



**IHMISEN ALKION JA UUELLEEN
OHJELMOITUJEN
KANTASOLULINJOJEN
SYDÄNERILAISTUMISEN
VERTALU**

Maria af Hällström

Opinnäytetyö
Joulukuu 2012
Laboratorioalan
koulutusohjelma

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU
Tampere University of Applied Sciences

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

MARIA AF HÄLLSTRÖM:

Ihmisen alkion ja uudelleen ohjelmoitujen kantasolulinjojen sydänerilaistumisen vertailu

Opinnäytetyö 50 sivua, joista liitteitä 3 sivua
Joulukuu 2012

Nopeasti kehittyvältä kantasoluteknologialta odotetaan uusia hoitokeinoja sydänsairauksiin ja muihin kudosvaurioihin. Aikuisen ihmisen sydän ei kykene uusiutumaan sydäninfarktin jälkeen. Ihmisen pluripotentit kantasolut pystyvät erilaistumaan sydänlihassoluiksi erilaisilla menetelmillä laboratorioviljelmissä.

Kantasoluista erilaistetut sydänlihassolut ovat erinomaisia sydänlihassolumalleja. Uudelleen ohjelmoitujen kantasolujen (Induced pluripotent stem cells, iPS-solut) kehityksen myötä kantasoluteknologia mahdollistaa potilasspesifisten solujen tuottamisen ja siten monien sydänsairauksien tutkimisen ja hoidon.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia eroaako erilaistuminen sydänlihassoluiksi uudelleen ohjelmoitujen kantasolulinjojen välillä sekä alkion kantasolulinjan ja uudelleen ohjelmoitujen kantasolulinjojen välillä. Ihmisen alkion kantasolulinja FES29 sekä kaksi eri menetelmällä tuotettua uudelleen ohjelmoitua kantasolulinjaa erilaistettiin sydänlihassoluiksi. Erilaistamistehokkuutta määritettiin laskemalla sykkiviä sydänlihassoluaggregaatteja ja sydänlihasspesifisten troponiinipositiivisten solujen määrää arvioitiin Cytospin-menetelmällä. Sydänlihassoluja karakterisoitiin arvioimalla morfologiaa, tarkastelemalla solujen elektrofysiologisia ominaisuuksia, immunofluoresenssivärjäyksillä ja kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktiolla.

Pluripotentit kantasolut erilaistuivat sydänlihassoluiksi, vaikka erilaistumistehokkuus oli vähäistä ja erilaistumiskyky vaihteli solulinjojen välillä. Erilaistuneet sydänlihassolut sykkivät spontaanisti ja ilmensivät sydänlihassoluille tyypillistä elektrofysiologista aktiivisuutta. Sydänlihassoluspesifisten geenien ilmentyminen kasvoi erilaistuksen edetessä.

Tässä tutkimuksessa eri kantasolulinjojen erilaistumisessa sydänlihassoluiksi ei havaittu suurta eroavaisuutta. Vastasyntyneen fibroblasteista valmistettu uudelleen ohjelmoitu h1/12 kantasolulinja erilaistui sydänlihassoluiksi paremmin kuin muut kantasolulinjat. Tulevaisuudessa sydänerilaistumista tullaan tutkimaan useammilla eri kantasolulinjoilla.

Asiasanat: kantasolu, alkion kantasolu, iPS-solut, sydänerilaistaminen

ABSTRACT

Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Sciences

MARIA AF HÄLLSTRÖM:

The Comparison of Human Embryonic Stem Cell Line and Induced Pluripotent Stem Cell Lines in Differentiating into Cardiomyocytes

Bachelor's thesis 50 pages, appendices 3 pages
December 2012

The rapid development in the field of stem cell technology is expected to provide new treatments for heart disease and other diseases concerning damaged tissues. An adult's heart cannot regenerate after a myocardial infarction. The human pluripotent stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes by using various methods of laboratory culture.

The cardiomyocytes differentiated from stem cells are excellent cardiomyocyte models. Reprogrammed stem cells (Induced pluripotent stem cells, iPS cells) technology enables patient-specific cell production, and thus it improves the research and treatment of cardiovascular diseases.

The goal of this study was to investigate the differentiation of cardiomyocytes, and to determine whether it differs in induced stem cell lines, as well as in between the embryonic stem cell line and the induced pluripotent stem cell lines. Human embryonic stem cell line FES29 and two iPS cell lines produced by two different methods were differentiated into cardiomyocytes. The efficiency of differentiation was determined by calculating the beating cardiac aggregates. The number of troponin positive cells specific for cardiomyocytes was assessed by Cytospin method. Cardiomyocytes were characterized by evaluating the morphology, by examining the electrophysiological properties of the cells, with immunofluorescence staining, and with quantitative polymerase chain reaction.

Pluripotent stem cells differentiated into cardiomyocytes, although the overall efficiency of differentiation was low and varied between the cell lines. Differentiated cardiomyocytes were beating spontaneously and represented electrophysiological activity, which is typical for cardiomyocytes. The expression of cardiomyocyte specific genes was increased in the progress of differentiation.

The results of this study show in the differentiation of cardiomyocytes between different stem cell lines major differences were not observed. Induced pluripotent stem cell line h1/12 produced from neonatal fibroblasts differentiated into cardiomyocytes better than the other stem cell lines. In the future, the cardiac differentiation will be studied in several different stem cell lines.

Keywords: stem cell, embryonic stem cell, iPS cells, cardiomyocyte differentiation

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	KIRJALLISUUSKATSAUS.....	8
2.1	Kantasolut	8
2.2	Alkion kantasolut.....	9
2.3	Uudelleen ohjelmoidut kantasolut	10
2.4	Kantasolujen viljely	11
2.5	Kantasolujen erilaistaminen sydänlihassoluiksi	12
2.6	Sydänlihassolujen karakterisointi	13
2.6.1	Immunofluoresenssivärjäys.....	13
2.6.2	Kvantitatiivinen PCR	15
2.6.3	Sydänlihassolujen toiminnallinen testaus	19
3	TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS.....	20
4	TYÖN SUORITUS	21
4.1	Ihmisen kantasolujen viljely	21
4.2	Kantasolujen erilaistaminen sydänlihassoluiksi	21
4.2.1	END-2-solujen kasvatus.....	21
4.2.2	Kantasolujen maljaus END-2-maljalle	22
4.2.3	Dissosiaatio	22
4.3	Näytteiden tutkiminen immunofluoresenssivärjäyksen avulla	23
4.4	Erilaistustehokkuuden määrittäminen Cytospin®-menetelmällä	23
4.5	Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR (RT-PCR, QPCR).....	24
4.5.1	Kokonais-RNA:n eristys ja pitoisuuden mittaaminen.....	24
4.5.2	cDNA-kääntö	25
4.5.3	Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR.....	26
4.6	Microelectrode Array (MEA)	27

5	TULOKSET	28
5.1	Sykkivät soluaggregaatit	28
5.1.1	Erilaistettujen sydänlihassolujen morfologia	29
5.1.2	Dissosioidut sykkivät sydänlihassolut	29
5.2	Cytospin tulokset	30
5.3	Immunofluoresenssinvärjäyksen tulokset	31
5.4	RNA-eristys	32
5.5	Geenien ilmentymisen määrittäminen sydänerilaistuksessa	34
5.6	MEA:n tulokset	37
6	POHDINTA	39
7	LÄHTEET	43
LIITTEET	48
	Liite 1. Lista kasvatusliuoksissa käytetyistä reagensseista	48
	Liite 2. Lista dissosiaatiopuskureissa käytetyistä reagensseista	50

LYHENTEET JA TERMIT

atriaalinen	eteisperäinen
blastokysti	alkiorakkula
dissosiaatio	hajotus, tässä yhteydessä solurykelmän hajotus erillisiksi soluiksi
END-2	(mouse visceral endodermal-like cells) hiiren endodermaalisia soluja
erilaistaminen	kantasolujen muuttaminen toisen solutyypin soluiksi erilaisilla menetelmillä
FBS	(fetal bovine serum), vasikan seerumi
FGF	(fibroblast grown factor), kasvutekijä
fenotyyppi	kaikkien havaittavien ominaisuuksien kokonaisuus
fibroblasti	sidekudossolun esiaste tai sidekudossolu
gelatiini	proteiineista koostuva aine
hESC	(human embryonic stem cell), ihmisen alkion kantasolu
iPS-solu	(induced pluripotent stem cell), esimerkiksi somaattisesta solusta uudelleen ohjelmoitu kantasolu
kantasolu	pystyy jakaantumaan kantasoluina sekä erilaistumaan eri solutyypeiksi
karyotyyppi	kromosomien lukumäärä ja rakenne
MEF	(mouse embryonic fibroblast), hiiren alkioperäinen fibroblasti
morula	alkion solurykelmävaihe
passage-numero (p.)	Solujen juokseva siirrostusnumero, joka kertoo kuinka monta kertaa kyseistä solulinjaa on jaettu eteenpäin
retrovirusmenetelmä	geenien vienti soluun, esimerkiksi virusten avulla
tsygootti	hedelmöittynyt munasolu
tukisolukko	kasvatusalusta soluviljelmille
ventrikulaarinen	kammiooperäinen

1 JOHDANTO

Nopeasti kehittyvältä ja kasvavalta kantasolututkimukselta odotetaan uusia hoitomuotoja, joissa kantasoluilla hoidettaisiin solu- ja kudostuhosta johtuvia sairauksia. Kantasolujen kyky uusiutua ja erilaistua useiksi solutyypeiksi mahdollistaa niistä tuotetun solukon käytön vahingoittuneissa ja vanhenevissa kudoksissa. Kantasolututkimus on herättänyt toiveita esimerkiksi diabeteksen, sydämen vajaatoiminnan ja vakavien neurologisten sairauksien uusista hoitomuodoista.

Sydänsairauksien lisääntyminen on kasvattanut kiinnostuksen uudelleen ohjelmoitujen kantasolujen, iPS-solujen erilaistamiseen sydänlihassoluiksi. iPS-solut ovat monikykyisiä kantasoluja, joita voidaan tuottaa myös potilaan omista soluista. Potilaan omia iPS-soluja käyttämällä välttyttäisiin hylkimisreaktioilta ja eettisiltä ongelmilta, joita liittyy alkion kantasolujen käyttöön. Sydäninfarktin jälkeen sydänlihassolut eivät kykene uusiutumaan. Regeneratiivisen lääketieteen tavoitteena on korjata sydän sydänlihassolusiirteellä, mutta tämä ei ole vielä lähitulevaisuudessa mahdollista. Sydänlihassolujen erilaistaminen ja eristäminen *in vitro* siirrekelpoiseksi solupopulaatioksi vaatii vielä pitkäjänteistä tutkimusta.

Tämä opinnäytetyö on tehty Tampereen yliopiston Solu- ja Kudosteknologiakeskus Regean sydäntutkimusryhmässä. Tutkimus Regeassa keskittyy kantasolututkimukseen ja kudosteknologiaan.

Työn tavoitteena oli tutkia eroaako erilaistuminen sydänlihassoluiksi uudelleen ohjelmoitujen kantasolulinjojen välillä sekä alkion kantasolulinjan ja uudelleen ohjelmoitujen kantasolulinjojen välillä. Työssä verrattiin yhtä alkion kantasolulinjaa ja kahta eri menetelmällä tuotettua uudelleen ohjelmoitua kantasolulinjaa. Erilaistumista sydänlihassoluiksi arvioitiin määrittämällä erilaistumistehokkuutta laskemalla sykkiviä sydänlihassoluagregaatteja ja sydänlihassoluspesifisten troponiinipostiivisten solujen määrää Cytospin-menetelmällä. Sydänlihassoluja karakterisoitiin arvioimalla sykkivien alueiden kokoa ja morfologiaa, syketiheyttä, sydänlihassoluspesifisten geenien ilmentymistä ja tutkimalla soluja immunofluoresenssivärväysmenetelmällä.

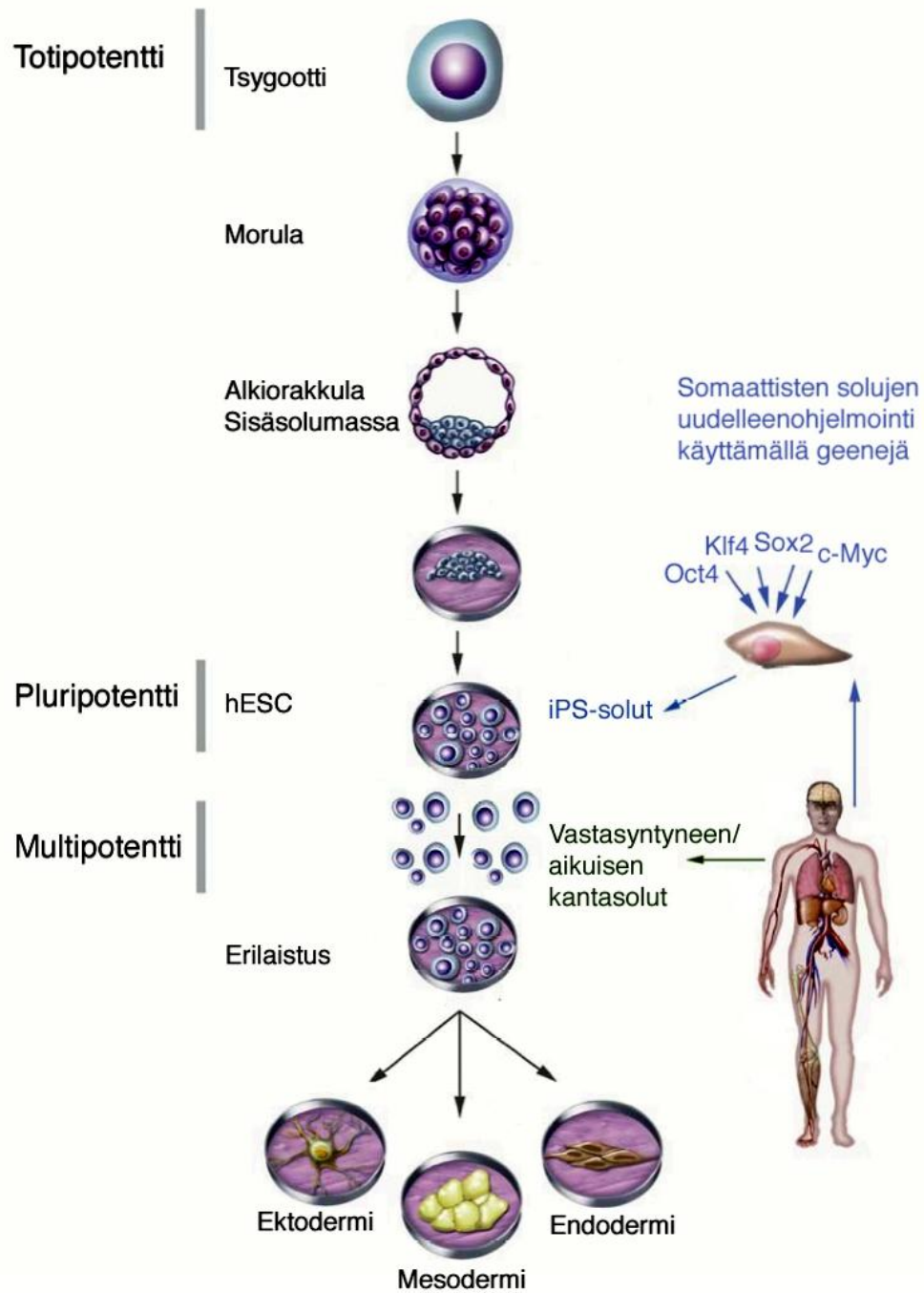
2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Kantasolut

Kantasolut ovat solujen kantamuotoja, jotka kykenevät uusiutumaan kantasoluina sekä muodostamaan erilaisia solu- ja kudostyyppisiä erityisten toimintojen ohjaamina (Wobus, A, M & Boheler, K, R 2005). Kantasolut voidaan jaotella neljään eri ryhmään: totipotentit, pluripotentit ja multipotentit kantasolut sekä progenitorit eli esiastesolut. Hedelmöittyneen alkion solut ovat totipotentteja kantasoluja. Ne voivat siten muodostaa kaikkia elimistön solutyyppisiä, ja myös kokonaisen yksilön. Pluripotentit kantasolut voivat erilaistua kaikiksi elimistön solutyypeiksi, mutta niistä ei voi kehittyä uutta yksilöä. Pluripotentteja kantasoluja eristetään blastokystivaiheisen alkion sisäsolumassasta tai valmistamalla ihmisen somaattisista soluista iPS-soluja (Kuva 1.). Multipotentteja kantasoluja esiintyy aikuisen ja sikiön kudoksissa. Multipotenttien kantasolujen kyky erilaistua on kuitenkin rajallinen. Multipotentit kantasolut pystyvätkin erilaistumaan vain tietyiksi solutyypeiksi. Multipotenttien kantasolujen jakautuessa syntyy joko uusia multipotentteja kantasoluja tai progenitoreja, jotka ovat jo alkaneet erilaistua tietyksi kudokseksi. (Pera, M, F & Dottori, M 2005, Takahashi, K & Ym 2007.)

Koska kantasoluilla on kyky erilaistua eri solutyypeiksi, ne ovat yksi eniten tutkituista aiheista tällä hetkellä solu- ja molekyylibiologiassa (Passier, R & Mummery, C 2003). Kantasolujen avulla pystytään tuottamaan ihmisen solumalleja tutkimuksen ja lääketieteellisuuden tarpeisiin. Kantasolututkimuksesta toivotaan myös olevan apua erilaisten sairauksien ja soluvaurioiden hoidoissa. (Thomas & Ym 1959, Weissman 2000.)

Alkion ja sikiön kantasoluihin liittyy monia eettisiä ongelmia. Kantasoluja ei voida eristää alkioista tai sikiöstä niitä tuhoamatta. Tämän vuoksi tutkimuksissa käytetyistä alkio- tai sikiöperäisten kantasolujen hyödyntämisestä säädellään yksityiskohtaisemmin eri laeissa. (Eskola J, Halila R, Hassinen S, Kiviharju E, Launis V & Ym 2007.)



KUVA 1. Kantasolutyyppit ja erilaistuminen. (Pekkanen-Mattila, M 2012, muokattu)

2.2 Alkion kantasolut

Ihmisen ensimmäinen alkion kantasolulinja tuotettiin vuonna 1998. Alkion kantasoluja voidaan eristää hedelmöityshoidoissa ylijääneistä alkioista. (Thomson, J, A & Ym 1998.) Alkion kantasolulinjat eristetään yleensä 5-8 päivän ikäisen blastokystin sisäsolumassasta. Nämä solut ovat pluripotentteja, itsestään jakautuvia ja voivat erilaistua

kaikiksi kolmeksi alkiokerrokseksi: ektodermiksi, mesodermiksi ja endodermiksi. (Chicha, L & Ym 2011.) Kustakin kerroksesta kehittyy sille tyypillistä solukkoa. Ektodermistä muodostuu keskushermosto ja pintaektodermi, endodermistä ruoansulatuskanava ja -elimet sekä hengityselimet ja mesodermistä luusto, lihaksisto, virtsa- ja sukupuolielimet, verenkiertoelimet ja luuydin. (Sariola, H & Ym 2003.)

Sisäsolumassan kantasolut siirretään tukisolujen päälle, jotka yleensä ovat ihmisen esi-nahan fibroblasteja (human foreskin fibroblast, hFF) tai vaihtoehtoisesti hiiren alkiopereäisiä fibroblasteja (mouse embryonic fibroblast, MEF). Fibroblastit on käsitelty niin, etteivät ne enää kykene jakaantumaan. Siirrostuksen jälkeen soluja viljellään kasvatusliuoksessa, joka sisältää solujen tarvitsemia ravintoaineita ja kasvutekijöitä. Tukisolujen elinikä on lyhyt, koska ne on eristetty primääriwiljelmästä. Siksi tukisolukko pitää uusia ajoittain. (Unger, C & Ym 2009.)

2.3 Uudelleen ohjelmoidut kantasolut

Vuonna 2006 Takahashi ja Yamanaka (2006) julkaisivat löydöksensä: he olivat kehittäneet uudelleen ohjelmoituja kantasoluja (Induced pluripotent stem cells, iPS-solut). Shinya Yamanaka palkittiin yhdessä Sir John B. Gurdonin kanssa iPS-soluteknologian kehittämistä lääketieteen Nobel palkinnolla vuonna 2012. (nobelprize.org 2012.) Uudelleen ohjelmoidut kantasolut valmistetaan jo erilaistuneista somaattisista soluista ilman alkion käyttöä. Uudelleen ohjelmoituja pluripotentteja kantasoluja voidaan valmistaa monella eri menetelmällä. Yksi tapa on retrovirus-menetelmä, jossa ihmisen somaattisen solun, esimerkiksi ihon fibroblastin, sisään viedään viruksen avulla neljä geeniä, jotka ovat Oct4, Klf4, Sox2 ja c-Myc, jolloin somaattinen solu alkaa ilmentää näitä genejä. Nämä geenit ovat tärkeitä kantasolujen erilaistumattomuudelle ja muille määrääville ominaisuuksille. (Takahashi, K & Ym 2007.) Uudelleen ohjelmoituja kantasoluja on tuotettu myös käyttämällä vain Oct4, Klf4 ja Sox2-geenejä tai vain kahta geeniä Oct4 ja Klf4 tai c-Myc (Nakagawa, M & Ym 2008, Park, IH & Ym 2008). Tuotetut kantasolut muistuttavat läheisesti alkion pluripotentteja kantasoluja ja toimivat samalla tavalla. iPS-soluja myös viljellään samalla tavalla kuin alkion kantasoluja. (Takahashi, K & Ym 2007.) iPS-solut pystyvät erilaistumaan kaikiksi kolmeksi alkiokerrokseksi: ektodermiksi, mesodermiksi ja endodermiksi (Mummery, C 2007).

iPS-solut omaavat saman genomien kuin henkilö, jonka soluista ne ovat lähtöisin. Tämä mahdollistaa potilasspesifisten solujen tuoton. (Li, W & Ym 2009.) iPS-solujen käytön avulla voidaan myös selvittää sairauksien mekanismeja ja tuottaa solumalleja lääkeainetestauksiin. Ihmisen somaattisten solujen uudelleen ohjelmoinnissa ei ole samoja teknisiä ja eettisiä kysymyksiä kuin alkion kantasolujen tuotannossa. (Shi, Y 2009.) Pluripotentit kantasolut ilmentävät muun muassa Oct4 (POU5F1), Nanog-, Sox2-, Foxd3-, TRA-1-60-, TRA-1-81-, SSEA4-, SSEA3- ja Rex1-geenejä (Takahashi, K & Ym 2007). Edellä mainittuja geenejä voidaan käyttää markkereina, merkkigeeneinä erilaistumista seurattaessa. Näillä tekijöillä on tärkeä rooli kantasolujen pitämisessä erilaistumattomina. Kantasolujen tunnistamiseksi soluista on löydettävä mielellään useampi kuin yksi kantasolumarkkeri, koska esimerkiksi erilaistumisen alussa Oct4-markkeri ilmenee vielä jonkin aikaa. (Trounson, A 2006.)

2.4 Kantasolujen viljely

Viljeltäessä kantasoluja on tärkeää, että ne säilyvät pluripotentteina ja omaavat vakiintuneen fenotyypin ja karyotyypin. Yksi tekijä, joka auttaa pitämään kantasolut erilaistumattomana, on kasvatus tukisolukon päällä. Yleensä soluviljelyssä käytetään tukisolukona hiiren tai ihmisen fibroblasteja, joihin kantasolut voivat kiinnittyä. Tukisolukko erittää kantasoluille ravinteita ja kasvutekijöitä. Tukisolukon jakautuminen estetään käsittelemällä solut mitomysiini C:llä. (Trounson, A 2006.) Mitomysiini C on vahva antibiootti. Se estää DNA-synteesiä bakteereissa ja viljellyissä ihmissoluissa, mutta se ei estä RNA-synteesiä tai translaatiota. Tämän vuoksi solut kasvavat, mutta eivät jakaannu. (Kuroda, Y & Furuyama, J 1963.)

Kantasolut kasvavat erilaistumattomina kolonioina, jotka täytyy jakaa viikoittain (Trounson, A 2006). Solukolonioiden jakaminen pienempiin osiin tapahtuu mekaanisesti tai entsymaattisesti trypsiini- tai kollageenaasi IV-entsyymien avulla (Brimble, S.N & Ym 2004). Vasikan seerumi (fetal bovine serum, FBS) on ollut käytössä pitkään kantasoluviljelyssä. FBS on eristetty naudun sikiön verestä. Koska FBS on eristetty eläimestä, se ei sovellu tulevaisuuden kliinisiin soluterapiahoitoihin, mutta on silti laajasti käytetty ainesosa kantasolututkimuksissa. (Jochems, C, E, A & Ym 2002.) FBS on ongelmallinen ainesosa, koska se sisältää tuntemattomia ainesosia ja seerumin sisältö vaihtelee. Tästä syystä solujen kyky säilyttää pluripotenssia vaihtelee ja ne voivat jopa eri-

laistua. (Koivisto, H & Ym 2004.) Tästä syystä FBS on laajalti korvattu kantasoluviljelystä. On myös tutkittu, että parempi sydänerilaistustehokkuus saadaan seerumittomissa viljelmissä kuin, että solut kasvavat 20 %:ssa tai pienemmissä FBS-pitoisuuksissa. (Passier, R & Ym 2005.) Kasvatusliuos erilaistumattomille soluille on KSR-medium, joka sisältää muun muassa 20 % kaupallista knockoutTM serum replacement:iä (KO-SR, Invitrogen) ja FGF kasvutekijää (fibroblast growth factor FGF) (Inzunza, J & Ym 2004, Amit, M & Ym 2000). Käyttämällä seerumitonta kasvatusliuosta vähennetään patogeeniriskiä ja eläinperäisiä proteiinikontaminaatioita (Inzunza, J & Ym 2004).

2.5 Kantasolujen erilaistaminen sydänlihassoluiksi

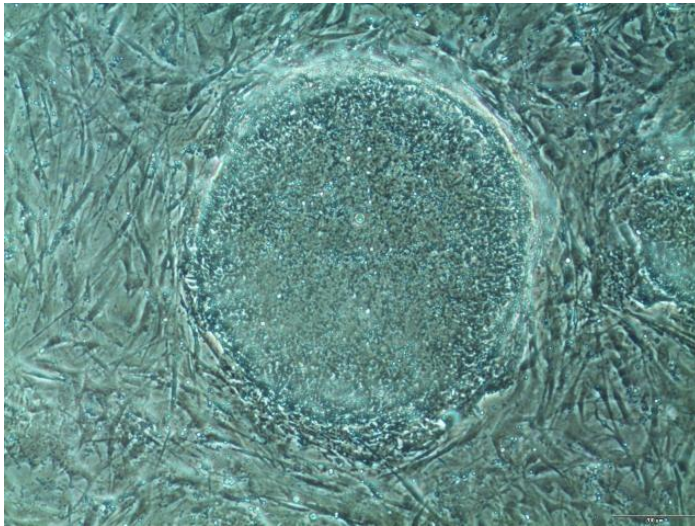
Jo kantasolun gastrulaatiovaiheessa muodostuu mesodermi, ektodermi ja endodermi. Sydän muodostuu mesodermistä. Endodermin tiedetään indusoivan viereistä mesodermiä erilaistumaan sydänlihakseksi. (Passier, R, Denning, C & Mummery, C 2006.) Tämä löydös mahdollistaa sydänerilaistuksen kahdella tavalla: viljelemällä kantasoluja hiiren endodermaalisten solujen (mouse visceral endodermal-like cells, END-2 solut) kanssa, jotka tuottavat sydänerilaistumista edistäviä signaaleja tai lisäämällä kasvatusliuokseen kasvutekijöitä ja hormoneja, joiden avulla kantasolut erilaistuvat sykkiviksi sydänlihassoluiksi (Freund, C & Mummery, C & Ym 2009).

Kasvatusliuokseen lisätyt kasvutekijät ja hormonit edistävät kantasolujen sydänerilaistusta (Freund, C & Mummery, C 2009). Kantasolut tarvitsevat myös tiettyjä kasvutekijöitä pysyäkseen erilaistumattomina. Näitä kasvutekijöitä ovat esimerkiksi FGF ja aktiviini A. Muuttamalla näiden kasvutekijöiden pitoisuuksia, voidaan kantasoluja erilaistaa sydänlihassoluiksi. (Singla, D, K & Burton, E, S 2005.)

Sydänerilaistukseen vaikuttavia kasvutekijöitä ovat muun muassa FGF, transformoiva kasvutekijä beeta (transforming growth factor b, TGF-b), ja Wnt. Wnt ja TGF-b-ryhmä, joka sisältää luun morfogeenisia proteiineja (bone morphogenetic proteins, BMP) ja aktiviini A:ta, osallistuvat viestinvälityksiin, ja niillä on tärkeä osa mesodermin muodostuksessa. (Yang, L & Ym 2008.) FGF vaikuttaa moniin biologisiin toimintoihin, kuten kantasolujen kehitykseen sekä solujen liikkuvuuteen ja kasvuun. Lisäksi sen käytöllä on saavutettu lisääntynyt sydänlihassolujen erilaistustehokkuus ihmisen kantasolulinjoilla. (Singla, D, K & Burton, E, S 2005.)

Sydänlihassoluja voidaan erilaistaa laboratorio-olosuhteissa erilaisina viljelminä END-2 solujen päällä (Kuva 2.) käyttämällä KO-SR-kasvatusmediumia (Passier, R & Ym 2005). Christine Mummeryn (2003) mukaan sykkivät sydänlihassolut tulevat yleensä näkyville, kun erilaistuksesta on kulunut 12-20 päivää. Pluripotentista kantasoluista erilaistettujen sydänlihassolujen morfologiaa voidaan käyttää karakterisoinnissa (Snir, M & Ym 2003).

Sydänerilaistuksessa seurataan solujen suuntautumista sydänlihassoluiksi tutkimalla soluja m-RNA- tai proteiinitasolla. Sydänlihassoluja karakterisoidaan tutkimalla sydänlihassolujen geenien ilmentymistä. Sydänerilaistusta voidaan seurata proteiinitasolla värjäämällä solut immunokemiallisin menetelmin. (Passier, R & Ym 2005.)



KUVA 2. Kantasolukolonia solulinjasta A116 p. 16 sydänerilaistuksen neljäntenä päivänä.

2.6 Sydänlihassolujen karakterisointi

2.6.1 Immunofluoresenssivärjäys

Immunofluoresenssivärjäyksellä voidaan havainnollistaa solujen osia tai kudoksia käyttämällä fluoresenssileimattuja vasta-aineita. Vasta-aineet, immunoglobuliinit ovat glykoproteiineja, joita esiintyy ihmisen seerumissa ja niiden tarkoitus on tunnistaa ja tuhota vieraita organismeja. Menetelmä perustuu erittäin herkkään vuorovaikutukseen, jossa

tietty fluoresenssileimattu vasta-aine sitoo siihen tarkoitetun antigeenin. Kun antigeenit ovat tarttuneet vasta-aineiden spesifiseen kohtaan aiheuttaen fluoresenssin, voidaan näyttää tarkastella fluoresenssimikroskoopilla. (Wilson, K & Walker, J 2005.)

Kaikki vasta-ainemolekyylit muodostuvat neljästä polypeptidiketjusta: kahdesta identtisestä raskaasta ja kahdesta identtisestä kevyestä ketjusta, jotka ovat yhdistyneet toisiinsa disulfididisidoksilla. Neljä ketjua muodostaa nivelmäisen alueen. Nivelmäinen rakenne mahdollistaa molekyylin joustavuuden, kun antigeeni sitoutuessaan reseptoriin aiheuttaa erilaisen avaruudellisen suuntautumisen. Vasta-aineen reseptori sijaitsee molempien ketjuhaarojen päissä. Vasta-aineissa esiintyy viittä erilaista raskasketjua: IgG, IgM, IgA, IgD ja IgE. Kaikki ryhmät sitoutuvat antigeeniin, mutta immunobiologinen toiminta vasta-aineen vaikutuksesta vaihtelee. IgG, IgE ja IgD ovat etupäässä tavallisia neljän ketjun monomeerirakenteita, mutta IgA on usein dimeerinen ja IgM on pentameerinen, ainakin nisäkkäillä. Multimeeriset IgA ja IgM sisältävät pienen J-ketjun, joka mahdollistaa polymeroitumisen. Useimmin käytetty vasta-aine immunokemiallisissa menetelmissä on IgG. (Wilson, K & Walker, J 2005, Willey, J, M & Sherwood, L, M & Woolverton, C, J 2009.)

Vasta-aineiden herkkyys tekee niistä tehokkaita analyttisesti. Immunofluoresenssimäärityksessä vasta-aineen ja antigeenin havainnoimisessa käytetään leimattuja vasta-aineita, jotka emittoivat näkyvää fluoresenssivaloa. (Wilson, K & Walker, J 2005.)

Immunofluoresenssinäytteiden valmistuksessa on erilaisia tapoja. Yksi näytteenvalmistustapa on kiinnittää näyte lasilevyille. Usein näyte kiinnitetään myös kuoppalevyn pohjalle. (Passier, R & Ym 2005, Graichen, R & Ym 2008.)

Cytospin-menetelmässä solut sentrifugoidaan lasilevyille cytospin-laitteella sydänlihassolujen erilaistamistehokkuuden määrittämiseksi (Graichen, R & Ym 2008). Sydänlihassolujen osuus muista soluista määritetään leimaamalla sydänlihassolut niille spesifisellä Troponiini T-vasta-aineella (Boheler, K, R & Ym 2002).

Useimmin käytetyssä epäsuorassa värjäysmenetelmässä leimattu sekundäärivasta-aine tunnistaa antigeeniin sitoutuneen leimaamattoman primäärivasta-aineen. Sekundäärivasta-ainetta valitessa täytyy ottaa huomioon, että se sitoutuu spesifisesti primäärivasta-aineeseen eikä muihin näytteen osiin. Primäärivasta-aine ja sekundäärivasta-aine eriste-

tään yleensä eri eläinlajeista, esimerkiksi jos primäärivasta-aine IgG on eristetty hiirestä, niin sekundäärivasta-aine anti-IgG on eristettävä esimerkiksi kanista. (Walker, J, M & Rapley, R 2008, Wilson, K & Walker, J 2005.)

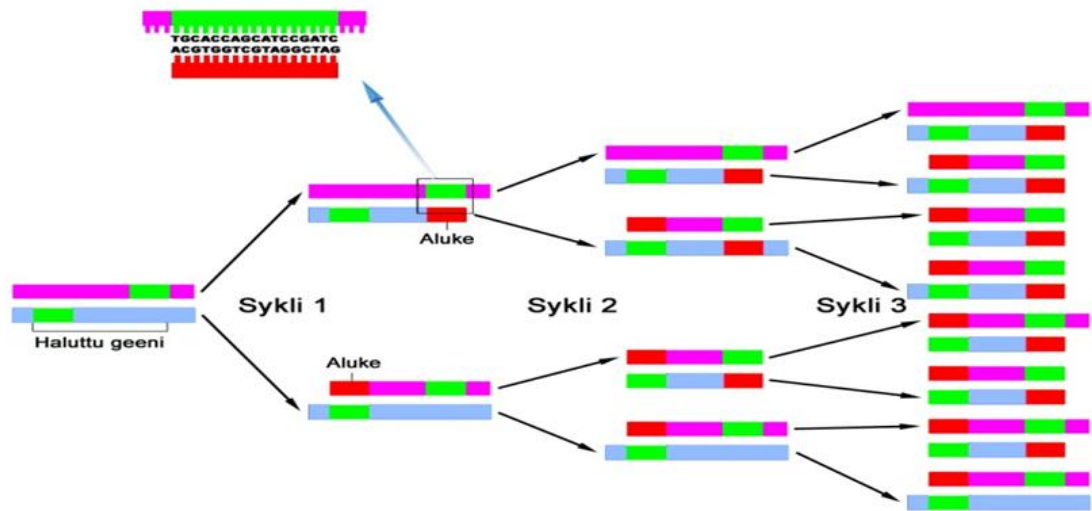
Sydänerilaistusta voidaan seurata sydänspesifisten proteiinien avulla, värjäämällä solut immunokemiallisella värjäysmenetelmällä. Alfa-aktiniini sitoutuu poikkijuovaisiin lihaksiin ja sydänlihaksiin ja troponiini T sitoutuu ohuisiin säikeisiin poikkijuovaisissa lihaksissa. (ncbi, National Center of Biotechnology Information 2011.) Konneksiini-43:lla on tärkeä osa vierekkäisten solujen välisessä viestinnässä ja se sitoutuu kammiooperäisiin sydänlihassoluihin (Schulz, R & Ym 2003, Gaborit, N & Ym 2007). Sydänlihassoluissa konneksiini-43 sitoutuu myös Ca^{2+} -kanaviin (Heino, J & Vuento, M 2004). Myosiinit ovat proteiineja, jotka yhdessä alfa-aktiniinin kanssa aiheuttavat lihas-solujen supistumisen, kun myosiininraskasketjun pää tarttuu aktiniinin pintaan (Niemi-nen, M. & Haikala, H. 1995). Ventrikulaarinen myosiini sitoutuu kammiooperäisiin li-hassoluihin (Kolossof, E & Ym 2005).

2.6.2 Kvantitatiivinen PCR

Polymeraasiketjureaktiolla eli PCR-menetelmällä monistetaan kahden nukleotidijärjes-tykseltään tunnetun DNA-jakson välistä DNA-jaksoa. PCR:llä pystytään monistamaan DNA-jaksoja eksponentiaalisesti, kun menetelmässä on mukana nukleotideja, alukkeita ja lämmönkestäviä polymeraasientsyymejä. Alukkeet ovat lyhyitä tunnettuja DNA-segmenttejä. Polymeraasientsyymit on eristetty bakteereista, joita löytyy kuumista läh-teistä. Yleisimmin käytetty on Taq-polymeraasi. (Suominen, I & Ym 2010.)

PCR-menetelmässä on kolme vaihetta: denaturaatio, kiinnittyminen ja ekstensio. Dena-turaatiossa lämpötila nostetaan noin +95 asteeseen, joka aiheuttaa kaksijuosteisen DNA:n juosteiden erkanemisen. Tämän jälkeen lämpötilaa lasketaan noin +55 asteeseen, jolloin alukkeet kiinnittyvät niille komplementaariseen kohtaan templaatti DNA:han. Ekstensio-vaiheessa lämpötila nostetaan noin +72 asteeseen, jolloin DNA-polymeraasientsyymi liittää nukleotideja templaatin mallin mukaisesti alukkeen 3'-päästä eteenpäin. Näiden kolmen vaiheen jälkeen syntyy templaatin kummallekin nau-halle vastinjuoste. Lämpötilan pikaisella nostolla noin +95 asteeseen saadaan juosteet irtoamaan toisistaan. Näitä kolmea vaihetta kutsutaan sykliksi (kuva 3.) ja yleisesti 25-

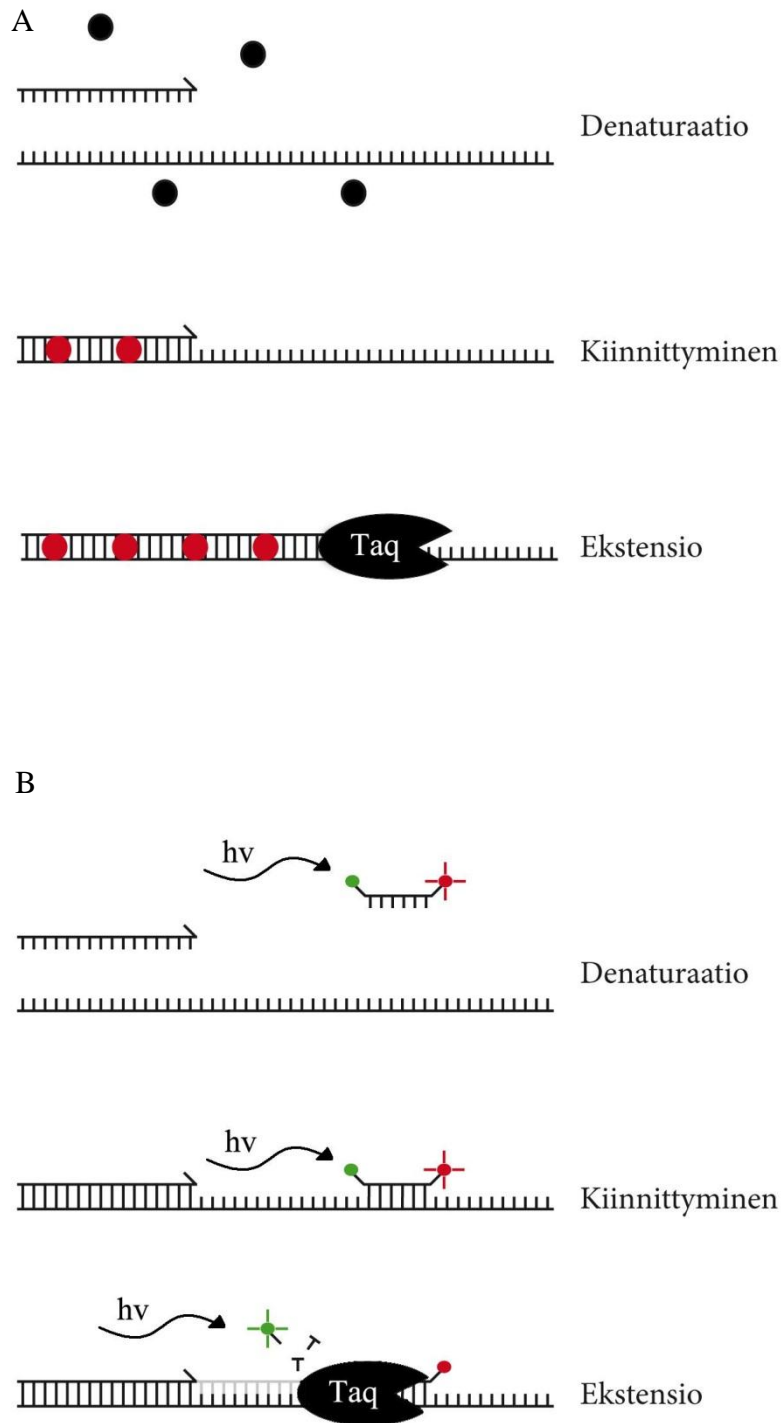
35 syklin PCR-menetelmä tuottaa tarpeeksi spesifistä DNA-tuotetta. (Suominen, I & Ym 2010.)



KUVA 3. Polymeerasiketjureaktio (Mukaillen Willey & Ym 2011, 405)

Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (Quatitative Real-Time PCR, qRT-PCR) on erittäin herkkä ja paljon käytetty PCR-menetelmä (Suominen, I & Ym 2010). Tavoitellun näytämäärän havaitsemiseen qPCR:ssä käytetään fluoresenssileimoja. Fluoresenssileimat sitoutuvat monistuneisiin DNA-sekvensseihin ja emittoivat fluoresenssia. Kvantitatiivisessa reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä templaatin määrää voidaan seurata fluoresenssileimojen antamasta signaalista syklien aikana. (Wilson, K & Walker, J 2005; Willey, J. M., Sherwood, L. M. & Woolverton, C. J. 2009.)

SYBR Green I on yksi yleisimmin käytetyistä epäspesifisistä leimatekniikoista. SYBR Green I on vapaana reaktioseoksessa, kun DNA on denaturoituneena (kuva 4.A.). PCR-reaktiossa alukkeet lukevat DNA-juostetta vastakkaisiin suuntiin. Kun aluke sitoutuu templaatti-DNA:n ja muodostuu kaksijuosteinen DNA, SYBR Green I väriaine sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han. Fluoresenssin intensiteetti on verrannollinen DNA:n määrään. Jokaisen syklin jälkeen fluoresenssin kasvu voidaan havainnoida. (Applied Biosystems 2011, Shipley, 2006.)



Kuva 4. SYBR Green I ja TaqMan leimatekniikoiden toimintaperiaate (mukaihen Applied Biosystems, 2011).

TaqMan -menetelmä käyttää sekvenssi-spesifisiä fluoresenssikoettimia. TaqMan:n koettin sisältää kaksi päätä: fluorofori (fluoresoiva reportteri) ja vaimentaja (quencher). Fluorofori sijaitsee koettimen DNA:n 5' päässä ja vaimennin 3' päässä. (Kuva 4.B.) Vai-

mentaja sammuttaa fluoroforin fluoresenssin, kun fluorofori ja vaimentaja ovat lähekkäin. Jos PCR:ssä muodostuu koettimen kohdesekvenssiä, koetin sitoutuu siihen. Kun DNA polymeraasi tekee templaatille vastinjuostetta, se pilkkoo koettimen. Tällöin fluorofori pääsee kauemmaksi vaimentajasta, ja alkaa fluoresoida. DNA:n monistuessa myös fluoresenssin määrä kasvaa. (Applied Biosystems 2011.)

DNA monistuksen jälkeen DNA:n tunnistamiseen käytetään dissosiaatiomenetelmää. Tätä menetelmää käytetään PCR monistussykliin jälkeen. Erottusvaihe sisältää kolme eri vaihetta (taulukossa 1.).

TAULUKKO 1. Dissosiaatiomenetelmä

Lämpötila	95°C	60°C	95°C
Aika	15 sekuntia	1 minuutti	15 sekuntia

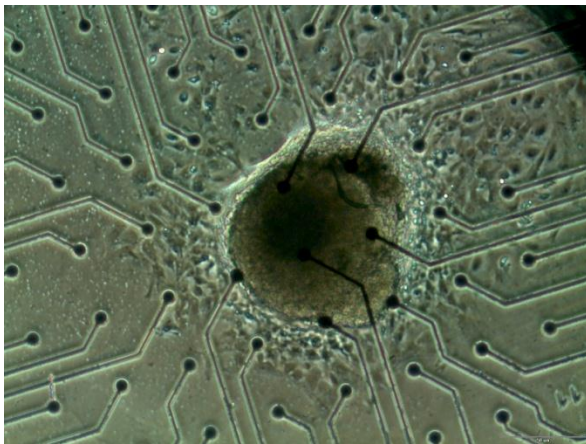
Monistetun tuotteen erottumislämpötila antaa DNA:lle sulamislämmön, joka kertoo nukleinihappojen GC/AT suhteen ja DNA-juosteen pituuden. Tämä antaa tiedon DNA-sekvenssistä ja muista epäspesifistä PCR tuotteista. (Ririe, K, M & Ym 1997.)

DNA toimii PCR:ssä templaattina. Soluista eristetty RNA käännetään DNA:ksi. DNA:n kääntö tehdään käyttäen RT-PCR-menetelmää (englanniksi reverse transcription PCR), jossa käänteisskriptaasi-entsyymi valmistaa RNA:sta cDNA-juosteen. Tämän jälkeen voidaan jatkaa PCR-työskentelyä normaalisti. (Suominen, I & Ym 2010.)

Sydänlihassolujen geenejä ovat muun muassa Troponiini T, Nkx2-5 ja Brachyury T. Troponiini T on osa tropomyosiini-kompleksia ja esiintyy poikkijuovaisessa lihaskudoksessa, kuten sydämessä. Se toimii lihaksen supistuksessa kalsiumioni konsentraation säätelijänä. Nkx2-5 toimii sydämen muodostuksessa ja kehityksessä. Brachyury T esiintyy erilaistumisen alkuvaiheessa mesodermaalisessa muodostumisessa ja erilaistuksessa. (ncbi, National Center of Biotechnology Information 2011.)

2.6.3 Sydänlihassolujen toiminnallinen testaus

Erilaistettut sykkivät sydänlihassolut ilmaisevat spontaania aktiopotentiaalia (action potential, AP) ja sykkimistoimintaa ja ne ilmentävät sydänlihasrakenteen proteiinien ja ionien virtausta (Kehat, I & Ym 2001, He, J, Q & Ym 2003, Mummery, C & Ym 2003). Erilaistuksen aikana joidenkin ionikanavia koodaavien geenien ilmentyminen kasvaa rajusti. Kantasoluperäiset sydänlihassolut kypsyvät myös ajan kuluessa viljelmissä. (Sartiani, L & Ym 2007.)



KUVA 5. Sydänlihassoluaggregaatti MEA-kaivossa kiinnittyneenä elektrodien päälle.

Micro-electrode array (MEA) tekniikka mahdollistaa käytännöllisen tavan tutkia solun elektrofysiologiaa, varsinkin kantasoluperäisistä sydänlihassoluista. MEA- menetelmässä sydänlihassoluaggregaatit ovat elektrodien päällä kaivotyyppisessä alustassa (kuva 5.) ja niitä voidaan mitata toistuvasti pitkiä aikajaksoja. (Reppel, M & Ym 2004.) Perinteisesti patch-clamp-menetelmää on käytetty analysoitaessa yksittäisten sydänlihassolujen toimintapotentiaalia ja myös niiden elektrofysiologisia ominaisuuksia. Patch-clamp-menetelmällä voidaan soluista tutkia proteiinien ja ionien virtausta. (Hescheler, J & Ym 2004, Brüggemann, A & Ym 2006.) Lisäksi MEA- tai patch-clamp menetelmillä voidaan testata lääkeaineiden vaikutuksia kantasoluperäisiin sydänlihassoluihin (Braam, S, R & Ym 2010).

3 TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS

Työn tavoitteena oli verrata sydänerilaistumista alkion ja uudelleen ohjelmoitujen kantasolulinjojen välillä sekä karakterisoida erilaistuneet sydänlihassolut. Tässä tutkimuksessa käytettiin kahta eri menetelmällä valmistettua uudelleen ohjelmoitua kantasolulinjaa. Vastasyntyneen fibroblasteista valmistetussa kantasolulinjassa oli käytetty hiiren lenti-+ retrovirusmenetelmää ja aikuisen fibroblasteista valmistetussa kantasolulinjassa ihmisen retrovirusmenetelmää.

Työn tarkoituksena oli tutkia, eroaako erilaistuminen sydänsoluiksi näiden vastasyntyneen ja aikuisen fibroblasteista eri menetelmillä tuotettujen uudelleen ohjelmoitujen kantasolulinjojen välillä sekä alkion kantasolulinjan ja uudelleen ohjelmoitujen kantasolulinjojen välillä. Sydänlihassoluksi erilaistamisen tehokkuutta arvioitiin laskemalla sydänlihassoluagregaatteja päivänä 22 ja troponiini T-positiivisia sydänlihassoluja käyttäen cytospin-menetelmää. Erilaistettuja sydänlihassoluja karakterisoitiin immunofluoresenssivärijäys- ja MEA-menetelmillä ja kvantitatiivisen polymeerasiketjureaktion avulla määritettiin sydänspesifisten geenien ilmentymistä päivinä 0, 3, 6 ja 13. Lisäksi arvioitiin sykkivien sydänlihassolualueiden kokoa ja morfologiaa.

4 TYÖN SUORITUS

4.1 Ihmisen kantasolujen viljely

Kantasoluja viljeltiin +37 °C:ssa ja 5 %:n hiilidioksidipitoisuudessa kuoppalevyillä. Kantasoluja viljeltiin monisoluisina koloniona hiiren alkion fibroblastien päällä. Fibroblastien jakaantuminen pysäytettiin sädetyksellä ennen kantasolujen maljaamista. Kantasoluille käytettiin kasvatusliuoksena KSR-mediumia, joka sisältää KO-DMEM-pohjaliuosta, 20 % seerumin korvausainetta KO-SR:ä sekä muita tärkeitä ravintoaineita (Liite 1). Medium vaihdettiin viisi kertaa viikossa kantasolujen ravintoaineiden turvaamiseksi. Kantasolut jaettiin uusille viljelymaljoille viikoittain, koska solutiheyden kasvaessa liian suureksi kantasolut alkavat erilaistua ja menettää jakautumiskykynsä. Jakovaihe suoritettiin entsyymaattisesti käyttämällä kollagenaasi IV:ä.

Tutkimuksessa käytettiin kolmea eri kantasolulinjaa: alkion kantasolulinja FES29:ä (Mikkola, M & Ym 2006), vastasyntyneen fibroblasteista Regeassa valmistettua kantasolulinjaa h1/12 (Lahti, A, L & Ym 2011) sekä aikuisen fibroblasteista Helsingissä valmistettua kantasolulinjaa A116 (Ory, D, S 1996). Vastasyntyneen uudelleen ohjelmoitu kantasolulinja h1/12 oli tuotettu käyttämällä hiiren lenti- ja retrovirusmenetelmää, ja aikuisen uudelleen ohjelmoitu kantasolulinja A116 oli tuotettu käyttämällä pelkästään ihmisen retrovirusmenetelmää.

4.2 Kantasolujen erilaistaminen sydänlihassoluiksi

4.2.1 END-2-solujen kasvatus

END-2 solulinja on alkujaan saatu lahjoituksena professori Christine Mummeryltä (Mummery, C & Ym 1991). END-2 soluja kasvatettiin gelatiinilla päällystetyssä soluviljelypulloissa END-2-mediumin kanssa (Liite 1.). Solut jaettiin entsyymaattisesti trypsiinillä kaksi kertaa viikossa, jolloin ne säilyttivät kasvukykynsä ja jakautuivat eksponentiaalisesti.

4.2.2 Kantasolujen maljaus END-2-maljalle

Kantasolujen erilaistaminen sydänlihassoluiksi tapahtuu käyttämällä hiiren endodermaalista solukkoa (END-2) tukialustana kantasoluille. Ennen END-2 solujen maljaamista, niille tehtiin kolmen tunnin mitomysiini -C-käsittely. Kantasolut siirrettiin END-2 tukisolukolle siinä vaiheessa, kun kantasolut olivat ehtineet kasvaa kolonioksi, mutta eivät vielä olleet spontaanisti erilaistuneet. Kantasolut kasvoivat 6-kuoppalevyllä, josta MEF-tukisolukko poistettiin ja kantasolut raaputettiin alustasta irti. Noin 30 kantasolukoloniapalasta siirrettiin 12-kuoppalevyn kuoppiin, jotka sisälsivät 175 000 END-2 solua ja 0 % KO-SR hES-mediumia sekä askorbiinihappoa eli C-vitamiinia.

0 % KO-SR hES-medium vaihdettiin erilaistuksen aikana päivinä 6, 9 ja 13. Päivänä 15 vaihdettiin 10 % KO-SR hES-medium ja tästä eteenpäin 10 % KO-SR hES-medium vaihdettiin kolme kertaa viikossa. Jokaisesta kantasolulinjasta tehtiin kaksi sydänlihassoluerilaistusta. Päivänä 6 kuoppalevylle kiinnittyneet solukoloniat laskettiin käyttäen tavallista valomikroskooppia ja lämpölevyä. Päivänä 22 laskettiin sykkivien soluagregaatien määrä ja kuvattiin niiden morfologiaa. Soluja mikroskoipoitaessa käytettiin nelinkertaista suurennosta.

4.2.3 Dissosiaatio

Sykkivät sydänlihassolualueet leikattiin mekaanisesti päivänä 22 käyttämällä steriiliä kirurginveistä. Sykkivät alueet siirrettiin yhteen 24-kuoppalevyn kuoppaan omassa mediumissaan. Tämän jälkeen sykkivät alueet dissosioitiin eli hajoitettiin kolmessa eri dissosiaatiopuskurissa: 1, 2, ja 3. (Liite 2). Inkubaatioajat olivat näille samassa järjestyksessä: 30 minuuttia, 45 minuuttia ja yksi tunti. Inkubaatiot 1 ja 3 tehtiin huoneenlämpötilassa ja inkubaatio 2 +37 °C inkubaattorissa. Kaikkien inkubaatioiden jälkeen soluille lisättiin EB-mediumia ja purskutettiin pipetillä solukoloniat irrallisiksi soluiksi. Soluliuos jaettiin neljään gelatiinilla päällystettyyn kaivoon ja EB-mediumia lisättiin niin, että lopputilavuus oli 1 ml. Dissosioidut solut siirrettiin inkubaattoriin 5-7 päiväksi, missä ne kiinnittyivät alustaansa. Tämän jälkeen soluille tehtiin immunofluoresenssivärykset.

4.3 Näytteiden tutkiminen immunofluoresenssivärjäyksen avulla

Cytospin-näytteiden värjäyksessä oli käytössä vain Troponiini T (Abcam) -vasta-aine. Dissosioiduille soluille käytettiin värjäyksessä seuraavia vasta-aineita tai vasta-ainepareja: alfa-aktiniini (Chemicon), konneksiini-43 (Sigma) ja troponiini T sekä ventrikulaarinen myosiinin raskas ketju (myosin heavy chain, MHC)(Sigma) ja troponiini T.

Immunofluoresenssivärjäys tehtiin dissosioisuille sydänlihassoluille ja cytospin-näytteille. Solut pestiin kaksi kertaa fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (Phosphate buffered saline, PBS) viiden minuutin ajan ja fiksattiin 4 % paraformaldehydillä (PFA, Sigma) 20 minuuttia. Tämän jälkeen solut pestiin kaksi kertaa PBS:llä viiden minuutin ajan. Fiksatus solut blokattiin huoneen lämpötilassa 45 minuutin ajan PBS-liuoksessa, jossa oli 10 % aasin seerumia (normal donkey serum, NDS), 0,1 % TritonX-100 ja 1 % naudan seerumista eristettyä albumiinia (Bovine serum albumin, BSA). Blokatus solut pestiin primäärivasta-aine -liuoksella, joka sisälsi 1 % NDS, 0,1 % TritonX-100, 1 % BSA ja vasta-aineet. Primäärivasta-aineita inkuboitiin +4 °C:ssa yön yli.

Seuraavana päivänä pestiin solut kolme kertaa 1 % BSA:lla 5-7 minuuttia. Pesun jälkeen soluille pipetoitiin sekundäärivasta-aineet ja inkuboitiin huoneen lämpötilassa tunnin ajan valolta suojattuna. Tämän jälkeen solut pestiin vielä kolme kertaa PBS:llä viiden minuutin ajan. Viiden minuutin pesu tehtiin myös kaksi kertaa PB-liuoksella, joka sisälsi natriumdivetyfosfaattia. Lopuksi solut käsiteltiin Dapi värillä (vectashield) ja laitettiin peitinlasit käsiteltyjen solujen päälle. Värjättyt solut säilötiin valolta suojattuna +4 °C:n lämpötilassa.

4.4 Erilaistustehokkuuden määrittäminen Cytospin®-menetelmällä

Cytospin-näytteet valmistettiin, kun sydänlihassoluerilaistamisen aloituksesta oli kulu-
nut 16 päivää. 12-kuoppalevyiltä pestiin kuopat, jossa oli solut pohjalla, jotta mahdolli-
nen medium ja kuolleet solut saataisiin pois. Kuoppiin lisättiin trypsiiniä, joka hajotti
solut erillisiksi soluiksi. Trypsiiniä pipetoitiin ylös ja alas, jotta mahdolliset solurykel-
mät hajoaisivat. Kuoppiin lisättiin EB-mediumia ja solut kerättiin puhtaaseen falcon-
putkeen. Solut laskettiin Neubauerin laskukammion avulla. Cytospin-näytteistä tehtiin
rinnakkaismääritys.

Soluja sentifugoitiin 500 000 – 1 000 000 solua lasilevyllä. Solut sentrifugoitiin cytospin kammioissa, joihin tuli kammio-osa, kuminen tiiviste ja metallinen lukkosysteemi sekä lasilevy. Soluliuosta laimennettiin PBS:llä niin, että saatiin haluttu solumäärä, ja lisättiin laimennettu soluliuos kammioihin. Solut sentrifugoitiin laselle cytospinlaitteella 800 rpm:n nopeudella viiden minuutin ajan. Kammioista poistettiin neste ja annettiin lasien kuivua. Tämän jälkeen näytelaseille tehtiin fiksaatio ja immunofluorensenssivärjäys.

Värjäyksessä käytettiin primäärivasta-aineena troponiini T:ä ja sekundäärivasta-aineena hiiren IgG:ä (Abcam) ja huolehdittiin, että näytteet eivät päässeet kuivumaan aineiden vaikutuksen aikana. Värjäyksen jälkeen näytteen päälle kiinnitettiin lasi kynsilakalla suojamaan näytekohtaa. Kuvat otettiin 20x suurennoksella Dapi-kanavalla ja punaisen aallonpituuden kanavalla. Kuvista laskettiin solujen määrä sekä troponiini-positiiviset solut, jotka ovat sydänlihassoluja.

4.5 Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR (RT-PCR, QPCR)

4.5.1 Kokonais-RNA:n eristys ja pitoisuuden mittaaminen

RNA-näytteet otettiin erilaistetuista sydänlihassoluista päivinä 0, 3, 6 ja 13. Kahden sattumanvaraisesti valitun 12-kuoppalevyn kuopan solut raaputettiin soluraaputtimella ja pestiin kerran PBS:lla. Soluliuos siirrettiin eppendorf-putkiin ja sentrifugoitiin solupalaset pohjalle. PBS-liuos poistettiin ja tilalle pipetoitiin 350 µl RA1 puskuria hajottamaan näytteitä. Näytteet säilöttiin -80 °C pakastimeen, kunnes RNA:n eristys aloitettiin.

Näytteiden RNA eristyksessä käytettiin kaupallista kittiä (Macherey-Nagel). Valmistajan työohjeen mukaan näytteet suodatettiin käyttämällä sentrifuugia ja suodatinkalvoa sitomaan RNA-jaksoja. Suolan poistamiseen käytettiin kalvon suolanpoistopuskuria (membrane desalting buffer, MEDB). DNA poistettiin entsymaattisesti käyttämällä DNAasia, joka hydrolysoi DNA juosteen fosfodiesterisidoksia. Jäljelle jäänyt RNA pestiin kolme kertaa valmistajan pesupuskureilla ja RNA liuotettiin 60 µl:aan vettä, joka ei sisällä RNAaseja (Macherey, Nagel. 2010).

RNA-eristyksen jälkeen näytteiden puhtaus mitattiin Nanodrop spektrofotometrillä ja näytteet varastoitettiin -80 °C:een. Näytteiden puhtaus määritettiin vertaamalla kahta eri spektrofotometrin aallonpituuden antamaa absorbanssiarvoa: 280 nm / 260 nm. RNA näytteet ovat puhtaita, kun absorbanssiarvojen suhde on noin 2,1 (Biomedical Genomics. 2007).

4.5.2 cDNA-kääntö

Näytteistä eristetty RNA käännettiin komplementaariseksi DNA:ksi käyttämällä käänteiskopioijaentsyymiä. RNA:n kääntö komplementaariseksi DNA:ksi suoritettiin normaalilla PCR laitteella ja näytteet pidettiin jäissä työskentelyn aikana. cDNA käännön jälkeen näytteet säilytettiin pakastimessa -4 °C:n lämpötilassa PCR-ajoon asti. Näytteet laimennettiin vedellä niin, että saatiin RNA-konsentraatioksi 500 ng / 10 µl. Kaikista RNA näytteistä tehtiin rinnakkaisnäyte ja RNA pipetoitiin rinnakkaisista näytteistä yhteen näyteputkeen niin, että saatiin haluttu RNA konsentraatio 500 ng / 10 µl. Näyte laimennettiin RNAasi-vapaalla vedellä 10 µl:n kokonaistilavuuteen.

Master mix -reaktioseos valmistettiin taulukon 2. mukaisesti ja 10 µl näyteliuosta (500 ng / 10 µl) lisättiin jokaiseen näyteputkeen. Näyteputkien liuos sentrifugoitiin ja ajettiin PCR-laitteella. PCR-laitteen ajo-olosuhteet on esitetty taulukossa 3.

TAULUKKO 2. Master mix reaktioseos

Reagenssi	Määrä µl (yksi reaktio)
10x RT puskuri	2
25x dNTP seos	0,8
10x satunnaisaluke	2
Käänteiskopioija	1
Rnaasi inhibiitori	1
H ₂ O	3,2

TAULUKKO 3. PCR-ajo-olosuhteet

Lämpötila	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Aika	10 min	120 min	5 s	∞

4.5.3 Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR

Puolet näytteestä laimennettiin 1:3 kvantitatiivista PCR ajoa varten. Solunäytteiden karakterisoinnissa käytettiin useita geenimarkkereita. Käytetyt markkerit ja havainnollistamistekniikat on lueteltu taulukossa 4. Jokainen geenimarkkeri ajettiin qPCR:llä erikseen omalla kuoppalevyllään.

TAULUKKO 4. Tutkimuksessa käytetyt geenimarkkerit

Geeni	Detektiokemia
Nanog	TaqMan
OCT $\frac{3}{4}$ (POU5F1)	TaqMan
RPLP0	TaqMan
PPIG	SYBR Green
Troponiini T	SYBR Green
Brachyury T	SYBR Green
Nkx2,5	SYBR Green

Kaupallinen Master mix-liuos oli valmista käytettäväksi. Aluksi valmistettiin työskentelyliuos Master mix:stä, vedestä ja alukkeista. Yhteen näytteeseen käytettiin 7,5 μ l Master mix:iä, 5,75 μ l vettä ja 0,75 μ l TaqMan-alukkeita tai 0,9 μ l SYBR Green-alukkeita. Työskentelyliuksesta pipetoitiin 96-kuoppalevyille 14 μ l kuhunkin kaivoon. Näytettä pipetoitiin 1 μ l kaivoihin. Kaikista näytteestä tehtiin kolme rinnakkaisnäytettä pipetointivirheen ja kontaminaatoriskin varalle. Kontrollinäytteinä jokaisessa kuoppalevyssä oli myös negatiivinen kontrolli (-RT) ja vesi. Negatiivisena kontrollina oli RPLP0 TaqMan-kemialle ja PPIG SYBR Green-kemialle. Negatiiviset kontrollinäytteet oli valmistettu samalla tavoin kuin normaalit näytteet, mutta niistä puuttui entsyymi. Pipetoinnin jälkeen kuoppalevy päällystettiin tiiviisti läpinäkyvällä muovikalvolla.

Ennen qPCR-ajoa kuoppalevy sentrifugoitiin, jotta kaikki liuokset olisivat kuoppalevyn pohjalla. Kuoppalevy asetettiin qPCR-laitteeseen, johon oli määritetty lämpötilaohjelma ajoa varten. Taulukossa 5. on esitetty lämpötilaohjelma, jota käytettiin TaqMan-kemialle ja taulukossa 6. SYBR Green-kemialle.

TAULUKKO 5. Kvantitatiivisen PCR:n lämpötilaohjelma TaqMan-kemialle

Lämpötila	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Aika	2 min	10 min	15 s	1 min
Syklit	1	1	40	

TAULUKKO 6. Kvantitatiivisen PCR:n lämpötilaohjelma SYBR Green-kemialle

	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C	95 °C	60 °C	95 °C
Aika	2 min	10 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s
Syklit	1	1	40		1	1	1

Kvantitatiivisen PCR-ajon jälkeen tulokset analysoitiin käyttäen suhteellisen geeniekspression aineistoa ja $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -menetelmää, jonka on esittänyt Livak, J ja Schmittgen, T, D (2001, 402-408). Kvantitatiivisten PCR-signaalien ja laskukaavan avulla määritetään halutun tuotteen osuus housekeeping-geenistä. Tutkimuksessa käytetyt housekeeping-geenit olivat TaqMan:lle RPLP0 ja SYBR Green:lle PPIG. Q-PCR:n tarkoitus on osoittaa geenien ilmentymisen erot sydänerilaistamisen aikana.

4.6 Microelectrode Array (MEA)

Sykkivien sydänlihassolujen sähköistä aktiviteettia seurattiin käyttämällä Micro Electrode Array (MEA) menetelmää. Sykkivät soluaggregaatit leikattiin 12-kuoppalevytä, kun sydänerilaistuksen aloituksesta oli kulunut 22 tai 23 päivää. Sykkivät soluaggregaatit siirrettiin MEA-kaivoihin, joiden pohja oli käsitelty FBS:llä 30 min ja gelatiinilla tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Tutkimuksessa käytetyt MEA-kaivot olivat 8x8 elektrodin sommitelmia, jotka sisälsivät 60 erillistä titaniumnitridi-pinnoitteella päällystettyä elektrodia. Sykkivien soluaggregaattien oli tarkoitus tarttua elektrodien päälle, jotta niiden sykkimistä voitiin mitata. Kasvatusliuoksena käytettiin EB-mediumia, joka vaihdettiin kolme kertaa viikossa.

Sykkivien sydänlihassolujen sähköistä aktiviteettia mitattiin, kunnes soluaggregaatit olivat kiinnittyneet MEA-kaivon pohjaan. Aineistoa nauhoitettiin käyttämällä MC_Rack ohjelmaa (Multichannel Systems, MCS). Näytteet nauhoitettiin 20 kHz taajuudella ja +37 °C lämpötilassa. Kaikkien elektrodien antamaa signaalia nauhoitettiin 2 minuuttia.

5 TULOKSET

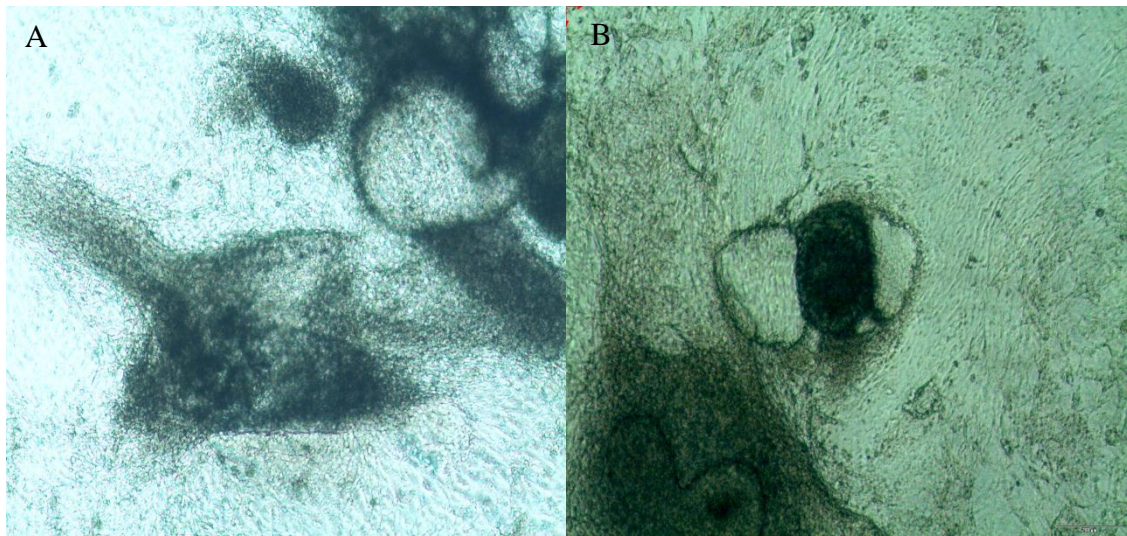
5.1 Sykkivät soluaggregaatit

Sydänlihassoluerilaistuksessa solualueet alkoivat sykkimään. Kaikista tutkimuksessa käytetyistä solulinjoista määritettiin sykkivien alueiden määrää ja laatua. Kiinnittyneet soluaggregaatit laskettiin päivänä 6 erilaistuksen aloituksesta ja sykkivät soluaggregaatit päivinä 21 ja 22 erilaistuksen aloituksesta. Taulukossa 7. on esitetty solulinjojen kiinnittyneet ja sykkivät soluaggregaatit, erilaistusprosentti sekä kokonaiserilaistusprosentti molemmista erilaistuseroista ja passage-numero. Erilaistukset kaikille solulinjoille tehtiin samalla tavalla, eikä mistään solulinjoista löydetty kontaminaatioita. Solulinjan A116 kokonaiserilaistusprosentti oli pieni.

TAULUKKO 7. Sykkivien sydänlihassolujen erilaistumistehokkuus

Solulinja	Passage nro	Kiinnittyneitä soluaggregaatteja	Sykkiviä aggregaatteja	Erilaistus-%	Kokonais-erilaistus-%
FES29	32	410	36	8,8	10,2
FES29	38	285	35	12,3	
h1/12	28	264	45	17	11,5
h1/12	30	498	43	8,6	
A116	16	329	1	0,3	2,3
A116	21	310	14	4,5	

5.1.1 Erilaistettujen sydänlihassolujen morfologia

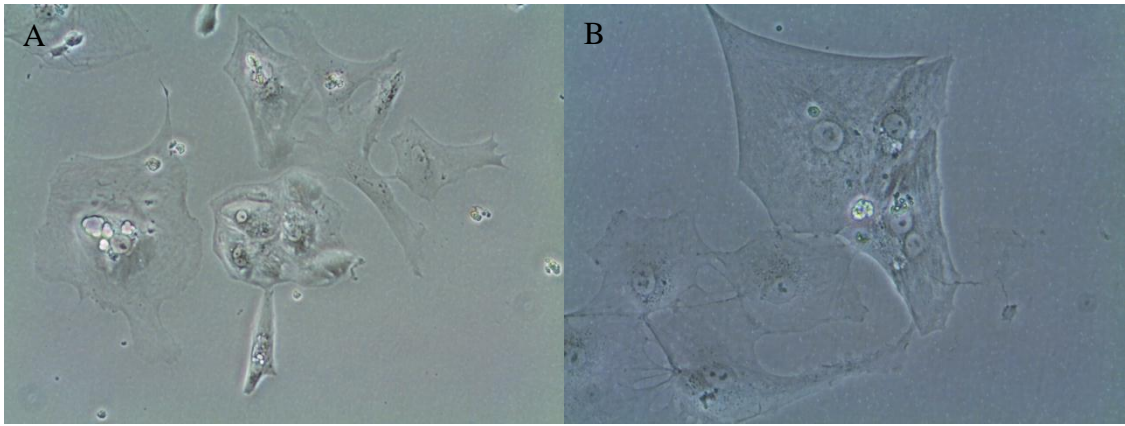


KUVA 6. 23. päivän ikäisiä sykkiviä sydänlihassoluaggregaatteja.

Sydänlihassolujen morfologiaa tarkasteltiin sydänerilaistuksen 21. tai 22. päivänä, jolloin soluviljelykuopat sisälsivät jo sykkiviä alueita. Sykkivät alueet olivat kaikissa solulinjoissa samankaltaisia. Sykkivät alueet olivat yleensä pyöreähköjä, mutta myös pitkulaisia ja rakkulamaisia sykkiviä alueita esiintyi jokaisessa solulinjassa. Kuvassa 6. on 23. päivän ikäisiä sykkiviä sydänlihassoluaggregaatteja. Kuvassa A on esimerkki solulinjasta FES29 p.33 ja kuvassa B on solulinja A116 p.21. Sykkivien alueiden halkaisija vaihteli välillä 200-800 μm . A116 -solulinjan sykkivät alueet olivat enimmäkseen pyöreähköjä ja suhteellisen pieniä verrattuna muihin solulinjoihin. Kaikista solulinjoista löytyi myös litteitä ja paksuja sykkiviä alueita sekä pieniä, muutaman solun sykkiviä alueita. Sykkivät alueet sykkivät soluviljelykuopissa suhteellisen tasaisesti, mutta muutama sykkivä alue piti sykkinnän aikana pieniä taukoja.

5.1.2 Dissosioidut sykkivät sydänlihassolut

Dissosioituja sykkiviä soluja sisältävissä soluviljelykuopissa oli paljon irrallisia soluja kellumassa pinnalla. Vain osa dissosioiduista soluista selviytyi ja kiinnittyi soluviljelykuoppien pohjiin. Pohjaan kiinnittyneistä dissosioiduista soluista vain osa jatkoi sykkimään. Kuvassa 7.B on hyvä esimerkki yksittäisestä sykkivästä sydänlihassolusta, joka on otettu 20 -kertaisella suurennoksella. Kuva 7.A. on otettu 10 -kertaisella suurennoksella ja kuvassa on monta erillistä sykkivää solua.



KUVA 7. Dissosioituja sydänlihassoluja solulinjasta h1/12 p. 45

5.2 Cytospin tulokset

Cytospin menetelmällä valmistettujen solujen värjäyksessä saatiin määritettyä sydänlihassolujen määrä. Taulukossa 8. on esitetty solulinjat, passage numero, kokonaissolumäärä, kaivojen solumäärä, troponiini T -positiiviset solut ja troponiini T -positiivisten solujen määrä kaivossa. Määrittys tehtiin kullekin solulinjalle kahdesta erilaistuskerrasta ja näytteet A ja B ovat rinnakkaismäärittämiä samasta erilaistuskerrasta. Cytospin menetelmä suoritettiin päivänä 16 erilaistuksen aloituksesta kaikille solulinjoille ja rinnakkaisnäytteille samalla tavalla.

Menetelmän rinnakkaismäärittämissä troponiini T -positiivisten solujen prosenttiosuudet ovat lähellä toisiaan. Solulinjojen FES29 ja h1/12 troponiini T -positiivisten solujen määrät ovat lähellä toisiaan. Solulinjan A116 soluviljelykaivoissa oli paljon vähemmän soluja kuin muissa solulinjoissa, mutta troponiini T -positiivisia soluja löytyi paljon suhteessa solumäärään.

TAULUKKO 8. Troponiini T -positiivisten solujen määrä

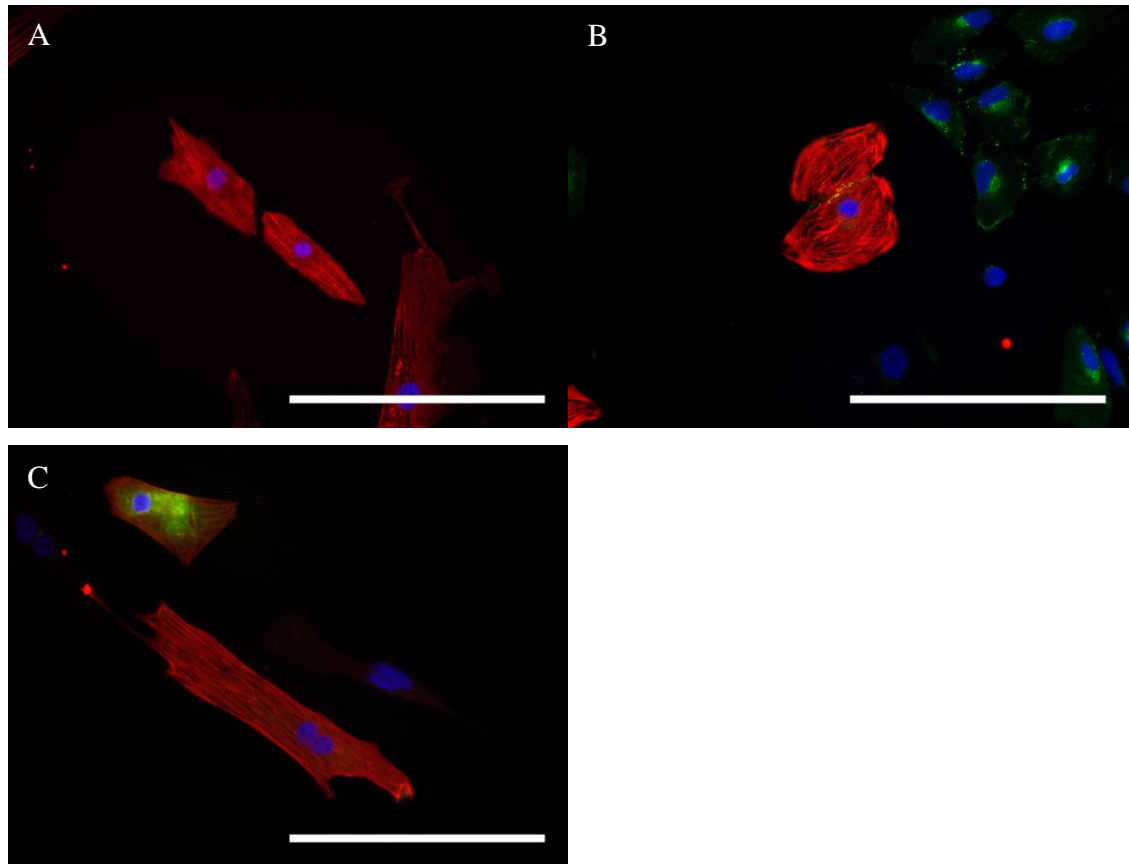
Solulinja	Solumäärä	Soluja / kaivo	Troponiini T + %	Troponiini T + / kaivo
FES29 p.32				
Näyte A	4 120 000	1 373 333	0,12 %	1 648
Näyte B	2 320 000	773 333	0,14 %	1 083
FES29 p.38				
Näyte A	2 700 000	900 000	0,14 %	1 260
Näyte B	2 340 000	780 000	0,12 %	936
h1/12 p.28				
Näyte A	4 580 000	1 526 667	0,27 %	4 122
Näyte B	6 280 000	2 093 333	0,26 %	5 443
h1/12 p.30				
Näyte A	1 960 000	653 333	0,18 %	1 176
Näyte B	2 080 000	693 333	0,24 %	1 664
A116 p.16				
Näyte A	840 000	280 000	1,49 %	4 172
Näyte B	600 000	200 000	1,06 %	2 120
A116p.21				
Näyte A	840 000	280 000	0,78 %	2 184
Näyte B	920 000	306 667	0,56 %	1 717

5.3 Immunofluoresensinvärjäyksen tulokset

Immunofluoresenssivärjäyksessä käytetyt vasta-aineet värjäävät niille spesifisiä kohteita soluissa. Kuvaan 8 A., B. ja C. on otettu esimerkiksi vain h1/12 solulinjan immunofluoresenssivärjäykset, koska kaikkien solujen värjäytyminen oli samanlaista.

Immunofluoresenssivärjäyksen avulla saadaan rakenteet erottumaan sydänlihassoluista. Kuvassa 8.A punaisella näkyy alfa-aktiniini, joka on värjännyt aktiniinisäikeet sydänlihassoluissa. Kuvassa 8.B punaisella näkyy troponiini T, joka on värjännyt ohuita säikeitä sydänlihassoluissa. Konneksiini 43 värjää sydänlihassolujen väliset aukkoliitokset (vihreä). Kuva 8.C troponiini T on värjännyt ohuita säikeitä sydänlihassoluissa ja MHC värjää vihreiksi kammioeräiset sydänlihassolut. Kuvassa vain punaisella värjäytyneet

sydänlihassolut ovat eteisperäisiä sydänlihassoluja. Kuvissa sinisellä näkyvät pyöreät alueet ovat solun tumia, jotka ovat värjätty DAPI-värillä (Vectashield).



KUVA 8. Sydänlihassolujen immunofluoresenssivärjykset. Kuvissa scale bar:in koko on 200 μ m.

5.4 RNA-eristys

Kantasolulinjoista eristettiin RNA:ta päivinä 0, 3, 6 ja 13 erilaistuksen aloituksesta. Taulukossa 9. on kuvattu ensimmäisen erilaistuskerran ja taulukossa 10. toisen erilaistuskerran RNA eristyksen tulokset ja puhtaus, sekä solulinja, aikapiste ja passage-numero. RNA:n määrä erilaistuksessa vaihtelee paljon rinnakkaisissa näytteissä, mikä johtuu osittain solukaivon sisältämistä solumääristä. RNA:n puhtaus mitattiin aallonpituuden 260/280 suhteella, jonka tulisi olla lähellä arvoa 2,10. Solulinjan A116 puhtaus jäi ensimmäisellä erilaistuskerralla tämän arvon alapuolelle, kun taas muiden solulinjojen eristettyjen RNA:n puhtausluokka oli lähellä kyseistä arvoa.

TAULUKKO 9. Ensimmäisen erilaistuskerran RNA-eristyksen pitoisuudet ja puhtausasteet.

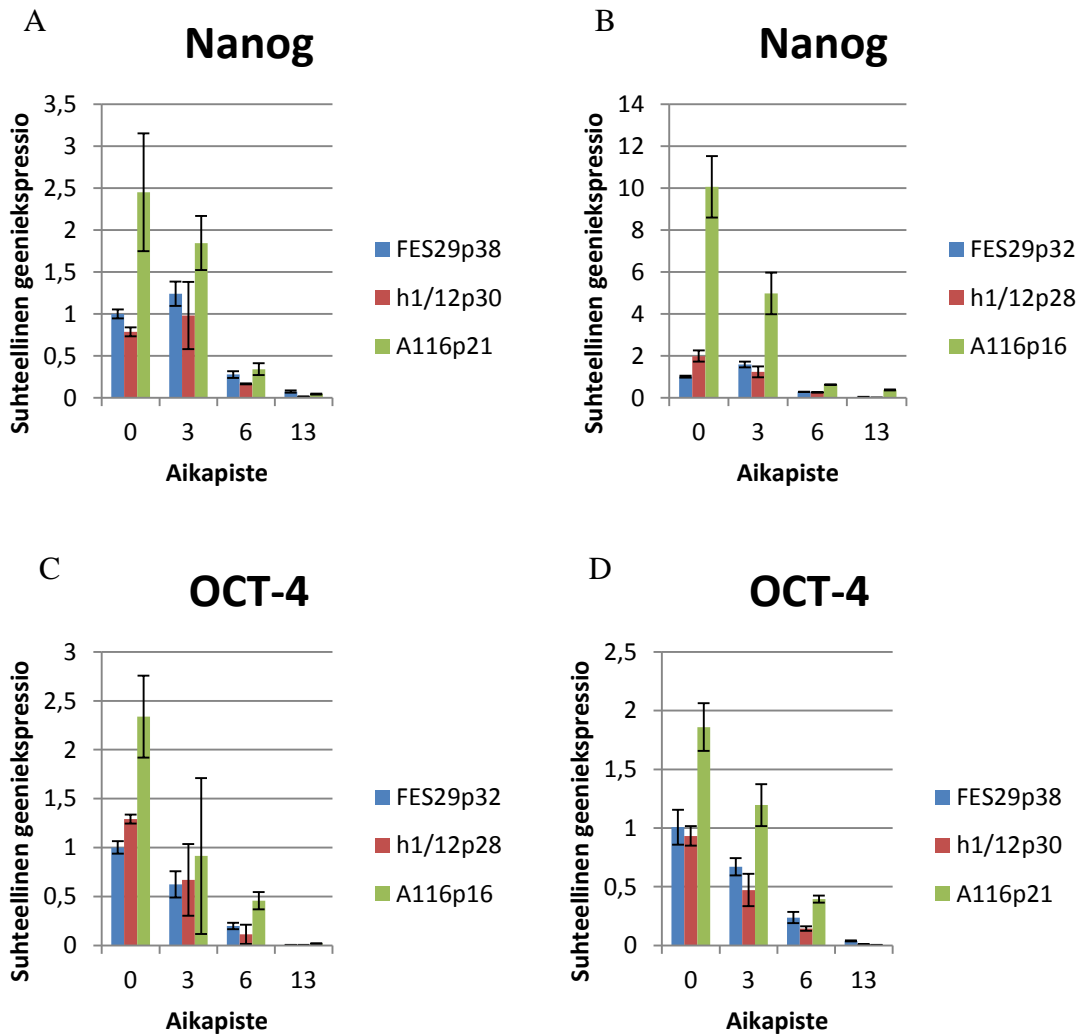
RNA-eristys	A116 p.16	Puhtaus	FES29 p.32	Puhtaus	h1/12 p.28	Puhtaus
näyte	ng/μl	260/280	ng/μl	260/280	ng/μl	260/280
d0 a	78,86	1,64	18,64	2,16	39,6	1,88
d0 b	270,36	1,40	6,39	2,04	20,88	2,48
d3 a	175,50	1,67	82,65	2,19	61,79	2,12
d3 b	145,59	1,66	59,71	2,16	89,21	2,16
d6 a	183,49	1,58	136,98	2,18	167,88	2,19
d6 b	53,24	1,82	105,62	2,22	122,95	2,27
d13 a	46,52	1,67	175,92	2,17	290,24	2,14
d13 b	116,17	1,61	73,45	2,2	147,09	2,16

TAULUKKO 10. Toisen erilaistuskerran RNA-eristyksen pitoisuudet ja puhtausasteet.

RNA-eristys	A116 p.16	Puhtaus	FES29 p.32	Puhtaus	h1/12 p.28	Puhtaus
näyte	ng/μl	260/280	ng/μl	260/280	ng/μl	260/280
d0 a	13,52	2,08	14,69	1,87	11,96	2,34
d0 b	11,45	2,08	16,78	1,74	-	-
d3 a	28,79	2,31	36,5	2,12	49,91	2,04
d3 b	25,64	2,18	25,21	2,02	50,61	2,18
d6 a	59,29	2,27	66,51	2,12	60,3	2,18
d6 b	18,68	2,61	39,13	2,07	89,63	2,2
d13 a	17,71	2,58	12,05	2,21	116,14	2,11
d13 b	44,75	2,32	30,37	2,1	56,89	2,28

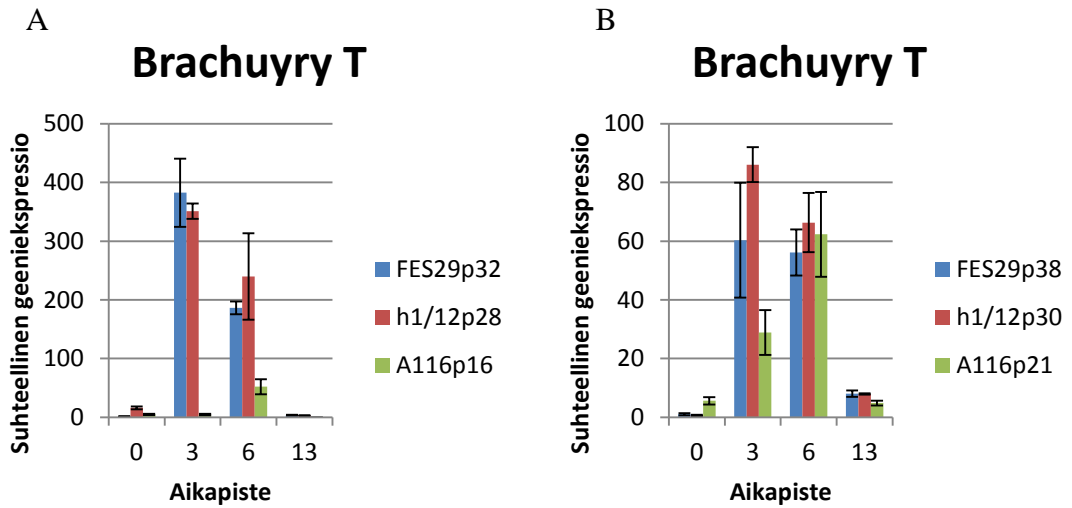
5.5 Geenien ilmentymisen määrittäminen sydänerilaistuksessa

Alkion kantasolujen ja uudelleen ohjelmoitujen kantasolujen erilaistumista sydänlihas-soluiksi määritettiin kantasolujen ja sydänlihassolujen geenien ilmentymisellä käyttämällä kvantitatiivista polymeerasiketjureaktiota. Kantasolugeenien, Nanog ja OCT-4, ilmentyminen erilaistumisen alussa oli korkealla (kuva 9.), mutta erilaistuksen edetessä ilmentyminen väheni.

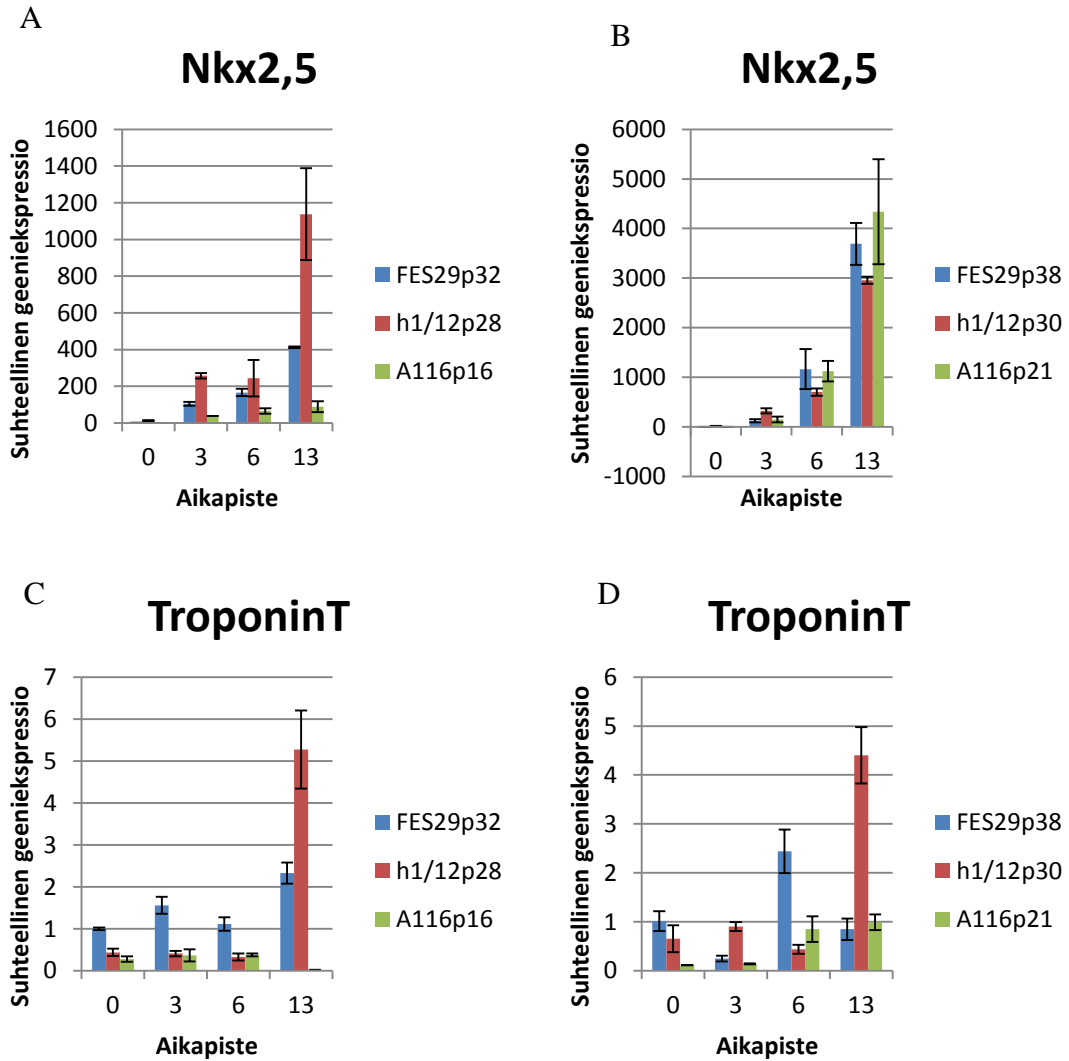


KUVA 9. Kantasoluspesifisten geenien Nanog ja OCT-4 ilmentyminen. Kuvissa A ja C on ensimmäisen sydänlihassoluerilaistuskerran ja kuvissa B ja D on toisen sydänlihassoluerilaistuskerran kantasoluspesifisten geenien ilmentyminen.

Kuvassa 10. on mesodermaalisen markkerigeenin Brachyury T:n ilmentyminen sydänri-laistuksessa. Työssä tutkittiin myös aikaisen mesodermin muodostumista. Brachyury T ilmeni päivinä 3-6 erilaistuksen aloituksesta. Sydänlihassolugeenien ilmentyminen (kuva 11) oli erilaistuksen alussa vähäistä. Vasta erilaistuksen 13. päivänä sydänlihassolugeenien ilmentyminen kasvoi huomattavasti (kuva 11).



KUVA 10. Mesodermaalisen brachyury T -geenimarkkerin ilmentyminen. Kuvassa A on ensimmäisen sydänlihassolurilaistuskerran ja kuvassa B on toisen sydänlihassoluerilaistuskerran mesodermaalisen geenimarkkerin ilmentyminen.



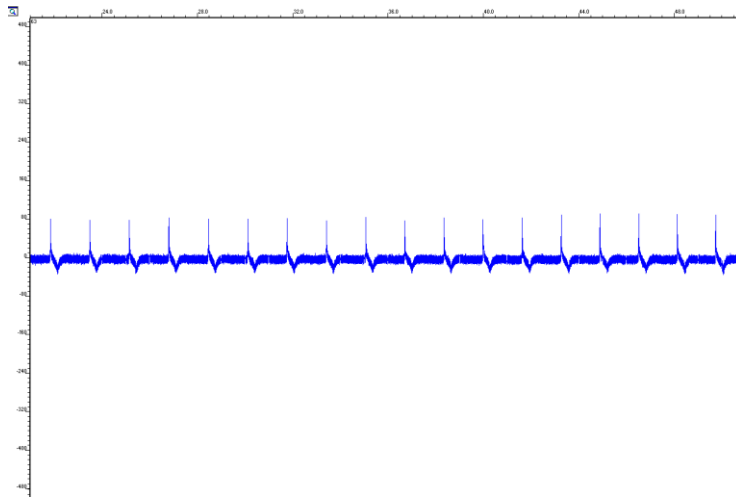
KUVA 11. Sydänspesifisten Nkx2,5 ja troponiini T -geenien ilmentyminen. Kuvissa A ja C on ensimmäisen sydänlihassoluerilaistuskerran ja kuvissa B ja D on toisen sydänlihassoluerilaistuskerran sydänlihassoluspesifisten geenien ilmentyminen.

Sydänspesifisten geenien ilmentyminen oli runsaimmillaan päivänä 13. Ensimmäisen erilaistuskerran A116 solut eivät ilmentäneet Nkx2,5 ja troponiini T -geenimarkkeria juuri lainkaan, mutta toisen erilaistumiskerran solut ilmensivät niitä jo paremmin. Solulinjalla FES29 Nkx2,5 ja troponiini T ilmenivät kohtalaisesti. Tutkimuksessa käytetyistä solulinjoista h1/12 ilmensi parhaiten sydänlihassolugeenejä.

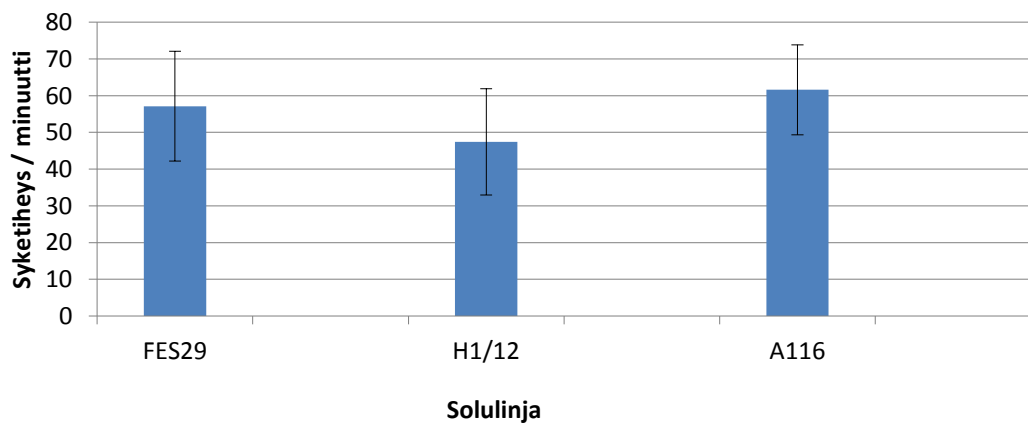
5.6 MEA:n tulokset

Sykkivien sydänlihassolujen syketiheyttä mitattiin MEA-menetelmällä. MEA-laitteiston avulla saatiin selville, että kaikilla tutkituilla sykkivillä soluaggregaateilla on elektrofysiologista aktiivisuutta, kuten pitääkin. Havaittiin myös, että solut sykkivät samanaikaisesti.

Sykkivä soluaggregaatti kiinnittyi elektrodien päälle. Kuvassa 12. on yksittäisen elektrodin antamaa signaalia solulinjasta FES29 p. 38. Tulokset laskettiin elektrodien antaman signaalin mukaan (kuva 13.).



KUVA 12. Kantasoluista erilaistetun sydänlihassoluaggregaatin sykesignaali.



KUVA 13. Tutkimuksessa käytettyjen sykkivien soluaggregaattien syketiheydet.

Kaikkien tutkimuksessa käytettyjen sykkivien soluaggregaattien sykintä oli tasaista. Normaalialueen ihmisen sydänsykettä, joka on noin 60 sykettä minuutissa, vastasivat parhaiten A116- ja FES29-solulinjojen sykkivät soluaggregaatit. Solulinjan h1/12 syketiheys minuutissa oli lähes 50.

6 POHDINTA

Tutkimuksen tarkoituksena oli verrata kolmen eri kantasolulinjan sydänlihassoluerilaistumista ja karakterisoida muodostuneet sydänlihassolut. Työssä käytetyt kantasolulinjat erilaistettiin sydänlihassoluiksi samalla tapaa viljelemällä niitä endodermaalisten solujen päällä. Morfologialtaan soluaggregaateissa ei ollut suurta eroa solulinjojen välillä. Kuitenkin kantasolulinjan A116 sykkivät solualueet olivat muita pienempiä ja yleensä pyöreämpiä.

Sydänlihassolujen erilaistumistehokkuutta arvioitiin laskemalla sykkiviä alueita soluviljelykuopista. Erilaistumisprosentilla ei ollut suurta eroa solulinjojen FES29 ja h1/12 välillä. Myös solulinjojen kummankin erilaistamiskerran erilaistumisprosentit olivat lähellä toisiaan. Solulinjan A116 ensimmäisellä erilaistuskerralla erilaistumistehokkuus oli todella heikko. Toisella erilaistuskerralla sykkivien alueiden laskentapäivänä sykkiviä alueita löytyi vain muutama, mutta päiviä myöhemmin sykkiviä alueita löytyi enemmän. Vertailuun otettiin myöhemminkin löytyneet sykkivät solualueet, jotta saataisiin laskettua solulinjan erilaistumistehokkuutta. Mahdollisesti solulinjalla A116 sydänerilaistuminen kestää pidemmän aikaa kuin muilla solulinjoilla. On myös mahdollista, että osaa sykkivistä soluaggregaateista ei kyetty havaitsemaan, koska solulinja A116 tuotti pieniä sykkiviä soluaggregaatteja.

Cytospin-menetelmällä määritettyjen troponiiniposiitivisten solujen määrän pitäisi olla verrattavissa sykkivien soluaggregaattien määrään. Solulinjojen FES29 ja h1/12 troponiiniposiitivisten solujen määrät molemmista erilaistuskertoista olivat lähellä toisiaan. Myös sykkivien alueiden laskennalla ja cytospin-menetelmällä määritetyt erilaistumistehokkuudet olivat lähellä toisiaan, tosin cytospin-menetelmällä saadut osuudet olivat hieman korkeampia. Solulinjan A116 ensimmäisen erilaistamiskerran troponiiniposiitivisten solujen määrä oli noin kaksi kertaa suurempi kuin jälkimmäisen erilaistamiskerran. Tämän mukaan ensimmäisestä erilaistuskerrasta olisi pitänyt saada enemmän sykkiviä alueita kuin jälkimmäisestä erilaistuskerrasta. Toisaalta sykkivien alueiden laskennassa laskettiin sykkiviä sydänlihassoluaggregaatteja ja cytospin-menetelmällä laskettiin yksittäisiä sydänlihassoluja. Soluaggregaattien koolla on merkitystä, koska suuremmat soluaggregaatit voivat sisältää enemmän sydänlihassoluja. Cytospin-näytteiden valmistuksessa käytetyn trypsiinin tarkoituksena oli hajottaa soluaggregaatit erillisiksi soluiksi. Yleisesti hajotus trypsiinillä osoittautui hankalaksi ja näytteeseen jäi solury-

kelmiä. Tämä hankaloitti solujen laskemista. Tämän tutkimuksen perusteella trypsiini ei ole paras mahdollinen entsyymi soluaggregaattien hajottamiseen. Myös tulosten epäluotettavuuden takia menetelmää tulisi tarkastella uudelleen.

Sydänlihassoluaggregaatteja dissosioitiin immunofluoresenssivärjäyksiä varten. Vaikka vain osa dissosioiduista soluista jatkoi sykintää, saatiin sykkivistä soluista värjättyä sydänlihassolujen rakenteita. Immunofluoresenssivärjäyksellä saatiin näkyville sekä kammio- että eteisperäisiä sydänlihassoluja. Eroja eri kantasolulinjoista erilaistettujen sydänlihassolujen välillä ei immunofluoresenssivärjäyksissä havaittu.

RNA-eristyksessä kaikki muut näytteet olivat puhtaita (puhtausarvo noin 2,1) paitsi ensimmäisen erilaistuskerran solulinjan A116 näytteet. Yhdessä näytteessä oli kahden sattumanvaraisesti valitun 12-kuoppalevyn kaivon solut. Kaivoihin kiinnittyneiden soluaggregaattien määrät vaihtelivat, joten RNA-eristyksessä myös RNA:n määrässä oli eroavaisuutta rinnakkaisissa näytteissä. Eristetyt RNA:n määrät olivat solulinjojen erilaistuksien kesken hyvin erisuuruisia, mikä voi johtua soluaggregaattien lukumäärän tai koon vaihteluista, pienistä RNA:n määristä tai mahdollisesti RNA-eristyksessä tapahtuneista pipetointivirheistä, jolloin kaikkea RNA:ta ei ole soluista saatu eristettyä näytteisiin. Kuitenkin RNA-näytteet riittivät tuottamaan tarpeeksi cDNA:a, koska näytteissä havaittiin selvät markkerigeenien ilmentymiset kvantitatiivisen polymeraasiketjureaktioiden jälkeen.

Kvantitatiivisella PCR:lla tutkittiin kantasolulinjojen sydänlihassoluspesifisten, mesodermaalisten ja kantasoluspesifisten geenien ilmentymistä. Oletuksena oli, että mitä suurempi ilmentyminen sydänlihassoluspesifisillä markkereilla on, sitä paremmin erilaistuminen tapahtuu sydänlihassoluiksi. Kantasolumarkkerit Nanog ja OCT-4 ilmentyivät erilaistuksen alussa voimakkaasti, mutta näiden markkerien ilmentyminen vähenyi erilaistuksen edetessä, kun kantasoluista erilaistui sydänlihassoluja. Aikaisen mesodermaalisen markkerigeenin Brachyury T:n ilmentyminen oli voimakkainta 3. ja 6. päivänä. Tämä vastaa Bettioliin & Ym:n (2007) saamia tuloksia, joiden mukaan ilmentymisen huippu sydänerilaistuksessa on kolmantena päivänä.

Sydänspesifisten Nkx2,5 ja Troponiini T -markkerigeenien ilmentyminen kasvoi sydänerilaistuksen edetessä. Nkx2,5 -geenimarkkerin ilmentyminen aikuisen kantasolulinjalla A116 ensimmäisellä erilaistuskerralla oli matala, mutta toisella erilaistuskerralla

ilmentymistä oli runsaasti päivänä 13. Vastasyntyneen kantasolulinjan h1/12 sydänspesifisten geenien ilmentyminen kasvoi kohtalaisesti erilaistuksen alussa, mutta päivän 13 tienoilla geenien ilmentyminen alkoi kasvaa voimakkaasti. Troponiini T - markkerigeenin ilmentyminen oli vähäisempää kuin Nkx2,5 markkerigeenin ilmentyminen. Kantasolulinjalla h1/12 Troponiini T:n ilmentyminen oli muita vahvempaa. Kantasolulinjan A116 ensimmäinen erilaistuskerta ei ilmentänyt Troponiini T geenimarkkeria päivänä 13, mutta ilmentymistä oli havaittavissa toisella erilaistuskerralla. Näiden sydänlihassolumarkkerien huonosta ilmentymisestä ja vähäisten sykkivien soluaggregaattien myötä voidaan todeta A116 solulinjan ensimmäisen erilaistuskerran olleen huono. Alkion kantasolulinja FES29:llä sydänlihassoluspesifisten geenien ilmentyminen oli odotettua vaimeampaa verrattuna muihin kantasolulinjoihin. Alkion kantasolulinjan toisella erilaistuskerralla Troponiini T:n ilmentyminen oli korkeampaa päivänä 6 kuin päivänä 13, koska 13. päivän RNA-näyte jäi halutun pitoisuuden (500 ng / 10 µl) alapuolelle. Troponiini T:n ilmentymishuippu voi myös olla vasta päivän 13 jälkeen, jolloin ilmentymishuippua ei tässä tutkimuksessa havaittu.

Erilaistetuilla sydänlihassoluilla oli elektrofysiologista aktiivisuutta. Syketiheys oli tutkituilla sykkivillä soluaggregaateilla lähellä toisiaan. Ihmisen normaali sydämen syke on 60-80 kertaa minuutissa (Nienstedt, W & Ym 2009). Laboratorio-olosuhteissa kasvaneet kaikki sydänlihassolut sykkivät samalla nopeudella kuin ihmisen sydän, vaikka solulinjan h1/12 syketiheys olikin hieman harvempaa.

Kaikilla sydänsolutyypeillä on kuitenkin erilainen sydänkäyrä, joten voidaan sanoa, että niillä on erilainen aktiopotentiaalikäyrä (He & Ym. 2003) ja niiden elektrofysiologia eroaa toisistaan. Koska MEA-signaalit saatiin erilaistetuista sydänlihassoluista, joissa oli mukana sekä kammio- että eteisperäisiä sydänlihassoluja, määritettiin näissä kokeissa sydänlihassoluyhdistelmän elektrofysiologiaa.

Tutkimuksessa olleista kantasolulinjoista parhaiten erilaistui sydänlihassoluiksi vastasyntyneen kantasolulinja h1/12. Sydänspesifiset markkerigeenit ilmentyivät siinä runsaimmin. Myös erilaistustehokkuus oli h1/12 kantasolulinjalla korkein, vaikka alkion-FES29 kantasolulinjan erilaistustehokkuus oli lähellä vastasyntyneen erilaistumistehokkuutta. Kuitenkaan alkion kantasolulinjalla ei havaittu kovin suurta sydänspesifisten markkerigeenien ilmentymistä. Cytospin-menetelmän mukaan aikuisen A116 - kantasolulinjalla oli korkein troponiinipositivisten solujen määrä, mutta erilaistumiste-

hokkuus sykkivien soluaggregaattien perusteella jäi minimaaliseksi ja sydänspesifisten markkerigeenien ilmentyminenkin oli heikkoa. Mahdollista on, että ensimmäinen erilaistuskerta A116 -solulinjalle oli huono, koska sykkiviä soluaggregaatteja oli vähän ja RNA:nkin määrät olivat vähäisiä johtuen vähäisestä solumäärästä.

Kaikkein luotettavin analyysimenetelmä sydänlihassolujen erilaistumistehokkuuden määrittämiseksi olisi muutaman sydänlihassoluille spesifisen markkerin määrittäminen proteiinitasolla. Tällä hetkellä cytospin–menetelmä on ainoa käytettävissä oleva kvantitatiivinen proteiinitason määrittäminen, joka soveltuu sydänerilaistuksessa saataville pienille solumäärille. Cytospin-menetelmällä saadut tulokset poikkesivat muiden menetelmien tuloksista, joten menetelmä sydänerilaistumisen seurannassa kaipaisi vielä kehittämistä. Kantasolulinjan A116 myöhemmin erilaistuneet sykkivät sydänlihasaggregaatit herättivät ajatuksen, että tällä solulinjalla voi olla pidempi erilaistumisaika.

Tutkimuksen tavoitteena oli verrata kolmen kantasolulinjan erilaistumista sydänlihassoluiksi. Vaikka vastasyntyneen fibroblasteista uudelleen ohjelmoitu kantasolulinja erilaistui tutkittavista solulinjoista tehokkaimmin sydänlihassoluiksi, ei kantasolulinjojen välillä ollut kokonaisuudessaan merkittävää eroa. Myös erilaistuskerrat voivat vaikuttaa solujen kykyyn erilaistua ja siten sydänlihassolujen määrityksiin. Tässä tutkimuksessa käytettiin vertailussa vain yhtä alkion kantasolulinjaa sekä yhtä erilaisilla menetelmillä tuotettua ja erivaiheisesta yksilöstä eristettyä ja uudelleen ohjelmoitua kantasolulinjaa. Opinnäytetyön tulokset olivat hyvin hyödynnettävissä ja ne julkaistaan osana isompaa tutkimuskokonaisuutta tieteellisessä artikkelissa vuonna (Toivanen S & Ym 2012). Tulevaisuudessa olisi mielenkiintoista verrata näitä tuloksia useampiin muihin kantasolulinjoihin.

7 LÄHTEET

Amit, M., Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Chiu, C. P., Harris, C. P., Waknitz, M. A., Itskovitz-Eldor, J. & Thomson, J. A. 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental Biology* 227, 271-278.

Applied Biosystems. 2011. TaqMan® and SYBR® Green Chemistries. Luettu 28.3.2011.

<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html>

Boheler, K. R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H-T., Anisimov, S. V. & Wobus, A. M. 2002. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circular Research* 91, 189-201.

Braam, S. R., Tertoolen, L., van de Stolpe, A., Meyer, T., Passier, R. & Mummery, C. L. 2010. Prediction of drug-induced cardiotoxicity using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Research* 4, 107-116.

Brimble, S. N., Zeng, X., Weiler, D. A., Luo, Y., Liu, Y., Lyons, I. G., Freed, W. J., Robins, A. J., Rao, M. S. & Schulz, T. C. 2004. Karyotyping stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells and Development* 13, 585-597. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cell* 23, 544-549.

Brüggemann, A., Stoelzle, S., George, M., Behrends, Jan C. & Fertig, N. 2006. Microchip technology for automated and parallel Patch-Clamp recording. *Small* 2, 840-846.

Chicha, L., Feki, A., Boni, A., Irion, O., Hovatta, O. & Jaconi, M. 2011. Human pluripotent stem cells differentiated in fully defined medium generate hematopoietic CD34+ and CD34- progenitors with distinct characteristics. *PLoS ONE* 6 (2).

Eskola, J., Hallila, R., Hassinen, S., Kiviharju, E., Launis, V., Pitkänen, K., Siipi, H., Takala, A. & Vestala, L. 2007. Terveys, bioteknologia ja etiikka. Biotekniikan neuvottelukunta.

Freund, C. & Mummery, C. L. 2009. Prospect for pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in cardiac cell therapy and as disease models. *Journal of Cellular Biochemistry* 107, 592-599.

Gaborit, N., Le Bounter, S., Szyts, V., Varro, A., Escande, D., Nattel, S. & Demolombe, S. 2007. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *The Journal of Physiology* 582, 675-693.

Graichen, R., Xu, X., Braam, S. R., Balakrishnan, T., Norfiza, S., Sieh, S., Soo, S., Tham, S. C., Mummery, C., Colman, A., Zweigerdt, R. & Davidson, B. P. 2008. Enhanced cardiomyogenesis of human embryonic stem cells by a small molecular inhibitor of p38 MAPK. *Differentiation* 76, 357-370.

He, J. Q., Ma, Y., Lee, Y., Thomason, J. A. & Kamp, T. J. 2003. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circulation Research* 93, 32-39.

Heino, J. & Vuento, M. 2004. *Solubiologia*. Porvoo: WS Bookwell Oy.

Hescheler, J., Halbach, M., Egert, U., Lu, Z., Bohlen, H., Fleischmann, B. K. & Reppel, M. 2004. Determination of electrical properties of ES cell-derived cardiomyocytes using MEAs. *Journal of Electrocardiology* 37, 110-116.

Inzunza, J., Gertow, K., Strömberg, M. A., Matilainen, E., Blennow, E., Skottman, H., Wolbank, S., Ährlund_richter, L. & Hovatta, O. 2004. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cell* 23, 544-549.

Jochems, C. E. A., van der Valk, J. B. F., Stafleu, F. R. & Baumans, V. 2002. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *ATLA* 30, 219-227.

Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J. & Gepstein, L. 2001. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *The Journal of Clinical Investigation* 108, 407-414.

Koivisto, H., Hyvärinen, M., Strömberg, A-M., Inzunza, J., Matilainen, E., Mikkola, M., Hovatta, O. & Teerijoki, H. 2004. Cultures of human embryonic stem cells – serum replacement medium or serum-containing media and the effect on basis fibroblast growth factor. *Reproductive BioMedicine Online* 9, 330-337.

Kolossov, E., Lu, Z., Drobinskaya, I., Gassanov, N., Duan, Y., Sauer, H., Manzke, O., Bloch, W., Bohlen, W., Hescheler, J. & Fleischmann, B. K. 2005. Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. *The FASEB journal* 19, 577-579.

Kuroda, Y. & Furuyama, J. 1963. Physiological and biochemical studies of effects of Mitomycin C on strain hela cells in cell culture. *Cancer Research* 23.

Lahti, A. L., Kujala, V. J., Chapman, H., Koivisto, A-P., Pekkanen-Mattila, M., Kerke-
lä, E., Hyttinen, J., Kontula, K., Swan, H., Conklin, B. R., Yamanaka, S., Silvennoinen,
O. & Aalto-Setälä, K. 2011. Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells
demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture. *Disease Models & Mecha-
nisms* (2012) 5 (2), 220-230.

Li, W., Zhou, H. Y., Abujarour, R., Zhu, S., Joo, J. Y., Lin, T., Hao, E., Schöler, H. R.,
Hayek, A. & Ding, S. 2009. Generation of human-induced pluripotent stem cells in the
absence of exogenous Sox. *Stem Cells* 27 (12), 2992-3000.

Livak, K. J. L. & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data us-
ing real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta \Delta$ CT method. *Methods* 25, 405-408.

Mikkola, M., Olsson, C., Palgi, J., Ustinov, J., Palomäki, T., Horelli-Kuitunen, N., Knuutila, S., Lundin, K., Otonkoski, T. & Tuuri, T. 2006. Distinct differentiation characteristics of individual human embryonic stem cell lines. *BMC Developmental Biology* 6, 40.

Nobelprize.org; The Official Web Site of the Nobel Prize. 2012. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012. Luettu 16.11.2012

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/

Mummery, C. 2007. Cardiomyocytes from human embryonic stem cells: more than heart repair alone. *Bioessays* 29, 572-579.

Mummery, C., Ward-van Oostwaard, D., Doevendans, P., Spijker, R., van den Riviere, A., Passier, R. & Tertoolen, L. 2003. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107, 2733-2740.

Mummery, C. L., van Achterberg, T. A., van den Eijnden-van Raaij, A. J., van Haaster, L., Willemsse, A., de Laat, S. W. & Piersma, A. H. 1991. Visceral-endoderm-like cell lines induce differentiation of murine P19 embryonal carcinoma cells. *Differentiation* 46, 51-60.

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N. & Yamanaka, S. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology* 26, 101-106.

National Center of Biotechnology Information. 2012. actinin, alpha 3. Luettu 23.4.2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/89>

National Center of Biotechnology Information. 2012. NK2 homeobox 5. Luettu 27.3.2011.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1482>

National Center of Biotechnology Information. 2012. T, brachyury homolog (mouse). Luettu 27.3.2011.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6862>

National Center of Biotechnology Information. 2012. Troponin T type 2 (cardiac). Luettu 27.3.2011.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7139>

Nieminen, M. & Haikala, H. 1995. Kalsiumherkistäjät. *Lääketieteellinen Aikakausikirja Duodecim* 111 (8), 779.

Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila, A. & Björkqvist, S-E. 2009. Ihmisen fysiologia ja anatomia. 18. uudistettu painos. Helsinki: WSOY

Ory, D. S., Neugeboren, B. A. & Mulligan, R. C. 1996. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11400-11406.

Park, I. H., Zhao, R., West, J., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T., Lerou, P., Lensch, W. & Daley, G. 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141-147.

Passier, R., Denning, C. & Mummery, C. 2006. Cardiomyocytes from human embryonic stem cells. *Handbook of experimental pharmacology* 174, 101-122.

Passier, R. & Mummery, C. 2003. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovascular Research* 58, 324-335.

Passier, R., Oostwaard, D. W., Snapper, J., Kloots, J., Hassink, R. J., Kujik, E., Roelen, B., de la Riviere, A. B. & Mummery, C. 2005. Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells* 23, 772-780.

Pekkanen-Mattila, M. 2010. Cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells. University of Tampere. Regea Institute for Regenerative Medicine. Väitöskirja.

Pera, M. F. & Dottori, M. 2005. Stem cells and their developmental potential. Teoksessa Bongso, A & Lee, E. H. (ed.) *Stem cells. From bench to bedside*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 56-58, 62.

Reppel, M., Pillekamp, F., Lu, Z. J., Halbach, M., Brockmeier, K., Fleischmann, B. K. & Hescheler, J. 2004. Microelectrode arrays: a new tool to measure embryonic heart activity. *Journal of Electrocardiology* 37, 104-109.

Ririe, K. M., Rassmussen, R. P. & Witter, C. T. 2009. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245 (2), 154-160.

Sariola, H., Frilander, M., Heino, T., Jernvall, J., Partanen, J., Sainio, K., Salminen, M. & Thesleff, I. 2003. *Kehitysbiologia. Solusta yksilöksi*. 1. painos. Duodecim. Jyväskylä: Gummerus.

Sartiani, L., Bettiol, E., Stillitano, F., Mugelli, A., Cerbai, E. & Jaconi, M. E. 2007. Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem Cells* 25, 1136-1144.

Schulz, R., Gres, P., Skyschally, A., Duschin, A., Belosjorow, S., Konietzka, I. & Heusch, G. 2003. Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig heart in vivo. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.

Shi, Y. 2009. Induced pluripotent stem cells, new tools for drug discovery and new hope for stem cell therapies. *Current Molecular Pharmacology* 2 (1), 15-18.

Shipley, G. L. 2006. An introduction to real-time PCR. Teoksessa Dorak, M. T. (toim.) *Real-time PCR*. USA: Taylor & Francis Group.

Singla, D. K. & Burton, E.S. 2005. Enhancement by growth factors of cardiac myocyte differentiation from embryonic stem cells: a promising foundation for cardiac regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335, 637-642.

- Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. *Geenitekniikka*. Turun ammattikorkeakoulu. Saarijärvi.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast culture by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Thomas, E. D., Lochte, H. L., Jr., Cannon, J. H., Sahler, O. D. and Ferrebee, J. W. 1959. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *The Journal of Clinical Investigation* 38, 1709-1716.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Sharp, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocyst. *Science* 282, 1145-1147.
- Toivanen, S., Ojala, M., Hyysalo, A., Ilmarinen, T., Rajala, K., Pekkanen-Mattila, M., Äänismaa, R., Lundin, K., Palgi, J., Weltner, J., Trokovic, R., Silvennoinen, O., Skottman, H., Narkilahti, S., Aalto-Setälä, K. & Otonkoski, T. 2012. Comparative analysis of targeted differentiation of hiPSC and hESC reveals variability associated with incomplete transgene silencing in retrovirally derived hiPSC lines. *Stem Translational Medicine*. Hyväksytty julkaistavaksi.
- Trounson, A. 2006. Future applications of cloning. *Methods in Molecular Biology* 348 (3), 319-331.
- Unger, C., Gao, S., Cohen, M., Jaconi, M., Berstrom, R., Holm, F., Galan, A., Sanchez, E., Irion, O., Dubuisson, J. B., Giry-Laterrierel, M., Salmon, P., Simon, C., Hovatta, O. & Feki, A. 2009. Immortalized human skin fibroblast feeder cells support growth and maintenance of both human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Human Reproduction* 24 (10), 2567-2581.
- Walker, J. M. & Rapley, R. 2008. *Molecular Biotechnology Handbook*. Humana press.
- Weissman, I. L. 2000. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287, 1442-1446.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M. & Woolverton, C. J. 2009. *Prescott's Principles of Microbiology*. 1. painos. USA, New York: The McGraw-Hill.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M. & Woolverton, C. J. 2011. *Prescott's Microbiology*. 8. painos. USA, New York: The McGraw-Hill.
- Wilson, K. & Walker, J. 2005. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. 6. painos. USA, New York: Cambridge University press.
- Wobus, A. M. & Boheler, K. R. 2005. Embryonic stem cells: prospect for developmental biology and cell therapy. *Physiological Reviews* 85, 635-678.

LIITTEET**1 (2)**

Liite 1. Lista kasvatusliuoksissa käytetyistä reagensseista

KSR- medium (20% KO-SR KO-DMEM)

38,6 ml	KO-DMEM
10 ml	KO-SR
0,5 ml	NEAA
0,5 ml	Glutamax
0,25 ml	Pen/Strep
98 µl	β-merkaptetaanoli
20 µl	FGF

END-2 Medium (7.5% FBS DMEM F-12)

46 ml	DMEM F-12
3,75 ml	FBS
0,5 ml	NEAA
0,5 ml	Glutamax
0,25 ml	Pen/Strep

0% KO-SR hES

48,75 ml	KO-DMEM
0,5 ml	NEAA
0,5 ml	Glutamax
0,25 ml	Pen/Strep.
97,5 µl	β-merkaptetaanoli

10 % KO-SR hES

2 (2)

5 ml	KO-SR
43,75 ml	KO-DMEM
0,5 ml	NEAA
0,5 ml	Glutamax
0,25 ml	Pen/Strep.
97,5 µl	β-merkaptoetanol

EB-medium (20% FBS KO-DMEM)

39,75 ml	KO-DMEM
10 ml	FBS
0,5 ml	NEAA
0,5 ml	Glutamax
0,25 ml	Pen/Strep

Lyhenteet:

NEAA: (non-essential amino acids) Välttämättömiä aminohappoja

FBS: Vasikan seerumi (fetal bovine serum)

Pen/Strep: Penisilliini and streptomysiini

Liite 2. Lista dissosiaatiopuskureissa käytetyistä reagensseista

DISSOSIAATIOPUKURI			
Reagenssi	Puskuri 1 (100 ml)	Puskuri 2 (100 ml)	Puskuri 3 (100 ml)
NaCl	12 ml (1 M)	12 ml (1 M)	-
CaCl ₂			-
K ₂ HPO ₄	-	3 μ (1 M)	3 ml (1 M)
KCl	0,54 l (1 M)	0,54 ml (1 M)	8,5 ml (1 M)
Na ₂ ATP	-	-	2 mmol/ L
MgSO ₄	0,50 ml (1 M)	0,50 ml (1 M)	0,50 ml (1 M)
EGTA	-	-	0,1 ml (1 M)
Na Pyruvaatti	0,50 ml (1 M)	0,50 ml (1 M)	0,50 ml (1 M)
Glukoosi	2 ml (1 M)	2 ml (1 M)	2 ml (1 M)
Kreatiini	-	-	5 ml (1 M)
Tauriini	20 ml (1 M)	20 ml (1 M)	20 ml (1 M)
Kollagenaasi A	-	1 mg/ ml	-
HEPES	1 ml (1 M)	1 ml (1 M)	-
pH:n säätö	NaOH	NaOH	-
pH	6,9	6,9	7,2