



Sanna Virtaniemi

Hiiren indusoitujen pluripotenttien kantasolukloonien karakterisointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Bioanalyttikko (AMK)
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
26.10.2011

Tekijä(t) Otsikko	Sanna Virtaniemi Hiiren indusoidujen pluripotenttien kantasolukloonien karakterisointi
Sivumäärä Aika	49 sivua + 15 liitettä 26.10.2011
Tutkinto	Bioanalyytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Dosentti Aija Kyttälä Lehtori Terttu-Liisa Lindell
<p>Tämä opinnäytetyö tuotettiin Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitokselle (THL) tutkimusryhmässä, joka kehittää solu- ja koe-eläinmalleja kansantautien mekanismien tutkimukseen. Ryhmän yhtenä tutkimusvälineenä ovat hiiren indusoidut pluripotentit kantasolut (iPS-solut). Ne ovat somaattisista soluista geenisiirrolla pluripotentiksi eli monikykyiseksi uudelleenohjelmoituja kantasoluja, jotka voivat erilaistua alkion kaikiksi kolmeksi solukerrokseksi. Ryhmä on kehittänyt uuden poistogeenisen hiirimallin NCL-proteiinien vuorovaikutusten tutkimukseen, ja erot mutanttihiirien ja villityypin hiirien välillä tulee pystyä osoittamaan toistettavasti useilla eri iPS-soluklooneilla. Tämän työn puitteissa karakterisoin kaksi villityypin solukloonin ja kolme mutanttikloonin. Työn tarkoituksena oli tutkia, ilmentävätkö kloonit markkereita, jotka osoittavat kloonien olevan sekä kantasoluja että monikykyisiä. Jos kloonit ovat kaikilta tutkittavilta ominaisuuksiltaan monikykyisiä kantasoluja, niitä voidaan käyttää jatkotutkimuksen työvälineinä.</p> <p>Karakterisointityössä kloonien kantasoluo ominaisuuksia tutkittiin morfologian, pintamarkkereiden ja geenimarkkereiden perusteella. Morfologiaa tutkittiin soluviljelmiä mikroskopioimalla. Tutkitut kantasoluspesifiset pintamarkkerit olivat alkalisen fosfataasin (AP) aktiivisuus sekä hiiren stage-specific embryonic antigen 1 (SSEA-1). Tutkimukset suoritettiin immunovärjäyksinä. Geenimarkkereina käytettiin geenejä Esg1, ERas, Fgf4, Nanog, Zfp42(Rex1), ja ne osoitettiin PCR-menetelmällä. Monikykyisyyttä tutkittiin erilaistamalla solukloonit ja osoittamalla eri alkiokerrokset pintamarkkereiden perusteella. Tämän työn puitteissa tehtiin ektodermin osoitus neuronispesifisellä beta-III-tubuliini-vasta-aineella immunofluoresenssivärjäysmenetelmällä.</p> <p>Tutkimus osoittaa, että molemmat karakterisoidut villityypin kloonit olivat kaikilta tutkituilta ominaisuuksiltaan monikykyisiä kantasoluja. Sen sijaan mutanttiklooneista yksi ei ollut morfologialtaan kantasolumainen, ja toinen osoittautui sekaklooniksi eli solukoloniat olivat vain osin kantasoluja. Kolmas mutanttikloonin ilmensi kantasolugeenimarkkereita heikosti, joten sen osalta PCR-tutkimus tulee suorittaa uudelleen. Kaikki kloonit ilmensivät erilaisumiskykyä ektodermikerroksen soluiksi.</p> <p>Tulosten perusteella molemmat villityypin kloonit ovat hyödynnettävissä jatkotutkimuksessa, ja toinen soveltuu erityisen hyvin neuronitutkimukseen. Mikäli kolmas mutanttikloonin ilmentää PCR-tutkimuksen uusinnassa kantasolugeenimarkkereita, myös se voidaan ottaa jatkotutkimuskäyttöön.</p>	
Avainsanat	iPS, monikykyinen kantasolu, soluviljely, immunofluoresenssi

Author(s) Title	Sanna Virtaniemi Characterization of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells
Number of Pages Date	49 pages + 15 appendices 26 October 2011
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Aija Kyttälä, Associate Professor Terttu-Liisa Lindell, Senior Lecturer
<p>This study was conducted for a National Institute for Health and Welfare (THL) research group that develops cell and mouse models for public health genetics research. The group has generated a new knockout mouse model for the study of proteomics in NCL disorders. The model involves the use of induced pluripotent stem cells (iPS), which are somatic cells genetically reprogrammed to a stem cell-like state by being forced to express certain genes, and are capable of generating cells characteristic of all three germ layers. In order to compare the characteristics of the wild type and knock-out mouse, the group needs to demonstrate the differences repeatably in several iPS clones. In this study I characterized two wild type and three knockout iPS cell clones. The purpose of the study was to show whether the clones express embryonal stem cell and pluripotency markers; if this is the case, the clones will be suitable for use in further research.</p> <p>The clones were characterized for morphology as well as the expression of surface and gene markers. Morphology was studied through microscopy, while the presence of surface markers alkaline phosphatase (AP) and mouse stage-specific embryonic antigen 1 (SSEA-1) was determined through immunostaining. PCR analysis was used for gene markers Esg1, ERas, Fgf4, Nanog, Zfp42(Rex1). Pluripotency was tested by differentiating the iPS cell clones and demonstrating the different germ layers through immunofluorescence. In this study, the clones were tested only for the ectoderm through the use of a neuron specific antibody.</p> <p>The results indicated that both of the wild type cell clones expressed all of the tested stem cell and pluripotency markers. Two of the knockout clones, however, expressed unacceptable colony morphology, which in one case was confirmed as a heterogenous population by the SSEA-1 test. The third knockout clone expressed some of the genes only marginally, requiring repeated PCR analysis. All cell clones demonstrated the ability to generate neuronal cells indicative of the ectoderm.</p> <p>The results lead to the conclusions that both wild type iPS clones are suitable for use in continued research, while two out of the three knockout clones are to be discarded. The status of the third knockout clone is pending a repeated PCR analysis.</p>	
Keywords	iPS, induced pluripotent stem cells, cell culture, immunofluorescence

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Työn tarkoitus	2
3	iPS-tutkimus	2
3.1	iPS-menetelmän hyödyt ja haasteet	2
3.2	iPS-tutkimuksen lyhyt historia	4
4	Karakterisointi	5
4.1	Yleistä solulinjojen karakterisoinnista	5
4.2	Hiiren iPS-solujen karakterisointi	6
5	Materiaalit ja menetelmät	8
5.1	Aineisto	8
5.2	Eettiset näkökohdat koe-eläinten käytössä	8
5.3	Menetelmien periaatteet	9
5.3.1	Solujen kasvatus ja mikroskopointi	9
5.3.2	Solujen immunovärjäys kantasolumarkkereilla	12
5.3.3	Kloonin puhdistaminen magneettikuulilla	12
5.3.4	RNA:n eristys soluista	13
5.3.5	RT-PCR, cDNA:n tekeminen RNA:sta	14
5.3.6	PCR spesifisillä alukkeilla ja elektroforeesi	14
5.3.7	Erilaistaminen ja erilaistumisen osoittaminen immunofluoresenssivärjäyksillä	15
6	Karakterisointien suoritus ja tulokset	16
6.1	Morfologian tutkiminen	16
6.1.1	SNL-tukisolut	17
6.1.2	iPS-solut	17
6.1.3	MEF-solut	21
6.2	Kantasolumarkkereiden tutkiminen immunovärjäyksillä	22
6.2.1	Alkalinen fosfataasi (AP)	22
6.2.2	Stage-specific mouse embryonic antigen-1 (SSEA-1)	23
6.2.3	Magneettikuulapuhdistus ja SSEA-1-uusintavärjäys	25
6.3	Kantasoluspesifisten geenimarkkereiden tutkiminen	26
6.3.1	RNA:n eristys	26
6.3.2	RT-PCR	27
6.3.3	PCR viidellä kantasoluspesifisellä alukkeella	28
6.4	Monikykyisyyden tutkiminen	32
6.4.1	Embryoid bodyjen (EB) muodostuskokeet	32
6.4.2	Erilaistumiskokeet immunofluoresenssivärjäyksellä	34
6.5	Yhteenveto tuloksista	37
7	Pohdinta	39
7.1	Johtopäätökset	39
7.2	Luotettavuus	41
7.3	Muita huomioita	43
7.4	Opinnäytetyöprosessi	44
	Lähteet	46

Liitteet

- Liite 1. Karakterisointipaneeli wt 14
- Liite 2 Karakterisointipaneeli wt 17
- Liite 3 Karakterisointipaneeli cross 2
- Liite 4 Karakterisointipaneeli cross 7
- Liite 5 Karakterisointipaneeli cross 25
- Liite 6. Opinnäytetyön vaiheistus
- Liite 7. Tarkistuslista työn suorituksen tueksi
- Liite 8 Soluviljely
- Liite 9. RNA-eristys
- Liite 10. RT-PCR
- Liite 11. PCR
- Liite 12. Magneettikuulapuhdistus
- Liite 13. AP-värjäys
- Liite 14. SSEA-1-värjäys
- Liite 15. Beta-III-tubuliinivärjäys

Sanasto työssä käytettävistä termeistä

EB – Embryoid Body, jos kantasolujen annetaan kasvaa suspensiossa eikä niitä ei pidetä erilaistumattomina ulkopuolisten tekijöiden avulla, ne alkavat kasautua ja muodostaa embryoid bodyja ja edelleen erilaistua. EB:t sisältävät kaikki kolme alkiokerrosta.

ES (ESC) – Embryonal Stem Cell, blastokystivaiheen alkion sisäsolumassan pluripotentti eli monikykyinen kantasolu. Monikykyisyys tarkoittaa, että solu voi erilaistua alkion kaikiksi kolmeksi solukerrokseksi (endo-, meso- ja ektodermi), mutta ei enää istukan solukoksi. Nk. luonnollinen kantasolu.

iPS (iPSC) – induced Pluripotent Stem Cell, somaattisesta solusta geenisiirrolla pluripotentiksi eli monikykyiseksi uudelleenohjelmoitu kantasolu, joka voi erilaistua alkion kaikiksi kolmeksi solukerrokseksi (endodermi, mesodermi ja ektodermi). Nk. kokeellinen kantasolu.

Karakterisointi – (kantasolujen) ominaisuuksien tutkiminen.

Klooni – soluviljelyssä solukloonit ovat geneettisesti identtisiä, mitosin kautta samasta solusta peräisin olevia soluja.

Kolonia – solu"pesäke", joka muodostuu kantasolun jakautuessa.

MEF – mouse embryonic fibroblast, hiiren sikiövaiheen fibroblasti.

Passage – soluviljelmän jakokertojen määrä, esimerkiksi neljä kertaa jaettu viljelämä merkitään passage 4 tai p 4.

Somaattinen solu – muut kuin ituradan solut ja ituradan kantasolut.

1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö tuotetaan Terveyden ja hyvinvoinnin laitokselle (THL) tutkimusryhmässä, joka kehittää solu- ja koe-eläinmalleja kansantautien mekanismien tutkimukseen. Ryhmä selvittää sekä yksittäisten tautiproteiinien toimintaa että proteiinien yhteisvaikutuksia soluissa käyttämällä eri solumalleja ja genomilaajuisia tutkimusmenetelmiä. Tautigeenien toiminnallisen selvitystyön malleina käytetään tämän työn kontekstissa pääasiassa neuronaaalisia seroidilipofuskiinoseja eli NCL-tauteja. (Jalanko – Braulke 2009.)

NCL-taudit ovat pääasiassa lapsuusiässä ilmeneviä keskushermostoa vaurioittavia kertymätauteja, jotka johtavat vaikeaan kehitysvammaisuuteen ja ennenaikaiseen kuolemaan. Ne ovat resessiivisesti periytyviä yhden geenin sairauksia. Suomalaisväestöstön tästä tautiryhmästä on rikastunut neljää eri NCL-alaryhmää. Vaikka NCL-taudit aiheutuvatkin mutaatioista yksittäisissä geeneissä, vuorovaikutusten kautta ne toimivat mallina myös monitekijäisten kansantautien tutkimuksessa. (Lyly 2008 ja 2009.) NCL-taudin infantilissa muodossa (INCL) on mutatoitunut palmityyliproteiini tioesteraasi 1:tä koodittava CLN1-geeni (Vesa ym. 1995), kun taas variantissa myöhäislapsuuden NCL-taudissa mutaatiot löytyvät CLN5-geenistä (Savukoski ym. 1998).

Ryhmän kehittämien NCL-tautien hiirimallien avulla pyritään rakentamaan uudenlaista tautimallitusta, jossa bioinformatiikan avulla yhdistetään geenien ilmentymisprofiloinnista, metabolomiikasta, proteiinien vuorovaikutusanalyseistä ja kudosanalyseistä saatu tieto (Lyly 2009). Parhailaan tutkimusryhmä on kehittänyt uuden NCL-hiirimallin, joka on poistogeeninen sekä CLN1-geenin että CLN5-geenin suhteen. Mallin avulla on tarkoitus syventää aiemmin havaittujen NCL-proteiinien vuorovaikutusten tutkimusta ja mahdollisesti korostaa NCL-tautien yhteistä patogeneesireittiä. Mallin avulla onkin jo osoitettu, että hiirellä NCL-sairaus pahenee kahden geenin virheen vuoksi (Kyttälä 2011).

Opinnäytetyössäni karakterisoin tämän uuden hiirimallin mutanttahiirien sekä mutatoitumattoman eli villityypin hiirien indusoituja pluripotentteja kantasoluklooneja. Oma lähtökohtani työhön oli kiinnostus tutkimustyötä ja erityisesti solutöitä kohtaan.

2 Työn tarkoitus

Työn päätavoitteena on karakterisoida toimeksiantajan valitsemat indusoidut pluripotentit kantasolu- eli iPS-kloonit selvittääkseni, mitkä ryhmän tuottamista iPS-klooneista soveltuvat jatkotutkimuksen työvälineiksi. Työssä haen vastausta siihen, ovatko tutkittavat iPS-solukloonit kaikilta tutkittavilta ominaisuuksiltaan

1. kantasoluja
2. monikykyisiä.

Työn tuloksena saadaan myös lisätietoa siitä, millaiset koloniamorfologiat ovat mahdollisia iPS-soluklooneille. Kaikki testit läpäisevät kloonit otetaan jatkokäyttöön. Jatkotutkimuksissa ryhmä käyttää testit läpäisseitä klooneja mm. neuroneiden tuottamiseen. Jatkokokeissa tutkitaan eroja villityypin ja mutanttihiiren solujen välillä.

3 iPS-tutkimus

3.1 iPS-menetelmän hyödyt ja haasteet

Perinteisesti sekä kantasolututkimus että kantasoluhoidot ovat olleet eettisesti ongelmallisia. Tämä johtuu pääasiassa siitä, että luonnollinen alkion kantasolu (embryonal stem cell, ES) tuhoutuu blastokystin sisämassaa otettaessa. iPS-solut ovat pluripotentisuuden eli monikykyisyyden suhteen ES-solujen kaltaisia, mutta niiden käyttöön ei liity eettisesti yhtä suuria rajoituksia kuin luonnollisten kantasolujen. Indusoitavat solut voidaan alkion sijaan ottaa aikuiselta yksilöltä esimerkiksi ihobiopsialla tai verinäytteestä. Siksi pluripotenttien kantasolujen indusointi on eettisesti helpompi vaihtoehto myös terapeuttiselle kloonaukselle, jossa ES-kantasolulinjaan vaihdetaan potilaan tuma. (Strachan – Read 2011: 693.)

Eettisten kysymysten lisäksi iPS-menetelmä avaa mahdollisuuden tutkia laajemmin esimerkiksi neuroneita. Monien tärkeiden tautien tutkimukseen on vaikea saada tarvittava kudoksia ja soluja; esim. neurodegeneratiivisissa sairauksissa (kuten Alzheimerin, Huntingtonin ja Parkinsonin taudit) patogeneesiä on voitu tutkia vain post mortem -näytteillä tai eläinmalleilla, joiden fenotyyppi voi erota ihmistautien fenotyypistä. Potilaiden tautispesifisiä iPS-soluja erilaistamalla voidaan tuottaa laaja valikoima ihmisen eläviä solumalleja eri tautien tutkimukseen. (Strachan – Read 2011: 693.)

Tautikohtaista, erityisesti neurologisia ja neuromuskulaarisia tauteja koskevaa tutkimusta onkin jo tehty soveltaen iPS-tekniikkaa. Tutkimuksia on julkaistu esimerkiksi Parkinsonin taudista (Rhee ym. 2011), Rettin oireyhtymästä (Amenduni ym. 2011) ja Pompen taudista (Kawagoe ym. 2011).

Potilasspesifisillä iPS-soluilla voidaan tulevaisuudessa mahdollisesti tuottaa erilaistettuja somaattisia soluja kyseisten tautien hoitoon. Toiveissa on, että iPS-menetelmää käyttäen voidaan tulevaisuudessa käyttää potilaan omia soluja esimerkiksi kantasoluhoidoihin ja kudossiirteiden kasvattamiseen ilman hyljintäreaktion pelkoa. (Aalto-Setälä – Silvennoinen – Otonkoski 2008: 215) Edelleen on kuitenkin epäselvää, voidaanko iPS-soluja käyttää tehokkaasti autologisiin solusiirtoihin. Uusien tutkimusten mukaan iPS-solut voivat olla immunogeenisiä, eli manipuloinnin jälkeen solut voivat herättää kehon immuunivasteen (Zhao – Zhang – Rong – Xu 2011).

Alkuperäisessä, retrovirusvektoreita ja tunnettua onkogeenia (c-Myc) käyttävässä iPS-tekniikassa turvallisuusnäkökohdat olivat terapeuttista käyttöä ajatellen todellinen ongelma. Virusvektorin integroituminen isäntägenomiin hallitsemattomiin kohtiin lisää tuumoririskiä. Uusissa sovelluksissa ei kuitenkaan enää välttämättä tarvita c-Myc-geeniä. On myös osin siirrytty käyttämään genomiin integroitumattomia virusvektoreita kuten adenovirusta ja sendaivirusta. Indusoinnissa on jopa käytetty suoraan pluripotenttisuutta indusoivia transkriptiofaktoriproteiineja, miRNA:ta tai muita pieniä molekyylejä, jotka vaikuttavat samoihin reitteihin. Edelleen ongelmana on tehokas, täsmällisesti ohjattu erilaistuminen halutuiksi soluiksi. Vielä ei tunneta riittävän hyvin niitä pitkiä ja moniportaisia reittejä, joita pitkin pluripotentit kantasolut erilaistuvat somaattisiksi soluiksi. (Strachan – Read 2011: 694)

iPS-soluja on onnistuttu tuottamaan ihmisten ja muiden nisäkkäiden fibroblasteista ja muistakin somaattisista soluista, eli muista paitsi ituradan soluista ja ituradan kantasoluista. iPS-solut ovat hyvin samankaltaisia embryonaalisten kantasolujen (ES) kanssa sekä molekyyllitasolla että toiminnallisesti. (Strachan – Read 2011: 693.) Näiden kokeellisesti tuotettujen iPS-solujen ja luonnollisten ES-solujen välillä on kuitenkin myös eroja; mm. monet geenit ilmentyivät eri tavalla iPS-soluissa kuin ES-soluissa (Scheper – Copray 2009: 204).

iPS-tekniikka saattaa tulevaisuudessa myös vähentää eläinmallien käyttöä. Perinteisille eläinmalleille vaihtoehtona on indusoida somaattisista soluista ES-solujen tavoin toimivia pluripotentteja kantasoluja. Nämä ovat hyviä vaihtoehtoja ES-soluille, kun luo-

daan tarkkoja geenimuunneltuja malleja. (Strachan – Read 2011: 672.) iPS-solulinjoja on tuotettu ainakin hiiristä, rotista, sioista ja rhesusapinoista.

Myös lääkkeitä voidaan testata suoraan iPS-peräisillä ihmissoluilla. Näin voidaan tutkia lääkkeiden kykyä hidastaa tai jopa estää patogeneesiä. Lisäksi lääkeaineiden toksisuutta voidaan tutkia eläinkokeiden sijaan suoraan ihmissolukoissa. (Strachan – Read 2011: 694.)

Tällä hetkellä iPS-solujen tärkeimpiä sovellusalueita ovat juuri tautimallintaminen ja lääkeaineiden testaus. iPS-solut ovat kyllä kantasoluja morfologian ja pintamarkkereiden perusteella, mutta ne eivät vastaa täysin ES-soluja. Terapeuttisten sovellusten ongelmana on esimerkiksi, että viljelmässä hyvin kasvavat erilaistetut iPS-solut säilyvät kehoon siirrettynä hengissä, mutta ne eivät silti ole toiminnallisia siten, että solut integroituisivat osaksi normaalia kudosta. (Hovatta 2011.)

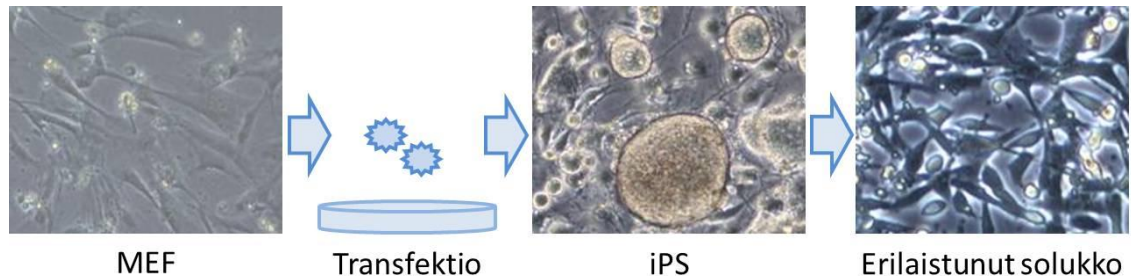
Edelleen indusoinnin haasteena on matala tehokkuus. Vuoteen 2010 mennessä mm. hiiren embryonaalisten fibroblastien (MEF) indusoinnin tehokkuus on parannetuilla kasvatusliuoksillakin vain 3 % luokkaa (Okada – Oka – Yoneda 2010: 962).

3.2 iPS-tutkimuksen lyhyt historia

Indusoitujen pluripotenttien kantasolujen eli nk. kokeellisten kantasolujen (induced pluripotent stem cells, iPS) tuottaminen somaattisista soluista on suhteellisen uusi ja merkittävä tekniikka. Japanilainen tutkimusryhmä osoitti vuonna 2006 ensimmäistä kertaa hiiren ihosta peräisin olevilla fibroblastisoluilla, että solujen kelloa on mahdollista kääntää taaksepäin niin, että erilaistuneet solut saadaan uudelleenohjelmoitua alkion pluripotentin kantasolun asteelle ilmentämällä tiettyjä transkriptiotekijöitä (Oct4, Sox2, Klf4 ja c-Myc). Näistä indusoiduista pluripotentteista kantasoluista voidaan edelleen erilaistaa kaikkia endodermin, mesodermin ja ektodermin soluja. (Takahashi – Yamanaka 2006.)

Takahashin ja Yamanakan (2006) tutkimusryhmä oli valinnut 24 kandidaattigeeniä, joiden tiedettiin osallistuvan pluripotenttiuden ylläpitämiseen. Nämä geenit siirrettiin erilaisina yhdistelminä hiiren somaattisiin fibroblastiviljelmiin retrovirusvektorin avulla. Tutkimusryhmä havaitsi, että transkriptiofaktoreiden Oct-3/4, Sox2, c-Myc ja Klf-4 yhdistelmällä saatiin kasvamaan useita solukolonioita, jotka muistuttivat morfologialtaan ja lisääntymisominaisuuksiltaan ES-soluja. Lisäksi nämä solut olivat positiivisia alkaliselle fosfataasille (AP) ja SSEA-1:lle, jotka ovat tunnettuja hiiren ES-solumarkkereita. So-

lut myös erilaistuiivat kaikiksi kolmeksi alkiokerrokseksi in vitro, sekä aiheuttivat tera-
toomia hiiriin ruiskutettuna. (Takahashi – Yamanaka 2006, Scheper – Copray 2009.)
Näin oli eristetty ensimmäinen populaatio indusoituja monikykyisiä kantasoluja. Kuvios-
sa 1 on esitetty indusoinnin ja erilaistamisen vaiheet morfologiakuvilla havainnollistaen.



Kuvio 1. Hiiren fibroblastisolujen indusointi ja erilaistaminen, vaikutus morfologiaan

Vuosi Takahashin ja Yamanakan tutkimuksen jälkeen julkaistiin kolme tutkimusta, jossa alkuperäistä tutkimusasetelmaa oli hieman muokattu. (Okita – Ichisaka – Yamanaka 2007, Werning ym. 2007, Maherali ym. 2007). Tämän jälkeen iPS-tutkimus on lisääntynyt huikeasti. Alkuperäisessä tutkimuksessa indusointi tapahtui neljällä transkriptiotekijällä, sittemmin indusointi on osoitettu mahdolliseksi jopa yhdellä transkriptiotekijällä (Tsai ym. 2011). Retrovirusvektorien lisäksi indusointia on tehty lentiviruksella (mm. Hamilton – Feng – Ye – Welstead 2009) ja adenoviruksilla (mm. Zhou – Freed 2009), plasmiditransfektioilla ja transposoneilla. Sittemmin on tuotettu iPS-soluja käyttäen rekombinanttiproteiineja (Zhou ym. 2009) ja proteiineja ilman geenimanipulointia (Cho ym. 2010). Somaattisista fibroblasteista tuotetuista iPS-soluista on erilaistettu mm. toimivaa, kypsää ja sykkivää sydänekudosta (Martinez-Fernandez ym. 2009) ja toimivia neuroneita (Strachan – Read 2011: 693).

Tutkimuksessa siirryttiin hyvin nopeasti hiiristä ihmisten soluilla tehtävään tutkimukseen. Jo vuonna 2007 myös ihmisen fibroblastisoluista tehtiin iPS-soluja (Takahashi ym. 2007 ja Yu ym. 2007). Vuonna 2010 sama onnistuttiin tekemään suoraan veren soluista (Loh ym. 2010; Seki ym. 2010; Staerk ym. 2010).

4 Karakterisointi

4.1 Yleistä solulinjojen karakterisoinnista

Yleisesti ottaen solulinjan karakterisoinnille on kuusi keskeistä syytä:

1. Ristikontaminaation mahdollisuuden poissulkeminen.
2. Alkuperäisen lajin osoittaminen.
3. Alkuperäisen kudoksen osoittaminen a) solusarjan osoittaminen b) kypsyyssasteen osoittaminen ko. solusarjassa (esim. kantasolu, esisolu, erilaistunut solu).
4. Solulinjan muuntuneisuuden tai ei-muuntuneisuuden osoittaminen a) onko solulinjan jakautumiskyky rajallinen vai ikuinen b) onko solulinjassa maligneja piirteitä.
5. Solulinjan geneettisen epästabiiliuden ja fenotyypivariaation alttiuden osoittaminen.
6. Tietyn solulinjan identifiointi muiden samaa alkuperää olevien solukantojen, solulinjojen tai hybridisolulinjojen joukosta. (Freshney 2005. 247.)

Monia näistä vaatimuksista voidaan täyttää käyttäen useita vaihtoehtoisia menetelmiä riippuen laboratorion erikoisalasta. Solulinja voidaan identifioida erilaisin molekyyli- ja sytogeneettisin sekä immunologisin menetelmin. Lajin osoitukseen ja solulinjan muuntuneisuuden osoittamiseen voidaan käyttää esimerkiksi kromosomianalyysiä. Kudoksen, solusarjan ja kypsyyssasteen osoitus tehdään yleisesti esimerkiksi immunovärjäyksellä käyttäen markkereina solun pinta-antigeeneja. Solulinjan uniikkien piirteiden osoittaminen voi tapahtua esimerkiksi lääkaineresistenssillä. Yksinkertaisin tekniikka solujen identifiointiin on kuitenkin morfologian tutkiminen. Tälläkin tekniikalla on rajoituksensa, jotka johtuvat pääasiallisesti solujen plastisuudesta eli mukautumisesta viljelyolosuhteisiin kuten käytettävissä olevaan tilaan. (Freshney 2005. 247-280.)

4.2 Hiiren iPS-solujen karakterisointi

Hiiren iPS-solujen karakterisoinnilla pyritään osoittamaan kaksi asiaa: ensimmäiseksi se, että indusoinnin seurauksena syntyneet solut ovat kantasoluja, ja toiseksi se, että solut ovat pluripotenttejä eli monikykyisiä. Karakterisoinnissa lähdetään liikkeelle morfologiasta. Faasikontrastimikroskoopilla varmistetaan, että solukolonioiden kasvupaikka on kantasolumainen. Kantasolumaisuutta tutkitaan lisäksi kantasolumarkkereilla, joita hiiren soluja tutkittaessa ovat värjäyksen avulla osoitettavat pintamarkkerit alkalinen fosfataasi (AP) ja stage-specific mouse embryonic antigen-1 (SSEA-1) sekä PCR:n avulla tutkittavat kantasoluspesifiset geenimarkkerit, joita tähän työhön on valittu viisi (Esg1, ERas, Fgf4, Nanog, ja Zfp42/Rex1).

Kantasolut, jotka ilmentävät näitä kantasolumarkkereita ovat yleensä pluripotenttejä. Pluripotenttisuutta tutkitaan solujen kyvyllä erilaistua in vitro -olosuhteissa kolmeen

alkiokerrokseen (endodermi, mesodermi, ektodermi) joko suoraan tai embryoid bodyiksi (EB) kutsuttujen soluryppäiden kautta. Erilaistuminen osoitetaan käyttämällä kullekin kerrokselle spesifistä vasta-ainevärijäystä ja immunofluoresenssimikroskopiaa.

Karakterisoinnissa käytetään useita eri menetelmiä, sillä näiden antamissa tuloksissa voi olla eroja eri syistä johtuen. PCR:ssä pienikin määrä voi riittää antamaan positiivisen signaalin kun on kysymyksessä sekakloonit, jossa osa soluista ilmentää markkereita ja osa ei. SSEA-1-värijäys paljastaa tällaiset sekakloonit. AP-värijäys ei ole aina hiiren soluissa yhtä tehokas indikaattori kuin SSEA-1.

On myös tärkeää, että induktiossa käytetyt transkriptiotekijät hiljentyvät metylaation kautta solun omien kantasolugeenien ilmentymisen myötä. Vasta tällaiset solut ovat hyviä jatkotutkimuksiin. Siirtogeenien hiljentymisen tapahtuu yleensä vasta kymmenennen jakokerran jälkeen, joten kvantitatiivista PCR:ää ei kannata tehdä aikaisista passageista. Hiljentymisen testataan kvantitatiivisella PCR:llä (qPCR) mittaamalla endogeenisen eli solun omien geenien ilmentymisen ja totaali-ilmentymisen (johon endogeenisen ilmentymisen lisäksi kuuluu transgeeninen ilmentymisen) suhdetta. Menetelmän käyttöönotto on vielä kesken tutkimusryhmässä, jossa työ suoritettiin. (Kyttälä 2011.)

Yleisesti iPS-solujen karakterisoinnissa käytetään lisäksi kromosomianalyysiä tai teratoomanmuodostuskokeita. Kromosomianalyysillä osoitetaan, että iPS-solulinjan kromosomisto ei ole muuttunut induktion tai viljelyn aikana. Humaani-iPS-sovelluksissa ollaan tosin siirtymässä kohti pienemmätkin mutaatiot tunnistavaa vertailevaa genomista hybridisaatiota (Hovatta 2011). Tyypillisesti hiiren iPS-tutkimuksessa solulinjalle tehdään kromosomianalyysi noin kymmenen jakokerran eli passagen välein. Teratooman muodostuskokeissa pluripotenttisyys todistetaan iPS-solujen kykyä muodostaa kasvaimia, joissa esiintyy solutyyppejä kaikista alkiokerroksista. Tässä työssä samaa näyttöä iPS-kloonien erilaistumiskyvystä pyritään saamaan immunovärijäyksillä, jotka osoittavat iPS-kloonien kykyä erilaistua eri alkiokerrosten soluiksi.

qPCR, kromosomianalyysi ja teratoomanmuodostuskokeet voidaan tarvittaessa suorittaa myöhemmin, mikäli niitä vaaditaan tulosten julkaisemisen yhteydessä. Ne eivät kuitenkaan kuulu tämän työn piiriin.

5 Materiaalit ja menetelmät

5.1 Aineisto

Tutkimusryhmällä oli valmiina C57BL/6J -hiirikannan villityypin eli mutatoitumattoman muodon sekä cln1/cln5-mutanttihiiren fibroblastisoluista indusoituja soluja pakastettuna. Työssä käytettiin jo aikaisemmin tuotettuja pakastettuja hiiren kantasoluklooneja, joten tätä työtä varten ei tuotettu erikseen uusia iPS-soluja.

iPS-solujen induktiossa oli käytetty nk. Yamanaka-menetelmää (Takahashi ja Yamanaka, 2006) jossa neljä transkriptiofaktoria (Oct-3/4, Sox2, c-Myc ja Klf-4) oli siirretty transdukoimalla retroviruksen avulla hiiren alkion fibroblastisoluihin. Työssä karakterisoitiin toimeksiantajan valitsema klooneja, kaksi villityyppiä ja kaksi mutanttia. Työn edetessä mukaan otettiin vielä yksi mutanttiklooni. Pakastetut kloonit oli alustavasti karakterisoitu morfologian osalta. Työhön valittiinkin morfologisesti erilaisia soluklooneja; koska menetelmä on uusi, kaivataan tietoa myös siitä, millaiset solumorfologiat ovat hyviä tai mahdollisia iPS-soluille.

Työssä tutkittiin useampia klooneja, koska kloonit ovat yksilöllisiä; vaikka kaikki kloonit ilmentäisivät markkereita, toiset erilaistuvat helpommin esimerkiksi neuronaaliksi soluiksi. Jotta hiirimallin kehitystyön erilaistumiskokeissa voitaisiin esimerkiksi osoittaa, että mutanttien ja villityypin iPS-kloonien välillä on eroja, täytyy ero pystyä osoittamaan vähintään kolmessa rinnakkaisessa solulinjassa. Siten riittävän näytön saamista varten on karakterisoitava useita solulinjoja, jotka soveltuvat jatkotutkimuksen työvälineiksi.

5.2 Eettiset näkökohdat koe-eläinten käytössä

Tutkimusryhmällä on voimassa olevat tutkimusluvut hiiren iPS-tutkimusta varten, joten tätä työtä varten ei haettu erillistä lupaa. iPS-solujen tuottamista varten embryonaaliset fibroblastit eli MEF-solut on kerätty hiiren alkioista, joista on kerätty aivonäytteet Etelä-Suomen lääninhallituksen myöntämällä koe-eläinluvalla nro. ESLH-2009-05074/Ym-23. Hiiriä ei siis lopetettu ainoastaan MEF-soluja varten, vaan koe-eläinten käytössä pyritään aina käyttämään kaikki tarpeelliset osat.

Samoin koe-eläinten käyttöä on pyritty minimoimaan monikykyisyyden osoituksessa. In vivo, kloonien pluripotentsisuus voidaan todentaa ruiskuttamalla kantasoluja immuunipuutteeseen hiireen, jolloin ne muodostavat teratoomia eli kasvaimia. Tässä työssä in vivo -todennusta ei tehdä, vaan in vitro -kokeiden tuloksia pidetään riittävänä

kriteerinä. Emme ohjaajani kanssa pidä koe-eläinten käyttöä tähän tarkoitukseen perusteltuna, koska työssä ei ole kyse terapeuttisesta tutkimuksesta. Näin ollen karakterisointityössä ei käytetty lainkaan koe-eläimiä.

5.3 Menetelmien periaatteet

Tässä työssä käytettävät menetelmät oli valinnut tutkimusryhmä, jolle työ tehtiin. Kantasoluominaisuuksien tutkimiseen käytettiin ES-solujen karakterisoinnissa yleisesti käytettäviä menetelmiä. Ryhmä oli jo aiemmin karakterisoinut muutamia iPS-klooneja, joten tarvittavat menetelmät oli pääsääntöisesti pystytetty. Työ sisälsi seuraavat vaiheet:

1. iPS-solujen kasvatus ja morfologian tutkiminen
2. Solujen immunovärjäys pintamarkkereilla AP ja SSEA-1
3. iPS-kloonien puhdistus magneettikuulilla
4. RNA:n eristys soluista
5. RT-PCR eli cDNA:n tekeminen RNA:sta
6. Geenimarkkereiden PCR spesifisillä alukkeilla ja tuloksen osoitus elektroforeesilla
7. Embryoid bodyjen (EB) muodostuskokeet
8. Solujen erilaistaminen ja erilaistumisen osoittaminen immunofluoresenssivärjäyksillä

Tässä kappaleessa esittelen opinnäytetyön kokeellisessa osassa käytettyjen menetelmien periaatteet.

5.3.1 Solujen kasvatus ja mikroskopointi

Kasvaakseen soluviljelyolosuhteissa erilaiset solut tarvitsevat niille optimoidut olosuhteet, joihin kuuluvat oikea lämpötila, ravinteet ja pH, jota tarkkaillaan pH-indikaattorin avulla. Solut kasvavat liuoksessa, joka tarjoaa niille ravintoaineita oikeassa suhteessa. Kasvatusliuos koostuu lähinnä suoloista, puskurista, energianlähteistä (yleensä glukosi), aminohapoista, vitamiineista, hormoneista ja kasvutekijöistä, proteiineista ja peptideistä, rasvahapoista ja lipideistä, hivenaineista ja tarvittaessa antibiooteista. (Cartwright – Shah 2003: 70-74.) iPS-solujen optimaalisia kasvatusolosuhteita on tutkittu vasta melko vähän, mutta niiden kehityksen toivotaan parantavan indusoinnin tehokkuutta (Okada – Oka – Yoneda 2010: 962).

Hiiren kantasoluja viljeltäessä kasvatuliouksessa tarvitaan lisäksi tekijä, joka estää solujen erilaistumisen maljalla. Tärkein kantasolujen erilaistumisen estäjä näyttäisi olevan leukemia inhibitory factor (LIF) (Freshney 2005: 419), jota voidaan lisätä kasvatulioukseen sellaisenaan. Vaihtoehtona on käyttää SNL-tukisoluja, jotka itse tuottavat kantasolujen tarvitsemaa LIFiä. SNL-solut ovat peräisin hiiren STO-fibroblastisolulinjasta, jota on muunneltu siirtämällä siihen neomysiiniresistenssi- ja hiiren LIF-geenit (Cell Biolabs 2009). Ennen kantasolujen viljelyä tukisolut on käsiteltävä mitomycin-c:llä tai säteilytettävä, jotta niiden jakautuminen pysähtyy.

Tässä työssä iPS-kloonien kasvatukseen ja erilaistumattomana pitämiseen käytetään SNL-tukisoluja (feeder cells). iPS-solut viljellään yhtenä kerroksena (monolayer) tukisolukon päällä. Myös tukisolukon tiheys vaikuttaa kasvatettavan solukon morfologiaan, joten sen tulee olla optimaalinen. Tukisoluja autetaan kiinnittymään muoviselle viljelyalustalle gelatiinikäsittelyn avulla.

Erilaistuminen alkaa spontaanisti ilman LIFiä tai SNL-tukisolukerrosta erityisesti, jos solujen annetaan aggregoitua. Varsinkin viljely gelatiinilla ilman tukisoluja tai tarttumattomilla (nonadherent) muovimaljoilla edesauttavat soluaggregaattien ilmaantumista. (Freshney 2005: 419.)

Tukisolujen päällä kasvaessaan ES-kantasolut muodostavat selvärajaisia, melko pyöreitä kloonieja. Siten myös hyvän iPS-kloonin yhtenä kriteerinä voidaan pitää kloonin tarkkarajaisuutta ja pyöreähköä muotoa. Ryhmän kokemuksen mukaan iPS-kolonioiden morfologia vaihtelee jonkin verran kloonista toiseen, ja myös epätavallisen muotoisia kolonioita muodostavat kloonit saattavat ilmentää kantasolu- ja monikykyisyysmerkkejä.

On kuitenkin tärkeää tarkkailla, että solut pysyvät kantasolutilassa eivätkä ole erilaistuneet. Kasvatus optimaalisessa tiheydessä estää spontaania erilaistumista. Luvussa 6.1.2 kuvat 3a. ja 3b. havainnollistavat eroja kantasolumaisten ja erilaistuneiden solujen morfologiassa. Solutiheyden pitäminen sopivana jakamisen avulla auttaa soluja säilyttämään normaalin fenotyypinsä. (Freshney 2005: 40.)

Morfologian tutkimisessa tulisikin panostaa siihen, että elävän viljelmän morfologiaa tarkastellaan säännöllisesti valomikroskoopilla käyttäen faasikontrastia, jolloin viljelmän kasvutavasta saadaan hyvä yleiskuva (Freshney 2005: 250). Faasikontrasti on yleisimmin käytetty kontrastinkorostustekniikka eläville soluille sen edullisuuden, luotettavuuden

den ja suuren kontrastintuottamiskyvyn takia. Kontrasti kuvan osien välille muodostuu valonsäteiden amplitudierosta, joka syntyy kun näytteen läpi kulkevaan valoon on aiheutettu $\frac{1}{4}$ -aallon vaihe-ero, mutta soluista sironnutta valoa ei ole käsitelty mitenkään. (Dobbie – Zicha 2002: 120.)

Soluviljelmän morfologian tarkkailu on tärkeää myös viljelmän tilan seuraamiseksi; näin havaitaan viljelmän mahdollinen kontaminaatio tai rappeutuminen, joka voi ilmentyä esimerkiksi sytoplasman granulaarisuutena ja vakuolisoitumisena tai solujen turpoamisena ja irtoamisena. Nämä merkit voivat kieliä esimerkiksi kasvatusliuoksen vaihdon tarpeesta. (Freshney 2005: 205.)

Koska kasvatusalustan koko voi vaikuttaa solujen kasvutapaan, pyritään soluviljelmiä herättämään pakastimesta aina samankokoiselle alustalle, jolta se on pakastettu. Edelleen jakosuhteessa on aina otettava huomioon solumäärän lisäksi alustan tilavuuden muutos: jos esimerkiksi 6-kuoppalevyn kuopasta koko solumäärä irrotetaan halkaisijaltaan 10 cm:n maljalle, viljelmiä jaetaan 1:6, koska alustoilla on noin kuusinkertainen pinta-alaero. Solumaljoille voidaan tarvittaessa asettaa peitinlaseja (coverslip) kasvun ajaksi ennen solususpension lisäystä; näin lasit voidaan poistaa solumaljoilta esimerkiksi immunovärjäykseen, kun ne ovat kasvaneet sopivan tiheiksi (Dobbie – Zicha 2003: 126).

Kasvatusalustan koon lisäksi kloonin luontainen kasvunopeus vaikuttaa siihen, kuinka usein viljelmiä täytyy jakaa. Puhdastilatyöskentely on aikaavievää, joten käytännön syistä pyritään luonnollisesti siihen, että viljelmiä tarvitsisi jakaa mahdollisimman harvoin ja että soluille tehtävät toimenpiteet voitaisiin suorittaa tasatahdissa muiden viljelmien kanssa. Siten kloonien kasvunopeuden voimakas yksilöllisyys voi haitata kloonin soveltuvuutta käytännön tutkimustyöhön.

Soluviljelyssä on aina tärkeää ajatella myös ainutlaatuisten solujen myöhempää käyttöä. Kloonien jatkokäyttöarvon takia soluja pyritään myös pakastamaan talteen aikaisessa vaiheessa silloin, kun niitä ei vielä ole jaettu montaa kertaa eli aikaisessa passagessa. Aikaisempi passage on arvokkaampi, sillä siitä voidaan aina kasvattaa myöhempiä passageja, mutta ei toisin päin. Mitä myöhäisempi passage on, sitä enemmän on mahdollisuuksia mutaatioihin. Toisaalta tietyissä työvaiheissa voidaan tarvita nimenomaan myöhäisempiä passageja; esimerkiksi transgeenien hiljentymisen tapahtuu yleensä vasta kymmenennen passagen jälkeen, joten hiljentymisen tutkimista qPCR:llä ei aikaisista passageista kannata tehdä. (Kyttälä 2011.)

5.3.2 Solujen immunovärjäys kantasolumarkkereilla

Kantasolut ilmentävät kehitysvaiheensa mukaisesti pintaproteiineja, jotka häviävät solujen erilaistuessa. Näin solujen erilaistumisastetta voidaan tutkia immunokemiallisesti käyttäen kantasoluspesifisiä markkereita.

Hiiren erilaistumattomat ES-solut ilmentävät pinnallaan voimakkaasti ns. SSEA-1-antigeeniä (stage-specific mouse embryonic antigen), joka voidaan tunnistaa SSEA-1-vasta-aineella (Solter – Knowles 1978: 5565). Hiiren ES-soluissa SSEA-1-antigeenin ilmeneminen vähenee solujen erilaistuessa toisin kuin ihmisillä, joiden kantasoluissa SSEA-1-antigeeni lisääntyy solujen erilaistumisen myötä. (Cell Signaling Technology 2011.) SSEA-1 osoitetaan epäsuoralla immunovärjäyksellä. Epäsuorassa immunovärjäyksessä tunnistetaan ensin tutkittava pintaproteiini sitä vastaan tuotetulla konjugoimattomalla primaarisella vasta-aineella, jonka jälkeen primaarisen vasta-aineen sitoutuminen osoitetaan leimatulla sekundaarisella vasta-aineella (Boenisch 2001: 26).

Hiiren erilaistumattomat monikykyiset kantasolut eli ES- ja iPS-solut ilmentävät usein voimakkaasti myös alkalista fosfataasia, joka on hydrolysoiva entsyymi (Pease – Braghetta – Gearing – Grail – Williams 1990). AP-värjäyksessä erilaistumattomat solut värjäytyvät käytetyistä kromogeenista riippuen punaisiksi tai sinivioleteiksi, kun taas erilaistuneet solut eivät värjäänny lainkaan. Siten AP-värjäys on yksinkertainen, tehokas ja nopea tapa osoittaa solujen olevan erilaistumattomia kantasoluja (Stemgent 2009). AP-värjäys ei kuitenkaan aina ole hiiren soluissa yhtä tehokas indikaattori kuin SSEA-1 (Kyttälä 2011).

AP-värjäyksessä käytetään immunoentsyymaattista menetelmää. Tässä työssä substraattina oli BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt) ja kromogeenina NBT (Nitro Blue Tetrazolium). Entsyymaattisessa reaktiossa alkalinen fosfataasi defosforyloi substraattina toimivan BCIPin. Jäljelle jäävä osa hapettuu muodostaen sinisen presipitaatin. Lisäksi varsinaisena kromogeeninä toimiva NBT muodostaa pelkistyessään voimakkaamman, tummanvioletin presipitaatin, mikä tekee värjäyksestä herkemmän. (Boenisch 2001: 16 ja Roche 2005.)

5.3.3 Kloonin puhdistaminen magneettikuulilla

Soluviljelmästä voidaan erottaa tiettyä pinta-antigeeniä ilmentävät solut Miltenyinin MACS MicroBeads -magneettikuulien avulla. Tässä työssä käytettiin SSEA-1-vasta-aineella päällystettyjä magneettikuulia SSEA-1-positiivisten eli kantasoluspesifistä pinta-

antigeeniä ilmentävien solujen erottamiseen SSEA-1-negatiivisista soluista (osittaiset sekakloonit) ja tukisoluista.

Eroteltavat SSEA-1-positiiviset solut leimataan SSEA-1-vasta-aineella päällystetyillä magneettikuulilla ja suodatetaan magneettitelineessä olevan erottelupylvään läpi. Magneettileimatut solut jäävät pylvääseen, kun taas leimaamattomat solut huuhtoutuvat pois. Lopuksi leimatut solut voidaan huuhtoa pylväästä puskurinsteellä, kun pylväs irrotetaan magneettitelineestä. (Miltenyi Biotec 2008.)

Magneettikuulat ovat kooltaan verrattavissa virukseen, halkaisijaltaan noin 50 nm. Pienen kokonsa ja biokemiallisen koostumuksensa vuoksi kuulat ovat biohajoavia eivätkä häiritse jatkoanalyysijä tai solujen viljelyä. Itse kuulat ovat superparamagneettisia, ja niitä käytetään yhdessä ferromagneettisten erottelupylväiden ja voimakkaiden magneettitelineiden kanssa. Nämä rakenteet aiheuttavat yhdessä niin voimakkaan magneettikentän, että pieni määrä erittäin pieniä kuulia riittää kohdesolujen erotteluun. (Miltenyi Biotec 2011.)

5.3.4 RNA:n eristys soluista

Tässä työssä kokonais-RNA eristettiin solupelletistä käyttäen silikapylväspuhdistukseen perustuvaa kaupallista RNA-eristysmenetelmää. Valikoivaan sitoutumiseen perustuvassa silikapuhdistuksessa nukleiinihappojen annetaan sitoutua puskurin korkeassa ionivahvuudessa pylvään silikakalvoon, jonka jälkeen epäpuhtaudet pestään pois kalvolta pesupuskureilla. Lopuksi nukleiinihapot irrotetaan silikasta eluointiliuoksella, jossa on matala ionivahvuus. (Solunetti 2006.) Tässä työssä näyte suodatettiin silikan läpi sentrifugoimalla. Eristämisessä tulee ottaa huomioon solujen oma RNAasi (ribonukleaaasientsyymi), joka hajottaa RNA:ta jatkuvasti osana solun omaa proteiinisynteesin säätelyä (Suominen – Pärssinen – Haajanen – Pelkonen 2010: 108). Siksi eristämisessä käytetään RNAasi-vapaita reagensseja ja materiaaleja.

Eristyksen jälkeen mitataan RNA-saannon pitoisuus. Mittaus tapahtuu spektrofotometrisesti ja perustuu RNA:n nukleotidien absorptioon 260 nm:ssa. Pitoisuuden lisäksi mitataan RNA:n puhtaus, joka ei tässä työssä ole ratkaisevan tärkeä tekijä, mutta jolla on merkitystä myöhemmin tehtävälle transgeenien hiljentymisen tutkimiselle qPCR-menetelmällä. Puhtaan RNA-liuoksen absorptio 1,0 aallonpituudessa 260 nm vastaa RNA-pitoisuutta 40 µg/ml. Puhtaan RNA:n absorbanssien suhde on $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}=2,0$. Epäpuhtaudet, kuten proteiinijäämät, jonka absorptiomaksimi on 280 nm, pienentävät absorbanssisuhdetta. (Suominen ym. 2010: 110–111.)

5.3.5 RT-PCR, cDNA:n tekeminen RNA:sta

RNA käännetään komplementaariseksi DNAksi (cDNA) käänteistranskriptio- eli RT-PCR:llä (reverse transcription polymerase chain reaction), johon tässä työssä käytetään niin ikään kaupallista reagenssipakettia. Mallina toimii siis eristetty kokonais-RNA. Sen perusteella syntetisoidaan cDNA:n ensimmäinen juoste käyttäen käänteiskopioijaentsyymiä, jonka toiminta aktivoidaan lämpötilaa nostamalla. Kun lämpötila nostetaan lähelle 100 astetta, DNA-RNA-hybridit irtautuvat toisistaan, ja syntynyt DNA-juoste toimii templaattina seuraavissa PCR-reaktioissa. Näin syntyy kaksijuosteista cDNA:ta. (Suominen ym. 2010: 170–171.)

5.3.6 PCR spesifisillä alukkeilla ja elektroforeesi

PCR eli polymeerasiketjureaktio koostuu sykleistä, joista jokainen koostuu kolmesta vaiheesta: denaturaatiosta, alukkeiden kiinnittymisestä (annealing) ja pidennysvaiheesta (ekstensio). Denaturaatio tapahtuu nostamalla reaktion lämpötilaa noin 95 asteeseen, jolloin kaksijuosteisen cDNA:n vastinjuosteet irtoavat toisistaan. Koska reaktioseoksessa on huomattavasti enemmän alukkeita kuin vastinjuosteita, alukkeet sitoutuvat komplementaarisesti cDNA-juosteisiin emäsjärjestyksensä mukaisille paikoille, kun reaktiolämpötilaa lasketaan noin 55 asteeseen. Pidennysvaiheessa lämpötilaa nostetaan DNA-polymeraasin optimaalueelle (noin 72 astetta), jolloin DNA-synteesi alkaa kummankin alukkeen 3'-päästä käyttäen cDNA-juostetta mallina. Syklejä toistetaan monistettavan jakson pituudesta riippuen tarpeellinen määrä. (Suominen ym. 2010: 153–157.)

Koska tutkittavien kloonien RNA:sta halutaan monistaa tiettyjä, tunnettuja jaksoja, käytetään cDNA:n 5'-päähen spesifisesti sitoutuvaa aluketta. Koska työssä tutkitaan viittä eri kantasoluille spesifistä geenimarkkeria, tarvitaan viittä spesifistä alukeparia (primer). Parin toinen aluke rajaa monistettavan alueen forward- ja toinen reverse-suunnassa, jolloin tunnetaan halutun monistustuotteen pituus. Tässä työssä käytettiin viittä alukeparia, joilla PCR pystyttiin luotettavimmin suorittamaan samoissa olosuhteissa. Spesifisten alukkeiden lisäksi tarvitaan templaattina toimiva sekvenssi cDNA:ta, joka on saatu RT-PCR:n tuloksena, termostabiili DNA-polymeraasientsyymi sekä kaikkia neljää deoksiribonukleotidia.

PCR on herkkä menetelmä, sillä pienetkin määrät DNA:ta monistuvat reaktiossa. Siksi positiivisten ja negatiivisten kontrollien käyttö on tärkeää. Tässä työssä positiivisena kontrollina toimi ES-solulinja, joka ilmentää kaikkia tutkittavia kantasolumarkkereita.

Negatiivisena kontrollina taas toimi MEF- (mouse embryonic fibroblast) solulinja, josta iPS-solut oli tuotettu. Koska MEF on erilaistunutta solukkoa, se ei ilmennä mitään tutkittavista markkereista.

PCR:n tulokset tarkastetaan elektroforeesin avulla. Elektroforeesissa DNA-monistustuotteet, kontrollit ja kokostandardit ladataan agarosigeelin kaivoihin. Geeliin johdetaan sähkövirta, joka saa negatiivisesti varautuneet molekyylit ajautumaan kohti anodia. Erikokoiset molekyylit erottuvat ajossa vyöhykkeiksi (band) molekyylikokonsa ja geelin tiheyden määräämänä. Vyöhykkeen intensiteetti kuvastaa kyseisen monistustuotteen määrää näytteessä. (Glick – Pasternak – Patten 2010: 53.) Kutakin erottunutta monistustuotetta verrataan kokostandardiin, josta voidaan päätellä saadun monistustuotteen pituus ja siten näytteen alkuperäinen RNA-sekvenssi eli geenimarkkeri.

Jos kloni on epätäydellisesti indusoitunut, se ei välttämättä ilmennä hyvin kaikkia tutkittuja markkerigeenejä. Joskus ilmentymisen puuttuminen saattaa kuitenkin johtua teknisistä syistä. PCR-tekniikkaa saatetaan saada herkemmäksi optimoimalla lämpötilaa ja säätämällä syklien lukumäärää. Tässä työssä käytimme lämpötilaa ja syklimäärää, joka sopisi kaikille tutkittaville alukkeille, eikä aikaa ohjelman optimoinnille jäänyt.

5.3.7 Erilaistaminen ja erilaistumisen osoittaminen immunofluoresenssivärjäyksillä

Kun tutkittavat solut on todettu kantasoluiksi edeltävillä kokeilla, varsinainen monikykyisyys testataan erilaistamalla iPS-soluja joko suoraan tai erilaistettujen soluaggregaattien, ns. embryoid bodyjen (EB) kautta kolmeen alkiokerrokseen eli endodermiin, ektodermiin ja mesodermiin. Erilaistuminen todennetaan immunofluoresenssivärjäyksillä näille kerroksille spesifisillä vasta-aineilla. (Takahashi – Yamanaka 2006: 674.)

Kantasolut alkavat muodostaa spontaanisti embryoid bodyja, kun soluja kasvatetaan tarttumattomalla bakteerikasvatusalustalla ilman LIFiä ja tukisoluja. Vaihtoehtona bakteerikasvatusmaljoille kasvatuksessa voidaan käyttää ns. low-attachment-solumaljoja, mutta ne ovat erittäin kalliita. Kun EB:t ovat muodostuneet (n. 4 vrk) ne maljataan (7–10 vrk) gelatinoiduille solumaljoille ja niiden annetaan erilaistua ainakin 10 vuorokautta. Erilaistuneille solukoille voidaan tehdä immunovärjäys kunkin alkiokerroksen osoittamiseksi. (Kyttälä 2011.)

Primäärivasta-aine sitoutuu antigeeneihin, jotka ovat tutkittavalle solutyypille spesifisiä. Mesodermin osoitus on tässä tutkimusryhmässä tehty alfa-aktiniinivärjäyksellä, ektodermin osoitus neuronispesifisellä beta-III-tubuliinivasta-aineella, ja endodermin osoi-

tus sox17-vasta-aineella. Sekundaarivasta-aineina käytetään fluoresoivasti leimattuja lajispesifisiä vasta-aineita. Immunovärjäyksen tulokset tutkitaan fluoresenssimikroskoopilla. (Kyttälä 2011.)

Fluoresenssimikroskopiassa fluoresoiva leima viritetään yleensä ultraviolettivalolla, jonka jälkeen osa absorboituneesta energiasta vapautuu pidempinä aallonpituuksina (usein vihreänä tai punaisena valona). Haluttua aallonpituutta voidaan tarkastella käyttämällä suodattimia. Tällöin saadaan näkyviin vain ne rakenteet, joihin esimerkiksi punaisena fluoresoiva leima on sitoutunut. (Dobbie – Zicha 2002: 123.)

6 Karakterisointien suoritus ja tulokset

Empiirisen osuuden laboraatiotyöt suoritettiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen Kansantautien genetiikan yksikön laboratoriotiloissa Biomedicumissa 22.8.-3.10.2011. Kaikki työvaiheet on kirjattu päiväkohtaiseen työkirjaan, joka jää THL:n haltuun. Työ eteni pääosin ennalta hahmotellun vaiheistuksen mukaisesti (ks. liite 6). Käytännön työtä tuki laatimani lista kunkin iPSc-solukloonin karakterisoinnin vaiheista (liite 7), jota tarkennettiin työn edetessä. Vastasin opinnäytetyötä tehdessäni itse kaikkien karakterisointien suorituksesta. Fluoresenssimikroskooppikuvat otti Aija Kyttälä, muut kuvat olen ottanut itse. Sain perehdytyksen käytettyihin menetelmiin ryhmän tutkimuslaborantilta. Kaikki työt suoritettiin tutkimusryhmän kokemukseen perustuvia käytäntöjä noudattaen.

6.1 Morfologian tutkiminen

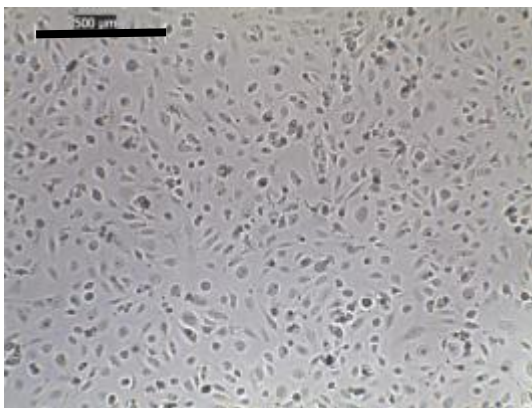
Kaikki solutyöt suoritettiin aseptisia käytäntöjä noudattaen erillisessä soluhuoneessa sijaitsevassa laminaarikaapissa käyttäen steriilejä ja autoklavoituja työvälineitä. Tuki-soluille, MEF-soluille ja iPSc-soluille käytettiin erillisiä kasvatusliuoksia ja PBS-puskureita (ilman Ca ja Mg) ristikontaminaation estämiseksi. Kasvatettavia soluja tarkasteltiin päivittäin mikroskoopilla niiden tilanteen seuraamiseksi.

Morfologiakuvia ottaessa on pyritty toisaalta valikoimaan näkökenttiä, joista ominaispiirteet on helposti osoitettavissa, ja toisaalta valikoimaan edustavia eikä ainoastaan kauniita esimerkkejä kloonin kasvusta. Tässä työssä käytetyistä kuvista on tarvittaessa muutettu ainoastaan brightness/contrast-asetusta kuvien selkeyttämiseksi.

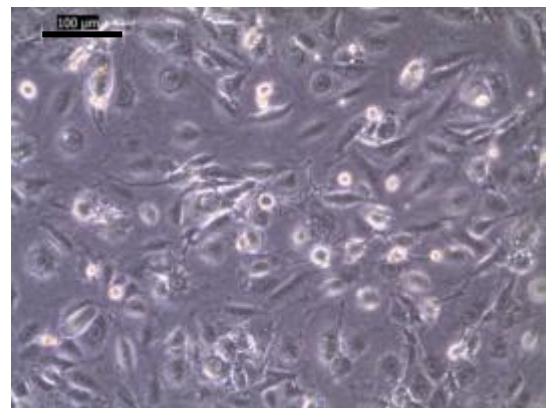
6.1.1 SNL-tukisolut

iPS-kloonien herättämistä edeltävänä päivänä herätettiin pakastetut (-150 °C) mitomycin-c-käsittelyllä jakautumattomiksi tehdyt SNL 76/7-tukisolut, joiden passage oli 20. SNL 76/7-tukisolut on muunneltu tuottamaan kantasolujen erilaistumista estävää LIF:iä. Solut herätettiin muovisille 6-kuoppalevyille tai 10 cm maljoille, jotka oli käsitelty 30 minuutin ajan 0,4 % gelatiinilla. Myöhemmissä vaiheissa maljoille lisättiin ennen solususpension lisäystä myös lasisia peitinlaseja, joille solut niin ikään kasvoivat. Kasvatusliuoksena käytettiin SNL-soluille tarkoitettua liuosta (ks. liite 8). Solujen jakotiheys oli 330 000 solua 6-kuoppalevyn kuopalle ja 2×10^6 solua 10 cm maljalle.

Herätystä seuraavana päivänä solujen morfologia tarkastettiin mikroskooppisesti ennen iPS-kloonien viljelyä tukisolujen päälle. Kuvio 2a on valomikroskooppikuva pelkästä SNL-tukisolukosta 4 x objektiivilla kuvattuna. Kuviossa 2b samaa solukkoa on kuvattu faasikontrastilla 10 x objektiivilla, jolloin solujen morfologia tulee paremmin esiin.



Kuvio 2a. SNL-tukisolukko, 40 x suurennos, valomikroskopia
Jana = 500 μm



Kuvio 2b. SNL-tukisolukko, 100 x suurennos, faasikontrasti, valomikroskopia
Jana = 100 μm

SNL-tukisoluja herätettiin vain kulloinkin iPS-viljelmien jakamista varten tarvittava määrä, sillä niiden kyky tuottaa LIF:iä alkaa heikentyä noin viikon kuluttua herätyksestä. Siten uusia SNL-soluja herätettiin vastaavalla tavalla lisää aina, kun iPS-solulinjojen jakaminen vaati uusia kasvatusalustoja.

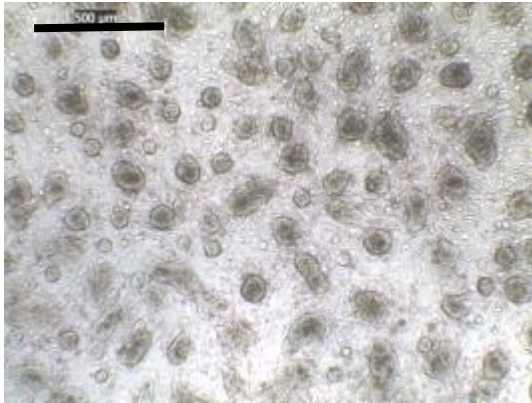
6.1.2 iPS-solut

Alun perin karakterisoitavaksi valitut solulinjat olivat C57BL/6J -hiirikannan villityypit 14 ja 17, jäljempänä wt 14 ja wt 17, sekä saman hiirikannan cln1/cln5-mutanttikannat 7 ja 25, jäljempänä cross 7 ja cross 25. Kun cross 7 aloitti kasvamisen hyvin hitaasti, päätettiin ensimmäisen viikon lopussa herättää vielä cln1/cln5-mutanttikanta 2, jäljem-

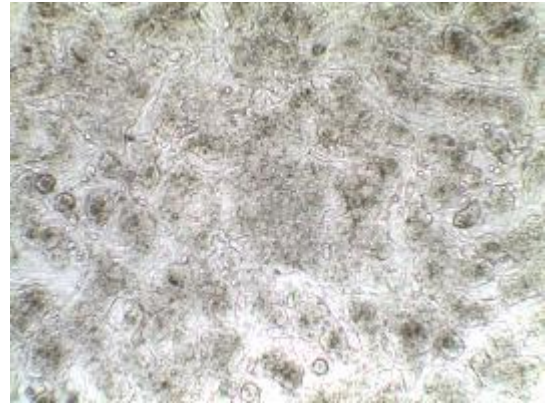
pänä cross 2. Solut herätettiin -150 °C lämpötilasta esivalmistellulle alustalle (ks. luku 6.1.1), joka oli samankokoinen kuin alusta, jolta solut oli alun perin pakastimeen siirretty. Kaikkien kloonien passage oli herätettäessä 3, paitsi wt 14, jonka passage oli 4.

iPS-solut viljeltiin ES-soluille tarkoitetussa kasvatusliuoksessa (ks. liite 8), joka sisältää enemmän ravinteita kuin somaattisille soluille tarkoitetut liuokset. Lisäksi liuos oli steriilisuodatettu.

Soluja kasvatettiin, kunnes viljelmä oli saavuttanut sopivan tiheyden mutta ei vielä ollut alkanut erilaistumaan. Kuviossa 3a on esimerkki cross 14:stä, joka kasvaa tiheästi mutta ei vielä ole alkanut erilaistua. Kuviossa 3b puolestaan cross 14 on alkanut erilaistua liian suuren solutiheyden vuoksi: iPS-kolonioiden rajat alkavat muuttua epäselviksi, ja kasvu alkaa muistuttaa tasaista mattoa.



Kuvio 3a. Wt 14, 40 x suurennos.
Tiheä mutta erilaistumaton viljelmä
Jana = 500 μm



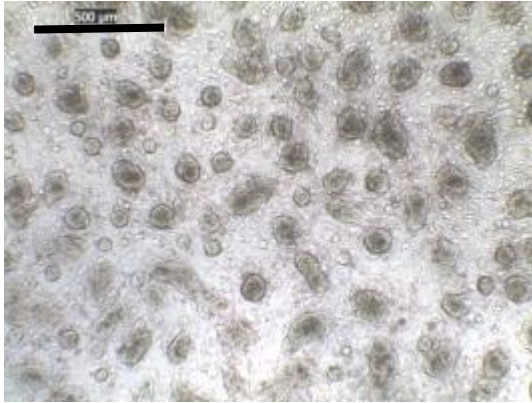
Kuvio 3b. Wt 14, 40 x suurennos. Liian tiheä, osittain erilaistunut viljelmä

Viljelmää jatkettiin jakamalla se uudelle kasvualustalle sopivaan tiheyteen. Sopiva tiheys oli etsittävä kloonikohtaisesti kokeilemalla.

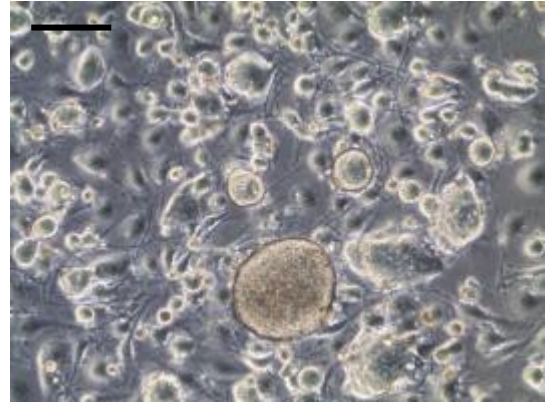
Soluja tarkasteltiin päivittäin valomikroskoopilla 4 x objektiivilla sekä 10 x objektiivilla faasikontrastilla. On huomattava, että kaikissa iPS-morfologiakuvissa taustalla näkyy SNL-tukisolukko (vrt. kuvio 2a ja 2b). Tukisolukon päällä kasvavat iPS-solukolonioiden erotettava taustasta, vaikka toisinaan tukisolukon pyöreä ja teräväreunainen morfologia on helppo sekoittaa alkavan iPS-soluviljelmän pieniin, pyöreisiin kolonioihin.

Kuvioissa 4a ja 4b on wt 14, joka kasvoi tyypillisesti siisteinä, teräväreunaisina ja pyöreämuotoisina kolonioina. Tiheänkin kasvaessaan koloniamorfologia säilyi pääsääntöisesti tiiviinä ja pyöreänä. Klooni oli siis morfologialtaan hyvä. Klooni myös kasvoi alusta

asti runsaana ja tasaisena, sen voi jakaa jopa 1:24 ilman, että kasvu kärsi.

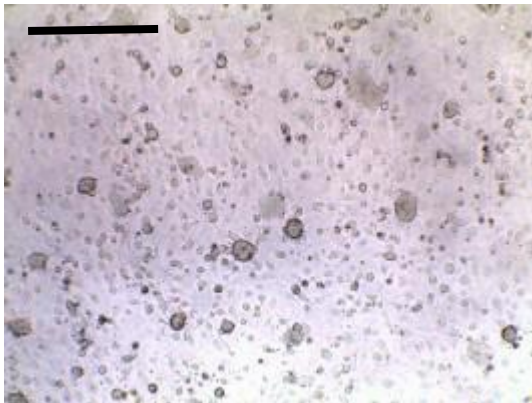


Kuvio 4a. Wt 14, 40 x suurennos
valomikroskopia
Jana = 500 μm

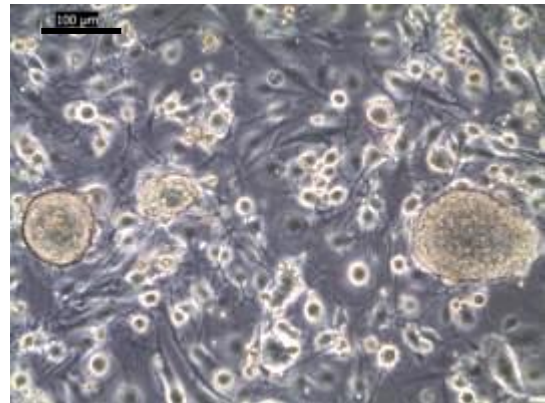


Kuvio 4b. Wt 14, 100 x suurennos,
valomikroskopia, faasikontrasti
Jana = 100 μm

Kuvioissa 5a ja 5b on wt 17, joka muodosti tyypillisesti melko siistejä iPS-kolonioina. Näillä kolonioilla oli kuitenkin taipumusta levitä reunoistaan epätarkemmiksi ja kulmikkaiksi. Kloonit olivat tästä huolimatta morfologialtaan varsin kelvollinen. Myös tämä villityypin kloonit voitiin jakaa 1:24, mutta sen kasvu ei ollut aivan yhtä nopeaa kuin wt 14:llä.



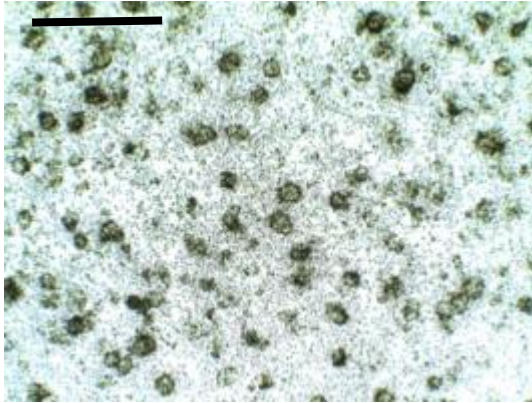
Kuvio 5a. Wt 17, 40 x suurennos
valomikroskopia
Jana = 500 μm



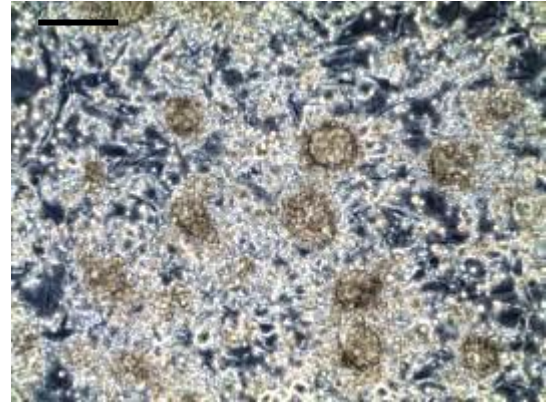
Kuvio 5b. Wt 17, 100 x suurennos,
valomikroskopia, faasikontrasti
Jana = 100 μm

Kuvioissa 6a ja 6b on cross 2, joka oli haastavaa kuvata iPS-kolonioiden päälle muodostuvan pienen pyöreän solukon takia. Tämä pieni pyöreä solumorfologia oli tyypillistä cross 2:lle, ja se alkoi muodostua kloonin herätyksen jälkeen heti toisena päivänä. Nykytietämyksellä tämän morfologisen piirteen syntymekanismi on tuntematon. Kuvissa valotus ja tarkennus on säädetty siten, että iPS-kolonioidet erottuvat pienen pyöreän solukon alta. Erottuvat iPS-kolonioidet olivat melko pyöreitä ja tasakokoisia. Morfologinen yleisilme cross 2:lla on kuitenkin heikko ylimääräisen, koheesioltaan vajaan solukon takia. Kasvultaan cross 2 oli mutanttiklooneista paras, mutta silti selvästi hitaampi kuin

villityypin klooneilla; sitä jaettiin enimmillään 1:12.

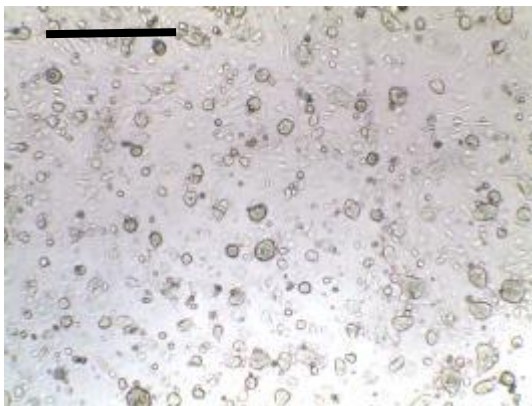


Kuvio 6a. Cross 2, 40 x suurennos
valomikroskopia
Jana = 500 μm

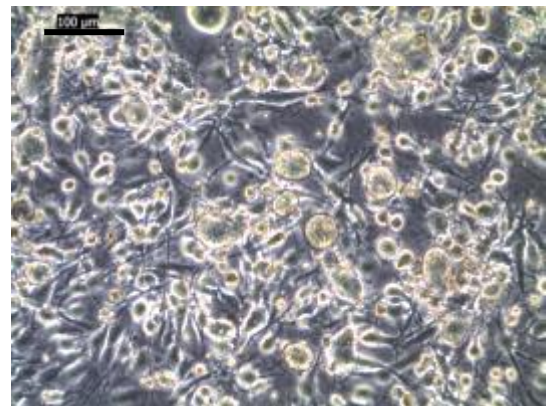


Kuvio 6b. Cross 2, 100 x suurennos,
valomikroskopia, faasikontrasti
Jana = 100 μm

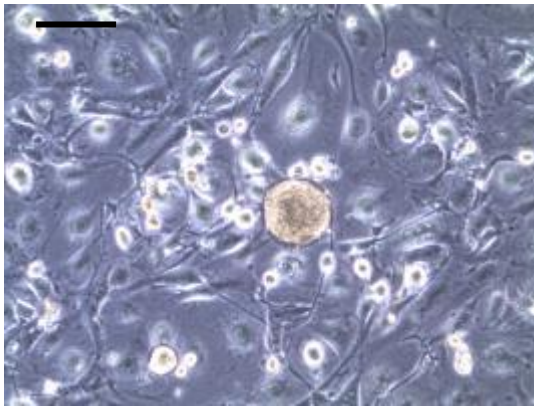
Kuvioissa 7a ja 7b on cross 7, joka muodosti erittäin selkeitä, pyöreitä ja tarkkareunaisia iPS-kolonioita. Cross 7 oli wt 14:n ohella morfologisesti kaunein kloonin, mikä näkyy erityisesti kuvioista 7c. Kuvio 7c on otettu vaiheessa, jolloin kloonin kasvoi vielä hyvin niukasti mutta erittäin napakoina iPS-kolonioina. Cross 7 tarvitsi selvästi eniten muiden iPS-solujen läheisyyttä, sillä tämä kloonin lähti selvään kasvuun vasta kahden viikon kasvatuksen jälkeen, kun se jaettiin viikonlopuksi 10 cm maljalta 6-kuoppalevyn kuopalle 1:1 (vertailun vuoksi samaan aikaan villityypin kloonien jaettiin 1:24). Tämän jälkeenkin kloonin jaettiin enimmillään 1:12. Kuviot 7a ja 7b on otettu runsaamman kasvun vaiheessa.



Kuvio 7a. Cross 7, 40 x suurennos
valomikroskopia
Jana = 500 μm

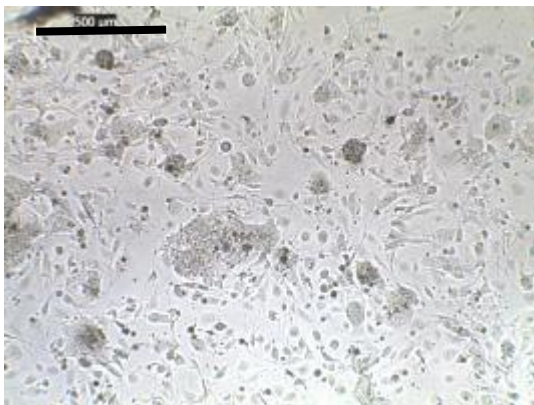


Kuvio 7b. Cross 7, 100 x suurennos
valomikroskopia, faasikontrasti
Jana = 100 μm

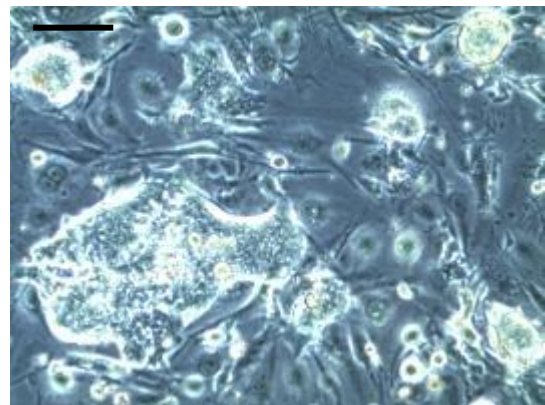


Kuvio 7c. Cross 7, 100 x suurennos
valomikroskopia, faasikontrasti
Jana = 100 μm

Kuvioissa 8a ja 8b on cross 25, joka oli morfologisesti sekaklooni, sillä se kasvatti sekä pyöreitä ja teräväreunaisia että suuria, epätarkkareunaisia ja levinneitä kolonioita, vaikka solujen tiheys ei vielä antaisi aiheutta erilaistumiseen. Kasvultaan cross 25 oli melko hidas, sitä jaettiin enimmillään 1:6.



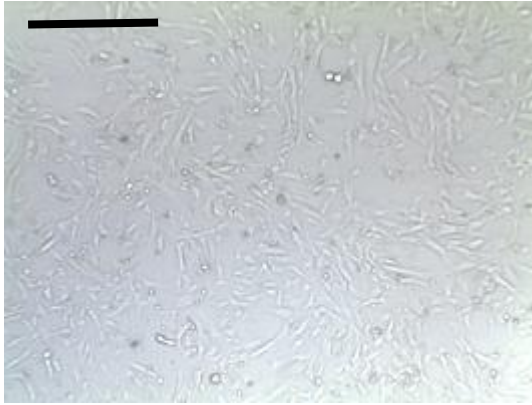
Kuvio 8a. Cross 25, 40 x suurennos
valomikroskopia
Jana = 500 μm



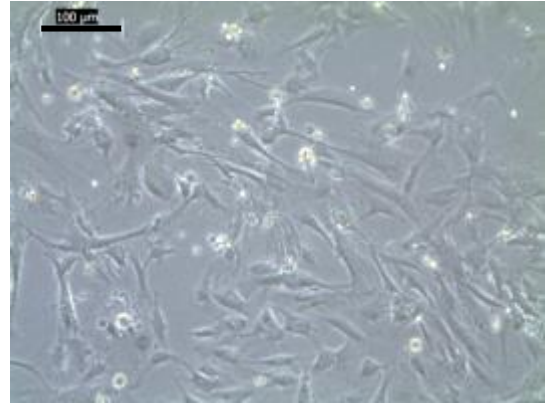
Kuvio 8b. Cross 25, 100 x suurennos,
valomikroskopia , faasikontrasti
Jana = 100 μm

6.1.3 MEF-solut

Työn PCR-osuudessa tarvittiin kontrolliksi alkuperäisiä MEF-soluja, joista iPS-kloonit oli tuotettu. MEF-solut eivät ilmennä mitään kantasolumarkkereita, sillä ne ovat erilaistuneita somaattisia soluja. MEF-solut kasvatettiin soluviljelypulloissa fibroblasteille tarkoitettussa kasvatusliuoksessa (ks. liite 8). Fibroblasteille on tyypillistä, että ne tarvitsevat toisten solujen läheisyyttä; siksi niitä ei pidä jakaa enempää kuin 1:4. Työn aikana havaittiin, että MEF-solujen kasvuvauhti kärsi huomattavasti jo jaettaessa soluja 1:4, ja työssä jouduttiinkin herättämään useita ampulleja MEF-soluja, ennen kuin viljelmä saatiin kasvamaan kunnolla. Kuvioissa 9a ja 9b on esitetty MEF-solujen pitkänomainen morfologia; niiden taustalla ei luonnollisestikaan näy tukisolukerrosta.



Kuvio 9a. MEF, 40 x suurennos.
valomikroskopia
Jana = 500 μm



Kuvio 9b. MEF, 100 x suurennos,
valomikroskopia, faasikontrasti
Jana = 100 μm

6.2 Kantasolumarkkereiden tutkiminen immunovärjäyksillä

6.2.1 Alkalinen fosfataasi (AP)

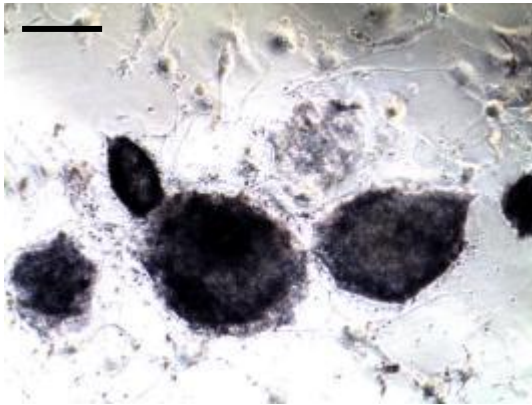
Ennen alkalisen fosfataasin (AP) aktiivisuuden osoittamista iPS-soluja kasvatettiin peitinlaseilla 4–5 vuorokauden ajan niin, että ne saavuttivat hyvän morfologian ja tiheyden. Peitinlaseille kasvatetut solut kiinnitettiin 4 % paraformaldehydissä (PFA).

Työssä AP-aktiivisuuden osoitus oli tarkoitus suorittaa Millipore ES cell characterization kit -tuotepakkauksella, jonka ohjeiden mukaisesti peitinlasit kiinnitettiin 2 minuutin ajan. Yksi reagensseista osoittautui kuitenkin vanhaksi, joten vaihdoimme värjäysmenetelmää. Uusi värjäysmenetelmä vaati 10 minuutin PFA-kiinnityksen, joten 2 minuutin ajan kiinnitettyjä soluja kiinnitettiin vielä 8 minuuttia. Tämän seurauksena osa kloonista kiinnittyi heikommin, joten peitinlasilta oli irronnut runsaasti soluja, mutta itse värjäystulokseen kaksivaiheinen kiinnitys ei vaikuttanut.

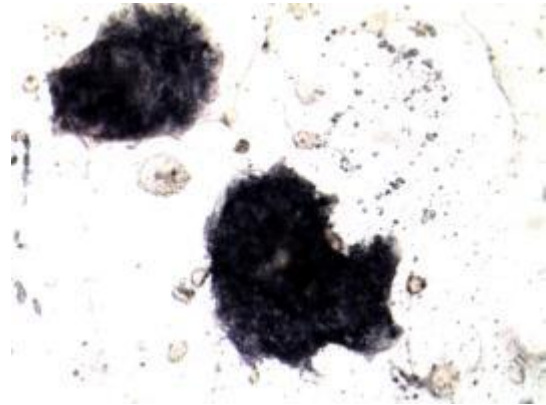
Lopulta 10 minuuttia kiinnitettyjen peitinlasien värjäykseen käytettiin Rochen NBT/BCIP Stock Solution -reagenssia, joka ilmaisee alkalisen fosfataasin aktiivisuuden siniviolettiä värireaktiona. Pesuihin käytettiin PBS-puskuria (ilman Ca ja Mg). Koko värjäys on esitetty liitteessä 13.

Kaikki tutkitut kloonit ilmensivät AP-aktiivisuutta. Kuviossa 10a–e näkyvät rinnakkain kaikki AP-värjätyt kloonit. Kuvion 10a wt 14 ja kuvion 10b wt 17 olivat kiinnitykseltään epäonnistuneita, mutta värjäyksessä peitinlaseille jääneet koloniat olivat AP-aktiivisia. Kuvion 10c cross 2 -kloonissa kuvaamista on jälleen häirinnyt pieni pyöreä solukko, mutta AP-aktiiviset iPS-koloniat erottuvat kuitenkin taustalla. Sen sijaan kuvion 10d cross 7 on hyvin selkeä. Kuvion 10e cross 25 on AP-värjäyksessä selvä sekakloni: osa

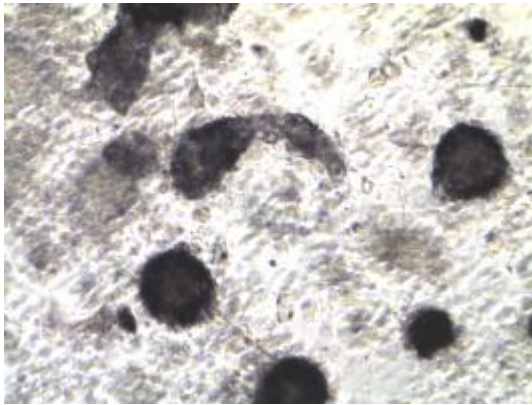
kolonioista on positiivisia, osa negatiivisia, ja lisäksi myös osa saman iPS-kolonian soluista on värjäytynyt osan jäädessä negatiiviseksi.



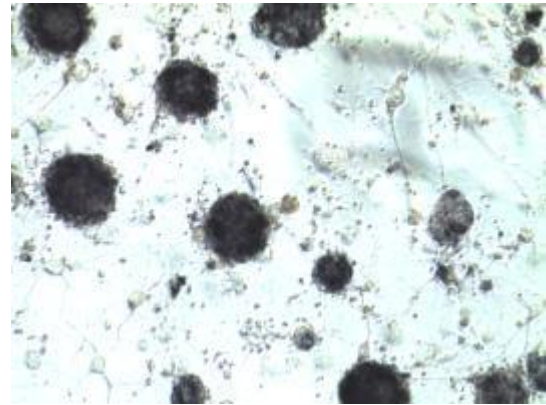
Kuvio 10a. Wt 14, 100 x suurennos, valomikroskopia, faasikontrasti
Jana = 100 μ m



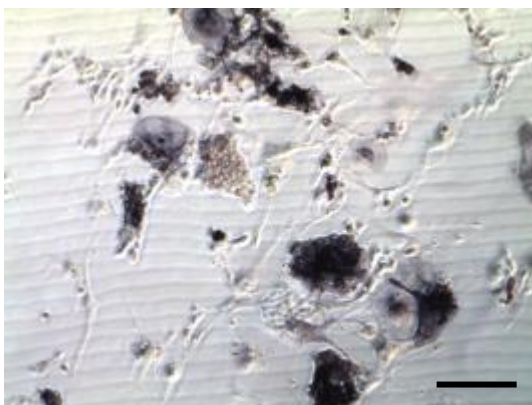
Kuvio 10b. Wt 17, 100 x suurennos, valomikroskopia, faasikontrasti



Kuvio 10c. Cross 2, 100 x suurennos, valomikroskopia, faasikontrasti



Kuvio 10d. Cross 7, 100 x suurennos, valomikroskopia, faasikontrasti



Kuvio 10e. Cross 25, 100 x suurennos, faasikontrasti. Jana = 100 μ m

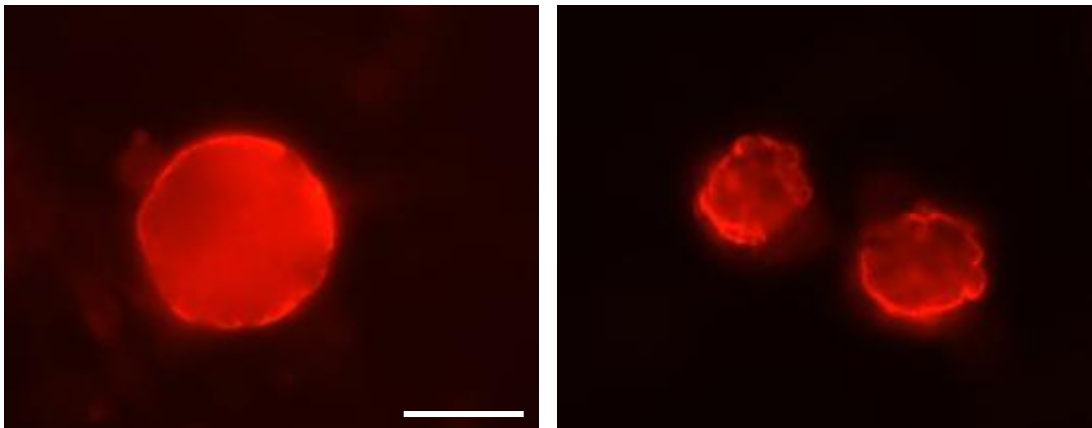
6.2.2 Stage-specific mouse embryonic antigen-1 (SSEA-1)

Stage-specific mouse embryonic antigen-1 eli SSEA-1 on kantasolujen ilmentämä solunpinnan proteiini. SSEA-1-immunofluoresenssivärjäyksessä primäärivasta-aineena

käytettiin Millipore ES cell characterization -pakkauksen monoklonaalista hiiren SSEA-1 IgM-vasta-ainetta. Sekundäärivasta-aineena oli fluoroforilla leimattu, kanissa hiirtä vastaan tuotettu (rabbit anti-mouse) TRITC. Lämpösuojaukseen käytettiin 0,2 % saponiinia, ja vasta-aineiden epäspesifistä tarttumista vähennettiin 0,5 % BSA:lla ("blokkaukset"). Koska saponiini-lämpösuojaukseen on reversiibeli eli palautuva, myös kaikki pesut suoritettiin samalla lämpösuojaukseen/blokkaukseenliuoksella (0,2 % saponin – 0,5 % BSA in PBS). Sekundäärivasta-aineen inkubointi tapahtui pimeässä fluoroforin hajoamisen vähentämiseksi. Koko värjäys on liitteenä 14.

SSEA-1-vasta-aine laimennettiin reagenssipakkauksen ohjeen mukaisesti 1:50. Mikroskopoidessa kävi kuitenkin ilmi, että pintamarkkeri oli tällä laimennoksella värjäytynyt niin voimakkaasti, että yksittäisiä solurakenteita kolonioiden sisällä oli vaikea saada esiin tavallisella fluoresenssimikroskoopilla. Näin ollen 1:200 laimennos olisi ollut riittävä SSEA-1-vasta-aineella.

Kuviot 11a–e kuvaavat kloonien SSEA-1-aktiivisuutta. Kuvio 11a tukee valomikroskopiolla tehtyjä löydöksiä wt 14 -kloonista; klooni on napakka, hyvä ja kokonaan SSEA-1-aktiivinen. Kuvio 11b osoittaa myös wt 17:n kokonaan SSEA-1-aktiiviseksi, joskin se on morfologialtaan hieman löyhempi kuin wt 14.

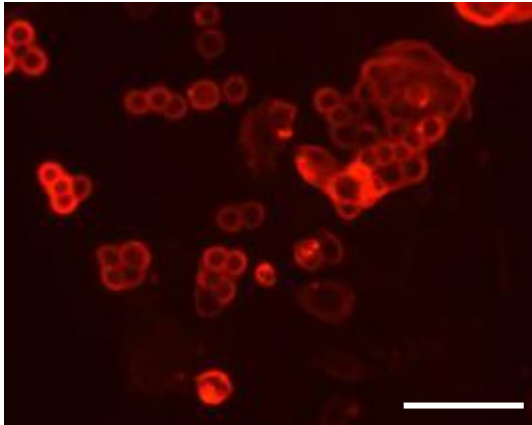


Kuvio 11a. Wt 14, 630 x suurennos, fluoresenssimikroskopia. Jana = 50 μ m

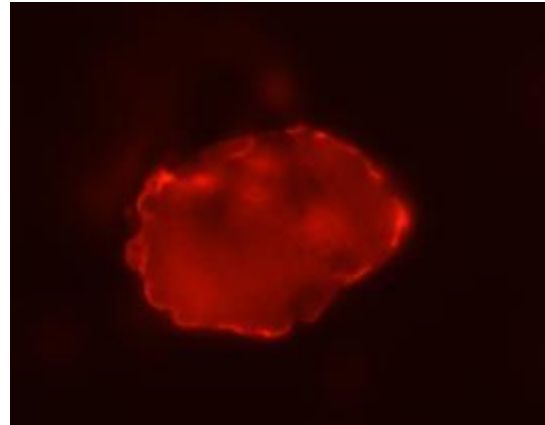
Kuvio 11b. Wt 17, 630 x suurennos, fluoresenssimikroskopia

Myös kuvion 11d cross 7:n SSEA-1-värjäys vahvistaa morfologisen tarkastelun tuloksia; klooni on siisti ja tasaisesti SSEA-1-positiivinen. Kuvio 11c sen sijaan on hieman yllättävä, sillä se osoittaa, että cross 2 -kloonin pinnalla nähty irrallinen pieni, pyöreä solukko on ainakin osittain SSEA-1-positiivista. Värjäys korostaa kloonin iPS-kolonioiden koheesion puutetta. SSEA-1-värjäys korostaa myös cross 25:n sekakloonimaisuutta kuvi-

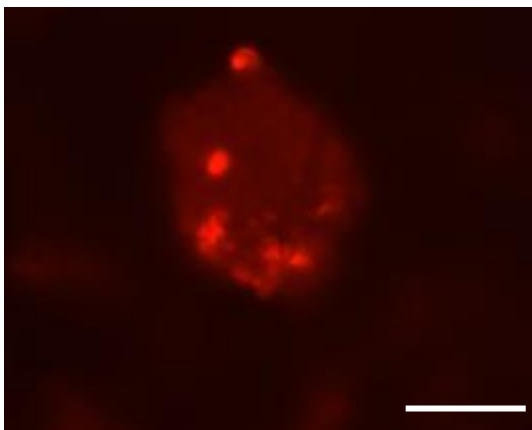
ossa 11e. Siinä nähdään iPS-kolonia, jonka soluista vain pieni osa on SSEA-1-positiivisia.



Kuvio 11c. Cross 2, 630 x suurennos, fluoresenssimikroskopia. Jana = 50 μm



Kuvio 11d. Cross 7, 630 x suurennos, fluoresenssimikroskopia



Kuvio 11e. Cross 25, 630 x suurennos, fluoresenssimikroskopia. Jana = 50 μm

6.2.3 Magneettikuulapuhdistus ja SSEA-1-uusintavärjäys

Magneettikuulapuhdistuksen tarkoituksena oli erotella solususpensioista vain SSEA-1-positiiviset solut, joten se ajoi kahta tehtävää. Ensinnäkin, puhdistuksen avulla voitiin päästä eroon SSEA-1-negatiivisista soluista, joten tutkimme, voitaisiinko puhdistuksella vaikuttaa SSEA-1-värjäystulokseen. Toisekseen puhdistuksen avulla solususpensiosta saatiin poistettua myös SNL-tukisolut, jotka voivat haitata myöhempää EB-muodostusta (ks. luku 6.4.1).

Työssä käytettiin Miltenylin Anti-SSEA-1-(CD15) Microbeads, human & mouse -kuulia, MACS separation columns -pylväitä sekä Mini MACS Separator magneetteja. Puhdistuksessa käytetty puskuri (pH 7,2 PBS – 0,5 % BSA – 2mM EDTA) valmistettiin juuri en-

nen käyttöä, ja kaikki liuokset käytettiin kylminä. Puhdistusta varten trypsinoimalla irrotetun solususpension solumäärä laskettiin (ks. taulukko 1) Cellometer-solulaskurilla, ettei puhdistuspylvään kapasiteettia (1×10^7 solua) ylitetä. iPS-solut ovat kooltaan lähinnä lymfoblasteja vastaavia, joten laskentaan käytettiin lymfoblastiohjelmaa. Kustakin kloonista erotettiin 1×10^7 solua, joita inkuboitiin kuulien kanssa. Suspensio suodatettiin pylväiden läpi magneettitelineissä. Työn suoritus on kuvattu liitteessä 12.

Kuten taulukosta 1 käy ilmi, solumäärä laski huomattavasti SSEA-1-negatiivisten solujen poistuessa. Mutanttikloonien kohdalla muutos oli jopa yli 10-kertainen, kun taas villityyppien solumäärä väheni vain noin puoleen. Solumäärän laskusta aiheutui hankaluuksia myöhemmissä EB-muodostuksessa (ks. luku 6.4.1).

Taulukko 1. Solukonsentraatio ennen ja jälkeen magneettikuulapuhdistuksen

Klooni (p=passage)	Konsentraatio ennen puhdistusta, solua/ml	Konsentraatio puhdistuksen jälkeen, solua/ml
wt 14 (p 10)	$2,00 \times 10^6$	$7,22 \times 10^5$
wt 17 (p 8)	$2,35 \times 10^6$	$1,32 \times 10^6$
cross 2 (p 7)	$3,32 \times 10^6$	$3,44 \times 10^5$
cross 7 (p 11)	$3,59 \times 10^6$	$2,85 \times 10^5$
cross 25 (p 6)	$2,58 \times 10^6$	$2,18 \times 10^5$

Magneettikuulapuhdistuksen jälkeen kasvatetuissa ja värjätyissä peitinlaseissa ei näkynyt olennaisia muutoksia puhdistusta edeltävään tilanteeseen. Villityypin klooneihin wt 14 ja 17 ei ollut odotettavissakaan muutoksia. Mutanttiklooni cross 2 oli siistiytynyt jonkin verran, mutta irtonaisesta pienestä pyöreästä solukosta ei päästy täysin eroon. Samoin cross 25 oli edelleen sekaklooni magneettikuulapuhdistuksesta huolimatta; kolonioissa näkyi selvästi alueita, jotka eivät olleet SSEA-1-positiivisia. Cross 7 oli niin paljon jäljessä kasvultaan, ettei sitä ehditty värjätä magneettikuulapuhdistuksen jälkeen tähän työhön.

6.3 Kantasoluspesifisten geenimarkkereiden tutkiminen

Kasvatetuista soluista eristettiin RNA, jotta solun ilmentämät kantasolumarkkerigeenit voitaisiin osoittaa PCR:n avulla. PCR-reaktion tarvitsemaa kaksijuosteista DNA-templaattia varten RNA käännettiin komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA).

6.3.1 RNA:n eristys

RNA:n eristystä varten soluviljelmistä kerättiin solupelletti, kun viljelämä oli silmämääräi-

sesti arvioituna riittävän täysi ja muut työvaiheet sen sallivat. Solut irrotettiin maljalta entsyymaattisesti trypsiinillä, pestiin PBS:llä ja pakastettiin -70 °C:ssa liitteessä 8 olevan ohjeen mukaisesti. Lähtöviljelmän koko ei ollut vakio, mutta toisaalta taulukosta 2 ilmenee, ettei saanto aina riipu suoraan lähtöviljelmän koosta. Samoin viljelmässä olevien iPS-solujen ja SNL-tukisolujen suhde voi vaihdella riippuen siitä, kuinka täysi viljelämä on ollut solupelletin tekohetkellä.

RNA:n eristykseen käytettiin Bio-Radin Aurum Total RNA Sample Pack - tuotepakkausta, joka sisälsi tarvittavat reagenssit sekä eristyspylväät. Pakkauksella eristetyt näytteet soveltuvat hyvin RT-PCR-sovelluksiin. Eristys tehtiin pakkauksen sentrifugointiprotokollaa käyttäen (liite 9). Ehjän RNA:n varmistamiseksi pakkauksen reagenssit ovat RNAasi-vapaita, ja protokollaan sisältyy DNAasi-käsittely, joka poistaa DNA-kontaminaation eristetyistä RNA:sta. RNA-saanto mitattiin Nanodrop-spektrofotometrillä. Taulukosta 2 ilmenee eristetyn RNA:n pitoisuus sekä puhtausaste RNA:n ja proteiinien absorptiokertoimien suhteena (tulisi mielellään olla mahdollisimman lähellä kahta). Saannot jäivät yllättävän mataliksi, ja tämän takia myös seuraavan työvaiheen eli RT-PCR:n RNA-templaattimäärä oli odotettua pienempi.

Taulukko 2. RNA-eristykseen käytetyn soluviljelmän koko sekä saannon konsentraatio ja puhtausaste

Klooni (p=passage)	Viljelmän koko	Konsentraatio ng/μl	Puhtaus 260/280
wt 14 (p 6)	¼ 10 cm malja	37,15	1,95
wt 17 (p 4)	¼ 10 cm malja	63,66	1,89
cross 2 (p 6)	1/6 10 cm malja	46,40	1,89
cross 7 (p 5)	½ 6-kuoppa	42,82	1,95
cross 25 (p 4)	¼ 10 cm malja	76,95	1,93
MEF wt (p 4)	½ 6-kuoppa	13,69	1,94
ES (p ei tiedossa)	1/5 10 cm malja	31,33	1,97

6.3.2 RT-PCR

Seuraavassa vaiheessa yksijuosteisesta RNA-templaattista luotiin kaksijuosteinen komplementaarinen DNA (cDNA)-templaatti käänteistranskription avulla. Työssä käytettiin Fermentasin Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR -reagenssipakettia. RT-PCR suoritettiin noudattaen pakkauksen protokollaa (liite 10).

Työssä käytettävän RNA-templaatin määräksi oli tutkimusryhmän aiempien karakterisointien perusteella sovittu 1 μg. Koska protokollan mukainen reaktion kokonaisvo-

lyymi on 20 μ l ja muiden reagenssien tilavuus oli 6 μ l, oli RNA-templaatin määrä korkeintaan 14 μ l reaktiota kohden. Ongelmana oli matala RNA-saanto, jonka takia kaikkia näytteitä pipetoitiin 14 μ l, mutta vain cross 25:n templaattimäärä ylsi tällä enimmäismäärällä 1 μ g:aan (ks. taulukko 3). Valitettavasti cDNA:n määrää ei voitu mitata, joten voitiin vain olettaa reaktiosta saadun DNA-templaatin määrän olevan riittävä.

Taulukko 3. RT-PCR:ssä käytetyn RNA-templaatin määrä

Kloonin nimi	Konsentraatio ng/ μ l	RNA-templaatin määrä ng
wt 14 (p 6)	37,15	520,10
wt 17 (p 4)	63,66	891,24
cross 2 (p 6)	46,40	649,60
cross 7 (p 5)	42,82	599,48
cross 25 (p 4)	76,95	1077,30
MEF wt (p 4)	13,69	191,66
ES (p ei tiedossa)	31,33	438,62

6.3.3 PCR viidellä kantasoluspesifisellä alukkeella

PCR suoritettiin viidelle eri kantasolumarkkerille Esg1, ERas, Fgf4, Nanog ja Zfp42 (Rex1), joita varten käytettiin SIGMAN spesifisiä sense- ja antisense-alukkeita, jotka rajaavat monistettavan alukkeen forward- ja reverse-suunnissa. Alukkeiden emäsjärjestys on esitetty liitteessä 11. PCR-reaktiossa käytettiin Promega GoTaq Green Master Mix -reagenssia, joka sisältää TaqDNA-polymeraasin lisäksi reaktiossa tarvittavat nukleotidit (dNTP), DNA-polymeraasin toiminnan mahdollistavat magnesiumionit ($MgCl_2$ -muodossa), PCR-reaktiopuskurin sekä latauspuskurin indikaattoriväreineen elektroforeesia varten.

PCR-reaktiot tehtiin 25 μ l:ssa. Templaatti-cDNA:ta otettiin reaktioon 1 μ l, paitsi MEF-solujen osalta matalan RNA-saannon vuoksi 1,5 μ l. Näin kussakin näytteessä on vähintään 20 ng templaatti-cDNA:ta, mikä riittää PCR-reaktioon. Näytteet pipetoitiin 96-kuoppalevyille. Koko PCR-työn suoritus on kuvattu liitteessä 11.

PCR-reaktio suoritettiin kaikilla alukepareilla samalla kerralla. Käytetyn PCR-ohjelman lämpötila ja syklimäärä oli laskettu siten, että reaktio toimii kaikilla alukkeilla, mutta näin ollen sitä ei ollut optimoitu millekään tietylle alukeparille. Elektroforeesikuvista voidaankin optimoinnin puuttumisen takia kuitenkin nähdä, että esimerkiksi Fgf4-alukkeilla myös epäspesifistä sitoutumista on tapahtunut (kuviot 14), ja Esg1-ajon ala-

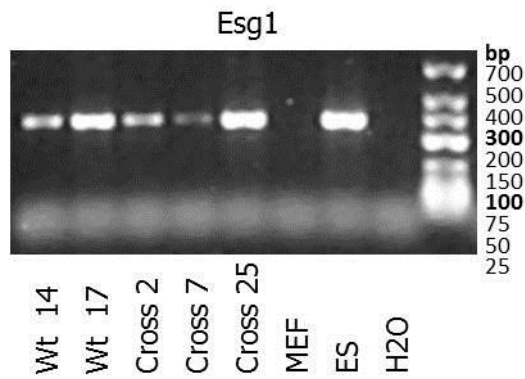
reunassa (kuvio 12) nähdään käyttämättömistä alukkeista muodostuvat vyöhykkeet.

Kaikkien alukeparien reaktioissa monistettiin myös negatiivisena kontrollina MEF-soluista eristetty templaatti sekä positiivisena kontrollina ES-soluista eristetty templaatti. Lisäksi kaikissa pareissa oli mukana vesikontrolli. Vesikontrolli ja positiivinen kontrolli olivat kaikissa ajoissa puhtaat. Negatiivisessa kontrollissa ilmeni kuitenkin vyöhyke Zfp42-alukkeella. Tämän voidaan arvella johtuvan ilmakontaminaatiosta.

PCR-reaktion tulokset tarkastettiin elektroforeesin avulla. Elektroforeesi suoritettiin TBE-puskuriin tehdyllä 1 % agarosigeelillä. Kaksijuosteisen DNA:n visualisoimista varten käytettiin Invitrogenin SYBR Safe DNA Gel Stain -reagenssia. Monistettujen DNA-juosteiden pituus visualisoitiin 25–700 emäsparin mittaisella O'Gene Ruler Low Range -kokostandardilla, sillä kaikilla käytetyillä alukepareilla odotettujen monistustuotteiden pituus oli 100–500 emäsparia (bp).

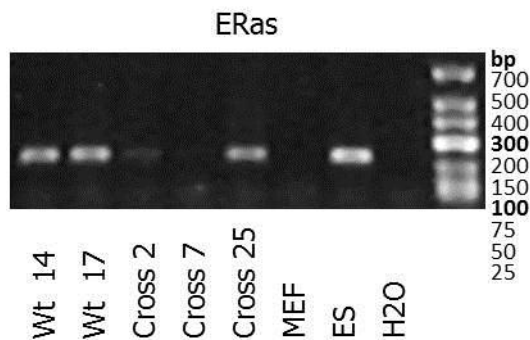
Kuhunkin agarosigeelin kaivoon pipetoitiin 5 µl PCR-monistustuotetta, eikä erillistä latauspuskuriä tarvittu PCR:ssä käytetyn GoTaq Green Master Mix -reagenssin ansiosta. Pipetointijärjestys oli liitteen 11 mukainen. Elektroforeesissa käytettiin ajopuskurina TBE:tä. Ensimmäistä, Esg1- ja ERas-alukkeet sisältävää geeliä ajettiin 80 V jännitteellä noin 45 minuutin ajan, jonka jälkeen jännitettä lisättiin 100 V:iin vielä 30 minuutin ajaksi, kunnes keltainen latausväri oli ajautunut aivan geelin reunaan. Toista, Fgf4- ja Nanog-alukkeet sisältävää geeliä ajettiin 100 V jännitteellä noin 60 minuutin ajan, ja viimeistä, Zfp42 (Rex1)-alukkeen sisältävää geeliä 100 V jännitteellä noin 40 minuuttia ja kiireen takia lopuksi vielä 120 V jännitteellä noin 10 minuuttia, minkä takia erottuvuus on tällä geelillä heikompi kuin muissa.

Kaikki tutkitut kloonit ilmensivät Esg1-geeniä. Kuvio 12 osoittaa, että ilmentyminen oli parasta klooneissa wt 17 ja cross 25, kun taas heikoiten geeniä ilmensi cross 7.

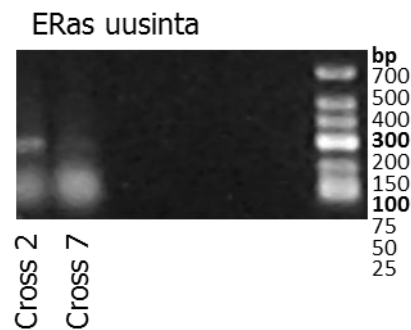


Kuvio 12. PCR-tulos Esg1-alukkeella

ERas-geenin ilmentyminen oli kuvion 13a mukaisesti hyvin heikko cross 2 -kloonilla ja lähes olematon kloonilla cross 7. Tuloksen varmistamiseksi elektroforeesi suoritettiin uudestaan käyttäen kolminkertaista määrää (15 μ l) PCR-tuotetta, joten alukkeista syntyvät vyöhykkeet ovat huomattavasti suuremmat uusinnassa (kuvio 13b). Uusinnassa molemmilla klooneilla voidaan havaita hyvin heikosti erottuvat vyöhykkeet, cross 2:lla edelleen voimakkaampana kuin cross 7:llä.

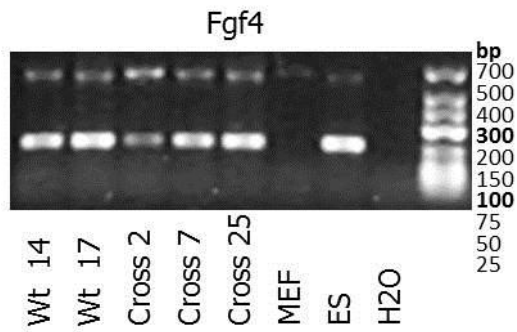


Kuvio 13a. PCR-tulos ERas-alukkeella



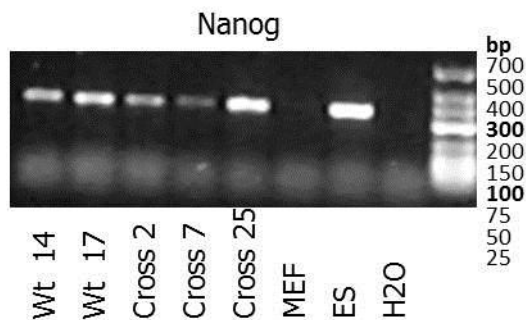
Kuvio 13b. Uusinta ERas-alukkeella

Kaikki tutkitut kloonit ilmensivät vahvasti Fgf4-geeniä kuvion 14 mukaisesti. Heikoimmin geeniä ilmensi cross 2. Vahvimmin tätäkin geeniä ilmensivät wt 17 ja cross 25.



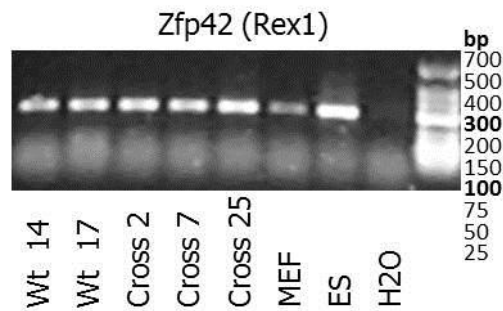
Kuvio 14. PCR-tulos Fgf4-alukkeella

Kaikki kloonit osoittautuivat positiivisiksi myös Nanog-kantasolumarkkerin osalta kuvion 15 mukaisesti. Tällä kertaa heikoiten geenä ilmensi cross 7, parhaiten cross 25.



Kuvio 15. PCR-tulos Nanog-alukkeella

Myös Zfp42 (Rex1)-geenin osalta kaikki tutkitut kloonit olivat kantasoluja kuvion 16 mukaisesti. Yllätys oli, että myös erilaistunut MEF-kontrolli, jonka ei pitäisi ilmentää mitään kantasolugeenejä, muodosti elektrofooresissa heikon vyöhykkeen. Tämän vyöhykkeen voidaan arvella muodostuneen muista PCR-tuotteista ilmakontaminaation kautta.



Kuvio 16. PCR-tulos Zfp42 (Rex1)-alukkeella

6.4 Monikykyisyyden tutkiminen

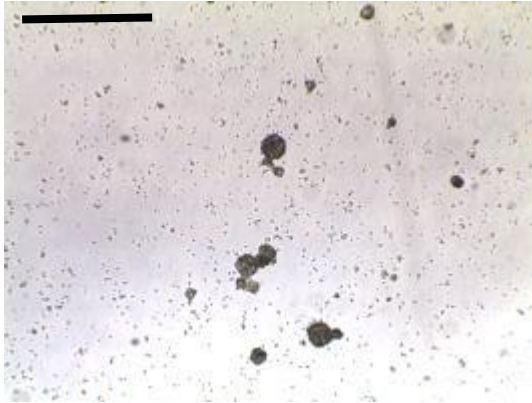
6.4.1 Embryoid bodyjen (EB) muodostuskokeet

Kun kantasolujen annetaan kasvaa suspensiossa eikä niitä ei pidetä erilaistumattomina ulkopuolisten tekijöiden avulla, ne alkavat kasautua ja muodostaa embryoid bodyja (EB) ja edelleen erilaistua. Koska tukisolut voivat inhiboida EB-muodostusta, tehtiin EB-muodostuskoe magneettikuulilla puhdistetuille iPS-soluille. Solut laitettiin kasvamaan halkaisijaltaan 6 cm steriileille bakteerimaljoille ES-kasvatusliuokseen, jossa niiden annettiin kasvaa 8 päivän ajan. Kasvatuksessa käytettiin steriilejä bakteerimaljoja, joihin kantasolut eivät tartu.

Tutkimusryhmän tekemien aiempien kokeiden mukaan noin $1,5 \times 10^6$ solua on ollut tässä tilavuudessa sopiva solumäärä embryoid bodyjen muodostumiselle. Mutanttikloonien iPS-solunäärä oli kuitenkin magneettikuulapuhdistuksen jälkeen niin alhainen, että EB-muodostuskokeessa jouduimme crossien osalta käyttämään pienempää solumäärää (cross 2: $1,25 \times 10^6$ solua; cross 7: $9,98 \times 10^5$ solua, cross 25: $7,63 \times 10^5$ solua). Jos halutaan verrata muodostuneiden embryoid bodyjen lukumäärää villityypin ja mutantin välillä, on solumäärän oltava sama. Tässä työssä haluttiin ainoastaan muodostaa EB:itä, joten solumäärän vaihtelulla ei ollut merkitystä.

Embryoid bodyjen muodostuminen ja koko eroaa ryhmän aiempien tulosten mukaisesti villityypin ja mutantin välillä, joten EB-muodostus tehtiin pareittain: rinnakkain kasvatettiin wt 14 ja cross 2, sekä wt 17 ja cross 25. Koska cross 7 kasvoi niin paljon muita kloonieja jäljessä, sille rinnakkaisvertailua ei suoritettu. Vaikka koe ei ollut näissä olosuhteissa solumäärältään standardoitu, aiempi tulos näytti toistuvan eli mutanttilinjojen muodostamat EB:t olivat epämääräisemmän muotoisia, löyhempiä ja pienempiä. Tulos korostuu kasvatuksen alkupäivinä, mutta erot tasaantuvat viikon kasvatuksen jälkeen.

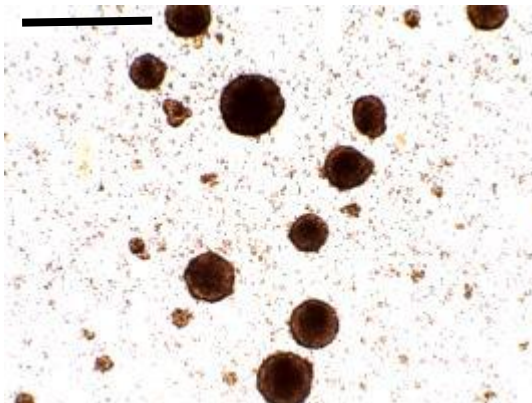
Rinnakkain kasvatettiin siis wt 14 ja cross 2. Neljäntenä kasvatuspäivänä kuvattuna klooneissa näkyy melko selvä ero: mutanttikloonin EB:t olivat rakenteeltaan löyhempiä ja epäsäännöllisemmän muotoisia (kuvio 17b), kun taas villityypin EB:t olivat jo pieninä melko tiiviitä ja pääsääntöisesti pyöreitä (kuvio 17a). Yleisilmeeltään kloonit olivat seitsemänten päivään mennessä melko samankaltaiset (kuvio 17c ja 17d).



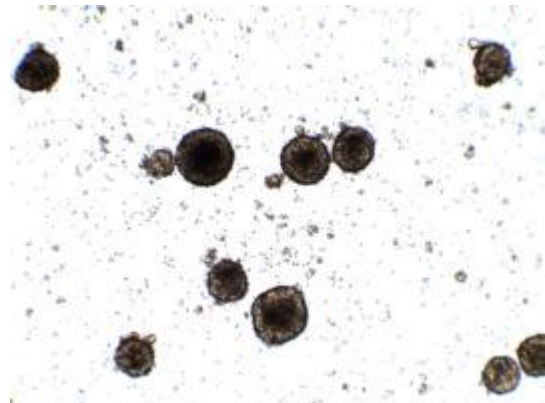
Kuvio 17a. Wt 14, päivä 4
40 x suurennos, valomikroskopia
Jana = 500 µm



Kuvio 17b. Cross 2, päivä 4
40 x suurennos, valomikroskopia

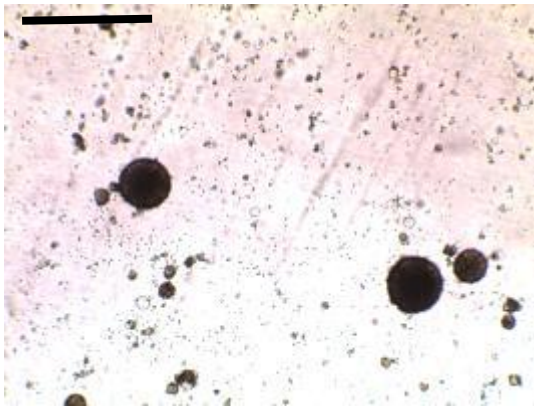


Kuvio 17c. Wt 14, päivä 7
40 x suurennos, valomikroskopia
Jana = 500 µm

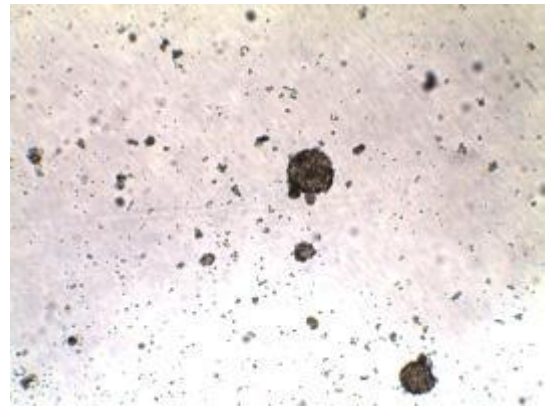


Kuvio 17d. Cross 2, päivä 7
40 x suurennos, valomikroskopia

Samoin rinnakkain kasvatettiin kloonit wt 17 ja cross 25. Tässä parissa oli selvemmin huomattavissa mutanttikloonin jonkin verran löyhempi EB-muodostus (kuvio 18b) villityypin klooniin (kuvio 18a) verrattuna. Ero oli näkyvissä vielä seitsemäntenäkin päivänä.



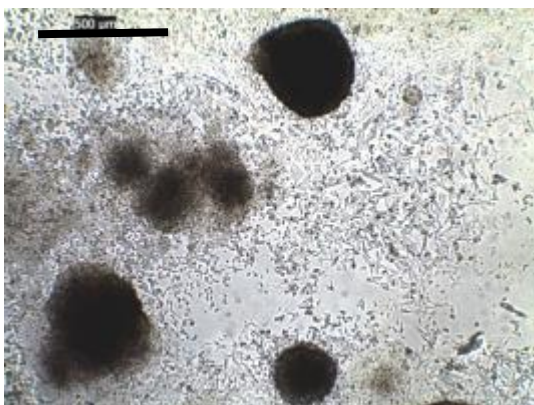
Kuvio 18a. Wt 17, päivä 7
40 x suurennos, valomikroskopia
Jana = 500 μ m



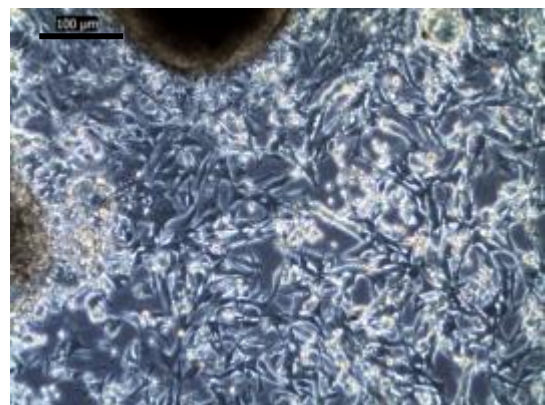
Kuvio 18b. Cross 25, päivä 7
40 x suurennos, valomikroskopia

6.4.2 Erilaistumiskokeet immunofluoresenssivärjäyksellä

Aiemmin magneettikuulien avulla tukisoluista puhdistetut iP-solut erilaistettiin siis embryoid bodyjen kautta. EB:t maljattiin kahdeksantena kasvuspäivänä solumaljoille gelatinoituille peitinlaseille käyttäen ES-kasvatusliuosta. Ilman LIFiä tuottavia SNL-tukisoluja iP-solut alkoivat erilaistua. Yleensä solujen annetaan erilaistua vähintään 10 päivän ajan, seuraten erilaistumista mikroskopoiden. Nyt kloonien annettiin erilaistua, kunnes viljelmät olivat mikroskopoiden arvioituna sopivan tiheitä värjättäviksi (ks. esimerkki kuvissa 19a ja 19b), ja tämä vei eri klooneilta eri ajan taulukon 4 mukaisesti. Koska EB:t olivat jakautuneet peitinlaseille hyvin epätasaisesti, soluryppäät irrotettiin entsymaattisesti trypsiinillä 8.–9. kasvatusvuorokautena, resuspensoitiin ja maljattiin uudelleen gelatinoituille peitinlaseille.



Kuvio 19a. Cross 25
40 x suurennos, valomikroskopia
Jana = 500 μ m



Kuvio 19b. Cross 25, 100 x suurennos,
valomikroskopia, faasikontrasti
Jana = 100 μ m

Taulukko 4. Kloonien erilaistumisajat

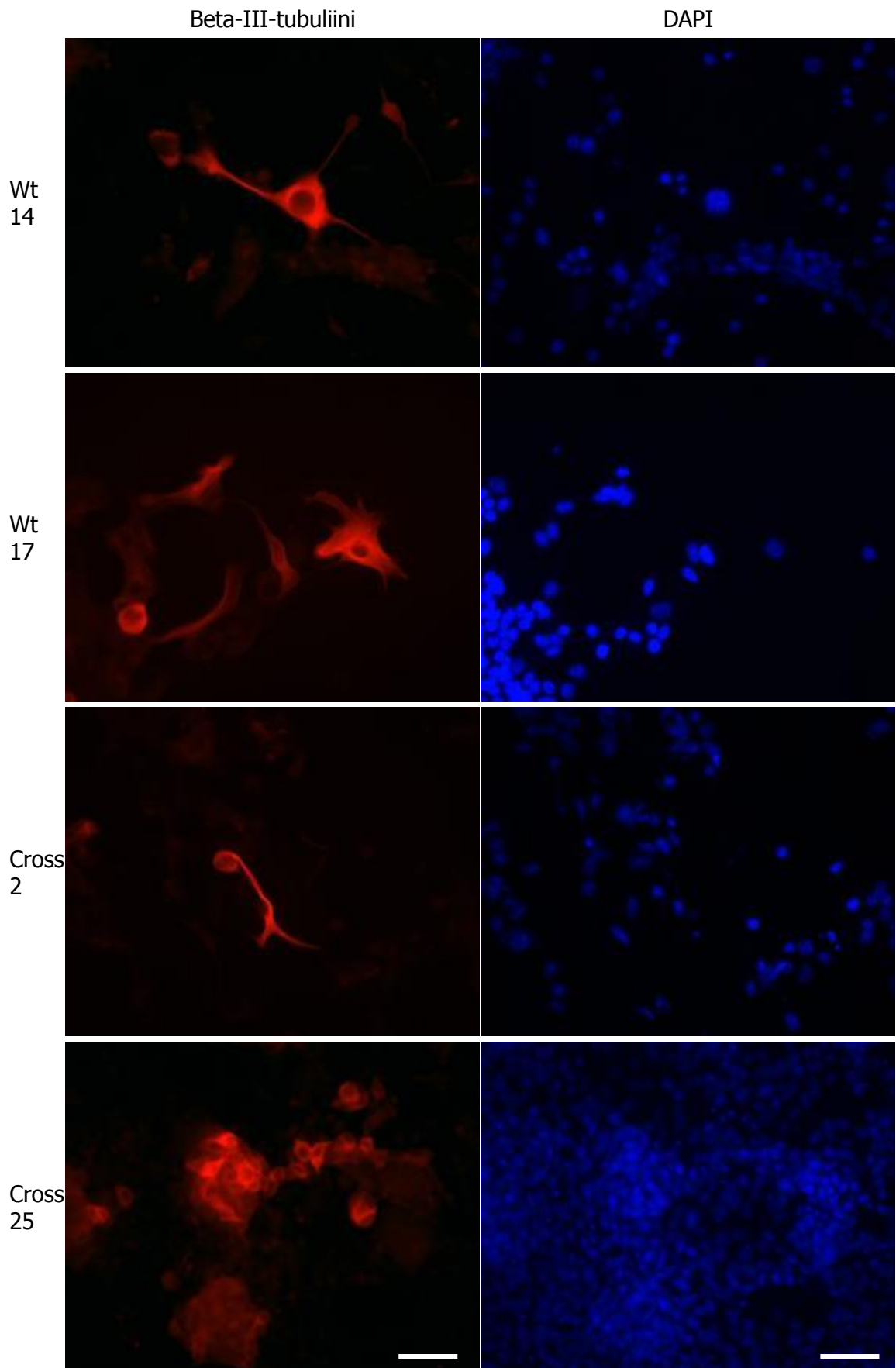
Klooni	Erilaistumisaika, vrk
wt 14 (p 11)	15
wt 17 (p 9)	15
cross 2 (p 8)	16
cross 7 (p 11)	(jäi erilaistumaan 28.9.2011)
cross 25 (p 7)	13

Erilaistuneille, peitinlaseille kasvatetuille ja kiinnitetyille soluille tehtiin tämän jälkeen alkiokerroksia osoittavat immunovärjäykset. Opinnäytetyölle varatussa aikataulussa ehdittiin suorittaa vain neuronispesifinen eli ektodermikerrosta osoittava värjäys, mutta tutkimusryhmä tekee vielä endo- ja mesodermispesifiset värjäykset peitinlaseille kiinnittämilleni soluille.

Primäärivasta-aineena ektodermikerroksen osoituksessa käytettiin kanin beta-III-tubuliinia käyttöläimennöksena 1:1000, ja sekundäärivasta-aineena aasissa kania vastaan (donkey anti-rabbit) tuotettu Texas Red -konjugoitu -vasta-aine käyttöläimennöksena 1:200. Texas Red -väriaine fluoresoi punaisena fluorerenssimikroskopiassa. Värjäys suoritettiin kuten SSEA-1-värjäys (ks. liite 15). Kuten SSEA-1-värjäyksessäkin, läpäisyyntä käytettiin 0,2 % saponiinia, ja vasta-aineiden epäspesifistä tarttumista vähennettiin 0,5 % BSA:lla ("blokkauk"), ja kaikki pesut suoritettiin samalla läpäisy/blokkauksella.

Kustakin näytteestä oli viljelty riittävästi peitinlaseja niin, että voitiin kokeilla erilaisia kiinnitysaineita; peitinlaseista toinen kiinnitettiin objektilasille tavallisella kiinnitysaineella (Thermo Immu-Mount), ja toinen taas DAPI-tumaväriaineen sisältävällä kiinnitysaineella (Vector Vectashield Mounting Media). DAPI kiinnittyy kaksijuosteisen DNA:n A-T-rikkaille alueille ja värjää näin tuman siniseksi.

Kuvion 20 vasemman puolen kuvissa nähdään punaisena fluoresoivia soluja. Nämä ovat erilaistuneita neuroneita, joihin on kiinnittynyt beta-III-tubuliini-vasta-aine, joka puolestaan on visualisoitu siihen kiinnittyneen Texas Red -konjugoidun vasta-aineen perusteella. Siten kaikkien kloonien voidaan todeta erilaistuneen ektodermin soluiksi. Kuvion oikeanpuoleiset kuvat on otettu samasta kohdasta sinisen suodattimen läpi, jolloin kuvassa näkyvät solujen tumat. Cross 7:n hitaasta kasvusta johtuen ektodermivärjäyksen tulosta ei tämän kloonin osalta ehditty saada tämän työn puitteissa.



Kuvio 20 Beta-III-tubuliinivärjäys, 400 x suurennos, fluoresenssimikroskopia
Jana = 50 μ m

6.5 Yhteenveto tuloksista

Työssä selvitettiin, kuinka yksittäiset tutkittavat iPSC-kloonit ilmentävät kantasolumarkkereita ja monikykyisyyttä. Koska aineisto oli pieni, ei sitä analysoitu kvantitatiivisesti, vaan kukin kloni käsiteltiin yksilönä. Liitteisiin 1–5 on kerätty kuvat kaikkien kloonien karakterisoinneista ns. karakterisointipaneeleihin.

Morfologialtaan kantasolumaisia eli tarkkareunaisia, pyöreähköjä kolonioita tuottivat molemmat villityypin kloonit, wt 14 ja wt 17, sekä mutanttikloni cross 7. Cross 25 tuotti sekä tarkkoja, pyöreitä kolonioita että leviämään pyrkiviä kolonioita, ja tällä perusteella kyseessä on sekakloni. Mutanttikloni cross 2 puolestaan oli morfologialtaan kaikkein epäilyttävien, sillä kantasoluille tyypillisesti kasvavat koloniat peittyivät pienen pyöreän solukon alle. Morfologian perusteella hyviksi kantasoluklooneiksi voidaan siis luokitella vain wt 14, wt 17 ja cross 7.

Kantasolujen pintamarkkereista tutkittiin alkalinen fosfataasi (AP) ja stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1). AP-aktiivisuuden osalta kaikkien tutkittujen kloonien voidaan sanoa olevan kantasoluja, joskin osa cross 25 -kloonin soluista oli AP-negatiivisia. SSEA-1 vahvisti cross 25 -kloonin sekakloonimorfologian: osa kolonioiden soluista oli SSEA-1-positiivisia ja osa negatiivisia. Cross 2 -kloonin osalta SSEA-1-tulos oli hämmäntävä, sillä se osoitti myös irtonaisen pienen pyöreän solukon ilmentävän kantasolumarkkeria. Tämä ei kuitenkaan kumoa morfologiatutkimuksen tulosta eikä kantasolumaisesta kasvusta. Villityypin kloonit wt 14 ja wt 17 sekä mutanttikloni cross 7 ilmensivät hyvin SSEA-1-pintamarkkeria.

RT-PCR-tekniikan avulla kantasolujen geenimarkkereita tutkittiin viisi: Esg1, ERas, Fgf4, Nanog ja Zfp42 (Rex1). Molemmat villityypin kloonit eli wt 14 ja wt 17 sekä mutanttiklooneista cross 25 ilmensivät hyvin kaikkia kantasolumarkkerigeenejä. Mutanttikloni cross 2 ilmensi muita markkereita hyvin, mutta ERas-geenin osalta tulos oli hyvin heikko. Tulos saatiin selvemäksi uusimalla elektroforeesi kolminkertaisella PCR-tuotemäärällä. ERas-markkeri oli vielä suurempi ongelma cross 7:n kohdalla, sillä kolminkertaisellakin PCR-tuotemäärällä ilmentyminen oli tuskin havaittava. ERas-tuloksen lisäksi cross 7 ilmensi hyvin heikosti myös Esg1- sekä Nanog-markkerigeenejä. Tällä perusteella mutanttikloni 7:ää ei ilmennä hyväksyttävästi kaikkia kantasolumarkkerigeenejä, ja cross 2:nkin kohdalla tulos on epävarma ERas-geenin osalta.

Monikykyisyyden eli pluripotenttisuuden osalta ehdittiin embryoid bodyjen kautta tehdyn erilaistamisen jälkeen tutkia vain yhden alkiokerroksen eli ektodermin osoitusvärjä-

ys neuronispesifisellä beta-III-tubuliinilla. Molemmat villityypin kloonit, wt 14 ja wt 17, ilmensivät neuronispesifistä antigeeniä hyvin, wt 17 jopa erittäin voimakkaasti. Mutanttikloonit cross 2 ja cross 25 olivat niin ikään tuottaneet beta-III-tubuliinivärjäyksessä positiivisia soluja. Cross 7 -mutanttikloonille ei ehditty saada tulosta monikykyisyydestä tämän työn puitteissa. Myös endodermin ja mesodermin osoitus jäi kaikille klooneille tehtäväksi myöhemmin, joten nyt saatu tulos ei vielä todista täysin solujen monikykyisyyttä eli erilaistumiskykyä kaikkien eri alkiokerrosten soluiksi.

Taulukkoon 5 on tiivistetty kaikkien tutkituille klooneille tehtyjen karakterisointien tulokset. Tulokset on ilmoitettu asteikolla - = ei ilmennä, + = ilmentää heikosti, ++ = ilmentää, +++ ilmentää voimakkaasti.

Taulukko 5. Karakterisoinnin tulokset

iPS-klooni	Morfologia	AP	SSEA-1	Esg1	ERas	Fgf4	Nanog	Zfp42	Beta-III-tubuliini
wt 14	Siistejä, tarkkareunaisia, pyöreähköjä iPS-kolonioita. Voimakas kasvu.	++	++	++	++	++	++	++	++
wt 17	Melko siistejä iPS-kolonioita, tosin kolonioilla taipumusta levitä kulmikkaiksi. Voimakas kasvu.	++	++	++	++	++	++	++	+++
cross 2	Tuntemattomasta syystä pieni pyöreä solukko lähes peittää iPS-koloniat alleen. Melko voimakas kasvu.	++	++	++	(+)	++	++	++	++
cross 7	Selkeitä, pyöreitä ja tarkkareunaisia iPS-kolonioita. Ei saa jakaa voimakkaasti, koska tällöin kasvaa erittäin hitaasti ja niukasti.	++	++	+	(+)	++	+	++	
cross 25	Morfologisesti sekaklooni: pyöreitä teräväreunaisia sekä suuria, levinneitä kolonioita. Laiskahko kasvu.	++	++/-	+++	++	++	++	++	++
wt MEF	-			-	-	-	-	+	
ES				+++	+++	+++	+++	+++	

7 Pohdinta

7.1 Johtopäätökset

Työtä ohjaava kysymys oli, ovatko tutkittavat hiiren iPS-kloonit kaikilta tutkittavilta ominaisuuksiltaan ensinnäkin kantasoluja ja toisekseen monikykyisiä. Tästä on johdettavissa vastaus kysymykseen, mikä tai mitkä ryhmän tuottamista iPS-klooneista soveltuvat jatkotutkimuksen työvälaineiksi. Vastaus saatiin kaikille viidelle karakterisoitavalla iPS-kloonille kantasolumaisuuden osalta.

Sen sijaan kysymys monikykyisyydestä jäi osin jatkotutkimusten varaan, sillä tämän työn puitteissa ehdin suorittaa ainoastaan yhden kolmea alkiokerrosta osoittavasta tutkimuksesta. Kaikki ektodermikerroksen osalta tutkitut kloonit eli wt 14, wt 17, cross 2 ja cross 25 ilmensivät neuronispesifistä markkeria, eli ne olivat erilaistuneet ainakin ektodermikerroksen soluiksi.

Kloonin käyttökelpoisuus on päätettävä kaikkien karakterisoinnissa tehtyjen testien perusteella. Kloonin hyvä kasvu ja morfologia painottuvat kuitenkin arvioitaessa kloonin käyttökelpoisuutta tutkimuksessa.

Tutkituista klooneista villityypin kloonit wt 14 ja wt 17 läpäisivät kaikki kantasoluille ennalta asetetut kriteerit. Molempien kloonien kolonioiden morfologia oli kantasoluille tyypillisesti tarkkarajainen ja pyöreämuotoinen. Villityypin kloonit olivat positiivisia kantasoluspesifisille AP- ja SSEA-1-pintamarkkereille, ja ne ilmensivät hyvin kaikkia tutkituja kantasoluspesifisiä geenimarkkereita. Lisäksi villityypin kloonit saatiin erilaistettua EB-muodostuksen kautta ektodermikerrosta edustaviksi neuroneiksi. Wt 17 vaikutti muodostavan neuroneita hyvinkin runsaasti, joten se soveltunee hyvin erityisesti neuroneita koskevaan jatkotutkimukseen. Molemmat villityypin kloonit kasvoivat lisäksi hyvin ja melko nopeasti, joten niiden soveltuvuus käytännön tutkimuskäyttöön on hyvä.

Cln1/cln5-mutanttiklooneissa oli sen sijaan enemmän hajontaa. Cross 2 ilmensi kyllä hyvin kantasolun tavoin AP-aktiivisuutta sekä SSEA-1-antigeeniä, ja geenitasollakin kantasolun kriteerit täyttyivät, joskin ERas-geenin osalta rimaa hipoen. Lisäksi cross 2 kasvoi hyvin ja sen erilaistuneet solut ilmensivät neuronispesifistä antigeeniä. Sen sijaan kloonin morfologia poikkesi niin paljon hyvän kantasolumorfologian kriteereistä, ettei sitä voi pitää jatkotutkimukseen soveltuvana kloonina. Kloonille tehtiin puhdistus magneettikuulien avulla, mutta koska myös irtonainen pieni pyöreä solukko oli osin

SSEA-1-positiivista, tämä ei auttanut kloonin morfologian siistimisessä. Mahdollinen jatkotoimenpide cross 2 -kloonille voisi olla mekaaninen subkloonaus, jossa maljalta poimitaan pipetinkärjellä yksi siisti iPS-kolonia. Mikäli tämä ei auta, kloonin ei tulla käyttämään jatkotutkimukseen, vaan se hylätään huonon morfologian vuoksi.

Cross 7 oli puolestaan morfologialtaan kaunein mutanttikloni. Se heräsi hyvin hitaasti ja vaati muita suuremman tiheyden maljalla eli sitä ei saanut jakaa voimakkaasti, mutta käyntiin päästyään cross 7 kasvoi hyvin ja muodosti erittäin kauniita iPS-kolonioita ja olisi näin ollut soveltuva jatkotutkimukseen. Jatkonut hidaskasvu olisi vaarantanut kloonin soveltuvuuden tutkimuskäyttöön; juuri hitaan alun takia tämän kloonin monikykyisyyttä ei ehditty tutkia lainkaan. Cross 7 ilmensi kantasolumarkkereita AP ja SSEA-1, mutta kantasolumarkkerigeenien osalta kloni aiheutti pettymyksen: se ei ilmentänyt juuri lainkaan ERas-geeniä, ja Esg1 ja Nanog-geenejäkin vain heikosti.

Jotta cross 7 -kloonin voisi harkita jatkokäyttöön, on markkerigeenien PCR-tutkimus uusittava uudesta solupelletistä eristetystä RNA:sta tehdyllä cDNA-templaattilla. Uusinnassa on varmistettava, että templaattiin saadaan enemmän iPS-soluja kuin tukisoluja, jotta tukisoluista eristetty RNA ei peitä alleen iPS-solujen ilmentymistä. Tämä voidaan varmistaa joko kasvattamalla malja hyvin täyteen iPS-soluja tai eristämällä RNA SSEA-1-selektiivisillä magneettikuulilla puhdistetuista soluista, jolloin tukisolujen vaikutus saadaan poistettua kokonaan.

Cross 25 oli morfologialtaan sekakloonin näköinen, ja AP- sekä SSEA-1-värjäykset vahvistivat havainnon. Edes kloonin magneettikuulapuhdistus ei riittänyt eliminoimaan SSEA-1-negatiivisia soluja kolonioista. Kloni kasvoi laiskanpuoleisesti, mutta maltillisesti jaettuna se pysyi muiden viljelmien tahdissa. Kloni myös muodosti beta-III-tubuliinivärjäyksessä neuronispesifisiä antigeenejä ilmentäviä soluja. Kloonin kantasolumaiset osat riittivät ilmentämään geenimarkkereita hyvin PCR:ssä; Esg1-geenin osalta tämä kloni antoi vieläpä voimakkaimman tuloksen. Näistä vahvuuksista huolimatta cross 25 -kloonin ei voi suositella jatkotutkimukseen, sillä kloni ei ole homogeeninen.

Kuten cross 25 -sekakloonin PCR-tulos osoitti, PCR:ssä pienikin templaattimäärä voi monistua niin, että testi antaa positiivisen tuloksen. Koska PCR on niin herkkä, se saattaa siis antaa hyvän signaalin, vaikka todellisuudessa kloni ilmentäisikin markkeria huonosti. SSEA-1- ja AP-värjäykset kertovat tästä syystä paremmin, kuinka homogeeninen kloni on; sekakloonitapauksissa nämä osoittavat kolonian epätasaisen värjäyty-

misen. Toisaalta PCR voi herkkyytensä takia toimia myös päinvastoin: jos tukisoluja on paljon iPS-soluihin verrattuna, ne voivat peittää iPS-solujen ilmentymisen, koska eriste-tyssä RNA-näytteessä on suuri osa tukisolujen RNA:ta. Tämä riski halutaankin sulkea pois cross 7:n kohdalla, sillä kloni oli erittäin siisti morfologisesti sekä AP- ja SSEA-1-kantasolumarkkereiden osalta. Siksi PCR-testit on uusittava tämän kloonin kohdalla.

Tässä työssä sekä AP- että SSEA-1-värjäys antoivat samansuuntaiset tulokset, vaikka AP-värjäys ei ryhmän aiempien kokemusten mukaan ole aina ollut hyvä kantasolu-markkeri hiiren soluja karakterisoitaessa. Värjäystulos ei ollut aivan yhtä havainnollinen ja selvä AP-värjäyksellä, mutta cross 25 -kloonin kohdalla voidaan havaita selvästi AP-positiivisia ja negatiivisia alueita iPS-kolonioissa.

7.2 Luotettavuus

Solutöissä erityisesti soluja jaettaessa vaarana on solulinjojen sekoittuminen inhimillisen virheen tai kontaminaation vuoksi. Tämän vuoksi selvät merkinnät soluviljelymaljoissa sekä hyvät työkäytännöt ja huolellisuus korostuvat. Laminaarikaapissa on syytä pitää vain helposti hallittavaa määrää klooneja kerrallaan. Eri solutyyppejä käsiteltäessä käytetään kullekin omia viljelyliuoksiaan, mutta kaikilla iPS-soluilla käytettiin luonnollisesti samaa viljelyliuosta, jolloin kontaminaatoriski viljelyliuosten kautta on teoreettinen olemassa. Pipetinkärkiä vaihdetaan kuitenkin aina jo aseptisten työskentelyn takia, mikä minimoi tätä riskiä. Se, että soluviljelmistä ei kertaakaan löydetty bakteerikontaminaatiota, on merkki aseptisen työskentelyn onnistumisesta.

Kun viljeltyjä soluja siirretään peitinlaseilla viljelymaljalta kiinnitettäväksi sekä edelleen värjättäväksi ja objektilaseille, on merkintöjen oltava aina yksiselitteisiä. Kloonien vaihtuminen päittäin inhimillisen virheen kautta on tällaisissa työvaiheissa kuitenkin aina mahdollista. Klooneja on seurattu mikroskopoiden joka päivä, joten morfologian muuttuminen tutkimusten aikana herättäisi epäilyksiä. Pieniä morfologiaan perustuvia epäilyksiä onkin magneettipuhdistuksen jälkeisen SSEA-1-värjäyksen tuloksesta wt 14 ja wt 17 välillä. Molemmat tulokset olivat positiivisia, ja mahdollinen vaihtuminen oli tapahtunut kahden villityypin eikä villityypin ja mutantin välillä, mikä olisi voinut vaarantaa ryhmän jatkotutkimusten luotettavuuden vertailtaessa villityypin- ja mutanttikloonien ominaisuuksia. Lisäksi varsinaiset tulokset on joka tapauksessa saatu magneettipuhdistusta edeltävästä SSEA-1-värjäyksestä.

Ryhmä tekee immunofluoresenssivärjäyksiä rutiininomaisesti, eikä värjäyksissä käytetä kontrolleja muuten kuin menetelmän toiminnan varmistamiseksi poikkeuksellisten tu-

losten yhteydessä. Kontrollien puuttuessa värjäystulosten luotettavuutta parantaa cross 25 -kloonin, jonka morfologinen sekakloonimaisuus tukee värjäystuloksien osittaisuutta. Immunofluoresenssivärjäysten osalta ongelmana tässä työssä on, että pintamarkkeri on SSEA-1-värjäyksessä värjäytynyt niin voimakkaasti, ettei kolonioiden yksittäisiä solurakenteita saatu esiin tavallisella fluoresenssimikroskoopilla. Tällöin on riski, että cross 25:n lisäksi on ollut muitakin osittaisia sekaklooneja, jotka ovat vain jääneet piiloon kolonian pinnan fluoresenssin alle. Toisaalta hyvissäkin klooneissa saattaa olla jonkin verran epätasaista värjäytymistä.

Mutanttikloonin cross 7:n hitaan heräämisen takia tämän kloonin kohdalla riskinä on valikoituminen. Koska ehkä vain osa alkuperäisen populaation soluista heräsi pakastamisen jälkeen, käyntiin lähtevä solupopulaatio ei välttämättä edusta täysin alkuperäistä kloonin. Tätä asiaa ei jälkikäteen voida kuitenkaan jälkikäteen selvittää, sillä työssä herätetty soluampulli oli ainoa tästä kloonista pakastettu ampulli.

Elektroforeesin erottuvuus jäi hieman heikoksi käytettäessä 1 % agarosigeeliä. Työssä käytettiin ryhmän aiemmin käyttämän keskipitkän kokostandardin loputtua lyhyille monistustuotteille tarkoitettua kokostandardia, joka olisi paremmin erottuakseen vaatinut korkeamman (2,5–3 %) agarosipitoisuuden. Kokostandardin tarkkuus riitti kuitenkin ilmaisemaan monistustuotteen pituuden tämän työn tarkoituksiin. Lisäksi kloonien ilmentämä vyöhyke on samankokoinen kuin ES-kontrollin vyöhyke.

RNA-saanto jäi työssä heikoksi, ja tästä aiheutui päänvaivaa RT-PCR-työhön. Saanto oli kuitenkin tasaisen matala kaikilla klooneilla, joten cross 7 -kloonin PCR-tuloksen heikkouden ei tällä perusteella voi olettaa johtuvan pelkästä saannosta. Uusittaessa cross 7:n geenimarkkeritutkimusta olisi kuitenkin varmasti syytä käyttää reagenssipakettia, jolla eristettäessä RNA-saannot ovat olleet korkeampia. Nyt käytettyjen Bio-Radin pylväiden kapasiteetiksi oli ilmoitettu 2×10^6 viljeltyä nisäkässolua, ja tämän määrän ylittäminen voi johtaa pylvään tukkeutumiseen ja RNA:n epäpuhtauteen. RNA:n puhtausaste oli 1,95 eli hyvin puhdasta, eikä pylvään pinnalla näkynyt nestettä, mikä viittaisi tukkeutumiseen. Tätä työtä varten ei erikseen mitattu pellettiin otettavaa solumäärää, mutta cross 7:n tapauksessa pelletti oli tehty $\frac{1}{2}$ 6-kuoppalevyn kuopasta eli 1,25 ml:sta solususpensiota. Magneettikuulapuhdistusta varten laskettaessa, jolloin viljelymalja oli kasvatettu hyvin täyteen, solukonsentraatio oli $3,59 \times 10^6$ solua/ml. Tämän perusteella lasketun karkean arvion mukaan pylvään kapasiteetti on todennäköisesti jonkin verran ylitetty. Reagenssivalmistajan mukaan pylväällä tulisi saada viljelystä soluista 20–40 µg:n RNA-saanto. Nyt RNA:n konsentraatio oli 42,82 ng/µl ja elu-

ointi tapahtui 80 μ l:aan, joten saanto oli vain 3,4 μ g eli merkittävästi odotettua pienempi. Ryhmän aikaisempienkin havaintojen mukaan hieman kalliimpi Qiagenin reagenssipaketti on antanut huomattavasti edullisempaa Bio-Radin pakettia korkeampia saantoja. Siten tämän työn perusteella en voi suositella Bio-Radin reagenssipakettia tuleviin karakterisointeihin.

On mahdollista, että PCR-ohjelman lämpötiloja ja syklimääriä säätämällä olisi herkkyyttä voitu lisätä erityisesti ERas-alukkeiden osalta. Nyt tulos jäi todella heikoksi cross 7 -kloonin lisäksi myös cross 2 -kloonin osalta. Aikataulu ei kuitenkaan riittänyt PCR-ohjelman optimointiin opinnäytetyön puitteissa.

Selvää on, että monikykyisyydestä ei voida pelkästään tämän työn perusteella antaa varmaa tulosta. Erilaistuminen tutkittiin vasta ektodermin osalta, mutta endo- ja mesodermin osalta tässä tutkimuksessa ei ehditty saada tuloksia. Tutkimusryhmä tekee puuttuvat monikykyisyyden osoitukset wt 14 - ja wt 17 -klooneille ennen niiden käyttöönottoa. Samoin kokeet tehdään cross 7 -kloonille, mikäli se läpäisee uusitun PCR-kokeen.

7.3 Muita huomioita

iPS-soluja ei vielä ymmärretä riittävän hyvin, jotta esimerkiksi cross 2 -kloonissa ilmeneen pienen irtonaisen solukon merkitystä osattaisiin arvioida. Myös muilla tutkimusryhmillä on ajoittain ilmennyt vastaavaa poikkeavaa morfologiaa. Sen voidaan arvella johtuvan esimerkiksi epätäydellisestä induktiosta, jolloin kaikki tekijät eivät olisi siirtyneet kloonin kunnolla, ja tämä vaikuttaisi kolonioiden puutteellisen oloiseen koheesioon. Koheesion puute voi mahdollisesti kieliä myös esimerkiksi syöpäkantasolumaisuudesta. Jatkotutkimusta tarvitaan ilmiön ymmärtämiseksi paremmin. (Kyttälä 2011.)

Toinen asia, josta olisi kiinnostavaa saada lisätietoa, on solujen hakeutuminen mieluummin muoville kuin lasille, vaikka molemmat materiaalit olisi gelatinoitu. Tämä ilmiö toistui aina kasvatettaessa soluja maljalla, jolla oli myös peitinlaseja. Soluja olisi tarvittu nimenomaan peitinlaseille värjäyksiä varten, mutta solut tuntuivat välttelevän kasvua peitinlaseilla ja hakeutuvan lasien väleihin maljan muoviselle pohjalle. Tämä ongelma voidaan kiertää kiinnittämällä ja värjäämällä solut suoraan solumaljalla. Tällöin analyysiin on käytettävä käänteismikroskooppia, jota tässä työssä ei ollut käytettävissä.

Tuotettaessa MEF-soluja (alkuperäiset solut, jotka uudelleenohjelmoitiin kantasoluiksi) PCR-työn negatiiviseksi kontrolliksi vasta neljäs MEF-kanta saatiin kasvamaan pakaste-

tusta ampullista. Kuten todettu, fibroblastisolut kestävät huonosti voimakasta jakamista, mutta kaikki ampullit herätettiin ennen pakastusta kasvatusta vastaavaan tilavuuteen, eikä ongelmaa siis pitäisi olla. Tämä korosti pakastamisohjeen huolellisen noudattamisen tärkeyttä; jos herätettävänä olisi ollut ainutlaatuinen iPS-klooni, olisi se todennäköisesti menetetty. On mahdollista, ettei soluja ollut pakastettu hyvässä kasvun vaiheessa eli mieluiten seuraavana päivänä jakamisesta, kun solut peittävät noin 50–80 % käytettävissä olevasta pinta-alasta.

Työssä kokeiltiin myös uutta AP-värjäysreagenssia ja -protokollaa suunnitellun reagenssin menetettyä tehonsa. Värjäyksen havainnollisuus uudella sinivioletin värjäystuloksen antavalla NBT/BCIP-reagenssilla oli heikompi kuin aikaisemmalla immunoentsyymaattisella menetelmällä, joka antoi AP-aktiivisille soluille kirkkaanpunaisen värjäystuloksen. Uuden reagenssin säilyvyys on hyvä, mikä tekee siitä taloudellisemmän tutkimusryhmässä, jossa AP-reagenssia tarvitaan harvakseltaan. Tämän työn perusteella menetelmä tuntui toimivalta AP-aktiivisuuden osoittamisessa. Olin kuitenkin ryhmän kanssa yhtä mieltä siitä, että aiemmin käytössä ollut punaisen reaktion tuottava AP-värjäys olisi tulkinnan ja havainnollisuuden kannalta parempi.

7.4 Opinnäytetyöprosessi

Työ oli motivoiva opinnäytteenä, koska toimeksiantajana toimivalla tutkimusryhmällä oli työlle selvä tarve. Karakterisoinnit on suoritettava kaikille tuotetuille iPS-klooneille, ennen kuin niitä voidaan hyödyntää tutkimuskäytössä. Tutkimusryhmä myös tarvitsi lisää karakterisoituja klooneja omia jatkotutkimuksiaan varten, voidakseen osoittaa toistettavasti eroja villityypin ja uuden cln1/cln5-mutanttihiirikannan iPS-kloonien välillä. Tässä työssä tuotettuja morfologiakuvia voidaan käyttää ryhmän tulevissa julkaisuissa.

Opinnäytetyöprosessin tiedettiin alusta alkaen olevan aikataulultaan haasteellinen. Solutöissä yllätyksiä aiheuttaa usein solukloonien yksilöllinen kasvuvauhti. Tässäkin tapauksessa cross 7 aiheutti alussa haasteita, ja tämän vuoksi karakterisoitavaksi otettiin vielä yksi uusi mutanttiklooni, cross 25. En kuitenkaan halunnut luopua toivosta cross 7:n kanssa, koska se oli morfologisesti niin lupaava. Tämän takia alun perin suunniteltu laajuus eli kahden villityypin kloonin ja kahden mutanttikloonin karakterisointi kasvoi kahteen villityypin kloonin ja kolmeen mutanttikloonin. Kävimme läpi tulokset ja seuraavan viikon työt viikoittain ohjaajani kanssa, ja vaikka alussa olimme jopa hieman edellä suunnitellusta aikataulusta, tilanne muuttui kun eri kloonit kasvoivat eritahtisesti.

Aikataulu oli kuitenkin suunniteltu joustavaksi siten, että jätimme jakson loppupuolelle kaavailun PCR-olosuhteiden optimoinnin kokonaan pois työstä.

Huolimatta tästä aikataulujoustosta monikykyisyyden osoituskokeet jäivät osin kesken. Tähän tosin vaikutti osaltaan myös se, että tilanne oli hieman auki endodermin ja mesodermin osoitusvärjäyksissä käytettävien vasta-aineiden osalta. Vaikka osa monikykyisyyden osoituksista jäi kesken, on näidenkin osalta aikaavievimmät työvaiheet jo suoritettu, ja myöhemmin suoritettavaksi jäi ainoastaan valmiiden peitinlasien värjääminen ja mikroskopointi.

Tämä opinnäytetyö tarjosi näköalapaikan ajankohtaiseen tutkimukseen ja tutkimuslaboratorion toimintaan sekä mahdollisuuden perehtyä monipuolisesti karakterisoinnissa käytettäviin menetelmiin. Erityisesti haluan kiittää työni ohjaajaa dosentti Aija Kyttälää sekä tutkimuslaborantti Seija Puomilahtea heidän korvaamattomasta panoksestaan tämän työn syntymiselle.

Lähteet

- Aalto-Setälä, Katriina – Silvennoinen, Olli – Otonkoski, Timo 2008. Ihmisen erilaistuneiden solujen uudelleenohjelmointi kantasoluiksi. *Duodecim* 124. 215-216.
- Amenduni, M. – De Filippis, R. – Cheung, A.Y. – Disciglio, V. – Epistolato, M.C. – Ariani, F. – Mari, F. – Mencarelli, M.A. – Hayek, Y. – Renieri, A. – Ellis, J. – Meloni, I. 2011. iPS cells to model CDKL5-related disorders. *European Journal of Human Genetics*. Advance online publication 2011 Jul 13.
- Boenisch, Thomas (toim.) 2001. *Immunochemical staining methods*. 3rd edition. Carpinteria: DakoCytomation.
- Cartwright, T. – Shah, G.P. 2003. *Culture Media*. Teoksessa Davis J.M. (toim.): *Basic Cell Culture: a practical approach*. 2nd edition (with corrections). New York: Oxford University Press. 69–106.
- Cell Biolabs 2009. *SNL Feeder Cells*. Product Data Sheet. Cell Biolabs Inc. San Diego. Verkkolähde. < <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/CBA-316-snl-feeder-cells.pdf> > Luettu 1.9.2011.
- Cell Signaling Technology 2011. *SSEA1 (MC480) Mouse mAb #4744*. Verkkolähde. <<http://www.cellsignal.com/products/4744.html>> Luettu 3.6.2011.
- Cho, H.J. – Lee, C.S. – Kwon, Y.W. – Paek, J.S. – Lee, S.H. – Hur, J. – Lee, E.J. – Roh, T.Y. – Chu, I.S. – Leem, S.H. – Kim, Y. – Kang, H.J. – Park, Y.B. – Kim, H.S. 2010. Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood* 116. 386-395.
- Dobbie, Ian – Zicha, Daniel 2003. *Microscopy of Living Cells*. Teoksessa Davis J.M. (toim.): *Basic Cell Culture: a practical approach*. 2nd edition (with corrections). New York: Oxford University Press. 107-133.
- Freshney, R. Ian 2005. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 5th ed. Hoboken, N.J: Wiley-Liss.
- Glick, Bernard R. – Pasternak, Jack J. – Patten, Cheryl L. 2010. *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. 4th ed. Washington, DC: ASM Press.
- Hamilton, B. – Feng, Q. – Ye, M. – Welstead, G.G. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells by reprogramming mouse embryonic fibroblasts with a four transcription factor, doxycycline inducible lentiviral transduction system. *Journal of Visualized Experiments*. 33. 1447.
- Hovatta, Outi 2011. *Kantasolujen biologia*. Esitys Laboratoriolääketiedepäivillä 6.10.2011.
- Jalanko, Anu – Braulke T. 2009. Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochim Biophys Acta*. 1793 (4). 697-709.
- Kawagoe, S. – Higuchi, T. – Meng, X.L. – Shimada, Y. – Shimizu, H. – Hirayama, R. – Fukuda, T. – Chang, H. – Nakahata, T. – Fukada, S. – Ida, H. – Kobayashi, H. – Ohashi, T. – Eto, Y. 2011. Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from a murine model of Pompe disease and differentiation of Pompe-iPS

cells into skeletal muscle cells. *Molecular Genetics and Metabolism*. 104 (1-2). 123-128.

Kyttälä, Aija 2011. Dosentti. Suullinen tiedonanto. Helsinki. 2.5.–3.10.2011.

Loh, Y.H. – Hartung, O. – Li, H. – Guo, C. – Sahalie, J.M. – Manos, P.D. – Urbach, A. – Heffner, G.C. – Grskovic, M. – Vigneault, F. – Lensch, M.W. – Park, I.H. – Agarwal, S. – Church, G.M. – Collins, J.J. – Irion, S. – Daley, G.Q. 2010. Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell* 7. 15-19.

Lyly, Anniina 2008. *Molecular Interactions Underlying Neuronal Ceroid Lipofuscinoses CLN1 and CLN5*. Publications of the National Public Health Institute A 17/2008. Helsinki: Yliopistopaino.

Lyly, Annina 2009. Solu- ja eläinmallit. Terveystieteiden tutkimuskeskus. Verkkodokumentti. Päivitetty 7.1.2009.
<http://www.ktl.fi/portal/suomi/osastot/mlo/tutkimus/solu-ja_elainmallit/> Luettu 10.2.2011.

Maherali, N. – Sriharan, R. – Xie, W. – et al 2007. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1. 55-70.

Martinez-Fernandez, Almudena – Nelson, Timothy J. – Yamada, Satsuki – Reyes, Santiago – Alekseev, Alexey E. – Perez-Terzic, Carmen – Ikeda, Yasuhiro – Terzic, Andre 2009. iPS Programmed Without c-MYC Yield Proficient Cardiogenesis for Functional Heart Chimerism. *Circulation Research* 105. 648–656.

Miltenyi Biotec 2008. MiniMACS starting kit. Data sheet. Verkkodokumentti.
<http://www.miltenyibiotec.com/download/datasheets_en/120/DS130_090_312.pdf> Luettu 18.10.2011.

Miltenyi Biotec 2011. MACS® Cell Separation—the principle. Verkkodokumentti
<http://www.miltenyibiotec.com/en/NN_736_MACS_Cell_Separation_the_principle_1.aspx#1> Luettu 24.9.2011.

Okada, M. – Oka, M. – Yoneda, Y. 2010. Effective culture conditions for the induction of pluripotent stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1800. 956-963.

Okita, K. – Ichisaka, T. – Yamanaka, S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448. 313-317.

Pease, S. – Braghetta, P. – Gearing, D. – Grail, D. – Williams, R.L. 1990. Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Developmental Biology*. 141 (2). 344-352.

Rhee, Y.H. – Ko, J.Y. – Chang, M.Y. – Yi, S.H. – Kim, D. – Kim, C.H. – Shim, J.W. – Jo, A.Y. – Kim, B.W. – Lee, H. – Lee, S.H. – Suh, W. – Park, C.H. – Koh, H.C. – Lee, Y.S. – Lanza, R. – Kim, K.S. – Lee, S.H. 2011. Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 121 (6). 2326-2335.

Roche 2005. NBT/BCIP Stock Solution Cat No. 11 681 451 001. Pakkauseloste. Version Sept. 2005.

Savukoski, M. – Klockars, T. – Holmberg, V. – Santavuori, P. – Lander, E.S. – Peltonen,

- L. 1998. CLN5, a novel gene encoding a putative transmembrane protein mutated in Finnish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nature Genetics*. 19 (3). 286-288.
- Scheper, Wouter – Copray, Sief 2009. The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. *Stem Cell Reviews and Reports* 5. 204–223.
- Seki, T. – Yuasa, S. – Oda, M. – Egashira, T. – Yae, K. – Kusumoto, D. – Nakata, H. – Tohyama, S. – Hashimoto, H. – Kodaira, M. – Okada, Y. – Seimiya, H. – Fusaki, N. – Hasegawa, M. – Fukuda, K. 2010. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7. 11–14.
- Solter, Davon – Knowles, Barbara 1978. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (11). 5565-5569.
- Solunetti 2006. Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus. Verkkodokumentti. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_eristys_ja_puhdistus/2/> Luettu 1.10.2011.
- Staerk, J. – Dawlaty, M.M. – Gao, Q. – Maetzel, D. – Hanna, J. – Sommer, C.A. – Mostoslavsky, G. – Jaenisch, R. 2010. Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7. 20-24.
- Stemgent 2009. Stemgent™ Mouse ES/iPS Cell Characterization Set. Product Specification Sheet. Stemgent. San Diego.
- Strachan, Tom – Read, Andrew 2011. *Human Molecular Genetics*. 4th edition. New York: Garland Science.
- Suominen, Ilari – Pärssinen, Raimo – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani 2010. *Geeniteknikka*. Turun Ammattikorkeakoulun oppimateriaaleja 52. Turku.
- Takahashi, Kazutoshi – Yamanaka, Shinya 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126. 663–676.
- Takahashi, K. – Tanabe, K. – Ohnuki, M. – Narita, M. – Ichisaka, T. – Tomoda, K. – Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131. 861–872.
- Tsai, S.Y. – Bouwman, B.A. – Ang, Y.S. – Kim, S.J. – Lee, D.F. – Lemischka, I.R. – Rendl, M. 2011. Single transcription factor reprogramming of hair follicle dermal papilla cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 29 (6). 964-971.
- Vesa, J. – Hellsten, E. – Verkruyse, L.A. – Camp, L.A. – Rapola, J. – Santavuori, P. – Hofmann, S.L. – Peltonen, L. 1995. Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nature*. 376 (6541). 584-587.
- Werning, M. – Meissner, A. – Foreman, R. – et al 2007. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448. 318–324.
- 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

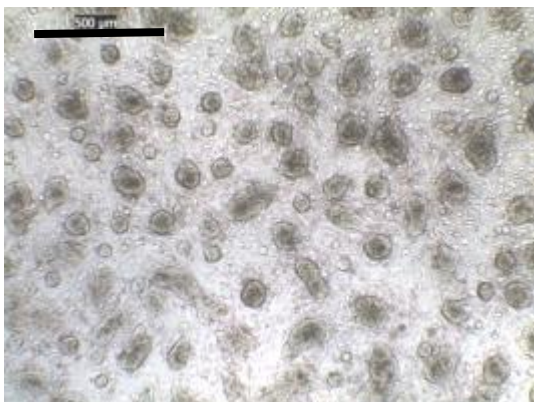
somatic cells. *Science*. 318 (5858). 1917-1920.

Zhao, T. – Zhang, Z.N. – Rong, Z – Xu, Y 2011. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 474 (7350). 212-215.

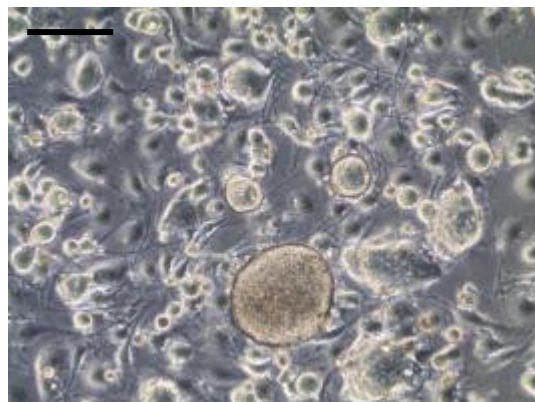
Zhou, H. – Wu, S. – Joo, J.Y. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4. 381–384.

Zhou, Wenbo – Freed, Curt R. 2009. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27. 2667–2674.

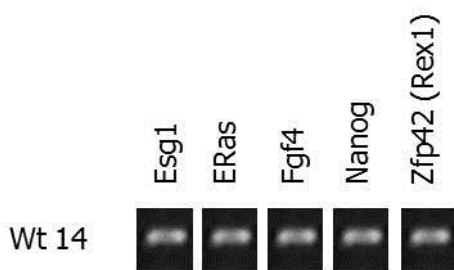
Karakterisointipaneeli wt 14



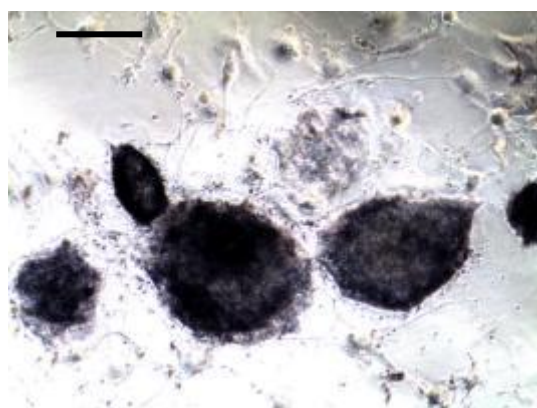
40 x suurennos, valomikroskopia.
Jana = 500 μm



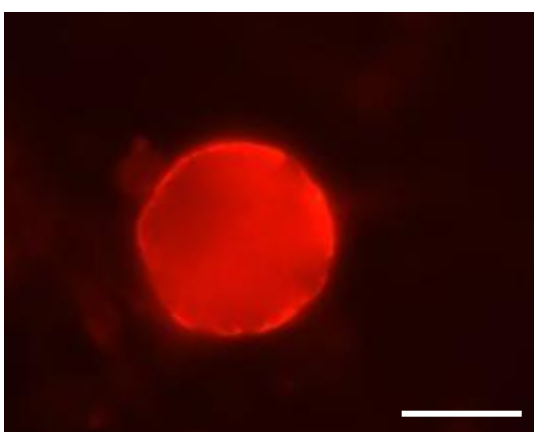
100 x suurennos, valomikroskopia,
faasikontrasti. Jana= 100 μm



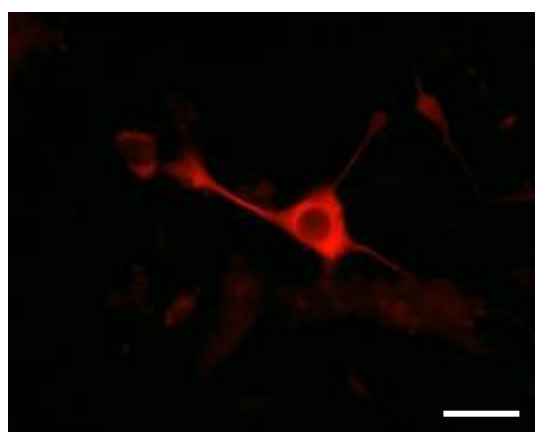
PCR-tulos spesifisillä alukkeilla



AP-värjäys, 100 x suurennos, valomikroskopia
faasikontrasti. Jana= 100 μm

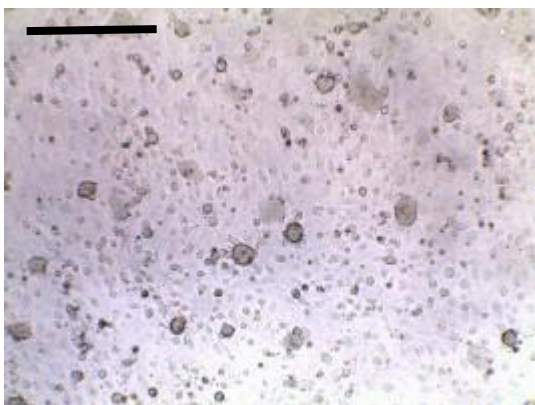


SSEA-1-värjäys, 630 x suurennos,
fluoresenssimikroskopia
Jana = 50 μm

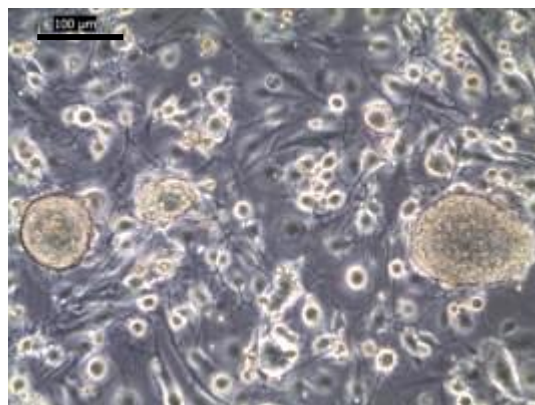


Beta-III-tubuliinivärjäys, 400 x suurennos,
fluoresenssimikroskopia
Jana = 50 μm

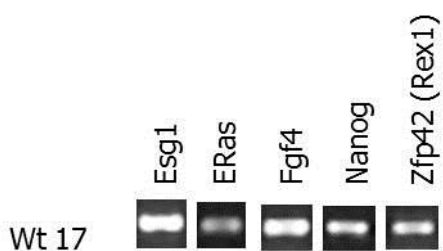
Karakterisointipaneeli wt 17



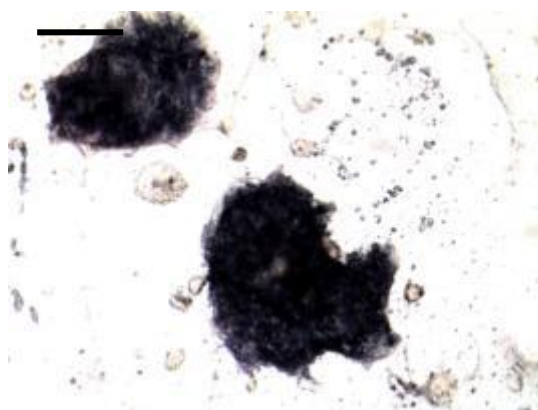
40 x suurennos, valomikroskopia.
Jana = 500 μ m



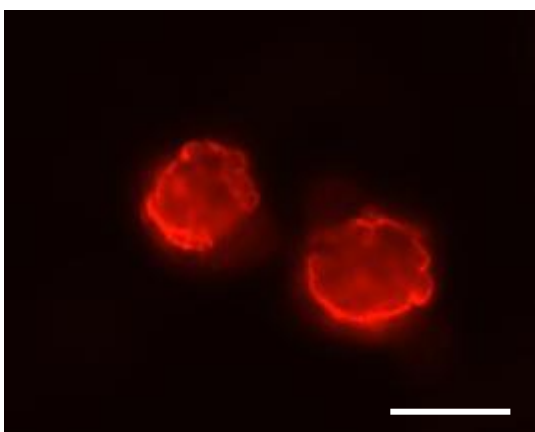
100 x suurennos, valomikroskopia,
faasikontrasti. Jana = 100 μ m



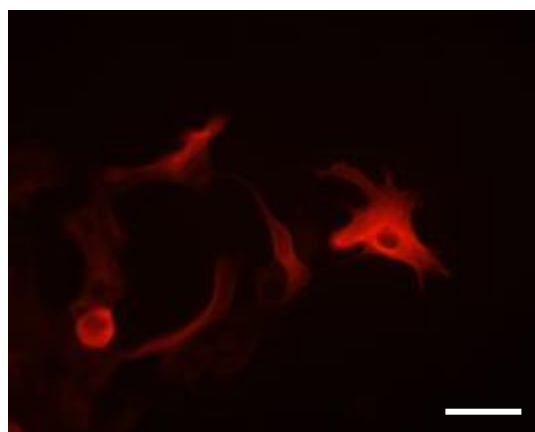
PCR-tulos spesifisillä alukkeilla



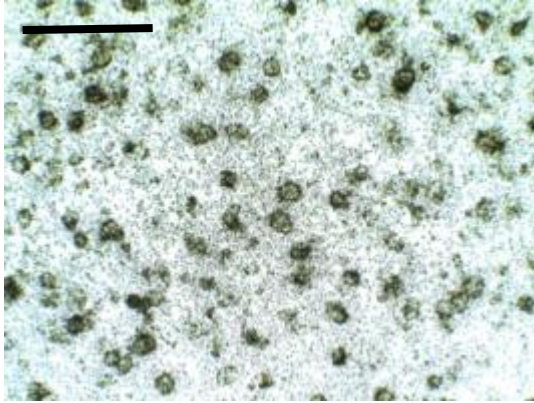
AP-värjäys, 100 x suurennos, valomikroskopia
faasikontrasti. Jana = 100 μ m



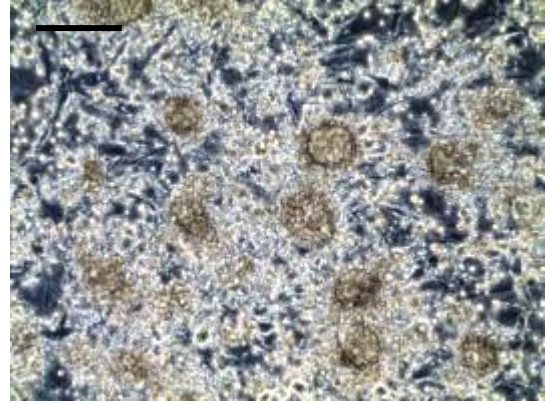
SSEA-1-värjäys, 630 x suurennos,
fluoresenssimikroskopia
Jana = 50 μ m



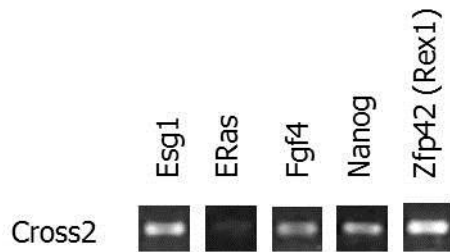
Beta-III-tubuliinivärjäys, 400 x suurennos,
fluoresenssimikroskopia
Jana = 50 μ m

Karakterisointipaneeli cross 2

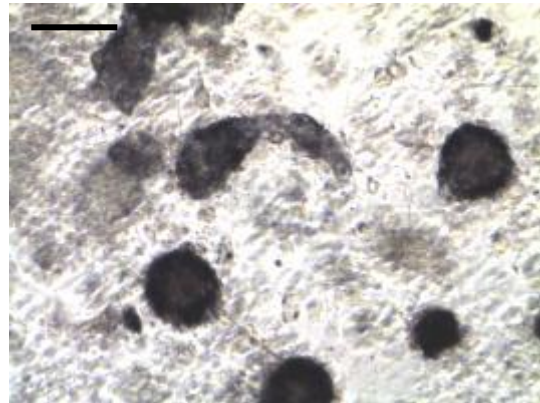
40 x suurennos, valomikroskopia
Jana = 500 µm



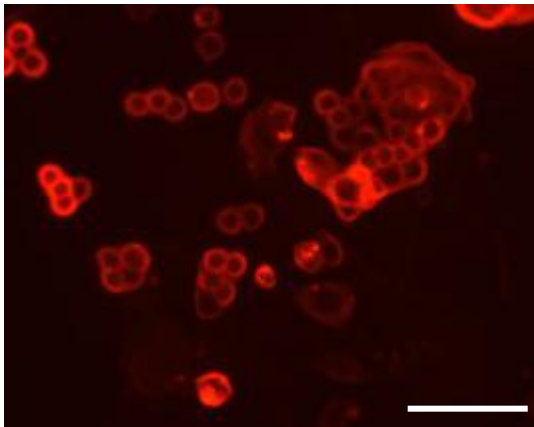
100 x suurennos, valomikroskopia,
faasikontrasti. Jana = 100 µm



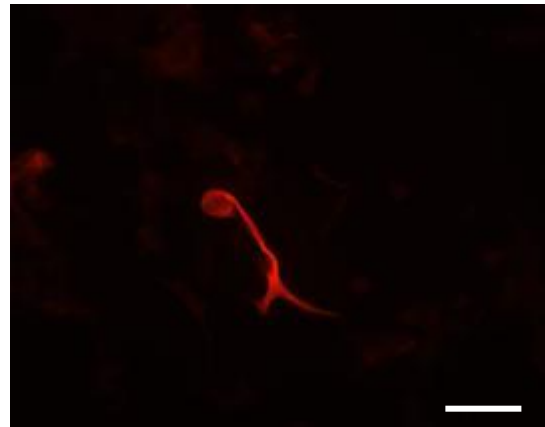
PCR-tulos spesifisillä alukkeilla



AP-värjäys, 100 x suurennos, valomikroskopia
faasikontrasti. Jana = 100 µm

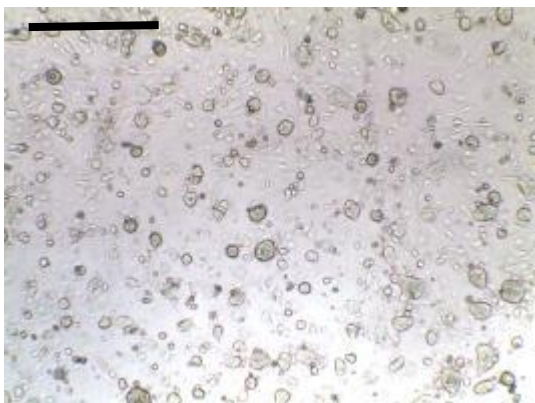


SSEA-1-värjäys, 630 x suurennos,
fluoresenssimikroskopia
Jana = 50 µm

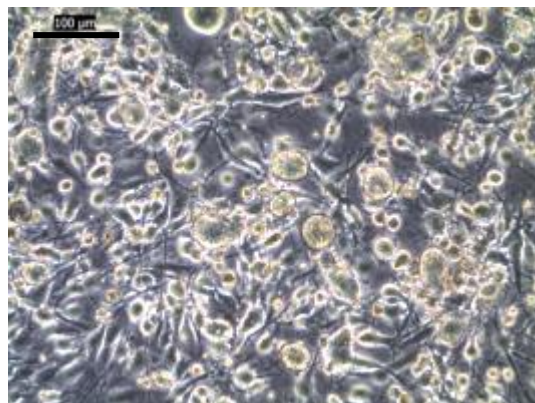


Beta-III-tubuliinivärjäys, 400 x suurennos,
fluoresenssimikroskopia
Jana = 50 µm

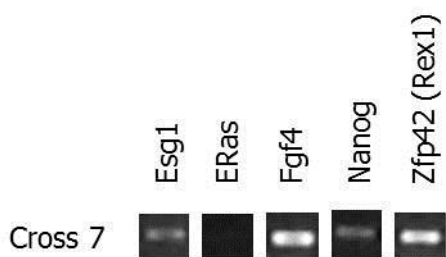
Karakterisointipaneeli cross 7



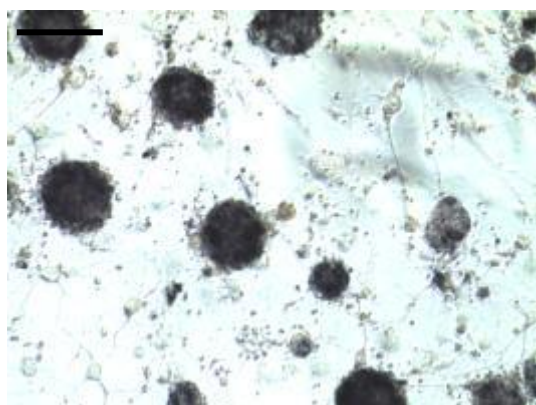
40 x suurennos, valomikroskopia
Jana = 500 µm



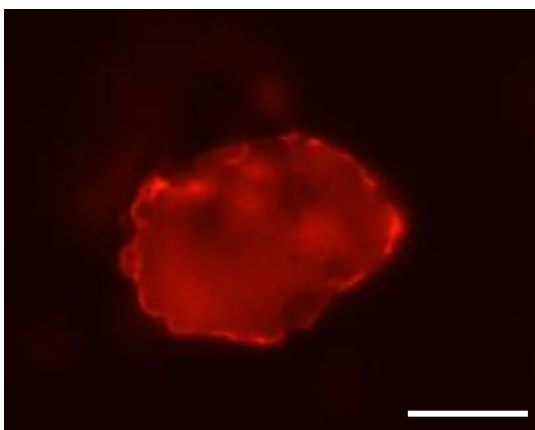
100 x suurennos, valomikroskopia,
faasikontrasti. Jana = 100 µm



PCR-tulos spesifisillä alukkeilla

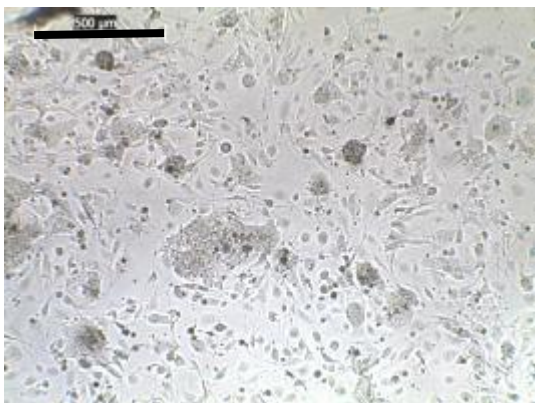


AP-värjäys, 100 x suurennos, valomikroskopia,
faasikontrasti. Jana = 100 µm

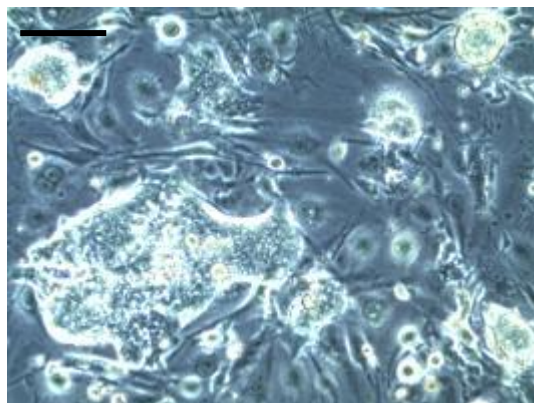


SSEA-1-värjäys, 630 x suurennos,
fluoresenssimikroskopia
Jana = 50 µm

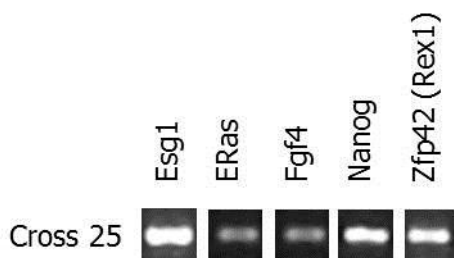
Karakterisointipaneeli cross 25



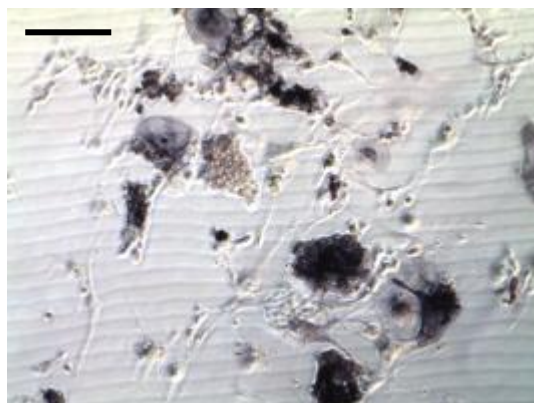
40 x suurennos, valomikroskopia
Jana = 500 μm



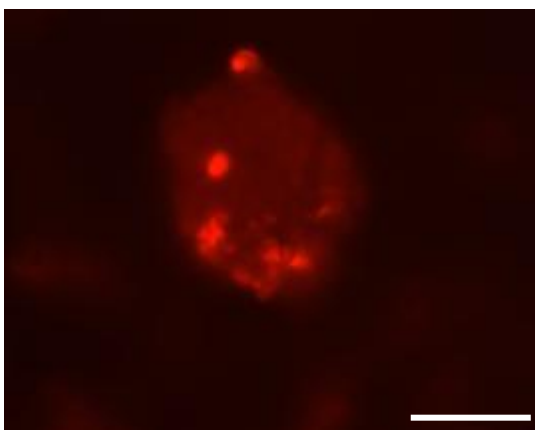
100 x suurennos, valomikroskopia ,
faasikontrasti. Jana = 100 μm



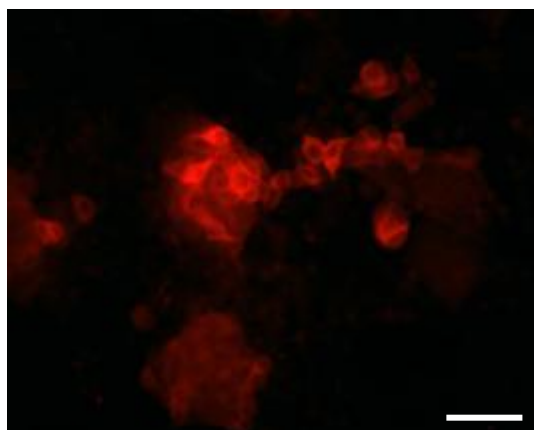
PCR-tulos spesifisillä alukkeilla



AP-värjäys, 100 x suurennos, valomikroskopia
faasikontrasti. Jana = 100 μm



SSEA-1-värjäys, 630 x suurennos,
fluoresenssimikroskopia
Jana = 50 μm



Beta-III-tubuliinivärjäys ,400 x suurennos
fluoresenssimikroskopia
Jana = 50 μm

Opinnäytetyön vaiheistus

Tehtävä	Viikko	34	35	36	37	38	39	40-42
Feeder-solujen maljaus (MEFejä varten)		■						
MEF:t ylös			■					
Feeder-solujen maljaus (IPSejä varten)			■					
iPS:t ylös			■					
Morfologian mikroskopointi			■					
RNA:n eristys				■				
cDNA:n kääntö (RT-PCR)				■				
SSEA1-coverslipit					■			
SSEA1- ja AP-immunovärjäys					■			
EB-muodostus bakteerimaljalla					■			
PCR spesifisillä alukkeilla + elektroforeesi					■			
Solut erilaistumaan					■	■		
Erileistumiskokeet immunovärjäyksellä						■		
PCR:n optimointi						■		
Kuvien käsittely							■	
Raportin kirjoittaminen								■
Raportti valmis 26.10.								■

Tarkistuslista työn suorituksen tueksi

	Kuvat	Kuvaus	Coverslips	Pelletti	Pakastus	AP fix 10 min	AP värjäys	SSEA-1 fix 20 min	SSEA-1 värjäys pre-BP	BP	BP pakastus	Coverslips post-BP	SSEA-1 fix post-BP	SSEA-1 värjäys post-BP	RNA-eristys	cDNA	PCR+elektroforeesi	EB muodostus	Spontaani erilaistuminen	IF fix erilaistuneille	IF beta-III-tubuliini	
wt 14	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	8x	8x	2x		
wt 17	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	8x	2x	2x		
cross 2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	8x	8x	2x		
cross 7	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-	x	x	x	8x				
cross 25	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	8x	8x	2x		
MEFs	x	x	/	x	x	/	/	/	/	/	/	/	/	/	x	x	x	/	/	/	/	/
(SNL feeders)	x	x	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Soluviljely

Kaikissa solutöissä käytettiin THL LATUn tuottamaa fosfaattipuskuroitua NaCl-liuosta (PBS) ilman Ca ja Mg, tuote 28, erä 92037, exp. 090912.

SNL-soluille käytettiin SNL-kasvatusliuosta: DMEM, 10 % FBS, 0,1 mM NEAA, Pen/Strep.

iPS-soluille käytettiin steriilisuodatettua ES-kasvatusliuosta: DMEM 400 ml, ES-seerumi 75 ml, L-glutamiini 5 ml, NEAA 5 ml, 2-ME 1 ml, Pen/Strep 0,75 ml.

MEF-soluille käytettiin fibroblastikasvatusliuosta: DMEM, 10 % FBS, 1x NEAA, Pen/Strep.

Solujen herätys -150°C:sta

1. Sulata soluampulli mahdollisimman nopeasti +37 °C:ssa
2. Pipetoi solut 15 ml Falcon-putkeen ja lisää solujen päälle 10 ml kasvatusliuosta
3. Sentrifugoi solut putken pohjalle (esim. 1000 rpm 5 min)
4. Kaada supernatantti pois ja naputtele solupelletti hajalle
5. Lisää päälle sopiva määrä kasvatusliuosta ja suspensoi
6. Siirrä solut viljelyalustalle (samankokoiseen josta pakastettu)

Viljelmän jakaminen

1. Poista kasvatusliuos pipetoimalla tai imulla
2. Pese solut PBS:llä
3. Lisää 0,05 % trypsiini-EDTA-liuosta niin, että solut juuri peittyvät
4. Inkuboi huoneenlämmössä tai solukaapissa muutama minuutti ja naputtele viljelyalustaa
5. Tarkista mikroskoopilla, että solut ovat irronneet
6. Pipetoi edestakaisin, kunnes suspensio on yksisoluista
7. Suspensoi solut sopivaan määrään kasvatusliuosta (niin paljon, että kasvatusliuoksen seerumi inaktivoi trypsiinin) ja siirrä sopivalle viljelyalustalle

Solujen pakastaminen

1. Irrota solut tavalliseen tapaan kasvatusliuokseen
2. Sentrifugoi solut putken pohjalle (esim. 1000 rpm 5-10 min)
3. Kaada supernatantti pois ja naputtele solupelletti hajalle
4. Suspensoi solut hyvin 1 ml:aan liuosta, jossa iPS-soluille 50 % ES-seerumi, 40 % DMEM, 10 % DMSO / MEF-soluille 10 % DMSO, 90 % FBS
5. Siirrä solususpensio huolellisesti merkittyyn kryo-putkeen ja isopropanoliastiaan
6. Siirrä isopropanoliastia -70 °C:een. Siirrä soluampulli 1-2 vrk kuluttua -150 °C:een.

RNA-eristys

Käytettiin Bio-Rad Aurum total RNA mini kit sample pack -reagenssipakettia (Cat. 732-6820S), joka sisältää eristyspylväät, pesuputkia, eppendorf-putkia, DNAasi I:n, lyysipuskurin, low stringency pesuliuoksen, high stringency pesuliuoksen, eluointiliuoksen ja DNAasi-laimennusliuoksen.

Solupelletteihin pipetoitiin 500 µl lyysipuskuria ja sekoitettiin pipetoimalla sekä vorteksoimalla. Tämän jälkeen seurattiin pakkauksen ohjetta:

1. Laita eluointiliuos +70 °C vesihautteeseen ja aseta eristyspylväs pesuputkeen.
2. Pipetoi homogenisoitu lysaatti eristyspylvääseen ja sentrifugoi 30 sekuntia. Poista eristyspylväs pesuputkesta, kaada filtraatti pois pesuputkesta ja aseta pylväs takaisin samaan putkeen.
3. Laimenna 5x low stringency -pesuliuos lisäämällä 16 ml abs. EtOH.
4. Lisää 700 µl low stringency -pesuliuosta pylvääseen ja sentrifugoi 30 sekuntia. Kaada pesuliuos pois pesuputkesta ja aseta pylväs takaisin samaan putkeen.
5. Lisää 250 µl 10 mM Tris, pH 7,5 lyofilisoituun DNAasi I:een ja sekoita pipetoinnalla.
6. Sekoita 5 µl DNAasi I-liuosta ja 75 µl DNAasi laimennusliuosta kutakin pylvästä kohden. Pipetoi 80 µl laimennosta kuhunkin pylvääseen ja inkuboi 15 min huoneenlämmössä. Sentrifugoi 30 sekuntia. Kaada liuos pois pesupylväästä ja aseta pylväs takaisin samaan putkeen.
7. Lisää 700 µl high stringency -pesuliuosta eristyspylvääseen ja sentrifugoi 30 sekuntia. Kaada pesuliuos pois pesupylväästä ja aseta pylväs takaisin samaan putkeen.
8. Lisää 700 µl low stringency -pesuliuosta eristyspylvääseen ja sentrifugoi 30 sekuntia. Kaada pesuliuos pois pesupylväästä ja aseta pylväs takaisin samaan putkeen.
9. Sentrifugoi vielä 2 minuuttia pesuliuosjäämien poistamiseksi.
10. Siirrä eristyspylväs pakkauksen mukana tulleeseen eppendorf-putkeen. Pipetoi 80 µl esilämmitettyä eluointiliuosta suoraan eristyspylvään kalvolle ja inkuboi 1 min. Sentrifugoi 2 min RNA:n eluomiseksi. Eluoitu RNA voidaan käyttää välittömästi RT-PCR-reaktiossa. Säilytys +4 °C:ssa.

RT-PCR

Käytettiin Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR -reagenssipakkausta, Cat. K1641, Lot 00054390, Exp. 09/2011.

- Maxima Enzyme Mix, sisältää käänteiskopioijaentsyymin (reverse transcriptase) ja RNAasi-estäjän (RNase inhibitor)
- Reaktioseos, sisältää reaktiopuskurin, deoksiribonukleotidit (dNTP) ja alukkeet.
- Nukleaasivapaa vesi

Säilytä reagenssit ja näytteet pipetoinnin ajan jäällä.

1. Pipetoi (Finnpipetillä) RNAasivapaaseen putkeen järjestyksessä

5x reaktioseos	4 µl
Maxima Enzyme Mix	2 µl
<u>Templaatti-RNA (tavoite: 1 µg)</u>	<u>14 µl</u>
yht.	20 µl

2. Sekoita ja sentrifugoi alas

3. Inkuboi
10 min 25°C
15 min 50°C
5 min 85°C

PCR

Työssä käytettiin:

- Käytettiin Promega GoTaq Green Master Mix. Cat. M7112, Lot 313876 exp. 09/2012
- seuraavia SIGMA-alukkeita:

Spesifinen aluke	Emäsjärjestys
Sg1 sense	GAA GTC TGG TTC CTT GGC AGG ATG
mESG antisense	ACT CGA TAC ACT GGC CTA GC
mERas sense	ACT GCC CCT CAT CAG ACT GCT ACT
mERas antisense	CAC TGC CTT GTA CTC GGG TAG CTG
mFgf4 sense	CGT GGT GAG CAT CTT CGG AGT GG
mFgf4 antisense	CCT TCT TGG TCC GCC CGT TCT TA
mNanog sense	AGG GTC TGC TAC TGA GAT GCT CTG
mNanog antisense	CAA CCA CTG GTT TTT CTG CCA CCG
mZfp42 (Rex1) sense	ACG AGT GGC AGT TTC TTC TTG GGA
mZfp42 (Rex1) antisense	TAT GAC TCA CTT CCA GGG GGC ACT

200 µM alukkeet laimennettiin 20 µM:iin 1:10. 180 H₂O + 20 µl aluke

Reagenssi	Tilavuus µl /1 reaktio	Tilavuus µl x 20
GoTaq Green Master Mix	12,5	250
primer sense 20 µM	3,75	75
primer antisense 20 µM	3,75	75
cDNA-templaatti > 20 ng	1 / 1,5 µl	
H ₂ O	4 µl	80 µl

Näytteiden pipetointijärjestys 96-kuoppalevyllä (pipetointi Finnpietillä):

		1.	2.	3.	4.	5.
		Esg1	ERas	Fgf4	Nanog	Zfp42
A	wt 14	→				→
B	wt 17	→				→
C	cross 2	→				→
D	cross 7	→				→
E	cross 25	→				→
F	MEF	→				→
G	ES	→				→
H	H ₂ O	↓	↓	↓	↓	↓

PCR-ohjelma:

Lämpötila	Aika
95°C	1 min
95°C	45 s
68°C	45 s
72°C	45 s
70°C	5 min
4°C	forever

} x 30

Elektroforesissa käytettiin

- DNA:n värjäämiseen Invitrogen SYBR Safe DNA gel stain 10 000x concentrate in DMSO, Lot 565366
- Kokostandardina O'Gene Ruler Low Range, Lot 00082610 concentration 0,1 µg/µl

Valmistettiin 1 % agarosigeeli: 100 ml 1xTBE + 1 g agarosi + 5 µl SYBR Safe -väri.

Näytteiden PCR-monistustuotetta pipetoitiin kaivoihin 5 µl.

Näytteiden ja kontrollien pipetointijärjestys agarosigeelin kaivoihin oli sama jokaiselle alukeparille:

tyhjä	wt 14	wt 17	cross 2	cross 7	cross 25	MEF	ES	H ₂ O	Kokostandardi
-------	-------	-------	---------	---------	----------	-----	----	------------------	---------------

Magneettikuulapuhdistus

Työssä käytettiin:

- Miltenyi Anti-SSEA-1-(CD15) Microbeads, human & mouse, Lot 5110317127, Exp. 16 Sep 2011.
- Miltenyi MACS separation MS columns , Lot 5100614039, Exp. 13 Jun 2013
- Miltenyi Mini MACS Separator -magneetit
- Puskurina PBS pH 7,2 – 0,5 % BSA (bovine serum albumin) – 2 mM EDTA.

Työn suoritus:

1. Trypsinoi solut huolellisesti niin että solut ovat suspensiona yksittäisinä. Lisää riittävästi kasvatusliuosta.
2. Laske suspension solumäärä.
3. Sentrifugoi solunappi pohjaan.
4. Suspensoi 1 ml:aan PBS:ää ja sentrifugoi 300g 10 min.
5. Suspensoi solut 80 µl:aan puskuria ja pipetoi päälle 20 µl magneettikuulia. Sekoita hyvin.
6. Inkuboi jääkaapissa 15 min.
7. Lisää 1 ml puskuria ja sentrifugoi 300 g 10 min.
8. Poista supernatantti huolellisesti ja suspensoi solunappi 500 µl:aan puskuria.
9. Aseta pylväs magneettitelineeseen ja pese pylväs 500 µl:lla puskuria.
10. Pipetoi solususpensio pylvääseen (pylväs koko ajan kiinni magneettitelineessä).
11. Pese pylväs 3 x 500 µl puskuria. Lisää uusi puskuri vasta kun edellinen on valunut kokonaan läpi.
12. Ota pylväs irti telineestä ja laita keräysputkeen. Lisää 1 ml puskuria ja paina puskuri männällä putkeen.
13. Lisää päälle ES-kavatusliuosta solujen suojaksi ja sentrifugoi solut pohjaan.
14. Resuspensoi solunappi sopivaan määrään ES-kasvatusliuosta.

Alkalinen fosfataasi -värjäys

Käytettiin Roche NBT/BCIP Stock Solution, Lot 12395020, Exp. Mar 2013.

Värireagenssi valmistetaan juuri ennen värjäämistä:

H ₂ O	810 µl
1 M Tris- HCl pH 9,5	100 µl
5 M NaCl	20 µl
1 M MgCl ₂	50 µl
NBT/BCIP	20 µl
yht.	1 ml

1. Solujen kiinnitys 10 min 4 % PFA.
2. Pesu PBS:llä.
3. Aspiroi, lisää värjäysreagenssi. Reaktio on nopea: sininen väri ilmenee muutamien minuuttien inkuboinnin (RT) jälkeen.
4. Pesu PBS:llä.
5. Jätä peitinlasit PBS:ään, säilytys +4°C. Väri pysyy peitinlaseilla hyvin ainakin viikon ajan.

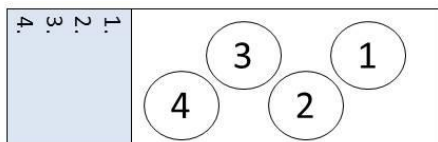
SSEA-1-värjäys

Primäärivasta-aineena käytettiin mouse SSEA-1 IgM clone MC 480 monoklonaalista vasta-ainetta, Lot PS01739905, Exp. 2011/09, joka oli peräisin Milliporen ES Cell Characterization Kit -reagenssipakkauksesta, Cat. SCR001.

Sekundaarivasta-aineena käytettiin Jackson rabbit anti-mouse TRITC.

Läpäisy/blokkausliuoksena käytettiin 0,2 % saponiini – 0,5 % BSA in PBS. Värjäystä varten tehtiin tuore erä liuottamalla 0,06 mg saponiinia 30 ml:aan 0,5 % BSA in PBS.

1. Kiinnitä solut 15-20 min 4 % PFA. Peitinlasit voi jättää PBS:ään +4°C.
2. Aspiroi PBS. Tee läpäisy ja blokkaukset pipetoimalla 600 µl saponiini-BSA-PBS:ää, inkuboi 30 min huoneenlämmössä.
3. Aspiroi liuos pois. Siirrä peitinlasit kammioon kostean imupaperin päällä olevalle parafilmille solupuoli ylöspäin, estä kuivuminen saponiini-BSA-PBS:llä.
4. Laimenna primäärivasta-aine 1:50 (10 µl SSEA-1 + 490 µl saponiini-BSA-PBS). Pipetoi laseille 50 µl laimennosta. Huom! 1:200 laimennos olisi riittävä!
5. Inkuboi vähintään 60 min huoneenlämmössä. Aspiroi ja huuhtelee saponiini-BSA-PBS:llä.
6. Pese 3 x 5-10 min 100 µl saponiini-BSA-PBS
7. Laimenna sekundäärivasta-aine 1:200 (2,5 µl Ab + 520 µl saponiini-BSA-PBS). Pipetoi laseille 50 µl laimennosta.
8. Inkuboi 45 min huoneenlämmössä valolta suojattuna. Aspiroi ja huuhtelee saponiini-BSA-PBS:llä.
9. Pese 3 x 5-10 min 100 µl saponiini-BSA-PBS.
10. Pese vielä H₂O:lla 5 min.
11. Kiinnitä peitinlasit objektilasille vesiliukoisella kiinnitysaineella (Thermo Imm-mount, Cat. 9990402).



Beta-III-tubuliinivärjäys

Primäärivasta-aineena käytettiin BioSite rabbit polyclonal anti-neuronal Class III beta-tubulin, Cat. PRB-435P-100.

Sekundäärivasta-aineena käytettiin Jackson Immuno Research Texas Red dye-conjugated Affini-Pure donkey anti-rabbit IgG, Code 711-075-152, Lot 77917.

Läpäisy/blokkausliuoksena käytettiin 0,2 % saponiini – 0,5 % BSA in PBS. Värjäystä varten tehtiin tuore erä liuottamalla 0,06 mg saponiinia 30 ml:aan 0,5 % BSA in PBS.

1. Kiinnitä solut 15-20 min 4 % PFA. Peitinlasit voi jättää PBS:ään +4°C.
2. Aspiroi PBS. Tee läpäisy ja blokkaukset pipetoimalla 600 µl saponiini-BSA-PBS:ää, inkuboi 30 min huoneenlämmössä.
3. Aspiroi liuos pois. Siirrä peitinlasit kammioon kostean imupaperin päällä olevalle parafilmille solupuoli ylöspäin, estä kuivuminen saponiini-BSA-PBS:llä.
4. Laimenna primäärivasta-aine. Käyttölaimennos 1:1000 tehtiin välilaimennoksesta 1:10 (2,5 µl Ab + 250 µl 0,2 % saponiini – 0,5 % BSA in PBS). Pipetoi laseille 50 µl laimennosta.
5. Inkuboi vähintään 60 min huoneenlämmössä. Aspiroi ja huuhtelee saponiini-BSA-PBS:llä.
6. Pese 3 x 5-10 min 100 µl saponiini-BSA-PBS
7. Laimenna sekundäärivasta-aine 1:200 (1,3 µl Ab + 250 µl saponiini-BSA-PBS). Pipetoi laseille 50 µl laimennosta.
8. Inkuboi 45 min huoneenlämmössä valolta suojattuna. Aspiroi ja huuhtelee saponiini-BSA-PBS:llä.
9. Pese 3 x 5-10 min 100 µl saponiini-BSA-PBS.
10. Pese vielä H₂O:lla 5 min.
11. Kiinnitä peitinlasit objektilasille vesiliukoisella kiinnitysaineella. Näytteen toinen lasi kiinnitettiin Thermo Immu-mountilla Cat. 9990402, toinen Vector VectaShield mounting medialla Cat. H-1200, Lot T0717.

