

## Functional role of novel RNA Binding Protein L1TD1 in Human Embryonic Stem Cells (hESC)

Stubb Aki

Terveyden biotieteet

FM lääkekehitystiede

Lahesmaa Riitta, BTK

Reddy Emani Maheswara, BTK

Alkion kantasoluilla on erityinen kyky uusiutua ja erilaistua elimistön kaikiksi solutyypeiksi. Tätä ominaisuutta kutsutaan pluripotenssiksi. Näiden ominaisuuksien vuoksi alkion kantasolut ovat kuin luotu regeneratiivisen lääketieteen käyttöön. Jatkuva jakautuminen sekä pluripotenssi mahdollistavat solujen viljelyn ja erilaistamisen halutuiksi solutyypeiksi. Pluripotenssia säädellään tarkoin molekyyliatasolla. Näiden mekanismien tunteminen on keskeistä, jotta kantasoluja voidaan hyödyntää lääketieteessä. Pluripotenssia ylläpitää monimutkainen proteiinien ja RNA-molekyylien joukko, jota kutsutaan pluripotenssiverkostoksi. Tässä työssä esitellään keskeisiä tekniikoita, joilla verkoston toimintaa voidaan tutkia.

Pluripotenssin säätely on osittain kartoitettu ja indusoituja pluripotentteja soluja on onnistuttu tekemään jo useiden vuosien ajan. Kuitenkin suuri osa tutkimuksista on tehty hiiren alkion kantasoluilla, eikä tuloksia voida soveltaa suoraviivaisesti ihmisen soluihin. Hiljattain on löydetty joukko proteiineja, jotka säätelivät solun keskeisiä toimintoja vaikuttamalla RNA-molekyyleihin tuoden uuden tason säätelyverkostoihin. Tutkimusryhmämme on hiljattain tunnistanut RNA:han sitoutuvan proteiinin L1TD1:n, joka vaikuttaa RNA:n ja muiden proteiinien välityksellä pluripotenssin säätelyyn. L1TD1 on kantasoluspesifinen ja ilmenee suurissa määrin ihmisen alkion kantasoluissa. L1TD1 on yksi keskeisistä pluripotenssin säätelijöistä.

Tutkittaessa geenin funktiota solussa kohdennettu geenin hiljentäminen on tärkeä lähestymistapa. Tekniikka mahdollistaa solun toiminnan ja morfologian tarkkailun ilman proteiinin ilmentymistä. Tässä työssä geenin ilmentyminen estetään käyttäen hyväksi RNA-interferenssiä. Soluun lisätty vieras RNA-molekyyli on komplementaarinen L1TD1:n mRNA:lle ja estää sen toiminnan.

Työssä esitellään kaksi kohdennettua geenin hiljentämismenetelmää, lentivirusvälitteinen shRNA-interferenssi sekä suora siRNA-välitteinen hiljennys. Lentivirusplasmidi, johon shRNA:ta koodaava sekvenssi on kloonattu transduktoidaan soluun lentivirusten avulla. Interferoivan RNA:n koodaaminen alkaa kun solu käsitellään doksisykliinillä. Hiljennys kestää niin pitkään kuin halutaan ja vaikutus on stabiili. Suorassa menetelmässä siRNA transfektoidaan soluihin lipofektamiinin avulla. Vaikutus on havaittavissa nopeasti, mutta menetelmä ei ole yhtä stabiili ja pitkäkestoinen.

Lisäksi työssä esitellään optimoitu protokolla in situ RNA-detektioille, jossa fluoresoivat alukkeet sitoutuvat L1TD1:n mRNA:han solujen sisällä. In situ hybridisaatio -tekniikalla voidaan samanaikaisesti detektoida ja kvantitoida kohdesekvenssi.