

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

Indutseeritud pluripotentsete tüvirakkude loomine LCL rakkudest

Bakalaureusetöö

12 EAP

Laura Liivand

Juhendajad
MSc, Rita Kreevan
PhD, Tõnis Org

TARTU 2021

INFOLEHT

Indutseeritud pluripotentsete tüvirakkude loomine LCL rakkudest

Indutseeritud pluripotentset tüvirakud (iPS) on pluripotentset tüvirakkude tüüp, mis on reprogrammeeritud tüvirakkude sarnaseks täiskasvanud somaatilistest rakkudest. iPS rakud sarnanevad küll embrüonaalsetele tüvirakkudele, kuid nende kasutamisel ei teki eetilisi probleeme. Käesolevas bakalaureusetöös antakse ülevaade rakkude reprogrammeerimisest indutseeritud pluripotentseteks rakkudeks, reprogrammeerimiseks kasutatavatest meetoditest ja iPS rakkude kasutamisevõimalustest meditsiinis. Antud lõputöö on osa suuremast cGEM projektist, mille üheks eesmärgiks on arendada välja integratsioonivaba iPS rakuliini loomise võimekus. Eksperimentaalses osas testitakse Epstein-Barr viirusega immortaliseeritud lümfoblastoidse B-raku liini (LCL) reprogrammeerimist iPS rakkudeks varem publitseeritud protokoll järgi, kasutades OCT4, MYC, KLF4 ja SOX2 transkriptsioonifaktoreid.

Märksõnad: indutseeritud pluripotentset tüvirakud, reprogrammeerimine, OCT4, SOX2, KLF4, MYC, plasmiidid, transfektsioon

CERCS: T490 Biotehnoloogia

Creation of induced pluripotent stem cells from LCL cells

Induced pluripotent stem cells (iPS) are a type of pluripotent stem cells that are created from somatic cells and reprogrammed to resemble embryonic stem cells. Unlike embryonic stem cells, iPS cells do not have ethical problems associated with them. This bachelor's thesis gives an overview of reprogramming cells into induced pluripotent stem cells, methods used for reprogramming and potential usages of iPS cells in medicine. This thesis is a part of a larger cGEM project, one aim of which is to create the capacity to develop integration free iPS cell lines. In the experimental part, lymphoblastoid cell lines (LCLs), that have been immortalized by Epstein-Barr virus, are used for reprogramming into iPS cells. A published protocol was used to create these iPS cells, with OCT4, MYC, KLF4 ja SOX2 transcription factors.

Keywords: induced pluripotent stem cells, reprogramming, OCT4, SOX2, KLF4, MYC, plasmids, transfection

CERCS: T490 Biotechnology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Inimese embrüonaalsed tüvirakud.....	7
1.2 Rakkude reprogrammeerimine	8
1.2.1 Reprogrammeerimise molekulaarsed ja epigeneetilised mehhanismid.....	9
1.3 Reprogrammeerimise meetodid	10
1.3.1 Transkriptsioonifaktoritel põhinev reprogrammeerimine	10
1.3.2 miRNA-del põhinev reprogrammeerimine.....	12
1.3.3 Väikestel molekulidel põhinev reprogrammeerimine	12
1.4 Reprogrammeerimisfaktorite viimine rakku	14
1.4.1 Viirusvektorid.....	14
1.4.2 Integreeruvad mitteviiruslikud vektorid	14
1.4.3 Mitteintegreeruvad viiruslikud vektorid.....	15
1.4.4 Mitteintegreeruvad mitteviiruslikud vektorid.....	15
1.5 iPS kasutusvõimalused	16
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	18
2.1 Töö eesmärgid	18
2.2 Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1 Plasmiidid	18
2.2.2 Rakuliinid ja söötmed.....	18
2.2.3 Plasmiidide kontrollimine ja plasmiidse DNA eraldamine	19
2.2.4 Restriksioonianalüüs	19
2.2.5 Sangeri sekveneerimine.....	20
2.2.6 Transfektsioon elektroporatsiooni meetodil	20
2.2.7 FACS analüüs.....	22
2.2.8 LCL rakkude reprogrammeerimine	22
2.2.9 iPS rakkude kasvatamine koekultuuris.....	23
2.3 TULEMUSED.....	24
2.3.1 Plasmiidide restriksioonianalüüs.....	24
2.3.2 LCL rakkude transfektsiooni efektiivsuse määramine kasutades FACS analüüsi	25
2.3.3 LCL rakkude reprogrammeerimine iPS rakkudeks	27
2.4 ARUTELU	32

KOKKUVÕTE	34
SUMMARY	35
TÄNUSÕNAD.....	36
KIRJANDUSE LOETELU	37
LISAD.....	45
LISA 1.....	45
LISA 2.....	46
LISA 3.....	48
LISA 4.....	50
LISA 5.....	52
LIHTLITSENTS	54

KASUTATUD LÜHENDID

bp – aluspaar (*base pair*)

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

EDTA – etüleendiamiintetraädikhape (*ethylene diamine tetra acetic acid*)

EGFP – võimendatud roheliselt helendav valk (*enhanced green fluorescent protein*)

EMT – epiteeliaalne-mesenhümaalne transitsioon (*epithelial-mesenchymal transition*)

ES rakud – embrüonaalsed tüvirakud (*embryonic stem cells*)

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

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

KLF4 – Kruppel'i-sarnane faktor 4 (*Kruppel-like faktor 4*)

LB – lüsogeenne sööde (*lysogeny broth*)

LV – lentiviiruse vektor (*lentiviral vector*)

MET – mesenhümaalne epiteeliaalne transitsioon (*mesenchymal-epithelial transition*)

miRNA – mikroRNA (*microRNA*)

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

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

PBS – fosfaatpuhvriga soolalahus (*phosphate buffered saline*)

PB – PiggyBac transposoon (*PiggyBac transposone*)

ROCK – Rho sõltuv proteiinkinaas (*Rho-associated protein kinase*)

SeV – Sendai viirus vektor (*Sendai Virus Vector*)

shRNA – lühike juuksenõela RNA (*short hairpin RNA*)

SOX2 – (sugu määrav regioonY)-box 2 transkriptsioonifaktor ((*sex determining region Y*)-box 2)

SISSEJUHATUS

Esimesed rakkude reprogrammeerimise katsed põhinesid somaatiliste rakkude tuumaülekanDEL, seejärel õnnestus luua embrüo blastotsüsti sisemisest rakumassist embrüonaalsed tüvirakuliinid. Sellise meetodi kasutamisega kaasnevad mitmed probleemid, mis tingis vajaduse arendada välja indutseeritud pluripotentsed tüvirakud (iPS). iPS rakke kirjeldas esimest korda 2006. aastal Shinya Yamanaka, kes avastas transkriptsioonifaktorite kombinatsiooni OSKM (OCT4, SOX2, KLF4, MYC), millega reprogrammeeriti hiire fibroblastid pluripotentseteks tüvirakkudeks. iPS rakud on pluripotentsete tüvirakkude tüüp reprogrammeeritud embrüonaalsete tüvirakkude sarnasteks rakkudeks täiskasvanud somaatilistest rakkudest (Lei Ye et al., 2013). iPS rakud on võimelised sarnaselt embrüonaalsetele tüvirakkudele lõpmatult jagunema ja arenema kõigiks kolmeks looteleheks (endoderm, mesoderm, ektoderm). Transkriptsioonifaktorite rakku viimiseks kasutati varasemalt peamiselt retroviiusevektoreid, kuid ümberprogrammeerimise efektiivsuse tõstmiseks ja võimalike reprogrammeerimisega kaasnevate riskide vähendamiseks on otsitud mitteintegreeruvaid vektoreid transkriptsioonifaktorite rakku viimiseks, nagu adenoviirused, plasmiidid või valgud. Lisaks on hakatud järjest rohkem otsima reprogrammeerimise meetodeid, et asendada ühte või mitut transkriptsioonifaktorit OSKM kombinatsioonis, selleks on kasutatud miRNA-sid või väikseid keemilisi molekule.

iPS rakkude loomine on olnud teaduses suur läbimurre, mis on võimaldanud teadlastel luua pluripotentsed tüvirakke ilma embrüosid kasutamata. Samuti on iPS rakkudel meditsiinis suur potentsiaal, võimaldades luua patsiendispetsiifilisi tüvirakke, mistõttu kaob immunoloogiline äratõukeprobleem. iPS rakke on võimalik kasutada baasuuringutes, haiguste mudelite loomisel, uute ravimite otsimisel ja regeneratiivses meditsiinis.

Käesolevas töös antakse ülevaade reprogrammeerimisest indutseeritud pluripotentsete tüvirakkude loomisest, peamistest selleks kasutatavatest meetoditest ja nende kasutusest meditsiinis. Praktilise osa eesmärk oli testida LCL rakkude repogrammeerimist iPS rakkudeks, kasutades selleks varem publitseeritud protokoll, ning luua integratsioonivaba iPS rakuliin.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Inimese embrüonaalsed tüvirakud

Inimese embrüonaalsed tüvirakud on rakud, mis on võimelised iseennast taastootma ning arenema kõikideks lootelehtede rakkudeks. Sellised rakud pärinevad embrüo sisemisest rakumassist (Chagastelles & Nardi, 2011), kuid mitte trofektodermi rakkudest, millest moodustub embrüonaalne tugistruktuur, näiteks platsenta (Zakrzewski et al., 2019). Tüvirakkude kaks olulisemat omadust on iseenda taastootmine ja potentsus. Embrüonaalsete tüvirakkude (ES rakkude) puhul ei kehti Hayflicki piir (Rubin, 2002), mistõttu on nad võimelised lõpmatult paljunema, säilitades eelasraku omadused (Romito & Cobellis, 2016). Tüvirakud ekspresseerivad mitmeid transkriptsioonifaktoreid pluripotentsuse säilitamiseks, millest 3 faktorit, Oct4 (oktameeriga seonduv transkriptsioonifaktor 4), Sox2 (sugu määrava regioon-Y box-2) ja Nanog on eriti olulise tähtsusega embrüonaalsete tüvirakkude varajases arengus (Boyer et al., 2005). Oct4, Sox2 ja Nanog panustavad eneseuuendamisvõime ja arengupotentsiaali säilitamiseks vajalike geenide ekspressiooni indutseerimisele. Pluripotentsetes rakkudes on lisaks ekspresseeritud rida teisi pluripotentsuseks olulisi geene, näiteks SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, Klf4 (Kruppel'i-sarnane faktor 4), MycN, Lin28, Cripto, Fbx15, Dnmt3b, Fgf4, Gdf3, Rex1, miR-200c, miR-302 perekond, miR-369-3p ja miR-369-5p (Eguchi & Kuboki, 2016).

Tüvirakud jaotatakse kahte klassi – naiivsed ja diferentseerumiseks valmistuvad tüvirakud. Naiivsed tüvirakud pärinevad preimplantatsiooni embrüo sisemisest rakumassist. Diferentseerumiseks valmistuvad tüvirakud pärinevad embrüo implatatsioonijärgsest epiblastist (Dodsworth et al., 2020). Naiivsed tüvirakud kasvavad pigem väiksemate, kompaksete kolooniatena, samas kui diferentseerumiseks valmistuvad tüvirakud kasvavad suurte kolooniatena. Naiivsetel tüvirakkudel esineb oluline omadus *in vitro* diferentseerumisel läbida X-kromosoomi inaktivatsioon (Kumari, 2016).

Koekultuuris hakati esimest korda embrüonaalseid tüvirakke kasvatama 1981. aastal, kui suudeti luua hiire blastotsüstidest embrüonaalsete tüvirakkude liin (Evans & Kaufman, 1981). Esimene inimese ES rakuliin loodi 1998. aastal (Thomson et al., 1998). Embrüonaalsete tüvirakkude kasutamisega kaasnevad eetilised küsimused, kuna ES rakuliini loomisel hävineb blastotsüst (Lo & Parham, 2009).

1.2 Rakkude reprogrammeerimine

Esimesed tõendid raku reprogrammeerimise kohta pluripotentsesse olekusse selgusid somaatiliste rakkude tuumaülekanne katsetest. Munarakkudesse, kust oli eelnevalt eemaldatud tuum, viidi rakutuum diferentseerunud rakkudest. Selle tulemusena tekkisid rakud, mis olid võimelised tootma kõiki tulevase organismi rakke ning diferentseeruma spetsialiseerunud rakutüüpideks (Gurdon, 1962). Hiljem tehti katseid juba embrüonaalsete tüvirakkudega, kui avastati, et somaatiliste rakkude pluripotentse oleku taastamiseks sisaldavad nii viljastamata munarakk kui ka embrüonaalsed tüvirakud faktoreid, mis on võimelised somaatilisi rakke ümber programmeerima (Romito & Cobellis, 2016).

2006. aastal avastas Shinya Yamanaka uurimisgrupp transkriptsioonifaktorite kombinatsiooni, mis koosnes neljast valgust: Oct4, Sox2, Klf4, cMyc (OSKM). Nende abil on võimalik rakku reprogrammeerida pluripotentsesse olekusse. Selliseid rakke nimetatakse indutseeritud pluripotentseteks tüvirakkudeks ehk iPS rakkudeks. Shinya Yamanaka töögrupp alustas iPS rakkude loomisel 24 transkriptsioonifaktoriga, kui nad reprogrammeerisid hiire fibroblaste, kasutades retroviirusel põhinevat vektorit. Hiljem näidati, et koos on vajalikud ainult neli transkriptsioonifaktorit, et viia läbi rakkude reprogrammeerimine (Takahashi & Yamanaka, 2006). 2007. aastal programmeeriti ümber inimese fibroblastid kahe töögrupi poolt. Yamanaka töögrupp kasutas inimese iPS rakkude loomiseks sama põhimõtet mida nad kasutasid hiirtelgi (Takahashi et al., 2007), James Thomson'i töögrupp kasutas OCT4, SOX2, NANOG ja LIN28 (OSNL) transkriptsioonifaktoreid (Yu et al., 2007).

Indutseeritud pluripotentsed tüvirakud sarnanevad embrüonaalsete tüvirakkudega morfoloogia ja pluripotentsusmarkerite ekspressiooni poolest, neil on sarnane promootorite ja telomeraasi aktiivsus ning esineb võime areneda teratoomiks. Sarnaselt embrüonaalsetele tüvirakkudele võivad iPS rakud diferentseeruda kõigiks kolmeks lootelehe rakuks (Vitale et al., 2011).

Peamised probleemid somaatiliste rakkude reprogrammeerimises on transkriptsioonifaktorite viimine rakku, ilma et tekiks geneetilised modifikatsioonid sihtmärkrakkudes, mida põhjustavad eksogeensed järjestused, ning reprogrammeerimine ei ole alati efektiivne. Selliste probleemide kõrvaldamiseks on proovitud kasutada erinevaid transkriptsioonifaktorite kombinatsioone, nagu OSNL, OSML või OSK (Singh et al., 2015). Samuti on reprogrammeerimine küllaltki aeglane. Tõenäoliselt on üheks takistuseks rakkude vananedes tekkinud epigeneetilised barjäärid, mis võivad olla takistuseks tõhusaks somaatiliste rakkude ümberprogrammeerimiseks (Van Den Hurk et al., 2016).

1.2.1 Reprogrammeerimise molekulaarsed ja epigeneetilised mehhanismid

Somaatiliste rakkude reprogrammeerimiseks vaigistatakse esialgu raku transkriptsiooniline profiil ja seejärel kutsutakse esile embrüonaalsete tüvirakkude laadne geeniekspressioon. Reprogrammeerimise esimeseks etapiks on initsiatsioonifaas, milles mängib olulist rolli mesenhümaalne epiteliaalne transitsioon (MET), kui rakud lähevad üle mesenhümaalsest olekust epiteliaalseks. MET käigus suureneb rakkude proliferatsioon ja väheneb rakkude suurus. Pärast MET läbimist suunduvad rakud küpsemisfaasi, kus hakatakse aktiveerima puripotentsusega seotud gene nagu Nanog, SaIi4, Esrrb ja Oct4. Initsiatsioonifaasist ülemineku küpsemisfaasi sõltub suuresti ka pidevast OSKM faktorite ekspressioonist. Stabiliseerumisfaasi üleminekuks vaigistatakse transgeenid, et tagada rakkude täielik pluripotentseteks muutumine ja endogeensete reprogrammeerimisfaktorite püsiv ekspressioon. Täielik pluripotentsete geenide transkriptsiooni indutseerimine toimub stabiliseerimisfaasis, kui ekspresseeruvad Utf1, Lin28, Dnmt3I, Dppa2/3/4, Pecam ja Sox2. Arvatakse, et somaatilise raku ülemineku iPS-ks ja pluripotentsuse säilitamine on reguleeritud erinevate molekulaarsete radade poolt, kuna küpsemisfaasist ülemineku stabiliseerimisfaasiks reguleerivad geenid erinevad nendest, mis osalevad pluripotentsuse regulatsioonis. Hiire rakkude peal on näidatud, et reprogrammeerimise ajal toimub 2 suuremat geeniaktivatsiooni. Esimene on väga varajases initsiatsioonietapis ning teine aktiveerub küpsemisfaasis (Polo et al., 2012).

Reprogrammeerimise käigus kujundatakse oluliselt ümber somaatiliste rakkude epigeneetiline profiil. DNA metülatsioon toimub tsütosiini C5 positsioonis ja viiakse läbi metüültransferaaside (Dnmt1 ja Dnmt3a/3b) poolt (Van Den Hurk et al., 2016). Embrüonaalsetes rakkudes on hüpometüleeritud promootorite CpG-rikkad piirkonnad, mis on rikastunud histoon H3K3me4 märgisega ja on seotud koduhoidjageenidega (Ponger et al., 2001). DNA metüleerimise muutusi on tähele pandud peamiselt reprogrammeerimise lõpus, kui pluripotentsusega seotud geenid on demetüleeritud, samas kui diferentseerumise eest vastutavad geenid on *de novo* metüleeritud (Van Den Hurk et al., 2016).

Samuti erinevad diferentseerunud ja pluripotentsetes rakkudes histoonide modifikatsioonid. Diferentseerunud rakkudes on metüülitud H3K9 ja H3K27 heterokromatiini domeenid tugevalt kokku pakitud, võrreldes pluripotentsete tüvirakkudega (Hawkins et al., 2010; Wen et al., 2009). Pluripotentsetes tüvirakkudes on kromatiin vähem kokku pakitud ja leidub rohkem H3K4 histooni metülatsiooni sisaldavat eukromatiini. Reprogrammeerimise käigus peavad transkriptsioonifaktorid pääsma endogeensete pluripotentsusgeenide juurde, selleks tuleb neil

pakkida lahti ja aktiveerida heterokromatiin (Van Den Hurk et al., 2016). Diferentseerumisega seotud geenidel on bivalentne domeen, mille geenil esinevad H3K4me3 kui ka H3K27me3 märgised (Bernstein et al., 2006). Nende geenide transkriptsiooni initseerimist repressseerib Polycombi valkude grupp, mis seondub H3K27me3-le, surudes maha diferentseerumisega seotud geenide ekspressiooni. Sellise bivalentse domeeni omamine võimaldab kiiresti sisse ja välja lülitada geenide ekspressiooni, lülitades ümber H3K27me3-le või H3K4me3-le (Omole & Fakoya, 2018).

1.3 Reprogrammeerimise meetodid

1.3.1 Transkriptsioonifaktoritel põhinev reprogrammeerimine

Transkriptsioonifaktorid tunnevad ära rakus kindla DNA motiivi ning seonduvad sellega. See võib viia kromatiini struktuuri muutusteni, mida mõjutavad DNA metülatsioon, histoonide modifikatsioonid ja ATP-sõltuv kromatiini ümberkujundamine. Sellised ümberkorraldused rakus on olulised, et algaks reprogrammeerimine ja transkriptsioonifaktorid seonduksid omavahel (Takahashi & Yamanaka, 2016).

Kõige olulisem reprogrammeerimise faktor on Oct4 ehk oktameeriga seonduv transkriptsioonifaktor 4, mis vastutab põhiliselt rakkude pluripotentsuse säilitamise eest, surudes maha geenide ekspressiooni, mis suunavad rakke diferentseeruma (Singh et al., 2015). Sox2 ehk sugu määrava regioon-Y box-2 transkriptsioonifaktor kuulub Sox transkriptsioonifaktorite perekonda. Sox2 on oluline faktor inimese pluripotentsete tüvirakkude pluripotentsuse ja neuraalse diferentseerumise kontrollis. Endogeense Sox2 aktivatsioon toimub reprogrammeerimise üsna varajases arenguetapis, mis käivitab transkriptsioonilised muutused ning viib iPS-e moodustumiseni. Pluripotentsuse säilitamisel ja tekkimisel on oluline, et Sox2 interakteeruks Oct4-ga. Indutseeritud pluripotentsete tüvirakkude loomisel on võimalik Sox2 asendada lähedaste "sugulastega" Sox perekonnast nagu Sox1 või Sox3, kuid mitte kaugemate sugulastega, nagu Sox7 või Sox15 (S. Zhang & Cui, 2014).

Klf4 ehk Kruppel'i sarnane faktor 4 on tsinksõrme sisaldav transkriptsioonifaktor, mis on oluline mitmete rakuprotsesside regulatsioonil nagu rakkude kasvamisel, jagunemisel ja diferentseerumisel. Klf4 kuulub Sp/Klf4 faktorite perekonda. Selle valgu transkriptsioon on taset on võimalik reguleerida nii transkriptsiooni kui post-transkriptsiooni tasemel. Klf4 roll reprogrammeerimise alguses on suruda maha diferentseerumiseks olulised geenid, mis teeb

hiljem lihtsamaks pluripotentsete geenide avaldumise (Ghaleb & Yang, 2017). Klf4 funktsioon on säilitada tüvirakkude iseenda taastootmine, interakteerudes otse Sox2 ja Oct4 faktoritega (Wei et al., 2009).

Myc transkriptsioonifaktor kuulub heeliks-ling-heeliks leutsiini tõmbluku motiiviga Myc perekonda, kuhu kuuluvad Myc, Myc-N ja Myc-L. Myc avaldab mõju juba rakkude ümberprogrammeerimise alguses, mistõttu on ka sellel faktoril tugev mõju pluripotentsetele tüvirakkudele sarnase geeniekspressiooni loomisel. Myc-i funktsioon on stabiliseerida ja võimendada OSK seondumist regulatoorsetele aladele. Myc seondub ajutiselt E-box-le, mille tulemusel suureneb ka OSK faktorite seondumine. Selle tulemusel moodustub eukromatiin, mis muudab ümberprogrammeeritud sihtmärkrakkudes kättesaadavamaks promootorid, et Myc, Klf4, Oct4 saaksid seonduda enda sihtmärkgeenide promootoritega, mille tulemusel aktiveerub transkriptsioon. Sox2 transkriptsioonifaktor jääb distaalsete enhanserite juurde (Chappell & Dalton, 2013). Kirjeldatud on ka mehhanismi, mis näitas, et Myc võimendab reprogrammeerimise alguses OSK faktorite seondumist ligipääsmatu kromatiiniga. OSK kaasab pluripotentsuse avaldumiseks vajalike geenide enhanserid. Seejärel seondub Myc modifitseeritud enhanserite lähedusse ja võimendab reprogrammeerimise protsessi mehhanismiga, mis arvatavasti sisaldab kromatiini avavate kofaktorite kaasamist (Soufi et al., 2012). OSKM faktorite koosmõju muudab hilisemates reprogrammeerimise etappides kromatiini kergemini kättesaadavamaks ja iga faktor lokaliseerub enda vastavasse seondumissaiti (Chappell & Dalton, 2013).

Levinud transkriptsioonifaktor reprogrammeerimisel on ka Nanog, mille ülesanne on säilitada rakkudes pluripotentsus. Tõenäoliselt aitab see stabiliseerida reprogrammeerimist hilises faasis (Pan & Thomson, 2007). Lin28 transkriptsioonifaktori ülesanne on soodustada reprogrammeeritud rakkude valmimist, olles ekspresseeritud ainult täielikult reprogrammeeritud rakkudes (J. Zhang et al., 2016).

Teadusuuringutes on enim levinud OSKM (Oct4, Sox2, Klf4, Myc) faktorite kombinatsioon, kuid on leitud ka alternatiivne transkriptsioonifaktorite kombinatsioon OSNL, mis koosneb Oct3/4, Sox2, Nanog ja Lin28 ning mida on edukalt kasutatud iPS rakuliinide genereerimisel. Tõenäoliselt aktiveerivad OSKM ja OSNL samu reprogrammeerimise signaaliradu (Omole & Fakoya, 2018).

1.3.2 miRNA-del põhinev reprogrammeerimine

Reprogrammeerimise efektiivsuse tõstmiseks on kasutusele võetud miRNA-d, tänu millele väheneb transkriptsioonifaktorite kasutamise vajadus, kuna miRNA-d võivad mõjutada mitut signaalirada pluripotentsuse avaldumisel ning raku saatuse ülemineku radadel (Subramanyam et al., 2011).

Esimesed miRNA-l põhinevad reprogrammeerimise katsed viidi läbi miR-291-3p, miR-294 ja miR-295 üleekspresseerimisega, mis kombineeriti koos OSK faktoritega. Kõik miRNA-d suurendasid oluliselt reprogrammeerimise efektiivsust, asendades cMyc transkriptsioonifaktorit. miR-302 on oluline ES rakkude pluripotentsuse säilitamiseks. Rakud, millesse on transfekteeritud miR-302, ekspresseerivad peamisi pluripotentsusmarkereid (Oct3/4, SSEA-3/4, Sox2 ja Nanog) (Eguchi & Kuboki, 2016). miR-302 ja miR-372 on kasutatud kombineerituna OSKM faktoritega, suurendades nii inimese fibroblastide reprogrammeerimise efektiivsust. Selline kombinatsioon mõjutab rakutsüklis osalevaid gene, EMT-d ja epigeneetilist regulatsiooni. Samuti on näidatud miR-302 ja miR-372 üleekspresseerimist ilma OSKM faktoriteta, mis andis veelgi kiirema ja parema tulemuse reprogrammeerimisel (Leonardo et al., 2012). Reprogrammeerimiseks on võimalik koospetsiifilisi miRNA-sid ka alla reguleerida. Näiteks on miR-21 ja miR-29a ekspressiooni alla reguleerimine vähendanud p53 ekspressiooni. Reprogrammeerimise käigus pluripotentsesse olekusse ülemikuga kaasneb MET, mida soodustavad miR-302/367 klaster ja miR-200c perekond, represseerides TGF β signaalirada ja E-kadheriini (Eguchi & Kuboki, 2016).

1.3.3 Väikestel molekulidel põhinev reprogrammeerimine

Efektiivsemaks iPS rakkude genereerimiseks on otsitud väikeseid molekule, mis jäljendavad transkriptsioonifaktoreid. Väikesed molekulid asendavad reprogrammeerimisel ühte või mitut transkriptsioonifaktorit (Lin & Wu, 2015).

Väikesed molekulid käituvad reprogrammeerimisel kui epigeneetilised modulaatorid. Nad suurendavad Oct4 ja Klf4 ekspressioonitaset reprogrammeerimise ajal. Samuti on nad vastutavad histoonide metülatiooni ja demetülatiooni eest (Huangfu, Maehr, et al., 2008). Väikesed molekulid võimaldavad epigeneetilist mälu kustutada, mis suurendab reprogrammeerimise efektiivsust. Selleks töödeldakse iPS rakke, näiteks trichostatiin A-ga, mis on histoonide deatsetülaaside inhibiitor (Lin et al., 2009). Väikeste molekulide üheks

ülesandeks on ka WNT signaaliraja moduleerimine, mille aktiveerimiseks kasutatakse GSK-3 β inhibiitor CHIR99021, asendades nii cMyc-i (Marson et al., 2008). Reprogrammeerimisel on kasutatud ka C vitamiini, mis vähendab iPS rakkude loomisel p21 ja p53 ekspressiooni. p53 reguleerib p21cip1 ja p16INK4a/p19arf ekspressiooni ning p53 geeniekspressiooni alla reguleerimine suurendab reprogrammeerimise efektiivsust (Esteban et al., 2010). Kahe väikese molekuli kombinatsioon, SB431542 ja PD0325901, inhibeerib TGF β signaalirada MET indutseerimise kaudu (Lin et al., 2009).

Väikeseid molekule kombineeritakse reprogrammeerimiseks nii omavahel kui ka asendatakse üht või mitut faktorit OSKM kombinatsioonis. Täielikult keemiliste molekulidega iPS rakkude loomisel rakkude pluripotentse seisundi saavutamiseks on vaja teha mitmeid rakulisi ümberkorraldusi, muuta signaaliradu ja saavutada rakuvälise maatriksi püsivad tingimused. Pluripotentsusega seotud transkriptsioonifaktorite aktiveerimiseks tuleb rakku indutseerida keemiliste molekulidega epigeneetiliste mehhanismide kaudu. Geenid, mis vastutavad rakkude diferentseerumise eest, tuleb välja lülitada ja epigeneetiliste mehhanismide abil vaigistada. Selliste ümberkorralduste tõttu on inimese rakkude reprogrammeerimine ainult väikeste molekulidega siiski keeruline (Shao & Wu, 2010). Mõned meetodid iPS rakkude reprogrammeerimiseks on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Valik meetodeid inimese rakkude reprogrammeerimisel iPS rakkudeks. Tabelis on välja toodud mõned iPS rakkude genereerimiseks loodud meetodid, mis põhinevad transkriptsioonifaktoritel, miRNA-del ja väikestel molekulidel.

Reprogrammeerimiseks kasutatud faktorid	Viide
OSKM	(Takahashi et al., 2007)
Oct4, Sox2, Nanog, Lin28	(Yu et al., 2007)
Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 ja Sall4	(Yu et al., 2007)
Oct4, Soc2, Klf4, Utf1	(Zhao et al., 2008)
miR302/367 klaster	(Anokye-Danso et al., 2011)
lincRNA-RoR	(Wen et al., 2009)
mir-200c, mir-302 s, mir-369 s	(Miyoshi et al., 2011)
mir-302, miR-372	(Subramanyam et al., 2011)
Oct4, Sox2 + VPA	(Huangfu, Osafune, et al., 2008)

Oct4, Klf4 + CHIR99021, parnaat	(Li et al., 2009)
Oct4, Klf4 + BIX-01294, BayK8644	(Shi et al., 2008)

1.4 Reprogrammeerimisfaktorite viimine rakku

1.4.1 Viirusvektorid

Viirusvektoritest on kõige laialdasemat kasutust leidnud retroviirusvektorid, kuna neil on kõrge ülekandefektiivsus ning bioloogia on hästi teada (Shao & Wu, 2010). Retroviirusvektorid integreeruvad hästi ainult jagunevate rakkude genoomi (Shao & Wu, 2010). Retroviirusvektorite headest omadusest hoolimata on neil ka puudusi, mistõttu ei ole need reprogrammeerimiseks kõige sobivamad. iPS rakkudes on peale reprogrammeerimist ekspresseeritud endogeensed pluripotentsuse geenid ning transgeenid on vaigistatud. Retroviirusvektorite vaigistamine iPS rakkudes ei pruugi alati olla tõhus, mistõttu võib transgeen aktiveeruda hiljem, suurendades nii riski kasvaja tekkeks. Iduteeliini kompetentse iPS rakkude loomisel on näidatud, et cMyc transgeeni reaktiveerimine võib põhjustada kasvaja teket (Okita et al., 2007).

Lisaks retroviirusvektoritele kasutatakse laialdaselt ka lentiviirusvektorit (LV). Erinevalt retroviirusvektoritest saab LV integreeruda nii jagunevatesse kui ka mittejagunevatesse rakkudesse (Shao & Wu, 2010). LV reprogrammeerimisel on disainitud polütsistronne LV, milles on olemas kõik neli reprogrammeerimise transkriptsioonifaktorit, mis on ühendatud ühes ekspressioonikassetis 2A iselõikuva valgujärjestusega, kus neli transkriptsioonifaktorit on ühe promootori all. Polütsistronse LV eeliseks on vähenenud viiruse koopia arv transdutseeritud rakkudes ning vähenenud transgeeni vaigistamise risk. Lisaks on polütsistronsete LV vektoritega tehtud cre/loxP süsteem ja võetud kasutusele indutseeritavad süsteemid nagu tetratsükliinist sõltuv aktivatsioon, et kõrvaldada ebaefektiivse vaigistamise ja transgeeni reaktiveerimise tagajärjed. Cre ekspressiooniga on võimalik kõrvaldada raku genoomist integreeritud transgeen, kuid see võib viia ka mutageneesini (Al Abbar et al., 2020).

1.4.2 Integreeruvad mitteviiruslikud vektorid

Reprogrammeerimisel on kasutatud ka mobiilseid geneetilisi elemente, näiteks piggyBac (PB) transposooni (Okita et al., 2008). Mobiilseid geneetilisi elemente kasutatakse reprogrammeerimisel eksogeensete pluripotentsusgeenide ülekandumiseks. Nende peamiseks positiivseks omaduseks on elemendi järele jäänud osa välja lõikamise võimalus, kasutades

selleks transientse transposaasi ekspressiooni. Inimese rakkude reprogrammeerimisel on transposooni keeruline kasutada, kuna inimese genoomis on endogeenseid PB sarnaseid transposoonseid elemente, mis võivad põhjustada genoomseid muudatusi transgeeni väljalõikamisel (Feschotte, 2006).

1.4.3 Mitteintegreeruvad viiruslikud vektorid

Inimese iPS-ide tegemiseks on edukalt kasutatud adeno ja sendai viirust. Neid viiruseid kasutades pole näidatud, et eksogeenne DNA integreeruks peremehe genoomi. Sellegipoolest on selliste vektorite kasutamise efektiivsus reprogrammeerimisel 0,001%, sest tõenäoliselt pole OSKM faktorite ajutine geeniekspressioon piisav, et epigeneetikat täielikult ümber kujundada (Medvedev et al., 2010). Adenoviiruste kasutamisel tuleb teha mitmeid viiruse infektsioone ja adenoviiruste tootmine on väga töömahukas (Omole & Fakoya, 2018). Samas on translatsioonilises meditsiinis adenoviirustel põhinevate meetodite rakendamine tulevikus paljulubav (Lee et al., 2017).

Alternatiivina adenoviirustele kasutatakse Sendai viirust (SeV). SeV vektori efektiivsus avaldub siis, kui näiteks sisestada mitmetesse rakutüüpidesse ja kudedesse võõrast päritolu geene. Negatiivseks küljeks on aga vektori keeruline eemaldamine somaatilistest rakkudest, kuna SeV vektorile on iseloomulik pidevalt replitseeruda (Fusaki et al., 2009).

1.4.4 Mitteintegreeruvad mitteviiruslikud vektorid

Transkripsioonifaktoreid saab somaatilistesse rakkudesse viia ka otse, ilma et vektor integreeruks genoomi. Mitteintegreeruvate mitteviiruslike ülekandesüsteemidena kasutatakse RNA-d (Yu et al., 2009), episomaalseid või polütsistronseid DNA mitteviiruslikke vektor-süsteeme (Jia et al., 2010). Sellise reprogrammeerimise efektiivsus on 5-10 korda madalam kui lentiviirusvektoritel ning nende kasutamine vajab põhjalikku optimeerimist (Al Abbar et al., 2020).

Episomaalseteks vektoriteks võivad olla plasmiidid või *minicircle* DNA. Nende kasutamine ei hõlma genoomi integreerumist. Episomaalse vektori ekspressioon on rakus ajutine, mistõttu on enamasti vaja teha mitu transfektsiooni. Kui võrrelda plasmiidide ja *minicircle* DNA efektiivsust, siis *minicircle* DNA reprogrammeerimise efektiivsus on kõrgem, kuna see on suuruse poolest väiksem ning transgeeni vaigistusmehhanism on madalam (Al Abbar et al., 2020).

miRNAde kasutusele võtmine on olnud paljulubav integratsioonivabade pluripotentsete rakuliinide loomiseks, muutes reprogrammeerimise efektiivsemaks. Homogeensete inimese iPS rakkude tegemiseks on asendatud cMYC miR-291-3p, miR-294 ja miR-295, mis inhibeerivad TGF β signaalirada, mis omakorda inhibeerib EMT rada (Subramanyam et al., 2011).

1.5 iPS kasutusvõimalused

iPS rakuliini loomise üks peamisi eesmärke on inimeste haiguste modelleerimine. Eelkõige selliste haiguste, mida on katseloomadel raske luua ning on tingitud loomade ja inimeste geneetilistest erinevustest. Seetõttu soovitaksegi leida kliiniliste katsete jaoks rakud, mis oleksid kättesaadavad ja lihtsasti reprogrammeeritavad (Vitale et al., 2011). Inimmudelipõhist reprogrammeerimist on katsetatud näiteks patsientidel, kellel esines närvisüsteemi haigus amüelotroofne lateraalne skleroos (ALS). Patsiendi fibroblastid reprogrammeeriti iPS-ideks, mida sai suunata diferentseeruma motoorseteks neuroniteks või astrotsüütideks, et uurida erinevaid haiguse mehhanisme. Selliseid haigusmudeleid, mis põhinevad iPS-idel on loodud veelgi nii monogeensete kui multigeensete haiguste põhiseid. Selline meetod annab võimalusi otsida haigustele uusi ravivõimalusi ning iPS rakuliini loomine aitab lahendada küsimusi pluripotentsuse mehhanismide ja ka inimeste iPS rakuliinidele omase immunogeensuse kohta (Bonaventura et al., 2017).

Lisaks iPS rakkude kasutamisel haiguste mudelite loomisel on nendel potentsiaal ka geeni asendusravis, kus patsiendilt eraldatud rakkudest genereeritakse iPS rakud ning haigust põhjustavat geeni on võimalik asendada terve geeniga. iPS rakk suunatakse diferentseeruma mõjutatud raku alamtüübiks ja seejärel siirdatakse rakud patsiendile tagasi. Raku asendusteraapias on suudetud näiteks beeta-talasseemiaga patsiendi rakk reprogrammeerida iPS rakuliiniks, mida suunati diferentseeruma vereloome rakkudeks, mis tootsid hemoglobiini (Lin Ye et al., 2009). Regeneratiivses meditsiinis kasutatakse iPS rakke kahjustunud või hävinenud kudede ja organite taastamisel. Selles valdkonnas on iPS rakke hakatud kasutama näiteks õnnetuse või haiguse tagajärel tekkinud kahjustuste ravimisel või kudede/organite siirdamisel tekkivate probleemide kõrvaldamisel (Liu et al., 2011). Veel on aga vaja teha lisauuringuid parimate somaatiliste rakkude väljaselgitamiseks, et reprogrammeeritud rakkudel oleks võimalikult stabiilne genoomne ja epigenoomne profiil (Chhabra, 2017).

Üle maailma on hakatud looma iPS rakkude pankasid, mis pakuvad teadlastele kvaliteetseid rakke. iPS rakkude loomine on kulukas protsess ning seetõttu ei suuda paljud laborid neid ise

luua. Loodud rakupangad võimaldavad ligipääsu iPS rakkudele, et neid saaks kasutada ka teaduslikes katsetes. Lisas 1, tabelis L1 on toodud välja mõned hetkel maailma eri paikades olevad iPS rakkude pangad (Huang et al., 2019).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesolev bakalaureusetöö on osaks suuremast cGEM (Centre for Genomics, Evolution and Medicine) projektist, mille üheks eesmärgiks on integratsioonivaba iPS rakuliini loomise võimekuse väljaarendamine. Antud töö eksperimentaalosa eesmärgiks oli testida LCL rakkude repogrammeerimist iPS rakkudeks, kasutades protokoll, mis põhineb varem publitseeritud tulemustel (Okita et al., 2011).

Nimetatud eesmärgi saavutamiseks:

1. Kasvatati, transfecteeriti ja reprogrammeeriti LCL rakuliini kasutades elektroporeerimist plasmiididega, mis kodeerivad transkriptsioonifaktoreid OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, RNA seonduvat valku LIN28 ja p53 vastast shRNAd.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Plasmiidid

Käesolevas töös on kasutatud reprogrammeerimiseks vajalike faktorite rakku viimisel järgmisi plasmide:

- pCXLE-hOCT3/4-shp53-F. Episomaalne plasmiid, mis kodeerib OCT3/4 rerogrammeerimise faktorit ja p53 vastast lühikest juuksenõela RNAd (shRNA).
- pCXLE-hSK. Episomaalne plasmiid, mis kodeerib SOX2 ja KLF4 reprogrammeerimise faktoreid.
- pCXLE-hUL. Episomaalne plasmiid, mis kodeerib L-MYC ja LIN28 reprogrammeerimise faktorit.
- pCXLE-EGFP. Episomaalne plasmiid, mis kodeerib EGFP valku.

2.2.2 Rakuliinid ja söötmed

Töös kasutati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudist saadud LCL rakuliine, mis on Epstein-Barr viirusega immortaliseeritud lümfoblastoidsed B-raku liinid. Rakke kasvatati RPMI 1640 (Corning) söötmes, millele lisati 15% FBS-i (Gibco) ja 2mM L-glutamiini. Iga 3-4 päeva tagant

määrati rakukultuuri tihedus hemotsütomeetriga ning passeeriti rakke tiheduseni $2-5 \times 10^5$ rakku ühes milliliitris. Rakke kasvatati koekultuuri inkubaatoris 37°C, 5% CO₂ sisalduse juures.

48h peale transfektsiooni vahetati rakkudel RPMI sööde kahekomponentse ReproTeSR™ (Stemcell) söötme vastu, mis sisaldab TeSR™-E7™/ReproTeSR™ basaalsel söödet ja 1x ReproTeSR™ lisandit. ReproTeSR™ sööde on toitjarakkude vaba ja loodud rakkude kasvatamiseks indutseeritud pluripotentsete rakkude genereerimiseks.

Indutseeritud pluripotentset tüvirakud passeeriti TeSR™-E8™ (Stemcell) söötmesse, mis koosneb TeSR™-E8™ basaalsest söötimest ning 1x TeSR™-E8™ lisandist. E8 sööde on toitjarakkude vaba ning loodud embrüonaalsete tüvirakkude ja iPS rakkude kasvatamiseks.

2.2.3 Plasmiidide kontrollimine ja plasmiidse DNA eraldamine

Töös kasutatavad plasmiidid telliti Addgene'ist. Agaril saabunud bakterid külvati välja ampitsiliini sisaldavale agarsöötmele. Kasvanud kolooniatest valiti üksik koloonia, mida kasvatati 2 mL LB söötmes (sisaldas 100 µg/ml ampicilliini) loksutil 37°C, 180 rpm juures. Plasmiidide kontrollimiseks tehti esialgu *miniprep*'id ja eraldatud DNA õigsuse kontrolliks restriksioonianalüüs. Antud lõputöö jaoks kasutati plasmiidse DNA eraldamiseks *NucleoBond Xtra Midi* (Macherey-Nagel) komplekti ning *midiprep*'id tehti tootja poolt ette antud protokoll järgi. Bakterisuspensioonist eraldatud DNA kontsentratsioon mõõdeti NanoDrop spektrofotomeetriga (Thermo Scientific).

2.2.4 Restriksioonianalüüs

Eraldatud plasmiidse DNA õigsuse kontrollimiseks teostati restriksioonianalüüs. Restriksioonisegusse pandi 1 µg plasmiidset DNA-d, 0,5 µl EcoRI ensüümi (Thermo Scientific), 2µl 10X EcoRI puhvrit (Thermo Scientific) ja mQ vett lõppruumalani 20 µl. Restriksioonisegu inkubeeriti 37°C juures 1h. Kontrollproovideks kasutati ilma restriksiooniensüümita lõikamata plasmiidse lõppruumalaga 10 µl, mis sisaldas 1µg DNA-d. Proovide edasiseks analüüsimiseks kasutati geelelektroforeesi 1% TBE agarosgeelis. 100 mL geeli valmistamiseks kasutati 0,5X TBE puhvrit ja agarospulbrit, DNA visuliseerimiseks lisati geelile 0,05 µg/µl etiidumbromiidi. Proovidele lisati enne geelile kandmist juurde 2 µl 6x Loading dye-d (Thermo Scientific). Pikkusmarkerina kasutati O'GeneRuler 1kb DNA Ladder markerit (Thermo Scientific). Geelile kanti 12 µl proovi ja 4.5 µl pikkusmarkerit.

Geelektroforees viidi läbi 220V juures 40 min 0,5X TBE puhvris. DNA visualiseeriti UV valgusega ergastades, kasutades Uvipro geeli dokumentatsioonisüsteemi (Uvitec).

2.2.5 Sangeri sekveneerimine

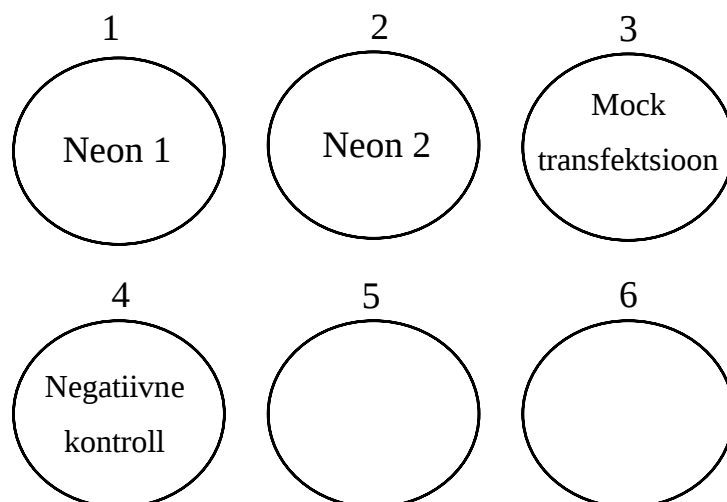
Plasmiidide õigsust kontrolliti lisaks ka Sangeri sekveneerimise meetodil Tartu Ülikooli Genoomika instituudi tuumiklaboris. Saadud sekventsides plasmiidse DNA järjestuse joondamine teostati veebipõhise programmiga Benchling. Sekveneerimisel kasutatud praimerid on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Sangeri sekveneerimisel kasutatud praimerid.

pCAG-F	5' - GCAACGTGCTGGTTATTGTG - 3'
WPRE-R	5' - CATAGCGTAAAAGGAGCAACA -3'

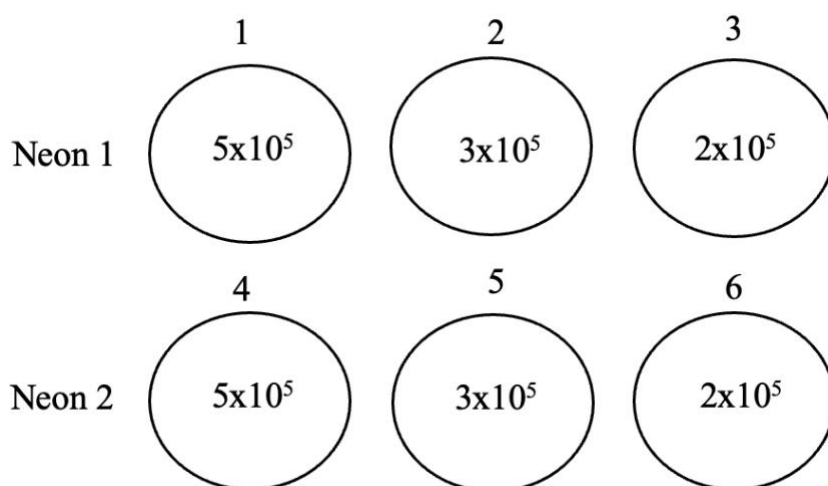
2.2.6 Transfektsioon elektroporatsiooni meetodil

Plasmiidid transfekeeriti rakkudes kasutades elektroporatsioonimasinat Neon[®] Transfection System (Thermo Scientific). Enne LCL rakkude reprogrammeerimise protokoll alustamist tehti transfektsioon kolme LCL rakuliiniga, M59, M60 ja M66, et teada saada, millise rakuliini transfektsiooni efektiivsus on kõige parem. 24h enne transfektsiooni vahetati LCL rakkudel sööde. Järgmisel päeval loendati rakkude tihedus hemotsütoomeetriga, transfektsiooniks vajalik rakkude arv oli 1×10^6 . Rakud tõsteti 50 mL tuubi ning tsentrifuugiti (Eppendorf Centrifuge Sigma 4K15) 185 x g, 5 min parameetritega, toatemperatuuri juures (järgnevalt kehtivad alati samad parameetrid). Rakkudelt aspireeriti sööde, pesti PBS-iga (Lonza) ning tsentrifuugiti. PBS aspireeriti ja rakud suspendeeriti 1 mL resuspensiooni puhvris (R puhver, Thermo Scientific). Rakkudele lisati 1,5 µg plasmiidi. Elektroporatsiooniks võeti 1×10^5 rakku 100 µL ning tehti elektroporatsioon parameetritega 1350 V, 30 ms, 1 pulss (edaspidi Neon 1) ja 1100 V, 30 ms, 1 pulss (edaspidi Neon 2), kasutades Neon[®] Transfection System (Thermo Scientific) masinat. Transfektsiooni efektiivsuse määramise katsel jaotati rakud 6-kannulisele koekultuuri plaadile 3 kannu vastavalt 100 µL (1×10^5) transfekeerimata ja plasmiidideta rakud, 100 µL transfekeeritud ja plasmiidideta rakud, 100 µL Neon 1 parameetritega ning 100 µL Neon 2 parameetritega transfektsioon (joonis 1). 24h peale transfektsiooni kontrolliti EGFP signaali fluorestsentsmikroskoobiga (CellR, Olympus).



Joonis 1. Elektroporatsioonikatse skeem 6-kannulisel koekultuuri plaadil. Neon 1 tähistab 1350 V, 30 ms, 1 pulss parameetritega transfektsiooni. Neon 2 tähistab 1100 V, 30 ms, 1 pulss parameetritega transfektsiooni.

LCL rakkude reprogrammeerimise katsel loendati transfektsiooniks rakud hemotsütomeetriga, kasutades värvimist 1X trüpaansinisega, eristamaks surnud ja elusaid rakke. Rakud tsentrifuugiti, aspireeriti sööde ja pesti PBS-iga. Seejärel tsentrifuugiti, aspireeriti PBS ja suspendeeriti rakud 1 mL resuspensiooni puhvrts (R puhver, Thermo Scientific). Valmistati ette 1,5 mL tuub 0,9 mL RMPI 1640 söödet 2 reaktsiooni jaoks. Rakud tõsteti 100 µl kaupa kahte 1,5 mL tuubi ning mõlemasse tuubi lisati kõik 4 plasmiidi koguses 1,5 µg. Ühe tuubi rakkudega tehti transfektsiooni Neon 1 parameetritega ja teise tuubi rakkudega Neon 2 parameetritega. Peale transfektsiooni pandi rakud ette valmistatud 0,9 mL söötmega tuubi. Mõlema reaktsiooni rakud jaotati 6-kannulisele Matrigeliga (Corning) kaetud koekultuuri plaadile vastavalt, et rakkude tihedused oleksid 5×10^5 , 3×10^5 , 2×10^5 . Erinevate tihedustega rakkude külvamise eesmärk oli määrata LCL rakkude reprogrammeerimiseks optimaalne tihedus (joonis 2). 24h peale transfektsiooni kontrolliti fluorestsentsmikroskoobiga (CellR, Olympus) EGFP signaali.



Joonis 2. Tiheduskatse skeem 6-kannulisel koekultuuri plaadil. Neon 1 (kannud 1-3) tähistab 1350 V, 30 ms, 1 pulss parameetritega transfektsiooni. Neon 2 (kannud 4-6) tähistab 1100 V, 30 ms, 1 pulss parameetritega transfektsiooni.

2.2.7 FACS analüüs

LCL rakkude transfektsiooni efektiivsuse kontrollimiseks tehti 48h peale transfektsiooni FACS analüüs, kasutades läbivoolutsütomeetrit FACSAria I (BD Biosciences), et määrata kindlaks EGFP positiivsete ja negatiivsete rakkude hulk. Rakud pipeteeriti FACS-i tuubidesse läbi sõelaga korgi ja tsentrifuugiti. Sööde aspireeriti, lisati 300 µl 5% FBSi-ga PBS-i (Lonza) ja DAPI (1:2000). Iga proovi kohta tehti positiivne ja negatiivne kontroll (transfekteerimata ja plasmiidideta rakud).

2.2.8 LCL rakkude reprogrammeerimine

LCL rakkude reprogrammeerimine teostati protokoll järgi (Lisa 5), mis on saadud Tartu Ülikooli Genoomika Instituudi vanemteaduri Irene Gallego Romero käest. Protokoll põhineb varem publitseeritud töödel (Stemcell Technologies Erythroid Progenitor reprogramming protocol, LifeTech Epi5 CD34+ reprogramming protocol, Agu et al 2015, Bryan Pavlovic, Wen Ting Tan's reprogramming protocol, Okita et al., 2011). Reprogrammeerimise protokoll pikkus on 25+ päeva.

LCL rakkude reprogrammeerimise esimesel päeval peale transfektsiooni kontrolliti fluorestsentsmikroskoobiga EGFP signaali. Teisel päeval lisati 1 mL RPMI 1640 (Corning) söödet, ilma eelmist söödet eemaldamata. Kolmandal ja viiendal päeval lisati 1 mL ReproTeSR™ (Stemcell) söödet, ilma söödet eemaldamata. Seitsmendal päeval aspireeriti sööde kõikides kannudest ning lisati 2 mL ReproTeSR™ söödet 1 kannu kohta. 8 - 27 päevani

vahetati söödet iga 1-2 päeva tagant, olenevalt söötme pH muutustest ja surnud rakkude hulgast. Igal söötmevahetusel kasutati 2 mL ReproTeSR™ söödet.

2.2.9 iPS rakkude kasvatamine koekultuuris

Tüvirakkudele sarnanevate kolooniate ilmunisel passeeriti kolooniad manuaalselt. Selleks aspireeriti reprogrammeeritud rakkudelt sööde, lisati 1 mL TeSR™-E8™ söödet (Stemcell), kraabiti pipetiotsikuga iPS rakkude kolooniad plaadi küljest lahti ja tõsteti 12-kannulisele Matrigeliga (Corning) kaetud koekultuuri plaadile. Söödet ei vahetatud 24h peale passeerimist, et anda rakkudele rohkem aega kinnitumiseks. Edaspidi vahetati TeSR™-E8™ söödet iga päev. Kui rakud olid saavutanud piisava tiheduse, passeeriti reprogrammeeritavad rakud 0,5 mM EDTA-ga 12-kannulisele plaadile. EDTA-ga passeerimisel pesti kõigepealt rakke PBS-iga ja seejärel inkubeeriti 4-5 min 0,5 mM EDTA-ga. Inkubatsiooni lõppedes aspireeriti rakkudelt sööde ja suspendeeriti TeSR™-E8™ söötmes. Seejärel tõsteti rakud 12-kannulisele Matrigeliga kaetud plaadile. Edaspidi passeeriti rakke iga 5 päeva tagant 6-kannulisele Matrigeliga kaetud koekultuuri plaadile. Peale EDTA-ga passeerimist vahetati rakkudel igapäevaselt TeSR™-E8™ söödet. Rakkude paremaks kinnitumiseks kasutati ROCK inhibiitorit (Y-27632, Stemcell) lahjendusega 1:1000 igal passeerimisel. Teises katses teostati kõik passeerimised peale kolooniate valimist manuaalselt ja kasutati alati ROCK inhibiitorit. Rakkude vaatamiseks kasutati mikroskoopi Nikon SMZ800 ja kaamerasüsteemi DS-L2.

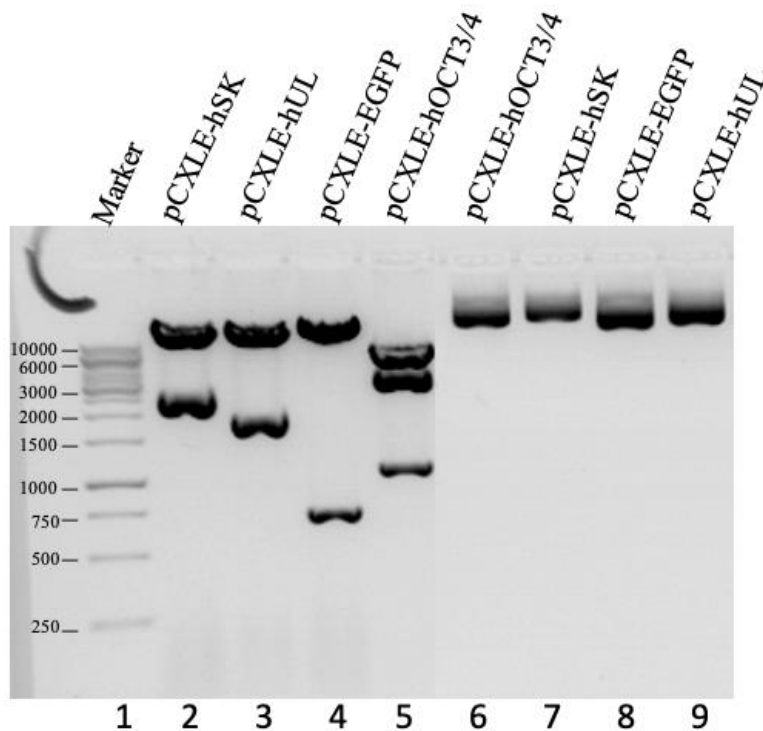
2.3 Tulemused

2.3.1 Plasmiidide restriksioonianalüüs

Eraldatud plasmiidide kontrollimiseks lõigati vastavaid plasmiide EcoRI restriksiooniensüümiga. Joonisel 3 on näha geelelektroforeesil lahutatud EcoRI-ga lõigatud (rajad 2-5) ja lõikamata plasmiidid (rajad 6-9). Addgene'ist saadud sekveneeritud plasmiidi järjestuse põhjal vaadati millistest kohtadest EcoRI restriksiooniensüüm lõikab (Lisa 2, joonis L2) ja leiti oodatavad fragmentide pikkused DNA lõikamisel (Tabel 3). Antud katse geelelektroforeesi tulemus näitas, et kõikide töös kasutatavate plasmiidide DNA fragmendid vastavad peale lõikamist oodatud pikkustele ja bakterisuspensioonist eraldatud plasmiidne DNA on õige. Plasmiidset DNA-d kontrolliti ka Sangeri sekveneerimisega, kasutades pCAG-F ja WPRE-R praimereid. Saadud tulemused joondati avalikult kättesaadava sekveneeritud plasmiidi järjestusega. Sekveneerimise tulemused näitasid, et eraldatud plasmiidide järjestused kattusid oodatavate DNA järjestustega (Lisa 3, joonis L3).

Tabel 3. Plasmiidide suurused (bp) ja EcoRI restriктаasiga lõigatud DNA oodatavad fragmentide pikkused (bp).

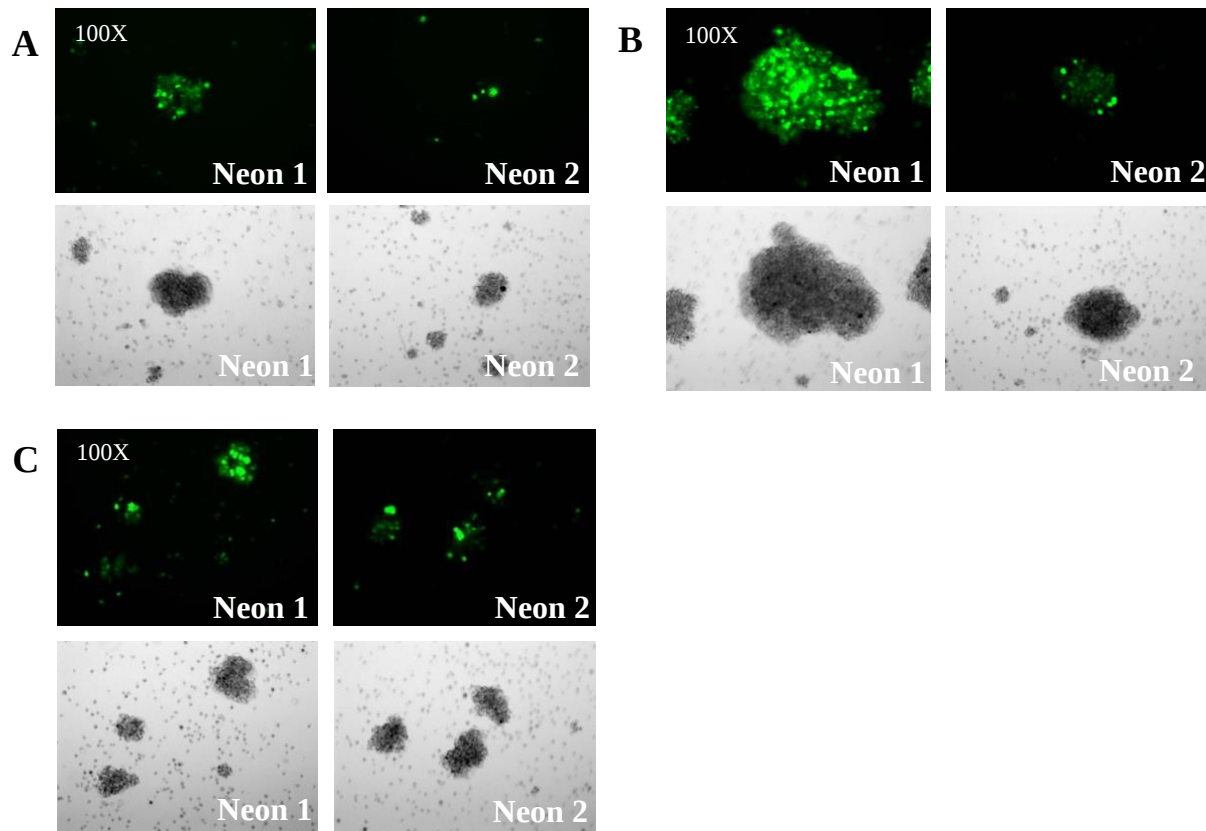
Plasmiid	Plasmiidi suurus	EcoRI ensüümiga lõikamisel oodatud fragmentide pikkused
pCXLE-hSK	12 693 bp	10180 bp 2513 bp
pCXLE-hUL	11 424 bp	9553 bp 1871 bp
pCXLE-EGFP	10 911 bp	10179 bp 732 bp
pCXLE-hOCT3/4-shp53-F	11 681 bp	6834 bp 3739 bp 1108 bp



Joonis 3. Puhastatud plasmiidse DNA restriksioonanalüüs. 1. rajal on suurusmarker (GeneRuler 1 kb). 2-5 rajal on lõigatud plasmiidid EcoRI restriктаasiga. 6-9 rajal on kontrollina lõikamata puhastatud plasmiidid.

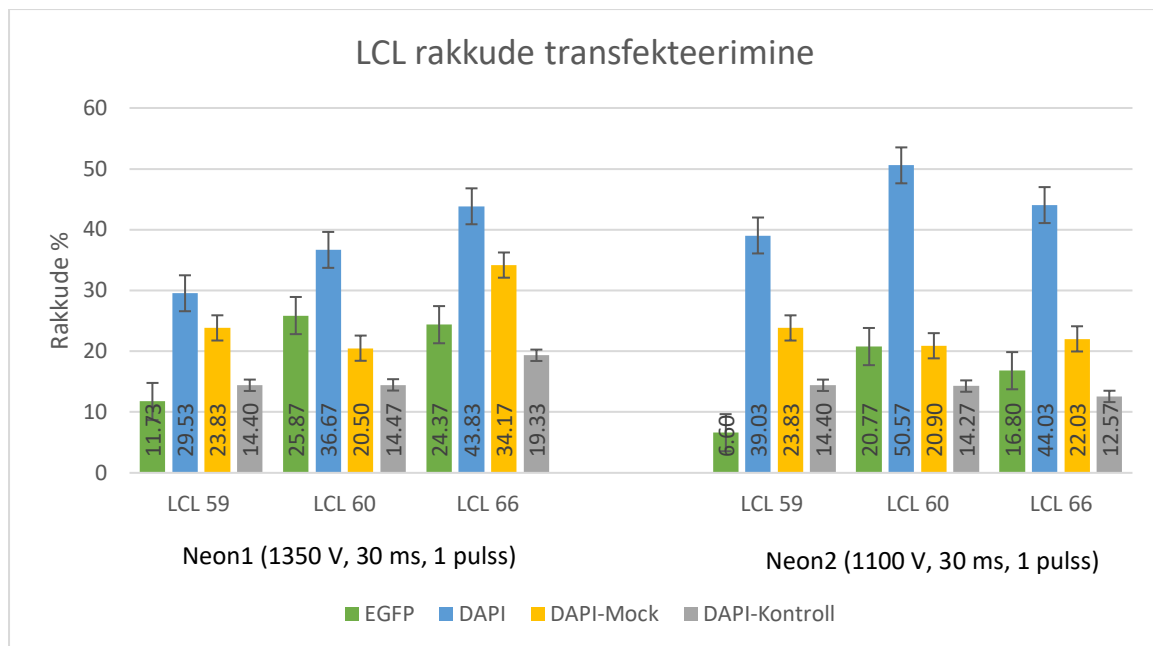
2.3.2 LCL rakkude transfektsiooni efektiivsuse määramine kasutades FACS analüüsi

LCL rakkude reprogrammeerimiseks on vajalik vastavate plasmiidide sisseviimine rakkudesse. Seetõttu teostati kontrollkatsed LCL M59, LCL M60 ja LCL M66 rakuliinidega, et leida sobivad transfektsioonitingimused ja tuvastada, kas rakuliinide vahel erineb transfektsiooni efektiivsus. Selleks viidi läbi transfektsioon elektroporatsiooni meetodil, kasutades parameetreid 1350 V, 30 ms, 1 pulss (Neon 1) ja 1100 V, 30 ms, 1 pulss (Neon 2), kus viidi rakku pCXLE-EGFP plasmiid, mis kodeerib EGFP valku. 48h peale transfektsiooni kontrolliti fluorestsentsmikroskoobiga EGFP fluorestsentsi transfektsiooni toimumise hindamiseks (Joonis 4). Rakkude transfektsiooni efektiivsuse võrdlemiseks tehti 48h peale transfektsiooni FACS analüüs, kus transfektsiooni efektiivsuse hindamiseks analüüsiti EGFP valku ekspresseeritavate rakkude hulka. Lisaks kasutati DAPI-t surnud rakkude tuvastamiseks (Lisa 4, joonis L4). Kontrollina tehti rakkudele *mock* transfektsioon, kus puudus plasmiid. Negatiivse kontrollina kasutati ka transfekteeimata, ilma plasmiiditeta rakke, et võrrelda rakkude suremust transfekteeitud rakkudega. Transfektsiooni katse kõigi kolme LCL rakuliiniga viidi läbi kolm korda ja saadud tulemustest võeti keskmine, mis on esitatud joonisel 5.



Joonis 4. EGFP fluorestsentsi kontroll fluorestsentsmikroskoobiga 48h peale transfektsiooni. A LCL M59 rakuliin. B LCL M60 rakuliin. C LCL M66 rakuliin. Näidatud on nii EGFP signaal (ülemised paneelid) kui ka valges valguses visualiseeritud rakud (alumised paneelid). Kõik pildid on tehtud 100x suurendusega.

LCL M59 rakuliini keskmiseks transfektsiooni efektiivsuseks saadi Neon 1 transfektsiooniga 11,73% ja Neon 2 transfektsiooniga 6,60%. Surnud rakkude osakaal oli Neon 2 transfektsioonis suurem kui Neon 1 transfektsiooniga. LCL M60 rakuliini keskmiseks transfektsiooni efektiivsuseks saadi 25,87% Neon 1 transfektsiooniga ja 20,77% Neon 2 transfektsiooniga. Surnud rakkude protsent oli Neon 2 parameetritega suurem kui Neon 1 puhul. LCL M66 transfektsiooni keskmiseks efektiivsuseks saadi 24,37% Neon1 transfektsiooniga ja 16,80 % Neon 2 transfektsiooniga. Surnud rakkude protsent oli sellel rakuliinil mõlemate parameetritega transfektsioonil samaväärne. Kõikide LCL rakkude suremust suurendas plasmiidide sisseviimine rakkudesse, kuna transfekteeeritud rakkude suremus oli kõrgem võrreldes *mock* transfektsiooni läbinud rakkudega.

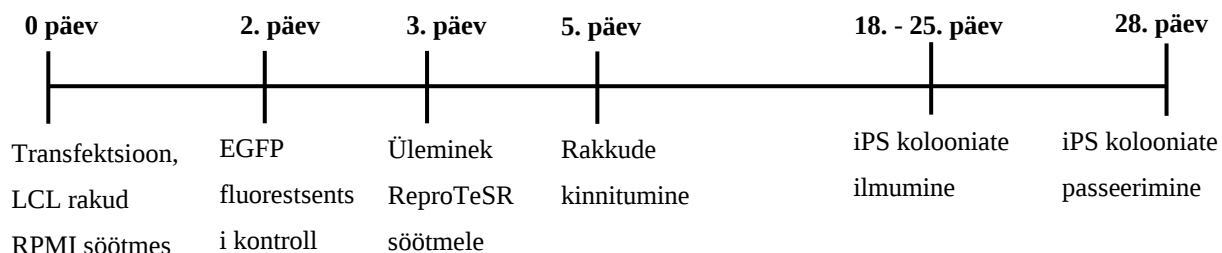


Joonis 5. LCL rakkude kolme katse keskmine transfektsiooni efektiivsus. EGFP näitab transfektsiooni efektiivsust, DAPI-ga vaadati surnud rakkude protsenti. *Mock* transfektsioon näitab surnud rakkude protsenti transfekteeeritud kuid ilma plasmiidideta rakkude puhul. Kontrolliks kasutati transfekteeerimata rakke. Andmed on esitatud koos standardhälbega.

Transfektsiooni efektiivsuse hindamise katse kolme rakuliini vahel näitas, et kõige kõrgem oli transfektsiooni efektiivsus LCL M60 rakuliiniga ja kõige madalam LCL M59 rakuliiniga. Lähtudes eelnevatest tulemustest, valiti LCL rakkude reprogrammeerimisel iPS rakkudeks LCL M60 rakuliin, millel oli Neon 1 parameetritega transfektsiooni efektiivsus pCXLE-EGFP plasmiidiga kõige kõrgem.

2.3.3 LCL rakkude reprogrammeerimine iPS rakkudeks

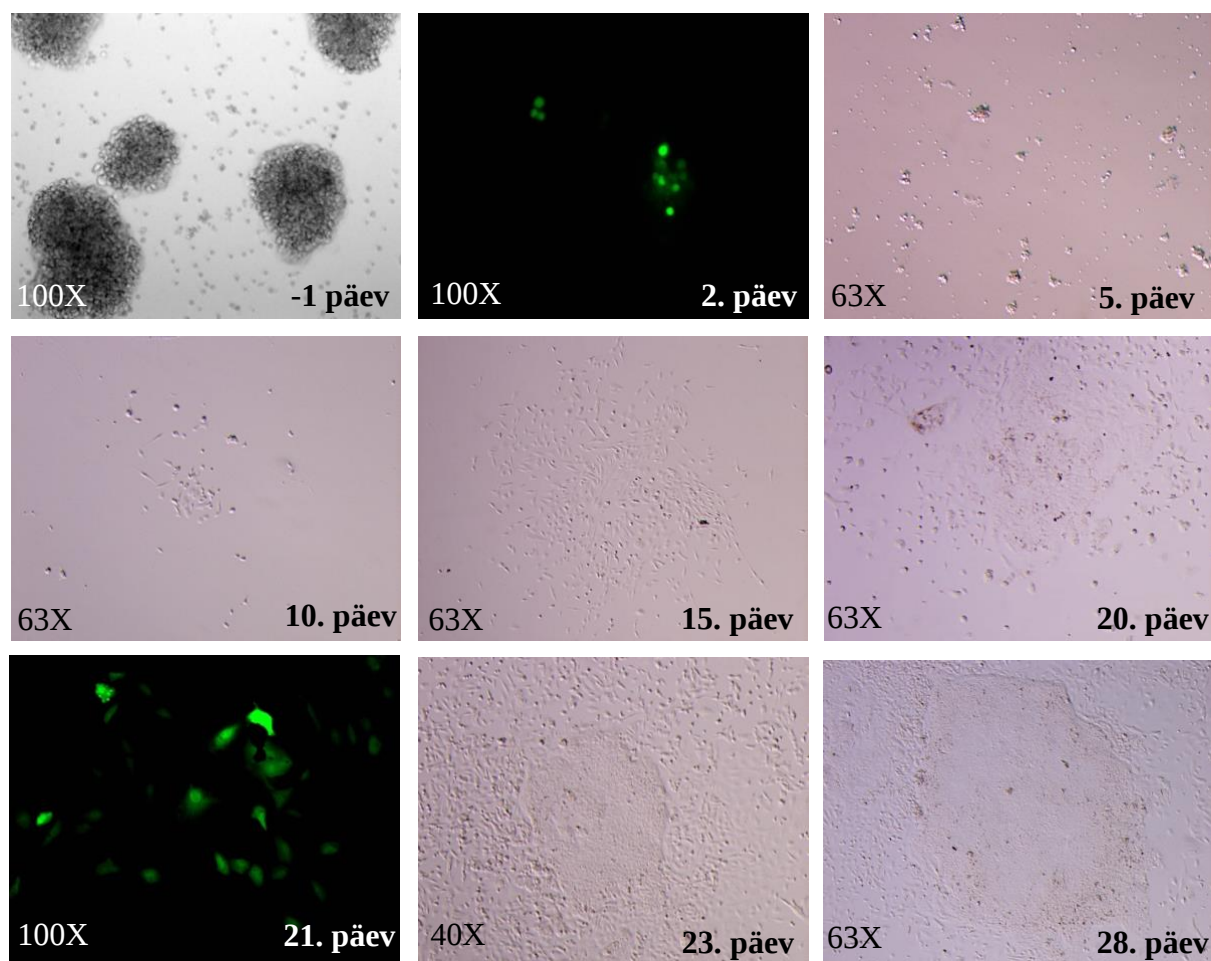
LCL M60 rakuliini reprogrammeerimine iPS rakkudeks teostati vastavalt LCL rakkude reprogrammeerimise protokollile. Antud katse, alates transfektsioonist kuni esimeste iPS kolooniate passeerimiseni, kestis kokku 28 päeva (Joonis 6).



Joonis 6. Skemaatiline diagramm LCL rakkude reprogrammeerimisest iPS rakkudeks.

Joonisel on näidatud LCL M60 rakuliini reprogrammeerimise olulisemad etapid alates LCL rakkude transfekteerimisest kuni esimeste iPS kolooniate passeerimiseni.

LCL rakud on morfoloogialt ümarad ja kasvavad klompidena (Joonis 7, -1 päev). Reprogrammeerimise esimestel päevadel oli näha LCL rakkudele omaseid kogumikke kui ka üksikuid rakke. 48h peale transfektsiooni vaadati EGFP signaali fluorestsentsmikroskoobiga, kus nähti kõikides koekultuuri plaadi kannudes EGFP signaali (Joonis 7, 2. päev), mis näitab, et transfektsioon oli õnnestunud ja plasmiidid rakku sisenenud. 5. päeval (Joonis 7, 5. päev) hakati täheldama üksikute rakkude kinnitumist plaadile. Esimene söötmevahetus tehti 7. päeval. Peale söötmevahetust võis täheldada, et osad rakud olid oma kujult muutunud piklikumaks ja hakanud moodustama jätkeid (Joonis 7, 10. päev). Neon 1 transfektsiooniga kannudes oli kõige rohkem muutunud rakke 5×10^5 ja 3×10^5 tiheduse juures. Neon 2 transfektsiooniga kannudes toimusid rakkude morfoloogilised muutused hiljem kui Neon 1 transfektsiooniga kannudes, mis võib olla tingitud sellest, et nende parameetritega on transfektsiooniefektiivsus madalam. 15. päeval oli näha suuri rakkude kogumikke, kus oli erineva morfoloogiga rakke (Joonis 7, 15. päev). 20. päevaks olid tekkinud selgelt piiritlemata rakkude kogumikud (Joonis 7, 20. päev). 21. päeval vaadati rakke fluorestsentsmikroskoobi all ja kontrolliti EGFP signaali, mis oli endiselt tugevalt olemas (Joonis 7, 21. päev). 23. päeval oli näha rakkude kogumikke, mis hakkasid meenutama tüvirakulaadseid kolooniaid. 28. päevaks olid kolooniad kasvanud suuremaks ja olid valmis passeerimiseks.



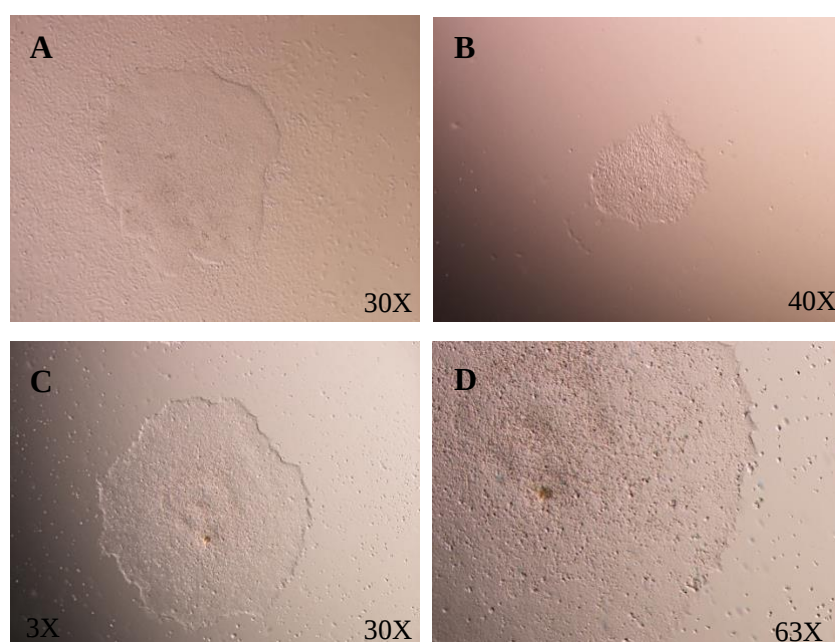
Joonis 7. LCL rakkude reprogrammeerimine iPS rakkudeks. Joonisel on toodud pildid alates üks päev enne rakkude transfecteerimist kuni 28. päevani, kui olid moodustunud esimesed iPS kolooniad. 2. ja 21. päeva pildid on tehtud fluorestsentsmikroskoobiga EGFP signaali kontrollimiseks.

Erineva tihedusega väljakulvatud rakkude võrdluses selgus, et kõige rohkem tekkis iPS kolooniaid 5×10^5 tiheduse juures, 9 iPS rakkude kolooniat 1 kannu kohta. Tabelis 4 on võrreldud tekkinud tüvirakusarnaste kolooniate arvu Neon 1 ja Neon 2 parameetrite ja erinevate tiheduste juures. Rohkem tekkis iPS kolooniaid nendest LCL rakkudest, mille transfectsioon oli tehtud Neon 1 parameetritega. Neon 2 parameetritega transfecteeritud rakkude reprogrammeerumine oli aeglasem ning rakkude suremus oli suurem kui Neon 1 parameetritega transfecteeritud rakkudes.

Tabel 4. Reprogrammeerimise efektiivsuse sõltumine transfektsiooni efektiivsusest ja rakkude tihedusest 1 kannu kohta. Tabelis on toodud reprogrammeerimisel saadud kolooniate arv vastavalt rakkude tihedusele ja transfektsioonil kasutatud parameetritele.

	Neon1	Neon2
5×10^5	9	2
3×10^5	6	0
2×10^5	2	0

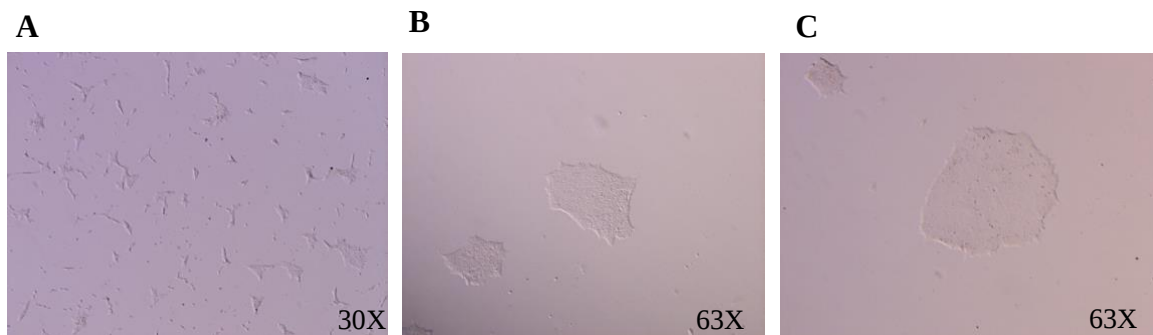
LCL rakkude reprogrammeerimise protokoll järgi tuleb iPS kolooniad manuaalselt passeerida E8 söötmesse. Alates reprogrammeerimise 28. päevast hakati iPS rakkude kolooniaid manuaalselt uutesse kannudesse passerima. Uuele koekultuuri plaadile passeeriti ainult sellised kolooniad, mis olid morfoloogialt kõige sarnasemad tüvirakkudele (Joonis 8). Kokku passeeriti algselt 18 kolooniat.



Joonis 8. iPS rakud enne ja pärast manuaalset passeerimist. Visualiseerimisel kasutati suurendamiseks mikroskoopi SMZ800 (Nikon). A iPS koloonia enne manuaalset passeerimist. B iPS koloonia 3 päeva peale passeerimist. C ja D iPS kolooniad 6 päeva peale passeerimist.

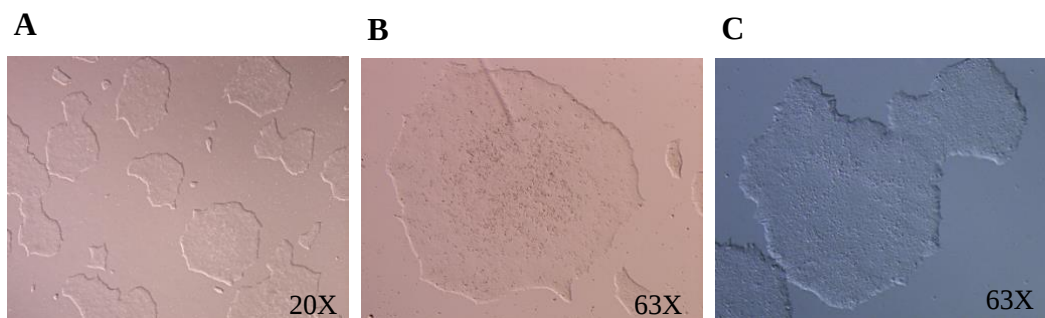
Antud katsetele aluseks võetud LCL rakkude reprogrammeerimise protokollis oli öeldud, et edasi tuleb rakke kasvatada E8 söötmes. Täpsemate juhiste puudumisel lähtuti edasise rakkude kasvatamisel samadest põhimõtetest nagu kasvatatakse embrüonaalseid tüvirakke, kasutades

rakkude passeerimiseks 0,5mM EDTA-d (Joonis 9). Peale igat iPS rakkude passeerimist oli rakkude suremus väga kõrge ja ainult väike osa rakkudest kinnitus plaadile. Antud katse rakud surid peale viiendat passeerimist, kui ei kaustatud enam ROCK inhibiitorit. Konsulteerides dr Irene Galleo Romeroga, kellel on iPS rakkude tegemise kogemus antud protokolliga kasutades, selgus, et rakke tuleks peale kolooniate eraldamist passeerida 10 korral manuaalselt ja alati tuleb kasutada ROCK inhibiitorit.



Joonis 9. iPS rakud peale EDTAga passeerimist. A iPS rakud 1 päev peale passeerimist. **B** iPS rakud 3 päeva peale passeerimist. **C** iPS rakud 5 päeva peale passeerimist.

Kuna LCL M60 rakuliiniga reprogrammeerimise katses saadud kõik iPS rakud surid, alustati teise katsega, kus reprogrammeeriti LCL M59, LCL M60 ja LCL M66 rakuliinid. Teise katsega taheti võrrelda kas kolme rakuliini reprogrammeerimise efektiivsuses esineb erinevusi olenemata sellest, et transfektsiooni efektiivsus oli LCL M59 ja LCL M66 liinidel madalam kui LCL M60 liinil. Teises katses kasutati sama protokolliga, mida kasutati esimeses katses, kuid eelnevate katsete põhjal saadud tulemusi aluseks võttes, tehti iga rakuliini transfektsioon ainult Neon 1 parameetritega ja rakud külvati plaadile üksnes 5×10^5 tihedusega ühe kannu kohta. Sellel katsel täheldati, et juba neljandal päeval toimus rakkude morfoloogias muutusi. Esimesed iPS kolooniad olid passeerimiseks valmis juba 18. päeval peale transfektsiooni. Kõige halvema reprogrammeerimise efektiivsusega oli LCL M59 rakuliin, millel oli ka transfektsiooni efektiivsus kõige madalam. Samas oli LCL M66 rakuliin väga hea reprogrammeerimise efektiivsusega. Selle puhul tekkis 20+ kolooniat, mis oli oluliselt rohkem kui LCL M60 rakuliini puhul. Teises katses külvati edasi kokku 30 kolooniat, millest kolmandaks passaažiks jäid ellu 7. Selleks ajaks kasvasid allesjäänud rakud hästi ja olid embrüonaalsetele tüvirakkudele omase morfoloogiaga (Joonis 10). Lõputöö esitamise ajaks ei olnud antud katses iPS rakkude passeerimiste arv ega ka rakkude hulk piisav, et teha FACS analüüs pluripotentsuse analüüsiks.



Joonis 10. iPS ja H9 inimese embrüonaalse tüviraku liini võrdlus. A ja B LCL M60 rakuliin reprogrammeeritud iPS rakkudeks. C Võrdluseks kasutatud H9 inimese embrüonaalset tüviraku liini. iPS rakud sarnanevad morfoloogialt ES rakuliiniga.

2.4 Arutelu

Antud töös loodud iPS rakkude morfoloogia võrdluseks kasutati H9 inimese embrüonaalset tüviraku liini (saadud TÜMRI vanemlaborant Annika Treilt). ES rakke iseloomustab kompaktne koloonia, millel on kindel määratletud piir ja teravatipulised koloonia ääred. Samad tunnused esinesid ka iPS kolooniatel.

LCL M60 rakuliini reprogrammeerimises tehti tiheduskatse, mis näitas, et kõige parem elulemus ja reprogrammeerimise efektiivsus saadi rakkudega, mis olid külvatud 5×10^5 tihedusega 1 kannu kohta. 2×10^5 tihedus 1 kannu kohta oli liiga madal reprogrammeerimiseks, kuna hõreda tiheduse juures on rakkude suremus suurem. Lisaks võrreldi omavahel 1350 V, 30 ms, 1 pulss (Neon 1) ja 1100 V, 30 ms, 1 pulss (Neon 2) transfektsiooni parameetreid. Transfektsiooni efektiivsuse analüüsimisel FACS andmete põhjal saadi antud töös parim keskmine transfektsiooni efektiivsus 25,8 % Neon 1 parameetreid ja LCL M60 rakuliini kasutades.

iPS rakkude passerimiseks kasutatakse nii ensümaatilist kui ka mitteensümaatilist meetodit. Antud töös kasutati esimeses reprogrammeerimise katses passeerimiseks EDTA-d ja teises katses manuaalset meetodit. Teine katse näitas, et reprogrammeerimise faasis on rakkudele parem manuaalne passeerimine, tagades nii madalama suremuse. Varasemates töödes on iPS rakke enne nende analüüsimist passeeritud 3-5 korda (Kumar et al., 2020), kuid ka üle kümne korra (Choi et al., 2011). Antud protokollil alusel tuleks rakke peale kolooniate edasikülvamist passeerida manuaalselt 10 korda, mis tagaks võimalikult puhta kultuuri, kuna iPS rakkudel säilib mingil määral veel epigeneetiline mälu (Vaskova et al., 2013), kuid mida pikema perioodi vältel rakke kasvatada, seda enam epigeneetiline mälu kustub. Peale 10. passeerimist

peaks iPS rakkudest kadunud olema ka plasmiidid. Reprogrammeerimise käigus peaks plasmiidide kontsentratsioon peale igat raku jagunemist vähenema. Selle analüüsimiseks tuleks teha PCR, kus kasutatakse praimereid, mis vastavad plasmiidse DNA järjestusele, ja antud metoodikat kasutades analüüsida, kas plasmiidne DNA on reprogrammeerumise käigus integreerunud genoomi. Peale seda võib analüüsida pluripotentsuse markerite ekspressiooni, kasutades FACS analüüsi. Lisaks tuleks teha *in vitro* diferentseerimise katseid, et kinnitada iPS rakkude pluripotentset arengupotentsiaali. Saadud iPS rakuliinid saab külmutada, et neid oleks võimalik kasutada edasistes katsetes.

iPS rakkude suur suremus peale passeerimist võib olla tingitud sellest, et oma morfoloogialt meenutavad nad küll ES rakke, kuid tegelikult pole need veel täielikult ümberprogrammeerunud või pole iPS rakud. Varasemates töödes on rakkude selekteerimiseks kasutatud TRA-1-81 värvimist, mis aitab eristada ainult täielikult reprogrammeerunud rakke (Kumar et al., 2020). Teises katses saadud ES rakke meenutavate kolooniatega saadud iPS rakud annavad lootust, et LCL rakkude reprogrammeerimine iPS rakkudeks on õnnestunud, kuid selle lõplik kinnitamine vajab veel lisakatseid.

KOKKUVÕTE

Antud lõputöö eesmärk oli testida protokoll LCL rakkude reprogrammeerimiseks iPS rakkudeks ning selle järgi luua integratsioonivaba indutseeritud pluripotentne tüvirakuliin. Lisaks leiti katsete tegemise käigus rakkude reprogrammeerimiseks optimaalsed rakkude transfektsiooni parameetrid ja külvamise tihedus. LCL rakkude reprogrammeerimiseks kasutati OCT4, SOX2, KLF4 ja L-MYC transkriptsioonifaktoreid, RNA seonduvat valku LIN28 ja p53 vastast shRNAd, mida kodeerivad plasmiidid viidi rakku transfektsiooniga elektroporatsiooni meetodil.

Antud lõputöös tehtud katsete põhjal selgus, et elektroporatsiooni parameetrid 1350 V, 30 ms, 1 pulss ja 5×10^5 rakkude tihedus 1 kannu kohta on efektiivsed LCL rakkude reprogrammeerimiseks. Samuti leiti, et iPS rakkude kolooniate passeerimiseks on rakkude suurema elulemuse saavutamiseks parem eelistada manuaalset passeerimist ensümaatilisele passeerimisele. Saadud iPS kolooniatega ei jõutud saavutada piisavalt suurt passaažide arvu ning tihedust pluripotentsuse markerite analüüsiks. Selleks, et näidata saadud iPS rakkude sarnasust ES rakkudega võrreldi neid inimese ES rakuliiniga H9. Võrdlemine morfoloogia põhjal näitas, et iPS rakud on kõikide morfoloogiliste tunnuste poolest sarnased ES rakkudele ja H9 rakuliinile. Sellest võib järeldada, et töös kasutatud reprogrammeerimise protokoll järgi on võimalik LCL rakke iPS rakkudeks reprogrammeerida.

Käesoleva lõputöö katsetes saadud iPS rakkudega tuleb teha veel täiendavaid katseid pluripotentsusmarkerite analüüsiks ja iPS rakkude pluripotentse arengupotentsiaali kinnitamiseks. Seejärel on võimalik iPS rakud külmutada, et kasutada neid tulevikus edasistes katsetes.

Creation of induced pluripotent stem cells from LCL cells

Laura Liivand

Summary

Induced pluripotent stem cells (iPS cells) are created from somatic cells, which have to be reprogrammed to look and act like embryonic stem cells. iPS cells were first described by Shinya Yamanaka in 2006. He discovered a combination of transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4 and L-Myc), which were used to reprogram mouse fibroblast cells into iPS cells using retrovirus vectors to introduce the transcription factors into the cells. Similarly to embryonic stem cells, iPS cells are capable of limitless self-renewal and developing into all three germ layers: mesoderm, endoderm or ectoderm. The discovery of iPS cells has been a big breakthrough in science. They can be used to create disease models, to find new pharmaceuticals and have huge potential in regenerative medicine. Patient-specific stem cells can be created from iPS cells, preventing unwanted response from the immune system.

The aim of this study was to test the reprogramming of LCL cells to iPS cells using a previously published protocol. Reprogramming lasted approximately one month and during this time changes in cell morphology and cell mortality were monitored. LCL cells reprogramming experiment was performed twice.

The experiments performed in this research concluded that transfection parameters 1350V, 30ms, 1 pulse and cell density of 5×10^5 were effective for reprogramming of LCL cells. Furthermore, manually passaged iPS cell colonies had better survival than after enzymatic passaging. Due to low passage number and low density of iPS cells FACS analysis of pluripotency markers could not be performed. The induced pluripotent stem cells were compared to human embryonic stem cell line H9. When compared by morphology, these iPS cells looked similar to H9 cell line. This suggests that using this particular protocol LCL cells can be reprogrammed to iPS cells.

iPS cells created during this research need further tests to analyze pluripotency markers and to confirm pluripotency of these iPS cells. After these tests, the cells can be frozen to be used in future experiments.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid, Rita Kreevanit ja Tõnis Orgu, kes olid valmis alati kõikidele tekkinud küsimustele vastama ning õpetasid ja suunasid mind kogu lõputöö tegemise ajal. Tänan vanemlaborant Annika Treid, kes õpetas koekultuuris töötamist ja aitas katsete läbiviimisega. Lisaks soovin tänada oma laborikaaslast Maria-Elizabeth Vaigot, kes aitas alati hea nõuga ja oli valmis aruteludeks.

KIRJANDUSE LOETELU

- Al Abbar, A., Ngai, S. C., Nograles, N., Alhaji, S. Y., & Abdullah, S. (2020a). Induced pluripotent stem cells: Reprogramming platforms and applications in cell replacement therapy. *BioResearch Open Access*, 9(1), 121–136.
- Al Abbar, A., Ngai, S. C., Nograles, N., Alhaji, S. Y., & Abdullah, S. (2020b). Induced pluripotent stem cells: Reprogramming platforms and applications in cell replacement therapy. *BioResearch Open Access*, 9(1), 121–136.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C. M., Juhr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P. J., Epstein, J. A., & others. (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 8(4), 376–388.
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., & others. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125(2), 315–326.
- Bonaventura, G., Barcellona, M. L., Rosario, I., & Cavallaro, S. (2017). Induced pluripotent stem cells: An innovative patient-specific neurodegenerative disease modeling. *J Stem Trans Biol*, 2, 112.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., & others. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6), 947–956.
- Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2011). Biology of stem cells: An overview. *Kidney International Supplements*, 1(3), 63–67.

- Chappell, J., & Dalton, S. (2013). Roles for MYC in the establishment and maintenance of pluripotency. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(12), a014381.
- Chhabra, A. (2017). Derivation of human induced pluripotent stem cell (iPSC) lines and mechanism of pluripotency: Historical perspective and recent advances. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(6), 757–773.
- Choi, S. M., Liu, H., Chaudhari, P., Kim, Y., Cheng, L., Feng, J., Sharkis, S., Ye, Z., & Jang, Y.-Y. (2011). Reprogramming of EBV-immortalized B-lymphocyte cell lines into induced pluripotent stem cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 118(7), 1801–1805.
- Dodsworth, B. T., Hatje, K., Rostovskaya, M., Flynn, R., Meyer, C. A., & Cowley, S. A. (2020). Profiling of naïve and primed human pluripotent stem cells reveals state-associated miRNAs. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9.
- Eguchi, T., & Kuboki, T. (2016). Cellular reprogramming using defined factors and microRNAs. *Stem Cells International*, 2016.
- Esteban, M. A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., Li, W., Weng, Z., Chen, J., Ni, S., & others. (2010). Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 6(1), 71–79.
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156.
- Feschotte, C. (2006). The piggyBac transposon holds promise for human gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), 14981–14982.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 85(8), 348–362.

- Ghaleb, A. M., & Yang, V. W. (2017). Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene*, 611, 27–37.
- Gurdon, J. B. (1962). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental Biology*, 4(2), 256–273.
- Hawkins, R. D., Hon, G. C., Lee, L. K., Ngo, Q., Lister, R., Pelizzola, M., Edsall, L. E., Kuan, S., Luu, Y., Klugman, S., & others. (2010). Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell*, 6(5), 479–491.
- Huang, C.-Y., Liu, C.-L., Ting, C.-Y., Chiu, Y.-T., Cheng, Y.-C., Nicholson, M. W., & Hsieh, P. C. (2019). Human iPSC banking: Barriers and opportunities. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 1–14.
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A. E., & Melton, D. A. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature Biotechnology*, 26(7), 795–797.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., & Melton, D. A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnology*, 26(11), 1269–1275.
- Jia, F., Wilson, K. D., Sun, N., Gupta, D. M., Huang, M., Li, Z., Panetta, N. J., Chen, Z. Y., Robbins, R. C., Kay, M. A., & others. (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nature Methods*, 7(3), 197–199.
- Kumar, S., Curran, J. E., Espinosa, E. C., Glahn, D. C., & Blangero, J. (2020). Highly efficient induced pluripotent stem cell reprogramming of cryopreserved lymphoblastoid cell lines. *Journal of Biological Methods*, 7(1).
- Kumari, D. (2016). *States of pluripotency: Naïve and primed pluripotent stem cells* (Vol. 1). IntechOpen.

- Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Zeng, Z., Shu, Y., Wu, X., & others. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes & Diseases*, 4(2), 43–63.
- Leonardo, T. R., Schultheisz, H. L., Loring, J. F., & Laurent, L. C. (2012). The functions of microRNAs in pluripotency and reprogramming. *Nature Cell Biology*, 14(11), 1114–1121.
- Li, W., Zhou, H., Abujarour, R., Zhu, S., Young Joo, J., Lin, T., Hao, E., Schöler, H. R., Hayek, A., & Ding, S. (2009). Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem Cells*, 27(12), 2992–3000.
- Lin, T., Ambasudhan, R., Yuan, X., Li, W., Hilcove, S., Abujarour, R., Lin, X., Hahm, H. S., Hao, E., Hayek, A., & others. (2009). A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nature Methods*, 6(11), 805–808.
- Lin, T., & Wu, S. (2015). Reprogramming with small molecules instead of exogenous transcription factors. *Stem Cells International*, 2015.
- Liu, H., Kim, Y., Sharkis, S., Marchionni, L., & Jang, Y.-Y. (2011). In vivo liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins. *Science Translational Medicine*, 3(82), 82ra39–82ra39.
- Lo, B., & Parham, L. (2009). Ethical issues in stem cell research. *Endocrine Reviews*, 30(3), 204–213.
- Marson, A., Foreman, R., Chevalier, B., Bilodeau, S., Kahn, M., Young, R. A., & Jaenisch, R. (2008). Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 3(2), 132.

- Medvedev, S., Shevchenko, A., & Zakian, S. (2010). Induced pluripotent stem cells: Problems and advantages when applying them in regenerative medicine. *Acta Naturae (Англоязычная Версия)*, 2(2 (5)).
- Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D. L., Kano, Y., Nishikawa, S., Tanemura, M., Mimori, K., Tanaka, F., & others. (2011). Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell*, 8(6), 633–638.
- Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151), 313–317.
- Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., & others. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods*, 8(5), 409–412.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 322(5903), 949–953.
- Omole, A. E., & Fakoya, A. O. J. (2018). Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: Historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *PeerJ*, 6, e4370.
- Pan, G., & Thomson, J. A. (2007). Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research*, 17(1), 42–49.
- Polo, J., Anderssen, E., Walsh, R., Schwarz, B., Nefzger, C., Lim, S., Borkent, M., Apostolou, E., Alaei, S., Cloutier, J., & others. (2012). Defining a molecular roadmap of cellular reprogramming into iPS cells. *Cell*.
- Ponger, L., Duret, L., & Mouchiroud, D. (2001). Determinants of CpG islands: Expression in early embryo and isochore structure. *Genome Research*, 11(11), 1854–1860.

- Romito, A., & Cobellis, G. (2016). Pluripotent stem cells: Current understanding and future directions. *Stem Cells International*, 2016.
- Rubin, H. (2002). Promise and problems in relating cellular senescence in vitro to aging in vivo. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34(3), 275–286.
- Shao, L., & Wu, W.-S. (2010). Gene-delivery systems for iPS cell generation. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(2), 231–242.
- Shi, Y., Desponts, C., Do, J. T., Hahm, H. S., Schöler, H. R., & Ding, S. (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 3(5), 568–574.
- Singh, V. K., Kumar, N., Kalsan, M., Saini, A., & Chandra, R. (2015). Mechanism of induction: Induced pluripotent stem cells (iPSCs). *Journal of Stem Cells*, 10(1), 43.
- Soufi, A., Donahue, G., & Zaret, K. S. (2012). Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell*, 151(5), 994–1004.
- Subramanyam, D., Lamouille, S., Judson, R. L., Liu, J. Y., Bucay, N., Derynck, R., & Blelloch, R. (2011a). Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 29(5), 443–448.
- Subramanyam, D., Lamouille, S., Judson, R. L., Liu, J. Y., Bucay, N., Derynck, R., & Blelloch, R. (2011b). Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 29(5), 443–448.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861–872.

- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(3), 183.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147.
- Van Den Hurk, M., Kenis, G., Bardy, C., Van Den Hove, D. L., Gage, F. H., Steinbusch, H. W., & Rutten, B. P. (2016). Transcriptional and epigenetic mechanisms of cellular reprogramming to induced pluripotency. *Epigenomics*, 8(8), 1131–1149.
- Vaskova, E., Stekleneva, A., Medvedev, S., & Zakian, S. (2013). “Epigenetic memory” phenomenon in induced pluripotent stem cells. *Acta Naturae (Англоязычная Версия)*, 5(4 (19)).
- Vitale, A. M., Wolvetang, E., & Mackay-Sim, A. (2011). Induced pluripotent stem cells: A new technology to study human diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(6), 843–846.
- Wei, Z., Yang, Y., Zhang, P., Andrianakos, R., Hasegawa, K., Lyu, J., Chen, X., Bai, G., Liu, C., Pera, M., & others. (2009). Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming. *Stem Cells*, 27(12), 2969–2978.
- Wen, B., Wu, H., Shinkai, Y., Irizarry, R. A., & Feinberg, A. P. (2009). Large organized chromatin K9-modifications (LOCKs) distinguish differentiated from embryonic stem cells. *Nature Genetics*, 41(2), 246.
- Ye, Lei, Swingen, C., & Zhang, J. (2013). Induced pluripotent stem cells and their potential for basic and clinical sciences. *Current Cardiology Reviews*, 9(1), 63–72.

- Ye, Lin, Chang, J. C., Lin, C., Sun, X., Yu, J., & Kan, Y. W. (2009). Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(24), 9826–9830.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 324(5928), 797–801.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., & others. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917–1920.
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 1–22.
- Zhang, J., Ratanasirintrawoot, S., Chandrasekaran, S., Wu, Z., Ficarro, S. B., Yu, C., Ross, C. A., Cacchiarelli, D., Xia, Q., Seligson, M., & others. (2016). LIN28 regulates stem cell metabolism and conversion to primed pluripotency. *Cell Stem Cell*, 19(1), 66–80.
- Zhang, S., & Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 305.
- Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z., & others. (2008). Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*, 3(5), 475–479.

LISAD

LISA 1. iPS rakkude pangad.

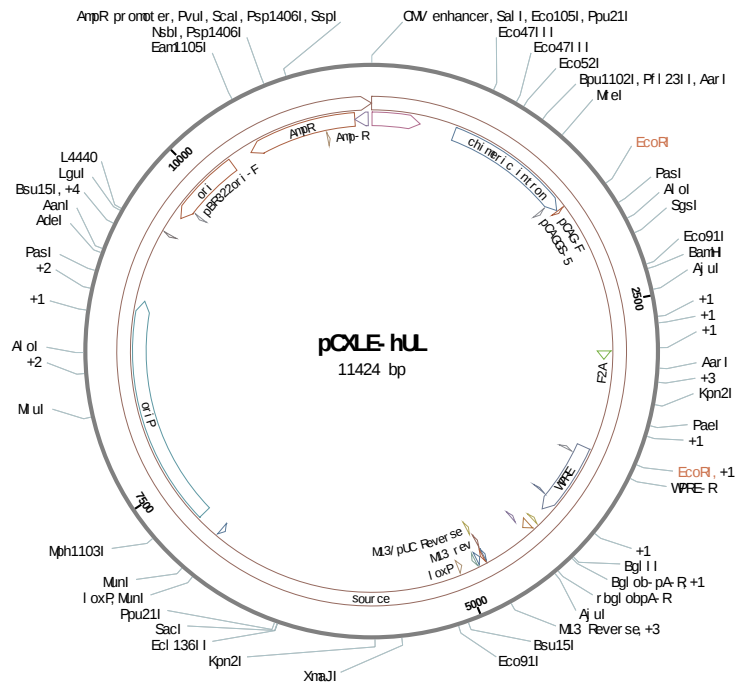
Tabel L1. iPS rakkude pangad. Tabelis on toodud üksuste nimed ja nende asukohad, kes tegelevad iPS rakkude pankade loomisega. Tabel pole lõplik. (Kohandatud Huang et al., 2019)

European Bank for induced pluripotent Stem Cells	Euroopa
Center for iPS Cell Research and Application	Jaapan
California regeneratiivse meditsiini instituut	USA
Coriell Institute for Medical Research	USA
Fujifilm Cellular Dynamics International	USA
Human Induced Pluripotent Stem Cell Initiative	UK
Human Disease iPSC Consortium Resource Center (Taiwan Human Disease iPSC Consortium)	Taiwan
Institute of Physical and Chemical Research	Jaapan
Korean National Stem Cell Bank	Korea
WiCell Research Institute	USA

LISA 2. Töös kasutatud plasmiidid

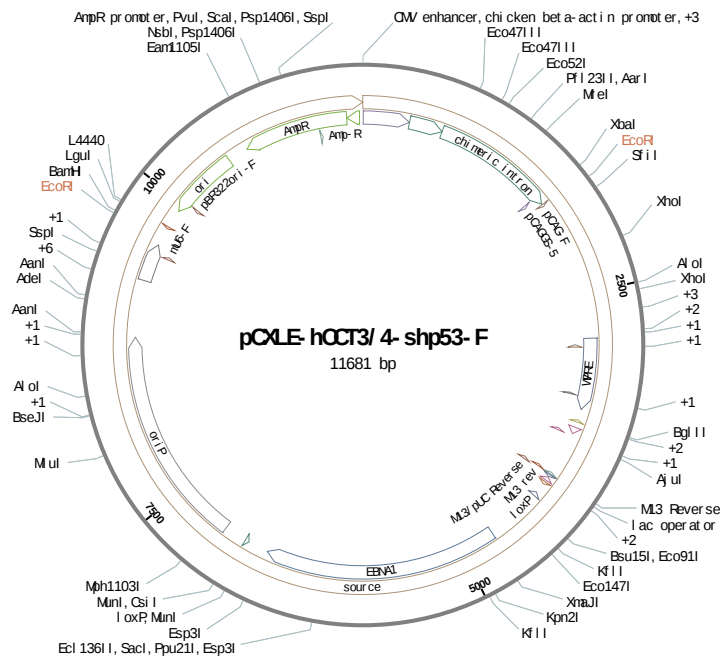
pCXLE-hUL (11424 bp)

A

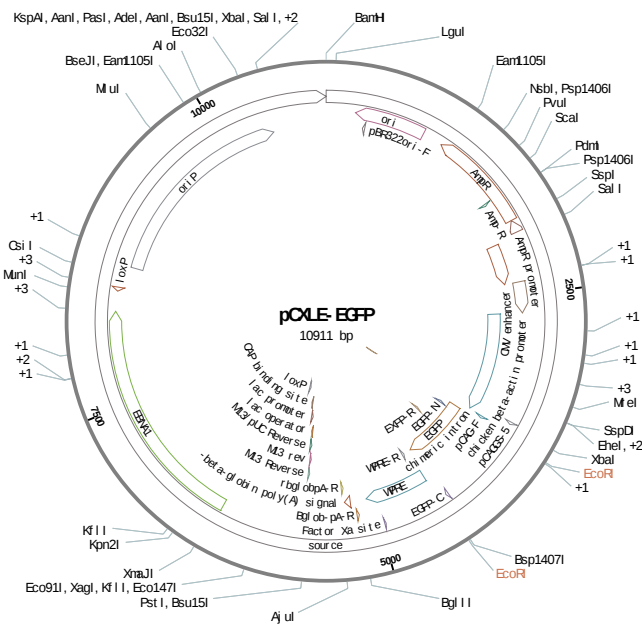


pCXLE-hOCT3/4-shp53-F (11681 bp)

B



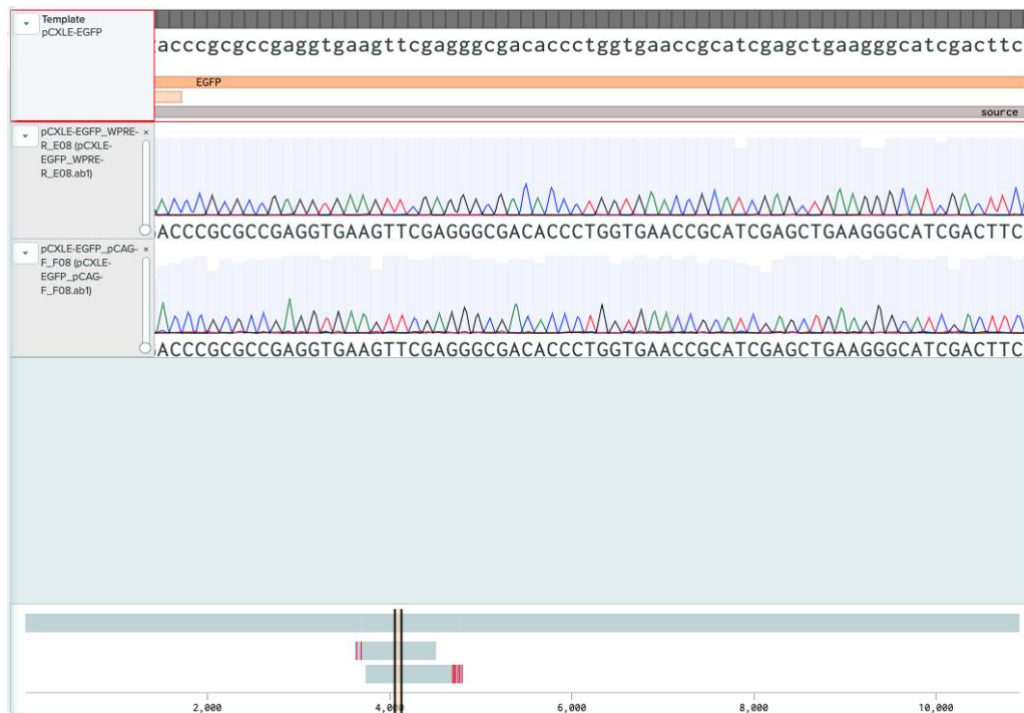
C



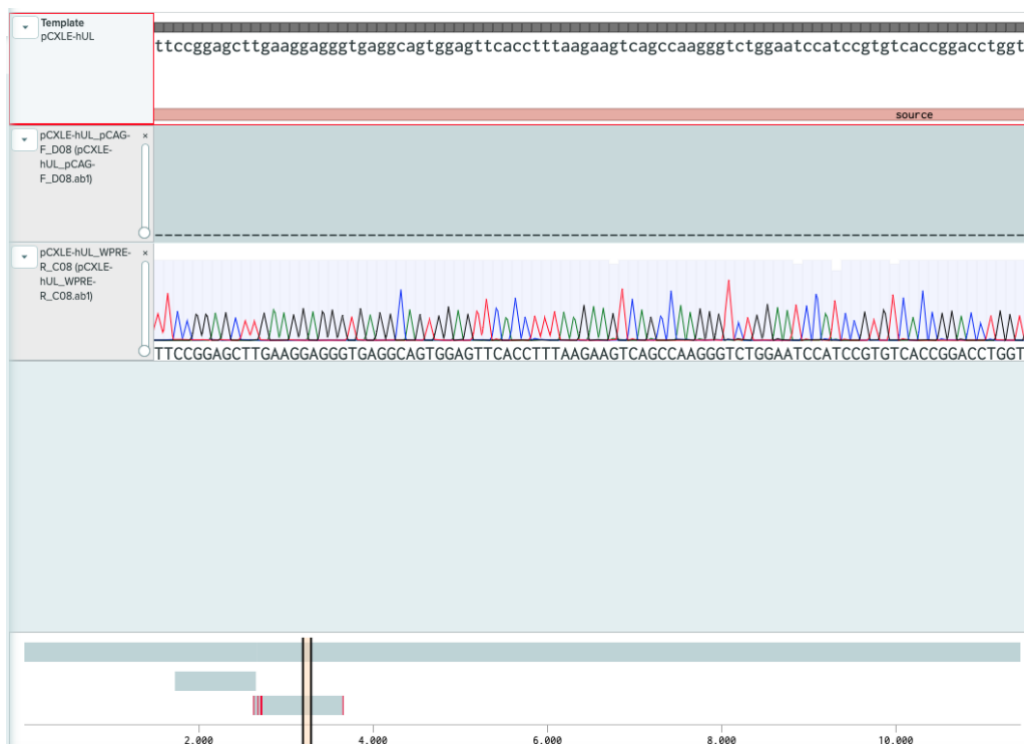
47

LISA 3. Sekvencerimistulemused

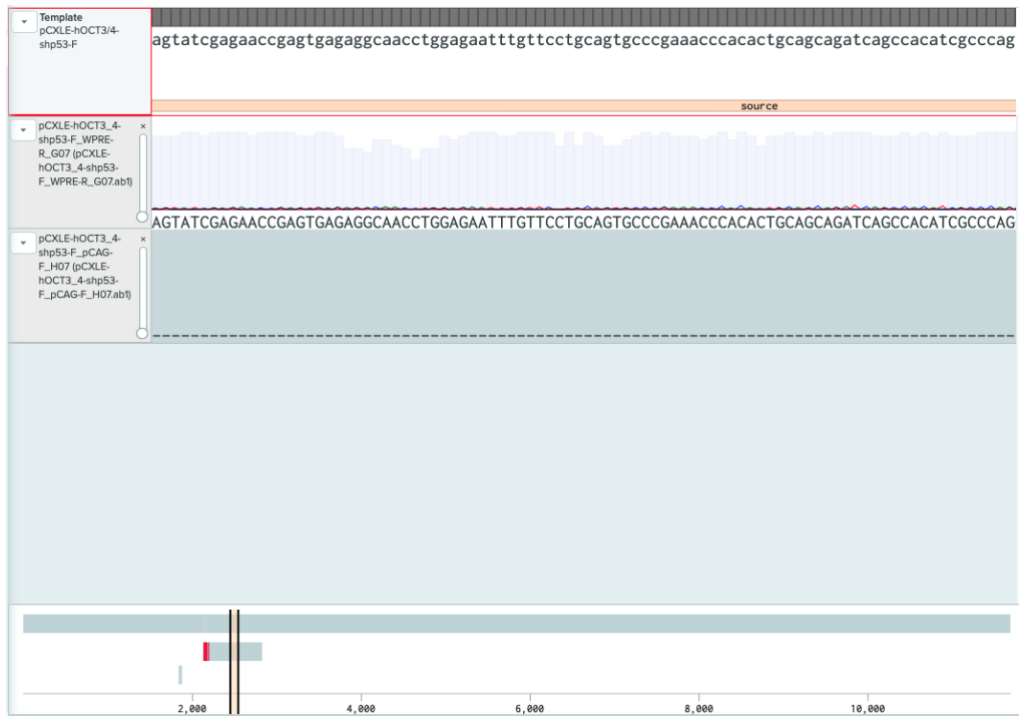
A



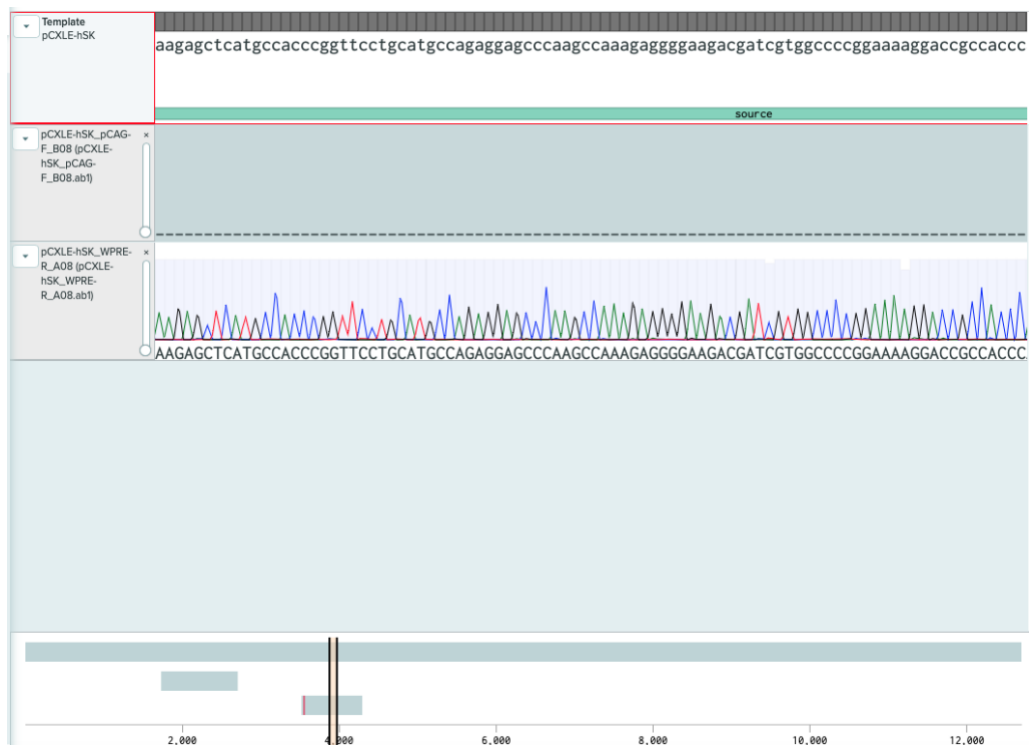
B



C



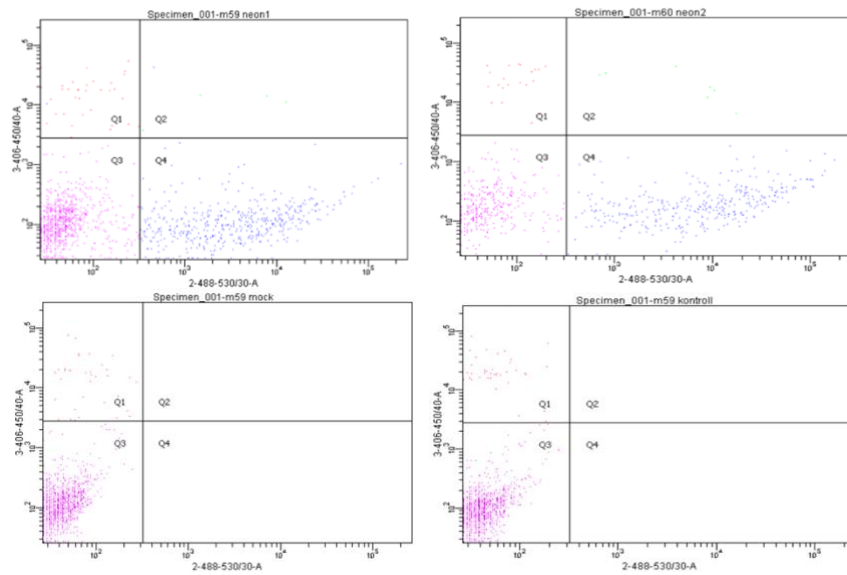
D



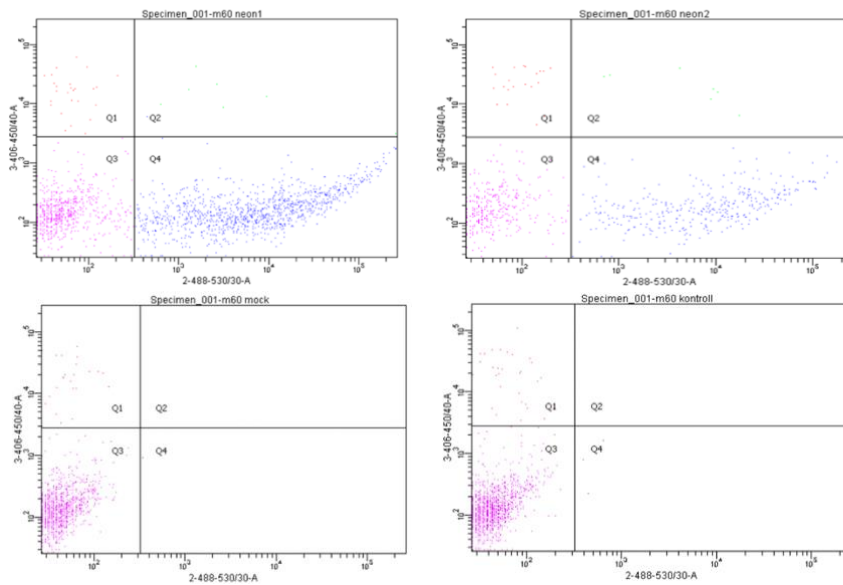
Joonis L3. Sanger sekveneerimise tulemused. Joonistel on näha kuvatõmmis benchling programmist, millega joondati sekveneerimisel saadud järjestused nii *forward* kui *reverse* praimeriga vastavatele plasmiididele. **A** pCXLE-EGFP. **B** pCXLE-hUL **C** pCXLE-hOCT3/4-shp53-F. **D** pCXLE-hSK.

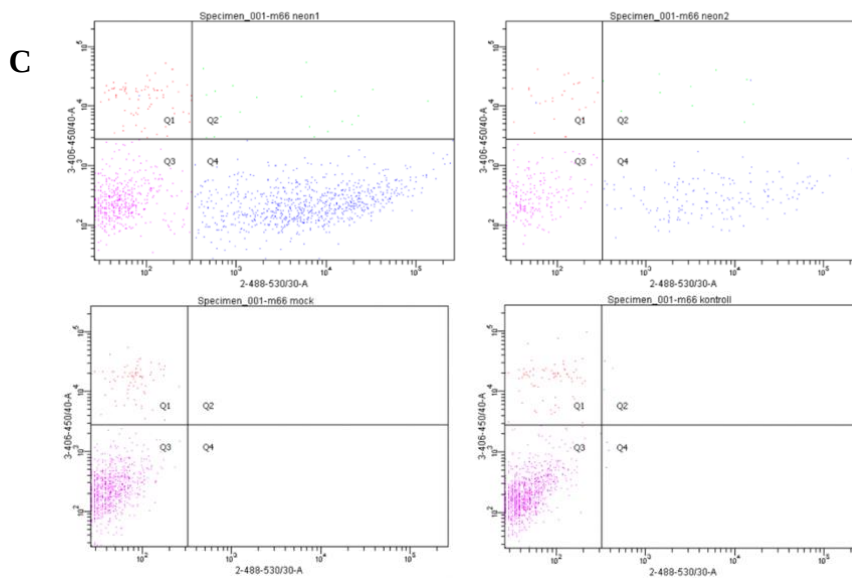
LISA 4. FACS tulemused

A



B





Joonis L4. FACS analüüsi tulemused. A LCL M59 rakuliin. **B** LCL M60 rakuliin. **C** LCL M66 rakuliin. Joonisel on näidatud kõikide rakuliinidega tehtud FACS tulemused. Transfektsiooni efektiivsuse hindamiseks analüüsiti EGFP valku ekspresseeritavate rakkude hulka, lisaks kasutati DAPI-t surnud rakkude tuvastamiseks. Kontrollina tehti rakkudele *mock* transfektsioon ja negatiivse kontrollina kasutati transfekteeerimata, ilma plasmiiditeta rakke.

LISA 5. LCL rakkude reprogrammeerimise protokoll iPS rakkudeks

Before starting

- Expand LCLs to at least 1×10^6 per cell line.

Day -1

1. Prepare 0.1 mg/mL Matrigel plates according to current Matrigel protocol.

Day 0

1. Complete ReproTeSR media by combining supplement and base media. Prepare a 50 mL aliquot, and refrigerate both at 4°C.
2. Allow 6-well plates to come to room temperature in the TC hood.
3. Thaw reprogramming vectors and aliquot 1.5 µg of each vector into 1.5 mL microfuge tubes (one tube per cell line).

Vector

pCXLE-hOCT3/4-shp53

pCXLE-hSK

pCXLE-hUL

pCXLE-EGFP

4. Prepare Neon Transfection Device – connect all components according to the manual provided.
5. Label 1.5 mL microfuge tube with details of each cell line to be reprogrammed and ‘RNA/DNA pellet day 0’

Electroporation

1. Resuspend LCLs to be harvested, and count cells with a haemocytometer
2. Transfer 1×10^6 cells to a 15 mL centrifuge tube
3. Centrifuge at 1,100 RPM for 5 minutes at RT
4. While cells are spinning, prepare one 0.9 mL aliquot of LCL media per cell line. Rinse out Matrigel from wells with DPBS and add 1 mL of LCL media to each well. Incubate at 37°C until needed.
5. Resuspend LCLs in 100 µL of *Resuspension Buffer R* (included with Neon Transfection kit) at a concentration of 1×10^7 cells/mL.

Note: avoid storing cell suspension at room temperature for more than 15-30 minutes, as this reduces cell viability and transfection efficiency.

6. Transfer resuspended cells to tube with reprogramming vectors. Mix by pipetting up and down **gently**.

7. Place Neon tube into the pipette station and add 3 mL of buffer E2

8. Electroporate the cells using the following parameters:

Pulse voltage: 1350 V

Pulse width: 30 ms

Pulse number: 1

Note: Neon tube must be replaced every 10 reactions

9. Transfer cells to microfuge prepared with LCL media. Plate cells into 3 wells of the previously prepared 6-well plate, at densities of 2×10^5 , 3×10^5 and 5×10^5 cells per well.

10. Fill wells with LCL media up to 2 mL. Swirl gently to distribute cells across wells, and incubate plate at 37°C

Days 1 to 25

Day 1 – Do nothing.

Day 2 – Add 1 mL of LCL media, without removing any media from wells.

Day 3 – Add 1 mL of ReproTeSR media, without removing any media from wells.

Day 4 – Check for expression of GFP under fluorescence microscope. Note which density of cells has the highest GFP expression. Cells should be attaching to plate and undergoing EMT either today or tomorrow.

Day 5 – Add 1 mL of ReproTeSR media, without removing any media from wells.

Day 6 – Do nothing.

Day 7 – Aspirate media from each well. Add 2 mL of fresh ReproTeSR.

Day 8 – 25 – Change media every 1-2 days by aspirating out media and adding 2 mL of fresh ReproTeSR. Check for cell death and changes in pH. iPSC colonies should appear around days 18 – 25. Once colonies appear, manually pick colonies into new 6-well plates using thiazovivin or ROCK inhibitor. Seed into E8 media.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.

Mina, **Laura Liivand**,

(sünnikuupäev 16.07.1999)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose **“Indutseeritud pluripotentsete tüvirakkude loomine LCL rakkudest”**, mille juhendajad on MSc Rita Kreevan ja PhD Tõnis Org reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Laura Liivand

31.05.21