

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

**Inimese embrüonaalsete tüvirakkude kultiveerimiseks sobiva B8 söötme valmistamine
ja testimine**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Maria-Elisabeth Vaigo

Juhendaja PhD Tõnis Org

TARTU 2021

„Inimese embrüonaalsete tüvirakkude kultiveerimiseks sobiva B8 söötme valmistamine ja testimine“

Embrüonaalsed ja indutseeritud pluripotentsed tüvirakud on osutunud väga väärtuslikuks erinevate bioloogiliste protsesside uurimisel ja omavad suurt potentsiaali kliinilises rakuteraapias. See on põhjustanud vajaduse keemiliselt defineeritud komponentidega, toiterakkude- ja ksenovabade kultuurisüsteemide järel. Kommertsiaalsed tüvirakusöötmed on väga kulukad ja vajavad üldjuhul igapäevast söötmevahetust, mille tõttu on nendega töötamine keeruline. Hiljuti avaldatud B8 sööde pakub kommertsiaalsetele söötmetele alternatiivi olles suhteliselt lihtsasti ise valmistatav, kuluefektiivne ja toetab tüvirakkude kasvu ka ilma igapäevase söötmevahetusega. Sellest tulenevalt püstitati käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks valmistada B8 tüvirakusööde ja testida selle sobivust inimese embrüonaalsete tüvirakkude kasvatamiseks.

Märksõnad: hES rakud, pluripotentsus, tüvirakusööde, B8 sööde

CERCS kood: B200 Tsütoloogia

„Preparation and testing of B8 media suitable for human embryonic stem cell cultivation“

Embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells have proven to be very valuable in the studies of various biological processes and have shown great potential in cell therapy. This has created a need for chemically defined, feeder-free and xeno-free culture systems. Commercial stem cell media is very expensive and requires daily medium changes, which makes it difficult to work with. The recently published B8 medium offers an alternative to commercial stem cell media, being relatively easy to prepare, cost-effective and supporting stem cell growth without daily media changes. Consequently, the aim of the present bachelor's thesis was to prepare a B8 stem cell medium and test its suitability for human embryonic stem cells.

Keywords: hES cells, pluripotency, stem cell media, B8 media

CERCS code: B200 Cytology

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Embrüonaalsed tüvirakud	8
1.1.1. Indutseeritud pluripotentsed tüvirakud	11
1.2. Embrüonaalsete tüvirakkude kultiveerimine	11
1.2.1. Pluripotentsust tagavad signaalirajad	12
1.2.2. Tüvirakkude passeerimine	16
1.3. Enim kasutatavad tüvirakusöötmed	16
1.3.1. B8 tüvirakusööde	19
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	20
2.1. Töö eesmärgid	20
2.2. Materjal ja metoodika	20
2.2.1. Söötmed, bakteritüved, plasmiidid	20
2.2.2. Plasmiidse DNA eraldamine	21
2.2.3. Restriksioonianalüüs ja geelelektroforees	21
2.2.4. Valkude ekspresseerimine	22
2.2.5. Valkude puhastamine	23
2.2.6. B8 söötme valmistamine	24
2.2.7. Tüvirakkude kasvatamine koekultuuris	24
2.2.8. Pluripotentsuse markerite analüüs läbivoolutsütomeetriaga	25
2.2.9. Andmete statistiline analüüs	26
2.3. Tulemused	27
2.3.1. B8 söötme valmistamiseks vajalike plasmiidide kontrollimine	27

2.3.2. Valguekspressiooni kontrollimine	28
2.3.3. Valkude puhastamine	28
2.3.4. B8 söötme valmistamine ja testimine	31
2.3.5. B8 söötme võrdlus kommertsiaalsete söötmetega	35
2.4. Arutelu	37
KOKKUVÕTE.....	39
SUMMARY	40
TÄNUSÕNAD	41
KIRJANDUSE LOETELU.....	42
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	46
LISAD.....	47
Lisa 1	47
Lisa 2	48
Lisa 3	50
Lisa 4	52
Lisa 5	53
LIHTLITSENTS.....	54

KASUTATUD LÜHENDID

2i – MEK/ERK ja GSK3 raja inhibiitoreid sisaldav keskkond

BMP – luu morfogeneetiline valk (*bone morphogenetic protein*)

BMPR I/II – luu morfogeneetilise valgu retseptor I/II

BSA – veise seerumi albumiin (*bovine serum albumin*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool (*4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

EpiS rakud – epiblasti tüvirakud (*epiblast stem cells*)

ERK – ekstratsellulaarselt reguleeritav kinaas (*extracellular signal-regulated kinase*)

FBS – fetaalne veiseseerum (*fetal bovine serum*)

FGF – fibroblasti kasvufaktor (*fibroblast growth factor*)

FGFR – fibroblasti kasvufaktori retseptor (*insulin-like growth factor 1 receptor*)

GSK3 – glükogeeni süntaasi kinaas 3 (*glycogen synthase kinase 3*)

hES rakud – inimese embrüonaalsed tüvirakud (*human embryonic stem cells*)

IGF-II – insuliini kasvufaktor II (*insulin growth factor II*)

IGF1R - insuliinilaadse kasvufaktor 1 retseptor

iPS rakud – indutseeritud pluripotentsed tüvirakud (*induced pluripotent stem cells*)

IPTG – isopropüül-β-D-1-tiogalaktopüranosiid (*isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*)

JAK – Janus kinaas (ingl. k. *janus kinase*)

KLF4 – kruppelilaadne faktor 4 (*kruppel-like factor 4*)

LIF – leukeemiat inhibeeriv faktor (*leukemia inhibitory factor*)

LIFR – leukeemiat inhibeeriva faktori retseptor

LPR – madala tihedusega lipoproteiinireseptoriga seotud valk (*low-density-lipoprotein-related protein*)

MEF – hiire embrüonaalsed fibroblastid (*mouse embryonic fibroblasts*)

MEK – mitogeenaktiveeritud proteiinkinaas (*mitogen-activated protein kinase*)

mES rakud – hiire embrüonaalsed tüvirakud (*mouse embryonic stem cells*)

mTOR – rapamütsiini mehaaniline sihtmärkvalk (*mammalian target of rapamycin*)

NRG1 – neureguliin1 (*neuregulin 1*)

OCT4 – oktameeri siduv transkriptsioonifaktor 4 (*octamer-binding transcription factor 4*)

PBS – fosfaat-puhverdatud soolalahus (*phosphate buffered saline*)

PFA – paraformaldehüüd (*paraformaldehyde*)

PI₃K – fosfoinosiid-3-kinaas (*phosphoinositide 3-kinase*)

Stat3 – signaali muundur ja transkriptsiooni aktivaator 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*)

TCF – T-raku faktor (*T cell factor*)

TGF β – transformatiivne kasvufaktor β (*transformative growth factor β*)

TGF β R – transformatiivse kasvufaktor β retseptor (*transformative growth factor β receptor*)

SISSEJUHATUS

Embrüonaalsed tüvirakud pärinevad embrüo blastotsüsti sisemisest rakumassist. Neid iseloomustab piiramatu jagunemisvõime ja pluripotentne arengupotentsiaal ehk võime diferentseeruda kõikideks kehas leiduvateks rakkudeks. Need omadused muudavad tüvirakud oluliseks mudelsüsteemiks nii alusuuringute kui ka regeneratiivse meditsiini jaoks.

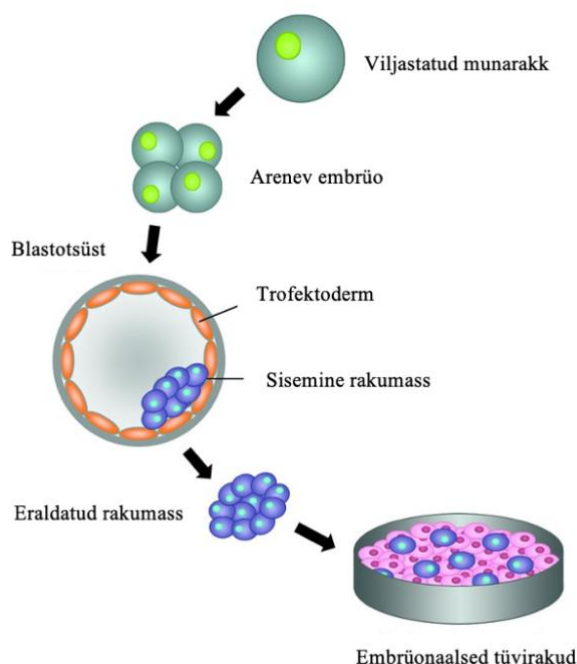
Embrüonaalsete tüvirakkude kultiveerimisel on oluline säilitada rakkude pluripotentsus ja piiramatu jagunemisvõime. Need omadused tagatakse tänu kindlatele söötmekomponentidele ja kasvatamistingimustele, mis võimaldavad rakusisese pluripotentsusvõrgustiku täpset regulatsiooni. Aastate jooksul on proovitud kultiveerimistingimusi ja rakkude passeerimise meetodeid pidevalt optimeerida, et luua embrüonaalsetele tüvirakkudele kõige sobivam ja kasvu soodustavam keskkond. Inimese pluripotentsete tüvirakkude jaoks saadaval olevad kommertsiaalsed defineeritud koostisega söötmed on kulukad ja enamus neist vajavad igapäevast söötmevahetust. Kulude vähendamiseks ja rakukultuuri laboritöö lihtsustamiseks on Kuo *et al.* (2020) loonud B8 söötme, mida on võimalik laboris ise valmistada.

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse osas antakse ülevaade embrüonaalsete tüvirakkude kultiveerimistingimustest ja signaaliradadest, mis toetavad nende pluripotentset olekut. Ekperimentaalse eesmärgiks oli valmistada B8 tüvirakusööde ja testida selle sobivust inimese embrüonaalsete tüvirakkude kasvatamiseks hinnates pluripotentsuse markerite ekspressiooni läbivoolutsütomeetrilise analüüsiga.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Embrüonaalsed tüvirakud

Inimese embrüonaalne areng saab alguse viljastatud munaraku lõigustumisega, mille tulemusena moodustub ühetaolistest rakkudest koosnev kobarloode ehk moorula. Moorula staadiumile järgneb rakkude esmane diferentseerumine ja blastotsüsti kujunemine. Blastotsüst koosneb sisemisest rakumassist ja seda ümbritsevast välimisest rakukihist ehk trofektodermist (Joonis 1). Trofektoderm osaleb embrüo implantatsioonis ja annab aluse ekstraembrüonaalsete kudede moodustumisele. Blastotsüsti sisemuses paikneb pluripotentsete rakkude kogum, mis on võimelised piiramatult jagunema ja diferentseeruma organismi kõikideks rakutüüpideks. Nende rakkude eraldamisel saadakse embrüonaalsed tüvirakud, mida on võimalik koekultuuris kasvatada (Boroviak ja Nichols, 2014).



Joonis 1. Embrüonaalsete tüvirakkude eraldamine. Kohandatud Landry, Zucker *et al.* (2004) järgi.

Embrüonaalsed tüvirakud on võimelised diferentseeruma kõigiks kolmeks lootelehe derivaadiks (ekto-, meso- ja endodermiks), millest saavad alguse kõik organismi koed ja elundkonnad. Lisaks *in vivo* arengupotentsiaalile on embrüonaalsetel tüvirakkudel märkimisväärne võime sobivatel tingimustel *in vitro* rakukultuuris diferentseeruda erinevateks rakkudeks. Peale pluripotentsuse iseloomustab neid piiramatu jagunemisevõime (ingl. k. *self-renewal*), mis võimaldab toota suurel hulgal soovitud rakutüüpe (Keller, 1995). Need omadused on võimaldanud põhjalikumalt uurida varajast embrüonaalset arengut ja aidanud kaasa regeneratiivse meditsiini ning rakuteraapia kontseptsiooni kujunemisele.

Esmakordselt õnnestus embrüonaalsed tüvirakud eraldada 1981. aastal hiire embrüo blastotsüstist (Evans ja Kaufman, 1981). Hiire embrüonaalsed tüvirakud (mES rakud, ingl. k. *mouse embryonic stem cells*) on võimelised moodustama kimääre ja panustama areneva embrüo kõikidesse rakutüüpidesse, kaasa arvatud iduliini (Bradley et al., 1984). Embrüonaalsete tüvirakkude *in vitro* geneetiline manipuleerimine on võimaldanud luua kimäärseid ja geneetiliselt modifitseeritud katseloomi ning uurida *in vivo* geenide avaldumist ja funktsiooni. Inimese embrüonaalsed tüvirakud (hES, ingl. k. *human embryonic stem cells*) erinevad mES rakkudest mitmete omaduste ja kultiveerimistingimuste poolest, mille tõttu õnnestus esimene inimese tüvirakuliin luua alles 1998. aastal (Thomson et al., 1998). Erinevusi mES ja hES rakkude vahel saab tänapäeval seletada kuulumisega kahte erinevasse embrüonaalse tüviraku pluripotentsuse staadiumisse, milleks on naiivne (ingl. k. *naive*) ja diferentseerumiseks valmistuv (ingl. k. *primed*) (Nichols ja Smith, 2009).

Naiivsed tüvirakud on hiire implantatsioonieelsed blastotsüsti sisemise rakumassi rakud ja naiivsed hES rakud. Diferentseerumiseks valmistuva staadiumi alla kuuluvad traditsiooniliselt eraldatud hES rakud, mis sarnanevad epigeneetiliselt hiire implantatsioonijärgsete epiblasti tüvirakkudega (EpiS rakud, ingl. k. *epiblast stem cells*) (Gafni et al., 2013). Naiivsed hES rakud on eraldatud inimese blastotsüsti varasemast staadiumist ja sarnanevad omaduste poolest implantatsioonieelsete embrüonaalsete epiblasti rakkudega (Dodsworth et al., 2020). Embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsuse staadiumit on võimalik spetsiifiliste koekultuuri tingimustega muuta (Gafni et al., 2013; Hanna et al., 2010).

Naiivse staadiumi tüvirakkude arengupotentsiaal on võrreldes diferentseerumiseks valmistuvate tüvirakkudega suurem olles võimelised panustama hiire kimäärse embrüo loomisesse (Gafni et al., 2013; Weinberger et al., 2016). Võrreldes diferentseerumiseks valmistuva olekuga on naiivse staadiumi tüvirakkude genoom vähem metüleeritud. Rakud on klonogeensemad ja XX kariotüübi puhul mõlema aktiivse X kromosoomiga. Lisaks moodustavad naiivse pluripotentsusega rakud tihedaid kuplikujulise morfoloogiaga rakukolooniaid. Diferentseerumiseks valmistuvad tüvirakud kasvavad seevastu söötmel tihedalt ühekihilise lameda kolooniana (Tabel 1) (Nichols ja Smith, 2009). Nii naiivset kui ka diferentseerumiseks valmistuvat olekut iseloomustavad kindlad kultiveerimistingimused, mis tagavad rakusiseste signaaliradade täpse regulatsiooni ja tüvirakkude arengupotentsiaali. Kuigi naiivse staadiumi tüvirakkude arengupotentsiaal on suurem (Gafni et al., 2013), kasutatakse teadustöös peamiselt diferentseerumiseks valmistuvaid inimese embrüonaalseid pluripotentseid tüvirakke. Selle tõttu keskendutakse ka käesolevas bakalauresetöös just selle staadiumi rakkudele ja valmistatud B8 sööde toetab just seda pluripotentsuse olekut.

Tabel 1. Naiivsete ja diferentseerumiseks valmistuvate tüvirakkude võrdlus. Tabelis on välja toodud naiivsete ja diferentseerumiseks valmistuvate pluripotentsete tüvirakkude erinevused morfoloogias, söötmekomponentides ja genoomis. FGF – fibroblasti kasvufaktor, iPS rakud – indutseeritud pluripotentsed tüvirakud, LIF – leukeemiat inhibeeriv faktor, 2i – kaks väikesemolekulist kinaaset inhibiitorit ehk MEK/ERK ja GSK3 inhibiitorid. (Gafni *et al.*, 2013; Nichols ja Smith 2009)

	Naiivne	Diferentseerumiseks valmistuv
Rakud	mES rakud, naiivsed hES rakud, naiivsed iPS rakud	hES rakud, hiire EpiS rakud, iPS rakud
Morfoloogia	Kompaktne, kuplikujuline	Kompaktne, ühekihiline
Enamlevinud söötmekomponendid	LIF + 2i	FGF + aktiviin
DNA metüleeritus	Hüpometüleeritud	Hüpermetüleeritud
Klonogeensus	Kõrge	Madal
XX kariotüüp	Mõlemad X kromosoomid aktiivsed	Üks X kromosoom inaktiveeritud

Embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsuse säilitamisel on oluline kindlate geenide regulatsioon, milles osalevad mitmeid transkriptsioonifaktorid. Transkriptsioonifaktorid Oct4 (Pou5f1), Sox2 ja Nanog on põhilisel kohal pluripotentsust tagavate geenide avaldumise signaalvõrgustikus. Samuti aitavad nad kaasa tüvirakkude iseuuenemisele (Boyer *et al.*, 2005). Nende faktorite vaigistamisel või üleekspresseerimisel algab tüviraku diferentseerumine kindlas suunas. Näiteks Oct4 (ingl. k. *octamer-binding transcription factor 4*) puudumisel hakkab *in vivo* ja *in vitro* rakukultuur diferentseeruma trofektodermi rakkudeks (Loh *et al.*, 2006). Seega peab transkriptsioonifaktorite ekspressioon ja tase olema täpselt reguleeritud, et tagada õige rakupotents.

Igal transkriptsioonifaktoril on oma sihtmärkgeenid, mille ekspressiooni nad koos teiste faktoritega võimendavad või pärsvivad. Lisaks sellele reguleerivad ja kontrollivad nad vastastikku üksteise avaldumist. Mitmel juhul võivad nende sihtmärkgeenid kattuda või reguleerib kindlat järjestust mitu transkriptsioonifaktorit korraga (Boyer *et al.*, 2005). Näiteks Oct4 seondub kindlatele DNA järjestustele vaid heterodimeerselt koos transkriptsioonifaktor Sox2-ga (Loh *et al.*, 2006). Nanog seondub omakorda heterodimeeriga võimendades geeniekspressiooni veelgi (Chen *et al.*, 2008). Niimoodi kontrollitakse pidevalt üksteise taset rakus ja hoitakse seda stabiilsena. Transkriptsioonifaktorid Oct4, Sox2 ja Nanog on lisaks antikehadega detekteeritavatele raku pinnamarkeritele peamised pluripotentsuse markerid. Selle tõttu kasutatakse ka käesoleva bakalaureusetöö eksperimentaalsas neid transkriptsioonifaktoreid embrüonaalse tüvirakuliini H9 pluripotentsuse kontrollimiseks.

1.1.1. Indutseeritud pluripotentsed tüvirakud

hES rakkude kasutamisevõimalustel teaduses ja regeneratiivses meditsiinis on teatud piirangud. Esiteks võib regeneratiivses meditsiinis immuunsobimatus doonor- ja retsipienttöve vahel kutsuda esile immuunvastuse, mille tagajärjel ei võta organism doonorrakke omaks. Teiseks piirab embrüonaalsete tüvirakkude eraldamise eetilised nendele rakendamist teaduses. Nimelt kasutatakse embrüonaalsete tüvirakkude saamiseks blastotsüsti, millel on olemas potentsiaal areneda inimeseks. Need kitsaskohad leidsid lahenduse 2006. aastal, kui loodi esimesed indutseeritud pluripotentsed tüvirakud (iPS rakud, ingl. k. *induced pluripotent stem cells*) (Takahashi ja Yamanaka, 2006). iPS rakud on pärit diferentseerunud somaatilistest rakkudest, mis on ümberprogrammeeritud embrüonaalse tüviraku staatusesse (Medvedev *et al.*, 2010). On avaldatud mitmeid erinevaid ümberprogrammeerimise meetodeid, millest kõige laialdasemalt on kasutusel transkriptsioonifaktorite üleekspressioonil põhinevad meetodid. Indutseerides raku pluripotentsust tagavate transkriptsioonifaktorite Oct4, Sox2, c-Myc ja Klf4 ekspressiooni somaatilistes rakkudes, on võimalik luua iPS rakuliine (Takahashi ja Yamanaka, 2006). Selliste rakkude loomine on veelgi laiendanud pluripotentsete tüvirakkude kasutust teadustöös. Antud bakalaureusetöö tulemusena valminud B8 söödet on plaan edaspidi kasutada muuhulgas ka iPS rakkude kultiveerimiseks.

1.2. Embrüonaalsete tüvirakkude kultiveerimine

Embrüonaalsete tüvirakkude kultiveerimiseks on vajalikud spetsiifilised kasvutingimused. Üheks levinumaks meetodiks on olnud toiterakkude kasutamine. Algselt kultiveeriti hES rakke sarnaselt naiivsetele mES rakkudele hiire embrüonaalsete fibroblastide (MEF, ingl. k. *mouse embryonic fibroblast*) peal veise loote seerumis (FBS, ingl. k. *fetal bovine serum*) (Thomson *et al.*, 1998). Toiterakkudena kasutatavad fibroblastid toodavad endogeenselt fibroblasti kasvufaktorit (FGF, ingl. k. *fibroblast growth factor*), mis on vajalik tüvirakkude pluripotentsuse säilitamiseks. FGF võimendab diferentseerumiseks valmistuvates hES rakkudes IGF-II (ingl. k. *insulin growth factor II*), TGF β (ingl. k. *transforming growth factor β*) ja aktiviini ekspressiooni, mis tagavad rakkude pluripotentse oleku ja piiramatut jagunemisvõimet (Bendall *et al.*, 2007; Vallier *et al.*, 2005). Loomset päritolu söötmekomponendid ei sobi aga hES rakkude kultiveerimiseks regeneratiivses meditsiinis. Esiteks võib immuunsobimatus inimese ja loomsete komponentide vahel esile kutsuda immuunvastuse (Desai *et al.*, 2015). Teiseks suureneb oluliselt saastumise oht, mida võib tekitada loomapatogeenide edasikandumine (Cobo *et al.*, 2008). Lisaks esineb toiterakkude ja

seerumite kasutamisel veel teisigi piiranguid. Toiterakud vajavad kindlaid kultiveerimistingimusi ja võivad omavahel partiides varieeruda. See mõjutab tüvirakkude diferentseerumisvõimet, mis võib kujuneda probleemiks regeneratiivses meditsiinis spetsiifiliste rakuliinide loomisel (Desai *et al.*, 2015). Embrüonaalsete tüvirakkude kultiveerimiseks kasutatav seerum on mitmelt loomalt saadud segu, mis võib olenevalt tooteseeriast erineda (Lee ja Lee, 2011). Selle tõttu keskendutakse tänapäeval toiterakkude-, seerumi- ja ksenovabade kultuurisüsteemide loomisele keemiliselt defineeritud söötme komponentidega.

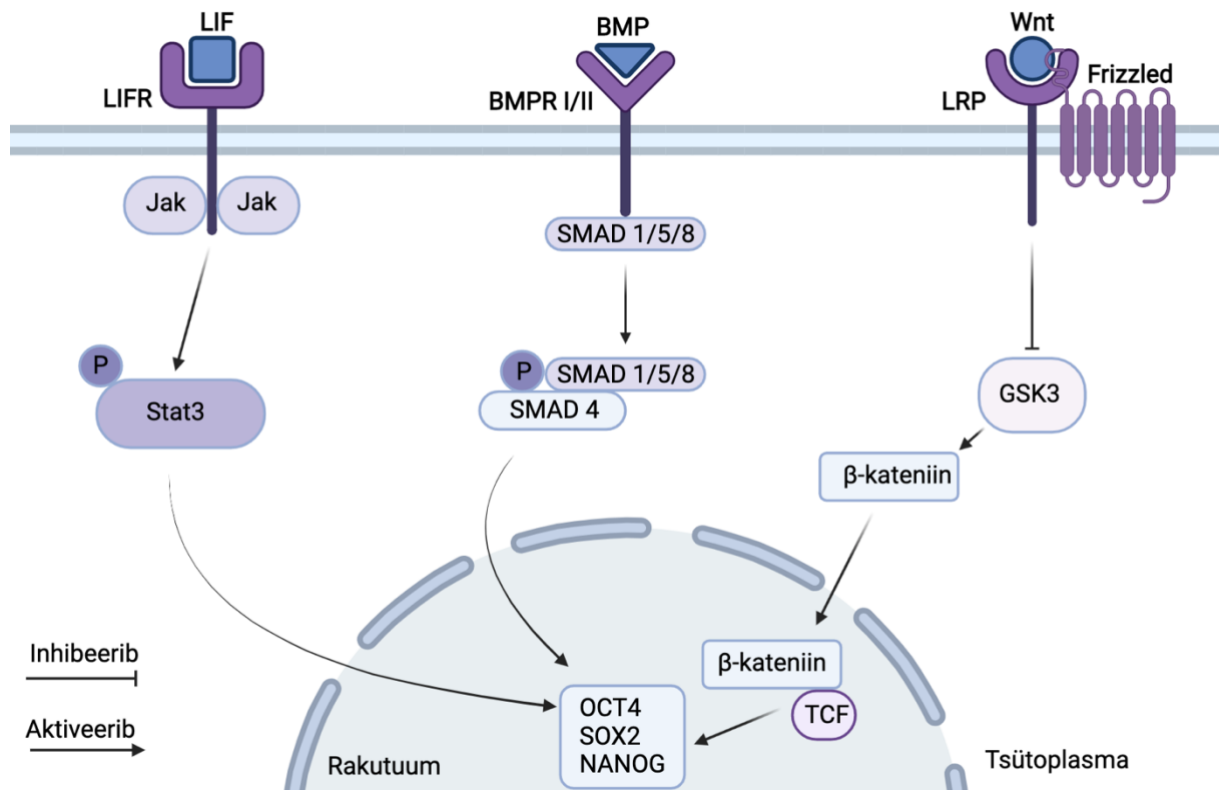
1.2.1. Pluripotentsust tagavad signaalirajad

Embrüonaalsete tüvirakkude arengupotentsiaali säilitamiseks kultuurisüsteemis on vaja kindlate faktorite koosmõju, mis tagavad rakusiseste signaalivõrgustike täpse regulatsiooni. Naiivseid ja diferentseerumiseks valmistuvaid tüvirakuliine iseloomustavad erinevad söötmetingimused, mille tõttu edastatakse rakkude jagunemisvõimet ja pluripotentsust reguleerivad signaalid tuuma läbi erinevate signaaliradade. Nii kasvavad diferentseerumiseks valmistuvad tüvirakuliinid näiteks FGF, TGF- β ja insuliini juureolekul (Bendall *et al.*, 2007). Naiivsed tüvirakud vajavad seevastu leukeemiat inhibeeriva faktori (LIF, ingl. k. *leukemia inhibitory factor*) ja kahe väikesemolekulise kinaasse inhibiitori ehk MEK/ERK (ingl. k. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*) ning GSK3 (ingl. k. *glycogen synthase kinase-3*) lisamist söötmesse (Gafni *et al.*, 2013) (vt ka Tabel 1). Rakutuumas on pluripotentsust tagav geeniekspressioon mõlema staadiumi tüvirakkudel sarnane. See võimaldab *in vitro* detekteerida pluripotentsust nii hiire kui ka inimese tüvirakukultuuris sarnastel meetoditel (Xu *et al.*, 2018).

1.2.1.1. JAK/STAT signaalirada

LIF signaliseerib naiivse pluripotentsuse säilitamiseks vajalikku JAK/STAT rada (Joonis 2) (Gafni *et al.*, 2013). JAK/STAT signaalikaskaad algab Stat3 (ingl. k. *signal transducer and activator of transcription 3*) fosforüleerimisega Janus kinaaside (JAK, ingl. k. *Janus kinases*) poolt. Aktiveeritud Stat3 liigub tsütoplasmast rakutuuma, kus signaliseerib kindlaid pluripotentsust tagavaid transkriptsioonifaktoreid (Zhang *et al.*, 2019). Seerumivabas söötmes vajavad naiivsed tüvirakud LIF ja BMP (ingl. k. *bone morphogenetic protein*) faktorite koosmõju, mis aktiveerivad SMAD signaalikaskaadi (Ying *et al.*, 2003). Aktiveeritud BMP retseptor põhjustab retseptor-reguleeritud SMAD valkude fosforüleerimist. Moodustub

SMAD1/5/8 heterotrimeerne kompleks, mis liitub SMAD4 valguga ja siseneb rakutuuma. BMP/SMAD signaalirada reguleerib *Id1* ja *Dusp9* geene, mis takistavad rakkude diferentseerumist neuralses suunas (Morikawa *et al.*, 2016). BMP/SMAD signaalirada koostöös LIF/STAT3 rajaga aitab säilitada naiivsete tüvirakkude piiramatut jagunemisvõimet (Ying *et al.*, 2003). Diferentseerumiseks valmistuvates tüvirakkudes põhjustavad BMP/SMAD ja JAK/STAT signaalirajad pluripotentsust soodustava geeniekspressiooni vähenemist ja seeläbi rakkude diferentseerumist (Beattie *et al.*, 2005).



Joonis 2. Naiivset pluripotentsust toetavad signaalirajad. Joonisel on välja toodud naiivse pluripotentsuse oleku tagavad JAK/STAT, BMP ja Wnt/β-kateniini signaalirajad. BMP – luu morfogeeniline valg, BMPRII – luu morfogeenilise valg retseptor I/II, Frizzled – Wnt/β-kateniini raja retseptor, GSK3 – glükogeeni süntaasi kinaas 3, Jak – Janus kinaas, LIF – leukeemiat inhibeeriv faktor, LIFR – leukeemiat inhibeeriva faktori retseptor, LPR – madala tihedusega lipoproteiinireseptoriga seotud valg (ingl. k *low-density-lipoprotein-related protein*), P – lisatud fosfaatrühm, Stat3 – signaali muundur ja transkriptsiooni aktivaator 3, TCF – T-raku faktor.

1.2.1.2. Wnt/β-kateniini signaalirada

Naiivsetes tüvirakkudes on samuti oluline Wnt/β-kateniini signaalirada (Joonis 2). Diferentseerumiseks valmistuvates inimese tüvirakkudes on Wnt signaal madalam või puudub. Wnt signaaliraja inhibeerimine naiivsetes tüvirakkudes ei põhjusta rakkude diferentseerumist, vaid nende epigeneetilist muutumist diferentseerumiseks valmistuvateks tüvirakkudeks. Wnt

retseptori aktiveerumisel edastatakse signaal läbi β -kateniini rakutuumas. Rakutuumas on β -kateniin koaktivaator TCF (ingl. k. *T-cell factor*) transkriptsioonifaktorile (Xu *et al.*, 2016). β -kateniini seondumisel TCF faktorile aktiveeritakse pluripotentsust tagavate geenide ekspressioon (Lee *et al.*, 2019). Wnt/ β -kateniini signaaliraja käivitumisel fosforüleerib GSK3 β -kateniini põhjustades selle lagunemise. GSK3 inhibeerimise tagajärjel stabiliseeritakse β -kateniini tase rakus ja tagatakse selle transport rakutuumas (Lee *et al.*, 2019). Wnt/ β -kateniini signaalirada on oluline naiivsete tüvirakkude jagunemisel ja kolooniate moodustumisel (Xu *et al.*, 2016). Samuti moduleerib Wnt/ β -kateniini signaalirada teiste signaaliradade regulatsiooni. Näiteks toetab Wnt signaal naiivsetes tüvirakkudes LIF/STAT signaalirada (Zhang *et al.*, 2019).

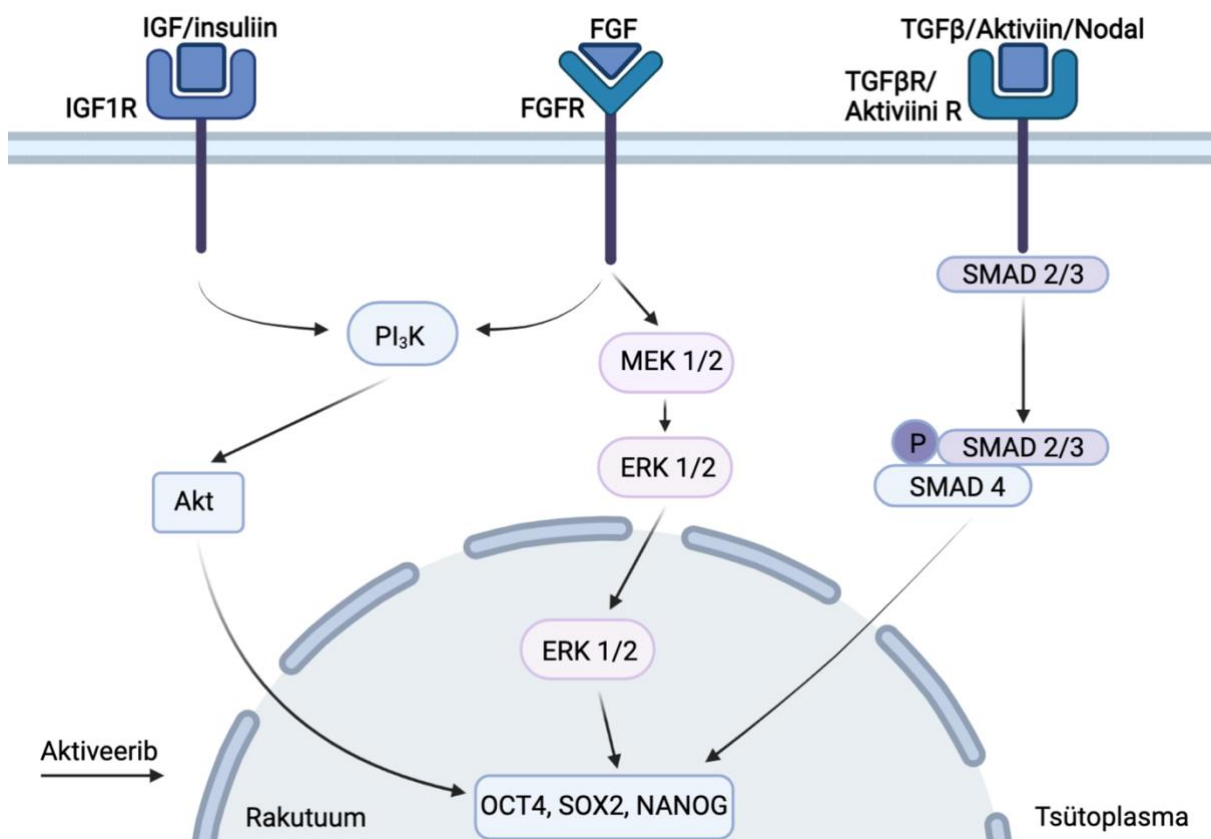
1.2.1.3. FGF signaalirada

Diferentseerumiseks valmistuvad tüvirakuliinid vajavad kultiveerimisel FGF olemasolu. FGF signaalirada inhibeerides hakkavad diferentseerumiseks valmistuvad tüvirakud diferentseeruma (Bendall *et al.*, 2007). Aktiveeritud FGF retseptorid rakupinnal edastavad signaali läbi PI₃K/AKT (ingl. k. *phosphoinositide 3-kinase/AKT*) ja MEK/ERK signaaliradade (Joonis 3) (Mossahebi-Mohammadi *et al.*, 2020). PI₃K/AKT signaalirada aitab inhibeerida apoptoosi ja võimendab rakujagunemist läbi mTOR (ingl. k. *mammalian target of rapamycin*) signaali. mTOR signaali puudumine on embrüonaalsele arengule kahjulik, mille tagajärjel väheneb rakkude elulemus (Oltulu *et al.*, 2019). Aktiivne PI₃K signaal pärsib naiivsetes tüvirakkudes GSK3 aktivatsiooni, mis omakorda võimendab Wnt/ β -kateniini signaalirada (Chen *et al.*, 2012). Naiivsetes tüvirakkudes on vaja inhibeerida FGF signaali poolt aktiveeritud MEK/ERK signaalirada. MEK/ERK signaalirada põhjustab naiivsete mES rakkude diferentseerumist. MEK inhibiitor takistab ERK fosforüleerimist blokeerides selle signaaliraja (Zhang *et al.*, 2019). Diferentseerumiseks valmistuvates tüvirakkudes on MEK/ERK signaal rakkude pluripotentse oleku säilitamiseks vajalik (Li *et al.*, 2007).

1.2.1.4. IGF signaalirada

IGF-II või insuliin on oluline faktor nii embrüo implantatsioonieelses kui ka hilisemas embrüonaalses arengus. Inhibeerides IGF signaalirada, väheneb rakkude elulemus ja klonogeensus (Bendall *et al.*, 2007). IGF-II ja insuliin on mõlemad ligandiks IGF1R (ingl. k. *insulin-like growth factor 1 receptor*) retseptorile, mille kaudu aktiveeritakse PI₃K/AKT signaalirada ja võimendatakse MEK/ERK signaalirada (Girni *et al.* 2014). FGF on oluline

faktor IGF signaaliraja aktivatsioonis (Bendall *et al.*, 2007). On täheldatud, et IGF-II või insuliini puudumisel muutuvad embrüonaalsed tüvirakud MEK/ERK signaaliraja inhibiitorite ja FGF-i suhtes tundlikumaks (Ying *et al.*, 2008).



Joonis 3. Diferentseerumiseks valmistuvate tüvirakkude pluripotentset olekut soodustavad signaalirajad. Joonisel on välja toodud diferentseerumiseks valmistuvate tüvirakkude pluripotentse oleku tagamiseks vajalikud IGF, FGF, TGFβ/Aktiviin/Nodal signaalirajad. Aktiviini R – Aktiviini retseptor, ERK – ekstratsellulaarselt reguleeritav kinaas, FGF – fibroblasti kasvufaktor, FGFR – fibroblasti kasvufaktori retseptor, IGF – insuliini kasvufaktor, IGF1R – insuliinilaadse kasvufaktor 1 retseptor, MEK – mitogeenaktiveeritud proteiinkinaas, TGFβ – transformatiivne kasvufaktor β, TGFβR – transformatiivse kasvufaktor β retseptor.

1.2.1.5. TGF/Aktiviin/Nodal signaalirada

Diferentseerumiseks valmistuvates tüvirakkudes on oluline TGF/Aktiviin/Nodal signaalirada. TGF-β või Aktiviin/Nodal retseptori aktiveerumisel kannab signaali edasi SMAD2/3 valgukompleks, mis seondub tsütoplasmas SMAD4 mediaatorvalguga ja siseneb rakutuumas (Joonis 3) (Bendall *et al.* 2007). See signaalirada mõjutab omakorda mitmeid teisi faktoreid. Näiteks võib TGF aktiveerida MEK/ERK signaalirada või parandada PI3K/AKT signaali madalat aktiivsust (Xu *et al.* 2018). Aktiviin A tagab toiterakkudevabas söötmekeskkonnas hES rakkude iseuuenemise mitme passaaži ehk hõredamaks külvamise vältel. Peale selle stimuleerib

Aktiviin läbi SMAD mediaatorvalkude Nanog, Oct4 ja Sox2 ekspressiooni (Xiao *et al.*, 2006). Nodal faktorit ekspresseerib pluripotentne embrüonaalne tüvirakk ise ning selle signaal kaob diferentseerumisel. Nodal signaali inhibeerimine ei põhjusta üksi rakkude diferentseerumist. Nimelt hakkavad tüvirakud diferentseeruma Aktiviin/Nodal retseptori blokeerimisel (Vallier *et al.*, 2005). TGF või Aktiviin/Nodal inhibeerimisel väheneb SMAD2/3 fosforüleerimine, mis põhjustab hES rakkude diferentseerumist (James *et al.*, 2005).

1.2.2. Tüvirakkude passeerimine

Vältimaks embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumist ja tagamaks nende kiire jagunemise on vaja söödet pidevalt vahetada ja teatud rakukoloonia tiheduse saavutamisel hõredamaks külvata ehk passeerida. Rakkude passeerimist on võimalik teostada manuaalselt või ensümaatilisel. Ensümaatiline passeerimine on võrreldes manuaalsega tüvirakkudele vähem invasiivne ja suuremas mahus kergemini ning kiiremini rakendatav (Moon *et al.*, 2006). Siiski võib ensümaatiline passeerimine päädida rakkude geneetiliste muutustega (Beers *et al.*, 2012). Samuti ei saa ensümaatilise meetodiga selekteerida morfoloogia põhiselt diferentseerumata kolooniaid juba pluripotentse oleku kaotanud tüvirakukolooniatest. Selle tõttu kombineeritakse manuaalset ja ensümaatilist passeerimist omavahel ning eraldatakse enne ensümaatilist töötlust diferentseerunud kolooniad käsitsi (Moon *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2005).

Ensümaatilisel passeeritakse tüvirakke peamiselt dispaasi, kollagenaasi või trüpsiiniga. Kollagenaasi kasutatakse toiterakkude peal kultiveeritavate tüvirakkude passeerimiseks. Dispaasi või trüpsiiniga passeeritakse embrüonaalseid tüvirakke põhiliselt toiterakkudevabas keskkonnas (Beers *et al.*, 2012). Sageli kasutatakse trüpsiini ja EDTA (ingl. k. *ethylenediaminetetraacetic acid*) segu (Ellerström *et al.*, 2007). EDTA seob kahevalentseid metallioone (Mg^{2+} ja Ca^{2+}) põhjustades rakkude vabanemist kasvupinnalt. Kahevalentsed metallioonid soodustavad tüvirakkude kolooniatükkide teket ja paremat kinnitumist uuele kasvupinnale. Võimalik on teostada ka embrüonaalsete tüvirakkude mitte-ensümaatilist passeerimist kasutades ainult EDTA-PBS lahust (Beers *et al.* 2012; Chen, 2013).

1.3. Enim kasutatavad tüvirakusöötmed

Embrüonaalsete tüvirakkude kasvukeskkonna ja aktiveeritavate signaaliradade tundmine on võimaldanud teadlastel välja töötada söötmeid, millel tüvirakkude kasv ning jagunemine oleksid optimaalsed (Kuo *et al.*, 2020). Inimese pluripotentsete tüvirakkude

kultiveerimistingimused on peale esmaseid *in vitro* kasvatamismeetodeid oluliselt muutunud. Toiterakkude asemel kasutatakse tänapäeval enamasti hiire sarkoomi rakkudel põhinevat ekstratsellulaarset maatriksit ehk Matrigeli (Xu *et al.*, 2001). 2006. aastal loodi defineeritud komponentidega mTeSR1 sööde, mis toetab hES rakkude kasvu Matrigeli peal (Ludwig *et al.*, 2006). Lisaks Matrigelile on võimalik hES rakke kultiveerida veel fibronektiini või laminiini sisaldaval kasvupinnal (Tsutsui *et al.*, 2011). Kommertsiaalne mTeSR1 sööde on väga kulukas, mille tõttu on aastate jooksul rõhku pööratud uute söötmete katsetamisele ja tüvirakkude kultiveerimistingimuste optimeerimisele. mTeSR1 söötme põhjal töötati 2011. aastal välja lihtsustatud kaheksast komponendist koosnev keemiliselt defineeritud E8 (ingl. k. *Essential 8*) sööde. E8 söötme komponentideks on insuliin, FGF2, TGF- β , naatrium seleniit, transferriin, L-askorbiinhape, naatriumvesinikkarbonaat (NaHCO_3) ja DMEM/F12 (ingl. k. *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*) (Chen *et al.*, 2011).

Lisaks E8 söötmele on ilmunud veel mitmeid söötmeprotokolle, mida on võimalik laboris ise valmistada. Katsetatud on väga erinevaid söötmekomponentide kooslusi, mis on välja toodud tabelis 2. Läbivateks komponentideks on kõikidel söötmetel DMEM/F12 baassööde, transferriin ja naatrium seleniit. DMEM/F12 on kõige enam kasutatav baassööde seerumivabas keskkonnas kultiveeritavatele tüvirakkudele valmistamisel (Chaudhry *et al.*, 2008). Naatrium seleniit on vajalik tüvirakukolooniate laienemiseks ja transferriin toetab tüvirakkude klonogeensust (Chen *et al.*, 2011). Kuigi mõlemad komponendid on valmistavate söötmete põhikomponentideks, varieerub oluliselt nende kontsentratsioon olenevalt söötimest. Naatrium seleniidi kontsentratsioon söötmes võib olla vahemikus 2,5-20 ng/ml ja transferriini kontsentratsioon 5-20 $\mu\text{g/ml}$. Valdavalt leiab mitmete söötmete komponentide seast L-askorbiinhape 2-fosfaadi, insuliini või IGF ning FGF kasvufaktori olemasolu. L-askorbiinhape toetab tüvirakkude jagunemist (Chen *et al.*, 2011). IGF ja FGF faktorite lisamisega tagatakse tüvirakkude pluripotentsus PI3K/AKT ja MEK/ERK signaaliradade aktivatsiooniga. FGF2 kontsentratsioon erinevates söötmeprotokollis on varieeruvalt 8-100 ng/ml. Välja on töötatud ka selliseid protokolle, kuhu ei ole FGF kasvufaktorit lisatud. Näiteks AI (ingl. k. *Activin and IGF1*) söötmes on näidatud, kuidas 50 ng/ml kontsentratsiooniga Aktiviin A tagab tüvirakkude piiramatut jagunemisvõimet FGF kasvufaktori puudumisel. Aktiviin A koos IGF1 faktoriga aktiveerib PI3K/AKT signaalirada nii naiivsete kui ka diferentseerumiseks valmistuvate tüvirakkude kultiveerimisel (Wamaitha *et al.*, 2020). Leidub ka mitmeid tüvirakusöötmeid, millele on lisatud teisi unikaalseid koostisosasid. Üheks selliseks söötmeiks on näiteks FTDA, millele on lisaks FGF, TGF- β ja aktiviin A-le lisatud dorsomorfiin, mis toimib BMP signaaliraja inhibiitorina ja takistab rakkude diferentseerumist (Breckwoldt *et al.*, 2017). Nii

Tabel 2. Laboris valmistavate söötmeprotokollide võrdlus. Tabelis on välja toodud 9 erineva tüvirakusöötme komponentide erinevused ja sarnasused. FGF2 – fibroblasti kasvufaktor 2, TGFβ – transformatiivne kasvufaktor β, NRG1 – neureguliin 1. (Chen *et al.*, 2011 ⁸; Frank *et al.*, 2012 ⁴; Hannan *et al.*, 2013 ¹; Kuo *et al.*, 2020 ⁹; Marinho *et al.*, 2015 ⁵; Wamaitha *et al.*, 2020 ⁷; Wang *et al.*, 2007 ²; Yamasaki *et al.*, 2014 ³; Yasuda *et al.*, 2018 ⁶)

	CDM-BSA ¹	DC-HAIF ²	hESF9T ³	FTDA ⁴	iDEAL ⁵	AKIT ⁶	AI ⁷	E8 ⁸	B8 ⁹
DMEM/F12 (l)	1	1	ESF	1	1	1	0.49	1	1
L-askorbiinhape 2-fosfaat (µg/ml)	1.25	50	100	-	-	64	-	64	200
Insuliin (µg/ml)	5+7	-	10	5	-	20	50	20	20
IGF (ng/ml)	-	200	-	-	240	-	17	-	-
Transferriin (µg/ml)	3.75+15	10	5	5	12	10	-	10	20
Natrium seleniit (ng/ml)	2.5	17.3	3.5	5	15.4	+	-	14	20
FGF2 (ng/ml)	12	8	10	10	51	-	-	100	40
NRG1 (ng/ml)	-	10	-	-	21	-	-	-	0.1
Aktiviin A (ng/ml)	10	10	-	5	-	-	50	-	-
TGFβ (ng/ml)		-	2	0.2	2	-	-	2	0.1
NODAL (ng/ml)	-	-	-	-	-	-	-	(või 100)	-
BMP inhibiitor (nM)	-	-	-	50	-	-	-	-	-
Veise albumiin (mg/ml)	0.2+5	20				-	-	-	-
Inimese albumiin (mg/ml)	-	-	0.0047	0.1	0.4	-	-	-	-
2-merkaptotetanool (mM)	-	0.1	0.01	-	-	-	-	-	-
1-tioglutserool (µg/ml)	450	-	-	-	-	-	-	-	
Lipiidid (%)	1	-	-	1	0.1	-	-	-	-
NEAA (%)	-	1	-	-	1.95	-	-	-	-
1-azakenpaullone (µM)	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-
ID-8 (µM)	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-
Tacrilomus/FK506 (pM)	-	-	-	-	-	5-200	-	-	-
Penitsilliin Streptomütsiin (ml)	-	-	-	-	-	-	5	-	-
GlutaMax (ml)	-	-	-	-	-	-	5	-	-

kommertsiaalselt müüdavates mTeSR1, E8 kui ka laboris ise valmistatavates AI, E8 ja FTDA söötmetes vajavad kultiveeritavad embrüonaalsed tüvirakud igapäevast söötmevahetust.

1.3.1. B8 tüvirakusööde

Embrüonaalsete tüvirakkudega töötamine rakukultuuris on ressursi ja ajamahukas, kuna nõuab pidevat söötmevahetust. See on problemaatiline paljudele laboritele, kuna eeldab tööd ka nädalavahetuseti ja pühadel. Probleemi lahendamiseks on aastate jooksul proovitud eri meetodeid, kuidas optimeerida tüvirakkude proliferasiooni ja pluripotentsuse säilitamist söötmes (Kuo *et al.*, 2020). Leevendamaks ülaltoodud kitsaskohti on Kuo *et al.* (2020) võtnud kasutusele B8 söötme. B8 sööde optimeerib rakkude kõrget kasvukiirust madala külvitihedusega tingimustes ja hoiab rakke diferentseerumast. Samuti ei pea söödet iga päev vahetama, mis lihtsustab tunduvalt tööd rakukultuuris. B8 sööde sarnaneb komponentide poolest E8 söötmele, kuid selles kasutatakse muteeritud FGF2 valku. Kommertsiaalselt söötmesse lisatav FGF2 ei ole 37 °C juures stabiilne ja degradeerub kiiresti. See on üks põhjustest, miks tüvirakusööde vajab igapäevast vahetust. B8 söötmes kasutatav muteeritud FGF2-G3 valk on temperatuurile vastupidavam ja püsib mitu päeva 37 °C juures stabiilsena. Lisaks on B8 söötmesse lisatud neureguliin 1 (NRG1, ingl. k. *neuregulin 1*) faktor, mis suurendab tüvirakkude kasvukiirust. NRG1 valk toetab kasvu vaid FGF2-G3 juuresolekul. Antud tingimused võimaldavad vältida igapäevast söötmevahetust. B8 sööde on laboritingimustes lihtsasti ise valmistatav ja oluliselt kuluefektiivsem võrreldes kommertsiaalsete mTeSR1 ja E8 söötmetega (Kuo *et al.*, 2020).

Lähtudes teadmistest, millised signaalirajad ja milliste markerite ekspressioon on tüvirakkude pluripotentsse arengupotentsiaali säilitamiseks olulised, seati antud bakalaureusetöö eesmärgiks B8 söötme valmistamine ja selle testimine hES rakkude kultiveerimisel.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eksperimentaalosa eesmärgiks oli valmistada B8 sööde ja testida, kas see on sobilik inimese embrüonaalsete tüvirakkude kultiveerimiseks.

Isevalmistatud B8 söödet testiti kõrvuti kommertsiaalsete mTeSR1 ja E8 söötmetega hinnates läbivoolutsütomeetrilise meetodiga pluripotentsuse markerite ekspressiooni säilimist inimese embrüonaalse H9 tüvirakuliini kultiveerimisel.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Söötmed, bakteritüved, plasmiidid

Antud bakalaureusetöö raames kasutatud plasmiidid telliti Addgene plasmiidide kollektsioonist. Plasmiidid saabusid *E. coli* BL21 Star (DE3) bakteritüvedes, mis olid torgatud agarsöötmesse. Bakteritüvedes olevate plasmiidide paljundamiseks kasutati LB (*Lysogeny Broth*) vedelsöödet (1% trüptoon; 0.5% pärmiekstrakt; 1% NaCl) või agarplaati (1% trüptoon; 0.5% pärmiekstrakt; 1% NaCl; 1,5% agar). Plasmidi kandvate rakkude selektsiooniks kasutati vastavalt ampitsilliini (Amp) lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml või kanamütsiini (Km) lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml (Tabel 3). Vedelkultuuri aeratsiooni tagamiseks kasvatati bakterikultuuri üleöö 37 °C ja 180 rpm juures loksutis.

Tabel 3. Töös kasutatud plasmiidid. Amp^r – ampitsilliini resistentsus; Km^r – kanamütsiini resistentsus.

Plasmiid	Iseloomustus	Allikas
pET-32a(+)-NRG1β1	N-terminaalse His ₆ -märkega, kodeerib NRG1β1 valku, Amp ^r	(Kuo <i>et al.</i> , 2020) Addgene #120287
pET-32a(+)-TGFβ1	N-terminaalse His ₆ -märkega, kodeerib TGFβ1 valku, Amp ^r	(Kuo <i>et al.</i> , 2020) Addgene #120288
pET-28a(+)-FGF2-G3	N-terminaalse His ₆ -märkega, kodeerib FGF2-G3 valku, Km ^r	(Kuo <i>et al.</i> , 2020) Addgene #135521

Plasmiidide kaardid on välja toodud Lisas 2, joonisel L1.

2.2.2. Plasmiidse DNA eraldamine

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati „*NucleoBond Xtra Midi Kit*“-i puhvreid. Peale üksiku koloonia valimist sobivat antibiootikumi sisaldavalt agarplaadilt kasvatati plasmidi sisaldavaid *E. coli* BL21 Star (DE3) tüve rakke üleöö 2 ml LB vedelsöötmes 37 °C juures, millesse oli lisatud plasmidi selektsiooniks vastavalt ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml või kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml. Bakterikultuuri tsentrifuugiti 6000 rpm juures 3 minutit, mille järgselt eemaldati supernatant. Bakterisade suspendeeriti 50 µl P1 puhvris, mille üheks komponendiks on RNAas A. Rakkude lüüsimiseks lisati bakterisuspensioonile 50 µl P2 puhvrit. Ühtlase lüüsi tagamiseks keerutati tuube aeglaselt kuus korda. Lüüsisegu inkubeeriti toatemperatuuril 2 minutit, mille järgselt neutraliseeriti see 75 µl P3 puhvriga. Seejärel tsentrifuugiti proove täispööretel (13400 rpm) 10 minutit ja eraldati ettevaatlikult supernatant uude puhtasse 1,5 ml Eppendorfi tuubi. DNA sadestamiseks lisati supernatandile 500 µl 96% etanooli ja tsentrifuugiti täispööretel 10 minutit. Järgnevalt aspireeriti supernatant ja DNA sade pesti 70% etanooliga. Proove tsentrifuugiti täispööretel 10 minutit, eraldati supernatant ja pandi mõneks minutiks 37 °C juurde termostaati kuivama. Seejärel lahustati DNA 25 µl TE puhvris (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0). DNA kontsentratsioon mõõdeti NanoDrop One spektrofotomeetriga (Thermo Scientific, USA).

Üleöö vastava selektsioonimarkeriga LB vedelsöötmes 37 °C juures kasvanud bakterikultuurist valmistati glütserooli säilituskultuurid. Selleks lisati 500 µl bakterikultuurile 500 µl 50% glütserooli ja säilitati edaspidi -80 °C juures.

2.2.3. Restriktsioonianalüüs ja geelelektroforees

Puhastatud plasmiidse DNA õigsust kontrolliti restriktsioonianalüüsi abil. DNA restriktsiooniks kasutati firma „*Fermentas*“ (Thermo Scientific, USA) Eco0109I ensüümi. Restriktsioonisegusse lisati 1 µl plasmiidset DNA-d (1µg/µl), 0,5 µl ensüümi ja 2 µl tootjapoolset reaktsioonipuhvrit. Kasutades mQ deioniseeritud vett, viidi reaktsioonisegu kogumaht 20 µl-ni. Restriktsioonisegu inkubeeriti 37 °C juures üks tund, mille järel visualiseeriti lõikus geelelektroforeesil.

Tulemuste hindamiseks geelelektroforeesil lisati 1 µl DNA proovile 2 µl 6x laadimisvärvi (6x *Loading Dye*, Thermo Scientific). Proovid kanti 1% agarosgeelile 0,5x TBE puhvris. DNA visualiseerimiseks lisati agarosgeelile eelnevalt etiidiumbromiidi (Bioatlas, Eesti)

lõppkontsentratsiooniga 0,05 µg/ml. Agaroosgeelile kanti 4,5 µl GeneRuler 1kb markerit (Thermo Scientific, USA).

Lisaks restriksioonianalüüsile sekveneeriti plasmiidses DNA-s kasvufaktoreid sisaldavad järjestused Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklaboris. Sekveneerimispraimerite järjestused on välja toodud Lisa 1, tabelis 4.

2.2.4. Valkude ekspresseerimine

FGF2-G3, TGFβ1, NRG1β1 valkude ekspresseerimiseks *E. coli* BL21 Star (DE3) tüve rakkudes eelkasvatati bakterikultuuri 5 ml LB vedelsöötmes sobiva antibiootikumi, ampitsilliini (100 µg/ml) või kanamütsiini (50 µg/ml), juuresolekul. Üleöö 37 °C juures kasvanud vedelkultuur lisati kogumahu uude 500 ml LB vedelsöötmesse (eelkatse puhul 2 ml ilma eelkasvatuseta) koos vastava antibiootikumiga. Bakterikultuuri kasvatati 37 °C loksutis nii kaua, kuni selle OD₆₀₀ oli 0,6-0,8. OD₆₀₀ väärtust mõõdeti NanoDrop One spektrofotomeetriga (Thermo Scientific, USA). Seejärel indutseeriti valguekspressioon 0,6 mM IPTG (ingl. k. *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) (Thermo Scientific, USA) lisamisega ja rakke inkubeeriti 37 °C juures 4 tundi. Bakterisuspensiooni tsentrifuugiti 5000 g juures 10 minutit ja aspireeriti supernatant. Bakterisade hoiustati -20 °C juures.

Valkude ekspressiooni kontrolliti SDS-poliakrüülamiid geelelektroforeesiga. Selleks lisati bakterisademele 50 µl 1x PBS lahust ja suspendeeriti see 950 µl 2x Laemmli puhvriga (10% SDS; 50% glütserool; 1M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% broomfenool sinine), millele lisati 50 µl β-merkaptotetanooli. Enne valgugeelile kandmist kuumutati proove 95 °C juures 5 minutit. Valkude lahutamiseks kasutati 10% Tris/glütsiin-SDS-poliakrüülamiid geeli ja markerina 4 µl PageRuler Prestained Protein Ladder'it (Thermo Scientific, USA). Geelelektroforeesil jooksutati valguproove 15 minutit 50 V ja 60 minutit 120 V juures. Järgnevalt loputati valgugeeli destilleeritud veega ja värviti Coomassie Blue värvilahusega (0,2% Coomassie Brilliant Blue; 50% metanool; 10% äädikhape) 1 tund. Valkudega mitteseondunud värvi eemaldamiseks pesti geeli korduvalt 50% metanooli ja 10% äädikhapet sisaldava puhvriga. Saadud valgumuster jäädvustati pildistades.

2.2.5. Valkude puhastamine

Peale valkude ekspressiooni kontrollimist võeti -20 °C juures hoiustatud bakterisade üles 5 ml lüüsipuhvris (1,5 mM magneesiumatsetaat, 1 mM CaCl₂, 250 mM NaCl, 100 mM ammoniumsulfaat, 40 mM Na₂HPO₄, 3,25 mM sidrunhape, 5% glütserool, 5 mM imidasool, 5 mM 2-merkaptotetanool, 0,08% NP40, 1 mM PMSF). Järgnevalt lisati rakususpensioonile lüsotsüümi lõppkontsentratsiooniga 2 mg/ml. Suspensiooni inkubeeriti ülepea (ingl. k. *end-over-end*) segajal 4 °C juures 40 minutit. Seejärel lõhuti bakterite rakumembraan Bioruptor sonikaatoriga (Diagenode, Belgia) kaheksa 30-sekundilise tsükli vältel kasutades kõrget parameetrit (ingl.k. *high setting*). Sonikeeritud rakulüsaati ultratsentrifuugiti 18 000 g ja 4 °C juures 40 minutit ning eraldati supernatant uude puhtasse tuubi. Valkude seondumiseks kasutati maatriksina nikli sefaroosikerakesi, mida pesti eelnevalt 2 korda mQ deioniseeritud veega ja sidumispuhvriga (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM NaCl; 5 mM 2-merkaptotetanool; 5 mM imidasool). Supernatant lisati pestud Ni-maatriksile ja inkubeeriti ülepea segajal 4 °C juures 1 tund. Ühe tunni möödudes tsentrifuugiti 2000 g juures 3 minutit ja aspireeriti supernatant. Maatriksit pesti järgnevalt 4 x 1,5 ml sidumispuhvriga, millele oli eelnevalt lisatud 25 mM imidasool. Peale igat pesu tsentrifuugiti proove 2000 g juures 3 minutit. Maatriksile lisati seejärel 5 x 175 µl elueerimispuhvrit (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM NaCl, 500 mM imidasool). Peale elueerimist ja kontrolliks vajaliku koguse lüsaadi eemaldamist teostati puhvri vahetus säilituspuhvri (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM NaCl, 5 mM 2-merkaptotetanool) vastu kasutades centricon-10 10K MWCO kolonne (Amicon, USA). Säilituspuhvrit lisati kuni 2 ml lõppmahuni ja kolonne tsentrifuugiti 7500 g juures 60 minutit. Valke sisaldav kontsentreeritud proov koguti kokku pöörates kolonni teistpidi puhtasse tuubi ja tsentrifuugides 100 g juures 1 minut. Järgnevalt mõõdeti valgukontsentratsioonid NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) spektrofotomeetriga.

Hindamaks valkude olemasolu ja puhtust, võeti peale iga protokolliga etapi läbimist 5 µl mahus kontrollproov. Kontrollproovidele lisati 28 µl PBS-i ja 1:1 mahus 2x Laemmli puhvrit. Kontrollproove säilitati -20 °C juures ja analüüsiti hiljem koos puhastatud valkudega SDS-geelelektroforeesil. Selleks kuumutati eelnevalt proove 95 °C juures 5 minutit. Proovid kanti 15% SDS-polüakrüülamiid geelile ja jooksutati 15 minutit 50 V ning 60 minutit 120 V juures. Puhastatud valkudest tehti alikvoodid, mis külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80 °C juures.

2.2.6. B8 söötme valmistamine

B8 tüvirakusöödet valmistati Kuo *et al.*, 2020 protokoll järgi. Esmalt valmistati alikvoodid A ja B.

Alikvoot A. Alikvoot A jaoks lahustati L-askorbiinhape-2-fosfaat *trisodium salt* (Sigma-Aldrich, USA) mQ deioniseeritud vees, nii et lahuse lõppkontsentratsioon oli 400 mg/ml. Alikvoot A jagati steriilsetesse 200 µl tuubidesse ja säilitati -80 °C juures. 100 ml B8 söötme valmistamiseks kasutati 50 µl Alikvoot A lahust.

Alikvoot B. Alikvoot B jaoks valmistati kõige pealt naatrium seleniidi ja insuliini lahused. Naatrium seleniit (Sigma-Aldrich, USA) lahustati mQ vees lõppkontsentratsioonini 2 mg/ml. Insuliini lahuse valmistamiseks lisati 20 mg insuliini (Gibco, USA) 450 µl mQ deioniseeritud veele. Segu lahustati lisades 20 µl 1M HCl ja 28 µl 1M NaOH. Nii naatrium seleniidi kui ka insuliini lahuseid säilitati -80 °C juures. 100 ml B8 söötme valmistamiseks segati omavahel 49,90 µl insuliini lahust, 1 µl naatrium seleniidi lahust ja 1 µl transferriini (Roche Diagnostics, Šveits) lõppkontsentratsiooniga 30 mg/ml.

100 ml B8 tüvirakusöötmeh valmistamiseks segati omavahel alikvoodid A ja B ja lisati 99,9 ml DMEM/F12 (Corning, USA) baassöötmele. Järgnevalt lisati segule *E. coli* BL21 Star (DE3) bakteritüvest puhastatud valgud FGF2-G3, TGFβ3 ja NRG1β1. Valke FGF2-G3 ja TGFβ3 lisati söötmesse lõppkontsentratsiooniga 4 mg/ml ja NRG1β1 lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml. Sööde steriilfiltreeriti läbi 0,2 µm filtri ja säilitati 4 °C juures.

2.2.7. Tüvirakkude kasvatamine koekultuuris

Töös kasutati inimese embrüonaalset tüvirakuliini H9 (WA09, XX kariotüüp, WiCell Research Institute, National Stem Cell Bank, USA). Rakke kasvatati 37 °C juures 5% süsinikdioksiidi sisaldusega ja veeauruga küllastatud inkubaatoris. Tüvirakkude kultiveerimiseks kasutati kommertsiaalseid defineeritud koostisega mTeSR1 (STEMCELL Technologies, USA) ja E8 (STEMCELL Technologies, USA) söötmeid ning isevalmistatud B8 söödet. Kõiki tüvirakusöötmeid vahetati iga 24 tunni järel, kui ei ole öeldud teisiti. Kasvupinnana kasutati Matrigeliga (BD Biosciences, USA) kaetud 6-kannulisi (kasvupindala 9,6 cm²) koekultuuri plaate.

Tüvirakkude passeerimist teostati iga 3-4 päeva järel. Selleks pesti tüvirakukultuuri 1x PBS lahusega, mille järel inkubeeriti rakke 37 °C juures 0,5 mM EDTA-PBS lahuses 4-5 minutit. Seejärel eemaldati EDTA-PBS lahus ja kolooniatükid suspendeeriti (keskmiselt 3 korda) 5 ml seroloogilise pipetiga kasvupinna küljest vastava söötmega. Sõltuvalt tüvirakususpensiooni visuaalsest tihedusest passeeriti rakke 1:6 või 1:12 uude Matrigeliga kaetud ja värske söötmega kannu. Töös kasutatud embrüonaalsete tüvirakkude passaaži numbrid jäid vahemikku 34-55.

2.2.8. Pluripotentsuse markerite analüüs läbivoolutsütomeetriaga

Pluripotentsuse markerite Oct4, Sox2 ja Nanogi määramiseks tüvirakukultuuris kasvatati rakke eelnevalt 3-4 päeva mTeSR1, E8 ja B8 söötmetes. Tüvirakusööde aspireeriti ja rakke pesti 1x PBS-iga ning inkubeeriti 0,5 mM EDTA-PBS lahuses 4-5 minutit. Inkubeerimisaja lõppedes aspireeriti EDTA-PBS lahus ja rakud suspendeeriti värskes söötmes kasvupinna küljest lahti. Rakususpensioon kanti 15 ml tuubi ja tsentrifuugiti 200 g juures 5 minutit. Seejärel aspireeriti supernatant ja rakusade võeti üles 1% BSA (veise seerumi albumiin, ingl.k. *bovine serum albumin*) (Capricorn Scientific, Saksamaa) ja 2mM EDTA lahuses PBS-is. Rakkude loendamiseks kasutati automatiseeritud rakuloendurit Countess II (Thermo Scientific, USA). Saadud andmete põhjal lahjendati rakususpensioon tiheduseni 300 000 rakku/ml. Seejärel tsentrifuugiti rakususpensiooni 300 g juures 5 minutit ja aspireeriti supernatant. Rakud fikseeriti 1,6% paraformaldehüüdi (PFA) lahusega PBS-is 10 minutit. Pesemiseks lisati rakkudele 1x PBS-i ja fikseeritud rakke tsentrifuugiti 300 g juures 5 minutit. Seejärel pesti rakud 1x permeabiliseerimispuhvriga (PERM, *permeabilization buffer*) (Thermo Scientific, USA) ja tsentrifuugiti 300 g juures 5 minutit. Supernatant aspireeriti ja rakkudele lisati vastava lahjendusega antikehad (Tabel 5). Rakke inkubeeriti 1 h pimedas. Tunni möödudes pesti rakke kaks korda 1x PERM puhvriga ja tsentrifuugiti 300 g juures 5 minutit. Enne läbivoolutsütomeetrilist analüüsi suspendeeriti rakud 1x PERM puhvris, millele oli eelnevalt lisatud DAPI (4',6-diamidino-2-fenüülindool, Sigma-Adrich, USA) fluoreseeruvat värvi lõppkontsentratsiooniga 0,5 µg/ml. Ettevalmistatud proovide analüüsimiseks kasutati läbivoolutsütomeetrit FACS Aria I (BD Biosciences, USA) ja tarkvara FACS-Diva 6.1.3 (BD Biosciences, USA).

Tabel 5. Töös kasutatud antikehad.

Primaarne antikeha (kloon)	Tootja	Kataloogi-number	Fluorokroom	Lahjendus
Nanog (N31-355)	BD Biosciences	560483	PE	1:5
Sox 2 (O30-678)	BD Biosciences	561506	PerCPCy 5.5	1:20
Anti-Oct 3/4	BD Pharmingen	560329	AlexaFluor 647	1:100

2.2.9. Andmete statistiline analüüs

Antud bakalaureusetöös analüüsiti embrüonaalsete tüvirakkude kultiveerimiskatseid mTeSR1, E8 ja B8 söötmetes kolmes korduses ja esitati korduste keskmistena koos standardhälvega. Testimaks standardhälbe erinevusi kasutati MS Excelis f-testi ja keskmiste väärtuste hindamiseks paariviisilise võrdlusega MS Excelis Studenti t-testi. Statistiliselt oluliseks peeti p-väärtust $p < 0,05$.

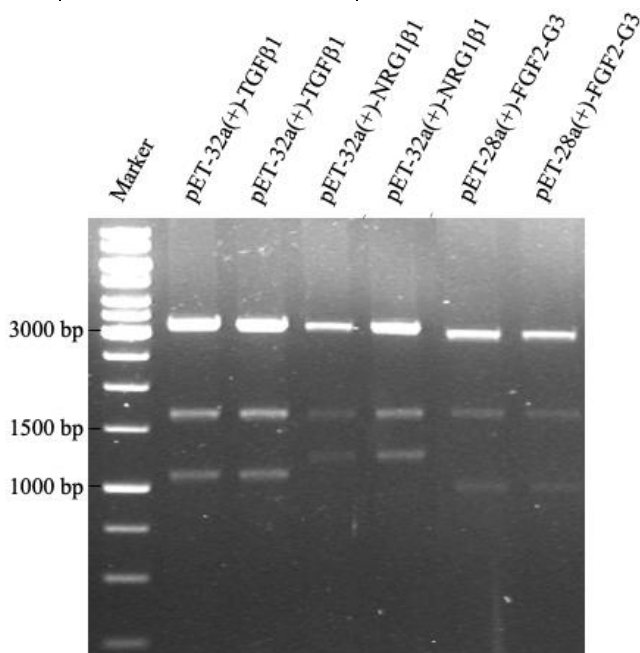
2.3. Tulemused

2.3.1. B8 söötme valmistamiseks vajalike plasmiidide kontrollimine

B8 söötme jaoks vajalike kasvufaktorite ekspresseerimiseks kasutatavad pET plasmiidid telliti Addgene plasmiidide kollektsioonist. Saabunud bakterirakkudest eraldatud pET plasmidi õigsust kontrolliti restriksioonianalüüsiga. Restriksioonianalüüs viidi läbi paralleelselt kahest erinevast bakterikolooniast minipreparatsioonil eraldatud plasmiidse DNA-ga. Restriksioonianalüüsi teostati Eco0109I restriksiooniensüümiga, mille lõikamise tulemusena tekkivad fragmendid on välja toodud tabelis 6.

Tabel 6. Restriksioonianalüüs. Tabelis on välja toodud restriksioonianalüüsil kasutatavad plasmiidid, nende suurused, järgnevateks katseteks välja valitud minipreparatsioonide kontsentratsioonid ning Eco0109I restriksiooniensüümi lõikamise tulemusena tekkivate fragmentide suurused.

Plasmiid	Plasmidi suurus (bp)	Kontsentratsioon (ng/μl)	Restriksiooni-fragmendid (bp)
pET-32a(+)-TGFβ1	6237	2982	3321, 1574, 1242
pET-32a(+)-NRG1β1	6097	4057	3321, 1674, 1102
pET-28a(+)-FGF2-G3	5831	3162	3188, 1674, 969

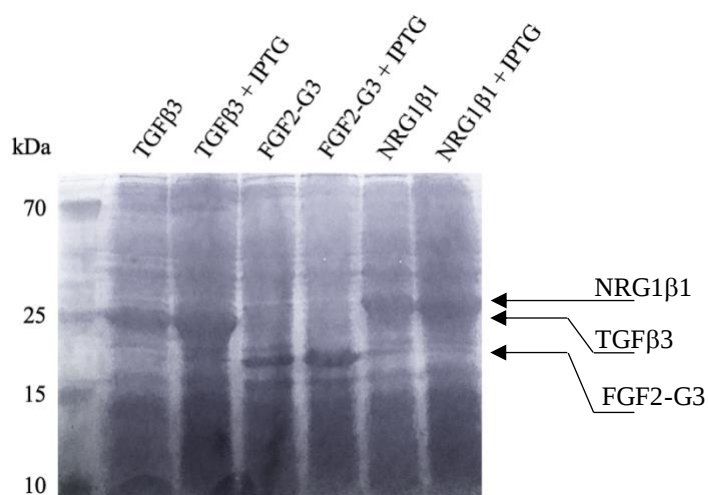


Joonis 4. Restriksioonianalüüs. Konstrukte kontrolliti Eco0109I restriksiooniensüümiga lõikamisel. Joonisel on näha kahest erinevast kolooniast pärit bakterirakkudest eraldatud plasmiidse DNA restriksioonianalüüsi tulemused. Marker – GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA).

Plasmiidse DNA restriksioonianalüüsi tulemusena geelil visualiseeritud fragmendid on oodatava suurusega, mis viitab sellele, et tegu õigete plasmiididega (joonis 4). Geelelektroforeesi pildil kuvatud kahest plasmiidist valiti tabelis 6 välja toodud kontsentratsioonidega konstruktid, mis saadeti sekveneerimisse. Sekveneerimisjärjestuste analüüsiks kasutati Benchling veebipõhist programmi. Joondamistulemused (Lisa 3, joonis L2) kinnitasid, et kõik plasmiidid sisaldasid oodatavaid, ilma mutatsioonideta kasvufaktorite järjestusi.

2.3.2. Valguekspressiooni kontrollimine

TGF β 3, FGF2-G3 ja NRG1 β 1 valguekspressioon indutseeriti *E. coli* BL21 Star (DE3) bakteritüves IPTG lisamisega. Enne suures mahus valkude puhastamist kontrolliti valguekspressiooni SDS-poliakrüülamiid geelil (Joonis 5). Kontrolliks võeti kõrvale bakterikultuur, millesse ei lisatud IPTG-d.

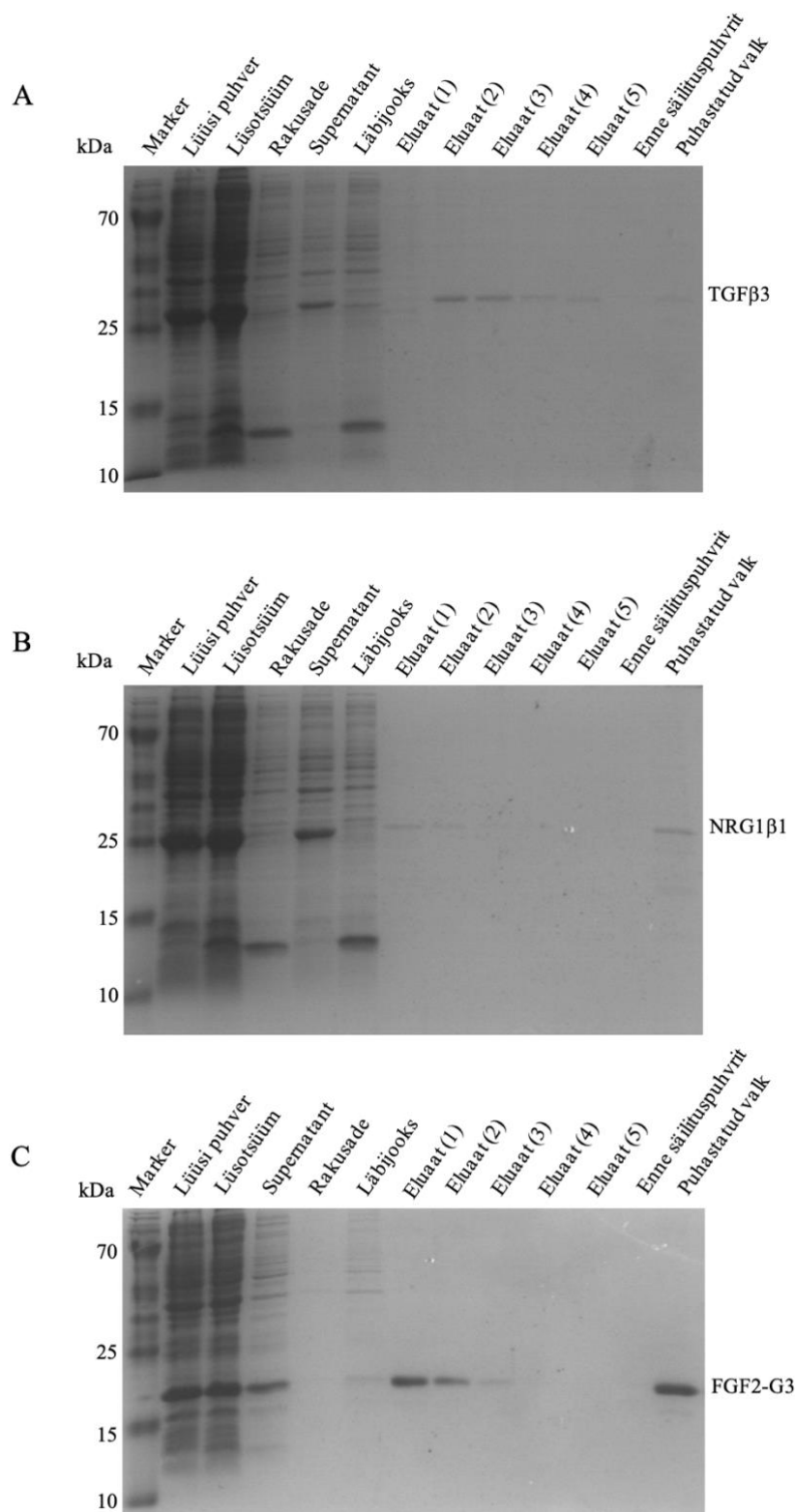


Joonis 5. Valguekspressioon. Geelipildil on visualiseeritud nii IPTG-ga indutseeritud kui ka induktormolekuli juuresolekuta toimuv valguekspressioon. Valguproove lisati 10% Tris/glütsiin SDS-poliakrüülamiid geelile 18 μ l ja PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA) markerit 4 μ l.

Jooniselt 5 on näha, et kõikide plasmiididega saadi oodatava suurusega üleekspressioneeritud valgud. Üllatavalt toimub arvestatav valguekspressioon juba ilma IPTG induktormolekuli juuresolekuta. Siiski on näha, kuidas IPTG võimendab vähesel määral soovitud valgu ekspressiooni.

2.3.3. Valkude puhastamine

B8 söötme jaoks vajalikud kasvufaktorid puhastati valkude His₆-märgise ja Ni-matriksi abil.



Joonis 6. TGF β 3 (A), NRG1 β 1 (B) ja FGF2-G3 (C) valkude puhastamisetappide kontrollproovid SDS-geelelektroforeesil. 15% Tris/glütsiin SDS-polüakrüülamiidgeel. Marker - Pageruler Prestained Protein Ladder #26616. Valguproove lisati geelile 10 μ l ja markerit 4 μ l. Joonisel on kujutatud 12 kontrollproovi, milles esimene on võetud peale lüüsi puhvri lisamist, teine peale lüsotsüümi lisamist ja rakkude sonikeerimist, kolmas ja neljas peale tsentrifuugimist supernatandist ja rakusademest ning viies peale supernatandi läbi jooksmist Ni-maatrisist. Kuues kuni kümnes kontrollproov on võetud peale maatriksi mitmekordset elueerimist elueerimispuhvriga, üheteistkümnes enne säilituspuhvri lisamist maatriksile. Viimasena on geelil näidatud puhastatud valk.

Valgupuhastamise käigus võeti peale iga etapi läbimist kontrollproov, mis visualiseeriti hiljem SDS-poliakrüülamiid geelil (Joonis 6). See võimaldas jälgida valkude kogust kõikides etappides ja lõpliku puhastatud valgu puhtust. Esimene kontrollproovi võeti peale -20 °C juures hoiustatud bakterisademele lüüsipuhvri lisamist. Lüsaadis on näha erinevaid bakteris ekspresseeruvaid valke, sealhulgas suuremas koguses eelnevalt indutseeritud soovitud valku. Teine kontrollproov peale lüütsüümi lisamist ja rakkude sonikeerimist näitas, et antud tingimused sobivad bakterirakkude lüüsiks. Kolmas ja neljas kontrollproov võeti peale lüsaadi tsentrifuugimist rakusademest ja supernatandist. Valgud TGFβ3, NRG1β1 ja FGF2-G3 on lahustuvad, mille tõttu on neid näha supernatandis. Supernatant kanti edasi Ni-maatriksile ja järgmine kontrollproov võeti peale tsentrifuugimist läbijooksust. Selles kontrollproovis on näha valke, mis jäid Ni-maatriksile sidumata. Seejärel pesti maatriksit sidumispuhvriga, millele lisati eelnevalt valkude His-märgisest vabanemiseks imidasooli lõppkonsentratsiooniga 25 mM. Järgnevalt lisati valkude kättesaamiseks maatriksile viis korda elueerimispuhvrit ja tsentrifuugiti. Igast eluaadist võeti peale tsentrifuugimist kontrollproov. Joonisel 6 on selgelt näha, kuidas alguses vabaneb maatriksilt suuremas koguses soovitud valguprodukti. Eelviimane kontrollproov võeti maatriksilt vahetult enne säilitamispuhvri lisamist. Viimases kontrollproovis on puhastatud valk säilitamispuhvris.

TGFβ3 ja NRG1β1 valkude puhul on täheldatav lisavalkude esinemine lõpp-proovis. Sellele vaatamata otsustati valke B8 söötme valmistamiseks kasutada. Järgnevalt mõõdeti puhastatud valkude kontsentratsioonid NanoDrop One (Thermo Scientific, USA) spektrofotomeetriga. Puhastatud valkude suurused, kontsentratsioonid ja valgukogused on välja toodud tabelis 7.

Tabel 7. Puhastatud valgu suurus, kontsentratsioon ja saadud kogus. Tabelis on välja toodud puhastatud valkude teoreetiline suurus, valgugeelilt loetav suurus, kontsentratsioon ja saadud valgukogus. Samuti on välja toodud kui suures koguses B8 tüvirakusöödet on võimalik puhastatud valgukogusest arvutuslikult valmistada. Sulgudes on märgitud B8 söötme teoreetilised valmistamise kogused lähtuvalt antud bakalaureusetöös kasutatud valgukogustele.

Valk	Teoreetiline suurus (kDa)	Suurus geelipildil (kDa)	Kontsentratsioon (mg/ml)	Puhastatud valgu kogus (mg)	B8 söötme valmistamise kogus (l)
TGFβ3	30,4	~30	1,879	0,45	6012 (~300)
NRG1β1	25,3	~25	2,324	0,53	4560 (~1140)
FGF2-G3	20,9	~20	7,050	1,96	486 (~121)

2.3.4. B8 söötme valmistamine ja testimine

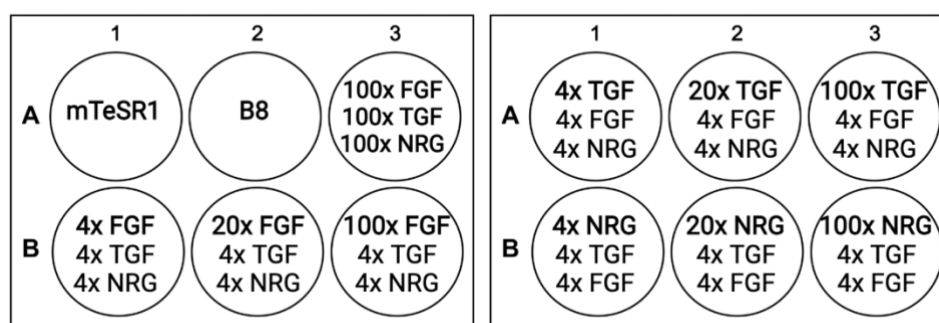
B8 tüvirakusööde valmistati Kuo *et al.* (2020) protokoll järgi. Erinevates katsetes kasutati erinevas koguses isetoodetud kasvufaktoreid, eesmärgiga välja selgitada tüvirakkude kasvatamiseks sobivaimad kontsentratsioonid. Kontrollina valmistati B8 sööde, kuhu ei lisatud puhastatud NRG1 β 1, TGF β 3 ja FGF2-G3 kasvufaktoreid. See võimaldas hinnata, millist mõju isevalmistatud kasvufaktorid tüvirakkudele avaldavad. Embrüonaalsete tüvirakkude kasvukiiruse ja pluripotentsuse hindamiseks kultiveeriti rakke paralleelselt B8 ja kommertsiaalsetes mTeSR1 ning E8 söötmetes. Kindla kultuuritiheduse saavutamisel analüüsiti tüvirakke läbivoolutsütomeetria ehk FACS (ingl. k. *fluorescence activated cell sorting*) meetodiga hinnates pluripotentsuse markerite Oct4, Sox2 ja Nanogi ekspressiooni.

Algselt lisati B8 söötmesse isevalmistatud kasvufaktoreid vastavas koguses (NRG1 β 1 (1 ng/ml), TGF β 3 (1 ng/ml) ja FGF2-G3 (40 ng/ml)) võttes aluseks NanoDrop spektrofotomeetriga mõõdetud valgukontsentratsioonid. Esimese kultiveerimiskatse tulemusena selgus, et inimese embrüonaalne tüvirakuliin H9 on võimeline B8 söötme keskkonnas kasvama ja rakukolooniaid moodustama. Sarnaste kultiveerimistingimuste loomiseks vahetati nii B8 kui ka kommertsiaalseid mTeSR1 ja E8 tüvirakusöötmel iga päev. See võimaldas hinnata paralleelselt rakkude kasvukiirust ja morfoloogiat. B8 söötmes olevad rakukolooniad moodustusid oluliselt aeglasemalt kui kommertsiaalsetes söötmetes. Samuti olid B8 söötmes kultiveeritud rakud visuaalselt suuremad ja moodustasid jätkeid. Seevastu tüvirakud ilma kasvufaktoriteta B8 söötmes olid väikesed ja kasvasid tihedates ümmargustes rakukogumikes, mis sarnanesid embrüoid kehakestega (ingl. k. *embryoid bodies*). Muutused morfoloogias viitasid rakkude diferentseerumisele. Tüvirakkude analüüs FACS meetodiga kinnitas, et pluripotentsuse markerite Oct4, Sox2 ja Nanogi ekspressioon B8 söötmes kultiveeritud rakkudel oli olematu.

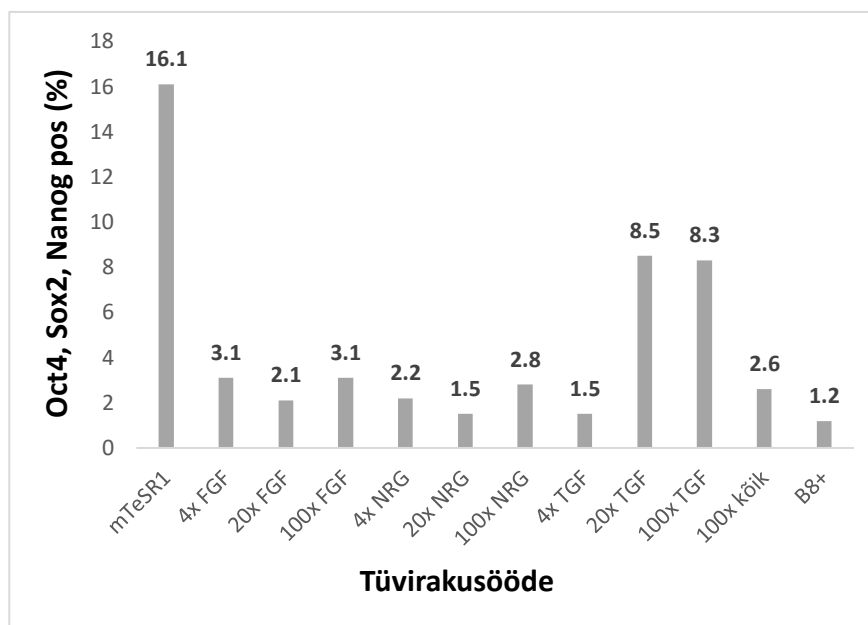
2.3.4.1. Kasvufaktorite kontsentratsioonide optimeerimine

Morfoloogia erinevused kasvufaktoritega ja ilma lisatud kasvufaktoriteta B8 söötmes kultiveeritud tüvirakkudel kinnitasid, et ise puhastatud kasvufaktoritel on mõju rakukultuurile. Selle põhjal otsustati üle vaadata kasvufaktorite kogused söötmes ja hinnata pluripotentsuse markerite ekspressiooni erinevates kasvufaktorite kontsentratsioonidega kombinatsioonides. Hindamiseks valkude kontsentratsioone NanoDrop spektrofotomeetrile alternatiivse meetodiga kõrvaltati puhastatud valkude kogust visuaalselt SDS-polüakrüülamiid geelipildil (joonis 6)

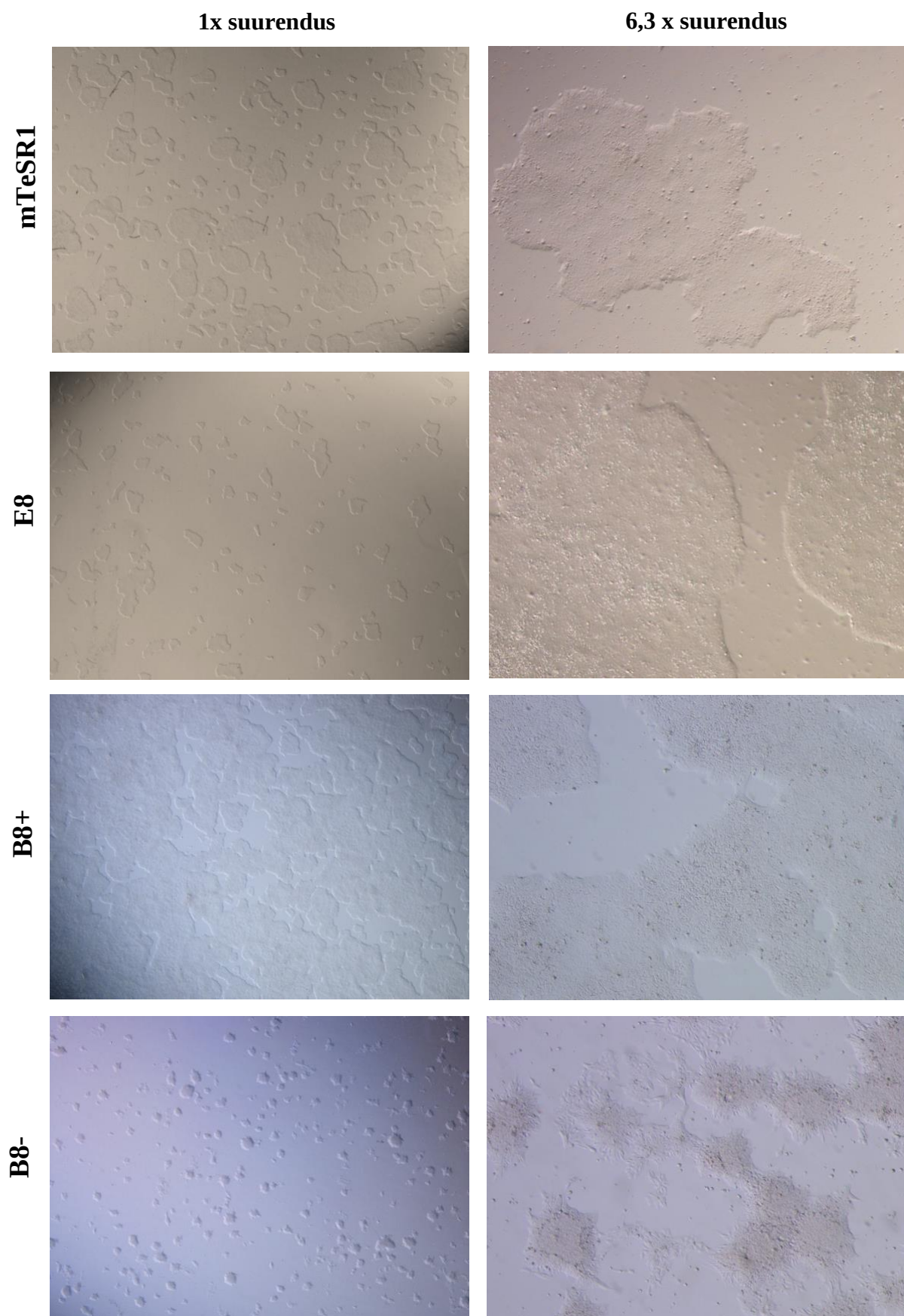
markeri fragmentide kogusega. Võttes arvesse, et hinnanguliselt on markeris leiduvate valkude kontsentratsioon 0,02-0,05 mg/ml võiksid valkude kontsentratsioonid olla NanoDrop spektrofotomeetriga mõõdetust 4-100 korda suuremad. Järgnevalt otsustati kõiki kasvufaktoreid lisada B8 söötme põhikomponentidele esimese katsega võrreldes 4-kordses koguses, millest ühe lõppkontsentratsiooni tõsteti esialgsega võrreldes veel lisaks 20 ja 100 korda (joonis 8). Samuti katsetati B8 söödet, kuhu lisati kõiki kasvufaktoreid 100-kordses koguses. Kõiki tüvirakusöötmeid vahetati iga päev ja neljandal kasvupäeval analüüsiti tüvirakke FACS meetodiga (joonis 9).



Joonis 8. Katseplaani erinevate kasvufaktorite kontsentratsioonide hindamiseks B8 söötmes. FGF – fibroblasti kasvufaktor (valk FGF2-G3), NRG1 – neureguliin 1 (valk NRG1β1), TGF – transformatiivne kasvufaktor (valk TGFβ3).



Joonis 9. Oct4, Sox2 ja Nanogi positiivsete rakkude protsentuaalne osakaal mTeSR1, B8 ja erinevate kasvufaktorite kontsentratsioonidega tüvirakusöötmetes. FGF – fibroblasti kasvufaktor (valk FGF2-G3), NRG1 – neureguliin 1 (valk NRG1β1), TGF – transformatiivne kasvufaktor (valk TGFβ3).

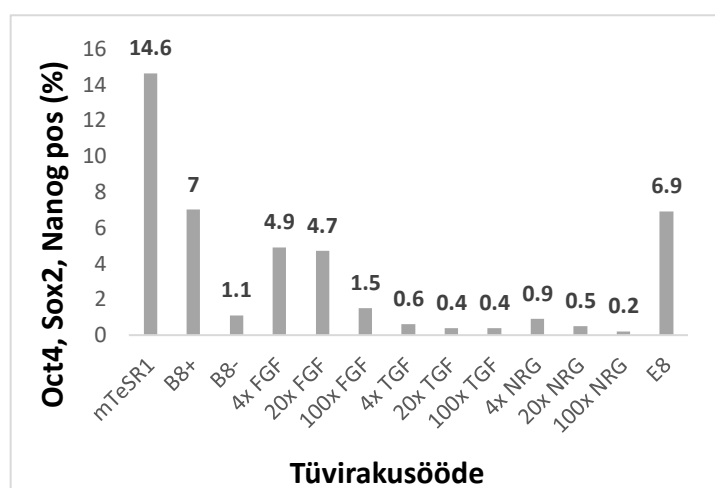


Joonis 10. mTeSR1, E8, kasvufaktoritega B8 (B8+) ja ilma kasvufaktoriteta B8 (B8-) söötmetes kultiveeritud hES rakkude morfoloogia. Rakke pildistati 1x ja 6,3x suurendusega Nikon SMZ800 stereomikroskoobiga. mTeSR1 ja E8 söötmes olevaid rakke on pildistatud kolmandal kultiveerimispäeval ja B8 söötmetes olevaid rakke neljandal kultiveerimispäeval.

Võrdlus kommertsiaalse mTeSR1 tüvirakusöötme näitas, et parim valgukombinatsioon oli B8 söötmes, mille puhul oli NRG1β1 ja FGF2-G3 kasvufaktoreid võetud 4-kordses koguses ning TGFβ3 valku 20-kordses koguses. Selles söötmes kasvatatud tüvirakkudest oli 8,5% pluripotentsuse markerite Oct4, Sox2 ja Nanogi suhtes kolmikpositiivsed ja sarnanesid morfoloogialt kõige rohkem mTeSR1 söötmes kultiveeritud tüvirakkudega (joonis 10). Järgnevate katsete puhul võeti nimetatud sööde kasutusele B8 tüvirakusöötme positiivse kontrollina.

2.3.4.2. Kasvufaktorite olulisuse hindamine B8 söötmes

Eristamaks B8 söötmes olevate üksikute kasvufaktorite mõju valgukombinatsioonide koosmõjust, valmistati söötmed, kuhu lisati erinevates kontsentratsioonides üksikuid kasvufaktoreid. Seejuures lähtuti kirjanduse ülevaates kirjeldatud signaaliradade mõjust tüvirakkude pluripotentsuse markerite ekspressioonile. Kuna aktiivin A ja TGFβ aktiveerivad mõlemad SMAD signaalikaskaadi, sooviti veenduda TGFβ3 kasvufaktori olulisuses tüvirakkude pluripotentsuse säilitamisel. Niisamuti väidab Wamaitha *et al.* (2020), et tüviraku söotmekomponentideks sobivad ainult insuliin ja aktiivin ning seda ilma FGF kasvufaktori juuresolekuta. Samuti oli kaheldav NRG1β1 kasvufaktori vajalikkus, kuna kommertsiaalses E8 söötmes see komponent puudub. Kasvufaktorite olulisuse hindamiseks B8 söötmes lisati söötme valmistamisel ühte vastavat valku 4-kordses, 20-kordses või 100-kordses koguses (joonis 11). Kõiki tüvirakusöötmeid vahetati igapäevaselt ja FACS analüüs teostati rakkude neljandal kasvupäeval.



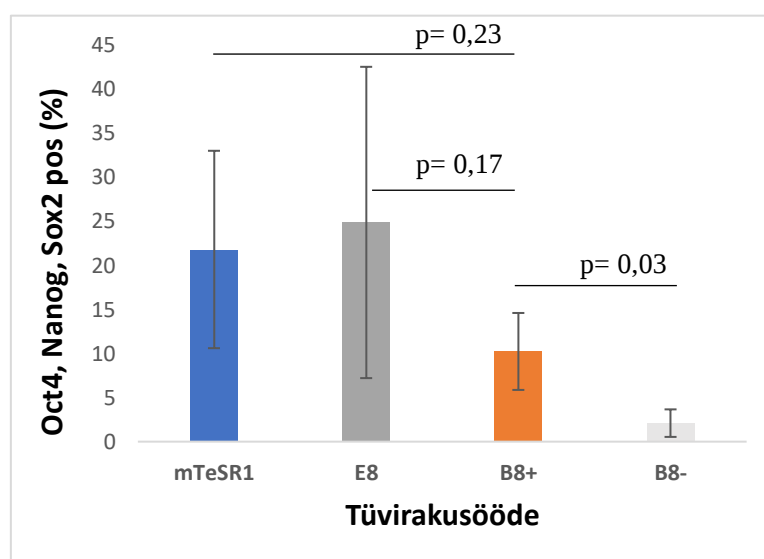
Joonis 11. Oct 4, Sox2 ja Nanogi positiivsete rakkude protsentuaalne osakaal tüvirakusöötmes. Omavahel võrreldi mTeSR1, E8, kõikide kasvufaktoritega B8 (B8+) ja vaid ühe lisatud kasvufaktoriga B8 tüvirakusöötmeid. Kontrollina võeti kõrvale ilma puhastatud valkudeta B8 sööde (B8-). FGF – fibroblasti kasvufaktor (valk FGF2-G3), NRG1 – neureguliin 1 (valk NRG1β1), TGF – transformatiivne kasvufaktor (valk TGFβ3).

Jooniselt 11 selgub, et kõige efektiivsem on kolme kasvufaktorit sisaldav B8 sööde, milles kultiveeritud tüvirakkude pluripotentsuse markerite ekspressioon ja morfoloogia sarnaneb E8 söötmele. Üksiku kasvufaktorina toetab embrüonaalsete tüvirakkude arengupotentsiaali kõige paremini FGF2-G3 ja seda eelistatuna 4-kordse või 20-kordse kontsentratsiooniga NanoDrop spektrofotomeetriga määratud kontsentratsioonist. TGF β 3 ja NRG1 β 1 valgud üksinda ei ole piisavad tüvirakkude arengupotentsiaali säilitamisel.

2.3.5. B8 söötme võrdlus kommertsiaalsete söötmetega

Kõige efektiivsemaks B8 tüvirakusöötmeks osutus sööde, millele lisati NanoDrop spektrofotomeetriga mõõdetust 20-kordne kogus TGF β 3 ja 4-kordne kogus FGF2-G3 ja NRG1 β 1 kasvufaktoreid. Võrreldes kolme korduskatse põhjal saadud tulemusi mTeSR1, E8 ja B8 tüvirakusöötmetega selgus, et B8 söötmes on pluripotentsuse markerite (Oct4, Sox2 ja Nanog) kolmikpositiivsete rakkude hulk umbes poole võrra väiksem võrreldes kommertsiaalsete söötmetega (Joonis 12).

Näide FACS analüüsist on välja toodud Lisas 4, joonisel L3. mTeSR1, E8 ja kasvufaktoritega ning kasvufaktoriteta B8 söötmete FACS analüüsi punktigraafikud on näidatud Lisas 5, joonisel L4.



Joonis 12. FACS analüüsiga määratud Oct4, Nanog ja Sox2 kolmikpositiivsete tüvirakkude osakaal keskmiselt kolmes korduskatses mTeSR1, E8, B8+ ja B8-tüvirakusöötmetes. Veapiiridena on joonisel toodud standardhälve. Horisontaalselt on näidatud t-testi p-väärtused B8+ ja mTeSR1, B8+ ja E8 ning B8+ ja B8- söötmete vahel.

Tüvirakke kultiveeriti söötmetes samades tingimustes ja kõikide läbiviidud katsete neljandal päeval teostati FACS analüüs. Kolme korduskatse põhjal selgus, et tüvirakkude pluripotentsuse

markerite ekspressioon nii kommertsiaalsetes mTeSR1 ja E8 kui ka ise valmistatud B8 söötmetes on väga varieeruv. Kuigi kommertsiaalsete söötmetega saadi pluripotentsuse markerite suhtes keskmiselt rohkem Oct4, Sox2 ja Nanog kolmikpositiivseid rakke, siis Studenti t-testi põhjal ($p < 0,05$) ei erine mTeSR1 ja E8 söötmetes kultiveeritud tüvirakud oluliselt B8 tüvirakusöötmes kasvanud rakkudest pluripotentsuse markerite ekspressiooni poolest. Samas kui B8+ söötmega saadud tulemused erinevad B8- söötmega saadud tulemustest oluliselt ($p < 0,05$).

2.4. Arutelu

Embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsus oleneb suuresti keskkonnast, milles neid kultiveeritakse. Arusaam tüvirakkude kultiveerimistingimustest on viimase viieteistkümne aasta jooksul pidevalt edasi arenenud (Kuo *et al.*, 2020). Uurimisel on pööratud pöhirõhku signaaliradadele, mis mõjutavad rakusiseseid ekspressioonimustreid ja määravad tüviraku arengupotentsiaali. Selle põhjal on välja töötatud mitmeid keemiliselt defineeritud komponentidega tüvirakusöötmeid, mis toetavad rakkude kasvu, pikaajalist jagunemisvõimet ja diferentseerumata olekut.

Käesolev bakalaureustöö on osaks suuremast cGEM (ingl. k. *Centre for Genomics, Evolution and Medicine*) projektist, mille üheks pikemaajaliseks eesmärgiks on luua koostöös Tartu Ülikooli genoomika instituudiga iPS rakkude pank. iPS rakke saab kasutada erinevate funktsionaalsete katsete tegemiseks, kuid rakkude suuremahulisel kultiveerimisel kasutatavad kommertsiaalsed tüvirakusöötmed muudavad need väga kulukaks. Üheks võimaluseks kulude vähendamisel on isevalmistatud tüvirakusöötme kasutamine. Kuo *et al.* (2020) loodud B8 sööde on lihtsasti ise toodetav ja küllaltki kuluefektiivne. B8 söötme protokollil väljatöötamisel testiti erinevaid söotmekomponente, nende koguseid ja valmistusmeetodeid. Näiteks on Kuo *et al.* (2020) söötme jaoks vajaminevate TGF β 3 ja NRG1 β 1 kasvufaktorite tootmiseks lisanud valgusjärjestusele tioredoksiini kodeeriva osa, mis suurendab kasvufaktorite lahustuvust. B8 sööde sisaldab termostabiilset FGF2-G3 kasvufaktorit, mis püsib mitu päeva 37 °C juures stabiilsena. Selle tõttu ei pea B8 tüvirakusöödet iga päev vahetama, mis lihtsustab tunduvalt tööd rakukultuuris (Kuo *et al.*, 2020).

Kirjanduse ülevaate põhjal selgus, et tüvirakusöötmete baaskomponendid on DMEM/F12 sööde, transferriin ja naatrium seleniit. Valdavalt lisatakse söötmesse FGF kasvufaktorit ja insuliini (Kuo *et al.*, 2020; Marinho *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2007), mis stimuleerivad diferentseerumiseks valmistuvate hES rakkude pluripotentse oleku säilitamiseks vajalikku PI3K/AKT ja MEK/ERK signaalirada (Mossahebi-Mohammadi *et al.*, 2020). FGF on oluline komponent ka B8 tüvirakusöötmes. Eksperimentaalses läbiviidud katsete põhjal selgus, et FGF kasvufaktori eemaldamisel söotmekeskkonnast väheneb oluliselt pluripotentsete rakkude osakaal rakukultuuris. Siiski väidab Wamaitha *et al.* (2020), et ka ilma FGF kasvufaktorita on võimalik hoida hES rakke diferentseerumata olekus ja seda vaid aktiiviin A ja insuliini koosmõjul. Selle põhjal järeldub, et tüvirakkude arengupotentsiaali on võimalik erinevate söotmekomponentiga kontrollida. Oluline on lisatud komponendid täpne vahekord ja lõppkontsentratsioon tüvirakusöötmes.

Antud bakalaureusetöö eksperimentaalsena tulemusena selgus, et valmistatud B8 tüvirakusööde toetab hES rakkude pluripotentsuse markerite ekspressiooni – võrreldes omavahel B8+ ja B8-söötmetega saadud tulemusi, saadi statistiliselt oluline erinevus. Samas statistilise analüüsi põhjal ei erine B8+ söötmes kasvatatud rakud pluripotentsuse markerite ekspressiooni poolest kommertsiaalsetes mTeSR1 või E8 söötmetes kasvatatud rakkudest. Sellegipoolest saadi kõikides katsetes kommertsiaalsete söötmetega pluripotentsuse markerite suhtes rohkem kolmikpositiivseid rakke. Antud tulemus on ilmselt tingitud väikesest korduskatsete arvust (n=3) ja suurest katsetevahelisest varieeruvusest. Seetõttu tuleks proovida B8 söötme efektiivsust tõsta parandades valkude puhastamist ja kontsentratsioonide määramist. Samuti tuleks B8 söötme efektiivsuses veendumiseks hES rakke söötmes kultiveerida pikema aja jooksul. Käesolevas bakalaureusetöös läbiviidud katsed olid lühiajalised ja ei anna kinnitust pluripotentsuse säilimisel rakkude pikaajalisel kasvatamisel. Samuti tuleks tüvirakkude pluripotentsuses kinnitamiseks läbi viia täiendavaid funktsionaalseid katseid. Üheks selliseks võimaluseks oleks indutseerida tüvirakkude diferentseerumist kõigis kolmes lootelehe suunas, mis tõendaks tüvirakkude pluripotentset arengupotentsiaali.

KOKKUVÕTE

Inimese embrüonaalsed tüvirakud (hES rakud, ingl. k. *human embryonic stem cells*) on võimelised piiramatult jagunema ja diferentseeruma kõikideks organismis leiduvateks rakutüüpideks. Need omadused muudavad embrüonaalsed tüvirakud oluliseks nii alusuuringutes kui ka regeneratiivses meditsiinis. hES rakkude pluripotentset olekut toetavad kindlad rakusisesed signaalirajad, mille aktivatsiooni kontrollitakse kindlate *in vitro* kultuuritingimustega. Selle põhjal on välja töötatud mitmeid tüvirakusöötmeid. Kommertsiaalsete tüvirakusöötmete kasutamine on tüvirakkude pikaajalisel kultiveerimisel väga kulukaks, mille tõttu on ilmunud mitmeid kuluefektiivseid ja laboris suhteluselt lihtsasti ise valmistatavaid söötmeprotokolle. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on ühe sellise tüvirakusöötme, B8, valmistamine ja testimine hES rakkude kasvatamisel.

B8 tüvirakusööde koosneb kaheksast komponendist. Söötme põhikomponentideks on DMEM/F12, transferriin, L-askorbiinhape-2-fosfaat, insuliin ja naatrium seleniit. Tüvirakkude pluripotentset olekut, kasvu ja klonogeensust võimaldavad B8 söötmesse lisatud FGF2-G3, TGFβ3 ja NRG1β1 kasvufaktorid. Antud bakalaureusetöö raames ekspresseeriti nimetatud kasvufaktorid Addgene plasmiidide kollektsioonist tellitud plasmiidse DNA valgujärjestustelt ja puhastati Ni-maatriksit kasutades.

Hindamaks tüvirakkude morfoloogiat, kasvukiirust ja pluripotentsuse markerite ekspressiooni kasvatati hES rakke paralleelselt kommertsiaalsetes mTeRS1 ja E8 ning isevalmistatud B8 söötmetes. Esimeste katsete käigus täheldati, et B8 söötmes kultiveeritud tüvirakud erinevad oluliselt kommertsiaalsetes söötmetes kasvavatest rakkudest nii morfoloogia kui ka pluripotentsuse markerite ekspressiooni põhjal. Selle tõttu hinnati puhastatud kasvufaktorite osakaalu ja muudeti nende lõppkonsentratsioone söötmes. Siiski ei toetanud B8 sööde tüvirakkude pluripotentsuse markerite ekspressiooni samal määral kui mTeSR1 või E8 sööde.

Käesoleva bakalaureusetöö edasiarendusena tuleks proovida puhastada nimetatud kasvufaktoreid uuesti. Samuti tuleks hES rakke kultiveerida B8 tüvirakusöötmes pikema aja jooksul ja tüvirakkude funktsionaalsuses veendumiseks viia läbi täiendavaid katseid.

Preparation and testing of B8 media suitable for human embryonic stem cell cultivation

Maria-Elisabeth Vaigo

Summary

Human embryonic stem cells (hES cells) are pluripotent cells derived from the inner cell mass of the blastocyst-stage embryos. Under appropriate *in vitro* culture conditions, hES cells have an indefinite capacity to self-renew and the potential to differentiate into all cell types in the body. This makes them valuable in developmental biology studies, regenerative medicine, and cell therapy. The pluripotent state of hES cells is supported by the intracellular transcriptional regulatory network that responds to specific extrinsic signaling stimuli. Because of that it's important to select appropriate growth medium for hES cell cultivation. Commercial stem cell media is very expensive and usually requires daily media changes, which can be problematic to many laboratories. For solution Kuo *et al.* (2020) have developed cost-effective chemically defined, feeder-free and xeno-free B8 stem cell media, which is relatively easy to prepare and offers weekend-free protocol for maintaining stem cell pluripotency.

The aim of this study was to prepare and test B8 stem cell media on hES cells and evaluate its impact on the pluripotency signaling network. hES cells in B8 media were compared with embryonic stem cells cultured in commercial mTeSR1 and E8 media. On the fourth or fifth day of cultivation, coexpression of pluripotency markers Oct4, Sox2 and Nanog in hES cells was analyzed by flow cytometry. Our results showed that hES cells in self-made B8 media had capacity to self-renew but compared to commercial stem cell media the number of cells triple positive for pluripotency markers were lower. One of the reasons for this may be inefficient purification of growth factors TGF β 3, NRG1 β 1 and FGF2-G3 required for the medium. In conclusion, the protein purification protocols should be further optimized. Also, to ensure the long-term effectiveness of B8 media, hES cells should be cultured for a longer period of time. The experiments performed in this study were short-term and do not confirm the maintenance of pluripotency in long-term hES cell culture.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma suurepärast juhendajat Tõnis Orgu pühendatud aja, jagatud nõuannete ja toetava suhtumise eest. Tänan motiveerivate sõnade eest, mis ei lasknud ebaõnnestumistele keskenduma jääda, vaid säruga silmis edasi töötada. Südamlikud tänusõnad Annika Treile, kes oli alati olemas ja valmis igakülselt aitama ning tööd rakukultuuris tutvustama. Tänan Dmitri Lubenetsi abivalmiduse ja asjakohaste nõuannete eest läbivoolutsütomeetria analüüsi läbiviimisel. Tänan kõiki biotehnoloogia õppetooli inimesi toreda seltskonna ja heasoovlikkuse eest.

KIRJANDUSE LOETELU

- Beattie, Gillian M et al. 2005. 'Activin A Maintains Pluripotency of Human Embryonic Stem Cells in the Absence of Feeder Layers'. *Stem cells* 23(4): 489–95.
- Beers, Jeanette et al. 2012. 'Passaging and Colony Expansion of Human Pluripotent Stem Cells by Enzyme-Free Dissociation in Chemically Defined Culture Conditions'. *Nature protocols* 7(11): 2029–40.
- Bendall, Sean C et al. 2007. 'IGF and FGF Cooperatively Establish the Regulatory Stem Cell Niche of Pluripotent Human Cells in Vitro'. *Nature* 448(7157): 1015–21.
- Boroviak, Thorsten, and Jennifer Nichols. 2014. 'The Birth of Embryonic Pluripotency'. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369(1657): 20130541.
- Boyer, Laurie A et al. 2005. 'Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells'. *cell* 122(6): 947–56.
- Bradley, Allan, Martin Evans, Matthew H Kaufman, and Elizabeth Robertson. 1984. 'Formation of Germ-Line Chimaeras from Embryo-Derived Teratocarcinoma Cell Lines'. *Nature* 309(5965): 255–56.
- Breckwoldt, Kaja et al. 2017. 'Differentiation of Cardiomyocytes and Generation of Human Engineered Heart Tissue'. *Nature protocols* 12(6): 1177.
- Chaudhry, Muhammad A, Timothy Z Vitalis, Bruce D Bowen, and James M Piret. 2008. 'Basal Medium Composition and Serum or Serum Replacement Concentration Influences on the Maintenance of Murine Embryonic Stem Cells'. *Cytotechnology* 58(3): 173–79.
- Chen, Guokai et al. 2011. 'Chemically Defined Conditions for Human iPSC Derivation and Culture'. *Nature methods* 8(5): 424–29.
- Chen, Guokai et al. 2013. 'Splitting HESC/HiPSC Lines with EDTA in Feeder Free Conditions'.
- Chen, Xi et al. 2008. 'Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells'. *Cell* 133(6): 1106–17.
- Cobo, Fernando et al. 2008. 'Electron Microscopy Reveals the Presence of Viruses in Mouse Embryonic Fibroblasts but Neither in Human Embryonic Fibroblasts nor in Human Mesenchymal Cells Used for HESC Maintenance: Toward an Implementation of Microbiological Quality Assurance Program in Stem Cell Banks'. *Cloning and stem cells* 10(1): 65–74.
- Desai, Nina, Pooja Rambhia, and Arsela Gishto. 2015. 'Human Embryonic Stem Cell Cultivation: Historical Perspective and Evolution of Xeno-Free Culture Systems'. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13(1): 1–15.
- Dodsworth, Benjamin T et al. 2020. 'Profiling of Naïve and Primed Human Pluripotent Stem Cells Reveals State-Associated MiRNAs'. *Scientific reports* 10(1): 1–9.
- Ellerström, Catharina et al. 2007. 'Facilitated Expansion of Human Embryonic Stem Cells by Single-Cell Enzymatic Dissociation'. *Stem Cells* 25(7): 1690–96.

- Evans, Martin J, and Matthew H Kaufman. 1981. 'Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos'. *nature* 292(5819): 154–56.
- Frank, Stefan, Miao Zhang, Hans R Schöler, and Boris Greber. 2012. 'Small Molecule-Assisted, Line-Independent Maintenance of Human Pluripotent Stem Cells in Defined Conditions'. *PloS one* 7(7): e41958.
- Gafni, Ohad et al. 2013. 'Derivation of Novel Human Ground State Naive Pluripotent Stem Cells'. *Nature* 504(7479): 282–86.
- Girnita, Leonard et al. 2014. 'Something Old, Something New and Something Borrowed: Emerging Paradigm of Insulin-like Growth Factor Type 1 Receptor (IGF-1R) Signaling Regulation'. *Cellular and molecular life sciences* 71(13): 2403–27.
- Hannan, Nicholas RF, Charis-Patricia Segeritz, Thomas Touboul, and Ludovic Vallier. 2013. 'Production of Hepatocyte-like Cells from Human Pluripotent Stem Cells'. *Nature protocols* 8(2): 430–37.
- James, Daylon, Ariel J Levine, Daniel Besser, and Ali Hemmati-Brivanlou. 2005. 'TGF β /Activin/Nodal Signaling Is Necessary for the Maintenance of Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells'. *Development* 132(6): 1273–82.
- Keller, Gordon M. 1995. 'In Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells'. *Current opinion in cell biology* 7(6): 862–69.
- Kuo, Hui-Hsuan et al. 2020. 'Negligible-Cost and Weekend-Free Chemically Defined Human iPSC Culture'. *Stem cell reports* 14(2): 256–70.
- Lee, Jeoung Eun, and Dong Ryul Lee. 2011. 'Human Embryonic Stem Cells: Derivation, Maintenance and Cryopreservation'. *International journal of stem cells* 4(1): 9.
- Lee, Jungwoon, Young-Jun Park, and Haiyoung Jung. 2019. 'Protein Kinases and Their Inhibitors in Pluripotent Stem Cell Fate Regulation'. *Stem cells international* 2019.
- Li, Jian et al. 2007. 'MEK/ERK Signaling Contributes to the Maintenance of Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal'. *Differentiation* 75(4): 299–307.
- Loh, Yui-Han et al. 2006. 'The Oct4 and Nanog Transcription Network Regulates Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells'. *Nature genetics* 38(4): 431–40.
- Ludwig, Tenneille E et al. 2006. 'Derivation of Human Embryonic Stem Cells in Defined Conditions'. *Nature biotechnology* 24(2): 185–87.
- Marinho, Paulo A, Thanathom Chailangkarn, and Alysson R Muotri. 2015. 'Systematic Optimization of Human Pluripotent Stem Cells Media Using Design of Experiments'. *Scientific reports* 5(1): 1–13.
- Medvedev, SP, AI Shevchenko, and SM Zakian. 2010. 'Induced Pluripotent Stem Cells: Problems and Advantages When Applying Them in Regenerative Medicine'. *Acta Naturae (англоязычная версия)* 2(2 (5)).
- Moon, RT. 2005. 'Wnt/b-Catenin Pathway'. *Science's STKE (Connections Map, as seen in April 2005)*, <http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/stkecm>.

- Moon, Shin Yong et al. 2006. 'Generation, Culture, and Differentiation of Human Embryonic Stem Cells for Therapeutic Applications'. *Molecular Therapy* 13(1): 5–14.
- Morikawa, Masato et al. 2016. 'BMP Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal through Distinct Functions of Different Krüppel-like Factors'. *Stem Cell Reports* 6(1): 64–73.
- Mossahebi-Mohammadi, Majid, Meiyu Quan, Jin-San Zhang, and Xiaokun Li. 2020. 'FGF Signaling Pathway: A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency'. *Frontiers in cell and developmental biology* 8: 79.
- Nichols, Jennifer, and Austin Smith. 2009. 'Naive and Primed Pluripotent States'. *Cell stem cell* 4(6): 487–92.
- Oh, Sun Kyung et al. 2005. 'Methods for Expansion of Human Embryonic Stem Cells'. *Stem cells* 23(5): 605–9.
- Oltulu, Fatih et al. 2019. 'Autophagy and MTOR Pathways in Mouse Embryonic Stem Cell, Lung Cancer and Somatic Fibroblast Cell Lines'. *Journal of cellular biochemistry* 120(10): 18066–76.
- Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. 'Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors'. *cell* 126(4): 663–76.
- Thomson, James A et al. 1998. 'Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts'. *science* 282(5391): 1145–47.
- Tsutsui, Hideaki et al. 2011. 'An Optimized Small Molecule Inhibitor Cocktail Supports Long-Term Maintenance of Human Embryonic Stem Cells'. *Nature communications* 2(1): 1–8.
- Vallier, Ludovic, Morgan Alexander, and Roger A Pedersen. 2005. 'Activin/Nodal and FGF Pathways Cooperate to Maintain Pluripotency of Human Embryonic Stem Cells'. *Journal of cell science* 118(19): 4495–4509.
- Wamaitha, Sissy E et al. 2020. 'IGF1-Mediated Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal Recapitulates the Embryonic Niche'. *Nature communications* 11(1): 1–16.
- Wang, Linlin et al. 2007. 'Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells Requires Insulin-like Growth Factor-1 Receptor and ERBB2 Receptor Signaling'. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 110(12): 4111–19.
- Weinberger, Leehee, Muneef Ayyash, Noa Novershtern, and Jacob H Hanna. 2016. 'Dynamic Stem Cell States: Naive to Primed Pluripotency in Rodents and Humans'. *Nature reviews Molecular cell biology* 17(3): 155.
- Xiao, Lei, Xuan Yuan, and Saul J Sharkis. 2006. 'Activin A Maintains Self-Renewal and Regulates Fibroblast Growth Factor, Wnt, and Bone Morphogenic Protein Pathways in Human Embryonic Stem Cells'. *Stem cells* 24(6): 1476–86.
- Xu, Chunhui et al. 2001. 'Feeder-Free Growth of Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells'. *Nature biotechnology* 19(10): 971–74.

- Xu, Xin et al. 2018. 'Transforming Growth Factor- β in Stem Cells and Tissue Homeostasis'. *Bone research* 6(1): 1–31.
- Xu, Zhuojin et al. 2016. 'Wnt/ β -Catenin Signaling Promotes Self-Renewal and Inhibits the Primed State Transition in Naïve Human Embryonic Stem Cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(42): E6382–90.
- Yamasaki, Sachiko et al. 2014. 'Generation of Human Induced Pluripotent Stem (Ips) Cells in Serum-and Feeder-Free Defined Culture and TGF-B1 Regulation of Pluripotency'. *PLoS One* 9(1): e87151.
- Yasuda, Shin-ya et al. 2018. 'Chemically Defined and Growth-Factor-Free Culture System for the Expansion and Derivation of Human Pluripotent Stem Cells'. *Nature biomedical engineering* 2(3): 173–82.
- Ying, Qi-Long, Jennifer Nichols, Ian Chambers, and Austin Smith. 2003. 'BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3'. *Cell* 115(3): 281–92.
- Zhang, Tong et al. 2019. 'Cooperation of FGF/MEK/ERK and Wnt/ β -Catenin Pathway Regulators to Promote the Proliferation and Pluripotency of Mouse Embryonic Stem Cells in Serum-and Feeder-Free Conditions'. *Bioresources and Bioprocessing* 6(1): 1–10.
- Zhang, Yan et al. 2019. 'Stat3 Activation Is Critical for Pluripotency Maintenance'. *Journal of cellular physiology* 234(2): 1044–51.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. Addgene: <http://www.addgene.org/120288/> (25.05.2020)
2. Addgene: <http://www.addgene.org/120287/> (25.05.2020)
3. Addgene: <https://www.addgene.org/135521/> (25.05.2020)
4. Benchling: <https://www.benchling.com/> (29.09.2020)
5. Marker, mille järgi hinnati SDS-poliakrüülamiid valgugeelil olevate kasvufaktorite kontsentratsioone: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26614#/26614> (30.10.2020)

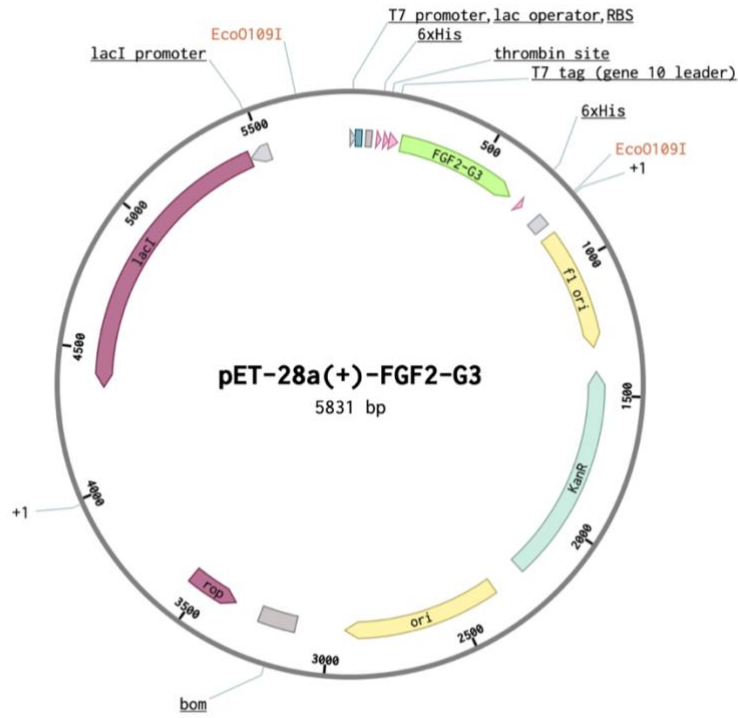
LISAD

Lisa 1

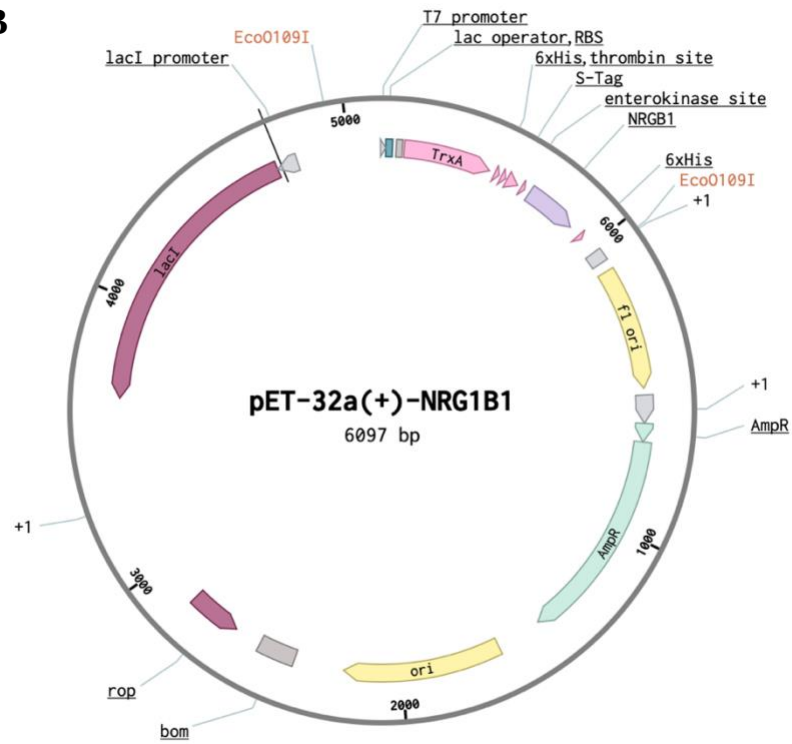
Tabel 4. Sekveneermisel kasutatud praimerid.

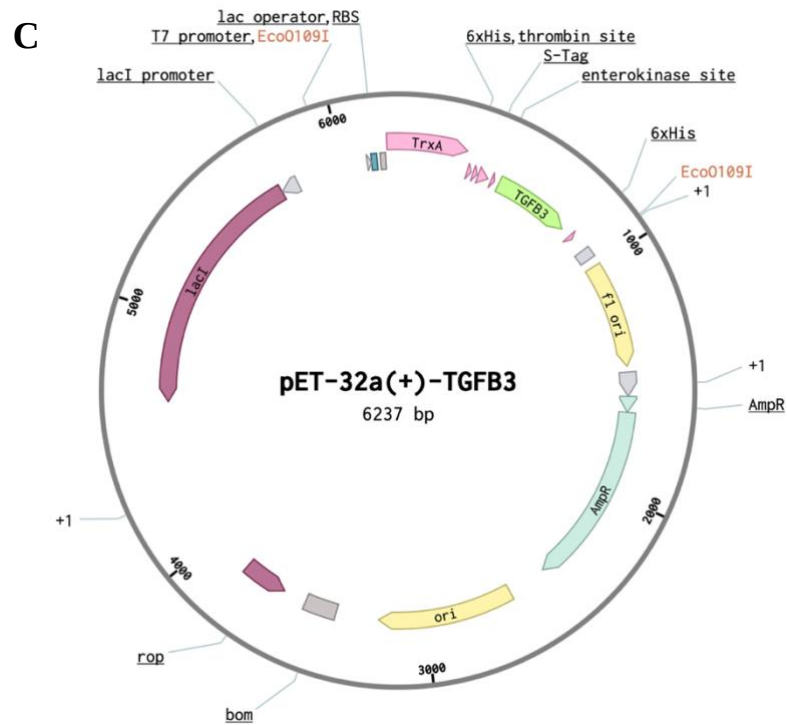
Plasmiid	Praimeri nimetus	Kasutatud praimerid (5' – 3')
pET-32a(+)-TGF β 1	T7_terminal	GCTAGTTATTGCTCAGCG
	pET32_F	GAGTTCCTCGACGCTAACCTG
pET-32a(+)-NRG1 β 1	T7_terminal	GCTAGTTATTGCTCAGCG
	pET32_F	GAGTTCCTCGACGCTAACCTG
pET-28a(+)-FGF2-G3	T7_terminal	GCTAGTTATTGCTCAGCG
	T7_F	TAATACGACTCACTATAGG

A



B





Joonis L1. Plasmiidide kaardid. Joonisel on näidatud pET-32a(+)-NRG1 β 1 (A), pET-28a(+)-FGF2-G3 (B), pET-32a(+)-TGFB3 (C) plasmiidide kaardid. Plasmiidide kaartidel on välja toodud suurus, restriksiooniensüümi Eco0109I lõikesaidid, vastavat kasvufaktorit kodeeriv ala ja antibiootikumiresistentsust (AmpR või KanR) tagav järjestus. AmpR – ampitsilliini resistentsus, KanR – kanamütsiini resistentsus, TrxA – tioredoksiin A.

Lisa 3

A



B



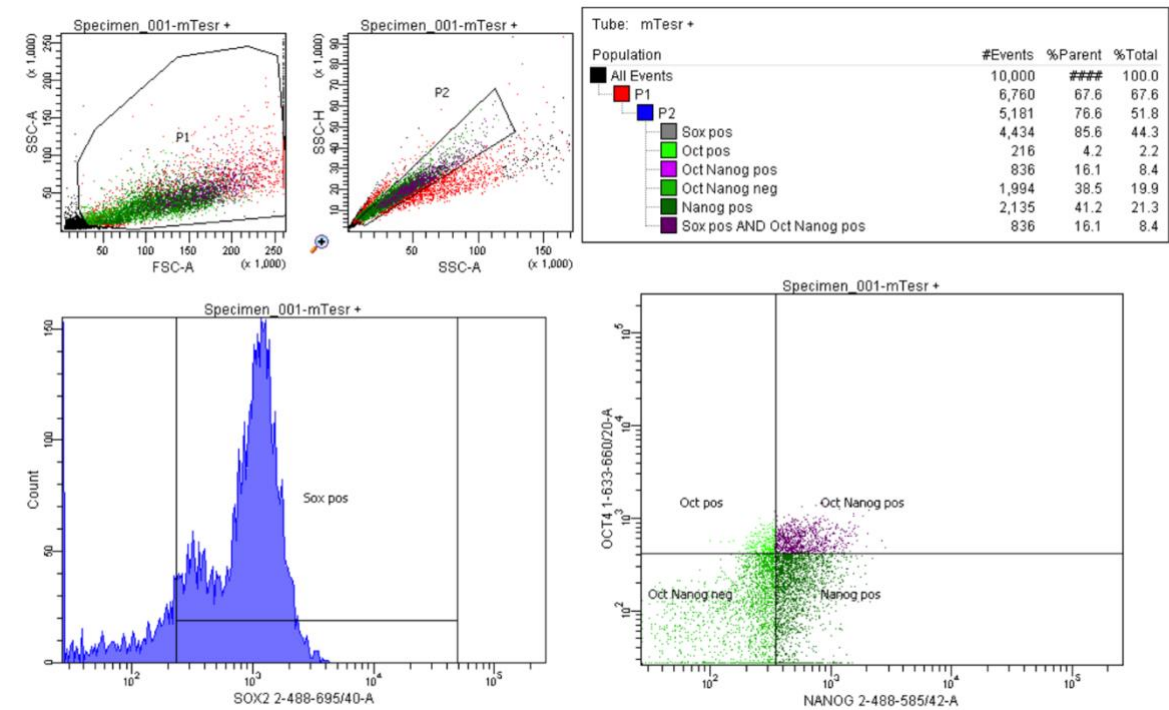
C



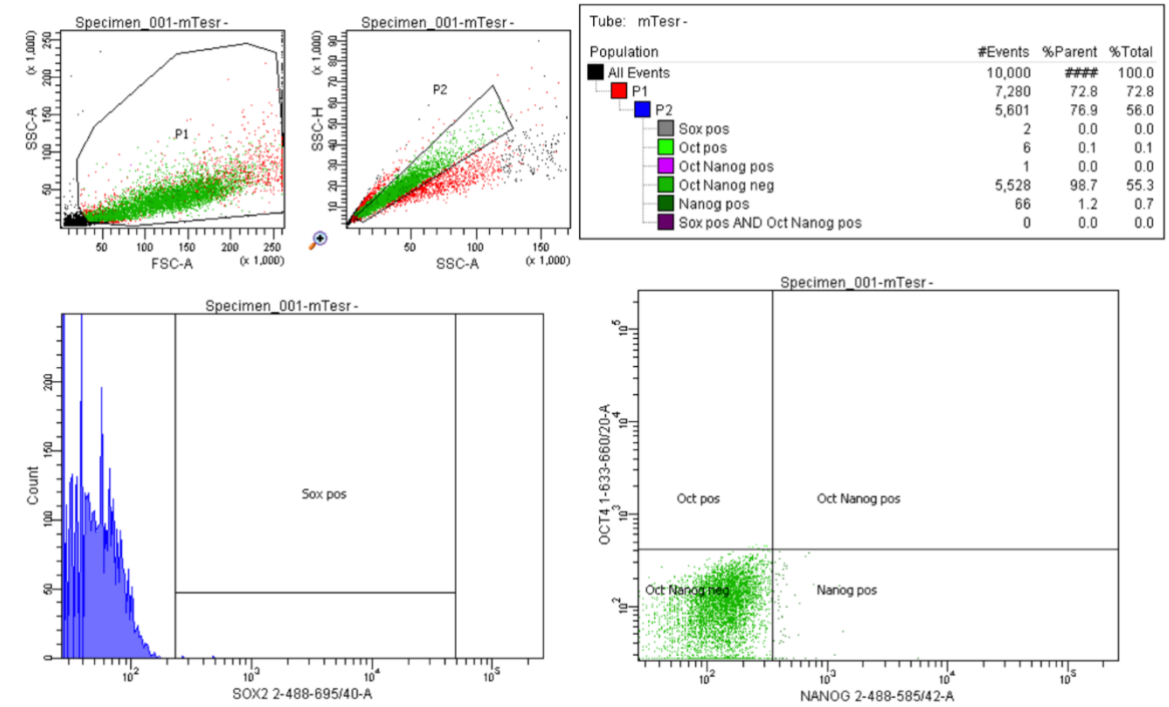
Joonis L2. Sanger sekveneerimise tulemused. Joonisel on näidatud pET-32a(+)-NRG1β1 (A), pET-28a(+)-FGF2-G3 (B), pET-32a(+)-TGFβ3 (C) sekveneerimise tulemuste kuvatõmmised Benchling veebipõhisest programmist. Sekveneeritud järjestused on joondatud vastavatele plasmiididele, kus need kattuvad oodatult kasvufaktoreid (NRG1β1, FGF2-G3, TGFβ3) kodeerivate aladega.

Lisa 4

A

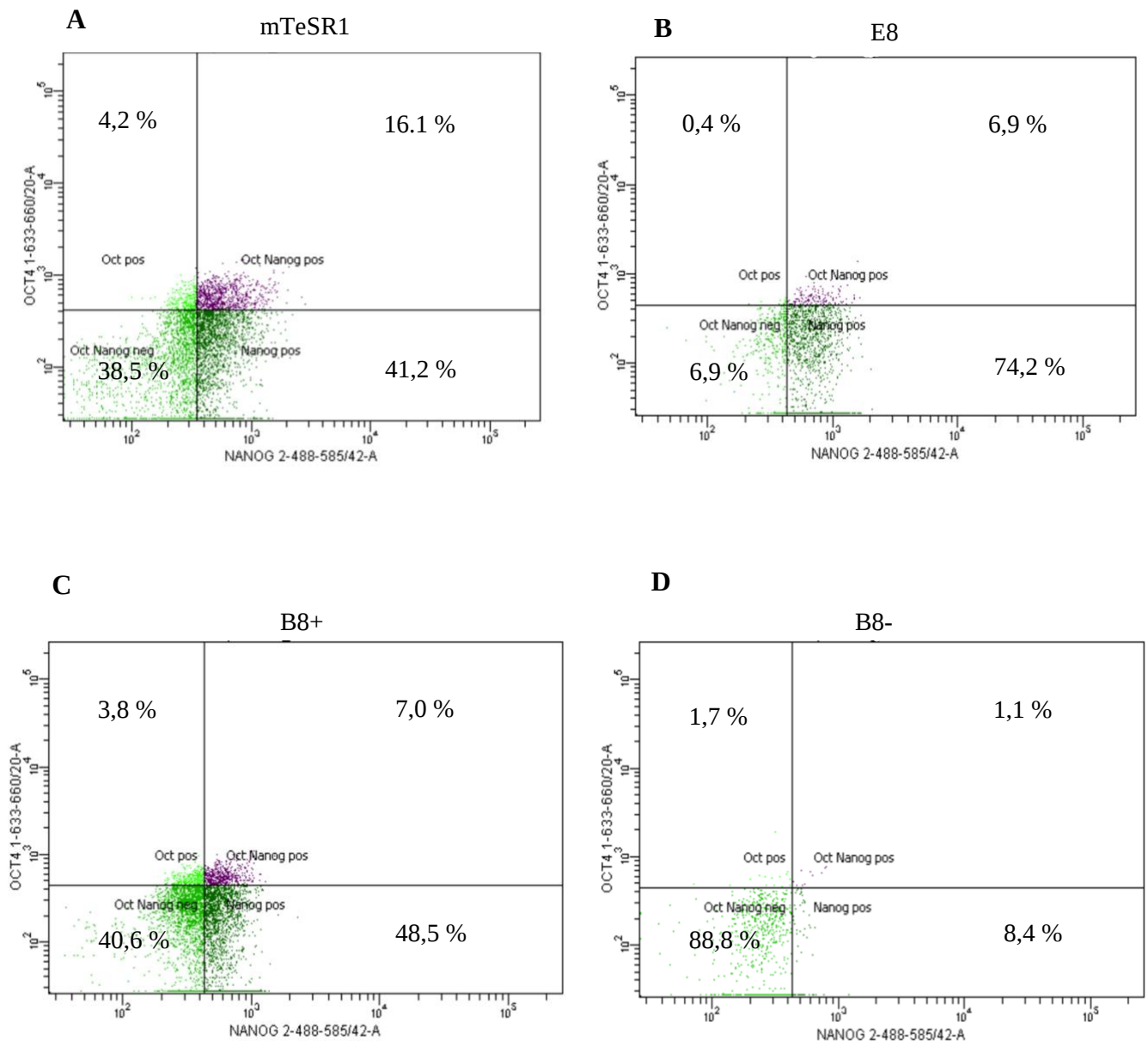


B



Joonis L3. Näide FACS andmete analüüsist. Joonisel on näidatud antikehadega visualiseeritud mTeSR1 söötmes kultiveeritud tüvirakukultuur (A) ja ilma antikehadeta negatiivne kontroll (B).

Lisa 5



Joonis L4. Näited FACS analüüsist. Joonisel on näidatud mTeSR1 (A), E8 (B), kasvufaktoritega B8+ (C) ja ilma lisatud kasvufaktoriteta B8- (D) tüvirakusöötmete FACS analüüsi tulemused kuvatud punktigraafikul. Joonisel kuvatud sündmused on kõik Sox2 positiivsed. Näidatud on kolmikpositiivsete Sox2, Oct4 ja Nanog sündmuste osakaal võrrelduna Sox2 ja Oct4 positiivsete, Sox2 ja Nanogi positiivsete ning ainult Sox2 positiivsete sündmustega.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Maria-Elisabeth Vaigo,

(sünnikuupäev 29.08.1997)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „**Inimese embrüonaalsete tüvirakkude kultiveerimiseks sobiva B8 söötme valmistamine ja testimine**“, mille juhendaja on PhD Tõnis Org, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Maria-Elisabeth Vaigo

30.05.2021