



**SANDWICH-
ERILAISTUSMENETELMÄN
OPTIMOINTI KAHDELLE IHMISEN
iPS-SOLULINJALLE JA
ERILAISTETTUJEN
SYDÄNLIHASSOLUJEN
KARAKTERISOINTI**

Heidi Peussa

Opinnäytetyö
Joulukuu 2012
Laboratorioala

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

HEIDI PEUSSA:

Sandwich-erilaistusmenetelmän optimointi kahdelle ihmisen iPS-solulinjalle ja erilaistettujen sydänlihassolujen karakterisointi

Opinnäytetyö 59 sivua, joista liitteitä 1 sivu
Joulukuu 2012

Pluripotentteja kantasoluja voidaan erilaistaa sydänlihassoluiksi useilla eri menetelmillä. Erilaistettujen sydänlihassolujen avulla voidaan tutkia sydänsairauksia ja kehittää tautimalleja lääketestauksiin. Tulevaisuudessa potilaan omista soluista erilaistettuja sydänlihassoluja voidaan mahdollisesti käyttää kudosisvaurioiden korjaamiseen. Tutkimuksen tavoitteena oli ottaa käyttöön sandwich-erilaistusmenetelmä opinnäytetyöpaikalla. Tarkoituksena oli optimoida menetelmä kahdelle solulinjalle ja karakterisoida erilaistettuja sydänlihassoluja. Sandwich-erilaistusmenetelmällä kantasolut ohjataan erilaistumaan sydänlihassoluiksi mattomaisena kerroksena kasvutekijöiden avulla. Erilaistaminen tapahtuu matriksikerrosten välissä.

Optimoitaville uudelleenohjelmoiduille kantasolulinjoille määritettiin menetelmän kannalta parhaiten toimiva solupitoisuus ja passage. Erilaistuneita soluja karakterisoitiin tutkimalla proteiinien ilmentymistä immunosytokemiallisten värjäysten avulla ja geenien ilmentymistä kvantitatiivisen reaaliaikaisen polymeraasiketjureaktion avulla.

Toisella tutkituista linjoista saatiin erilaistettua yksisolukerroksena sykkiviä alueita, mutta toisella erilaistumista ei havaittu kertaakaan. Menetelmän toistettavuus oli heikko ja se oli hyvin herkkä passagen ja solupitoisuuden muutoksille. Jotta menetelmä voitaisiin ottaa käyttöön, sen optimoimista täytyy vielä jatkaa. Tulevaisuudessa menetelmää voitaisiin tutkia useammilla solulinjoilla, sillä tämän tutkimuksen otos oli hyvin pieni.

Asiasanat: kantasolu, iPS-solu, erilaistuminen, aktiviini A, BMP-4.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Science

PEUSSA, HEIDI:

Optimisation of Sandwich Differentiation Method for Two Human iPS Cell Lines and Characterisation of Differentiated Cardiomyocytes

Bachelor's thesis 59 pages, appendices 1 page
December 2012

Pluripotent stem cells can be differentiated into cardiomyocytes by several different methods. Differentiated cardiomyocytes can be used for studying cardiac diseases and for creating cell models for drug testing. In the future, cardiomyocytes differentiated from patient-derived cells may also be used in tissue repair. The objective of this study was to introduce the sandwich differentiation method in the Cardiology Research group. The purpose was to optimise the method for two cell lines and to characterise the differentiated cells. This method uses growth factors to direct stem cells to differentiate into a monolayer of cardiomyocytes. The differentiation is carried out between matrix layers.

The two induced pluripotent stem cell lines were studied in order to find the most efficient cell density and passage. The differentiated cells were characterised by studying their protein expression using immunocytochemical staining and gene expression using quantitative real-time polymerase chain reaction.

Areas of beating monolayer were achieved with one cell line, but with the other cell line no differentiation was observed. The repeatability of the method was weak and it was highly sensitive to alterations in passage and cell density. The method requires further optimisation in order for it to be taken into use. In the future, the method could be further studied with multiple cell lines, as in this study the sampling was very scarce.

Key words: stem cell, iPS-cell, differentiation, activin A, BMP-4.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	TEORIATAUSTA.....	8
2.1	Kantasolut	8
2.1.1	Kantasolutyyppit	8
2.1.2	iPS-solut	9
2.2	Sydänlihassolut	10
2.3	Sydänlihassolujen erilaistus	11
2.4	Sydänlihassolujen karakterisointi	12
2.4.1	Sydänlihassoluille ominaiset geenit	12
2.4.2	Sydänlihassolujen karakterisointimenetelmät.....	14
2.4.3	Immunosytokemialliset värjäykset.....	15
2.4.4	Polymeraasiketjureaktio	16
2.5	Kantasolujen ja sydänlihassolujen kasvatus	22
2.5.1	Soluviljely	22
2.5.2	BD Matrigel™ kantasolujen viljelyssä	23
3	OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS.....	25
4	TYÖN SUORITUS	26
4.1	Kantasolulinjat	26
4.2	Mediumit.....	26
4.3	Kantasolulinjojen ylläpito ja sydänlihassolujen erilaistaminen sandwich- menetelmällä	27
4.3.1	Kasvatusalustojen päällystys BD Matrigel™:llä	27
4.3.2	Solujen jakaminen.....	27
4.3.3	Erilaistumattomien solulinjojen ylläpito	29
4.3.4	Erilaistaminen sandwich-menetelmällä	29
4.3.5	Solujen pakastus.....	31
4.4	Erilaistettujen solujen immynosytokemiallinen värjäys	31
4.5	Geenien ilmentymisen tutkiminen q-PCR:lla	34
4.5.1	RNA:n eristys.....	34
4.5.2	RNA:n käntö cDNA:ksi	36
4.5.3	Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio	38
5	TULOKSET	41
5.1	Passagen ja solupitoisuuden vaikutus erilaistukseen	41
5.2	Solujen immunosytokemialliset värjäykset	44
5.3	Kvantitatiivinen PCR.....	48
	POHDINTA	50

LÄHTEET	54
LIITTEET	59
Liite 1. Mediumien valmistusohjeet	59

LYHENTEET JA TERMIT

Adherentti solu	Solu, joka on kiinnittynyt kasvualustan pohjaan.
Aktiviini A	TGF- β -geeniperheeseen kuuluva kasvutekijä.
Antigeeni	Proteiini, jonka pinnalla olevan epitoopin vasta-aine tunnistaa.
bFGF	Basic fibroblast growth factor, emäksinen fibroblastikasvutekijä.
BMP-4	Bone morphogenetic protein 4, luun morfogeeninen proteiini 4, TGF- β -geeniperheeseen kuuluva kasvutekijä.
cDNA	Komplementaarinen DNA.
ECC	Embryonic carcinoma cell, embryonaalinen karsinoomasolu.
EGC	Embryonic germ cell, sikiön itusolu.
Epitoooppi	Antigeenin osa, johon vasta-aine sitoutuu.
ESC	Embryonic stem cell, alkion kantasolu.
Feeder-solu	Tarvittavia kasvutekijöitä erittäviä soluja, joiden päällä toisia soluja kasvatetaan.
G ₀ -vaihe	Solun elinkierron vaihe, jossa solu on poistunut solusyklistä.
Glykoproteiini	Proteiini, johon on liittynyt hiilihydraattiryhmä.
<i>in vitro</i>	Elävän organismin ulkopuolella suoritettu koe.
<i>in vivo</i>	Elävässä organismissa tehty koe.
iPSC	Induced pluripotent stem cell, uudelleenohjelmoitu kantasolu.
Konfluenssi	Solustiheys kasvatusmaljalla.
Monolayer	Yksisolukerros.
Passage	Solulinjan jakamiskertojen määrä.
Solusykli	Koostuu interfaasista, eli vaiheista, joissa solu valmistautuu jakautumaan, sekä mitoosista.
Somaattinen solu	Kaikki solut paitsi kanta- ja sukusolut.
Suspensiosolu	Solu, joka kasvaa kiinnittymättömänä kasvatusmaljan pohjaan.
TGF- β	Transforming growth factor β , transformoiva kasvutekijä β , kasvutekijäperhe.

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston Biolääketieteellisen teknologian yksikössä Katriina Aalto-Setälän (LT) johtamassa sydäntutkimusryhmässä. Opinnäytetyön ohjasivat Mari Pekkanen-Mattila (FT, tutkijatohtori) ja Henna Venäläinen (laboratorioanalyttikko).

Sydänryhmän tutkimus keskittyy sydänlihassolujen erilaistusmenetelmien ja kasvatusympäristön kehittämiseen sekä muutamien geenimutaation aiheuttamien sydänsairauksien tutkimiseen. Sydänsairauksista tehdään perustutkimusta solutasolla ja taudeille pyritään kehittämään tautimallit, joita voidaan käyttää lääketestauksissa ja sairauksien tutkimisessa. Lisäksi tulevaisuudessa sydämen kudოსvaurioita voidaan mahdollisesti korjata kantasoluista tuotetuilla sydänlihassoluilla.

Sydänlihassoluja voidaan erilaistaa kantasoluista useilla eri menetelmillä. Tällä hetkellä IBT:n sydänryhmässä käytetään erilaistukseen pääosin END-2-menetelmää. Siinä kantasoluja kasvatetaan hiirestä peräisin olevien END-2-solujen päällä, mikä saa solut erilaistumaan sydänlihassoluiksi.

Sandwich-erilaistusmenetelmässä ei käytetä feeder-soluja, vaan mediumiin lisätään tiettyjä kasvutekijöitä, joilla solut ohjataan erilaistumaan sydänlihassoluiksi. Kirjallisuuden perusteella sandwich-menetelmä on END-2-menetelmää tehokkaampi sydänlihassolujen erilaistamisessa. Lisäksi sandwich-menetelmällä päästäisiin eroon eläinperäisten solujen käytöstä erilaistuksessa.

Opinnäytetyön tavoite on ottaa sydänryhmän käyttöön uusi sandwich-erilaistusmenetelmä sydänlihassolujen erilaistusta varten. Tarkoituksena on optimoida menetelmä kahdelle ihmisen iPS-solulinjalle ja karakterisoida erilaistettuja soluja.

2 TEORIATAUSTA

2.1 Kantasolut

Kantasolut ovat soluja, joilla on kyky joko jakautua rajattomasti säilyen kantasoluna tai erilaistua miksi tahansa aikuisen yksilön solutyypiksi (Sylvester & Longaker 2004, 94). Ne voidaan luokitella totipotentteiksi, pluripotentteiksi ja multipotentteiksi. Totipotentteja kantasoluja esiintyy ainoastaan munasolun muutaman ensimmäisen jakautumiskerran ajan. Niistä muodostuu sekä alkio että istukka ja sikiökalvot. Varsinaisen alkion kantasolut ovat pluripotentteja, eli ne pystyvät erilaistumaan kaikiksi yksilön eri solutyypeiksi, mutta istukkaa ja sikiökalvoja niistä ei enää voi muodostua. (National Institute of Health 2001, 1.)

Aikuisenkin yksilön kudoksissa esiintyy kantasoluja, joita tarvitaan uusien solujen tuottamiseen tai kudoksen korjaamiseen (Passier & Mummery, 2002, 324). Aikuisen kantasolut ovat yleensä multipotentteja, eli ne voivat erilaistua vain tietyiksi solutyypeiksi. Esimerkiksi ihmisen luuytimessä on multipotentteja kantasoluja, jotka voivat erilaistua vain veren ja immuunipuolustuksen soluiksi. (Sylvester & Longaker 2004, 96.)

Solut voidaan tunnistaa pluripotentteiksi kantasoluiksi tutkimalla tiettyjä markkereita, joiden ilmentyminen on ominaista pluripotentteissa kantasoluissa, mutta ei erilaistuneissa soluissa. Yleisesti käytettyjä markkereita ovat esimerkiksi OCT4, Sox2, Nanog, SSEA-4, TRA-1-60 ja TRA-1-81. OCT4, Sox2 ja Nanog ovat pluripotenssia ylläpitäviä transkriptiotekijöitä, ja SSEA-4 sekä TRA-1-60 ja -1-81 ovat pluripotentteille kantasoluille ominaisia pintamarkkereita. (Hoffman & Carpenter 2005, 701.)

2.1.1 Kantasolutyypit

Kantasoluja voidaan eristää alkioista, sikiöstä tai aikuisesta yksilöstä (Passier & Mummery 2002, 324). Lisäksi kantasoluja voidaan uudelleenohjelmoida somaattisista soluista (Takahashi & Yamanaka 2006, 663). Uudelleenohjelmoiduista kantasoluista (induced Pluripotent Stem Cell, iPS) on kerrottu tarkemmin luvussa 2.1.2 (s. 9).

Pluripotentteja alkion kantasoluja (Embryonic Stem Cell, ESC) eristetään noin neljä päivää munasolun hedelmöittymisen jälkeen alkiorakkulan sisäsolumassasta. Multipotentteja sikiön itusoluja (Embryonic Germ Cell, EGC) puolestaan saadaan 5-7 viikon ikäisten sikiöiden sukurauhasista. ESC- ja EGC-soluja on eristetty muun muassa ihmisestä ja hiirestä. (Donovan & Gearhart 2001, 92.)

Embryonaaliset karsinoomasolut (Embryonal Carcinoma Cell, ECC) ovat aikuisen yksilön teratokarsinoomasta eristettyjä pluripotentteja kantasoluja. Teratokarsinooma on sukurauhasissa esiintyvä kasvain, joka sisältää sekä somaattisia soluja että kantasoluja. ECC-solut ovat kasvainten kantasoluja. ECC-soluja on eristetty hiirestä ja ihmisestä, yleensä kivesten teratokarsinoomasta. (Andrews, Przyborski & Thomson 2001, 231-233.)

2.1.2 iPS-solut

Uudelleenohjelmoidut kantasolut, eli iPS-solut, ovat kantasolututkimuksen uusin läpimurto. Takahashi ja Yamanaka (2006, 663) onnistuivat ensimmäisinä uudelleenohjelmoimaan iPS-soluja hiiren soluista ja vuotta myöhemmin aikuisen ihmisen fibroblastisoluista (Takahashi, Tanabe, Ohnuki, Narita, Ichisaka, Tomoda & Yamanaka 2007, 861).

Uudelleenohjelmointi tapahtuu siten, että kohdesoluun siirretään neljä geeniä virusvektorin avulla ja transfektoituja soluja kasvatetaan ESC-solujen tavoin. Nämä geenit, Oct3/4, Sox2, c-Myc ja Klf4, ovat ESC-soluissa ilmentyviä genejä, jotka ylläpitävät kantasolujen pluripotenssia. Geenien siirto ja kasvatusolosuhteet aikaansaavat sen, että somaattiset solut palaavat takaisin kantasoluasteelle. iPS- ja ECS-solut ovat pitkälti yhtäläisiä muun muassa ulkonäön, jakautumisen, pinta-antigeenien, geenien ilmentymisen ja erilaistumiskyvyn suhteen. (Takahashi ym. 2007, 861.)

iPS-solut mahdollistavat kantasolututkimuksen ilman alkion kantasolujen tuomia eettisiä ongelmia (Takahashi ym. 2007, 861). Lisäksi iPS-solut sisältävät saman genomin kuin se somaattinen solu, josta se uudelleenohjelmoitiin. Tätä ominaisuutta voidaan hyödyntää monien geneettisten sairauksien tutkimuksessa sekä mahdollisesti

tulevaisuudessa soluterapiahoidoissa. Potilaista luotuja iPS-soluja voidaan käyttää tautimalleina lääketestauksissa ja niiden avulla voidaan tutkia sairautta solutasolla. (Park, Arora, Huo, Maherali, Ahfeldt, Shimamura, Lensch, Cowan, Hochedlinger & Daley 2008, 877.)

Tulevaisuudessa iPS-soluja saatetaan käyttää soluterapiahoidoissa käyttämällä potilaan omista soluista ensin uudelleenohjelmoituja ja sitten tarvittavaksi solutyypiksi erilaistettuja soluja. Koska solut olisivat potilaan omia, välttyttäisiin immuunipuolustuksen hylkimisreaktioilta. (Park ym. 2008, 877.) iPS-solujen avulla voitaisiin esimerkiksi korvata sydänkohtauksen sydämeen aiheuttamaa arpikudosta sydänlihassoluilla. Käytännössä iPS-solujen käyttö soluterapiahoidoissa on kuitenkin vielä kaukaista, sillä osa uudelleenohjelmoinnissa käytetyistä geneeistä on syöpägenejä. Lisäksi virusten käyttö geenien siirrossa on riski. (Nishikawa, Goldstein & Nierras 2008, 726.)

2.2 Sydänlihassolut

Alkion kehityksen alkuvaiheessa muodostuu kolme alkiokerrosta: endodermi, ektodermi ja mesodermi. Eri alkiokerrosten soluista muodostuvat tietyt elimet ja solutyypit. Sydänlihassolut ovat peräisin mesodermistä, josta muodostuvat myös muun muassa verisolut, muut lihassolut ja luun solut. (National Institute of Health 2001, 1-2.)

Sydämen soluista vain noin 25 % on sydänlihassoluja, mutta suuren kokonsa vuoksi ne täyttävät 90 % sydämen tilavuudesta. Lihassolujen lisäksi sydämessä on sidekudosta ja verisuonten endoteelikuodsta. Sydänlihassoluissa on yleensä yksi tai muutama tuma ja ne ovat poikkijuovaisia, eli niiden aktiini- ja myosiinisäikeet ovat järjestäytyneet sarkomeereiksi. Lisäksi sydänlihassoluissa on erittäin paljon mitokondrioita, sillä niiden energiatuotanto on lähes täysin aerobista. Sydämen eri osissa sijaitsevat sydänlihassolut eroavat toisistaan hieman esimerkiksi ionikanavien ja sähköisten ominaisuuksien kannalta. (Humpath.com 2003.)

Sydänlihassolut ovat kiinni toisissaan siten, että ne muodostavat verkkomaisen rakenteen (Kettunen 2011). Lisäksi liitoskohdissa on aukkoliitoksia, joiden kautta viestimolekyylit pääsevät kulkemaan suoraan solusta toiseen. Verkkomainen rakenne ja

aukkoliitokset mahdollistavat impulssin erittäin nopean leviämisen koko sydänlihaskudokseen. (Humpath.com 2003.)

Sydänlihassolujen supistuva yksikkö on sarkomeeri, joka koostuu aktiini- ja myosiinisäikeistä. Lihaksen supistuessa myosiini tarttuu aktiiniin ja vetää säikeitä toistensa lomiin. Supistus on troponiinikompleksin välityksellä Ca^{2+} :n säätelemä. (Kettunen 2011.) Sydänlihassolujen erityispiirre on, että ne kykenevät supistumaan spontaanisti ilman ulkoista ärsykettä. Sydämen toiminnan kannalta on kuitenkin oleellista, että sydämen eri alueet supistuvat tietyillä tavoilla oikeassa rytmissä. Tätä sydämen perusrhythmiä ylläpitävät eteiskammiosolmukkeen ja sinussolmukkeen tahdistinsolut. Autonominen hermosto puolestaan voi hidastaa tai kiihdyttää sykettä. Soluviljelmässä havaitaan kuitenkin vain spontaania sykintää. (Marieb 2009, 369.)

2.3 Sydänlihassolujen erilaistus

Sydänlihassolujen erilaistuminen alkaa mesodermin muodostumisesta ja sen täsmentymisestä kardiogeeniseksi mesodermiksi. Kardiogeenisestä mesodermistä erilaistuu ensin sydänlihassolujen edeltäjiä, jotka lopulta kypsyvät sykkiviksi sydänlihassoluiksi. Erilaistuminen on eri vaiheille ominaisten geenien ja niiden koodaamien transkriptiotekijöiden ja viestimolekyylien aikaansaamaa. Geenien aktivaatio puolestaan on useiden tekijöiden, kuten kasvutekijöiden ja toisten geenien, säätelemää. Tarkkaa erilaistumisprosessia ei tunneta kovin tarkasti, mutta kullekin erilaistuksen vaiheelle on löydetty tiettyjä ominaisia genejä. (Rajala, Pekkanen-Mattila & Aalto-Setälä 2011, 2-3.)

Sydänlihassoluja voidaan erilaistaa kantasoluista useilla eri menetelmillä. Päämenetelmiä ovat spontaani erilaistaminen embryoid-body -soluagregaateista (EB), kantasolujen kasvattaminen viskeraali-endodermin kaltaisten (END-2) solujen päällä ja erilaistumisen ohjaaminen tiettyjen kasvutekijöiden avulla. (Rajala ym. 2011, 3-4.) Kasvuolosuhteissa, joissa kantasoluja ei pidetä kantasoluasteella, ne alkavat erilaistua spontaanisti. EB-menetelmässä kantasoluja kasvatetaan ensin suspensiona erilaistuksen sallivassa mediumissa. Tällöin muodostuu EB:ja, eli alkion alkuvaihetta muistuttavia soluryppäitä, joissa havaitaan kaikki kolme alkionkerrosta. Kun EB:t siirretään suspensiosta kasvatusmaljalle, jonka pohjaan EB:t voivat kiinnittyä, havaitaan pian

sykkiviä sydänlihassolualueita. (Kehat, Kenyagin-Karsenti, Snir, Segev, Amit, Gepstein, Livne, Binah, Itskovitz-Eldor & Gepstein 2001, 407-408.)

END-2-menetelmässä kantasoluja kasvatetaan samalla maljalla END-2-solujen päällä. Erilaistusprosessia ei tunneta tarkasti, mutta END-2-solujen läsnäolo ja niiden erittämät viestiaineet saavat kantasolut erilaistumaan sydänlihassoluiksi. (Mummery, Ward-van Oostwaard, Doevendans, Spijker, van den Brink, Hassink, van der Heyden, Opthof, Pera, Brutel de la Riviere, Passier & Leon Tertoolen 2003, 2733.)

Kasvutekijöillä ohjatussa erilaistuksessa kasvutekijät lisätään soluviljelmään suoraan, jolloin feeder-soluja ei tarvita. Ohjatussa erilaistuksessa käytetään yleensä transformatiivien kasvutekijöiden β -perheeseen (TGF- β), Wnt-proteiineihin ja fibroblastikasvutekijöihin (FGF) kuuluvia kasvutekijöitä. Eri menetelmissä käytetään eri kasvutekijöitä, eri vaikutusaikoja ja erilaisia kasvatusmaljan päällystysmateriaaleja sekä mediuumeja. (Rajala ym. 2011, 5-6.) Esimerkiksi Zhangin (2010) sandwich-erilaistusmenetelmässä käytetään TGF- β -perheeseen kuuluvia aktiviini A- ja BMP-4- ja bFGF-kasvutekijöitä. Näiden kasvutekijöiden on osoitettu indusoivan erilaistumista mesodermaaliseen suuntaan ja vaikuttavan sydänlihassolujen erilaistumisessa. Menetelmässä kantasoluja kasvatetaan yksisolukerrosena BD MatrigelTM-kerrosten välissä, kunnes solut ovat konfluenteja. Erilaistus aloitetaan lisäämällä mediumiin aktiviini A:ta ja seuraavana päivänä kasvutekijä vaihdetaan BMP-4:ään ja bFGF:iin. Viidentenä päivänä kasvutekijät poistetaan, ja kymmenennestä päivästä lähtien voidaan havaita sydänlihassoluiksi erilaistuneita sykkiviä alueita. Menetelmällä noin 40-90 % soluista saadaan erilaistumaan sydänlihassoluiksi (Zhang, Raval, Lian, Herman, Wilson, Barron, Yu, Palecek, Thompson & Kamp 2010, abst).

2.4 Sydänlihassolujen karakterisointi

2.4.1 Sydänlihassoluille ominaiset geenit

Sydänlihassolujen erilaistumisprosessin eri vaiheita ja kypsiä sydänlihassoluja voidaan tutkia tiettyjen geenien ilmentymisen perusteella. Geenien ilmentymistä tutkitaan PCR-menetelmän tai immunosytokemiallisten värjäysten avulla. Immunosytokemiallisilla

värjäyksillä tutkitaan proteiineja, joita geenit koodaavat. PCR-menetelmällä geenien ilmentymistä puolestaan tutkitaan yleensä RNA:sta käännetyn cDNA:n avulla. Kummallakin menetelmällä voidaan siis tutkia samoja geenejä niiden ilmentymisen eri vaiheissa. (Pekkanen-Mattila ym. 2010, 3-4.)

Kuten luvussa 2.3 (s. 11) on kerrottu, erilaistumisen eri vaiheissa ilmentyvät tietyt kullekin vaiheelle ominaiset geenit. Samaan aikaan kantasolujen pluripotenssia ylläpitävien geenien ilmentyminen vähenee nopeasti (Okumura-Nakanishi, Saito, Niwa, and Ishikawa 2004, 5307). Mesodermin muodostuksen alkuvaiheessa ilmentyy muun muassa Brachyury T-geeni ja myöhemmin kardiogeenisessä mesodermissä Mesp-1-geeni (Vidricaire, Jardine & McBurney 1994, 115; Saga, Miyagawa-Tomita, Takagi, Kitajima, Miyazaki & Inoue 1999, 3437). Sydänlihassolujen kypsyessä puolestaan ilmentyvät esimerkiksi Nkx2.5- ja Gata-4-geenit (Lints, Parsons, Hartley, Lyons & Harvey 1993, 419; Watt, Battle, Li, & Duncan 2004, 12573).

Kypsät sydänlihassolut voidaan tunnistaa esimerkiksi α -MHC- (Myosin Heavy Chain, myosiinin raskasketju), α -aktiniini- ja c troponiini T (cardiac troponin T) -geenien ilmentymisen perusteella (Dhoot, Frearson & Perry 1979, 339; Nakao, Minobe, Roden, Bristow & Leinwand 1997, 2362; Sjöblom, Salmazo & Djinović-Carugo 2008, 2688). Kyseiset geenit koodaavat sydänlihassoluille tyypillisiä lihaksen supistumiseen liittyviä proteiineja. Myosiini ja aktiini ovat kaikissa lihassoluissa esiintyviä proteiineja, jotka aikaansaavat lihaksen supistumisen. Myosiinin raskasketju eli MHC (Myosin Heavy Chain) on yksi myosiinin rakenneosia, ja α -MHC eräs sen sydämelle spesifinen tyyppi (Nakao ym. 1997, 2362). α -aktiniini puolestaan on sydänlihassoluissakin esiintyvä aktiinin rakenneosia (Sjöblom, Salmazo & Djinović-Carugo 2008, 2688). c troponiini T on osa troponiini-kompleksia, joka osallistuu lihaksen supistumisen kalsiumvälitteiseen säätelyyn (Farah & Reinach 1995, 755). c troponiini T on vain sydänlihassoluissa esiintyvä troponiini T:n isomuoto (Dhoot ym. 1979, 339).

Lisäksi sydänlihassoluista voidaan tutkia konneksiini 43- ja Ki 67 -proteiinien ilmentymistä. Konneksiini 43 on sydänlihassoluissa yleisin konneksiiniproteiinityyppi. Konneksiiniproteiinit muodostavat aukkoliitoksia, eli kahden vierekkäisen solun solukalvot läpäiseviä liitoksia, joita on sydänlihassoluissa erittäin paljon. (Ai, Fischer, Spray, Brown & Fishman 2000, 161.) Ki 67 on proteiini, joka ilmentyy kaikissa solusyklin vaiheissa, mutta ei G₀-vaiheessa. Solusykliin kuuluvat kaikki interfaasin

vaiheet, joissa solu valmistautuu jakautumaan, sekä mitoosi. G_0 -vaiheessa solu on solusyklin ulkopuolella, eli se ei jakaudu. (Scholzen & Gerdes 2000, 311.) Kypsät sydänlihassolut eivät ole solusyklissä, joten sydänlihassolujen ei tulisi ilmentää Ki 67:ää (Evans-Anderson, Alfieri & Yutzey 2008, 686).

2.4.2 Sydänlihassolujen karakterisointimenetelmät

Sydänlihassoluista tutkitaan yleensä niiden sykkimisaktiivisuutta, elektrofysikaalisia ominaisuuksia sekä geenien ja proteiinien ilmentymistä. Kuten luvussa 2.2 (s. 10) on kerrottu, sydänlihassolujen eräs ominaisuus on spontaani sykkiminen (Marieb 2009, 369). Sykkimisaktiivisuus voidaan havaita soluviljelmästä valomikroskoopin avulla (Pekkanen-Mattila, Peltto-Huikko, Kujala, Suuronen, Skottman, Aalto-Setälä & Kerkelä 2010, 597).

Elektrofysikaalisia ominaisuuksia voidaan tutkia muun muassa mikroelektrodi array- eli MEA-tekniikalla, tai patch clamp -tekniikalla. MEA-tekniikassa solukolonia siirrostetaan MEA-maljalle, jonka pohjassa on elektrodeja. Elektrodit mittaavat solujen ulkopuolisen sähköisen potentiaalin vaihtelua. MEA-menetelmää käytetään usein lääkkeiden testauksissa, kun halutaan tietää, miten lääkeaine vaikuttaa sydänlihassoluihin. (Reppel, Pillekamp, Ju Lu, Halbach, Brockmeier, Fleischmann, & Hescheler 2004, 104.) Patch clamp -tekniikassa sen sijaan tutkitaan yksittäisiä soluja tai ionikanavien toimintaa. Solun pintaan kiinnitetään erittäin ohutkärkinen pipetti, joka sisältää elektrolyyttiliuosta ja elektrodin. Pipetinkärjen eristämältä alueelta ionikanavien läpi kulkevat ionit päätyvät pipetin sisään, ja elektrodi havaitsee sähköisen potentiaalin muutoksen elektrolyyttiliuoksessa. (Veitinger 2011.)

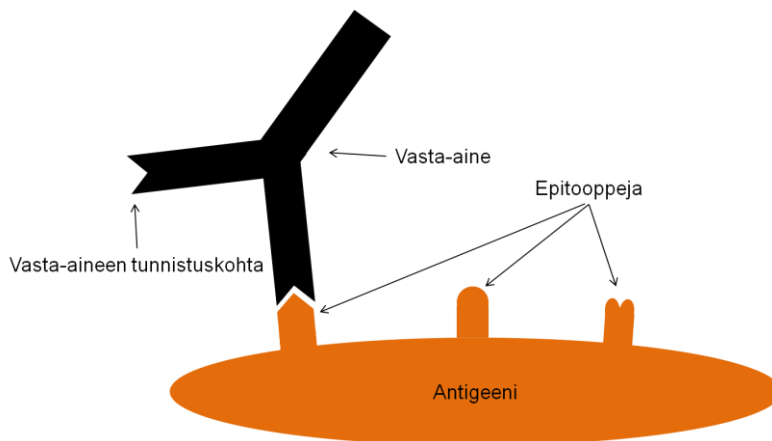
Geenien ilmentymistä tutkitaan yleensä PCR-menetelmällä ja geenien koodaamien proteiinien ilmentymistä immunosytokemiallisilla värjäyksillä. Menetelmillä tutkittavista geneeistä ja proteiineista on kerrottu luvussa 2.4.1 (s. 12). Immunosytokemiallisilla värjäyksillä pyritään muun muassa tunnistamaan erilaistuneet sydänlihassolut muista maljalla olevista soluista. Immunosytokemiallisissa värjäyksissä käytetään vasta-aineita, jotka tunnistavat sydänlihassoluille ominaisia proteiineja. Immunosytokemiallisista värjäyksistä on kerrottu tarkemmin luvussa 2.4.3 (s. 15). PCR-menetelmällä voidaan tutkia geenien ilmentymistä soluissa. Esimerkiksi q-PCR-

menetelmällä voidaan tutkia, miten eri geenien ilmentyminen muuttuu erilaistumisen edetessä. Näin voidaan esimerkiksi vertailla, miten eri solulinjat käyttäytyvät erilaistuessaan. (Pekkanen-Mattila ym. 2010, 3-4.) PCR- ja q-PCR-menetelmistä on kerrottu luvussa 2.4.4 (s. 16).

2.4.3 Immunosytokemialliset värjäykset

Immunosytokemiallinen värjäys on biokemiallinen perusmenetelmä, jonka avulla voidaan havaita haluttu molekyyli erittäin spesifisesti käyttäen jollain detektoitavalla leimalla varustettuja vasta-aineita. Detektointi voi tapahtua esimerkiksi fluoresoivan molekyylin, eli fluorokromin, avulla tai enstymaattisesti. (Oliver & Jamur 2010, 3.)

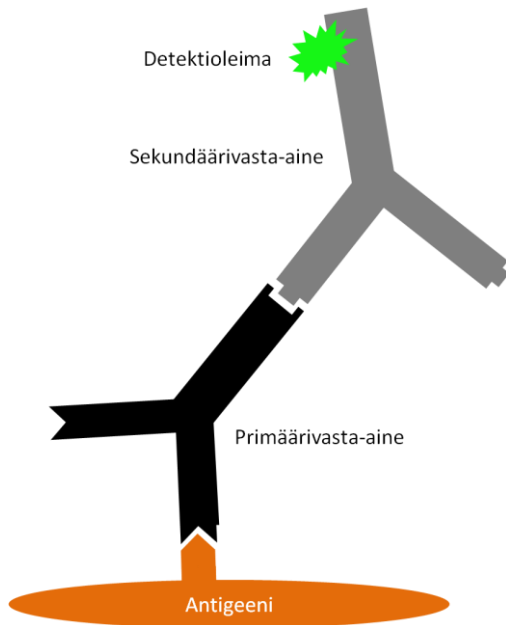
Vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat immuunijärjestelmän B-solujen tuottamia glykoproteiineja, joiden tarkoitus on tunnistaa elimistölle vieraita molekyyliä eli antigeenejä. Tunnistus tapahtuu siten, että vasta-aine sitoutuu antigeenin johonkin tiettyyn rakenneosaan, eli epitooppiin (kuvio 1). B-soluja on valtavan paljon erilaisia ja niistä kukin tuottaa erilaista vasta-ainetta, joka on spesifinen yhdelle tietylle epitoopille. (Campbell & Farrell 2006, 392.)



KUVIO 1. Vasta-aine tunnistaa antigeenin sitoutumalla sen epitooppiin (Campbell & Farrell 2006, 392).

Immunosytokemiallinen värjäys voidaan tehdä joko suoralla tai epäsuoralla menetelmällä. Suorassa menetelmässä halutun molekyylin tunnistava vasta-aine, eli primäärivasta-aine, on leimattu. Epäsuorassa menetelmässä on puolestaan kaksi vasta-ainetta: primäärivasta-aine, joka tunnistaa halutun proteiinin, sekä sekundäärivasta-aine,

joka tunnistaa primäärivasta-aineen (kuvio 2). Epäsuorassa menetelmässä vasta sekundäärivasta-aine on leimattu. (Freshney 2005, 278.)



KUVIO 2. Epäsuora immunosytokemiallinen värjäys (Freshney 2005, 278).

Mille tahansa antigeenille voidaan tuottaa spesifinen vasta-aine koe-eläimessä. Koe-eläiminä käytetään usein hiiriä, kaneja, aaseja ja vuohia. Käytettäessä epäsuoraa menetelmää on tärkeää, että primääri- ja sekundäärivasta-aineet on tuotettu eri eläimissä. Sekundäärivasta-aineet tuotetaan aina niin, että ne tunnistavat kaikki vasta-aineet, jotka on tuotettu primäärivasta-aineen tuottaneen eläinlajin elimistössä. Esimerkiksi kanissa tuotetulle primäärivasta-aineelle voidaan käyttää vuohessa tuotettua anti-kani-sekundäärivasta-ainetta. Yhden näytteen voi värjätä samanaikaisesti useilla väreillä, kunhan kaikille primäärivasta-aineille on eri sekundäärivasta-aineet, joiden fluoresenssileimat ovat eriväriset. Tällöin jokaisen primäärivasta-aineen täytyy olla myös eri eläimessä tuotettu. (IHCWORLD 2011.)

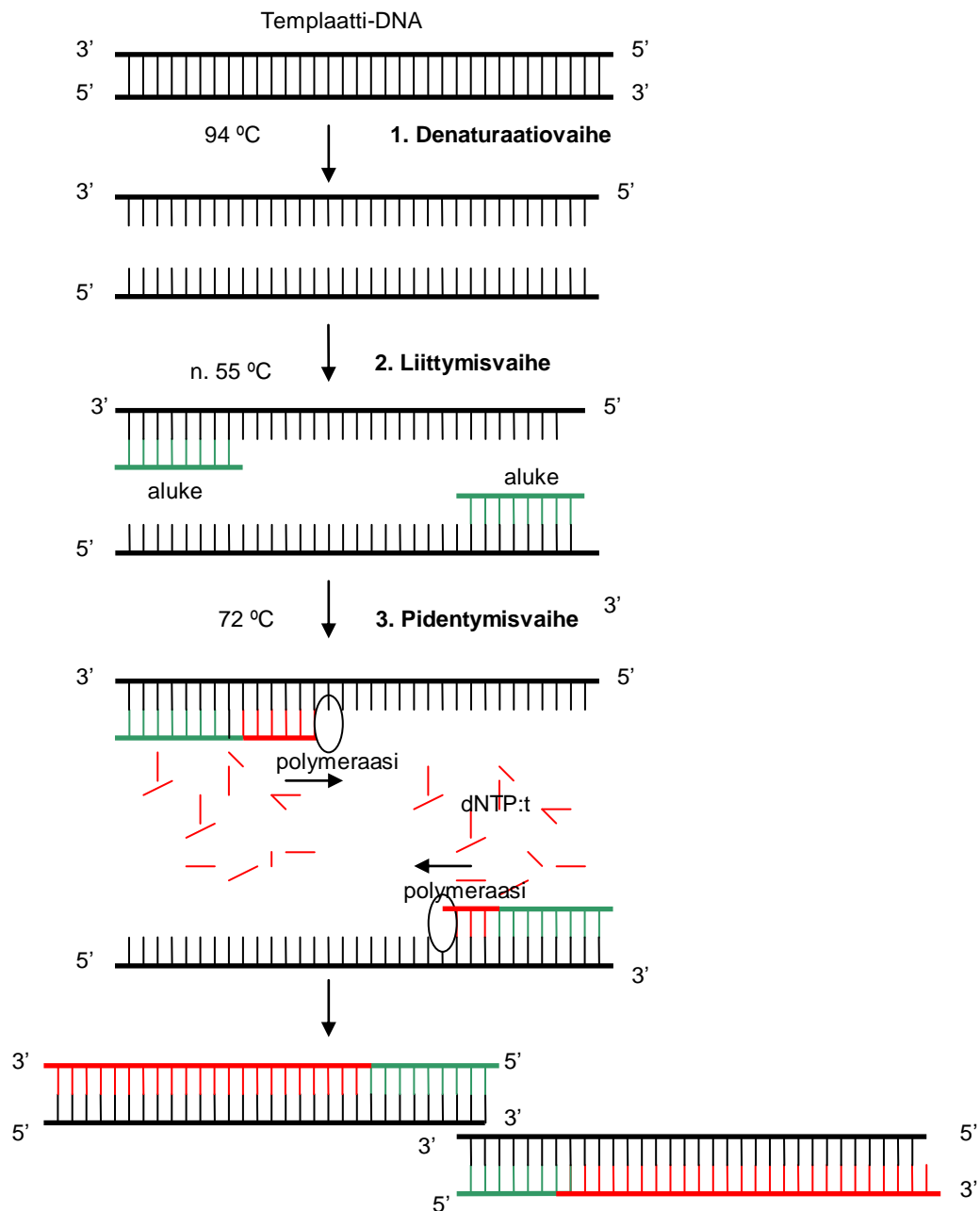
2.4.4 Polymeraasiketjureaktio

Polymeraasiketjureaktio eli PCR on menetelmä, jolla voidaan tehokkaasti monistaa DNA-juosteesta haluttua sekvenssiä. Reaktiossa tarvitaan spesifisiä alukkeita, deoksiribonukleotideja (dNTP) sekä termostabiilia polymeraasienstyymiä. Yleisimmin käytetään *Thermus aquaticus* -bakteerista eristettyä Taq-polymeraasia. Lisäksi tarvitaan

PCR-laite, joka säätelee lämpötilaa tarkasti vaiheiden mukaan. (Campbell & Farrell 2006, 352.)

Yksi PCR-sykli koostuu kolmesta vaiheesta, kuten on esitetty kuviossa 3. Ensimmäisessä vaiheessa eli denaturaatiovaiheessa reaktion lämpötila nostetaan + 94 °C:een, jolloin DNA:n vastinjuosteet irtoavat toisistaan. Toisessa vaiheessa, eli alukkeiden liittymisvaiheessa (*annealing*), lämpötila lasketaan hetkellisesti. Liittymisvaiheen lämpötila riippuu alukkeiden ominaisuuksista, mutta yleensä lämpötila on + 45 °C:n ja + 65 °C:n välillä. Tällöin lyhyet alukkeet ehtivät tarttua yksijuosteiseen templaatti-DNA:han komplementaarisesti, mutta varsinainen polymeerasientsyymi ei ehdi alkaa toimia. (Karp 2005, 775-776.)

Kolmannessa vaiheessa, eli pidentymisvaiheessa (*extension*), lämpötilaa nostetaan jälleen + 72 °C:een. Tässä lämpötilassa Taq-polymeerasientsyymi alkaa luoda templaatti-DNA-juosteille vastinemäsuperiaatteen mukaisesti vastinjuosteita. Normaalissa PCR-ajossa toistetaan noin 20-30 sykliä, jolloin alkuperäinen DNA-määrä monistuu miljooniksi kopioiksi. (Karp 2005, 776.) Polymeerasientsyymi alkaa syntetisoida juostetta alukkeista alkaen, jolloin vain alukkeiden välinen osa monistuu. Alukkeiden on siis oltava spesifiset juuri sille sekvenssille, jota halutaan monistaa. (Campbell & Farrell 2006, 354.)

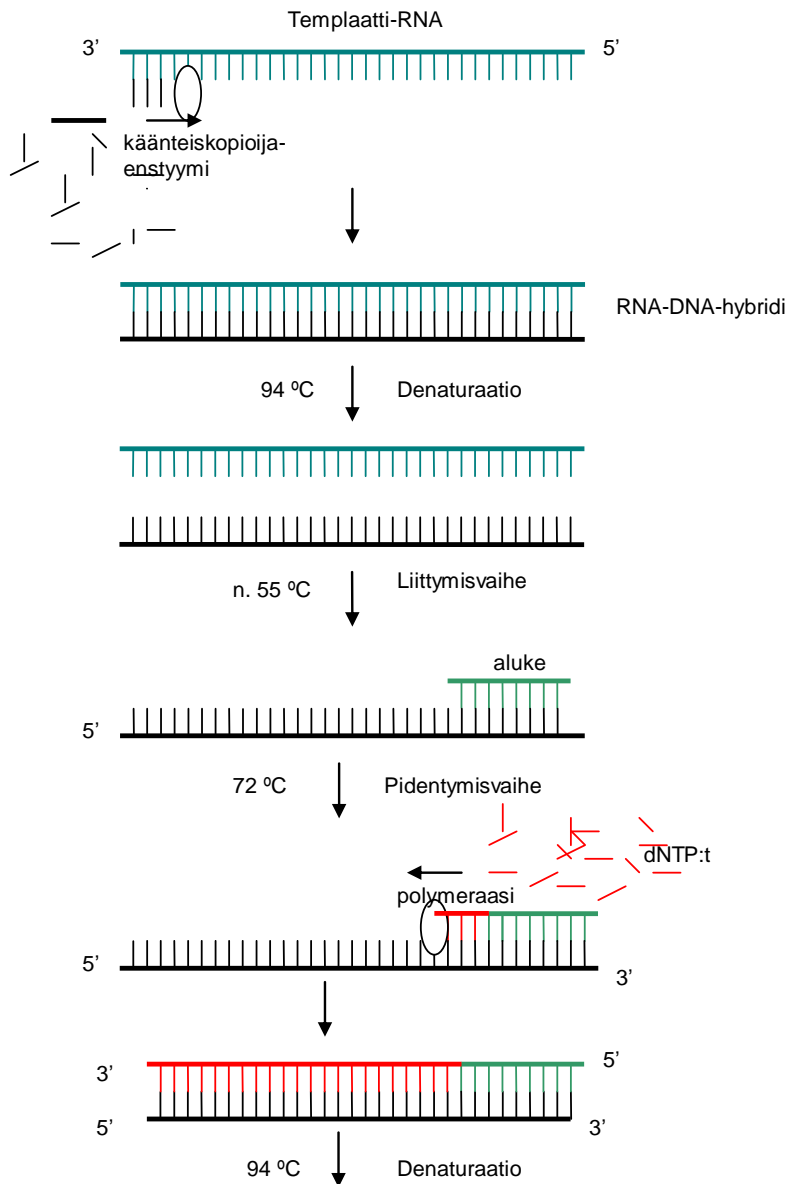


KUVIO 3. PCR-reaktio (Campell & Farrell 2006, 353, muokattu).

PCR-menetelmästä on paljon sovelluksia ja variaatioita, kuten kvantitatiivinen PCR ja käänteiskopiointi-PCR. Käänteiskopiointi-PCR:ssä, eli RT-PCR:ssä (reverse transcription PCR) alkuperäisenä templaattijuosteena on kaksijuosteisen DNA:n sijaan yksijuosteinen RNA. Reaktio on muuten sama kuin tavallisessa PCR:ssä, mutta aluksi RNA muutetaan komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) retroviruksista saatavan käänteiskopioijaentsyymin avulla. (Promega 2011, 2-3.) Reaktio on esitetty kuviossa 4.

Käänteiskopioijaentsyymi luo ensin DNA-vastinjuosteen RNA:lle, jolloin syntyy RNA-DNA-hybridin DNA-juoste

kopioituu. RT-PCR:llä saadaan siis monistettua RNA-näytteen DNA-vastinjuostetta. Näin saadaan selville solun transkriptioprofiili, eli se, mitkä geenit ilmentyvät solussa tietyllä hetkellä. (Promega 2011, 2-3.)

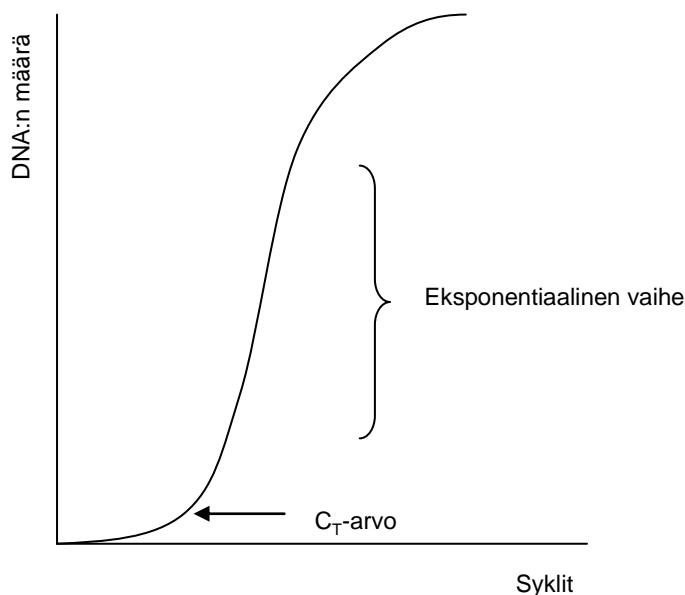


KUVIO 4. RT-PCR-reaktio (Promega 2011, 2-3).

Kvantitatiivinen PCR eli q-PCR (quantitative PCR) on keino määrittää näyte-DNA-sekvenssin määrää. q-PCR-menetelmää käytetään usein yhdessä RT-PCR:n kanssa, jolloin voidaan tutkia, kuinka paljon geeniä on transkriptoitu RNA:ksi. Näin saadaan tietää, kuinka voimakkaasti geeni ilmentyy. (VanGuilder, Vrana & Freeman 2008, 619.)

q-PCR:ssä käytetään hyväksi reaktioiden C_T -arvoja, eli kynnysyklarvoja (Threshold Cycle). C_T -arvo on esitetty kuviossa 5. C_T -arvo kertoo monennenko syklin kohdalla

näytteen fluoresenssin voimakkuus ensimmäisen kerran ylittää taustan tason. Mitä enemmän näytteessä on DNA:ta, sitä aikaisemmin kynnys ylittyy. (Goni, Garcia & Foissac 2009, 3.) q-PCR:ssa fluoresenssimittaus tehdään jokaisen syklin jälkeen, joten DNA-määrän kasvua voidaan seurata reaaliaikaisesti. Tämän vuoksi menetelmää kutsutaan joskus myös real time-PCR:ksi. (Wong & Medrano 2005, 75.)



KUVIO 5. DNA-määrän kasvu PCR-reaktiossa (NCBI 2012, muokattu).

Fluoresenssimarkkerit voivat olla joko spesifisiä tai epäspesifisiä. SYBR® Green (Life Technologies™) on epäspesifinen fluoresenssileima, joka sitoutuu kaksijuosteisen DNA:n emästen väliin. Sitoutumattomana SYBR® Green fluoresoi vain heikosti, mutta fluoresenssi voimistuu, kun SYBR® Green sitoutuu DNA:han. Tällöin fluoresenssin voimakkuuden kasvu kertoo kaksijuosteisen DNA:n määrän kasvusta. (Zipper, Brunner, Bernhagen & Vitzthum 2004, 1.)

Hybridisaatiokoettimet, kuten TaqMan® (Life Technologies™) ja molecular beacon -koettimet, sen sijaan ovat sekvenssispesifisiä fluoresenssimarkkereita. Ne ovat lyhyitä fluoresenssileimattuja DNA-pätkiä, jotka sitoutuvat spesifisesti vain tietyillä alukkeilla monistettuun DNA-sekvenssiin. Ne siis eivät detektoi sivutuotteita, kuten alukedimeerejä. (Holland, Abramson, Watson & Gelfand 1991, 7276; Tyagi & Kramer 1996, 303.)

q-PCR:lla DNA-määrä voidaan määrittää joko absoluuttisesti tai suhteellisesti. Yleensä käytetään suhteellista määrittystä, jossa voidaan nähdä, miten geenin ilmentyminen

muuttuu samoissa soluissa eri aikapisteissä, tai voidaan verrata eri solulinjoja keskenään. Tutkittavan geenin ilmentyminen tulee normalisoida käyttäen ylläpitogeeniä, eli tutkittavissa solussa jatkuvasti ja tasaisesti ilmenevää geeniä. Normalisoinnin avulla eliminoidaan näytteiden välistä vaihtelua. Esimerkiksi jos verrataan geenin ilmenemistä samalla solulinjalla eri aikapisteissä, näytteiden alkucDNA-määrien vaihtelut vaikuttavat tuloksiin. Normalisoinnin avulla tämä ero voidaan poistaa. (Pfaffl, Tichopad, Prgomet & Neuvians 2004, 509.)

Absoluuttisessa määrittämisessä ei käytetä ylläpitogeeniä, vaan luodaan standardisuora. Standardisuoraa varten luodaan standardinäytteet, joiden pitoisuudet tunnetaan erittäin tarkasti. Standardinäytteinä voidaan käyttää esimerkiksi plasmideja, joihin on kloonattu tietty määrä geeniä (Hou, Zhang, Miranda & Lin 2010, 1). Standardien C_T -arvoista luodaan lineaarinen standardisuora, johon näytettä verrataan. Näin tulokseksi saadaan absoluuttinen DNA-pitoisuus. (Wong & Medrano 2005, 76-77.)

Koska SYBR® Green -fluoresenssimarkkerit ovat epäspesifisiä, niitä käytettäessä on suositeltavaa muodostaa sulamiskäyrä q-PCR-ajon päätteeksi. Näin saadaan selville ovatko markkerit sitoutuneet tutkittavaan sekvenssiin vai esimerkiksi alukedimeereihin. Normaalien PCR-sykliden jälkeen lämpötilaa aletaan nostaa samalla mitaten fluoresenssia. Lämpötilan noustessa kaksijuosteinen DNA denaturoituu, jolloin SYBR® Green irtoaa siitä ja sen emittoima fluoresenssi vähenee. Eri DNA-sekvenssien sulamislämpö on erilainen riippuen muun muassa sekvenssin pituudesta ja G- ja C-emästen pitoisuuksista. Mitattua fluoresenssia muokataan siten, että saadaan käyrä, jossa näkyy piikkejä niiden lämpötilojen kohdalla, joissa jotain DNA-sekvenssiä on denaturoitunut. Jos vain tuote on monistunut, saadaan yksi terävä piikki tuotteelle ominaisen sulamislämmön kohdalla. Jos piikkejä on useita, on monistunut myös muita sekvenssejä, yleisimmin alukedimeerejä. Sulamiskäyrän avulla saadaan tietoa q-PCR:n tulosten luotettavuudesta. (Cubie, Seagar, McGoogan, Whitehead, Brass, Arends & Whitley 2001, 25.)

2.5 Kantasolujen ja sydänlihassolujen kasvatatus

2.5.1 Soluviljely

Soluja kasvatetaan erillisessä soluviljelylaboratoriossa, jonne kuljetaan sulun kautta. Työskentely tapahtuu laminaarikaapeissa ja soluja kasvatetaan + 37 °C:ssa 5 % CO₂:ssa inkubaattorissa. Soluviljelyssä noudatetaan aseptisia työskentelymenetelmiä kontaminaatioiden välttämiseksi. (Freshney 2005, 43, 63, 73.)

Konfluenssi eli solutiheys kertoo, kuinka paljon kasvutilaa soluilla vielä on kasvatusalustallaan. Kasvatusalustan ollessa 100 % konfluentti, kasvatusalusta pohja on täysin solujen peittämä ja 50 % konfluentilla maljalla solut täyttävät puolet alustan pinta-alasta. Konfluenssi määritetään silmämääräisesti, joten se ei ole tarkka määre. (Freshney 2005, 40.)

Aina soluja jaettaessa tai pakastettaessa solujen passagenumeroa (p.) kasvatetaan yhdellä. Passagenumero kertoo, kuinka monta kertaa soluviljelmä on jaettu uudelleen. Passagenumeron kasvaessa muun muassa solulinjan proteiinituotanto, morfologia, ja kasvunopeus saattavat muuttua. Esimerkiksi kantasolut saattavat alkaa erilaistua spontaanisti korkeissa passageissa. Tämän takia on tärkeää pitää lukua passagenumerosta. (ATCC 2007, 1.)

Kantasoluja voidaan kasvattaa joko feeder-solujen päällä tai ilman feeder-solukerrosta. Oleellista kuitenkin on, että kasvatusolosuhteet ovat pluripotenssia ylläpitäviä. Muuten kantasolut alkavat erilaistua spontaanisti. Feeder-soluina käytetään yleensä hiiren alkion fibroblasteja, eli MEF:jä (Mouse Embryonic Fibroblast), joiden erittämien aineiden avulla kantasolut pysyvät pluripotentteina. Feederittömässä kasvatuksessa voidaan käyttää feeder-konditioitua mediumia, jolloin MEF-solujen erittämät aineet ovat siirtyneet mediumiin ilman, että kantasolut ja MEF:t kasvavat samalla maljalla. (Passier & Mummery 2002, 325.) Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää mediumia, johon on lisätty kasvutekijöitä ja viestiaineita, jotka pitävät solut kantasoluasteella. Esimerkiksi mTeSRTM1-medium (STEMCELL Technologies) on hESC- ja iPS-kantasolujen feeder-soluttomaan kasvatukseen suunniteltu kaupallinen medium. (STEMCELL Technologies 2011, 1-2.) Jotta kantasolut säilyisivät feederittömässä kasvatuksessa pluripotentteina,

on lisäksi käytettävä jotain kantasolujen ylläpitoon sopivaa matriksia, kuten BD Matrigel™:ä (STEMCELL Technologies) (Nagaoka, Si-Tayeb, Akaike & Duncan 2010, 1).

B-27® (Life Technologies) on alun perin neurosolujen ylläpitoa varten kehitetty lisäravinne, mutta sitä käytetään myös sydänlihassolujen erilaistuksessa ja ylläpidossa. B-27®-ravintolisää on sekä insuliinipitoista että insuliinitonta. (Life Technologies 2012.) Koska insuliini inhiboi solujen erilaistumista sydänlihassoluiksi, erilaistusvaiheessa on käytettävä insuliinitonta B-27®-ravintolisää (Freund, Ward-Van, Oostwaard, Monshouwer-Kloots, van den Brink, van Rooijen, Xu, Zweigerdt, Mummery & Passier 2007, 727).

Adherentteja sydänlihas- ja kantasoluja jaettaessa solut voidaan irrottaa esimerkiksi dispaasilla tai StemPro® Accutase®:lla (Life Technologies). Accutase® on solujen irrotusaine, joka koostuu useista eri entsyymeistä ja irrottaa solut yksisolususpensioksi (Life Technologies 2009). Dispaasi on *Bacillus polymyx* -bakteerista eristettyä proteaasientsyymiä (Worthington Enzyme Manual 1993), joka irrottaa solut suurempina kolonioina yksisolususpension sijaan (STEMCELL Technologies 2009, 1). Solujen jaon yhteydessä käytetään yleensä ROCK-inhibiittoria (Rho-associated kinase) (Merck Millipore), joka estää solukuolemaa yksisolususpensiossa ja parantaa siten solujen selviytymistä jaosta vaikuttamatta kantasolujen ominaisuuksiin (Watanabe, Ueno, Kamiya, Nishiyama, Matsumura, Wataya, Takahashi, Nishikawa, Nishikawa, Muguruma & Sasai 2007, 681).

Kantasoluja ja sydänlihassoluja voidaan pakastaa dimetyylisulfoksidi-liuoksella (DMSO). mFreSR®-pakastusmediumi (STEMCELL Technologies) on eräs kaupallinen pakastusliuos, joka on suunniteltu käytettäväksi mTeSR™1-mediumissa kasvatettujen ESC- ja iPSC-solujen pakastukseen. Se sisältää DMSO:ta mutta on seerumiton, toisin kuin yleisesti käytetyt pakastusmediumit. (STEMCELL Technologies 2012, 1-2.)

2.5.2 BD Matrigel™ kantasolujen viljelyssä

BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced (STEMCELL Technologies) on hiiren Engelbreth-Holm-Swarm -sarkoomasta eristettyä tyvikalvoa.

Matrigel™ koostuu pääasiassa laminiinista, kollageeni IV:stä ja muista soluväliaineen proteiineista. Lisäksi se sisältää tyvikalvossa luonnostaan esiintyviä kasvutekijöitä, kuten TGF- β :a, epidermaalista kasvutekijää ja insuliininkaltaista kasvutekijää. Tuotteen kasvutekijöiden määrää on vähennetty, mutta niitä ei voida täysin poistaa. (BD Biosciences 2008, 1.) Matrigel™ jähmettyy hyvin nopeasti jo huoneenlämmössä, joten se lisätään aina kylmään mediumiin käyttäen jääkaapissa kylmennettyjä pipetinkärkiä ja falcon-putkia (BD Biosciences 2008, 2).

Tyvikalvo on eräs soluväliaineen muoto, jota esiintyy sidekudoksen ja epiteelisolujen rajalla. Tyvikalvo myös ympäröi lihas- ja rasvasoluja sekä ääreishermoston tukisoluja. Myös sydänlihassolut ovat siis tyvikalvon ympäröimiä. BD Matrigel™ luo siis sydänlihassoluille hyvän *in vivo* -tilaa muistuttavan kasvualustan, johon solujen on hyvä kiinnittyä. (Karp 2005, 245.) Lisäksi BD Matrigel™ on yleisesti käytetty matriksi kantasolujen ylläpidossa (Nagaoka, Si-Tayeb, Akaike & Duncan 2010, 1).

3 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS

Opinnäytetyön tavoitteena on ottaa sydänryhmän käyttöön uusi sandwich-erilaistusmenetelmä sydänlihassolujen erilaistusta varten. Uusi menetelmä on nopeampi ja tehokkaampi tapa erilaistaa sydänlihassoluja kuin tutkimusryhmässä aiemmin käytössä ollut menetelmä. Lisäksi uudella menetelmällä päästään eroon eläinperäisistä feeder-soluista, mikä on tärkeää mahdollisten lääketieteellisten sovellusten kannalta.

Opinnäytetyön tarkoitus on optimoida uusi erilaistusmenetelmä kahdelle ihmisen iPS-solulinjalle. Työssä selvitetään, missä solupitoisuudessa ja passagessa solut erilaistuivat parhaiten. Erilaistettuja sydänlihassoluja karakterisoidaan immunosytokemiallisin värjäyksin ja tutkimalla solujen geenien ilmentymistä erilaistuksen eri vaiheissa. Näin voidaan verrata uudella ja vanhalla menetelmällä erilaistettuja soluja keskenään ja todeta, onko uusi menetelmä soveltuva käytettäväksi.

4 TYÖN SUORITUS

4.1 Kantasolulinjat

Työssä tutkittiin linjoja UTA.04602.WT ja UTA.07801.HcMMc. UTA.07801.HcMMc on hypertrofista kardiomyopatiaa sairastavasta potilaasta peräisin oleva iPS-solulinja. Se siis sisältää sairautta aiheuttavan geenivirheen. UTA.04602.WT on kontrollilinja, jossa ei ole sydänsairauden aiheuttavaa geenivirhettä.

4.2 Mediumit

Erilaistumattomien solujen ylläpidossa sekä erilaistuksen alkuvaiheessa käytettiin mTeSR™1-mediumia. Erilaistusvaiheessa ja erilaistettujen solujen ylläpidossa käytettiin RPMI-mediumia (Life Technologies). RPMI-mediumpohjaan lisättiin GlutaMAX™-ravintolisää, NEAA-aminohappoliuosta, penisilliini-streptomysiini-antibioottiliuosta ja B-27®-ravintolisää (kaikki Life Technologies). Erilaistusvaiheessa käytettiin insuliinitonta B-27®-ravintolisää ja ylläpitovaiheessa insuliinipitoista versiota. Lisäksi erilaistettujen solujen ylläpitomediumiin lisättiin 2 % FBS:a. mTeSR™1-mediumiin lisättiin vain antibioottia. Mediumien tarkat valmistusohjeet ovat liitteenä 1.

Mediumia annosteltiin erikokoisten kuoppalevyjen kaivoille taulukon 1 mukaan. Mediumeja säilytettiin jääkaapissa + 4 °C:ssa ja ne lämmitettiin inkubaattorissa + 37 °C:seen ennen soluille annostelua. Poikkeuksena BD Matrigel™ lisättiin kylmään mediumiin ja myös annosteltiin soluille kylmänä.

TAULUKKO 1. Erikokoisten kuoppalevyjen kaivojen pinta-alat, tarvittavat määrät mediumia ja tarvittavat määrät päällystysliuosta.

Kuoppalevy	Kaivon pinta-ala	Mediumia/kaivo	Päällystysliuosta/kaivo
6-kuoppalevy	9,6 cm ²	2 ml	1 ml
12-kuoppalevy	3,5 cm ²	1 ml	0,5 ml
24-kuoppalevy	1,9 cm ²	0,75 ml	0,5 ml

4.3 Kantasolulinjojen ylläpito ja sydänlihassolujen erilaistaminen sandwich-menetelmällä

4.3.1 Kasvatusalustojen päällystys BD Matrigel™:llä

Päällystysliuos valmistettiin lisäämällä kylmään KO-DMEM-mediumiin BD Matrigel™:iä kaavan 1 mukaan. Liuosta tarvittiin erikokoisten kuoppalevyjen kaivoille taulukon 1 (s. 26) mukaiset määrät. Päällystettyjä kuoppalevyjä pidettiin inkubaattorissa +37 °C:ssa tunnin ajan ennen solujen viljelyä kaivoille.

$$m = \frac{n \cdot A \cdot c_1}{c_2} \quad (1)$$

m = tarvittava määrä BD Matrigel™:iä (µl)

n = päällystettävien kaivojen lukumäärä

A = kaivojen pinta-ala (cm²), listattu taulukossa 1

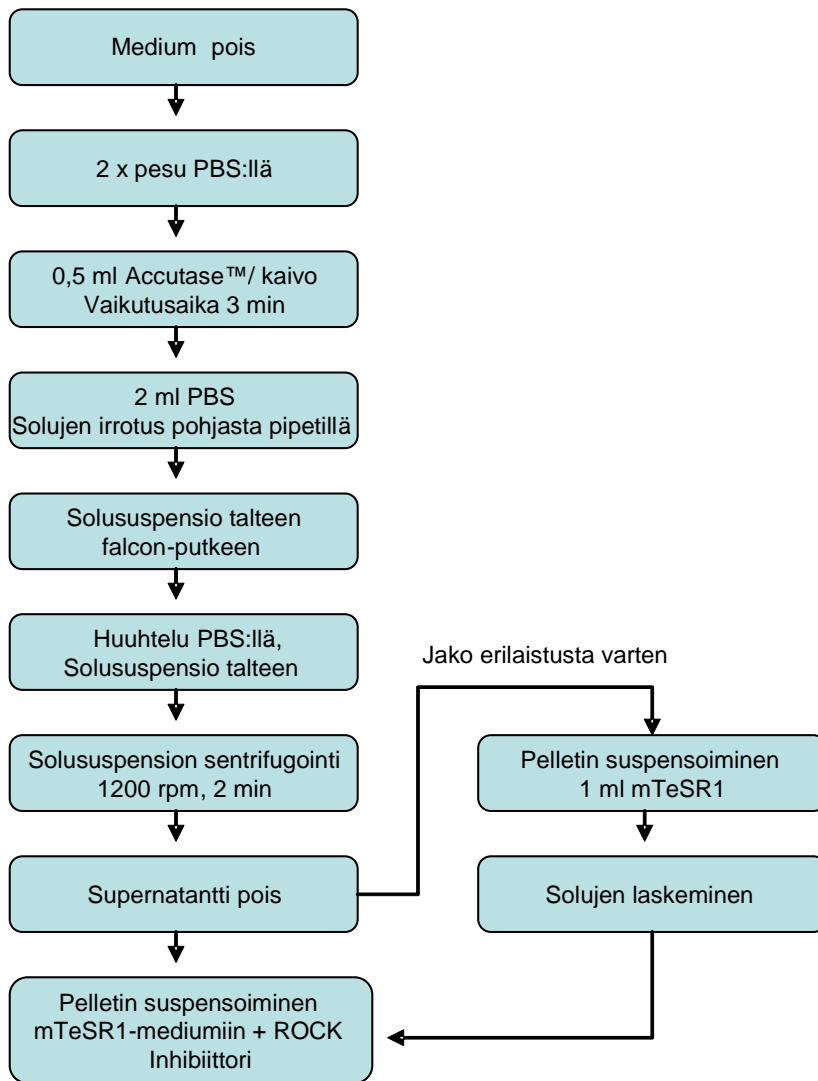
c_1 = haluttu matrigeelipitoisuus (2,2 µg/cm²)

c_2 = BD Matrigel™-erän proteiinipitoisuus (µg/µl)

4.3.2 Solujen jakaminen

Ennen jakoa matrigeelipäällystettiin tarvittava määrä kaivoja luvun 4.3.1 (s. 27) mukaisesti. Jako tehtiin kuvion 6 mukaan. Solupelletti suspensoitiin mTeSR™1-mediumiin jakosuhteen mukaan ja suspensioon lisättiin ROCK-inhibiittoria (Merck Millipore) 0,01 µmol/ml.

Jos esimerkiksi yksi 6-kuoppalevyn kaivo jaettiin suhteessa 1:6 kuudelle 6-kuoppalevyn kaivolle, pelletti suspensoitiin 12 ml:aan mTeSR™1-mediumia, lisättiin 12 µl 10 mM ROCK-inhibiittoria ja jaettiin 2 ml/kaivo. Jakamisen jälkeen kuoppalevyt siirrettiin +37 °C:seen inkubaattoriin.



KUVIO 6: Solujen jako-ohje.

Jos soluja jaettiin erilaistusta varten, ne laskettiin sentrifugoinnin jälkeen. Solut laskettiin kummastakin kammiosta keskimmäisestä 1 mm x 1 mm -ruudusta. Solususpension solupitoisuus (solua/ml) laskettiin kaavan 2 mukaan. Kaavan 3 mukaan laskettiin, kuinka paljon solususpensiota tarvittiin maljattavaan solususpensioon, ja kaavassa 4 näkyy, kuinka paljon mediumia tarvittiin. Maljattavan suspension tarve kaivoa kohden on esitetty taulukossa 1 (s. 26).

$$C_{solususpensio} = n_{KA} \cdot 10000 \quad (2)$$

$$V_{suspensio} = \frac{n_{kaivot} \cdot c_{kaivo}}{C_{solususpensio}} \quad (3)$$

$$V_{medium} = V_{kok.} - V_{suspensio} \quad (4)$$

$c_{solususpensio}$ = solususpension solupitoisuus (solua/ml)

n_{KA} = kammioista laskettujen solujen keskiarvo

$V_{suspensio}$ = tarvittava suspension määrä (ml) maljattavaan suspensioon

c_{kaivo} = haluttava solumäärä/kaivo

n_{kaivo} = maljattavien kaivojen lukumäärä

V_{kok} = tarvittava määrä maljattavaa suspensiota (ml)

V_{medium} = mediumin määrä (ml)

Soluja kasvatettaessa Matrigel™:n päällä merkittiin kaksi passagenumeroa. Varsinaisen passagenumeron lisäksi merkittiin sulkeisiin toinen passagenumero, joka kertoi solujen kasvuajan Matrigel™:llä. Esimerkiksi jos passagenumero oli p. 33(5), solujen varsinainen passagenumero oli 33, ja siitä viiden jaon verran soluja oli kasvatettu Matrigel™:llä. Ennen Matrigel™:iä soluja oli kasvatettu MEF:ien päällä. Matrigel™:lle merkittiin oma passagenumero, sillä sen päällä kasvatettujen solujen erilaistumisominaisuuksien oli havaittu muuttuvan merkittävästi passagen mukaan (Pekkanen-Mattila, henkilökohtainen tiedonanto 28.05.2012).

4.3.3 Erilaistumattomien solulinjojen ylläpito

Erilaistumattomia soluja ylläpidettiin luvun 4.3.1 (s. 27) mukaisesti matrigeelipäällystetyillä 6-kuoppalevyn kaivoilla mTeSR™1-mediumissa. mTeSR™1-mediumi vaihdettiin päivittäin.

Solut jaettiin luvun 4.3.2 (s. 27) mukaan kaivojen ollessa konfluentteja. Yleensä käytettiin jakosuhdetta 1:6. Jos maljalla kasvoi kantasolukolonioiden lisäksi erinäköistä solukkoa, se poistettiin jaon yhteydessä, jotta linja säilyi erilaistumattomana.

4.3.4 Erilaistaminen sandwich-menetelmällä

Erilaistus aloitettiin jakamalla solut halutuissa solupitoisuuksissa 12-kuoppalevyille mTeSR™1-mediumissa. Jako tehtiin luvun 4.3.2 (s.27) mukaan ja käytettiin

solupitoisuuksia 100 000 solua/kaivo, 150 000 solua/kaivo, 200 000 solua/kaivo tai 300 000 solua/kaivo. Jaon jälkeisenä päivänä soluille vaihdettiin mTeSRTM1-medium.

Toisena päivänä jaon jälkeen soluille vaihdettiin kylmä matrigeeliä sisältävä mTeSRTM1-medium, jolloin solut jäivät kahden matrigeelikerroksen väliin. BD MatrigelTM:n määrä laskettiin kaavan 5 mukaan käyttäen pitoisuutta 17,5 µg/cm². Tarvittava mediumin määrä kaivoa kohden on esitetty taulukossa 1 (s. 26).

$$m = \frac{n \cdot A \cdot c_1}{c_2} \quad (5)$$

m = tarvittava matrigeelin määrä (µl)

n = kaivojen lukumäärä

A = kaivojen pinta-ala (cm²), listattu taulukossa 1

c_1 = haluttu matrigeelipitoisuus (µg/cm²)

c_2 = BD MatrigelTM-erän proteiinipitoisuus (µg/µl)

Varsinainen erilaistus aloitettiin päivänä 0, jolloin soluille vaihdettiin aktiviini A:ta ja BD MatrigelTM:ää sisältävä insuliiniton RPMI-medium. BD MatrigelTM:n määrä laskettiin kaavan 5 mukaan ja aktiviini A:n määrä kaavan 6 mukaan. BD MatrigelTM:lle haluttu pitoisuus oli 8,75 µg/cm² ja aktiviini A:lle 100 ng/ml.

$$V_{kasvutekijä} = \frac{V_{medium} \cdot c_1}{c_2} \quad (6)$$

$V_{kasvutekijä}$ = tarvittava kasvutekijän määrä (µl)

V_{medium} = mediumin määrä (ml)

c_1 = mediumin haluttu kasvutekijäpitoisuus

c_2 = kasvutekijäliuoksen pitoisuus (µg/µl)

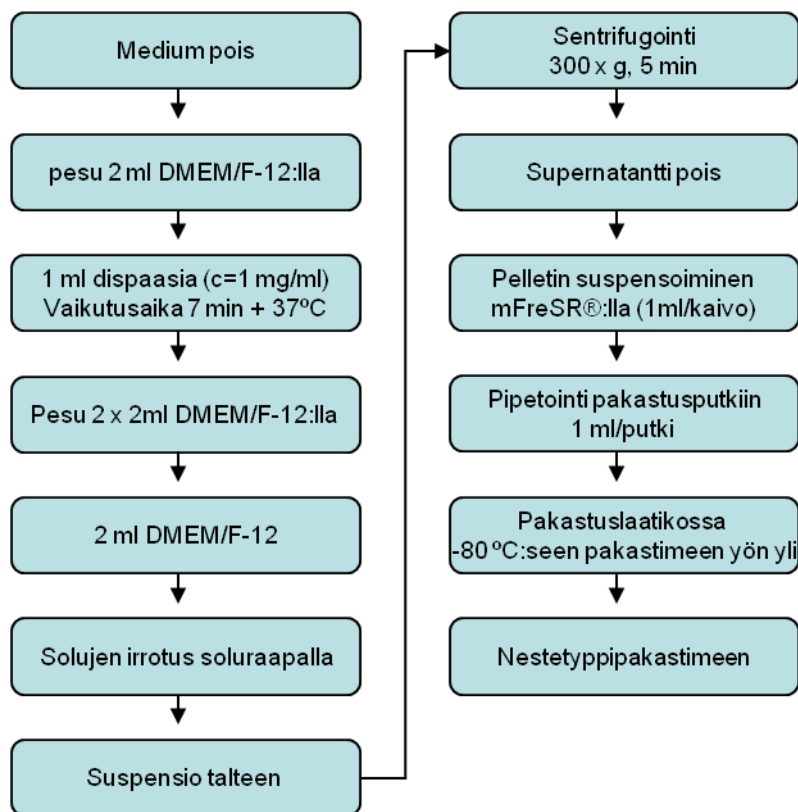
Päivänä 1 soluille vaihdettiin BMP-4:ä ja bFGF:a sisältävä insuliiniton RPMI-medium. BMP-4:n ja bFGF:n määrät laskettiin kaavan 6 mukaan. BMP-4:lle haluttu pitoisuus oli 10 ng/ml ja bFGF:lle 5 ng/ml.

Päivänä 5 soluille vaihdettiin insuliinia ja FBS:a sisältävä RPMI-medium. Päivästä 6 alkaen RPMI + B27 (+ insuliini) + 2% FBS -medium vaihdettiin 2-3 päivän välein.

Solujen kuuluisi alkaa sykkiä päivästä 10-15 lähtien (Pekkanen-Mattila, henkilökohtainen tiedonanto 28.05.2012).

4.3.5 Solujen pakastus

Erilaistamattomia soluja pakastettiin, jotta tietyssä passagessa tutkittuja soluja voitaisiin tarvittaessa ottaa uudelleen testaukseen. Soluja pakastettiin mTeSR™1-mediumin valmistajan pakastusohjetta noudattaen kuvion 7 mukaan, kun kaivot olivat lähes 100 % konfluentteja. (STEMCELL Technologies 2011 s.10-11.) Solupellettiä suspensoitaessa pyrittiin pitämään solut ryppäissä yksisolususpension sijaan.



KUVIO 7. Solujen pakastusohje yhdelle 6-kuoppalevyn kaivolle.

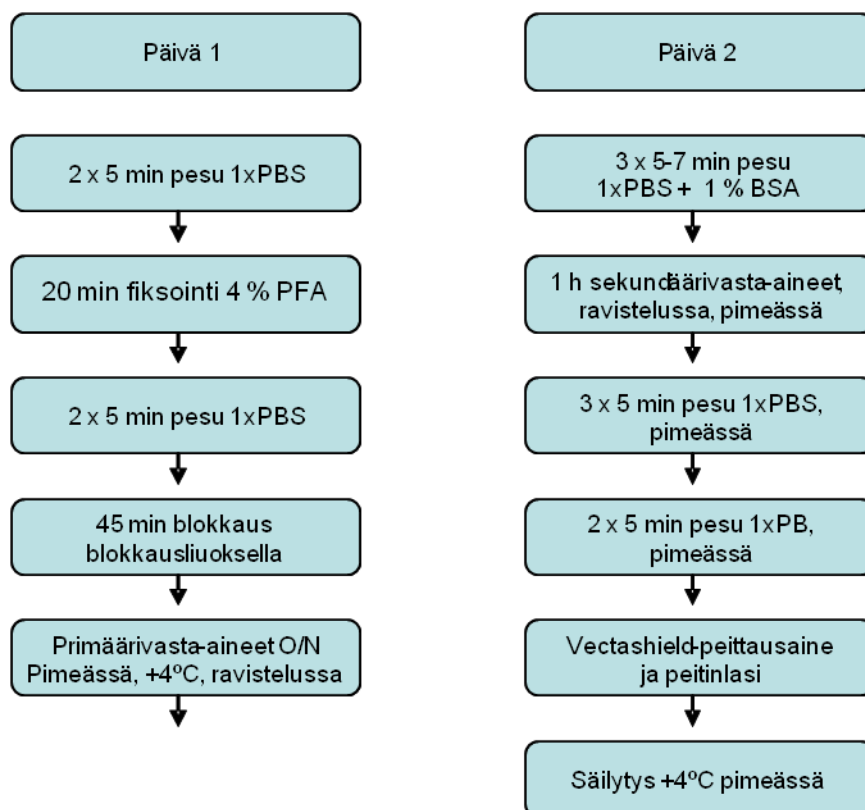
4.4 Erilaistettujen solujen immynosytokemiallinen värjäys

Erilaistettuja soluja värjättiin yleensä 2-4 viikkoa erilaistuksen jälkeen. Solut värjättiin huolimatta siitä, olivatko ne alkaneet sykkiä vai eivät. Sykkivät solut värjättiin siinä vaiheessa, kun sykkintä oli selkeää, eikä sykkiviä kohtia enää tullut lisää. Jos solut eivät

vielä monen viikonkaan päästä olleet alkaneet sykkiä, ne värjättiin silti. Näin nähtiin, olivatko solut erilaistuneet, mutteivät jostain syystä sykkineet vai eivätkö solut olleet erilaistuneet lainkaan. Lisäksi erilaistamattomia soluja värjättiin tietyillä kantasolumarkkereilla, jotta voitiin nähdä, oliko linjassa tapahtunut spontaania erilaistumista.

Erilaistetuista soluista värjättiin sydänlihassoluille ominaisia proteiineja ja erilaistamattomista soluista kantasolumarkkereita. Tutkituista proteiineista on kerrottu luvussa 2.4.1 (s. 12). Lisäksi näytteet värjättiin DAPI-värillä, joka värjää tumat sitoutumalla dsDNA:han. Värjäyksissä käytettiin epäsuoraa menetelmää ja samoja kaivoja saatettiin värjätä samanaikaisesti kahdella eri primäärivasta-aineella.

Ensin solut fiksoitiin kiinni kaivojen pohjaan, minkä jälkeen ne värjättiin ensin primäärivasta-aineilla, ja seuraavana päivänä sekundäärivasta-aineilla. Värjäys tehtiin kuvion 8 mukaan, tarvittavat reagenssit ovat taulukossa 2 ja käytetyt vasta-aineet taulukossa 3.



KUVIO 8. Värjäysohje.

TAULUKKO 2. Värjäyksissä tarvittavat liuokset ja niiden koostumukset (FBS eli fosfaattipuskuroitu suolaliuos, BSA eli naudan seerumin albumiini, PB eli fosfaattipuskuri, PFA eli paraformaldehydi, NDS eli normaali aasin seerumi ja DAPI eli 4',6-Diamidino-2-fenyyli-indoli dihydrokloridi).

Liuos	Reagenssit
Pesuliuokset	1 x PBS
	1 x PBS + 1 % BSA
	1 x PB
Fiksausliuos	4 % PFA
Primäärivasta-aineen liuos	TritonX-100 + 1 % BSA
Blokkausliuos	1 x PBS + 1 % NDS + 0,1 % TritonX-100 + 1 % BSA
Sekundäärivasta-aineen liuos	1 x PBS + 1 % BSA
Peittäusaine	VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI (Vector Labs)

TAULUKKO 3. Immunosytokemiallisissa värjäyksissä käytetyt vasta-aineet.

Primäärivasta-aineet	Valmistaja, cat-numero	Laimennussuhde
Vuohen anti-cTropT IgG	Abcam, ab64623-1	1:2500
Kanin anti-Cx43 IgG	Sigma-Aldrich, c6219	1:1000
Kanin anti-Ki67 IgG	Millipore, AB9260	1:800
Hiiren anti- α -aktiniini IgG	Sigma-Aldrich, A7811	1:1500
Hiiren anti-MHC IgG	Millipore, MAB1552	1:100
Vuohen anti-Nanog IgG	R&D Systems, AF1997	1:200
Vuohen anti-Oct3/4 IgG	R&D Systems, AF1753	1:400
Vuohen anti-Sox2 IgG	Santa Cruz Biotechnology, sc17319	1:200
Hiiren anti-SSEA-4 IgG	Santa Cruz Biotechnology, sc21703	1:100
Hiiren anti-TRAi-1-60 IgM	Millipore, MAB4360	1:200
Hiiren anti-TRA-1-81 IgM	Millipore, MAB438	1:200
Sekundäärivasta-aineet	Valmistaja, cat-numero	Laimennussuhde
Aasin anti-vuohi IgG	Invitrogen, A11057	1:800
Aasin anti-kani IgG	Invitrogen, A10042/A21206	1:800
Aasin anti-hiiri IgG	Invitrogen, A21202	1:800
Vuohen anti-hiiri IgG	Invitrogen, A11004	1:800
Vuohen anti-hiiri IgM	Invitrogen, A21043	1:800

4.5 Geenien ilmentymisen tutkiminen q-PCR:lla

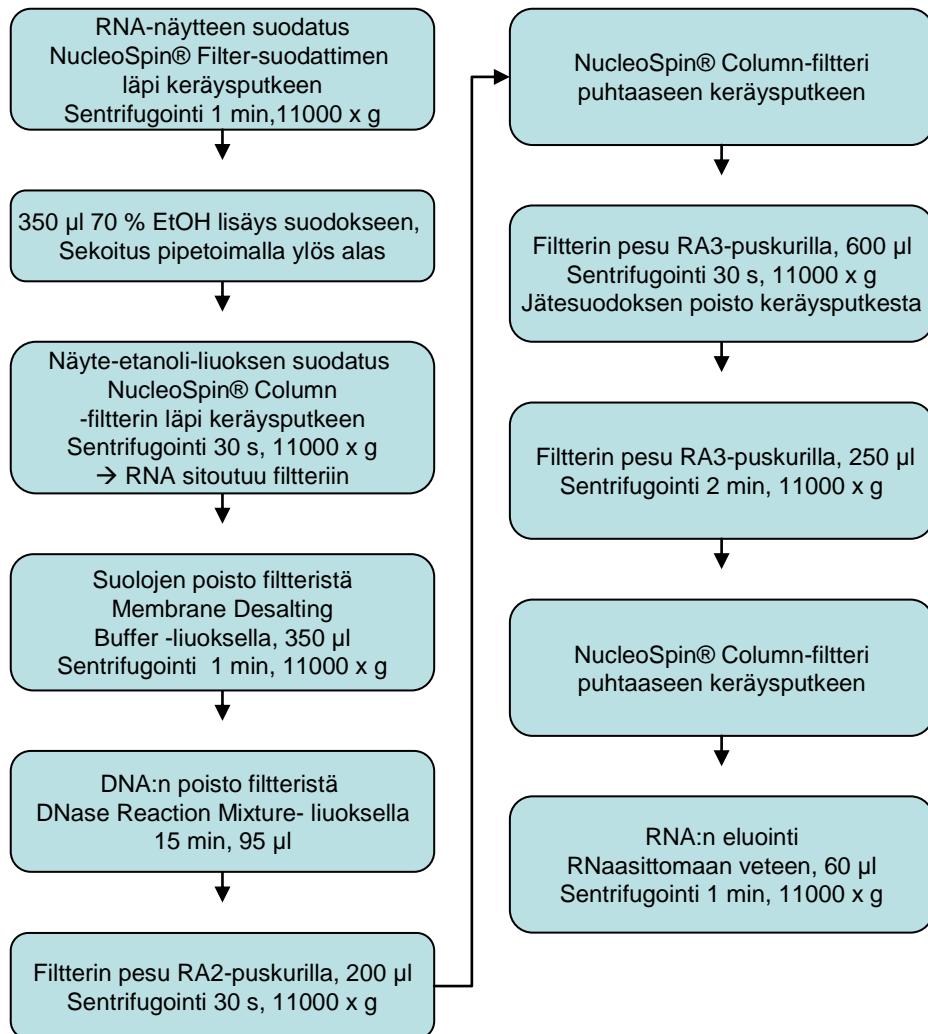
4.5.1 RNA:n eristys

RNA-näytteitä kerättiin päivinä 0, 1, 4, 6, noin 10-15 ja noin 25. Päivänä 0 nähtiin tilanne ennen kasvutekijöiden lisäämistä, päivänä 1 aktiviini A:n vaikutus, päivänä 4 BMP-4:n ja bFGF:n vaikutus ja päivänä 6 tilanne, kun kasvutekijät on otettu pois. Lisäksi kerättiin näyte päivänä 10-15, jolloin menetelmän mukaan solujen tulisi alkaa sykkiä, eli erilaistuksen pitäisi olla valmis ja lopulta noin päivänä 25, kun solujen tulisi sykkiä jo voimakkaasti.

Yksi RNA-näyte kerättiin aina kahdelta 12-kuoppalevyn kaivolta, jotta RNA:ta saatiin riittävästi. Kaivot huuhdeltiin kaksi kertaa PBS:lla ennen keräystä. RNA-näytteet kerättiin käyttäen 350 µl RA1 (Macherey-Nagel) + 1 % β-merkaptetaanoli -liuosta (Sigma-Aldrich). Näytteet säilytettiin Eppendorf-putkissa -80 °C:ssa. Näytteiden keräämisen jälkeen tyhjät kaivot huuhdeltiin jälleen PBS:lla, jottei myrkyllinen β-merkaptetaanoli vahingoittanut viereisten kaivojen soluja.

RNA eristettiin NucleoSpin® RNA II -kitillä (Macherey-Nagel) valmistajan ohjeen mukaan. RNA sidottiin ensin RNA-suodattimeen. Tämän jälkeen suodattimesta poistettiin suolat, DNA ja muut epäpuhtaudet, ja lopuksi RNA eluoiitiin veteen. Eristys tehtiin kuvion 9 mukaan. Veteen eluotua RNA:ta säilytettiin pakastimessa.

Kitin mukana tulivat kaikki tarvittavat liuokset 70 % etanolia ja DNase Reaction Mixture -liuosta lukuun ottamatta. DNase Reaction Mixture-liuos valmistettiin sekoittamalla RNAasitonta DNAasia ja rDNAasin reaktiopuskuria suhteessa 1:10. RNAasi ja DNAasi ovat RNA:ta ja DNA:ta hajottavia enstyymejä.



KUVIO 9. RNA:n eristys RNA-näytteestä NucleoSpin® RNA II -kitillä (Macherey-Nagel) valmistajan ohjeen mukaan.

4.5.2 RNA:n käänntö cDNA:ksi

Ennen RNA:n käänntöä cDNA:ksi luvun 4.5.1 (s. 34) mukaan valmistettujen näytteiden RNA-pitoisuudet määritettiin Nanodrop-spektrofotometrillä. Pitoisuusmääritys tehtiin mittaamalla näytteiden absorbanssit aallonpituudella 260 nm ja näytteiden puhtausasteet määritettiin A260/280 -suhteella. RNA-näytteiden RNA-pitoisuudet sekä puhtaudet on esitetty taulukossa 4. Puhtausasteet olivat kaikissa näytteissä noin 2,1-2,2, mikä on lähellä puhtaan RNA:n 2,0-arvoa.

TAULUKKO 4. Näytteiden RNA-pitoisuudet ja puhtausasteet.

Näyte	RNA-pitoisuus (ng/μl)	Puhtausaste (A 260/280)
UTA.07801.HcMMc päivä 0	90,24	2,18
UTA.07801.HcMMc päivä 1	83,47	2,14
UTA.07801.HcMMc päivä 4	65,40	2,25
UTA.07801.HcMMc päivä 6	110,78	2,18
UTA.07801.HcMMc päivä 15	242,72	2,19
UTA.04602.WT päivä 0	162,85	2,25
UTA.04602.WT päivä 1	202,61	2,20
UTA.04602.WT päivä 4	236,24	2,19
UTA.04602.WT päivä 6	434,30	2,13
UTA.04602.WT päivä 15	149,71	2,21

RNA käännettiin cDNA:ksi High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit for 200 and 1000 Reactions -kitillä (Applied Biosystems). Master mix -liuosta valmistettiin taulukon 5 mukaan. Liuosta tarvittiin 10 μl näytettä kohden. Master mix liuoksen lisäksi tarvittiin 500 ng näyte-RNA:ta. Tarvittavat näytemäärät laskettiin kaavalla 7 käyttäen näytteille mitattuja RNA-pitoisuuksia (taulukko 4). Näytteitä laimennettiin vedellä siten, että laimennosten kokonaistilavuudeksi tuli 10 μl. Kunkin laimennetun näytteen päälle pipetoitiin 10 μl master mixiä, jolloin reaktion kokonaistilavuudeksi tuli 20 μl. Liuokset sekoitettiin vorteksoimalla ja sentrifugoitiin reaktioputkien pohjalle.

Näytteiden lisäksi tehtiin kaksi kontrollinäytettä, joista toisesta puuttui käänteistranskriptaasientsyymi ja toisesta näyte-RNA. Käänteistransfekaasikontrolliin laitettiin normaalisti näyte-RNA, mutta master mix -liuoksessa käänteistransfekaasi oli korvattu vedellä. Vesikontrollissa puolestaan näyte-RNA oli korvattu vedellä. Ilman käänteistranskriptaasientsyymiä näyte-RNA:n ei pitäisi kääntyä cDNA:ksi, jolloin kontrollinäytteestä ei pitäisi monistua mitään q-PCR-ajossa. Vesikontrollissa puolestaan käänteistranskriptaasilla ei ole templaattia, jota kääntää cDNA:ksi, jolloin q-PCR:ssä ei jälleen pitäisi monistua mitään. Näytteet ajettiin taulukon 6 mukaisella lämpötilaohjelmalla Eppendorf Thermal Cycler -PCR-laitteella ja ajon päätyttyä cDNA-näytteet siirrettiin pakastimeen.

$$\frac{500 \text{ ng}}{\text{näytteen RNA - pitoisuus, ng / } \mu\text{l}} = \text{tarvittava näytemäärä, } \mu\text{l} \quad (7)$$

TAULUKKO 5. Master mixin pipetointitaulukko yhtä näytettä kohden.

Master Mix, reagenssit	
10x käänteistranskriptaasipuskuri	2,0 μl
25X dNTP-mix (100 mM)	0,8 μl
10X RT -alukkeet	2,0 μl
MultiScribe™ -käänteistranskriptaasi	1,0 μl
RNAasi-inhibiittori	0,5 μl
Yhteensä	10 μl

TAULUKKO 6. RT-PCR-ajon ohjelma.

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

4.5.3 Kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio

q-PCR-ajo tehtiin 96-kuoppalevyllä. Kaikki näytteet sekä kontrollit ajettiin sekä tutkittavan geenin, c troponiini T:n, alukkeilla että tulosten normalisointiin käytetyn peptidyylipropyli-isomeraasi-geeni G:n (PPIG) alukkeilla. Kustakin näytteestä tehtiin kolme rinnakkaisnäytettä. Näytteiden pipetointijärjestys on esitetty kuviossa 10. Tarvittiin siis kaksi eri master mix -liuosta, joissa oli eri alukkeet. Kumpaakin master mix -liuosta valmistettiin taulukon 7 mukaan 12 μl /näyte. Master mix -liuoksessa alukkeiden tuli olla pitoisuudessa 10 pmol/ μl . Alukkeiden mahdolliset laimennokset tehtiin kaavan 8 mukaan.

wt d0	wt d1	wt d4	wt d6	wt d15		hcm d0	hcm d1	hmc d4	hcm d6	hcm d15	H ₂ O
wt d0	wt d1	wt d4	wt d6	wt d15		hcm d0	hcm d1	hmc d4	hcm d6	hcm d15	-RT
wt d0	wt d1	wt d4	wt d6	wt d15		hcm d0	hcm d1	hmc d4	hcm d6	hcm d15	
wt d0	wt d1	wt d4	wt d6	wt d15		hcm d0	hcm d1	hmc d4	hcm d6	hcm d15	H ₂ O
wt d0	wt d1	wt d4	wt d6	wt d15		hcm d0	hcm d1	hmc d4	hcm d6	hcm d15	-RT
wt d0	wt d1	wt d4	wt d6	wt d15		hcm d0	hcm d1	hmc d4	hcm d6	hcm d15	

KUVIO 10. Näytteiden pipetointi 96-kuoppalevyn kaivoihin. Punaisiin kaivoihin laitettiin c troponiini T:n alukkeita sisältävää master mix -liuosta ja sinisiin kaivoihin kontrolligeenin alukkeita sisältävää master mix -liuosta.

TAULUKKO 7. Q-PCR-reaktion pipetointitaulukko yhtä näytettä kohden.

Master mix	
Power SYBR® Green PCR Master Mix	7,5 µl
Vesi	3,6 µl
Alukkeet (forward) 10 pmol/ µl	0,45 µl
Alukkeet (reverse) 10 pmol/ µl	0,45 µl
Yhteensä	12 µl
cDNA-näyte	3 µl
Reaktion kokonaistilavuus	15 µl

$$\frac{n \cdot 0,45 \mu\text{l} \cdot 100 \text{ pmol}/\mu\text{l}}{\text{alukkeen pitoisuus, pmol} / \mu\text{l}} = \text{tarvittava määrä alukkeita, } \mu\text{l} \quad (8)$$

n = näytteiden määrä

Luvun 4.5.2 (s. 36) mukaan valmistetut cDNA-näytteet laimennettiin vedellä 1:5. 96-kuoppalevyn kaivoille pipetoitiin 12 µl master mixiä ja 3 µl laimennettua cDNA-näytettä, jolloin reaktion kokonaistilavuudeksi tuli 15 µl. 96-kuoppalevyn päälle liimattiin kalvo ja kuoppalevy sentrifugoitiin. Tämän jälkeen kuoppalevy asetettiin q-PCR-laitteeseen ja aloitettiin taulukon 8 mukainen ohjelma. Taulukon kohdissa 1-4 toistettiin normaalia PCR-sykliä 40 kertaa, minkä aikana tehtiin varsinainen

kvantitatiivinen määrittely. Kohdissa 5-7 näytteille muodostettiin lämpötilaa nostamalla sulmaisikäyrät, jotka kertovat monistuneen sekvenssin puhtaudesta.

TAULUKKO 8. Q-PCR:n lämpötilaohjelma.

Vaihe	1	2	3	4	5	6	7
Toisto	1 x	1 x	40 x		1 x	1 x	1 x
Lämpötila	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C	95 °C	60 °C	95 °C
Aika	2 min	10 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s

5 TULOKSET

5.1 Passagen ja solupitoisuuden vaikutus erilaistukseen

Linjoja UTA.04602.WT ja UTA.07801.HcMMc erilaistettiin useita kertoja kokeillen eri solupitoisuuksien ja passagen vaikutusta erilaistustulokseen. Erilaistuskertojen passaget, käytetyt solupitoisuudet ja erilaistuskertojen tulokset on esitetty taulukossa 9.

UTA.04602.WT:n kohdalla parhaaksi todettu solupitoisuus oli 100000 solua/kaivo. Tällä solupitoisuudella saatiin noin kymmenennen passagen kohdalla erittäin hyvin erilaistuneita soluja, jotka sykkivät alueittain yksisolukerroksena. Kaikissa onnistuneimmissa erilaistuksissa käytettiin solupitoisuutta 100000 solua/kaivo. Passagen kasvaessa erilaistumiseen vaadittiin suurempi solupitoisuus, 200000 solua/kaivo. Tätä suuremmilla solupitoisuuksilla sykkivät soluryppäät alkoivat irtoilla pohjasta.

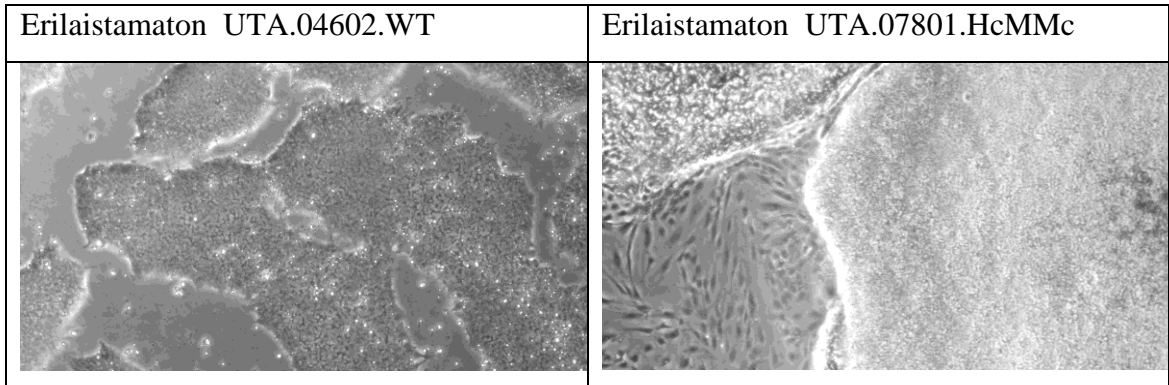
Passagen vaikutus erilaistumiseen oli merkittävä. UTA.04602.WT-linjalla passagen ollessa alle viiden erilaistumista ei tapahtunut lainkaan ja viidennessäkin passagessa vain muutamilla kaivoilla saatiin erilaistuneita soluja. Toisaalta passagen ollessa hyvin suuri, yli 30, sykkivän yksisolukerroksen sijaan UTA.04602.WT-linjalla saatiin sykkiviä kolmiulotteisia soluryppäitä. Parhaat tulokset saatiin passagen ollessa noin kymmenen.

TAULUKKO 9. UTA.04602.WT:n ja UTA.07801.HcMMc:n erilaistuskerrat. Solulinjan passage erilaistushetkellä, solupitoisuus ja erilaistuksen tulos. *Solupitoisuus epävarma.

linja	passage	solua/kaivo	tulos
UTA.04602.WT	30 (2)	200000	Solut irtosivat pohjasta
	33 (5)	200000/ 100000*	Osalla 100000 solua/kaivo -kuopilla sykkii mattona, 200000 solua/kaivo -kuopilla sykkiviä soluryppäitä
	34 (6)	100000/ 200000	Ei syki
	36 (8)	200000	Solut irtosivat pohjasta
	24 (9)	100000	Sykkii mattona
	37 (9)	100000/ 200000/ 300000	100000 solua/kaivo-kuopilla sykkii mattona, 200000/300000 solua/kaivo -kuopilta solut irronneet
	40 (12)	100000/ 300000	100000 solua/kaivo -kuopilla sykkii mattona, 300000 solua/kaivo -kuopilla sykkiviä soluryppäitä
	29 (14)	100000/ 200000	Solut irtosivat pohjasta
	30 (15)	100000/ 150000/ 200000	Sykkiviä soluryppäitä 200000 solua/kaivo -kuopilla
	32 (17)	100000	
	62 (32)	100000	Ei syki
	63 (33)	200000	Solut irtosivat pohjasta
	65 (35)	100000/ 200000	Reunoilla sykkiviä alueita 200000 solua/kaivo -kuopilla
	66 (36)	200000/ 100000	200000 solua/kaivo -kuopilla sykkiviä soluryppäitä
	67 (37)	100000/ 200000	100000 solua/kaivo -kuopilta solut irtosivat pohjasta, 200000 solua/kaivo ei syki
UTA.07801.HcMMc	29 (2)	200000	Ei syki
	30 (3)	200000	Ei syki
	34 (7)	100000/ 200000/ 300000	Ei syki

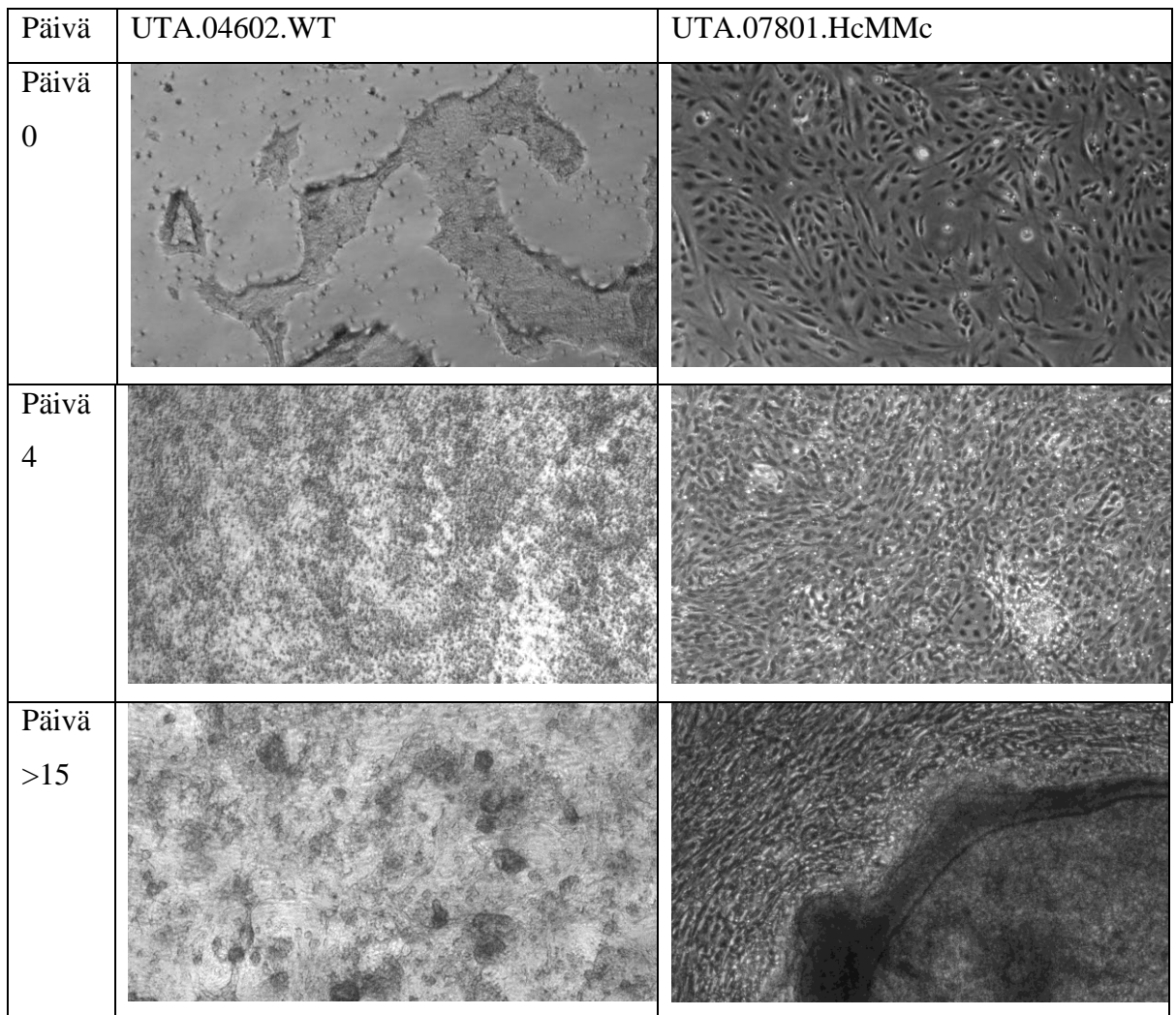
Linjalla UTA.07801.HcMMc ei saatu kertaakaan erilaistettua sydänlihassoluja. Kuten kuviossa 11 on esitetty, linjojen kantasolukoloniat ovat hyvin erinäköisiä. Siinä missä

UTA.04602.WT:n kaikki koloniat ovat saman näköisiä, 07801.HcMMc:n koloniat eroavat selvästi toisistaan. UTA.04602.WT:n koloniat ovat tyypillisen kantasolukolonian näköisiä: ne ovat tiiviitä ja selväreunaisia ja solut ovat melko pieniä. UTA.07801.HcMMc:llä osa soluista on muodoltaan pitkulaisia ja muistuttavat neurosoluja.



KUVIO 11. UTA.04602.WT:n ja UTA.07801.HcMMc:n morfologia kantasolumuodossa.

Kuviossa 12 on esitetty linjojen morfologian muutosta erilaistumisen myötä. Päivästä 0 lähtien, jolloin solut ovat vielä erilaistumattomia, solujen ulkonäkö on hyvin erilainen linjojen välillä. UTA.04602.WT:n koloniat muistuttavat kantasolukolonioita, mutta UTA.07801.HcMMc-solukko näyttää jo valmiiksi erilaistuneelta. Päivänä neljä solut ovat altistuneet erilaistusprosessissa käytetyille kasvutekijöille. Taulukon alimmat kuvat on otettu, kun erilaistuksesta on kulunut yli 15 päivää. Tällöin sykkiviä alueita pitäisi olla havaitavissa. UTA.04602.WT:llä solut ovat muodostaneet melko tasaisen maton, jossa on muutamia paksumpia kohtia. UTA.07801.HcMMc-linjan kaivolla näkyy kahta selvästi erilaista solutyyppiä.

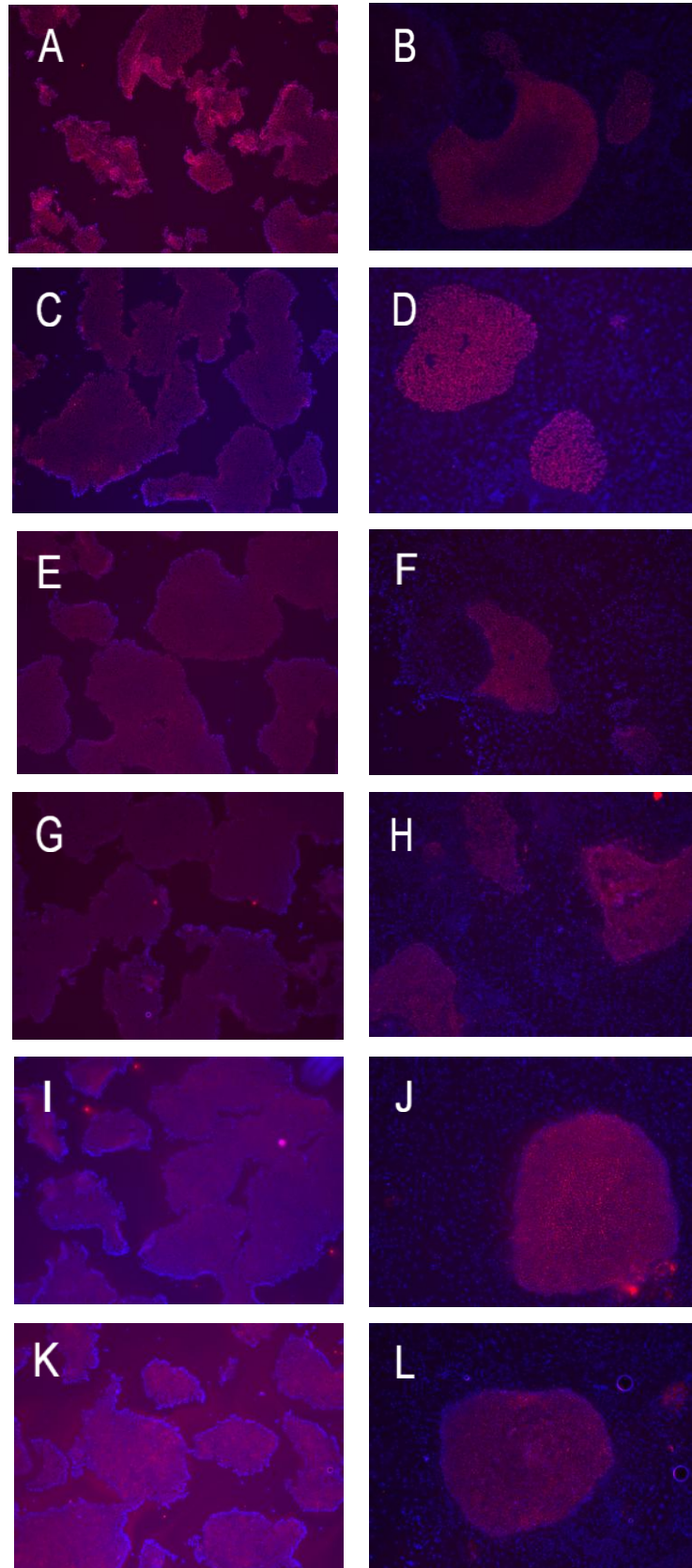


KUVIO 12. UTA.04602.WT:n ja UTA.07801.HcMMc:n morfologia erilaistumisen myötä.

5.2 Solujen immunosytokemialliset värjäykset

Kummankin linjan kantasoluja immunovärjättiin kantasoluille ominaisilla markkereilla, Nanog:lla, Oct3/4:llä, Sox2:lla, SSEA-4:llä, TRA-1-60:llä ja TRA-1-81:llä. Lisäksi käytettiin DAPI-väriä, joka värjää kaikkien solujen tumat. Kuviossa 13 esitetyistä kuvista käy ilmi, että UTA.04602.WT:llä kaikki solut ilmentävät kaikkia kantasolumarkkereita, mutta 07801.HcMMc:llä aina vain muutama kolonia ilmentää tutkittuja markkereita. UTA.07801.HcMMc-linja ei siis säilynyt kantasoluasteella.

UTA.04602.WT UTA.07801.HcMMc

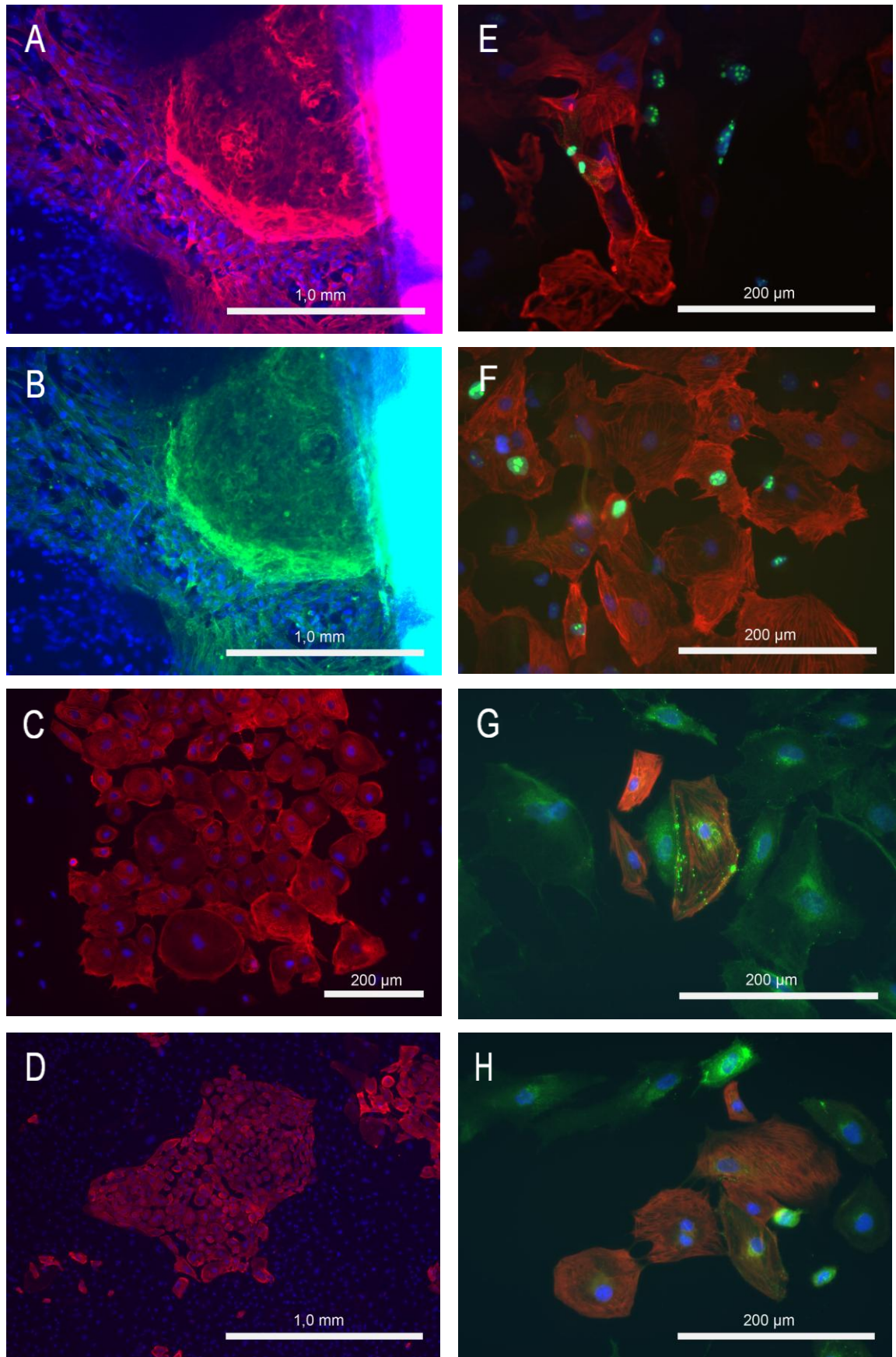


KUVIO 13. Erilaistamattomia UTA.04602.WT- ja UTA.07801.HcMMc-soluja immunovärjättiin kantasolumarkkereilla, jotta nähtiin oliko solulinja pluripotentissa tilassa. **A-B** Nanog (punainen) ja DAPI (sininen), **C-D** Oct 3/4 (punainen) ja DAPI

(sininen), **E-F** Sox2 (punainen) ja DAPI (sininen), **G-H** SSEA-4 (punainen) ja DAPI (sininen), **I-J** TRA-1-60 (punainen) ja DAPI (sininen), **K-L** TRA-1-81 (punainen) ja DAPI (sininen).

Erilaistetuista soluista värjättiin muun muassa sydänlihassoluille spesifisiä c troponiini T- ja α -aktiniini-proteiineja sekä konneksiini 43- ja Ki 67 -proteiineja. Proteiineista on kerrottu tarkemmin luvussa 2.4.1 (s. 12). Värjäyksiä tehtiin kummankin linjan soluille, mutta UTA.07801.HcMMc-linjan solut eivät värjäytyneet sydänlihassoluspesifisillä vasta-aineilla kertaakaan. Fluoresenssimikroskoopilla otetut kuvat UTA.04602.WT-linjan soluista on esitetty kuviossa 14.

Kuvion 14 kuvissa A ja B sama kaivo on värjätty sekä c troponiini T:llä että α -aktiniinilla, jotka ovat kumpikin sydänlihassoluille ominaisia proteiineja. Sama kohta, sykkivä solurypäs kaivon reunalla, on värjäytynyt kummallakin värillä, eli samat solut ilmensivät kumpaakin sydänlihassoluille ominaista proteiinia. Kuvat C-H ovat dissosioituja soluja, joissa troponiiniposiitiviset solut näkyvät punaisina. Kuvissa E ja F solut on lisäksi värjätty Ki 67:llä, joka kertoo solun olevan solusykliissä. Kuvassa E värjäytyneet tumat eivät ole sydänlihassolujen tumia, mutta kuvassa F nähdään Ki 67-värjäytymää myös troponiiniposiitivisten solujen tumissa. Kuvissa G ja H punaisen c troponiini T:n lisäksi vihreällä näkyy konneksiini 43. Konneksiini 43 on eräs aukkoliitoksen rakenneosia.

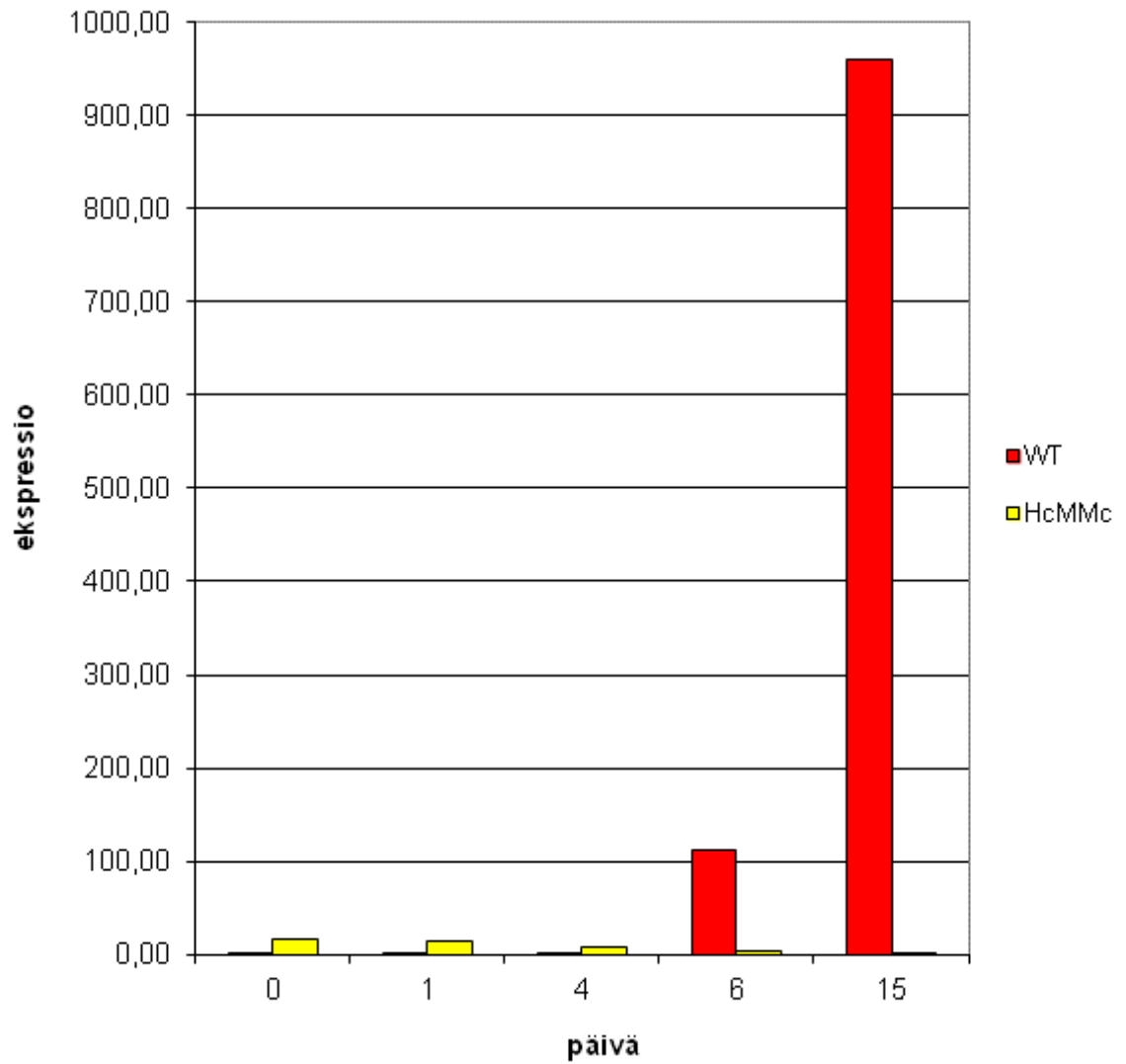


KUVIO 14. **A-D** c troponiini T (punainen), α -aktiniini (vihreä) ja DAPI (sininen), **E-F** c troponiini T (punainen), Ki 67 (vihreä) ja DAPI (sininen) **G-H** c troponiini T (punainen), konneksiini 43 (vihreä) ja DAPI (sininen).

5.3 Kvantitatiivinen PCR

Kummankin linjan yhden erilaistuskerran päivinä 0, 1, 4, 6 ja 15 kerättiin RNA-näytteet, joiden RNA käännettiin cDNA:ksi. RNA-näytteiden puhtausasteet on esitetty taulukossa 4 (s. 37). cDNA:sta tehtiin q-PCR ajo, jossa tutkittiin c troponiini T:n ilmentymistä. Linjan UTA.04602.WT näytteet kerättiin passagen 40 (12) erilaistuskerralta, jolloin saatiin erilaistettua yksisolukerrosena sykkiviä sydänlihassolualueita. UTA.07801.HcMMc:n näytteet kerättiin passagen 34 (7) erilaistuskerralta, jolla ei saatu erilaistuneita soluja.

c troponiini T:n ilmentyminen tutkituissa linjoissa on esitetty kuviossa 15. Normalisoinnissa käytettiin endogeenistä PPIG-geeniä. UTA.04602.WT:llä c troponiini T:n ilmentyminen oli hyvin vähäistä päivinä 0, 1 ja 4 ja voimistui päivinä 6 ja 15. UTA.07801.HcMMc:llä c troponiini T:n ilmentyminen oli kaikkina aikapisteinä vähäistä ja jopa laski hiukan ajan kuluessa.



KUVIO 15. c troponiini T:n ilmentyminen UTA.04602.WT- ja UTA.07801.HcMMc-
linjoissa erilaistuksen päivinä 0, 1, 4, 6 ja 15.

POHDINTA

Opinnäytetyön tavoite oli ottaa sydänryhmän käyttöön uusi sandwich-erilaistusmenetelmä. Työn tarkoituksena oli selvittää kahdelle iPS-linjalle erilaistumisen kannalta optimaalinen passage ja solupitoisuus sekä karakterisoida erilaistuneita sydänlihassoluja. Karakterisointiin käytettiin immunosytokemiallisia värjäyksiä sekä q-PCR:ta, joiden avulla selvitettiin, ilmensivätkö erilaistuneet solut sydänlihassoluille ominaisia geenejä ja proteiineja.

Menetelmä saatiin optimoitua toiselle tutkituista linjoista. UTA.04602.WT-linja saatiin erilaistumaan alueittain sykkiväksi yksisolukerrokseksi, jonka solut ilmensivät sydänlihasspesifisiä geenejä ja proteiineja. Menetelmän tutkimista täytyy kuitenkin jatkaa, jotta sen voisi ottaa sydänryhmässä käyttöön, sillä sen toistettavuus oli heikko. UTA.07801.HcMMc-linjan kohdalla menetelmä ei toiminut lainkaan, sillä linjan iPS-solut eivät säilyneet pluripotentteina. Myös linjan erilaistamattomien solujen hidas kasvu rajoitti linjan erilaistuskertojen määrää. Näin ollen UTA.07801.HcMMc-linjaa ei saatu erilaistumaan kertaakaan.

Immunosytokemiallisten värjäysten ja kantasolujen morfologian perusteella UTA.07801.HcMMc-linja ei säilynyt pluripotenttina, kun sitä ylläpidettiin BD Matrigel™:n päällä. Linjan iPS-solut eivät muistuttaneet tyypillisiä kantasolukolonioita ja immunovärjäyksissä havaittiin, että vain murto-osa linjan soluista ilmensi kantasolumarkkereita. Linja saattoi olla valmiiksi erilaistunut jo ennen kuin se siirrettiin BD Matrigel™:lle, tai solut saattoivat itse tuottaa jotain proteiinia, joka aiheutti erilaistumisen. Hallitsemattoman erilaistumisen takia linjasta ei saatu kertaakaan erilaistettua sydänlihassoluja, sillä valmiiksi erilaistuneet solut eivät enää voi erilaistua (Sylvester & Longaker 2004, 94). UTA.04602.WT-linja puolestaan säilyi pluripotenttina. Linjan iPS-solut kasvoivat hyvin, muodostivat kantasoluille tyypillisen näköisiä kolonioita ja ilmensivät kantasolumarkkereita.

UTA.04602.WT-linja saatiin erilaistumaan sykkiviksi sydänlihassoluiksi useita kertoja, joten menetelmä toimi kyseisellä linjalla. Solut saatiin erilaistumaan ensimmäisen kerran passagess 5 ja ne erilaistuivat yhä passagessa 36. Selvästi parhaat tulokset saatiin kuitenkin passagen ollessa noin kymmenen solupitoisuudella 100000 solua/kaivo. Passagen kasvaessa erilaistumiseen vaadittiin 200000 solua/kaivo -solupitoisuus.

Tällöin ei kuitenkaan enää saatu sykkivää yksisolukerrosta, vaan kolmiulotteisia sykkiviä soluryppäitä. Menetelmän tavoite on saada nimenomaan yksisolukerros erilaistuneita soluja, joten soluryppäät eivät olleet toivottuja. Onnistuneimmilla erilaistuskerroilla solut säilyivät yksisolukerrosena, mutta sykkivät alueet eivät kattaneet koko pinta-alaa, vaan esiintyivät alueittain.

Erilaistuneet solut ilmensivät sydänlihassoluille ominaisia c troponiini T-, MHC- sekä α -aktiniini-proteiineja (Dhoot ym. 1979, 339; Nakao ym. 1997, 2362; Sjöblom ym. 2008, 2688). Kun samoista soluista värjättiin yhtä aikaa c troponiini T- ja MHC-proteiineja tai c troponiini T- ja α -aktiniini-proteiineja, samat alueet värjäytyivät. Erilaistuneet solut siis ilmensivät kaikkia kolmea sydänlihassoluille ominaista proteiinia. Lisäksi huomattiin, että vain sellaiset alueet värjäytyivät, joilla oli havaittu sykkimistä. Ilmiötä, jossa solut olisivat erilaistuneet, mutta eivät alkaneet sykkiä, ei siis havaittu. UTA.07801.HcMMc-linjan solut eivät kertaakaan värjäytyneet sydänlihassoluspesifisillä vasta-aineilla, mikä vahvisti oletuksen siitä, että linjan solut eivät olleet erilaistuneet.

UTA.04602.WT-linjan dissosioiduista soluista värjättiin myös konneksiini 43- ja Ki 67 -proteiineja yhtä aikaa c troponiini T:n kanssa. Havaittiin, että konneksiini 43:a esiintyy sekä sydänlihassoluissa että muissa soluissa. Vaikka konneksiini 43 onkin yleinen aukkoliitoksen osa sydänlihassoluissa, se ei ole vain sydänlihassoluille spesifinen (Ai ym. 2000, 161). Solusykliin liittyvää Ki 67 -proteiinia ei juurikaan esiintynyt troponiiniposiitivisten solujen tumissa. Joidenkin kohdalla esiintymistä kuitenkin havaittiin, mikä viittasi siihen, että kyseiset sydänlihassolut olivat solusykliissä (Scholzen & Gerdes 2000, 311). Yleensä sydänlihassolut eivät erilaistuttuaan enää jakaudu vaan siirtyvät G_0 -faasiin (Evans-Anderson, ym. 2008, 686).

q-PCR-ajon tulokset tukivat muita tuloksia. c troponiini T on sydänlihassolujen ilmentämä geeni, joten ilmentyminen oli oletuksen mukaista UTA.04602.WT-linjalla (Dhoot ym. 1979, 339). Geenin ilmentyminen alkoi nousta erilaistumisen edetessä ja oli voimakkaimmillaan päivänä 15, jolloin solut jo sykkivät. Linja kuitenkin ilmensi c troponiini T:tä vähäisesti jo päivänä 0, jolloin solut olivat vielä kantasoluasteella. Tämä saattoi johtua alukedimeerien muodostumisesta. UTA.04602.WT-linjan solut siis erilaistuivat sydänlihassoluiksi q-PCR-tulosten, immunovärjäysten ja solujen spontaanin sykkinnän perusteella.

UTA.07801.HcMMc-linjan kohdalla c troponiini T:n ilmentyminen pysyi vähäisenä kaikkina aikapisteinä. q-PCR:n tulokset vahvistivat edelleen oletusta siitä, että UTA.07801.HcMMc-linjan kantasolut olivat erilaistuneet spontaanisti, eivätkä solut siksi erilaistuneet sydänlihassoluiksi. Linja ilmensi c troponiini T:tä jo päivänä 0, jolloin solujen kuuluisi vielä olla kantasolujasteella. Pluripotentit kantasolut eivät ilmennä sydänspesifisiä geenejä, joten UTA.07801.HcMMc-linja ei ollut säilynyt kantaosluasteella (Hoffman & Carpenter 2005, 701). c troponiini T:n ilmentyminen ei myöskään voimistunut erilaistusprosessin edetessä, joten solut eivät erilaistuneet sydänlihassoluiksi (Dhoot ym. 1979, 339). Tulokset ovat yhdenmukaisia immunovärjäysten ja solujen morfologian kanssa.

q-PCR-ajossa c troponiini T:n vesikontrollinäyte ei ollut puhdas, vaan siinä oli todennäköisesti muodostunut alukedimeerejä. Tulevaisuudessa c troponiini T:n alukkeiden pitoisuutta täytyy pienentää, jotta alukedimeerien muodostuminen vähenisi. Toinen käänteistranskriptaasiton kontrollinäytekään ei ollut puhdas. Tämä on mahdollisesti voinut johtua RNA-näytteisiin jääneestä genomisesta DNA:sta. Vaikka kontrollinäytteet eivät olleet täysin puhtaita, niiden aiheuttama virhe ei merkittävästi muuttaisi q-PCR:n tuloksista tehtäviä päätelmiä.

Sandwich-menetelmän käyttöönotto sydänryhmässä vaatisi lisätutkimuksia ja optimointia. Se on sydänryhmän nykyistä END-2-erilaistusmenetelmää työläämpi ja kalliimpi, eikä se ole yhtä luotettava. Jokaiselle tällä menetelmällä erilaistettavalle linjalle pitäisi erikseen optimoida passage ja solupitoisuus, joissa erilaistus toimii. UTA.04602.WT-linjan antamien tietojen perusteella menetelmä ei myöskään toimi optimaalisesti kuin muutaman passagen ajan. Tämä johtaisi siihen, että kutakin käytettävää linjaa pitäisi olla erittäin suuret määrät pakastettuna, ja uusia eriä pitäisi ottaa kasvuun lähes jatkuvasti. Tämä lisäisi menetelmän työmäärää entisestään.

Toisaalta sandwich-menetelmää käytettäessä ei tarvitsisi enää kasvattaa END-2-soluja, ja erilaistettujen solujen dissosiointi helpottuisi. Sandwich-menetelmällä erilaistetut solut saatiin hajotettua yhdellä entsyymikäsittelyllä, kun taas END-2-menetelmällä erilaistettujen solujen dissosiointi on hyvin pitkäkestoinen monimutkainen prosessi. Menetelmä olisi myös ohjatumpi ja sillä päästäisiin eroon eläinperäisten solujen käytöstä erilaistusprosessissa, mikä mahdollistaisi sydänlihassolujen käytön kliinisissä

sovelluksissa. Lisäksi kirjallisuuden perusteella sandwich-menetelmä on END-2-menetelmää huomattavasti tehokkaampi (Mummery 2003, 2735; Zhang 2010, abst).

Tulevaisuudessa olisi mielenkiintoista selvittää sandwich-menetelmällä erilaistettujen solujen fysikaalisia ominaisuuksia, mitä tässä tutkimuksessa ei tehty lainkaan. Menetelmälle voitaisiin myös määrittää erilaistumistehokkuus laskemalla kuinka paljon saadaan erilaistuneita soluja suhteessa kaikkiin soluihin. Lisäksi menetelmää tulisi tutkia useammilla solulinjoilla, jotta menetelmästä saataisiin kattavampaa tietoa.

Tehokkaiden ja luotettavien erilaistusmenetelmien kehittäminen on oleellista sydänryhmän tavoitteiden ja kantasolututkimuksen kannalta. Kliinisten sovellusten näkökulmasta on myös tärkeää kehittää erilaistusmenetelmiä, joissa ei käytetä eläinperäisiä soluja. Vaikka opinnäytetyössä sandwich-menetelmää ei saatu toimimaan aukottomasti, siitä saatiin kuitenkin paljon käytännön tietoa, joiden pohjalta kehitystä voidaan jatkaa.

LÄHTEET

Ai, Z., Fischer, A., Spray, D. C., Brown A. M. C, & Fishman, G. I. 2000. Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *Journal of Clinical Investigation* 105 (2), 161–171.

Andrews, P., Przyborski, S. & Thomson, J. 2001. Embryonal Carcinoma Cells as Embryonic Stem Cells. Teoksessa Marshak, D., Gardner, R. & Gottlieb, D. (ed.). *Stem Cell Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 231-265.

ATCC. 2007. Passage Number Effects In Cell Lines. Technical Bulletin nro 7. [pdf]. Luettu 13.08.12.

<http://fhs.mcmaster.ca/safetyoffice/documents/ATCCHighPassageBulletin7.pdf>

BD Biosciences. 2008. Manual: BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, Growth Factor Reduced. Catalog #354230.

Campbell, M. & Farrell, S. 2006. *Biochemistry*. 5. painos. Belmont: Thomson Brooks/Cole.

Cubie, H., Seagar, H., McGoogan, E., Whitehead, J., Brass, A., Arends, M. & Whitley, M. 2001. Rapid real time PCR to distinguish between high risk human papillomavirus types 16 and 18. *Molecular Pathology* 54 (1), 24-29.

Donovan, P. & Gearhart, J. 2001. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *NATURE* 414 (1), 92-97

Dhoot, G., Frearson N. & Perry, V. 1979. Polymorphic forms of troponin T and troponin C and their localization in striated muscle cell types. *Experimental Cell Research* 122 (2), 339-350.

Evans-Anderson, H., Alfieri, C. & Yutzey, K. 2008. Regulation of Cardiomyocyte Proliferation and Myocardial Growth During Development by FOXO Transcription Factors. *Circulation Research* 102, 686-694.

Farah, C. & Reinach, F. 1995. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *The FASEB Journal* 9 (9), 755-767.

Freshney, R. I., 2005. *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. 5. painos. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Freund, C., Ward-van Oostwaard, D., Monshouwer-Kloots, J., van den Brink, S., van Rooijen, M., Xu, X., Zweigerdt, R., Mummery C. & Passier, R. 2008. Insulin Redirects Differentiation from Cardiogenic Mesoderm and Endoderm to Neuroectoderm in Differentiating Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 26 (3), 724-733.

Goni, R., Garcia P. & Foissac, S. 2009. The qPCR data statistical analysis. [pdf] Integromics White Paper. 2009. <http://www.gene-quantification.de/integromics-qpcr-statistics-white-paper.pdf>

- Hoffman, L. & Carpenter, M. 2005. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 23 (6), 699-708.
- Holland, P., Abramson, R., Watson R. & Gelfand, D. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' \rightarrow 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS* 88 (16), 7276–7280.
- Hou Y., Zhang H., Miranda L. & Lin S. 2010. Serious Overestimation in Quantitative PCR by Circular (Supercoiled) Plasmid Standard: Microalgal *pcna* as the Model Gene. *PLoS ONE* 5(3), 1-7.
- Humpath.com. 2003. Cardiomyocyte. [www-sivu]. First European Symposium of Biopathology. Julkaistu 18.11.2003. Luettu 12.07.2012. <http://www.humpath.com/spip.php?article1727>.
- IHCWORLD. 2011. How to Choose the Best Secondary Antibody for Immunohistochemistry Application. [www-sivu]. Luettu 27.08.12. http://www.ihcworld.com/_technical_tips/2nd_antibody_tips.htm
- Karp, G. 2005. *Cell and Molecular Biology*. 4. painos. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J. & Gepstein, L. 2001. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *The Journal of Clinical Investigation* 108 (3), 407-414.
- Kettunen, R. 2011. Sydänlihaksen rakenne ja toiminta. [www-sivu]. Duodecim Terveysportti. Artikkelin tunnus syd00005 (002.030). Julkaistu 6.5.2011. Luettu 13.09.12. http://www.ebm-guidelines.com/dtk/syd/avaa?p_artikkeli=syd00005
- Life Technologies. 2009. StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent. [www-sivu] Luettu 27.08.12. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Stem-Cell-Research/Stem-Cell-Culture/Stem-Cell-Research-Misc/stempro-accutase.html>
- Life Technologies. 2012. B-27® Serum-Free Supplement (50X), Liquid. [www-sivu]. Luettu 26.09.2012. <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/17504044>
- Lints, T., Parsons, L., Hartley, L., Lyons I. & Harvey, R. 1993. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 119, 419-431.
- Marieb, E. 2009. *Essentials of Human Anatomy and Physiology*. 9. painos. San Fransisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Mummery, C., Ward-van Oostwaard, D., Doevendans, P., Spijker, R., van den Brink, S., Hassink, R., van der Heyden, M., Opthof, T., Pera, M., Brutel de la Riviere, A., Passier R. & Tertoolen, L. 2003. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes: Role of Coculture With Visceral Endoderm-Like Cells. *Circulation* 107, 2733-2740.

Nagaoka, M., Si-Tayeb, K., Akaike T. & Duncan, S. 2010. Culture of human pluripotent stem cells using completely defined conditions on a recombinant E-cadherin substratum. *BMC Developmental Biology* 10(60).

National Institute of Health. 2001. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. [pdf]. Department of Health and Human Services. Julkaistu 2001. Päivitetty 2010. Luettu 07.09.12. <http://wteec.org/SCE/fullrptstem.pdf>

NCBI. 2012. Real-Time qRT-PCR. [www-sivu]. Luettu 27.12.2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml>

Nishikawa, S., Goldstein, R. & Nierras, C. 2008. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 725-729.

Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H. and Ishikawa, F. 2004. Oct-3/4 and Sox2 Regulate Oct-3/4 Gene in Embryonic Stem Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (7), 5307-5317.

Oliver, C. & Jamur, M. 2010. Overview of Antibodies for Immunocytochemistry. Teoksessa Oliver, C. & Jamur, M. (toim.). 2010. *Immunocytochemical Methods and Protocols*. 3. pianos. *Methods in Molecular Biology* 588. Lontoo: Humana Press, 3-9.

Park, I-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T. Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K. & Daley, G. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* 134, 877-886.

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

Pekkanen-Mattila, M. 2012. Filosofian tohtori. Tampereen yliopisto. Biolääketieteellisen teknologian yksikkö. Sydänryhmä. Tampere Henkilökohtainen tiedonanto 28.05.2012.

Pekkanen-Mattila, M., Pelto-Huikko, M., Kujala, V., Suuronen, R., Skottman, H., Aalto-Setälä, K. & Kerkelä, E. 2010. Spatial and temporal expression pattern of germ layer markers during human embryonic stem cell differentiation in embryoid bodies. *Histochemistry and Cell Biology* 133 (5), 595-606.

Pfaffl, M., Tichopad, A., Prgomet C. & Neuvians, T. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26, 509-515.

Promega. 2011. *Protocols and Applications Guide 1. Nucleic Acid Amplification*. [pdf]. Luettu 22.10.2012. <https://www.promega.com/~media/files/resources/paguide/a4/chap1a4.pdf?la=en>

Rajala, K., Pekkanen-Mattila, M. & Aalto-Setälä, K. 2011. Review Article: Cardiac Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells International* 2011, 1-12.

Reppel, M., Pillekamp, F., Ju Lu, Z., Halbach, M., Brockmeier, K., Fleischmann, B. & Hescheler, J. 2004. Microelectrode Arrays: A New Tool to Measure Embryonic Heart Activity. *Journal of Electrocardiology* 37, 104-109.

Saga Y., Miyagawa-Tomita S., Takagi A., Kitajima S., Miyazaki J. & Inoue T. 1999. MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 126, 3437-3447.

Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182 (3), 311-322.

Sjöblom, B., Salmazo, A. & Djinović-Carugo, K. 2008. Alpha-actinin structure and regulation. *Cellular and molecular life sciences* 65 (17), 2688-2701.

STEMCELL Technologies. 2012. Product Information Sheet: mFreSR™. Catalog #05854. Versio 1.2.0. [pdf]. Luettu 12.09.2012.
<http://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/8/E/4/3/7/29586%20PIS120.pdf.ashx>

STEMCELL Technologies. 2011. Maintenance of hESCs and hiPSCs in mTeSR®1 and TeSR™2. Technical Manual. Version 2.2.3. Catalog #29106.

STEMCELL Technologies. 2009. Product Information Sheet: Dispase Solution. Catalog #07923. Versio 1.1.0. [pdf]. Luettu 12.09.2012.
http://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/7/2/9/4/C/29639_PIS_1_1_0.ashx

Sylvester, K. & Longaker, M. 2004. Stem Cells. Review and Update. *Archives of Surgery* 139 (1), 93-99.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131 (5), 861–872.

Takahashi, K. & Yamanaka, S. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663-676.

Tyagi, S. & Kramer, F. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* 14 (3), 303-308.

VanGuilder, H., Vrana, K. & Freeman, W. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44, 619-626.

Veitinger, S. 2011. The Patch-Clamp Technique – an Introduction. [www-sivu]. Leica Microsystems. Päivitetty 03.04.2012. Luettu 20.09.12. <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique-an-introduction/>

Vidricaire, G., Jardine, K. & McBurney, M. 1994. Expression of the *Brachyury* gene during mesoderm development in differentiating embryonal carcinoma cell cultures. *Development* 120, 115-122.

Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J., Nishikawa, S., Nishikawa, S-i., Muguruma K. & Sasai, Y. 2007. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 25, 681 – 686.

Wong, M. & Medrano, J. 2005. Real-time PCR for mRNA Quantitation. *BioTechniques* 39, 74-85.

Worthington Enzyme Manual. 1993. Neutral Protease (Dispase). [www-sivu]. Luettu 16.11.2012. <http://www.worthington-biochem.com/DISP/default.html>

Zhang, J., Raval, K., Lian, X., Herman, A., Wilson, G., Barron, M., Yu, J., Palecek, S., Thompson J. & Kamp, T. 2010. Matrix-promoted efficient cardiac differentiation of human iPS and ES cells. *Circulation* 122 (21), A20724 (abstrakti).

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen J. & Vitzthum, F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 32 (12), e103.

LIITTEET

Liite 1. Mediumien valmistusohjeet

RPMI + B-27® -medium, 50 ml	
RPMI 1640	47,75 ml
B-27®, 50X (Life Technologies) (insuliiniton/insuliinipitoinen)	1,0 ml
Non-Essential Amino Acid Solution, 100X (Life Technologies)	0,5 ml
GlutaMAX™, 100X (Life Technologies)	0,5 ml
Penicillin-Streptomycin (Life Technologies)	0,25 ml
(FBS)	(1,0 ml)

mTeSR™1-medium, 505 ml	
mTeSR™1 Basal Medium (STEMCELL Technologies)	500 ml
mTeSR™1 Supplement 5X (STEMCELL Technologies)	100 ml
Penicillin-Streptomycin (Life Technologies)	5 ml