

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TERVISETEHNOLOOGIATE ARENDUSKESKUS AS

Rakkude transpordilahuse optimeerimine terve genoomi amplifikatsiooniks

Bakalaureusetöö

12 EAP

Diana Lanevskaja

Juhendajad PhD Kaarel Krjutškov

PhD Lilian Kadaja-Saarepuu

TARTU 2023

Infoleht

Rakkude transpordilahuse optimeerimine terve genoomi amplifikatsiooniks

Viljatus on sagedane probleem, mis mõjutab miljoneid paare üle maailma. Viljatusravi üheks võimaluseks on kehaväline viljastamine, mille tulemusel arenevad inkubaatoris blastotsüstid, millest siirdamiseks valitakse kromosomaalselt terved embrüod. Embrüote siirdamiskõlbulikkust hinnatakse morfoloogia ja kromosoomhaiguste sõeluuringu tulemusel. Viimases kasutatakse kuni kümmet rakku, mis võetakse biopsiana embrüo trofektodermi rakkudest. Embrüote siirdamiseelne geneetiline testimine ehk PGT vajab piiratud geneetilise materjali koguse tõttu terve genoomi paljundamist ehk WGA-d. WGA omakorda eeldab vastava valmidusastmega labori ja personali olemasolu ning sellest tulenevat vajadust biopsia transpordiks kliinikust laborisse. Käesolevas töös võrreldi NaOH ja KOH aluselist hüdrolyüüsi võimaldavaid lahuseid ja nende lahuste kontsentratsioonide mõju WGA etapis. Lisaks selgitati välja lahuste stabiilsus pikaajalises transpordis. Tehtud töö tulemusel osutus kõige stabiilsemaks transpordilahuseks 50 mM KOH. Samas vajab testitud protokoll edasist optimeerimist, sest WGA ei paljundanud genoomi kõikjal võrdse efektiivsusega ning põhjustas vale-positiivseid tulemusi.

Märksõnad: terve genoomi amplifitseerimine, rakkude lüüsimine, aluseline hüdrolyüüs, sekveneerimine, qPCR.

B790 Kliiniline geneetika

Optimizing Cell Transport Solution for Whole Genome Amplification

Infertility affects millions of couples worldwide, leading to the need for assisted reproductive technologies like *in vitro* fertilization. To enable preimplantation genetic testing (PGT), limited genetic material from biopsied cells must undergo whole genome amplification (WGA). This study compares NaOH and KOH solutions for alkaline hydrolysis and evaluates the impact of different concentrations during WGA. The stability of these solutions during transportation for 0-72 hours is also assessed. Results indicate that 50 mM KOH is a more stable transport solution, although WGA yield showed false-positive results. This research aims to optimize cell transport solutions for WGA and PGT, enhancing the efficiency of genetic testing in infertility treatments.

Keywords: Whole Genome Amplification, cell lysis, alkaline hydrolysis, sequencing, qPCR

B790 Clinical genetics

Sisukord

Infoleht.....	2
Sisukord	3
Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Implantatsioonieelne geneetiline testimine ehk PGT	7
1.1.1. PGT-A	7
1.1.2. PGT-M.....	8
1.1.3. PGT-SR	9
1.2. Aluseline hüdrolüüs	9
1.2.1. KOH ja NaOH	10
1.3. WGA meetodid	10
1.3.1. Polümeraasi ahelreaktsioonil baseeruvad WGA meetodid	11
1.3.2. Isotermilised WGA meetodid	13
1.3.3. Mikrovedeliksüsteemil põhinev amplifitseerimise tehnoloogia	16
1.4. PGT rakkude transpordi lahused.....	16
2. EKSPERIMENTAALOSA	18
2.1. Töö eesmärgid.....	18
2.2. Materjalid ja meetodika	18
2.2.2. Rakkude kasvatamine ja ettevalmistus.....	19
2.2.3. Aluseline hüdrolüüs ja neutralisatsioon	19
2.2.4. Terve genoomi amplifikatsioon endomeetriumi strooma rakkudest.....	20
2.2.5. Rakkude lüüsimise efektiivsuse kontroll.....	20
2.2.7. Reaalaja PCR.....	21
2.2.8. Raamatukogu valmistamine	21
2.3. Tulemused.....	23
2.4. Arutelu	27
Kokkuvõte.....	29
Summary	31
Tänuõnad	33
Kirjanduse leotelu	34
Kasutatud veebiaadressid.....	40
Lisad.....	42
Lihtlitsents	46

Kasutatud lühendid

(D)PBS - (Dulbecco) fosfaatpuhver (*(Dulbecco's) Phosphate Buffered Saline*)

DMDM/F-12 - Dulbecco muudetud Eagle sööde/toitainete segu F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*)

DMEM(H) - Dulbecco muudetud Eagle sööde kõrge glükoosi sisaldusega (*Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose*)

DOP-PCR - Degeneratiivse oligonukleotiidi alusel tehtav PCR (*Degenerate Oligonucleotide Primed PCR*)

IVF - kunstlik viljastamine (*in vitro fertilization*)

K-SFM - Keratinotsüütide vaba keskkond (*Keratinocyte Serum-Free Medium*)

LA-PCR - Pikk ja täpne PCR (*Long and Accurate PCR*)

LIANTI - Lineaarne amplifikatsioon läbi transposooni sisestamise (*Linear Amplification via Transposon Insertion*)

LM-PCR - Ligeerimise-vahendatud PCR (*Ligation Mediated PCR*)

MALBAC - Korduva seondumise ja tsüklilise amplifikatsiooni põhine paljundus (*Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycles*)

MDA - Korduv asendusamplifikatsioon (*Multiple Displacement Amplification*)

PEP-PCR - Eelamplifikatsiooniga PCR (*Primer Extension Preamplification PCR*)

PGT - Implantatsioonieelne geneetiline testimine (*Pre-implantation Genetic Testing*)

PGT-A - Implantatsioonieelne geneetiline testimine aneuploiduse tuvastamiseks (*Pre-implantation Genetic Testing for Aneuploidy*)

PGT-M - Implantatsioonieelne geneetiline testimine monogeensete kõrvalekallete tuvastamiseks (*Pre-implantation Genetic Testing for Monogenic disorders*)

PGT-SR - Implantatsioonieelne geneetiline testimine kromosomaalsete struktuursete kõrvalekallete tuvastamiseks (*Pre-implantation Genetic Testing for chromosomal Structural Rearrangements*)

qPCR - Reaalaja PCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RPMI 1640 - Roswell Parki 1640 sööde (*Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*)

T-PCR - Markeeritud juhuslike praimeritega PCR (*Tagged random primers PCR*)

WGA - Terve genoomi amplifitseerimine (*Whole Genome Amplification*)

α -MEM - Minimaalne vajalik keskkond α (*Minimum Essential Medium α*)

Sissejuhatus

Viljatusravi vajadus on sagedane probleem, mis hõlmab 15% paaridest ja mõjutab hinnanguliselt 48 miljonit paari üle maailma (UCLA Health, 2020; WHO, 2020). Lastetuse põhjus on võrdselt tingitud nii naistest kui ka meestest, 40 protsendil juhtudest on viljatus seotud naiste ja samavõrra meeste terviseprobleemidega. Kümme protsenti viljatusest on samaaegselt mõjutatud mõlema partneri poolt ning ülejäänud juhtudel on põhjus ebaselge (ASRM, 2017). Domineerivaks lastetuse põhjuseks on laste saamise edasilükkamine. Paaride kõige levinumad põhjused laste saamise edasilükkamiseks on kõrgem haridustase, partneri puudumine, finantsiliselt ebastabiilne olukord ning soov tegeleda õpingute ja karjääriga (Clarke ja Hammarberg, 2005; Mills *et al.*, 2011). Laste saamise edasi lükkamisest põhjustatud lastetust arengumaades kinnitavad ka numbrilised näitajad. Madalad sündimusnäitajad on näiteks Lõuna- ja Ida-Euroopas, kus üks naine sünnitab keskmiselt 1,5 last. Sellest madalam sündimusnäitaja on poliitilistel põhjustel Ida-Aasias, kus näiteks Hongkongis, Taiwanis ja Lõuna-Koreas sünnib ühel naisel keskmiselt üks laps (Raymo *et al.*, 2015).

Naiste viljatuse peamised põhjused on menstruaaltsükli häired, endometrioos, ülekaalulisus, erinevad haigused nagu kilpnäärmehaigused ja diabeet, ovulatsiooni düsfunktsioon, emaka ja munajuhade anomaaliad (Masoumi *et al.*, 2015; Adamson *et al.*, 2003). Masoumi ja kolleegide 2015. aasta artiklis tuuakse välja ka mehe viljatuse põhjusi, milleks on ravimata eesnäärme põletik, seemnerakkude tekkimise häired ja liikumatus ning erinevad geneetilised põhjused. Seda kinnitab Eestis läbi viidud uuring, kus leiti, et valdav enamus (87,4%) teadaoleva geneetilise faktoriga patsientidel kaasnes viljatus kolmel kliinilisel põhjusel: azoo-, krüpto- või aspermia (Punab *et al.*, 2017).

Lastetuse ravivõimalusi on mitmeid ja sobiv lähenemine valitakse sõltuvalt iga paari vajadusest. Meditsiinilist abi saab nii kirurgiast, hormonaalse ravi kasutamisest kui ka kaalu langetamisest ülekaaluliste patsientide puhul (Carson ja Kallen, 2021). Üks valikutest on kunstlik viljastamine ehk *in vitro* viljastamise tehnoloogia (Cunningham, 2017). Kunstliku viljastamise esimene viis on inseminatsioon ehk doonori seemnerakud sisestatakse naise munajuhasse või emakasse. Teine meetod on kehaväline viljastamine ehk *in vitro* viljastatud munaraku siirdamine emakasse (Kauppila ja Nikkola, 1997; TÜ naistekliinik, 2022). Kehavälise viljastamise tulemusel arenevad

inkubaatoris blastotsüstid, millest edasisteks protseduurideks valitakse siirdamiskõlblikud (Penzias *et al.*, 2018).

Embrüote siirdamiskõlblikkust hinnatakse morfoloogia ja kromosoomhaiguste sõeluuringu tulemusel. Hinnanguliselt 60% rasedustest katkeb nii loomuliku- kui ka kehavälise viljastamise tulemusel. Kromosomaalsed kõrvalekalded moodustavad hinnanguliselt 60 protsenti raseduse katkemise juhtudest nii loomulikest rasedumistest kui ka viljatusravi tulemusel saadud rasedustest (Levy *et al.*, 2014). Selleks, et testida embrüoid kromosoomhaiguste suhtes, on tänapäeval mitmeid võimalusi.

Embrüote siirdamiseelset geneetilist testimist ehk PGT (ingl *Pre-implantation Genetic Testing*) saab kasutada monogeensete häirete või üksikute geenidefektide tuvastamiseks. Üksiku geenidefekti analüüsimeetodi nimi on PGT-M (ingl *Pre-implantation Genetic Testing for Monogenic disorders*). Embrüo kromosomaalsete struktuursete ümberkorralduste analüüsimiseks on PGT-SR test (ingl *Pre-implantation Genetic Testing for Structural chromosomal Rearrangements*) ja aneuploidsuse tuvastamiseks kasutatakse PGT-A (ingl *Pre-implantation Genetic Testing for Aneuploidy*) testi (Handyside *et al.*, 1990, Zegers-Hochschild *et al.*, 2017).

Põhjusel, et blastotsüsti rakkudest saadakse väga piiratud kogus geneetilist informatsiooni, vähem kui kümme rakku, on genoomse DNA paljundamine enne PGT analüüsi mõõdapääsmatu. Esmalt viiakse läbi terve genoomi amplifitseerimine ehk WGA (ingl *Whole Genome Amplification*), mis eeldab vastava valmidusastmega laborit ja personali (Handyside *et al.*, 2004). Biopsia transpordilahus peaks olema kergesti valmistatav ja stabiilne ning ei tohiks negatiivselt mõjutada edasisi WGA tulemusi, kuna võib tulla ette vajadus võetud biopsia transpordiks teise laborisse.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on töötada välja embrüo rakkude transpordilahuse koostis, mis sobituks WGA ja PGT analüüsi. Töö käigus selgitatakse välja optimaalse kontsentratsiooniga aluseline lahus, mille efektiivsust testitakse erinevates ajaetappides WGA tingimustes. Töö viimases etapis kontrollitakse saadud WGA tulemusi PGT-sarnase sekveneerimise protokolliga. Bakalaureusetöö praktiline osa viidi läbi Tervisetehnoloogiate Arenduskeskuse AS laboris.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Implantatsioonieelne geneetiline testimine ehk PGT

PGT ehk embrüo siirdamiseelne geneetiline analüüs sai alguse 1980. aastatel ning Suurbritannia teadlased tegid esimese eduka PGT analüüsi 1990. aastal. Uuringus kasutati PCR (ingl *Polymerase Chain Reaction*) põhise amplifikatsiooni, et tuvastada poiss-embryoide ning välistada haploidse X-kromosoomiga seotud haiguste edasikandumist lapsele (Coutelle *et al.*, 1989; Handyside *et al.*, 1990). Embrüo PGT sai kiirelt üheks enamkasutatavaks testimisvahendiks ühe-geeni mutatsioonide tuvastamiseks, nagu näiteks tsüstiline fibroos ja sirprakuline aneemia. Samuti on meetod sobilik suguliiteliste haiguste tuvastamiseks, näiteks hemofiilia, ja kromosoomi koopiaarvu põhjustatud haiguste, näiteks Downi sündroomi, vältimiseks (Verlinsky *et al.*, 2002; Kuliev ja Verlinsky, 2005).

PGT on ühe või enama raku biopsia *in vitro* viljastatud embrüost. Biopsia võetakse blastotsüsti välisest rakukihist ehk trofektodermist ning sisemist rakumassi ei häirita. DNA analüüsi tulemuste põhjal valitakse siirdamiseks eelistatult geneetiliselt terved embrüod (De Rycke ja Berckmoes, 2020). Eksisteerib mitu PGT võimalust. Enimkasutatav on PGT-A ja PGT-M ning PGT-SR meetod (Handyside *et al.*, 1990, Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Hiljem on rakendust leidnud ePGT meetod (ingl *extended Preimplantation Genetic Testing*) ehk kombineeritud PGT, mis ühendab endas PGT-A ja PGT-M laborianalüüsi ning mitteinvasiivset kaameratel põhinevat jälgimissüsteemi (Fasahat, 2020).

1.1.1. PGT-A

PGT-A on terve genoomi analüüsimeetod, mis võimaldab määrata *in vitro* viljastatud embrüote kariotüüpi, analüüsides 22 autosoomi paari ja sugukromosoomi. Eesmärk on tuvastada kliiniliselt olulisi kromosoomi koopiaarvu muutusi ehk aneuploidiaid (Munné *et al.*, 1993; Penzias *et al.*, 2018).

Aneuploidsust defineeritakse kui ebanormaalset kromosoomide arvu rakkudes, mis võib tekkida kromosoomide duplitseerumisel või deleteerumisel ning põhjustada raseduse peetust või IVF (ingl *in vitro fertilization*) protseduuri ebaõnnestumist. On leitud, et aneuploidsus põhjustab 50-70% raseduse katkemistest (Heinaru, 2012 (a); Zegers-Hochschild, *et al.*, 2017; Hassold *et al.*, 1980; Hassold ja Hunt, 2001). Aneuploidsuse risk suureneb koos naise vanusega, seega PGT-A uuringut

soovitatakse teha IVF patsientidele, kelle vanus on suurem kui 35 aastat (Hook *et al.*, 1983; Demko *et al.*, 2016). Kliiniliselt olulised aneuploidiad on 21. kromosoomi trisoomia ehk Downi sündroom, 18. kromosoomi trisoomia ehk Edwardsi sündroom ja 13. kromosoomi trisoomia ehk Patau sündroom (Genetic Alliance, 2010). Lisaks analüüsitakse sugukromosoomide kõrvalekaldeid nagu 45,X0 ehk Turneri sündroom, 47,XXY ehk Klinefelteri sündroom, 47,XYY ehk Jacobseni sündroom ja 47,XXX ehk trisoomia X. Kui autosoomide trisoomiad on seotud raskete vaimsete ja füüsiliste puuetega, siis sugukromosoomide anomaaliad vastutavad eelkõige reproduktiivtervise ja täisväärtusliku elu eest (Roost *et al.*, 2016).

PGT-A analüüsi jaoks võetakse 5-6 päevase embrüo trofektodermi rakukihist tavapäraselt viis kuni kümme rakku. Seejärel kõik blastotsüstid külmutatakse ja jäädakse ootama kromosoomanalüüsi tulemusi. Tulemuste saabudes ajastatakse embrüote siirdamine, mille tarvis sulatatakse üles vaid valitud embrüo(d) (Zhang *et al.*, 2014).

Embrüote PGT-A testimine aitab vähendada peetunud raseduste arvu ehk raseduse katkemist, aitab jääda rasedaks vähemate siirdamiste arvuga ning tõsta rasestumise tõenäosust (Shi *et al.*, 2021). On näidatud, et *in vitro* viljastatud embrüod, millele tehti PGT-A, kinnituvad statistiliselt suurema tõenäosusega emaka limaskestale ning nendest sünnib terve laps (Karhaman *et al.*, 2022). Samaaegselt on teada, et PGT-A võib anda vale-positiivseid ja vale-negatiivseid tulemusi, mis on tingitud trofektodermi mosaiiksusest (Scott Jr *et al.*, 2013). Samuti võib trofektodermi biopsia mõjutada embrüo elujõulisust ja hilisemat implantatsiooni potentsiaali (Somigliana *et al.*, 2019).

1.1.2. PGT-M

Kindlatele geenidele suunatud PGT-M teostatakse eelneva perekondliku kliinilise informatsiooni põhjal, kui soovitakse välistada mutantse alleeli kandumist lapsele. PGT-M võimaldab tuvastada kõiki valitud geeni poolt põhjustatud monogeenseid haigusi (PCSART ja PCASRM, 2008; Kuliev, 2012; De Rycke ja Berckmoes, 2020).

Haigust põhjustavad lookused, mida laps võib pärida, on tavaliselt X-kromosoomi seoselised, autosomaalsed, dominantsete või retsessiivsete ning ka emalt päritud mitokondriaalsed lookused (Richards *et al.*, 2015; Kuliev, 2012). Autosomaalsed häired on näiteks tsüstiline fibroos, Hungtingtoni tõbi, 1. tüüpi müotooniline düstroofia ja neurofibromatoos, X-seoselised häired on näiteks Duchenne'i lihasealine düstroofia, hemofiilia ja fragiilne X (MedlinePlus, 2023). PGT-M uuringu tarvis võetakse samalaadne biopsia kui PGT-A testi jaoks. Geneetilisele analüüsile lisandub mõlema vanema kariotüübi analüüs vereproovist (De Rycke ja Berckmoes, 2020). Paul

Scriven toob oma 2022. aasta uuringus välja, et PGT-M test kaasatakse viljatusravisse eelkõige nooremate kui 35 aastaste partneritega paaride korral. Seevastu PGT-A soovitatakse teha 35 aastastele ja vanematele paaridele. Uuringuid on põhjust kombineerida, kuid seda eelkõige vanematel paaridel (Scriven *et al.*, 2022).

1.1.3. PGT-SR

Kromosoomi struktureid muutusi uuriv PGT-SR on üks PGT alaliike (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Struktureid ümberkorraldusi jaotatakse kahte rühma: tasakaalustatud ja tasakaalustamata ümberkorraldused. Tasakaalustatud muutuste puhul kromosoomides on toimunud kas kromosoomi segmendi ümberpöördumine ehk inversioon või kromosoomi asukoha muutus ehk translokatsioon. Tasakaalustamata ümberkorralduste puhul kaob või lisandub juurde mingi kromosoomi osa ehk on toimunud näiteks kromosoomi osa deleteerumine, duplitseerumine või insertioon (Genetic Alliance, 2010; Heinaru, 2012 (b)). PGT-SR soovitatakse teha eelkõige paaridele, kellel on esinenud mitmeid raseduse katkemisi (Pajuva *et al.*, 2020).

1.2. Aluseline hüdrolüüs

Aluseline hüdrolüüs on protsess, mille käigus keemilised sidemed lõhutakse vee sisestamisel aatomite sidemete vahele (BioSAFE, 2023). Aluselise hüdrolüüsi kasutamine oli esialgu patenteeritud 1888. aastal Inglismaa taluniku Amos Herbert Hobsoni poolt. Esmalt kasutati seda looma korjuste ning alates 2005. aastast ka inimeste laipade lagundamiseks, sest kõrge kontsentratsiooniga aluselised lahused lagundavad kõik orgaanilised materjalid makromolekulideks (Kaye *et al.*, 1998; Wilson, 2014).

Aluseline hüdrolüüs leidis laialdast kasutust ka teistel otstarvetel nagu näiteks detergentide ja seepide tootmiseks, valgendavates ainetes, kanalisatsiooni puhastusvahendites ning raskmetallide eemaldamiseks veest. Toiduainetööstuses saab aluselist hüdrolüüsi kasutada toidu konserveerimiseks (PubChem (a), 2023; PubChem (b), 2023). Aluselist hüdrolüüsi saab kasutada muuhlgas ka DNA denatureerimiseks. DNA täielikku denatureerimist kõrgel pH skaalal kinnitab 1969. aasta Biophysical Journalis ilmunud artikkel DNA aluselise hüdrolüüsi kohta. Näidati, et kõrgemal pH kui 11,8 kaovad DNA vesiniksidemed täielikult ning DNA kaksikahel (dsDNA) muutub üheaahelalisteks ssDNA molekulideks (Ageno *et al.*, 1969). Leelisena kasutatakse leelismetallihüdrokksiidide nagu näiteks naatriumhüdrokksiidi (NaOH) või kaaliumhüdrokksiidi (KOH) vesilahuseid (PubChem (a), 2023; PubChem (b), 2023). Aluselise pH korral on lahuses

ülekaalus OH⁻ ioonid. Need eemaldavad vesinikku siduva prootoni guaniinist ja tümiinist, lõhkudes vesiniksidemed kahe oligonukleotiidi vahel (Shin ja Day, 1995). Aluselise hüdroolüüsi denatureerivat toimet kinnitavad ka hilisemad katsed. Näiteks demonstreerisid Korea ja USA teadlased 2014. aastal, et DNA denatureerub täielikult 2-5 minutiga ühe molaarse NaOH ja 60% DMSO puhul (Wang *et al.*, 2014).

1.2.1. KOH ja NaOH

Nii KOH kui ka NaOH on tugevad alused ja leelismetallide hüdroksiidid (O'Neil *et al.*, 2006). Mõnevõrra erineb nende tugevus — kaalium vajab vähem energiat ioniseerimiseks, mis tähendab, et aatomite eemaldamine on KOH lahusele vähema energiakuluga ja KOH on tugevam alus kui NaOH (Atkins *et al.*, 2021).

Nii KOH kui ka NaOH lahuste stabiilsus sõltub temperatuurist ja kontsentratsioonist. Temperatuuri tõstmisel mõlema lahuse pH langeb. Näiteks kui 1 M NaOH või KOH lahust kuumutada 0°C-st 100°C-ni, siis langeb pH 15-lt 12-ne peale (Hausman *et al.*, 2021). Kirjeldatud pH muutus ei mõjuta aluselist hüdroolüüsi, kuna see toimub juba pH 9 juures (Thacker ja Kastner, 2004). Seega NaOH ja KOH 1 M lahust saab efektiivselt kasutada aluselise hüdroolüüsi jaoks ka muutuvates temperatuuri tingimustes. On uuritud ka lahjema lahuse, 0.1 M ehk 100 mM, NaOH stabiilsust erinevates tingimustes. Võrreldi lahuse hoiustamist normaaltingimustes (20°C, rõhk 1 atm), pimedas ja 35°C juures. Leiti, et 0.1 M NaOH lahust saab turvaliselt hoiustada normaaltingimustes ja pimedas kuni 30 päeva. Nendes tingimustes ei täheldatud aine statistiliselt olulist keemilist degradatsiooni. Keemiline degradatsioon oli 35°C juures ligikaudu 1% ja lahja aluseline lahus oli vähem stabiilne (Kumar ja Ram, 2019; Churikov *et al.*, 2011).

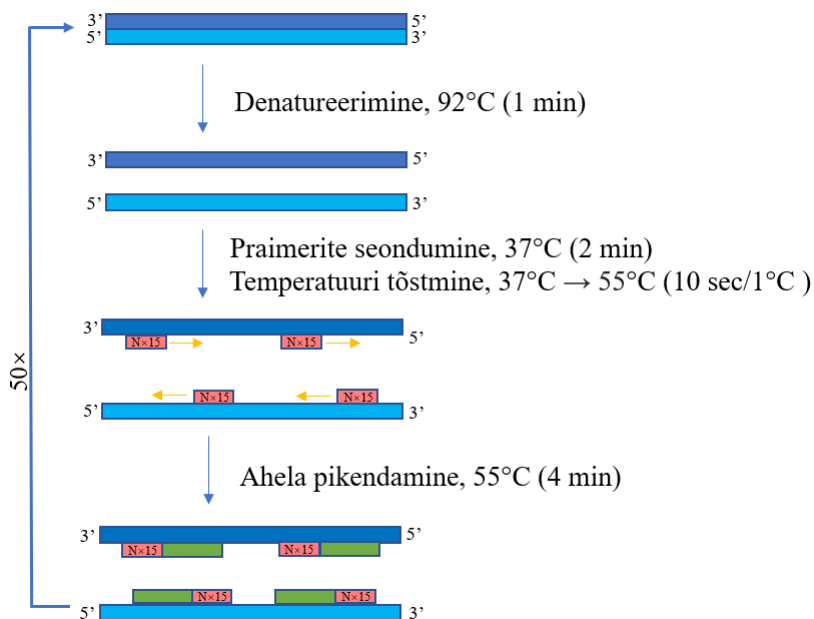
1.3. WGA meetodid

Embrüo PGT uuringu läbiviimiseks on tarvis paljundada algmaterjali ehk tervet genoomi. Terve genoomi amplifikatsioon ehk WGA, lisaks embrüo DNA analüüsile, on kasutuses erinevates arheoloogilistes/vana DNA uuringutes, molekulaardiagnostikas ja mikrobioloogilistes analüüsides (Wang *et al.*, 2022). WGA meetodid jagunevad kolme rühma. Esimeses on meetodid, mis kasutavad PCR lähenemist. Näiteks PEP-PCR (ingl *Primer Extension Pre-amplification PCR*) ja DOP-PCR (ingl *Degenerate Oligonucleotide Primed PCR*) (Zhang *et al.*, 1992; Carter *et al.*, 1992). Teises on meetodid, mis kasutavad isotermilist amplifikatsiooni nagu näiteks MDA (ingl *Multiple Displacement Amplification*), MALBAC (ingl *Multiple Annealing and Looping-Based*

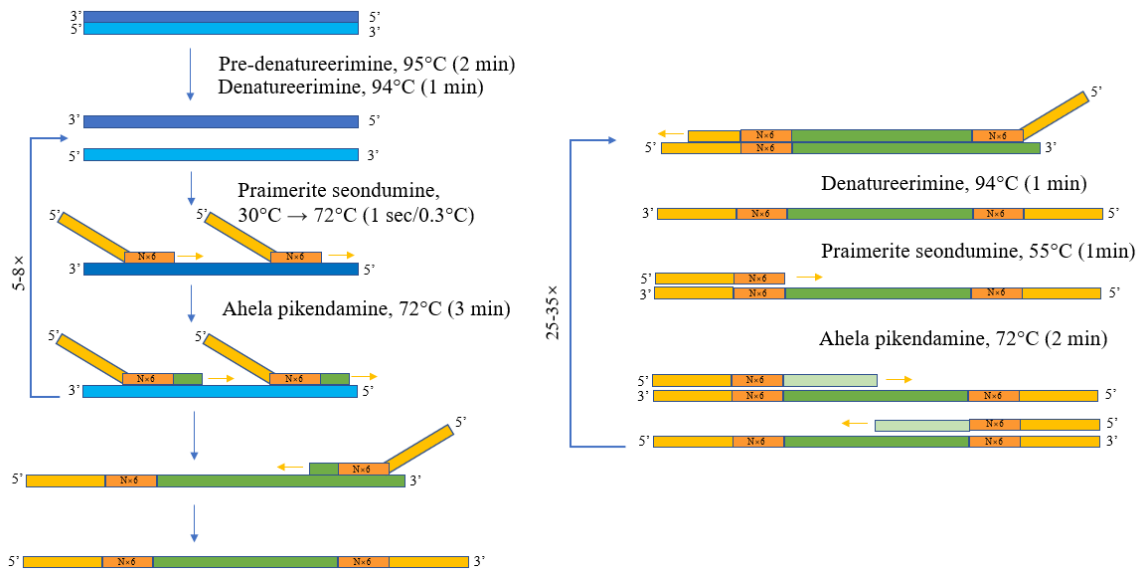
Amplification Cycles) ja LIANTI (ingl *Linear Amplification via Transposon Insertion*) (Duan *et al.*, 2016; Spits *et al.*, 2006; Hou *et al.*, 2013). Kolmandas on meetodid, mis kasutavad mikrovedeliksüsteeme (ingl *Digital MicroFluidics*), mis põhinevad automatiseeritud digitaalsel amplifikatsioonil (Ruan *et al.*, 2020).

1.3.1. Polümeraasi ahelreaktsioonil baseeruvad WGA meetodid

WGA meetodid PEP-PCR ja DOP-PCR publitseeriti 1992. aastal. PEP-PCR ehk praimerite pikendusega eelamplifikatsiooniline PCR oli arendatud Lõuna-Kalifornia Ülikooli teadlaste poolt. Kasutati viieteistkümnest juhuslikust nukleotiidist koosnevaid primereid ($N \times 15$), *Taq* DNA polümeraasi ja eelnevalt lüüsitud seemnerakkude genoomset DNA-d. Amplifikatsiooni käigus seonduvad $N \times 15$ praimerid juhuslikult genoomse DNA-ga ning viiekümne PCR tsükli tulemusel oli 75% genoomsest DNA-st amplikonidega kaetud (Joonis 1) (Zhang *et al.*, 1992). Carter ja kolleegid täiustasid 1992. aastal PEP-PCR meetodit, mille tulemuseks oli DOP-PCR, kus kombineeriti praimerites universaalset ja juhuslikke järjestusi. Pre-amplifitseerimise faasis tõstetakse N-praimerite seondumise temperatuur 30°C kuni 72°C , tsüklit korratakse viis kuni kaheksa korda. Järgmises PCR faasis viiakse läbi 25-35 tsüklit universaalsete parameetritega (Joonis 2) (Cheung ja Nelson, 1996; Carter *et al.*, 1992).



Joonis 1. PEP-PCR meetod. Kaheaahelaline DNA denatureeritakse ja seondatakse praimeritega, mis koosnevad viieteistkümnest juhuslikust nukleotiidist ($N \times 15$). Praimerite seondumine viiakse läbi temperatuuri gradiendis 37°C kuni 55°C . Praimerite pikendamine algab 55°C juures. Sünteesitud ahelad on kujutatud rohelisena. Tsüklit korratakse 50 korda. Joonis on koostatud Van Loo ja Voet artiklis avaldatu järgi (Van Loo ja Voet, 2014).



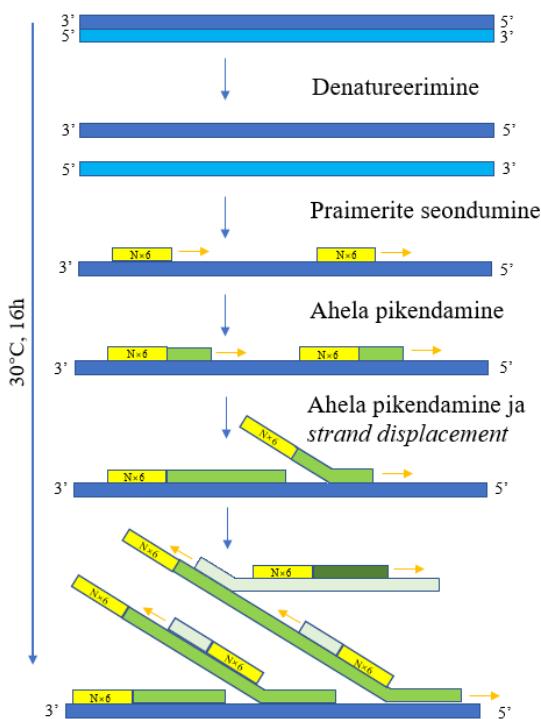
Joonis 2. DOP-PCR meetod. Meetod koosneb kahest etapist. Esimeses etapis (vasakul) DNA denatureeritakse ja seondatakse praimeritega, mis koosnevad juhuslikest nukleotiitidest (N×6) ja universaalsest järjestusest. Praimerite seondumine viiakse läbi temperatuuri gradiendis 30°C kuni 72°C. Praimerite pikendamine toimub 72°C juures. Sünteesitud ahelad on kujutatud rohelisega. Tekkinud kaheaahelalised ahelad omavad mõlemalt poolt fikseeritud praimeri järjestust, mis on kujutatud kollase ja oranžiga. Tsüklit korratakse 5 kuni 8 korda. Teises etapis (paremal) toimub eelnevalt valmistatud produktidest koopiade tegemine 25 kuni 35 tsükli jooksul. Joonis on koostatud Volozonoka jt artiklis avaldatud joonise järgi (Volozonoka *et al.*, 2022).

WGA meetodi modifikatsiooniks on T-PCR (ingl *Tagged random primers PCR*), mille praimeri 3' otsas on N×9-15 järjestus ning 5' otsas 17 aluspaariga universaalne järjestus. Selline lähenemine on kõrge tundlikkusega ja on efektiivne piiratud algmaterjali korral (Grothues *et al.*, 1993). LA-PCR modifikatsioon (ingl *Long and Accurate PCR*), kasutatakse kahte termostabiilset polümeraasi, millest ühel on 3'-5' eksonukleasne aktiivsus. Ensüümide kombinatsiooni tulemusena saadakse keskmiselt pikemad ampliconid võrreldes tavapärase PCR lähenemisega (Green ja Sambrook, 2019). DNA ligeerimisel põhinev LM-PCR (ingl *Ligation Mediated PCR*) on mitmest etapist koosnev protokoll, kus kasutatakse DNA lõikamist, tõmbistamist, linkerite lisamist ja PCR produktide pikendamist (Yu *et al.*, 2014; Mueller ja Wold, 1989). PCR põhiste meetodite efektiivsust mõjutavad kasutatud praimerite kontsentratsioon, genoomi GC piirkonnad ja DNA sekundaarsete struktuuride teke. Amplifikatsiooni takistuste tulemusel tekivad lühikesed ampliconid, mis põhjustab mittetäieliku genoomi kattvuse hilisemas analüüsis (Peng *et al.*, 2007; Zong *et al.*, 2012; Blagodatskikh *et al.*, 2017).

1.3.2. Isotermilised WGA meetodid

1.3.2.1. MDA

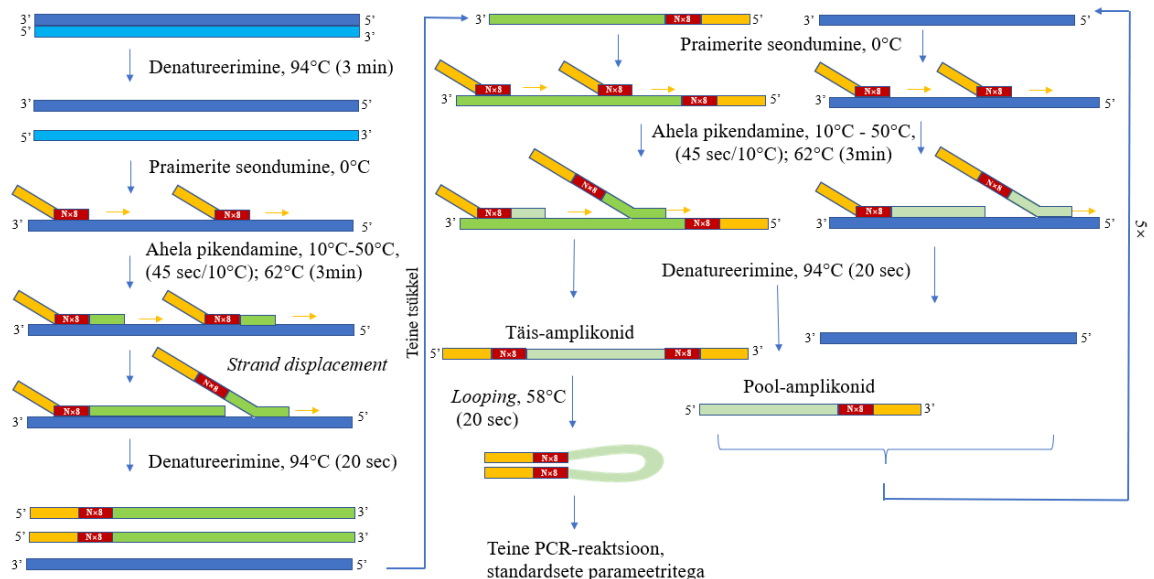
MDA on leiutatud 2001. aastal ja on tänapäeval üks peamisi WGA paljunduse meetodeid. MDA-s kasutatakse kõrge efektiivsusega ja 3'-5' eksonukleaaase veaparandusaktiivsusega (ingl *proofreading*) DNA polümeraasi, mis on isoleeritud bakteriofaag *phi29* genomist. Amplifikatsioonis kasutatakse N×8 nukleotiitidest koosnevaid primereid. DNA paljundamine toimub 16 tundi isotermilise reaktsiooni tingimustes 30°C juures (Dean *et al.*, 2001; Lasken, 2009). Kui esmalt rakendati MDA protokollit tsirkulaarsete DNA molekulide paljundamiseks, siis hilisemad protokollid võimaldavad ka lineaarsete ahelate amplifikatsiooni (Lasken, 2009). MDA eelis teiste WGA protokollide ees seisneb selles, et MDA suudab ühtlaselt ja kõrge täpsusega paljundada tervet genoomi, amplikonid on 10-100 Kb pikad ning efektiivsus ei sõltu genoomi GC kontekstist (He *et al.*, 2018; Dean *et al.*, 2002; Tzvetkov *et al.*, 2005). Meetodi puudusteks on mittespetsiifilised amplikonid, mis tekivad kas algmaterjali saastumisest või endogeenselt genereeritud järjestustest (Joonis 3) (Dean *et al.*, 2001; Hosono *et al.*, 2003).



Joonis 3. MDA meetod. Amplifikatsioon toimub 30°C juures 16 tunni jooksul. Kaheaheelaline DNA denatureeritakse ja seondatakse praimeritega, mis koosnevad kuuest juhuslikust nukleotiidist (N×6). Sünteesitud ahelad on kujutatud rohelisena. Kasutataval *phi29* polümeraasil on ahela eemalelükkamise (ingl *strand displacement*) omadus, mille tulemusel tekivad hargnevad DNA struktuurid. Joonis on koostatud New England Biolabs veebileheküljel avaldatud joonise järgi (New England Biolabs, 2023).

1.3.2.2. MALBAC

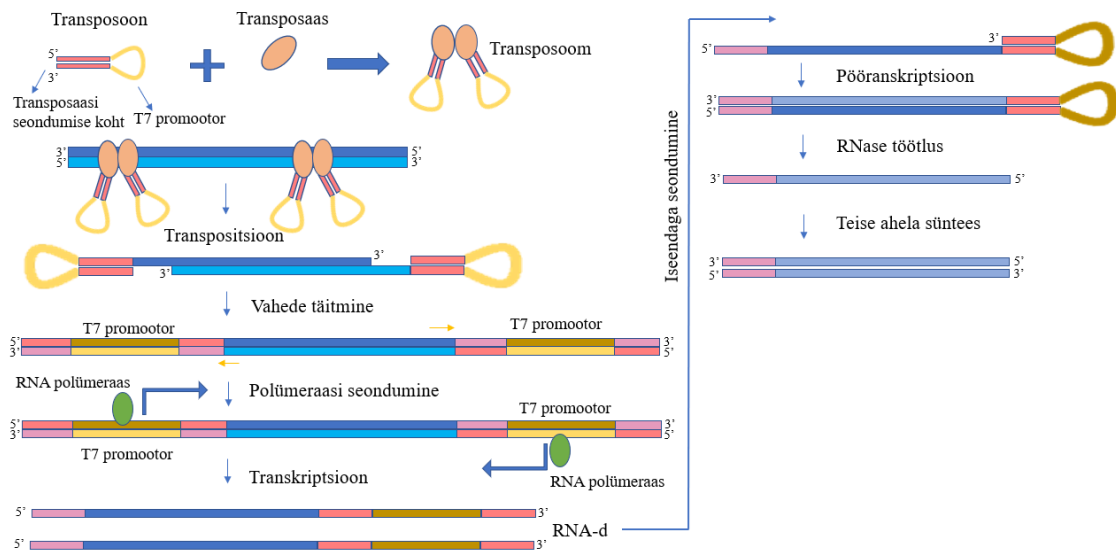
MALBAC meetod publitseeriti 2012. aastal ja see koosneb kahest etapist. Esmalt denatureeritakse kaheaahelaline DNA 94°C juures. Temperatuuri langetamisel algab praimerite paardumine ja ahela pikendamine. Tekivad pool-amplikonid, kus sünteesitud ahelal on 5' otsas MALBAC universaalne järjestus. Edaspidi tekitatakse universaalse praimeriga täis-amplikone, mille tulemusena tekivad 3'ots on täielikult komplementaarne 5' otsale ning tänu sellele tekib aasakujuline DNA-vorm, mis takistab selle pealt jätkata DNA sünteesi. Paljunduse esimeses etapis kasutatakse kahest erinevast praimerist koosnevat segu. Pool-amplikonide tegemiseks kasutatakse primereid, millel ühine osa 5' otsast koosneb kindlast 27 nukleotiidi osast ja 3'otsas on N×8. Iga praimeril lõpus on kolm guaniini (G) või kolm tümiini (T) nukleotiiti. Polümeraasideks sobivad kõrge termostabiilsusega ja ühe DNA ahela eemale lükkamise omadusega (ingl *strand displacement*) ensüümid, nagu näiteks mõned Deep Vent, Bst ning phi29 polümeraasid. MALBAC lähenemise eeliseks peetakse täpsemate ampliconide teket ainult algselt DNA materjalilt, mis vähendab vale-positiivsete ja vale-negatiivsete tulemuste tõenäosust (Joonis 4) (Zong *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2014).



Joonis 4. MALBAC meetod. Meetod koosneb kahest etapist. Esimeses etapis kaheaahelaline DNA denatureeritakse ja seondatakse praimeritega, mis koosnevad 27 kindla järjestusega nukleotiididest ja kaheksast juhuslikust nukleotiidist (N×8). Primerid seonduvad 0°C juures ja ahelate pikendamine viiakse läbi temperatuuri gradiendis 10°C kuni 50°C. Etapi lõpus ahelad denatureeritakse 94°C juures 20 sekundit, tulemuseks on pool-amplikonid. Teise etapi tulemusel tekivad üheaahelalised DNA ahelad ehk täis-amplikonid, mille otstes olevad osad on komplementaarsed. Komplementaarsed osad ühinevad ja tekib aasakujuline DNA struktuur (*looping*). Tsükli korratakse viis korda. Joonis on koostatud Zong jt artiklis avaldatud joonise järgi (Zong *et al.*, 2012).

1.3.2.3. LIANTI

LIANTI on üks uuematest WGA tehnoloogiatest, kus kasutatakse lineaarseid amplifitseerimist transposooni sisestamise abil (Chen *et al.*, 2017). Transposoon on DNA osa, mis võib ühes DNA-molekulis või eri DNA-molekulide vahel vahetada oma positsiooni (Heinaru, 2012 (c)). LIANTI reaktsiooni läbiviimiseks kasutatakse Tn5 transposaasi ensüümi ja meetodis kombineeritakse transposoon, mis sisaldab T7 promootorit ning ensüümi seondumise järjestust, mis kõik koos moodustavad transposoomi kompleksi. Protsessi käigus ühest rakust pärit genoomne DNA juhuslikult fragmenteeritakse transposoomiga ning transposooni osad seonduvad DNA ahelaga. T7 promootoriga märgistatud genoomsed DNA fragmendid lineaarselt amplifitseeritakse ja tekitatakse RNA. Sellele järgneb pöördtranskriptsioon, tekib DNA ning RNase töötuse abil jääb alles üheaahelaline DNA, millele sünteesitakse komplementaarne ahel. LIANTI meetod tõstab amplifikatsiooni stabiilsust ja välistab amplifikatsioonivigade teket, kuna meetodi käigus ei teki mittespetsiifilisi praimerite seondumisi. Meetodil on samuti madal vale-negatiivsete ja valepositiivsete tulemuste osakaal. (Chen *et al.*, 2017; Xi *et al.*, 2017). Puudusteks on sõltumine Tn5 transposasaasist ja protokollide keerukus (Joonis 5) (Khoshkhoo *et al.*, 2021).



Joonis 5. LIANTI meetod. Kaheaahelaline DNA fragmenteeritakse transposoomi kompleksi abil, mis koosneb transposoonist (T7 promootor) ja Tn5 transposaasi ensüümist. Transposooni kaheaahelalised osad denatureeruvad, lineariseeruvad ja DNA polümeraasi abil toimub vahede täitmine. T7 promootorile seondunud RNA polümeraasi abil tekitatakse üheaahelaline RNA. RNA otsad koosnevad komplementaarsetest osadest, mis ühinemisel taastavad T7 promootori aasakujulist olekut. Sellele järgneb pöördtranskriptsioon, üheaahelalisele RNA-le tekitatakse komplementaarne üheaahelaline DNA. RNA lagundatakse kasutades RNase ensüümi, DNA polümeraasi abil toimub DNA komplementaarse ahela süntees. Joonis on koostatud Chen jt artiklis avaldatud joonise järgi (Chen *et al.*, 2017).

1.3.3. Mikrovedeliksüsteemil põhinev amplifitseerimise tehnoloogia

Mikrovedeliksüsteem on tehnoloogia, mille puhul erinevate analüüside jaoks kasutatakse mikrokiipe ja nano- või mikrolitri suuruseid ruumalaseid (Figeys ja Pinto, 2000; Li *et al.*, 2019). Meetodi eeliseks on reagentide väiksem kulu, automatiseeritavus ja lühem analüüsi aeg. Samuti on meetodil kõrgem tundlikkus ja madalam kontaminatsiooni risk (Sposito *et al.*, 2016; Chin *et al.*, 2007). Mikrovedeliksüsteeme kasutatakse biokeemilistes ja molekulaarsetes analüüsides, DNA eraldamises ning ka WGA metoodikas (Dittrich ja Manz, 2006; McDonald *et al.*, 2000; Wainright *et al.*, 2003; Chin *et al.*, 2007). Ruan ja kolleegid 2020. aastal arendasid mikrovedeliksüsteemil põhineva WGA. Meetod integreerib endas peamisi MDA etappe, kasutades vaid nanoliitilisi ruumalaseid ning spetsiaalseid mikrokiipe. Vaatamata suletud süsteemi eelistele, ei täida mikrovedeliksüsteem kõiki WGA nõudeid: mikrotilgad võivad olla ebastabiilsed ja raskesti kontrollitavad, mis suurendab meetodi ebatäpsust ja mõjutab tulemuste korratavust (Wang *et al.*, 2022).

1.4. PGT rakkude transpordi lahused

Olukorras, kus PGT analüüsi labor ei asu embrüo kasvatamise ja biopsia võtmisega samas asutuses, on vaja tagada turvaline biopsiate transport, mille käigus säilib bioloogilise materjali kvaliteet. Biopsia rakkude transportimine ja analüüsi tingimused on reguleeritud ning eeldavad nii embrüo- kui ka PGT-labori koostööd (ESHRE PGT Consortium Steering Committee, 2020). Levinumad lahused rakkude ja erinevate teiste kudede transpordi või hoidmise jaoks on fosfaatpuhverdatud soolalahus ehk PBS (ingl *Phosphate-Buffered Saline*) või DPBS (ingl *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*). PBS koosneb veest, dinaatriumfosfaadist, kaaliumfosfaadist ning naatrium- ja kaaliumkloriidist. Lahuse pH on 7,2-7,6 (Thermo Fisher Scientific, 2023 (a)). PBS lahust kasutatakse rakukultuuri pesemises, rakkude ja koeproovide transportimises ning rakkude lahjendamises enne loendamist. Põhjusel, et PBS on isotooniline ja mittetoksiline ning lahusel on võime tagada intra- ja ekstratsellulaarne osmootne rõhk, on lahus laialt kasutuses (Dulbecco ja Vogt, 1954). Embrüote säilitamisel, enne biopsia võtmist, kasutatakse magneesiumi- ja kaltsiumivaba PBS lahust, sest see teeb biopsia võtmise kergemaks ja kiiremaks ning vähendab rakkude lüüsi ja võimalikku DNA lagunemist *DNaseI* ensüümi poolt (Dumoulin *et al.*, 1998). Samuti on leitud, et kaltsium soodustab rakkude adhesiooni, mis takistaks biopsia võtmist. Lisaks kasutatakse magneesiumi- ja kaltsiumivaba PBS-i rakkude pesemiseks enne Petri tassilt eemaldamist, kuna söötmes olevad metallide ioonid inhibeerivad trüpsiini (Rous ja Jones, 1916).

DPBS lahust kasutatakse erinevates WGA protokollides. DPBS on kasutuses näiteks Illumina SurePlex protokollis, Takara Bio USA PicoPLEX WGA protokollis ja eelpool kirjeldatud MALBAC meetodis (Illumina, 2020; Takara Bio USA, 2023; Xie *et al.*, 2014).

PBS lahus on laialt kasutuses, kuid tähelepanu peab pöörama negatiivsetele mõjufaktoritele edasises WGA etapis. Tay ja kolleegid näitasid, et embrüo biopsiarakkude transpordilahuse ruumala mõjutab WGA tõhusust. Ruumala kuni viis mikrolitrit ei muutnud WGA tõhusust, kuid kaheksa mikrolitrit ja suurem ruumala vähendasid WGA saagikust (Tay *et al.*, 2018). PBS lahust peetakse sobilikuks transpordilahuseks, kuid selle stabiilsus on temperatuurist sõltuv. Uuringud SARS-CoV-2 viirusega näitasid, et 4°C, -20°C ja -80°C juures on PBS stabiilne ja ei mõjuta viiruse analüüsi kvaliteeti 28 päeva jooksul. Seevastu toatemperatuuril langes viiruse tuvastamise kvaliteet seitsme vaadeldud päeva jooksul (Perchetti *et al.*, 2020). Teises uuringus hinnati tüvirakkude transportimise tingimusi erinevatel temperatuuridel ja võrreldi lahuste stabiilsust 6-48 tunni jooksul. Temperatuurideks valiti 4°C, 22°C ja 37°C ning rakkude tiheduseks oli 1×10^7 . Uuringus kasutati erinevaid lahuseid, kaasaarvatud PBS ja soolalahust. Sõltumata temperatuurist ja ruumalast PBS ja soolalahuses olevad rakud hukkusid ligikaudu kaheteistkümne tunni jooksul. Ka teised lahused, nagu K-SFM (ingl *Keratinocyte Serum-Free Medium*), RPMI 1640 (ingl *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*) või α -MEM (ingl *Minimum Essential Medium α*) ei näidanud soovitud tulemusi. DMEM(H) (ingl *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose*) lahus, milles transporditud tüvirakud omasid samasugust elujõulisust nagu värsked tüvirakud, näitas efektiivsemaid tulemusi 4°C juures kaheteistkümne tunni jooksul (Yu *et al.*, 2018). PGT rakkude transpordilahuse optimeerimises ei ole tarvis säilitada rakkude elujõudu, kuid on vaja tagada rakkude genoomse DNA intaktsus ja sobivus edasiseks WGA amplifikatsiooniks. Kokkuvõtvalt peavad transpordilahuse keemilised omadused olema temperatuurist sõltumatud, et tagada rakkude DNA säilimine.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Bakalaureusetöö eesmärk on töötada välja embrüo rakkude transpordilahuse koostis, mis sobiks WGA ja PGT analüüsile. Töö vastab küsimusele, kas KOH või NaOH aluseline lahus saab olla rakkude transpordilahuseks enne ensümaatilisi töötlusi?

Esimene eesmärk on viia läbi taustauuring kasutuses olevate rakkude transpordilahuste, WGA ensüümide ja nende reaktsioonipuhvrite koostistest. Teadmine on oluline, et tagada transpordilahuses optimaalsed tingimused edasistes ensümaatilistes etappides.

Teine eesmärk on võrrelda NaOH ja KOH kui aluselist hüdrolüüsi võimaldavat agenti ja nende lahuste kontsentratsioonide mõju WGA etapis. Võrdluse tulemusel valitakse välja kõige optimaalsemad tingimused WGA reaktsiooniks kahe polümeraasi ensüümiga.

Kolmas eesmärk on valitud transpordilahuse stabiilsuse kontrollimine erinevatel transpordiaegadel WGA tingimustes. Võrdluse tulemusel hinnatakse WGA saagist peale 0-72 tunnist rakkude transporti.

Neljas eesmärk on WGA produktide sekveneerimine ja võrdlemine esialgsete rakkude DNA sekveneerimisega, et hinnata WGA tulemust siin töös kasutatud protokolliga.

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Praimerite disain terve genoomi amplifitseerimiseks

Transpordilahuse efektiivsuse kontrollimiseks kombineeriti WGA protokoll, mis põhines MALBAC ja PEP-PCR meetodi etappidel ning Xie patendil (Xie *et al.*, 2014). Praimerid disainiti MALBAC protokollil alusel, kuid kahe kasutatava järjestuse asemel konstrueeriti neli. Autorid ei hinnanud praimerite omavahelise paardumise tõenäosust kolme 3' otsa nukleotiidi vahel oluliseks. Seetõttu disainiti ja telliti kahe praimeri asemel neli, et tagada ka DNA komplementaarsel ahelal praimerite seondumist ja ahela pikendamist. Disainimisel lisati iga praimeri 3' otsa vastavalt kolm A, G, T või C nukleotiidi ning järgnes kaheksa nukleotiidi pikkune juhuslik järjestus. Kõigil praimeritel oli 5' otsas ühine 27 nukleotiidi pikkune järjestus (Lisa tabel 1, Metabion International AG). Neljast praimerist valmistati segu, kus igaühe kontsentratsioon oli 25 µM.

2.2.2. Rakkude kasvatamine ja ettevalmistus

Inimese endomeetriumi koeproovid olid võetud tervelt naiselt Lõuna-Eesti Haiglas. Analüüs näitas negatiivset tulemust sugulisel teel levivate haigustele, samuti ei tuvastatud endometrioosi ega polütsüstilist munasarjade haigust. Endomeetriumi primaarsed stroomarakud eraldati Külli Samuel poolt (Tervisetehnoloogiate Arenduskeskus AS). Patsientide värbamine ja bioloogilise materjali kasutamine teadusuuringuks on heaks kiidetud Tartu Ülikooli eetilise komitee poolt (No. 302/T-4 ja 330M-8).

Rakke kasvatati 10 cm diameetriga Petri tassil termostaadis (Galaxy 170 S, New Brunswick) 37°C ja 5% CO₂ juures. Kasvusöötmeks kasutati 10 ml DMDM/F-12 (ingl *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*, Corning), kuhu oli lisatud 500 ml kohta 50 ml FBS (ingl *Fetal Bovine Serum*, Gibco) ja 5 ml 100× antibiootikum-antimükootikumi, mis sisaldas 10000 U penitsilliini, 10 mg streptomütsiini ja 25 µg amfotertsin B-d (Gibco). Kasvusöödet vahetati keskmiselt iga kahe-kolme päeva tagant. Rakkude eemaldamiseks tassi pealt kasutati 900 µl trüpsiini (0,25% trüpsiin, 2,21 mM, EDTA, 1× naatrimbikarbonaat, Corning). Analüüsi jaoks rakud koguti 10 ml 1× DPBS-i (Sigma-Aldrich) ja raku suspensiooni säilitati jääl, kuni transportlühisilahusesse viimiseni. Rakkude konfluentsust hinnati Useful Numbers for Cell Culture (2023) tabeli alusel. Katses kasutati rakkude tihedust 5×10²/ml.

2.2.3. Aluseline hüdrolüüs ja neutralisatsioon

Aluseliseks hüdrolüüsiks kasutati 1 M NaOH ja 1 M KOH (mõlemad Sigma-Aldrich). Kummastki 1 M kontsentratsiooniga lahusest valmistati 25 mM, 50 mM, 75 mM ja 100 mM töölahused. Kõiki lahuseid pipeteeriti 8 µl kaupa 8-well 0,2 ml reaktsioonianumatesse (BIOplastics, BV). Lahusele lisati 1 µl eelnevalt valmistatud raku suspensioon DPBS lahuses. Positiivseks kontrolliks kasutati 8 µl deioniseeritud vett ja 8 µl DPBS-i ning lisati samuti 1 µl rakke. Negatiivseks kontrolliks võeti 9 µl deioniseeritud vett.

Neutralisatsioonireaktsiooniks kasutati 1 µl HCl lahjendusi (Sigma-Aldrich). Neutraliseerivad lahjendused olid tehtud 1 M HCl-ist vastavalt aluseliste lahuste kontsentratsioonidele: 200 mM, 400 mM, 600 mM ja 800 mM. Ensüümide Deep Vent ja Large Fragment Bst (mõlemad New England Biolabs) polümeraaside efektiivse töö pH tagamiseks (pH 8,8) lisati samades kontsentratsioonides vastavatesse NaOH või KOH lahjendustesse ka 1 µl Tris-HCl, pH 8,5 (Rockland Immunochemicals). Neutraliseerimisele järgnes rakkude täieliku lüüsimise jaoks 1 µl

Proteinaas K (Qiagen) töötlus, 60°C 20 minutit ja inaktivatsioon 95°C juures 10 minutit. Neutraliseeritud lahuse lõppruumala oli 12 µl.

2.2.4. Terve genoomi amplifikatsioon endomeetriumi strooma rakkudest

Esimene PCR viidi läbi ruumalas 17 µl, mis sisaldas 12 µl rakulüsaati ja 5 µl amplifitseerimise segu. Kasutatud komponentide kontsentratsioonid olid järgmised: 1× ThermoPol Reaction Buffer Large Fragment Bst või Deep Vent polümeraaside jaoks (New England Biolabs), 0,35 mM dNTP segu (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Thermo Fisher Scientific), 3,5 mM MgSO₄ (New England Biolabs), 900 nM iga praimerit (Metabion International AG) ja 0,015 U/µl Bst Large Fragment või Deep Vent DNA polümeraasist. Mõlema ensüümiga viidi läbi erinevad reaktsioonid koos korduskatsetega (Lisa joonis 1 ja 2). Ensümaatiline reaktsioon viidi läbi UNO-Thermoblock termostükleris (Biotron) järgmistel tingimustel. Esialgne denaturatsioon 95°C 2 minutit, millele järgnes 14 tsüklit: 95°C 30 sekundit, praimerite seondumine 15°C kuni 35°C (iga minuti järel temperatuur tõusis 5°C võrra) kokku 5 minutit, 65°C 2 minutit ja 75°C 2 minutit lõplikuks pikendamiseks. Negatiivse kontrolli ruumala oli 17 µl deioniseeritud vett. Amplifitseerimise efektiivsust kontrolliti qPCR-iga (ingl *quantitative Polymerase Chain Reaction*).

2.2.5. Rakkude lüüsimise efektiivsuse kontroll

Lahuste ja Proteinaas K lüüsimise efektiivsuse kontrolliks kasutati võrdlemiseks SurePlex protokollis (Illumina) kasutatavat lüüsilahust ja protokollis esimesi etappe vastavalt tootja protokollile. DNA amplifitseerimine ja analüüs toimusid sarnaselt punktides 2.2.3. ja 2.2.4. kirjeldatud tegevustele.

2.2.6. WGA saagis peale 0 – 72 tunnist rakkude transporti

Peale aluselise hüdrolyüsi lahuste ja polümeraaside võrdluse analüüsi, transpordilahuseks valiti KOH ja WGA reaktsiooniks Large Fragment Bst polümeraas. Transpordilahuse stabiilsuse kontrollimiseks valiti neli ajapunkti: 0, 24, 48 ja 72 tundi, misjärel teostati Proteinaas K töötlus ja neutraliseerimine. Transport viidi läbi muutuvates keskkonnatingimustes ja temperatuur varieerus 4°C kuni 25°C. KOH 1 M kontsentratsiooniga lahusest valmistati lahjendused: 25 mM, 50 mM, 75 mM ja 100 mM. Positiivseks kontrolliks kasutati 8 µl deioniseeritud vett ja 8 µl DPBS-i ning negatiivseks kontrolliks kasutati 9 µl deioniseeritud vett. Lahuste ettevalmistus, rakkude lisamine, lahuste neutralisatsioon, Proteinaas K töötlus ja WGA toimusid sarnaselt punktides 2.2.3. ja 2.2.4. kirjeldatud tegevustele. Katset korrati samadel tingimustel veel ühe korra (Lisa joonis 3).

2.2.7. Reaalaja PCR

Terve genoomi pre-amplifitseeritud PCR produktide paljundamiseks ja fluorestsentsi detekteerimiseks oli viidud läbi qPCR kasutades Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System aparati. Eelnevalt saadud produktide paljundamiseks kasutati universaalset praimerit, mis koosnes 24 nukleotiidist (Lisa tabel 1, Metabion International AG).

Reaktsiooni lahuse lõplik ruumala oli 20 µl, mis sisaldas 4 µl 5× HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX) puhvrit (Solis BioDyne), 1 µl universaalset praimerit (10 µM) ja 1 µl eelnevalt pre-amplifitseeritud PCR produkti. qPCR programm algas polümeraasi aktivatsioonist 95°C 15 minutit, millele järgnes 40 tsüklit: denaturatsioon 95°C 15 sekundit, praimerite seondumine 60°C 30 sekundit ja praimerite pikendamine 72°C 30 sekundit. Lävijoon (ingl *threshold*) ehk tase, kus reaktsioon saavutab taustatasemest kõrgema fluorestsentsi intensiivsuse, oli paigutatud 0,02 peale. Kõiki seitset reaktsiooni analüüsiti qPCR meetodiga kolmes korduses. Efekti hindamiseks analüüsiti samaaegselt ka 10× pre-amplifitseeritud produkti lahjendusi. Negatiivseks kontrolliks kasutati 19 µl qPCR reaktsiooni segu ja 1 µl deioniseeritud vett.

Tulemused analüüsiti Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System tarkvaraga. Kolmes korduses saadud qPCR lävitsükli tulemustest iga katsetingimuse jaoks arvutati keskmine ja 95% usalduspiir ning kanti diagrammidele.

2.2.8. Raamatukogu valmistamine

Sekveneerimiseks valiti 0-72 tunnises katses saadud WGA produktid, kus kasutati 50 mM KOH transpordilahust ja Large Fragment Bst polümeraasi. Valituteks osutusid qPCR põhjal neli kõige efektiivsemat tulemust näidanud proovi, WGA produktid kvantiseeriti Qubit BR kitiga vastavalt tootja protokollile (Qubit Fluoromeeter, Invitrogen) ja lahjendati kontsentratsioonini 1 ng/µl. Raamatukogu valmistamiseks viidi läbi tagmenteerimine ruumalas 50 µl, mis sisaldas 25 µl Tagment DNA puhvrit (Illumina), 5 µl Amplicon Tagment Mix-i (Illumina) ja 15 µl deioniseeritud vett ning 5 µl WGA produkti (1 ng/µl). Segu valmistati 0,2 ml MicroAmp tuubi (Thermo Fisher Scientific). Proovid inkubeeriti UNO-Thermoblock termostükleris 37°C 30 minutit (95°C kaanekuumutusega). Produkt puhastati Gel and PCR Clean-up Kit protokolliga (Macherey-Nagel) ja elueeriti ruumalas 20 µl. Produkt kanti puhtasse 0,2 ml MicroAmp tuubi.

Amplifitseerimise segu iga proovi kohta koosnes 20 µl produktist, 2,5 µl indeksiga praimerist (10 µM) ja 2,5 µl universaalsest praimerist (10 µM) (Metabion International AG, Lisa tabel 1) ja 25 µl 2× High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer (Thermo Fisher Scientific). Mastercycler Nexus

SX1 termotsükler (Eppendorf AG) soojendati 72°C, 98°C kaanekuutusega. Proove inkubeeriti 72°C juures 5 minutit. Seejärel viidi läbi PCR reaktsioon termotsükleris järgmistel tingimustel: denaturatsioon 98°C 10 sekundit, praimerite seondumine 63°C 30 sekundit ning praimerite pikendamine 72°C 10 sekundit. Lõplik pikendamine peale 17 tsüklit toimus 72°C juures 1 minut. PCR produktid puhastati Gel and PCR Clean-up Kit protokolliga ja elueeriti ruumalas 20 µl. Produkti kontsentratsioon mõõdeti Qubit BR kitiga vastavalt tootja protokollile. Kvaliteedi kontrolli ja kvantiseerimise jaoks analüüsiti produkti kasutades Agilent TapeStation 4150 aparati, Agilent 2200 TapeStation süsteemi ja High Sensitivity D1000 ScreenTape'i (Agilent Technologies).

Kvantiseerimise tulemusel segati kõik produktid kokku võrdsel kontsentratsioonil. Tekkinud sekveneerimise raamatukogu analüüsiti Agilent TapeStation 4150 aparaadiga ning Agilent TapeStation 4150 tarkvara abil määrati raamatukogu kontsentratsioon. Raamatukogu sekveneeriti kasutades Illumina NextSeq 500/550 reagente (Illumina). Sekveneerimine viidi läbi Eesti Biokeskuses, Tartus, kasutades NextSeq 500 sekvenaatorit. Tulemuste analüüsis kasutati Maire Peters'i abi (Tervisetehnoloogiarenduskeskus AS) ning Bluefuse Multi tarkvara (Illumina).

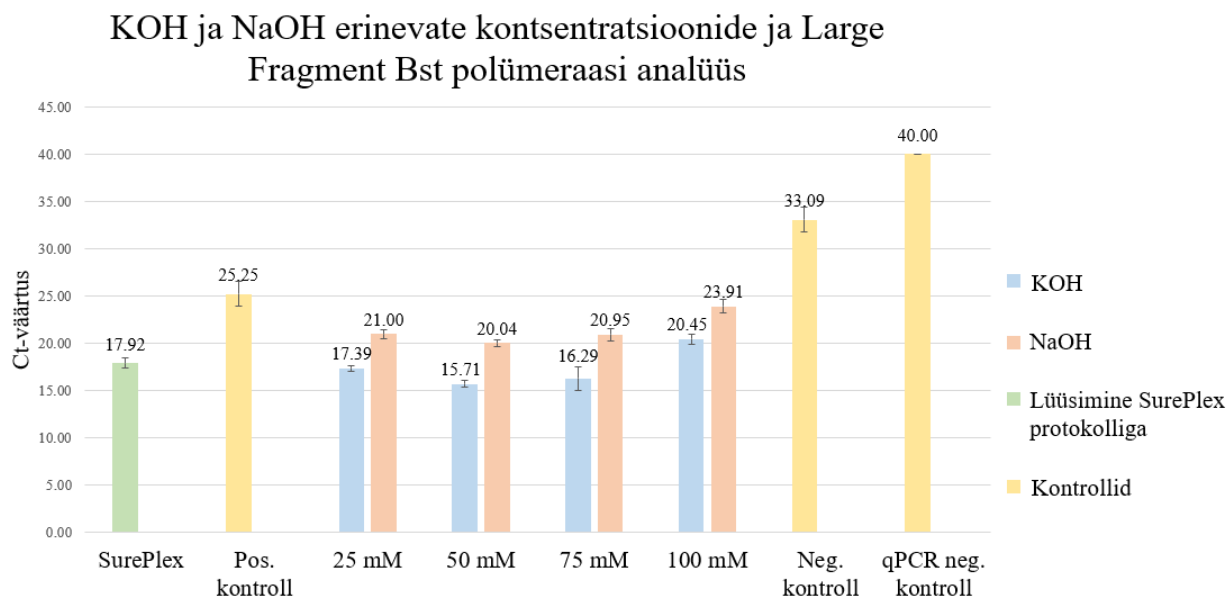
2.2.9. Rakkude DNA eraldamine

Terve genoomi amplifitseerimise sekveneerimistulemuste kontrolliks eraldati primaarsetest endomeetriumi stroomarakkudest genoomne DNA. DNA eraldamiseks kasutati GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit-i vastavalt tootja protokollile ning elueeriti ruumalas 200 µl (Thermo Fisher Scientific). Produktid kvantiseeriti Qubit BR kitiga vastavalt tootja protokollile ja lahjendati kontsentratsioonini 1 ng/µl. Raamatukogu ettevalmistus, kvaliteedikontroll, kvantiseerimine ning sekveneerimine teostati vastavalt punktis 2.2.8. kirjeldatud tegevustele.

2.3. Tulemused

2.3.1. KOH ja NaOH võrdlus Large Fragment Bst polümeraasiga

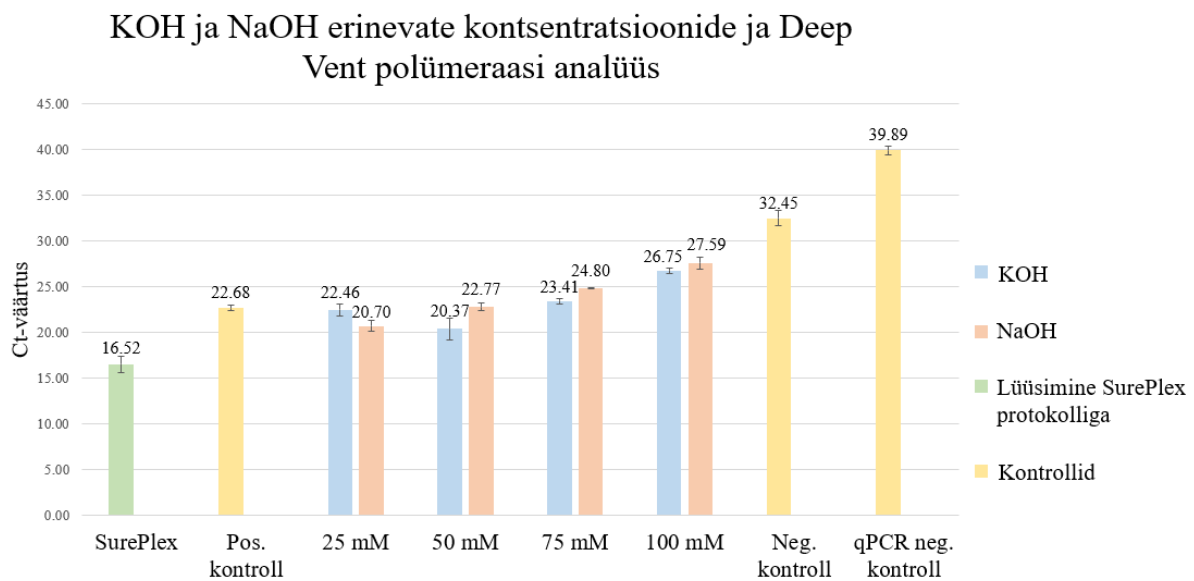
Aluselise hüdrolyüsi efektiivsust hinnati WGA etapi järgselt ja mõõdeti qPCR meetodiga. Tulemustest järeldub, et valitud aluste kontsentratsioonide juures 25-100 mM andis kõigil juhtudel KOH kõrgema saagise ehk madalama Ct-väärtuse võrreldes NaOH lahusega (Joonis 6). Madalaim Ct-väärtus ehk kõrgeim efektiivsus registreeriti 50 mM KOH tingimustes. Kontrolliks kasutatud SurePlex lüüsimise etapp oli samaväärne KOH kontsentratsioonile 25-75 mM, kuid osutus kõigi NaOH kontsentratsioonide puhul efektiivsemaks. Korduskatses saadi sarnane tulemus (Lisa joonis 1). WGA negatiivse kontrolli Ct-väärtus oli 33. Produkti tekkimine kõrgematel Ct-väärtustel oli ootuspärane ja põhjustatud praimerite omavahelisest paardumisest. qPCR negatiivse kontrolli Ct-väärtus oli 40, mis tähendab, et kontaminatsiooni ei tuvastatud (Joonis 6).



Joonis 6. WGA analüüsi tulemused kasutades Large Fragment Bst polümeraasi KOH ja NaOH lahustes. X-teljel on testitud KOH ja NaOH lahused 25-100 mM kontsentratsioonidel ning positiivsed (vasakul) ja negatiivsed kontrollproovid (paremal). Y-teljel on qPCR Ct-väärtused. Igale tulpale on lisatud kolmest kordusest saadud qPCR Ct-väärtuste keskmine ning 95% usalduspiirid. Aluste võrdluses andis KOH madalama Ct-väärtuse ehk kõrgema saagise kõigil neljal kontsentratsioonil. SurePlex positiivne kontroll oli samaväärne KOH lahusega.

2.3.2. KOH ja NaOH võrdlus Deep Vent polümeraasiga

Tulemuste võrdlusest selgus, et WGA etapis valitud aluseliste lahuste kontsentratsioonide korral andis KOH rohkem saagist ehk madalama Ct-väärtuse võrreldes NaOH-ga. Erinevus tuvastati ühel tingimusel, kui kasutati 25 mM aluselisi lahuseid ja NaOH Ct-väärtus detekteeriti kaks tsüklit varem võrreldes KOH lahusega. Kontrolliks kasutatud SurePlex lüüsimise etapp oli efektiivsem võrreldes KOH ja NaOH aluselise hüdrolüüsiga, andes Ct-väärtuse 16,52. WGA negatiivse kontrolli Ct-väärtuseks registreeriti 32,45 ning qPCR negatiivse kontrolli puhul vastavalt 39,89. Viimane tähendab, et kontaminatsiooni ei esinenud (Joonis 7). Korduskatses saadi sarnane tulemus (Lisa joonis 2).

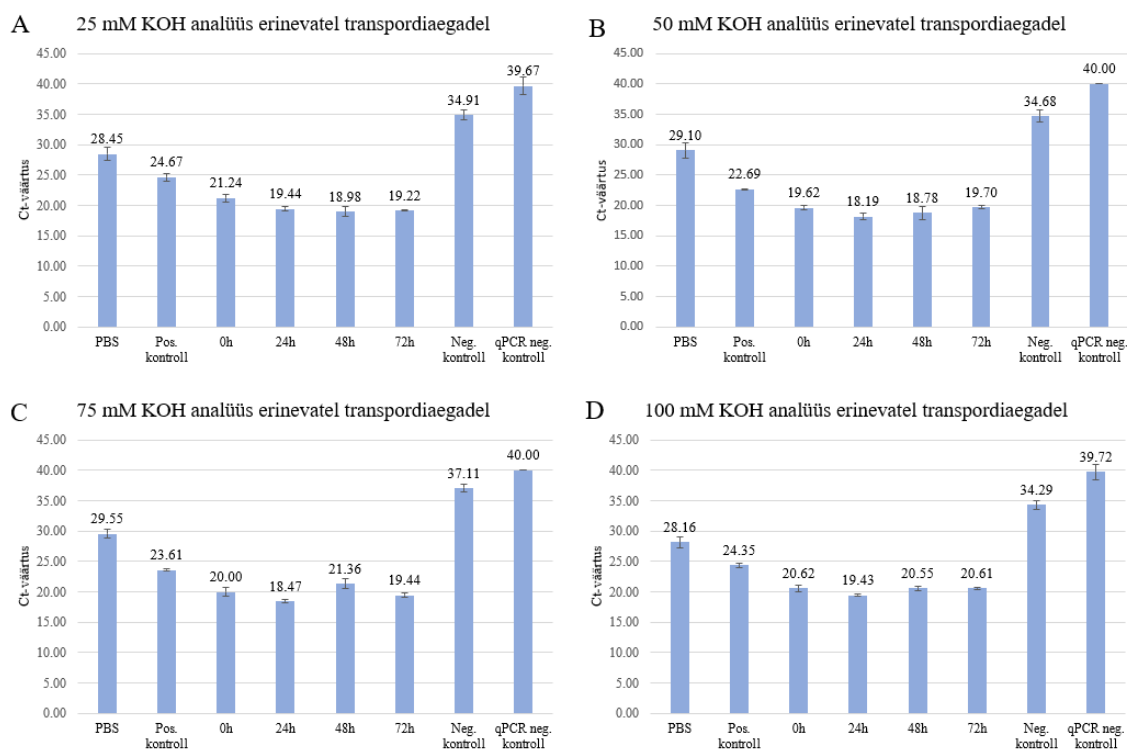


Joonis 7. WGA analüüsi tulemused kasutades Deep Vent polümeraasi KOH ja NaOH lahustes. X-teljel on testitud KOH ja NaOH lahused 25-100 mM kontsentratsioonidel ning positiivsed (vasakul) ja negatiivsed kontrollproovid (paremal). Y-teljel on qPCR Ct-väärtused. Igale tulbale on lisatud kolmest kordusest saadud qPCR Ct-väärtuste keskmine ning 95% usalduspiirid. Analüüsist selgus, et KOH andis madalama Ct-väärtuse kolmel neljast analüüsitud kontsentratsioonist. SurePlex positiivne kontroll osutus efektiivsemaks kui KOH ja NaOH lahused.

2.3.3. Rakkude transpordiaja mõju WGA saagisele

KOH lahusega testiti erinevate transpordiaegade (0, 24, 48 ja 72 h) mõju WGA efektiivsusele. WGA ensüümiks valiti Bst Large Fragment polümeraas ning tulemused kvantiseeriti qPCR meetodiga. Võrdlusesse kaasati neli KOH kontsentratsiooni (25-100 mM) koos erinevate kontrollproovidega (Joonis 8). Tulemustest selgus, et Ct-väärtused neljal mõõdetud transpordiajal

olid samaväärsed. Kõrgeim WGA efektiivsus tuvastati 50 mM KOH tingimustes, fluorestsentsi detekteeriti keskmiselt 19,1 tsükli pealt. Kõrgemad KOH kontsentratsioonid, 75 mM ja 100 mM, tingisid Ct-väärtused vastavalt 19,8 ja 20,3. Positiivne kontroll, kus rakud olid paigutatud DPBS-i, andis kõige kõrgema Ct-väärtuse (28,8). Positiivse kontrolli puhul deioniseeritud veega fluorestsents detekteeriti 5 tsükli varem (23,8). WGA negatiivsete kontrollide Ct-väärtuste keskmine oli 35,3 ning qPCR negatiivse kontrolli proovide keskmine Ct-väärtus oli 39,8. Korduskatse andis sarnast Ct-väärtuste jaotumist (Lisa joonis 3).

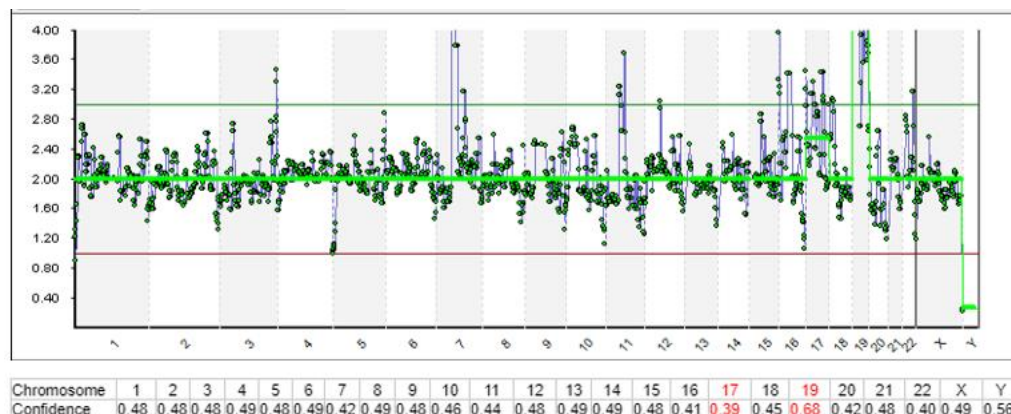


Joonis 8: WGA saagis 25 mM KOH (A), 50 mM KOH (B), 75 mM KOH (C) ja 100 mM KOH (D) peale 0-72 tundi rakkude transpordi. X-teljel on positiivsed kontrollid (vasakul), 0-72 tunnised transpordiajad ja negatiivsed kontrollid (paremal). Y-teljel on qPCR Ct-väärtused. Igale tulbale on lisatud kolmest kordusest saadud qPCR Ct-väärtuste keskmine ning 95% usalduspiirid. Tulemused näitasid, et 25-100 mM KOH lahuses erinevatel transpordiaegadel mõõdetud Ct-väärtused olid samaväärsed. Madalamad Ct-väärtused registreeriti 50 mM KOH juures.

2.3.4. Sekvenerimise tulemused

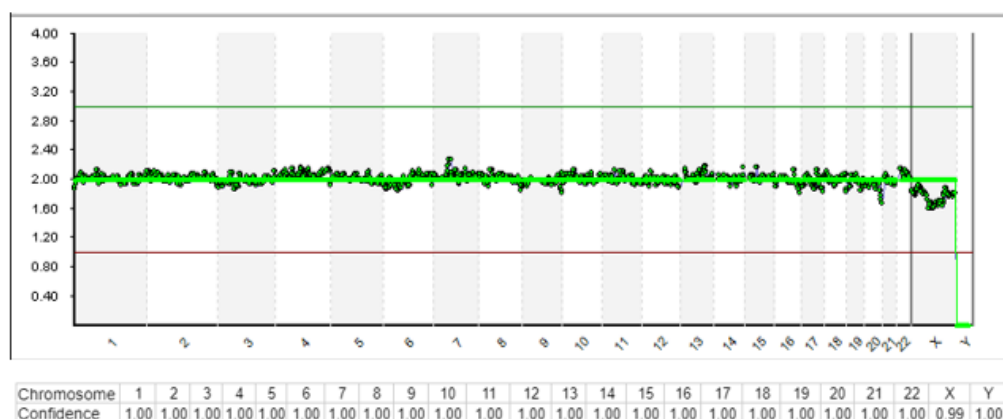
Sekvenerimiseks valiti neli 50 mM KOH WGA produkti erinevatest transpordiaegadest. Tulemustest selgus, et töös kasutatud WGA protokollis saagis katab terve genoomi ehk kõik kromosoomid saavad sekvenerimise lugemeid. Analüüsi tulemus näitas, et rakkudel esineb seitsmeteistkümnenda kromosoomi trisoomia ja üheksateistkümnenda kromosoomi tetrasoomia.

48-tunnises katses, lisaks eelpool nimetatud aneuploidustele, tuvastati ka 22. kromosoomi trisoomia. Bluefuse Multi tarkvaraga leiti kõikidele kromosoomidele katvuse usaldusväärsus, mis varieerus 0,36 kuni 0,77 (Joonis 9 ja Lisa joonis 4). Tulemus üks (1) tähendab maksimaalset usaldusväärsust.



Joonis 9. WGA sekveneerimise tulemused 50 mM KOH transpordilahuses 0-tunni järel. Allpool, tabelina, on märgistatud usaldusväärsused iga kromosoomi tulemuste kohta. Punase värviga on toodud tuvastatud aneuploidsused. X-teljel on kromosoomide arv. Analüüsis tuvastati seitsmeteistkümnenda kromosoomi trisoomia ja üheksateistkümnenda kromosoomi tetrasoomia. Joonis on koostatud Bluefuse Multi programmi abil (Illumina).

WGA sekveneerimise tulemust võrreldi analüüsiks kasutatud endomeetriumi primaarsete stroomarakkudega. Primaarsetest rakkudest eraldatud genoomne DNA sekveneeriti ilma WGA protokollita. Tulemustest selgus, et rakud olid euploidsed ning ei tuvastatud ühtegi kõrvalekallet. Iga kromosoomi tulemuse usaldusväärsus varieerus 0,99 kuni 1,0 (Joonis 10 ja Lisa joonis 5).



Joonis 10. Primaarsete endomeetriumi strooma rakkude sekveneerimise tulemused. Allpool, tabelina, on toodud usaldusväärsused iga kromosoomi tulemuste kohta. X-teljel on kromosoomide arv. Analüüsis ei tuvastatud ühtegi kromosomaalset kõrvalekallet. Joonis on koostatud Bluefuse Multi programmi abil (Illumina).

2.2. Arutelu

Käesolevas töös kasutati embrüo trofektodermi rakkude asemel terve inimese endomeetriumi koeproove ja primaarseid rakke. Kui PGT analüüsis kasutatakse viis kuni kümme embrüo trofektodermi rakke, siis siin oli rakkude kogus hinnanguliselt 5×10^2 /ml rakku ühe katsetingimuse kohta. Suurem rakkude kogus valiti põhjusel, et see vähendab optimeerimise katsetes juhuslikku varieeruvust. Edaspidi tuleks kontrollida lahuste ja kontsentratsioonide mõju WGA-le ka väiksema ehk kontrollitud rakkude kogusega ning lõpuks ka embrüo trofektodermi rakkudega, et kinnitada töös saadud tulemusi.

Töö eesmärgi täitmiseks kombineeriti aluseline hüdrolüüs koos Proteinaas K ensümaatilise töötlusega. Tulemusi kõrvutati kommertsiaalse SurePlex protokolliga, mille põhjal saab järeldada, et SurePlex meetodis kasutatud reagentid ja lüüsimine on üldiselt efektiivsem kui töös kasutatud meetodid. SurePlex meetodit ei olnud võimalik võrrelda transpordikatses, kuna SurePlex protokoll on mõeldud vaid värskest kogutud rakkude analüüsiks (Illumina, 2023). Siit ilmneb võrdluskatsete kitsaskoht, sest kõigile seatud tingimustele ei olnud alati võimalik leida võrdluspunkti ning puudus referents. Järeldame, et töös kirjeldatud rakkude lüüsimise meetod ja valkude eemaldamine Proteinaas K ensüümiga on vähenõudlik ja stabiilne protokoll, mille järgselt on võimalik läbi viia WGA reaktsiooni. Küll aga vajavad testitud tingimused edasist optimeerimist, et ühtlustada terve genoomi amplifikatsioon ning vältida vale-positiivsete tulemuste esinemist.

WGA sekveneerimistulemustest selgus, et siinses töös loodud terve genoomi amplifitseerimine annab vale-positiivseid tulemusi. Pekingi ülikooli teadlased võrdlesid 2015. aastal Sigma Aldrich DOP-PCR, Qiageni MDA, General Electric MDA, Rubicon ja Yikon Genomics MALBAC ja Rubicon Genomics MALBAC-i laadset meetodit. Kuigi need meetodid on laialdaselt kasutuses, siis igas meetodis oli kas kõrge vale-positiivsete tulemuste määr või esines üle- või alaesindatud genoomseid regioone. Sellised kitsaskohad võivad tuleneda PCR reaktsioonis ebaspetsiifiliste praimerite seondumise tõttu või korduvate DNA osade ülepaljundamise pärast. Seetõttu võib muutuda ka kromosoomide katvus või lugemite arv sekveneerimisel (Huang *et al.*, 2015). Viimast kinnitavad Harvardi Ülikooli (USA) teadlased, mis oma 2012. aasta analüüsist tegid järelduse, et vale-positiivsed tulemused on süstemaatilised sekveneerimise ja amplifitseerimise vead. Ka DOP-PCR arendajad puutusid kokku kirjeldatud probleemidega (Zong *et al.*, 2012; Cheung ja Nelson, 1996).

Töös kasutatud WGA protokoll põhines Xie (2014) patendi kirjeldusel. Terve genoomi amplifitseerimist võis mõjutada polümeraaside valik, kuna Large Fragment Bst polümeraas ei oma vigade parandamise aktiivsust. Seevastu Deep Vent ensüüm on 3'-5' eksonukleaaase aktiivsusega (New England Biolabs). Töös võrreldi küll kahte polümeraasi, kuid WGA-protokolli optimeerimiseks oleks parim kontrollida ka teisi ensüüme või koguni nende segusid. Samuti võisid WGA tulemusi mõjutada valitud praimerid, sest PCR põhiste meetodite efektiivsus on tingitud praimerite kontsentratsioonist, nukleotiidilisest järjestusest ja võimalikust praimerite-dupleksite tekkest (Thermo Fisher Scientific, 2023 (b); Blagodatskikh *et al.*, 2017). Töös loodud WGA protokollis andis suurimat saagist Large Fragment Bst polümeraas, kuid on näidatud, et ka Deep Vent polümeraasiga on võimalik teha edukalt WGA etappi. Uurimistöös terve genoomi pre-amplifitseeritud PCR produktide paljundamiseks ja fluorestsentsi detekteerimiseks rakendati reaaljaja PCR-i ehk qPCR meetodikat. qPCR analüüs annab teadmisi, mis PCR tsüklil fluorestsentsisignaali tugevus ületab läviväärtuse ehk hindab terve genoomi amplifitseerimise produkti teket. Selline analüüs on sobilik pigem transpordilahuse kontsentratsioonide võrdlemiseks kui polümeraaside analüüsiks. Ensüümide valikul peaks lähtuma aga sekveneerimise tulemustest. Samuti peaks praimerite optimeerimise viima läbi sekveneerimise tulemuste põhjal. Meie oma töös ei võrrelnud sekveneerimise tulemusi kahe ensüümi vahel. Seega puudub läbiviidud katsete põhjal lõppvõrdluse võimalus. Olemasolev võrdlus Illumina SurePlex protokolliga, mida kasutatakse PGT-A rutiinses teenuses Tervisetehnoloogiarenduskeskuses, näitab, et embrüo trofektodermi kolme kuni viie raku WGA katab kogu genoomi ühtlaselt ja vale-positiivsete tulemusteta (Lisa joonis 6).

Antud uurimistöös andis väärtuslikke teadmisi aluselise hüdroloüüsi rakendamise rakkude transpordis. Töö vastas osaliselt seatud eesmärkidele ning tulemuste põhjal potentsiaalseks rakkude transpordilahuseks enne ensümaatilisi töötusi võiks olla 50 mM KOH aluseline lahus. WGA protokollis ning selles kasutatavate ensüümide ja praimerite valikut tuleb täiendavalt optimeerida, et tagada ühtlane genoomi amplifitseerimine ning vältida vale-positiivsete tulemuste esinemist.

Kokkuvõte

Töö eesmärk oli selgitada välja aluselise hüdrolyüsi kasutusvõimalus embrüo rakkude transpordilahusena WGA ja PGT sarnastes tingimustes. Töös kasutati inimese endomeetriumi primaarseid rakke, mis saadi teadusuuringuks Lõuna-Eesti Haiglast.

Bakalaureusetöö esimene eesmärk oli viia läbi taustauuring kasutuses olevate rakkude transpordilahuste, WGA ensüümide ja nende reaktsioonipuhvrite koostisest. Kirjanduse ülevaate põhjal valiti NaOH ja KOH kui potentsiaalsed aluselised lahused. Võrdluseks valiti DPBS puhver. MALBAC WGA protokollis alusel valiti ensüümide võrdlusesse Deep Vent ja Large Fragment Bst, mille efektiivsust testiti töös loodud WGA protokollis tingimustega. Lahuste mõju ja WGA efektiivsuse võrdlemiseks kasutati qPCR metoodikat. Tulemused näitasid, et terve genoomi amplifikatsioon andis suuremat saagist Large Fragment Bst polümeraas. Lisaks kontrolliti aluselise hüdrolyüsi ja Proteinaas K töötuse efektiivsust võrreldes kommertsiaalselt kasutuses oleva SurePlex protokollis kirjeldatud rakkude lüüsimisetapiga. Selgus, et SurePlex meetodis kasutatud reagentid tagavad suurema saagise võrreldes töös loodud tingimustega.

Teine eesmärk oli võrrelda NaOH ja KOH kui aluselist hüdrolyüsi võimaldavat agendi ja võrrelda nende lahuste kontsentratsioonide mõju WGA etapis. Aluste mõju võrdlemiseks kasutati qPCR metoodikat. Tulemused näitasid, et KOH ja NaOH lahused tagavad DNA intaksuse ja sobivuse edasiseks WGA amplifikatsiooniks. Andmete põhjal toimus KOH aluseline hüdrolyüs efektiivsemalt kui NaOH ning optimaalne KOH kontsentratsioon on 50 mM.

Kolmas eesmärk oli KOH lahuse stabiilsuse kontrollimine erinevatel transpordiaegadel (null kuni 72 tundi) WGA tingimustes. Aja mõju hindamiseks kasutati qPCR metoodikat. Tulemustest selgus, et KOH lahuste lahjendused on stabiilsed testitud ajapunktides, KOH lahuse mõju rakkudele ei sõltu temperatuurist ega mõjuta WGA saagikust. Tulemuste põhjal oli kõrgeim WGA efektiivsus 50 mM KOH tingimustes, kuid ka 25 mM, 75 mM ja 100 mM KOH lahused olid samaväärsed ehk võivad olla potentsiaalseteks lahusteks rakkude transpordis.

Neljas eesmärk oli valitud tingimustes loodud WGA produkti DNA sekveneerimine ja võrdlemine algsete rakkudega, kus ei olnud vahepealset WGA protokollis rakendatud. Tulemuste võrdlemisel ilmnes, et 50 mM KOH transpordilahus, järgnev neutraliseerimine, Proteinaas K töötus ja ensümaatiline WGA reaktsioon andis mitte-kokkulangevaid tulemusi võrreldes rakkude

kariotüübiga. Rakkude transpordilahus koos genoomi paljundamisega on terviklik protsess, mis vajab paremate tulemuste saamiseks edasist optimeerimist.

Töö tulemuste põhjal võib järeldada, et 50 mM KOH lahus on rakkude transpordiks stabiilne ning säilitab tõenäoliselt DNA intaktsuse. Aluselist KOH lahust saab neutraliseerida sobivaks järgnevateks ensümaatilisteks etappideks. Aluselist hüdrolüüsi tagav 50 mM KOH lahus on potentsiaalne kandidaat embrüo trofektodermi rakkude transpordilahuseks PGT analüüsi jaoks. Töö tulemusel selgus, et valitud transpordilahuse ja WGA tingimused üheskoos vajavad edasist optimeerimist, et vältida vale-positiivseid ja -negatiivseid tulemusi sekveneerimise etapis.

Summary

Optimizing Cell Transport Solution for Whole Genome Amplification

Diana Lanevskaja

Resümee / Summary

Infertility is a common problem affecting approximately 15% of couples worldwide. It can affect both men and women due to various factors, including health conditions and lifestyle choices. Delayed childbearing is a significant contributing factor, driven by factors such as higher education, financial instability, and career pursuits. Treatment options include surgery, hormone therapy, and *in vitro* fertilization (IVF), which often involves Preimplantation Genetic Testing (PGT). PGT is a genetic testing method used to assess the viability of embryos before implantation. PGT can identify monogenic disorders, structural chromosomal rearrangements, and aneuploidy. Prior to PGT analysis, Whole Genome Amplification (WGA) is necessary to obtain sufficient genetic material from the limited number of cells available after biopsy. WGA requires a specialized laboratory and personnel. As there may be a need to transport the biopsy to another laboratory, the transport solution should be easily prepared, should be stable, and not affect the subsequent WGA results.

The aim of this bachelor's thesis was to investigate the potential use of alkaline hydrolysis as a transport solution for embryo cells under conditions similar to WGA and PGT. Human endometrial primary cells obtained from the South Estonian Hospital were used in the study.

The first objective was to analyze existing cell transport solutions, WGA enzymes, and reaction buffers. Based on literature review, NaOH and KOH were chosen as potential alkaline solutions, and DPBS buffer served as a comparison. In terms of WGA enzymes, the study compared the efficiency of Deep Vent and Large Fragment Bst polymerases based on the MALBAC WGA protocol. The effectiveness of these enzymes was evaluated using qPCR methodology, and it was found that Large Fragment Bst polymerase yielded higher amplification of the entire genome.

The second objective focused on comparing the effects of NaOH and KOH as alkaline hydrolysis agents during the WGA stage. It was determined that both KOH and NaOH solutions maintained DNA integrity and were suitable for subsequent WGA amplification. However, KOH demonstrated greater efficiency compared to NaOH, with an optimal concentration of 50 mM.

The third objective assessed the stability of KOH solution for cell transport over different time intervals (0 to 72 hours) under WGA conditions. It was found that the dilutions of KOH solutions remained stable, and neither temperature nor transport time affected WGA yield. Although 25 mM, 75 mM, and 100 mM KOH solutions also showed comparable results, indicating their potential as transport solutions for cells.

The fourth objective involved sequencing and comparing the DNA products of WGA with the initial cells that did not undergo the WGA protocol. Discrepancies were observed between the karyotype of cells and the outcomes obtained through the 50 mM KOH transport solution, subsequent neutralization, Proteinase K treatment, and enzymatic WGA reaction. This suggests that the process of cell transport solution with genome amplification is a complex process that requires further optimization for improved results.

In conclusion, the study highlighted the stability and DNA preservation potential of a 50 mM KOH solution as a transport medium for embryo cells. However, further optimization is needed to improve the results and avoid false-positive and false-negative outcomes in the sequencing stage.

Tänuõnad

Soovin väljendada sügavat tänu ja siirast tunnustust minu bakalaureusetöö juhendajale, Kaarel Krjutškovile, tema hindamatu panuse eest. Tema professionaalsus ja toetus on olnud hindamatu väärtusega kogu töö valmimise protsessi vältel. Lisaks avaldan suurt tänu oma kaasjuhendajale Lilian Kadaja-Saarepuule. Ta on andnud mulle väärtuslikke soovitusi ja tähelepanekuid bakalaureusetöö kirjutamisel.

Samuti soovin tänada kõiki Tervisetehnoloogiate Arenduskeskuse töötajaid. Nad võtsid mind vastu sooja vastuvõtuga ja olid toeks kogu töö kirjutamise vältel. Olen äärmiselt tänulik, et olen saanud teha koostööd erinevate valdkondade spetsialistidega ning õppida nende teadmistest ja kogemustest.

Eriti soovin avaldada suurt tänu Külli Samuelile tema hindamatu panuse eest minu bakalaureusetöösse. Tema osalus rakkude eraldamisel, rakkudega töötamise väljaõppel ja sellega seotud tegevustes on olnud olulise tähtsusega minu uurimistöö edukusele. Lisaks soovin tänada Maire Petersit tema väärtusliku panuse eest sekveneerimistulemuste analüüsimisel. Tema abi andmete tõlgendamisel ja järelduste tegemisel on olnud olulise väärtusega.

Soovin väljendada sügavat tänu Tatjana Kodasele tema panuse eest minu bakalaureusetöö keelilise korrektsuse kontrollimisel. Tema tähelepanelikkus, keeleoskus ja professionaalsus on olnud hindamatuks ressursiks minu uurimistööle. Tema parandused on aidanud mul tagada, et minu töö oleks grammatiliselt korrektne, selge ja arusaadav.

Täna ka minu peret ja sõpru, kelle mõistmine, julgustus ja moraalne tugi on olnud oluliseks jõuallikaks kogu protsessi vältel. Nende usk minu võimesse on aidanud mul läbida väljakutseid ning jääda keskendunuks oma tööle. Olen äärmiselt tänulik, et nad on olnud minu kõrval selle teekonna jooksul!

Kirjanduse leotelu

Adamson, G. D., & Baker, V. L. (2003). Subfertility: causes, treatment and outcome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 17(2), 169-185.

Ageno, M., Dore, E., & Frontali, C. (1969). The alkaline denaturation of DNA. *Biophysical journal*, 9(11), 1281-1311.

American Society for Reproductive Medicine (ASRM) (2017). Infertility: An Overview. A Guide for Patients. 10, 14.

Atkins, P., Jones, L., & Laverman, L. (2021) *Keemia alused*. Tartu: Tartu Ülikool. 574, 994.

Blagodatskikh, K. A., Kramarov, V. M., Barsova, E. V., Garkovenko, A. V., Shcherbo, D. S., Shelenkov, A. A., ... & Ignatov, K. B. (2017). Improved DOP-PCR (iDOP-PCR): A robust and simple WGA method for efficient amplification of low copy number genomic DNA. *PLoS One*, 12(9), e0184507.

Carson, S. A., & Kallen, A. N. (2021). Diagnosis and management of infertility: a review. *Jama*, 326(1), 65-76.

Carter, N. P., Bebb, C. E., Nordenskjo, M., Ponder, B. A., & Tunnacliffe, A. (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13(3), 718-725.

Chen, C., Xing, D., Tan, L., Li, H., Zhou, G., Huang, L., & Xie, X. S. (2017). Single-cell whole-genome analyses by Linear Amplification via Transposon Insertion (LIANTI). *Science*, 356(6334), 189-194.

Cheung, V. G., & Nelson, S. F. (1996). Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14676-14679.

Chin, C. D., Linder, V., & Sia, S. K. (2007). Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities. *Lab on a Chip*, 7(1), 41-57.

Churikov, A. V., Zapsis, K. V., Khramkov, V. V., Churikov, M. A., & Gamayunova, I. M. (2011). Temperature-induced transformation of the phase diagrams of ternary systems NaBO₂+ NaOH+ H₂O and KBO₂+ KOH+ H₂O. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 56(3), 383-389.

Clarke, V. E., & Hammarberg, K. (2005). Reasons for delaying childbearing: a survey of women aged over 35 years seeking assisted reproductive technology. *Australian family physician*, 34(3).

Coutelle, C., Williams, C., Handyside, A., Hardy, K., Winston, R., & Williamson, R. (1989). Genetic analysis of DNA from single human oocytes: a model for preimplantation diagnosis of cystic fibrosis. *British Medical Journal*, 299(6690), 22-24

Cunningham, J. (2017). Infertility: A primer for primary care providers. *Journal of the American Academy of PAs*, 30(9), 19-25.

- De Rycke, M., & Berckmoes, V. (2020). Preimplantation genetic testing for monogenic disorders. *Genes*, *11*(8), 871
- Dean, F. B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A. F., Bray-Ward, P., ... & Lasken, R. S. (2002). Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(8), 5261-5266.
- Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L., & Lasken, R. S. (2001). Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi29 DNA polymerase and multiply primed rolling circle amplification. *Genome research*, *11*(6), 1095-1099.
- Demko, Z. P., Simon, A. L., McCoy, R. C., Petrov, D. A., & Rabinowitz, M. (2016). Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism-based preimplantation genetic screening. *Fertility and sterility*, *105*(5), 1307-1313
- Dittrich, P. S., & Manz, A. (2006). Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, *5*(3), 210-218.
- Duan, R., Lou, X., & Xia, F. (2016). The development of nanostructure assisted isothermal amplification in biosensors. *Chemical Society Reviews*, *45*(6), 1738-1749.
- Dulbecco, R., & Vogt, M. (1954). Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *The Journal of experimental medicine*, *99*(2), 167-182.
- Dumoulin, J. C., Bras, M., Coonen, E., Dreesen, J., Geraedts, J. P., & Evers, J. L. (1998). Effect of Ca²⁺/Mg²⁺-free medium on the biopsy procedure for preimplantation genetic diagnosis and further development of human embryos. *Human reproduction (Oxford, England)*, *13*(10), 2880-2883.
- ESHRE PGT Consortium Steering Committee, Carvalho, F., Coonen, E., Goossens, V., Kokkali, G., Rubio, C., ... & De Rycke, M. (2020). ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT. *Human reproduction open*, *2020*(3), hoaa021.
- Figeys, D., & Pinto, D. (2000). Lab-on-a-chip: a revolution in biological and medical sciences
- Genetic Alliance (2010); District of Columbia Department of Health. Understanding Genetics: A District of Columbia Guide for Patients and Health Professionals. Washington (DC): Genetic Alliance; Appendix H, Chromosomal Abnormalities.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Long and accurate polymerase chain reaction (LA PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, *2019*(3), pdb-prot095158.
- Grothues, D., Cantor, C. R., & Smith, C. L. (1993). PCR amplification of megabase DNA with tagged random primers (T-PCR). *Nucleic acids research*, *21*(5), 1321.
- Handyside, A. H., Kontogianni, E. H., Hardy, K. R. M. L., & Winston, R. M. (1990). Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, *344*(6268), 768-770.
- Handyside, A. H., Robinson, M. D., Simpson, R. J., Omar, M. B., Shaw, M. A., Grudzinkas, J. G., & Rutherford, A. (2004). Isothermal whole genome amplification from single and small numbers

of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Molecular human reproduction*, 10(10), 767-772.

Hassold, T., & Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics*, 2(4), 280-291.

Hassold, T., Chen, N., Funkhouser, J., Jooss, T., Manuel, B., Matsuura, J., ... & Jacobs, P. A. (1980). A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Annals of human genetics*, 44(2), 151-164

Hausmann, J. N., Traynor, B., Myers, R. J., Driess, M., & Menezes, P. W. (2021). The pH of aqueous NaOH/KOH solutions: a critical and non-trivial parameter for electrocatalysis. *ACS Energy Letters*, 6(10), 3567-3571.

He, F., Zhou, W., Cai, R., Yan, T., & Xu, X. (2018). Systematic assessment of the performance of whole-genome amplification for SNP/CNV detection and β -thalassemia genotyping. *Journal of Human Genetics*, 63(4), 407-416.

Heinaru, A. (2012) (a). *Geneetika õpik kõrgkoolile*. Tartu: Tartu Ülikool. Lk 132.

Heinaru, A. (2012) (b). *Geneetika õpik kõrgkoolile*. Tartu: Tartu Ülikool. Lk 134-138.

Heinaru, A. (2012) (c). *Geneetika õpik kõrgkoolile*. Tartu: Tartu Ülikool. Lk 1085.

Hook, E. B., Cross, P. K., & Schreinemachers, D. M. (1983). Chromosomal abnormality rates at amniocentesis and in live-born infants. *Jama*, 249(15), 2034-2038.

Hosono, S., Faruqi, A. F., Dean, F. B., Du, Y., Sun, Z., Wu, X., ... & Lasken, R. S. (2003). Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. *Genome research*, 13(5), 954-964.

Hou, Y., Fan, W., Yan, L., Li, R., Lian, Y., Huang, J., ... & Qiao, J. (2013). Genome analyses of single human oocytes. *Cell*, 155(7), 1492-1506.

Huang, L., Ma, F., Chapman, A., Lu, S., & Xie, X. S. (2015). Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications. *Annual review of genomics and human genetics*, 16, 79-102.

Kauppara, A., Nikkola O. (1997). *Sünnitusabi ja günekoloogia*. Tallinn: Medicina.

Kaye, G. I., Weber, P. B., Evans, A., & Venezia, R. A. (1998). Efficacy of alkaline hydrolysis as an alternative method for treatment and disposal of infectious animal waste. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 37(3), 43-46.

Khoshkoo, S., Lal, D., & Walsh, C. A. (2021). Application of single cell genomics to focal epilepsies: A call to action. *Brain Pathology*, 31(4), e12958.

Kuliev, A. (2012). *Practical preimplantation genetic diagnosis*. Springer Science & Business Media.

Kuliev, A., & Verlinsky, Y. (2005). Preimplantation diagnosis: a realistic option for assisted reproduction and genetic practice. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 17(2), 179-183

Kumar, S., & Ram, B. (2019). The shelf-life study of 0.1 M Sodium hydroxide volumetric solution at different condition for analytical purpose in Laboratory. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(4-s), 957-960.

Lasken, R. S. (2009). Genomic DNA amplification by the multiple displacement amplification (MDA) method. *Biochemical Society Transactions*, 37(2), 450-453.

Levy, B., Sigurjonsson, S., Pettersen, B., Maisenbacher, M. K., Hall, M. P., Demko, Z., ... & Rabinowitz, M. (2014). Genomic imbalance in products of conception: single-nucleotide polymorphism chromosomal microarray analysis. *Obstetrics & Gynecology*, 124(2 PART 1), 202-209

Li, Z., Zhao, J., Wu, X., Zhu, C., Liu, Y., Wang, A., ... & Zhu, L. (2019). A rapid microfluidic platform with real-time fluorescence detection system for molecular diagnosis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 223-230

Masoumi, S. Z., Parsa, P., Darvish, N., Mokhtari, S., Yavangi, M., & Roshanaei, G. (2015). An epidemiologic survey on the causes of infertility in patients referred to infertility center in Fatemeh Hospital in Hamadan. *Iranian journal of reproductive medicine*, 13(8), 513.

McDonald, J. C., Duffy, D. C., Anderson, J. R., Chiu, D. T., Wu, H., Schueller, O. J., & Whitesides, G. M. (2000). Fabrication of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 21(1), 27-40.

Mills, M., Rindfuss, R. R., McDonald, P., & Te Velde, E. (2011). Why do people postpone parenthood? Reasons and social policy incentives. *Human reproduction update*, 17(6), 848-860.

Mueller, P. R., & Wold, B. (1989). In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science*, 246(4931), 780-786.

Munné, S., Lee, A., Rosenwaks, Z., Grifo, J., & Cohen, J. (1993). Fertilization and early embryology: Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Human reproduction*, 8(12), 2185-2191

O'Neil, M. J., Smith, A., & Heckelman, P. E. (2006). The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals; Merck and Co. Inc.: *Whitehouse Station, NJ, USA*, 1420, 1485.

Peng, W., Takabayashi, H., & Ikawa, K. (2007). Whole genome amplification from single cells in preimplantation genetic diagnosis and prenatal diagnosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 131(1), 13-20.

Penzias, A., Bendikson, K., Butts, S., Coutifaris, C., Falcone, T., Fossum, G., ... & Widra, E. (2018). The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion. *Fertility and Sterility*, 109(3), 429-436.

Perchetti, G. A., Huang, M. L., Peddu, V., Jerome, K. R., & Greninger, A. L. (2020). Stability of SARS-CoV-2 in phosphate-buffered saline for molecular detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(8), e01094-20.

Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology (PCSART), & Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (PCASRM). (2008).

Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion. *Fertility and Sterility*, 90(5), S136-S143.

Punab, M., Poolamets, O., Paju, P., Vihljajev, V., Pomm, K., Ladva, R., ... & Laan, M. (2017). Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Human reproduction*, 32(1), 18-31.

Raymo, J. M., Park, H., Xie, Y., & Yeung, W. J. J. (2015). Marriage and family in East Asia: Continuity and change. *Annual Review of Sociology*, 41, 471-492.

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*, 17(5), 405-423

Roost, A. M., Reimand, T., & Krjutškov, K. (2016). Sünnieelne mitteinvasiivne geneetiline sõeluuring-võidukäik ja puudujäägid. *Eesti Arst*.

Rous, P., & Jones, F. S. (1916). A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells. *The Journal of experimental medicine*, 23(4), 549-555.

Ruan, Q., Ruan, W., Lin, X., Wang, Y., Zou, F., Zhou, L., ... & Yang, C. (2020). Digital-WGS: Automated, highly efficient whole-genome sequencing of single cells by digital microfluidics. *Science advances*, 6(50), eabd6454.

Scott Jr, R. T., Upham, K. M., Forman, E. J., Zhao, T., & Treff, N. R. (2013). Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertility and sterility*, 100(3), 624-630.

Scriven, P. N. (2022). Combining PGT-A with PGT-M risks trying to do too much. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(9), 2015-2018.

Shi, W. H., Jiang, Z. R., Zhou, Z. Y., Ye, M. J., Qin, N. X., Huang, H. F., ... & Xu, C. M. (2021). Different strategies of preimplantation genetic testing for aneuploidies in women of advanced maternal age: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical medicine*, 10(17), 3895

Shin, S., & Day, L. A. (1995). Separation and size determination of circular and linear single-stranded DNAs by alkaline agarose gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 226(2), 202-206.

Somigliana, E., Busnelli, A., Paffoni, A., Vigano, P., Riccaboni, A., Rubio, C., & Capalbo, A. (2019). Cost-effectiveness of preimplantation genetic testing for aneuploidies. *Fertility and Sterility*, 111(6), 1169-1176

Spits, C., Le Caignec, C., De Rycke, M., Van Haute, L., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., & Sermon, K. (2006). Whole-genome multiple displacement amplification from single cells. *Nature protocols*, 1(4), 1965-1970.

Sposito, A., Hoang, V., & DeVoe, D. L. (2016). Rapid real-time PCR and high resolution melt analysis in a self-filling thermoplastic chip. *Lab on a Chip*, 16(18), 3524-3531.

- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., De Mouzon, J., Sokol, R., ... & Van Der Poel, S. (2017). The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Human reproduction*, 32(9), 1786-1801
- Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R., Navidi, W., & Arnheim, N. (1992). Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(13), 5847-5851.
- Zhang, S., Tan, K., Gong, F., Gu, Y., Tan, Y., Lu, C., ... & Lin, G. (2014). Blastocysts can be rebiopsied for preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertility and sterility*, 102(6), 1641-1645
- Zong, C., Lu, S., Chapman, A. R., & Xie, X. S. (2012). Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*, 338(6114), 1622-1626.
- Tay, L., Jasper, M. J., & Warren, K. A. (2018). Embryo biopsy to tube transfer-how much PBS is too much?. *Fertility and Sterility*, 110(4), e411.
- Thacker, H. L., & Kastner, J. (2004). Alkaline hydrolysis. *Carcass disposal: a comprehensive review*.
- Tzvetkov, M. V., Becker, C., Kulle, B., Nürnberg, P., Brockmüller, J., & Wojnowski, L. (2005). Genome-wide single-nucleotide polymorphism arrays demonstrate high fidelity of multiple displacement-based whole-genome amplification. *Electrophoresis*, 26(3), 710-715.
- Wainright, A., Nguyen, U. T., Bjornson, T., & Boone, T. D. (2003). Preconcentration and separation of double-stranded DNA fragments by electrophoresis in plastic microfluidic devices. *Electrophoresis*, 24(21), 3784-3792.
- Van Loo, P., & Voet, T. (2014). Single cell analysis of cancer genomes. *Current opinion in genetics & development*, 24, 82-91.
- Wang, X., Lim, H. J., & Son, A. (2014). Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization. *Environmental health and toxicology*, 29.
- Wang, X., Liu, Y., Liu, H., Pan, W., Ren, J., Zheng, X., ... & Li, S. (2022). Recent advances and application of whole genome amplification in molecular diagnosis and medicine. *MedComm*, 3(1), e116.
- Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Kenigsberg, D., Moshella, J., Ivakhnenko, V., ... & Kuliev, A. (2002). Polar body-based preimplantation diagnosis for X-linked disorders. *Reproductive biomedicine online*, 4(1), 38-42.
- Wilson, J. H. (2014). The history of alkaline hydrolysis. *Good Funeral Guide*.
- Volozonoka, L., Miskova, A., & Gailite, L. (2022). Whole genome amplification in preimplantation genetic testing in the era of massively parallel sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4819.
- Xi, L., Belyaev, A., Spurgeon, S., Wang, X., Gong, H., Aboukhalil, R., & Fekete, R. (2017). New library construction method for single-cell genomes. *PLoS one*, 12(7), e0181163

Xie, X. S., Zong, C., & Lu, S. (2014). *U.S. Patent No. 9,617,598*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Yu, C. Y., Yin, B. C., Wang, S., Xu, Z., & Ye, B. C. (2014). Improved ligation-mediated PCR method coupled with T7 RNA polymerase for sensitive DNA detection. *Analytical chemistry*, 86(15), 7214-7218.

Yu, N. H., Chun, S. Y., Ha, Y. S., Kim, H. T., Kim, D. H., Kim, J., ... & Kwon, T. G. (2018). Optimal stem cell transporting conditions to maintain cell viability and characteristics. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15, 639-647.

Kasutatud veebiaadressid

BioSAFE Life Science Solutions. Viimati külastatud 02.02.2023. <https://biosafeeng.com/divisions/life-science/resources/alkaline-hydrolysis/process-waste-materials-costs/>.

Illumina, SurePlex Summary Protocol. Veebis avaldatud pdf fail. Viimati külastatud 03.04.2023. [SurePlex Summary Protocol \(illumina.com\)](#)

MedlinePlus veebileht. What are the different ways a genetic condition can be inherited? Viimati külastatud 29.04.2023. <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/inheritance/inheritancepatterns>

New England Biolabs. Veebileht. Whole Genome Amplification & Multiple Displacement Amplification. Viimati külastatud 18.04.2023. [Whole Genome Amplification & Multiple Displacement Amplification | NEB](#)

Pajuva, M., Kreek, E-L., Alev, K., Viirmaa, L. (2020-2023). Veebileht. On aeg rääkida viljakusest! Digiõpik igale kooliastmele. Viimati külastatud 29.04.2023. [Viljakusest.ee](#) ★ [Digiõpik](#) ★ [Inimeseõpetus bioloogia viljakus](#)

PubChem (a), Sodium Hydroxide. Viimati külastatud 06.02.2023. [Sodium Hydroxide | NaOH - PubChem \(nih.gov\)](#),

PubChem (b), Potassium Hydroxide. Viimati külastatud 06.02.2023. [Potassium Hydroxide | KOH - PubChem \(nih.gov\)](#),

TakaraBio USA. Whole-genome amplicifation. PicoPLEX WGA. Veebis avaldatud pdf fail. Viimati külastatud 30.04.2023. [PicoPLEX® Single Cell WGA Kit v3 User Manual \(takarabio.com\)](#)

Tartu Ülikooli Kliinikum. Naistekliinik. Viimati külastatud 24.11.2022. <https://www.kliinikum.ee/naistekliinik/patsiendile/kunstlik-viljastamine/>

Thermo Fisher Scientific. Viimati külastatud 07.04.2023. [PBS - Phosphate-Buffered Saline \(10X\) pH 7.4, RNase-free \(thermofisher.com\)](#)

Thermo Fisher Scientific. Viimati külastatud 22.05.2023. [PCR Setup—Six Critical Components to Consider | Thermo Fisher Scientific - EE](#)

UCLA Health. (2020). Infertility. Viimati külastatud 22.10.2022. <http://obgyn.ucla.edu/infertility>

Useful Numbers for Cell Culture. Veebis avaldatud pdf fail. Viimati külastatud 27.04.2023. [Useful Numbers for Cell Culture](#)

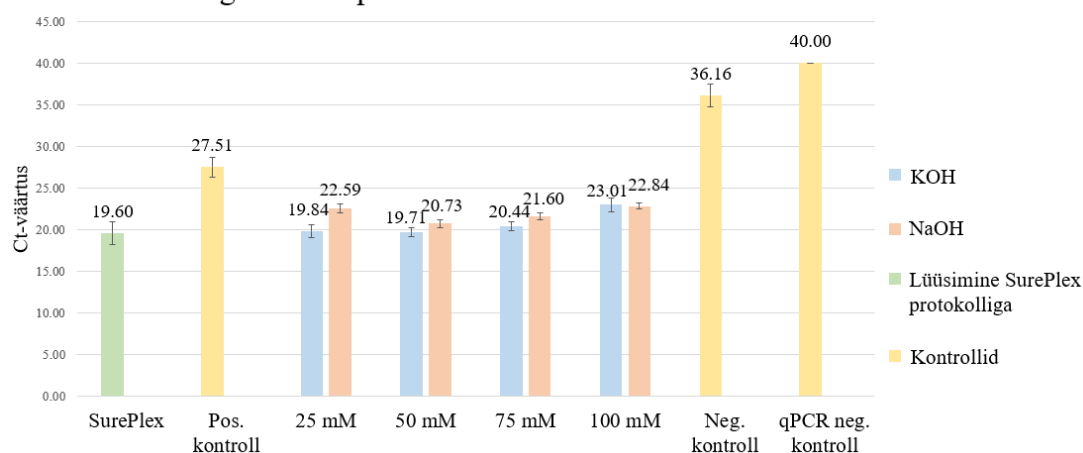
WHO. WHO fact sheet. Viimati külastatud 22.10.2022. www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility

Lisad

Lisa tabel 1. Töös kasutatud praimerid järjestused, puhastamise meetod, sünteesiskaala ja stokk-lahuse kontsentratsioon. Oligonukleotiidid olid tellitud ja sünteesitud Metabion International AG poolt.

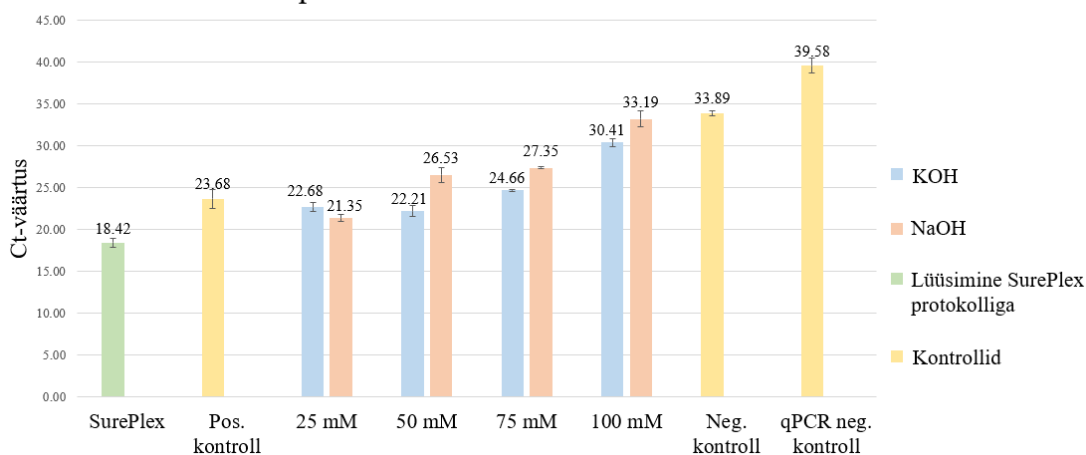
Praimeri nimetus	Praimeri nukleotiidne järjestus	Puhastamise meetod	Sünteesi skaala	Kontsentratsioon
WGA-3A	GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAG NNNNNNNNAAA	nGS grade	5-10 nmol	100 µM
WGA-3G	GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAG NNNNNNNNGGG	nGS grade	5-10 nmol	100 µM
WGA-3C	GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAG NNNNNNNNCCC	nGS grade	5-10 nmol	100 µM
WGA-3T	GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAG NNNNNNNNTTT	nGS grade	5-10 nmol	100 µM
WGA-PCR univ	GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTG	nGS grade	5-10 nmol	100 µM
PGS17	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCGG TGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT	nGS grade	5-10 nmol	100 µM
PGS18	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAACG CTGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT	nGS grade	5-10 nmol	100 µM
PGS19	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGGT ACGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT	nGS grade	5-10 nmol	100 µM
PGS20	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTGT GGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT	nGS grade	5-10 nmol	100 µM
PGS-univ	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TCGTCCGACGCTCAGATGTG	nGS grade	5-10 nmol	100 µM

KOH ja NaOH erinevate kontsentratsioonide ja Large Fragment Bst polümeraasi kordusanalüüs

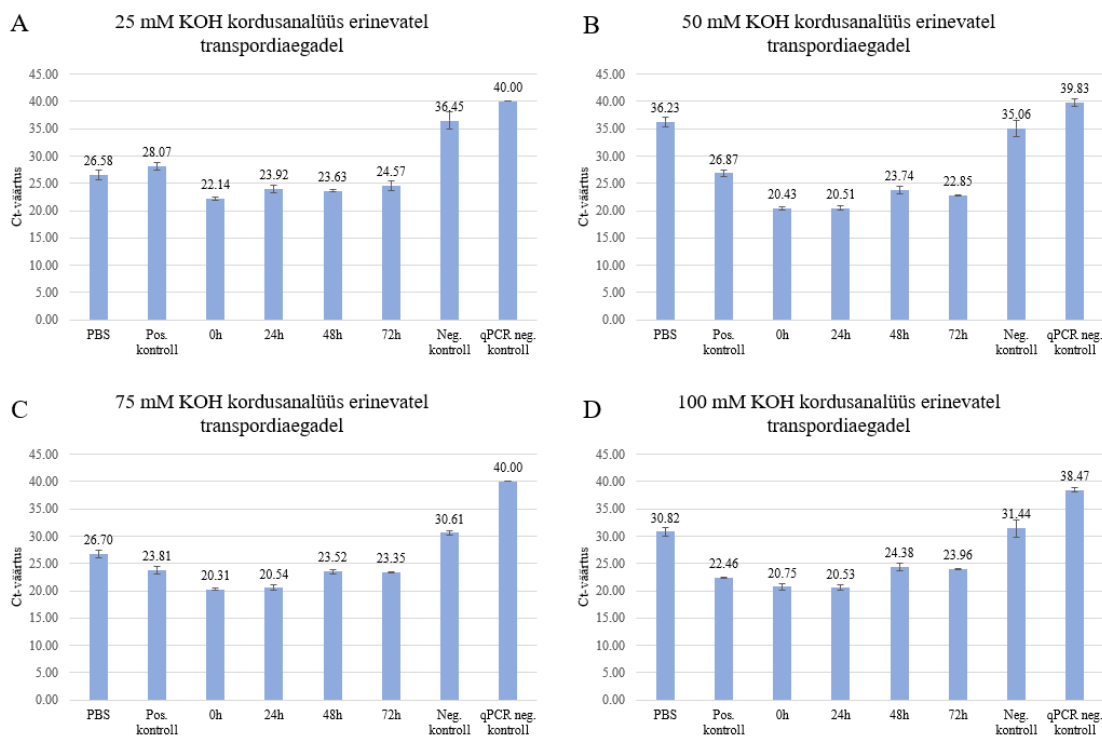


Lisa joonis 1. WGA analüüsi tulemused kasutades Large Fragment Bst polümeraasi KOH ja NaOH lahustes. X-teljel on testitud KOH ja NaOH lahused 25-100 mM kontsentratsioonidel ning positiivsed (vasakul) ja negatiivsed kontrollproovid (paremal). Y-teljel on qPCR Ct-väärtused. Igale tulbale on lisatud kolmest kordusest saadud qPCR Ct-väärtuste keskmine ning 95% usalduspiirid. Aluste võrdluses andis KOH madalama Ct-väärtuse ehk kõrgema saagise kõigil neljal kontsentratsioonil. SurePlex positiivne kontroll oli samaväärne KOH lahusega.

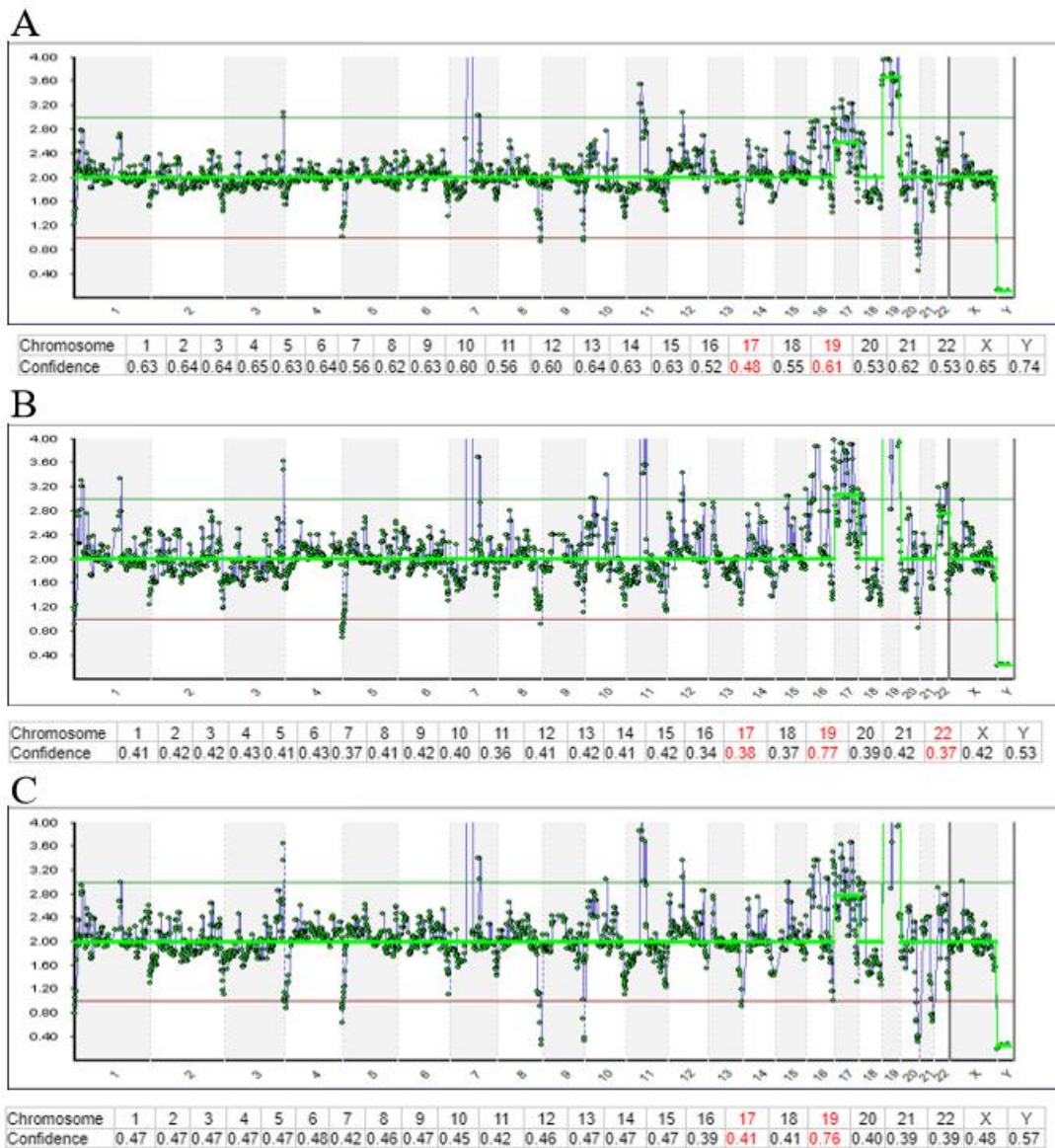
KOH ja NaOH erinevate kontsentratsioonide ja Deep Vent polümeraasi kordusanalüüs



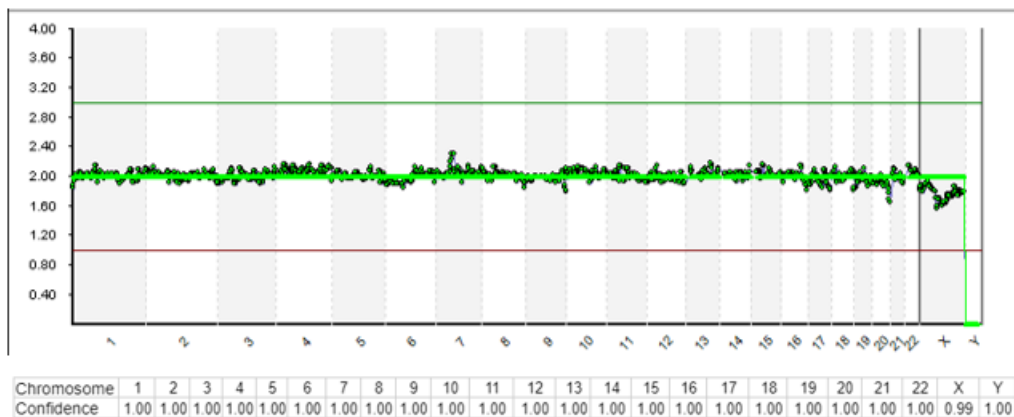
Lisa joonis 2. WGA analüüsi tulemused kasutades Deep Vent polümeraasi KOH ja NaOH lahustes. X-teljel on testitud KOH ja NaOH lahused 25-100 mM kontsentratsioonidel ning positiivsed (vasakul) ja negatiivsed kontrollproovid (paremal). Y-teljel on qPCR Ct-väärtused. Igale tulbale on lisatud kolmest kordusest saadud qPCR Ct-väärtuste keskmine ning 95% usalduspiirid. Analüüsist selgus, et KOH andis madalama Ct-väärtuse kolmel neljast analüüsitud kontsentratsioonist. SurePlex positiivne kontroll osutus efektiivsemaks kui KOH ja NaOH lahused.



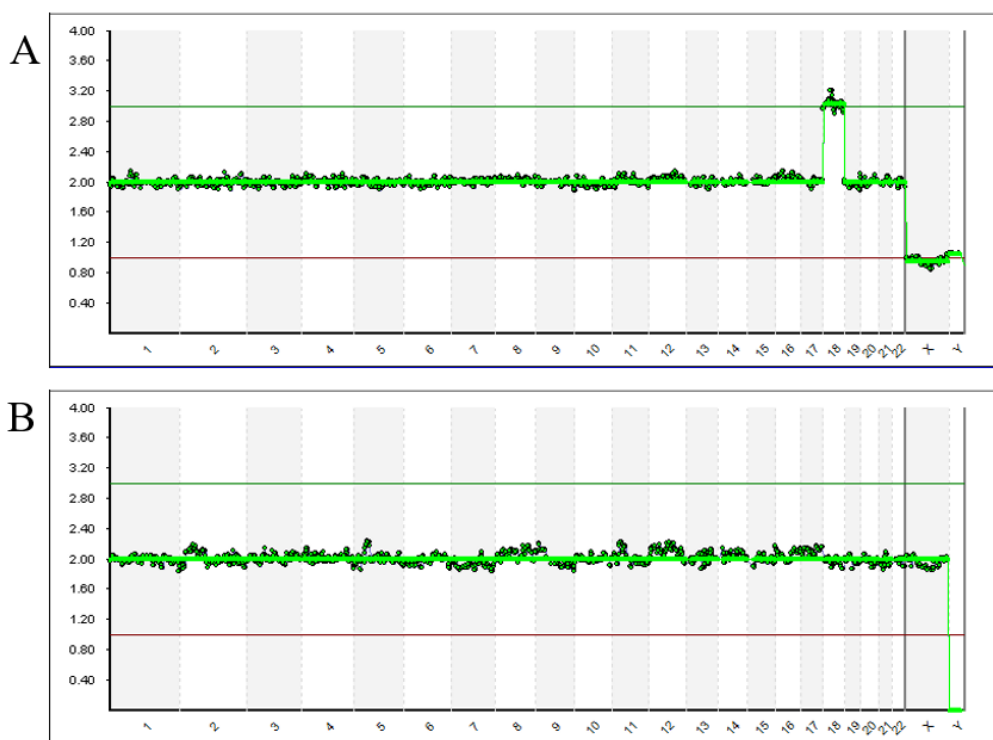
Lisa joonis 3. Korduskatse, WGA saagis 25 mM KOH (A), 50 mM KOH (B), 75 mM KOH (C) ja 100 mM KOH (D) peale 0-72 tunnist rakkude transporti. X-teljel on positiivsed kontrollid (vasakul), 0-72 tunnised transpordiajad ja negatiivsed kontrollid (paremal). Y-teljel on qPCR Ct-väärtused. Igale tulbale on lisatud kolmest kordusest saadud qPCR Ct-väärtuste keskmine ning 95% usalduspiirid. Tulemused näitasid, et 25-100 mM KOH lahuses erinevatel transpordiaegadel mõõdetud Ct-väärtused olid samaväärsed.



Lisa joonis 4. WGA sekveneerimise tulemused 50 mM KOH transportilahuses 24-tunni järel (A), 48-tunni järel (B), 72-tunni järel (C). Allpool, tabelina, on märgistatud usaldusväärsused iga kromosoomi tulemuste kohta. Punase värviga on toodud tuvastatud aneuploidsused. X-teljel on kromosoomide number ja Y-teljel on kromosoomide arv. 24-tunnises (A) ja 72-tunnises (C) analüüsis tuvastati seitsmeteistkümneenda kromosoomi trisoomia ja üheksateistkümneenda kromosoomi tetrasoomia. 48-tunnises katses (B), lisaks eelpool nimetatud aneuploidustele, tuvastati ka 22. kromosoomi trisoomia. Joonis on koostatud Blufuse Multi programmi abil (Illumina).



Lisa joonis 5. Primaarsete endomeetriumi strooma rakkude sekveneerimise korduskatse tulemused. Allpool, tabelina, on toodud usaldusväärsused iga kromosoomi tulemuste kohta. X-teljel on kromosoomide number ja Y-teljel on kromosoomide arv. Joonis on koostatud Blufuse Multi programmi abil (Illumina).



Lisa joonis 6. PGT teenuses kasutatava SurePlex WGA protokollu sekveneerimise tulemused. Tulemused on analüüsitud Bluefuse Multi tarkvaraga (Illumina). Joonised A on tuvastatud poisembrüöl kaheksateiskümnenda kromosoomi trisoomia ja joonisel B pole tuvastatud ühtegi aneuploidust, tulemuste põhjal saab järeldada, et tegemist on euploidse naissoost embüoga. X-teljel on kromosoomide number ja Y-teljel on kromosoomide arv. Joonis on koostatud Blufuse Multi programmi abil (Illumina).

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Diana Lanevskaja (sünnikuupäev 28.02.2001),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Rakkude transpordilahuse optimeerimine terve genoomi amplifikatsiooniks

mille juhendajad on PhD Kaarel Krjutškov ja PhD Lilian Kadaja-Saarepuu, 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.

Diana Lanevskaja

Tartus, 29.05.2023

(allkiri)