

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

**Indutseeritud pluripotentsete tüvirakkude valmistamine külmutatud vereproovidest**

Magistritöö

30 EAP

Katariina Kordemets

Juhendajad  
PhD, Tõnis Org  
Annika Trei

TARTU 2024

## **INFOLEHT**

### **Indutseeritud pluripotentsete tüvirakkude valmistamine külmutatud vereproovidest**

Viimase 15 aasta jooksul on tehtud laiaulatuslikke ülegenoomseid assotsiatsiooniuringuid, et uurida genotüüpide ja fenotüüpide vahelisi seoseid, kuid keerulisem on uurida seotud variantide funktsionaalset panust fenotüübi avaldumisse. Sellisteks funktsionaalseteks uuringuteks saab kasutada indutseeritud pluripotentsed tüvirakke. Üks väheinvasiivne allikas, millest iPSCsid teha saab, on vererakud. Eesti Geenivaramus on olemas esimese 50 000 doonori külmutatud vererakud. iPSC-de tegemine on aga madala efektiivsusega ja nii pikalt külmutatud olnud vererakkudest pole tüvirakke töö autorile teadaolevalt tehtud.

Sellest tulenevalt on käesoleva magistritöö eesmärgiks välja selgitada, kas ja mis protokollid kasutades on Geenivaramu külmutatud vereproovidest võimalik luua indutseeritud pluripotentsed tüvirakke.

Märksõnad: indutseeritud pluripotentsed tüvirakud, reprogrammeerimine, transfektsioon, transduktsioon

CERCS: T490 Biotehnoloogia

### **Generating induced pluripotent stem cells from frozen blood samples**

In the last 15 years, large-scale genome-wide association studies have been performed to investigate the associations between genotypes and phenotypes, but it is more difficult to investigate the functional contribution of the associated variants to the manifestation of the phenotype. Induced pluripotent stem cells could be used for such functional studies. One less invasive source from which iPSCs can be made is blood cells. The Estonian Gene Bank has the frozen blood cells of the first 50,000 donors. However, making iPSCs already has a low efficiency, and to the author's knowledge, stem cells have not been made from blood cells that have been kept frozen for that long.

Consequently, the aim of this master's thesis was to find out whether and using which protocol it is possible to create induced pluripotent stem cells from the frozen blood samples of the Gene Bank.

Keywords: induced pluripotent stem cells, reprogramming, transfection, transduction

CERCS: T490 Biotechnology

# SISUKORD

<b>INFOLEHT</b>	<b>2</b>
<b>SISUKORD</b>	<b>3</b>
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b>	<b>5</b>
<b>SISSEJUHATUS</b>	<b>6</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b>	<b>7</b>
1.1 Funktsionaalsed katsed ja Eesti geenivaramu	7
1.2 Indutseeritud pluripotentsed tüvirakud ja embrüonaalsed tüvirakud	7
1.3 Erinevad rakutüübid iPSC-de tegemiseks	8
1.4 Meetodid iPSC-de saamiseks ja nende piirangud	10
1.3.1 Integreeruvad vektorid	12
1.3.2 Mitteintegreeruvad vektorid	12
<b>2.0 EKSPERIMENTAALOSA</b>	<b>13</b>
2.1 Töö eesmärgid	13
2.2 Materjal ja meetodika	13
2.2.1 Vererakkude puhastamine	13
2.2.1.1 Värskest verest buffy coat'i eraldamine	13
2.2.1.2 Vererakkude puhastamine punaste vererakkude lüüsi puhvriga	13
2.2.1.3 Vererakkude puhastamine SepMate tuubidega	14
2.2.2 Vererakkude ettekasvatamine	14
2.2.3 Reprogrammeerimine	15
2.2.3.1 Transfektsioon elektroporatsiooniga	15
2.2.3.2 Plasmidi suuruse mõju transfektsiooni efektiivsusele	16
2.2.3.3 Transduktsioon Sendai viirustega	16
2.2.4 Tüvirakkude kasvatamine koekultuuris	17
2.2.5 Rakuliini analüüs	17
2.2.5.1 Karüotüübi analüüs	17
2.2.5.2 STR analüüs	17
2.2.5.3 Mükoplasma testimine	17
2.2.5.4 Sendai viiruste puudumise kontrollimine	18
2.2.5.5 Voolutsütomeetria pluripotentsusmarkerite ekspressiooni kontrollimiseks	19
2.2.5.6 Diferentseerumispotentsiaali hindamine	20
2.3 Tulemused	22
2.3.1 Reprogrammeerimiseks kasutatud vererakud	22
2.3.1.1 Vererakkude puhastamine värskest verest	22
2.3.1.2 Vererakkude puhastamine külmutatud verest	23
2.3.2 Vererakkude ettekasvatamine	25
2.3.3 Reprogrammeerimine	27
2.3.3.1 Elektroporatsioon	27
2.3.3.2 Reprogrammeerimine Sendai viirustega	29

2.3.5 Loodud iPSC rakuliini analüüs	30
2.3.5.1 Karüotüübi analüüs	30
2.3.5.2 STR analüüs	31
2.3.5.3 Mükoplasma testimine	35
2.3.5.4 Sendai viiruste puudumise kontrollimine	35
2.3.5.5 Pluripotentsusmarkerite ekspressioon	36
2.3.5.6 Diferentseerumispotentsiaali hindamine	38
2.4 Arutelu	47
<b>KOKKUVÕTE</b>	<b>50</b>
<b>TÄNUSÕNAD</b>	<b>52</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS</b>	<b>53</b>
<b>TÖÖS KASUTATUD VEEBIAADRESSID</b>	<b>61</b>
<b>LISAD</b>	<b>62</b>
Lisa 1. Punaste vererakkude lüüsi puhvri koostisosad.	62
Lisa 2. Töös kasutatud praimerid	63
Lisa 3. Plasmidi suuruse mõju transfektsiooni efektiivsusele	65

## KASUTATUD LÜHENDID

ESC – embrüonaalsed tüvirakud (*embryonic stem cells*)

FBS – veise loote seerum (*fetal bovine serum*)

GFP – roheline fluorentseeruv valk (*green fluorescent protein*)

GWAS – ülegenoomne assotsiatsiooniuuring (*genome-wide association study*)

iPSC – indutseeritud pluripotentsed tüvirakud (*induced pluripotent stem cells*)

KLF4 – Kruppeli-sarnane faktor 4 (*Kruppel-like factor 4*)

MYC – proto-onkogeenide perekonna nimi (*family of proto-oncogenes*)

NGS – tavaline kitseseerum (*normal goat serum*)

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

OTX2 – *orthodenticle homeobox 2*

PAX6 – *paired box protein 6*

PBMC – perifeerse vere mononukleaarne rakk (*peripheral blood mononuclear cell*)

PBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus (*phosphate buffered saline*)

qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*quantitative polymerase chain reaction*)

SeV – Sendai viirus

SOX2 – sugu määrava regioon-Y box-2 transkriptsioonifaktor (*sex determining region Y-box 2*)

STR – lühike kordusjärjestus (*short tandem repeat*)

## SISSEJUHATUS

Viimasel ajal on tehtud laiaulatuslikke ülegenoomseid assotsiatsiooniuringuid (GWASe), et uurida genotüüpide ja fenotüüpide vahelisi seoseid, kuid keerulisem on seotud variantide funktsionaalse panuse väljaselgitamine fenotüübi avaldumisse. Selle jaoks saab kasutada indutseeritud pluripotentseid tüvirakke (iPSC). iPSC-de tegemiseks on erinevaid meetodeid, saab kasutada nii integreeruvaid kui mitteintegreeruvaid vektoreid. Eelistatud on mitteintegreeruvad, sest genoomi integreerumine võib põhjustada mutatsioone ja geeniekspressiooni muutust. Samas on mitteintegreeruvad vektorid vähem efektiivsed. iPSC-sid saab teha erinevatest rakutüüpidest, sagedasti on selleks kasutatud fibroblaste. Vererakud pakuvad sellele aga alternatiivi, kuna vereproovi võtmine on vähem invasiivne kui nahabiopsia. Samas on iPSC-de loomise efektiivsus vererakkudest madalam kui fibroblastidest. Antud magistritöös kasutatakse geenivaramu vereproove, mis on teadaolevalt olnud külmutatuna kauem, kui seni teadustöodes kasutatud vererakud.

Käesoleva magistritöö kirjanduse osas antakse ülevaade indutseeritud pluripotentsetest tüvirakkudest, sealhulgas nende tegemiseks kasutatavatest meetoditest ja rakutüüpidest. Eksperimentaalselt oli eesmärgiks välja töötada protokoll, mis võimaldaks luua indutseeritud pluripotentseid tüvirakuliine Geenivaramu külmutatud vereproovidest.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Funktsionaalsed katsed ja Eesti geenivaramu

Viimase 15 aasta jooksul on tehtud laiaulatuslikke ülegenoomseid assotsiatsiooniuringuid (GWASe), et uurida geneetiliste markerite (genotüüpide) ja fenotüüpide vahelisi seoseid. Need uuringud on seostanud tuhandeid variante sadade fenotüüpidega (MacArthur *et al.*, 2017), kuid keerulisem ja seetõttu oluliselt vähem uuritud on seotud variantide funktsionaalne panus fenotüübi avaldumisse (Gallagher ja Chen-Plotkin, 2018). Nende katsete läbiviimine on keeruline, kuna fenotüübiga seotud molekulaarsed mehhanismid on tihti rakutüübi spetsiifilised. Seetõttu sobiksid selliste uuringute läbiviimiseks hästi iPSC rakud, mida on võimalik luua soovitud genotüüpide või fenotüüpide põhjal ning mida on võimalik seejärel diferentseerida huvipakkuvateks rakutüüpideks. Eesti geenivaramu biopank on väärtuslik ressurss ainulaadse iPSC kollektsiooni loomiseks, kuna geenivaramusse on kogutud geenidoonorite terviseandmed, mis võimaldavad uurida seoseid geenide ja haiguste vahel ehk on olemas informatsioon nii genotüübi kui ka fenotüübi kohta. Eesti geenivaramu on riiklik biopank, millega on liitunud juba üle 210 000 eestlase, kellest kõik on genotüüpiseeritud. Rohkem kui 5500 geenidoonorile on tehtud ka täisgenoomi või eksoomi analüüs ning seda numbrit suurendatakse järjepidevalt (Eesti Geenivaramu, 2021). Esimesel 50 000 geenidoonoril on kogutud verest *buffy coat*, mida hoitakse külmutatuna vedelas lämmastikus. Neid rakke saaks kasutada iPSC-de tekitamiseks, mida omakorda saaks kasutada funktsionaalsete uuringute läbiviimiseks.

## 1.2 Indutseeritud pluripotentsed tüvirakud ja embrüonaalsed tüvirakud

Pluripotentsed tüvirakud on rakud, millel on võime piiramatult jaguneda (andes järglaseks samasuguste omadustega rakke) ja diferentseeruda kõikideks kehas leiduvateks rakutüüpideks (Romito ja Cobellis, 2016). Pluripotentsete rakkude alla kuuluvad embrüonaalsed tüvirakud (ESC) ja indutseeritud pluripotentsed tüvirakud (iPSC). Embrüonaalsed tüvirakud saadakse blastotsüsti staadiumi embrüote sisemisest rakumassist (Bellin *et al.*, 2012). Indutseeritud pluripotentsed tüvirakud (iPSC) on somaatiliste rakkude reprogrammeerimise tulemusena saadud rakud, millel on sarnased omadused embrüonaalsetele tüvirakkudele (Ye *et al.*, 2013).

See uurimistöö keskendub inimese rakkudele. Esimest korda demonstreerisid inimese somaatiliste rakkude reprogrammeerimist tüvirakkudeks Takahashi ja kolleegid 2007. aastal.

Nad tegid fibroblastidest iPSC-d, kasutades retroviirustega transduktsiooni, et viia rakkudesse plasmiidid, mis võimaldavad nelja transkriptsioonifaktorit (OCT3/4, SOX2, KLF4 ja c-MYC) üleekspresseerida. Pärast seda on somaatilistest rakkudest iPSC-de saamiseks välja töötatud mitmeid alternatiivseid meetodeid, mis on kirjeldatud peatükis 1.3.

Tüvirakkudel on märkimisväärne potentsiaal mitmete rakenduste jaoks, sealhulgas haiguste modelleerimine, ravimite avastamine ja personaalsed rakuteraapiad. Embrüonaalsete tüvirakkude kasutamisega kaasnevad aga nii eetilisusest kui ka turvalisusest lähtuvad murekohad. Eetilised probleemid on seotud peamiselt sellega, et nende saamine hõlmab inimese embrüote kasutamist. Samuti ei pruugi embrüonaalsed tüvirakud olla inimestele siirdamiseks ohutud, sest on näidatud, et ESC siirdamine hiirtesse võib põhjustada pahaloomulisi kasvujaid (Hadjimichael *et al.*, 2015). Kolmandaks võidakse need immuunsüsteemi poolt siirdamise järgselt ära tõugata (Lo ja Parham, 2009).

Indutseeritud pluripotentsed tüvirakud pakuvad turvalisemat alternatiivi embrüonaalsetele tüvirakkudele. Pluripotentsete rakkude saamine patsiendi enda rakkude reprogrammeerimise teel (iPSC) võib lahendada mõned ESC kasutamisega seotud murekohad - see minimeerib immuunsüsteemi äratõukereaktsiooni, vähendades infektsioonide ja kasvaja tekke riski (Lu *et al.*, 2019) ja kaotab embrüote kasutamisega seotud eetilised probleemid, kuna embrüoid ega munarakke ei kasutata (Lo ja Parham, 2009). iPSC-de diferentseerimisel on võimalik uurimiseks kasutada erinevaid patsiendi spetsiifilisi rakutüüpe, mida muidu oleks keeruline saada (näiteks neuroneid ja kardiomyotsüüte), kuid mis on väärtuslikud haiguste modelleerimiseks ja ravimite avastamiseks (Okita *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2013). Erinevate haiguste uurimiseks on loodud iPSC liine näiteks Huntingtoni tõve, Parkinsoni tõve, seljaaju lihaskatroofia ja Rett'i sündroomiga patsientide rakkudest (Okita *et al.*, 2013). iPSC-de sarnasuse tõttu inimese embrüonaalsete tüvirakkudega on neist saanud oluline tööriist.

### **1.3 Erinevad rakutüübid iPSC-de tegemiseks**

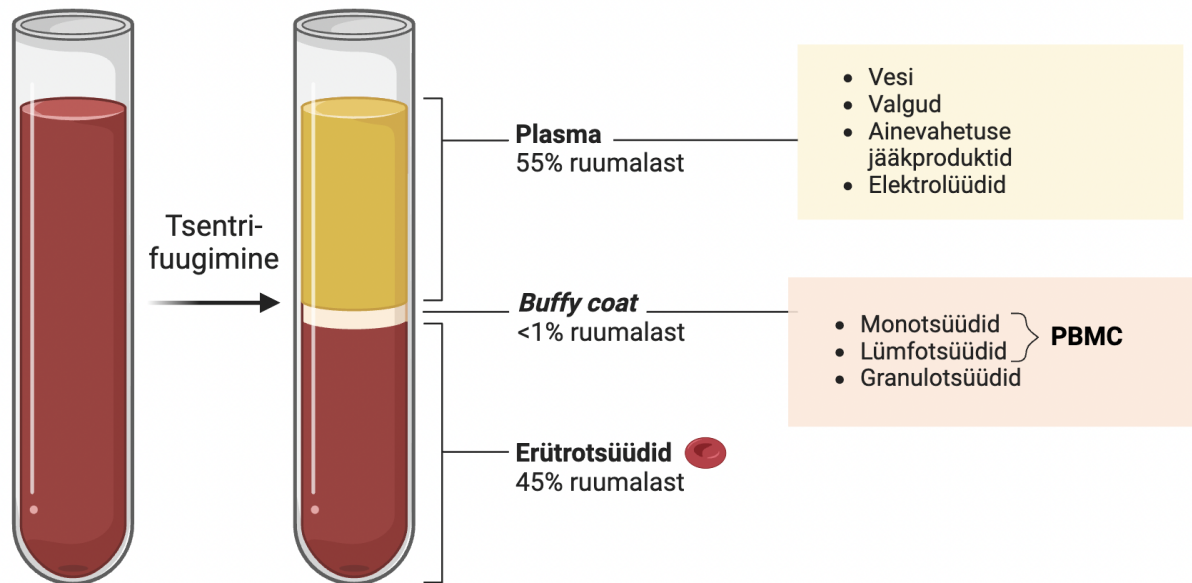
Inimese iPSC-sid saab luua erinevatest somaatilistest rakkudest, sealhulgas fibroblastidest, keratinotsüütidest, mesenhümaalsetest tüvirakkudest (Okita *et al.*, 2013), vererakkudest (Meraviglia *et al.*, 2015) ja uriinis esinevatest neerutuubulirakkudest (Zhou *et al.*, 2011). Indutseeritud pluripotentsete tüvirakkude (iPSC-de) päritolu mõjutab reprogrammeerimise ja diferentseerimise efektiivsust (Ye, 2013). Siiani kõige sagedamini kasutatav rakutüüp on

fibroblastid, mille isoleerimine nõuab koeproovi võtmist, mis on invasiivne kirurgiline protseduur (Meraviglia *et al.*, 2015). Vererakud (spetsiifilisemalt perifeerse vere mononuklearsed rakud (PBMCd)) on atraktiivne allikas iPSC-de tekitamiseks nende kogumise madala invasiivsuse tõttu (Okita *et al.*, 2013; Meraviglia *et al.*, 2015). Lisaks uuendatakse vererakke pidevalt luuüdis leiduvate hematopoeetiliste tüvirakkude poolt, seetõttu on võrreldes naha fibroblastidega väiksem tõenäosus, et nende DNAs on tekkinud keskkonna poolt põhjustatud mutatsioone (Dowey *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2008).

Vererakkudest on võimalik iPSC-de loomiseks kasutada erütroidsed eellasrakke, B- ja T-rakke. Erütroidsete eellasrakkude kasutamine on eelistatud, sest T- ja B-rakud sisaldavad geneetilisi ümberkorraldusi V(D)J regioonis, mis võib limiteerida nende kasutatavust teadusuuringutes ja eriti rakuteraapias (Al-Shehri *et al.*, 2021; Serwold *et al.*, 2010). Geneetiliste ümberkorralduste täpne mõju pole hetkel teada (Brown *et al.*, 2010; Hanna *et al.*, 2008), kuid on näidatud, et see võib põhjustada diferentseerumisvõime vähenemist (Wada *et al.*, 2011). Erütroidsete eellasrakkude peamine probleem on nende vähene kogus perifeerses veres, aga neid on võimalik juurde tekitada, kasvatades neid vastavate kasvufaktoritega söötmes (Filippone *et al.*, 2010).

Meraviglia ja teised (2015) näitasid, et iPSC-sid saab luua perifeerse vere mononukleaarsetest rakkudest (PBMC), mis on pärit külmutatud *buffy coat*'idest (vaata joonis 1). Külmutatud *buffy coat*'id moodustavad suure osa biopankades hoitavatest verenäidistest, moodustades seega kergesti kättesaadava materjali iPSC-de loomiseks ilma, et peaks eraldi proove koguma (Meraviglia *et al.*, 2015; Kleeberger *et al.*, 1999). Ka selles töös kasutatud Geenivaramu proovid on *buffy coat*'id. Proove hakati koguma 2002. aastal ja külmas on esimese ca 50 000 doonori proovid. Siiani pole töö autorile teadaolevalt iPSC-sid loodud nii kaua külmas olnud rakkudest.

## Veri ja selle komponendid



**Joonis 1. Veri ja selle komponendid.** Lühendid: PBMC - perifeerse vere mononukleaarne rakk. Tsentrifugimise tulemusena jaguneb veri plasmaks, *buffy coat*'iks ja erütrotsüütideks. *Buffy coat* omakorda koosneb monotsüütidest, lümfotsüütidest (T-, B- ja NK-rakud) ja granulotsüütidest (neutrofiilid, eosinofiilid, basofiilid). Monotsüüdid ja lümfotsüüdid moodustavad PBMC-d. Joonis on tehtud Biorenderis.

### 1.4 Meetodid iPSC-de saamiseks ja nende piirangud

Indutseeritud pluripotentsete tüvirakkude saamiseks on kasutatud mitmeid lähenemisviise, näiteks viiruslikud vektorid (integreeruvad ja mitteintegreeruvad), episomaalsed vektorid, valgud, RNA, CRISPR-Cas või keemilised meetodid (Li *et al.*, 2014, Meraviglia *et al.*, 2015) (vaata tabel 1). Nende loomisel on olulised nii reprogrammeerimise efektiivsus kui ka mutageneesi vältimine. Paljud meetodid, nt viiruslikud ja episomaalsed vektorid põhinevad Yamanaka faktorite (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) üleekspressioonil. Võidakse kasutada ka lisafaktoreid protsessi efektiivsemaks muutmiseks, tihedamini kasutatavate hulgas on LIN28A (Wang *et al.*, 2019) ja p53 ekspressiooni allasurumine (Rasmussen *et al.*, 2014).

**Tabel 1. Meetodid, mida kasutatakse reprogrammeerimiseks.**

Kategooria	Reprogrammeerimise meetod	Viide katsele, kus on kasutatud
Viiruslikud integreeruvad vektorid	retroviirus	Takahashi, Yamanaka, 2007
	lentiviirus (retroviiruste alamkategooria)	Sommer <i>et al.</i> , 2012
Viiruslikud mitteintegreeruvad vektorid	adenoviirus	Zhou & Freed, 2009
	Sendai viirus	Seki <i>et al.</i> , 2010
DNAl põhinevad	episomaalsed vektorid/ plasmiidid	Si-Tayeb <i>et al.</i> , 2010
		Okita <i>et al.</i> , 2011
	miniring DNAd	Narsinh <i>et al.</i> , 2011
	transposoonid	Davis <i>et al.</i> , 2013
RNAd	modifitseeritud mRNA	Uhm <i>et al.</i> , 2017
	miRNA	Miyoshi <i>et al.</i> , 2011
CRISPR	CRISPRa, mille sihtmärgiks on endogeensed <i>OCT4</i> , <i>SOX2</i> , <i>KLF4</i> , <i>c-MYC</i> , ja <i>LIN28A</i> promootorid	Weltner <i>et al.</i> , 2018
Valgud	<i>OCT4</i> , <i>SOX2</i> , <i>KLF4</i> , ja <i>c-MYC</i> , mille külge on pandud rakku tungiv peptiid ( <i>cell-penetrating peptide</i> )	Kim <i>et al.</i> , 2009
Keemilised meetodid	Faas I: CHIR99021, 616452, TTNPB, Y27632, ABT869 ja SAG Faas II: 5-asatsütidin, tranüülsüpromiin, JNKIN8 Faas III: epigeneetilised regulaatorid (tranüülsüpromiin,	Guan <i>et al.</i> , 2022

	valproehape, DZNep, EPZ004777 ja UNC0379) ja raku signaaliülekanne inhibiitorid (CHIR99021, 616452, Y27632, PD0325901) Faas IV: CHIR99021, PD0325901, SB590885, IWP2 ja Y27632	
--	--	--

### 1.3.1 Integreeruvad vektorid

Integreeruvatest vektoritest on iPSCde loomiseks kasutatud retroviiruseid (Takahashi ja Yamanaka, 2007) ja lentiviiruseid (Sommer *et al.*, 2012). Spetsiifilised transkriptsioonifaktorid (näiteks OCT4, SOX2, KLF4 ja c-MYC) viiakse somaatilistesse rakkudesse retroviiruste või lentiviiruste abil. Need viirusvektorid integreerivad reprogrammeerimisfaktorid peremeesgenoomi, põhjustades pluripotentsuse geenide stabiilset ja pikaajalist ekspressiooni. Selle meetodiga kaasneb kõrge reprogrammeerimise efektiivsus, kuid kuna viirusvektorid integreeruvad peremeesrakkude genoomi, siis võib sellega kaasneda mutagenees, geeniekspressiooni püsiv muutus ja vaigistatud transgeenide taasaktiveerumine ja ka kasvajate teke (Okita *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2013; Check, 2005).

### 1.3.2 Mitteintegreeruvad vektorid

Mitteintegreeruvatest viiruslikest vektoritest on kasutusel adenoviirused (Zhou ja Freed, 2009) ja Sendai viirus (Lieu *et al.*, 2013). Lisaks sellele on võimalik kasutada erinevaid mitteviiruslike vektoreid nagu plasmiidid (Okita *et al.*, 2011; Si-Tayeb *et al.*, 2010), transposoonid (Davis *et al.*, 2013), valgud (Kim *et al.*, 2009) ja RNA (Annand, 2021; Uhm *et al.*, 2017; Warren *et al.*, 2012) (vaata tabel 1). Need meetodid vähendavad geneetiliste muutuste riski, muutes need paremaks alternatiiviks kliiniliste rakenduste jaoks. Siiski on nende reprogrammeerimise efektiivsus sageli oluliselt madalam võrreldes integreeruvatel viirusvektoritel põhinevate meetoditega (Li *et al.*, 2014; Okita *et al.*, 2011). Sendai viirusel on teistest mitteintegreeruvatest vektoritest kõrgem efektiivsus (Li *et al.*, 2014), kuid kommertsiaalne reprogrammeerimiskit on kallis (Meraviglia *et al.*, 2015) ja ise Sendai viirusvektorite muutmine töömahukas ja tehniliselt keeruline (Okita *et al.*, 2011). Paljude mitteviiruslike vektorite (nt plasmiidid) rakku sisse viimiseks kasutatakse elektroporatsiooni.

Selles osas on tehtud olulisi tehnoloogilisi edusamme, mis on viinud suurenenud transfektsiooni efektiivsuseni, kuid probleemiks on madal rakkude elujõulisus (Mellott *et al.*, 2014). Ülalmainitud meetoditest on loodud verest integreerumisvabasid iPSC-e, kasutades Sendai viiruseid ja episomaalseid vektoreid (Zhang, 2013).

## 2.0 EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Antud töö eksperimentaalosa eesmärgiks oli välja selgitada, kas ja mis protokoll kasutades on TÜ Eesti geenivaramu külmutatud vereproovidest võimalik luua indutseeritud pluripotentsid tüvirakke. Reprogrammeerimiseks kasutati episomaalseid vektoreid ja Sendai viirust.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Vererakkude puhastamine

Värskest verest eraldati kõigepealt *buffy coat* (2.2.2.1) ja seejärel puhastati punaste vererakkude lüüsipuhvriga (2.2.2.2) või SepMate tuubidega (2.2.2.3). Külmutatud verega tehti kohe puhastamine (2.2.2.2 või 2.2.2.3).

##### 2.2.1.1 Värskest verest *buffy coat*'i eraldamine

Vabatahtlikelt võttis verd spetsialist Esta Pintsar Geenivaramu andmekogumis- ja nõustamiskabinetis. Veri koguti BD Vacutainer Plus Plastic K2 EDTA-ga tuubidesse. Värske veri tsentrifuugiti 15 minutit 800 g juures. Pärast tsentrifuugimist suurem osa plasmast eraldati, kasutades seroloogilist pipetti. Pärast plasma eraldamist pipeteeriti 120 µl DMSO-d ja 750 µl plasmat 1,5 ml Eppendorfi tuubi, segati ja jahutati jää peal. Seejärel eemaldati verega tuubist 600 µl *buffy coat*'i ja lisati see eelnevalt valmistatud DMSO ja plasma segule ning suspendeeriti. Seejärel paigutati segu krüokülmutusanumasse ja viidi -80°C sügavkülmikusse. Järgmisel päeval viidi proovid üle vedela lämmastiku hoidlasse pikaajaliseks säilitamiseks.

##### 2.2.1.2 Vererakkude puhastamine punaste vererakkude lüüsipuhvriga

Eksperimentaalses osa kõikides etappides kasutati modifitseeritud PBS-i ilma kaltsiumi ja magneesiumita (HyClone, #SH30028.02).

Vererakkude puhastamine punaste vererakkude lüüsipuhvriga tehti Meraviglia *et al.* protokoll järgi (2015). *Buffy coat* lahjendati steriilse PBS-iga lõppmahuni 2 ml. Lahjendatud *buffy coat* viidi 50 ml koonilisse katsutisse, lisati 10 ml punaste vererakkude lüüsipuhvrit (koostise jaoks vaata lisa 1) ja inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Kogumaht viidi PBS-ga 50 ml-ni ja tsentrifuugiti toatemperatuuril 300g juures 10 minutit. Supernatant aspireeriti ja sade pesti 50

ml PBS-ga (tsentrifuugimine toatemperatuuril 300g juures 10 minutit). Rakud võeti üles 2 ml SFEMII (StemSpan Serum-Free Expansion Medium II, StemCell Technologies, #09655) söötmes, millele oli lisatud StemSpan erythroid expansion supplement (StemCell Technologies, #02692), 10 µl 10 mM deksametasooni (StemCell Technologies, #72092), 20 µl 0,2 mg/ml IGF-1 (StemCell Technologies, #78142.1) (samade lisanditega söödet kasutati ka kõikides järgmistes etappides, kus kasutati SFEMII söödet). Rakud kanti üle 12-kannulise plaadi ühte kannu. Neid inkubeeriti 48 tundi.

### **2.2.1.3 Vererakkude puhastamine SepMate tuubidega**

Rakkude puhastamine SepMate tuubidega tehti StemCell Technologies SepMate-15 #85415 protokoll järgi. 4,5 ml tihedusgradiendi söödet LymphoPrep'i lisati SepMate'i katsutisse. Proov lahjendati võrdse mahu PBS + 2% FBS-ga (StemCell Technologies, #07905), õrnalt segades. Lahjendatud proov (veri + PBS) lisati SepMate'i katsutisse, hoides samal ajal SepMate'i tuubi vertikaalselt ja pipeteerides seda tuubi küljelt alla. Seejärel tsentrifuugiti toatemperatuuril 1200g juures 10 minutit. Ülemine kiht (koos MNC-dega) valati uude tuubi. Kogumaht viidi PBS-ga 50 ml-ni ja tsentrifuugiti toatemperatuuril 300g juures 10 minutit. Supernatant eemaldati ja sade pesti veel üks kord 50 ml PBS-ga, fuugides 300g juures 10 minutit. Rakud võeti üles 2 ml SFEMII söötmes, kanti üle 12-kannulise plaadi ühte kannu ja inkubeeriti 48 tundi.

### **2.2.2 Vererakkude ettekasvatamine**

Kõiki rakke kultiveeriti 37°C ja 5% CO<sub>2</sub> juures. Punaste vererakkude eellasrakkude kasvatamiseks kasutati lisanditega SFEMII söödet. Rakke kasvatati söötmes 7-12 päeva, vahetades üle päeva söödet. Selleks tõsteti rakud 15 ml tuubi, tsentrifuugiti 300g juures 10 minutit ja võeti üles 1 ml söötmes.

T-rakke rakke kasvatati neli päeva RPMI söötmes (Corning, #10-041-CV), kuhu oli lisatud 0,2 µl/ml IL-2 (Gibco, #PHC0026) ja 25 µl/ml CD3/CD28 vastaseid antikehi (StemCell Technologies, #10991). Söödet vahetati samuti üle päeva ja selleks tsentrifuugiti rakke 300g juures 10 minutit ja võeti need üles 1 ml söötmes.

## 2.2.3 Reprogrammeerimine

### 2.2.3.1 Transfektsioon elektroporatsiooniga

**Tabel 2. Elektroporatsiooni jaoks vajalikud plasmiidid**

Plasmiidid	Mida kodeerib
pCXLE-hOCT3/4-shp53	OCT3/4 ja shRNA p53 vastu
pCXLE-hSK	SOX2, KLF4
pCXLE-hUL	L-MYC, LIN28
pCXLE-EGFP	GFP (et näha transfektsiooni efektiivsust)

Transfektsioon tehti koostööpartnerilt Genoomika instituudi bioinformaatika ja meditsiinilise genoomika kaasprofessorilt Irene Gallego Romerolt saadud protokoll järgi, mis põhineb StemCell Technologies Erythroid Progenitor ja LifeTech Epi5 CD34+ reprogrammeerimisprotokollidel.

Esimesel päeval pesti rakud PBS-ga (tsentrifuugides 300g juures 5 minutit) ja võeti üles T-puhvris (Invitrogen, MPK10096) tihedusega  $1 \times 10^6$ . Rakud jagati 100  $\mu$ l kaupa eppendorfi tuubidesse ja lisati 1,5ng igat plasmidi (tabel 2). Masinasse lisati 3 ml puhvrit E2 (Invitrogen, MPK10096). Elektroporatsioon viidi läbi Neon Transfection masinaga (Thermo Fisher Scientific), kasutades 100 $\mu$ l otsikuid ja järgmisi parameetreid: 1650V, 10ms, 3 pulssi. Elektroporeeritud rakud kanti Matrigel maatriksiga (Corning, #354277) kaetud 6-kannulisele plaadile koos 2 ml SFEMII söötmega, jaotades rakud tihedustega  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$  ja  $5 \times 10^5$ . Teisel päeval lisati 1 ml SFEMII söödet ilma söödet eemaldamata. Pärast 48 tunni möödumist vaadati rakke fluorestsentsmikroskoobi all, et näha GFP-d. Kolmandal ja viiendal päeval lisati 1 ml ReproTeSR (StemCell Technologies, #05926) söödet (ilma söödet eemaldamata). Seitsmendal päeval eemaldati sööde ja lisati 2 ml ReproTeSR söödet. Edasi vahetati söödet üle päeva, kuni ilmusid kolooniad (umbes 18-25 päeva jooksul).

T-rakkudega kasutati RPMI söödet, kuhu oli lisatud IL-2 ja CD3/CD28 ning samu parameetreid.

### 2.2.3.2 Plasmidi suuruse mõju transfektsiooni efektiivsusele

Plasmidi suuruse mõju uurimiseks transfektsiooni efektiivsusele T-rakkudega kasutati samu parameetreid nagu ülal kirjeldatud, aga plasmiididena kasutati pCXLE-EGFP plasmidi, mille suurus on 11kb või N1-GFP plasmidi suurusega 5kb. Tulemuste hindamiseks vaadati rakke pärast 48h möödumist fluorestantsmikroskoobi all ja tehti voolutsütomeetria. Rakud loendati Countess II Automated Cell Counter masinaga (Invitrogen) ja jaotati 300 000 raku kaupa FACSi tuubidesse ja tsentrifugeeriti 300g juures 5 minutit toatemperatuuril. Supernatant aspireeriti ja rakud pesti 1 ml PBS-s (tsentrifugeerimine tehti samade parameetritega). Seejärel rakud suspendeeriti 200 µl PBS-s, kuhu lisati 1: 2000 lahjenduses DAPI-t (Sigma-Aldrich, #D9542). Analüüsi kasutades BD FACSAria I (BD Biosciences, USA) masinat.

### 2.2.3.3 Transduktsioon Sendai viirustega

Katsed Sendai viirustega tehti Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biomeditsiini BSL-2 laboris. Transduktsioon viidi läbi kasutades protokollit, mis põhineb StemCell Technologies tehnilisel manuaalil "*Integrated workflow for the isolation, expansion and reprogramming of erythroid progenitor cells*" ja Thermo Fisheri Cytotune -iPS 2.0 Sendai reprogrammeerimiskit'i protokollil.

Rakud värviti trüpaansinise (Invitrogen, #T10282) ja loendati Countess Automated Cell Counter masinaga. 150 000 raku viidi ümara põhjaga 1 ml eppendorfi tuubi. 1 ml tuubi lisati viirused (kogused vastavalt tootja juhistele) ja 1 ml SFEMII söödet. Sööde koos viirustega lisati tuubi, kus on rakud ja suspendeeriti. Rakke tsentrifugeeriti 1000g juures toatemperatuuril 30 minutit. Pärast seda lisati 1 ml SFEMII söödet, rakud suspendeeriti ja viidi 12-kannulise plaadi ühte kannu. Neid inkubeeriti üleöö. Järgmisel päeval viidi rakud 15 ml tuubi ja viirused eemaldati tsentrifugeerides 200g juures 10 minutit. Supernatant eemaldati ja rakud võeti üles 0,5 ml SFEMII-s ning kanti 24-kannulise plaadi ühte kannu. Rakke inkubeeriti 2 päeva. Seejärel loendati rakud samamoodi nagu üleval kirjeldatud ja kanti Matrigel'iga kaetud 6-kannulise plaadi kannu tihedusega  $1 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$  koos 2 ml SFEMII söötmega. Neljandal päeval lisati 1 ml SFEMII (ilma söödet eemaldamata). Viiendal ja kuuendal päeval lisati 1 ml ReproTeSR söödet (ilma söödet eemaldamata). Seitsmendal päeval sööde eemaldati ja asendati 2 ml värsket ReproTeSR söötmega. Edasi vahetati söödet igal teisel päeval (lisades 2 ml ReproTeSR söödet igasse kannu) kuni iPSC kolooniate tekkimiseni (oodatud kolooniate tekkimise aeg on umbes 25 päeva).

## **2.2.4 Tüvirakkude kasvatamine koekultuuris**

Katsetes kasutati kontrollina embrüonaalset tüvirakuliini H9 (46, XX). iPSC ja H9 rakke kasvatati Matrigel'iga (BD Biosciences, #354277) kaetud 6-kannulistel koekultuuri plaatidel defineeritud koostisega mTeSR Plus (StemCell Technologies, #100-0276) söötmes, mida vahetati iga päev. Tüvirakkudele sobiva kasvukeskkonna tagamiseks hoiti kultuuri inkubaatoris temperatuuril 37 °C ning 5% CO<sub>2</sub> juures.

Rakke passeeriti rutiinsel kasvatamisel iga 3-4 päeva järel. Esimesed kümme passeerimist viidi läbi manuaalselt. Selleks kraabiti hES rakkude kolooniatükid pipetiotsikuga kasvupinnalt lahti ning tõsteti seejärel uuele Matrigel'iga kaetud koekultuuri plaadile. Lisati 0,4 µl 10mM inhibiitor Thiazovivini (StemCell Technologies, #72254) (0,2 µl inhibiitorit 1 ml söötmesse). Pärast seda passeeriti rakke ReLeSR-ga (StemCell Technologies, #05872). H9 rakke passeeriti samuti ReLeSR-ga. hES ja iPSC rakkude igapäevase kultiveerimisega tegeles TÜ rakubioloogia õppetooli vanemlaborant Annika Trei.

## **2.2.5 Rakuliini analüüs**

### **2.2.5.1 Karüotüübi analüüs**

Karüotüübi analüüsi teostas Tartu Ülikooli Kliinikumi geneetika ja personaalmeditsiini kliiniku laboratoorse geneetika osakonna tsütogeneetik. Metafaasi ettevalmistamine viidi läbi vastavalt standardprotseduuridele ja karüotüüpe analüüsiti Giemsa meetodil ~550 vöödi tasemel. Mosaiiksuse välistamiseks kontrolliti iga proovi jaoks vähemalt 30 metafaasi. Karüotüübi analüüs viidi läbi hiPSC-de kümnenda passaaži juures.

### **2.2.5.2 STR analüüs**

STR (*short tandem repeat*) analüüs teostati Eesti Kohtuekspertiisi Instituudis. Inimese DNA tüpiseeriti DNA STR lookuste alusel PCR-meetodil vastavalt Eesti Akrediteerimiskeskuse akrediteeritud EKEI kinnitatud meetodikale DNA-MR-T. Proove analüüsiti testsüsteemidega NGM Detect ja PowerPlex ESI 17 Fast.

### **2.2.5.3 Mükoplasma testimine**

Mükoplasma puudumine tehti kindlaks Sartorius Microsart AMP Mycoplasma protokoll järgi, tehes qPCR-i ja geelelektroforeesi. Geelelektroforeesiks tehti 2% agarosgeel (Fisher

BioReagents, BP160-500). Markeriks oli GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, SM0373), mida kanti geelile 8 µl. Proove, millele lisati 2 µl 6x MassRuler laadimisvärvi (Thermo Scientific, R0621), kanti geelile samuti 8 µl.

#### **2.2.5.4 Sendai viiruste puudumise kontrollimine**

##### **RNA eraldamine**

RNA eraldus tehti Zymo Research Direct-zol RNA microprep *kit*'iga vastavalt tootja juhistele. Rakud võeti üles 50 µl-s TRI reagensis. Lisati võrdne maht etanooli (96%) ja segati vortexil. Segu kanti kolonni, mis oli asetatud kogumistuubi. Tsentrifugeeriti 12 000g juures 30 sekundit (järgmised tsentrifugeerimised tehti samade parameetritega, kui pole öeldud teistmoodi). Kolonn asetati uude kogumistuubi, sellele lisati 400 µl RNA pesupuhvrit ja tsentrifugeeriti. Edasi lisati tuubi DNase I (6u/ µl) ja 35 µl DNA lagundamispuhvrit ja segati tuubi paar korda tagurpidi pöörates. Inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril. Kolonni lisati 400 µl Direct-zol RNA PreWash'i ja tsentrifugeeriti. Kolonn tõsteti uude kogumistuubi ja sammu korrati. Lisati 700 µl RNA pesupuhvrit tsentrifugeeriti 12 000g juures 1 minut. Kolonn tõsteti puhtasse eppendorfi tuubi, lisati 15 µl vett ja tsentrifugeeriti.

##### **cDNA sünteesimine**

cDNA sünteesimiseks pipeteeriti 200 µl eppendorfi tuubi 13,5 µl vett, 2 µl 10x RT Reaction Premix, oligo juhuslikud praimerid (Solis BioDyne, #06-16-0000S), 3 µl RNA-d ja 1,5 µl FIREScript ensüümisegu (Solis BioDyne, #06-16-0000S). Segu suspendeeriti ja sellega viidi läbi cDNA sünteesi programm, mille parameetrid on leitavad tabelist 3.

**Tabel 3. Programm cDNA sünteesiks**

<b>Temperatuur</b>	<b>Aeg</b>
25°C	5 min
50°C	15 min
85°C	5 min

## qPCR

qPCR-i tegemiseks kanti 384-kannusele plaadile ühte kannu 2 µl 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR segu (Solis BioDyne, #08-36-00001), 0,25 µl F praimer (5 µM), 0,25 µl R praimer (5 µM) (praimerite järjestusete jaoks vaata lisa 2), 7,5 µl cDNA, suspendeeriti ja tsentriifugiti 1000g juures 1 minut. qPCR viidi läbi vastavalt programmile, mis on kirjas tabelis 4. qPCR-i analüüsiks kasutati ( $\Delta\Delta CT$ ) meetodit.

**Tabel 4. qPCR-i programm reprogrammeerimisfaktorite puudumise näitamiseks.**

Etapp	Tsükleid	Temperatuur	Aeg
1	1	95°C	10 min
2	40	95°C	15 sekundit
		60°C	1 minut

## Geelektroforees

qPCR-i tulemused kanti 2% agarosgeelile (Fisher BioReagents, BP160-500) Markerina kasutati 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis BioDyne, #07-11-00050), mida kanti geelile 8µl. Proovidele lisati 2 µl 6x MassRuler laadimisvärvi (Thermo Scientific, R0621) ja neid kanti geelile samuti 8µl.

### 2.2.5.5 Voolutsütomeetria pluripotentsusmarkerite ekspressiooni kontrollimiseks

**Tabel 5. Pluripotentsusmarkerite ekspressiooni kontrollimiseks kasutatud antikehad.**

Antikeha	Päritolu	Kogus
BD Nanog-PE	BD Biosciences, 560483, clone N31-355	10 µl
BD Sox2-PerCPCy 5.5	BD Biosciences, 561506, clone O30-678	2,5 µl
Anti-Oct 3/4	BD Pharmingen AlexaFluor 647 Mouse, cat 560329	0,5 µl

Rakud loendati Countess II Automated Cell Counter masinaga (Invitrogen) ja jaotati 300 000 raku kaupa FACSi tuubidesse ja tsentriifugiti 300g juures 5 minutit toatemperatuuril. Supernatant aspireeriti ja rakud suspendeeriti 1 ml fikseerimispuhvrts (4% paraformaldehüüd PBS lahuses). Inkubeeriti 30 minutit. Seejärel tsentriifugiti fikseeritud rakud taaskord 300g

juures 5 minutit ja supernatant aspireeriti. Rakud pesti 2 ml 1x permeabiliseerimispuhvril (Thermo Fisher Scientific, #00-8333-56), neid tsentrifugiti samade parameetritega. Rakud võeti üles 50 µl permeabiliseerimispuhvril, inkubeeriti 15 minutit. Lisati 50 µl antikehasid permeabiliseerimispuhvril (tabel 5). Inkubeeriti 30 minutit pimedas toatemperatuuril. Pesti 2 ml permeabiliseerimispuhvril, tsentrifugiti samade parameetritega. Seejärel rakud suspendeeriti 200 µl permeabiliseerimispuhvril, kuhu lisati 1: 2000 lahjenduses DAPI-t (4',6-diamidino-2-fenüülindool, Sigma-Aldrich, #D9542). Analüüsiti, kasutades BD FACSAria I (BD Biosciences, USA) masinat.

#### **2.2.5.6 Diferentseerumispotentsiaali hindamine**

Diferentseerumispotentsiaali hindamiseks viidi läbi suunatud diferentseerumine, tehti qPCR ja immunofluoresentsi analüüs. Suunatud diferentseerimine tehti StemCell Technologies STEMdiff Trilineage Differentiation *kit*'iga (#05230) vastavalt tootja juhiste. Rakud passeeriti ReLeSR-ga, loendati ja jaotati kolme kannu vahel vastavalt tootja soovitatud tihedustele. Neid kasvatati kas seitse päeva STEMdiff Trilineage ektodermi söötmes (#05231) või viis päeva STEMdiff Trilineage mesodermi söötmes (#05232) või STEMdiff Trilineage endodermi söötmes (#05233), vahetades iga päev söödet. RNA eraldamine ja qPCR viidi läbi samamoodi nagu kirjeldatud punktis 2.2.5.4. Kasutatud praimerid on kirjas lisa 2. qPCR-i analüüsiks kasutati ( $\Delta\Delta CT$ ) meetodit.

Immunofluoresentsi jaoks kasutatavad antikeha lahused ja DAPI lahus tehti blokeerimispuhvril (2% NGS (*normal goat serum*, Thermo Fisher Scientific, #11819220) PBS-s). Rakkudelt aspireeriti sööde ja neid pesti 500 µl PBS-ga. Rakud fikseeriti 500 µl 4% paraformaldehüüd PBS lahuses 20 minutit toatemperatuuril. Seejärel pesti neid kolm korda viis minutit 500 µl PBS-ga. Rakud permeabiliseeriti 0,2% Triton X-100 lahusega PBS-s 10 minutit toatemperatuuril. Rakke pesti kaks korda kolme minuti jooksul 500 µl PBS-ga. Blokeerimine toimus 500 µl blokeerimispuhvril (2% NGS PBS-is) 1h toatemperatuuril. Blokeerimispuhver aspireeriti ja pesti PBS-ga. Primaarse antikehaga (tabel 6) blokeerimispuhvril inkubeeriti 1h kuni üleöö. Seejärel pesti rakke kolm korda viis minutit 500 µl PBS-ga ning inkubeeriti sekundaarse antikehaga (tabel 6) blokeerimispuhvril 1h toatemperatuuril pimedas. Seejärel pesti rakke jälle kolm korda viis minutit 500 µl PBS-ga ning inkubeeriti DAPI-ga blokeerimispuhvril (1:1000) 10 minutit toatemperatuuril. Peale seda toimus taaskord kolm

korda viis minutit 500 µl PBS-ga pesemine. Edasi lisati alusklaasile tilk paigalduslahust ja klaasid tõsteti alusklaasile.

**Tabel 6. Immunofluoresentsi jaoks kasutatud antikehad.**

<b>Antikeha</b>	<b>Lahjendus</b>
ab224637 Rabbit monoclonal (EPR20684) to SOX17	1:200
ab194045 Rabbit monoclonal (EPR15858) to PAX6	1:200
ab209665 Rabbit monoclonal (EPR18113) to BRACHYURY	1:1000
ab150077 Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 488)	1:500

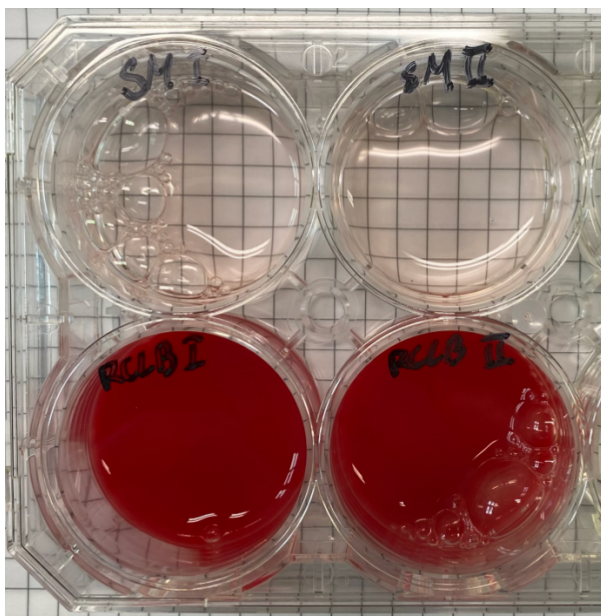
## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 Reprogrammeerimiseks kasutatud vererakud

Geenivaramu doonorite vererakkude kasutamiseks on kaks võimalust. Esimene võimalus on algmaterjalina kasutada juba alla külmutatud *buffy coat* vereproove. Teine variant on patsientide tagasikutsumine ja neilt värske vere võtmine ja selle kasutamine. Katseid tehti nii vabatahtlikelt kogutud värske ja külmutatud verega kui ka geenivaramu doonorite külmutatud *buffy coat* proovidega. Vabatahtlike vereproovide kasutamiseks saadi Tartu Ülikooli inimuuringu eetikakomitee kooskõlastus 382/T-16 ja geenivaramu proovide kasutamiseks Eesti bioetika ja inimuuringu nõukogu otsus nr 1.1-12/1925.

#### 2.3.1.1 Vererakkude puhastamine värskest verest

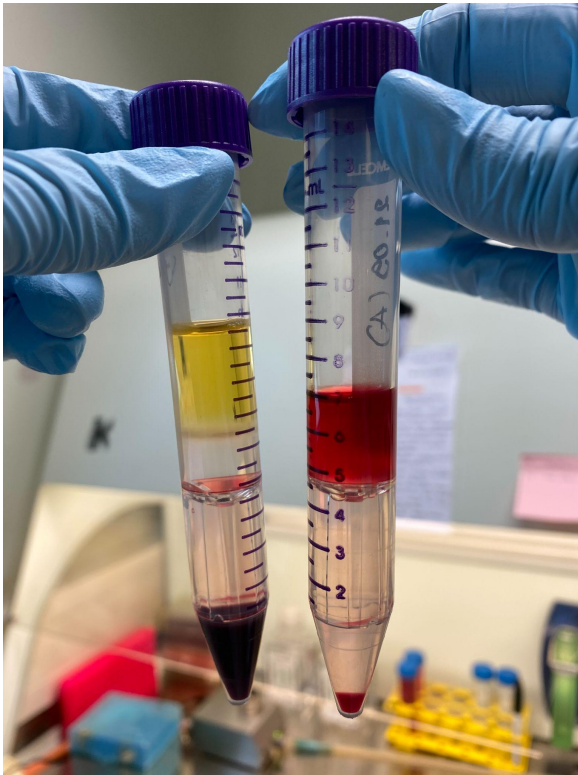
Alguses on veri (*buffy coat*) vaja puhastada punastest vererakkudest. Vere puhastamiseks katsetati kahte meetodit: SepMate tuubid (StemCell Technologies) ja punaste vererakkude lüüsipuhver (RCLB). Värsket verd kasutades oli selgelt näha, et lüüsipuhver ei puhasta verd efektiivselt (vaata joonis 2), samas SepMate tuubid sobisid värske vere puhastamiseks punastest vererakkudest.



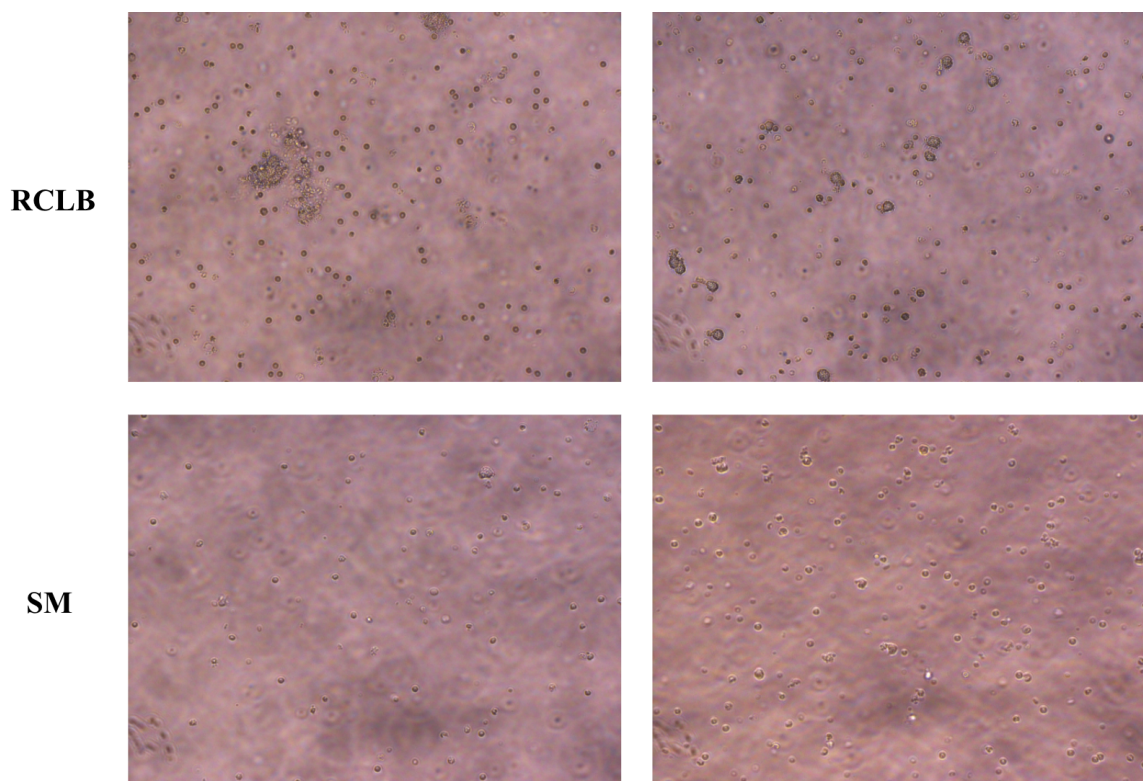
Joonis 2. Veri pärast puhastamist SepMate tuubidega (ülemine rida) ja punaste vererakkude lüüsipuhvriga (alumine rida) ning SFEMII söötme lisamist.

### 2.3.1.2 Vererakkude puhastamine külmutatud verest

Värske ja külmutatud verrega tehtud puhastamise tulemused on selgelt erinevad, eriti SepMate tuube kasutades (lüüsipuhver ei puhastanud edukalt juba värsket verd nagu nähti eelmises punktis). Värske verega töötab punaste vererakkude eraldamine SepMate tuubidega paremini (vaata joonis 3). Külmutatud proovis on punased vererakud ilmselt lüüsunud ja seetõttu ei eraldu tsentrifugimise käigus sama edukalt kui värsket verd kasutades. Mikroskoobi all vaadates olid tulemused sarnased, aga SepMate tuubidega puhastatud proovid tundusid puhtamad kui lüüsipuhvriga puhastatud proovid (vaata joonis 4).



**Joonis 3. Värske (vasakul) ja külmutatud veri (paremal) pärast puhastamist SepMate tuubidega.**



**Joonis 4. Külmutatud veri vabatahtlikult pärast puhastamist lüüsipuhvriga (ülemine rida) ja SepMate tuubidega (alumine rida) 200x suurendusega. Lühendid: RCLB - punaste vererakkude lüüsipuhver (*red cell lysis buffer*), SM - SepMate.**

Nende tulemuste põhjal otsustati alates kuuendast katses (katsete kokkuvõtlikku skeemi vaata jooniselt 10) kasutada ainult SepMate tuube, kuna need andsid selgelt parema tulemuse värsket verd kasutades ja ka külmutatud verd puhastades tundus tulemus puhtam.

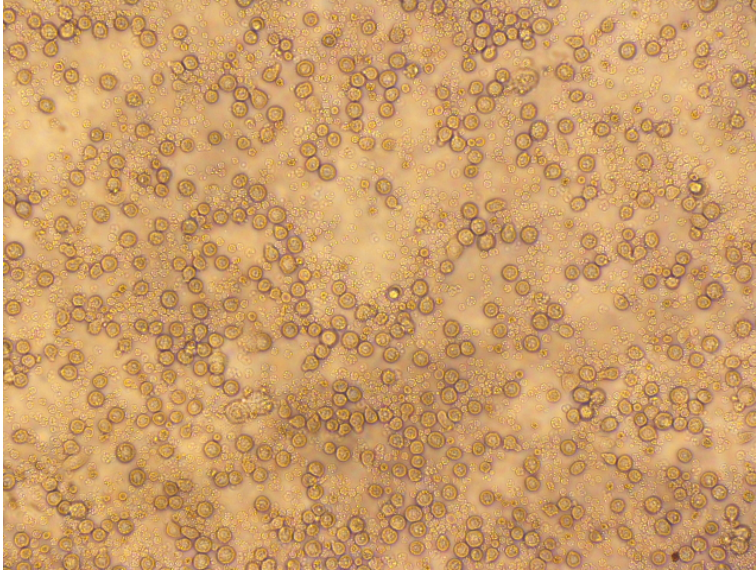
Geenivaramu proovidega oli kõigepealt eesmärgiks näha, kas külmutatud rakkude hulgas on üldse elusaid rakke. Naxo tegi 2015. aastal Eesti geenivaramu proovidele valgete vererakkude elujõulisuse kontrolli, milles 12 proovist 10 proovi andsid nädala möödudes paljunevad valgete vererakkude kobarad. Sellest on aga veel üheksa aastat mööda läinud. Selle töö raames tehtud katsetes kasutati viit geenivaramu proovi. Nendest kolmes oli eelkasvatamise lõpuks edasisteks katseteks piisavalt rakke, ühes oli neid ka pärast üheksat päeva kasvatamist liiga vähe ja üks proov oli saastunud (vaata tabel 7).

**Tabel 7. Rakkude arvukused geenivaramu doonorite proovides pärast SepMate tuubidega puhastamist ja pärast eelkasvatamist.**

Proov	Rakkude arvukus pärast SepMate tuubidega puhastamist	Rakkude arvukus pärast ettekasvatamist (/ml)	Tulemus
1	$1,0 \times 10^6$	-	Tekkis saastus pärast paari päeva kasvatamist
2	$3,0 \times 10^6$	$> 1,00 \times 10^6$ (täpne arv pole teada)	Tehti reprogrammeerimine elektroporatsiooniga, aga kolooniaid ei tekkinud
3	$6,7 \times 10^6$	$1,80 \times 10^6$	Tehti reprogrammeerimine Sendai viirustega, tekkisid iPSC kolooniad
4	$2,26 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	Rakke oli liiga vähe
5	$7,85 \times 10^5$	$5,05 \times 10^5$	Tehti reprogrammeerimine Sendai viirustega, aga kolooniaid ei tekkinud

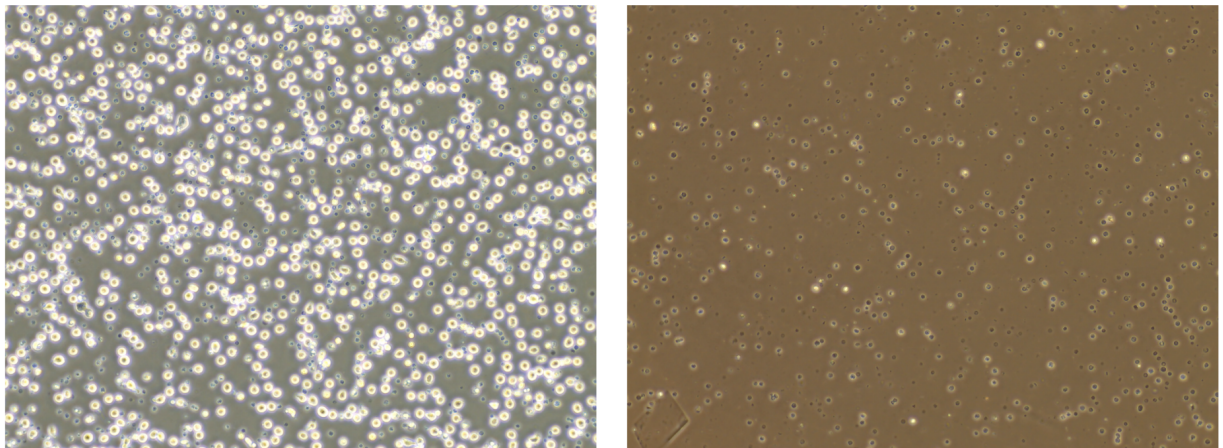
### 2.3.2 Vererakkude ettekasvatamine

iPSC-de tegemiseks vererakkudest on võimalik kasutada punaste vererakkude eellasrakke. Nendega on eelkasvatamine eriti vajalik, sest veres leidub neid vähem kui 1% (Filippone *et al.*, 2010). Eellasrakkude paljundamiseks kasvatati neid lisanditega SFEMII söötmes 7-12 päeva. Vabatahtlike doonorite vererakkude piisavaks paljundamiseks, et saada elektroporatsiooniks vajalikud  $1 \times 10^6$  rakku, sellest piisas (vaata joonis 5).



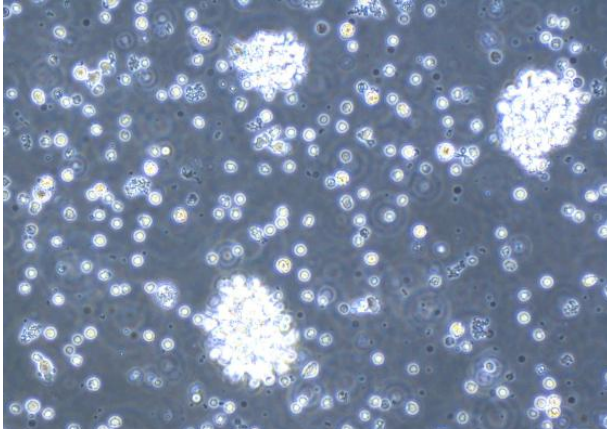
**Joonis 5. Vabatahtliku puhastatud vereproov pärast 9 päeva SFEMII söötmes kasvatamist 200x suurendusega.**

Geenivaramu proovid on üksteisest küllaltki erinevad ja nagu eelmises punktis mainitud, pole mõnes piisavalt elusaid rakke ka pärast rohkem kui 10 päeva kasvatamist. Joonisel 6 on näidatud kaks erinevat proovi (proovid 4 ja 5) pärast 12 päeva samades tingimustes kasvatamist.



**Joonis 6. Kaks geenivaramu vereproovi pärast 12 päeva SFEMII söötmes kasvatamist 200x suurendusega. Vasakul on proov 5 ja paremal proov 4.**

iPSC-de tegemiseks on võimalik kasutada ka veres tunduvalt suuremal arvul leiduvaid T-rakke. T-rakke kasvatati neli päeva RPMI söötmes, kuhu lisati IL-2 ja CD3/CD28 antikehad, et T-rakke aktiveerida. T-rakke aktiveeriti, et need hakkaksid jagunema, kuna on näidatud, et jagunevaid rakke on lihtsam reprogrammeerida (Hu *et al.*, 2019). Need rakud on äratuntava morfoloogiaga, moodustades nii-öelda kobaraid (joonis 7).



**Joonis 7. Vererakud neli päeva pärast IL-2 ja CD3/CD28 antikehadega rikastatud RPMI söötmes kasvatamist 200x suurendusega. T-rakud on näha kobaratena.**

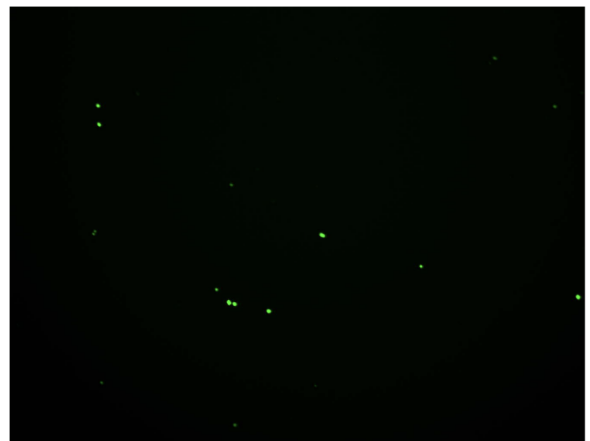
Üldiselt töötas ettekasvatamine/ aktiveerimine nii punaste vererakkude kui ka T-rakkudega, kuid geenivaramu proovides sõltus selle edukus elus rakkude arvust konkreetses proovis.

### **2.3.3 Reprogrammeerimine**

Järgmiseks oli ettekasvatatud rakkude reprogrammeerimiseks vaja sinna sisse viia vastavat informatsiooni kandev DNA, et üleekspresseerida reprogammeerimiseks vajalikke faktoreid. Selleks kasutati kahte reprogrammeerimiseks enim kasutatavat meetodit: elektroporatsiooni plasmiididega ja transduktsiooni reprogrammeerimisfaktoreid sisaldavate Sendai viirustega.

#### **2.3.3.1 Elektroporatsioon**

Elektroporatsiooni tehti alguses punaste vererakkude eellasrakkudega. Transfektsiooni efektiivsus oli madal (joonis 8) ja pärast kolme katset ei õnnestunud saada mitte ühtegi tüvirakukooniat.

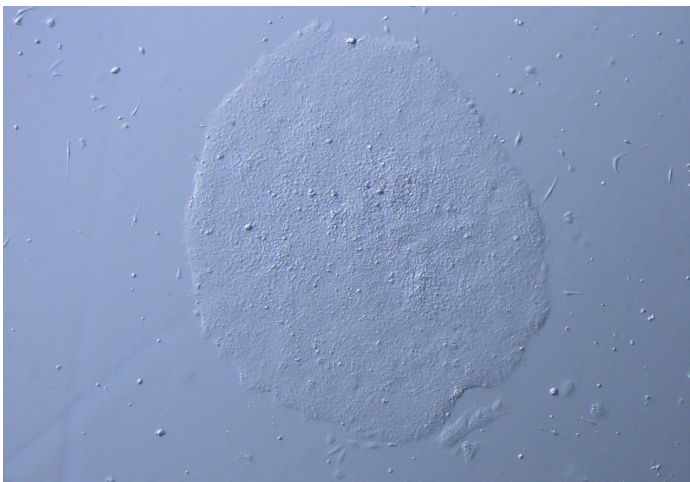


**Joonis 8. GFP signaal fluorestsentsmikroskoobi all 48h pärast transfektsiooni 40x suurendusega. Vasakul valge valguse ja paremal fluorestsentsvalguse all tehtud pilt.**

Seejärel prooviti elektroporatsiooni teha T-rakkudega. Katsete põhjal ei töötanud elektroporatsioon oluliselt paremini T-rakkudega (katsete arvu kokkuvõtteks vaata joonis 10) ning T-rakkudel on erinevalt eellasrakkudest geneetilised ümberkorraldused, seetõttu tehti järgmised katsed ikkagi punaste vererakkude eellasrakkudega.

Lisaks katsetati, kas transfektsiooni efektiivsus sõltub plasmidi suurusest (vaata lisa 3). Selle tulemusena leiti, et väikese plasmiidiga on transfektsioon märkimisväärselt efektiivsem kui suure plasmiidiga, mis võib selgitada transfektsiooni madalat efektiivsust. Suure plasmiidiga jääb efektiivsus alla 1%.

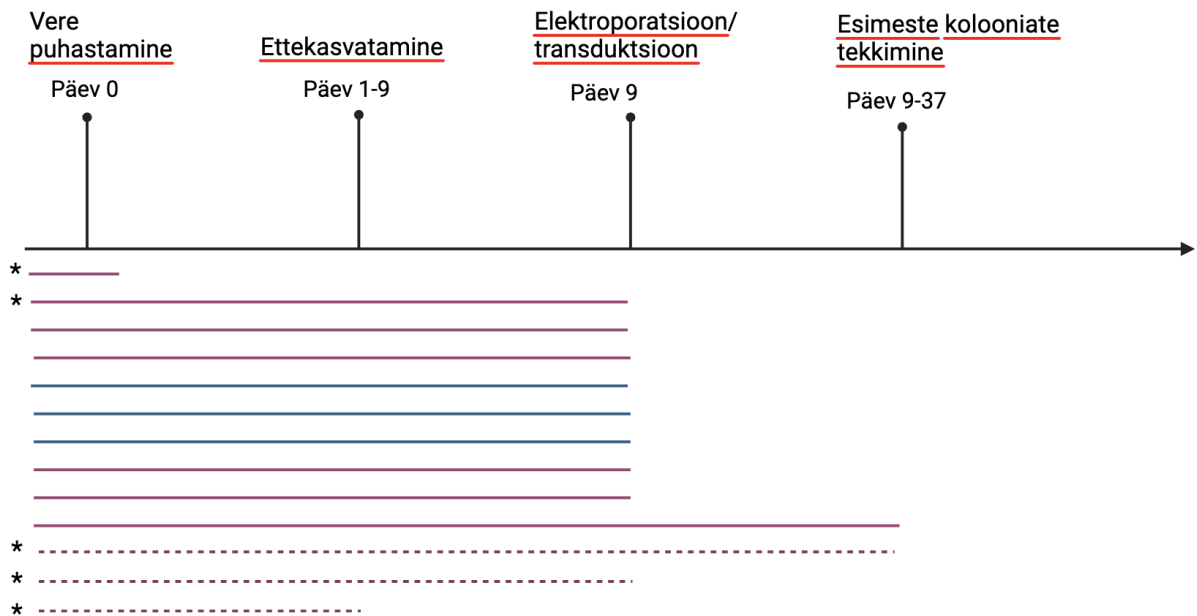
Uuesti punaste vererakkude eellasrakkudega katsetades saadi lõpuks vabatahtliku verest kolooniad (vaata joonis 9), millel oli tüvirakkudele omane morfoloogia. Rakke passeriti kümme korda ja seejärel need külmutati.



**Joonis 9. Vabatahtliku verest elektroporatsiooniga saadud iPSC koloonia 40x suurendusega.**

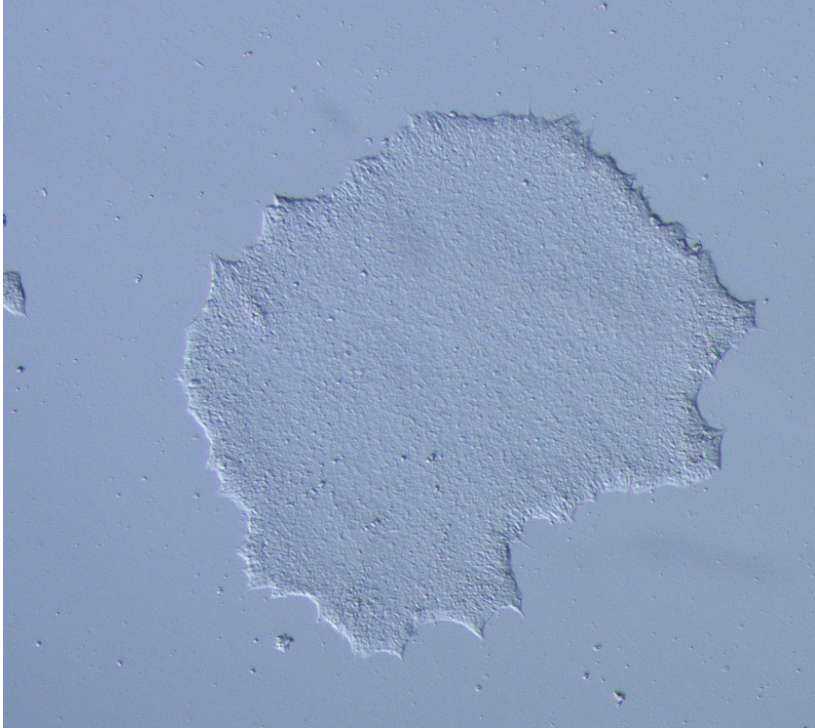
### 2.3.3.2 Reprogrammeerimine Sendai viirustega

Edasi kasutati katsetes reprogrammeerimiseks Sendai viirustel põhinevat CytoTune 2.0 *kit* 'ti. Katsed tehti Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse biomeditsiini laboris. Sendai viiruseid kasutades sai vanemlaborant Annika Trei iPSC koloonia geenivaramu proovist. Siiski ei õnnestunud töö autoril järgmise geenivaramu prooviga ühtegi kolooniat saada (katsete kokkuvõtlikku skeemi vaata jooniselt 10).



**Joonis 10. Reprogrammeerimiskatsete kokkuvõtlik skeem.** Jätkuva joonega on tähistatud katsed, kus kasutati episomaalseid vektoreid ja katkendliku joonega katseid, kus kasutati Sendai viiruseid. Roosaga on märgitud katseid punaste vererakkude eellasrakkudega ja sinisega T-rakkudega. Tärniga on tähistatud katsed, kus kasutati geenivaramu proove. Sendai viirustega geenivaramu doonori vererakkudest sai iPSC-d Annika Trei ja see on sellel joonisel näidatud, sest edasiseks analüüsiks kasutati seda rakuliini (altpoolt kolmas katse).

Mikroskoobi all vaadates paistsid kolooniad olevat tüvirakkudele omase morfoloogiaga (vaata joonis 11). Kinnitamiseks, et tegemist on indutseeritud pluripotentsete tüvirakkudega, tehti geenivaramu proovi kahe erineva klooniga edasi põhjalikum rakuliini analüüs.



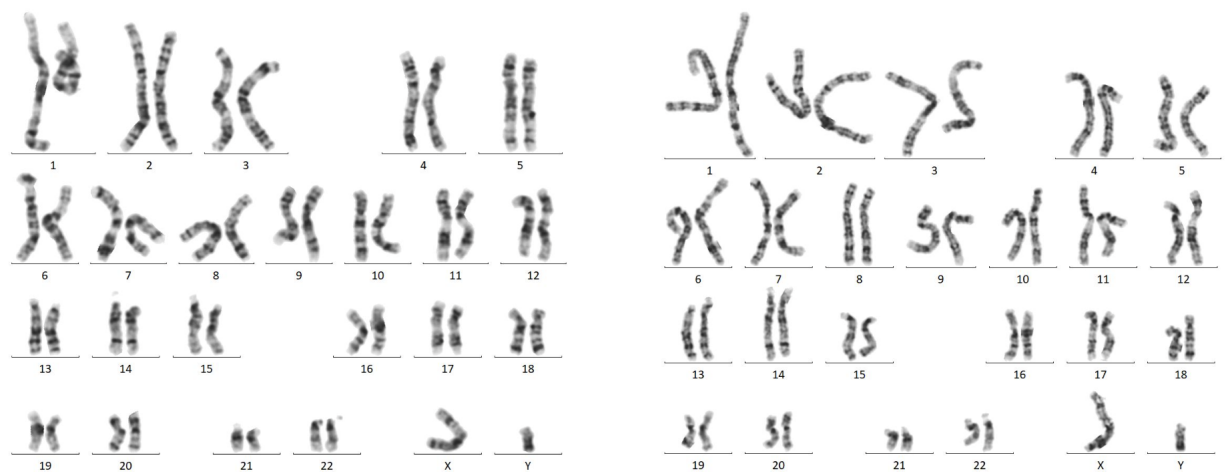
**Joonis 11. Geenivaramu doonori verest Sendai viirustega saadud iPSC koloonia 50x suurendusega.**

### **2.3.5 Loodud iPSC rakuliini analüüs**

#### **2.3.5.1 Karüotüübi analüüs**

Karüotüübi analüüsi teostas Tartu Ülikooli Kliinikumi geneetika ja personaalmeditsiini kliiniku laboratoorse geneetika osakonna tsütogeneetik Giemsa meetodil ~550 vöödi tasemel.

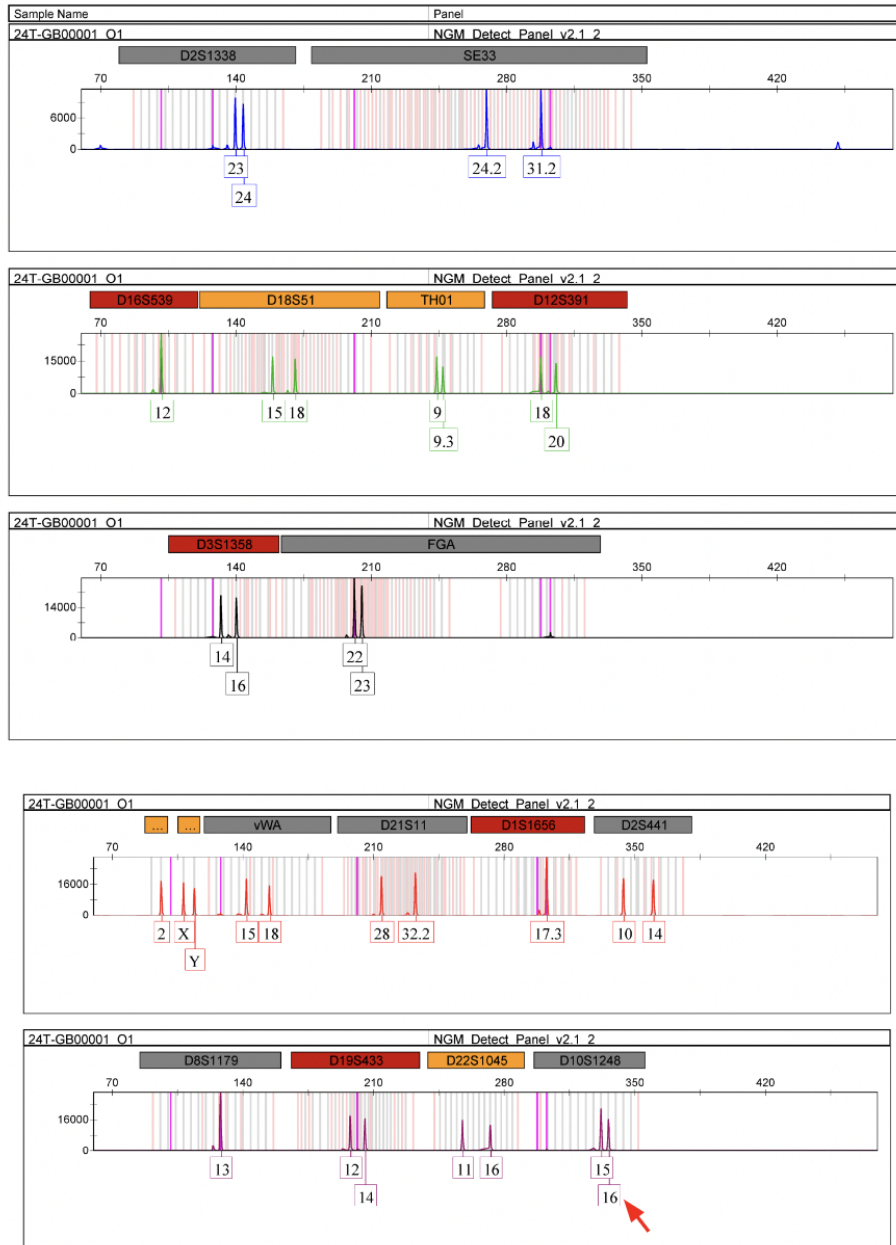
Nii kloon ühel kui ka kloon kahel oli normaalne mehe karüotüüp (vaata joonis 12). Ka iPSC-de tegemiseks kasutatud geenivaramu doonoril on teadaolevalt normaalne karüotüüp.



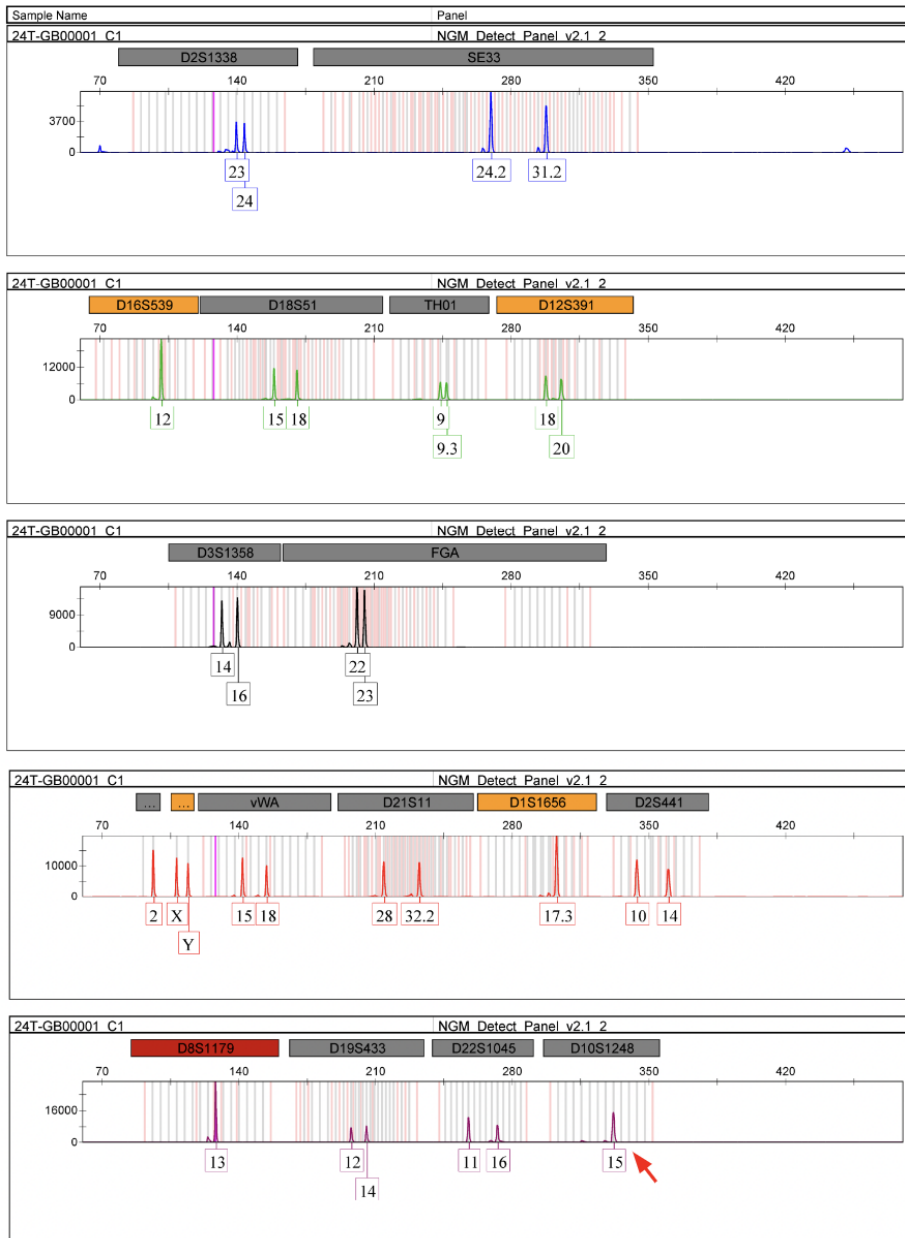
**Joonis 12. Kloon ühe (vasakul) ja kloon kahe (paremal) karüotüübid.**

### 2.3.5.2 STR analüüs

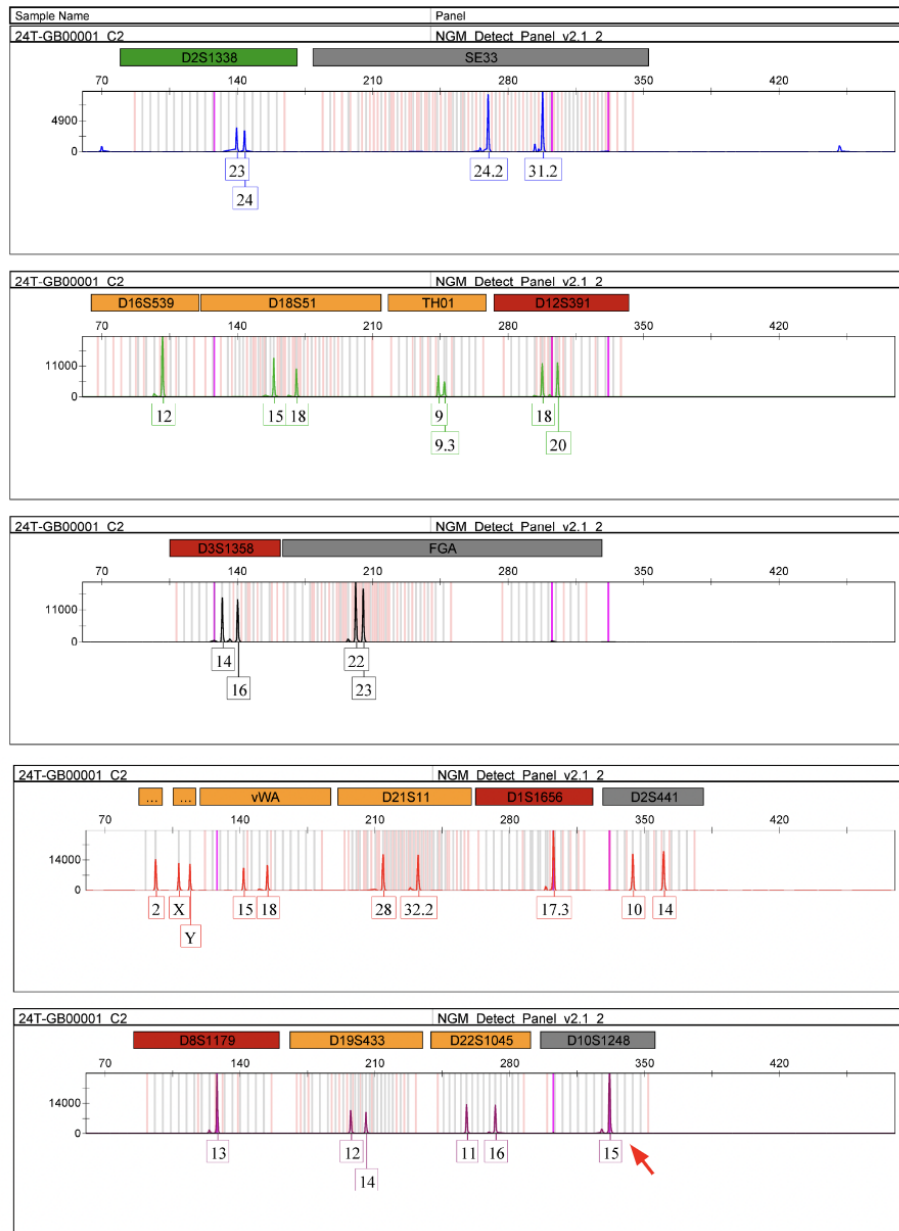
STR analüüsi tehti võrdluseks doonori vererakust (joonis 13) ja tuletatud iPSC liini kahest kloonist. STR-analüüsis täheldati ühes lookuses ühe alleeli kadu nii kloon ühes (joonis 14) kui ka kloon kahes (joonis 15) (märgitud punase noolega). See erinevus viitab võimalikule mutatsioonile iPSC ümberprogrammeerimise või kultiveerimisprotsessi ajal. Siiski võib STR analüüsi tulemusel järeldada, et geneetiline materjal on pärit ainult ühest allikast ja see ühtib algmaterjaliga.



**Joonis 13. STR analüüsi tulemus iPSC liinide loomiseks kasutatud doonori vererakust. Noolega on tähistatud lookus, kus teistes rakuliinides on näha mutatsiooni.**



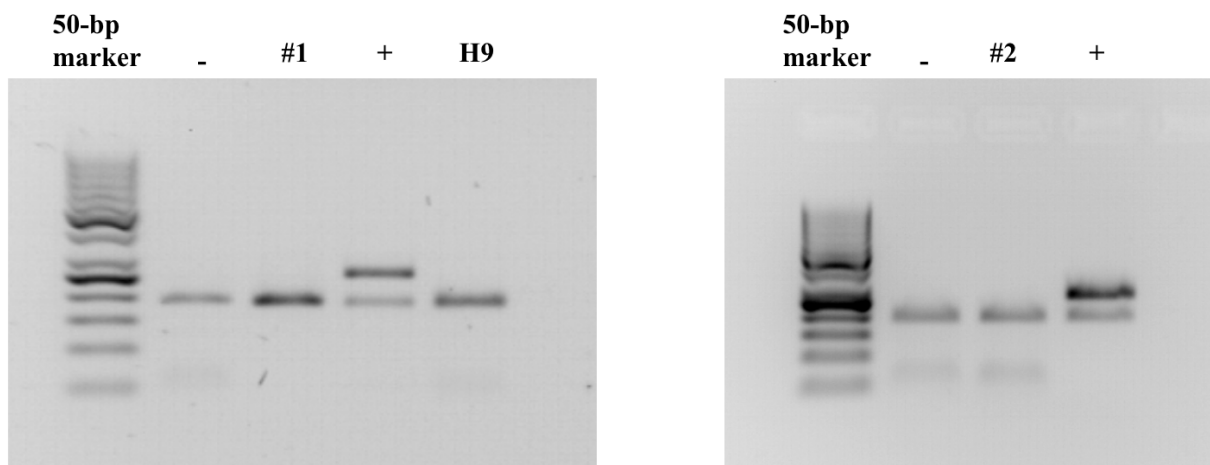
**Joonis 14. STR analüüsi tulemus iPSC kloon ühega.** Noolega on tähistatud lookus, kus võrreldes doonori vererakuga tehtud STR analüüsiga on näha mutatsiooni.



**Joonis 15. STR analüüsi tulemus kloon kahega.** Noolega on tähistatud lookus, kus võrreldes doonori vererakuga tehtud STR analüüsiga on näha mutatsiooni.

### 2.3.5.3 Mükoplasma testimine

Mükoplasma kontrollimiseks tehti Sartorius Microsart AMP Mycoplasma *kit*'iga qPCR ja selle tulemustega geelelektroforees. Joonis 16 järgi on näha, et mükoplasma puudub nii H9 rakuliinis kui ka kloon ühes ja kahes. Positiivne kontroll oli *kit*'iga kaasas.



**Joonis 16. Mükoplasma puudumise kontrollimiseks tehtud qPCR-i tulemused 2% agarosgeelil. Mükoplasma puudub nii kloon ühes (vasakul) kui ka kloon kahes (parempoolne pilt). Lühendid: #1 - kloon üks, #2 - kloon kaks.**

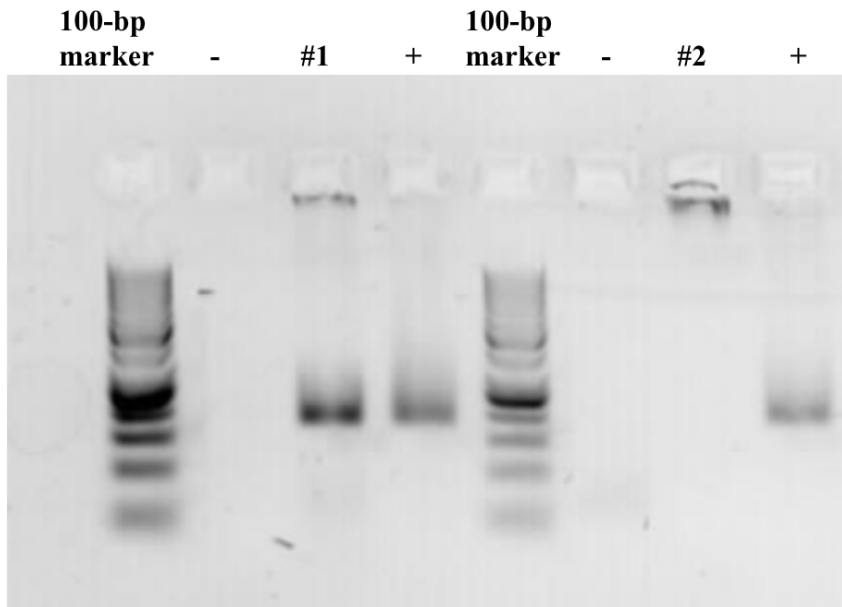
### 2.3.5.4 Sendai viiruste puudumise kontrollimine

Sendai viiruste kontrollimise puudumiseks rakuliinidest tehti qPCR ja tulemustega geelelektroforees. Kasutatud praimerite järjestused on kirjas lisas 2. Positiivseks kontrolliks olid rakud, millest RNA oli eraldatud vahetult pärast transduktsiooni Sendai viirustega. Geeniekspressiooni tasemed normaliseeriti TBP taseme järgi.

Kloon ühes paistavad endiselt olevat reprogrammeerimisfaktorid (Sendai viirused), kloon kahes aga mitte nii qPCR-i (tabel 8) kui ka geelelektroforeesi tulemuste järgi (joonis 17).

**Tabel 8. Reprogrammeerimisfaktorite puudumise kontrollimiseks tehtud qPCR-i tulemused.**

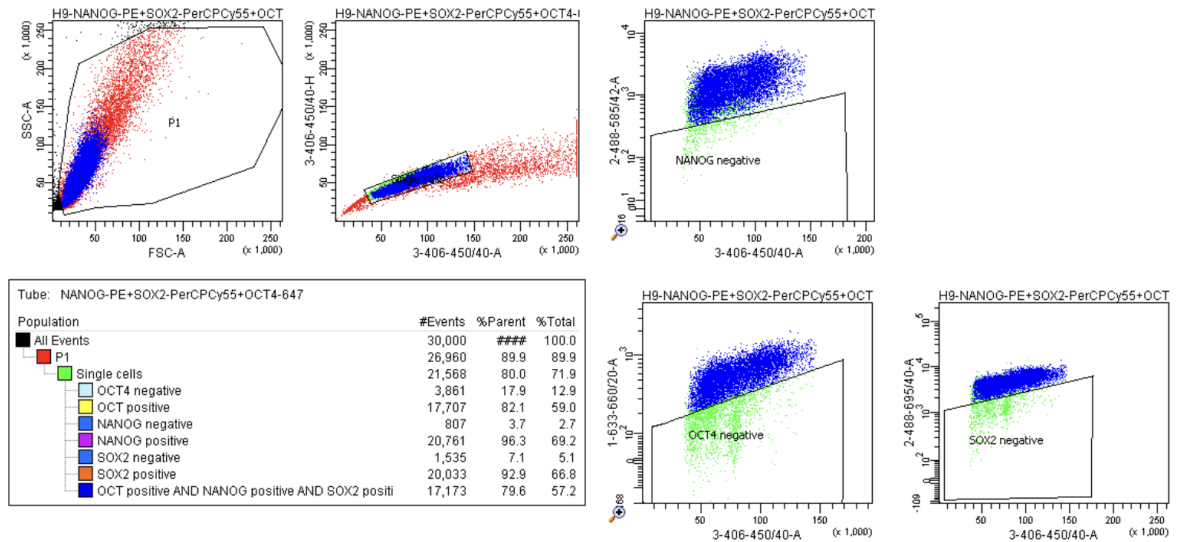
Proov	Ekspressioonimuutus ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )
#1	4,56
#2	-
+	69773,39



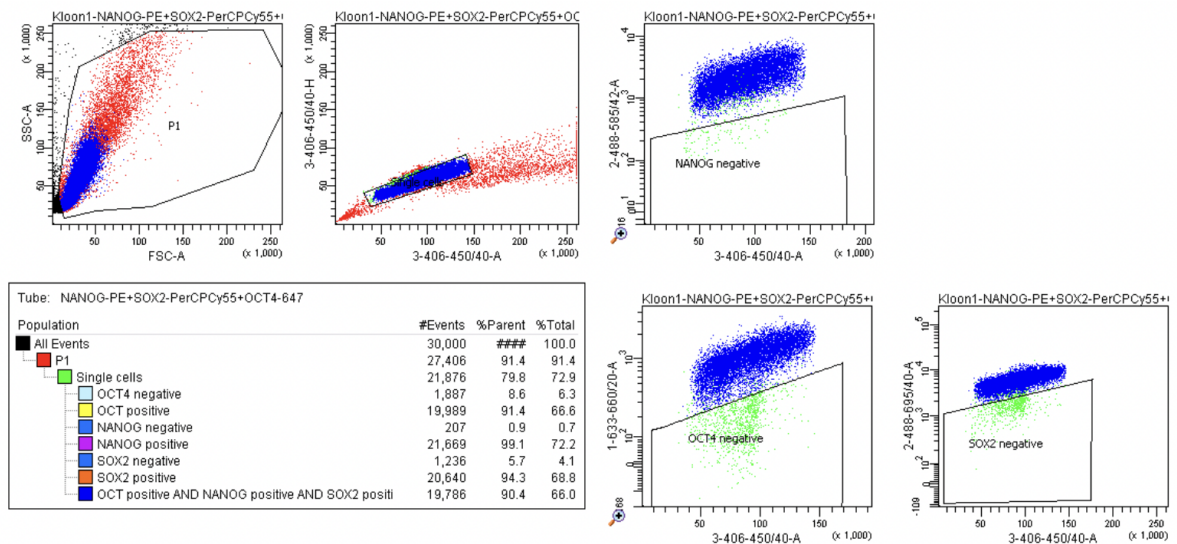
**Joonis 17. Reprogrammeerimisfaktorite puudumise kontrolliks qPCR-i tulemused 2% agarosgeelil. Lühendid: #1 - kloon üks, #2 - kloon kaks.**

### 2.3.5.5 Pluripotentsusmarkerite ekspressioon

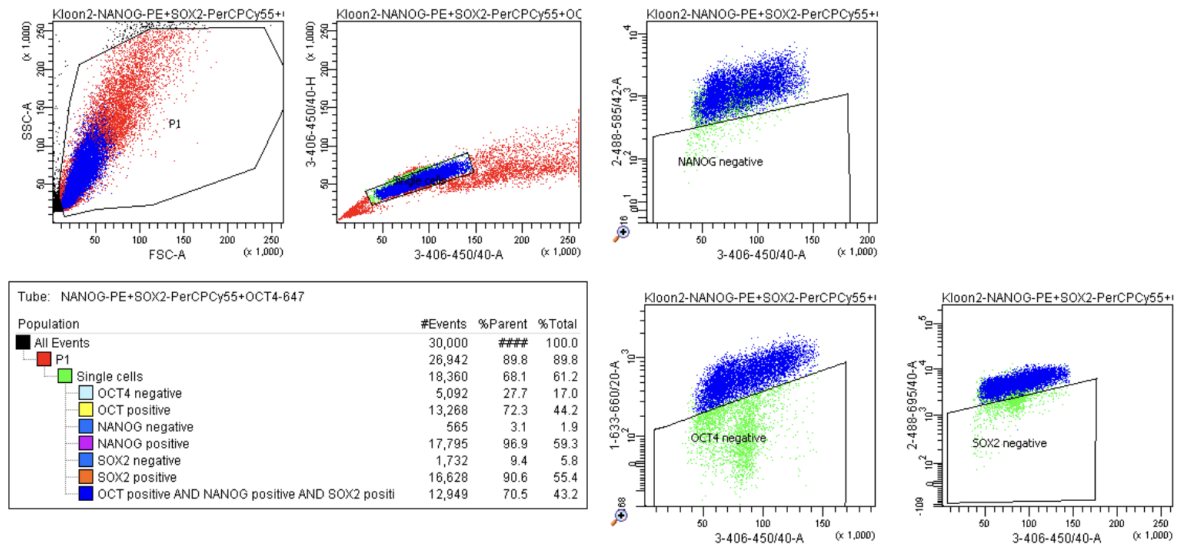
Pluripotentsusmarkerite OCT4, NANOG ja SOX2 ekspressiooni tuvastamiseks tehti voolutsütomeetria analüüs. Selle tulemusena nähti, et rakke, mis ekspresseerisid kõiki kolme markerit oli 79,6% võrdluseks kasutatavates H9 rakkudes (joonis 18), 90,4% kloon ühe rakkudes (joonis 19) ja 70,5% kloon kahe rakkudes (joonis 20), mis on sarnases suurusjärgus tulemused.



**Joonis 18. Pluripotentsusmarkerite OCT4, NANOG JA SOX2 ekspressiooni tuvastamine FACS analüüsi H9 rakkudes.**



**Joonis 19. Pluripotentsusmarkerite OCT4, NANOG JA SOX2 ekspressiooni tuvastamine FACS analüüsi klõon ühe rakkudes.**

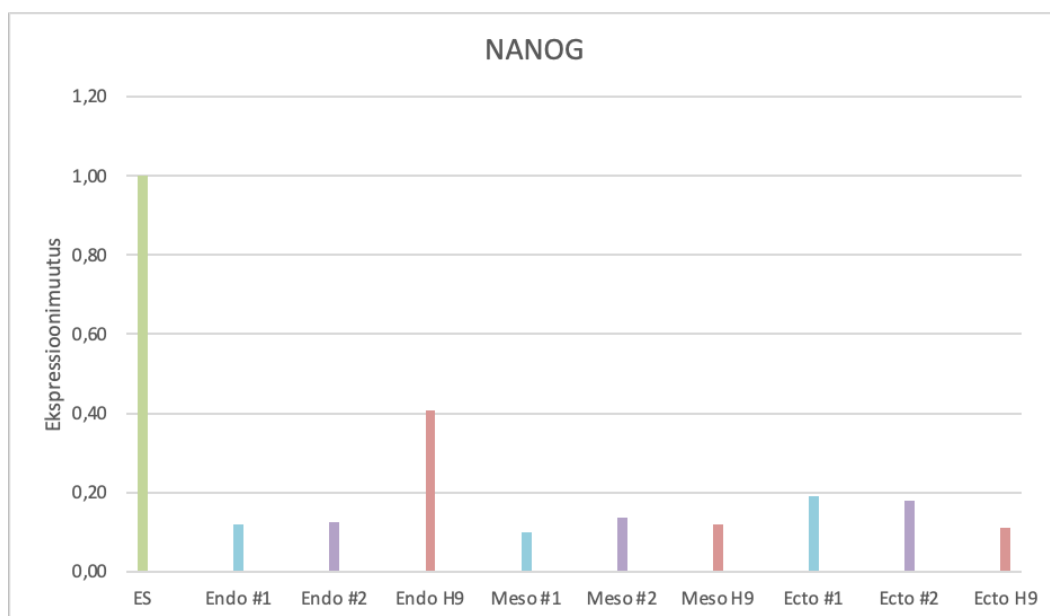


**Joonis 20. Pluripotentsusmarkerite OCT4, NANOG JA SOX2 ekspressiooni tuvastamine FACS analüüsiga kloon kahe rakkudes.**

### 2.3.5.6 Diferentseerumispotentsiaali hindamine

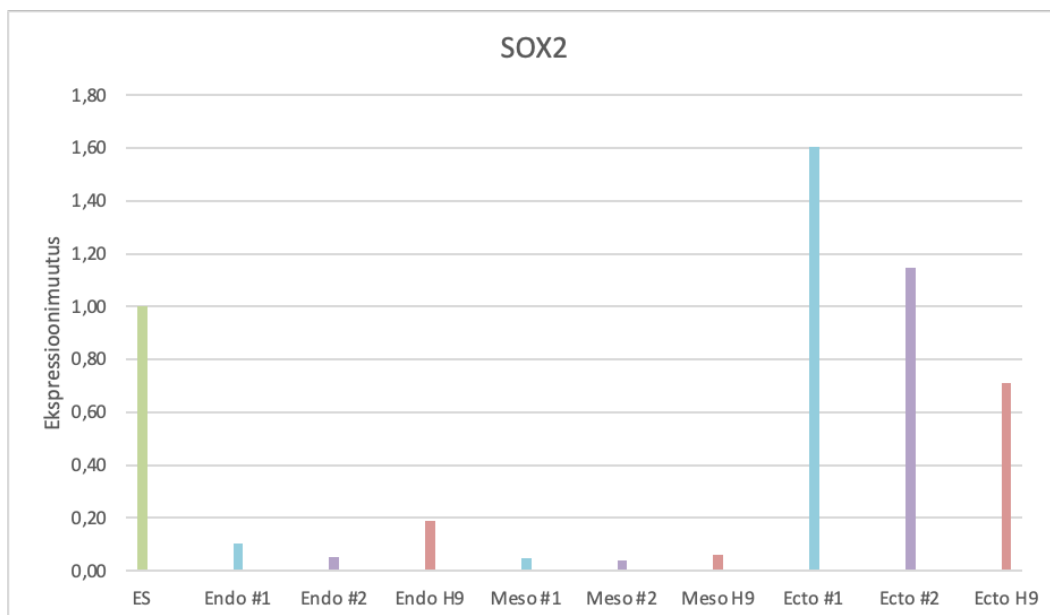
Peale suunatud diferentseerumist hinnati diferentseerumispotentsiaali nii qPCR-i kui ka immunofluoretsentsiga. qPCR analüüs tehti Excelis. Vaadati pluripotentsusmarkerite NANOG, SOX2 ja OCT4, endodermi markeri SOX17, mesodermi markerite BRACHYURY ja HAND1 ja ektodermi markerite OTX2 ja PAX6 ekspressiooni muutust.

NANOG on transkriptsioonifaktor, mis on vajalik pluripotentsete rakkude diferentseerumata oleku säilitamiseks ning on seotud embrüonaalsete tüvirakkude iseenesliku uuenemisega (Gawlik-Rzemieniewska, Bednarek, 2016). Diferentseerumisele suunamise järgselt oli näha allaregulatsiooni kõikides endo- meso- ja ektodermiks suunatud rakupopulatsioonides (joonis 21). Pluripotentsusmarkeri ekspressiooni vähenemine diferentseerumise käigus on ootuspärane.



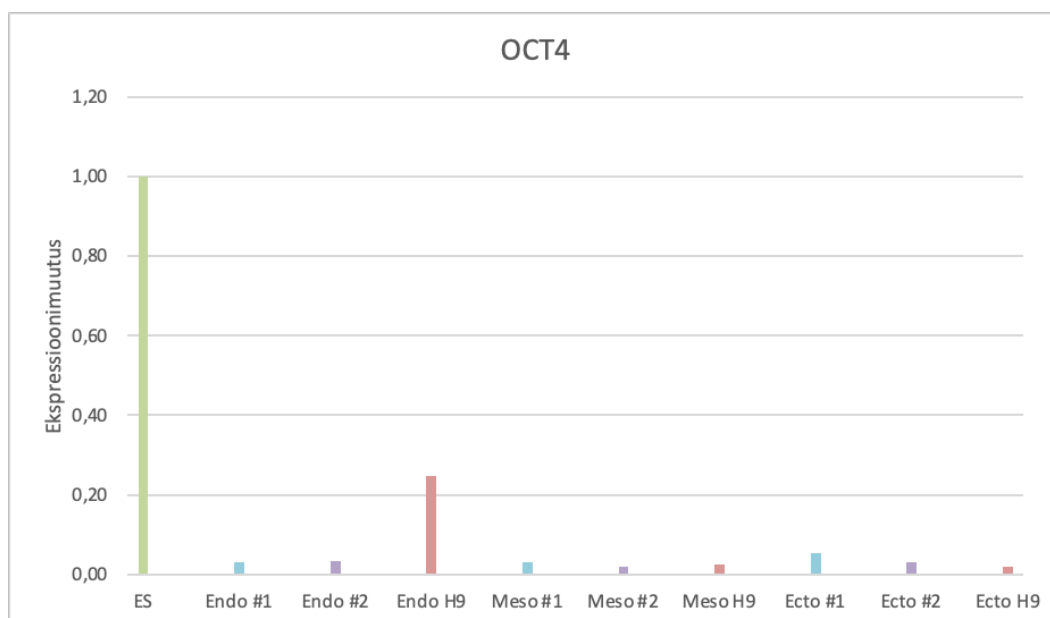
**Joonis 21. qPCR-ga leitud NANOG ekspressioonimuutus suunatud diferentseerumise käigus.** Iga proovi jaoks tehti kolm tehnilist kordust. Lühendid: #1 - kloon üks, #2 - kloon kaks.

SOX2 on oluline transkriptsiooni regulaator pluripotentsetes tüvirakkudes. Koos OCT4 ja NANOGiga kontrollib see geeniekspressiooni PSC-des ja aitab säilitada nende pluripotentsuse (Zhang ja Cui, 2014). Endo- ja mesodermiks diferentseeritud rakkudes oli näha SOX2 diferentseerumise vähenemist (joonis 22). Nii kloon ühes ja kahes kui ka H9 rakkudes, mis olid suunatud diferentseeruma ektodermiks, oli võrreldes diferentseerumata embrüonaalsete tüvirakkudega näha kõrgemat SOX2 ekspressiooni (joonis 22). Lisaks oma rollile pluripotentsuse reguleerimisel on SOX2 samuti kriitiline PSC-de diferentseerumise suunamisel närvi eellasrakkudeks ning närvi-tüviraku eellasrakkude omaduste säilitamisel (Zhang ja Cui, 2014), mis võiks selgitada selle kõrgemat ekspressiooni taset ektoderms.



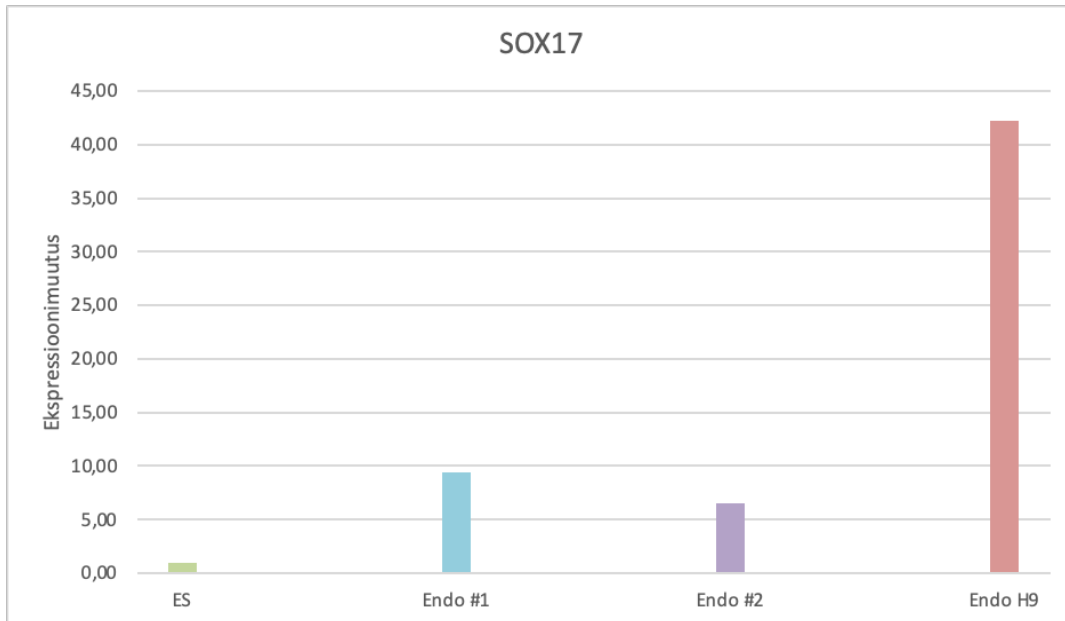
**Joonis 22. qPCR-ga leitud SOX2 ekspressioonimuutus suunatud diferentseerumise käigus.** Iga proovi jaoks tehti kolm tehnilist kordust. Lühendid: #1 - kloon üks, #2 - kloon kaks.

OCT4 on kõrge ekspressiooniga pluripotentsetes rakkudes ja selle ekspressioon vaigistatakse diferentseerumisel (Shi ja Jin, 2010), mida nähti ka selle katse tulemusena - ekspressioon vähenes märgatavalt kõikides diferentseerunud rakupopulatsioonides (joonis 23).



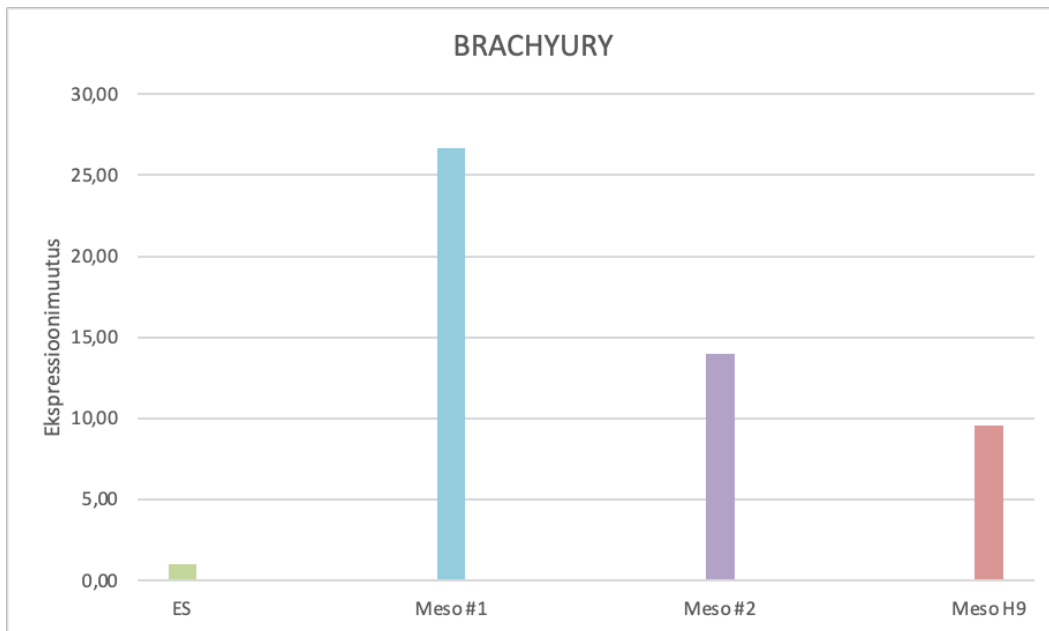
**Joonis 23. qPCR-ga leitud OCT4 ekspressioonimuutus suunatud diferentseerumise käigus.** Iga proovi jaoks tehti kolm tehnilist kordust. Lühendid: #1 - kloon üks, #2 - kloon kaks.

SOX17 osaleb embrüonaalse arengu reguleerimises ja raku saatuse määramises, see on vajalik lõpliku endodermi tekkimiseks (Viotti *et al.*, 2014). SOX17 oli kõikides proovides üles reguleeritud (joonis 24), eriti märkimisväärselt H9 rakuliinis.



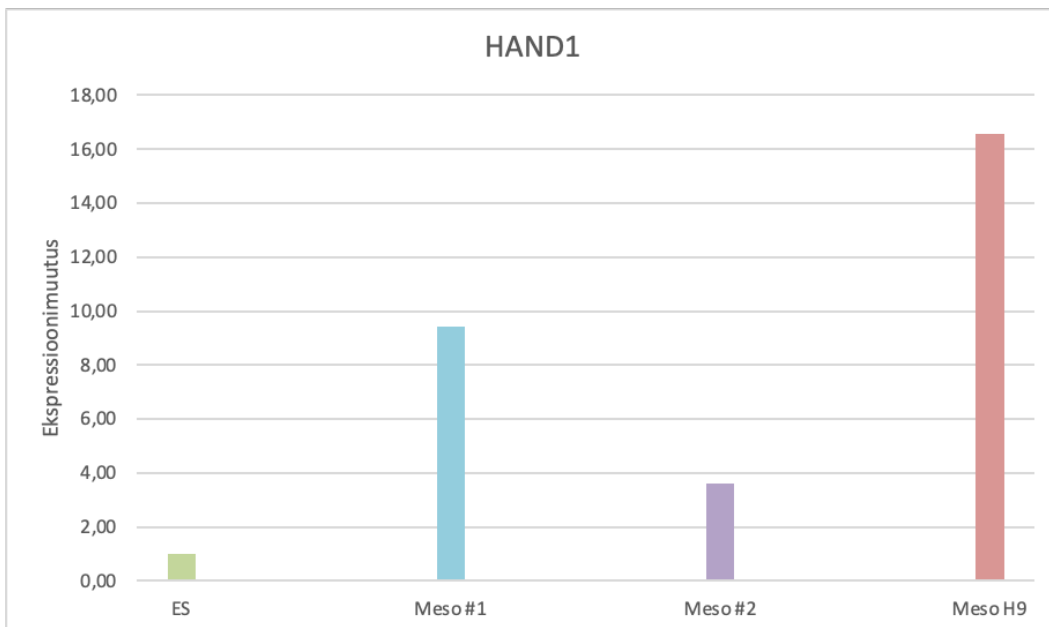
**Joonis 24. qPCR-ga leitud SOX17 ekspressioonimuutus suunatud diferentseerumise käigus.** Iga proovi jaoks tehti kolm tehnilist kordust. Lühendid: #1 - kloon üks, #2 - kloon kaks.

BRACHYURY on transkriptsioonifaktor, mis on vajalik posterioorse mesodermi moodustumiseks ja diferentseerumiseks (Barresi *et al.*, 2014). See oli üles reguleeritud kloon ühe, kahe ja H9 mesodermi rakkudes (joonis 25).



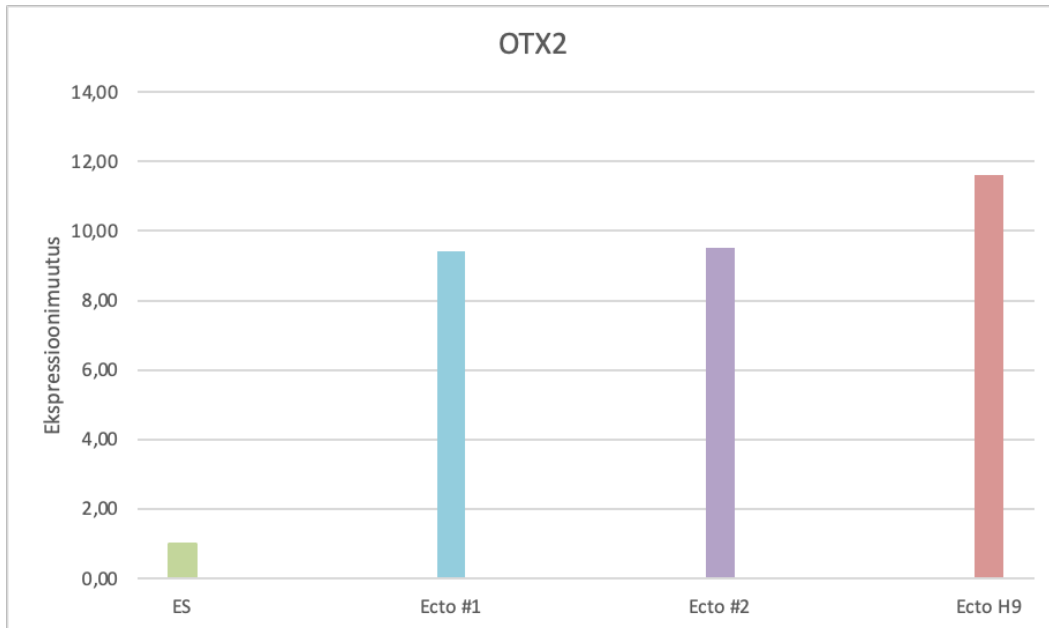
**Joonis 25. qPCR-ga leitud BRACHYURY ekspressioonimuutus suunatud diferentseerumise käigus.** Iga proovi jaoks tehti kolm tehnilist kordust. Lühendid: #1 - kloon üks, #2 - kloon kaks.

HAND1 on transkriptsioonifaktor, millel on oluline roll kardiogeneesis ja lateraalse mesodermi derivaatide, sealhulgas soolestiku, arengus (Barnes *et al.*, 2010). See oli üles reguleeritud kõikides mesodermi proovides (joonis 26).



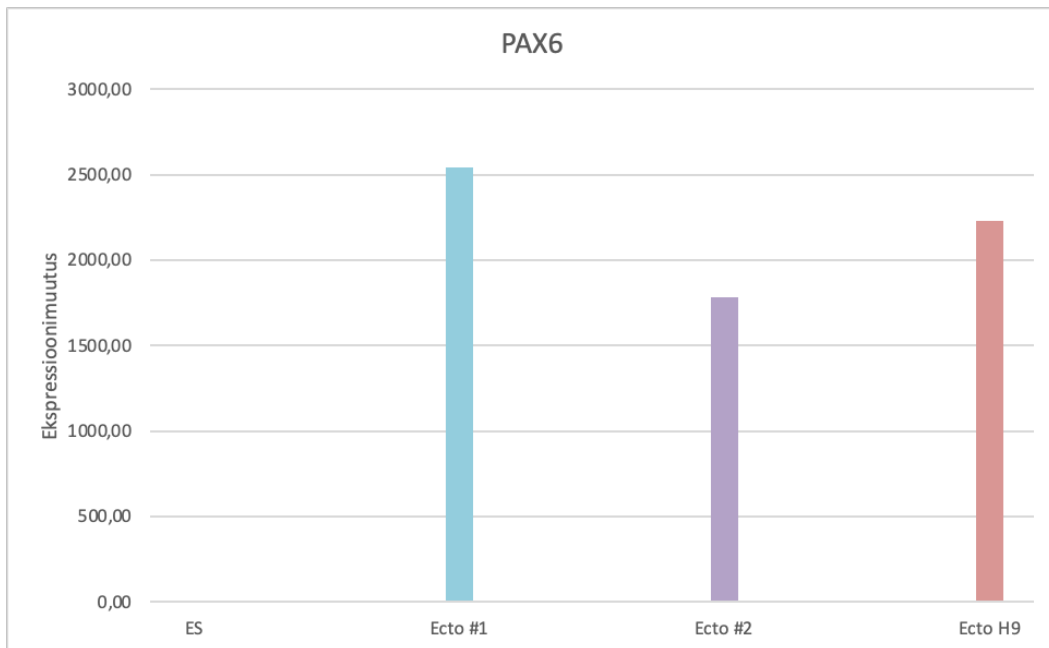
**Joonis 26. qPCR-ga leitud HAND1 ekspressioonimuutus suunatud diferentseerumise käigus.** Iga proovi jaoks tehti kolm tehnilist kordust. Lühendid: #1 - kloon üks, #2 - kloon kaks.

OTX2 toimib transkriptsioonifaktorina ja mängib rolli aju, kraniofatsiaalsete struktuuride ja meelelundite arengus (NCBI, 2024). Selle ekspressioon oli kõrgem kui diferentseerumata rakkudes kloon ühes, kahes ja H9 rakkudes (joonis 27).



**Joonis 27. qPCR-ga leitud OTX2 ekspressioonimuutus suunatud diferentseerumise käigus.** Iga proovi jaoks tehti kolm tehnilist kordust. Lühendid: #1 - kloon üks, #2 - kloon kaks.

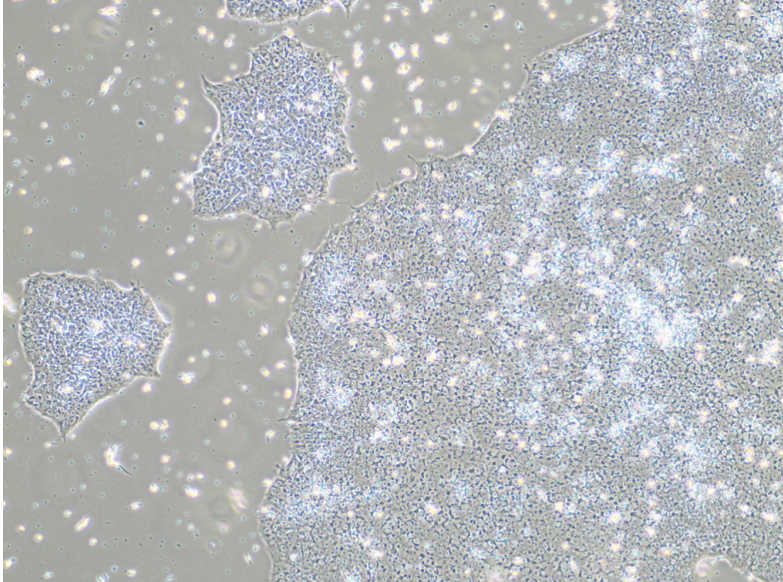
PAX6 on järjestusspetsiifiline DNA-ga seonduv transkriptsioonifaktor, mis avaldub mitmetes rakutüüpides areneva organismi ja täiskasvanu kesknärvisüsteemis (Ochi *et al.*, 2022). See oli tugevalt üles ekspresseeritud kõikides ektodermi rakupopulatsioonides (joonis 28).



**Joonis 28. qPCR-ga leitud PAX6 ekspressioonimuutus suunatud diferentseerumise käigus.** Iga proovi jaoks tehti kolm tehnilist kordust. Lühendid: #1 - kloon üks, #2 - kloon kaks.

qPCR-i tulemustena saadud ekspressiooni muutused olid ootuspärased.

Varasemate tulemuste (Sendai viiruste puudumise ehk punkt 2.3.5.4) põhjal tehti immunofluorestsentsanalüüs kloon kahega. Endodermi jaoks kasutati SOX17, mesodermi jaoks BRACHYURY ja ektodermi jaoks PAX6 antikeha. Kloon kahe rakud enne kannudesse laiali jagamist ja diferentseerimist on näha joonisel 29. Selgelt oli näha morfoloogia muutumist nii endo- meso kui ektodermis (joonis 30).

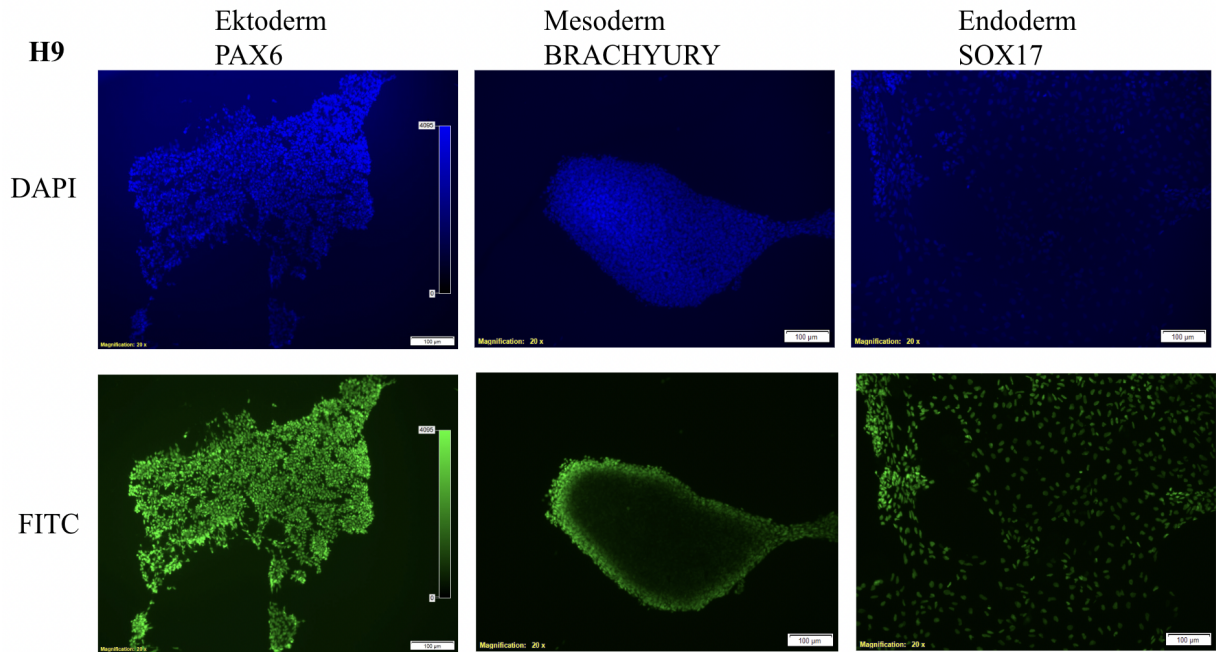


**Joonis 29. Kloon kahe rakud enne kannudesse laiali jagamist ja diferentseerimist 100x suurendusega.**

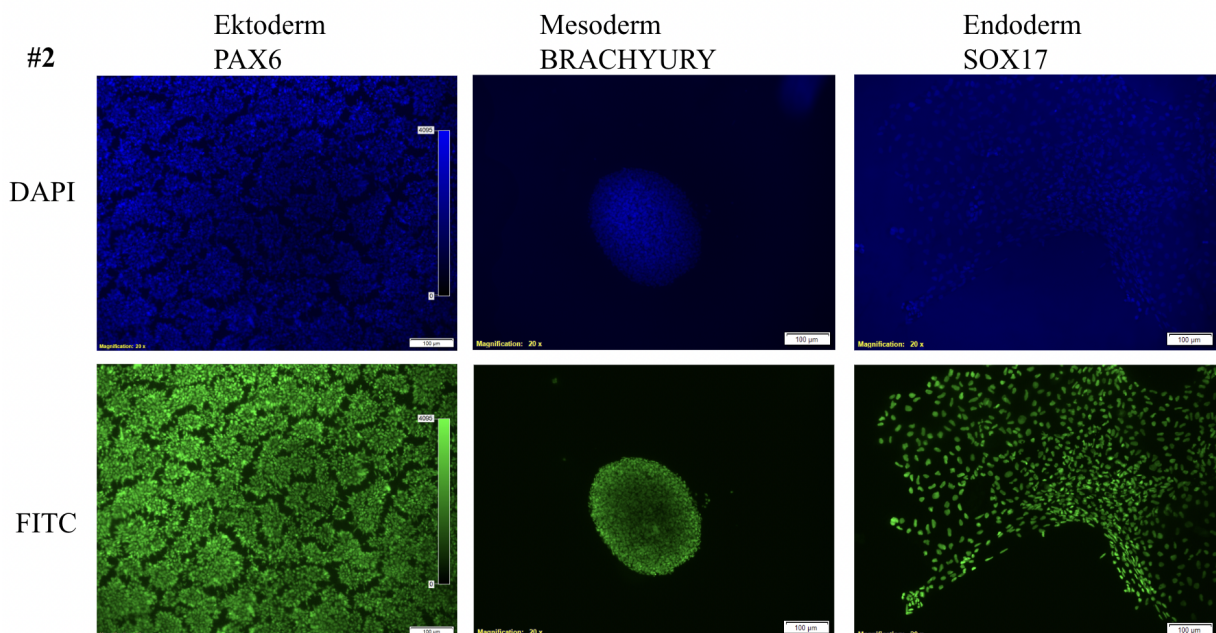


**Joonis 30. Rakud pärast viit päeva ektodermi, mesodermi või endodermi söötmes kasvatamist 200x suurendusega.**

Rakke vaadeldi fluorestsentsmikroskoobi all, kasutades DAPI-d (värvib tuumasid) ja FITC-d (vastab sekundaarsele antikehale). Nii H9 rakud (joonis 31) kui ka kloon kahe (joonis 32) rakud ekspresseerisid suunale vastavaid markereid.



**Joonis 31.** H9 rakud fluorestsentsmikroskoobi all pärast viit päeva ektodermi, mesodermi või endodermi söötmes kasvatamist 200x suurendusega. Lühendid: #2 - kloon kaks.



**Joonis 32.** iPSC kloon kahe rakud fluorestsentsmikroskoobi all pärast viit päeva ektodermi, mesodermi või endodermi söötmes kasvatamist 200x suurendusega. Lühendid: #2 - kloon kaks.

## 2.4 Arutelu

Palju on tehtud laiaulatuslikke ülegenoomseid assotsiatsiooniuringuid (GWASe), et välja selgitada genotüüpide ja fenotüüpide vahelisi seoseid. Keerulisem ja seetõttu oluliselt vähem uuritud on seotud variantide funktsionaalne panus fenotüübi avaldumisse. Selliste uuringute läbiviimiseks sobiksid hästi iPSC rakud, mida on võimalik diferentseerida huvipakkuvateks rakutüüpideks. Geenivaramus on olemas 50 000 doonori külmutatud vererakud, lisaks on võimalik doonoreid värske vere võtmiseks ka tagasi kutsuda. Selle töö eesmärk oli näha, kas nii kaua külmutatud olnud vererakkudest on võimalik iPSC-sid teha. Tüvirakke on ka varem tehtud külmutatud rakkudest, Meraviglia *et al.* (2015) näitasid, et iPSC-sid saab teha *buffy coat* fraktsiooni rakkudest, kuid kasutatud proovid olid kogutud selle konkreetse katse jaoks ja polnud pikemalt külmas olnud. Ye *et al.* (2009) tegid iPSC-d kaheksa aastat külmutatud olnud vererakkudest (CD34<sup>+</sup> vererakkudest). On näidatud, et iPSC-sid on võimalik teha ka fibroblastidest, mis saadi kuni 11 aastat  $-80^{\circ}\text{C}$  juures säilitatud ajulõikudest, mis olid külmutatud ilma krüokaitsevate aineteta nagu DMSO (Sproul *et al.*, 2014). Fibroblastidega on reprogrammeerimine ka 10-50 korda efektiivsem kui vererakkudega, vererakkudega on efektiivsus erinevate allikate põhjal ainult 0.001% - 0,1% (Loh *et al.*, 2009, Staerk *et al.*, 2010, Ye *et al.* 2009).

Geenivaramu proovides oli elusaid vererakke, kuid mõnes oli neid ka pärast ettekasvatamist liiga vähe - arvukus varieerus doonori proovides pärast punaste vererakkude eellasrakkude ettekasvatamist  $1,0 \times 10^4$  rakust  $1,82 \times 10^6$  rakuni. Samuti oli ühes proovis probleem saastusega. Puhastamiseks kasutasid Meraviglia *et al.*, 2015 punaste vererakkude lüüsipuhvrit. Antud katsetes sama protokolliga kasutades see häid tulemusi ei andnud. Värske verega oli ka pärast puhastamist proov punast värvi ja ka külmutatud verd kasutades andsid SepMate tuubid parema tulemuse (rakukultuur paistis mikroskoobi all visuaalselt puhtam). Punaseks teevad proovi kas terved punased vererakud või kui rakud on katki, siis hemoglobiin. Selle probleemi korral oleks võinud aidata lisapesemised, kuid antud olukorras oli efektiivsem kasutada edasi pigem SepMate tuube.

Samuti oli probleeme saavutamaks piisav elektroporatsiooni efektiivsus. Thermo Fisher Scientificu järgi peaks efektiivsus T-rakkudega olema umbes 60%, kuid antud töös tehtud katsetes jäi see alla 1%. Võimalik põhjus on plasmidi suurus - on näidatud, et suuremad plasmiidid mõjuvad toksiliselt (Lesueur *et al.*, 2016) ning neid on raskem rakku sisse viia.

Tootja kasutas efektiivsuse näitamisel väiksemaid (4-7kb) plasmide, kuid ka väikse plasmiidiga ei saadud selles töös tootjate lubatud efektiivsustele sarnast tulemust (väikse 5kb plasmiidiga saadud efektiivsus oli 5,8%) (lisa 3). Selles töös otsustati edasi kasutada Sendai viiruseid. Selle meetodi eeliseks on lihtne protokoll ja kõrgem efektiivsus (Manzini *et al.*, 2015). Sendai viirustega töötamine nõuab BSL2 laborit, mistõttu viidi see osa läbi Tehnoloogiainstituudis. Lisaks on Sendai viiruste kommertsiaalne *kit* suhteliselt kallis. Järgnevas katses ei saadud geenivaramu proovist ühtegi kolooniat, ning pole selge, miks ühel korral saadi palju kolooniaid ja teisel korral mitte ühtegi.

Tüvirakuliini loomise järgselt on oluline selle iseloomustamine. ISSCR (*International Society of Stem Cell Research*) on loonud juhised minimaalseteks analüüsideks, mida peaks tegema. Nende alla kuuluvad isikutuvastus, reprogrammeerimisfaktorite puudumise kontrollimine, mükoplasma puudumise kontrollimine ning pluripotentsuse ja diferentseerumispotentsiaali hindamine. Isikutuvastuseks soovitatakse teha STR analüüsi. See on oluline kinnitamaks, et töötatakse ootuspärase materjaliga ja et see ei ole ristsaastunud rakkudega teisest allikast. STR-i eelised hõlmavad kulutõhusust, reprodutseeritavust ja võimet tuvastada kultuuris mitut rakuallikat. Rakkude või rakuliini autentimisel tuleks päritolu kinnitamiseks kasutada võrdlusproovi algsest doonorist. STR analüüsi põhjal esineb mutatsioon mõlemas kloonis, kuid sellegipoolest paistab, et geneetiline materjal on pärit ainult ühest allikast ja tegemist on sama isikuga.

Reprogrammeerimisfaktorite puudumise kontrollimine on oluline, sest reprogrammeerimisfaktorite püsiv ekspressioon hiPSC rakkudes võib mõjutada nende proliferatsiooni- ja diferentseerumispotentsiaali ning suurendada kasvaja tekkimise riski hiiremudelil (Okita *et al.*, 2007). Transgeeni ekspressioon võib olla alles äsja loodud hiPSC liinides, kuid seda saab tavaliselt elimineerida läbi mitme rakupassaaži. Enamik Sendai viirustega tehtud hiPSC liine on 10. passaažiks transgeenivabad. Nende liinide puhul tuleks vektori eemaldamist kinnitada viirusevastaste antikehadega immunovärvimise või qPCR abil Sendai viiruste spetsiifiliste järjestuste jaoks. Saadud kloonidest Sendai viiruste puudumise kontrollimise tulemusel qPCR-i ja geelelektroforeesiga paistavad kloon ühes Sendai viirused endiselt sees olevat. Selle alusel kasutati diferentseerumispotentsiaali uurimiseks teist kloonit, milles Sendai viirused antud katse põhjal puudusid. Rakukultuurides tuleks kinnitada ka mükoplasma puudumine. See võib mõjutada raku morfoloogiat ja füsioloogiat, muutes

nakatunud kultuuriga saadud tulemused ebausaldusväärseks. Mükoplasma puudus nii H9 rakuliinis kui ka kloon ühes ja kahes.

Pluripotentsust tüvirakkudes tuleks eksperimentaalselt tõestada testidega, mis hindavad diferentseerumisvõimet. Rakuliin tuleks määratleda pluripotentseks ainult siis, kui eksperimentaalselt on näidatud, et see on võimeline diferentseeruma rakkudeks, mis esindavad kõiki kolme embrüonaalset lootekihti, millest arenevad organismi somaatilised liinid. Diferentseerumise tõendid peaksid põhinema mitmetel kriteeriumitel, mis võivad hõlmata morfoloogiat, vastavate liini või rakutüübi spetsiifiliste mRNA-de või valkude kombinatsioonide ekspressiooni, rakupinna markereid ja funktsionaalsete omaduste hindamist. Samuti peaks toimuma pluripotentsusmarkerite allareguleerimine. Diferentseerumisvõimet saab näidata embrüoidkehade moodustumise, suunatud diferentseerumise või teratoomide moodustumise kaudu. Teratoomide testid ei ole aga enam soovitatavad, kuna pole põhjust ohverdada loomade heaolu, kui samaväärset teavet saab *in vitro* testidega. Loodud tüvirakuliinis hinnati voolutsütomeetriaga pluripotentsusmarkerite ekspressiooni. Samuti viidi läbi suunatud diferentseerumise katse, mille järgselt hinnati lootelehe spetsiifiliste markerite ekspressiooni qPCRi ja immunofluorestsentsi kasutades. Pluripotentsusmarkerite ekspressiooni ja diferentseerumispotentsiaali hindamise järgi paistis, et tegemist on tüvirakkudega. Nii kloon üks kui ka kloon kaks ekspresseerisid pluripotentsusmarkereid. Suunatud diferentseerumise käigus oli näha morfoloogia muutust ja markerite ekspressiooni muutused olid ootuspärased (pluripotentsusmarkerite ekspressioon vähenes ja vastava suuna markerite ekspressioon suurenes) ja läksid kokku muutustega võrdluseks kasutatud H9 rakuliinis. Ekto- meso- ja endodermi markerite ekspressiooni vastavas suunas nähti ka immunofluorestsentsanalüüsis.

Selle magistritöö käigus töötati välja protokoll, millega on võimalik geenivaramu proovidest luua iPSC-sid, aga tegemist on aeganõudva protsessiga, mis iga kord ei õnnestu. Katsete jaoks on vaja laborit, kus on väga puhtad tingimused, selle töö käigus oli probleeme saastusega. Hetkel oli viirustega töö jaoks vaja viia rakud Tehnoloogiainstituuti, sest Molekulaar- ja rakubioloogia instituudis puudub BSL-2 labor, ning sellise transportimise mõju rakkudele ja nende reprogrammeerimisele pole teada.

## KOKKUVÕTE

Geenivaramu külmutatud 50 000 doonori vereproovidest loodud indutseeritud pluripotentsetel tüvirakkudel oleks suur väärtus funktsionaalsetes uuringutes. Vererakkude reprogrammeerimise efektiivsus on aga madalam kui fibroblastides ning antud vereproovid on umbes 20 aastat külmutatud olnud. Antud töö eesmärk oli selgitada, kas ja millise protokolliga kasutamine võimaldab luua indutseeritud pluripotentseid tüvirakke Geenivaramu külmutatud vereproovidest.

Katsete käigus selgus, et Geenivaramu vereproovides oli elus rakke, kuid mõnes proovis oli neid reprogrammeerimiseks liiga vähe ja ühes proovis esines saastumist. Vere puhastamiseks osutusid SepMate tuubid sobivamaks kui punaste vererakkude lüüsi- ja hüdrofoorsuhteliseks. Selles töös tehtud katsete järgi paistab doonori vererakkude reprogrammeerimiseks transduktsioon Sendai viirustega parem meetod kui elektroporatsioon plasmiididega, sest see on efektiivsem. Vabatahtliku verest õnnestus üheksandal katsel iPSC sarnase morfoloogiaga koloonia saada. Sendai viiruste kasutamisel saadi ka Geenivaramu doonori vererakkudest iPSC morfoloogiaga kolooniaid, mida seejärel põhjalikumalt iseloomustati.

Karüotüübi analüüs näitas, et kromosoomide komplekt oli normaalne. STR analüüsis tuvastati küll ühe alleeli mutatsioon, kuid kinnitati, et tegemist on sama inimesega. Mükoplasma saastumist ei leitud. Klooni kahe rakud ei sisaldanud Sendai viiruseid, kuid kloon ühes paistsid Sendai viirused endiselt sees olevat. FACS analüüs näitas, et rakud ekspresseerisid pluripotentsusmarkereid. Diferentseerumispotentsiaali tõestati nii qPCR-i kui ka immunofluoresentsanalüüsiga. Analüüsi tulemused kinnitasid, et tegemist on suure tõenäosusega iPSC rakuliiniga. Siiski on protsess ajamahukas ja küllaltki madala efektiivsusega ning ei õnnestu iga kord.

## **Generating induced pluripotent stem cells from frozen blood samples**

Katariina Kordemets

### Summary

Recent large-scale genome-wide association studies (GWAS) have extensively investigated the links between genotypes and phenotypes. However, exploring the functional contributions of genetic variants remains challenging. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) present a valuable tool for such functional studies. While iPSCs are frequently derived from fibroblasts, a less invasive alternative source is blood cells. However, reprogramming efficiency of blood cells is generally lower compared to fibroblasts. The Estonian Biobank houses frozen blood cells from the first 50 000 donors, each with genotypic and extensive health data. To the author's knowledge, stem cells have not previously been generated from blood cells stored at low temperatures for a that long period.

The primary aim of this study was to determine whether it is possible to create iPSCs from the frozen blood samples of the Estonian Gene Bank and to identify the most effective protocol for this process. The experiments concluded that firstly, the frozen blood samples contained viable cells, although some samples had too few cells for effective reprogramming and potential contamination issues were noted. SepMate tubes proved to be more effective for blood cell purification compared to red cell lysis buffer (RCLB). In terms of reprogramming efficiency, Sendai virus transduction was superior to electroporation as it has a higher reprogramming efficiency. This method successfully generated iPSC-like colonies from the donor blood cells, which were then analyzed for various characteristics. Chromosomal analysis through karyotyping confirmed a normal karyotype in the derived iPSCs. Although STR analysis detected a mutation, it verified that the cells originated from the same individual. Additionally, mycoplasma testing confirmed the absence of contamination. Further analysis revealed that one of the two clones was free of Sendai virus, while the other one still contained the viruses. Flow cytometry analysis demonstrated that the iPSCs expressed key pluripotency markers OCT4, NANOG, and SOX2. Both qPCR and immunofluorescence analysis confirmed the differentiation potential of the iPSCs.

The study successfully generated true iPSC lines from the frozen blood samples, as confirmed by various analytical methods. Despite this success, the overall efficiency of the process was low and inconsistent.

## TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid. Aitäh Annika, et mulle kõik need uued rakukultuuriga seotud meetodid nii kannatlikult ja põhjalikult selgeks õpetasid ja aitäh Tõnis, et suuremat pilti jälgisid ja töö valmis kirjutamist juhendasid ning mind mu tulevasele doktoritöö juhendajale tutvustasid. Samuti soovin tänu avaldada Merle Külaotsale, kes mul alati õiged reagentid üles aitas leida ja vajadusel eksperimendiks vajalikke nõuandeid jagas. Soovin tänada ka oma ema, kes töö üle luges ja korrektse keelekasutuse osas nõu andis.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Al-Shehri, M., Baadhaim, M., Jamalalddin, S., Aboalola, D., Daghestani, M., AlZahrani, H., Malibari, D., Mubarak, M., Aldubayan, K., AlBalwi, M., & Alsayegh, K. (2021). Generation of induced pluripotent stem cell Line KAIMRCi001-A by reprogramming erythroid progenitors from peripheral blood of a healthy Saudi donor. *Stem Cell Research*, 56, 102548. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102548>

Annand R. R. (2021). Generation of Human iPSCs by Reprogramming with the Unmodified Synthetic mRNA. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2239, 163–174. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1084-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1084-8_11)

Barnes, R. M., Firulli, B. A., Conway, S. J., Vincentz, J. W., & Firulli, A. B. (2010). Analysis of the Hand1 cell lineage reveals novel contributions to cardiovascular, neural crest, extra-embryonic, and lateral mesoderm derivatives. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 239(11), 3086–3097. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22428>

Barresi, V., Ieni, A., Branca, G., & Tuccari, G. (2014). Brachyury: a diagnostic marker for the differential diagnosis of chordoma and hemangioblastoma versus neoplastic histological mimickers. *Disease markers*, 2014, 514753. <https://doi.org/10.1155/2014/514753>

Bellin, M., Marchetto, M. C., Gage, F. H., & Mummery, C. L. (2012). Induced pluripotent stem cells: the new patient?. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(11), 713–726. <https://doi.org/10.1038/nrm3448>.

Brown, M. E., Rondon, E., Rajesh, D., Mack, A., Lewis, R., Feng, X., Zitur, L. J., Learish, R. D., & Nuwaysir, E. F. (2010). Derivation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Peripheral Blood T Lymphocytes. *PLOS ONE*, 5(6), e11373. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011373>

Check E. (2005). Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature*, 433(7026), 561. <https://doi.org/10.1038/433561a>

Davis, R. P., Nemes, C., Varga, E., Freund, C., Kosmidis, G., Gkatzis, K., de Jong, D., Szuhai, K., Dinnyés, A., & Mummery, C. L. (2013). Generation of induced pluripotent stem cells from human foetal fibroblasts using the Sleeping Beauty transposon gene delivery system. *Differentiation; research in biological diversity*, 86(1-2), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2013.06.002>

Dowey, S. N., Huang, X., Chou, B. K., Ye, Z., & Cheng, L. (2012). Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from postnatal blood mononuclear cells by plasmid vector expression. *Nature protocols*, 7(11), 2013–2021. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.121>

Eesti Geenivaramu. (2021). University of Tartu. <https://genomics.ut.ee/et/eesti-geenivaramu> (vaadatud 04.04.24).

Filippone, C., Franssila, R., Kumar, A., Saikko, L., Kovanen, P. E., Söderlund-Venermo, M., & Hedman, K. (2010). Erythroid progenitor cells expanded from peripheral blood without mobilization or preselection: Molecular characteristics and functional competence. *PLOS ONE*, 5(3), e9496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009496>

Gallagher, M. D., & Chen-Plotkin, A. S. (2018). The Post-GWAS Era: From Association to Function. *American journal of human genetics*, 102(5), 717–730. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.04.002>

Gawlik-Rzemieniewska, N., & Bednarek, I. (2016). The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells. *Cancer biology & therapy*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1121348>

Guan, J., Wang, G., Wang, J., Zhang, Z., Fu, Y., Cheng, L., Meng, G., Lyu, Y., Zhu, J., Li, Y., Wang, Y., Liuyang, S., Liu, B., Yang, Z., He, H., Zhong, X., Chen, Q., Zhang, X., Sun, S., Lai, W., Shi, Y., Liu, L., Wang, L., Li, C., & Deng, H. (2022). Chemical reprogramming of

human somatic cells to pluripotent stem cells. *Nature*, 605, 325–331.

<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04593-5>

Hadjimichael, C., Chanoumidou, K., Papadopoulou, N., Arampatzi, P., Papamatheakis, J., & Kretsovali, A. (2015). Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells.

*World journal of stem cells*, 7(9), 1150–1184. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i9.1150>

Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B. W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M. P., Steine, E. J., Cassady, J. P., Foreman, R., Lengner, C. J., Dausman, J. A., & Jaenisch, R. (2008). Direct Reprogramming of Terminally Differentiated Mature B Lymphocytes to Pluripotency. *Cell*, 133(2), 250-264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.028>

Hu, X., Eastman, A. E., & Guo, S. (2019). Cell cycle dynamics in the reprogramming of cellular identity. *FEBS Letters*, 593(20), 2853-2866. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13625>

International Society for Stem Cell Research. (2023). *Standards for human stem cell use in research*. <https://www.isscr.org/standards>

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

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.005>

Kleeberger, C. A., Lyles, R. H., Margolick, J. B., Rinaldo, C. R., Phair, J. P., & Giorgi, J. V. (1999). Viability and Recovery of Peripheral Blood Mononuclear Cells Cryopreserved for up to 12 Years in a Multicenter Study. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(1), 14-19. <https://doi.org/10.1128/cdli.6.1.14-19.1999>

Lesueur, L. L., Mir, L. M., & André, F. M. (2016). Overcoming the Specific Toxicity of Large Plasmids Electrotransfer in Primary Cells In Vitro. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 5(3), e291. <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.4>

Lieu, P. T., Fontes, A., Vemuri, M. C., & MacArthur, C. C. (2013). Generation of induced pluripotent stem cells with CytoTune, a non-integrating Sendai virus. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 997, 45–56. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0_5)

Li, J., Song, W., Pan, G., *et al.* (2014). Advances in understanding the cell types and approaches used for generating induced pluripotent stem cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 7(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0050-z>

Loh, Y. H., Agarwal, S., Park, I. H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G. C., Kim, K., Miller, J. D., Ng, K., & Daley, G. Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*, 113(22), 5476–5479. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-204800>

MacArthur, J., Bowler, E., Cerezo, M., Gil, L., Hall, P., Hastings, E., Junkins, H., McMahon, A., Milano, A., Morales, J., *et al.* (2017). The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D896–D901. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1133>

Manzini, S., Viiri, L. E., Marttila, S., & others. (2015). A comparative view on easy to deploy non-integrating methods for patient-specific iPSC production. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(6), 900-908. <https://doi.org/10.1007/s12015-015-9619-3>

Mellott, A. J., Godsey, M. E., Shinogle, H. E., Moore, D. S., Forrest, M. L., & Detamore, M. S. (2014). Improving viability and transfection efficiency with human umbilical cord wharton's jelly cells through use of a ROCK inhibitor. *Cellular reprogramming*, 16(2), 91–97. <https://doi.org/10.1089/cell.2013.0069>

Meraviglia, V., Zanon, A., Lavdas, A. A., Schwienbacher, C., Silipigni, R., Di Segni, M., Chen, H. S., Pramstaller, P. P., Hicks, A. A., & Rossini, A. (2015). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Frozen Buffy Coats using Non-integrating Episomal Plasmids. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (100), e52885. <https://doi.org/10.3791/52885>

Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D. L., Kano, Y., Nishikawa, S., Tanemura, M., Mimori, K., Tanaka, F., Saito, T., Nishimura, J., Takemasa, I., Mizushima, T.,

Ikeda, M., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Doki, Y., & Mori, M. (2011). Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell stem cell*, 8(6), 633–638. [10.1016/j.stem.2011.05.001](https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.05.001)

Narsinh, K. H., Jia, F., Robbins, R. C., Kay, M. A., Longaker, M. T., & Wu, J. C. (2011). Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nature protocols*, 6(1), 78–88. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.173>

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2024). *OTX2 orthodenticle homeobox 2 [Homo sapiens (human)]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5015>

Ochi, S., Manabe, S., Kikkawa, T., & Osumi, N. (2022). Thirty Years' History since the Discovery of Pax6: From Central Nervous System Development to Neurodevelopmental Disorders. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 6115. <https://doi.org/10.3390/ijms23116115>

Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151), 313–317. <https://doi.org/10.1038/nature05934>

Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., 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 methods*, 8(5), 409–412. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1591>

Okita, K., Yamakawa, T., Matsumura, Y., Sato, Y., Amano, N., Watanabe, A., Goshima, N., & Yamanaka, S. (2013). An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 31(3), 458–466. <https://doi.org/10.1002/stem.1293>

Park, I. H., Zhao, R., West, J., *et al.* (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451, 141–146. <https://doi.org/10.1038/nature06534>

Rasmussen, M. A., Holst, B., Tümer, Z., Johnsen, M. G., Zhou, S., Stummann, T. C., Hyttel, P., & Clausen, C. (2014). Transient p53 suppression increases reprogramming of human fibroblasts without affecting apoptosis and DNA damage. *Stem cell reports*, 3(3), 404–413. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.07.006>

Seki, T., Yuasa, S., Oda, M., Fusaki, N., Hasegawa, M., & Fukuda, K. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Stem Cell Reports*, 7(1), 11-14. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.003>

Serwold, T., Hochedlinger, K., Swindle, J., Hedgpeth, J., Jaenisch, R., & Weissman, I. L. (2010). T-cell receptor-driven lymphomagenesis in mice derived from a reprogrammed T cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(44), 18939–18943. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013230107>

Shi, G., & Jin, Y. (2010). Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(39). <https://doi.org/10.1186/scrt39>

Si-Tayeb, K., Noto, F. K., Sepac, A., Sedlic, F., Bosnjak, Z. J., Lough, J. W., & Duncan, S. A. (2010). Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC developmental biology*, 10, 81. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-81>

Sommer, A. G., Rozelle, S. S., Sullivan, S., Mills, J. A., Park, S. M., Smith, B. W., Iyer, A. M., French, D. L., Kotton, D. N., Gadue, P., Murphy, G. J., & Mostoslavsky, G. (2012). Generation of human induced pluripotent stem cells from peripheral blood using the STEMCCA lentiviral vector. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (68), 4327. <https://doi.org/10.3791/4327>

Sproul, A. A., Vensand, L. B., Dusenberry, C. R., Jacob, S., Vonsattel, J. P., Paull, D. J., Shelanski, M. L., Crary, J. F., & Noggle, S. A. (2014). Generation of iPSC lines from archived non-cryoprotected biobanked dura mater. *Acta neuropathologica communications*, 2, 4. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-4>

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>

Uhm, K.-O., Go, G. Y., Kim, S.-J., Jo, E. H., Choi, H. Y., Im, Y. S., Ha, H.-Y., Kim, J.-H., & Koo, S. K. (2017). Generation of human induced pluripotent stem cell lines from human dermal fibroblasts using a modified RNA system. *Stem Cell Research*, 24, 148-150. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.02.009>

Wada, H., Kojo, S., Kusama, C., Okamoto, N., Sato, Y., Ishizuka, B., Seino, K., (2011). Successful differentiation to T cells, but unsuccessful B-cell generation, from B-cell-derived induced pluripotent stem cells. *International Immunology*, 23(1), 65-74. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxq458>

Wang, L., Su, Y., Huang, C., Yin, Y., Chu, A., Knupp, A., & Tang, Y. (2019). NANOG and LIN28 dramatically improve human cell reprogramming by modulating LIN41 and canonical WNT activities. *Biology open*, 8(12), bio047225. <https://doi.org/10.1242/bio.047225>

Warren, L., Ni, Y., Wang, J., & Guo, X. (2012). Feeder-free derivation of human induced pluripotent stem cells with messenger RNA. *Scientific reports*, 2, 657. <https://doi.org/10.1038/srep00657>

Weltner, J., Balboa, D., Katayama, S., Bernal, M., Krjutškov, K., Jouhilahti, E.-M., Trokovic, R., Kere, J., & Otonkoski, T. (2018). Human pluripotent reprogramming with CRISPR activators. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05067-x>

Ye, L., Swingen, C., & Zhang, J. (2013). Induced pluripotent stem cells and their potential for basic and clinical sciences. *Current cardiology reviews*, 9(1), 63–72. <https://doi.org/10.2174/157340313805076278>

Ye, Z., Zhan, H., Mali, P., Dowey, S., Williams, D. M., Jang, Y. Y., Dang, C. V., Spivak, J. L., Moliterno, A. R., & Cheng, L. (2009). Human-induced pluripotent stem cells from blood cells

of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood*, 114(27), 5473–5480. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-217406>

Zhang, S., & Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World journal of stem cells*, 6(3), 305–311. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.305>

Zhang, X. B. (2013). Cellular reprogramming of human peripheral blood cells. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 11(5), 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2013.09.001>

Zhou, W., & Freed, C. R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 27(11), 2667–2674. <https://doi.org/10.1002/stem.201>

Zhou, T., Benda, C., Duzinger, S., Huang, Y., Li, X., Li, Y., Guo, X., . . . , Esteban, M. A. (2011). Generation of induced pluripotent stem cells from urine. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 22(7), 1221–1228. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011010106>

## TÖÖS KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Biorender: <https://app.biorender.com/>

## LISAD

### Lisa 1. Punaste vererakkude lüüsipuhvri koostisosad.

Tabel 9. Punaste vererakkude lüüsipuhvri koostisosad.

Koostisosa	Kogus
$\text{KHCO}_3$	0,5 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	4,145 g
0,5 M EDTA	100 $\mu\text{l}$

## Lisa 2. Töös kasutatud praimerid

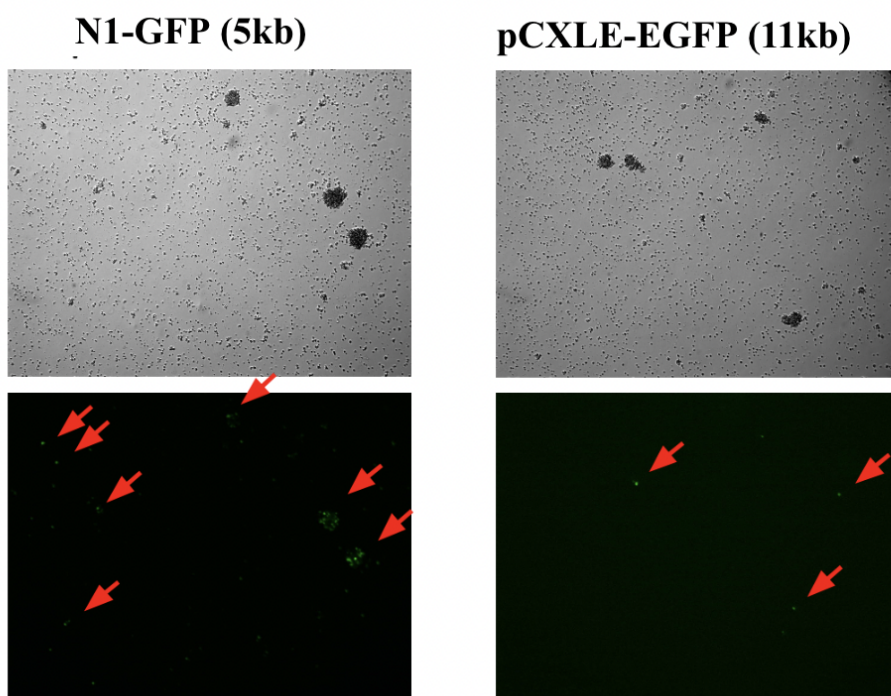
Nimi	Järjestus	Etapp, kus kasutati
SeV_F	GGATCACTAGGTGATAT CGAGC	Reprogrammeerimisfaktorite puudumine
SeV_R	ACCAGACAAGAGTTTAA GAGATATGTATC	Reprogrammeerimisfaktorite puudumine
OCT4 mRNA_R	CTGGAGCAAAACCCGGA GG	Diferentseerumispotentsiaal
OCT4 mRNA_F	CCTCAAAGCGGCAGATG GTC	Diferentseerumispotentsiaal
SOX2 mRNA_R	CATGCACCGCTACGACG	Diferentseerumispotentsiaal
SOX2 mRNA_F	CGGACTTGACCACCGAA C	Diferentseerumispotentsiaal
NANOG mRNA_R	CCTGTGATTTGTGGGCCT G	Diferentseerumispotentsiaal
NANOG mRNA_F	GACAGTCTCCGTGTGAG GCAT	Diferentseerumispotentsiaal
PAX6 mRNA_F	AACAGACACAGCCCTCA CAAAC	Diferentseerumispotentsiaal
PAX6 mRNA_R	CGGGAACTTGAAGTGA ACTGAC	Diferentseerumispotentsiaal
HAND1 mRNA_F	GTGAGAGCAAGCGGAAA AG	Diferentseerumispotentsiaal
HAND1 mRNA_R	GTGCGTCCTTTAATCCTC TTC	Diferentseerumispotentsiaal
SOX17 mRNA_F	GGCGCAGCAGAATCCAG A	Diferentseerumispotentsiaal
SOX17 mRNA_R	CCACGACTTGCCCAGCA T	Diferentseerumispotentsiaal
TBP mRNA_F	CACGAACCACGGCACTG ATT/ TGCACAGGAGCCAAGAG TGAA	Diferentseerumispotentsiaal
TBP mRNA_R	TTTTCTTGCTGCCAGTCT GG/	Diferentseerumispotentsiaal

	CACATCACAGCTCCCCA CCA	
OTX2 mRNA_F	GCTGGCTATTTGGAATTT AAAGC	Diferentseerumispotentsiaal
OTX2 mRNA_R	GGGTTTGGAGCAGTGGA AC	Diferentseerumispotentsiaal

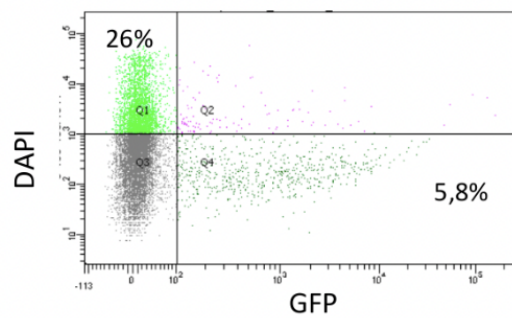
### Lisa 3. Plasmidi suuruse mõju transfektsiooni efektiivsusele

Uuriti plasmidi suuruse mõju transfektsiooni efektiivsusele, kasutades T-rakke. Rakud aktiveeriti, kasvatades neid neli päeva (kirjeldatud punktis 2.2.2). Seejärel sooritati elektroporatsioon, vaadati rakke fluorestsentsmikroskoobi all ja tehti volutsütomeetria (kirjeldatud punktis 2.2.3.2). Elektroporatsiooniks kasutati pCXLE-EGFP plasmidi, mille suurus on 11kb või N1-GFP plasmidi, mille suurus on 5kb.

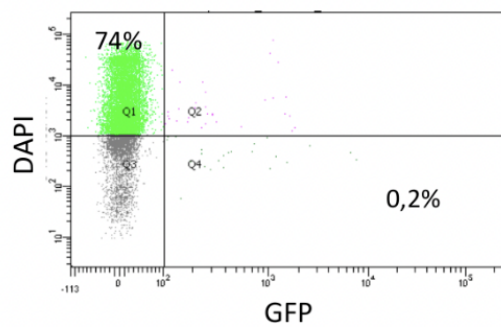
Elektroporatsiooni efektiivsus oli madalam suurema plasmidiga (joonis L1) ja suurem kõrgem (joonis L2). Elusaid GFP positiivseid rakke oli väiksema plasmidiga 5,8% ja suurema plasmidiga vaid 0,2% (joonis L2).



**Joonis L1. T-rakud 48h pärast elektroporatsiooni pCXLE-EGFP või N1-GFP plasmidiga. GFP positiivsed rakud on märgitud punaste nooltega.**



**N1-GFP (5kb)**



**pCXLE-EGFP (11kb)**

**Joonis L2. Voolutsütomeetria tulemused T-rakkudega pärast elektroporatsiooni pCXLE-EGFP või N1-GFP plasmiidiga.** Elusaid GFP positiivseid rakke oli väiksema plasmiidiga 5,8% ja suurema plasmiidiga vaid 0,2%.

## LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.

Mina, Katariina Kordemets,

(sünnikuupäev 04.10.2000)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “Indutseeritud pluripotentsete tüvirakkude valmistamine külmutatud vereproovidest”, mille juhendajad on PhD Tõnis Org ja Annika Trei, 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 4.0, 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.

Katariina Kordemets

27.05.24