



Indusoiduista pluripotenteista kantasoluista erilaistettujen sydänlihassolujen rikastamiseen käytettävien magneettierottelijoiden vertailu

Minna Karhe

OPINNÄYTETYÖ
Toukokuu 2020

Laboratoriotekniikka

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikka

KARHE, MINNA:

Indusoiduista pluripotenteista kantasoluista erilaistettujen sydänlihassolujen rikastamiseen käytettävien magneettierottelijoiden vertailu

Opinnäytetyö 78 sivua, joista liitteitä 2 sivua
Toukokuu 2020

Kantasolujen ominaisuuksiin kuuluu niiden rajattomat mahdollisuudet jakautua ja erilaistua eri solutyypeiksi. Ihmisen somaattiset solut voidaan uudelleenohjelmoida indusoiduiksi pluripotenteiksi kantasoluiksi, eli iPS-soluiksi, hyödyntäen solun sisälle vietäviä transkriptiotekijöitä. iPS-solut voidaan edelleen erilaistaa eri solutyypeiksi, esimerkiksi sykkiviksi sydänlihassoluiksi, ja puhdistaa rikastamalla useita erilaisia menetelmiä hyödyntäen.

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää Sydänryhmälle, onko MACS[®] ja MojoSort[™] -magneettirikastimilla eroja tehokkuudessa, käytettävyydessä tai toiminnallisuudessa sydänlihassoluja rikastettaessa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli erilaistaa sydänlihassoluja HEB-erilaistusmenetelmällä ja rikastaa ne kahdella eri magneettirikastimella. Tuloksia kahden magneettirikastimen välillä oli tarkoitus vertailla käyttäen analysoinnissa virtausytometriaa ja solujen immunofluoresenssivärijäystä. Työstä saatujen tulosten perusteella Sydänryhmä voi tehdä perusteltuja laitehankintapäätöksiä.

Toisen työssä käytetyn solulinjan solut eivät erilaistuneet kunnolla sydänlihassoluiksi, jonka vuoksi vain yhden soluerän näytteistä saatiin tavoitellun kaltaisia tuloksia. Rikastusmenetelminä kumpikin vertailtu menetelmä todettiin yksinkertaiseksi ja käytännölliseksi. Magneettien välisestä vertailusta ja menetelmien rikastustehokkuudesta ei saatu luotettavia tuloksia, joiden perusteella magneetteja voisi arvioida. Epäluotettavuus tuloksissa johtui tavoitellun kaltaisten analyysien vähäisyydestä, solujen huonosta erilaistumisesta ja solumäärän huomattavasta vähenemisestä rikastusta varten valmistavissa pesuissa.

Tämän tutkimuksen perusteella saatiin tietoa magneettirikastusmenetelmistä ja tekijöistä, joiden avulla tutkimuksen suoritusta voidaan kehittää. Uusissa tutkimuksissa näiden kahden magneettirikastimen välillä tulee kiinnittää huomiota erilaistumiskykyisen iPS-solulinjan valintaan ja näytteiden huolellisiin ja tarkkoihin pesuihin. Jatkotutkimusaiheena tämän työn perusteella voisi selvittää toisen solulinjan huonoon erilaistumiskykyyn vaikuttavia tekijöitä ja onko solulinjan erilaistumistehokkuudella vaikutusta magneettirikastimien rikastamistehokkuuteen. Lisäksi erilaistusmenetelmien eri esikäsitelymenetelmien vaikutuksia rikastamiseen olisi kannattavaa tutkia.

Asiasanat: rikastus, magneettierottelu, sydänlihassolu, iPS, erilaistus

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Laboratory Technology

KARHE, MINNA:

The Comparison of Magnetic Separators Used for Enriching Cardiomyocytes Differentiated from Induced Pluripotent Stem Cells

Bachelor's thesis 78 pages, appendices 2 pages
May 2020

One of the properties of stem cells is their limitless ability to divide and differentiate into various cell types. Human somatic cells can be reprogrammed into induced pluripotent stem cells (iPSC) using transcription factors that are brought inside the cells. iPSC cells can be further differentiated into diverse cell types such as beating cardiomyocytes and purified by use of several different methods.

This Bachelor's thesis was done for the Heart Group. The objective of this study was to collect information on whether MACS[®] and MojoSort[™] magnetic cell separators have differences regarding efficiency, usability or functionality. The purpose of the study was to differentiate cardiomyocytes using the HEB-differentiation method and to purify them with two different magnetic cell separators. The differing results between the two magnetic cell separators were to be compared utilizing flow cytometry and immunofluorescence staining for the analysis. Based on the results gained from the study the Heart Group can make well-informed decisions on buying new equipment.

The cells of one of the cell lines used in the study did not differentiate properly into cardiomyocytes, which is why only the samples from the other cell line yielded desirable results. Both of the compared purification methods were discovered to be simple and practical. No trustworthy or complete results were gained from the comparison of the methods or of their purification efficiency with which the methods could have been evaluated. The uncertainty in the results was caused by the scarcity of desired analyses, the poor differentiation of cells and the noticeable decrease of cell mass in the pre-purification washes.

This study produced information on magnetic purification methods and factors with which the research process can be developed. In further studies the selection of a differentiation-capable iPSC cell line and the meticulous and precise wash of samples require increased attention. A topic for a continued research could be the investigation of factors regarding the poor differentiation ability of the second cell line. Additionally, it could be studied if the differentiation efficiency of a cell line affects the purification efficiency of magnetic cell separators. In addition, a comparison of the various prehandling procedures belonging to their respective differentiation methods and their effects on purification would be worthwhile.

Key words: cell sorting, magnetic separation, cardiomyocyte, iPSC, differentiation

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	8
2	KANTASOLUT	10
	2.1 iPS-solut ja niiden valmistaminen.....	10
	2.2 iPS-solujen karakterisointi.....	13
3	iPS-SOLUJEN ERILAISTAMINEN SYDÄNLIHASSOLUIKSI.....	16
	3.1 Yleisimmät sydänlihassolujen erilaistusmenetelmät.....	19
4	iPS-SOLUISTA ERILAISTETUT SYDÄNLIHASSOLUT	21
	4.1 Sydänlihassolujen karakterisointi	24
	4.2 Virtaussytometria	25
5	SOLUJEN RIKASTAMINEN.....	26
	5.1 Solujen rikastusmenetelmiä	26
	5.2 Sydänlihassoluille käytettäviä rikastusmenetelmiä.....	29
6	TYÖN SUORITUS	32
	6.1 Työssä käytetty laitteisto ja kaupalliset kitit	32
	6.2 Työssä käytetty solulinja ja erilaistusmenetelmä.....	34
	6.3 Solujen kasvatus ja erilaistus	34
	6.4 Soluerien rikastaminen MojoSort™-magneettirikastimella	37
	6.5 UTA.14803.WTpb-solulinjan pluripotentiuden tarkastus	40
	6.6 Soluerien rikastaminen MACS®-magneettirikastimella	43
	6.7 Virtaussytometrianäytteiden käsittely ja analysointi	47
	6.8 Immunofluoresenssinäytteiden värjääminen ja analysointi.....	48
7	TULOKSET	50
8	POHDINTA	65
	LÄHTEET	71
	LIITTEET.....	77
	Liite 1. Työssä käytetyt mediumit ja erotuspuskuri.....	77
	Liite 2. Työssä käytetyt värjäysreagenssit.....	78

LYHENTEET JA TERMIT

α - ja β -kateniini	vyöliitoksen rakenneproteiini
α -aktiini	sydänlihassolun rakenneproteiini
α -MHC	myosin heavy chain alpha
activin, nodal, Tfg-b, BMP, Wnt	sydänlihassoluja erilaistettaessa aktivoitava signaalintireitti
AKP	alkalinen fosfataasi
APC	allophycocyanin
β -kateniini/GSK3	kardiogeneesiä inhiboiva signaalintireitti
blebbistatiini	myosiini-aktiinisäikeiden supistumista inhiboiva pienmolekyyli
BMP	bone morphogenic protein (luun morfogeeninen proteiini)
BMP4, aktivin-A, IWP-4	sydänerilaistuksessa käytettäviä pienmolekyylejä
Brachyury T	sydänerilaistuksen T-box transkriptiotekijä
cDNA	komplementaarinen DNA
CHIR99021	sydänerilaistuksessa käytettävä pienmolekyyli
c-Myc	cellular myelocytomatosis oncogene
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole (tumien väriaine)
elektroporaatio	sähkövirta-avusteinen solukalvon läpäisytekniikka
EMILIN2	elastin microfibril interfacier 2
endogeeni	geeni, jota solu ilmentää
epigeneettinen	geenisekvenssiä muuttamaton
eksogeeni	siirtogeeni, jota solu ei ilmennä
ES	embryonic stem cell (alkion kantasolu)
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FGF	fibroblast growth factor (fibroblastikasvutekijä)
FITC	fluorescein-isothiocyanate

GADPH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (housekeeping-proteiini)
GATA	transkriptiotekijäperhe
HCN4	hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium and sodium channel 4
helix-loop-helix-transkriptiotekijä	sydänerilaistuksessa toimiva transkriptiotekijä
housekeeping-geeni	ylläpitogeneeni
<i>in vitro</i>	koeputkessa tai maljoilla tehty tutkimus
iPS	indusoitu pluripotentti kantasolu
Isl1	insulin gene enhancer protein 1
IWP-4	inhibitor of WNT production 4
kardiogeneesi	sydämen ja sydänlihassolujen kehittyminen
Klf4	Kruppel-like factor 4
konneksiini -40, -43	aukkoliitoksien rakenneproteiini
LIM	LIM domain
Lin8	abnormal cell lineage protein 8
markkeri	tekijä, jota solu tyypillisesti ilmentää
MEF2	myocyte enhancer factor 2
Mesp1	mesoderm posterior 1
Mixl1	mix-paired-like-homeobox 1
MLC2V	myosin regulatory light chain 2
MYH6	myosin heavy chain 6
myofibrilli	sydänlihassolun lihassäie
Nanog	homeobox proteiini
N-cadherin	neural cadherin
Nkx2-5	NK2 homeobox 5
Oct4, Oct3/4	octamer binding transcription factor
onkogeeninen	kasvaimia aiheuttava
PCR	polymerase chain reaction
PE	phycoerythrin
Pen/Strep	penisilliini/streptomysiini -antibioottiliuos

proteiinikinaasi-C/ c-Jun-N-terminaalikinaasi Rex1 signalointireitti siirrostusluku	kardiogeneesiä edistävä signalointireitti reduced expression 1 solun viestintäreitti luku, josta ilmenee solulinjan jakamiskertojen lukumäärä
sinkkisormi-transkriptiotekijä SIRPA somaattinen solu Sox2 SRF SSEA Tbx5 teratooma Tra-1-60, Tra-1-81 troponiini T, C, I VCAM WNT WNT/ β -kateniini	sydänerilaistuksen transkriptiotekijä signal regulatory protein alpha solu, joka ei ole kantasolu tai sukusolu sex determining transcription factor 2 serum response factor stage specific embryonic antigen T-box transcription factor 5 itusolukasvain tumor related antigen sydänlihassolun rakenneproteiini vascular cell adhesion molecule 1 wingless/INT-proteiini sydänerilaistusta inhiboiva ja edistävä signalointireitti
Yamanakan faktorit	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc -transkriptiotekijät

1 JOHDANTO

Kantasolut ovat soluja, joilla on kyky jakaantua rajattomasti ja erilaistua miksi tahansa solutyypiksi. Uudelleenohjelmoidut erittäin monikykyiset kantasolut eli indusoidut pluripotentit kantasolut (iPS) ovat soluja, jotka on uudelleenohjelmoitu kantasoluiksi ihmisen somaattisista soluista. Ensimmäisen kerran uudelleenohjelmoinnissa onnistuttiin vuonna 2007 kahden eri tutkijaryhmän toimesta (Takahashi ym. 2007; Yu ym. 2007). Uudelleenohjelmoinnissa hyödynnetään solun sisään vietäviä transkriptiotekijöitä. iPS-soluilla odotetaan olevan suuri merkitys kudosteknologian ja lääketieteen kehityksessä (Yoshida & Yamanaka 2017, 1964). iPS-soluja voidaan erilaistaa useiksi eri solutyypeiksi, esimerkiksi sydänlihassoluiksi (Tiscornia, Vivas, & Izpisua-Belmonte 2011, 1571). Erilaistusmenetelmiä on useita erilaisia ja ne perustuvat solujen signalointireittien aktivoimiselle vaiheittain tietyssä järjestyksessä (Mummery ym. 2012, 346).

Erilaistetut solut voidaan puhdistaa muista solutyypeistä käyttämällä erilaisia rikastusmenetelmiä. Käytettävä rikastusmenetelmä tulee valita rikastettavan solutyypin vaatimuksien ja jatkokäsittelytarpeen mukaisesti. Käytetyimmät rikastusmenetelmät perustuvat solun pintaproteiinien tarttuvien vasta-aineiden fluoressivärjäykseen tai solun genomin muuntamiseen, jotta solu alkaa ilmentää rikastukseen tarvittavia tekijöitä. (Amos ym. 2011, 26.)

Opinnäytetyö tehdään Tampereen yliopistossa toimivalle Sydänryhmälle. Sydänryhmän tärkeimpiä tavoitteita on toiminnallisten sydänlihassolujen ja maksasolujen erilaistaminen iPS-soluista ja niiden hyödyntäminen perinnöllisten sydänsairauksien sekä ateroskleroosin mallinnuksessa. Sydänryhmässä tehtävä tutkimus keskittyy iPS-solujen tuottoon potilasnäytteistä ja niiden avulla erilaistamismenetelmien ja kasvatusympäristöjen kehittämiseen sydänlihassoluille ja maksasoluille. Opinnäytetyötä Sydänryhmässä ohjaavat tutkijatohtori Mari Pekkanen-Matila ja laboratorioanalyttikko Henna Lappi. (Aalto-Setälä 2020.)

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, onko MACS[®] ja MojoSort[™] -magneettirikastimilla eroja tehokkuudessa, käytettävyydessä tai toiminnallisuudessa sydän-

lihassoluja rikastettaessa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli erilaistaa sydänlihassoluja HEB-erilaistusmenetelmällä ja rikastaa ne kahdella eri magneettirikastimella. Tuloksia kahden magneettirikastimen välillä oli tarkoitus vertailla käyttäen analysoinnissa virtaussytometriä ja solujen immunofluoresenssivärijäystä. Työstä saatujen tulosten perusteella Sydänryhmä voi tehdä perusteltuja laitehankintapäätöksiä.

2 KANTASOLUT

Ensimmäiset tutkijat, jotka määrittelivät mitä kantasolut ovat ja millaisia ominaisuuksia niillä on, olivat Ernest McCulloch ja James Till 1960-luvulla. Pioneerityösään hiirillä he löysivät verta tuottavat kantasolut eli hematopoieettiset kantasolut. (Becker, McCulloch & Till 2014.) Heidän tutkimuksensa oli alku uudelle saralle tieteen maailmassa, sillä kantasoluja hyödynnetään lääketieteessä, tutkimuksissa ja tieteellisissä yhteisöissä yhä enenevässä määrin (Skottman & Seppänen 2014).

Kantasolut ovat soluja, joilla on rajaton jakaantumiskyky ja ne voivat erilaistua miksi tahansa solutyypiksi. Kantasolut jaotellaan ryhmiin niiden erilaistumiskyvyn sekä alkuperän mukaan. Erilaistumiskyvyn mukaan kantasolut voidaan jakaa pluripotentteihin, totipotentteihin, multipotentteihin ja unipotentteihin kantasoluihin. Totipotentit kantasolut ovat hedelmöittyneitä munasoluja ja ne voivat erilaistua miksi tahansa ihmiskehon kudostyypiksi. Pluripotentit kantasolut syntyvät alkionkehityksen aikana, kun solut ovat jo eriytyneet ryhmiksi, joista muodostuu sikiökalvo, istukka ja itse eliö. Tämän vuoksi pluripotentit kantasolut voivat erilaistua kaikiksi muiksi kuin istukan tai sikiökalvon soluiksi. Alkion kantasoluja kutsutaan ES-soluiksi (embryonic stem cell). Multipotentit kantasolut ovat aikuisen kantasoluja, jotka voivat erilaistua enää vain tietyn kudoksen tai elimen soluiksi. Unipotentit kantasolut ovat aikuisen kantasoluja, jotka voivat erilaistua ainoastaan yhdeksi solutyypiksi tietyssä kudoksessa. Kantasoluja löytyy kaikkialta ihmiskehosta, mutta vuodesta 2006 lähtien pluripotentteja kantasoluja on osattu valmistaa myös ihmiskehon ulkopuolella *in vitro*. Näitä kantasoluja kutsutaan iPS-soluiksi. (Takahashi & Yamanaka 2006, 663; Weltner, Trokovic & Otonkoski 2014, 785; ISSR 2020.)

2.1 iPS-solut ja niiden valmistaminen

Solujen uudelleenohjelmointi iPS-soluiksi onnistui hiiren soluista vuonna 2006 ja ihmisen fibroblasteista vuonna 2007 kahden eri tutkimusryhmän toteuttamana (Takahashi & Yamanaka 2006; Takahashi ym. 2007; Yu ym. 2007). iPS-solut

ovat peräisin somaattisista soluista ja ne on tehty pluripotenteiksi hyödyntäen transkriptiotekijöitä. Geeninsäätelyproteiinia koodaavat geenit, jotka tunnetaan nykyisin yleisesti myös Yamanakan faktoreina (Oct4 (octamer binding transcription factor 4), Sox2 (sex determining transcription factor 2), Klf4 (Kruppel-like factor 4), c-Myc (cellular myelocytomatosis oncogene)) on syötetty uudelleenohjelmoitavan solun sisään useimmiten käyttäen virusvektoreita (Takahashi ym. 2007, 861). Yun johtama tutkimusryhmä hyödynsi Oct4, Sox2, Nanog (homeobox protein) ja Lin8 (abnormal cell lineage protein 8) -transkriptiotekijöitä (Yu ym. 2007). Tällä osoitettiin, että iPS-soluja voidaan valmistaa useammalla eri tavalla. Pääsääntöisesti solun sisään transkriptiotekijöitä koodaavat geenit osallistuvat solun proteiinisynteesiin ja alkavat muokata solusta pluripotenttia. Nykyään monien muidenkin tekijöiden on osoitettu toimivan tuman uudelleenohjautumisessa. Näitä tekijöitä ovat esimerkiksi muut soluille tyypilliset transkriptiotekijät, solusykliin vaikuttavat tekijät, entsyymit, jotka vaikuttavat kromatiinin muokkauksessa sekä jotkin mikro-RNA-molekyylit ja soluadheesiomolekyylit. (Takahashi ym. 2007, 861; Weltner ym. 2014, 785–786.)

Solun uudelleenohjautuminen on monivaiheinen prosessi, joka voidaan jakaa kahteen vaiheeseen: sattumanvaraiseen ja ohjelmoituun etenemiseen kohti pluripotenttia kantasolua. Uudelleenohjelmoinnin sattumanvaraisuus johtuu tuman epigeneettisen tilan uudelleenohjelmoinnista ja sen aiheuttamista haasteista. Sattumanvarainen vaihe alkaa solusyklin aktivoinnilla, jotta solut jakautuisivat aktiivisesti ja jatkuu vaiheella, jossa solut muuntuvat epiteelisolujen kaltaisiksi soluiksi. Aktiivinen jakautuminen edesauttaa myös Oct4 ja Sox2 -transkriptiotekijöiden kiinnittymistä, koska se aiheuttaa estävien kromatiinirakenteiden hetkellistä heikkenemistä. Oct4 ja Sox2 sitoutuvat kromatiinirakenteeseen niiden kohdegeenien alueelle, joita ne säätelevät. Sox2 edesauttaa Oct4:n ilmentymisen ohjaamisessa. Transkriptiotekijöistä c-Myc ja oletettavasti myös Klf4 muokkaavat tuman kromatiinirakennetta sellaiseksi, mihin transkriptiotekijät Oct4 ja Sox2 voivat kiinnittyä. C-Myc aktivoi kromatiinia muokkaavia proteiineja ja Klf4 aktivoi Sox2:ta. C-myc ja Klf4 edesauttavat ja ohjaavat näin solussa tapahtuvia alkuvaiheen muutoksia. Klf4 ja c-Myc myös vaikuttavat solun solusykliä estävien kasvunrajoitusgeenien (p21 ja p53) toimintaan, minkä on osoitettu lisäävän uudelleenohjautumisen tehokkuutta. Jatkotutkimuksissa on lisäksi havaittu, ettei onkogeeninen c-Myc ole korvaamaton ja solun uudelleenohjelmointi onnistuu myös

ilman sitä (Nakagawa ym. 2008, 101). (Takahashi ym. 2007, 862, 868; Yamanaka 2007, 42–46; Weltner ym. 2014, 786–787; Yoshida & Yamanaka 2017, 1958–1959.)

Sattumanvaraisen vaiheen jälkeen uudelleenohjelmoinnissa siirrytään kohti ohjelmoitua vaihetta, kun solut alkavat vähitellen ilmentää geenejä, jotka ovat ominaisia pluripotenteille kantasoluille. Uudelleenohjelmoinnin loppupuolella solun toimintaa ohjaavat transkriptiotekijät Oct4 ja Sox2. Ohjelmoidussa vaiheessa solut muuntavat itsensä pluripotentiin tilaan muokkaamalla epigeneettisen tilansa sekä geeniverkostonsa pluripotenttia vastaavaksi. Tässä vaiheessa solut myös hiljentävät siirtogeeniset uudelleenohjelmointitekijät, jotka ovat vaikuttaneet solun uudelleenohjautumiseen pluripotentiksi kantasoluksi. Kokonaisuudessaan solun uudelleenohjelmointi on hidasta ja alusta loppuun pluripotentiksi kantasoluksi muuntuminen vie aikaa noin kolmenkymmenen päivän ajan. (Takahashi ym. 2007, 862–863; Weltner ym. 2014, 786–787.)

Transkriptiotekijät vietiin uudelleenohjelmoitavien kantasolujen sisään alun perin käyttäen retroviruksia ja lentiviruksia (Takahashi ym. 2007, 861,869; Weltner ym. 2014,788). Näitä viruksia käytettäessä esiintyi kuitenkin ongelmia, sillä retroviruksen ja lentiviruksen avulla solun sisään kuljetetut geenit pystyivät integroitumaan solun genomiin aiheuttaen mutaatioita. Vaikka siirtogeenit hiljentyvät uudelleenohjelmoinnin lopuksi ne voidaan tarkoituksettomasti aktivoida, jolloin riski kasvainten muodostumiselle nousee. Lisäksi retrovirukset voivat aiheuttaa iPS-solujen muuttumisen immunogeenisiksi (Zhao ym. 2011, 212–213). Näiden haittojen ehkäisemiseksi kehitettiin uusia, integraatiovapaita menetelmiä, joilla transkriptiotekijät saatiin siirrettyä solukalvon sisäpuolelle. Näitä uusia transkriptiotekijöiden kuljetustapoja ovat Sendai-virukset (Fusaki ym. 2009), adenovirukset (Stadtfield ym. 2008), plasmidit (Okita ym. 2011; Okita ym. 2008), syntetisoitu mRNA (Warren ym. 2010) ja proteiinit (Kim ym. 2009). (Yamanaka 2012, 679; Yoshida & Yamanaka 2017,1958.)

Indusoituja pluripotenteja kantasoluja hyödynnetään nykyisin paljon lääketutkimuksen ja kudospallintamisen parissa. Pluripotentiuden saavuttaneet iPS-solut voidaan jatkokäsittellä ja erilaistaa useiksi eri solutyypeiksi. Esimerkkinä solutyty-

peistä toimivat sydänlihassolut, adiposyytit (rasvasolut), hermosolut, haiman solut tai hematopoieettiset solut (verisolut). Vaikka iPS-solujen ja ES-solujen toiminnallinen samankaltaisuus on huomattava, tarkemmissa tutkimuksissa on huomattu, että solut ilmentävät satoja geenejä eri tavoin ja iPS-solut onkin luokiteltu pluripotenttien kantasolujen alatyypiksi (Chin ym. 2009, 111). iPS-solut ja ES-solut eroavat toisistaan myös epigeneettisten profiiliensa suhteen. Esimerkiksi metyloituneiden alueiden metylaatioprofiilit eroavat toisistaan. Muita vähäisiä eroavaisuuksia ilmenee mitokondrioissa ja mahdollisesti myös X-kromosomien deaktivoinnissa (Baghbaderani ym. 2016, 394; Tchieu ym. 2010, 329). iPS-soluja verrataan usein ES-soluihin, koska niillä on samat edellytykset toimia tutkimuksissa, mutta ES-solujen käytössä on eettisiä ongelmia niiden alkioikäisyyden vuoksi. (Tiscornia ym. 2011, 1571; Weltner ym. 2014, 785, 788–789; Yoshida & Yamanaka 2017, 680–681.)

2.2 iPS-solujen karakterisointi

Karakterisoinnilla tarkoitetaan tutkittavan asian, tässä tapauksessa solujen tai solulinjojen, tarkastamista ja ominaisuuksien tutkimista ja havainnointia. iPS-solujen karakterisoinnin avulla on tarkoitus varmistaa solujen tai solulinjan olevan pluripotentteja. iPS-solujen pluripotenttiutta voidaan tutkia tarkastelemalla solujen morfologiaa, tekemällä immunofluoresenssivärjäyksiä, PCR-menetelmillä (polymerase chain reaction) sekä tutkimalla teratoomien muodostumista. Morfologisia tunnusmerkkejä iPS-soluille ovat pieni koko, pyöreys, vähäinen sytoplasma, huomattava tuma ja korkea tumien ja sytoplasman suhde. iPS-solukolonioiden tunnusmerkkejä ovat tasaisuus ja pyöreä muoto sekä hyvin erottuva ja pehmeä reuna. Koloniat ovat myös kompaktin kokoisia. (Takahashi ym. 2007, 863–864, 866–867; Wakui ym. 2017, 044003-1–044003-2.)

Immunofluoresenssivärjäyksillä tutkitaan solun kykyä ilmentää pluripotentille solulle ominaisia markkereita. Markkereiksi kutsutaan esimerkiksi geenejä tai proteiineja, joita tutkittava solu tyypillisesti ilmentää. Immunofluoresenssivärjäys voidaan tehdä käyttäen suoraa tai epäsuoraa värjäystapaa. Skaperin (2012) mukaan suorassa värjäystavassa fluoresoiva merkkiaine on kiinnitetty primääri-

vasta-aineeseen ja epäsuorassa menetelmässä primäärivasta-aineeseen kiinnittyvään sekundäärivasta-aineeseen. Antigeeninä, johon vasta-aineet kiinnittyvät toimii tutkittava markkeri. Analyyseissä käytetään usein epäsuoraa värjäystapaa sen paremman herkkyyden ja intensiivisemmän värjäystuloksen vuoksi. (Skaper 2012, 235, 237–238.) Tutkittaessa solun pluripotentiutta markkereina toimivat esimerkiksi alkalinen fosfataasi (AKP), SSEA (stage specific embryonic antigen) ja Tra-1-60 ja Tra-1-81 (tumor related antigen). Lisäksi usein tutkitaan geenien, kuten Nanog:n, Oct4:n ja Sox:n ilmentymistä. Pluripotentin solun tulisi ilmentää kaikkia edellä mainittuja markkereita. (Takahashi ym. 2007 863–864; Tiscornia ym. 2011, 1574; Deng ym. 2015, 153–154.)

PCR-menetelmällä monistetaan tutkittavista soluista eristettyä RNA:ta tai DNA:ta, jotta voidaan tutkia, mitä geenejä solu ilmentää tai ei ilmennä. Kantasoluista eristetään RNA:ta, joka muunnetaan cDNA:ksi eli komplementaariseksi DNA:ksi, josta on poistettu intronit. cDNA-synteesi voidaan toteuttaa käänteistranskriptaasi-PCR-tekniikkaa käyttäen, jolloin synteessin jälkeen cDNA:ta monistetaan alukkeiden avulla, koska sitä muodostuu muuten niin vähäisiä määriä. Valmistettuun cDNA-näytteeseen lisätään tutkittavien geenien alukkeet ja näytteitä monistetaan PCR:llä, jotta ilmennettävää geeniä olisi tarpeeksi analyysia varten. Analyysillä voidaan tutkia endogeenejä, joita pluripotentin solun tulisi ilmentää tai eksogeenejä, joita pluripotentin solun ei tulisi ilmentää. Endogeeneillä tarkoitetaan geenejä, joita solu on uudelleenohjelmoinnin aikana alkanut ilmentää ja jotka toimivat siten pluripotenssimarkkereina. Eksogeenit ovat geenejä, jotka vietiin solun sisään uudelleenohjelmoinnin aikana, ja jotka solu on hiljentänyt muuntuessaan iPS-soluksi. Esimerkkejä usein käytetyistä endogeenimarkkereista ovat Sox2, Nanog, Oct3/4, c-Myc, Rex1 (reduced expression 1), GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) ja β -aktiini. Edellä mainituista markkereista GAPDH on niin sanottu housekeeping -geeni, eli ylläpitogeeni, jonka ilmentämisen voimakkuuden ei tulisi muuttua solujen muokkaamisen aikana (Artyukhov ym. 2017, 234). Solun sisään tuotujen eksogeenien markkereina toimivat Oct4, Sox2, c-Myc ja Klf4. (Bustin 2004, 88–91; Takahashi ym. 2007, 863; Tiscornia ym. 2011, 1573–1574; Manzini ym. 2015, 905.)

Teratoomien eli itusolukasvaimien muodostuminen on yksi pluripotentiuden havaitsemiskeino. Tuumorien muodostumista testataan siirrostamalla tutkittavia soluja hiirten selänpuoleisiin kylkiin ja tarkastelemalla tuumorin muodostumista yhdeksän viikon jälkeen. Jos teratooma on muodostunut, siitä otetaan histologisia näytteitä ja selvitetään siinä esiintyvät kudostyypit. Jotta solut voidaan todeta pluripotenteiksi näytteestä tulee löytyä kaikkia kolmen alkiokerroksen solutyyppejä. Alkiokerrosten solutyyppeiden muodostumista voi testata myös EB-erilaistuksen (embryonic body) avulla *in vitro*, koska menetelmässä soluaggregaatit erilaistuvat jokaisen alkiokerroksen soluiksi. (Takahashi ym. 2007, 866–867; Rajala, Pekkanen-Mattila & Aalto-Setälä 2011, 4; Acimovic ym. 2014, 2.)

3 IPS-SOLUJEN ERILAISTAMINEN SYDÄNLIHASSOLUIKSI

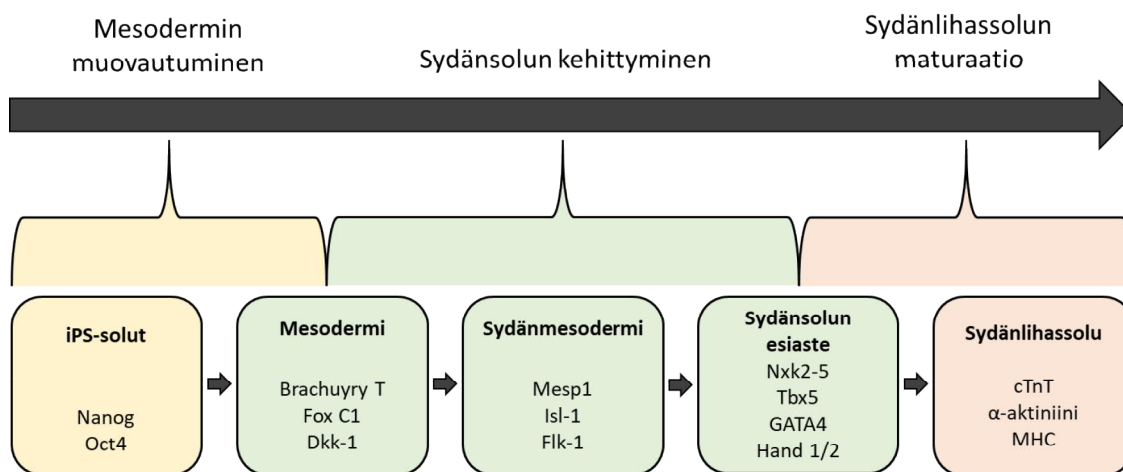
iPS-solujen erilaistaminen sydänlihassoluiksi on prosessina hyvin samanlainen kuin sydämen kehittyminen alkionkehityksen aikana. Vaiheittainen transkriptiotekijöiden aktivointi aikaansaa alustavan esisydän-mesodermin muodostumisen ja lopulta määrittää sydänsolujen kohtalon. Prosessien samankaltaisuutta tukee se, että monissa erilaistusmenetelmissä hyödynnetään alkionkehityksessäkin toimivien signalointireittien aktivointia ja inhibointia, joka saa solun kehittymään kohti sydänlihassolua. Toinen prosessien samankaltaisuutta tukeva asia on geenisekvenssissä tapahtuvat muutokset, joita on havaittu sekä alkionkehityksessä että iPS-solujen erilaistuksessa. Lisäksi iPS-solun sydänlihassoluksi muovautumisen vaiheet tapahtuvat samoja vaiheita noudattaen *in vitro* kuin alkionkehityksenkin aikana. (Mummery ym. 2012, 345; Karakikes ym. 2015, 3–4.)

Alkionkehityksen alkuvaiheissa kehitystä kontrolloivat kolme proteiinikasvutekijöiden perhettä. Ne vaikuttavat alkeellisen mesodermin muodostukseen ja kardiogeneesiin. Nämä kolme proteiiniperhettä ovat luun morfogeeniset proteiinit (BMP, bone morphogenic protein), wingless/INT-proteiinit (WNT) ja fibroblastikasvutekijät (FGF, fibroblast growth factor). Näitä proteiineja tai niiden inhibiittoreita ilmentää alkionkehityksessä endodermi. BMP-signaali yleisesti edesauttaa kardiogeneesiä kun taas signaali WNT-signaaliintireittien kautta on monimutkaisempi tapahtuma. WNT-signaali vaikuttaa sydämen määrittelyyn ja voi joko edistää tai estää sydämen kehitystä. Signaalin tapahtuessa proteiini-naasi-C/c-Jun-N-terminaalikinaasi -reitin kautta WNT-signaali edistää kardiogeneesiä ja β -kateniini/GSK3 -reitin kautta tapahtuessa estää sitä. Lisäksi on havaittu WNT/ β -kateniini -signaaliintireitin myös edistävän sydänerilaistusta aivan erilaistuksen alussa (Ueno ym. 2007, 9685). Näiden signaaliintireittien häiriöt vaikuttavat negatiivisesti sydämen muodostumiseen. FGF:n rooli sydänkehityksessä on antaa sijaintitietoja soluille niiden oikeanlaista sijoittumista varten. BMP2-proteiini säätelee lisäävästi FGF8-proteiinin tuottoa ja ne yhdessä aiheuttavat mesodermivaiheisien solujen muutoksen käynnistämisen kohti alkuvaiheen sydänerilaistumista. On havaittu, että erilaisten kasvutekijäyhdistelmien oikea-aikainen toiminta ja ilmentyminen aiheuttaa ja muoaa alkuvaiheen sydänmesodermin muodostumista. (Mummery ym. 2012, 345; Burrige ym. 2012, 4.)

Mesodermin solut vastaanottavat signaaleja, joiden avulla ne käynnistävät sydänspesifisten transkriptiotekijöiden tuoton. Transkriptiotekijöiden tuotto aloittaa sydäntranskriptio-ohjelman toiminnan. Ensimmäisenä osana tätä tapahtumaa mesodermin solut ilmentävät T-box tekijä Brachyury T -transkriptiotekijää ja Mixl1 homeoboksi -proteiinia (mix-paired-like-homeobox 1). Nämä solut myös aktivoivat ohimenevästi helix-loop-helix-transkriptiotekijä Mesp1:n (mesoderm posterior 1), jonka aktivoitumisen myötä siirrytään sydänmesodermi -vaiheeseen sydämen kehitystä. Mesp1-proteiini vaikuttaa homeoboksi transkriptiotekijän Nkx2-5:n (NK2 homeobox 5), T-box proteiini Tbx5:n (T-box transcription factor 5), Isl1:n (insulin gene enhancer protein 1) ja LIM (LIM domain) transkriptiotekijän ilmentämiseen. Nämä tekijät ovat sydänlinjan erilaistuksen varhaisia markkereita. Nkx2-5:llä on olennainen osa muotosignaalien tulkinnassa muodostettaessa varhaisia sydänputkia. On todennäköistä, että Nkx2-5 toimii transkriptiossa yhteistyössä Tbx5:n kanssa, jolloin ne yhdessä auttavat sydämen rakenneosien, kuten väliseinän ja vasemman kammion alustavassa muodostumisessa. (Mummery ym. 2012, 345–346; Burridge ym. 2012, 4; Rajala ym. 2011, 2–3.)

Toisena osana sydäntranskriptio-ohjelman toiminnan alkamista Nkx2-5 ja Tbx5 liittyvät yhteen sinkkisormi -transkriptiotekijöiden jäsenperheen GATA:n ja SRF:n (serum response factor) kanssa aktivoitakseen sydämen rakennegeenejä. Rakennegeenejä aktivoidaan sydänsolun esiaste -kehitysvaiheessa. Aktivoitavia rakennegeenejä ovat aktiinia, myosiinin raskasketjua, myosiinin kevyetketjua, troponiinia ja desmiinejä koodaavat geenit. Lisäksi Tbx5 ja Nkx2-5 toimivat yhdessä aktivoitakseen konneksiini-40-proteiinin ilmentämisen. GATA 4:llä ja GATA 6:lla on tärkeä osa sydänsolujen kehityksessä ja ilman niiden osallistumista ei sydänkudosta muodostu. GATA 4 toimii varhaisessa vaiheessa prosessia esimerkiksi varhaisten sydänputkien muodostamisessa. GATA 4 sekä GATA 6 toimivat myös lihaskudosten muodostamisessa. Lisäksi MEF2-transkriptiotekijöillä (myocyte enhancer factor 2) on tärkeä osa sydänsolujen muodostumisessa, sillä ne säätelevät sydänlihaksen rakennegeenejä. Sydänsolut voidaan tunnistaa niiden rakenneproteiinien, kuten cTnT:n (troponiini-T) ja α -aktiniinin tai α -MHC-proteiinin (myosin heavy chain alpha) avulla. Kokonaisuutena tämä geeninsäätelyverkosto hyödyntää useita monimutkaisia vuorovaikutuksia säädelllessään sydämen kehi-

tystä. Kuviossa 1 on esitetty sydänlihassolujen muovautuminen. Kuvioon on merkitty myös kunkin erilaistumisvaiheen aikana vaikuttavia tekijöitä. (Rajala ym. 2011, 3; Mummery ym. 2012, 346; Burrige ym. 2012, 4.)



KUVIO 1. Sydänlihassolujen erilaistumisen vaiheet (Rajala ym. 2011, 3, muokattu)

iPS-solujen muuntuminen sydänlihassoluiksi tapahtuu edellä kuvatun (kuvio 1) kaltaisesti normaalin sydämen kehityksen vaiheiden mukaisesti. Sydämen kehityksessä esiintyviä tekijöitä voidaan hyödyntää iPS-solujen erilaistamisessa sydänlihassoluiksi käyttämällä signalointireittejä, jotka aktivoivat tiettyjä transkriptiotekijöitä vaiheittain. iPS-solujen erilaistaminen eroaa sydämen kehityksestä siinä, että tarvittavia signalointireittejä aktivoivia aineita ei ole samalla tavalla saatavilla kuin alkiokehityksessä. Tämän vuoksi iPS-soluja erilaistettaessa sydänlihassoluiksi aktivoidaan ulkoisesti muun muassa activin-, nodal-, TGF- β -, Wnt-, ja BMP-signalointireittejä (Hartman, Dai, & Laflamme 2016, 4). (Mummery ym. 2012, 346; Karakikes ym. 2015, 3.)

Näitä erilaistumista edesauttavia signalointireittejä voidaan aktivoida esimerkiksi syöttämällä iPS-soluille sytokiineja, eli viestiaineita, kuten BMP4:ää, IWP-4:ää (inhibitor of WNT production 4) tai activin-A:ta. BMP4 ja activin-A sytokiinien lisääminen viljelmään lisää muun muassa Mixl1-markkerin ilmentymistä. WNT/ β -kateniini -signalointireittiä inhiboivia IWP-molekyylejä hyödynnetään erilaistuksen loppupuolella, sillä erilaistuksen myöhemmässä vaiheessa WNT-signalointi inhiboi sydänerilaistusta (Ueno ym. 2007, 9685). Tätä signalointia estämällä sydän-

lihassolujen saanto paranee. Askorbiinihapolla taas voidaan edesauttaa sydämen geenien, esimerkiksi GATA 4:n parempaa ilmentymistä ja spontaanin sykinän alkamista (Takahashi ym. 2003, 1912). Lisäksi on havaittu, että erilaistuksen alussa insuliinipitoiset olosuhteet inhiboivat sydänerilaistusta, joten insuliini lisää viiljelmiin usein vasta erilaistamisen myöhemmässä vaiheessa (Lian ym. 2013, 2). Kun iPS-solut ovat erilaistuneet sydänlihassoluiksi, ne alkavat sykkimään kasvatusalustoillaan spontaanisti. (Burrige ym. 2012, 5; Karakikes ym. 2014, 21.)

3.1 Yleisimmät sydänlihassolujen erilaistusmenetelmät

iPS-soluja voidaan erilaistaa sydänlihassoluiksi useita eri menetelmiä hyödyntäen. Neljä yleisintä käytössä olevaa menetelmää ovat pienmolekyyli menetelmä, yksikerros menetelmä, EB-menetelmä ja END-2-menetelmä. Muut käytetyt menetelmät perustuvat edellä mainittuihin menetelmiin tai ovat niiden erilaisia variaatioita ja muunnelmia. Kaikissa menetelmissä iPS-soluja kasvatetaan solumaljoilla tai kuoppalevyillä mediumissa, jossa erilaistuminen sydänlihassoluiksi tapahtuu. (Burrige ym. 2012, 5; Smith ym. 2017, 3–5.)

END-2-menetelmä on yksi ensimmäisistä sydänlihassolujen erilaistusmenetelmistä. Tässä menetelmässä pluripotentteja kantasoluja kasvatetaan hiiren viskeeraalisen endodermin kaltaisten solujen (END-2) päällä. Samalla tavalla kuin alkiokehityksessä sydänkehityksessä endotermi erittää sydänerilaistusta edistäviä tekijöitä, kuten BMP:tä, aktivin-A:ta, FGF:ää ja WNT/ β -kateniini -signalointireitin repressoreita, jotka vaikuttavat pluripotenttien solujen erilaistumiseen sydänlihassoluiksi. Menetelmän erilaistustehokkuutta on saatu parannettua kasvattamalla soluja aluksi insuliinittomissa ja seerumittomissa olosuhteissa. Lisäksi L-askorbiinihapon on todettu edistävän sydänerilaistusta. Menetelmällä saadaan sydänlihassolujen saannoksi 20-25 %. (Mummery ym. 2012, 349; Acimovic ym. 2014, 2.)

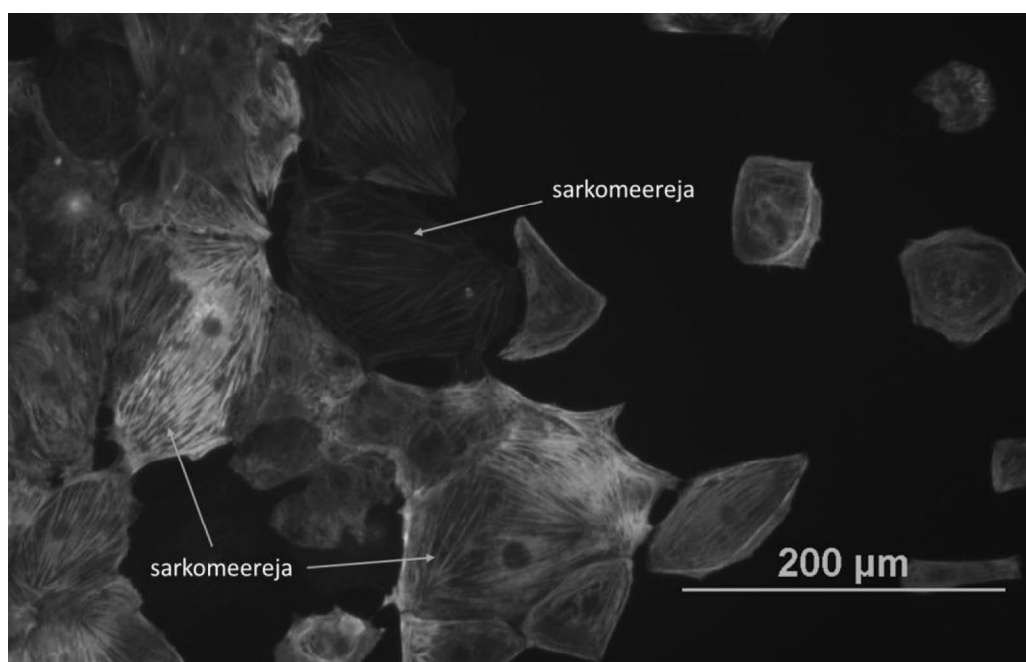
EB-menetelmässä (embryoid body) soluja kasvatetaan suspensiossa. Kasvaessaan maljalla tai kaivoissa solut muodostavat pallomaisia soluagregaatteja, joiden ei anneta kiinnittyä kasvatusalustansa seiniin tai pohjaan. Soluagregaatit

erilaistuvat spontaanisti jokaisen kolmen eri alkiokerroksen endodermin, mesodermin ja ektodermin soluiksi. Sydänlihassolut ovat varhaisimpia solutyyppejä, joita alkaa ilmentyä niin alkionkehityksen kuin soluaggregaattien spontaanin erilaistumisen aikana. Suspensiovaiheen jälkeen soluja kasvatetaan gelatiinipäällystetyillä kasvatusalustoilla, joihin solut kiinnittyvät ja joissa solut alkavat sykkiä. Menetelmän saanto on melko heikko (<10 %), mutta sitä on pyritty parantamaan tasapainottamalla soluaggregaattien kokoa viljelemällä niitä esimerkiksi V:n ja U:n muotoisissa kaivoissa. Yksikerrosmenetelmässä soluja kasvatetaan koko kasvatusalustan pohjan peittävänä mattona. Sekä EB-menetelmässä että yksikerrosmenetelmässä on tärkeää, että solut saavat oikeat signaalit oikeaan aikaan erilaistuaan hyvin. (Rajala ym. 2011, 4–5; Mummery ym. 2012, 348; Acimovic ym. 2014, 2–3.)

Pienmolekyyliomenetelmässä solut kasvavat kiinnittyneenä kasvatusalustansa pohjaan. Menetelmässä ei käytetä kasvutekijöitä ja solujen erilaistumisolosuhteet määritellään tarkasti pipetoimalla niille pienmolekyylejä määritetyssä järjestyksessä. Erilaistuksen aluksi solut käsitellään CHIR99021-pienmolekyylillä, joka inhiboi WNT/GSK3-signalointireittiä, auttaen sydänerilaistusta (Lian ym. 2013, 2–3). Menetelmässä soluille syötetään mediumien mukana myös BMP4:ää ja aktiivin-A:ta, jotka auttavat erilaistumista. Menetelmän toinen tärkeä signalointireitti on WNT/ β -kateniini-signalointireitti, jonka toimintaa inhiboidaan IWP-4-molekyylillä erilaistuksen loppuvaiheessa. Menetelmän tavoitteena on kasvattaa soluista verkko, joka sykkii yhtenäisesti. Menetelmän saanto (>30 %) on suurempi kuin END-2-menetelmässä tai EB-menetelmässä. (Rajala ym. 2011, 5–6; Acimovic ym. 2014, 3.)

4 IPS-SOLUISTA ERILAISTETUT SYDÄNLIHASSOLUT

Yksittäinen aikuinen sydänlihassolu on keskimäärin halkaisijaltaan 10-15 μm ja pituudeltaan noin 100-150 μm . iPS-soluista erilaistettut sydänlihassolut ovat epäkypsiä, eikä niillä siten ole aikuisen solun kokoa, rakennetta ja morfologiaa, vaan ne ovat keskimäärin vain 600 μm^2 kokoisia (Yang, Pabon & Murry 2014, 2; Bedada, Wheelwright & Metzger 2016, 2). iPS-solusta erilaistetuissa sydänlihassoluissa myofibrillien eli lihassäikeiden sijoittuminen ei ole niin järjestäytyntä kuin ihmisen sydänlihassoluissa, joissa myofibrillit kulkevat solun päästä päähän (Ribeiro ym. 2015, 12705). Kuvassa 1 on esitetty mikroskooppikuva troponiinilla värjäytyistä iPS-soluista erilaistetuista sydänlihassoluista, joissa solujen sarkomeerirakenteet näkyvät selkeästi. Useissa sydänlihassoluissa on kaksi pitkänomaista tummaa, mutta kaksitumaisuus vähenee huomattavasti mitä kehittymättömämpi sydänlihassolu on. Kuvasta 1 nähdään myös, että iPS-soluista erilaistettut sydänlihassolut ovat muodoltaan enemmän kulmikkaan pyöreitä kuin sauvamaisia, jollaisia kypsät ihmisen sydänsolut ovat (Rajala ym. 2011, 7). Lundyn ym. (2013) tutkimuksen mukaan viljelyaikaa pidennettäessä iPS-soluista erilaistettavat sydänlihassolut alkavat muistuttamaan kypsydeltään enemmän aikuisia sydänlihassoluja (Lundy, Zhu, Regnier & Laflamme 2013). (Robertson, Tran & George 2013, 316; Sarantitis ym. 2012, 367.)

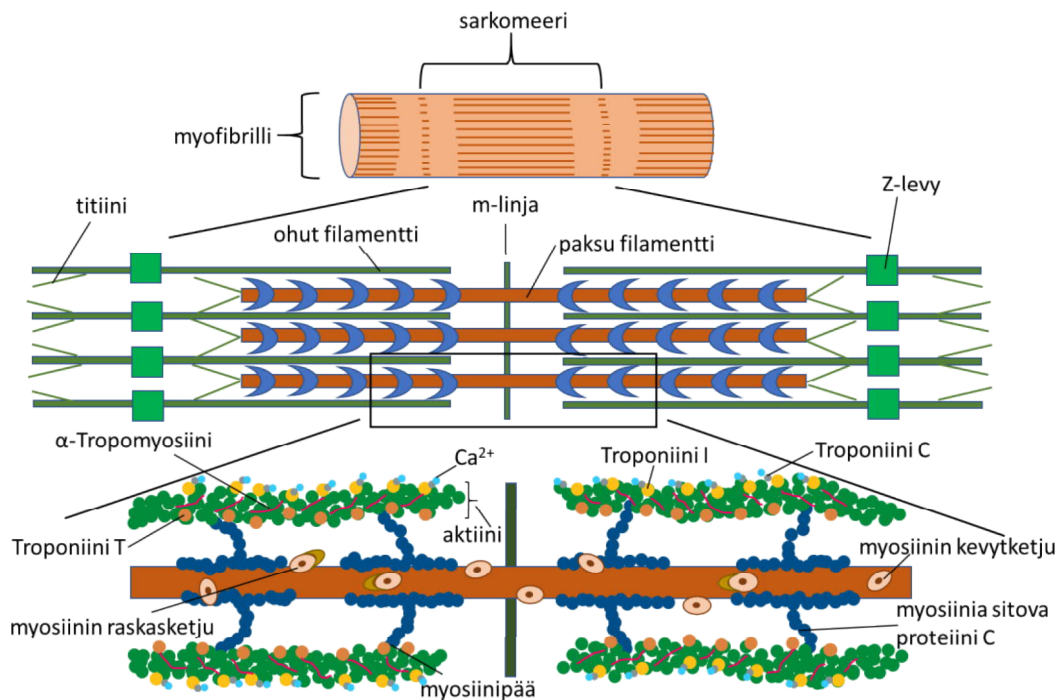


KUVA 1. Sydänlihassoluja ja niiden sarkomeerirakennetta

Sydänlihassolut kiinnittyvät pituussunnassa kiinni toisiin sydänlihassoluihin kytkylevyjen välityksellä. Kytkeytyvät koostuvat desmosomeista, vyöliitoksista ja aukkoliitoksista. Desmosomit pitävät solut kiinni toisissaan solun supistuessa sykäyksittäin. Aukkoliitokset rakentuvat konneksiiniproteiineista ja niiden läpi kulkee sydänlihassolun sähköinen signaali, sekä pienet molekyylit. Vyöliitoksien rakenneproteiineja ovat esimerkiksi N-cadherin (neural cadherin) ja α - ja β -kateniinit. Solun sarkomeerirakenteen aktiinisyyden päät kiinnittyvät vyöliitoksien α - ja β -kateniini -proteiineihin solun sisällä sekä muiden solujen liitoskohdissa. (Sarantitis ym. 2012, 367–368.)

Sarkolemma eli sydänlihassolun solukalvo koostuu fosfolipidimolekyyleistä, kolesterolista sekä proteiinimolekyyleistä, jotka antavat kalvolle kaksikerroksisen rakenteen. Kalvolla sijaitsevat proteiinit toimivat kanavina ioneille ja molekyyleille, jotka liikkuvat kalvon läpi. Kostameerit ovat kiinnittäviä rakenteita, jotka kiinnittävät sarkomeerit Z-levyistä sarkolemmän sisempään osaan. Tärkeimpiä sydänlihassolun rakenteita ja organelleja ovat mitokondriot, kalsiumvarastona toimiva sarkoplasmakalvosto, mikä ei iPS lähtöisessä sydänlihassolussa ole täysin loppuun kehittynyt ja solun tukiranka eli sytoskeleton. (Sarantitis ym. 2012, 368–369.)

Sydänlihassolun tukiranka koostuu aktiinisäikeistä, välikokoisista säikeistä ja mikrotubuluksista, jotka kiinnittävät myofibrillit sarkolemmaan, ohuista ja paksuista filamentteista sekä kytkylevyistä. Z-levyt rajaavat sarkomeereja, jotka ovat noin 2,2 μm pitkä ja jotka yhteen liittyneinä muodostavat myofibrillejä (kuvio 2) (Ribeiro ym. 2015, 12706). Z-levyt keräävät sarkomeerien tuottaman mekaanisen energian ja välittävät sen kostameeriin. Z-levyt yhdessä ohuiden ja paksujen filamenttien sekä titiinin kanssa muodostavat verkkomaisen rakenteen. (Sarantitis ym. 2012, 369–375.)



KUVIO 2. Myofibrillin rakenne (Sarantitis ym. 2012, 370, muokattu)

Kuviossa 2 on esitetty myofibrillin rakenne ja siellä toimivia rakenneproteiineja. Sarkomeerin tärkeimpiä proteiineja ovat troponiini, aktiini ja myosiini, joilla jokaisella on oma tehtävänsä solussa. Tukirankaan kuuluvat ohuet filamentit rakentuvat aktiinimolekyyleistä ja niihin tasaisin välimatkoin kiinnittyneistä kolmesta troponiinimolekyylisestä (troponiini-T, -C ja -I). Paksut filamentit rakentuvat myosiinimolekyyleistä sekä aktiiniin kiinnittyvästä myosiinipäästä. (Sarantitis ym. 2012, 370–371.)

Sydänlihassolun supistumisen saa aikaan ohuen ja paksun filamentin lomittuminen sarkomeerissa. Solun ulkoisen ja sisäisen jännite-eron purkautuminen aiheuttaa kalsiumkanavien avautumisen ja kalsiumionien virtauksen solun sisään. Kalsiumionit kiinnittyvät aktiinifilamenttiin kiinnittyneeseen troponiini-C:hen, jolloin troponiini-I irttaa työntäen tropomyosiinia syrjään, mikä mahdollistaa paksun myosiinifilamentin sitoutumisen aktiiniin. Samalla aktiiniin sitoutuvat myös adenosiinidifosfaatti (ADP) ja fosfaatti. Reaktiossa vapautuva energia kääntää myosiinipään kohti sarkomeerin keskustaa, M-linjaa, aiheuttaen solun supistumisen. Solun supistuminen loppuu, kun solun ulkopuolelta tuleva kalsiumvirta päättyy kalsiumpumppujen käynnistyessä. Tällöin adenosiinifosfaatti (ATP) pääsee sitoutumaan myosiiniin, irrottaen samalla myosiinipään aktiinista. (Lieberman & Marks 2013, 889.)

4.1 Sydänlihassolujen karakterisointi

Sydänlihassoluja voidaan karakterisoida niiden rakenteellisten ominaisuuksien avulla, tutkimalla mitä geenejä solu ilmentää tai tutkimalla sydänlihassolujen toiminnallisia ominaisuuksia. Geenien ilmentymistä voidaan tutkia PCR-tekniikalla. Mikroskoopilla sydänlihassolujen morfologiaa tutkittaessa selvä merkki sydänlihassolusta on kaksitumaisuus ja toinen havaitsemista ja tunnistamista helpottava ominaisuus on solujen kulmikkuus. Sydänlihassolun toiminnan kannalta on olennaista, että solu on alkanut sykkiä spontaanisti erilaistuksen aikana. Sykkimisen rytmiä ja voimakkuutta voidaan seurata ja mitata elektrodeilla. Yksi parhaimmista ja selkeimmistä tavoista tunnistaa sydänlihassoluja ja varmistaa niiden oikeanlaiset rakennekomponentit on sydänlihassolujen immunosytokemiallinen värjäys. (Rajala ym. 2011, 7–8; Lian ym. 2013, 3–4.)

Immunosytokemiallisista värjäystavoista usein käytetään immunofluoresenssi-värjäystä, jossa vasta-aineet on leimattu fluoresoivalla molekyylillä. Epäsuoraa värjäystapaa käytetään sen paremman herkkyyden ja intensiivisemmän värjäystuloksen vuoksi (Skaper 2012, 238). Sydänlihassolussa on paljon sille ominaisia markkereita, joita hyödyntämällä sydänlihassolun rakenteiden muodostumista voidaan tarkkailla. Näitä rakenteita värjätään hyödyntäen vasta-aineita, jotka kiinnittyvät omaan antigeeniinsä. Sydänlihassolun värjäyksessä hyvin toimivia anti-geenejä ovat esimerkiksi sarkomeerirakenteen ohuiden filamenttien aktiini, ohuihin filamentteihin kiinnittyneet troponiinit, paksujen filamenttien myosiini ja kyt-kylevyjen aukkoliitoksien konneksiiniproteiinit. Troponiineista hyödynnetään usein troponiini-T:tä (cTnT), konneksiiniproteiineista käytetään usein konneksiini-43-proteiinia ja aktiinista sydänspesifistä α -aktiinia. Usein värjättävässä solumäärässä on muitakin soluja kuin sydänlihassoluja, yleensä fibroblasteja, jolloin näiden solujen värjääminen voi olla hyödyllistä paremman ja selkeämmän tuloksen saamiseksi. Fibroblastien värjäämiseen voidaan hyödyntää vasta-ainetta, joka kiinnittyy vimentiniin (Kawamura ym. 2016, 316). (Rajala ym. 2011, 7.)

4.2 Virtausytometria

Karakterisoinnissa kuten muissakin sydänlihassoluilla tehtävissä analyyseissa voidaan sydänlihassolujen tunnistamisessa hyödyntää virtausytometriä. Virtausytometria on tekniikka, jossa nestefaasissa olevat solut tai hiukkaset laskeaan ja lajitellaan niiden kulkiessa yksitellen pienen suppilon läpi. Näyte viritetään laserilla ja syntyvän emission intensiteetti detektoidaan laitteen optiikan avulla. Laitteen optiikkaan kuuluu valonlähde, linssijä ja analysoitavalle fluoresoivalle aineelle soveltuva häiriösuodatin. Solut luokitellaan niiden emission ja eteenpäin suuntautuvan (FSC) ja sivulle siroutuvan (SSC) valon perusteella. Saadut tulokset ilmoitetaan kuvaajina, joissa näkyy solujen sijoittuminen kaavioon niiden koon, rakenteen, pinnan molekyylien ja kompleksisuuden mukaan. Virtausytometrillä näytteen analysoiminen on nopeaa, sillä laitteen kapasiteetista riippuen solujen analysointinopeus on jopa 70 000 tapahtumaa sekunnissa. Tulokuvajissa kuvaajan x-akselille on merkitty eteenpäin suuntautuneen valon avulla havaitut solut ja y-akselille sivulle siroutuvan valon perusteella havaitut solut (O'Brien ym. 2012, 224). (Thermo Fisher Scientific n.d., How a flow...; Adan ym. 2017.)

Virtausytometrejä on kahden tyyppisiä, lajittelevia ja ei lajittelevia malleja. Lajittelevissa malleissa solut voidaan tunnistamisen ja kuvaajalle lajittelun lisäksi myös erotella analyysin aikana. Virtausytometrillä ajettavat solunäytteet voidaan myös leimata tai värjätä fluoresoivalla markkereilla, jotta voidaan tunnistaa tietty solupopulaatio sekä analysoida sitä tarkemmin. Käytetyimpiä fluoresoivia markkereita ovat FITC (fluorescein-isothiocyanate), PE (phycoerythrin) ja APC (allophycocyanin). (Adan ym. 2017, 163, 166–167)

5 SOLUJEN RIKASTAMINEN

Solujen rikastamisella tarkoitetaan solujen lajittelua solutyypin ja solun ominaisuuksien mukaan. Erottelemalla tutkittavasta solumäärästä pois muut kuin tutkitavat solut pystytään parantamaan ja optimoimaan tutkittavasta solutyypistä tehtävien analyysien tuloksia. Tällöin tutkimukset suoritetaan vain kohdesoluista ja muut solutyypit eivät häiritse analyysin tai jatkoviljelyn suorittamista. Näitä puhdistettuja soluja voidaan esimerkiksi käyttää solupohjaisten lääkkeiden kehittämisessä. Solujen rikastamiseen on kehitetty useita erilaisia menetelmiä. Käytettävää rikastusmenetelmää valitessa tulee huomioida menetelmien hyvät ja huonot puolet puhdistettavaa solunäytettä ajatellen. Rikastusmenetelmät voidaan jakaa solun pintaproteiinipohjaisiin menetelmiin, solun genomien muuntamiseen liittyviin menetelmiin ja muihin erottelumenetelmiin. (Amos ym. 2011, 26–28.)

5.1 Solujen rikastusmenetelmiä

Usein solujen rikastamiseen kannattaa valita menetelmä, jossa solun sisälle ei kajota, jotta solun rakenne pysyy muuttumattomana. Tällöin hyödynnetään usein solujen pintaproteiineja. Solujen pintaproteiinien käyttöön pohjautuvia rikastusmenetelmiä ovat adheesiopohjainen menetelmä, magneettinen menetelmä, FACS (fluorescence-activated cell sorting) ja komplementin vähennys -menetelmä. Adheesioon perustuvassa rikastusmenetelmässä solut kiinnittyvät pintaproteiinimarkkereilla eli ligandeilla päällystetylle pinnalle (Didar & Tabrizian 2010, 3053). Ligandit on valittu rikastettavien solujen ominaisuuksien mukaisesti. Menetelmässä soluja ei tarvitse esikäsitellä. Menetelmän etuja ovat nopeus ja edullisuus ja haittana pidetään menetelmän epäspesifisyyttä, sillä adheesioprosessiin liittyy usein monia eri adheesioproteiineja. (Amos ym. 2011, 27–31.)

Magneettisessa menetelmässä tutkitavat solut tai pois puhdistettavat solut leimataan vasta-aineeseen kiinnitettyllä magneettisella leimalla, joka kiinnittyy solujen pintaproteiineihin. Solut altistetaan magneettikentälle ja leimaamattomat solut karsiutuvat pois. Rikastustapaa kutsutaan negatiiviseksi selektioksi, kun pois puhdistettavat solut on leimattu magneettileimalla ja positiiviseksi selektioksi kun

kohdesolut on leimattu magneettileimalla. Magneettimenetelmän etuina on sen edullisuus ja yksinkertainen käyttö ja haittana riippuvuus saatavilla olevista vasta-aineista. (Amos ym. 2011, 29–30; Bio Legend – MojoSort 2020.)

Komplementin vähennys -menetelmässä käytetään aktivoituja plasmaproteiineja, jotka kiinnittyessään kohdesoluun luovat sen pinnalle huokosia aiheuttaen solukuoleman. Myöhemmin puhdistuksen aikana nämä huokoselliset solut pilkotaan ja pestään pois näytteestä. Menetelmän etuna on nopeus, edullisuus ja sen korkea rikastusaste, jopa 90-100 %. Menetelmän haittana on sen mahdollisuus vahingoittaa näytteen muita soluja. Yleisin käytetty solujen puhdistusmenetelmä on virtaussytometriaan perustuva FACS. Menetelmän suosio johtuu sen suuresta tarkkuudesta ja merkittävästä tehokkuudesta solujen rikastuksessa. Solujen rikastamisessa FACSilla käytetään fenotyypispesifisiä pintamarkkereita, joihin fluoresoivasti leimatut vasta-aineet kiinnittyvät. Solut altistetaan laserille, joka erottelee solut niiden fluoresoivasti leimatun pintaproteiinin läsnäolon tai puuttumisen perusteella. FACS-laitetta voidaan käyttää myös solun sisäisten fluoresoivien proteiinien tunnistamisessa. Menetelmän haittana on sen hitaus, korkea hinta ja riippuvuus saatavilla olevista vasta-aineista. (Dittel 2010, 1487; Amos ym. 2011, 27–29.)

Pintaproteiineihin perustuvissa menetelmissä rajoittavana tekijänä on usein riippuvuus saatavilla olevista vasta-aineista. Sen takia on kehitetty solujen rikastusmenetelmiä, jotka eivät ole vasta-aine riippuvaisia. Nämä menetelmät hyödyntävät rikastuksessa solun DNA:ta. Kaksi merkittävintä tapaa, jolla DNA:han perustuvaa rikastusta hyödynnetään ovat solun sisään kuljetettavat merkkiaineet tai solun tekeminen vastustuskykyiseksi selektioaineille. DNA:han perustuvia menetelmiä ovat virusmenetelmä, integraaseja ja transposoneita hyödyntävä menetelmä, homologinen rekombinaatio ja integraatiovapaat menetelmät. Yksinkertaisin tapa viedä haluttu geenisekvenssi soluun on hyödyntää virusvektoreita. Virusmenetelmässä virukseen insertoidaan haluttu kohdesolussa ilmennettävä geenisekvenssi, joka integroituu soluun virusvektorin läpäistessä solun solukalvon. Solu alkaa ilmentää soluun vietyä geenisekvenssiä, jonka perusteella solut voidaan lajitella käyttäen esimerkiksi FACSia tai lääkeresistenttiyttä. Virusmenetelmän etuna on sen tehokkuus ja haittana pysyvä sitoutuminen solun genomiin sekä kuljetettavien geenisekvenssien kokorajoitukset. (Amos ym. 2011, 31.)

Eräässä rikastusmenetelmässä hyödynnetään plasmideja, jotka koodaavat integraaseja tai transposoneita. Näiden tekniikoiden periaate on ilmentää entsyymiä, joka kykenee siirtämään geenisekvenssin määritelyihin kohtiin solun genomissa. Integraasia koodaavilla plasmideilla määritellyt kohdat sijaitsevat yleensä introneissa, jotka eivät osallistu transkriptioon, joten soluun siirretty geenisekvenssi ei häiritse transkriptiota. Geenisekvenssi on kuitenkin peruuttamattomasti integroitunut solun genomiin. Transposoneita koodaavilla plasmideilla siirretty geenisekvenssi ei integroidu solun genomiin vaan on poistettavissa solujen lajittelun jälkeen. Solujen lajittelussa hyödynnetään FACSia. (Amos ym. 2011, 31–32.)

Integraatiovapaisissa menetelmissä hyödynnetään esimerkiksi adenovirusgeenisekvenssin soluun viemisessä, sillä silloin geenisekvenssi ei integroidu solun genomiin. Lisäksi käytetään episomeja tai plasmideja, jotka siirretään solun sisään esimerkiksi elektroporaatiolla. Solun sisään päässeet plasmidit alkavat ilmentää haluttua geenisekvenssiä ennen kuin solu hajottaa sisään päässeet plasmidit. Näiden menetelmien etuna on ohimenevä reportterigeenin ilmentäminen ja haittoina heikko tehokkuus ja tekninen vaikeus. Homologisessa rekombinaatiossa luodaan geenisegmentti, joka sisältää geenisekvenssin ja siihen liittyvän reportterin, jotka ovat identtisiä tai homologisia solun sisällä olevan geenisekvenssin kanssa. Tämä valmistettu geenisegmentti siirretään alkion kantasolun (ES) sisään käyttäen elektroporaatiota. Solujen jakaantuessa homologiset alueet hajoavat, mikä johtaa siirtogeenien integroitumiseen genomiin. Homologisessa rekombinaatiossa voidaan hyödyntää myös bakteerien keinotekoisia kromosomeja ja sinkkisormi-nukleaaseja. Leimatut solut erotellaan hyödyntäen lääkeaineresistenssiä. Menetelmän etuna on reportterin luotettava ilmentyminen ja haittana tehoton integraatio solun sisään. (Amos ym. 2011, 32–33.)

Muita kehitettyjä rikastusmenetelmiä voidaan käyttää solujen jatkopuhdistuksessa puhtauden lisäämiseksi tai käsiteltäessä suuria näytemääriä esimerkiksi kudostekniikan tai soluterapian parissa. Muita rikastusmenetelmiä ovat sydänlihassoluspesifi mitokondrioiden värjäys, tiheyteen perustuva sentrifugointi, erotelu käyttäen laseria ja kohdistettu erottelu. Hattorin ym. (2010) tutkimuksen mukaan mitokondrioiden värjäyksessä hyödynnetään Nerstian-väriainetta, joka pää-

see kulkeutumaan mitokondrioon ja sieltä ulos. Menetelmässä värjätyt solut erotellaan esimerkiksi käyttäen FACSia. Menetelmän etuina on nopeus, geeniperimään integroimattomuus ja melkein sataprosenttinen saanto. Haittana on menetelmän validointi ainoastaan sydänlihassoluille. (Hattori ym. 2010.) Tiheyteen perustuvassa menetelmässä solut erotellaan toisistaan niiden koon ja tiheyden perusteella sentrifugoimalla näytteitä hiljaisella nopeudella. Menetelmä on nopea, helppo ja edullinen, mutta melko tehoton solujen rikastuksessa eikä sillä pysty erottelemaan samaan kokoluokkaan kuuluvia soluja. (Amos ym. 2011, 33.)

Laserilla tapahtuva erottelu, eli lasermikroleikkaus, on rikastustapa, jolla voidaan negatiivisen selektion avulla tuhota heterogeenisestä soluseoksesta ei fluoresoivat solut. Menetelmää voidaan hyödyntää autofluoresoivien solujen sekä fluoresoivalla markkerilla värjäytyneiden solujen hävittämisessä rikastuksen aikana. Kohdistetussa erottelussa esiastesoluja ohjataan kasvamaan kohti tiettyä fenotyyppiä puhtaamman populaation saamiseksi. Soluja ohjataan oikeaan suuntaan oikeanlaisilla viljelyolosuhteilla ja erilaistusprotokollilla, joilla pyritään lisäämään solujen spesifiä erilaistumista. (Amos ym. 2011, 34.)

5.2 Sydänlihassoluille käytettäviä rikastusmenetelmiä

iPS-soluista eri erilaistusmenetelmiä käyttäen erilaistetut sydänlihassolut eivät kasva täysin puhtaissa viljelmissä. Erilaistusmenetelmillä saatu sydänlihassolujen saanto vaihtelee alle kymmenestä prosentista 50-prosenttiin asti, mikä tarkoittaa, että viljelmissä on yleensä 50-90 % muita kuin sydänlihassoluja (Rajala ym. 2011, 4). Näitä muita soluja pyritään rikastamisella poistamaan, jotta sydänlihassoluista tehtävistä tutkimuksista saisi laadukkaampia tuloksia ja jotta soluja voidaan käyttää translationaalisen lääketieteen tutkimuksissa. (Amos ym. 2011, 27).

Perinteisesti sydänlihassoluja on rikastettu tiheyteen perustuvalla Percoll-rikastusmenetelmällä, jolloin sentrifugoiminen johtaa kolmesta jopa seitsenkertaiseen rikastukseen. Sykkiviä sydänlihassoluja voidaan myös mikroleikata niiden kasvatusalustalta, jolloin leikattu sydänlihassolupopulaatio voi sisältää jopa 70-prosenttisesti sydänlihassoluja (Rajala ym. 2011, 6–7). Geneettisesti sydänlihassoluja

voi rikastaa integroimalla sydänlihassoluissa esiintyviin geeneihin fluoresenssia ilmentäviä merkkiaineita tai geenejä, jotka muokkaavat solun lääkeresistentiksi. Useimmiten geenit integroidaan seuraavien promoottorien alaisuuteen: Nkx2-5, MYH6 (myosin heavy chain 6), MLC2V (myosin regulatory light chain 2) ja Isl1. Geneettisen fluoresoivan selektion yhdistäminen lääkeresistenttiin rikastukseen tuottaa jopa 99 %:n puhtaustuloksen. Geneettisen rikastuksen haittana sydänlihassoluilla on genomiin integroitumisen mahdollisuus sekä lisääntyneen tuumoriraktiivisuuden aiheuttaminen, jonka vuoksi tällä tavalla rikastettuja soluja ei voida hyödyntää kliinisessä käytössä. (Rajala ym. 2011, 6–7; BurrIDGE ym. 2012, 10.)

Pintaproteiineihin perustuvat rikastusmenetelmät ovat hyödyllisimpiä käyttää sydänlihassolujen rikastukseen, sillä ne eivät aiheuta muutoksia solun genomissa tai sisäisessä rakenteessa ja siten niitä voidaan käyttää myös kliinisesti. FACSia käytettäessä pystytään analysoimaan useiden pintaproteiinien fluoresoivia markkereita samanaikaisesti, mikä tekee analysoinnista käytännöllisempää. Sydänlihassolujen pintaproteiinit, joihin fluoresoiva vasta-aine usein kiinnitetään, ilmenevät spesifisesti vain sydänlihassoluissa. Näitä pintaproteiineja ovat muun muassa SIRPA (signal regulatory protein alpha), EMILIN2 (elastin microfibril interfacier 2), HCN4 (hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium and sodium channel 4) ja VCAM (vascular cell adhesion molecule 1). FACS-menetelmän ohella magneettierottelumenetelmät, joissa solut leimataan magneettihelmillä ovat rikastustehokkuudeltaan korkeita. Pintaproteiinirikastusmenetelmien ohella mitokondrioita värjäävä rikastusmenetelmä on rikastettavan solun genomiin integroitumaton ja siten turvallinen menetelmä solun muuttumattomuuden kannalta. Mitokondriomenetelmässä vaikuttaa mitokondrioiden ilmentymisen tiheys, joten menetelmällä ei voida analysoida viljelmien kehittyneimpiä kypsyttömiä sydänlihassoluja. Näiden menetelmien lisäksi esisydänsolujen erilaistumista tukemalla on onnistuttu parantamaan viljelytehokkuutta. (Amos ym. 2012, 27; BurrIDGE ym. 2012, 10.)

Useista rikastusmenetelmistä on valmistettu kaupallisia sovelluksia. Kaupallisia sovelluksia sydänlihassoluille sopivista rikastusmenetelmistä ovat esimerkiksi magneettiseen rikastamiseen perustuvat MACS[®] (Miltenyi Biotec) ja MojoSort[™] (Bio Legend) -magneettirikastustekniikat (Herron, Monteiro da Rocha & Camp-

bell 2017; Bio Legend – MojoSort 2020). Tiheyteen perustuvia kaupallisia menetelmiä ovat esimerkiksi Percoll® (GE Healthcare) ja SepMate™ (Stemcell) (Cytiva 2020; Stemcell 2020). Pintaproteiinien fluoresenssivärjäytymistä voidaan tarkastella esimerkiksi BD FACSAria™ III (BD Biosciences) -laitteella (BD Biosciences 2020, BD FACSAria™ III) .

6 TYÖN SUORITUS

Työssä valmistettiin yhteensä kuusi erää sydänlihassoluja, joista yksi erä valmistettiin käyttäen eri solulinjaa sen solujen paremman erilaistumiskyvyn vuoksi. Solut erilaistettiin sydänlihassoluiksi iPS-soluista. Erilaistuksen jälkeen solut rikastettiin käyttäen erillä 1, 2, 3 ja 6 MojoSort™-magneettirikastinta ja erillä 4 ja 5 MACS®-magneettirikastusmenetelmää. Rikastuksen jälkeen sydänlihassolujen määrää verrattiin ennen rikastusta otettuihin solunäytteisiin käyttämällä virtaus-sytometriä. Solujen vähäisen määrän takia solulinjan UTA.14803.WTpb kantasolujen pluripotenttius päätettiin tarkastaa 1., 2. ja 3. erän analyysien jälkeen. Solueristä viisi ja kuusi otettiin näytteitä ennen ja jälkeen rikastamisen, jotka viljelyn jälkeen immunovärjättiin, jotta voitiin tarkastella solujen morfologiaa.

Kaikkien työssä käytettyjen mediumien valmistajat, valmistustavat sekä erotuspuskurin valmistus löytyvät liitteistä (Liite 1). Immunovärjäyksissä käytettyjen värjäysreagenssien valmistukset löytyvät myös liitteistä (Liite 2).

6.1 Työssä käytetty laitteisto ja kaupalliset kitit

Tärkeimmät työssä käytetyt laitteet olivat mikroskoopit, magneettirikastimet ja virtaus-sytometri. Mikroskooppeja hyödynnettiin solujen tarkastelussa ja kuvaamisessa työn eri vaiheissa. Magneettirikastimilla rikastettiin tutkittavat soluerät ja virtaus-sytometriä käyttäen analysoitiin solueristä kerätyt näytteet. Taulukkoon 1 on koottu edellä mainittujen laitteiden tiedot.

TAULUKKO 1. Opinnäytetyössä käytetty laitteisto

Laite	Malli ja/tai valmistaja
valomikroskooppi	Nikon Eclipse TS100
fluoresenssimikroskooppi	Olympus IX51 fluorescence microscope
virtaus-sytometri	BD Accuri™ C6, BD Biosciences
MojoSort™-magneettirikastin	BioLegend
MACS®-magneettirikastin	MidiMACS™, Miltenyi Biotec

Työssä käytetty virtausytometri oli BD Accuri™ C6 (BD Biosciences), jolla voidaan analysoida 10 000 tapahtumaa sekunnissa. Näytekonsentraatiot voivat laitteella analysoidessa olla yli 5×10^7 solua/ml. Laite oli varusteltu kahdella laserilla (sininen ja punainen), kahdella sirontailmaisimella (FCS ja SSC) ja neljällä fluoressianturilla, joiden häiriösuodattimet oli optimoitu FITC:n, PE:n, PerCP-Cy5.5:n ja APC:n havaitsemiseksi. Laitteella pystytään analysoimaan näytehiukasia, joiden koko osuu 1- 40 μm välille. (Biomeditech n.d.)

Työssä käytettiin useita kaupallisia kittejä. MojoSort™:lla ja MACS®:lla tehtävien rikastuksien alussa solut valmisteltiin molempia menetelmiä varten samalla tavalla samojen kaupallisten kittien ohjeita noudattaen. Kummassakin analyysissä hyödynnettiin MACS®-menetelmälle kehitettyjä kittejä, sillä ne olivat Sydänryhmällä valmiina aiemman käytön vuoksi. Laitevalmistajan mukaan kitit soveltuvat myös solunäytteiden valmisteluun MojoSort™-magneettirikastimella rikastamista varten. Kantasolujen pluripotenttiuden tarkistamisessa hyödynnettiin RNA:n eristyksessä kaupallista kittiä. Työssä käytetyt kaupalliset kitit on koottu taulukkoon 2.

TAULUKKO 2. Kaupalliset kitit

Työn vaihe	Kitti ja valmistaja
solujen hajotus	Multi Tissue Dissociation Kit 3, Miltenyi Biotec
solujen rikastus	PCS-Derived Cardiomyocyte Isolation Kit, human, Miltenyi Biotec
RNA:n eristys	Monarch® Total RNA Miniprep Kit, New England Bio Labs
RNA:n käänntö cDNA:ksi	High capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific
solujen leimaus virtausytometriä varten	BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit, BD Sciences

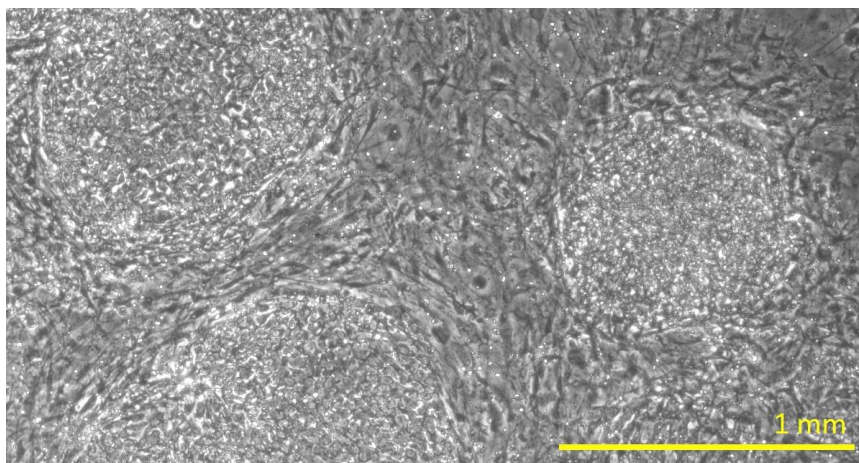
6.2 Työssä käytetty solulinja ja erilaistusmenetelmä

Työssä käytettiin kahta eri iPS-solulinjaa, UTA.14803.WTpb ja UTA.04602.WT, jotka kummatkin ovat kontrollilinjat. Kontrollilinjat ovat linjoja, jotka on valmistettu terveiden ihmisten solunäytteistä Tampereen yliopiston Sydänryhmässä. UTA.14803.WTpb-solulinja on peräisin verisoluista, joihin on siirretty erilaistumisen aloittavat transkriptiotekijät hyödyntäen plasmideja. UTA.04602.WT-solulinja on peräisin kudoksenäytteestä, jonka fibroblastisoluihin transkriptiotekijät on siirretty hyödyntäen retroviruksia. Kummatkin solulinjat on linjojen valmistusaikana karakterisoitu ja todettu pluripotentiksi iPS-solulinjoiksi. Solulinjoja on säilytetty sulattamiseen asti kaasufaasipakastimessa -196 °C:ssa. (Lappi 2019.)

Soluja kasvatettiin ennen erilaistamisen aloitusta KSR-mediumissa (Liite 1) hiiren alkion fibroblastien (MEF, mouse embryonic fibroblasts) päällä, jossa kantasolut muodostivat kolonioita. Solulinjojen solut erilaistettiin sydänlihassoluiksi käyttäen HEB-erilaistusmenetelmää, joka on Sydänryhmän tarpeisiin muokattu versio Karakikes ym. (2014) julkaistusta erilaistusmenetelmästä. Menetelmässä solut kasvavat ja erilaistuvat suspensiossa, ja niille syötetään mediumien mukana pienmolekyylejä, jotka käynnistävät erilaistumisen ja edesauttavat sitä.

6.3 Solujen kasvatus ja erilaistus

Solut kasvoivat erilaistuksen aloittamiseen asti MEF-solujen päällä 6-kuoppalevyillä KSR-mediumissa. Kuvassa 2 on nähtävissä KSR-mediumissa kasvaneet linjan UTA.14803.WTpb kantasolukoloniat ennen niiden irrottamista kaivon pohjasta. Nähtävissä on kolme kantasolukoloniaa MEF-solujen ympäröiminä.



KUVA 2. Kantasolukoloniat

Solulinjojen erilaistukset aloitettiin taulukon 3 mukaisesti noudattaen Sydänryhmän käyttöön muokattua HEB-erilaistus -työohjetta. Erilaistuksen aloituksessa MEF-solukerros poistettiin ja solut irrotettiin Versene-entsyymillä (Gibco®) kasvatuskupalevytä ja siirrettiin siirrostusmediumissa low-attachment-6-kupalevyille. Siirrostuksessa käytetty siirrostusmediumi koostui mTeSR™ 1 -mediumista (Liite 1) ja pienmolekyylillä blebbistatiinista (5 µM), joka inhiboi myosiini-aktiinisäikeiden supistumista ja näin ehkäisee ohjelmoitua solukuolemaa (Karakikes ym. 2014).

TAULUKKO 3. Solulinjojen erilaistuksien aloituspäivämäärät ja rikastuspäivämäärät

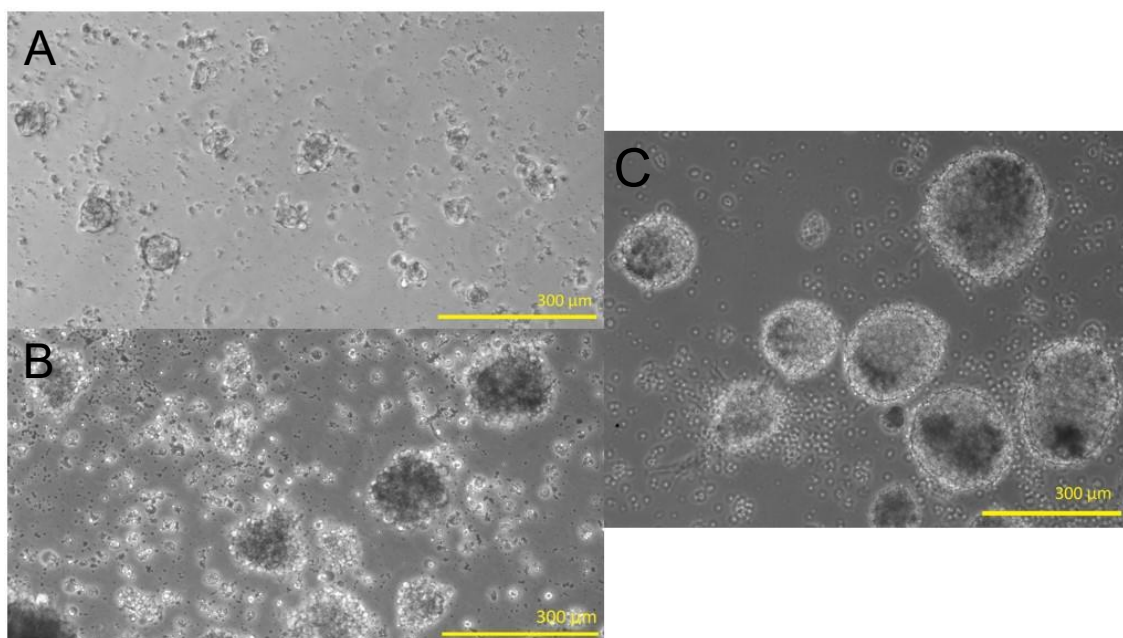
Erilaistuksen aloituspäivämäärä	Solulinja ja siirrostusluku (engl. passage)	Erä	Rikastuspäivämäärä
30.12.2019	UTA.14803.WTpb p. 20	1	23.01.2020
13.01.2020	UTA.14803.WTpb p. 22	2	06.02.2020
20.01.2020	UTA.14803.WTpb p. 23	3	17.02.2020
27.01.2020	UTA.14803.WTpb p. 24	4	20.02.2020
10.02.2020	UTA.14803.WTpb p. 26	5	27.02.2020
17.02.2020	UTA.04602.WT p.59	6	05.03.2020

Seuraavana päivänä soluille vaihdettiin erilaistusmediumi (Liite 1), joka sisälsi RPMI-mediumia, insuliinitonta B27-supplementtia ja penisilliini/streptomysiini -antibioottiliuosta (Pen/Strep). Mediumiin oli lisätty seuraavia pienmolekyylejä: as-

korbiinihappoa (5 µg/ml), BMP4:ää (10 ng/ml) ja activin A:ta (25 ng/ml). Kolmantena erilaistuksen päivänä soluille vaihdettiin erilaistusmediumi, joka sisälsi askorbiinihappoa (5 µg/ml).

Neljäntenä erilaistuksen päivänä soluille vaihdettiin erilaistusmediumi, johon oli lisätty IWP-4 pienmolekyyliä (2,5 µM). Kahdeksantena päivänä soluille vaihdettiin normaali insuliiniton erilaistusmediumi. Yhdennestätoista päivästä eteenpäin soluille vaihdettiin joka toinen päivä erilaistusmediumi, jossa insuliiniton B27-supplementti oli korvattu insuliinillisella. Soluerät olivat valmiita rikastukseen, kun solut olivat saavuttaneet 25 päivän iän. Muista eristä poiketen soluerä 3 rikastettiin kolme päivää myöhemmin kuin muut erät. Soluerien rikastuspäivämäärät ovat nähtävillä edellä mainitussa taulukossa 3.

Solujen erilaistuksen aikana soluerästä kolme (UTA.14803.WT p. 23) otettiin kuvia erilaistuksen eri vaiheista. Kuvat vaiheista on otettu mikroskoopilla (Nikon Eclipse TS100) erilaistuksen päivinä 1, 9 ja 28. Edellä mainitut kuvat on esitetty kuvassa 3.



KUVA 3. Erilaistuksen vaiheet

Kuvasta 3 nähdään solujen kasvu erilaistuksen aikana. Kuva 3A on otettu erilaistuksen ensimmäisenä päivänä, kun solut on siirretty low-attachment-6-kuoppalevyille. Tässä vaiheessa solukoloniat ovat osittain hajonneet siirrosta ja ovat siksi

pieniä. Kuva 3B on otettu yhdeksäntenä päivänä erilaistuksen aloittamisessa. Kuvassa solut ovat erilaistumisvaiheen loppupuolella ja kuvasta nähdään hyvin soluryppäiden kasvu. Kuva 3C on otettu juuri ennen soluerän rikastamista, jolloin solut olivat 28 päivän ikäisiä. Kuvassa soluryppäät ovat selkeästi suurempia ja niiden reuna on tarkkarajaisempi.

6.4 Soluerien rikastaminen MojoSort™-magneettirikastimella

MojoSort™-magneettirikastinta käytettiin soluerien 1, 2, 3 ja 6 rikastamisessa. Ensimmäiset kolme rikastusta tehtiin samasta solulinjasta ja kuudennen erän soluissa käytettiin eri solulinjaa. Erien 1, 2 ja 3 solut eivät sykkineet ennen rikastuksen alkua, mutta kuudennen erän solut sykkivät rikastuksen alussa.

Rikastus aloitettiin keräämällä solususpensiossa kasvaneet sydänlihassolut 4-kuoppalevyn yhteen kaivoon mahdollisimman pienessä mediumtilavuudessa. Kaivoon kerätyt solut pestiin kolmesti käyttäen fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (DPBS, Lonza). Pesujen jälkeen soluryppäät hajotettiin yksisoluisiksi kaupallisella Multi Tissue Dissociation Kit 3:lla (Miltenyi Biotec n.d. Dissociation...). Solujen päälle pipetoitiin 360 µl puskuri X:ää ja 40 µl entsyymi T:tä ja solut vietiin inkubaattoriin (37 °C) kymmenen minuutin ajaksi. Inkuboinnin jälkeen solujen päälle lisättiin 400 µl lämmitettyä EB 20 % -mediumia (Liite 1) ja soluaggregaatit hajotettiin yksisoluisiksi vähäisellä pipetoinnilla.

Hajotuksen jälkeen solususpensio suodatettiin 70 µm Pre-separation suodatimen (Miltenyi Biotec) läpi 15 ml:n putkeen (Sarstedt). Suodatinta kostutettiin 200 µl:lla EB 20 % -mediumia, jotta lopputilavuudeksi suodatuksen jälkeen saatiin 1 ml. Suodatuksen jälkeen näytteen solumäärä laskettiin käyttäen Neubauer-laskentakammiota. Solujen laskemisen jälkeen virtausytometria varten ennen rikastusta otettavat näytteet kerättiin 15 ml:n putkiin (Sarstedt). Putkiin pipetoitiin solususpensiota siten, että solumäärä yhtä putkea kohden oli 200 000 solua/putki. Putket vietiin jääkaappiin 4 °C:een odottamaan näytteiden jatkokäsittelyä. Soluerien lasketut solumäärät ja valmistettujen virtausytometrianäytteiden määrät ilmenevät taulukosta 4.

TAULUKKO 4. Solumäärät ja virtausytometrianäytteet ennen rikastusta

Soluerä	Solulinja	Laskettu solumäärä (solua/ml)	Valmistetut näytteet
1	UTA.14803.WTpb	8,05 milj.	3 + 1 neg.kontr.
2	UTA.14803.WTpb	1,065 milj.	2
3	UTA.14803.WTpb	1,68 milj.	2 + 1 neg.kontr.
6	UTA.04602.WT	0,685 milj.	1 + 1 neg.kontr.

Jäljelle jäänyt solususpensio jatkokäsiteltiin kaupallisen PCS-Derived Cardiomyocyte Isolation Kit, human (MiltenyiBiotecs) -kitin ohjeen mukaisesti (Miltenyi Biotec n.d. PCS-derived...). Ensin solususpensio sentrifugoitiin 200 g:ssä viiden minuutin ajan, jonka jälkeen supernatantti poistettiin ja solut suspensoitiin 80 µl:aan itse valmistettua erotuspuskuria (Liite 1). Puskurin lisäksi putkeen lisättiin 20 µl Non-Cardiomyocyte Depletion Cocktailia ja putkea inkuboitiin jääkaapissa 4 °C:ssa viiden minuutin ajan. Inkuboinnin jälkeen solut pestiin 1 ml:lla erotuspuskuria ja sentrifugoitiin uudestaan 200 g:ssä viiden minuutin ajan. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti poistettiin ja solut suspensoitiin 80 µl:aan erotuspuskuria ja 20 µl:aan Anti-Biotin MicroBeads -liuosta. Solususpensio siirrettiin pienempään pyöreäpohjaiseen Falcon®-putkeen, joka oli MojoSort™-magneettiin sopiva. Soluputkea inkuboitiin jääkaapissa 4 °C:ssa kymmenen minuutin ajan.

Ensimmäisen soluerän solujen suspensointi erotuspuskuriin ei onnistunut, sillä solumassa ei sentrifugoinnin jäljiltä hajonnut enää yksisolaiseksi. Hajoamattomuudesta johtuen jäljelle jääneet solut suodatettiin uudestaan 70 µm suodattimen läpi ja protokolla suoritettiin kokonaisuudessaan uudestaan käyttäen pe-suissa erotuspuskurin sijasta DPBS:ää, jolloin samankaltaisia ongelmia ei enää ilmennyt. Edellä mainitussa taulukossa 4 ilmoitettu ensimmäisen erän solumäärä on laskettu näiden ongelmien jälkeen. Muilla solulinjoilla erotuspuskurin käytössä ei ilmennyt ongelmia.

Inkuboinnin jälkeen solujen magneettierottelu suoritettiin MojoSort™ Streptavidin Nanobeads Protocol - Negative Selection -ohjeen mukaan työohjeen kohdasta 10 alkaen (Bio Legend 2020). Putkeen lisättiin 2,5 ml erotuspuskuria ja putki asetettiin MojoSort™-magneettiin viideksi minuutiksi. Viiden minuutin kuluttua pohjalle kertynyt solususpensio pipetoitiin pois magneetissa olevasta putkesta 15

ml:n putkeen (Sarstedt). Pipetoinnin jälkeen putki nostettiin pois magneetista ja edelliset vaiheet toistettiin kahdesti. Kuvassa 4 on esitetty MojoSort™-magneetti soluputkineen rikastuksen aikana. Kuudennen soluerän analysoinnin yhteydessä myös rikastusputkeen jääneet solut kerättiin erotuspuskuriin ja käsiteltiin kuten kohdesolut.



KUVA 4. Magneettierottelu käyttäen MojoSort™-magneettirikastinta

Kun erottelu oli tehty, 15 ml:n putkeen (Sarstedt) kerätty solususpensio sentrifugoitiin 200 g:ssä viiden minuutin ajan. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti kerättiin pois ja solut suspensoitiin 100 µl:aan EB 20 % -mediumia (soluerä 1 suspensoitiin 200 µl:aan). Solususpension solumäärä laskettiin käyttäen Neubauer-laskentakammiota. Lasketuista näytteistä kerättiin rikastuksen jälkeiset virtausytometrianäytteet, joiden tavoitesolumäärä oli 200 000 solua/putki. Virtausytometrianäytteet vietiin jääkaappiin 4 °C:een odottamaan näytteiden jatkokäsittelyä. Solueristä lasketut solumäärät ja virtausytometrille kerättyjen näytteiden lukumäärät selviävät taulukosta 5.

TAULUKKO 5. Solumäärät ja virtausytometrianäytteet rikastuksen jälkeen

Soluerä	Solulinja	Laskettu solumäärä (solua/100 µl)	Valmistetut näyt- teet
1	UTA.14803.WTpb	704 000 solua/200 µl	3 + 1 neg.kontr.
2	UTA.14803.WTpb	43 000	2
3	UTA.14803.WTpb	1000	1
6a	UTA.04602.WT	65 500	1
6b	UTA.04602.WT (putkeen jääneet solut)	42 000	1

Rikastuksen jälkeen lasketut solumäärät olivat ensimmäisen erän jälkeen niin alhaisia, että näytteet hyödynnettiin suoraan näytteiksi virtausytometrille, kuten taulukosta 5 nähdään. Soluerän kaksi näytteet jaettiin vähäisestä solumäärästä huolimatta kahdeksi virtausytometrianäytteeksi. Soluja ei myöskään niiden määrän takia riittänyt viljeltäväksi immunofluoresenssivärjäyksiä varten. Koska ensimmäisen, toisen ja kolmannen erän solut eivät sykkineet rikastuksen alussa, eivätkä solumäärät rikastuksen jälkeen olleet suuria, solulinjan kantasolujen pluripotentiin varmistettiin seuraavasta kasvussa olevasta linjan UTA.14803.WTpb p.27 kantasoluerästä.

Kuudennen erän solut erilaistuivat sydänlihassoluiksi hyvin, mutta niitä oli erilaistuksen aikana kuollut, joten solumäärät jäivät alusta lähtien vähäisiksi. Kuudenesta erästä kerättiin kuitenkin solumäärien laskemisen jälkeen ennen rikastusta solunäyte (20 µl) ja rikastuksen jälkeen solunäyte (40 µl). Kumpikin solunäyte viljeltiin omaan kaivoonsa 4-kuoppalevyille. Kaivot päällystettiin 0,1-prosenttisella gelatiinilla tunnin ajan ennen viljelyä. Kaivoihin lisättiin solususpension päälle 750 µl lämmitettyä EB 20% -mediumia ja kuoppalevy siirrettiin inkubaattoriin, jotta solut kiinnittyisivät kasvualustaansa. Kuudennen erän soluista otettiin kuvia valomikroskoopilla ennen värjäyksen aloittamista.

6.5 UTA.14803.WTpb-solulinjan pluripotentiuden tarkastus

Koska solulinjan UTA.14803.WTpb solut eivät erilaistuneet kunnolla sydänsoluiksi ja rikastettujen sydänsolujen määrä oli erittäin vähäinen, linjan kantasolujen

pluripotenttius tarkastettiin. Tarkastusta varten UTA.14803.WTpb p.27 -kantasolulinjasta eristettiin RNA:ta, joka käännettiin cDNA:ksi, monistettiin PCR:llä ja analysoitiin agarosigeelielektroforeesilla.

RNA-näyte kerättiin KSR-mediumissa kasvaneista tutkittavan linjan kantasoluista kaupallisen Monarch® Total RNA Miniprep Kit (New England Bio Labs) -kitin ohjeen mukaan (New England Bio Labs 2018). Eristetyn RNA:n pitoisuus näytteessä mitattiin käyttäen NanoDrop™-spektrofotometriä (Thermo Fisher Scientific). RNA:n pitoisuudeksi näytteessä saatiin 299,7 µg/µl. Näyte säilytettiin -80 °C:ssa cDNA:n valmistukseen asti.

RNA:n kääntöä cDNA:ksi varten valmistettiin Master Mix-reaktioseos sekä negatiivinen kontrolli, johon ei lisätty käänteiskopioijaentsyymiä. Master Mix:n ja negatiivisen kontrollin komponentit on ilmoitettu taulukossa 6.

TAULUKKO 6. Master Mix:n valmistus yhdelle näytteelle

Reagenssi	Master Mix (µl)	Master Mix Negatiivinen kontrolli (µl)
10x RT puskuri	2	2
25x dNTP mix	0,8	0,8
10x alukkeet	2	2
käänteiskopioijaentsyymi	1	0
RNAasi inhibiittori	0,5	0,5
H ₂ O	3,7	4,7

RNA:n kääntö cDNA:ksi tehtiin kaupallisen High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) -kitin ohjeiden mukaisesti (Thermo Fisher Scientific n.d. High...). Näytekuoppaan pipetoitiin 10 µl Master Mix-reaktioseosta ja 10 µl RNA-näytteen ja veden seosta. Näytteen lisäksi ajettiin negatiivinen kontrolli ja vesinäyte, johon pipetoitiin näytteen sijasta ainoastaan vettä. Ajossa käytetty lämpötilaohjelma on esitetty taulukossa 7.

TAULUKKO 7. cDNA:n valmistuksessa käytetty lämpötilaohjelma

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

Valmistunutta cDNA-näytettä säilytettiin qPCR-ajoon asti pakastimessa -20 °C:ssa. Näytteestä haluttiin tutkia taulukossa 8 esitetyt endogeenit, joita pluripotentin solun tulisi ilmentää.

TAULUKKO 8. Näytteestä tutkittavat endogeenit

Geeni
Sox2
Nanog
Oct3/4
c-myc
Rex1
GADPH
β-actin

qPCR-ajoa varten jokaiselle tutkittavalle geenille valmistettiin oma Master Mix. Master Mix:ssä käytetyt komponentit on ilmoitettu taulukossa 9. Valmistuksessa käytettiin Thermo Fisher Scientificin yksittäisiä reagensseja.

TAULUKKO 9. Master Mix:n valmistus yhdelle näytteelle PCR:ää varten

Reagenssi	Master Mix (µl)
10x dynazyme puskuri	2,5
dNTP Mix (10 mM)	0,5
aluke F (5 µM)	2,5
aluke R (5 µM)	2,5
Dynazyme II	0,25
MgCl (25 mM)	0,5
DMSO	1,25
H ₂ O	14

Näytteistä haluttiin valmistaa kaksi erää. Ensimmäistä erää varten jokaiselle tutkittavaa geenille valmistettiin näyte, johon pipetoitiin 24 µl Master Mix:ä ja 1 µl cDNA-näytettä. Toista erää varten cDNA:n näytepitoisuus nostettiin 1,5 µl:aan. Geeninäytteiden lisäksi valmistettiin kumpaakin erää kohden negatiivinen kontrolli ja vesinäyte, joihin pipetoitiin näytteeksi cDNA:n ajon negatiivinen kontrolli ja vesinäyte. Näytteet sekoitettiin ja sentrifugoitiin ennen ajoa analyysiä häiritsevien ilmakuplien poistamiseksi.

PCR-ajossa käytetty lämpötilaohjelma on esitetty taulukossa 10. Tutkittavien geenien alukkeet tarvitsevat toimiakseen eri lämpötiloja sitoutumista varten. Nanog ja b-actin toimivat 45 °C:n lämpötilassa, Rex1 ja GAPDH toimivat 55 °C:n lämpötilassa ja Oct3/4, Sox2 ja c-myc tarvitsevat 60 °C:n lämpötilan. Tarvittavat lämpötilat huomioitiin käytettävässä ajo-ohjelmassa ja ajolaitteen valinnassa. Ajossa käytetty PCR-laite oli Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler.

TAULUKKO 10. Lämpötilaohjelma qPCR-ajossa

Lämpötila	94 °C	94 °C	45-60 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Aika	2 min	30 s	30 s	30 s	5 min	pito
Syklit	1	35			1	-

Ajon jälkeen näytteisiin pipetoitiin 6x DNA Loading Dye -väriä (Thermo Fisher Scientific) ja näytteet pipetoitiin valmistetun 2-prosenttisen geelin kaivoihin elektroforeesia varten. Näytteiden lisäksi yhteen geelin kaivoista pipetoitiin 50pb GeneRuler 50x DNA Ladder:ia (Thermo Fisher Scientific). Näytteiden ajo tapahtui 1x TBE-puskurissa (Medicago). Ajon loputtua geeli kuvattiin käyttäen Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR System -laitetta.

6.6 Soluerien rikastaminen MACS[®]-magneettirikastimella

MACS[®]-magneettirikastinta käytettiin soluerien 4 ja 5 rikastamiseen. Kumpikaan soluerä ei sykkinyt rikastuksen alussa. Tarkoituksena oli analysoida vielä seitsemäs erä soluja, jotka olisivat olleet samaa linjaa erän 6 solujen kanssa, ja näin ollen oletettavasti sykkiviä. Aluksi kantasolujen kasvatuksessa tarvittavat MEF-

solut olivat huonoa erää, joten seitsemättä linjaa varten kasvatetut solut kuolivat ja lopulta seitsemännen erän analysoinnin esti koronapandemia.

Erien 4 ja 5 solujen valmistelu rikastamista varten suoritettiin samalla tavalla kuin MojoSort™:a varten tulevien näytteiden valmistelu. Työ suoritettiin samoin aina Anti-Biotin MicroBeads -liuoksen lisäämisen jälkeiseen inkubointiin asti. Ennen rikastamista lasketut solumäärät ja virtaussytometrille kerättyjen näytteiden lukumäärä ilmoitetaan taulukossa 11.

TAULUKKO 11. Solumäärät ja virtaussytometrianäytteet ennen rikastusta

Soluerä	Solulinja	Laskettu solumäärä (solua/ml)	Valmistetut näytteet
4	UTA.14803.WTpb	7,22 milj.	3 + 1 neg.kontr.
5	UTA.14803.WTpb	2,57 milj.	3 + 1 neg.kontr.

Inkuboinnin jälkeen näyteputken tilavuus täydennettiin 500 µl:aan lisäämällä erotuspuskuria 400 µl. Magneettierottelu suoritettiin PCS-Derived Cardiomyocyte Isolation Kit, human -kitin ohjeen mukaisesti (Miltenyi Biotec n.d. PCS-derived...). Aluksi magneetti kiinnitettiin telineeseensä ja magneettiin kiinnitettiin LS Column -kolonni (Miltenyi Biotec), jossa rikastuminen tapahtuu. Kolonnin alle sijoitettiin 15 ml:n keräysputki (Sarstedt), johon sydänlihassolut kerättiin. Käytetty välineistö on esitetty kuvassa 5.



KUVA 5. Magneettierottelu käyttäen MACS®-magneettirikastinta

Magneettiin kiinnitetty kolonni huuhdeltiin 3 ml:lla erotuspuskuria, jonka jälkeen solususpensio pipetoitiin kolonniin. Kolonnin valuttua tyhjäksi, erottuminen toistettiin lisäämällä kolonniin 3 ml erotuspuskuria. Erotuspuskurin lisääminen toistettiin yhteensä kolmesti. Rikastuksen jälkeen 15 ml:n putkeen (Sarstedt) kerätyt sydänlihassolut sentrifugoitiin 200 g:ssä viiden minuutin ajan, jonka jälkeen supernatantti poistettiin ja solut suspensoitiin 1 ml:aan lämmitettyä EB 20 % -mediumia. Viidennestä soluerästä kerättiin talteen myös erotuskolonniin jääneet solut. Erotuskolonni irrotettiin magneetista ja sijoitettiin uuteen 15 ml:n putkeen (Sarstedt), johon solut kerättiin. Kolonniin lisättiin 5 ml erotuspuskuria ja solut työnnettiin paineella kitin mukana tulevan ruiskuosan avulla putkeen. Nämä solut sentrifugoitiin ja käsiteltiin kuten kohdesolut.

Rikastettujen näytteiden solumäärät laskettiin käyttäen Neubauer-laskentakammiota. Lasketuista näytteistä kerättiin virtaussytometrianäytteet, joiden tavoiteso-

lumäärä oli 200 000 solua/putki. Virtaussytometrianäytteet vietiin keräämisen jälkeen 4 °C:een odottamaan jatkokäsittelyä. Lasketut solumäärät ja virtaussytometrianäytteiden lukumäärä on esitetty taulukossa 12.

TAULUKKO 12. Solumäärät ja virtaussytometrianäytteet rikastuksen jälkeen

Soluerä	Solulinja	Laskettu solumäärä (solua/ml)	Valmistetut näytteet
4	UTA.14803.WTpb	20 000	1
5a	UTA.14803.WTpb	250 000	1
5b	UTA.14803.WTpb (kolonniin jääneet solut)	700 000	1

Kuten taulukosta 12 huomataan, solumäärät olivat melko alhaisia rikastuksen jälkeen suuresta alun solumäärästä huolimatta. Alhaisen solumäärän takia näytteet hyödynnettiin sellaisenaan näytteiksi virtaussytometrille. Kolonniin jääneitä soluja ei jaettu useampaan näyteputkeen, jotta saatiin mahdollisimman kokonaisvaltainen kuva kolonniin jääneiden solujen laadusta ja näytteen ajaminen kokonaisuudessaan oli myös käytetylle virtaussytometrille mahdollista. Näytteistä ei myöskään riittänyt soluja jatkoviljeltäväksi enää rikastuksen jälkeen immunofluoresenssivärjäyksiä varten. Rikastuksien jälkeisten alhaisien solumäärien takia haluttiin tarkastella linjan UTA.14803.WTpb sydänlihassolujen lukumäärää visuaalisesti immunofluoresenssivärjäyksellä.

Viidennestä soluerästä kerättiin ennen rikastusta jatkoviljelynäytteet immunofluoresenssivärjäystä varten. Solumäärän laskemisen jälkeen solususpensiota pipe-toitiin 20 µl/kaivo kolmeen 4-kuoppalevyn kaivoon. Kaivot päällystettiin 0,1 %:lla gelatiinilla tunnin ajan ennen viljelyä. Kaivoihin lisättiin solususpension päälle 750 µl lämmitettyä EB 20 % -mediumia ja kuoppalevy siirrettiin inkubaattoriin, jotta solut kiinnittyvät kasvualustaansa.

6.7 Virtaussytometrianäytteiden käsittely ja analysointi

Näytteiden keräämisen jälkeen 4 °C:ssa säilytyksessä olleet virtaussytometrianäytteet käsiteltiin kaupallisen Fixation/Permeabilization Kit (BD Cytotfix/Cytoperm™) -kitin ohjetta mukailten (BD Biosciences n.d.). Näytteisiin lisättiin 1 ml DPBS:ää ja solususpensio sentrifugoitiin 1900 rpm:ssä kahden minuutin ajan, jotta mediumi saatiin poistettua näytteistä. Sentrifugoinnissa syntynyt supernatantti poistettiin ja näyteputkiin lisättiin 250 µl kitin mukana tullutta Fixation/Permeabilization -liuosta, jonka avulla näytteen solujen solukalvo saatiin läpäiseväksi. Lisäyksen jälkeen näytteet vorteksoitiin lyhyesti ja pidettiin kahdenkymmenen minuutin ajan 4 °C:ssa.

Inkuboinnin jälkeen näytteet sentrifugoitiin 1900 rpm:ssä kahden minuutin ajan ja syntynyt supernatantti kerättiin jätteeseen. Seuraavaksi solunäytteet pestiin kahdesti lisäämällä 500 µl kitin mukana tullutta Perm/Wash -puskuria. Ensimmäistä pesua inkuboitiin viiden minuutin ajan jäällä. Pesujen jälkeen sentrifugoiduista (1900 rpm, 2 min) näytteistä poistettiin supernatantti jätteeseen ja tilalle pipetoitiin 100 µl Perm/Wash -puskuria ja 5 µl PE Mouse Anti-Cardiac Troponin T (BD Pharmingen™) -antigeeniä, joka kiinnittyy sydänlihassolujen sarkomeerirakenteeseen. Antigeenia ei lisätty negatiivisiin kontrollinäytteisiin. Antigeenin lisäämisen jälkeen näytteitä inkuboitiin neljänkymmenen minuutin ajan huoneenlämmössä valolta suojattuna.

Ensimmäisen soluerän virtaussytometrianäytteitä inkuboitiin antigeeniliuoksessa yön yli, sillä antigeenia voitiin lisätä näytteisiin vain puolet suositellusta (5 µl) määrästä reagenssin vähyden vuoksi. Muiden erien virtaussytometrianäytteet käsiteltiin edellä mainitun kaltaisesti.

Inkuboinnin jälkeen näytteet pestiin lisäämällä 500 µl Perm/Wash -puskuria solususpension päälle, jonka jälkeen näytteet vorteksoitiin ja sentrifugoitiin 1900 rpm:ssä kahden minuutin ajan. Pesu suoritettiin kahdesti. Pesujen jälkeen supernatantti poistettiin jätteeseen ja solut suspensoitiin 200 µl:aan Perm/Wash -puskuria ja siirrettiin pienempiin pyöreäpohjaisiin Falcon®-putkiin, joista näytteen imeytyminen virtaussytometille tapahtui. Näyteputket säilytettiin valolta suojattuna jääkaapissa 4 °C:ssa näytteiden virtaussytometrillä analysointiin asti.

Näytteiden solut, poissulkien negatiiviset kontrollit, oli leimattu troponiini-T -antigeenillä, johon oli kiinnitetty R-phycoerythrin-proteiinikompleksi (PE). Proteiini-kompleksin emissio tapahtuu aallonpituudella 578 nm (Thermo Fisher Scientific n.d. R-phycoerythrin (R-PE)). Virtausytometrin (BD Accuri C6) ajo-ohjelmaan säädettiin kanava, jolla näytteet detektoitiin sekä ajonopeus ja ajon lopetuskohta valittiin. Näytteet ajettiin hitaalla nopeudella, jotta laite ehtii varmasti detektoidaan kaikki solut. Kanavaksi säädettiin PE ja ajon lopetuskohdaksi määritettiin tavoitetapahtumamäärä kunkin näytteen solupitoisuuden mukaan.

6.8 Immunofluoresenssinäytteiden värjääminen ja analysointi

Immunofluoresenssinäytteitä saatiin lopulta vain solueristä 5 ja 6. Viidennestä erästä oli kolme näytekaivoa ja kuudennesta erästä kaksi. Jatkoviljellyt solut otettiin pois inkubaattorista kahden ja neljän päivän kasvatuksien jälkeen ja kiinnitettiin kuoppien pohjiin ensin pesemällä kaivot kahdesti viiden minuutin ajan DPBS:llä ja sitten lisäämällä kuoppiin 4 %:sta paraformaldehydi -liuosta (PFA, Sigma-Aldrich) siten, että kaivojen pohja peittyi. PFA-liuoksen annettiin vaikuttaa 20 minuutin ajan, jonka jälkeen kaivot pestiin kahdesti viiden minuutin ajan DPBS:llä.

Pesujen jälkeen kaivoihin lisättiin blokkausliuos (engl. blocking) (Liite 2). Blokkausliuosta lisättiin kaivoihin 500 µl ja sen annettiin vaikuttaa huoneenlämmössä 45 minuutin ajan. Blokkauksen jälkeen solut pestiin pesuliuos 1:llä (Liite 2). Pesun jälkeen kaivoihin pipetoitiin 150 µl:aa primäärivasta-aineliuoksia, jotka oli valmistettu edellisen kaltaiseen pesuliuokseen. Näytteitä inkuboitiin primäärivasta-aineliuoksessa jääkaapissa 4 °C:ssa yön yli.

Värjäyksessä käytettiin primäärivasta-aineina taulukkoon 13 merkittyjä vasta-aineita. Troponiini-T -vasta-ainetta lisättiin jokaiseen viidestä näytekaivosta. Vimentiniä, α -aktiinia ja konneksiini-43:ta lisättiin kutakin vain yhteen viidennen erän kolmesta kaivoista. Vimentiniä lisättiin kumpaankin kuudennen erän näytekaivoon.

TAULUKKO 13. Primäärivasta-aineet

Primäärivasta-aine	Valmistaja
vuohessa tuotettu Troponiini-T (1:1500)	Abcam
hiiressä tuotettu α -aktiini (1:1500)	Sigma
kanissa tuotettu konneksiini-43 (1:1000)	Sigma
hiiressä tuotettu vimentiini (1:100)	Abcam

Seuraavana päivänä kaivot pestiin kolmesti viiden minuutin ajan pesuliuos 2:lla (Liite 2). Pesun jälkeen kaivoihin pipetoitiin sekundäärivasta-aineliuokset, jotka oli valmistettu edellisen kaltaiseen pesuliuokseen. Näytekaivoja inkuboitiin pimeässä huoneenlämmössä tunnin ajan. Käytetyt sekundäärivasta-aineet on esitetty taulukossa 14. Sekundäärivasta-aineena troponiini-T:lle toimi anti-vuohi-vasta-aine, α -aktiinille ja vimentiinille anti-hiiri-vasta-aine ja konneksiini-43:lle anti-kani-vasta-aine.

TAULUKKO 14. Sekundäärivasta-aineet

Sekundäärivasta-aine	Valmistaja
aasissa tuotettu Alexa Fluor [®] 568 anti-vuohi-vasta-aine (1:800)	Invitrogen
aasissa tuotettu Alexa Fluor [®] 488 anti-hiiri-vasta-aine (1:800)	Invitrogen
aasissa tuotettu Alexa Fluor [®] 488 anti-kani-vasta-aine (1:800)	Invitrogen

Inkuboinnin jälkeen näytekaivot pestiin kolmesti viiden minuutin ajan DPBS:llä ja sen jälkeen vielä kahdesti viiden minuutin ajan 0,01 M fosfaattipuskuriliuoksella (PB) (Liite 2). Pesujen jälkeen kaivot kuivattiin ja solujen päälle laitettiin pisara Vectashield[®] mounting-liuosta (Vector Laboratories), joka sisälsi solujen tumat värjäävän DAPI:n (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride). Mounting-liuoksen laittamisen jälkeen solut peitettiin peitinlasilla ja vietiin pimeään 4 °C:een säilytykseen mikroskopointiin asti.

Solunäytteiden mikroskopointi suoritettiin fluoresenssimikroskoopilla (Olympus IX51 fluorescence microscope). Näytteitä mikroskopoitiin ja kuvattiin kolmella eri aallonpituudella, koska DAPI fluoresoi aallonpituudella 358 nm, troponiini-T:hen kiinnittynyt leima fluoresoi aallonpituudella 568 nm ja vimentiiniin, α -aktiiniin ja konneksiini-43:een kiinnittyneet leimat fluoresoivat aallonpituudella 488 nm.

7 TULOKSET

Tuloksissa on ilmoitettu lasketut solumäärät ennen ja jälkeen rikastuksen kutakin analysoitua erää kohden. Virtaussytometrianäytteistä on esitetty kuvaajat, joista ilmenee positiivisten solujen osuudet näytteissä. Virtaussytometrianäytteiden ja solumäärien perusteella on esitetty laskennalliset prosenttiosuudet sydänsolujen, muiden solujen ja analyysin vaiheissa hävinneiden solujen määrästä. Tuloksissa on esitetty eristä 5 ja 6 kerättyjen solunäytteiden immunofluoresenssivärijäyksien tulokset kuvina. Lisäksi kantasolulinjan UTA.14803.WTpb pluripotenttiuden tarkastuksen tulos on esitetty kuvana. Tuloksissa on myös esitetty yhden analyysin hinta kummallakin käytetyllä magneettirikastimella.

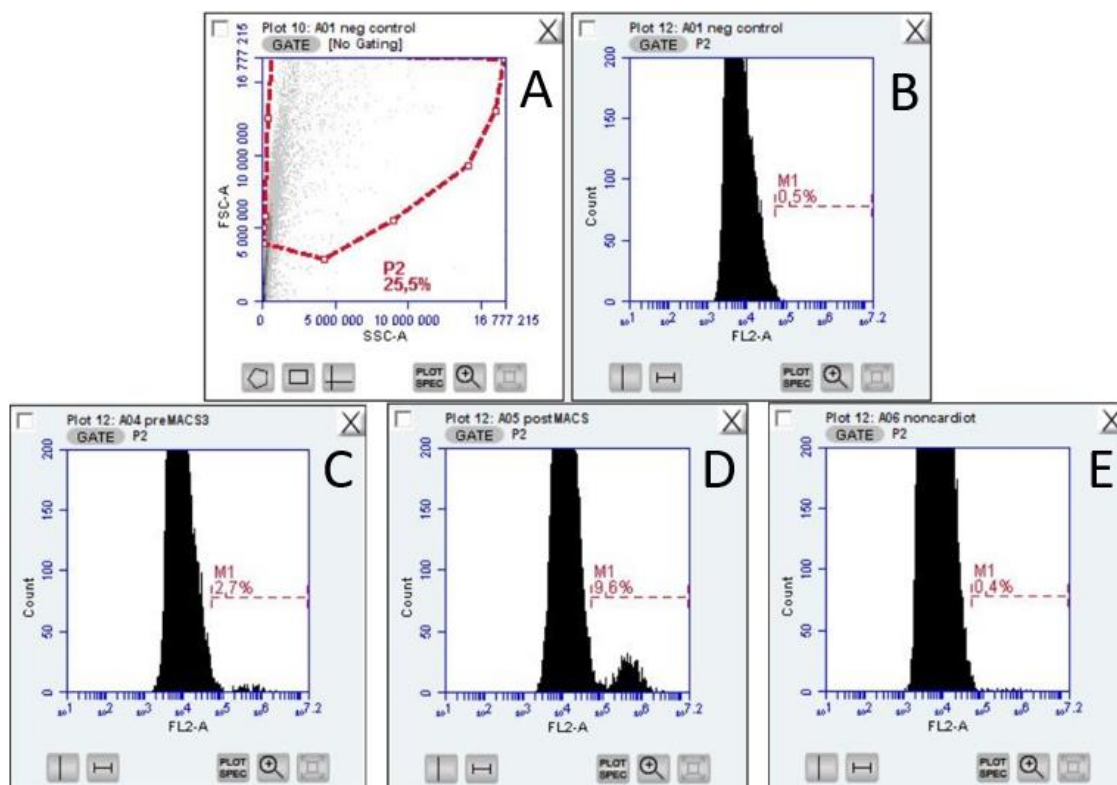
Taulukkoon 15 on kerätty kaikkien soluerien solumäärät. Taulukosta nähdään solumäärien vähentyneen paljon rikastuksen suorituksen aikana. Taulukossa b-kirjainliitteellä merkityn soluerän tulokset edustavat rikastusmenetelmässä pois karsiutuneiden solujen määrää, jotka oli leimattu magneettileimalla. *Jälkeen yhteensä* -tuloksen tulisi olla sama kuin *solumäärä ennen* -tuloksen, jos soluja ei olisi rikastuksen aikana hävinnyt ollenkaan. Solumäärät ovat jäljellä olevien solujen kokonaissolumääriä ennen ja jälkeen rikastuksen.

TAULUKKO 15. Soluerien lasketut solumäärät ennen ja jälkeen rikastuksen

Erä	Solulinja	Menetelmä	Solumäärä ennen	Solumäärä jälkeen	Jälkeen yht.
1	UTA.14803.WTpb	MojoSort™	8,05 milj.	704 000	
2	UTA.14803.WTpb	MojoSort™	1,065 milj.	43 000	
3	UTA.14803.WTpb	MojoSort™	1,68 milj.	1000	
4	UTA.14803.WTpb	MACS®	7,22 milj.	20 000	
5	UTA.14803.WTpb	MACS®	2,57 milj.	250 000	
5b	UTA.14803.WTpb	MACS®	-	700 000	950 000
6	UTA.04602.WT	MojoSort™	0,685 milj.	65 500	
6b	UTA.04602.WT	MojoSort™	-	42 000	107 500

Virtaussytometrianäytteistä ainoat odotetun kaltaiset tulokset saatiin kuudennessa soluerästä, jonka solut sykkivät ja olivat rikastuksen aluksi erilaistuneet

kunnolla sydänlihassoluiksi. Vertailukohtana kuudennen erän MojoSort™-magneettirikastimella rikastettujen solujen tuloksille on osoissa esitetty myös viidennen erän MACS®-rikastusmenetelmää käyttäen saadut solujen virtausytometriatulokset. Soluerien 1, 2, 3 ja 4 virtausytometriatuloksista esitetään vain soluerän kolme tulokset esimerkkinä, sillä tavoitellun kaltaisia tuloksia ei näistä solueristä saatu. Kuvioissa 3 ja 4 on esitetty soluerien viisi ja kuusi virtausytometriäntytteen tulokset.



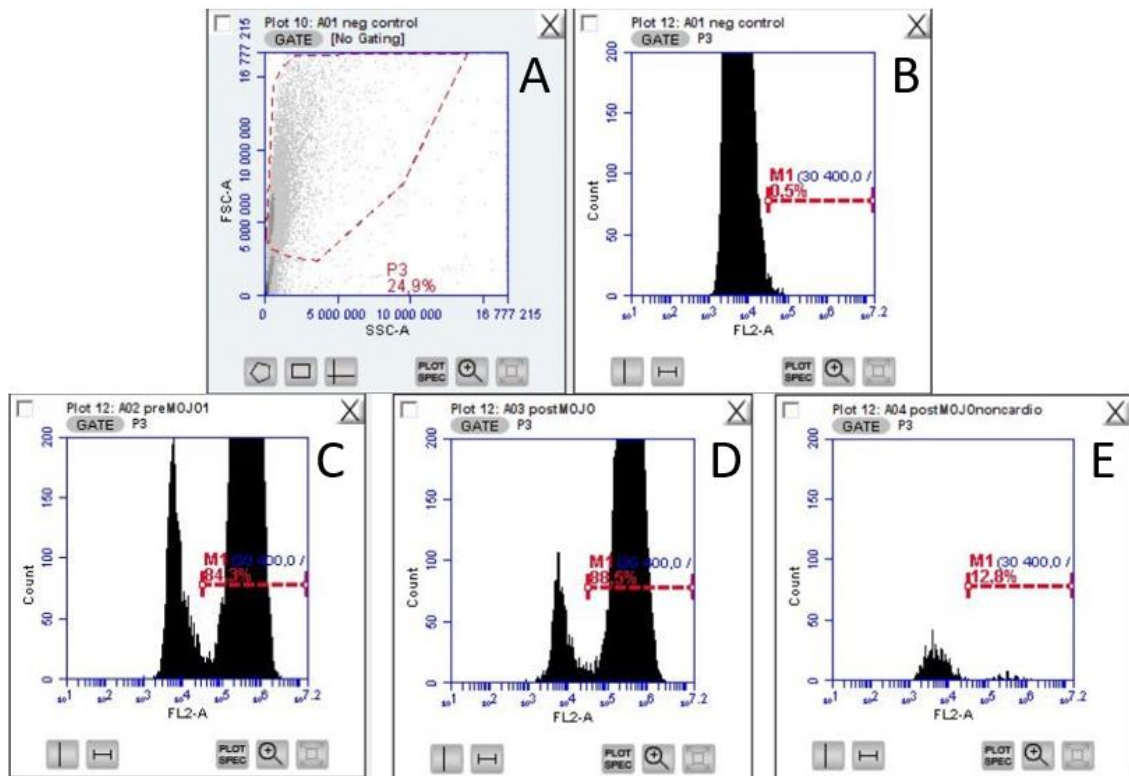
KUVIO 3. Virtausytometriatulokset soluerällä 5

Kuviossa 3A on nähtävissä negatiivisen kontrollin avulla rajattu alue, jolle sydänlihassolujen pisteet kuvaajassa osuvat. Kuvaajasta rajataan alaosaan syntyneet pisteet alueen ulkopuolelle, sillä kuvaajan alaosaan osuvat solut eivät ole tarpeeksi kompleksisia tai suuria ollakseen tutkittavia sydänlihassoluja. Negatiivisen kontrollin kuvaajan piikki kuviossa 3B edustaa rajatun alueen sisäpuolelle osuvien solujen määrää. Kuvaajaan on myös asetettu nollaraja 0,5 %:iin soluista. Kuvion 3A x-akselilla on sivulle suuntautunut valo (SSC-A) ja y-akselilla eteenpäin suuntautunut valo (FCS-A). Muissa kuvioissa 3B-3E x-akselilla on käytetty kanava ja aallonpituus (PE) ja y-akselilla analysoitujen tapahtumien lukumäärä.

Kuvioissa 3C, 3D ja 3E nollarajan oikealle puolelle siirtyneet solut ja niissä nähtävät prosenttiosuudet edustavat rajatun alueen sisäpuolelle osuvista soluista sitä osuutta, jotka ovat positiivisia eli sydänlihassoluja. Solujen siirtymässä on automaattisesti huomioitu, ettei nollarajaa ole asetettu nolnaan prosenttiin. Kuviossa 3C on esitetty ennen rikastusta kerätyn solunäytteen tulokset, kuviossa 3D rikastuksen jälkeen kerätyn solunäytteen tulokset ja kuviossa 3E putkeen jääneiden magneettileimattujen ei-sydänlihassolujen tulokset. Ennen rikastusta kerättyjä solunäytteitä oli yhteensä kolme, joten kuviossa 3 päädyttiin esittämään ajettujen näytteiden keskimääräinen tulos.

Viidennen erän soluista saatiin välttäviä tuloksia. Tuloksista kuviossa 3 huomataan, että rikastettavien sydänlihassolujen määrä ei ollut suuri, sillä kuvioiden 3C ja 3D ei-sydänlihassolujen piikin ulkonäössä tai positiivisten solujen prosenttiosuudessa ei ole suuria eroja kuvaajien välillä. Lisäksi kuvion 3B negatiivisen kontrollin piikkiin verrattaessa ei suurta eroa ilmene. Kuvaajissa näkyvä nollarajan vasemmalla puolella oleva ei-sydänlihassoluja kuvaava piikki on suhteettoman iso. Ennen rikastusta otetussa näytteessä (kuvio 3C) kuuluu olla muitakin kuin kohdesoluja, mutta piikin koon pitäisi huomattavasti pienentyä rikastuksen jälkeen otetussa näytteessä (kuvio 3D), sillä muiden solujen lukumäärän tulisi laskea. Rikastuksen tarkoituksena oli poistaa sydänlihassolujen seasta muita soluja ja ei-sydänlihassolunäytteen (kuvio 3E) vähäisen sydänlihassolumäärän perusteella voidaan sanoa rikastuksen onnistuneen. Ennen rikastusta kerätyn näytteen kuvaajan suuri piikki näin ollen oletettavasti kuvaa solususpensiossa olleita kuolleita tai hajonneita soluja ja osittain myös mediumien mukana kulkeutunutta pienmateriaalia. Rikastuksen jälkeen kerätyn näytteen suuri piikki oletettavasti indikoi troponiini-T:llä värjäyksen aikana kuolleita ja hajonneita soluja ja solususpensioon rikastuksen jälkeen jäänyttä pienmateriaalia.

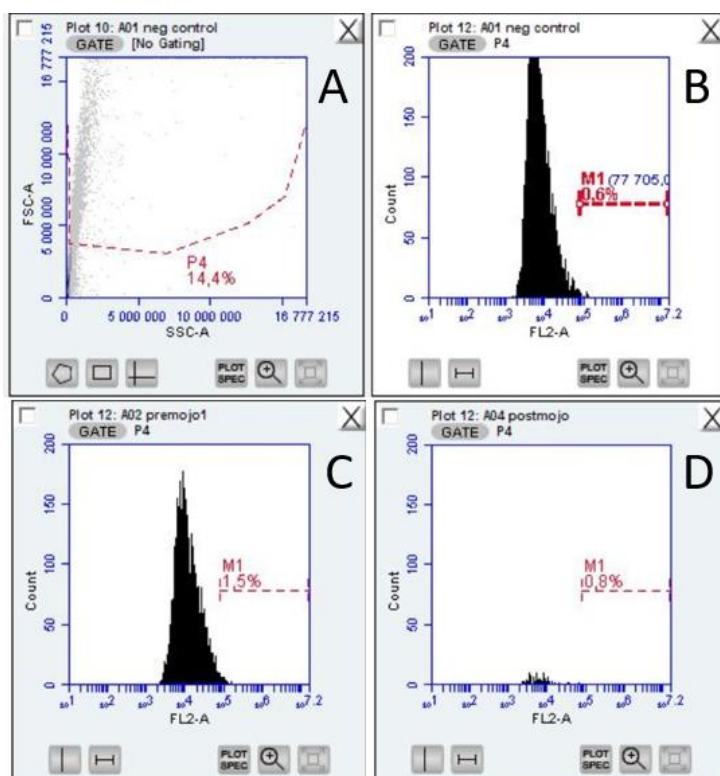
Seuraavassa kuviossa 4 on esitetty kuudennen erän virtaussytometriatulokset. Kuvaajissa on havaittavissa selviä eroja viidennen erän näytteiden tuloksiin verrattuna sekä visuaalisesti, että prosentuaalisesti. Tuloksissa kuviossa 4 negatiivisen kontrollin avulla rajattu analyysialue ja nollaraja on asetettu kuten kuvioista 4A ja 4B voidaan havaita. Kuviossa 4C on esitetty ennen rikastusta kerätyn solunäytteen tulokset, kuviossa 4D rikastuksen jälkeen kerätyn solunäytteen tulokset ja kuviossa 4E kolonniin jääneiden ei-sydänlihassolujen tulokset.



KUVIO 4. Virtausytometriatulokset soluerällä 6

Kuviosta 4 nähdään piikin muodon ja arvojen muuttuminen verrattaessa negatiivisen kontrollin piikkiä kuviossa 4B ja ennen ja jälkeen rikastuksen kerättyjen näytteiden piikkejä kuvioissa 4C ja 4D. Piikin suurin massa on troponiini-T:llä leimatuissa näytteissä siirtynyt nollarajan positiiviselle puolelle, jonka perusteella voidaan sanoa sydänlihassoluja olleen näytteessä runsaasti. Lisäksi piikin nähdään pienentyvän siirryttäessä ennen -näytteestä (kuvio 4C) rikastuksen jälkeiseen näytteeseen (kuvio 4D), mikä indikoi näytteen puhdistumista rikastuksen aikana. Verrattaessa ennen ja jälkeen rikastuksen kerättyjen solunäytteiden sydänlihassolujen piikkejä visuaalisesti sekä prosentuaalisesti huomataan, ettei muutos kuitenkaan ole kovin suuri. Onnistuneesta rikastustuloksesta kertoo myös kuvion 4E melko pieni osuus sydänlihassoluja.

Kolmannen soluerän epäonnistuneet virtausytometriatulokset esitetään kuviossa 5. Kolmannen soluerän tuloksia mukailevat myös solueristä 1, 2 ja 4 saadut virtausytometriatulokset, joita ei esitetä Tulokset-osiossa. Ylärivillä kuviossa 5A on negatiivisen kontrollin avulla rajattu sydänlihassolujen alue sekä kuviossa 5B prosenttiosuus rajatulle alueelle osuvista soluista. Alarivillä kuviossa 5C on tulos ennen rikastusta kerätystä näytteestä ja kuviossa 5D rikastuksen jälkeen kerätystä näytteestä.



KUVIO 5. Esimerkki epäonnistuneista tuloksista, soluerä 3

Kuvaajista kuviossa 5 huomataan suuria eroja viidennen ja kuudennen soluerän virtausytometriatuloksiin verrattuna. Kuvion 5 kuvaajista nähdään, että negatiivisen kontrollin avulla rajatun alueen sisäpuolelle kuvaajassa 5A osuu lähes puolet vähemmän soluja kuin soluerien viisi ja kuusi virtausytometriäntäytteen tuloksissa kuvioissa 3 ja 4. Näistä reilusta 14 %:ta oletettuja sydänlihassoluja aidosti sydänlihassoluiksi osoittautui laitteen mukaan vain 1,5 %. Rikastuksen jälkeen otetussa näytteessä kuvaajassa 5D tulisi olla enemmän sydänlihassoluja kuin rikastusta ennen otetussa näytteessä kuvaajassa 5C. Näin ei kuitenkaan esimerkiksi soluerällä kolme laitteen tulosten mukaan ollut. Koska rikastuksen jälkeen kerätyn näytteen sydänlihassolujen määrä on pienempi kuin ennen rikastusta otetussa näytteessä, voidaan tuloksien todeta olevan epäluotettavia.

Virtausytometriltä saatujen tuloksien sekä laskettujen solumäärien perusteella solueristä viisi ja kuusi on saatu taulukossa 14 esitetyt tulokset. Taulukon ylimässä osassa on esitetty virtausytometrin antamat tulokset sekä laskettu kuinka monta prosenttiyksikköä soluja on rikastuksen jälkeen enemmän kuin ennen rikastusta. Taulukon keskiosassa on laskettu analyysissä kadonneiden solujen määrä sekä rikastuksen jälkeen jäljellä olevien solujen määrä. Rikastuksen jälkeen jäljellä oleva solumäärä koostuu kohdesoluista ja rikastusmenetelmässä

karsiutuneiden magneettileimattujen solujen yhteismäärästä. Taulukon alimmaisessa osiossa on verrattu rikastuksen jälkeisiä sydänlihassolujen ja ei-sydänlihassolujen määriä alkuperäiseen solumäärään sekä rikastuksen jälkeen jäljellä olevaan yhteissolumäärään.

TAULUKKO 16. Analyseista saadut laskennalliset tulokset

Erä	Menetelmä	Virtaussytometri (positiivisia ennen rikastusta) (%)	Virtaussytometri (positiivisia rikastuksen jälkeen) (%)	Virtaussytometri magneettileimatut (positiivisia) (%)	Prosenttiyksikköä enemmän sydänlihassoluja rikastuksen jälkeen
5	MACS®	2,67 %	9,60 %	0,40 %	6,93
6	MojoSort™	84,30 %	88,50 %	12,80 %	4,2
Erä	Menetelmä	Rikastuksessa hävinneet solut (lkm)	Rikastuksessa hävinneet solut (%)	Rikastuksen jälkeen jäljellä olevat solut yhteensä (lkm)	Rikastuksen jälkeen jäljellä olevat solut (%)
5	MACS®	1 620 000	63,04 %	950 000	36,96 %
6	MojoSort™	550 000	80,36 %	134 500	19,64 %
Erä	Menetelmä	Sydänlihassoluja verrattuna alkuperäiseen solumäärään (%)	Ei-sydänlihassoluja verrattuna alkuperäiseen solumäärään (%)	Sydänlihassoluja verrattuna rikastuksen jälkeen jäljellä olevaan solumäärään (%)	Ei-sydänlihassoluja verrattuna rikastuksen jälkeen jäljellä olevaan solumäärään (%)
5	MACS®	9,73 %	27,23 %	26,32 %	73,68 %
6	MojoSort™	9,56 %	6,13 %	60,93 %	39,07 %

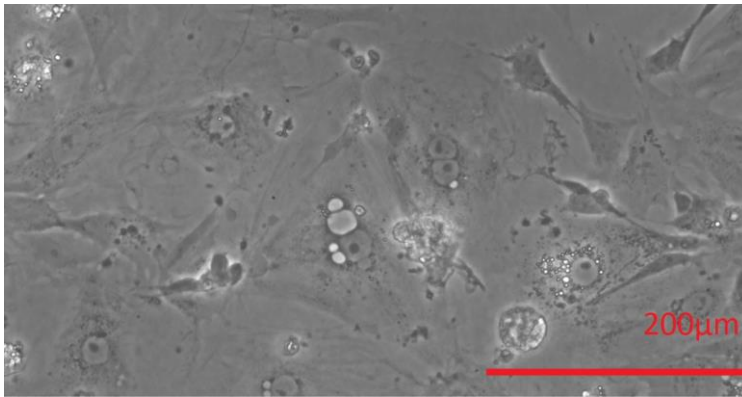
Taulukosta 16 ilmenee, että MACS®-magneettirikastinta käytettäessä sydänlihassolujen prosenttiosuus nousi ennen rikastuksen ja rikastukseen jälkeen otettujen näytteiden välillä 6,9 prosenttiyksikköä ja että magneettileimalla leimattujen ei-sydänlihassolujen näytteessä oli vain 0,4 % sydänlihassoluja. MojoSort™-magneettirikastinta käytettäessä sydänlihassolujen prosenttiosuus nousi rikastuksen jälkeen 4,2:lla prosenttiyksiköllä, mikä oli vähemmän kuin MACS®-magneettirikastinta käytettäessä. Ei-sydänlihassolujen näytteestä löytyi virtaussytometrin mukaan 12,8 % sydänlihassoluja, mikä oli korkeampi tulos kuin MACS®-magneettirikastimella rikastettaessa. Taulukosta 16 nähdään, että soluja hävisi MACS®:lla rikastettaessa 63,04 % ja MojoSort™:lla rikastettaessa 80,36 % solujen alkuperäisestä määrästä. Koska soluja hävisi runsaasti, sydänlihassolujen määrää verrattiin myös rikastuksen jälkeen jäljellä olevaan solumäärään, joka sisälsi sydänlihassolut ja magneettileimatut ei-sydänlihassolut. Näin saadut tulokset

set ovat vertailukelpoisempia, jos oletetaan hävinneissä soluissa olleen sydänlihassoluja ja ei-sydänlihassoluja samassa suhteessa kuin rikastuksen jälkeen jäljelle jääneissä soluissa.

Virtaussytometrin antamien ja laskettujen tulosten mukaan taulukossa 16 viidennen soluerän puhtaus oli 9,60 % ja saanto 9,73 % alkuperäisestä solumäärästä ennen MACS[®]:lla rikastusta. Vertaamalla sydänlihassolujen määrää rikastuksen jälkeen jäljellä olevaan solumäärään saannoksi saadaan 26,32 %. Ei-sydänlihassolujen prosentuaaliset osuudet samalla tavalla määriteltynä olivat 27,23 % verrattuna alkuperäiseen solumäärään ja 73,68 % verrattuna rikastuksen jälkeiseen solumäärään. Koska analyysissä käytetty linja ei kuitenkaan erilaistunut kunnolla, saatuja tuloksia ei voida pitää täysin luotettavina.

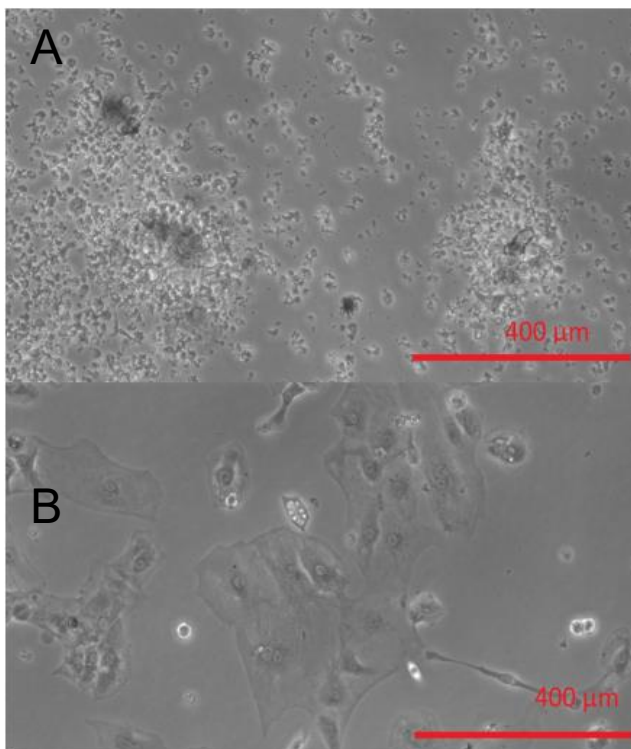
Virtaussytometrin antamien ja laskettujen tulosten mukaan taulukossa 16 MojoSort[™]:lla rikastettujen kuudennen erän näytteiden puhtaudeksi saatiin 88,50 % ja saannoksi 9,56 % verrattuna alkuperäiseen solumäärään. Vertaamalla rikastuksen jälkeen jäljellä olevaan solumäärään saannoksi saatiin 60,93 %. Ei-sydänlihassolujen prosentuaaliset osuudet olivat 6,13 % verrattuna alkuperäiseen solumäärään ja 39,07 % verrattuna rikastuksen jälkeen jäljellä olevaan solumäärään. MojoSort[™]-magneettirikastimella sydänlihassolujen määrä rikastuksen jälkeen verrattuna kokonaissolumäärään rikastuksen jälkeen on huomattavasti suurempi kuin MACS[®]-magneettirikastimella saadut samat tulokset, koska linjan solut erilaistuivat paremmin.

Ennen immunofluoresenssivärjäystä soluerien viisi ja kuusi näytteistä otettiin mikroskoopilla (Nikon Eclipse TS100) kuvia. Kuvista nähdään solujen morfologiaa viidennellä erällä ennen rikastusta ja kuudennella erällä ennen ja jälkeen rikastuksen. Kuvassa 6 nähdään soluja viidennen erän yhdestä kaivosta ennen värjäystä.



KUVA 6. Erä 5 ennen rikastusta

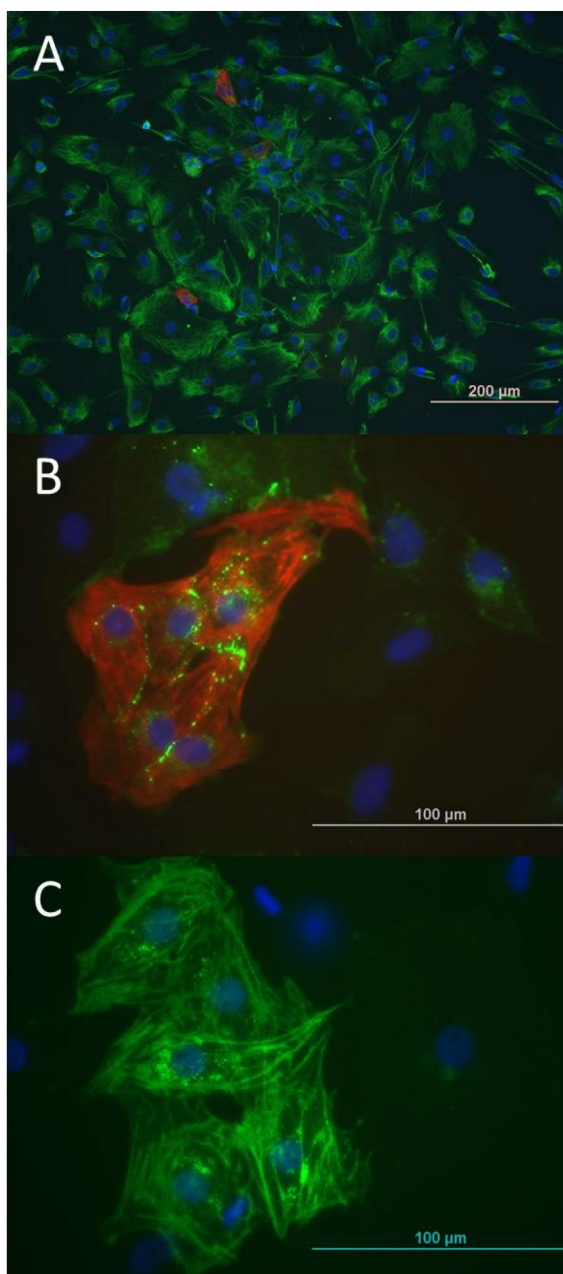
Kuva 6 on otettu 20x suurennoksella. Kuvassa on nähtävissä kohtuullisen paljon soluja ja aivan kuvan keskivaiheilla on nähtävissä ainakin kaksi hieman kolmionmallista sydänlihassolua. Toisessa sydänlihassolussa on nähtävissä kaksi tummaa, mikä on yksi sydänlihassoluilla ilmenevistä ominaisuuksista ja siten tunnistamista helpottava tekijä. Mikroskoopilla katsottuna solut eivät kuitenkaan sykki-neet. Koska soluerästä 5 ei saatu otettua näytettä rikastuksen jälkeen rikastuksen vaikutuksia solun morfologiaan ei voida arvioida eikä virtausytometrianäytteiden rikastukseen jälkeen kerätyn näytteen koostumusta voitu tarkistaa visuaalisesti vasta-aineita hyödyntäen. Seuraavassa kuvassa 7 on esitetty kuudennen erän solut ennen värjäämistä. Kuva 7 on otettu 10x suurennoksella.



KUVA 7. Erä 6 ennen värjäämistä. A: ennen rikastusta, B: rikastuksen jälkeen

Ennen rikastusta otetun näytteen kuvassa 7A on havaittavissa kolme solukeskittymää. Mikroskoopilla katsottaessa solukeskittymät sykkivät toisistaan eroavaan rytmiiin. Kuvassa on nähtävissä myös paljon pientä massaa, joka osittain peittää kaivon pohjaan kiinnittyneitä sydänlihassolukeskittymiä vaikeuttaen niiden havaitsemista. Tämä peittävä solumassa ei ollut kiinnittynyt kaivon pohjaan. Rikastuksen jälkeen otetussa kuvassa 7B on nähtävillä useita sydänlihassoluja ja osassa näkyvissä olevista soluista on havaittavissa myös kaksi tumaa. Suurin osa kuvassa olevista soluista sykkii mikroskoopilla tarkasteltaessa. Sykkiminen tapahtuu kontaktissa olevien solujen välillä samassa yhteneväisessä rytmissä, ikään kuin ”verkkona”. Muodoltaan solut ovat laajemmalle levittyneempiä kuin kuvassa 7A, sillä soluilla on ollut enemmän tilaa kasvaa pienemmän solumäärän vuoksi. Rikastuksen jälkeinen näyte ei myöskään sisältänyt muita soluja yhtä paljon kuin näyte ennen rikastamista, joten muiden solujen jakaantuminen ja kaivon pohjan täyttäminen oli hitaampaa. Näiden ennen ja jälkeen kuvien välillä ei havaittu rikastamisesta johtuvia negatiivisia muutoksia solujen morfologiassa.

Immunofluoresenssivärjäyksen jälkeen otetuissa kuvissa punaisella on esitetty troponiini-T, joka värjää solujen sarkomeerirakenteen kiinnittymällä troponiini-T -proteiiniin, sinisellä on esitetty DAPI, joka värjää tumat ja vihreällä värillä on esitetty α -aktiini, konneksiini-43 ja vimentiini. Vimentiini värjää muut kuin sydänsolut, konneksiini-43 värjää solujen aukkoliitokset kiinnittymällä konneksiini-43 proteiiniin ja α -aktiini värjää solujen sarkomeerirakennetta troponiini-T:tä paremmin, sillä sitä esiintyy solun sarkomeerirakenteessa enemmän. Ensimmäisessä kuva-sarjassa (kuva 8) on esitetty erän viisi värjätyt solunäytteet.

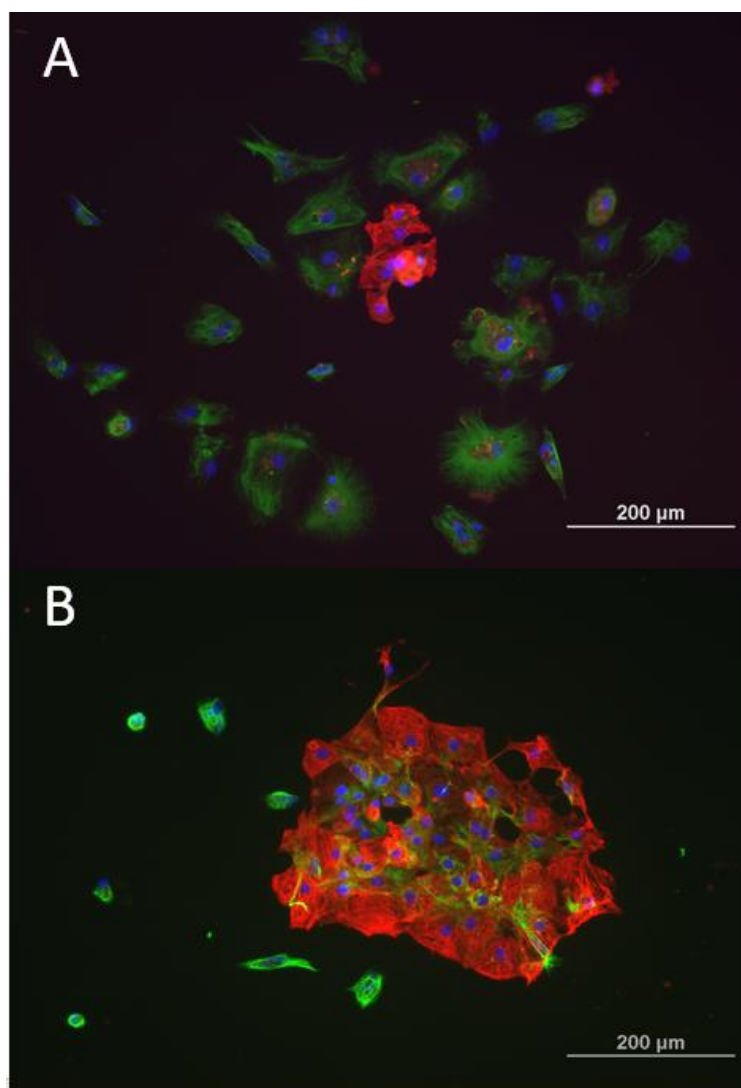


KUVA 8. Erä 5 ennen rikastusta, 8A: DAPI (sininen), troponiini-T (punainen) ja vimentiini (vihreä). 8B: DAPI (sininen), troponiini-T (punainen) ja konneksiini-43 (vihreä). 8C: DAPI (sininen), α -aktiini (vihreä)

Kuvasta 8A nähdään, että sydänlihassolujen (punaisella) määrä näytteessä on erittäin vähäinen ja muita soluja on runsaasti. Värjäystulos on onnistunut, sillä solut ja tumat ovat värjäytyneet tasaisesti, eikä kirkkaita tai epäspesifisesti värjäytyneitä kohtia näy. Kuvassa 8B nähdään solujen väliset aukkoliitokset värjäytyneenä vihreällä. Aukkoliitokset ilmentyvät solujen rajapinnoissa, kuten kuuluukin. Kuvasta on helposti erotettavissa viisi sydänlihassolua. Kuvassa on nähtävissä myös muiden solujen sinisellä näkyviä tumia. Värjäystulos on hyvä, tosin kuvan tummalla osiolla on havaittavissa hieman taustavärjäytymistä. Kuvassa 8C

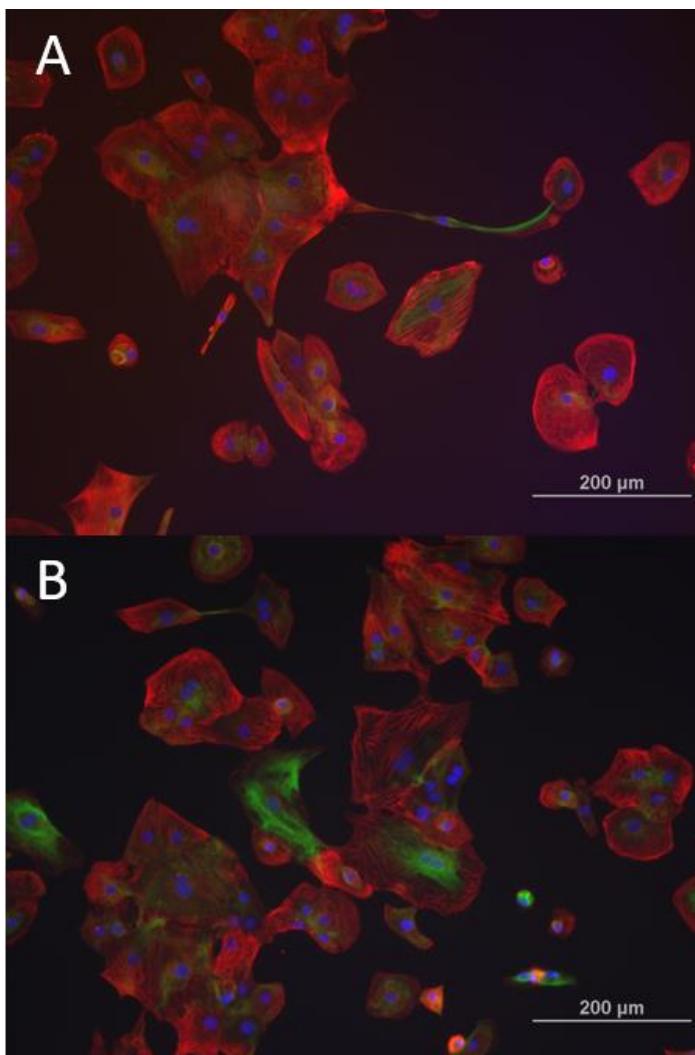
on nähtävissä sydänlihassolun sarkomeerirakenteet selkeästi. α -aktiini ei ole niin spesifinen kuin troponiini-T, jonka vuoksi kuvassa on nähtävillä hieman epäspesifiä värjäytymistä. Sydänlihassoluja kuvassa vaikuttaa olevan viisi kappaletta ja lisäksi on värjäytynyt muiden solujen tumia. Viidennen erän värjäystuloksista nähdään, että huonosti erilaistuvasta linjasta oli erilaistunut sydänlihassoluja, vaikka niiden määrä olikin huomattavan pieni.

Toisessa kuvasarjassa on nähtävillä kuudennen erän immunofluoresenssivärjäyksen tulokset ennen rikastusta otetusta näytteestä sekä rikastuksen jälkeen otetusta näytteestä. Kaikki näytteet on värjätty DAPI:lla, troponiini-T:llä ja vimentiinillä. Kuvassa 9 on esitetty kuudennen erän tulokset ennen rikastusta ja kuvassa 10 rikastuksen jälkeen.



KUVA 9. Erä 6 ennen rikastusta, troponiini-t (punainen), vimentini (vihreä) ja DAPI (sininen)

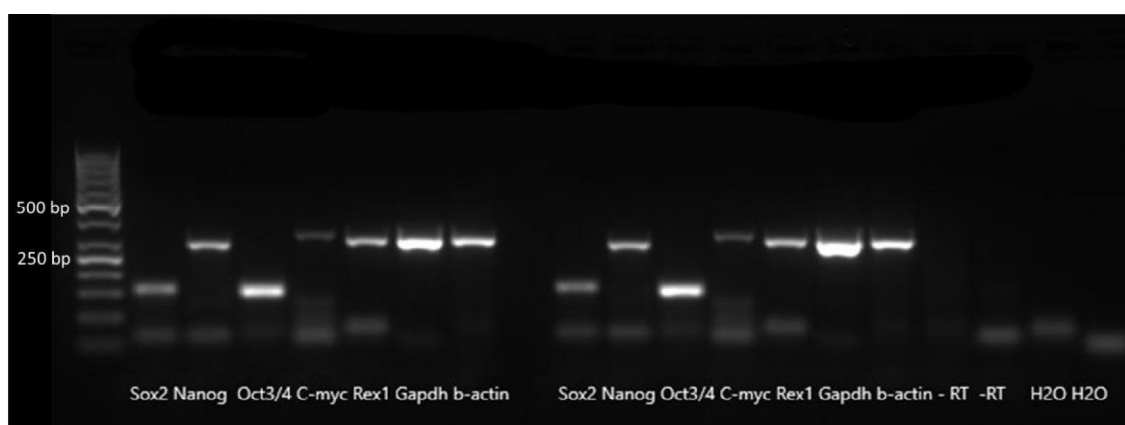
Kuvassa 9A punaisella näkyy troponiini-T:llä värjäytyt sydänlihassolut ja vihreällä vimentiinillä värjäytyt muut solut. Muiden solujen määrä ennen rikastusta on selkeästi korkeampi kuin sydänlihassolujen määrä. Värjäystulos on onnistunut sillä kuvan solut ja niiden tumat ovat värjäytyneet tasaisesti, eikä kirkkaita tai epäspesifejä värjäytymiskohtia ole näkyvissä. Kuvassa 9B on nähtävissä sydänlihassolujen keskittymä ja ympärillä olevia pieniä ja rikkonaisia muita soluja ja niiden palasia. Solukeskittymässä on myös vihreällä värjäytyneitä muita soluja, jotka sijaitsevat sydänsolujen päällä, väleissä tai alla. Värjäystulos kuvassa on onnistunut, sillä kuvan komponentit näkyvät kirkkaina, eikä taustan värjäytymistä ole havaittavissa. Kokonaissolumäärä kuvassa 9 on pienempi kuin ennen värjäystä otetuissa kuvissa. Pienempi solumäärä osoittaa, että solut eivät olleet joko kiinnittyneet kaivon pohjaan tarpeeksi ennen värjäyksen aloittamista tai niitä on irronnut värjäysprotokollan pesuvaiheissa.



KUVA 10. Erä 6 rikastuksen jälkeen troponiini-t (punainen), vimentini (vihreä) ja DAPI (sininen)

Rikastuksen jälkeinen tulos kuvassa 10 on hyvä. Kuvan A ja B -kohdissa on molemmissa selkeästi enemmän punaisella värillä näkyviä sydänlihassoluja kuin vihreällä värillä näkyviä muita soluja. Kuvissa ei myöskään ole havaittavissa rikkonaisia soluja tai solujen palasia kuten kuvassa 9B ennen rikastusta. Kuvista on nähtävissä sydänlihassolujen sarkomeerirakenne hyvin ja kaksitumaisia sydänlihassoluja on havaittavissa useita. Kuvien värjäystulos on onnistunut, vaikka kuvassa 10A on havaittavissa hieman punaista taustan värjäytymistä. Vertaamalla kuvaa 10 kuvaan 9 nähdään selvästi rikastuksen vaikutus solunäytteisiin. Ennen rikastusta kerätyssä näytteessä on sydänlihassoluja ja muita soluja sekä hajonneita soluja ja esimerkiksi mediumien mukana kulkeutuneita pienaineita, kuten mediumien rakennekomponentteja. Rikastuksen jälkeen viljelmä vaikuttaa puhtaammalta ja muita kuin sydänlihassoluja ei juurikaan ole havaittavissa.

Solulinja UTA.14803.WTpb ei erilaistunut hyvin sydänlihassoluiksi, joten linjan kantasolujen pluripotentialuus tarkastettiin. Agarosigeelielektroforeesilla ajettujen näytteiden geeleistä otetuista kuvista näkyy ilmentääkö solu tutkittua geeniä vai ei. Kuvat geeleistä on yhdistetty yhteen kuvaan ja ne esitetään kuvassa 11. Agarosigeelin kuvan vasemmassa reunassa sijaitsee kokomittari (Ladder), josta kirkkaampina bändeinä nähdään koot 250 bp ja 500 bp. Analyysissä tutkittavien geenien tulisi muodostaa bändit seuraavilla kohdilla: Nanog 287 bp, Rex1 306 bp, Sox2 151 bp, c-Myc 328 bp, Oct3/4 124 bp, GAPDH 302 bp ja β -aktiini 294 bp (Manzini ym. 2015, 905; Thermo Fisher Scientific, tuotekatalogi).



KUVA 11. Agarosigeelit, linja UTA.14803.WTpb p.27, vasemmalla 1,0 µl:n näytetilavuus ja oikealla 1,5 µl:n näytetilavuus

Kuten kuvasta 11 on havaittavissa, jokaisesta tutkittavasta geenistä ja jokaisesta geenistä, joita pluripotentin solun tulisi ilmentää on muodostunut bändi, joten linjan kantasolut todettiin pluripotenteiksi. Negatiivisista kontrollinäytteistä (-RT) ja vesinäytteistä ei ole muodostunut bändejä, joten epäspesifiä monistumista ei ole tapahtunut ja työssä käytetty vesi on osoittautunut puhtaaksi. Näytetilavuuden muutoksella ei ollut vaikutusta testin tuloksiin.

Vertailtavien rikastusmenetelmien hinnat eroavat toisistaan hieman. Kumpaakin rikastusmenetelmää varten tulee hankkia välttämättömät tarvikkeet kuten rikastamiseen käytettävä magneetti. Alla olevassa taulukossa 17 on listattu välttämättömien välineiden hinnat ja ilmoitettu yhden analyysin suorittamisen hinta. Taulukkoon merkityt hinnat ovat peräisin laite- ja välinevalmistajien sivuilta.

TAULUKKO 17. Hinnat

MACS®		MojoSort™	
Väline	Hinta	Väline	Hinta
magneetti	630 €	magneetti (5 ml)	480 €
magneettiteline	160 €	magneetti (14 ml)	950 €
kolonnit	440 €/25 kpl	Pre-separation filter 70 µm	195 €/50 kpl
Pre-separation filter 70 µm	195 €/50 kpl	pyöreäpohjaiset Falcon®-putket	104 €/500 kpl
pyöreäpohjaiset Falcon®-putket	104 €/500 kpl		
yhden analyysin hinta yhdelle viiden miljoonan solun näytteelle 55,0 €		yhden analyysin hinta yhdelle viiden miljoonan solun näytteelle 37,7 €	

Taulukossa 17 yhden analyysin hintaan on laskettu mukaan käytetyt reagenssit ja tarvittavien välineiden hinnat. Käytetyt reagenssit koostuvat työssä käytettyjen kaupallisten kittien reagensseista, DPBS:tä ja erotuspuskurin reagensseista. Välineistöön on laskettu kertakäyttöiset pipetit, pipetinkärjet, kuoppalevyt, putket, suodattimet ja kolonnit. Taulukossa ei ole erikseen esitetty näitä laboratorion normaalivarustuksen kuuluvien välineiden, kuten pipettien ja putkien hintoja. MojoSort™-magneettirikastinta käytettäessä työssä esitetyn protokollan mukaan yh-

den analyysin hinta on 17,3 € vähemmän kuin MACS[®]-magneettirikastinta käytettäessä. Yhden analyysin hintojen eroon vaikuttaa suoraan MACS[®]-magneettirikastinta käytettäessä tarvittavien kolonnien hinta. MojoSort[™]-magneettirikastinta käytettäessä erityisiä kolonneja ei tarvita ja sen asemassa toimii pyöreäpohjainen Falcon[®]-putki, jonka kappalehinta on vain noin 0,21 €. Lisäksi analyysiä varten on hankittava laitteisto, joka on MojoSort[™]-magneettirikastusmenetelmällä käytettäessä 5 ml:n magneettia 150 € halvempi kuin MACS[®]-magneettirikastusmenetelmää käytettäessä.

8 POHDINTA

Saatujen tuloksien perusteella ei voida antaa luotettavaa arviota MACS[®] tai MojoSort[™] -magneettirikastimien tehokkuudesta, käytettävyydestä tai menetelmien eroavaisuuksista. Tutkimussuunnitelman mukaan käyttökelpoista dataa tuli saada 6-7 soluerästä, joista noin puolet oli rikastettu käyttäen MACS[®]-magneettirikastinta ja puolet käyttäen MojoSort[™]-magneettirikastinta. Odotetun kaltaisia tuloksia saatiin kuitenkin vain kuudennesta ja samalla viimeisestä analysoidusta soluerästä, sillä seitsemännen erän rikastusta ei voitu suorittaa. Kuudennen erän solut kehittyivät erilaistuksen aikana kuitenkin erittäin hyvin sydänlihassoluiksi, joten erän rikastamisesta ei ollut erityistä hyötyä.

Vaikka käytetyt solulinjat olivat karakterisoituja ja pluripotentiksi kantasoluiksi todettuja linjoja, soluerien 1-5 solut eivät erilaistuneet hyvin sydänlihassoluiksi. Erilaistumattomuuden huomasi aluksi siitä, etteivät soluaggregaatit alkaneet sykkiä erilaistuksen loppupuolella. Huonosta erilaistumisesta antoi myös viitteitä rikastuksen jälkeinen sydänlihassolujen laskennallinen määrä ja lopulta virtaussy-tometrillä analysoitujen näytteiden tulokset. Erilaistumattomuuden syyksi epäiltiin kantasolujen pluripotenttiuden menetystä, mutta analyysillä osoitettiin, että kantasolut olivat säilyneet pluripotentteina ja ettei huono erilaistuminen siten johtunut kantasolujen kunnosta. Huonon erilaistumisen syytä tietämättä käytettävä solulinja päätettiin vaihtaa. Koska soluerien neljä ja viisi erilaistukset oli jo ehditty aloittaa, eikä syytä huonolle erilaistumiselle tiedetty, niiden erilaistamista jatkettiin ja uusi solulinja (UTA.04602.WT) saatiin vaihdettua vasta soluerälle kuusi. Uudella linjalla oli tarkoitus analysoida yksi soluerä kummallakin vertailtavalla magneetilla, mutta seitsemännen erän kasvatus, erilaistus ja rikastus jouduttiin hylkäämään laboratoriotilojen sulkeuduttua koronaviruspandemian vuoksi. Erilaistaminen on hidaskasvatusprosessi, joten uudella linjalla ei senkään vuoksi olisi ollut aikaa tehdä useita uusia erilaistuksia.

Solueristä 1-4 vain kolmannen soluerän tulokset esitettiin Tulokset-osiossa, sillä erilaistuneiden solujen solumäärät olivat analysoitavissa näytteissä niin vähäisiä, että tavoiteltuja tuloksia analyysistä ei saatu. Solueristä 1-4 ei riittänyt soluja

jatkoviljeltäväksi ja värjättäväksi, joten vasta-aineita hyödyntäen ei voitu määrittää visuaalista varmistusta virtaussytometrin antamille tuloksille. Jotta eristä 1-4 olisi voitu määrittää rikastustehokkuutta olisi eristä tullut kerätä talteen myös ei-sydänlihassolut ja analysoida ne virtaussytometrillä, kuten soluerien viisi ja kuusi kohdalla tehtiin.

Sekä viidennen että kuudennen soluerän rikastuksien voitiin sanoa onnistuneen ei-sydänlihassolunäytteen vähäisten sydänlihassolumäärien takia. Vaikka luotettavia tuloksia vertailtavien magneettien välille ei saatu, olemassa olevien viidennen sekä kuudennen erän tulosten perusteella MACS[®]:lla rikastettujen solujen saanto ja puhtaus olisivat mahdollisesti paremmat kuin MojoSort[™]:lla saadut vastaavat arvot. Viitteitä tästä antaa ei-sydänlihassolujen näytteessä ollut pienempi prosentuaalinen osuus sydänlihassoluja ja suurempi prosenttiyksikön nousu ennen ja jälkeen rikastuksen kerättyjen näytteiden sydänlihassolumäärissä. Prosentuaalisesti MojoSort[™]:n 12,8 % sydänlihassoluja ei-sydänlihassolunäytteessä oli kuitenkin samaa suuruusluokkaa kuin Sydänryhmän aiemmissa analyyseissa saadut tulokset MACS[®]:lla, joten lukuun vaikuttaa oletettavasti rikastettavan sydänlihassolumäärän suuruus. Herron ym. (2017) mukaan MACS[®]:lla rikastettaessa saadaan näytteen puhtaudeksi yli 90 %, jos alkuperäisestä näytteestä vähintään 50 % on ollut sydänlihassoluja (Herron ym 2017, 1). Opinnäytetyössä saadut tulokset soluerällä viisi jäivät tästä puhtaustavoitteesta reilusti, tosin huonon erilaistumiskyvyn takia näytteestäkään puolet ei ollut sydänlihassoluja.

Viidennestä erästä saatiin kerättyä immunofluoresenssinäyte vain ennen rikastusta. Tästä syystä solujen morfologian muutoksia tai virtaussytometrianäytteiden rikastuksen jälkeen kerätyn näytteen koostumusta ei voitu tarkistaa visuaalisesti. Viidennen erän tulosten perusteella (kuva 8) voitiin kuitenkin todeta näytteissä olleen sydänlihassoluja, vaikka niiden määrä oli huomattavan pieni. Ennen värjäystä otettujen kuudennen erän kuvien (kuva 7A ja 7B) perusteella ei havaittu negatiivisia muutoksia solun morfologiassa. Värjäyksen jälkeen otettujen kuudennen erän kuvien (kuvat 9 ja 10) perusteella todettiin rikastuksen positiivinen ja puhdistava vaikutus solunäytteisiin. Saatu tulos tuki virtaussytometrillä saatuja tuloksia. Värjäysprotokollan aikana soluja oli irronnut kaivoilta, mikä vaikeutti so-

lujen kuvaamista värjäyksen jälkeen. Jotta solujen irtoamista kaivoilta voisi vähentää, solujen kiinnittymiseen kaivoille tulisi antaa enemmän aikaa ja värjäysprotokollan pesujen rauhalliseen suorittamiseen tulisi kiinnittää enemmän huomiota.

Yksi opinnäytetyön tavoitteista oli vertailla menetelmiä niiden käytettävyydessä. Koska kumpaakin magneettirikastinta varten solut esikäsiteltiin samalla tavalla menetelmien suurin ja ainoa eroavaisuus esiintyi rikastusmagneetin käytössä. MACS[®]-magneettirikastimella rikastettaessa solut pipetoitiin kolonniin, josta leimaamattomat solut pääsivät valumaan läpi. MojoSort[™]-magneettirikastimella solususpensio asetettiin magneetikenttään putkessa, jonka reunoille leimatut solut jäävät kiinni ja josta leimaamattomat solut pipetoitiin pois. Ajallisesti menetelmät olivat yhtä nopeita suorittaa, sillä solususpension valuminen kolonnin läpi vei yhtä kauan aikaa kuin soluputken inkuboiminen magneetissa. Kumpikin tekniikka on yksinkertainen ja helposti käytettävissä eikä solujen pipetoiminen pois putkesta ollut vaikeaa. Tulosten perusteella (taulukko 17) havaittiin MACS[®]-magneettirikastusmenetelmää varten hankittavan välttämättömien tarvikkeiden olevan kalliimpia kuin MojoSort[™]-menetelmää varten tarvittavan välineistön. Taloudellisesta näkökulmasta voitiinkin todeta MojoSort[™]-magneettirikastimen käytön olevan edullisempaa ja käytännöllisyyden näkökulmasta voitiin sanoa, ettei menetelmien välillä ole suurtakaan eroa.

Työn suoritukseen ja tulosten tulkintaan liittyneet ongelmat vaikuttivat opinnäytetyöhön monin tavoin. Ne ovat myös eniten virhettä tuloksiin tuovat tekijät. Suurin ongelma oli toisen analysoitavan solulinjan huono erilaistumiskyky. Huono erilaistumiskyky ei johtunut kantasolujen pluripotentiuden menetyksestä, joten vaikuttimena toimi jokin muu tekijä. Eräs mahdollinen erilaistumiseen vaikuttava tekijä on hiirillä sekä ihmisillä todettu epigeneettisen informaation jääminen iPS-soluihin niiden valmistusvaiheessa, mikä heikentää niiden kykyä erilaistua (Welter ym. 2014, 787–788; Hartmann ym. 2016, 18). Erilaistumisen aikana on saatanut olla ongelmia myös solun rakenteellisessa kehityksessä, koska solut eivät sykkineet erilaistuksen päätyttyä. Lieberman & Marks (2013) mukaan supistuesaan solu hyödyntää muun muassa troponiini-C:tä ja -I:tä sekä ohuita ja paksuja filamentteja. Näiden komponenttien rakennegeenejä aktivoivien GATA-transkriptiotekijöiden, SRF:n sekä Nkx2-5 ja Tbx5 -transkriptiotekijöiden ilmentymisessä

solussa on saattanut olla ongelmia, jotka ovat johtaneet solujen puutteelliseen erilaistumiseen (Mummery ym. 2012, 346). Koska sydänerilaistumisen loppuvaihe on spontaani ja kaikkia tekijöitä, jotka käynnistävät muutoksen viimeisen vaiheen sykkiväksi sydänlihassoluksi ei tunneta tarkasti, varmuutta linjan heikon erilaistumisen syystä on vaikea todentaa (Rajala ym. 2011, 3).

Toisena ongelmana olivat vähäiset solumäärät rikastuksen alussa, sillä soluja oli kuollut erilaistamisen aikana. Soluja kuoli etenkin IWP-4 -reagenssin poistamisen jälkeen, joka inhiboi sydänerilaistusta inhiboivaa WNT/ β -katenin -signalointireittiä (Lian ym. 2013, 2–3). Inhiboivan reagenssin poistamisen jälkeen solujen erilaistumista edesauttava tekijä poistui ja nopea muutos solujen kasvatusolosuhteissa saattoi vaikuttaa soluihin niitä kuolettavasti. Rikastuksen alkuun kerättävää solumäärä voisi mahdollisesti kasvattaa IWP-4 -reagenssin asteittaisella poistamisella erilaistusmediumien vaihdon yhteydessä, jolloin kasvatusolosuhteissa ei tapahtuisi niin nopeaa muutosta pienellä aikavälillä. Lisäksi dissosiointipuskurin eli soluryppäiden hajotuspuskurin vaihtamisella tehokkaampaan aivan erilaistuksen alussa saattaisi olla positiivisia vaikutuksia rikastusta varten jäljelle jäävien solujen määrään. Opinnäytetyössä käytössä ollut dissosiointikit Multi Tissue Dissociation Kit 3 (Miltenyi Biotec) ei hajottanut soluaggregaatteja täysin ja hajoamattomat soluaggregaatit suodatettiin pois seuraavassa vaiheessa, jolloin solumäärä jäi potentiaaliaan vähäisemmäksi. Solumäärää parantavana toimenpiteenä solut voisi jatkossa kerätä kasvatuskuoppalevyiltä suoraan 15 ml:n putkeen (Sarstedt) solujen hajotusta varten. Tällöin ensimmäisten pesuvaiheiden nesteet voitaisiin poistaa supernatanttina sentrifugoinnin jälkeen eikä soluaggregaattien keskeltä, mikä olisi huomattavasti vähemmän riskialttiimpaa solujen häviämisen kannalta.

Soluja hävisi suuria määriä rikastuksen esikäsitteilyvaiheiden aikana, mikä oli kolmas työn suorituksen ongelma. Tulosten perusteella (taulukko 16) havaittiin, että soluja hävisi MojoSort™-magneettirikastusmenetelmässä enemmän kuin MACS®-magneettirikastusmenetelmässä. Rikastusprotokolla on useine pesuineen soluille melko rankka, ja siksi osa soluista hajoaa ja kuolee sen suorittamisen aikana. Osa tästä kuolleesta ja hajonneesta solumäärästä huuhtoutuu pois pesujen aikana. Hävinneiden solujen suureen määrään saattaa vaikuttaa sentrifugoinnin nopeus, sillä liian hitaalla sentrifugoinnilla solut eivät muodosta kunnol-

lista pellettiä ja ne huuhtoutuvat supernatanttia poistettaessa pois. Kierrosnopeuden lisääminen sentrifugoinnissa saattaisi lisätä jäljelle jäävien solujen määrää, koska silloin pelletti muodostuisi varmemmin. Nopeutta tulisi kuitenkin lisätä maltillisesti, jotta solut eivät vaurioituisi ja jotta ne pysyisivät elinkykyisinä. Supernatantin poispipetointitarkkuudella on oletettavasti myös vaikutusta solujen häviämiseen. Solujen häviämistä voidaan siis estää huolellisemmalla pipetoinnilla ja mahdollisesti nopeammalla sentrifugoinnilla.

Tekniset työn suoritukseen vaikuttavat ongelmat olivat ensimmäisen soluerän käsittelyssä tapahtunut solujen paakkuuntuminen puskurin lisäämisen jälkeen ja saman erän virtaussytometrianäytteiden yön yli värjääminen, värjäysreagenssin puutteen vuoksi. Lisäksi soluerä kolme rikastettiin joitakin päiviä myöhemmin kuin muut soluerät, jolloin solut olivat rikastuspäivänä muiden erien soluja vanhempia. Edellä mainitut ongelmat eivät kuitenkaan vaikuttaneet työn tuloksiin. Vaikka tässä tutkimuksessa muutaman päivän ikäerolla solulinjojen välillä ei ollut merkitystä työn tuloksiin, paremman rikastustehokkuuden saamiseksi voisi olla hyödyllistä tutkia rikastettavien solujen iän vaikutusta rikastustehokkuuteen. Lundyn ym. (2013) tutkimuksen mukaan solujen ikä vaikuttaa solujen kypsyysasteeseen, jolloin solujen iällä voi olla vaikutusta myös rikastustehokkuuteen solun kypsyessä enemmän aikuista sydänlihassolua muistuttavaksi pidemmän viljelyn aikana (Lundy ym. 2013.)

Virtaussytometrillä ja Neubauer-laskentakammiolla saatuihin tuloksiin voi mahdollisesti vaikuttaa rikastusta varten suoritettujen esikäsittelyjen tekeminen molemmissa menetelmissä hyödyntäen MACS[®]:n kaupallisia kittejä. Vaikka laitevalmistajan mukaan käytetyt kaupalliset kitit soveltuivat käytettäväksi kummallakin rikastusmenetelmällä, olisi MojoSort[™]:a varten kehitetyillä kiteillä voinut saada erilaisia tuloksia. Tulee kuitenkin huomioida, että opinnäytetyössä oli tarkoitus vertailla rikastukseen käytettäviä magneetteja eikä esikäsittelymenetelmiä. Lisäksi tuloksiin saattaa vaikuttaa opinnäytetyössä rikastuksessa käytetty negatiivinen selektiotapa. Negatiivisessa selektiossa ei leimata kohdesoluja, ja siten ne pääsevät mediumin mukana kulkeutuvien pienaineiden ja magneettileimoihin tarttumattomien ei-sydänlihassolujen mukana rikastuksesta läpi (Bio Legend – MojoSort 2020). Tulevaisuudessa rikastuksen tuloksien parantamiseksi tulisi harkita vaihtoehtona myös positiivista selektiota tai sen lisäämistä negatiivisen selektion

rinnalle, kuten PCS-Derived Cardiomyocyte Isolation Kit, human (Miltenyi Biotecs) -kitin käyttöoppaassa suositellaan (Miltenyi Biotec n.d. PCS-derived...). Haittana positiivisessa selektiossa on kuitenkin mahdollinen kohdesolujen vahingoittuminen magneettileiman kiinnittyessä niihin.

Kehitettävänä toimenpiteinä uusissa tutkimuksissa näiden kahden magneettirikastimen välillä tulee kiinnittää huomiota erilaistumiskykyisen iPS-solulinjan valintaan ja näytteiden huolellisiin ja tarkkoihin pesuihin, jotta voidaan välttyä solujen ylimääräiseltä häviämiseltä rikastuksen aikana. Lisäksi rikastustehokkuuden analysointia varten kaikista näyte-eristä tulisi kerätä analysoitavaksi myös magneettileimalla leimatut solut. Jatkotutkimusaiheina tämän työn perusteella voisi selvittää toisen solulinjan huonoon erilaistumiskykyyn vaikuttavia tekijöitä ja onko erilaistumistehokkuudella vaikutusta magneettirikastimien rikastustehokkuuteen. Lisäksi erilaistusmenetelmien eri esikäsitelymenetelmien vaikutuksia rikastamiseen olisi kannattavaa tutkia.

Opinnäytetyön tavoitteena oli vertailla sydänlihassolujen rikastamiseen käytettäviä rikastusmagneetteja, mutta tavoitteeseen ei kaikilla osa-alueilla päästy. Tutkimuksen perusteella saatiin alustavaa tietoa magneettirikastusmenetelmistä ja tekijöistä, joiden avulla sydänlihassolujen rikastusta Sydänryhmässä voidaan kehittää. Sydänryhmän tekemä työ on osa laajempaa tutkimusta iPS-solujen ja tautimallinnusten saralla. Tämä tutkimusala on nopeasti kehittyvä ja siksi tämän opinnäytetyön kaltaiset ajankohtaiset tutkimukset ovat tärkeässä osassa laboratoriotason käytännön toiminnan virtaviivaistamisessa ja tehostamisessa.

LÄHTEET

Aalto-Setälä, K. 2020. Physiology, Heart Group. Tampere University. Luettu 17.03.2020. <https://research.uta.fi/heart-group/suomeksi/>

Acimovic, I., Vilotic, A., Pesl, M., Lacampagne, A., Dvorak, P., Rotrekl, V. & Meli, A. C. 2014. Human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as research and therapeutic tools. *BioMed research international* 512831.

Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y. & Nalbant, A. 2017. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology* 37 (2), 163–176 .

Amos, P.J., Cagavi Bozkulak, E. & Qyang, Y. 2011. Methods of cell purification: a critical juncture for laboratory research and translational science. *Cells, tissues, organs* 195 (1-2), 26–40.

Artyukhov, A.S., Dashinimaev, E.B., Tsvetkov, V.O., Bolshakov, A.P., Konovalova, E.V., Kolbaev, S.N., Vorotelyak, E.A. & Vasiliev, A.V. 2017. New genes for accurate normalization of qRT-PCR results in study of iPS and iPS-derived cells. *Gene* 626, 234–240.

Baghbaderani, B.A., Syama, A., Sivapatham, R., Ying, P., Mukherjee, O., Fellner, T., Zeng, X. & Rao, M.S. 2016. Detailed characterization of human induced pluripotent stem cell manufactured for therapeutic applications. *Stem Cell Rev.* 12, 394–420.

BD Biosciences. n.d. BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit. Käyttöohje. Luettu 04.04.2020. https://www.bdbiosciences.com/ds/pm/ot-hers/554714_554715_555028_Book_Website.pdf

BD Biosciences. 2020. BD FACSAria™ III. Luettu 29.04.2020. <https://www.bdbiosciences.com/en-us/instruments/research-instruments/research-cell-sorters/facsaria-iii>

Becker, A., McCulloch, E. & Till, J. 2014. Pillars article: Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963. 197:452-454. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. 1950) 192 (11), 4945–4947.

Bedada, F. B., Wheelwright, M. & Metzger, J. M. 2016. Maturation status of sarcomere structure and function in human iPSC-derived cardiac myocytes. *Biochimica et biophysica acta*, 1863 (7 Pt B), 1829–1838.

New England Bio Labs. 2018. Monarch® Total RNA Miniprep Kit. Käyttöohje. Luettu 05.04.2020. <https://international.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manu-alt2010.pdf?rev=789588efee9a41de8e113c3b52ce4572&hash=9F693B386CF24185CF06F86BDAC6578EE1F1D8BF>

Bio Legend – MojoSort. 2020. MojoSort, Applications and Data. Luettu 17.04.2020. <https://www.biolegend.com/en-us/mojosort>

Bio Legend, 2020. MojoSort™ Streptavidin Nanobeads Protocol - Negative Selection. Käyttöohje. Luettu 25.3.2020. <https://www.biolegend.com/en-us/protocols/mojosort-streptavidin-nanobeads-protocol-negative-selection>

Biomeditech. n.d. Accuri C6 Flow Cytometer Instrument Manual. Käyttöohje. Luettu 29.3.2020. https://biomeditech.fi/wp-content/uploads/2017/04/Accuri_C6_InstrumentManual.pdf

Burridge, P. W., Keller, G., Gold, J. D. & Wu, J. C. 2012. Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell* 10 (1), 16–28.

Bustin, S.A. 2004. Chapter 3: A-Z of quantitative PCR. International University Line, La Jolla, California.

Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsuyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., Khvorostov, I., Ott, V., Grunstein, M., Lavon, N., Benvenisty, N., Croce, C.M., Clark, A.T., Baxter, T., Pyle, A.D., Teitell, M.A., Pelegri, M., Plath, K. & Lowry, W.E. 2009. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5 (1), 111–123.

Cytiva. 2020. Percoll density gradient media. Luettu 29.04.2020. <https://www.cytivalifesciences.com/en/cg/shop/cell-therapy/media/percoll-density-gradient-media-p-05823?current=17089109>

Deng, X.Y., Wang, H., Wang, T., Fang, X.T., Zou, L.L., Li, Z.Y. & Liu, C.B. 2015. NonViral Methods for Generating Integration-Free, Induced Pluripotent Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy* 10 (2), 153–158.

Didar, T.F. & Tabrizian, M. 2010. Adhesion based detection, sorting and enrichment of cells in microfluidic Lab-on-Chip devices. *Lab Chip* 10 (22), 3043-3053.

Dittel B. N. 2010. Depletion of specific cell populations by complement depletion. *Journal of visualized experiments. JoVE* (36), 1487.

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K. & Hasegawa, M. 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85 (8), 348–362.

Hartman, M. E., Dai, D. F. & Laflamme, M. A. 2016. Human pluripotent stem cells: Prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for in vitro modeling and cell-based cardiac repair. *Advanced drug delivery reviews* 96, 3–17.

Hattori, F., Chen, H., Yamashita, H., Tohyama, S., Satoh, Y., Yuasa, S., Li, W., Yamakawa, H., Tanaka, T., Onitsuka, T., Shimoji, K., Ohno, Y., Egashira, T., Kaneda, R., Murata, M., Hidaka, K., Morisaki, T., Sasaki, E., Suzuki, T., Sano, M., Makino, S., Oikawa, S. & Fukuda, K. 2010. Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nature Methods*, 7 (1), 61–66.

Herron, T., Monteiro da Rocha, A. & Campbell, K. 2017. Cardiomyocyte purification from pluripotent stem cells. Miltenyi Biotec. Luettu 29.04.2020. <https://www.miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0019217.PDF>

ISSR - International Society for Stem Cell Research. 2020. Stem Cell Facts. Luettu 11.04.2020. <https://www.closerlookatstemcells.org/wp-content/uploads/2018/10/stem-cell-facts.pdf>

Karakikes, I., Ameen, M., Termglinchan, V. & Wu, J. C. 2015. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and functional phenotypes. *Circulation research* 117 (1), 80–88.

Karakikes, I., Senyei, G.D., Hansen, J., Kong, C.W., Azeloglu, E.U., Stillitano, F., Lieu, D.K., Wang, J., Ren, L., Hulot, J.S., Iyengar, R., Li, R.A. & Hajjar, R.J. 2014. Small molecule-mediated directed differentiation of human embryonic stem cells toward ventricular cardiomyocytes. *Stem cells translational medicine* 3 (1), 18–31.

Kawamura, T., Miyagawa, S., Fukushima, S., Maeda, A., Kashiyama, N., Kawamura, A., Miki, K., Okita, K., Yoshida, Y., Shiina, T., Ogasawara, K., Miyagawa, S., Toda, K., Okuyama, H. & Sawa, Y. 2016. Cardiomyocytes Derived from MHC-Homozygous Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Reduced Allogeneic Immunogenicity in MHC-Matched Non-human Primates. *Stem Cell Reports* 6 (3), 312–320.

Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R. & Kim, K.S. 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4 (6), 472–476.

Lappi, H. laboratorioanalyttikko. 2019. Suullinen tiedonanto. 17.12.2019

Lian, X., Zhang, J., Azarin, S., Zhu, K., Hazeltine, L., Bao, X., Hsiao, C., Kamp, T. & Palecek, S. 2013. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nature Protocols* 8, 162–175.

Lieberman, M. & Marks, A. D. 2013. *Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approach*. 4. painos. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.

Lundy, S. D., Zhu, W. Z., Regnier, M. & Laflamme, M. A. 2013. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem cells and development*, 22(14), 1991–2002.

Manzini, S., Viiri, L.E., Marttila, S. & Aalto-Setälä, K. 2015. A Comparative View on Easy to Deploy non-Integrating Methods for Patient-Specific iPSC Production. *Stem Cell Rev and Rep* 11, 900–908.

Miltenyi Biotec. n.d. Dissociation of PSC derived cardiomyocytes using the Multi Tissue Dissociation Kit 3. Käyttöohje. Luettu 04.04.2020. <https://www.miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0015572.PDF>

Miltenyi Biotec. n.d. PSC-Derived Cardiomyocyte Isolation Kit human. Käyttöohje. Luettu 04.04.2020. https://www.miltenyibiotec.com/Resources/Persistent/af9624c0a7fc854576bc5d081a6f637fce1b854d/DS_PSC-Derived%20Cardiomyocyte%20Isolation%20Kit_h.pdf

Mummery, C., Zhang, J., Ng, E., Elliott, D., Elefanty, A. & Kamp, T. 2012. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes: A Methods Overview. *Circulation Research* 111, 344–358.

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

O'Brien, C., Lamshead, J., Chy, H., Zhou, Q., Wang, Y. & Laslett, A. 2012. Chapter 15 - Analysis and Purification Techniques for Human Pluripotent Stem Cells. In *Human Stem Cell Manual*. Second Edition, 223–248.

Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K-I, Shibata, T., Kunisada, T., Takahashi, M., Takahashi, J. Saji, H. & Yamanaka, S. 2011. A more efficient method to generate integration-free human iPSCs. *Nat Methods* 8 (5), 409–412.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322 (5903), 945–953.

Rajala, K., Pekkanen-Mattila, M. & Aalto-Setälä, K. 2011. Cardiac differentiation of pluripotent stem cells. *Stem cells international*, 383709.

Ribeiro, A. J., Ang, Y. S., Fu, J. D., Rivas, R. N., Mohamed, T. M., Higgs, G. C., Srivastava, D. & Pruitt, B. L. 2015. Contractility of single cardiomyocytes differentiated from pluripotent stem cells depends on physiological shape and substrate stiffness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (41), 12705–12710.

Robertson, C., Tran, D. & George, S. 2013. Concise Review: Maturation Phases of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells* 31, 829–837.

Sarantitis, I., Papanastasopoulos, P., Manousi, M., Baikoussis, N. G. & Apostolakis, E. 2012. The Cytoskeleton of the Cardiac Muscle Cell. *Hellenic Journal of Cardiology* 53 (5), 367–379.

Skaper, S. D. 2012. Neurotrophic Factors : Methods and Protocols.

Skottman, H. & Seppänen, R. 2014. Ihmisen kantasolut - ihmeeparantajat? Aika-kausikirja Duodecim 130 (19). Luettu 09.04.2020. <https://www.duodecimlehti.fi/duo11877>

Smith, A. S., Macadangdang, J., Leung, W., Laflamme, M. A. & Kim, D. H. 2017. Human iPSC-derived cardiomyocytes and tissue engineering strategies for disease modeling and drug screening. Biotechnology advances 35 (1), 77–94.

Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G. & Hochedlinger, K. 2008. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. Science 322 (5903), 945–949.

Stemcell. 2020. SepMate™ PBMC Isolation. Luettu 29.04.2020. <https://www.stemcell.com/products/brands/sepmate-pbmc-isolation.html>

Takahashi, K. & Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell Stem Cell 126 (4), 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 Stem Cell 131 (5), 861-872.

Takahashi, T., Lord, B., Schulze, PC., Fryer, RM., Sarang, SS., Gullans, SR. & Lee, RT. 2003. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. Circulation 107 (14), 1912–1916.

Tchieu, J., Kuoy, E., Chin, M.H., Trinh, H., Patterson, M., Sherman, S.P., Aimiwu, O., Lindgren, A., Hakimian, S., Zack, J.A., Clark, A.T., Pyle A.D., Lowry, W.E. & Plath, K. 2010. Female human iPSCs retain an inactive X chromosome. Cell Stem Cell 7 (3), 329–342.

Thermo Fisher Scientific. n.d. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Käyttöohje. Luettu 05.04.2020. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017977_highcap_cDNA_RT_UG.pdf

Thermo Fisher Scientific. n.d. How a flow cytometer works. Luettu 02.04.2020. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html>

Thermo Fisher Scientific. n.d. R-phycoerythrin (R-PE). Luettu 29.3.2020. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/r-phycoerythrin.html>

Tiscornia, G., Vivas, E.L. & Izpisua-Belmonte, J.C. 2011. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. Nature Medicine 17 (12), 1570–1576.

Ueno, S., Weidinger, G., Osugi, T., Kohn, A., Golob, J., Pabon, L., Reinecke, H., Moon, R. & Murry, C. 2007. Biphasic role for Wnt/ β -catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *PNAS* 104 (23), 9685–9690.

Wakui, T., Matsumoto, T., Matsubara, K., Kawasaki, T., Yamaguchi, H. & Akutsu, H. 2017. Method for evaluation of human induced pluripotent stem cell quality using image analysis based on the biological morphology of cells. *J Med Imaging (Bellingham)* 4 (4), 044003.

Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., Daley, G.Q., Brack, A.S., Collins, J.J., Cowan, C., Schlaeger, T.M. & Rossi, D.J. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7 (5), 618–630.

Weltner, J., Trokovic, R. & Otonkoski, T. 2014. Indusoidut pluripotentit kantasolut lääketieteellisessä tutkimuksessa, Aikauskirja Duodecim 130 (8). Luettu 09.04.2020. <https://www.duodecimlehti.fi/lehti/2014/8/duo11597>

Yamanaka, S. 2007. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 1 (1), 39–49.

Yamanaka, S. 2012. Induced pluripotent stem cells: past, present and future. *Cell Stem Cell* 10 (6), 678–684.

Yang, X., Pabon, L. & Murry, C. E. 2014. Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circulation research*, 114(3), 511–523.

Yoshida, Y. & Yamanaka, S. 2017. Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later. *Circulation Research* 120, 1958–1968.

Yu J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I. & Thomson, J. A. 2007. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318 (5858), 1917–1920.

Zhao, T., Zhang, Z.N., Rong, Z. & Xu, Y. 2011. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474, 212–215.

LIITTEET

Liite 1. Työssä käytetyt mediumit ja erotuspuskuri

KSR-mediumi, 50 ml

38,75 ml KO-DMEM (Gibco®)
10 ml KO-SR (Gibco®)
0,5 ml NEAA (Gibco®)
0,5 ml Glutamax (Ginco®)
0,25 ml PenStrep (Lonza)
98 µl β-mercaptoetanol (Gibco®)
26 µl FGF (juuri ennen käyttöä)

RPMI-mediumi, 50 ml

48,75 ml RPMI (Gibco®)
1 ml B27 (ThermoFisher)
0,25 ml PenStrep (Lonza)

EB 20% mediumi, 50 ml

38,75 ml KO-DMEM (Gibco®)
10 ml FBS (Gibco®)
0,5 ml NEAA (Gibco®)
0,5 ml Glutamax (Gibco®)
0,25 ml PenStrep (Lonza)

MTeSR1-mediumi, 500 ml

400 ml MTeSR1 (Stemcell)
100 ml MTeSR1 5x Supplement (Stemcell)

Erotuspuskuri, 50 ml

47,1 ml DPBS (Lonza)
2,5 ml (=0,5%) BSA (bovine serum albumin)
0,037 g EDTA
Säädä pH 7.2, suodata ja säilytä +4 °C

Liite 2. Työssä käytetyt värjäysreagenssit**Blokkausliuos, 10 ml**

250 µl 4% TritonX-100 (Sigma-Aldrich)
1 ml 10 % BSA (Sigma-Aldrich)
1 ml NDS (normal donkey serum) (Millipore)
7,75 ml DPBS (Lonza)

Primääriliuos/pesuliuos 1, 20 ml

0,5 ml 4 % TritonX-100 (Sigma-Aldrich)
2 ml 10 % BSA (Sigma-Aldrich)
200 µl NDS (Millipore)
17,3 ml DPBS (Lonza)

Sekundääriliuos/pesuliuos 2, 50 ml

5 ml 10 % BSA (Sigma-Aldrich)
45 ml DPBS (Lonza)

Fosfaattipuskuri (PB)

A stock	NaH ₂ PO ₄	27,6 g
	dH ₂ O	1000 ml
B stock	Na ₂ HPO ₄	28,6 g
	dH ₂ O	1000 ml

Työliuos (PB), 100 ml

1,15 ml A stock
3,85 ml B stock
95 ml dH₂O