiallinen tehtävä ihmiselimistössä on toimia lämmöntuottajana kylmäältistuksen aikana, kun taas valkoinen rasvakudos toimii energiavarastona. Runsaan verisuoniston ansiosta luotu lämpö pystytään kuljettamaan tehokkaasti muualle elimistöön. Ruskean rasvakudoksen määrän sekä aktiivisuuden on todettu olevan sidoksissa ikään ja painoon. Ylipainoisilla on siten vähemmän aktiivista ruskeaa rasvaa kuin normaali-painoisilla. (Laurila & Laheesmaa & Nuutila & Virtanen 2020: 625–627.)

2.1 Adipogeneesi

Rasvasolut erittävät endokriinisia hormoneja sekä varastoivat lipidejä. Adipogeneesi eli rasvasolujen erilaistuminen onkin riippuvainen monista endokriinisistä hormoneista kuten kasvuhormoneista, insuliinista sekä steroidihormoneista. Monet transkriptiotekijät eli proteiinit, jotka osallistuvat DNA:n muokkaamiseen RNA:ksi ovatkin tärkeässä osassa adipogeneesiä. (Mota de sa & Richard & Hang & Stephens 2017: 640.)

Ruskeat rasvasolut polveutuvat MYF5⁺ (engl. Myogenic factor 5⁺) esiasteen soluista (Brown 2019: 5). Peroxisomiproliferaattorin aktivoima reseptori γ (PPAR- γ) on tärkeä transkriptiotekijä molempien rasvasolutyyppien erilaistumisessa. PPAR- γ osallistuu mm. insuliiniherkkyyden säätelyyn, rasvasolujen ylläpitoon sekä lipogeneesiin eli rasvahappojen synteesiin. (Lefterova & Haakonsson & Lazar & Mandrup 2014: 8.) Ruskeat rasvasolut tarvitsevat adipogeneesiin myös luun morfogeneettisen proteiinin 7 (BMP7) sekä transkriptionaalisen PRDM16 (engl. Co-regulator domain containing 16) toimin-

taa erilaistua kypsyksi ruskeiksi rasvasoluiksi. Ruskealle rasvalle ominaisia geenimarkkereita ovat lisäksi mm. EBF2 (engl. Early B cell factor) ja PDGFR α (engl. Platelet-derived growth factor α). EBF2 on ruskean rasvan esiastevaiheessa olevien solujen markkeri ja se osallistuu ruskean rasvan transkription säätelyyn. PDGFR α on taas ruskean rasvan esiasteen solujen pinta markkeri. Solujen, jotka omaavat tämän solun pintamarkkerin on todistettu ilmentävän ruskean rasvan mitokondriaalisia geenejä (Wang ym. 2014: 14467; Lee & Schmidt & Lai & Ge 2019: Brown 2019: 4.) Ruskean rasvan adipogeneesi malli on kuvattu kuvassa 1.



Kuva 1. Adipogeneesi malli. Muokattu kirjasta Kierszenbaum & Tres 2016: 138. OCT4 pluripotenssi markkeri, TBOX mesodermaalinen markkeri, MYF5 paraksiaalinen mesodermi markkeri, EBF2 ruskean rasvan esiaste markkeri, PPAR γ aineenvaihdunta markkeri, BMP7 edistää ruskeiden rasvasolujen erilaistumista, PRDM16 adipogeneesin edistäjä markkeri, UCP1 termogeeninen markkeri.

2.2 Mitokondriot

Mitokondriot tunnetaan useimmiten solujen energiatehtaana, ne kuitenkin osallistuvat myös steroidigeneesiin eli steroidihormonien tuotantoon, solukuoleman säätelyyn sekä lämmön tuotantoon ruskeissa rasvasoluissa (Kierszenbaum & Tres 2016: 82). Niiden uskotaan olleen erillisiä bakteereita, jotka yhdistyivät eukaryootti solujen kanssa aikojen saatossa. Tätä teoriaa tukee muun muassa se, että mitokondriot omaavat mitokondriaalista DNA:ta (mtDNA) sekä kykenevät itsenäiseen jakautumiseen. (Polinati 2015: 15; Heiskanen & Pirinen 2020: 1005–1006.) Mitokondriot ovat jatkuvassa vuorovaikutuksessa toistensa kanssa, ne fuusioituvat eli sulautuvat yhteen ja fissionituvat eli eroavat taas kahdeksi mitokondrioksi. Fuusioitumisen aikana mitokondriot voivat jakaa keskenään proteiineja, kalvorakenteita sekä elektrokemiallisia gradientteja. (Liu & McIntyre & Janssens & Houtkoopre 2020: 1–2.)

Mitokondriot ovat muodostuneet kahdesta kalvosta sisä- ja ulkokalvosta. Sisempi kalvo on laskostunut ja ulompi ei. Sisemmän kalvon sisään jäävää tilaa kutsutaan matriksiksi ja kalvon laskoksia kristoiksi. Mitä enemmän näitä kristoja esiintyy, sitä vilkkaampaa

energian tuotanto on. Kristat lisäävät sisäkalvon pinta-alaa, sallien suurempien protonimäärien läpäisevyyden. Ruskean rasvan mitokondrioiden sisäkalvo on vahvemmin laskostunut kuin valkoisten rasvasolujen mitokondrioiden. (Kierszenbaum & Tres 2016: 79; Hangan 2020: 17.)

Mitokondriot tuottavat soluille energiaa oksidatiivisen fosforylaation kautta hapettamalla ravintoaineita kuten lipidejä tai glukoosia adenosinitrifosfaatti (ATP) muotoon. ATP:n tuottamiseen kuuluu kolme vaihetta. Ensimmäisenä vaiheena on glykolyysi, jossa glukoosi hapetetaan pyruvaateiksi. Glykolyysin jälkeen pyruvaatit kuljetetaan matriksiin, missä ne muuntuvat asetyylikoentsyymi A:ksi (CoA). CoA:ta hyödynnetään sitruunahappokierrossa tuottamaan hiilidioksidia sekä korkeaenergiaa elektroneja nikotiiniamiidadieniinidinukleotideja (NADH) ja flaviinadieniinukleotideja (FADH₂), jotka toimivat elektroninsiirtäjinä elektroninsiirtoketjussa. Elektronit siirtyvät elektroninsiirtoketjussa vaiheittain alemmalle energiatasolle vapauttaen samalla energiaa. (Koene & Smeitink 2013: 127; Kierszenbaum & Tres 2016: 80–82; Polinati 2015: 16–19.)

ATP:n lopullinen reaktio tapahtuu mitokondrioiden sisemmällä kalvolla, jossa hyödynnetään kalvopotentiaalin muutoksia ja energiansiirtoketjussa syntyneitä energiaa protonien siirtoon matriksin ja ulko- ja sisäkalvon välitilan välillä. Näin ATP-syntaasi eli kompleksi V pystyy muuntamaan adenosinidifosfaatin (ADP) ATP:ksi. Ruskeiden rasvasolujen mitokondriot kuitenkin energian tuotannon sijaan kuluttavat energiaa. Tämä perustuu protonien ATP-synteesin ohittamiseen ja potentiaalienergian vapauttamiseen lämmöksi. (Kierszenbaum & Tres 2016: 80–82; Heiskanen & Pirinen 2020: 1006.)

2.3 Termogeneesi

Ihmisen altistuessa kylmälle, keho alkaa toimia elimistön lämpötilan ylläpitämiseksi. Ruskean rasvan lämmöntuotanto tapahtuu biokemiallisten reittien kautta muuttamalla lipidien sisältämää energiaa lämmöksi. Ruskean rasvan toiminnan säätelyssä vaikuttavat sympaattinen hermosto sekä hormonit kuten insuliini ja kilpirauhashormonit. (Brown 2019: 3.)

UCP1 eli irtikytkentäproteiini 1 on ruskealle rasvalle ominainen termogeneesin eli lämmöntuotannon aikaansaaja. Näitä proteiineja sijaitsee ruskeiden rasvasolujen mitokondrioiden sisemmällä kalvolla. (Carobbio ym. 2021: 641.) Elimistön altistuminen kyl-

mälle saa aikaan sympaattisen hermoston aktivoitumisen ja noradrenaliinin vapautumisen. Noradrenaliinin sitoutuminen beeta-3-adrenoreseptoreihinsa (β 3AR) laukaisee lipolyysin eli lipidien hajoamisreaktion. β 3AR onkin todettu olevan tärkeässä osassa termogeneesiä sekä rasvahappojen metaboliaa. (Cero ym. 2021: 2.) Lipolyysissä syntyneitä vapaita rasvahappoja käytetään mitokondrioissa oksidatiivisessa fosforylaatiossa luomaan energiaa ATP:n muodossa. Ruskeiden rasvasolujen mitokondrioissa UCP1 kytkee kuitenkin ATP:n pois soluhengityksestä, jolloin tuotettu energia vapautuu lämpönä. (Laurila 2021: 21–22; Brown 2019: 3.)

Kilpirauhashormonit trijodityroniini (T3) ja tyroksiini (T4) ovat tärkeä osa ruskeiden rasvasolujen toimintaa, sillä ne lisäävät UCP1 aktiivisuutta (Laurila ym. 2020: 628–629; Poher ym. 2015: 4). Ilman DIO2 (engl. Deiodinase 2) geenin aktiivisuutta, tyroksiinin muuntaminen trijodityroniiniksi ei onnistu ja lämmöntuottaminen mitokondrioissa jää vähäiseksi (Yau & Yen 2020: 4).

2.4 Insuliiniresistenssi

Insuliini on hormoni, joka toimii energia-aineenvaihdunnan säätelijänä. Sen vapautuminen vereen estää lipolyysiä eli rasvasolujen hajoamista rasvahapoiksi. Insuliiniresistentsit rasvasolut reagoivat insuliinin signaaleihin poikkeavasti, jolloin insuliini ei kykene rajoittamaan rasvahappojen pitoisuutta plasmassa. Insuliiniresistenssi johtaa mitokondrioiden toiminnan heikkenemiseen sekä aiheuttaa insuliiniresistenssin kohoamista myös muissa kudoksissa. (Mäkinen & Skrobuk & Nguyen & Koistinen 2013: 2117–2118.)

Ruskean rasvan on todettu olevan insuliiniherkkää kudosta. Ruskean rasvan aktiivisuuden puute onkin useiden tutkimuksien mukaan yhteydessä liikalihavuuteen ja liikalihavuus johtaa edelleen insuliiniresistenssiin. Vaikka insuliiniresistenssin sekä liikalihavuuden yhteys ruskean rasvan aktiivisuuteen on edelleen moniselitteinen, tiedetään ruskean rasvan aktiivisuuden vähenevän liikalihavuuden johdosta. (Poher ym. 2015: 1–3; Markussen & Winther & Wicksteed & Hansen 2018: 1; Laurila ym. 2020: 628–627.)

3 Kantasolut

Kantasolut ovat erilaistumattomia soluja, joilla on kyky uusiutua sekä erilaistua toiseksi soluiksi. Kantasolut voidaan luokitella niiden alkuperän sekä muovautuvuuden perusteella. Mitä pidemmälle erilaistuminen etenee, sitä enemmän muovautuvuus vähenee ja toisinpäin. (Zakrzewski & Dobrzyński & Szymonowicz & Rybak 2019: 1.)

3.1 Alkioperäiset kantasolut

Alkioperäiset kantasolut pystyvät tuottamaan jokaisen solutyypin, jota ihmisessä on. Istukan ja sikiön muut ulkopuoliset kudokset mukaan lukien. Hedelmöittynyt munasolu eli tsygootti on tällainen kaikkikykyinen eli totipotentti kantasolu. Totipotentti vaihe päättyy kompaktioon, jossa solut alkavat järjestäytyä ja erota. Nämä varhaiskehityksen solut ovat kuitenkin edelleen erittäin pluripotentteja ja niillä on rajaton uusiutumiskyky. (Zakrzewski ym. 2019: 1–2.)

Sikiönkehityksen aikana tapahtuu paljon solujakautumista eli proliferaatiota. Kasvun aikana solut alkavat erilaistua vaiheittain eri alkiokerroksista, joita ovat ektodermi, mesodermi ja endodermi. Ektodermi on uloin alkiokerroksista ja siitä polveutuvat mm. ihon epiteelisolut, hermosolut sekä hampaan kiillesolut. Mesodermistä taas polveutuvat esimerkiksi lihassolut, veren punasolut sekä munuaisputkisolut. Endodermistä polveutuvat mm. suolen pintasolut, haimasolut sekä keuhkosolut. Jokainen alkiokerros on yhteydessä toisiinsa ja ne toimivat monimutkaisten viestikompleksien välityksellä kokonaisuutena. (Thesleff & Sainio & Sariola 2015: 15.)

3.2 Kudoskantasolut

Aikuisen kantasoluja (kudoskantasolu) on olemassa kaikissa aikuisen kudoksissa, joilla on kyky uusiutua. Aikuisen kantasolut eivät ole alkioperäisten kantasolujen tapaan pluripotentteja. Ne ovat multipotentteja eli ne kykenevät tuottamaan vain tiettyjä solutyyppejä. Esimerkiksi hematopoieettiset kantasolut, jotka voivat erilaistua eri verisoluiksi, mutta eivät muiksi solutyypeiksi. (Helsingin yliopisto 2021.)

Kudoskantasolujen viljeleminen on sitä hitaampaa, mitä vanhemmasta yksilöstä on kyse. Sitä kuvaa esimerkiksi se, että vanhemmat ihmiset eivät parane yhtä nopeasti kuin nuoremmat. (Wartiovaara ym. 2015: 76.) Kudoskantasolut toimivat siis kudoksen

kehityksen ylläpitäjinä. Ne pyrkivät tuottamaan uusia soluja vaurioituneiden tai kuolleiden solujen tilalle. Osa kudostantasoluista tuottaa uusia soluja tasaiseen tahtiin, kun taas osa aktivoituu tuottamaan uusia soluja vain vaurion syntyessä. Iän myötä kudostantasolujen kyky korvata vaurioituneita soluja uusilla heikkenee. (Helsingin yliopisto 2021.)

3.3 Indusoidut pluripotentit kantasolut

Indusoidut pluripotentit kantasolut (iPS-solu) ovat somaattisista kantasoluista viljeltyjä kantasoluja, jotka on keinotekoisesti uudelleenohjelmoitu takaisin pluripotenteiksi eli useakykyisiksi soluiksi. IPS-soluilla pyritään lääketieteessä mallintamaan sekä tutkimaan ihmisissä olevia sairauksia, solujen kehitystä sekä luomaan uusia hoitokeinoja. (Weltner & Trokovic & Otonkoski 2014: 785–786.) IPS-soluteknologia luo turvallisemman sekä eettisemmän tavan uusien solujen luomiseen kuin alkiooperäisten kantasolujen käyttö. Esimerkiksi ihon soluja voidaan muuttaa iPS-soluiksi, joita voidaan edelleen kasvattaa laboratoriossa ja ohjelmoida transkriptiotekijöiden avulla haluttuun suuntaan. Suurena hyötynä voidaan nähdä myös se, että iPS-solut voidaan luoda potilaan omista soluista, jolloin ne vastaavat potilaan soluja myös geneettisesti. Täten voidaan minimoida hylkimisreaktiot potilaan ja saatujen solujen välillä. (Wartiovaara ym. 2015: 78; Zakrzewski ym. 2019: 7.)

IPS-solujen tuottaminen perustuu tiettyjen transkriptiotekijöiden aktivoimiseen, jotta solut saadaan ohjelmoitua takaisin erilaistumiskykyiseen tilaan saaden ne ilmentämään alkion soluille tyypillisiä transkriptiotekijöitä. Shinuya Yamanakan urauurtavassa iPS-solu tutkimuksessa hiiren somaattisille soluille käytettiin neljää transkriptiotekijää OCT4, KLF4, SOX2 ja cMyc, jotka tunnetaan nykyisin ”Yamanakan faktoreina”. (Yamanaka & Takahashi 2006: 666–671; Zakrzewski ym. 2019: 6.)

4 Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyön tarkoituksena oli saada erilaistettua indusoiduista pluripotenteista kantasoluista ruskeita rasvasoluja, käyttämällä Vidal-Puig laboratorion tuotetta protokollaa. Tutkimuskysymykset, joihin haluttiin vastauksia, olivat seuraavat.

1. Mitkä tekijät johtavat ruskeiden rasvasolujen erilaistumiseen?

2. Onko Vidal-Puig laboratorion protokolla toistettavissa onnistuneesti?

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa tietoa ja tuloksia, joita voitaisiin hyödyntää Helsingin yliopiston metabolian ja kantasolujen tutkimusryhmän ruskeaa rasvaa käsittelevässä tutkimuksessa. Opinnäytetyön tavoitteena oli myös tekijän oman osaamisen lisääminen soluviljelyssä sekä tutkimusprojektin kokonaisuuden hahmottamisessa. Tärkeänä tavoitteena nähtiin myös opinnäytetyön tekijän oman ammatillisen kasvun sekä teknisen osaamisen edistäminen soluviljelyssä sekä tutkimuksellisen työn tekemisessä.

5 Opinnäytetyön tiedonkerääminen ja aikataulu

Opinnäytetyöprosessin suunnitelmavaiheessa kerättiin ja luettiin aikaisempaa tutkimustietoa aiheesta, jotta tietotaso ja asian ymmärrys lisääntyisi. Tietoa pyrittiin keräämään mahdollisimman monipuolisista lähteistä, hyödyntäen kirjastoja, verkkoaineistoja, tutkimusartikkeleita sekä itse tutkimusryhmän keräämiä tietoja.

Tietokantoja, joita hyödynnettiin, olivat mm. PubMed, ScienceDirect, ResearchGate ja Google Scholar. Myös Metropolia Ammattikorkeakoulun kirjaston palvelut olivat käytössä. Taulukossa 1 on mainittu käytetyt hakusanat sekä niiden avulla löytyneitä aiheeseen liittyviä lähteitä. Opinnäytetyön aiheeseen liittyvän tiedon keräämisessä käytettiin myös vanhempia julkaisuja, joihin viitataan edelleen uusissakin tutkimusartikkeleissa niiden merkittävyyden takia. Muutoin käytettiin mahdollisimman uusia tutkimusartikkeleita.

Taulukko 1. Aineiston keräämisessä käytetyt hakusanat.

Tietokannat	Hakusanat	Hakutulosten määrä
PubMed	Brown adipose tissue	91
ScienceDirect	induced pluripotent stem cells	840
ScienceDirect	Mitochondria thermogenesis	1281
Google Scholar	stem cells	597000
Pubmed	Uncoupling protein 1	9
Pubmed	brown adipose tissue insulin	23

Opinnäytetyön aikataulu (ks. taulukko 2) määräytyi Metropolia Ammattikorkeakoulun sekä opinnäytetyön tekijän itse asettamien aikataulullisten tavoitteiden mukaan. Opinnäytetyön tutkimuksellinen osuus suoritettiin osana 10 viikkoa kestävästä harjoittelujaksosta, joka sijoittui loka- joulukuulle 2021.

Taulukko 2. Opinnäytetyön aikataulu.

Vaihe	Aika
Suunnitelmavaihe	Syyskuu 2021
Tutkimuksellisen osuuden suorittaminen	Lokakuu 2021 - joulukuu 2021
Tulosten esittely tutkimusryhmälle	17.12.2021
Raportin kirjoittaminen	Tammikuu 2022 - maaliskuu 2022
Opinnäytetyön esittely seminaarissa	5–6.4.2022
Kypsyysnäyte	27.4.2022

6 Opinnäytetyön menetelmät

Toteutusvaiheessa erilaistamisprosessin aikana soluja kerättiin talteen pakastukseen soluviljelyn eri vaiheissa ja lopuksi tutkittiin, ilmensivätkö solut haluttuja geenejä. Solujen analysoinnissa käytettiin RT-qPCR (reverse transcription polymerase chain reaction) -menetelmää ja lipidien muodostumista tarkasteltiin Oil red O- värjäyksen avulla. Analysoinnissa hyödynnettiin myös mikroskopointia, jolloin pyrittiin havainnoimaan solujen morfologian muutoksia, lipidien lisääntymistä sekä solumäärää.

Ruskeiden rasvasolujen erilaistuksessa käytettiin iPS 24.3 kontrollikantasolulinjaa. Terve iPS-kontrollikantasolulinja 24.3 oli ostettu kaupallisena valmiina Biomedicum kantasolukeskuksesta Timo Otonkosken ryhmästä. Tämän opinnäytetyön aikana ei siis ohjelmoitu somaattisia soluja iPS-soluiksi vaan keskityttiin iPS-solujen erilaistamiseen ruskeiksi rasvasoluiksi.

6.1 Soluviljely

Soluviljely tarkoittaa solujen kasvatusta keinotekoisesti säädellyssä ympäristössä. Solut tarvitsevat tarkasti säädellyt olosuhteet kuten pH:n, hiilidioksidipitoisuuden, lämpötilan sekä ravintoaineet. Soluja kasvatettiin +37 °C asteen inkubaattorissa, jonka hiilidioksidipitoisuus oli 5 %. Solut olivat siis vain kasvatusliuosten vaihdon tai muun maljoille

tehtävän työn aikana poissa inkubaattorista. + 37 °C asteen on todettu olevan optimaalinen lämpötila iPS-solujen lisääntymiselle (Rivera & Zhao & Ni & Wang 2020: 9). Useimmat solut selviytyvät vain, jos ne pystyvät kiinnittymään alustaan. Kuitenkin joitakin soluja voidaan viljellä myös niin, että ne kelluvat kasvatusliuoksessa. Tässä työssä solut viljeltiin matrigelia sisältäville maljoille, jolloin matrigel luo maljan pohjalle soluille suotuisat kiinnittymis- mahdollisuudet.

Soluviljelyhuone vaatii steriilit olosuhteet, jolloin mahdolliset bakteeri-, sieni- tai virusinfektiot voidaan minimoida. Aseptiikkaan kuuluu myös laminaarikaapissa työskentely, käsineiden ja työtakin käyttö sekä laminaarikaapin puhdistaminen 70 % etanolilla ennen ja jälkeen käytön. (Gibco 2016.) UV valoa käytettiin 2 kertaa viikossa laminaarikaappien puhdistamiseen. Jokainen esine, joka laminaariin laitettiin tuli desinfioida 70 % etanolilla, paitsi soluja sisältävät maljat. Soluviljelyhuoneen tuli olla käytössä ainoastaan soluviljelytarkoitukseen sekä liiallinen kulkeminen soluhuoneen läpi tuli minimoida.

6.1.1 Solujen viljeleminen maljoille

IPS-soluja ylläpidettiin essential 8 hESC (E8) kasvatusliuoksessa, jonka on todistettu ylläpitävän pluripotenssia sekä kasvattavan iPS-soluja (Rivera ym. 2020: 4–5). Liuokseen lisättiin myös 50 µl primosiini-antibiootia ehkäisemään bakteerikontaminaatioita. Ennen iPS-solujen viljelemistä maljoille, maljat valmisteltiin tekemällä suspensio matrigelistä sekä fosfaattipuskuroidusta suolaliuoksesta (PBS). Matrigel-maljoja inkuboitiin minimissään kaksi tuntia 5% CO₂-lämpökaapissa +37 °C asteessa ennen solujen siirrostamista maljoille.

Halutut viljeltävät solut otettiin -150 °C asteen pakkasesta ja sulatettiin +37 °C asteen vesihauteessa. Sulatetut solut yhdistettiin ensin DMEM/F12 GlutaMAX:in (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) kanssa falcon-putkessa ja sentrifugoitiin 500 × rpm (engl. rounds per minute) 5 minuuttia, jotta solut saatiin erotettua pakastusliuoksesta. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti poistettiin ja falcon-putkessa oleva solupelletti suspensoitiin E8 kasvatusliuokseen.

Ennen solujen siirtämistä maljoille, matrigelia sisältävät maljat valmisteltiin pesemällä niitä 2–3 kertaa pipetoimalla aikaisempi kasvatusliuos pois ja lisäämällä puhdasta kasvatusliuosta tilalle. Pesun jälkeen maljoille lisättiin 1 ml E8 kasvatusliuosta. Maljoille li-

sättiin myös 2 µl Rho-kinaasi inhibiittoria (ROCK), joka keskeyttää solukuoleman ja antaa soluille paremmat mahdollisuudet selvitä (Rivera ym. 2020: 9). Falcon-putkessa oleva solususpensio pipetoitiin viimeisenä maljoille tippa kerrallaan, jotta minimoitiin solujen mahdollinen mekaaninen rasitus. Lopuksi maljat siirrettiin 5 % CO lämpökaappiin +37 °C asteeseen säilytykseen. Kasvatusliuos vaihdettiin uuteen tarvittaessa, yleensä päivittäin, jotta solujen ravinnon saanti olisi ihanteellinen. Maljat merkittiin siten, että maljoilta ilmenee solujen linja, solujen jakomäärä sekä päivämäärä, jolloin solut viljeltiin maljoille.

DMEM/F12+GlutaMAX kasvatusliuoksessa oli lisättyä fenolipunaväriä, joka kertoo pH:n muutoksista maljoilla. pH:n muutokset voivat viestiä kontaminaatioista tai solujen suuresta ravinnonkulutuksesta. Kasvatusliuoksien vaihtojen aikana pyrittiin olemaan nopea, sillä solut rasittuvat niiden ollessa kuivana, poissa ominaisesta ympäristöstään.

6.1.2 Solujen jakaminen

Solujen määrän kasvaessa ja maljojen saavuttaessa 70–80 prosentin täyttyvyyden soluja jaettiin uusille maljoille. Solujen jakaminen aloitettiin ensin pesemällä solut DMEM/F12+GlutaMAX kasvatusliuoksella pipetoimalla uutta kasvatusliuosta vanhan tilalle. Pesun jälkeen solut pestiin vielä 3 kertaa 0,5 mM etyleenidiamiinitetraetikahapolla (EDTA), jossa oli 500 µl 0,5 mM EDTA:ta ja 500 µl PBS:ää. Kolmannella pesukerralla suspensio jätettiin maljalle ja solumaljaa inkuboitiin 3 minuuttia 5% CO -lämpökaapissa +37 °C asteessa. EDTA irrottaa solut matrigelistä, jolloin solut pystytään siirtämään pipetoimalla pakastusputkeen tai uudelle maljalle. Inkuboinnin jälkeen EDTA poistettiin ja maljalle lisättiin E8 kasvatusliuosta noin 1 ml, jonka mukana solut pipetoitiin uusille maljoille. Yhdeltä maljalta solut jaettiin neljälle uudelle maljalle. Jos solut eivät heti irronneet maljan pohjalta, E8 kasvatusliuosta pipetoitiin hellästi edestakaisin solujen irtoamisen avustamiseksi kuitenkin luomatta soluille liikaa räsitusta.

6.1.3 Solujen pakastus

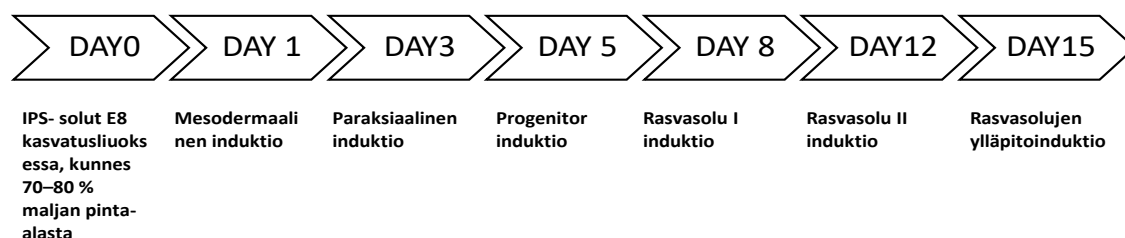
Solujen pakastus on myös mahdollista, jolloin pystytään säilyttämään niiden solurakenne. Solut käsiteltiin ensin pesemällä niitä kolme kertaa 0,5 mM EDTA:lla (1 ml per 3,5 cm malja). Viimeinen EDTA jätettiin maljalle ja inkuboitiin 3–4 minuuttia 5% CO -lämpökaapissa +37 °C asteessa. Solut irrotettiin inkuboinnin jälkeen pipetoimalla maljalle 0,5 ml pakastusliuosta I. Edestakainen pakastusliuoksen pipetointi irrottaa solut

maljalta, mutta liiallinen pipetointi voi vaurioittaa soluja (Rivera ym 2020: 13). Solususpensio siirrettiin pakastusputkeen ja putkeen lisättiin myös 0,5 ml pakastusliuosta II. Tämän jälkeen solut tuli siirtää -70 °C asteeseen mahdollisimman nopeasti. Pakastettuihin näytteisiin merkittiin pakastuspäivämäärä, solulinja sekä solujen erilaistusaste ja jakojen määrä.

Pakastusliuos I sisältää DMEM:iä sekä naudansikiön seerumia FBS:ää (engl. fetal bovine serum). Pakastusliuos II sisältää DMEM:iä, FBS:ää sekä dimetyylisulfoksidia (DMSO). DMSO ylläpitää ja suojelee solurakennetta pakastuksen ajan estäen jääkiteiden muodostumisen ja solukalvon tuhoutumisen (Wohnhaas 2019: 2). Pakastusliuosten valmistus on liitteessä 3.

6.2 Ruskeiden rasvasolujen erilaistaminen

Helsingin yliopiston Tyynismaan laboratoriossa käytettiin Vidal- Puig -laboratorion julkaisemaa erilaistamisprotokollaa, joka sisältää kuusi vaihetta (ks. Kuvio 1). Vaiheet olivat mesodermaalinen induktio, paraksiaalinen mesodermin induktio, progenitor induktio, rasvasoluinduktio I, rasvasoluinduktio II ja lopuksi rasvasolujen ylläpitoinduktio. (Carobbio ym. 2021: 642.) Induktioiden avulla pyrittiin kopioimaan solujen normaalia erilaistumista joko aktivoimalla tai inaktivoimalla eri soluviestintä- eli signaalintireittejä (Zakrzewski ym. 2019: 8–9). Erilaistaminen aloitettiin kuudelle 3,5 cm maljalle, joilla oli morfologialtaan suotuisat iPS-solu kolonnit ja kasvu oli noin 30–40 prosenttia maljan pinta-alasta. Hyvänlaatuinen iPS-solu kolonnit on yhtenäinen, selkeärajainen ja kolonnit ovat erillään toisistaan (Merck 2022 a).



Kuvio 1. Erilaistamisprotokolla kuvattuna aikajanana.

Ensimmäisenä erilaistuspäivänä iPS-soluja kerättiin talteen kahdelta maljalta, jotta niitä voitaisiin käyttää myöhemmin tulosten analysoinnissa käsittelemättöminä soluina.

Muille maljoille vaihdettiin 2 millilitraa maljaa kohden taulukon 3 mukaista kasvatusliuosta, jonka oli määrä ohjata solut kohti mesodermaalista vaihetta. Kasvatusliuoksessa käytettiin Insuliinia, FGF2:ta (engl. fibroblast growth factor 2) ja chironia, joka on glykogeenisynteesikinaasi 3 (GSK3) inhibiittori. GSK3 inhibointi lisää UCP1 aktiivisuutta (Markussen ym. 2018: 3). Insuliinia on yleisesti käytetty rasvasolujen erilaistamisessa ja FGF2 ylläpitää ja edistää solujen kasvua sekä normaalia tasapainoa. Soluja inkuboitii tässä kasvatusliuoksessa 5% CO₂-lämpökaapissa +37°C asteessa kaksi päivää.

Taulukko 3. Mesodermaalinen induktio 50 ml. CDM base toimii liuottimena.

Reagenssi	konsentraatio kasvatusliuoksessa	Määrä
CDM base kasvatusliuos (Liite 2)		49976,15 µl
Insuliini	0,35 ng/ml	1,85 µl
Fgf2	40 ng/ml	4 µl
Chiron	8 µl	20 µl

Kolmantena päivänä vaihdettiin taulukon 4 mukainen kasvatusliuos, joka ohjasi solut kohti paraksiaalista mesodermia. Solut olivat kasvatusliuoksessa kahden päivän ajan 5% CO₂-inkubaattorissa +37 °C asteessa. Tässä vaiheessa solujen erilaistuminen alkoi näkyä jo selvästi. Solut alkoivat ajautua erilleen sekä niiden morfologia muuttua ulokkeisemmaksi. Kasvatusliuokseen lisättiin retinoidihappoa, joka on varhaisessa adipogeneesi vaiheessa tärkeässä osassa ja ohjaa soluja kohti paraksiaalista mesodermia (Carobbio ym. 2021: 642–643).

Taulukko 4. Paraksiaalinen mesodermi-induktio 50 ml. CDM base toimii liuottimena.

Reagenssit	konsentraatio kasvatusliuoksessa	Määrä
CDM base kasvatusliuos (Liite 2)		49912,8 µl
Insulin	7 ng/ml	37 µl
Fgf2	4 ng/ml	2 µl
Retinoic acid	1 µM	5 µl

Viidentenä päivänä solut jaettiin useammalle maljalla, sillä ne olivat jakautuneet paljon ja alkoivat täyttää maljaa liikaa. Solujen liiallinen määrä maljalla voi johtaa solujen enneaikaiseen kuolemaan, sillä soluilla ei ole tilaa. Maljoille vaihdettiin myös taulukon 5

mukainen kasvatusliuos ja niiden annettiin olla 5 % CO₂-inkubaattorissa +37 °C asteessa viikonlopun yli. Kasvatusliuos sisälsi LDN:ää sekä askorbiinihappoa. Askorbiinihappo edistää solujen lisääntymistä sekä toimii antioksidanttina ja LDN toimii BMP 1 inhibiittorina (Carobbio ym. 2021: 644).

Taulukko 5. Progenitor-induktio 50 ml. CDM base toimii liuottimena.

Reagenssit	konsentraatio kasvatusliuoksessa	Määrä
CDM base kasvatusliuos (Liite 2)		49679,8 µl
Insuliini	7 ng/ml	37 µl
Fgf2	4 ng/ml	2 µl
Chiron	3 µM	7,5 µl
LDN	100 nM	0,5 µl
Askorbiinihappo	50 ug/ml	275 µl

Päivinä 8,9,10 ja 11 soluja pidettiin taulukon 6 mukaisessa kasvatusliuoksessa sekä pakastettiin solut kahdelta maljalta päivinä 8 ja 10. Tässä kasvatusliuoksessa solut erilaistuvat, mutta eivät jakaudu enää. Käytetyt reagenssit olivat T3, deksametasoni, IBMX, Biotiini, Pantoteeni, Rosiglitatsoni, insuliini, askorbiinihappo sekä HEPES. FBS toimii kasvun edistäjänä ja HEPES on puskuri, joka ylläpitää soluille ideaaleja olosuhteita. Pantoteeni on oleellinen osa rasva-aineenvaihduntaa sekä CoA-synteesiä (Santa Cruz Biotechnology 2022). Rosiglitatsoni aktivoi PPAR γ transkriptiotekijää (Fayyad 2019: 12). Biotiini on tärkeä osa energia-aineenvaihduntaa sekä rasvahappojen- ja aminohappojen synteesiä (Merck 2022b). Deksametasonia, insuliinia sekä IBMX:ää on todistetusti käytetty rasvasolujen erilaistamisessa. IBMX toimii lisäksi cAMP signaalireitin aktivoijana. (StemCell Technologies 2022.)

Taulukko 6. Rasvasolujen induktio I 100 ml. DMEM/Nutrients HAM F12+ GlutaMAX toimii liuottimena.

Reagenssit	konsentraatio kasvatusliuoksessa	Määrä
DMEM/Nutrients HAM F12+ GlutaMAX kasvatusliuos		88700,4 µl
5% FBS	5%	5000 µl
HEPES	15 mM	1500 µl
T3	1 nM	1 µl
Deksametasoni	100 nM	150 µl
IBMX	0,25 mM	25 µl
Biotiini	33 µM	4020 µl
Pantoteeni	17µM	7,3 µl
Insuliini	500 nM	29.4 µl
Rosiglitatsoni	5 µM	17,8 µl
Askorbiinihappo	50 ug/ml	550 µl

12. päivänä vaihdettiin taulukon 7 mukainen kasvatusliuos. Tässä vaiheessa solut alkoivat pyöristyä sekä omata rasvapisaroiita. Solujen kasvatusliuosten vaihdon aikaan tuli olla varovainen, sillä rasvan muodostuminen aiheuttaa solujen herkempää irtoamista maljalta.

Taulukko 7. Rasvasolujen induktio II 50 ml. DMEM/Nutrients HAM F12+ GlutaMAX toimii liuottimena.

Reagenssit	konsentraatio kasvatusliuoksessa	Määrä
DMEM/Nutrients HAM F12+GlutaMAX kasvatusliuos		44637,7µl
5% FBS	5%	2500 µl
HEPES	15 mM	750 µl
T3	1 nM	0,5 µl
Deksametasoni	100 mM	75 µl
Biotiini	33 µM	2010 µl
Pantoteeni	17 µM	3.65 µl
Insuliini	500 nM	14,7 µl
Rosiglitatsoni	5 µM	8,9 µl

15. päivänä vaihdettiin viimeinen kasvatusliuos, joka ylläpitää rasvasoluja (ks. taulukko 8). Lisätty oleaatti on rasvahappo, joka on tärkeä osa solujen energia-aineenvaihduntaa (Merck 2022c).

Taulukko 8. Rasvasolujen ylläpito induktio 100 ml. DMEM/Nutrients HAM F12+ GlutaMAX toimii liuottimena.

Reagenssit	konsentraatio kasvatusliuoksessa	Määrä
DMEM/Nutrients HAM F12+GlutaMAX kasvatusliuos		89247,7 µl
5% FBS	5 %	5000 µl
HEPES	15 mM	1500 µl
T3	1 nM	1 µl
Deksametasoni	100 nM	150 µl
Biotiini	33 µM	4020 µl
Pantoteeni	17 µM	7,3 µl
Insuliini	500 nM	29,4 µl
Rosiglitatsoni	5 µM	17,8 µl
Oleaatti	100 uM	27,7 µl

Jokaisen kasvatusliuoksen valmistus suoritettiin laminaarikaapissa soluviljelyhuoneessa noudattaen mahdollisimman steriiliä toimintaa. CDM base -liuos, HEPES, 5 % FBS sekä DMEM/Nutrients HAM F12+GlutaMAX suodatettiin niiden valmistuksen aikana. Kasvatusliuoksia tehtiin vain maljoille tarvittava määrä sekä niitä säilytettiin jääkaapissa +4 °C asteessa enintään kahden viikon ajan.

6.3 Visuaalinen analysointi

Soluja tarkasteltiin visuaalisesti mikroskoopin alla päivittäin. Maljat käytiin läpi yksi kerrallaan mikroskoopilla. Mikroskoopilla tarkasteltiin solujen erilaistumista sekä niiden morfologian muutoksia. Tärkeää oli myös seurata solujen jakautumista ja määrää. Solujen erilaistumisvaiheita seurattiin päivittäin sekä niistä otettiin kuvia dokumentointia varten. Erilaistumisvaiheita haluttiin kuvata mahdollisimman tarkasti, joten kuvien ottaminen oli tärkeää. Kuvat ovat tulokset-osiossa kuvissa 2 ja 3.

6.4 Solujen värjäys

Erilaistuneet solut värjättiin Oil Red O (ORO) -värjäyksellä, jolla haluttiin visualisoida iPS-soluista erilaistettujen ruskeiden rasvasolujen rasvapisaroita. Värjäyksessä seurattiin Helsingin yliopiston Pietiläisen tutkimusryhmän protokollaa, jota sovellettiin 3,5 cm soluviljelymaljalle. Värjäykseen käytettiin 0,35 prosenttista ORO:a, 60 prosenttista 2-propanolia, Milli-Q vettä sekä 4 prosenttista paraformaldehydiä (PFA). Käytettävissä

oleva 0,5 prosenttinen ORO laimennettiin Milli-Q veteen, jotta siitä saatiin 0,35 prosenttista. Laimennettu ORO suodatettiin suodatinpaperin läpi, jolloin se oli valmis käytettäväksi kahden tunnin ajan. Tutkimus suoritettiin yhdelle maljalle, jolla oli erilaistuneita ruskeita rasvasoluja. Värjäyksen lopuksi soluja tarkasteltiin valomikroskoopilla.

Solut fiksoitiin eli kiinnitettiin ensin laittamalla maljalle 4 prosenttista PFA:ta 30–60 minuutiksi. Fiksoinnin jälkeen soluja pestiin kaksi kertaa pipetoimalla PBS:ää maljalle. Tämän jälkeen PBS poistettiin ja maljalle lisättiin 60 prosenttista propanolia kahdeksi minuutiksi. Propanoli poistettiin ja maljalle lisättiin ORO väriä 15 minuutiksi. Värjäyksen jälkeen ORO poistettiin ja maljalle laitettiin PBS:ää mikroskopoinnin ja kuvien ottamisen ajaksi. Kuvat löytyvät tulokset-osiosta kuvasta 4.

6.5 RT-qPCR

RT-qPCR (reverse transcription polymerase chainreaction) on DNA:n monistamiseen käytetty menetelmä laboratorioissa. Menetelmä on vakiintunut laboratorioissa geenien monistumisen määrittämisessä. (Zhang ym. 2016: 2.) Menetelmää varten eristettiin totaali-RNA:ta halutuista soluista ja tästä luotiin komplementaarista DNA:ta eli cDNA:ta, joka on yksiketjuinen vain eksoneita omaava DNA. DNA:n monistaminen perustuu polymeerasiketjureaktioon, jota voidaan seurata reaaliaikaisesti tietokoneennäytöltä. Geenien ilmentyminen perustuu fluoresoivan merkkiaineen kiinnittymiseen monistuneeseen DNA:han. Merkkiaineena käytettiin SYBRgreeniä.

Geenien ilmentymistä vertailtiin Cq-arvojen (quantification cycle) välillä, joka kertoo missä syklissä lopputuotetta alkaa syntyä. Cq- arvo saadaan, kun fluoresenssikäyrä ylittää kynnsarvon eli milloin lopputuotetta alkaa ilmentyä. Yleensä hyvinä Cq- arvoina pidetään alle 29 syklin arvoja, jotka merkitsevät kohdesekvenssin suurta muodostumista. Yli 38 syklin arvot viittaavat nukleiinihappojen vähäiseen määrään, jolloin monistumista ei tapahdu. (Oswald 2020.)

Cq- arvojen ero laskettiin käyttämällä kaavaa $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$. Δ merkitsee kahden numeraalisen arvon erotusta. Normalisoivana geeninä käytettiin GAPDH- geeniä, jonka tiedettiin esiintyvän tasaisesti, jokaisessa näytteessä niiden erilaistumisasteesta huolimatta. Ensimmäisenä laskettiin kaikkien triplikaattien keskiarvot (ks. Taulukko 9). Sen jälkeen suoritettiin tulosten normalisointi saaden ΔCq arvot, joita verrattiin keskenään suorittamalla erotus käsiteltyjen ja käsittelemättömien näytteiden ΔCq arvojen välillä.

Lopuksi $\Delta\Delta Cq$ arvot laskettiin $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ jolloin saadaan relatiivinen kvalifointi (engl. Relative qualification). Laskukaavat löytyvät liitteestä 5. Relatiivinen kvalifointi kertoo käsittelemättömien ja käsiteltyjen näytteiden eron valitun kohdegeenin ilmentymisessä. (Livak & Schmittgen 2001: 402–408.)

Taulukko 9. Cq- arvot triplikaatteina sekä triplikaattien keskiarvot.

Sample name	Target name	Cq1	Cq2	Cq3	Average	House keeping gene	Cq1	Cq2	Cq3	Average
iPS	EBF2	34,12	34,10	34,29	34,17	GAPDH	18,38	18,47	18,56	18,47
iPS	PLIN1	35,22	34,59	34,69	34,83	GAPDH	18,38	18,47	18,56	18,47
iPS	PDGFRa	29,16	28,99	28,93	29,03	GAPDH	18,38	18,47	18,56	18,47
iPS	MYF5	29,97	29,76	29,23	29,66	GAPDH	18,38	18,47	18,56	18,47
iPS	ADRB3	31,24	31,75	31,10	31,37	GAPDH	18,38	18,47	18,56	18,47
iPS	DIO2	29,58	32,76	29,26	30,53	GAPDH	18,38	18,47	18,56	18,47
iPS	UCP1	31,06	30,96	31,02	31,01	GAPDH	18,38	18,47	18,56	18,47
iPS	PRDM16	38,55	35,70	35,80	36,68	GAPDH	18,38	18,47	18,56	18,47
Day2	EBF2	31,26	31,39	31,71	31,45	GAPDH	18,27	18,15	18,31	18,24
Day2	PLIN1	35,12	34,03	34,07	34,41	GAPDH	18,27	18,15	18,31	18,24
Day6	PDGFRa	24,88	24,79	24,86	24,84	GAPDH	18,34	18,11	18,00	18,15
Day6	MYF5	36,32	33,35	35,14	34,94	GAPDH	18,34	18,11	18,00	18,15
Day15	ADRB3	33,05	31,92	31,87	32,28	GAPDH	19,94	20,17	20,12	20,08
Day15	DIO2	30,20	30,47	30,21	30,29	GAPDH	19,94	20,17	20,12	20,08
Day20+	UCP1	31,43	31,37	30,96	31,25	GAPDH	18,37	18,50	18,54	18,47
Day20+	PRDM16	34,05	36,44	34,60	35,03	GAPDH	18,37	18,50	18,54	18,47

6.5.1 RNA-eristys

Erilaistamisen aikana talteen kerätyistä soluista eristettiin totaali- RNA:ta kaupallisen NucleoSpin-kitin avulla ja RNA- eristys suoritettiin pakkauksen ohjeiden mukaan. Pakastetut solut sulatettiin +37 °C asteen vesihauteessa ja solut sentrifugoitii 800 x rpm 1 minuutin ajan kasvatusliuoksen kanssa.

Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti poistettiin ja solupelletin päälle lisättiin ensin Lysis buffer RA1 sekä B-mercaptoethanolia (B-ME). Solu-uute suodatettiin kitin mukana tulleen filterin läpi 1 minuutti 11,000 x g:ssä. Suodatettuun solu-uutteeseen lisättiin 70 prosentista etanolia ja solu-uutetta sekoitettiin vortex- solusekoittajalla nopeasti. Solu-uute siirrettiin uuteen silikamembraanin sisältävään putkeen etanolin kanssa, jolloin etanoli sitoo RNA:n silikamembraaniin. Seuraavaksi sentrifugointi 30 sekuntia 11000 x g:ssä. Silikamembraaniin kiinnittyneestä RNA:sta poistettiin suolat membrane desalting puskurilla (MDB) sekä mahdollinen DNA hajotettiin inkuboimalla 15 minuuttia huoneenlämmössä rDNase liuoksessa. Seuraavaksi suoritettiin pesut, jossa ensimmäinen pesu tehtiin RAW2 bufferilla, joka inaktivoi rDNAasin. Seuraavat pesut tehtiin RA3 bufferilla kaksi kertaa. Lopuksi suoritettiin RNA:n eluointi eli irrottaminen silikasta RNAasi vaapaalla vedellä. Lopullinen RNA siirtyi siis silikasta eppendorf putken pohjalle.

RNA-konsentraatio mitattiin De NOVIX DS-11 FX spektrofotometri laiteella. Konsentraatio arvot taulukossa 10. RNA:n 260/280 nm arvo oli kaikkien näytteiden osalta keskiarvoltaan 2,078, joten näytteiden puhtausarvot olivat suotuisat. 260/280 nm on aallonpituuksien absorbanssisuhde, joka kertoo RNA:n puhtauden ja pitoisuuden. Puhtaan RNA:n hyväksyttävä pitoisuus on ~2.0 ja se yleensä vaihtelee 1.8 ja 2.2 välillä (DeNovix 2021: 24).

6.5.2 RNA:n kääntö cDNA:ksi

RNA käännettiin cDNA:ksi käyttäen kaupallista kittiä Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR. Reagenssien määrä laskettiin RNA:n konsentraation mukaan. Lopullinen tilavuus yhtä näytettä kohti oli 20 µl. Reagenssien sekä näytteiden määrät on merkitty näytekohtaisesti taulukkoon 10. Pipetointi suoritettiin niin, että RNA-näytteet olivat jatkuvasti jäällä kylmässä, sillä RNA hajoaa herkästi huoneenlämmössä. Varmistettiin myös, että ympäristö olisi mahdollisimman vapaa ribonukleasikontaminaatioilta pyyhkimällä tasot sekä käytettävät tarvikkeet RNase-away suihkeella. Näytteet ajettiin sen jälkeen T100 Thermal cycler Biorad laitteella valitun ajoin ohjelma 10 min +25 °C asteessa, 15 min +50 °C asteessa, 5 min +85 °C asteessa ja lopuksi +8 °C asteessa siihen asti, kunnes näytteet poistettiin laitteesta.

Taulukko 10. cDNA valmistus sekä RNA:n konsentraatiot. Näytteet on nimetty keräämispäivän mukaan

Näyte (RNA)	RNA Konsentraatio ng/µl	RNA määrä	H ₂ O	RT Buffer	Maxima Reverse Transcriptase
IPS	56,250	2,6 µl	11,4 µl	4 µl	2 µl
DAY2	90,107	1,6 µl	12,4 µl	4 µl	2 µl
DAY6	115,453	1,2 µl	12,8 µl	4 µl	2 µl
DAY15	50,964	2,9 µl	11,1 µl	4 µl	2 µl
DAY20+	10,293	14,5 µl	0	4 µl	2 µl

6.5.3 qPCR

cDNA näytteet laimennettiin niin, että niiden konsentraatio oli 12,5 nanogrammaa lisäämällä 1,67 µl cDNA:ta ja 3,33 µl H₂O:ta. Käytetyt alukkeet (ks. liite 4) laimennettiin myös niin, että alukkeiden loppukonsentraatio oli 10 µM. Lopullinen tuote valmistettiin Thermo Scientific DyNAmo Flash SYBR Green qPCR kitillä. Mastermix, jossa on

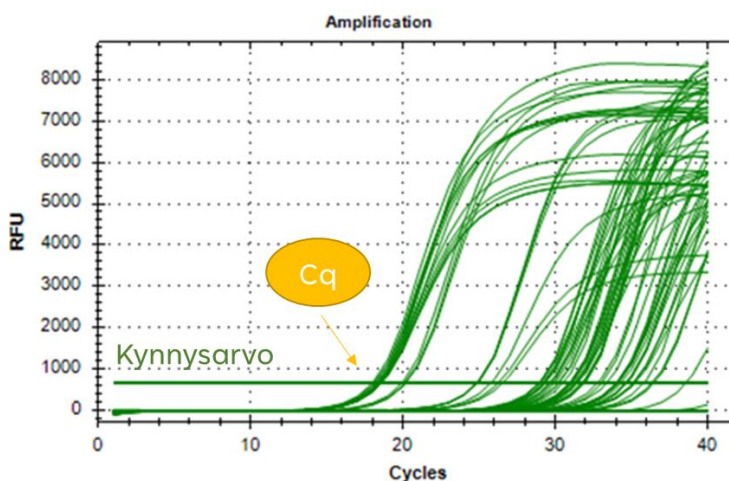
SYBR green fluoresoiva merkkiaine sekä alukkeet DNA:n monistamiseen valmistettiin lisäämällä 10 µl Dynamo Flash SYBR Greeniä, 3 µl H₂O:ta ja 2 µl haluttuja alukkeita. Jokaisen 96-levyn kaivon lopullinen tilavuus tuli olemaan 20 µl, jolloin kaivoihin pipetoitiin 15 µl Mastermixiä ja 5 µl laimennettua cDNA:ta.

Jokaisesta näytteestä tehtiin triplikaatit eli kolme rinnakkaisnäytettä. Näytteet ajettiin FX96 real-time system laiteella. Ohjelma oli 7 minuuttia 95 °C asteessa, 0,10 sekuntia +95 °C asteessa, 0,30 sekuntia +60 °C asteessa, 39 kertaa GOTO 2, 0,05 sekuntia +65 °C asteessa ja 0,5 sekuntia +95 °C asteessa.

7 Tulokset

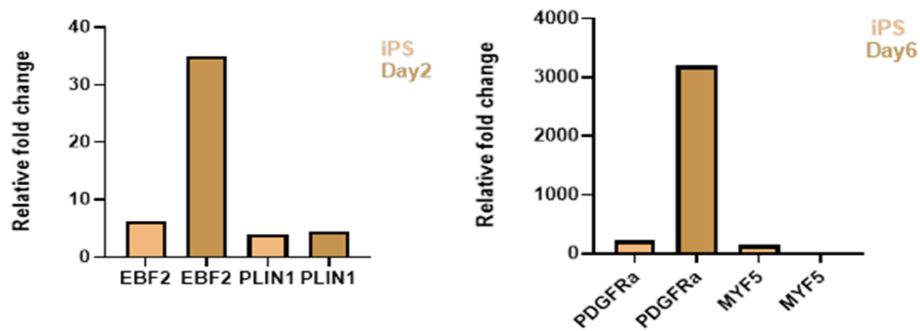
7.1 RT-qPCR tulokset

RT- qPCR:ssä (reverse transcription polymearse chain reaction) Käsittelemättömät iPS-solut toimivat kontrollina ja testinäytteinä olivat käsitellyt eli erilaistuneet solut. Kohdegeenin ilmentymistä verrattiin iPS-solujen sekä valitun testinäytteen välillä. Tutkitut geenit ovat liitteessä 4. GAPDH toimi referenssigeeninä, jonka ilmentyminen oli taasaista jokaisessa solutyypissä ja jota käytettiin tulosten normalisoinnissa. Kuviossa 2 on monistumiskurva, josta ilmenee C_q-arvot, joiden avulla voitiin laskea $2^{-(\Delta\Delta C_q)}$ eli kohde geenin ilmentymisen erot käsiteltyjen ja käsittelemättömien solujen välillä (fold change).



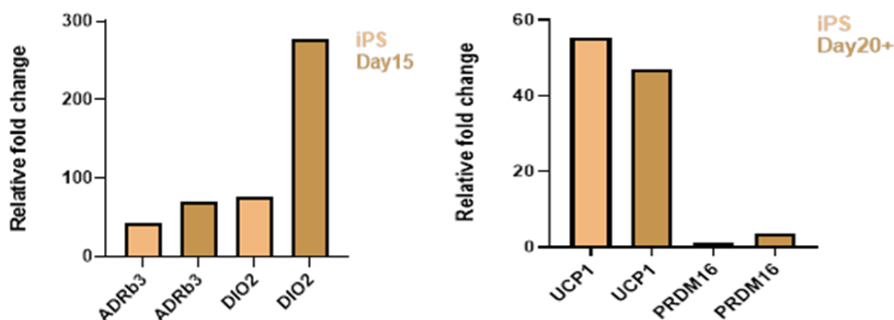
Kuvio 2. Ajettujen näytteiden monistumiskurva. Kuvassa C_q:t sekä kynnysarvo. RFU = Relative fluorescence units. Fluoresenssin määrä korreloi geenin monistumisen määrän kanssa.

Kuviossa 3 ilmenee iPS-solujen ja Day2 solujen ilmentymisen erot geenien EBF2 ja PLIN1 välillä. IPS-olut ovat käsittelemättömiä soluja ja Day2 solut käsiteltyjä soluja. PLIN1 geenin ilmentymisessä ei ole eroja näiden solujen välillä. EBF2 ilmentyminen on kuitenkin suurempi Day2 soluissa kuin iPS-soluissa. Relative fold change kertoo ekspression muutoksen käsittelemättömien ja käsiteltyjen solujen välillä. Kuviossa 3 oikealla on PDGFRa ilmentyminen, joka huomattavasti suurempaa Day6 soluissa kuin iPS-soluissa. IPS-solut ovat tässäkin käsittelemättömiä ja Day6 solut käsiteltyjä. MYF5 ilmentyminen oli merkityksetöntä iPS-solujen ja Day6 solujen välillä.



Kuvio 3. Vasemmalla iPS verrattuna Day2 soluihin. Kohdegeeneinä PLIN1 ja EBF2. Oikealla iPS- ja Day6 solujen ilmentymisen erot. Kohdegeeneinä PDGFRa ja MYF5. Taulukko tehty GraphPad Prism ohjelmalla.

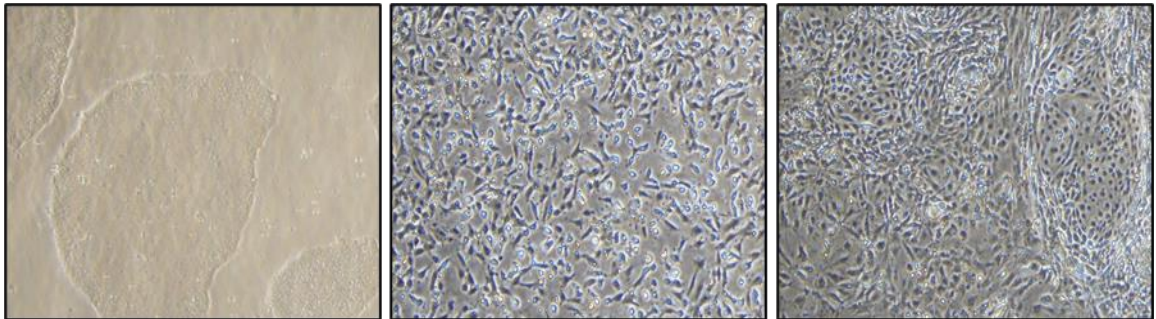
Kuviossa 4 Day15 solut ilmensivät iPS-soluihin verrattuna enemmän DIO2. ADRb3 muutos oli merkityksetön. IPS- solut ovat käsittelemättömiä soluja ja Day6 solut käsiteltyjä. Kaaviossa 4 oikealla Day20+ solujen UCP1 ilmentyminen oli vähäisempää kuin iPS-solujen UCP1 ilmentyminen. PRDM16 ilmentyminen oli merkityksetöntä niin käsitellyissä kuin käsittelemättömissä soluissa.



Kuvio 4. Vasemmalla iPS- ja Day15 solujen ilmentymisen erot. Kohdegeeneinä ADRb3 JA DIO2. Oikealla iPS-solut ja Day20+ solut. Kohdegeeneinä PRDM16 ja UCP1. Taulukko tehty GraphPad Prism ohjelmalla.

7.2 Mikroskopointi tulokset

IPS-solut olivat suotuisan näköisissä kolonnioissa. IPS-solu kolonnioiden reunat olivat selkeät ja tarkkarajaiset. IPS-solut alkoivat muuttua kohti mesodermi vaihetta, jolloin solut alkoivat erilaistua ja liikkua kauemmaksi toisistaan. Solujen erilaistuessa niiden rajat sekä rakenne olivat paremmin nähtävissä (ks. Kuva 2).



Kuva 2. IPS ja mesodermaaliset solut vasemmalta oikealle.

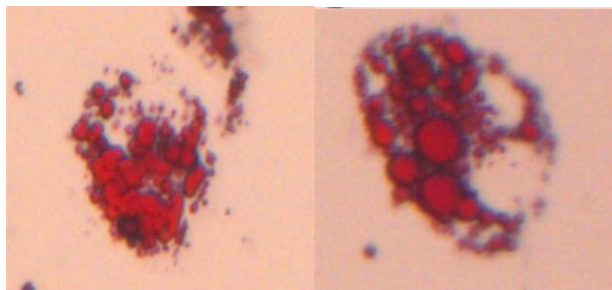
Progenitor eli rasvasolujen esiasteen vaiheen solut muistuttivat vielä mesodermaalisia soluja, mutta ne alkoivat muodostaa pieniä rasvapisaroita sekä solujen muoto pyörityä. Lopulta progenitor solut erilaistuivat oletetuiksi ruskeiksi rasvasoluiksi, jolloin pystyttiin huomaamaan solujen suurempi pyöreämpi koko sekä huomattava lipidien muodostuminen. Solujen erilaistuminen oli mikroskopoitaessa selkeästi huomattavissa (ks. Kuva 3).



Kuva 3. Progenitor- sekä ruskeat rasvasolut vasemmalta oikealle.

7.3 Solujen värjäyksen tulokset

Oil red O -värjäyksessä lipidit värjäytyivät halutulla tavalla punaisiksi. Värjäytyneitä soluja oli kuitenkin loppujen lopuksi odotettua vähemmän. Kuvasta 4 ilmenee useiden lipidipisaroiden ilmentyminen sekä solujen pyöreä ominainen muoto.



Kuva 4. Oil red O:lla värjätyt rasvasolut.

8 Pohdinta

8.1 Tulosten tarkastelu

IPS-solujen sekä testisolujen kohdegeenien ilmentymisen oletettiin eroavan toisistaan merkittävästi. Protokollaa mukailemalla onnistuttiin erilaistamaan soluja, joiden lipidien muodostus viittasi jonkinlaiseen adipogeneesiin sekä mikroskoopilla havainnoitaessa että Oil red O -värjäyksen perusteella. Soluja ei voi kuitenkaan vain tämän perusteella luokitella toiminnallisiksi ruskeiksi rasvasoluiksi.

Ruskeiden rasvasolujen ominaisin geenimarkkeri on UCP1 (Carobbio ym. 2013). RT-qPCR:n perusteella saadut tulokset viittaavat siihen, etteivät solut olleet erilaistuneet täysin ruskeiksi rasvasoluiksi, sillä UCP1 ilmentyminen ei ollut lisääntynyt. Ruskeiden rasvasolujen adipogeneesiä stimuloivan geenin PRDM16 ilmentymisen ero IPS-solujen sekä Day20+ solujen välillä oli myös merkityksetöntä. EBF2:n sekä PDGFR α :n ovat ruskeiden rasvasolujen esiasteen geenejä (Wang ym. 2014: 14467; Lee & Schmidt & Lai & Ge 2019: Brown 2019: 4). PDGFR α :n ja EBF2:n ilmentymisen muutos verrattaessa IPS-soluihin viittaa ruskeiden rasvasolujen erilaistumisen etenemiseen. Ruskeat rasvasolut tarvitsevat ADRb3 signaalin, jotta termogeneesi voi toimia (Cero ym. 2021: 2). ADRb3 ilmentyminen käsittelemättömien sekä käsiteltyjen solujen välillä säilyi kuitenkin muuttumattomana.

Saadut tulokset ovat ristiriidassa Vidal-Puig (2021) laboratorion protokollan saamiin tuloksiin nähden, sillä he olivat saaneet iPS- soluista erilaistettua toiminnallisia ruskeita rasvasoluja, joiden UCP1 ilmentyminen oli lisääntynyt huomattavasti iPS-soluihin verrattaessa.

Opinnäytetyössä saadut tulokset voivat viitata solujen multipopulaatioon, jolloin maljalla on ollut eri vaiheessa olevia soluja eikä vain täysin erilaistuneita ruskeita rasvasoluja. Tällöin erilaistumattomat solut ovat häirinneet analysointia. Myös eristetyn RNA:n konsentraatioarvot olivat varsin matalia solujen määrään nähden. Kvantitatiivisen polymeerasiketjureaktion tuloksiin vaikuttavat RNA:n laatu, cDNA:ksi käänntö sekä oikeiden alukkeiden valitseminen. RNA:n laatu oli kunnossa A260/280 puhtausasteen mukaan eikä cDNA:ksi käänntössä ollut ongelmia. Kuitenkin RNA:n konsentraatioarvot viittaavat solujen vähäisyyteen maljoilla, vaikka silmämääräisesti soluja oli paljon. Suurimmasta osasta näytteistä saatiin alle 100 ng/μl konsentraatio, joka kertoo RNA:n vähäisestä määrästä.

8.2 Eettisyys

Opinnäytetyön kirjoittamisen prosessia ohjaa hyvä tieteellinen käytäntö (HTK), jolla tarkoitetaan eettisesti kestäviä tiedonhankintamenetelmiä ja tutkimusmenetelmiä. Tieteellisen tutkimuksen aikana tulee noudattaa avoimuutta, rehellisyyttä, huolellisuutta sekä tarkkuutta. Opinnäytetyön tekijän tulee ottaa huomioon muiden julkaisujen käyttäminen sekä tunnustaa muiden tekemät työt viittaamalla oikein heidän julkaisuihinsa sekä muihin tuotoksiin. Muutoin tekijä syyllistyy vilppiin ja piittaamattomuuteen. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta.)

Tässä opinnäytetyössä on tunnustettu muiden tekemä työ viittaamalla oikein heidän tutkimuksiinsa sekä noudattamalla rehellisyyttä tutkimuksia käytettäessä. Käytettyjen tutkimusartikkeleiden sivunumerot sekä verkko-osoitteet on merkitty asianmukaisesti, jotta lähteiden saavutettavuus olisi mahdollisimman avointa. Pyrittiin käyttämään kaikkien saatavilla olevia avoimia lähteitä, jotta opinnäytetyötä voidaan arvioida kriittisesti. Opinnäytetyön saavutettavuus on myös varmistettu EU:n saavutettavuusdirektiivin (2016/2102) mukaan sekä julkaistu Theseus tietokannassa, jossa se on kaikkien saavutettavissa.

IPS-soluteknologian ollessa varsin uusi menetelmä tarvitaan sen turvallisuuden varmistamiseen useita tutkimuksia ja laadunarviointimenetelmiä. Tällaisten uusien menetelmien myötä myös lakien sekä eettisten sääntöjen uusimista ja lisäämistä on mietittävä. Maailman lääkäriliitto laati Helsingin julistuksen, jossa on ilmoitettu eettiset periaatteet koskien ihmiseen kohdistuvaa lääketieteellistä tutkimustyötä. Julistuksessa mainitaan, ettei tutkimus saa koskaan mennä yksilön edun ja hyvinvoinnin edelle. (World Medical Association 2018.) Opinnäytetyössä käytettyjen näytteiden osalta on noudatettu anonymiteettiä, jolloin solujen luovuttajien henkilöllisyyttä ei mainita. Lupa näytteiden käyttöön tulee Helsingin yliopistolta ja Tyynismaan laboratoriolta, joilla on asianmukaiset tutkimus- ja eettiset luvat.

Bioanalyytikoilla on myös omat eettiset ohjeet, joita tulee noudattaa. Bioanalyytikoilla on velvollisuus edistää yksilön, väestön sekä elinympäristön terveyttä. Bioanalyttikon tulee myös vastata laboratoriotutkimusten ja menettelytapojen luotettavuudesta ja laadusta ja noudattaa rehellisyyttä sekä laboratoriotutkimuksille tarkoitettua vaatimustasoa. (Suomen bioanalyttikkoliitto 2017.) Opinnäytetyöntekijä on omalta osaltaan noudattanut rehellisyyttä ja luotettavuutta tulosten julkistamisessa sekä dokumentoinnissa. Pyrittiin toimimaan mahdollisimman laadukkaasti noudattamalla tämänhetkisiä protokollia sekä ohjeita.

8.3 Luotettavuus

Opinnäytetyön luotettavuudesta kertoo se, että tutkimuksen kohde ja käytetty materiaali ovat yhteensopivia. Opinnäytetyön tekijän omaa rehellisyyttä voidaan pitää luotettavuuden merkinä ja hänen onkin itse arvioitava tutkimuksensa luotettavuutta jokaisen valinnan kohdalla. Opinnäytetyön tekijän on pystyttävä vastaamaan kysymyksiin mistä tutkimusaineisto on peräisin, miten hän on päätenyt valintoihinsa sekä mitä valinnat ovat olleet. (Vilka 2015: 196.) Tämä toteutuu opinnäytetyössä osaltaan tutkimuksellisen osuuden tarkkana selostamisena niin käytettyjen menetelmien kuin välineiden osalta.

Menetelmien valinnassa noudatettiin tutkimusryhmän ohjeita sekä heidän käyttämiään saatavilla olevia menetelmiä. Käytetyt reagenssit ja niiden katalogi numerot on mainittu liitteessä 1, jotta voidaan tarkistaa ja tarvittaessa toistaa työ käyttäen samoja reagensseja. Opinnäytetyön menetelmällisessä osiossa on RT-qPCR analysoinnissa käytettiin triplikaatteja, jotta voitiin tarkastella tulosten luotettavuutta triplikaattien erojen välillä.

RNA:n puhtaus varmistettiin spektrofotometrillä. Osat RNA:n konsentraatio mittaukset toistettiin useamman kerran. RNA:n pitoisuuksista haluttiin varmistua, oliko alhainen konsentraatiopitoisuus pipetoinnista johtuva virhe vai näytteen oikea konsentraatio.

Tutkimuksen ja opinnäytetyön luotettavuuden arvioinnissa voidaan käyttää merkkeinä aineiston ajankohtaisuutta käyttäen lähteinä tuoreita ja alkuperäisjulkaisuja. Opinnäytetyössä käytettyihin tieteellisiin artikkeleihin ja muuhun ammatilliseen kirjallisuuteen perehdyttiin tarkasti sekä arvioitiin kriittisesti useiden lähteiden kautta. Tutkimuksen aikana noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä kirjaamalla muistiinpanoihin tehdyt tutkimuksen vaiheet, sekä huomioita tutkimuksen etenemiseen liittyen. Muistiinpanojen tekeminen oli erityisen tärkeää, sillä ei voitu luottaa siihen, että opinnäytetyön tekijä muistaisi tehdyt asiat vielä myöhemminkin ulkoa. Täten edistetään tutkimuksen tarkkuutta ja edelleen tutkimuksen luotettavuutta. ”Uskottavan tutkimustekstin perusta on tutkijan taidoissa ja tutkimuksessa, joka on toteutettu järjestelmällisesti, kurinalaisesti ja rehellisesti” (Vilkkä 2015: 82).

Opinnäytetyön toteutusvaiheen aikataulun ollessa rajallinen solujen erilaistamista ei ehditty tehdä toiseen kertaan. Erilaistusprotokolla olisi ollut tärkeää saada toistaa edes toisen kerran, jotta saatuja tuloksia olisi voinut vertailla keskenään. Näin protokollaa olisi voitu parantaa sekä kehittää edelleen. Toistettavuutta ei voitu siis testata luotettavasti.

8.4 Johtopäätökset

Tässä opinnäytetyössä ruskeiden rasvasolujen erilaistaminen iPS-soluista ei mennyt suunnitellusti, sillä erilaistetut solut eivät ilmentäneet niille ominaisia geenejä. Opinnäytetyön tutkimuskysymyksiin onnistuttiin kuitenkin vastaamaan, mutta vastaukset eivät olleet oletettuja. Vidal-Puig laboratorion erilaistamisen protokolla selvästi toimii luomaan soluja, joilla on kyky synnyttää rasvaa, mutta tämän opinnäytetyön perusteella ei kuitenkaan onnistuttu saamaan ruskeita rasvasoluja. Aihe vaatii lisää tutkimuksia, jotta voidaan olla varmoja tulosten luotettavuudesta ja toistettavuudesta. Tämä opinnäytetyö toimii kuitenkin kartoittajana sekä esimerkkinä protokollan läpi viemisestä.

8.5 Kehittämisehdotukset

IPS-solut vaativat päivittäistä tarkkailua ja analysointia. Soluviljelyssä käytetyt useat solujenkasvatusliuokset ja niiden teko tuovat oman haasteensa, sillä mitä enemmän vaiheita on, sitä enemmän altistutaan inhimillisille virheille. Protokolla olisi hyvä käydä uudestaan läpi ja selvittää onko niin monen kasvatusliuoksen sekä reagenssin käyttäminen välttämätöntä. Soluviljelyvaiheessa olisi ollut hyvä laskea solujen määrä ennen niiden jakamista sekä ennen niiden siirrostamista maljoille, jotta jokaisen maljan solumäärä olisi ollut todistettavissa sama.

RT-qPCR käytettyjen alukkeiden tarkistaminen ja uudelleen suunnittelu olisi myös paikallaan. Esimerkiksi Day2 solujen testaaminen PLIN1 geenillä oli tarpeetonta, sillä oletusarvona oli, ettei niin varhaisen vaiheen solut vielä edes ilmennä kyseistä geeniä. Solujen värjäyksen tarkempien tulosten saavuttamiseksi lipidipisaroiden värjäämisen lisäksi olisi ollut järkevää värjätä myös tumat DAPI värjäyksellä ja tarkastella tuloksia fluoresenssimikroskoopilla. Tällöin voitaisiin nähdä tarkemmin solujen määrä tumien värjäytyvyyden perusteella sekä kuinka moni niistä olisi rasvasoluja niiden sytoplasman värjäytyvyyden avulla.

8.6 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyön tekijän ammatillisen kasvun voidaan ajatella kulminoituvan opinnäytetyöhön ja sen tekoprosessiin sekä opiskelijan kykyyn tuottaa lähdekriittistä ja faktoihin pohjautuvaa tietoa, joka pyrkii kehittämään tai tuottamaan uutta tietoa. Koen saaneeni valmiuksia työelämään sekä toimimaan ammattitaitoisesti. Tutkimuksen aikana sain tehdä itsenäisiä päätöksiä omaa tutkimustani koskien. Opinnäytetyön toteuttamisvaiheessa opin dokumentoinnin ja avoimuuden tärkeyden tutkimusta tehdessäni. Täytyy pystyä tuottamaan läpinäkyvää informaatiota, jotta pystytään kehittymään ja oppimaan virheistä.

Opinnäytetyötä tehdessäni opin paljon omista heikkouksistani sekä vahvuksistani. Heikkouksinani näin tieteellisen tekstin tuottamisen, sillä en ollut koskaan tehnyt näin laajaa ja yksityiskohtaista työtä. Oli tärkeää muistaa, ettei tämän opinnäytetyön lukijalla saata olla aikaisempaa tietoa aiheesta. Lyhenteiden, termien sekä menetelmien auki selittäminen unohtui aina välillä, mutta lopulliseen raporttiin olen pyrkinyt avaamaan kaiken mahdollisimman ymmärrettävästi ja selkeästi. Opinnäytetyöni aihe oli erittäin

kiinnostava sekä ajankohtainen globaalisti. Opinnäytetyön aihe alussa myös pelotti hieman, sillä jo iPS-solut terminä oli minulle vieras käsite. Kuitenkin oma tahto ja kiinnostus tutkimusryhmää ja opinnäytetyön aihetta kohtaan sai minut tarttumaan haasteeseen.

Mahdollisuus toteuttaa opinnäytetyö kansainvälisessä tiimissä Henna Tynnismaan Helsingin yliopiston tutkimuslaboratoriossa toi paljon uusia näkemyksiä sekä työkontakteja. Osaavan sekä innovatiivisen tiimin osana oleminen toi uutta innostusta omaa alaa kohtaan ja antoi paljon uutta tietoa niin menetelmien kuin teorian kannalta.

Lähteet

Brown, Aaron C 2019. Brown adipocytes from induced pluripotent stem cells-how far have we come? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1463 (1). 1–21. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7078043/pdf/nihms-1051905.pdf>>. Viitattu 4.11.2021.

Carobbio, Stefania & Guenantin, Anne-Claire & Bahri, Myriam & Rodriguez-Fdez, Sonia & Honig, Floris & Kamzolas, Ioannis & Samuelson, Isabella & Long, Kathleen & Awad, Sherine & Lukovic, Dunja & Erceg, Slaven & Basset, Andrew & Mendjan, Sasha & Vallier, Ludovic & Rosen, Barry S & Chiarugi, Davide & Puig-Vidal, Antonio 2021. Unraveling the Developmental Roadmap toward Human Brown Adipose Tissue. *Stem Cell Reports* 16 (3). 641–655. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7940445/pdf/main.pdf>>. Viitattu 21.9.2021.

Carobbio, Stefania & Rosen, Barry & Vidal-Puig, Antonio 2013. Adipogenesis: new insights into brown adipose tissue differentiation. *Journal of Molecular Endocrinology* Volume 51 (3). 75–85. <<https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/51/3/T75.xml>>. Viitattu 10.12.2021.

Cero, Cheryl & Lea, Hannah J & Zhu, Kenneth Y & Shamsi, Farnaz & Tseng, Yu-Hua & Cypess, Aaron M 2021. β_3 -Adrenergic receptor regulate human brown/beige adipocyte lipolysis and thermogenesis. *JCI Insight* 6 (11): 1–20. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8262278/pdf/jciinsight-6-139160.pdf>>. Viitattu 20.2.2022.

DeNovix 2021. DS-11 Spectrophotometer/Fluorometer Series Users Guide. Kappale 8: 19–26. <<https://www.denovix.com/pdf/ds-11-series-user-guide.pdf>>. Viitattu 17.2.2022.

Fayyad, Abeer Maher & Khan, Amir Ali & Abdallah, Sallam Hassan & Alomran, Sara Sultan & Bajou, Khalid & Khattak, Muhammad Nasir Khan 2019. Rosiglitazone Enhances Browning Adipocytes in Association with MAPK and PI3-K Pathways During the Differentiation of Telomerase-Transformed Mesenchymal Stromal Cells into Adipocytes. *International Journal of Molecular Sciences* 20(7): 1–16. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6480475/pdf/ijms-20-01618.pdf>>. Viitattu 24.2.2022.

Gibco 2016. Cell Culture Basics Handbook. Thermo Fisher. <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1563-PJT1267-COL31122-Gibco-Cell-Culture-Basics-Handbook-Global-FLR.pdf>>. Viitattu 7.1.2022.

Hangas, Anu 2020. Tissue specificity and topoisomerase functions in mitochondrial dna maintenance. Publications of the University of Eastern Finland Dissertations in Forestry and Natural Sciences. University of Eastern Finland, Joensuu. Väitöskirja. <<https://erepo.uef.fi/bitstream/handle/123456789/23857/1606816724878308086.pdf>>. Viitattu 1.9.2021.

Heiskanen, Vladimir & Pirinen, Eija 2020. Mitokondrioiden toimintahäiriöt aineenvaihduntasairauksissa – Tulevatko B3- vitamiinit aikanaan avuksi? Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim 136 (9). 1005–1012. <<https://www.duodecimlehti.fi/xmedia/duo/duo15558.pdf>>. Viitattu 14.10.2021.

Helsingin yliopisto 2021. Kantasoluportaali. Kudoskantasolut. <<https://www2.helsinki.fi/fi/projektit/kantasoluportaali/kudoskantasolut>>. Viitattu 9.9.2021.

Kierszenbaum, Abraham L & Tres, Laura L 2016. Histology and cell biology an introduction to cell pathology. 4. painos. Philadelphia: Saunders.

Kilpinen, Helena & Trokovic, Ras & Loukola, Anu & Otonkoski, Timo 2021. Tautimekanismien jäljille iPS- solujen ja biopankkien avulla. Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim 137 (9). <<https://www.duodecimlehti.fi/xmedia/duo/duo15947.pdf>>. Viitattu 6.10.2021.

Koene, Saskia & Smeitink, Jan 2013. Suom. muokkaus Isohanni, Pirjo & Wartiovaara, Anu 2016. Mitokondriotaudit. Opas sairastuneille, heidän perheilleen sekä lääketieteen opiskelijoille ja ammattilaisille. Neuroliitto. <https://neuroliitto.fi/wp-content/uploads/Mitokondriotauditopas_web.pdf>. Viitattu 3.1.2022.

Laurila, Sanna 2021. Metabolic effects of the gastrointestinal hormone secretin with focus on brown adipose tissue. Turun yliopisto lääketieteellinen tiedekunta. Väitöskirja. <<https://www.utupub.fi/bitstream/handle/10024/152408/AnnalesD1560Laurila.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Viitattu 7.9.2021.

Laurila, Sanna & Lahesmaa, Minna & Nuutila Pirjo & Virtanen, Kirsi A 2020. Ruskean rasvakudoksen toiminta ja merkitys. Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim 136 (6): 625–632. <<https://www.duodecimlehti.fi/xmedia/duo/duo15468.pdf>>. Viitattu 25.8.2021.

Lee, Ji-Eun & Schmidt, Hanna & Lai, Binbin & Ge, Kai 2019. Transcriptional and Epigenomic Regulation of Adipogenesis. American society for microbiology: Molecular and Cellular Biology 39 (11). <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/MCB.00601-18>>. Viitattu 27.1.2022.

Lefterova, Martina I & Haakonsson, Anders K & Lazar, Mitchell A & Mandrup, Susanne 2014. PPAR γ and the Global Map of Adipogenesis and Beyond. Trends Endocrinol Metab. 25 (6). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4104504/pdf/nihms591695.pdf>>. Viitattu 4.2.2022.

Liu, Yasmine J & McIntyre, Rebecca L & Janssens Georges E & Houtkoopre, Riekelt H 2020. Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age- related disease. Mechanisms of Ageing and Development. Volume 186. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32017944/>>. Viitattu 26.11.2021.

Livak, Kenneth J & Schmittgen Thomas D 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. Methods 25: 402–408. <<http://www.gene-quantification.net/livak-2001.pdf>>. Viitattu 10.4.2022.

Markussen, Lasse K & winther, Sally & Wicksteed, Barton & Hansen, Jacob B 2018. GSK3 is negative regulator of the thermogenic program in brown adipocytes. *Scientific Reports* 8(3469). <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-21795-y.pdf>>. Viitattu 22.2.2022.

Merck 2022 a. Induced Pluripotent Stem Cell Culture protocols. <<https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/stem-cell-culture/human-ipsc-culture-protocols>>. Viitattu 9.2.2022.

Merck 2022 b. Biotin in Cell Culture. <<https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/biotin>>. Viitattu 24.2.2022

Merck 2022 c. Oleic Acid in Cell Culture. <<https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/oleic-acid>>. Viitattu 24.2.2022.

Mota de sá, Paula & Richard, Allison, J & Hang, Hardy & Stephens, Jacqueline, M 2017. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Comprehensive Physiology* 7: 635–674.

Mäkinen, Selina & Skrobuk, Paulina & Nguyen, Yen Hoang & Koistinen, Heikki 2013. Insuliiniresistenssin mekanismit. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 129(29): 2115–2122. <<https://www.duodecimlehti.fi/xmedia/duo/duo11275.pdf>>. Viitattu 10.2.2022.

Orava, Janne 2014. Characterisation of functional brown adipose tissue in adult humans. Turun yliopisto. Väitöskirja. <<https://www.utupub.fi/bitstream/handle/10024/95825/AnnalesD1108Orava.pdf?sequence=2&isAllowed=y>>. Viitattu 25.8.2021.

Oswald, Nick 2020. What is Cq (Ct) value? <<https://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/>>. Viitattu 10.4.2022

Poher, Anne-Laure & Altirriba, Jordi & Veyrat-Durebex & Rohner-Jeanrenaud Françoise 2015. Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity/insulin resistance. *Frontiers in Physiology Integrative Physiology* (6)4. <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2015.00004/full>>. Viitattu 21.2.2022.

Polinati, Padmini P 2015. A study on genetic mutations involving mitochondrial disorders – a diagnostic approach and application of human iPSCs to understand disease pathogenesis. Institute of Biomedicine, Department of Clinical Molecular Medicine Research Program Unit, Molecular Neurology, University of Helsinki. Väitöskirja. <<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/157100/astudyon.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Viitattu 6.10.2021.

Rivera, Teresa & Zhao, Yuanyuan & Ni, Yuhui & Wang, Jiwu 2020. Human-Induced Pluripotent Stem Cell Culture Methods Under cGMP Conditions. *Current Protocols in*

Stem Cell Biology 54: 1–21. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7507179/pdf/CPSC-54-e117.pdf>>. Viitattu 23.2.2022.

Santa Cruz Biotechnology 2022. D-Pantothenic acid sodium salt (CAS 867-81-2). <<https://www.scbt.com/p/d-pantothenic-acid-sodium-salt-867-81-2>>. Viitattu 24.3.2022.

StemCell Technologies 2022. IBMX. <<https://www.stemcell.com/ibmx.html>>. Viitattu 24.2.2022.

Suomen bioanalytikkoliitto ry 2017. Bioanalyttikon, Laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. <https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaatteet_FI_print_2017.pdf>. Viitattu 6.10.2021.

Thesleff, Irma & Sainio, Kirsi & Sariola, Hannu 2015. Solujen kommunikaatio ja induktiiviset vuorovaikutukset. Kirjasta Kehitysbiologia solusta yksilöksi. (toim) Sariola, Hannu Duodecim: Helsinki. 12–19.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. Tiedevilppi. Hyvä tieteellinen käytäntö (HTK). <<https://tenk.fi/fi/tiedevilppi/hyva-tieteellinen-kaytanto-htk>>. Viitattu 21.9.2021.

Vilka, Hanna 2015. Tutki ja kehitä. PS- kustannus: Jyväskylä. 4, uudistettu painos.

Wang, Wenshan & Kissig, Megan & Rajakumari, Sona & Huang, Li & Lim, Hee-Woong & Won, Kyoung.Jae & Seale, Patrick 2014. Ebf2 is a selective marker of brown and beige adipogenic precursor cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111 (40) 14466–14471 <<https://www.pnas.org/content/pnas/111/40/14466.full.pdf>>. Viitattu. 15.2.2022.

Wartiovaara, Kirsi & Partanen, Juha & Heino, Tapio 2015. Solujen keskeiset tapahtumat ja kantasolut. Kirjasta Kehitysbiologia solusta yksilöksi. (Toim.) Sariola, Hannu. Duodecim: Helsinki. 68–78.

Weltner, Jere & Trokovic, Ras & Otonkoski Timo 2014. Indusoidut pluripotentit kantasolut lääketieteellisessä tutkimuksessa. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 130 (8). 785–792. <<https://www.duodecimlehti.fi/xmedia/duo/duo11597.pdf>>. viitattu 9.9.2021.

WHO = World Health Organization.

WHO 2020. The top 10 causes of death. <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Viitattu 7.9.2020.

Wohnhaas, Christian T & Leparc, Germán G & Albert-Fernandez, Francesc & Kind, David & Gantner, Florian & Viollet, Coralie & Hildebrandt, Tobias & Baum, Patrick 2019. DMSO cryopreservation is the method of choice to preserve cells for droplet-based single-cell RNA sequencing. Scientific Reports 9 (10699). <<https://www.nature.com/articles/s41598-019-46932-z.pdf>>. Viitattu 8.1.2022.

World Medical Association 2018. WMA declaration of Helsinki – ethical principles for medical research involving human subjects. <<https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>>. Viitattu 23.2.2022

Yamanaka, Shinya & Takahashi, Kazutoshi 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126 (4). 663–676. <<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0092867406009767?to-ken=8DFAD919DE1B96952C7E27E38624B6F65B67970EC6E427CE03C52EDD74E965D647A83EE0C7A030A571773EE908EB485D&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220223091912>>. Viitattu 10.12.2021.

Yau, Winifred W & Yen, Paul M 2020. Thermogenesis in Adipose Tissue Activated by Thyroid Hormone. *International Journal of Molecular Sciences* 21(8) 1–16. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32344721/>>. Viitattu 20.2.2022.

Zakrzewski, Wojciech & Dobrzyński, Maciej & Szymonowicz, Maria & Rybak, Zbigniew 2019. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy* 10 (68). <<https://stemcellres.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13287-019-1165-5.pdf>>. Viitattu 13.10.2021.

Zhang, Wan-Xia & Fan, Jie & Ma, Jing & Rao, Yi-Song & Zhang, Li & Yan You-E 2016. Selection of Suitable Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization in Three Types of Rat Adipose Tissue. *International Journal of Molecular Sciences* 17(6). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4926500/pdf/ijms-17-00968.pdf>>. Viitattu 17.2.2022.

Käytetyt reagenssit

Reagenssilista
Insulin /Sigma I9278
Fgf2/ Sigma SRP3043
Chiron /Sigma CHIR99021
Retinoic acid / Sigma R2625
LDN 193189/ Sigma SML0559
Ascorbic acid/ Sigma A4403
HEPES / Sigma
T3/ Sigma T6397
IBMX/ Sigma I7018
Biotin/ Sigma B4639
Pantothenate/ Santa/ D- Pantothenic acid sodium salt Chem Cruz
Rosiglitazone/ sigma R2408
Dexamethasone / Sigma D1756-25 Mg/ Lot BCB25483
Oleate/ Sigma O1008
DMEM/Nutrients HAM F12+GlutaMAX
IMDM/ Invitrogen 21980065
HyClone BSA/ GE Healthcare SH30574-02
CD Lipid Concentrate/ Invitrogen 11905031
Transferrin/ Roche Sigma 10652202001
Mono-Thioglycerol/ Sigma M6145-25ml
0.5 M EDTA Ph 8.0/ Life Technologies 15575
PBS/ Sigma D8537
DMEM/F12 media with GlutaMAX / 31331028
Dimetyl Sulphoxide (DMSO) /Sigma D2650
FBS / Life Technologies 10106-169
Oil Red O/ Sigma 01391-250ML
Matrigel Growth factor reduced basement membrane matrix, Phenol red free, LDEV free / Corning Life Sciences 356231
Essential 8 Hesc (Life Technologies A1517001)

CDM Base valmistus

CDM base media	Määrät
F-12 Nut Mix	125 ml
IMDM	125 ml
HyClone BSA	1,25g
CD Lipid Concentrate	2,5 ml
Transferrin	125 µ
Mono- Thioglycerol	10 µ

Valmista tarpeen mukaan

1. Punnitse ensin HyClone BSA ja liuota se F-12 Nut Mixiin
2. Lisää muut reagenssit
3. Suodata kaikki
4. Säilytys +4 °C asteessa jääkaapissa

Pakastusliuos I & II valmistus

Pakastusliuos I 10 ml

DMEM/F12 8 ml

FBS 2 ml

Suodata molemmat ja säilytä +4 °C asteessa.

Pakastusliuos II 10 ml

DMEM/F12 6 ml

FBS 2 ml

DMSO 2 ml

Suodata DMEM/F12 ja FBS. Lisää DMSO sen jälkeen. Säilytys +4 °C asteessa.

Alukkeet / kohdegeenit

Näytteet		Aluke ja alukkeen emäsjärjestys	
Day2	IPS	EBF2 F EBF2 R PLIN1 F PLIN1 R	AAGACCAACAACGGCACTCA TTCGCAGCATCGACTACACA AGGGAAGAAGTTGAAGCTTGAGG TTCTGGAAGCATTTCGCAGGT
Day6	IPS	PDGFR α F PDGFR α R MYF5 F MYF5 R	CCACCTGAGTGAGATTGTGG TCTTCAGGAAGTCCAGGTGAA CTGCCAGTTCTCACCTTCTGA AACTCGTCCCCAAATTCACCC
Day15	IPS	ADrb3 F ADrb3 R DIO2 F DIO2 R	CTCGACGGGGCTTCTTGG TTTTCCACAGAGGCCAGAGG CCTCCTCGATGCCTACAAAC GCTGGCAAAGTCAAGAAGGT
Day20+	IPS	UCP1 F UCP1 R PRDM16 F PRDM16 R	CTCACCGCAGGGAAAGAA GGTTGCCCAATGAATACTGC TGGCTGCTTCTGGACTCA ATATTATTACAACGTCACCGTCACT
Kaikkille näyteteille		GAPDH F GAPDH R	AGCCACATCGCTCAGACAC GCCCAATACGACCAATCC

Laskukaavat

$$\Delta Cq = Cq (\text{kohdegeeni}) - Cq (\text{normalisoiva geeni})$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (\text{käsitelty näyte}) - \Delta Cq (\text{käsittelemätön näyte})$$

$$2^{\Delta\Delta Cq}$$