

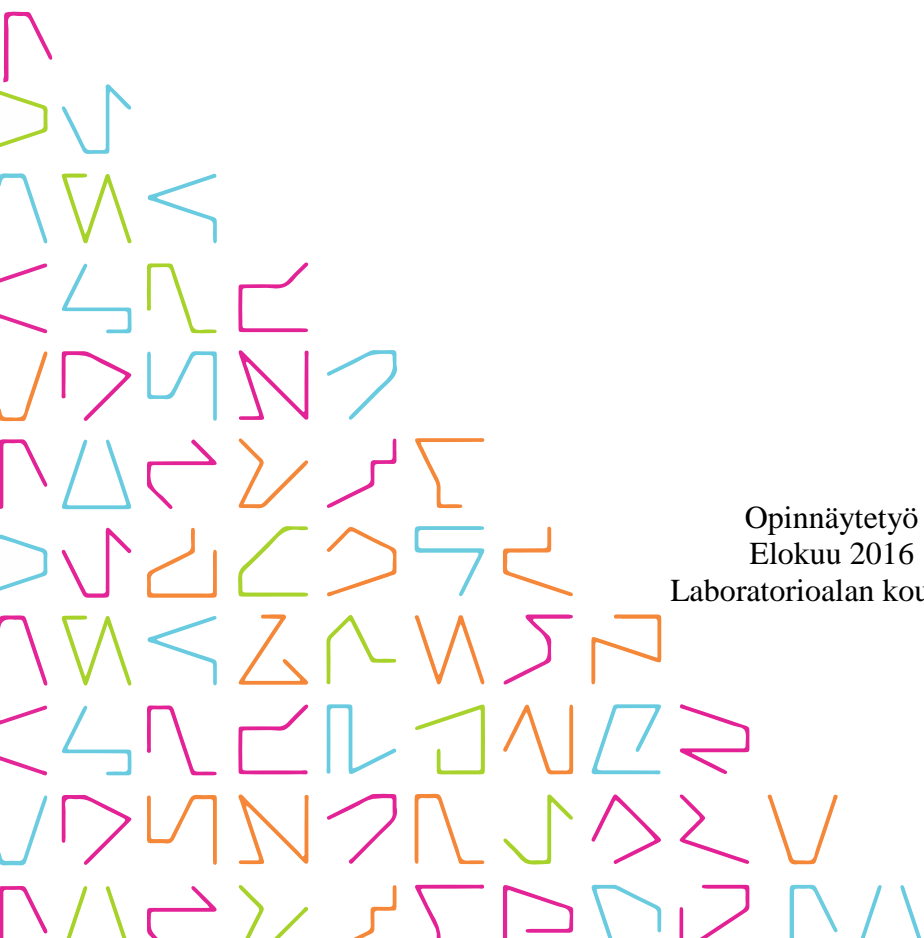


TAMPEREEN  
AMMATTIKORKEAKOULU

# **IÄN VAIKUTUS UDELLEEN- OHJELMOIDUISTA KANTASOLUISTA ERILAISTETTUIHIN SYDÄNLIHASSOLUIHIN**

Emma Vikstedt

Opinnäytetyö  
Elokuu 2016  
Laboratorioalan koulutus



## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Laboratorioalan koulutus

VIKSTEDT EMMA:

Iän vaikutus uudelleenohjelmoiduista kantasoluista erilaistettuihin sydänlihassoluihin

Opinnäytetyö 50 sivua, joista liitteitä 6 sivua  
Elokuu 2016

---

Uudelleenohjelmoiduista kantasoluista (iPS-solut) erilaistetut sydänlihassolut tarjoavat mahdollisuuden tutkia sydänsairauksia sekä tehdä lääketestauksia *in vitro*. Nykyisillä erilaistusmenetelmillä saadut sydänlihassolut ovat kuitenkin epäkypsiä ja eroavat aikuisen sydänlihassoluista morfologialtaan ja toiminnallisilta ominaisuuksiltaan.

Kypsempiä sydänlihassoluja halutaan saada, koska aikuisen sydänlihassolujen eristäminen sydäimestä on hankalaa. Kypsemät sydänlihassolut ovat todennäköisesti myös fysiologisilta ominaisuuksiltaan lähempänä aikuisen sydänlihassoluja ja näin ollen ne ovat hyödyllisempiä esimerkiksi lääketestauksissa ja sydänsairauksien tutkimisessa.

Opinnäytetyön tavoitteena oli verrata toisiinsa eri-ikäisiä iPS-soluista erilaistettuja sydänlihassoluja ja tutkia eroja niiden morfologiassa ja geeniekspressiossa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia eri-ikäisiä sydänlihassoluja immunovärjäyksen ja qPCR:n avulla ja arvioida ovatko vanhat solut ominaisuuksiltaan lähempänä aikuisen ihmisen sydänlihassoluja.

Työssä vertailtiin eri-ikäisiä iPS-soluista erilaistettuja sydänlihassoluja. Soluja analysoitiin käyttämällä immunosytokemiaalista värjäystä. Opinnäytetyössä käytettiin hyödyksi myös CytoSpectre-ohjelmaa, jolla sai tietoa sarkomeerien järjestäytyneisyydestä. qPCR-menetelmän avulla tutkittiin 7 eri geenin ekspressiota, joiden geeniekspressiota maturaation tason määrittämiseksi verrattiin aikuisen sydämen ekspressiotasoihin.

Eri-ikäisissä sydänlihassoluissa huomattiin eroja sekä vasta-ainemäärityksissä että geeniekspressiossa. Soluviljelyaika näyttäisi huomattavasti vaikuttavan iPS-soluista erilaistettujen sydänlihassolujen morfologiaan ja geeniekspressioon. Tulevaisuudessa iPS-soluista erilaistettujen sydänlihassolujen maturaation edistämiseksi voisi kokeilla esimerkiksi kilpirauhashormonin (T3) lisäystä erilaistuksen aikana.

## ABSTRACT

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

VIKSTEDT EMMA:

The Effect of Age on Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes

Bachelor's thesis 50 pages, appendices 6 pages  
August 2016

---

Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CM) offer a possibility to study cardiac diseases and drug tests *in vitro*. The problem is that the current differentiation methods give immature hiPSC-CMs that differ from adult phenotype by their morphology and functional characteristics.

Mature human cardiomyocytes are needed for example because adult human cardiomyocytes are hard to obtain from adult heart. Mature cardiomyocytes may also reflect the adult heart's physiology better than immature cells, and therefore be more useful for drug screening and disease modeling.

The aim of this thesis was to compare the different-aged hiPSC-CMs by studying the differences in their morphology and gene expression. The purpose was to study the different-aged hiPSC-CMs with immunostaining and qPCR method to assess if the characteristics of the oldest cells are closer to adult phenotype.

hiPSC-CMs were analyzed by immunostaining and the qPCR method. Also the Cytospectre program was used to determine the organization of sarcomeres. An expression of 7 genes of different-aged hiPS-CMs was compared to adult human heart to determine the phase of maturation.

Both immunostaining and gene expression analysis showed differences between different-aged hiPSC-CMs. Time in culture appears to significantly affect the morphology and gene expression of hiPSC-CMs. The effect of thyroid hormone (T3) on maturation could be tested when added into the culture medium during differentiation.

---

Key words: stem cell, iPS-cell, maturation, cardiomyocyte

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	KANTASOLUT .....	7
2.1	Alkion kantasolut.....	7
2.2	Uudelleenohjelmoidut pluripotentit kantasolut (iPS) .....	8
2.3	Aikuisen kantasolut.....	9
3	ERILAISTUSMENETELMIÄ.....	11
3.1	END2-menetelmä .....	11
3.2	EB-menetelmä .....	11
3.3	Pienmolekyyliomenetelmä.....	11
4	iPS-SOLUISTA ERILAISTETUT SYDÄNLIHASSOLUT .....	13
4.1	Sydänlihassolujen karakterisointi .....	14
4.1.1	Immunosytokemiallinen värjäys .....	14
4.1.2	Kvantitatiivinen PCR (qPCR).....	16
4.2	Sydänlihassolun maturaatio .....	18
5	MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	19
5.1	Työssä käytetty solulinja .....	19
5.2	Soluviljelymenetelmä .....	19
5.3	Analyysimenetelmät .....	20
5.3.1	Vasta-ainevärjäys ja CytoSpectre .....	20
5.3.2	qPCR suoritus .....	22
6	TULOKSET .....	25
6.1	Mikroskopointi.....	25
6.2	Vasta-ainevärjäys ja CytoSpectre .....	26
6.3	Suhteelliset geeniekspressiot .....	34
7	POHDINTA.....	36
	LÄHTEET.....	40
	LIITTEET .....	45
	Liite 1. Kasvatusmediumeissa käytetyt reagenssit .....	45
	Liite 2. NanoDrop™ tulokset .....	46
	Liite 3. qPCR data .....	47
	Liite 4. CytoSpectre tulokset .....	50

## LYHENTEET JA TERMIT

BMP	luun morfogeeninen proteiini
BSA	naudan seerumin albumiini
Cx43	konneksiiniproteiini 43
DNA	deoksiribonukleiinihappo
EB	(embryoid body) spontaanisti muodostuva soluaggregaatti
END2-solu	viskeraalisen endodermin kaltainen solu
ES-solu	alkion kantasolu
FBS	(fetal bovine serum) naudan sikiön seerumi
FGF	fibroblastikasvutekijä
fibroblasti	sidekudoksen perussolu
fiksaus	solujen kiinnitys alustaan värjäystä varten
Gsk3	glykogeeni-syntaasi kinaasi 3
<i>in vitro</i>	koeputkessa tai maljoilla tehty tutkimus
<i>in vivo</i>	elävässä organismissa tehty tutkimus
iPS-solu	uudelleenohjelmoitu pluripotentti kantasolu
kardiogeneesi	sydämen ja sydänlihassolujen kehittyminen
maturaatio	kypsyminen
NDS	(normal donkey serum) aasin seerumi
PB	fosfaattipuskuriliuos
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos
Pen/Strep	penisilliini ja streptomysiini
qPCR	kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio
PFA	paraformaldehydiliuos
RNA	ribonukleiinihappo
sarkomeeri	lihaksen toiminnallinen yksikkö
somaattinen solu	solu, joka ei ole sukusolu tai sen kantasolu
teratooma	kasvain, jossa on havaittavissa jokaisesta kolmesta alkiokerroksesta peräisin olevaa kudosta

## 1 JOHDANTO

Lähes jokaisesta ihmisen kudoksesta löytyy kantasoluja. Ne ovat soluja, jotka kykenevät itse uusiutumaan ja erilaistumaan esimerkiksi sydän-, aivo- tai hermosoluiksi. iPS-solut eli uudelleenohjelmoidut pluripotentit kantasolut ovat soluja, joita voidaan tuottaa ihmisen somaattisista soluista. iPS-soluja voidaan erilaistaa sydänlihassoluiksi useilla eri menetelmillä, kuten END2- (viskeraalisen endodermin kaltainen solu), EB- (spontaanisti muodostuva soluaggregaatti) tai pienmolekyylimenetelmällä.

iPS-soluista erilaistettujen sydänlihassolujen maturaatiota eli kypsymistä voidaan tutkia morfologian, molekyyli diagnostiikan ja toiminnollisuuden kautta. Nuoret epäkypsät sydänlihassolut ovat pyöreitä ja yksitumaisia, kun taas kehittyneet aikuisen sydänlihassolut ovat pitkittäisiä ja yleensä kaksi- tai useampitumaisia. Tutkimusten mukaan sydänlihassolun maturaation merkkejä ovat muun muassa suurempi koko, korkeampi myofibrillien tiheys ja järjestäytyminen sekä sarkomeerien selkeä näkyvyys (Lundy ym. 2013).

Tämä opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston BioMediTechin Sydänryhmään. BioMediTech on osa Tampereen yliopiston ja Tampereen teknillisen yliopiston yhteistä instituuttia. Sydänryhmän johtajana toimii professori Katriina Aalto-Setälä ja opinnäytetyön ohjasivat laboratorioanalyttikko Henna Lappi ja filosofian tohtori Marisa Ojala.

Sydänryhmän tärkeimpänä tavoitteena on toiminnallisten sydänlihassolujen erilaistaminen kantasoluista ja iPS-soluteknologian hyödyntäminen perinnöllisten sydänsairauksien mallinnuksessa. Tutkimus keskittyy solumallien tuottoon eri sydänsairauksiin iPS-solujen avulla, sekä sydänlihassolujen erilaistamismenetelmien ja kasvatusympäristön kehittämiseen. Ryhmässä kehitetään myös menetelmiä sydänlihassolujen karakterisointiin sekä esimerkiksi lääkevasteen mittaamiseen.

Opinnäytetyön tavoitteena oli verrata toisiinsa eri-ikäisiä sydänlihassoluja ja tutkia eroja niiden morfologiassa ja geeniekspressiossa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia eri-ikäisiä sydänlihassoluja immunovärjäyksen ja qPCR:n avulla ja arvioida ovatko vanhat solut ominaisuuksiltaan lähempänä aikuisen ihmisen sydänlihassoluja.

## 2 KANTASOLUT

Ihmisellä on lähes jokaisessa kudoksessa kantasoluja. Kantasolut ovat soluja, jotka kykenevät itse uusiutumaan jakautumalla. Ne pystyvät myös erilaistumaan muiksi solutyypeiksi. (He, Nakada & Morrison 2009, 377.) Kantasolujen jakaminen ryhmiin tapahtuu niiden erilaistumiskyvyn ja alkuperän mukaan totipotentteihin-, pluripotentteihin- ja multipotentteihin kantasoluihin. Hedelmöittynyt munasolu on totipotentti kantasolu, joka pystyy erilaistumaan mihin tahansa elimistön kudostyyppiin ja muodostamaan lopulta kokonaisen yksilön. Alkion kantasolut ovat pluripotentteja kantasoluja, jotka kykenevät muodostamaan kaikkia kehon kudoksia ja niillä on rajaton uusiutumiskyky. Aikuisen kantasolut ovat multipotentteja ja ne voivat tuottaa useita solutyyppettä, mutta niillä on huomattavasti rajallisempi kyky erilaistua. (Bongso & Lee 2005, 3; Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2003, 4; Porkka 2004, 1391.)

### 2.1 Alkion kantasolut

Alkion kantasoluja (ES-solu) saadaan hedelmöityshoidoista ylijääneistä alkioista, jotka ovat kelpaamattomia hedelmöityshoitoihin (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2003, 4). Ne muodostuvat blastokystin sisäisestä solumassasta ennen sen kiinnittymistä kohdun seinämään. ES-solut ovat pluripotentteja soluja, jotka pystyvät rajattomasti itse uusiutumaan ja pystyvät muodostamaan mitä tahansa kehon soluja. Nämä ominaisuudet erottavat ES-solut kudoksesta saatavista aikuisen kantasoluista, joilla on rajallisempi kyky uusiutua ja erilaistua. (Takahashi ym. 2007, 861; He ym. 2009, 379; Bongso & Lee 2005, 3.)

ES-soluihin liittyy paljon eettisiä ongelmia. Koska Suomessa alkioita ei saa tuottaa tutkimuskäyttöön, on keskusteltu ”alkion oikeuksista” ja kantasolututkimuksen eettisyydestä. (Seppänen & Skottman 2014, 1961.) Monissa Euroopan maissa ES-soluja pidetään samanarvoisina muiden viljeltyjen solujen kanssa, kun taas toisissa ajatellaan, että alkiolla on ihmisoikeuksia, joita pitää kunnioittaa. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2003, 9.) Suomessa laki lääketieteellisestä tutkimuksesta (1999) määrää, että alkion muodostumisesta ei saa olla kulunut enempää kuin 14 vuorokautta. Alkiotutkimuksiin ja

ES-solujen eristämiseen tarvitaan myös aina sukusolujen luovuttajien kirjallinen suostumus.

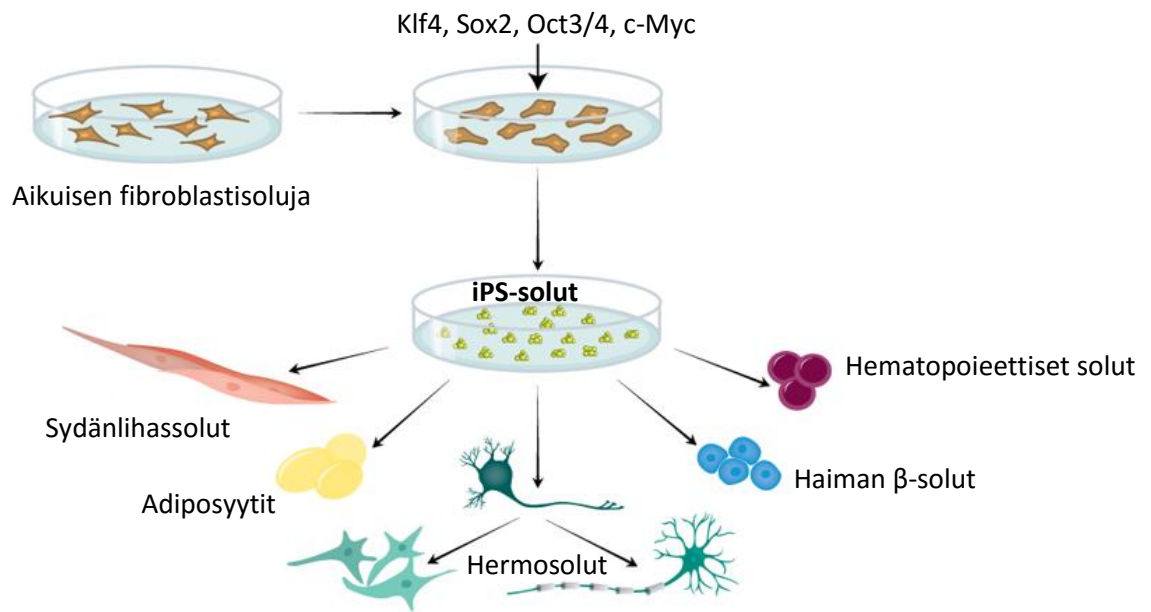
## 2.2 Uudelleenohjelmoidut pluripotentit kantasolut (iPS)

Kazutoshi Takahashi ja Shinya Yamanaka onnistuivat uudelleenohjelmoimaan hiiren fibroblastisoluja takaisin pluripotentiksi kantasoluiksi. He tutkivat yhteensä 24 kantasoluissa esiintyvää geeniä ja havaitsivat näistä neljän palauttavan solut alkion kantasolujen kaltaisiksi soluiksi, kun ne siirrettiin täysikasvuisen hiiren fibroblastisoluihin. (Takahashi & Yamanaka 2006). Näitä uudelleenohjelmoituja kantasoluja kutsutaan induoiduiksi pluripotentiksi kantasoluiksi (iPS-solut). Vuotta myöhemmin iPS-soluja saatiin tuotettua myös ihmisen fibroblastisoluista (Takahashi ym. 2007).

iPS-soluilla on kyky uusiutua ja erilaistua moniksi eri solutyypeiksi (Tiscornia, Vivas & Belmonte 2011, 1570). iPS-solut muistuttavat ES-soluja morfologialtaan, geeniekspressioltaan, epigeneettiseltä statukseltaan sekä *in vitro*-erilaistumiseltaan. Tällä hetkellä iPS-solujen karakterisoimiseen voidaan käyttää muun muassa näitä kolmea eri menetelmää: morfologian tarkastelua, immunosytokemiallista värjäystä ja PCR:ää sekä lisäksi tarkkaillaan teratooman muodostumista. (Deng ym. 2015, 153–154.)

iPS-soluja voidaan valmistaa uudelleenohjelmoimalla kohdesolut siirtämällä niihin esimerkiksi Klf4, Oct3/4, Sox2 ja c-Myc transkriptiotekijät eri menetelmien avulla (kuvio 1). Nämä geenisäätelyproteiinia koodaavat transkriptiotekijät tunnetaan yleisesti nimellä Yamanakan faktorit. (Takahashi ym. 2007, 861.) ”Pluripotentti uudelleenohjelmoituminen on monivaiheinen prosessi, jonka aikana solujen transkriptioverkostot ja epigeneettinen tila muokkautuvat uudelleen pluripotenttia tilaa vastaaviksi” (Weltner, Trokovic & Otonkoski 2014, 786). Klf4 ja c-Myc ohjaavat alkuvaiheen muutoksia, jossa keskeistä on solusyklin aktivaatio ja solujen aktiivinen jakautuminen. Oct3/4 ja Sox2 ohjaavat loppuvaiheen muutoksia, jossa solut muodostavat uusiutumiskykyisen linjan. (Takahashi ym. 2007, 861; Weltner, Trokovic & Otonkoski 2014, 785–787.)





KUVIO 1. Fibroblastien uudelleenohjelmointi iPS-soluiksi (R&D Systems, Inc. 2016, muokattu)

Ensimmäisissä menetelmissä käytettiin geeninsiirtoon retro- tai lentiviruksia. Retro- ja lentivirusten avulla siirretyt geenit integroituvat kohdesolun genomiin, joka saattaa aiheuttaa mutaatioita. Tämän vuoksi on kehitetty integraatiovapaita menetelmiä käyttämällä esimerkiksi adenovirus- (Zhou & Freed 2009) ja Sendai-virusvektoreita (Fusaki ym. 2009) tai syntetisoitua mRNA:ta (Warren ym. 2010). (Okita ym. 2011, 409.)

### 2.3 Aikuisen kantasolut

Aikuisen kantasolut mielletään usein erilaistumattomiksi soluiksi, joita löydetään jo erilaistuneiden solujen seasta kudoksista tai elimistä. Aikuisen kantasolut pystyvät itse uusiutumaan ja erilaistumaan. Niiden tärkein rooli on ylläpitää ja korjata kudoksia. Koska aikuisen kantasoluilla on rajallinen erilaistumiskyky, ne pystyvät yleensä erilaistumaan vain niiksi solutyypeiksi, joita siinä kudoksessa on, mistä kantasolu on peräisin. (National Institute of Health 2015; Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2003, 4.)

Aikuisen kantasoluja löytyy esimerkiksi iholta tai hermostosta, mutta tunnetuin lähde on luuydin. Koska ihon ja hermoston kantasolut ovat yksittäisinä soluina muiden joukossa, on niiden eristäminen siksi vaikeaa. Luuytimeä saataviin kantasoluihin voidaan vaikuttaa erilaisilla kasvutekijöillä, jolloin niitä voidaan eristää helposti verenkierrosta tai

ottaa suoraan luuytimestä. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2003, 4.) Luuytimen tuottamat hematopoieettiset kantasolut erilaistuvat eri verisolutyypeiksi ja mesenkymaaliset kantasolut esimerkiksi luu-, lihas-, rusto- ja rasvasoluiksi (Bongso & Lee 2005, 7).

### 3 ERILAISTUSMENETELMIÄ

#### 3.1 END2-menetelmä

Sydänlihassoluja voidaan erilaistaa kantasoluista usealla eri menetelmällä. END2 on yksi ensimmäisistä sydänlihassolujen erilaistusmenetelmistä. Siinä erilaistettavia kantasoluja kasvatetaan viskeraalisen endodermin kaltaisten solujen päällä. Endodermin erittämät tekijät, kuten BMP (luun morfogeeninen proteiini) ja FGF (fibroblastikasvutekijä), vaikuttavat suoraan sydänlihassolujen erilaistukseen. Menetelmän tuottavuuden on huomattu lisääntyvän, kun menetelmä on seerumiton ja alussa insuliiniton. Menetelmässä käytetyn askorbiinihapon on puolestaan todettu lisäävän kardiogeneesiä. (Acimovic ym. 2014, 2; Mummery ym. 2012, 349; Rajala, Pekkanen-Mattila & Aalto-Setälä 2011, 5.)

#### 3.2 EB-menetelmä

Toinen yleinen erilaistusmenetelmä on EB-menetelmä (engl. embryoid body). Siinä soluja kasvatetaan solususpensiossa ja muodostuvat soluaggregaatit erilaistuvat spontaanisti jokaisen kolmen alkiokerroksen (ektodermi, endodermi, mesodermi) soluiksi. Sydänlihassolut muodostuvat ensimmäisten joukossa. Menetelmän ongelmia ovat muun muassa soluaggregaattien vaihteleva koko ja rakenne. Myös sydänlihassolujen saanto on huono. Soluaggregaattien kokoon pyritään vaikuttamaan esimerkiksi käyttämällä U- tai V-mallisia mikrokaivoja, joihin siirretään tunnettu määrä soluja. (Mummery ym. 2012, 346,348; Rajala ym. 2011, 4–5.)

#### 3.3 Pienmolekyyli menetelmä

Kasvutekijävapaassa pienmolekyylierilaistusmenetelmässä kantasolut erilaistetaan sydänlihassoluiksi täysin tunnetuissa olosuhteissa. Artikkelin mukaan sydänlihassolujen saanto on jopa 80–98 %. (Lian ym. 2013.) On havaittu, että Gsk3-inhibiittorin käyttö parantaa huomattavasti sydänerilaistusta. Siksi kantasolut esikäsitellään ensin CHIR99021-pienmolekyyllillä. (Lian ym. 2013, 162–163.)

Myös Wnt-signaalintireitti on avainasemassa kardiogeneesissä sekä *in vivo* että *in vitro*. Wnt/ $\beta$ -kateniini on signalointireiteistä tunnetuin ja se edistää muun muassa proliferaatiota sekä solun selviytymistä. Alkionkehityksen aikana Wnt/ $\beta$ -kateniini signalointireitti edistää sydänerilaistusta, mutta myöhemmin estää sitä. (Ueno ym. 2007, 9685.) Tästä syystä menetelmän myöhemmässä vaiheessa solut käsitellään Wnt/ $\beta$ -kateniini signalointireittiä inhiboivalla IWP4:llä (Lian ym. 2013, 163).

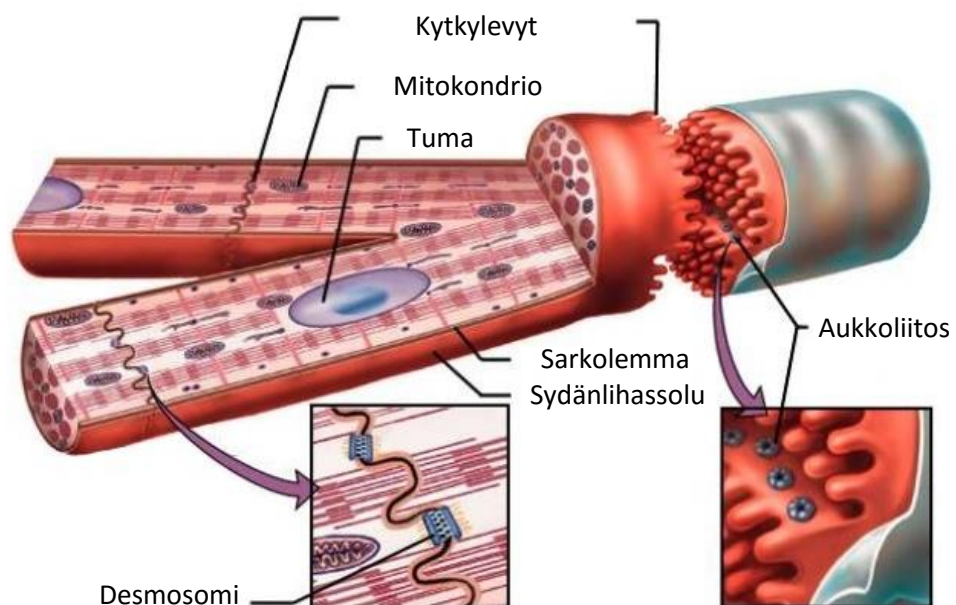
Pienmolekyyliserilaistuksessa käytetään RPMI/B27-mediumia. B27 on seerumiton lisäravinne. Erilaistuksen alussa käytetään insuliinitonta B27-suplementtia, koska insuliinin on havaittu inhiboivan sydänerilaistusta ensimmäisen viiden päivän aikana. Erilaistuksen jälkeen ylläpitomediumissa käytetään insuliinia sisältävää B27:ää. (Lian ym. 2013, 162.)

Menetelmän tavoitteena on saada yksikerroksinen solumatto (engl. monolayer), jossa solut sykkivät tasaisena mattona samaan tahtiin. (Lian ym. 2013, 162.) Menetelmän tarkempi suoritus on kuvattu kappaleessa 5.2.

#### 4 IPS-SOLUISTA ERILAISTETUT SYDÄNLIHASSOLUT

Sydämen kammiolihasen yksittäinen solu on noin 50–150 µm pitkä ja 10–20 µm leveä (kuvio 2). Jopa 85 % aikuisen sydänlihassoluista on kaksitumaisia. Yli puolet solun sisällöstä käsittävä supistuva proteiiniaine on järjestäytynyt sadoiksi solun päästä päähän kulkeviksi erillisiksi lihassäikeiksi eli myofibrilleiksi. Kukaan säie koostuu keskimäärin 60:stä sarjaan kytkeytyneestä sarkomeerista. Sarkomeerin tärkeimmät proteiinit ovat myosiini, aktiini ja titiini. Sarkomeerit koostuvat paksuista ja ohuista myofilamenteista. Jokainen paksu alkusäie rakentuu sadoista myosiinimolekyyleistä ja ohut alkusäie aktiinimolekyyleistä. Solun toiminnan kannalta tärkeitä ovat myös sarkolemma sekä siihen liittyvät T-putket ja levymäiset soluliitokset, sytoplasman tiehytverkko, mitokondriot ja muotoa tukevat tukirihmat. (Kettunen, Hassinen, Peuhkurinen & Kupari 2008; Woodcock & Matkovich 2005, 1747; Tajsharghi 2008, 1260.)

Levymäiset soluliitokset sisältävät aukkoliitoksia (engl. gap junctions), jotka rakentuvat konneksiiniproteiineista ja osallistuvat solujen väliseen viestintään muodostamalla avoimen, mutta säätyvän yhteyden viereisten solujen sytosolien välille. Aukkoliitosten ansiosta sähköärsytys leviää solusta toiseen helposti ja myös pienten molekyylien vaihdanta on mahdollista. (Kettunen ym. 2008.)



KUVIO 2. Sydänlihassolun rakenne (James 2011, muokattu)

Sydänlihassolut suurenevat ihmisen kasvaessa, mutta niiden määrä ei lisääny. Sydänlihassolu menettää syntymän jälkeen kykynsä uusiutua, joten se kuolee joko vaurioituttuaan tai ohjelmoituneesti. Koska osa soluista kuolee, tarkoittaa se jäljelle jääneille soluille isompaa työmäärää. (Kettunen ym. 2008; Woodcock & Matkovich 2005.)

Tutkimusten mukaan ihmisen sydänkudoksesta on kuitenkin havaittu löytyvän primitiivisiä kantasoluja, jotka kykenevät erilaistumaan endoteelisoluiksi ja sileälihassoluiksi. Sydämen endogeeniset kantasolut hakeutuvat vaurioalueelle ja kykenevät näin korjaamaan sitä. (Anversa ym. 2006; 1458–1460; Laine 2006.) Kantasolujen kyky erilaistua ja jakautua heikkenee iän myötä sekä sydämen vajaatoiminnalle altistavissa sairauksissa, kuten diabeteksessa. Heikkeneminen johtuu kromosomien telomeerirakenteiden lyhentymisestä, mikä johtaa solujen jakautumiskyvyn ja kasvun heikkenemiseen. (Kettunen ym. 2008.)

#### **4.1 Sydänlihassolujen karakterisointi**

iPS-soluista erilaistettuja sydänlihassoluja voidaan karakterisoida biokemiallisten, rakenteellisten ja toiminnallisten ominaisuuksien perusteella. Sydänlihassoluja voidaan tunnistaa esimerkiksi niille spesifisten geenien ja proteiinien avulla, kuten troponiini T ja *MYH7*. (Megy, Audic & Claverie 2002, 3,5.) Sydänlihassolujen tunnistaminen tapahtuu immunosytokemiallisen värjäyksen avulla ja geenien ilmentymistä voidaan tutkia PCR-menetelmällä.

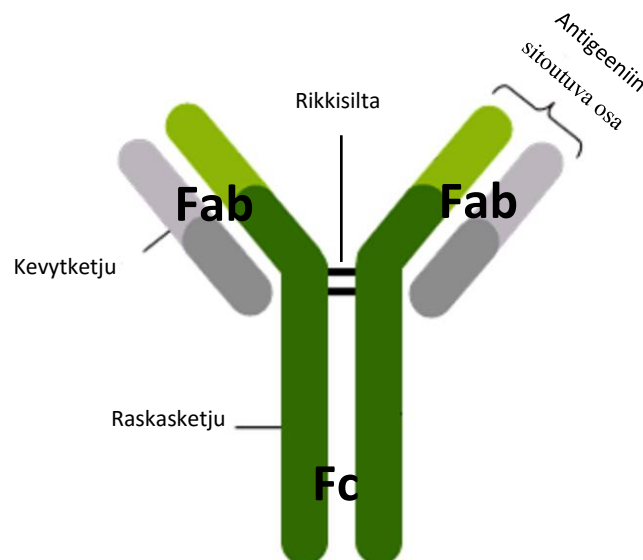
##### **4.1.1 Immunosytokemiallinen värjäys**

Immunosytokemiassa määritetään tiettyjen proteiinien tai antigeenien ilmentymistä soluissa niille spesifisten vasta-aineiden avulla. Se on hyödyllinen menetelmä yksittäisten solujen morfologian tarkastelussa. Analysoitavia näytteitä voivat olla esimerkiksi solususpensiot ja soluviljelmät. Immunofluoresenssivärjäystä käytetään yleisesti sekä tutkimuksissa että kliinisissä kokeissa. (Robinson ym. 2009, 61; IHC World 2015)

Vasta-aineet kuuluvat immunoglobuliineihin. Ne luokitellaan viiteen eri luokkaan: IgG (immunoglobuliini G), IgM, IgA, IgD ja IgE. Jokaisella vasta-aineluokalla on omat teh-

tävänsä. Esimerkiksi IgA huolehtii elimistön etulinjan puolustuksesta (limakalvot, ruuansulatuskanava, hengitystiet) ja IgG suojaa veressä elimistöön jo tunkeutuneilta taudinaiheuttajilta. (Immuunipuotospotilaiden yhdistys ry 2016; Delves, Martin, Burton & Roitt 2011, 54.)

Vasta-aineet ovat Y:n muotoisia proteiineja, jotka koostuvat kahdesta raskaasta polypeptidiketjusta (H) ja kahdesta kevyestä polypeptidiketjusta (L). Nämä polypeptidikejut ovat yhteydessä toisiinsa rikkisilloilla. Vasta-ainemolekyylissä on kaksi antigeeniä sitovaa osaa (Fab-osat) ja Fc-osa, joka sitoo komplementin ja toimii sytotoksisten solujen kiinnittymiskohtana vasta-ainevälitteisessä reaktiossa (kuvio 3). (Campbell & Farrell 2010, 411; Kurki & Jalanko 1995; Immuunipuotospotilaiden yhdistys ry 2016; Delves ym. 2011, 54.)



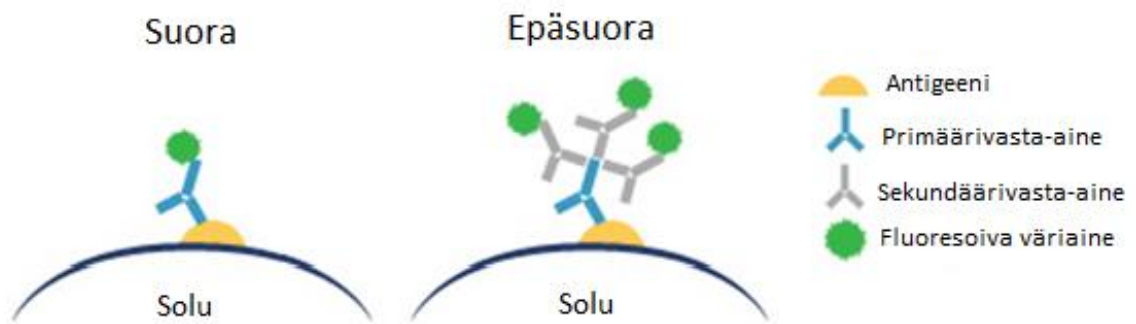
KUVIO 3. Vasta-aineen rakenne (Jena Bioscience 2016, muokattu)

Vasta-aineet muodostuvat imusolmukkeissa B-soluissa. B-solut muodostuvat luuytimessä, josta ne siirtyvät verenkierron mukana imusolmukkeisiin ja muihin kudoksiin. B-solut aktivoituvat auttaja-T-solujen sitoutuessa niihin. Samalla vapautuu interleukiineja, jotka laukaisevat B-solujen maturaation ja kehittymisen plasmak soluiksi. Sekä B-solut, että plasmak solut muodostavat vasta-aineita ja vapauttavat ne verenkiertoon. (Campbell & Farrell 2010, 409–410.)

Antigeeneillä, kuten bakteereilla tai viruksilla, on useita vasta-aineiden sitoutumiskoh-  
tia. Vasta-aine inaktivoi patogeenin tai muuttaa esimerkiksi toksiinin harmittomaksi.

(Campbell & Farrell 2010, 409–410.) Kuten edellä on jo mainittu, jokaisella vastaaineluokalla on omat tehtävänsä ja ne ovat tärkeä osa ihmisen immuunipuolustusta.

Immunovärjäyksiä voidaan tehdä kahdella menetelmällä: suoralla tai epäsuoralla (kuvio 4). Suora menetelmä on vähemmän käytetty ja siinä leimattu primäärivasta-aine tunnistaa antigeenin ja sitoutuu siihen. Menetelmän etuja ovat lyhemmät värjäysajat sekä yksinkertaisempi värjäysprotokolla. Suoralla menetelmällä saadaan huonompi signaali ja se maksaa enemmän verrattuna epäsuoraan menetelmään. Epäsuorassa menetelmässä primäärivasta-aine on leimaamaton ja se toimii antigeeninä sekundäärivasta-aineelle. Sekundäärivasta-aine sisältää fluoresoivan väriaineen. Epäsuoran menetelmä on herkempi ja sen avulla voidaan leimata useampia primäärivasta-aineita. (Robinson ym. 2009, 61.)



KUVIO 4. Suora- ja epäsuora menetelmä (Abcam plc. 2016, muokattu)

#### 4.1.2 Kvantitatiivinen PCR (qPCR)

PCR eli polymeraasiketjureaktio on tekniikka, jolla voidaan monistaa DNA:ta. Kvantitatiivinen PCR-menetelmä perustuu fluoresoivaan väriaineen käyttöön (esimerkiksi Taqman®), joka reagoi muodostuvan tuotteen kanssa. Tuotteen muodostumista reaktioseokseen voidaan seurata mittaamalla fluoresenssia ja jokainen positiivinen reaktio havaitaan fluoresenssisignaalin kerääntymisenä. Menetelmässä saatava  $C_T$ -arvo kertoo syklien määrän, joka tarvitaan siihen, että näytteen fluoresenssisignaali ylittää tietyn kynnyksarvon. Mitä alhaisempi  $C_T$ -arvo on, sitä enemmän näytteessä on nukleinihappoa. qPCR:ssä pystytään seuraamaan PCR-tuotteen määrän muutoksia reaaliaikaisesti jokaisen reaktion jälkeen. (Kuparinen 2010, 9.)



Työssä käytetty reverse transcriptase PCR-tekniikka perustuu käänteiskopioijaentsyymin käyttöön, jolloin RNA-näytteestä voidaan tuottaa cDNA:ta (kuvio 5). Menetelmässä valmistetaan ensin yksijuosteisesta RNA:sta kaksijuosteinen cDNA-RNA-hybridi käänteistranskriptaasilla. Hybridin cDNA toimii PCR-reaktiossa templaattina ja lopputuotteena saadaan kaksijuosteista cDNA:ta. RNA-juoste hydrolysoituu eli hajoaa PCR:n aikana. (Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2013, 170–171.)



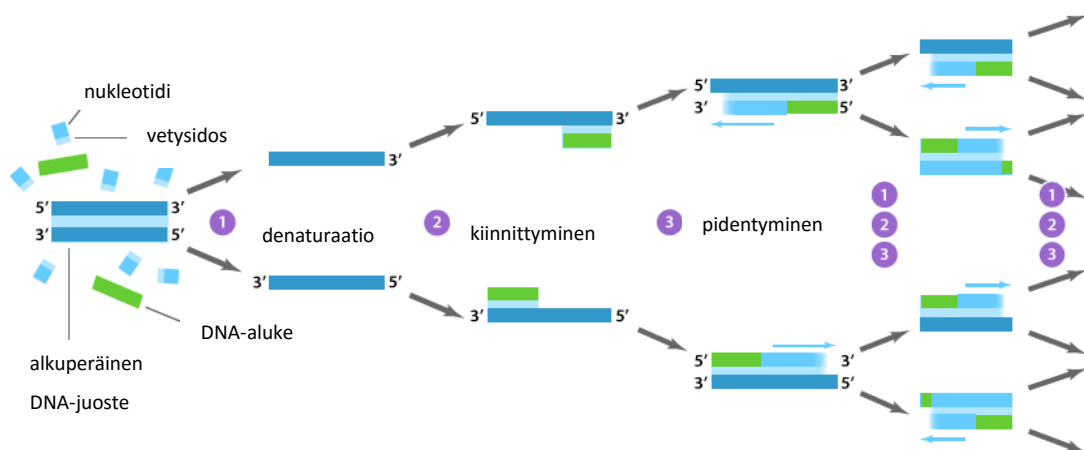
1: Käänteiskopiointi

2: Käänteiskopioijan inaktivointi ja cDNA-RNA-hybridin denaturaatio

3: PCR

KUVIO 5. Käänteistranskriptio (Solunetti 2006, muokattu)

PCR koostuu kolmesta eri vaiheesta ja näitä kaikkia kolmea vaihetta yhdessä kutsutaan sykliksi. PCR-reaktion ensimmäisessä vaiheessa lämpötilaa nostetaan 95 °C:een, jotta DNA denaturoituu eli vastinjuosteet irtoavat toisistaan (kuvio 6). Seuraavassa vaiheessa lämpötilaa lasketaan niin, että alukkeet voivat sitoutua yksijuosteisiin DNA-molekyyleihin. Kolmannessa vaiheessa lämpötilaa nostetaan DNA-polymeraasin toiminnalle optimaaliseksi eli noin 72 °C:een. Tällöin DNA-polymeraasi pystyy syntetisoimaan yksijuosteisesta DNA:sta jälleen kaksijuosteista DNA:ta. Jokaisen syklin jälkeen DNA on monistunut kahdeksi kopioksi. (Kubista ym. 2006, 97–98; Solunetti 2006.)



KUVIO 6. PCR-reaktion kulku (Applied Biological Materials Inc. 2015, muokattu)

## 4.2 Sydänlihassolun maturaatio

Ihmisen sydänlihassolujen kehittyminen aikuisen tasolle vie vuosia. Saavuttaakseen aikuisen fenotyypin sydänlihassolut käyvät kehittyessään läpi monimutkaisia rakenteellisia muutossarjoja. Aikuisen sydänlihassolut ovat pitkittäisiä ja järjestäytyneitä sekä *in vivo* että *in vitro*, kun taas epäkypsät sydänlihassolut ovat pitkittäisiä *in vivo*, mutta eivät *in vitro*. (Yang, Pabon & Murry 2014, 2-3, 7.)

Yleisesti ottaen ES- ja iPS-soluista erilaistetut sydänlihassolut ovat epäkypsiä, koska ne eivät vastaa aikuisen sydänlihassolun morfologiaa ja sarkomeerirakennetta (Bedada, Wheelwright & Metzger 2015, 1). Nuoret ES- ja iPS-soluista erilaistetut sydänlihassolut muistuttavat morfologialtaan alkion tai sikiön sydänlihassoluja. Ne ovat pienempiä kuin vanhat sekä muodoltaan pyöreitä. Suurin osa aikuisen sydänlihassoluista on yleensä kaksitumaisia, mutta alkion solut ovat yksitumaisia. (Robertson, Tran & George 2013,830.)

Sydänlihassolujen maturaatioon pyritään vaikuttamaan biokemiallisilla-, molekyylibiologisilla- tai bioteknisillä menetelmillä. Biokemiallisiin menetelmiin kuuluvat muun muassa kasvuhormonit ja adrenerginen stimulaatio (esim. noradrenaliinin käyttö). Bioteknisillä menetelmillä voidaan soluihin vaikuttaa esimerkiksi muokkaamalla kasvatusalustan ominaisuuksia tai pinnan muotoja sekä altistamalla soluja sähkökentälle. (Tzatzalos ym. 2015, 236.)

Maturaatiota arvioidaan morfologian, molekyyli diagnostiikan ja toiminnallisuuden kautta. Sydänlihassolujen morfologiasta tarkastellaan solujen muotoa ja kokoa, sarkomeerien järjestäytyneisyyttä, T-putkien esiintymistä sekä vierekkäisten solujen ryhmitymistä toisiinsa nähden. Molekyyli diagnostiikassa tutkitaan solujen geeniekspressiota. Solujen toiminnallisuutta mitattaessa tutkitaan muun muassa solujen supistumista sekä sähköisiä ominaisuuksia elektrofysiologisten mittausten (esim. aktiopotentiaalien mitta-  
us) avulla. (Tzatzalos ym. 2015, 236.)

## 5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 5.1 Työssä käytetty solulinja

Työssä käytetty solulinja oli UTA.11705.ScN5As. Työssä käytettiin eri-ikäisiä iPS-soluista erilaistettuja sydänlihassoluja. Vanhimmat solut erilaistettiin 23.3.2015, keskimmäiset 13.8.2015 ja nuorimmat 11.3.2016. Soluja ylläpidettiin (RPMI/B27 medium, +37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) aina analysointiin asti. Soluviljelmien analysointiin käytettiin vasta-ainevärjäystä sekä qPCR menetelmää. Vasta-ainevärjäyksiä varten eri-ikäisistä soluviljelmistä olevia soluja dissosioitiin eli hajotettiin yksisoluisiksi 4-kuoppalevyille. Hajotetut solut olivat 20, 228 ja 373 päivää vanhoja. Dissosiointi perustuu kolmen eri dissosiointipuskurin käyttöön. Ensimmäinen puskuri on pesuliuos ja toisen puskurin (entsyymipuskuri) tarkoituksena on löystyttää solujen väliset liitokset. Kolmas puskuri sisältää kaliumia, joka auttaa soluja selviämään dissosiointiprosessista. (Reponen 2016, 27–28.)

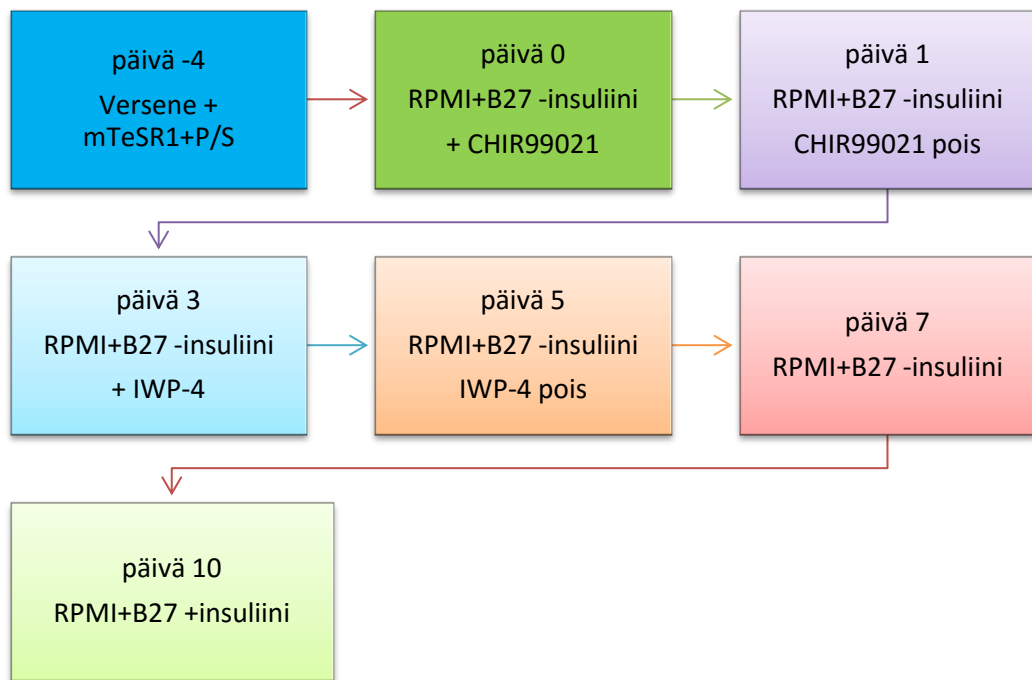
### 5.2 Soluviljelymenetelmä

Solulinja sulatettiin lämmittämällä putkea ensin varovasti kädenlämpöisessä vedessä, jonka jälkeen putkeen lisättiin mTeSR™1 mediumia (StemCell Technologies) 1 ml tippa kerrallaan varovasti sekoittaen. Tämän jälkeen solut jaettiin Geltrex®-pinnoitetulle 6-kuoppalevyille mTeSR™1-mediumiin. Soluja kasvatettiin 6-kuoppalevyllä noin viikon ajan, kunnes kuoppien pohjat olivat täynnä soluja.

Päivänä -4 6-kuoppalevyiltä poistettiin kaikki medium ja kaivoihin lisättiin Versene-entsyymiä solujen irrottamiseksi. Kun solut olivat valmiita irtoamaan pohjasta, Versene otettiin pois ja tilalle lisättiin mTeSR™1 mediumia, johon oli lisätty Pen/Strep (penisilliini/streptomysiini antibioottiliuos). Solut irrotettiin soluraaputtimella pohjasta ja niitä siirrettiin runsaasti Geltrex®-käsitellyn yhdeksään 12-kuoppalevyn kaivoon.

Varsinainen erilaistus aloitettiin päivänä 0 vaihtamalla mTeSR™1 medium insuliinitomaan RPMI/B27 mediumiin ja samalla lisättiin CHIR99021-pienmolekyylä (Reinervate, 12 µM) 24 tunnin ajaksi. Seuraavana päivänä (päivä 1) CHIR99021 poistettiin ja tilalle laitettiin insuliiniton RPMI/B27 medium (kuvio 8).

Päivänä 3 kaivoihin lisättiin IWP-4 reagenssi (Tocris, 5  $\mu$ M), joka inhiboi Wnt-solusignaalintekijöitä. Kaivoihin vaihdettiin yhdistetty medium, joka sisälsi puolet vanhaa ja puolet uutta insuliinitonta RPMI/B27 mediumia. Kahden päivän päästä (päivä 5) yhdistetty medium otettiin pois ja tilalle lisättiin uutta insuliinitonta RPMI/B27 mediumia. Päivänä 7 kaivoille vaihdettiin vielä insuliiniton RPMI/B27 medium. Päivänä 10, ja sen jälkeen joka kolmas päivä, kaivoihin vaihdettiin insuliinia sisältävä RPMI/B27 medium. Liitteestä 1 löytyy kasvatusmedieumeissa käytettyjen reagenssien määrät ja valmistajat.



KUVIO 7. Pienmolekyylierilaistuksen vaiheet

## 5.3 Analyysimenetelmät

### 5.3.1 Vasta-ainevärjäys ja CytoSpectre

Vasta-ainevärjäys tehtiin dissosioiduille soluille, soluaggregaateille ja suoraan 12-kuoppalevyn pohjassa oleville soluille. 4-kuoppalevyn pohjalle asetettiin peitinlasi ( $\varnothing$  12 mm), jonka päälle lisättiin gelatiinia (Sigma-Aldrich) solujen kiinnittymisen parantamiseksi. Gelatiinin annettiin vaikuttaa tunnin ajan, jonka aikana leikattiin sykkivät soluaggregaatit. Sykkiviä soluaggregaatteja leikattiin jokaisesta ikäryhmästä noin 12 kappaletta. Solut olivat leikattaessa 24, 232 ja 377 päivää vanhoja.

Leikatut soluaggregaatit jaettiin toiselle 4-kuoppalevyille, 3-4 kappaletta per kaivo. Tämän jälkeen gelatiini poistettiin peitinlaseilta ja leikatut soluaggregaatit siirrettiin 20 mikrolitrassa mediumia peitinlasin päälle. Solujen päälle lisättiin 1 ml EB-mediumia varovasti niin, että soluaggregaatit pysyivät peitinlasin keskiosassa. Kuoppalevyt siirrettiin inkubaattoriin viikoksi, jotta soluaggregaatit kiinnittyivät peitinlaseihin kunnolla. Tämän jälkeen solut värjättiin.

Sydänlihakselle spesifisenä primäärivasta-aineena oli vuohessa tuotettu troponiini-T (1:2000) ja sekundäärivasta-aineena aasissa tuotettu anti-vuohi-vasta-aine (1:400) fluoressileimalla (Alexa Fluor® 568, Life Technologies). Aukkoliitoksille spesifisenä primäärivasta-aineena käytettiin kanissa tuotettua konneksiiniproteiinia (Cx43) (1:1000) ja sekundäärivasta-aineena aasissa tuotettua anti-kani-vasta-ainetta (1:400) (Alexa Fluor® 488, Life Technologies). Tumien värjäykseen käytettiin DAPIa, joka sitoutuu DNA:han fluoresoi sinistä väriä (Vector Laboratories 2015).

Solujen värjäys aloitettiin pesemällä solut kaksi kertaa fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS, Lonza) viiden minuutin ajan. Tämän jälkeen solut fiksattiin käyttämällä 4 % paraformaldehydiliuosta (PFA, Sigma-Aldrich), jonka annettiin vaikuttaa 20 minuuttia. Seuraavaksi soluille tehtiin jälleen kaksi kertaa viiden minuutin pesu PBS:llä. Jotta vasta-aineet eivät kiinnittyisi epäspesifisiin kiinnityskohtiin, soluja inkuboitiin huoneenlämmössä blokkauksliuoksessa (engl. blocking) 45 minuutin ajan. Blokkauksliuos sisälsi 10 % aasin seerumia (NDS, Millipore), 0,1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) ja 1 % naudan seerumista eristettyä albumiinia (BSA, Sigma-Aldrich) liuotettuna PBS:ään. Blokkauksen jälkeen solut pestiin liuoksella, joka sisälsi 1 % NDS, 0,1 % Triton X-100 ja 1 % BSA liuotettuna PBS:ään. Soluihin lisättiin primäärivasta-aineliuos. Vastaaineliuos tehtiin edellisen kaltaiseen liuokseen. Tämän jälkeen soluja inkuboitiin jääkaapissa +4 °C:een lämpötilassa yön yli.

Seuraavana päivänä solut pestiin kolme kertaa 7 minuutin ajan 1 % BSA-PBS-liuoksella, jonka jälkeen soluihin lisättiin sekundäärivasta-aineliuos. Sekundäärivasta-aineen annettiin vaikuttaa tunnin ajan, jonka jälkeen solut pestiin kolme kertaa 7 minuuttia fosfaattipuskuriliuoksella (PB, Sigma-Aldrich). Pesun jälkeen peitinlasit kuivatettiin ja asetettiin objektilasin päälle niin, että solut jäävät peitinlasin ja objektilasin väliin. Ennen peitinlasin asettamista, objektilasien päälle lisättiin haalistumista ja kuivumista estävää Mounting-liuosta, joka sisälsi myös tumat värjäävän DAPI:n.

Dissosioiduille ja kuoppien pohjissa oleville soluille värjäysprotokolla oli samanlainen. Värjättyjä soluaggregaatteja kuvattiin konfokaalimikroskoopilla (Zeiss LSM 780 LSCM), jolloin saatiin solujen 3D-rakenne selville. Yksittäisten solujen kuvaamiseen käytettiin fluoresenssimikroskooppia (Zeiss Axio Scope.A1), kuten myös kuoppalevyn pohjassa olevien solujen kuvaamiseen (Olympus IX51 fluorescence microscope).

CytoSpectre-ohjelmalla määritettiin sarkomeerien järjestäytyneisyyttä suoraan 12-kuoppalevyn pohjasta kuvatuista soluista. Ohjelma perustuu spektrianalyysiin ja se mahdollistaa erilaisten rakenteiden analysoinnin. Periaatteessa CytoSpectre-ohjelmalla voidaan analysoida millä tahansa mikroskoopilla kuvattuja 2D kuvia. (Kartasalo ym. 2015.)

### 5.3.2 qPCR suoritus

RNA-näytteet kerättiin päivinä 26, 236 ja 379. RNA eristettiin näytteistä kaupallisella kitillä (Norgen Biotek Corp.) sen ohjeen mukaisesti ja näytteiden RNA-pitoisuudet mitattiin NanoDrop™-spektrofotometrillä (Thermo Scientific) (taulukko 1). Maturaatiota-son vertailemiseksi mukaan otettiin Human Heart Total RNA, joka on aikuisen sydäimestä eristettyä RNA:ta.

TAULUKKO 1. RNA-pitoisuudet näytteissä

Näyte	Pitoisuus	Pitoisuus/20 µl
26 pv	19,86 ng/µl	397,2 ng
236 pv	12,48 ng/µl	245,6 ng
379 pv	12,40 ng/µl	248 ng
Human Heart Total RNA	1 000 ng/µl	20 000 ng

RNA:n kääntöä cDNA:ta varten valmistettiin Master mix-reaktioseos taulukon 2 mukaisesti. Nuorimman näytteen (26 pv) kohdalla tehtiin vedellä 2/3 laimennos, koska RNA-pitoisuus oli huomattavasti suurempi kuin vanhemmissa näytteissä. Tällöin RNA-pitoisuudeksi tuli 264,8 ng/näyte. Myös Human Heart Total RNA laimennettiin 80-kertaiseksi vedellä, jolloin RNA-pitoisuudeksi saatiin 250 ng/näyte. Oletuksena on, että käynnön jälkeen cDNA-pitoisuus näytteessä pysyy samana kuin RNA:n.

TAULUKKO 2. Yhteen näytteeseen tarvittava Master Mix

Reagenssit	Master Mix
10x RT puskuri	2 µl
25x dNTP mix	0,8 µl
10x alukkeet	2 µl
käänteiskopioijaentsyymi	1 µl
RNAse inhibiittori	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	3,7 µl

RNA:n käänntö cDNA:ksi suoritettiin kaupallisen kitin ohjeiden mukaisesti (High capacity cDNA Reverse Transcription Kit). RNA:n käänntössä käytetty lämpötilaohjelma on esitetty taulukossa 3. Sekä RNA:ta että Master mixiä pipetoitiin 10 µl kaivoihin.

TAULUKKO 3. Lämpötilaohjelma RNA:n käänntössä cDNA:ksi

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

cDNA-näytteet säilytettiin -20 °C pakkasessa qPCR-ajoon asti. Näytteiden karakterisoinnissa käytettiin useita geenejä. Tutkittavat geenit on lueteltu taulukossa 4.

TAULUKKO 4. Tutkittavat geenit (U.S. National Library of Medicine 2016)

Geeni	Selitys
<i>GAPDH</i>	Koodaa proteiinia, joka pilkkoo glukoosia energiaksi ja hiilimolekyyleiksi (käytetty housekeeping geeninä)
<i>TNNT2</i>	Sydänlihakselle spesifi geeni (troponiini T)
<i>MYH6</i>	Ohjaa α-myosiini raskasketjujen valmistamista → II myosiini
<i>MYH7</i>	Ohjaa β-myosiini raskasketjujen valmistamista → II myosiini
<i>CACNA1C</i>	Antaa ohjeet kalsiumkanavien rakentamiselle
<i>SCN5A</i>	Ohjaa natriumkanavien valmistamista
<i>KCN1</i>	Ohjaa kaliumkanavien valmistamista
<i>KCNH2</i>	Ohjaa kaliumkanavien valmistamista

qPCR:ää varten jokaiselle tutkittavalle geenille valmistettiin oma Master mix (taulukko 5). Taulukkoon on merkittynä yhteen näytteeseen tarvittava määrä kutakin reagenssia. qPCR-ajot tehtiin kolmella 96-kuoppalevyllä. 96-kuoppalevyn kuhunkin kaivoon lisät-

tiin 14 µl Master mixiä ja 1 µl tutkittavaa näytettä. Jokaista näytettä pipetoitiin kolme rinnakkaista pipetointivirheen ja kontaminaatoriskin varalle.

TAULUKKO 5. Yhden näytteen qPCR Master mix

Reagenssi	Määrä
Taqman® master mix	7,5 µl
H <sub>2</sub> O	5,75 µl
Geeni	0,75 µl

Kuoppalevy sentrifugoitiin ennen laitteistoon asettamista, jotta liuokset olisivat kuoppalevyn pohjalla ja mahdolliset ilmakuplat eivät häiritsisi. Taulukossa 6 on esitetty qPCR-lämpötilaohjelma.

TAULUKKO 6. qPCR lämpötilaohjelma

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

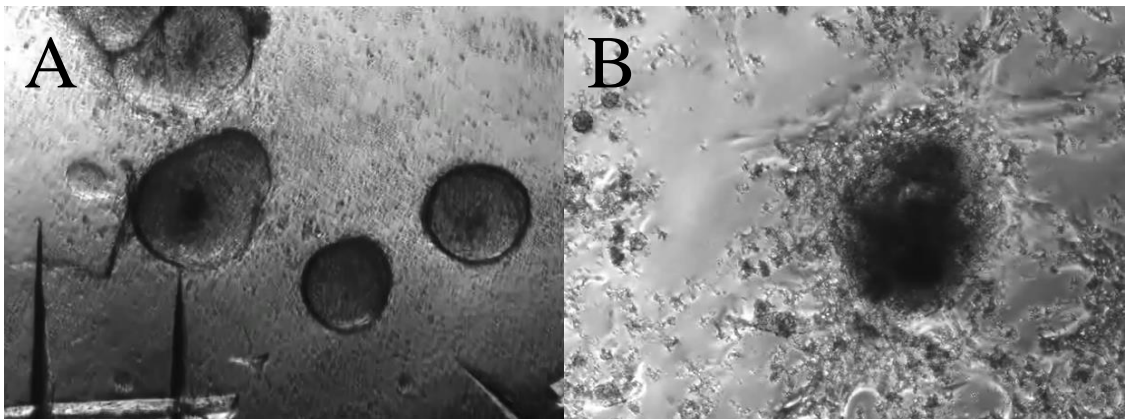
Kvantitatiivisen PCR-ajon jälkeen tulokset analysoitiin Livakin ja Schmittgenin esittämällä  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -menetelmällä, jonka avulla määritetään tutkittavan tuotteen osuus housekeeping-geenistä (Livak & Schmittgen 2001). Housekeeping-geeniä käytetään normalisoimaan qPCR-tuloksia. Jokainen qPCR-ajo normalisoidaan, jotta PCR:n lähettämät fluoresenssit voidaan qPCR:ssä muuttaa luotettavasti lähetti RNA:n määräksi. Suhteellinen normalisointi tehdään kontrolligeenin avulla (tässä työssä *GAPDH*). (Kuparinen 2010, 10.)



## 6 TULOKSET

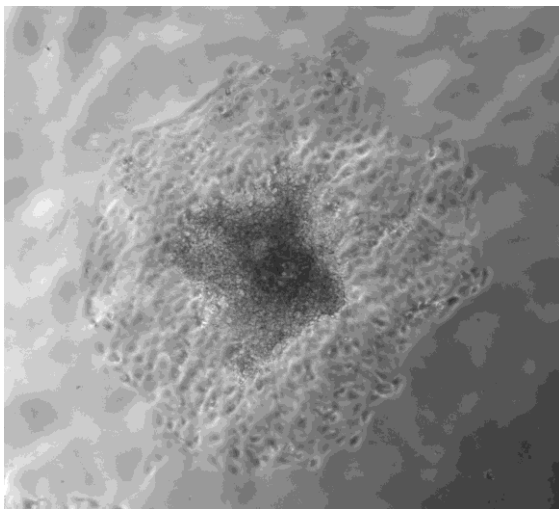
### 6.1 Mikroskopointi

Sykkiviä soluaggregaatteja tarkasteltiin valomikroskoopilla suoraan kaivoista. Vanhimmissa (kuva 1A, 371 päivää) ja nuorimmissa (kuva 1B, 18 päivää) huomattiin selkeä rakenteellinen ero. Vanhimmat ovat tarkkareunaisia, pyöreitä ja paljon tiiviimpiä, kun taas nuorimmilla rakenne on huokea ilman selkeää reunaa.



KUVA 1. Soluaggregaattien rakenne, 4X-suurennos

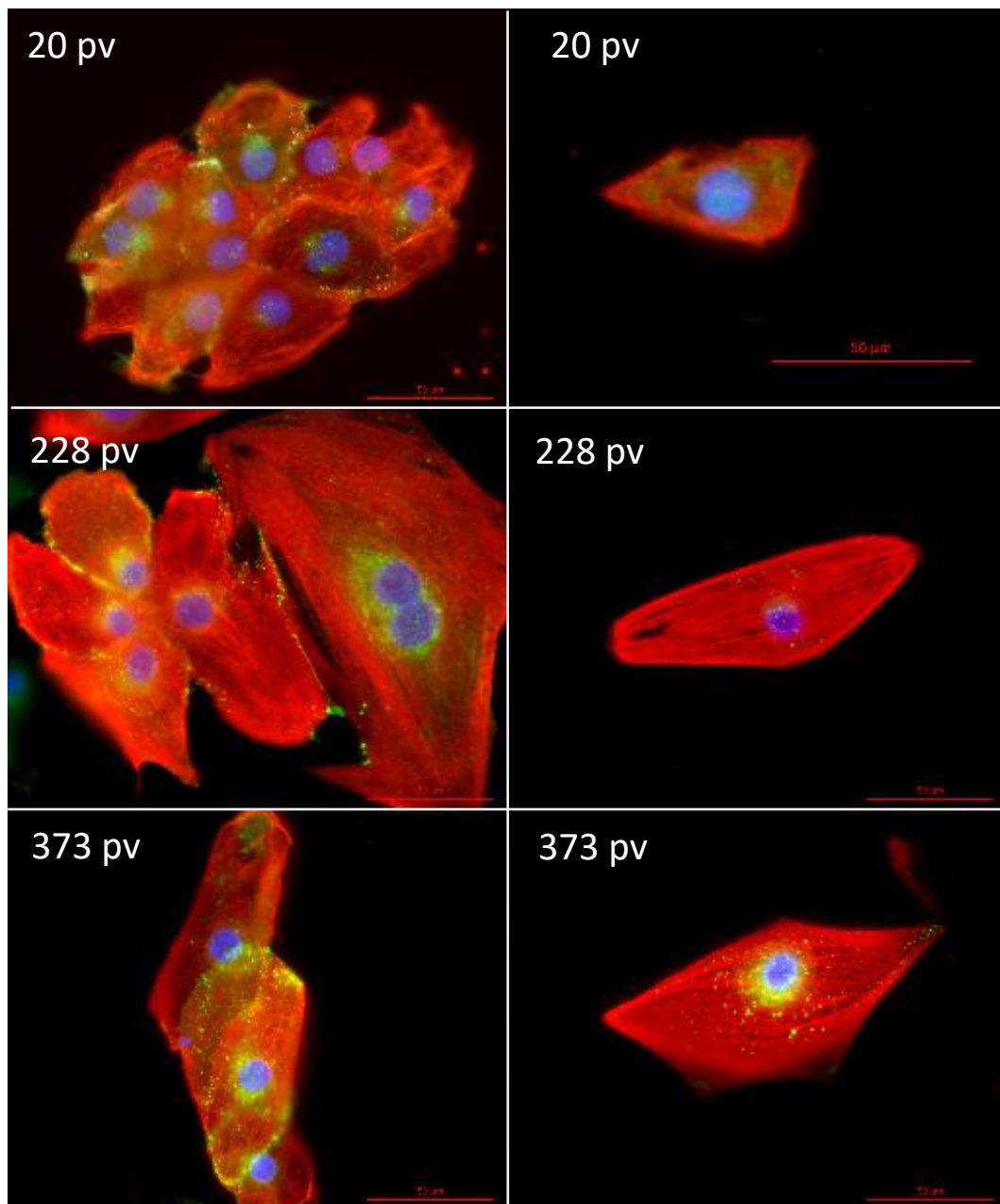
Alla olevasta kuvasta 2 nähdään, että soluaggregaatit olivat kiinnittyneet hyvin ennen konfokaalikuvausta.



KUVA 2. Kiinnittynyt soluaggregaatti

## 6.2 Vasta-ainevärjäys ja CytoSpectre

Sydänlihassolut hajotettiin yksisoluisiksi 20, 228 ja 373 päivän ikäisinä. Kuvassa 3 on esitetty tyypillisiä esimerkkejä kaikista aikapisteistä. Nuorimmat olivat selkeästi kolmiulotteisempia kuin 228 tai 373 päivää vanhat. 20 päivää vanhoissa näkyi myös enemmän solurykelmiä, kuin toisistaan erillään olevia yksittäisiä soluja. 228 ja 373 päivää vanhoissa soluissa ei näkynyt juuri rakenteellisia eroja. Molemmissa oli tiivis sarkomeerirakenne sekä konneksiinit sijoittuneet joko tuman ympärille tai solun reunoille.



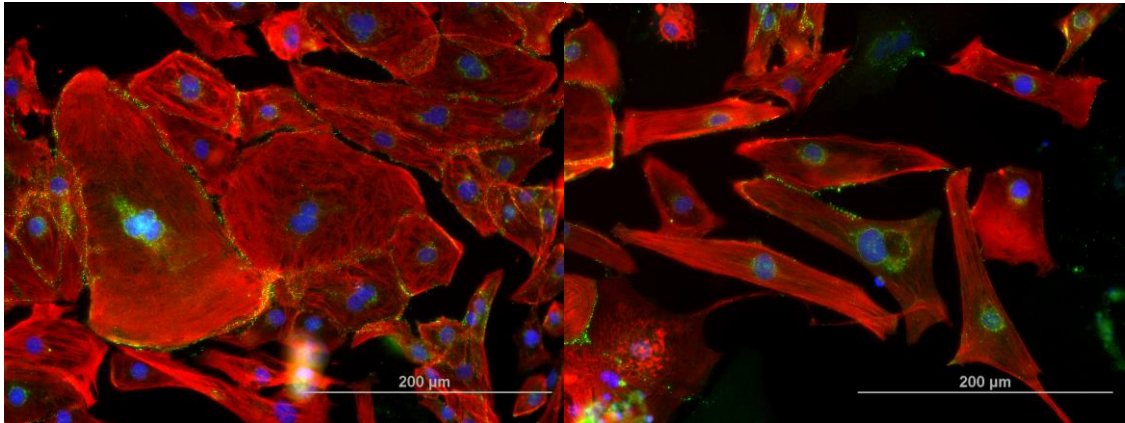
KUVA 3. 63X. Eri-ikäiset dissosioidut solut (mitta-astekko 50  $\mu$ m). Kuvassa troponiini T spesifinen vasta-aine on värjätynyt punaisella sydänlihassolut, konneksiiniproteiini (Cx43) spesifinen vasta-aine vihreänä aukkoliitokset ja DAPI sinisenä tumat.

Opinnäytetyössä vertailtiin yksittäisiä soluja myös CytoSpectre-ohjelmalla. Sillä saatiin tietoa solujen sarkomeerien järjestäytyneisyydestä (engl. circular variance). Ohjelman asteikko menee 0-1, jossa 0 tarkoittaa täydellistä järjestäytyneisyyttä ja 1 puolestaan täydellistä epäjärjestystä. Ohjelmalla tutkittiin yksittäisten dissosioitujen solujen lisäksi suoraan kaivojen pohjista kuvattuja soluja. Dissosioitujen kohdalla luku pieneni, mitä vanhemmaksi solut tulivat eli sarkomeerit olivat järjestäytyneempiä vanhimmissa. Kaikki tulokset on esitetty taulukossa 7 ja liitteessä 4.

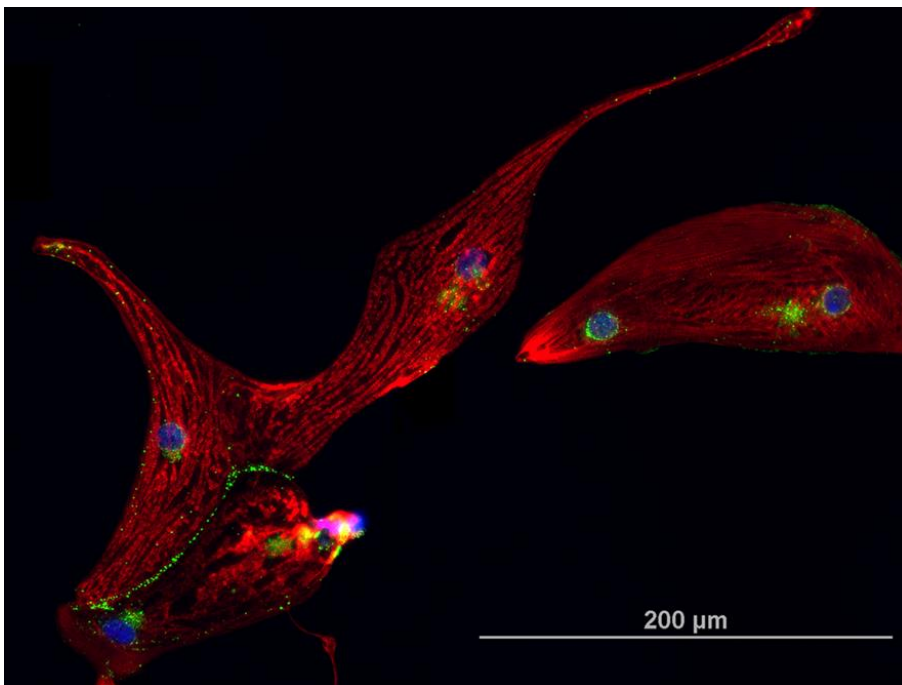
TAULUKKO 7. CytoSpectre tulokset

<b>Ikä (päivää)</b>	<b>Analysoidut solut</b>	<b>Järjestäytyneisyys</b>
20 (dissosioidut)	22 kpl	0,5724
228 (dissosioidut)	26 kpl	0,4553
373 (dissosioidut)	14 kpl	0,2911
412 (kaivot)	19 kpl	0,5287

Suoraan kaivojen pohjista kuvatut solut olivat 412 päivää vanhoja värjätessä. Soluista saatiin selkeämpiä kuvia (kuvat 4–8), kuin dissosioiduista soluista (kuva 3). Solut tuntuvat kärsivän jonkin verran dissosioinnista, sillä kaivoista kuvatuista soluista näkyi selkeästi sarkomeerirakenteet sekä aukkoliitokset solujen välillä. Mikroskopoidessa ei myöskään näkynyt rikki repeytyneitä soluja, toisin kuin dissosioiduissa.

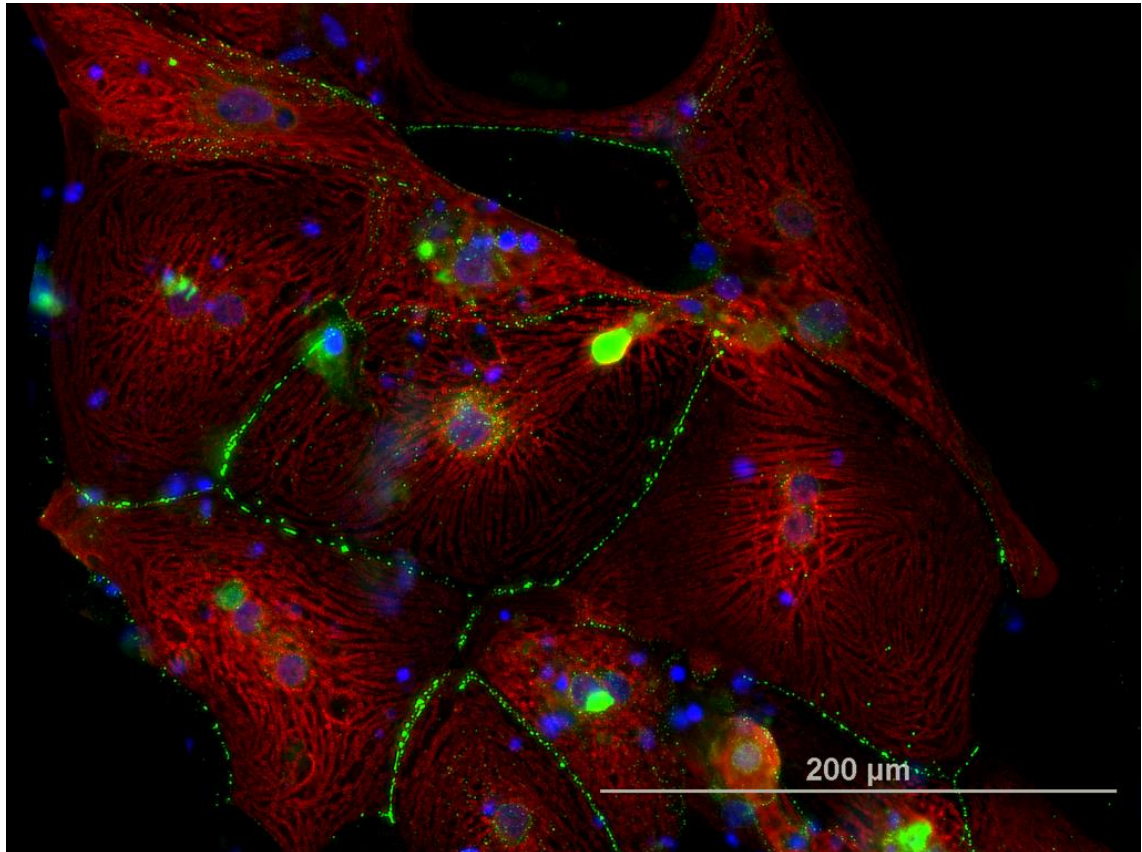


KUVA 4. 20X. 412 pv suoraan kaivoista kuvatut solut (mitta-asteikko 200  $\mu\text{m}$ ). Kuvassa troponiini T spesifinen vasta-aine on värjätynyt punaisena sydänlihassolut, konneksiiniproteiini (Cx43) spesifinen vasta-aine vihreänä aukkoliitokset ja DAPI sinisenä tumat.



KUVA 5. 20X. 412 pv suoraan kaivoista kuvatut solut (mitta-asteikko 200  $\mu\text{m}$ ). Kuvassa troponiini T spesifinen vasta-aine on värjätynyt punaisena sydänlihassolut, konneksiiniproteiini (Cx43) spesifinen vasta-aine vihreänä aukkoliitokset ja DAPI sinisenä tumat.

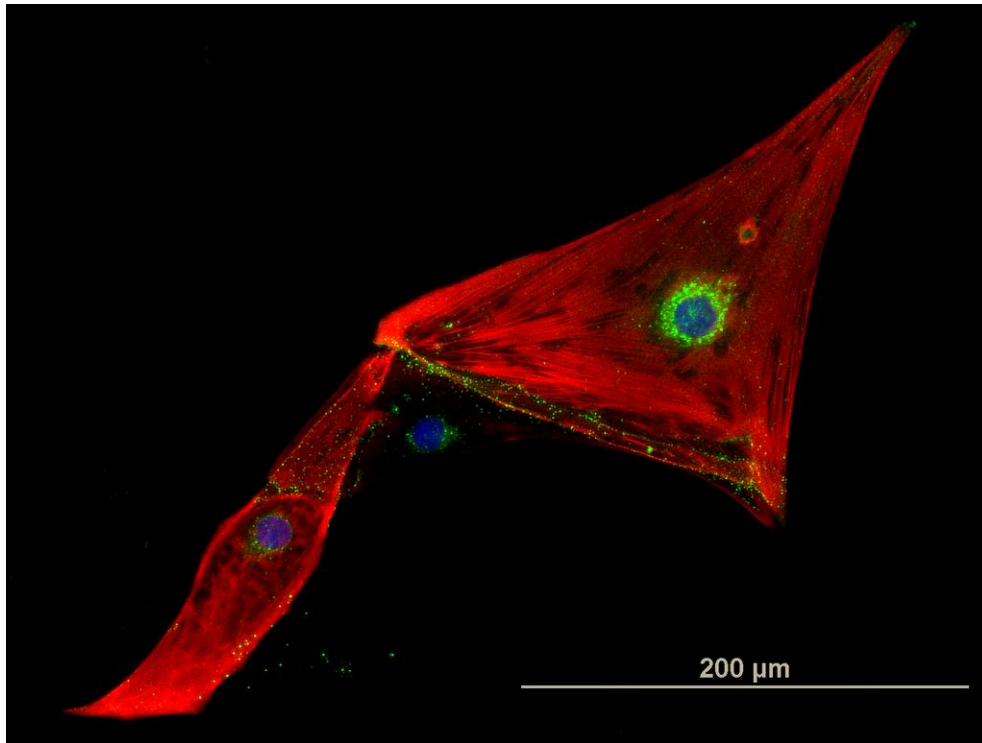
Osa soluista oli jopa yli 200  $\mu\text{m}$  kokoisia. Isommat solut olivat lähes poikkeuksetta kaksi- tai useampitumaisia, pienemmät yksitumaisia. Solujen ollessa kiinni toisissaan niiden välissä näkyy aukkoliitokset todella selkeästi. Kiinniolevat solut ovat pyöreämpiä, kun irrallaan muista olevat ovat pitkittäisempiä. Yleensä kiinni toisissaan olevat solut olivat yksitumaisia ja pieniä. Joissakin kuvissa näkyi myös paljon muiden kuin sydänlihassolujen tumia (kuva 6).



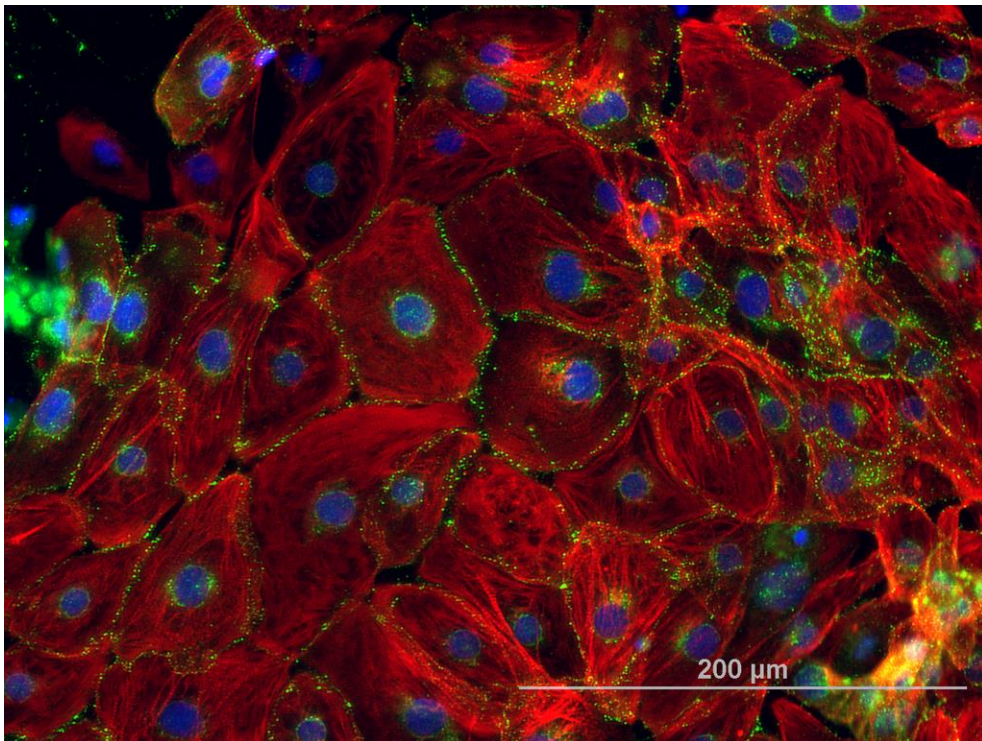
KUVA 6. 20X. 412 pv suoraan kaivoista kuvatut solut (mitta-asteikko 200  $\mu\text{m}$ ). Kuvassa troponiini T spesifinen vasta-aine on värjännyt punaisena sydänlihassolut, konneksiniproteiini (Cx43) spesifinen vasta-aine vihreänä aukkoliitokset ja DAPI sinisenä tumat.

Selvästi nämä ”käsitlemättömät” eli vain immunovärjätty sydänlihassolut olivat kunnoltaan parempia kuin dissosioidut tai soluaggregaatit. Värit olivat huomattavasti kirkkaammat ja kuvista sai paljon tietoa solujen rakenteista. Kirjallisuudesta ja artikkeleista ei ole löytynyt vastaavan laatuista kuvia iPS-soluista erilaistetuista sydänlihassoluista lyhyen tai pitkän ajan soluviljelystä.



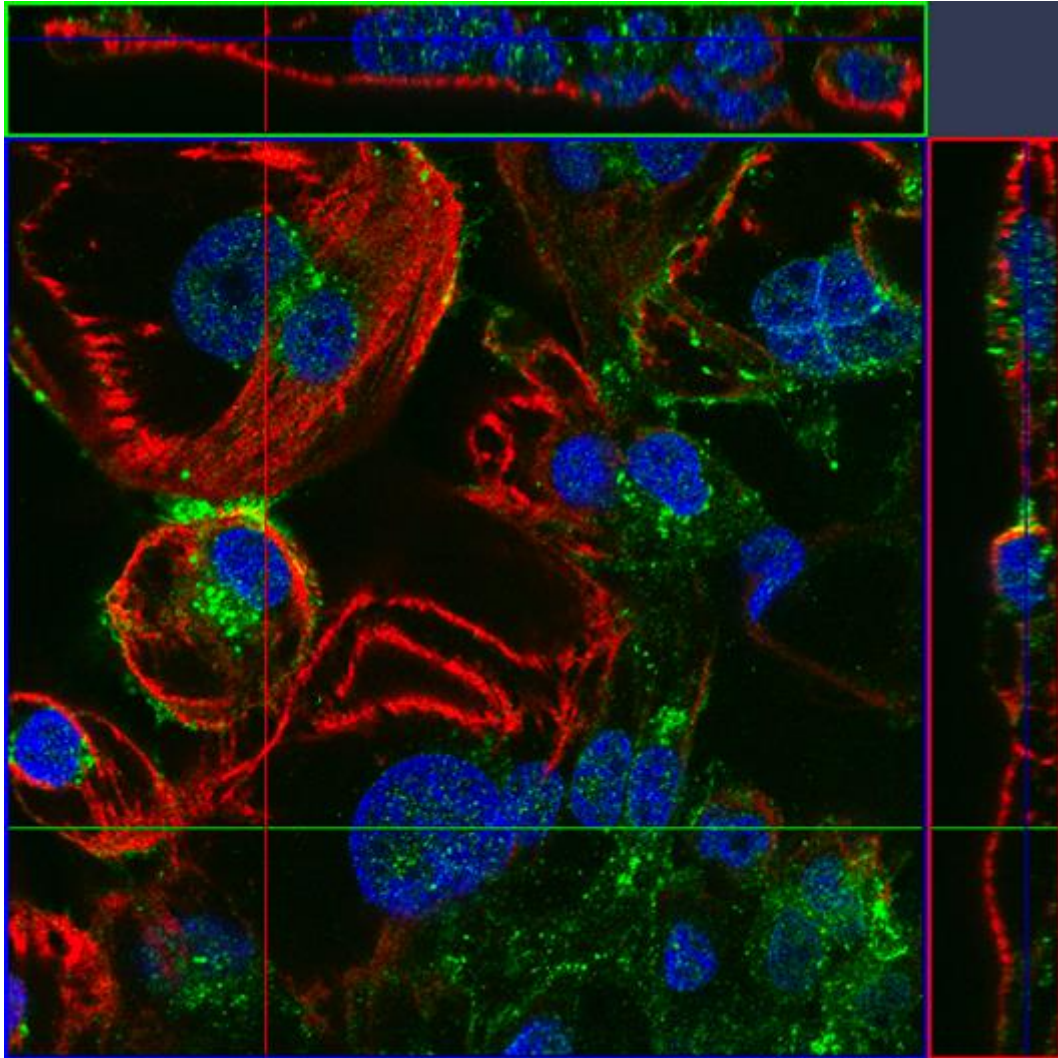


KUVA 7. 20X. 412 pv suoraan kaivoista kuvatut solut (mitta-asteikko 200 μm). Kuvassa troponiini T spesifinen vasta-aine on värjännyt punaisena sydänlihassolut, konneksiiniproteiini (Cx43) spesifinen vasta-aine vihreänä aukkoliitokset ja DAPI sinisenä tumat.



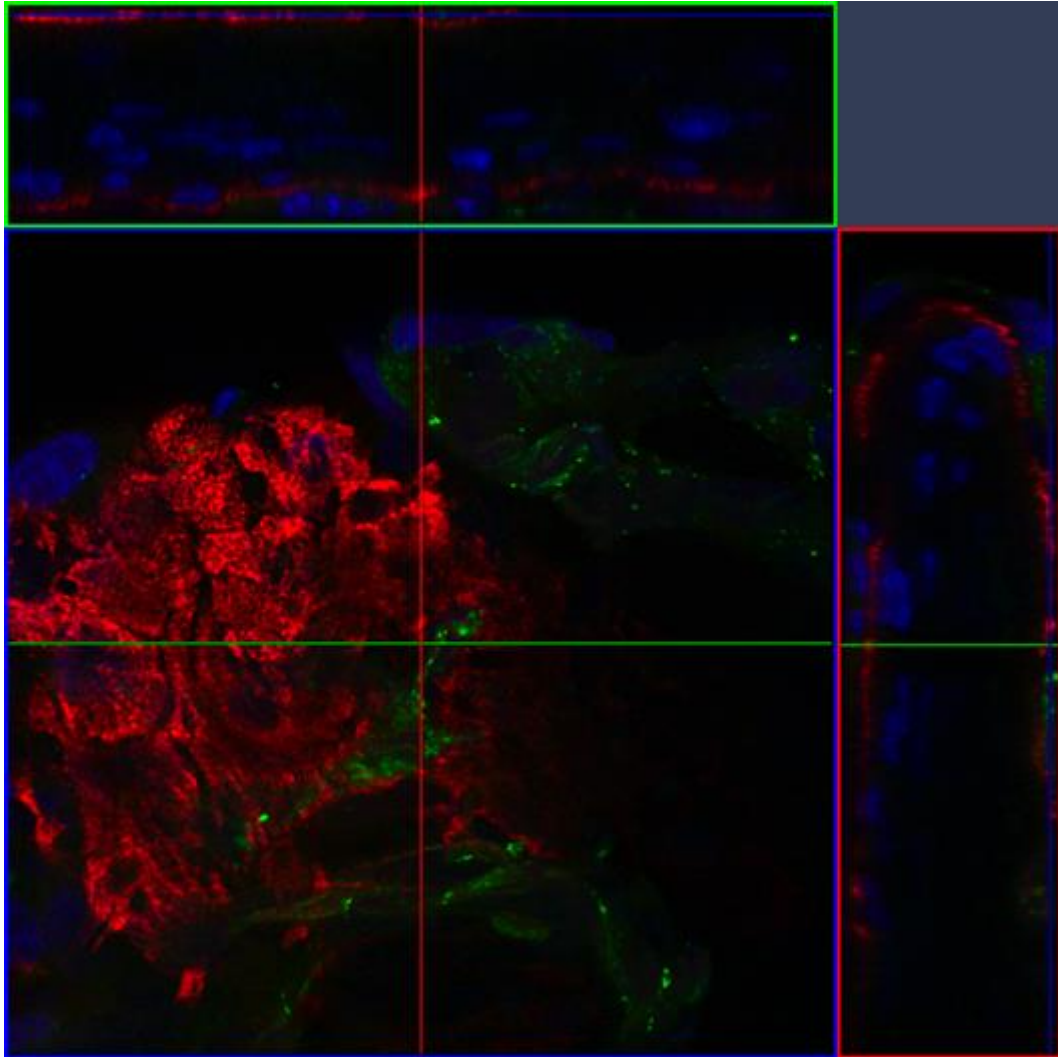
KUVA 8. 20X. 412 pv suoraan kaivoista kuvatut solut (mitta-asteikko 200 μm). Kuvassa troponiini T spesifinen vasta-aine on värjännyt punaisena sydänlihassolut, konneksiiniproteiini (Cx43) spesifinen vasta-aine vihreänä aukkoliitokset ja DAPI sinisenä tumat.

Konfokaalikuvissa 22 päivää vanhoissa nähdään poikkileikkauskuvista (ylä- ja oikea reuna) troponiini T:n värjäytyneen osittain solun sisälläkin (kuva 9). Soluaggregaatissa on tumat olivat suuria aggregaatin kokoon nähden. Konneksiinit näyttävät osittain värjäytyneen soluaggregaatin sisällä, mutta eivät pelkästään aukkoliitoksissa.



KUVA 9. 63X. Konfokaalikuva 22 päivää. Kuvassa troponiini T spesifinen vasta-aine on värjännyt punaisena sydänlihassolut, konneksiiniproteiini (Cx43) spesifinen vasta-aine vihreänä aukkoliitokset ja DAPI sinisenä tumat.

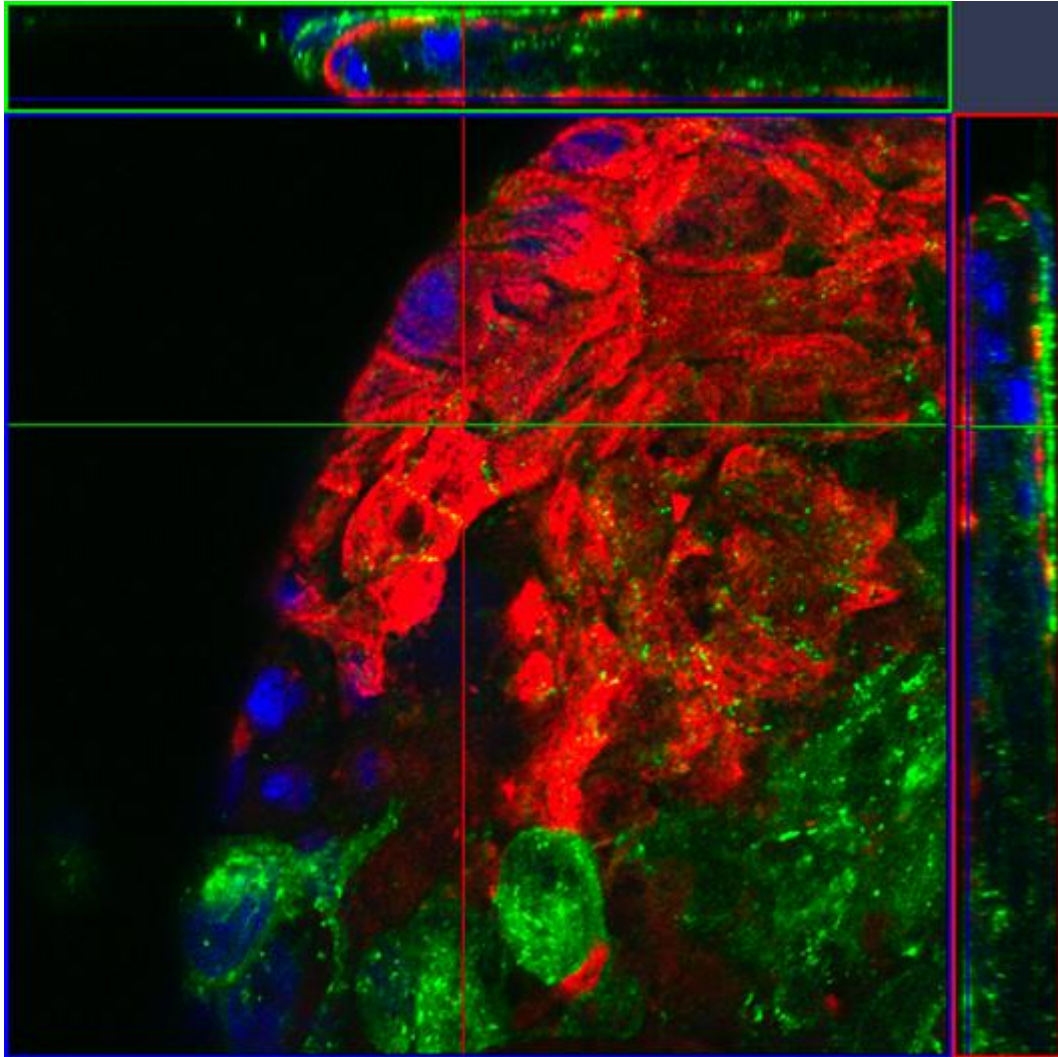
232 päivää vanhojen konfokaalikuvasta näkyi selvästi troponiini T soluaggregaatin ympärillä (kuva 10). Konfokaalikuvaukseen valittu soluaggregaatti on myös huomattavasti paksumpi kuin muut näytteet. Sydänlihassolujen sarkomeerirakenteet näkyvät hyvin, mutta konneksiinia ei ole ollenkaan solujen välissä aukkoliitoksissa. Poikkileikkauskuvasta (ylä- ja oikea reuna) nähdään sydänlihassoluaggregaatin päällä olevan joistakin muista soluista muodostunut solumatto ja siksi pinnalla näkyy paljon tumia ja joissakin kohdissa konneksiinia.



KUVA 10. 63X. Konfokaalikuva 232 päivää. Kuvassa troponiini T spesifinen vasta-aine on värjännyt punaisena sydänlihassolut, konneksiiniproteiini (Cx43) spesifinen vasta-aine vihreänä aukkoliitokset ja DAPI sinisenä tumat.



377 päivää vanhan soluaggregaatin pinnalla nähdään sarkomeerirakenteet sekä selkeästi konneksiinin sijoittuvan solujen välisiin liitoksiin (kuva 11). Myös vanhoissa poikkileikkauksista (ylä- ja oikea reuna) nähdään sydänlihassoluaggregaatin päällä olevan joistakin muista soluista muodostunut solumatto ja siksi pinnalla näkyy paljon konneksiinia. Varsinkin ylemmästä poikkileikkauksista nähdään solumaton ulottuvan troponiinin yli. Troponiini T näkyy koko soluaggregaatin ympärillä, mutta ei ole soluaggregaatin sisällä.

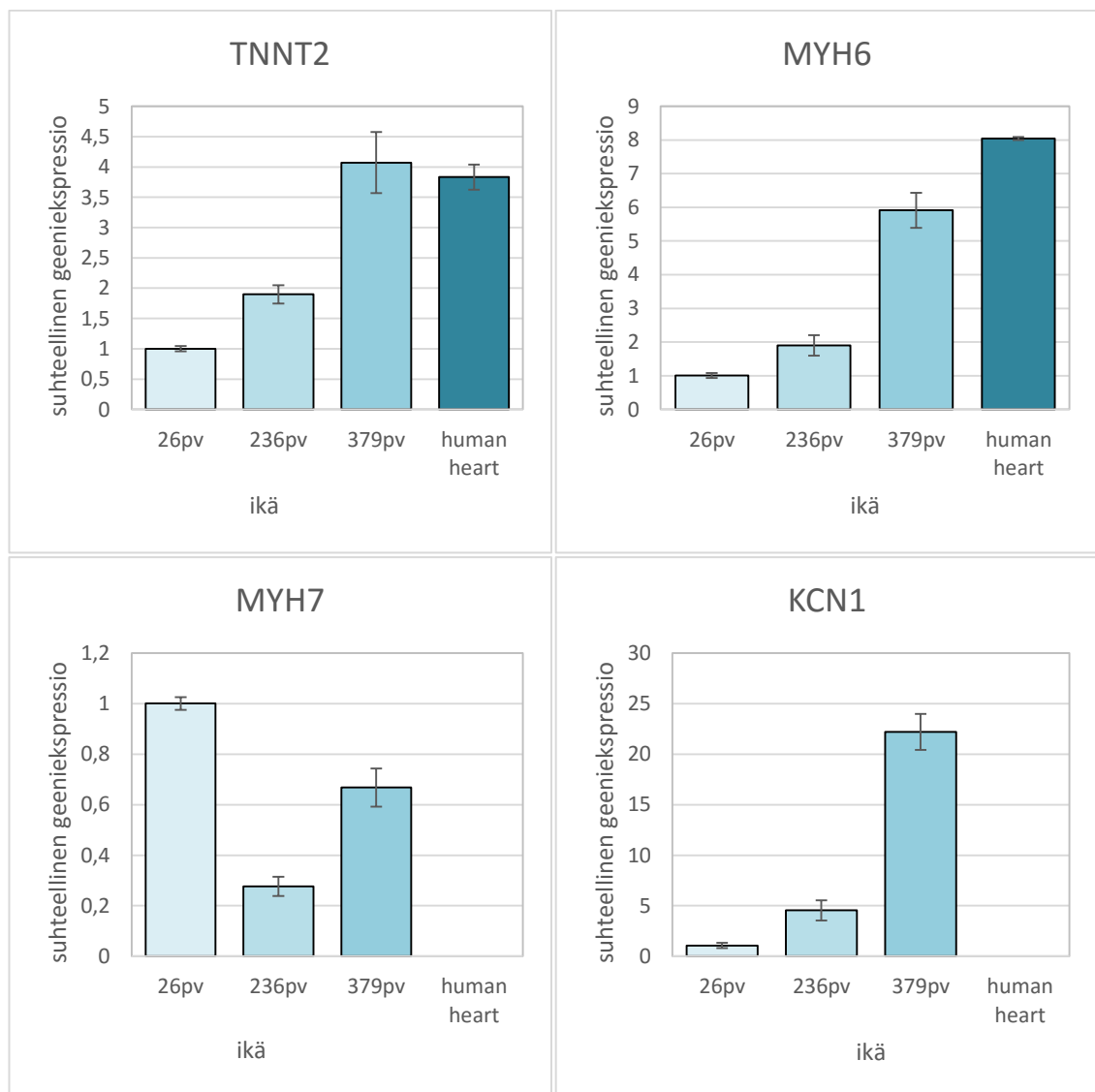


KUVA 11. 63X. Konfokaalikuva 377 päivää. Kuvassa troponiini T spesifinen vasta-aine on värjätynyt punaisena sydänlihassolut, konneksiiniproteiini (Cx43) spesifinen vasta-aine vihreänä aukkoliitokset ja DAPI sinisenä tumat.

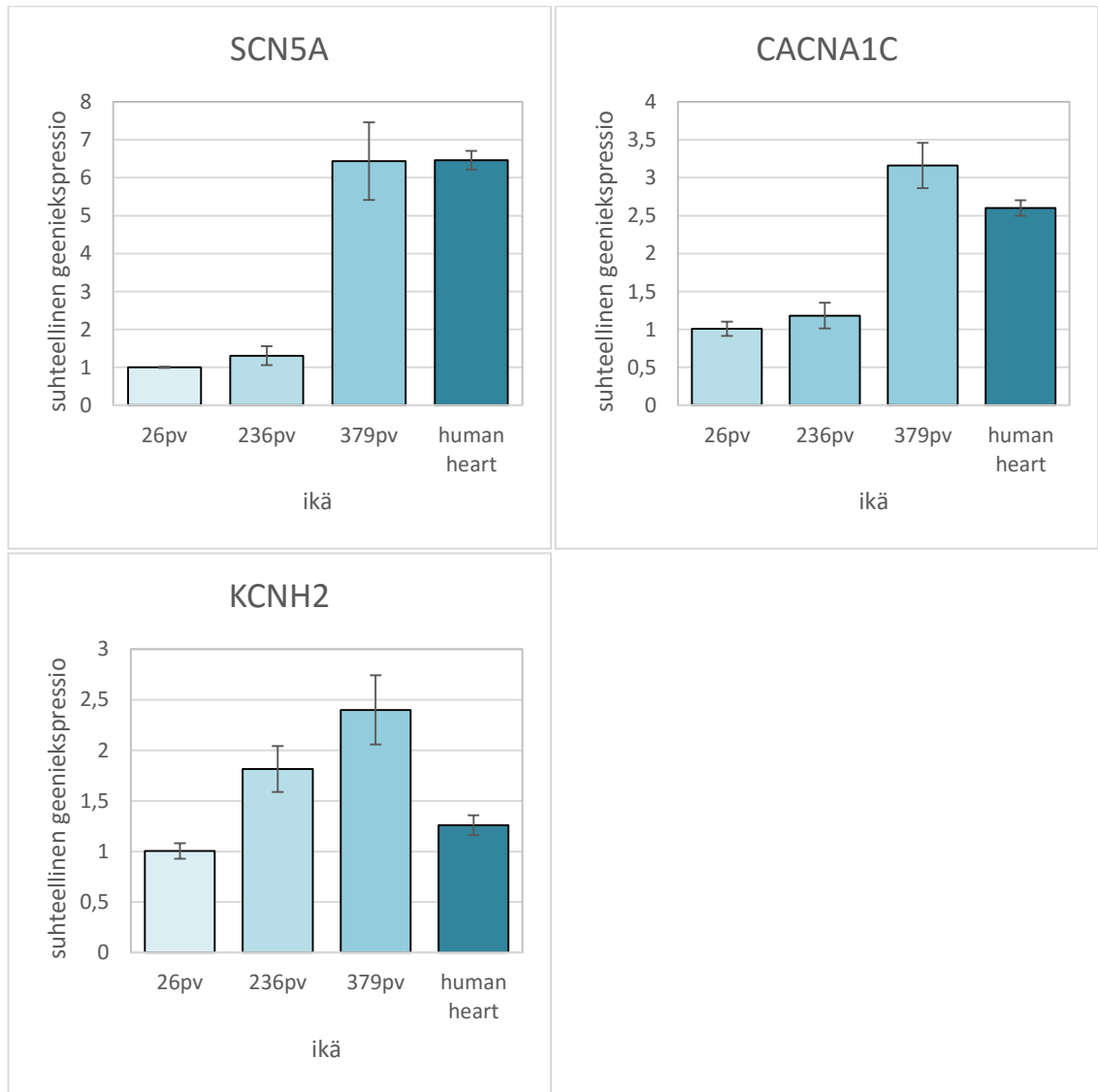
### 6.3 Suhteelliset geeniekspressiot

qPCR:llä tutkittiin tiettyjen geenien ilmentymistä näytteissä (kuviot 8 ja 9). *MYH7* ja *KCN1* geeneistä ei saatu aikuisen sydämen (Human Heart Total RNA) ilmentymistä pipetointivirheen vuoksi. Liitteestä 3 löytyy tarkempi data. Eri-ikäisten ekspressiota on verrattu 26 päivän ikäisiin.

Kaikkien muiden paitsi *MYH7* ilmentyminen nousi mitä vanhempia solut olivat. *TNNT2*:n ja *SCN5A*:n 379 päivän ja aikuisen sydämen välillä ilmentymisessä ei huomattu keskivirhettä verrattaessa merkittävää eroa. Samoin oli myös *CACNA1C* geenin kohdalla 26 päivän ja 236 päivän välillä.



KUVIO 8. *TNNT2*, *MYH7*, *MYH6*, *KCN1* suhteelliset geeniekspressiot



KUVIO 9. *CACNA1C*, *KCNH2*, *SCN5A* suhteelliset geeniekspressiot

## 7 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli verrata toisiinsa eri-ikäisiä iPS-soluista erilaistettuja sydänlihassoluja ja tutkia eroja niiden morfologiassa ja geeniekspressiossa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia eri-ikäisiä sydänlihassoluja immunovärjäyksen ja qPCR:n avulla ja arvioida ovatko vanhat solut ominaisuuksiltaan lähempänä aikuisen ihmisen sydänlihassoluja. Työssä käytettiin yhtä iPS-solulinjaa ja solut erilaistettiin sydänlihassoluiksi pienmolekyylimenetelmällä. Sekä solujen morfologiassa, että geeniekspressiossa huomattiin eroja eri-ikäisten sydänlihassolujen välillä.

Työtä varten saatiin ylläpidettyä vuoden ja puolen vuoden ikäisiä soluja erittäin hyvin. Solut pysyivät kaivojen pohjassa kiinni ja sykkivät aina leikkaamiseen asti. Myös keväällä nuorien solujen erilaistus onnistui ongelmitta. Tavallisella valomikroskoopilla katsottaessa huomattiin soluaggregaattien välillä rakenteellisia eroja. Vanhimmat olivat selvästi tarkempireunaisia ja tiiviimpiä sekä niitä katsottaessa pystyi arviomaan sykkivät ja ei sykkivät soluaggregaatit melkein vain ulkomuodon perusteella. Puolivuotiaissa solumatto oli paljon paksumpi kuin vanhoissa tai nuorissa. Nuoriin kehittyi myös paljon verkkorakenteellisia sykkiviä alueita pyöreiden aggregaattien lisäksi.

Työssä eri-ikäiset solut värjättiin dissosioituina eli hajotettuna yksisoluisiksi, soluaggregaatteina sekä suoraan kaivojen pohjasta. Immunovärjäyksissä käytettiin sydänlihassoluille spesifistä troponiini T:tä solujen tunnistamiseen, DAPIa tumien värjäykseen sekä konneksiiniproteiinia (Cx43) aukkoliitosten havainnoimiseen. Vasta-ainevärjäyksillä sekä dissosioidut solut, että kaivot värjäytyivät onnistuneesti. Troponiini T spesifi vasta-aine värjäsi vain sydänlihassolut, eikä epäspesifisiä soluja ollut lainkaan.

Soluaggregaattien värjäyksessä oli ongelmana se, että vasta-aineet eivät päässeet aggregaattien sisälle. Konfokaalikuvista huomattiin myös, että sydänlihassoluaggregaattien päällä oli vielä jokin erillinen solumatto muita soluja. Tämä häiritsi hieman konfokaalikuvien tulkintaa siitä, mitkä tumat kuuluvat sydänlihassoluaggregaattiin ja mitkä ovat erillisen solumatton tumia. Vanhimpien pinnalla huomattiin kuitenkin konneksiiniproteiinien (Cx43) sijoittuneen solujen väliin ja sarkomeerirakenteiden näkyvän soluissa.

Lundyn ym. tutkimuksessa vertailtiin nuoria (20–40 päivää) ja vanhoja (80–120 päivää) ES-soluista ja iPS-soluista erilaistettuja sydänlihassoluja. Sen mukaan sydänlihassolun maturaation merkkejä ovat muun muassa suurempi koko, korkeampi myofibrillien tiheys ja asettuminen, sarkomeerien selkeä näkyvyys sekä monitumallisten solujen 10-kertainen määrä nuorempiin verrattuna. (Lundy ym. 2013.)

CytoSpectre-ohjelmalla mitattiin sarkomeerien järjestäytyneisyyttä yksittäisissä soluissa. Ohjelman asteikko menee 0-1, jossa 0 on tarkoittaa täydellistä järjestäytyneisyyttä ja 1 järjestäytymättömyyttä. Tulosten perusteella vanhimmat olivat todella lähellä täydellistä järjestäytyneisyyttä. Osassa soluista sarkomeerien järjestäytyneisyys oli jopa 0,11 sekä dissosioituilla että kaivoista kuvatuilla. Opinnäytetyöstä saaduissa tuloksissa päätettiin myös samaan päätelmään, kuin Lundyn ym. tutkimuksessa, sillä CytoSpectren perusteella laskettu keskiarvo laski iän myötä (Lundy ym. 2013).

22 päivää vanhoista näytteistä löytyi vain yksi solu, jossa sarkomeerit olivat järjestäytyneet tiiviisti. Muuten solut olivat sarkomeerirakenteiltaan järjestäytymättömiä ja solurykelmiä oli enemmän kuin yksittäisiä soluja. Puolivuotiaissa ja vuoden vanhoissa ei huomattu selkeää eroa dissosioitujen solujen välillä. Molemmissa aikapisteissä sarkomeerirakenteet olivat tiiviitä ja näkyivät hyvin sekä solujen muodot olivat lähellä toisiaan. Lisäksi solut tuntuivat kärsivän hieman värjäyksestä, sillä rikkirepeytyneitä soluja oli muutamia.

412 päivää vanhoista kaivojen pohjassa olevista soluista saatiin kuvattua edustavia kuvia. Soluilla oli selkeät sarkomeerirakenteet, solut olivat monitumaisia ja konneksiinit olivat sijoittuneet vain solujen väleihin sekä tuman ympärille. Tästä päätellen solut olivat kehittyneet lähemmäs aikuisen sydänlihassoluja (Lundy ym. 2013; Yang ym. 2013). Konneksiiniproteiinin (Cx43) kuuluisikin näkyä vain solujen välisissä kytkylevyissä olevissa aukkoliitoksissa (van Veen, van Rijen & Opthof 2001).

Sachlos & Augusten mukaan EB-soluaggregaatin ympärille ja sisäpinnoille muodostuu kollageenikalvo soluviljelyn aikana. 1-tyyppin kollageenia todettiin olevan soluväliaineen päällä ja 4-tyyppin kollageenia tyvikalvossa. (Sachlos & Auguste 2008.) Todennäköisesti näin on myös tässä työssä käytetyissä kaikissa soluaggregaateissa, koska vastaaineet eivät olleet päässeet aggregaattien sisälle. Konfokaalikuvista nähtiin myös selväs-

ti se, että kollageenikalvo ei ollut nuorissa yhtä paksu ja niiden pinnanmuoto on todennäköisesti siksi epätasaisempi kuin vanhimmissa.

Tulevaisuudessa varsinkin vanhoille soluagregaatteille voisi kokeilla kollageenin hajottamista esimerkiksi kollageenaasientsyymillä ennen värjäystä ja testata, pääsevätkö vasta-aineet huokoisempaan pintaan paremmin sisälle. Sachlos & Auguste saivat myös inhiboitua 1-tyyppin kollageenin muodostumista lisäämällä kasvatusmediumiin atsetidiinikarboksyylilihappoa (AzC). AzC ei kuitenkaan vaikuttanut 4-tyyppin kollageenin muodostumiseen. (Sachlos & Auguste 2008.)

qPCR:llä mitattiin geenien ilmentymistä eri-ikäisissä soluissa. Sen mukaan kaikkien tutkittujen geenien (*SCN5A*, *MYH6*, *TNNT2*, *KCNI*, *KCNH2*) ilmentyminen nousi mitä vanhemmaksi solut tulivat, paitsi *MYH7* kohdalla. Keskivirhettä verrattaessa *SCN5A*:n ja *TNNT2*:n kohdalla vanhojen sydänlihassolujen ja aikuisen sydämen kohdalla ei voitu sanoa, että niiden välillä olisi jotain eroa (keskivirhepalkit osuvat kuvaajassa päällekkäin). *KCNI*:stä ei saatu tulosta lainkaan aikuisen sydäimestä, koska todennäköisesti se on pipetoitu vahingossa *MYH7* kaivoihin. Näin ollen myöskään *MYH7* aikuisen sydämen tuloksiin ei voinut luottaa ja ne jätettiin pois.

Lundy ym. vertailivat geeniekspressiota qPCR-menetelmällä nuorien ja vanhojen sydänlihassolujen välillä. Tutkittavina geneeinä olivat *MYH6*, *MYH7*, *SCN5A*, *GJA1*, *HCN4*, *KCNJ2* ja *SERCA2A*. *MYH7* määrä oli 14-kertainen ja *MYH6* määrä 8-kertainen nuoriin sydänlihassoluihin verrattuna. *SCN5A* ja *KCNJ2* määrät eivät nousseet merkittävästi. Tutkimuksessa testattiin samat geenit myös aikuisen sydäimestä, jotta voitiin verrata maturaation tasoa. (Lundy ym. 2013.) Tässä työssä *SCN5A* oli kuitenkin selvästi aikuisen sydämen tasolla.

Kamakura ym. vertasivat 30 päivän, 180 päivän ja 360 päivän ikäisiä sydänlihassoluja muun muassa tutkimalla geenien ilmentymistä. Tutkimuksessa on otettu vertailukohteeksi aikuisen vasemmasta kammioista ja eteisestä otettuja sydänlihassoluja sekä alkion sydänlihassoluja. *MYH6* suhteellinen geeniekspressio iPS-soluista erilaistettujen sydänlihassolujen kohdalla nousi 180 päivään asti, jonka jälkeen määrä laski. Aikuisen ja sikiön sydämiä verrattaessa *MYH6* oli aikuisella selvästi suurempi. *MYH7* kohdalla geeniekspressio oli suurempi sikiöllä kuin aikuisella ja samoin oli iPS-soluista erilaistetuilla sydänlihassoluilla.

Opinnäytetyössä *MYH7* ekspressio laski ensin 26 päivää vanhoista 236 päivää vanhoihin, mutta lähti nousuun 377 päivää vanhoissa. Myös *MYH6* nousi iän myötä. Tämän mukaan opinnäytetyössä saadut tulokset kertoisivat solujen olevan lähempänä aikuisen kuin sikiön sydäntä. Myös *TNNT2*:n todettiin nousevan iän myötä. Todellisuudessa kuitenkin *MYH7*:n ekspressio nousee sydämen kehittyessä ja se onkin vallitseva aikuisen sydämessä (van Rooij ym. 2007; Yang ym. 2014).

Kilpirauhashormoni T3 on kasvuhormoni, jonka on todettu olevan välttämätön sydämen optimaalisessa kasvussa. Yang tutkimusryhmineen käsitelivät soluja viikon ajan T3 hormonilla ja huomasivat eroja koossa sekä sarkomeerien järjestäytyneisyydessä ja pituudessa. (Yang ym. 2014.) Tulevaisuudessa myös tätä teoriaa voisi testata iPS-soluista erilaistettuihin sydänlihassoluihin, jos sillä saataisiin kypsempää sydänlihassoluja nopeammin ilman vuoden kestävästä soluviljelyä. Pitkässä soluviljelyajassa on aina riskinä esimerkiksi solumaton irtoaminen pohjasta.

Tavoitteena oli tutkia eroja eri-ikäisissä sydänlihassoluissa. Verrattaessa 20 päivän ja 373 päivän ikäisiä sydänlihassoluja huomattiin vanhimpien ja nuorimpien välillä selkeitä eroja. Vanhimmillä oli selkeä, tiivis ja järjestäytynyt sarkomeerirakenne, solut olivat pitkittäisempiä ja geeniekspressio nousi solujen maturoituessa. Monitumallisia soluja oli prosentuaalisesti paljon enemmän vanhemmissa kuin nuorimmissa. Vanhimmat sydänlihassolut olivat myös selvästi suurempia kuin nuoret. Kaiken kaikkiaan yli vuoden ikäiset sydänlihassolut olivat huomattavasti lähempänä aikuisen fenotyyppiä kuin sikiön.

## LÄHTEET

- Abcam plc. 2016. Direct vs. Indirect immunofluorescence. Luettu 19.5.2016.  
<http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>
- Acimovic, I., Vilotic, A., Pesl, M., Lacampagne, A., Dvorak, P., Rotrekl, V. & Meli, A.C. 2014. Review Article: Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as Research and Therapeutic Tools. *BioMed Research International* 1–14.
- Anversa, P., Kajstura, J., Leri, A. & Bolli, R. 2006. Life and Death of Cardiac Stem Cells: A Paradigm Shift in Cardiac Biology. *Circulation* 113: 1450–1463.
- Applied Biological Materials Inc. 2015. Polymerase Chain Reaction (PCR) – An introduction. Luettu 17.5.2016.  
[https://www.abmgood.com/marketing/knowledge\\_base/polymerase\\_chain\\_reaction\\_introduction.php](https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php)
- Bedada, F., Wheelwright, M. & Metzger, J. Maturation status of sarcomere structure and function in human iPSC-derived cardiac myocytes. *BBA Molecular Cell Research* 1–10.
- Bongso, A. & Lee, E.H. 2005. Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources. Teoksessa Bongso, A. & Lee, E.H. (toim.) *Stem Cells: From Bench to Bedside*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte Ltd.
- Campbell, M. & Farrell, S. 2010. *Biochemistry*. 7. painos. Brooks/Cole, Cengage Learning.
- Delves, P., Martin, S., Burton, D. & Roitt, I. 2011. *Roitt's Essential Immunology*. 12.painos. Hoboken, GB: Wiley-Blackwell.
- Deng, X-Y., Wang, H., Wang, T., Fang, X-T., Zou, L-L., Li, Z-Y. & Liu, C-B. Non-Viral Methods for Generating Integration-Free, Induced Pluripotent Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy* 10:153–158.
- Fusaki, N., Hiroshi, B., Nishiyama, A., Saeki, K. & Hasegawa, M. 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 85:348–362.
- GraphPad Software, Inc. 2010. FAQ: What you can conclude when two error bars overlap (or don't)? Luettu 7.7.2016. <http://graphpad.com/support/faqid/1362/>
- He, S., Nakada, D. & Morrison, S. 2009. Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25:377–406.
- IHC World. 2011. Introduction to Immunocytochemistry. Luettu 6.6.2016.  
[http://www.ihcworld.com/\\_protocols/general\\_ICC/introduction.htm](http://www.ihcworld.com/_protocols/general_ICC/introduction.htm)



Immunopuutospotilaiden yhdistys ry. 2016. Vasta-aineet. Luettu 19.5.2016.  
<http://www.immuunipuutospotilaidenyhdistys.fi/tietoa/tietoa/immuunipuutokset-ja-hoito/vasta-aineet/>

James, L. 2011. The Heart as Pump and Function of the Heart Valves. LinkedIn SlideShare. Luettu 13.6.2016. <http://www.slideshare.net/LawrenceJames/lec16cvs>

Jena Bioscience. 2016. Antibodies. Luettu 19.5.2016.  
[http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/browse/1441\\_antibodies.html](http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/browse/1441_antibodies.html)

Kamakura, T., Makiyama, T., Sasaki, K., Yoshida, Y., Wuriyanghai, Y., Chen, J., Hattori, T., Ohno, S., Kita, T., Horie, M., Yamanaka, S. & Kimura, T. 2013. Ultrastructural Maturation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Long-Term Culture. *Circulation Journal* 77:1307–1314.

Kartasalo, K., Pölönen, R-P., Ojala, M., Rasku, J., Leikkala, J., Aalto-Setälä, K. & Kallio, P. CytoSpectre: a tool for spectral analysis of oriented structures on cellular and subcellular levels. *BMC Bioinformatics* 16:344.

Kettunen, R., Hassinen, I., Peuhkurinen, K. & Kupari, M. 2008. Kardiologia. Sydänlihaksen rakenne ja toiminnot, sydän pumppuna. *Duodecim oppiportti*. Luettu 10.5.2016.  
<http://www.oppiportti.fi.elib.tamk.fi/op/kar00067/do>

Kubista, M., Andrade, J., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. & Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of Medicine* 27:95–125.

Kuparinen, T. 2010. Kylmän aiheuttamat muutokset *Dca*- ja *Frost*-geenien toiminnassa *Drosophila montana*-mahlakärpäsellä. Jyväskylän yliopisto. Bio- ja ympäristötieteiden laitos. Pro Gradu –tutkielma.

Kurki, P. & Jalanko, H. 1995. Vasta-aineet lääkkeinä. Lääketieteellinen Aikakauskirja *Duodecim*. Luettu 19.5.2016.  
[http://duodecimlehti.fi/web/guest/arkisto?p\\_p\\_id=Article\\_WAR\\_DL6\\_Articleportlet&viewTy-pe=viewArticle&tunnus=duo50189&\\_dlehtihaku\\_view\\_article\\_WAR\\_dlehtihaku\\_p\\_auth=](http://duodecimlehti.fi/web/guest/arkisto?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&viewTy-pe=viewArticle&tunnus=duo50189&_dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_p_auth=)

Laine, M. 2006. Sydämen kantasolut – voiko sydänlihas uusiutua? *Suomen Lääkärilehti* 40/2006.

Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta 9.4.1999/488

Lian, X., Zhang, J., Azarin, S., Zhu, K., Hazeltine, L., Bao, X., Hsiao, C., Kamp, T. & Palecek, S. 2013. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling under fully defined conditions. *Nature America* 8(1):162–175.

Livak, K. & Schmittgen, T. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *METHODS* 25:402–408.

Lundy, S., Zhu, W-Z., Regnier, M. & Laflamme, M. 2013. Structural and Functional Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells and Development* 22(4):1991–2000.

Megy, K., Audic, S. & Claverie, J-M. 2002. Heart-specific genes revealed by expressed sequence tag (EST) sampling. *Genome Biology* 3(12):1–11.

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

National Institute of Health. 2015. Stem Cell Basics. Luettu 30.6.2016. <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics4.aspx>

Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K-I, Shibata, T., Kunisada, T., Takahashi, M., Takahashi, J. Saji, H. & Yamanaka, S. 2011. A more efficient method to generate integration-free human iPS-cells. *Nature America* 8(5):409–414.

Porkka, K. 2004. Kantasolujensiirrot. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 120: 1391–9.

R&D Systems, Inc. 2016. Differentiation Potential of Induced Pluripotent Stem Cells. Luettu 22.6.2016. <https://www.rndsystems.com/resources/articles/differentiation-potential-induced-pluripotent-stem-cells>

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

Reponen, M. 2016. Yksittäisten sydänlihassolujen kasvatuksen optimointi. Laboratorian kolutusohjelma. Tampereen ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

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

Robinson, J., Sturgis, J. & Kumar, G.L. 2009. Immunofluorescence. Teoksessa Kumar, G.L. & Rudbeck, L. (toim.) *Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods*. 5. painos. Dako North America 61–65.

Sachlos, E. & Auguste, D. 2008. Embryoid body morphology influences diffusive transport of inductive biochemicals: A strategy for stem cell differentiation. *Biomaterials* 29:4471–4480.

Seppänen, R. & Skottman, H. 2014. Ihmisen kantasolut – ihmeeparantajat? *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 130:1961–1962.

Solunetti. 2006. Nukleiinihappojen monistaminen. Luettu 17.5.2016. [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen\\_monistaminen/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_monistaminen/2/)

Solunetti. 2006. RT-PCR. Luettu 17.5.2016. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/rt-pcr/2/>

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2013. *Geenitekniikka*. 2., korjattu painos. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Tajsharghi, H. 2008. Thick and Thin Filament Gene Mutations in Striated Muscle Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 9:1259–1275.

Takahashi, K. & Yamanaka, S. 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.

Tiscornia, G., Vivas, E. & Belmonte J. 2011. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nature Medicine*. 17(2):1570–1576.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta, Valtakunnallinen terveydenhuollon eettinen neuvottelukunta, ETENE:n lääketieteellinen tutkimuseettinen jaosto, Koe-eläintoiminnan yhteistyöryhmä, Biotekniikan neuvottelukunta & Geenitekniikan lautakunta. 2003. Ihmisen kantasolut, kloonaus ja tutkimus. Luettu 22.6.2016.  
<http://www.btnk.fi/files/pdf/kantasolu.pdf>

Tzatzalos, E., Abilez, O., Shukla, P. & Wu, J. 2015. Engineered heart tissues and induced pluripotent stem cells: Macro- and microstructures for disease modeling, drug screening and translational studies. *Advanced Drug Delivery Reviews* 96:234–244.

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

U.S. National Library of Medicine. 2016. Genetics Home Reference. Genes. Luettu 6.6.2016. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene>

van Rooij, E., Sutherland, L., Qi, X., Richardson, J., Hill, J. & Olson, E. 2007. Control of Stress-Dependent Cardiac Growth and Gene Expression by MicroRNA. *SCIENCE* 316:575–579.

van Veen, van Rijen, Opthof, T. 2001. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovascular Research* 51:217–229.

Vector Laboratories. 2015. Product information: VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI. Luettu 10.6.2016. <http://docs.vectorlabs.com/protocols/H-1200.pdf>

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

Weltner, J., Trokovic, R. & Otonkoski, T. 2014. Indusoidut pluripotentit kantasolut lääketieteellisessä tutkimuksessa. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 130:785–792.

Woodcock, E. & Matkovich, S. 2005. Cells in focus: Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37(9):1746–1751.

Yang, X., Pabon, L. & Murry, E. 2014. Engineering Adolescence: Maturation of Human Pluripotent Stem-Cell Derived Cardiomyocytes. *National Institute of Health Public Access: Author Manuscript* 114(3): 511–523.

Yang, X., Rodriguez, M., Pabon, L., Fischer, K., Reinecke, H., Regnier, M., Sniadecki, N., Ruohola-Baker, H. & Murry, C. 2014. Tri-iodo-L-thyronine Promotes the Maturation of Human Cardiomyocytes-derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *National Institute of Health Public Access: Author Manuscript* 72:296–304.

Young, H. & Black, A. 2004. Adult Stem Cells. *The Anatomical Record Part A*. 276A:75–102.

Zhou, W. & Freed, C. 2009. Adenoviral Gene Delivery Can Reprogram Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 27:2667–2674.

**LIITTEET**

## Liite 1. Kasvatusmedieissa käytetyt reagenssit

**mTSeR™1 + P/S, 500 ml**

400 ml	mTeSR™1 Basal Medium (Stemcell™ Technologies)
100 ml	mTeSR™1 5X Supplement (Stemcell™ Technologies)
2,5 ml	Pen/Strep (Gibco)

**RPMI+B27, 50 ml**

48,75 ml	RPMI 1640 (Life Technologies)
1 ml	B27® Supplement (Life Technologies)
0,25 ml	Pen/Strep (Gibco)

**RPMI+B27 -ins., 50 ml**

48,75 ml	RPMI 1640 (Life Technologies)
1 ml	B27® -insulin Supplement (Life Technologies)
0,25 ml	Pen/Strep (Gibco)





2(3)

Plate Name: Plate2							
Detector	Reporter	Threshold					
MYH6	FAM	0,891066	MYH6	GAPDH			
Well	SampleName	Ct	kalibraattorin ka			keskihajonta	keskivirhe
16	2	24,3678	24,56000	21,97966667	1,1429271		
17	2	24,6407	24,56000	21,979667	0,8953558		
18	2	24,6715	24,56000	21,979667	0,9772049	1,0051626	0,1261313
19	3	24,6697	24,56000	21,979667	2,1662999		0,0728219
20	3	24,591	24,56000	21,979667	2,2445605		
21	3	25	24,56000	21,979667	1,2878218	1,8995608	0,5312246
22	4	24,8305	24,56000	21,979667	4,8767939		0,3067027
23	4	24,9003	24,56000	21,979667	6,3428578		
24	4	24,8759	24,56000	21,979667	6,5180165	5,9125561	0,9012617
61	#NIMI?		24,56000	21,979667	5,9807773		0,5203437
70	univ	22,0745	24,56000	21,979667	8,0995008		
71	univ	22,1682	24,56000	21,979667	8,0698005		
72	univ	22,1387	24,56000	21,979667	7,9592528	8,0428514	0,0739058
						0,0426695	

Plate Name: Plate2							
Detector	Reporter	Threshold					
CACNA1C	FAM	0,803933	CACNA1C	GAPDH			
Well	SampleName	Ct	kalibraattorin ka			keskihajonta	keskivirhe
28	2	30,4609	30,64133333	21,97966667	1,1336432		
29	2	30,4631	30,641333	21,979667	1,0713768		
30	2	31	30,641333	21,979667	0,8233433	1,0094544	0,1641563
31	3	31,7527	30,641333	21,979667	1,0818991		0,0947757
32	3	31,2418	30,641333	21,979667	1,5125324		
33	3	31,5176	30,641333	21,979667	0,9517575	1,182063	0,2934991
34	4	31,7883	30,641333	21,979667	2,6563882		0,1694518
35	4	31,9959	30,641333	21,979667	3,1402208		
36	4	31,7789	30,641333	21,979667	3,6878143	3,1614744	0,5160414
73	#NIMI?		30,641333	21,979667	404,96853		0,2979366
82	univ	29,6866	30,641333	21,979667	2,8031831		
83	univ	29,9317	30,641333	21,979667	2,5146646		
84	univ	29,8989	30,641333	21,979667	2,4858961	2,601248	0,1754716
						0,1013086	

Plate Name: Plate2							
Detector	Reporter	Threshold					
SCN5A	FAM	0,496731	SCN5A	GAPDH			
Well	SampleName	Ct	kalibraattorin ka			keskihajonta	keskivirhe
40	2	32,2363	32,18706667	21,97966689	0,966807		
41	2	32,0887	32,18707	21,979667	1,0136805		
42	2	32,2362	32,18707	21,979667	1,0203775	1,0002883	0,0291884
43	3	32,5843	32,18707	21,979667	1,7748573		0,0168519
44	3	33,0919	32,18707	21,979667	1,2248482		
45	3	33,1156	32,18707	21,979667	0,9178963	1,3058672	0,4341873
46	4	32,4993	32,18707	21,979667	4,737753		0,2506781
47	4	32,5385	32,18707	21,979667	6,2941127		
48	4	32,1581	32,18707	21,979667	8,2781191	6,4366616	1,7744825
85	#NIMI?		32,18707	21,979667	1182,3185		1,0244979
94	univ	29,9327	32,18707	21,979667	6,90051		
95	univ	30,12	32,18707	21,979667	6,4433144		
96	univ	30,1633	32,18707	21,979667	6,0423217	6,4620487	0,4294008
						0,2479147	



3(3)

Plate Name: Plate3							
Detector	Reporter						
MYH7	FAM		MYH7	GAPDH			
Well	SampleName	Ct	alibraattorin ka			keskihajonta	keskivirhe
4	2	23,6624	23,7003	21,9797	1,0269742		
5	2	23,6944	23,7003	21,9797	0,950725		
6	2	23,7442	23,7003	21,9797	1,0240598	1,0005864	0,0432058 0,0249449
7	3	26,5613	23,7003	21,9797	0,321725		
8	3	26,6035	23,7003	21,9797	0,3065512		
9	3	26,8177	23,7003	21,9797	0,2013113	0,2765292	0,0655809 0,0378632
10	4	27,1753	23,7003	21,9797	0,5290221		
11	4	27,2504	23,7003	21,9797	0,6855339		
12	4	27,0618	23,7003	21,9797	0,7893844	0,6679802	0,1310658 0,0756709
49	#NIMI?		23,7003	21,9797	3,2957344		
58	univ	21,3876	23,7003	21,9797	7,185059		
59	univ	21,4802	23,7003	21,9797	7,1641721		
60	univ	21,4031	23,7003	21,9797	7,3030545	7,2174285	0,0748861 0,0432355

Plate Name: Plate3							
Detector	Reporter						
KCN1	FAM		KCN1	GAPDH			
Well	SampleName	Ct	alibraattorin ka			keskihajonta	keskivirhe
16	2	33,9024	34,5688333	21,9797	1,5876945		
17	2	35,0249	34,56883333	21,9797	0,6902225		
18	2	34,7792	34,56883333	21,9797	0,9124601	1,063459	0,4674019 0,2698546
19	3	33,2299	34,56883333	21,9797	5,9127666		
20	3	33,4043	34,56883333	21,9797	5,1405878		
21	3	34,013	34,56883333	21,9797	2,5681569	4,5405038	1,7511936 1,0110521
22	4	32,4574	34,56883333	21,9797	25,418964		
23	4	33,1217	34,56883333	21,9797	21,895057		
24	4	33,3192	34,56883333	21,9797	19,292034	22,202018	3,0749777 1,7753392
50	#NIMI?		34,56883333	21,9797	6161,788		
70	univ		34,56883333	21,9797			
71	univ		34,56883333	21,9797			
72	univ		34,56883333	21,9797			

Plate Name: Plate3							
Detector	Reporter						
KCNH2	FAM		KCNH2	GAPDH			
Well	SampleName	Ct	alibraattorin ka			keskihajonta	keskivirhe
28	2	27,6791	27,708900	21,9797	1,0212245		
29	2	27,4521	27,7089	21,9797	1,1313145		
30	2	27,9955	27,7089	21,9797	0,8654966	1,0060118	0,1335603 0,0771111
31	3	27,8949	27,7089	21,9797	2,0546605		
32	3	27,8828	27,7089	21,9797	2,0328447		
33	3	28,0708	27,7089	21,9797	1,3594282	1,8156445	0,3952454 0,228195
34	4	29,4771	27,7089	21,9797	1,7269185		
35	4	29,3213	27,7089	21,9797	2,6262423		
36	4	29,2198	27,7089	21,9797	2,8469161	2,4000256	0,5932783 0,3425294
51	#NIMI?		27,7089	21,9797	53,047027		
82	univ	28,1451	27,7089	21,9797	1,0688801		
83	univ	27,8447	27,7089	21,9797	1,3994889		
84	univ	27,8886	27,7089	21,9797	1,3118475	1,2600721	0,1712777 0,0988872

## Liite 4. CytoSpectre tulokset

	22 päivää	Circ. variance	228 päivää	Circ. variance	373 päivää	Circ. variance
	1	0,283771379	1	0,683507657	1	0,351205211
	2	0,66515501	2	0,500482642	2	0,374055949
	3	0,515007675	3	0,2774566	3	0,32068972
	4	0,539490152	4	0,554793121	4	0,479185994
	5	0,652711042	5	0,491258035	5	0,171210674
	6	0,940187416	6	0,460835429	6	0,145386883
	7	0,684667323	7	0,28467634	7	0,361099584
	8	0,709813204	8	0,56441876	8	0,106702751
	9	0,850684951	9	0,238479569	9	0,290395178
	10	0,317948732	10	0,951378551	10	0,317658588
	11	0,377878796	11	0,23117781	11	0,324805636
	12	0,45151339	12	0,296160748	12	0,126836219
	13	0,662721795	13	0,271693359	13	0,340481143
	14	0,492865271	14	0,185206126	14	0,366192336
	15	0,419076499	15	0,585823632		
	16	0,71427271	16	0,654404742		
	17	0,46129623	17	0,766207068		
	18	0,26585605	18	0,565957864		
	19	0,578374344	19	0,401428991		
	20	0,569363245	20	0,37369444		
	21	0,840185012	21	0,570099189		
	22	0,600050719	22	0,343567723		
			23	0,274211039		
			24	0,333050571		
			25	0,432317246		
			26	0,545294836		
keskiarvo		0,572404134		0,455291619		0,291136133

KAIVOT	
Kuva	Circ. variance
1	0,642107985
2	0,499360496
3	0,345331223
4	0,393318149
5	0,643996913
6	0,514715086
7	0,449743736
8	0,378486649
9	0,663046984
10	0,785587626
11	0,790882762
12	0,85089526
13	0,444337372
14	0,448530742
15	0,276449022
16	0,755063447
17	0,348012344
18	0,448272055
19	0,366815312
keskiarvo	0,528681745