

Anna Marishina

UUDELLEEN OHJELMOIDUISTA KANTASOLUISTA (IPS-SOLUT) TUOTETUT SYDÄNSOLUT – SYKINTÄ NORMAALEISSA SYDÄNSOLUISSA JA KARDIOMYOPATIAPOTILAAN SYDÄNSOLUISSA

Lääketieteen ja biotieteiden tiedekunta
Lääketieteen lisensiaatin syventävä työ
Tammikuu 2021

TIIVISTELMÄ

Anna Marishina: Uudelleen ohjelmoituista kantasoluista (iPS-solut) tuotetut sydänsolut – sykintä normaaleissa sydänsoluissa ja kardiomyopatiapotilaan sydänsoluissa
Lääketieteen lisensiaatin syventävä työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen lisensiaatin koulutusohjelma
Tammikuu 2021

Alkion kantasolut (ES-solut) voivat erilaistua kaikiksi sikiön kudossoluiksi. Kyseisiä soluja osataan ottaa monilta nisäkkäiltä talteen ja viljellä tutkimustarkoituksissa. Tämä on eettisesti ongelmallista ja Suomessa on lailla kielletty alkioden tuottaminen tutkimustarkoituksiin.

Vuonna 2006 on opittu tuottamaan indusoituja pluripotentteja kantasoluja (iPS-solut) mistä tahansa ihmisen erilaistuneista soluista. Tuotetut solut pystyvät jakautumaan rajattomasti ja näitä voidaan jatkoerilaistaa kaikiksi sikiön kudossoluiksi, esimerkiksi sydänlihassoluiksi. Tässä tutkimuksessa mallinnetaan potilasspesifisistä iPS-soluista erilaistetuilla sydänlihassoluilla dilatoiva kardiomyopatia -sydänsairautta (DCM) videoanalyysimetelmän avulla.

Dilatoiva kardiomyopatia johtuu usein geenimutaatioista, joista tärkeimmät ovat LMNA-geenin mutaatiot. LMNA-geeni koodittaa proteiineja, jotka ylläpitävät sydänlihassolun tuman rakennetta ja lujuutta. Potilailla, joilla on LMNA-mutaatioon liittyvä DCM, on todettavissa sydänimpulssien johtumishäiriöitä tai sydänkammioiden toimintahäiriöitä, jotka aiheutuvat eteisten tai kammioiden arytmiasta.

Tutkimuksen aineistona ovat videot kolmesta solulinjasta, jotka ovat peräisin kolmen eri potilaan fibroblasteista. Kyseiset fibroblastit ovat uudelleenohjelmoitu iPS-soluiksi, ja nämä on erilaistettu sydänlihassoluiksi. Potilaista kahdella on DCM ja LMNA-mutaatio (solulinjat 12619.LMNAs.p28(11) ja 12704.LMNAs.p29(5)). Kolmannella kontrollisolulinjalla (WT04602p10(6)) kyseistä mutaatiota ei ole. Videoita on kuvattu 21–27 kappaletta solulinjaa kohden. Videoinnin jälkeen videot on analysoitu Beatview-analyysiohjelmalla. Ohjelma mittaa solun supistumisen ja relaksaation kestot, mahdolliset ajat näiden välissä sekä solun supistumisfrekvenssin.

Tutkimuksen tuloksena oli, että 12619.LMNAs.p28(11)-solulinjan solujen supistuksen kesto oli merkitsevästi kontrollisolujen supistusta lyhyempi ($p = 0,051$). Tästä voisi ajatella, että supistuksen ollessa lyhyempi, supistuvat mutatoituneet solut samassa ajassa useammin kuin kontrollisolut. Tutkimuksen molempien LMNA-solulinjojen supistumisfrekvenssi oli korkeampi kuin kontrollisoluilla, vaikkakin tässä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa solulinjojen välillä. Aiempien tutkimusten perusteella on epäselvää, miksi LMNA-solulinjojen supistumisfrekvenssi on korkeampi kuin terveillä soluilla, mutta tämän on arveltu johtuvan muutoksista LMNA-solujen kalsiumin säätelyssä, tämän vapautumisessa sekä solujen repolarisaatioajassa. Nämä voivat selittää syketiheyksien eron.

Toinen tilastollisesti merkitsevä tulos saatiin, kun verrattiin 12704.LMNAs.p29(5)-solulinjan sydänlihassolujen supistuksen ja relaksaation välistä aikaa kontrollisolujen vastaavaan. Tässä mutatoituneilla soluilla supistuksen ja relaksaation välinen aika oli merkitsevästi pidempi kuin terveillä kontrollisoluilla (p -arvo = 0,039). Tulos merkitsee sitä, että mutatoituneet sydänlihassolut pysyvät pidempään supistuneena kuin kontrollisolut ennen relaksaatiovaihetta. 12404.LMNAs.p29(5)-linjan soluilla oli siis pidentynyt repolarisaatioaika ja relaksaation alku on häiriintynyt terveisiin soluihin verrattuna. Solujen pidentynyt repolarisaatioaika voisi viitata LMNA-solujen lisääntyneeseen rytmihäiriöherkkyyteen, mikä on linjassa LMNA-DCM:n oireiston kanssa, jossa rytmihäiriöt ovat potilailla yleisiä.

Avainsanat: uudelleen ohjelmoitu erittäin monikykyinen kantasolu, sydäntautimallinnus, dilatoiva kardiomyopatia

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

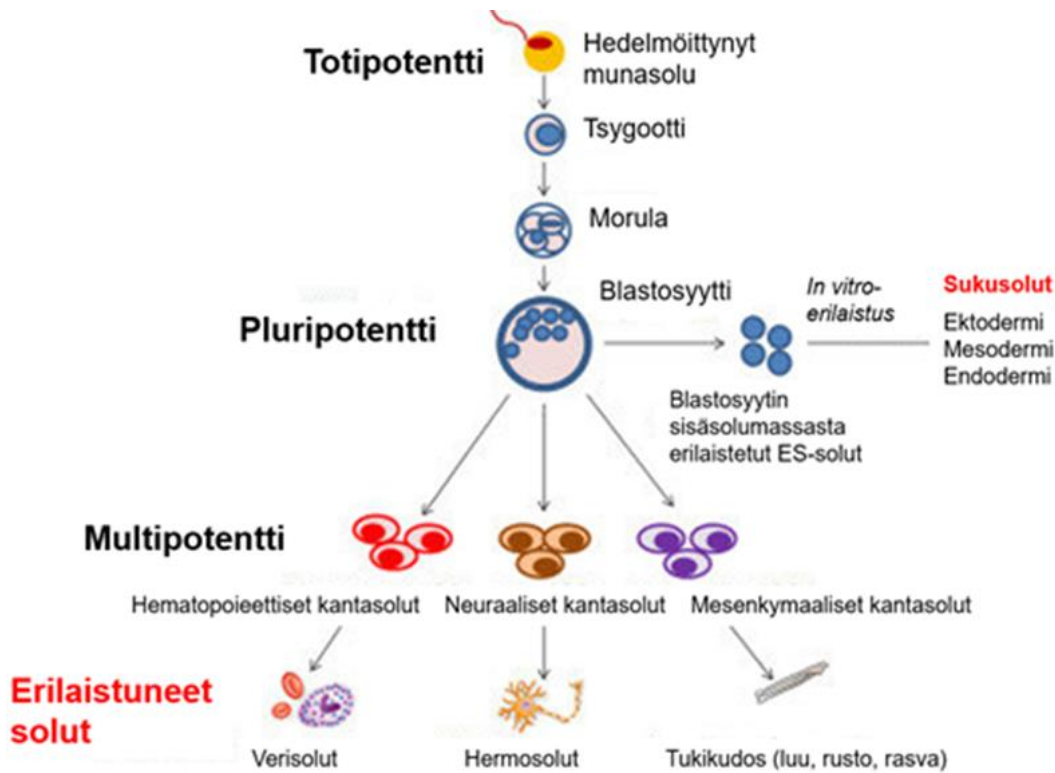
1	JOHDANTO.....	1
1.1	Kantasolut	1
1.2	Alkion kantasoluista iPS-soluihin	3
1.3	Sydänsoluerilaistus iPS-soluista	5
1.3.1	Sydämen kehitys.....	5
1.3.2	Pluripotenttien kantasolujen erilaistaminen sydänlihassoluiksi.....	6
1.3.3	Spontaani EB-sydänsoluerilaistus	6
1.3.4	END2-sydänsoluerilaistus	8
1.3.5	Kasvutekijä- ja pienmolekyylierilaistus	9
1.3.6	iPS-soluista erilaistetut kardiomyosyytit (iPS-CM).....	10
1.4	Sydäntä laajentava eli dilatoiva kardiomyopatia	11
1.5	Sydäntautimallinnus iPS-soluilla	14
2	TUTKIMUSKYSYMYKSET	15
3	MENETELMÄT.....	15
3.1	Eettinen hyväksyntä	15
3.2	Aineisto.....	16
3.3	Videointi ja analyysit.....	16
3.4	Tilastollinen analyysi	18
4	TULOKSET	19
5	POHDINTA.....	24
6	LÄHTEET	27

1 JOHDANTO

1.1 Kantasolut

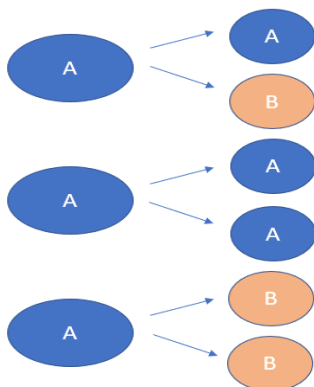
Hedelmöitynyt munasolu on totipotentti eli kaikkikykyyinen solu, joka erilaistuu sekä uuden yksilön että istukan ja sikiökalvojen soluiksi. Kaikkikykyyinen vaihe päättyy, kun hedelmöitynyt munasolu (tsygootti) saavuttaa 16-soluasteen muutamassa päivässä. Samaan aikaan tapahtuu solujen kompaktio eli solut järjestäytyvät ja eroavat toisistaan. Kompaktion seurauksena muodostuu alkiorakkula (blastosyytti). Alkiorakkulan seinämän soluista muodostuu myöhemmin istukka ja rakkulan sisälle jäävistä soluista sikiö. Alkiorakkulan sisäsolu-massa läpikäy gastrulaation, jonka aikana yksinkertainen epiblastisolukko muuttuu kolmikerroksiseksi alki-oksi: ektodermiksi, mesodermiksi ja endodermiksi. Myöhemmin ihmisen alkion ektodermista muodostuu kes-kushermosto, mesodermista luusto ja lihaksisto sekä endodermistä ruuansulatuskanava ja -elimet. Alkiorak-kulan sisäsolumassan solut ovat siis nisäkkäillä pluripotentteja eli erittäin monikykyisiä kantasoluja, joten ne voivat erilaistua sikiön kaikiksi kudossoluiksi, paitsi ekstraembryonaaliseksi kudokseksi eli sikiökalvostoksi ja istukaksi. Näitä alkiorakkulan sisäsoluja eli alkion kantasoluja (eng. embryonic stem cells, ES-solut) osataan ottaa monilta nisäkkäiltä talteen ja viljellä tutkimustarkoituksissa. (www.oppiportti.fi, kbi00033)

Kun alkio kehittyy ja solut erilaistuvat, näiden monikykyisyys heikkenee. Osa aikuisen soluista säilyttää aina-kin osittain monikykyisyytensä. Näitä soluja ovat kudokskantasolut, joita löytyy lähes jokaisen aikuisen kudok- sessa. Nämä aikuisen kantasolut ovat multi- tai unipotentteja riippuen niiden kyvystä erilaistua eteenpäin. Kantasolun määritelmän mukaan, se voi tuottaa itsensä kaltaiset kantasolut ja voi erilaistua yhdeksi (unipo- tentti) tai useammaksi (multipotentti) toimivaksi solutyypiksi. Tämä visualisoitu Kuvassa 1. (Hayes et al. 2012)



Kuva 1. Kantasolujen alkuperä ja luokitus. Hedelmöittynyt munasolu eli tsygootti on totipotentti eli se voi erilaistua mihin vain soluksi. Pluripotentit ihmisten alkion kantasolut (ES-solut) erilaistuvat blastosyytin sisäsolu-massasta. ES-solut voivat erilaistua sikiön kaikiksi kudossoluiksi, paitsi ekstraembryonaaliseksi kudokseksi eli sikiökalvostoksi ja istukaksi. Multipotentteja kudokskantasoluja ovat esimerkiksi luuytimen kantasolut (hematopoeettiset kantasolut), kun taas aikuisen sukusolut ovat unipotentteja kantasoluja. (Mukaiillen Hayes et al., 2012)

Kantasolujen jakautuminen on mahdollista kahdella eri tapaa. Asymmetrisessä jakautumisessa kantasolu tuottaa kaksi tytärsolua, joista toinen säilyy kantasoluna ja toinen erilaistuu. Symmetrisessä jakautumisessa syntyvät kaksi tytärsolua ovat molemmat joko kantasoluja (uusiutuva jakautuminen) tai erilaistuvia soluja (erilaistuva jakautuminen). Ainoastaan symmetrisellä jakautumisella voidaan lisätä kantasolujen määrää. Jakautumistavat hahmotettu Kuvassa 2. (Takahashi et al., 2007)



Kuva 2. A kantasolu, B erilaistuva solu. Kuvassa ensimmäisenä jakautumistapana on esitetty asymmetrinen jakautuminen, jossa toinen syntyvistä tytärsoluista on kantasolu ja toinen erilaistuva solu. Toisena on symmetrinen uusiutuva jakautuminen, jolloin kantasolun molemmat tytärsolut ovat uusia kantasoluja. Ainoastaan kyseinen jakautuminen lisää kantasolujen määrää. Kolmantena on esitetty erilaistuva jakautuminen, jossa kantasolun molemmat tytärsolut ovat erilaistuvia soluja. Kyseinen jakautumistapa ei lisää kantasoluja. (Mukaiillen Takahashi et al., 2007)

1.2 Alkion kantasoluista iPS-soluihin

Alkion kantasolut, jotka ovat syntyneet alkion sisäsolumassasta ovat pluripotentteja ja kykenevät jakautumaan rajattomasti. ES-soluja on opittu kasvattamaan 1900-luvun lopulla, jolloin soluja erilaistamalla oli tarkoitus ymmärtää sairausmekanismeja, tuottaa tehokkaita ja turvallisia lääkkeitä sekä hoitaa sairauksia (Weltner et al., 2014). Solujen alkuperän takia näiden käyttöön liittyy kuitenkin paljon eettisiä ongelmia ja Suomessa on lailla kielletty alkioiden tuottaminen tutkimustarkoituksiin.

Tutkimustarkoituksissa käytetäänkin hedelmöityshoidoissa ylijääneitä alkioita, joiden sisäsolumassasta eristetään kantasolut. Kyseinen toimenpide tuhoaa alkion, eikä ole tämän vuoksi eettisesti mutkatonta. Lisäksi potilas- tai sairausspesifisten ES-solujen tuottaminen on monimutkaista (Takahashi et al., 2007).

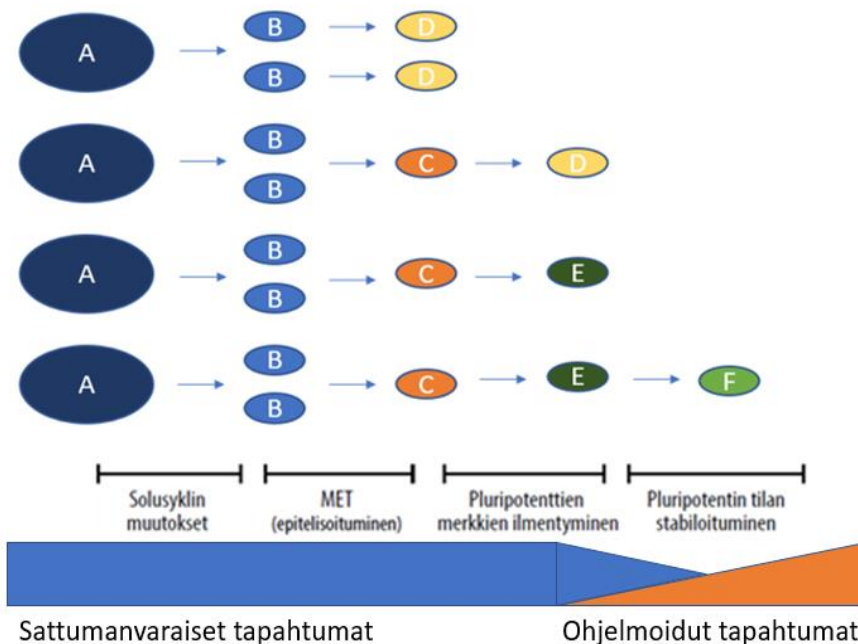
ES-soluja koskien Suomessa on käytössä vuonna 2010 voimaan astunut Biolääketiedesopimus. Sopimuksen on asettanut Euroopan neuvosto vuonna 1997. Biolääketiedesopimus kieltää tutkimuksissa potilaan perimän muuntelun siten, että muutos voi periytyä jälkeläisille. Lisäksi lääketieteellisessä tutkimuksessa on lailla (488/1999) kielletty alkio tutkimus ja sulusolujen tutkimus, joiden tarkoituksena on periytyvien ominaisuuksien muuntaminen, ellei tarkoituksena ole vakavan perinnöllisen sairauden ehkäiseminen. Kyseisiä alkioita tai soluja on kuitenkin kiellettyä siirtää ihmiseen ja alkio on hävitettävä 14 vuorokauden kuluttua sen hedelmöityksestä. Tähän aikaan ei lasketa mukaan alkioiden tai solujen pakastusaikaa. (www.finlex.fi, www.oppiportti.fi, Itg02901)

Vuonna 1962 Gurdon et al. siirsivät sammakon suoliston solun tumen tumattomaan munasoluun. He osoittivat, että tumen siirron jälkeen solu kykenee erilaistumaan aikuiseksi yksilöksi. Tunnetuin tumen siirron esimerkki on utaren solusta tuotettu Dolly-lammas. Dolly-menetelmään liittyy kuitenkin paljon ongelmia sekä se on varsin tehoton menetelmä. (Gurdon et al., 1962, Aalto-Setälä et al., 2012)

Vuonna 2006 japanilaiset tutkijat Takahashi ja Yamanaka et al. kehittivät menetelmän, jossa indusoituja pluripotentteja kantasoluja (iPS-solut) pystyttiin tuottamaan ilman munasoluja tai alkioita, jolloin vältyttiin näitä koskevilta eettisiltä ongelmilta (Takahashi & Yamanaka, 2006). iPS-solut ovat alun perin potilaasta kerättyjä soluja, joiden geeniekspressiota käsitellään laboratorio-olosuhteissa. Käsitelyn jälkeen kyseiset solut pystyvät jakautumaan rajattomasti ja kykenevät erilaistumaan kaikiksi alkion kudossoluiksi. (Weltner et al., 2014) Menetelmässä voidaan käyttää mitä tahansa aikuisen jakautuvaa erilaistunutta solua, johon viedään pluripotenssisuuteen vaikuttavia geenejä. Takahashi ja Yamanaka käyttivät menetelmässään aikuisen fibroblasteja,

joihin siirrettiin transkriptiotekijät Oct4, Sox2, Klf4 ja c-Myc. Kyseiset geenit johtavat käsiteltävien solujen omien geenien uudelleenohjelmoitumiseen (Takahashi & Yamanaka, 2006, Aalto-Setälä et al., 2012), jolloin käsiteltävät solut menettävät aiemman erilaistumisensa. Tarkoituksena on tuottaa iPS-soluja, jotka käyttäytyvät erittäin monikykyisten kantasolujen tavoin eli voivat erilaistua sikiön kaikiksi kudossoluiksi, mutta ei istukan soluksi (www.oppiportti.fi, Itg02901). Myöhemmin on tunnistettu myös monia muita tekijöitä, jotka säätelevät geenien uudelleenohjautumista (Weltner et al., 2014).

Somaattisten solujen uudelleenohjautuminen pluripotenteiksi soluiksi on monivaiheinen prosessi, jonka alussa tärkeintä on solusyklin aktivaatio ja solujen aktiivinen jakautuminen. Prosessin edetessä solut muuntuvat epiteelisoluja muistuttaviksi MET-soluiksi (eng. mesenchymal-epithelial transition). Kyseessä on prosessi, jossa mesenkymaalisolut muuntuvat epiteelisoluiksi 12 solumarkkerin avulla. (Owusu-Akyaw et al., 2019, Pei et al., 2019) Tämän muutoksen jälkeen solut alkavat vähitellen ilmentämään pluripotenteille soluille ominaisia piirteitä. Tämä prosessin vaihe näyttäisi perustuvan satunnaisiin tapahtumiin eri soluissa. Kun käsiteltävissä soluissa on ilmentyneenä riittävä määrä pluripotentiuden piirteitä, solun uudelleenohjautuminen tapahtuu järjestelmällisesti. Uudelleenohjautuminen on kuitenkin prosessina hidas ja etenee loppuun asti vain pienessä osassa soluja. Tämä esitetty Kuvassa 3. (Weltner et al., 2014)



Kuva 3. A somaattinen solu, B jakautuvat solut, C epiteeliaaliset solut, D transformoidut tai erilaistuneet solut, E pre-iPS-solut, F iPS-solut. Somaattisten solujen uudelleenohjautumista voidaan jakaa kahteen vaiheeseen, sattumanvaraiseen (stokastinen) uudelleenohjautumiseen prosessin alkuvaiheessa ja ohjelmoituun (deterministinen) prosessin loppuvaiheessa. (Mukaien Weltner et al., 2014)

iPS-solujen vahvuutena verrattuna alkion kantasoluihin on solujen alkuperä. iPS-solujen ollessa aikuisen ihmisen somaattisista soluista peräisin, vältetään munasoluja tai alkioita koskevilta eettisiltä ongelmilta (Takahashi & Yamanaka, 2006). Lisäksi iPS-solujen geeniekspressio on identtinen potilaan kanssa, josta solut

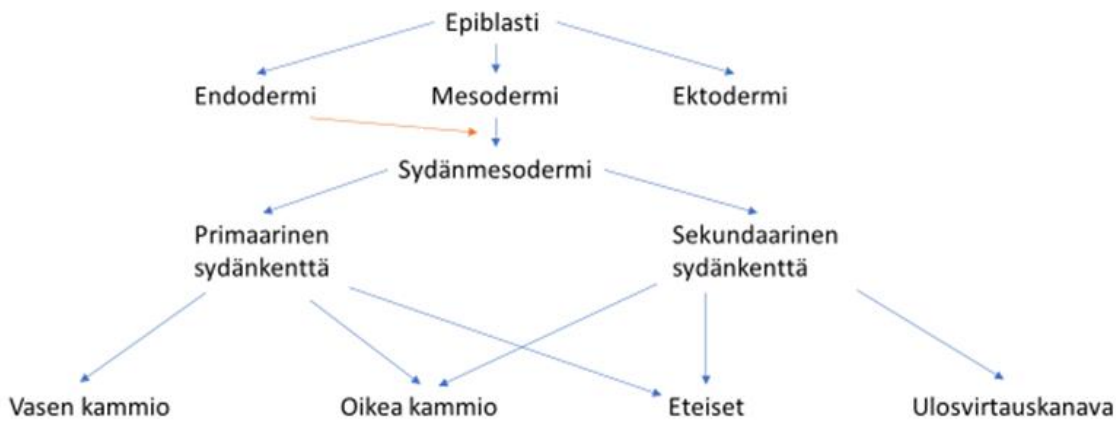
ovat peräisin (Dimos et al., 2008, Park et al., 2008), joten solujen avulla on mahdollista mallintaa potilaan sairauksia solutasolla, jos potilaan sairaus johtuu geenivirheestä. Myös solujen mahdollisuus rajattomaan jakautumiseen laboratorio-olosuhteissa on iPS-solujen vahvuus (Weltner et al., 2014).

1.3 Sydänsoluerilaistus iPS-soluista

1.3.1 Sydämen kehitys

Selkärankaisilla alkionkehityksessä sydän on ensimmäinen kehittyvä elin, ja tämän toimiva verenkierto on elintärkeä alkionkehitykselle (Buckingham et al., 2005). Sydänlihassolut erilaistuvat mesodermistä eli alkiokerroksesta, joka gastrulaation aikana muodostuu alkujuovasta. Itse sydän kehittyy sydänputkesta, joka läpikäy monimutkaisen kehitysprosessin ja muodostuu lopuksi nelikammioiseksi rakenteeksi. (Buckingham et al., 2005, Pekkanen-Mattila, 2010, Mummery et al., 2012)

Nykykäsityksen mukaan on olemassa kahdenlaisia sydänsolun esiasteita eli progeniittorisoluja, jotka osallistuvat sydämen kehitykseen. Näitä kutsutaan sydänkentiksi (eng. heart field). Toiset kyseisistä soluista osallistuvat vasemman, osittain oikean kammion, eteiskammioiskanavan sekä eteisten muodostukseen. Vastavasti toiset solut osallistuvat ulosvirtauskanavan, oikean kammion sekä eteisten muodostukseen. Jälkimmäinen kenttä, jota kutsutaan myös sekundaariseksi tai anterioriseksi kentäksi, ilmentää *Isl-1*-geeniä (*Isl-1*), joka on LIM-homeoboksin transkriptiotekijä. Homeoboksi on DNA-jakso, joka esiintyy selektorigeeneissä ja joka on osallisena anatomisen kehityksen säännöllisyyteen. Sekundaarinen kenttä muodostaa kaksi kolmasosaa sydäimestä, johon lukeutuvat sydänlihas, sileälihas sekä endoteelisolut. (Cai et al., 2003, Pekkanen-Mattila, 2010) Muita aikaisia progeniittoreilla spesifisiä geenejä sydänkehityksessä ovat mesoderm posterior 1 ja 2 (*MESP1* ja *MESP2*), jotka ilmenevät väliaikaisesti mesodermisissä (Kitajima et al., 2000). Lisäksi on todettu, että nisäkkäillä luun morfogeeniset proteiinit (eng. bone morphogenic proteins, BMPs), jotka kuuluvat TGF- β -perheeseen (eng. transforming growth factor beeta superfamily), WNT-proteiinit (*Wingless/INT*-proteiinit) sekä fibroblastikasvutekijät (eng. fibroblast growth factors, FGFs) ovat tärkeitä sydämen alkuvaiheen kehityksessä (Brand et al., 2003, Pekkanen-Mattila, 2010). Nämä tekijät säätelevät sydänlihaksen säätelygeenien aktivaatiota tai inhibitiota ja ilmenevät endodermisissä (Mummery et al., 2012). Sydämenmuodostuksen kehitysvaiheet kuvataan Kuvassa 4.



Kuva 4. Kuvassa yksinkertaistettu kaavio sydänkehityksestä. Alkion kantasolut erilaistuvat kolmeksi alkiokerroksi, endodermiksi, mesodermiksi sekä ektodermiksi. Mesodermi on sydänlihassolujen alkuperä ja sydänlihassolujen kehitykseen osallistuu endodermi signaloinnillaan. Sydänmesodermistä kehittyvistä kahdesta sydänkentästä kehittyvät sydämen osat. Vasen kammio kehittyy primaarisesta sydänkentästä, kun taas oikea kammio ja eteis kehittyvät molempien sydänkenttien soluista. Ulosvirtauskanava muodostuu sekundaarisesta sydänkentästä. (Mukaillen Pekkanen-Mattila, 2010)

1.3.2 Pluripotenttien kantasolujen erilaistaminen sydänlihassoluiksi

In vitro -erilaistetut kardiomyosyytit jäljittelevät sydämen normaalia kehitystä mesodermistä alkaen. Solut läpikäyvät erilaistuessaan sydänmesodermin, sydänsolujen esiasteen ja erilaistuvat lopuksi sydänlihassoluiksi. (Mummery et al., 2012, Ojala, 2015)

Nykyaikaisia kantasolujen erilaistusmenetelmiä sydänlihassoluiksi ovat spontaani EB-menetelmä sekä END-2-menetelmä. EB-erilaistuksessa ES-soluista tai iPS-soluista muodostuu soluagregaatteja (eng. embryoid body, EB), jotka erilaistuvat spontaanisti kaikiksi kolmeksi alkiokerrokseksi, mukaan lukien sydänlihassoluiksi, mallintaen näin sydämen normaalia kehitystä. (Itskovitz-Eldor et al., 2000) END-2-erilaistuksessa iPS-soluja yhteisviljellään hiiren alkioista erilaistettujen solujen kanssa (Mummery et al., 2003). Uusin menetelmä on pienmolekyyliserilaistus, jossa sydänlihassoluja erilaistetaan yksikerroksisena soluviljelmänä erilaisten tunnettujen kasvutekijöiden avulla. Kyseinen menetelmä perustuu signalointireittien peräkkäisiin aktivointiin ja inhibointiin tunnetuilla kasvutekijöillä, jolloin tuloksena on ES-solujen erilaistuminen kardiomyosyyteiksi. (Lafamme et al., 2007)

1.3.3 Spontaani EB-sydänsoluerilaistus

EB-menetelmässä sydänsoluerilaistus alkaa, kun alkion kantasoluviljelmä tai iPS-soluviljelmä poistetaan pluripotentiutta ylläpitävältä kasvualustalta (Itskovitz-Eldor et al., 2000) ja jaetaan pienemmiksi solurykelmiksi joko mekaanisesti tai entsyymaattisesti esimerkiksi kollagenaasi IV:n avulla. Saadut 3–20 solun rykelmät kasvavat soluagregateiksi petriمالjassa, johon solut eivät kiinnity. Näistä päivissä syntyneistä

soluaggregaateista käytetään englanninkielistä termiä embryoid body eli EB. (Kurosawa, 2007, Pekkanen-Mattila, 2010) Kun EB:t poistetaan olosuhteista, jotka inhiboivat näiden erilaistumista, alkion kantasolut tai iPS-solut erilaistuvat spontaanisti kaikkiksi kolmeksi alkiokerrokseksi eli mesodermiksi, ektodermiksi ja endodermiksi (Itskovitz-Eldor et al., 2000).

EB-erilaistusmenetelmiä on kehitelty monia (Kurosawa, 2007). Ensimmäisenä on kehitetty menetelmä, jossa hiiren ES-soluja viljeltiin bakteerisoluviljelymaljoissa (Doetschman et al., 1985) ja myöhemmin tätä menetelmää on käytetty erilaistamaan sydänlihassoluja ES-soluista (Itskovitz-Eldor et al., 2000). Tässä menetelmässä solut dissosioidaan entsyymaattisesti ja nämä aggregoituvat, kun soluja viljellään mediumissa. ES-solut dissosioituvat mielellään yksisoluisen vaiheeseen ja siksi ES-solut hajoavat pieniksi soluaggregaateiksi solu-solukontaktin säilyttämiseksi. (Amit et al., 2000, Pekkanen-Mattila, 2010)

Kun EB:t ovat muodostuneet, nämä siirretään myöhemmin 0,1 %:lla gelatiinilla päällystetylle alustalle (Pekkanen-Mattila et al., 2013) ja jo ensimmäisenä päivänä siirrosta, alustalla voi nähdä supistuvia alueita. Kyseiset supistuvat solut ovat tässä kohtaa tunnistettavissa kardiomyosyyteiksi, sillä muilla soluilla ei ole supistumisaktiivisuutta. (Kehat et al., 2001, Mummery et al., 2003) Sekä kantasoluista että iPS-soluista tuotetuissa soluissa nähdään supistumista erilaistaen näitä EB-menetelmällä (Itskovitz-Eldor et al., 2000, Zhang et al., 2009). Kyseinen menetelmä on todettu tehokkaaksi hiiren EB:llä, joiden erilaistuksessa 2–10 vuorokauden kuluttua 80–90 % siirretyistä EB:stä supistuvat (Wobus et al., 1991, Pekkanen-Mattila, 2010). Ihmisen ES-soluilla tässä erilaistusmenetelmässä sykkivät alueet nähdään vasta myöhemmin ja yleensä vain alle 10 % soluista supistuvat (Kehat et al., 2001). Kyseisessä erilaistamismenetelmässä supistuvien solujen määrä yleensä kasvaa erilaistuksen edetessä ja sykkiminen kestää päivistä jopa yli kuukauteen, riippuen sykkivien alueiden laajuudesta (Boheler et al., 2002).

Myös roikkuvan pisaran -menetelmää (eng. hanging drop) on käytetty ES-solujen erilaistamisessa kardiomyosyyteiksi. Tässä menetelmässä yksittäiset solupisarat pipetoidaan petrimaljan kannelle ja kansi asetetaan petrimaljalle. (Takahashi et al., 2003, Burridge et al., 2007) Menetelmässä pisarat roikkuvat pintajännitteen vuoksi ja luovat näin soluille hyvät olosuhteet EB-aggregaatiota varten. Menetelmä ei ole sopiva pitkäaikaiseen soluerilaistukseen, sillä mediumin vaihto ei ole tässä mahdollista (Kurosawa, 2007). Menetelmä on soveltuva laboratorio-olosuhteisiin. Menetelmä on kuitenkin soluille hellä painovoiman vuoksi, mikä on menetelmän vahvuuksia. (Takahashi et al., 2003).

Kardiomyosyytierilaistukseen vaikuttaa EB-aggregaattien koko ja jotta erilaistuminen olisi optimaalisinta, tulisi solujen määrä EB:ssä olla mitattavissa. Roikkuvan pisaran menetelmä mahdollistaa ES-solujen määrän standardoimisen. Kuitenkin vankempia menetelmiä on kehitetty, joista pakotettua aggregaatiota (eng. forced aggregation, FA) on käytetty sydänsoluerilaistuksessa. (Ng et al., 2005, Burridge et al., 2007) Menetelmässä käytetään sentrifugia, jossa haluttu solumäärä lingotaan. Linkousvoima muodostaa soluista aggregaatin sentrifugikaivon pohjalle. Mediumin vaihto menetelmässä on mahdollista, joten päästään pidempiin erilaistamisaikoihin ja mediumiin voidaan lisätä erilaistumista indusoivia tekijöitä. (Burridge et al., 2007) Menetelmän

heikkoutena on tarve dissosoida ES-solut yksisoluasteelle. Kuitenkin menetelmä on yksinkertainen ja tässä on helppoa standardoida yhden EB:n solumäärä. (Ng et al., 2005).

EB:n koon ja solumäärän on todettu vaikuttavan sydänerilaistuksen tehokkuuteen. Tämän takia on kehitetty menetelmiä EB:n koon vakioimiseksi. Yksi menetelmistä on Bauwens et al. kehittämä menetelmä, joka perustuu micropatterning-tekniikkaan. Kyseisessä menetelmässä tuotetaan muotti, johon entsyymaattisesti dissosoidut yksittäiset kantasolut kiinnittyvät ja muodostavat standardikokoisia EB-soluaggregaatteja. Tämän jälkeen EB:t irrotetaan varovasti soluviljelmästä ja siirretään neljän päivän ajaksi gelatinilla päällystetylle alustalle, jotta kardiomyosyyttien erilaistus EB:stä käynnistyisi. Koneiston tarve on menetelmän rajoittava tekijä, mutta EB:n solumäärä on tässä menetelmässä vakioitavissa, mikä on menetelmän vahvuus. (Bauwens et al., 2008)

EB-menetelmillä erilaistettujen sydänlihassolujen määrä soluaggregaateissa on kuitenkin vähäinen, sillä kardiomyosyyttien prosenttiosuus EB:stä vaihtelee vain kolmesta prosentista viiteen (Boheler et al., 2002).

1.3.4 END2-sydänsoluerilaistus

END2-sydänsoluerilaistuksen menetelmässä kantasolut yhteisviljellään solujen kanssa, jotka on erilaistettu hiiren alkion karsinoomasoluista (Xu et al., 2008). Kyseisiä soluja kutsutaan END2-soluiksi ja nämä ovat viskeraalis-endodermi-kaltaisia soluja, jotka ovat inaktivoituja niin, että soluissa ei ole mitoosiaktiivisuutta. Erilaistuksessa END2-solujen ja kantasolujen välille syntyy solu-solu-yhteys ja lisäksi END2-solut erittävät tekijöitä, jotka aikaansaavat kantasolujen erilaistumisen kardiomyosyyteiksi. (Graichen et al., 2007, Xu et al., 2008) END2-solut auttavat kantasolujen erilaistumista läpikäyden endodermin ja mesodermin vaiheet (Mummery et al., 2003), ja vaikka END2-solujen tarkkaa sydänsoluerilaistuksen säätelymekanismia ei tunneta, on tutkittu, että viskeraalis-endodermillä on tärkeä rooli normaalissa sydänkehityksessä (Lough et al., 2000). Tutkimuksissa on osoitettu, että END2-solut käyttävät mediumista insuliinia, joka muuten inhiboisi kantasolujen erilaistumista sydänlihassoluiksi. Tämä ei kuitenkaan itsessään selitä kantasolujen erilaistumista sydänlihassoluiksi kyseisellä menetelmällä. (Xu et al., 2008)

END2-erilaistuksen menetelmää voidaan toteuttaa joko solu-solukontaktin avulla, jolloin kantasolut viljellään END2-solujen päällä tai käyttämällä END2-soluilla konditioitua mediumia, jossa kantasoluja viljellään (Mummery et al., 2003, Passier et al., 2005). Molemmissa menetelmissä erilaistaminen aloitetaan käsittelemällä END2-solukkenoja mitomysiini C:llä kolmen tunnin ajan, mikä inaktivoi END2-solujen mitoosit eli solut eivät jatka jakautumistaan tytärsoluikseen (Mummery et al., 2003, Xu et al., 2008). Molemmissa menetelmissä sykkivät alueet eristetään kollageenaasin avulla alustoiltaan ja siirretään gelatiinilla peitettylle alustalle jatkokutkimuksia varten (Sallam et al., 2015).

Solu-solukontaktissa toteuttavan END2-menetelmän seuraavassa vaiheessa kantasolut asetetaan samoihin soluviljelykaivoihin END2-solujen kanssa yhteisviljelyä varten. Yhteisviljelykennoissa on tutkitusti nähtävissä

sykkiviä alueita seitsemän vuorokauden kuluttua. (Mummery et al., 2003) On tutkittu, että kyseisellä erilaistusmenetelmällä tuotettuna, sykkiviä alueita nähdään noin kolmasosassa kokonaisalueesta, mutta soluista kuitenkin vain 2–3 % ovat kardiomyosyyttejä. Kyseisen menetelmän heikkoutena onkin erilaistuvien sydänlihassolujen vähäinen määrä. Mummery et al. ovat tutkimuksessaan osoittaneet, että mediumin ollessa täysin seerumi- ja insuliinivapaa, sykkivien alueiden määrä kymmenkertaistuu ja kardiomyosyyttien osuus soluista kasvaa 25 %:iin. (Mummery et al., 2012) Toinen menetelmän heikkous on se, että END2-solukerros pitää erikseen tuottaa juuri ennen solujen erilaistamista. Menetelmän vahvuuksia kuitenkin ovat sen helppous, nopeus sekä erilaistuneiden solurykelmien manuaalinen dissosiaatio, jolloin entsyymaattista dissosiaatiota ei tarvita. (Mummery et al., 2003)

Menetelmässä, jossa käytetään END2-konditioitua mediumia, medium on aluksi yhteisvaikutuksessa END2-solujen kanssa 4–5 vuorokautta, minkä jälkeen mediumiin siirretään EB:t. EB:t kasvatetaan edeltävästi kantasoluista tehdyssä suspensiossa. Konditioitua mediumia käyttäessä, sykkiviä alueita voidaan nähdä 12 vuorokautta sen jälkeen, kun EB-aggregaatit ovat siirretty kyseiseen mediumiin. Tämän menetelmän heikkoutena on END2-konditoidun mediumin tuottaminen aina samanlaisena. Menetelmässä ei kuitenkaan ole tarvetta sijoittaa EB:t END2-solukerroksen päälle ja medium on varastoitavissa. Nämä ovat kyseisen menetelmän vahvuuksia. (Xu et al., 2008)

1.3.5 Kasvutekijä- ja pienmolekyylirilaistus

Pienmolekyylirilaistusmenetelmässä käytetään joko kasvutekijöitä, jotka ovat tiettyjä proteiineja tai kardiogeneesiin vaikuttavia pienmolekyylejä (Xu, 2012). Pienmolekyylirilaistuksessa ES-solujen signaalintireittejä aktivoidaan ja inhiboidaan tietyssä järjestyksessä aikaansaaden näin ES-solujen erilaistuminen kardiomyosyyteiksi. Sydänsoluerilaistus on monimutkainen prosessi, joten ei ole olemassa yksittäistä kasvutekijää, jonka avulla kantasolu saadaan erilaistumaan sydänlihassoluksi. (Pekkanen-Mattila, 2010)

Tutkimuksessaan Laflamme et al. käyttivät aktiviini-A:ta sekä luun morfogeenistä proteiini 4:sta (eng. bone morphogenetic protein 4, BMP-4) erilaistaessaan kardiomyosyyttejä (Laflamme et al., 2007). Aktiviini-A ja BMP-4 aikaansaavat ES-soluissa mesoendodermin muodostuksen, joka myöhemmin jatkuu mesodermi- ja endodermikehitykseen (Osakada et al., 2009). Syntyvät sydänlihassolut erilaistuvat mesodermista ja on osoitettu, että sydänlihassolujen erilaistumista indusoivat kasvutekijät ovat suurilta osin endodermin alkuperää (Lough and Sugi, 2000). On osoitettu, että kardiomyosyyttejä on mahdollista erilaistaa näiden kahden kasvutekijän avulla. Kyseinen erilaistustapa alkaa pitämällä kantasoluja viikon ajan kasvatusmediumissa. Tämän jälkeen ES-soluja käsitellään aktiviini-A:n avulla yhden päivän ajan, minkä jälkeen soluja käsitellään BMP-4:lla neljän päivän ajan. Sydänsolujen esiasteita on nähtävissä kahdeksantena päivänä ja kahden päivän kuluttua tästä, mediumissa nähdään spontaanisti supistuvia solurykelmiä. Syntyneitä erilaistuneita soluja on mahdollista pitää elossa 2–3 viikkoa mediumissa, jossa ei ole seerumia. (Ueno et al., 2007, Lian et al., 2013)

Yang et al. ovat osoittaneet, että erilaistus onnistuu myös käyttämällä kasvutekijöitä aktiviini-A, BMP-4, bFGF (eng. basic fibroblast growth factor), VEGF (eng. vascular endothelial growth factor eli verisuonten endoteelin kasvutekijä) ja DKK-1 (eng. dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1) (Lough and Sugi, 2000, Ueno et al., 2007, Yang et al., 2008) yhdistelemällä näitä vaihtelevasti (Yang et al., 2008). Nämä aikaansaavat ES-solujen erilaistumisen solupopulaatioiksi, joissa jopa 50 % soluista ovat sykkiviä kardiomyosyyttejä (Yang et al., 2008). Menetelmässä on kolme vaihetta ja se perustuu EB-erilaistukseen. (Pekkanen-Mattila, 2010, Yang et al., 2008) Alussa erilaistettavia soluja käsitellään aktiviini-A:lla, BMP-4:lla ja bFGF:lla neljän päivän ajan, mikä indusoi mesodermin. Seuraavan neljän päivän ajan soluja käsitellään DKK 1:n ja VEGF:n avulla. Kasvutekijöiden lisäksi soluja pidetään vähähappisissa oloissa ensimmäiset 10–12 päivää. (Ueno et al., 2007)

Lisäksi tutkimuksissa on osoitettu, että mesodermin muodostus on mahdollista käyttämällä Wnt3A-kasvutekijää, joka on synteettisesti tuotettu tekijä ja joka aktivoi Wnt/ β -catenin-signalointireitin (Lough and Sugi, 2000, Tran et al., 2009). On tutkittu, että seeprakalojen alkiokehityksen aikana Wnt/ β -catenin-signalointireitti edistää sydänerilaistusta ennen gastrulaatiota, mutta estää sitä gastrulaation aikana (Ueno et al., 2007). Signalointireitin inhibointi on siis tärkeää sydänsoluerilaistuksen lopussa ja tähän tarkoitukseen on käytössä Wnt/ β -catenin-signalointireitin inhiboijaa IWP4 (eng. inhibitors of Wnt ligand production 4). Tutkimuksissa on myös osoitettu, että kun kantasoluja käsitellään Gsk3-inhibiittorilla (glykokeenisyntaasikinaasi 3-inhibiittori) erilaistusta edeltävästi, onnistuu kardiomyosyytien erilaistus tehokkaammin. Kyseisellä menetelmällä 80–98 % kantasoluista erilaistuu kardiomyosyyteiksi. (Lian et al., 2013).

1.3.6 iPS-soluista erilaistetut kardiomyosyytit (iPS-CM)

Erilaistamismenetelmissä iPS-solut erilaistuvat heterogeeniseksi joukoksi sydänsoluja eli tuotetut kardiomyosyytit erilaistuvat eteis-, kammio- sekä johtorata-soluiksi (Pekkanen-Mattila, 2010, Rajala et al., 2011, Mummery et al., 2012).

Ensimmäinen merkki iPS-CM:n onnistuneesta erilaistamisesta ovat sykkivät alueet soluviljelmässä. Aiemmissä menetelmissä tätä käytettiin arvioimaan, onko erilaistamisen tuloksena syntynyt sydänlihassoluja. Nykykäytännön mukaan erilaistamisaste arvioidaan sydämen spesifisen proteiinin, esimerkiksi solunsisäisen troponiini-T:n virtaussytometrialla. (Mummery et al., 2012) Menetelmässä troponiini-T leimataan vasta-aineella. Vasta-aineleimaa ilmentävien troponiinipositiivisten solujen määrä koko solupopulaatiossa lasketaan tämän jälkeen FACS-menetelmällä (eng. fluorescence-activated cell sorting). Tämä määrittelee erilaistamismenetelmän tehokkuuden paremmin kuin supistumisalueiden määrät.

Muita sydänlihassoluille ominaisia proteiineja on mahdollista tarkastella immunofluoresenssimenetelmällä. Menetelmällä on esimerkiksi mahdollista määrittää solujen myofilamenttiproteiinit kuten alfa-aktiini, ja näin voidaan tarkastella sydänlihassoluille ominaisen sarkomeerirakenteen. (Mummery et al., 2012)

Erilaistettujen CM:n keskeisin ominaisuus on sähköinen aktiivisuus eli aktiopotentiaalit (Kehat et al., 2001, Mummery et al., 2003), joiden avulla sähköinen signaali etenee sydänlihaksessa. Sydänlihassolujen

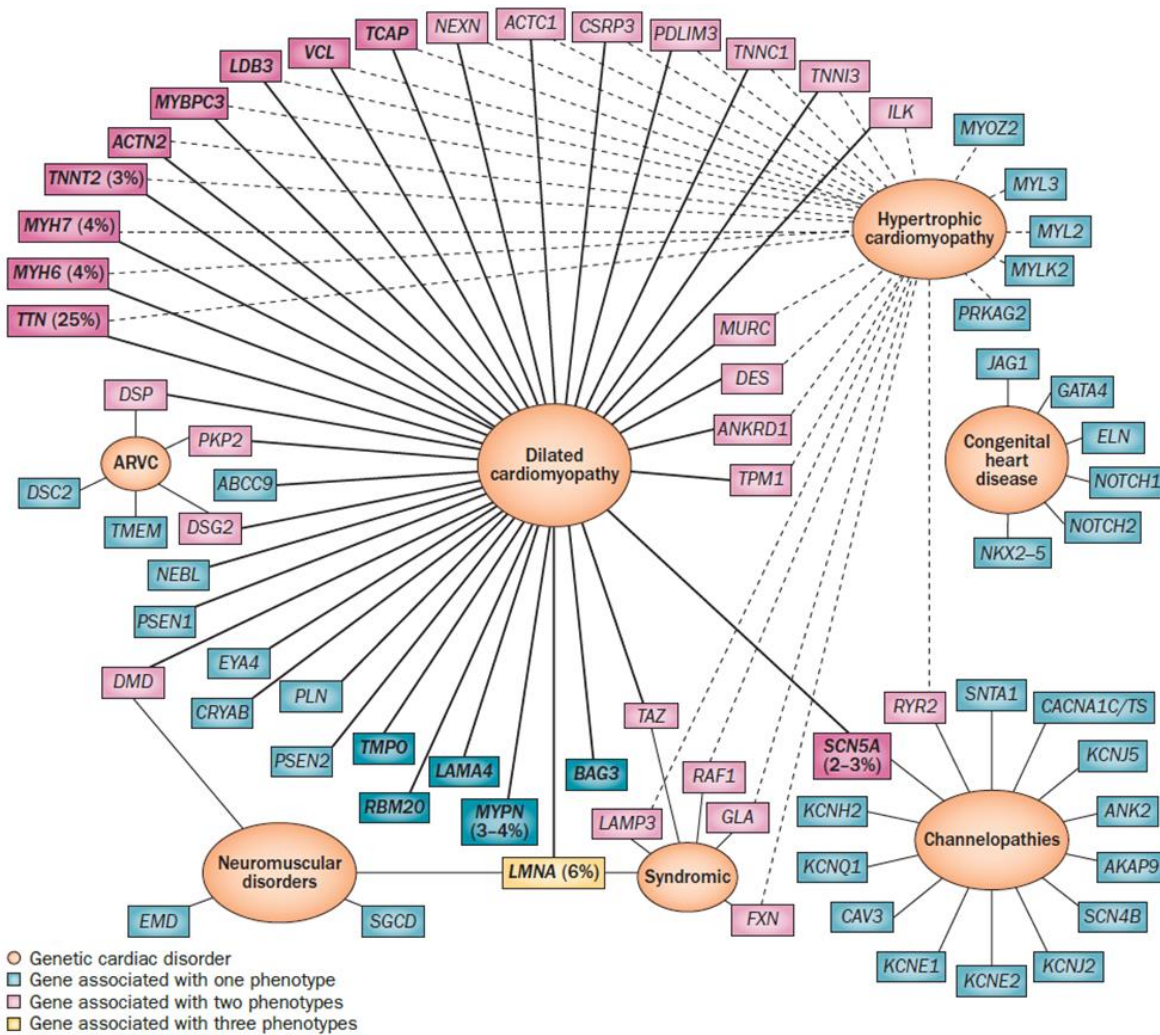
aktiopotentiaalit tarvitsevat syntyäkseen solunsisäisen kalsiumin, jonka vapautuminen solusta aikaansaa solun mekaanisen supistumisen. PCR-menetelmällä on mahdollista tarkastella sydänlihassolujen ilmentämiä transkriptiotekijöitä, monofilamenteja sekä kalsiumia kierrättäviä proteiineja. Erilaistettujen CM:n aktiopotentiaaleista on eroteltavissa spontaani depolarisaatio sekä diastolinen vaihe. Solujen aktiopotentiaalit viittaavat kuitenkin siihen, että tuotetut solut ovat suhteellisen epäkypsiä verrattuna aikuisin sydänlihassoluihin. (Moretti et al., 2013)

iPS-menetelmän heikkouksena onkin tuotettujen kardiomyosyyttien matala maturaatioaste. Tuotettujen solujen ionikanavat sekä sarkomeeriproteiinit eroavat aikuisten kardiomyosyyteistä, ja tämän vuoksi iPS-CM:t muistuttavat morfologialtaan enemmän alkion kuin aikuisen kardiomyosyyttejä. (Lieu et al., 2009, Ojala, 2015) Lisäksi on huomioitava, että iPS-menetelmä on vain yksittäisten sydänsolujen mallinnus, joten sydänkudoksen monimuotoisuus jää puuttumaan mallinnuksesta. Menetelmä ei myöskään ota huomioon sydämen toimintaa elimenä eikä muita kehon elinjärjestelmiä, jotka voivat omalta osaltaan vaikuttaa sydänsairauksien kulkuun. (Moretti et al., 2013)

Näiden tunnettujen ominaisuuksien vuoksi, erilaistuvat sydänlihassolut ovat tunnistettavissa ja paikannettavissa soluviljelmissä.

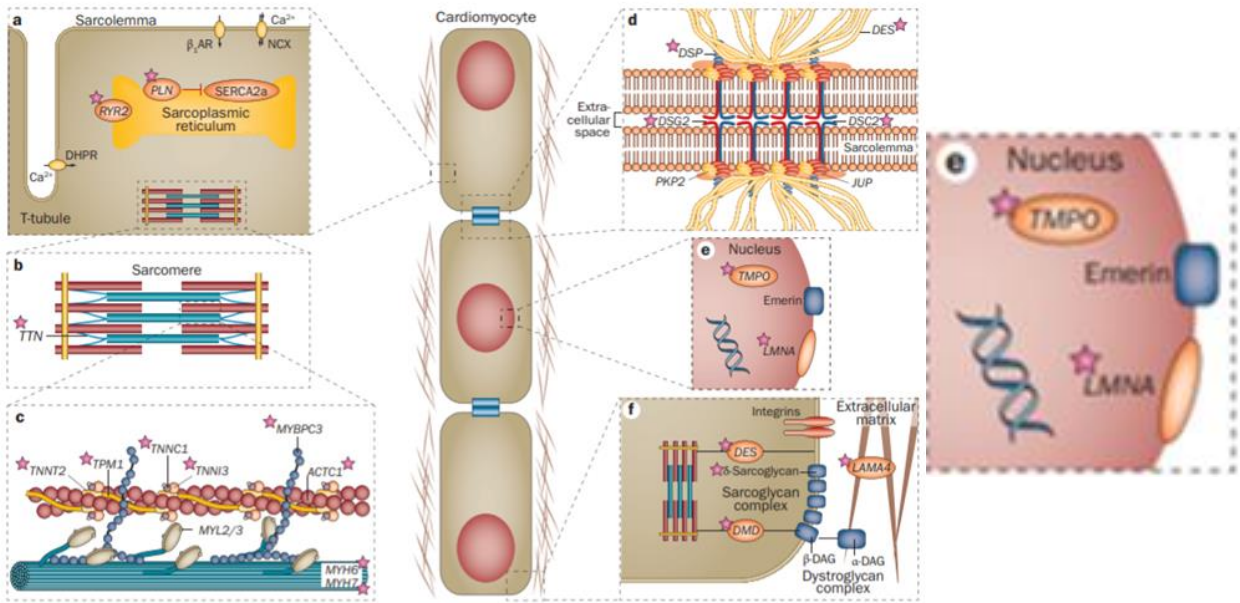
1.4 Sydäntä laajentava eli dilatoiva kardiomyopatia

Dilatoivalle kardiomyopatialle (DCM) ovat ominaisia suurentuneet sydänkammiot ja sydämen systolisen toiminnan heikentyminen (ejektiofraktio alle 40 %), mikä johtaa sydämen vajaatoimintaan ja arytmiaan (Siu et al., 2012, Ito & Nomura, 2018). Lisäksi taudille ominaisia ovat ongelmat sydänimpulssien johtumisessa (www.oppiportti.fi, kar01518). Taudin oireina ovat yleensä hengenahdistus, väsymys, rintakivut ja rytmihäiriöt. DCM on tautina heterogeeninen ja arviolta 40 % tautitapauksista aiheutuu erilaisista geenimutaatioista, joita on löydetty yli 50. (Ito & Nomura, 2018) Kuvassa 5 on esitetty tunnettuja geenejä, jotka aiheuttavat kardiomyopatioita sekä tärkeimpien taudinaiheuttajien prosenttiosuudet (Hershberger et al., 2013).



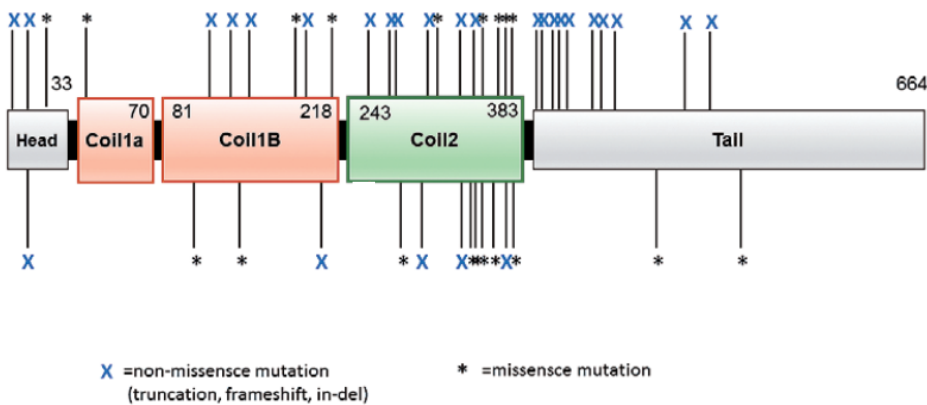
Kuva 5. Kaaviossa esitetty kardiomyopatioiden aiheuttavien geenimutaatioiden monimuotoisuus sekä mutaatioihin liitetyt sairausfenotyypit. Kaaviossa kirkaammin esitetyt geenit liittyvät perinnölliseen dilatoivaan kardiomyopatiaan. Geeni on kirjoitettu vahvistettuna, jos sen aiheuttaman taudin esiintyvyys DCM-potilaista on > 1 %. Geenin perään on merkitty %-osuus, jos geenimutaation aiheuttama osuus sairaudesta on > 3 %. Kuvasta nähdään, että LMNA-geenin mutaatiot aiheuttavat noin 6 % potilaiden dilatoivista kardiomyopatioista ja että LMNA-mutaatio assosioidaan kolmeen eri fenotyyppiin. LMNA-mutaation fenotyyppinä ovat DCM:n lisäksi neuromuskulaaritaudit sekä muut oireyhtymät. (Hershberger et al., 2013)

LMNA-geeni koodittaa lamiinia A ja C, jotka ovat tumen säieproteiineja. Kyseiset proteiinit polymerisoituvat rakenneproteiineiksi tumen ääreisosissa niin kutsutuksi tumalevyksi. Tumalevy ylläpitää tumen rakenteen lujuutta ja välittää tumen liikkeitä liittämällä aktiinin ekstrasellulaarimatriksiin. Lisäksi tumalevy ylläpitää kromatiinin järjestäytyneisyyttä ja osallistuu solun geeni-ilmentymään. (Tesson et al., 2014) Kuvassa 6 on esitetty LMNA:n sekä muiden DCM:ä aiheuttavien geenimutaatioiden sijainti sydänlihassolussa (Hershberger et al., 2013).



Kuva 6. Kuvassa on esitetty, että heterogeeninen joukko geenimutaatioita voivat aiheuttaa saman DCM-fenotyypin. Nämä geenit vaikuttavat laajasti sydänlihassolun perusominaisuuksiin ja solun biokemiallisiin reitteihin, mutta kuitenkin suurin osa geneeistä voidaan liittää sydänlihaksen supistumiseen ja tämän säätelyyn. Kohdissa a-d sekä f esitetään muita kuin LMNA genejä, jotka aiheuttavat dilatoivaa kardiomyopatiaa. Lisäksi kuvasta nähdään näiden geenien sijoittuminen sydänlihassolussa. Kohdassa e nähdään sydänlihassolun tumaa ääreisosassa LMNA-geeni, joka koodaa lamiini A- ja C-filamenteja, jotka ovat tumalevyn proteiini-rakenteita. (Mukaillen Hershberger et al., 2013)

Nykykäsityksen mukaan, tärkeimpiä dilatoivan kardiomyopatian geneettisen muodon aiheuttajia ovat sydänlihassolujen LMNA-mutaatiot, jotka periytyvät autosomissa dominoivasti (<http://www.oppiportti.fi>, kar01518). LMNA-mutaatiot aiheuttavat 5–10 % kaikista perinnöllisistä DCM-tautitapauksista (Siu et al., 2012, Tesson et al., 2014, Ito & Nomura, 2018). Kyseisiä LMNA-mutaatioita tunnetaan nykyään yli 160 (Ito & Nomura, 2018). Kuvassa 7 on esitetty osa LMNA-geenin mahdollisista mutaatioista, jotka aiheuttavat dilatoivaa kardiomyopatiaa. Lisäksi tässä on mainittu mutaatioiden syntytavat. (Ito & Nomura, 2018)



Kuva 7. LMNA-geenin rakenne, johon on merkattu mahdollisten geenimutaatioiden paikat. * tarkoittaa missense-mutaatiota eli mutaatiota, joka muuttaa yhden tai useamman kodonin siten, että polypeptidiketjuun tulee alkuperäisestä poikkeavia aminohappoja. X tarkoittaa ei-missense-mutaatiota, joita ovat mm. katkaisu, insertio ja deleetio. (Ito & Nomura, 2018)

LMNA-mutaatioon liittyvä DCM-fenotyyppi on todettavissa suurimmalla osalla potilaista, joilla on sydämessä johtumishäiriöitä sekä lieviä kammioden toimintahäiriöitä. Geenivirheen kantaja voi olla pitkään myös täysin oireeton, kunnes sydämen toiminta romahtaa. Muita fenotyyppisiä, joita LMNA-mutaatiot aiheuttavat, ovat mm. hermo-lihassairaudet, lipodystrofia eli rasvansiirtymishäiriö ja Hutchison-Gilford progeria eli potilaan ennenaikainen vanheneminen. LMNA-mutaation aiheuttamassa kardiomyopatiassa penetranssi on erittäin korkea, mikä tarkoittaa sitä, että kyseinen tautigeeni ilmenee sitä kantavassa yksilössä usein (Shah et al., 2019). LMNA-mutaatioiden kantajille on yleistä, että jokin aiemmin mainituista taudin fenotyypeistä ilmenee 50–60 vuoden iässä. Kuvassa 5 on aikaisemmin esitetty geeneihin liitettyjä fenotyyppisiä. (Hershberger et al., 2013)

1.5 Sydäntautimallinnus iPS-soluilla

iPS-solujen geenit ovat täysin identtiset soluja luovuttaneen potilaan geenien kanssa (Dimos et al., 2008, Park et al., 2008). Tolloin, jos potilaan sydänsairaus johtuu geenivirheestä, sisältävät erilaistetut sydänlihassolut saman geenivirheen (Lahti et al., 2012). Tämä mahdollistaa perinnöllisten sydäntautien mekanismien mallinnuksen ja tutkimuksen laboratorio-olosuhteissa (Siu et al., 2012, Shah et al., 2019) ja voi mahdollisesti johtaa yksilöityyn kantasoluterapiaan tulevaisuudessa (Dimos et al., 2008, Park et al., 2008).

Aikaisemmissa tutkimuksissa iPS-soluilla on mallinnettu Hutchison-Gilford progerian (HGP) fenotyyppisiä ja mekanismeja. Kyseessä on yksi vakavimmista LMNA-mutaatioista, joka aiheuttaa potilaan ennenaikaista vanhenemista ja voi johtaa kuolemaan. (Zhang et al., 2010, Liu et al., 2011, Siu et al., 2012) Zhan et al. ovat tutkimuksessaan tuottaneet iPS-soluja HPG-potilaan fibroblasteista. Kyseiset iPS-solut ilmensivät hieman HGP:lle ominaista progeriinia, lamiini A:ta tai lamiini C:tä. (Zhang et al., 2010) Toisessa tutkimuksessa Liu et al. ovat osoittaneet, että erilaistaessa HGP-iPS-soluja, on näissä nähtävissä HGP:lle ominainen progeriini. Erilaistaessaan kyseisiä iPS-soluja jatkossa sileiksi lihassoluiksi, nähdään erilaistetuissa soluissa verisuonien ikääntymiseen liittyvät ennenaikaiset vanhenemismuutokset, jotka ovat HGP-potilaille ominaisia. (Liu et al., 2011) Tutkimustulosten perusteella voidaan todeta, että iPS-mallinnuksella tuotetut solut ilmentävät kyseisen sairauden fenotyypin ja mallinnuksella soluissa voidaan nähdä samoja oireita, kuin potilailla, joista solut ovat peräisin. (Zhang et al., 2010, Liu et al., 2011)

Dilatoivaa kardiomyopatiaa on pystytty mallintamaan iPS-solujen avulla, joista on sittemmin erilaistettu sydänlihassoluja, jotka ilmentävät LMNA-mutaatiota (Siu et al., 2012, Shah et al., 2019). Siu et al. ovat osoittaneet, että MAPK-inhibiittorit lievittävät LMNA-mutatioituneiden iPS-CM:iän tumahäiriöitä ja apoptoosia eli solukuolemia sähköstimulaation jälkeen (Siu et al., 2012). MAPK eli mitogeeniaktivoituneet proteiini-kinasit vaikuttavat proteiini-kinasikaskadeilla ja ohjaavat solujen vasteita lukuisiin ärsykkeisiin. MAPK-inhibiittorit vaikuttavat suoraan MAPK-signaalintireittiin ja inhiboivat tätä (Zhang et al., 2016). Toisessa tutkimuksessa on osoitettu, että Atalurenin käyttö suojaa osan LMNA-soluista tumahäiriöiltä ja apoptoosilta. Ataluren myös parantaa iPS-CM:iän supistumista. (Lee et al., 2017) Ataluren on EU:ssa käytössä oleva lääkeaine, jota

käytetään Duchennen lihasdystrofian hoidossa. Molemmat tutkimuksista osoittavat, että yksilöllinen mutaatiolähtöinen lääketiede on tärkeä DCM-potilaiden hoidossa (Shah et al., 2019).

DCM:n lisäksi iPS-soluilla on mallinnettu myös muita sydänsairauksia, kuten pitkä QT-syndroomaa. Lahti et al. ovat tutkimuksessaan osoittaneet, että kardiomyosyyteilla, joilla on pitkä QT-syndroomamutaatio (LQT2) on pidempi aktiopotentialiaali kuin verrokeilla. Lisäksi nopean viivästyneen kaliumkanavan tiheys oli LQT2-soluissa merkittävästi alhaisempi kuin kontrollisolulla. Tutkimuksessa on myös osoitettu, että LQT2-solut olivat verrokkeja herkempiä lääkkeille, jotka voivat aiheuttaa arytmiää solun sähköisessä toiminnassa. (Lahti et al., 2012)

iPS-soluihin perustuva sydäntautimallinnus on ollut lupaava työkalu sydänsairauksien mallintamiseen ja yksilölliseen lääketestaukseen, mutta saatujen kardiomyosyytien alhainen maturaatioaste, mahdollinen tuumorigeenisuus sekä vastaanottajan immuunivaste soluille tarvitsevat lisää tutkimuksia ennen sydänlihassolujen kliinistä soveltamista potilastyöhön (Shah et al., 2019).

2 TUTKIMUSKYSYMYKSET

Tämän työn tarkoituksena on verrata keskenään DCM-potilaiden, joilla on LMNA-mutaatio, ja terveen kontrollipotilaan iPS-kardiomyosyytteja Beatview-videoanalyysin avulla. Analyysin on tarkoitus verrata kyseisten sydänlihassolujen eri toimintavaiheita ja arvioida, onko analyysin avulla mahdollista nähdä eroja solujen sykkinisessä. Tavoitteena on ymmärtää, voiko kyseisellä videoanalyysillä arvioida dilatoivan kardiomyopatian fenotyyppiä ja näin ollen mallintaa kyseistä tautia. (Ahola et al., 2014a, Ahola et al., 2014b)

3 MENETELMÄT

3.1 Eettinen hyväksyntä

Tutkimus tehtiin lääketieteen ja biotieteiden tiedekunnan sydäntutkimusryhmässä, joka on saanut hyväksytyt eettisen lausunnon iPS-solujen tutkimukseen ja käyttöön Pirkanmaan sairaanhoitopiirin eettiseltä lautakunnalta (R08007). Potilailta, joilta on otettu ihobiopsia, on saatu kirjallinen suostumus.

3.2 Aineisto

Aineistona on videoita kolmesta indusoidusta pluripotentista kantasolulinjasta, jotka ovat peräisin kolmen eri potilaan fibroblasteista. Sydänryhmä on jo aiemmin uudelleenohjelmoinut tämän tutkimuksen fibroblastit iPS-soluiksi sendai-virus-ohjelmointimenetelmällä ja karakterisoinut ne. iPS-solut on erilaistettu sydänlihassoluiksi pienmolekyylirilaistusmenetelmällä. Kyseistä erilaistamismenetelmää on käsitelty aikaisemmin luvussa 1.3.5. Tutkielmassa ei esitetä potilaan tunnistamisen mahdollistavaa tietoa ja solulinjat ovat koodattuja.

Tutkittavia solulinjoja ovat 12619.LMNAs.p28(11) (potilas 1) ja 12704.LMNAs.p29(5) (potilas 2). Molempien solulinjojen soluilla ja molemmilla potilailla on muutos lamiini A/C-geenissä (LMNAs) ja fenotyypinä dilatoiva kardiomyopatia. Lisäksi on yksi iPS-solulinja terveestä henkilöstä (WT04602p10(6)). Yksi video käsittää yhden sydänlihassolun. 12619.LMNAs.p28(11)-solulinjan käsiteltäviä soluja on 24 kappaletta ja näin ollen videoiden lukumäärä on 24. Solulinjan 12704.LMNAs.p29(5) soluja ja soluvideoita on käsitelty 27 kappaletta.

Kontrollilinjan WT04602p10(6) (WT = wild type) solut ovat alun perin sellaisen potilaan ihon fibroblasteja, jolla ei ole LMNA-mutaatiota (Lahti et al., 2012). Kontrollisoluja ja -videoita on käsitelty 21 kappaletta. Taulukossa 1 esitellään tarkemmin tutkimuksen aineistoa.

Taulukko 1. Solujen lukumäärä, potilas, LMNA-mutaatio ja sydänsoluerilaistusmenetelmä solulinjan mukaan.

	Solujen lukumäärä, n	Potilas	LMNA-mutaatio	Sydänsoluerilaistusmenetelmä
WT04602p10(6)	21	terve kontrolli	ei	pienmolekyylirilaistus
12619.LMNAs.p28(11)	24	potilas 1	kyllä	pienmolekyylirilaistus
12704.LMNAs.p29(5)	27	potilas 2	kyllä	pienmolekyylirilaistus

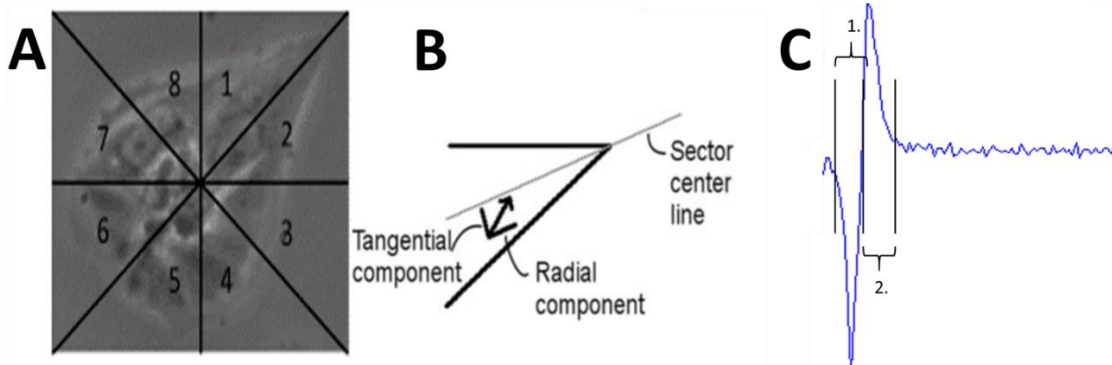
3.3 Videointi ja analyysit

iPS-soluista erilaistettuja sydänlihassoluja, jotka sykkivät, voidaan tarkastella ja videoida mikroskoopilla. Kuvauksen aikana solukaivot ovat lämpölevyn (37–38 °C) päällä, koska lämpötilan lasku hidastaa sydänsolujen sykintää. Mikroskooppi on Nikon Eclipse TS100 (Nikon Corporation, Tokio, Japan) ja digitaalinen videokamera Optika DIGI-12, Optica Microscopes (Ponteranica, Italy). Yksittäinen video kestää 60 sekuntia, resoluutio on 720 x 480 ja kuvataajuus on 30 kuvaa sekunnissa. Videointia varten kardiomyosyyttien rykelmät dissosioitiin yksisolutasolle (Kuvat 10–12).

Videoinnin jälkeen videot voidaan analysoida Beatview-analyysohjelmalla yksi kerrallaan. Ohjelma mittaa sydänsolun supistumisen ja relaksaatioiden kestot, mahdolliset ajat näiden välissä sekä solun supistumisfrekvenssin. (Ahola et al., 2014a)

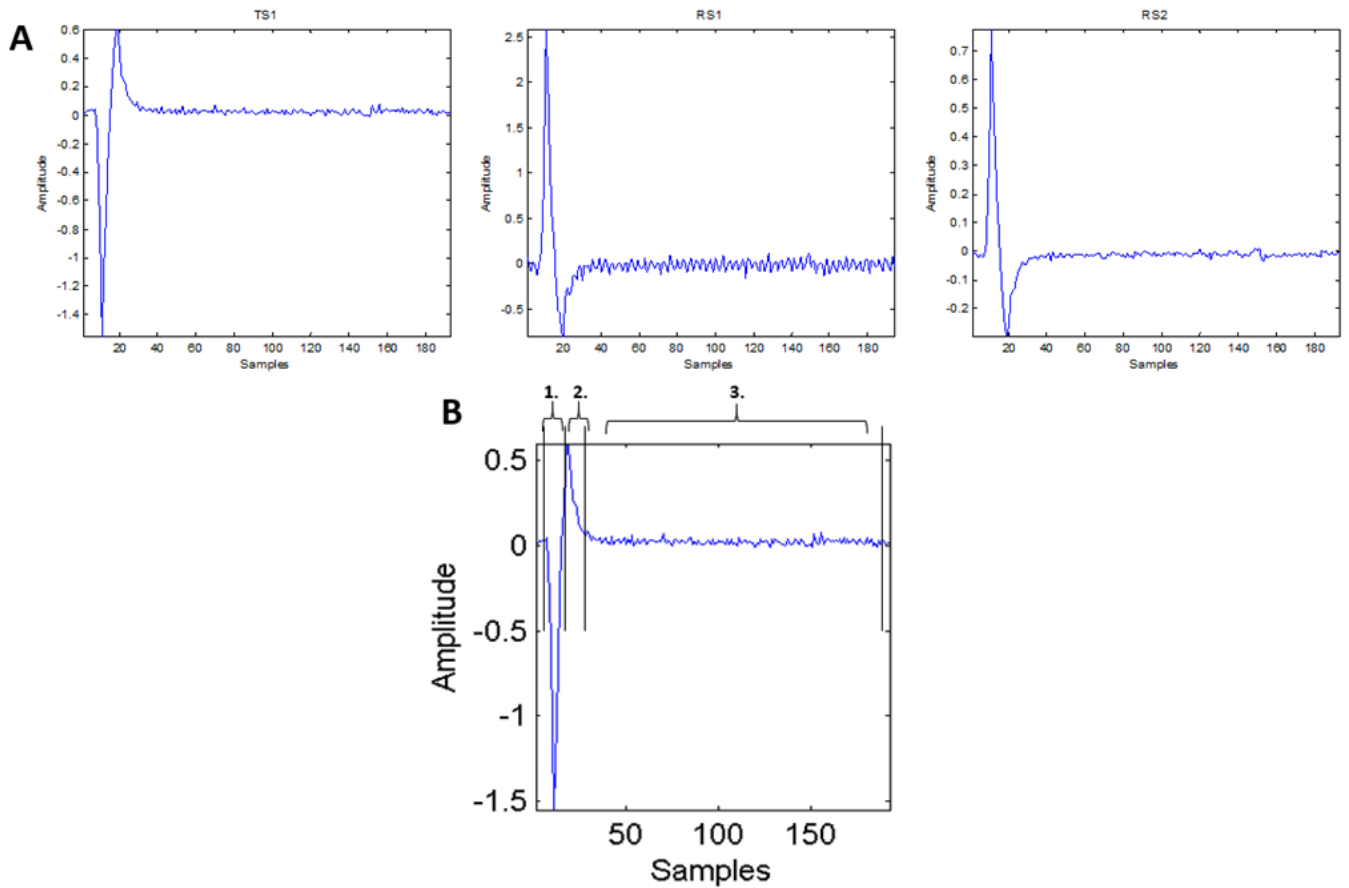
Analyysi alkaa siitä, että videon kuva leikataan manuaalisesti niin, että huonosti tai ei ollenkaan supistuvat sydänlihassolualueet rajautuvat kuvasta pois virheiden vähentämiseksi. Lisäksi solulle valitaan keskittymäpiste, jota kohti sykintä näyttää suuntautuvan (eng. focus point). (Ahola et al., 2014a)

Ohjelma jakaa solun kahdeksaan sektoriin, joista jokaisen kulma keskittymäpisteeseen suhteen on 45 astetta. Analyysiohjelma laskee jokaiselle sektorin nopeusvektorille kaksi komponenttia – tangentialiaisen ja radiaalisen. Radiaalinen komponentti lasketaan sektorin keskilinjan suhteen (sector center line) ja tangentialinen komponentti keskilinjan normaalin suhteen. Lopuksi videosta saadaan 16 erilaista signaalia, joista kahdeksan ovat radiaalisia ja kahdeksan tangentialisia. Ohjelma piirtää jokaisesta signaalista kuvaajan, joka esittää kardiomyosyytin sykkimisen kyseisellä alueella. Radiaaliselle komponentille solun supistuminen on määritetty negatiivisen y-akselin mukaan ja relaksaatio positiivisen y-akselin mukaan. (Ahola et al., 2014a) Tämä hahmoteltu Kuvassa 8. (Mukaiillen Ahola et al., 2014a)



Kuva 8. A Solulinjan 12704.LMNAs.p29(5) sydänsolu. Solu jaetaan keskittymäpisteestä kahdeksaan sektoriin, joista jokaisen kulma kyseiseen pisteeseen nähden on 45 astetta. B Jokaiselle sektorille lasketaan tangentialinen ja radiaalinen komponentti. C Solulinjan WT04602p10(6) solun radiaalisen komponentin kuvaaja, jossa 1. = solun supistumisvaihe ja 2. = solun relaksaatiovaihe. (Mukaiillen Ahola et al., 2014a)

Saaduista signaaleista valitaan silmämääräisesti kolme parasta, jotka kuvaavat hyvin solun sykintää. Näistä ohjelma laskee solun supistumiskierron vaiheet, joita ovat supistuksen kesto (eng. contraction duration), supistuksen ja relaksaation välinen aika (eng. contraction end – relaxation start), relaksaation kesto (eng. relaxation duration), relaksaation jälkeinen aktiivisuus (eng. post-relaxation activity) ja relaksaation loppumisen ja seuraavan supistuksen alun välinen aika (eng. relaxation end – next contraction start). Lisäksi ohjelma laskee supistumistiheyden (eng. beating frequency). (Ahola et al., 2014a) Kuvassa 9 on esitetty solulinjan 12704.LMNAs.p29(5) kardiomyosyytin kolme parhaaksi arvioitua kuvaajaa, joista ohjelma on lopuksi muodostanut yhden lopullisen kuvaajan ja laskenut edellä mainitut arvot.



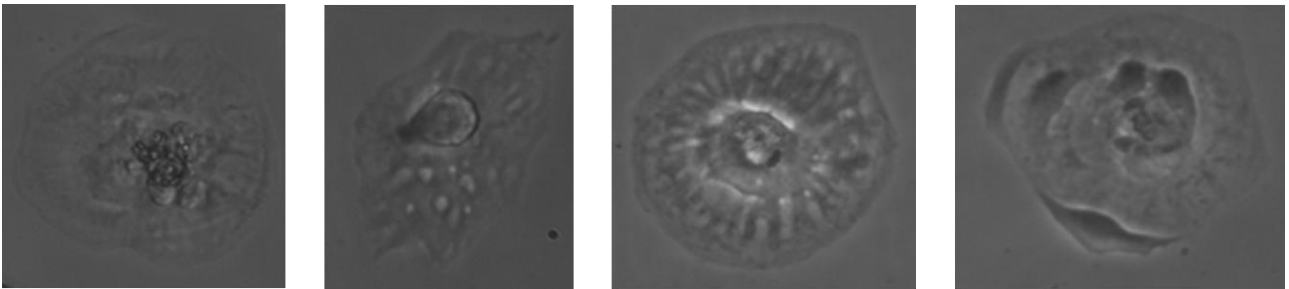
Kuva 9. A Solulinjan 12704.LMNAs.p29(5) kardiomyosyytin kolme kuvaajaa, jotka on arvioitu kaikkein edustavimmiksi. Kuvaajiksi on valittu sektorin 1 tangentiaalinen komponentti sekä sektoreiden 1 ja 2 radiaaliset komponentit. B Ohjelma laskee kolmesta valitusta kuvaajasta yhden lopullisen kuvaajan, joka kuvastaa parhaiten kyseisen kardiomyosyytin toimintaa. Kuvaajalle on merkattu solun supistumisvaihe (1.), solut relaksaatiovaihe (2.) sekä relaksaation jälkeinen aika (3.). Kuvaajassa ei nähdä supistuksen ja relaksaation välistä aikaa.

3.4 Tilastollinen analyysi

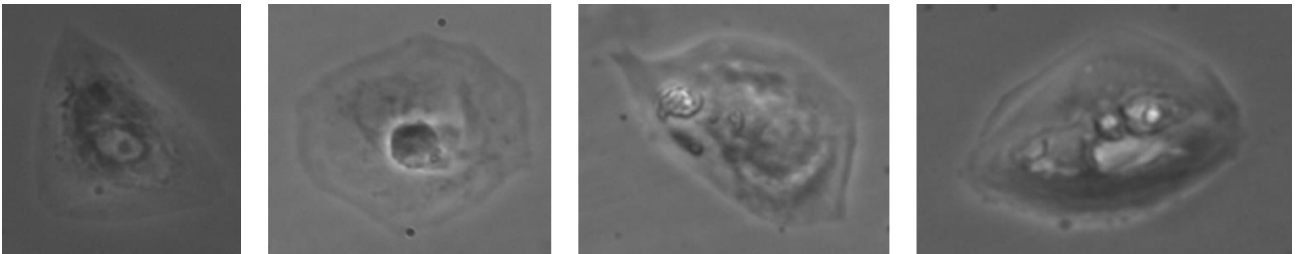
Tilastolliset testit on tehty IBM SPSS Statistics 25 -ohjelmalla (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Käsiteltävät muuttujat ovat epäparametrisia ja riippumattomia. Tilastolliseksi testiksi on valittu Kruskal-Wallis-testi, sillä testi jatkaa Mann-Whitney U-testiä ja sopii kahdelle tai useammalle muuttujalle. Testi suoritettiin sekä Bonferroni-korjauksen kanssa että ilman. Kaikkien muuttujien tunnusluvuiksi on laskettu mediaanit, IQR sekä minimi- ja maksimiarvot (Taulukot 3–5). Lisäksi on tehty taulukko ja laatikkojanakuvaajat kaikista solun toimintakierron vaiheista (supistuksen kesto, supistuksen ja relaksaation välinen aika, relaksaation kesto, relaksaation jälkeinen aktiviteetti, relaksaation ja seuraavan supistuksen välinen aika).

4 TULOKSET

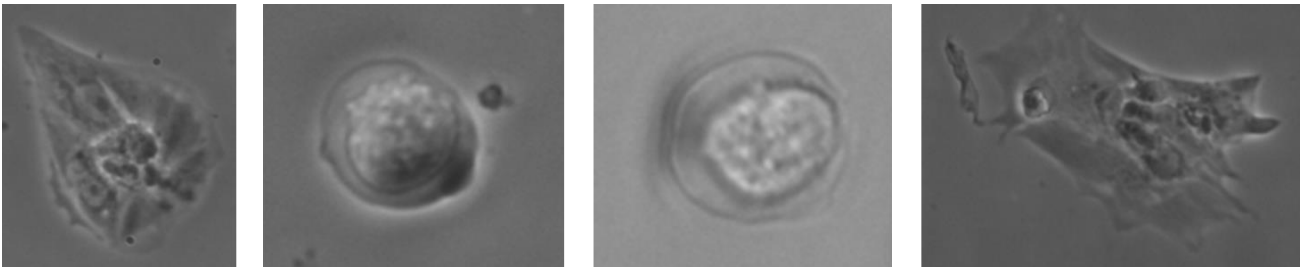
Alkuun on esitelty mikroskopoituja ja videokuvattuja kuvia uudelleenohjelmoituista kardiomyosyyteistä solulinjojen mukaan (Kuvat 10–12). Silmämääräisesti ei voida luotettavasti sanoa, missä soluista on LMNA-mutaatio.



Kuva 10. WT04602p10(6)-kontrollisolulinjan soluja mikroskopoituna ja videoituna. Kardiomyosyyttien rykelmät on dissosioituna yksisoluisiksi levyksi videointia varten.



Kuva 11. 12619.LMNAs.p28(11)-solulinjan soluja, joilla LMNA-mutaatio.



Kuva 12. 12704.LMNAs.p29(5)-solulinjan kardiomyosyyttejä, joilla LMNA-mutaatio.

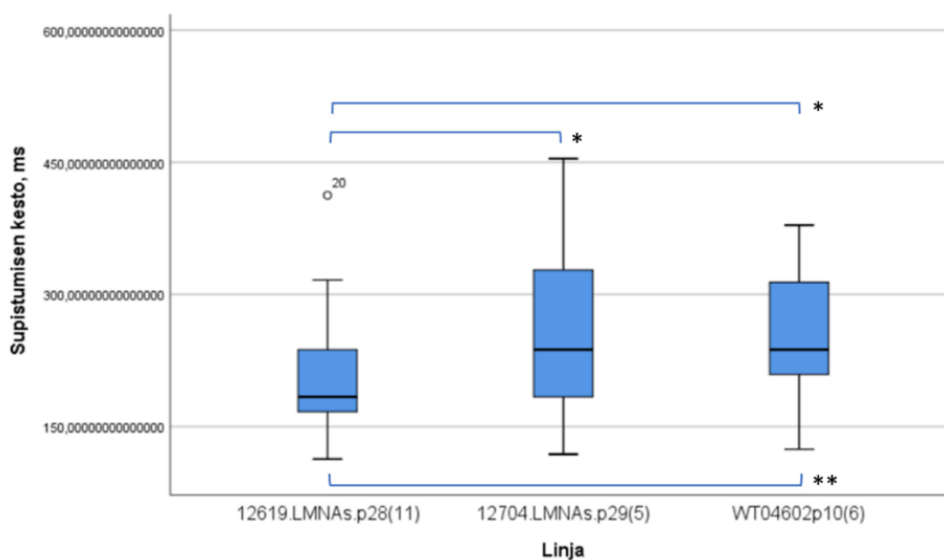
Taulukosta 2 nähdään, että 12619.LMNAs.p28(11)-solulinjan solut supistuvat nopeammin kuin kontrollilinjan ja 12704.LMNAs.p29(5)-solulinjan solut. 12704.LMNAs.p29(5)-solulinjan solujen ja kontrollisolujen supistumisen kestossa ei havaita eroja. Supistuksen ja relaksaation välisessä ajassa eli ajassa, jolloin solu on

supistuneena, erot ovat päinvastaiset. 12619.LMNAs.p28(11) ja kontrollisolulla ei ole eroa, 12704.LMNAs.p29(5)-linjan solut sen sijaan pysyvät terveitä soluja kauemmin supistuneena. Kontrollisolut relaxoituvat molempia mutaatiolinjoja nopeammin. Missään solulinjoissa ei esiinny relaxsaation jälkeistä aktiivisuutta. WT04602p10(6)-linjan solut aloittavat muita solulinjoja hitaammin uuden supistuksen, kun taas 12704.LMNAs.p29(5)-solut nopeimmin. Kummassakin mutatoituneessa solulinjassa solut aloittavat uuden supistuksen nopeammin kuin vertailusolulinjassa.

Taulukko 2. Solujen toimintakierron aikojen mediaanit solulinjojen mukaan.

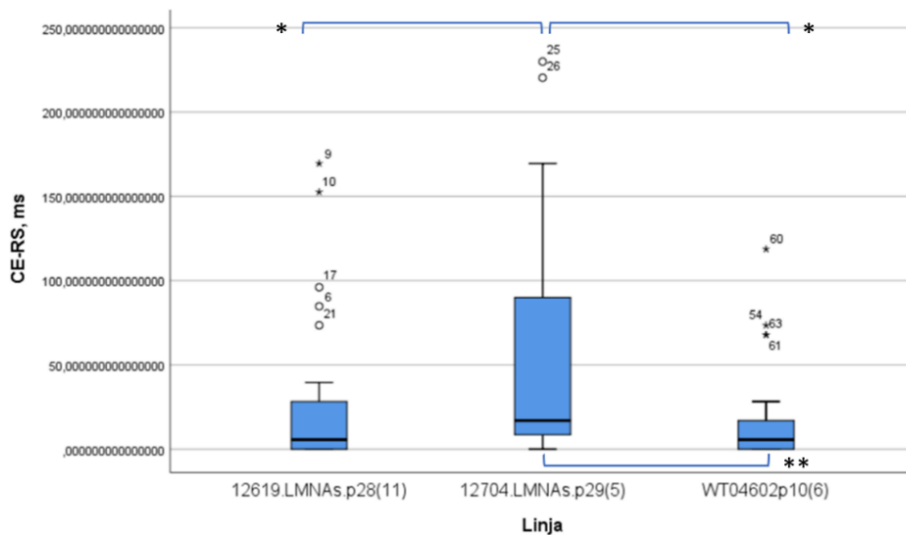
	Solujen määrä (n)	Supistuksen kesto (ms)	Supistuksen ja relaxsaation välinen aika (ms)	Relaksaation kesto (ms)	Relaksaation jälkeinen aktiivisuus (ms)	Relaksaation ja seuraavan supistuksen välinen aika (ms)	Sykenopeus (BPM)
WT04602p10(6)	21	237,29	5,65	299,44	0,00	1553,67	29,02
12619.LMNAs.p28(11)	24	183,62	5,65	333,33	0,00	1412,43	30,96
12704.LMNAs.p29(5)	27	237,29	16,95	338,98	0,00	1258,62	32,48

Kuvissa 13–16 esitetään solujen toimintakierron kaikki vaiheet laatikkojanakuvina solulinjoittain ryhmiteltynä. Kuviiin on merkattu merkittävät erot solulinjojen toimintavaiheiden välillä. Relaxsaation jälkeistä aktiivisuutta kuvaava laatikkojanakuva on poistettu, sillä koko datassa oli vain yksi solu, jolla tämä arvo ei ollut nolla.

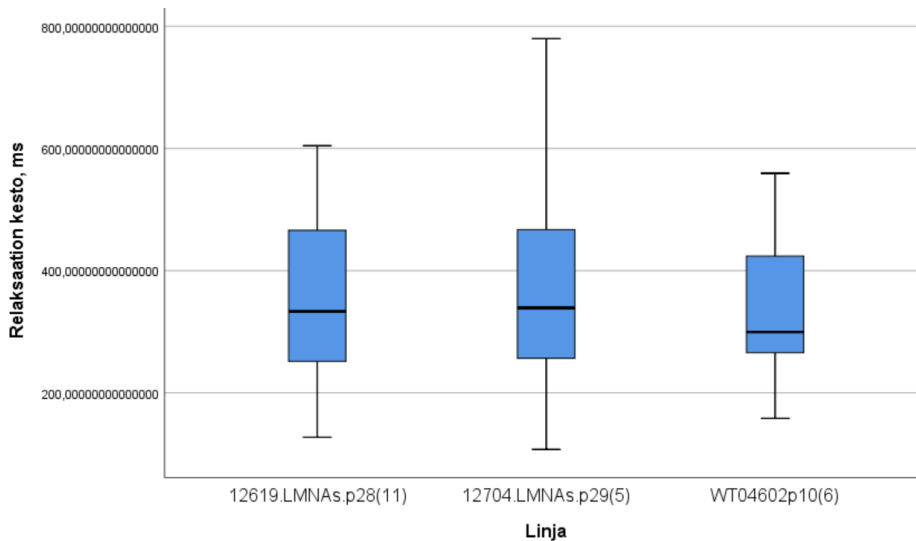


Kuva 13. Laatikkojanakuva supistumisen kestosta solulinjoittain. Vaaka-akselilla solulinjat: vasemmalla potilaan 12619.LMNAs.p28(11)-solulinja, keskellä toisen potilaan 12704.LMNAs.p29(5)-solulinja ja oikealla

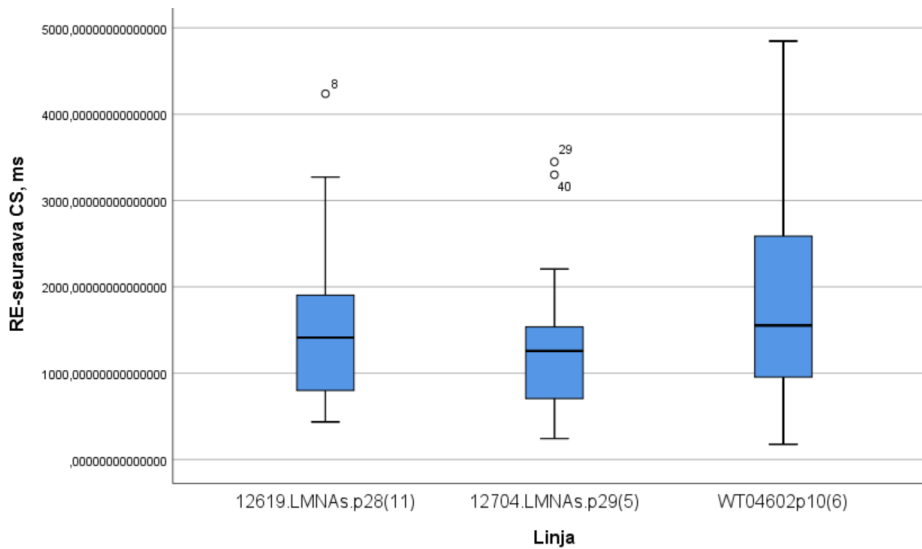
kontrollisolulinja. * = merkitsevä ero supistumisen kestossa Kruskal-Wallis-testillä. ** = merkitsevä ero supistumisen kestossa Bonferroni-korjauksella.



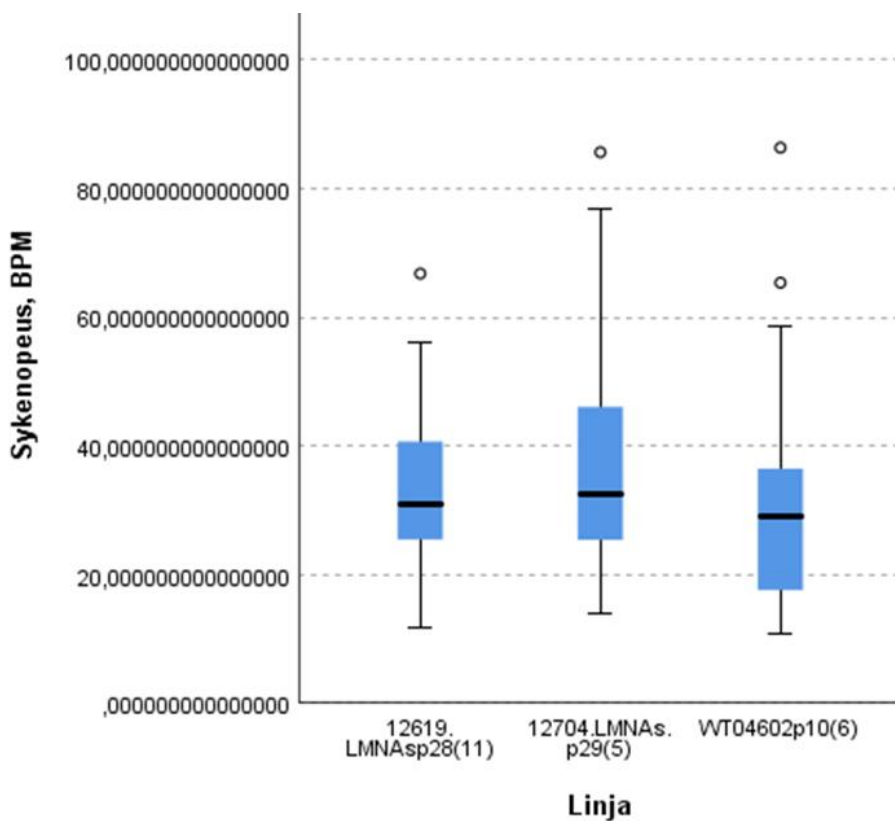
Kuva 14. Laatikkojanakuva supistuksen ja relaksaation välisestä ajasta (CE-RS) solulinjoittain. Vaaka-akselilla solulinjat: vasemmalla potilaan 12619.LMNAs.p28(11)-solulinja, keskellä toisen potilaan 12704.LMNAs.p29(5)-solulinja ja oikealla WT04602p10(6)-solulinja. * = merkitsevä ero CE-RS:ssa Kruskal-Wallis-testillä. ** = merkitsevä ero CE-RS:ssa Bonferroni-korjauksella.



Kuva 15. Laatikkojanakuva relaksaation kestosta solulinjoittain. Vaaka-akselilla solulinjat: vasemmalla potilaan 12619.LMNAs.p28(11)-solulinja, keskellä toisen potilaan 12704.LMNAs.p29(5)-solulinja ja oikealla kontrollisolulinja. Solulinjojen välissä ei ole merkitsevää eroa.



Kuva 16. Laatikkojanakuva relaksaation ja seuraavan supistuksen välisestä ajasta solulinjoittain. Vaaka-akselilla solulinjat: vasemmalla potilaan 12619.LMNAs.p28(11)-solulinja, keskellä toisen potilaan 12704.LMNAs.p29(5)-solulinja ja oikealla terve solulinja. Solulinjojen välissä ei ole merkitsevää eroa.



Kuva 17. Laatikkojanakuva solulinjojen sykenopeudesta. Vaaka-akselilla solulinjat: 12619.LMNAs.p28(11), 12704.LMNAs.p29(5) ja kontrollisolulinja WT04602p10(6). Solulinjojen välillä ei ole merkitsevää eroa.

Tilastollisessa testauksessa (Kruskal-Wallis-testi) verrataan kaikkien kolmen solulinjan toimintavaiheita keskenään, ja huomataan, että supistuksen kestossa ja supistuksen ja relaksaation välisessä ajassa on merkitsevää eroa ryhmien välillä (Kuvat 13–14, Taulukko 3). Muiden toimintavaiheiden vertailuissa ei havaita merkitsevää eroa solulinjojen välillä. P-arvoksi on valittu $< 0,05$.

Tarkastellessa merkitsevää eroa supistuksen kestossa solulinjojen välillä, huomataan, että 12619.LMNAs.p28(11)-solulinja eroaa merkitsevästi sekä 12704.LMNAs.p29(5)-solulinjasta ($p = 0,032$) että terveestä solulinjasta ($p = 0,017$). Kun suoritetaan Bonferroni-korjaus, joka vähentää tyyppi I -virheen mahdollisuutta useamman ryhmän testauksessa, huomataan, että vain kontrollilinjan ja linjan 12619.LMNAs.p28(11) ero pysyy lähellä merkitsevää ($p = 0,051$). (Kuva 13, Taulukko 4)

Vastaavassa supistuksen ja relaksaation välisen ajan tarkemmassa tarkastelussa saadaan merkitsevää eroa 12704.LMNAs.p29(5)-solulinjan ja kontrollilinjan välille ($p = 0,013$) sekä molempien LMNA-mutaatiosolulinjojen välille ($p = 0,030$) Kruskal-Wallis-testillä. Bonferroni-korjauksella vain 12704.LMNAs.p29(5)-solulinjan ja kontrollilinjan supistuksen ja relaksaation välinen aika eroavat merkitsevästi ($p = 0,039$). (Kuva 14, Taulukko 5)

Muissa solulinjojen toimintavaiheissa ei saada esille merkitsevää eroa kummallakaan tilastollisella testillä (Taulukko 3).

Taulukko 3. Taulukossa esitetty riippumattomien muuttujien Kruskal-Wallis-testin tulokset. Taulukosta nähdään, että merkitsevää eroa joidenkin solulinjojen välillä on supistuksen kestossa ja supistuksen ja relaksaation välisessä ajassa. Muissa muuttujissa ei havaita merkitsevää eroa.

Toimintakierron vaiheiden vertailu solulinjojen kesken	Merkitsevyys	Päätelmä
Supistuksen kesto	0,032	Merkitsevä ero
Supistuksen ja relaksaation välinen aika	0,023	Merkitsevä ero
Relaksaation kesto	0,797	Ei merkitsevää eroa solulinjojen välillä
Relaksaation jälkeinen aktiivisuus	0,368	Ei merkitsevää eroa solulinjojen välillä
Relaksaation ja seuraavan supistuksen välinen aika	0,235	Ei merkitsevää eroa solulinjojen välillä
Sykenopeus, BPM	0,466	Ei merkitsevää eroa solulinjojen välillä

Taulukko 4. Tarkastellaan supistuksen kestoa tarkemmin solulinjojen mukaan. Taulukossa Kruskal-Wallis-testin arvo sekä Bonferroni-korjattu arvo.

Supistuksen kesto	Kruskal-Wallis-arvo	Bonferroni-korjaus
12619.LMNAs.p28(11) vs. 12704.LMNAs.p29(5)	0,032	0,099
12619.LMNAs.p28(11) vs. WT04602p10(6)	0,017	0,051
12704.LMNAs.p29(5) vs. WT04602p10(6)	0,696	1,000

Taulukko 5. Tarkastellaan supistuksen ja relaksaation välistä aikaa tarkemmin solulinjojen mukaan. Taulukossa Kruskal-Wallis-testin arvo sekä Bonferroni-korjattu arvo.

Supistuksen ja relaksaation välinen aika	Kruskal-Wallis-arvo	Bonferroni-korjaus
12619.LMNAs.p28(11) vs. 12704.LMNAs.p29(5)	0,030	0,089
12619.LMNAs.p28(11) vs. WT04602p10(6)	0,708	1,000
12704.LMNAs.p29(5) vs. WT04602p10(6)	0,013	0,039

5 POHDINTA

Tutkimuksessa verrattiin videoanalyysiohjelman avulla terveiden iPS-soluista pienmolekyyliomenetelmällä erilaistettujen sydänlihassolujen ja sairaiden, LMNA-geenivirhettä kantavien iPS-soluista erilaistettujen sydänlihassolujen mekaanista supistustoimintaa.

Videoanalyysillä tarkasteltiin iPS-soluista erilaistettuja kardiomyosyyttejä, jotka olivat tuotettu pienmolekyyli-erilaistuksella ja olivat LMNA-mutaation omaavista potilaista peräisin. Kyseisen menetelmän vahvuutena on se, että tuotetut solut ilmentävät tutkitun sairauden fenotyypin ja mallinnuksella soluissa nähdään samoja oireita, kuin potilailla (Zhang et al., 2010, Liu et al., 2011), sillä solujen geenit ovat identtiset potilaiden geenien kanssa. Näin voimme olettaa, että videoanalyysillä on mahdollista nähdä sairauden ilmentymiä solutasolla.

Tutkimuksen tuloksena oli, että 12619.LMNAs.p28(11)-solulinjan solujen supistuksen kesto oli merkitsevästi kontrollisolujen supistusta lyhyempi Kruskal-Wallis-testillä ($p = 0,017$) ja arvo pysyi lähellä merkitsevää Bonferroni-korjauksella ($p = 0,051$) (Kuva 13, Taulukko 4). Tästä voisi ajatella, että supistuksen ollessa lyhyempi, supistuvat mutatoituneet solut samassa ajassa useammin kuin kontrollisolut. 12619.LMNAs.p28(11)-linjan sydänlihassolujen syketiheyden mediaani oli 30,96 BPM, kun taas kontrollisolujen mediaani oli 29,02. Tilastollisessa testauksessa syketiheydessä ei kuitenkaan ollut merkitsevää eroa solulinjojen välillä (Kuva 17).

Sydämessä QT-intervalli kuvaa aikaa kammioiden depolarisaation alusta repolarisaation loppuun eli mekaanisesti QT-aika vastaa aikaa kammioiden supistuksen alusta kammiorelaksaation loppuun. Videoanalyysiohjelmalla ei saada yksittäisen solun QT-aikaa, mutta käyttökelpoisin suure on solun pysyminen supistuneena, koska tämän ajan pidentyessä, koko sydämen QT-aika pitenee. Toinen tilastollisesti merkitsevä tulos saatiinkin, kun verrattiin 12704.LMNAs.p29(5)-solulinjan sydänlihassolujen supistuksen ja relaksaation välistä aikaa kontrollisolujen vastaavaan (Kuva 14, Taulukko 5). Tässä mutatoituneella solulinjalla supistuksen ja relaksaation välinen aika oli merkitsevästi pidempi kuin terveillä soluilla (Kruskal-Wallis $p = 0,013$, Bonferroni $p = 0,039$). Tulos merkitsee sitä, että mutatoituneet sydänlihassolut pysyvät pidempään supistuneena kuin kontrollisolut ennen relaksaatiovaihetta. 12404.LMNAs.p29(5)-linjan soluilla oli siis pidentynyt repolarisaatioaika ja relaksaation alku on häiriintynyt terveisiin soluihin verrattuna.

On mielenkiintoista, että löydökset vaihtelevat mutatoituneiden solulinjojen välillä, sillä toisen solulinjan supistus on merkitsevästi lyhyempi kuin kontrollilla, kun taas toisessa solulinjassa nähtiin pidentynyt repolarisaatioaika kontrollisoluihin verrattuna. Tämä voi liittyä solulinjakohtaisiin eroihin, joita nähdään aina iPS-solultautimallinnuksessa (Moretti et al. 2013). Molempien LMNA-solulinjojen supistumisfrekvenssi oli korkeampi kuin kontrollisolulla (Taulukko 2), vaikkakin tässä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa solulinjojen välillä. Aiempien tutkimusten mukaan on epäselvää, miksi LMNA-solulinjojen supistumisfrekvenssi on korkeampi kuin terveillä soluilla, mutta tutkimukset viittaavat tämän johtuvan mutatoituneiden CM:ien epäsäännöllisyydestä kalsiumin spontaanissa vapautumisessa, kalsiumin säätelyssä ja repolarisaatioajassa (Shah et al., 2019, Johnson et al., 2013). Solujen pidentynyt repolarisaatioaika voisi myös viitata LMNA-solujen lisääntyneeseen rytmihäiriöherkkyyteen, mikä on linjassa LMNA-DCM:n oireiston kanssa, jossa rytmihäiriöt ovat potilailla yleisiä (Ito & Nomura, 2018).

Videoanalyysi on hyvä menetelmä tarkastelemaan yksittäisen solun supistustoimintaa (Ahola et al., 2014a, Kiviaho et al., 2015). Kyseisen Beatview-videoanalyysin heikkoutena on kuitenkin soluvideoiden manuaalinen käsittely ennen näiden analyysijä. Tolloin huonosti tai ei ollenkaan supistuvat sydänlihassolualueet rajataan kuvasta ulos virheiden vähentämiseksi. Lisäksi soluille asetetaan manuaalisesti keskittymäpiste sen mukaan, mihin solun sykintä näyttäisi suuntautuvan. (Ahola et al., 2014a) Myös analyysiin valitut kolme signaalia joudutaan välillä korjaamaan manuaalisesti. Kyseinen menetelmä on siis tekijäriippuvainen, jolloin menetelmän käyttöön liittyy satunnaisvirheen mahdollisuus.

Videoanalyysiin on valittu mukaan 21 kontrollilinjan analyysikelpoista soluvideota, mutatoituneista solulinjoista on valittu 24 videota (12619.LMNAs.p28(11)-solulinja) ja 27 videota (12704.LMNAs.p29(5)-solulinja).

Otos on pieni, joten tästä on hankala tehdä laajalle yleistettäviä päätelmiä. Videoiden valikointi myös lisää tutkimuksen virhettä. Jatkossa, jos halutaan arvioida video-ohjelman tarkempaa sopivuutta erilaistettujen kardiomyosyyttien tutkimiseen, tarvitaan lisätutkimuksia suuremmalla solumäärällä ja suuremmalla määrällä solulinjoja. Lisäksi tilannetta olisi mielekästä tarkastella tulevaisuudessa kolmiulotteisena, sillä tässä tutkimuksessa solut olivat dissosioituneena yksisolaiseksi levyksi ennen videointia (Kuvat 10–12). Sydänlihassoluja tarkasteltiin yksitellen, joten sydänkudoksen monimuotoisuus jää puuttumaan tutkimuksesta. Myös sydämen toiminta elimenä ja muiden kehon elinjärjestelmien vaikutukset sydämeen jäävät mallinnuksesta tarkastelematta (Moretti et al., 2013). Näihin näkökulmiin olisi mielekästä keskittyä lisätutkimuksissa tulevaisuudessa.

iPS-soluista erilaistettujen kardiomyosyyttien maturaatioaste on tutkitusti matala. Aiemmin tutkimuksissa on osoitettu, että erilaistettujen solujen ionikanavat ja sarkomeerirakenteet eroavat aikuisten solujen vastaavista (Moretti et al., 2013) ja solut muistuttavatkin enemmän alkion sydänlihassoluja (Lieu et al., 2009, Ojala, 2015). iPS-CM:ien matala maturaatioaste voi jatkossa olla rajoittava tekijä sydäntautimallinnuksessa ja lääketestauksessa, jos tutkittava mutaatio ilmenee soluissa vasta näiden kypsyessä (Moretti et al., 2013). LMNA-mutaatioiden fenotyypit ilmenevät yleensä potilaissa vasta noin 50–60 vuoden iässä (Hershberger et al., 2013), jolloin kyseisen tutkimuksen iPS-CM:t ovat liian immatureja tarkastellakseen kyseisiä ilmentymiä.

Vaikka iPS-soluihin perustuva sydäntautimallinnus on ollut lupaava työkalu sydänsairauksien mallintamiseen ja yksilölliseen lääketestaukseen, tarvitaan lisää tutkimuksia erilaistettujen kardiomyosyyttien alhaisesta maturaatioasteesta, ennen kuin tulosten soveltaminen kliiniseen potilastyöhön olisi mahdollista (Shah et al., 2019).

6 LÄHTEET

Aalto-Setälä K., Otonkoski T., Sariola H. Nobelin palkinto kantasolutkijoiille Gurdonille ja Yamanakalle. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 2012;128(24):2492-3.

Ahola A., Kiviaho A., Larsson K., Honkanen M., Aalto-Setälä K., Hyttinen J. Video image-based analysis of single human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocyte beating dynamics using digital image correlation. BioMedical Engineering OnLine 2014a;num.39.

Ahola A., Pradhapan P., Laurila E., Aalto-setälä K., Hyttinen J. Motion Analysis method for determining cardiomyocyte beating properties based on digital image correlation and templates. In Computing in Cardiology Conference (CinC) 2014b;1137–1140.

Amit M., Shariki C., Margulets V., Itskovitz-Eldor J. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. Biol Reprod 2004;70:837-845.

Bauwens C. L., Peerani R., Niebruegge S., Woodhouse K. A., Kumacheva E., Husain M., Zandstra P. W. Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories. Stem Cells 2008;26:2300-2310.

Boheler K., Czvz J., Tweedie D., Yang H., Anisimov S., Wobus A. Differentiation of Pluripotent Embryonic Stem Cells Into Cardiomyocytes. Circulation Research 2002;91:189–201.

Brand T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. Dev Biol 2003;258:1-19.

Buckingham M., Meilhac S., Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. Nat Rev Genet 2005;6:826-835.

Burridge P. W., Anderson D., Priddle H., Barbadillo Munoz M. D., Chamberlain S., Allegrucci C., Young L. E., Denning C. Improved human embryonic stem cell embryoid body homogeneity and cardiomyocyte differentiation from a novel V-96 plate aggregation system highlights interline variability. Stem Cells 2007;25:929-938.

Cai C. L., Liang X., Shi Y., Chu P. H., Pfaff S. L., Chen J., Evans S. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. Dev Cell 2003;5:877-889.

Dimos J. T., Rodolfa K. T., Niakan K. K., Weisenthal L. M., Mitsumoto H., Chung W., Croft G. F., Saphier G., Leibel R., Golland R., Wichterle H., Henderson C. E., Eggan K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. Science 2008;321:1218-1221.

Doetschman T. C., Eistetter H., Katz M., Schmidt W., Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol 1985;87:27-45.

Graichen R., Xu X., Braam S. R., Balakrishnan T., Norfiza S., Sieh S., Soo S. Y., Tham S. C., Mummery C., Colman A., Zweigerdt R., Davidson B. P. Enhanced cardiomyogenesis of human embryonic stem cells by a small molecular inhibitor of p38 MAPK. *Differentiation* 2008;76:357-370.

Gurdon J.B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Embryol Exp Morphol* 1962;10:622-40.

Hayes M., Curley G., Ansari B., Laffey J.G. Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome – hope or hype? *Critical Care* 2012;16:205

Hershberger R.E., Dale J., Morales H., Morales A. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nature Reviews Cardiology* 2013;10:531-547.

Ito M., Nomura S. Cardiomyopathy with LMNA Mutation, From Genotype to Phenotype. *Int Heart J* 2018;59:462-464.

Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M., et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies Comprising the Three Embryonic Germ Layers. *Molecular Medicine* 2000;6:88-95.

Johnson D.M., Heijman J., Bode E.F., Greensmith D.J., Van D.L., Abi-Gerges N., Eisner D., Trafford A.W., Volders P. Diastolic Spontaneous Calcium Release from the Sarcoplasmic Reticulum Increases Beat-to-Beat Variability of Repolarization in Canine Ventricular Myocytes after β -Adrenergic Stimulation. *Circ. Res* 2013;112:246–256.

Kehat I., Kenyagin-Karsenti D., Snir M., Segev H., Amit M., Gepstein A., Livne E., Binah O., Itskovitz-Eldor J., Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001;108:407-414.

Kitajima S., Takagi A., Inoue T., Saga Y. MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development* 2000;127:3215-3226.

Kiviaho A., Ahola A., Larsson K., Penttinen K., Swan H., Pekkanen-Mattila M., Venäläinen H., Paavola K., Hyttinen J., Aalto-Setälä K. Distinct electrophysiological and mechanical beating phenotypes of long QT syndrome type 1-specific cardiomyocytes carrying different mutations. *IJC Heart & Vasculature* 2015;8:19-31.

Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 2007;103:389-398.

Laflamme M.A., Chen K.Y., Naumova A.V., Muskheli V., Fugate J.A., et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 2007;25:1015–1024.

Lahti A., Kujala V.J., Chapman H., Koivisto A.P., Pekkanen-Mattila M., Kerkelä E., et al. Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture. *Dis Model Mech* 2012;5(2):220-30.

Lee Y., Lau Y., Cai Z., Lai W., Wong L., Tse H., Ng K., Siu C. Modeling Treatment Response for Lamin A/C Related Dilated Cardiomyopathy in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Am. Heart Assoc.* 2017;6:1–16.

- Lian X., Zhang J., Azarin S., Zhu K., Hazeltine L. Bao X., et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc.* 2013;8(1):162-75.
- Lieu D.K., Liu J., Siu C.W., McNERney G.P., Tse H.F., Abu-Khalil A., et al. Absence of transverse tubules contributes to non-uniform Ca²⁺ wavefronts in mouse and human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells Dev* 2009;18(10):1493-1500.
- Liu G.H., Barkho B., Ruiz S., Diep D., Qu J., Yang S.L., Panopoulos A., et al. Recapitulation of premature aging with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2011;472(7342): 221–225.
- Lough J., Sugi, Y. Endoderm and heart development. *Dev Dyn* 2000;217:327-342.
- Moretti A., Lauqwitz K.L., Dorn T., Sinnecker D., Mummery C. Pluripotent Stem Cell Models of Human Heart Disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2013;1;3(11)a014027.
- Mummery C., Ward-van Oostwaard D., Doevendans P., Spijker R., van den Brink S., Hassink R., et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes. *Circulation* 2003;107:2733-2740.
- Mummery C., Zhang J., Ng E., Elliott D., Elefanty A., Kamp T. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes. *Circulation Research* 2012;111:344-358.
- Ng E. S., Davis R. P., Azzola L., Stanley E. G., Elefanty A. G. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood* 2005;106:1601-1603.
- Ojala M. Cardiac Differentiation of Pluripotent Stem Cells and Modeling Hypertrophic Cardiomyopathy. University of Tampere; 2015.
- Osakada F., Jin Z.-B., Hiram Y., Ikeda H., Danjyo T., et al. In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *Journal of Cell Science* 2009;122:3169-3179.
- Owusu-Akyaw A., Krishnamoorthy K., Goldsmith L., Morelli S. The role of mesenchymal–epithelial transition in endometrial function. *Human Reproduction Update* 2019;25(1):114-133.
- Park I. H., Arora N., Huo H., Maherali N., Ahfeldt T., Shimamura A., Lensch M. W., Cowan C., Hochedlinger K., Daley G. Q. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008;134:877-886.
- Pei D., Shu X., Gassama-Diagne A., Thiery J.P. Mesenchymal–epithelial transition in development and reprogramming. *Nature Cell Biology* 2019;21(1):44–53.
- Pekkanen-Mattila M. Cardiomyocyte Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells. University of Tampere; 2010.
- Pekkanen-Mattila M., Chapman H., Kerkelä E., Suuronen R., Skottman H., Koivisto A.-P., Aalto-Setälä K. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: demonstration of a portion of cardiac cells with fairly mature electrical phenotype. *Experimental Biology and Medicine* 2010;235:522-530.
- Rajala K., Pekkanen-Mattila M., Aalto-Setälä K. Cardiac Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells International* 2011;2011:383709.

Sallam K., Li Y., Sager P., Houser S., Wu J. Tissue and Animal Models of Sudden Cardiac Death. *Circulation Research* 2015;116(12):1989-2004.

Shah D., Virtanen L., Prajapati C., Kiamehr M., Gullmets J., West G., Kreutzer J., Pekkanen-Mattila M., Heliö T., Kallio P., Taimen P., Aalto-Setälä K. Modeling of LMNA-Related Dilated Cardiomyopathy Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells* 2019;8:594.

Siu C., Lee Y., Ho J.C., Lai W., Chan Y., Ng K., Wong L., Au K., Lau Y., Zhang J. et al. Modeling of lamin A/C mutation premature cardiac aging using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Aging (Albany NY)* 2012;4:803–822.

Takahashi T., Lord B., Schulze P. C., Fryer R. M., Sarang S. S., Gullans S. R., Lee R. T. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* 2003;107:1912-1916.

Takahashi K., Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 2006;126:663-676.

Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 2007;131(5):861-872.

Tesson F., Saj M., Uvaize M.M., Nicolas H., Ploski R., Bilinska Z. Lamin A/C mutations in dilated cardiomyopathy. *Cardiology Journal* 2014;21(4):331-42.

Tran T. H., Wang X., Browne C., Zhang Y., Schinke M., Izumo S., et al. Wnt3a-induced mesoderm formation and cardiomyogenesis in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2009;27(8):1869-1878.

Ueno S., Weidinger G., Osugi T., Kohn A.D., Golob J.L., Pabon L., Reinecke H., Moon R.T., Murry C.E. Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:9685–9690.

Weltner J., Trokovic R., Otonkoski T. Indusoidut pluripotentit kantasolut lääketieteellisessä tutkimuksessa. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 2014;130(8):785-92.

Wobus A.M., Wallukat G., Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 1991;48:173-182.

Xu X. Q., Graichen R., Soo S. Y., Balakrishnan T., Rahmat S. N., Sieh S., Tham S. C., Freund C., Moore J., Mummery C., Colman A., Zweigerdt R., Davidson B. P. Chemically defined medium supporting cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Differentiation* 2008;76:958-970.

Xu C. Differentiation and enrichment of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2012;52(6):1203-1212.

Yang L., Soonpaa M. H., Adler E. D., Roepke T. K., Kattman S. J., Kennedy M., Henckaerts E., et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR⁺ embryonic stem-cell-derived population. *Nature* 2008; 453(7194):524–528.

Zhang J., Wilson G., Soerens A., Koonce C., Yu J., Palecek S., et al. Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation Research* 2009;104:e30-e41.

Zhang J., Lian Q., Zhu G., Zhou F., Sui L., Tan C., Mutalif R.A., Navasankari R., Zhang Y., Tse H.-F., Steward C.L., Colman A. A Human iPSC Model of Hutchinson Gilford Progeria Reveals Vascular Smooth Muscle and Mesenchymal Stem Cell Defects. *Cell Stem Cell* 2010;8:4-6.

Zhang G., Frederick D. T., Wu L., et al. Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors. *J Clin Invest* 2016;126:5:1834-1856.

https://www.oppiporrtti.fi/op/kbi00033/do?p_haku=kantasolut#q=kantasolut. Luettu 10.3.2019

https://www.oppiporrtti.fi/op/ltg02901/do?p_haku=alkio#q=alkio. Luettu 10.3.2019

<http://www.oppiporrtti.fi/op/kar01518/do>. Luettu 20.6.2019

<https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1999/19990488>. Luettu 16.5.2020