

Solja Eurola

VSNL1:n poiston vaikutus hiirien suonten muodostukseen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

22.9.2013

Tekijä(t) Otsikko	Solja Eurola VSNL1:n poiston vaikutus hiirien suonten muodostukseen
Sivumäärä Aika	60 sivua + 9 liitettä 8.10.2013
Tutkinto	insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede
Ohjaaja(t)	Kehitysbiologian professori Hannu Sariola Päätoiminen tuntiopettaja Titta Pirkola
<p>Visinin-like 1 eli VSNL 1-geeni sijaitsee kromosomissa 2p24 ja se kuuluu NCS-perheeseen (Neuronal Calcium sensor) eli hermosolujen kalsiumsensoreihin. VSNL 1-geeniä ilmentään runsaasti aivojen hermosoluissa sekä keskus- että ääreishermostossa. Sitä ilmentään myös muissa elimissä; muun muassa maksassa, munuaisissa, sydämessä ja ihossa etenkin yksilön kehityksen aikana. VSNL1 vaikuttaa sydämen kehitykseen ja sitä on kehitetty sydämen kudoksissa ja kehittyvissä laskimorakenteissa. Laskimoiden endoteelisolut, joista myöhemmin kehittyy myös imusuonisto, ilmentävät VSNL1-geeniä.</p> <p>VSNL1-poistogeenisillä hiirillä on häiriöitä imusuoniston kehityksessä. Niillä esiintyy ihonalaista turvotusta sekä verenvuotoa ja niiden imusuonet ovat hyperplastisia ja täyttyneet verellä. Sikiöt kuolevat noin 15 vuorokauden ikäisinä. Tämän fenotyypin taustalla olevista solun sisäisistä ja molekylaarisista mekanismeista tarvitaan lisää tietoa, jotta geenin toimintaa ja vaikutusta ymmärrettäisiin nykyistä tarkemmin. Molekylaarisia mekanismeja lähdettiin tässä työssä selvittämään kvantitatiivisen reaaliaikaisen polymeerasiketjureaktion (RT qPCR) avulla. RT qPCR:n avulla pyrittiin määrittämään suonten muodostukseen vaikuttavien proteiinien mRNA tasojen mahdollisia muutoksia VSNL1-poistogeenisten hiirten E11,5 ja E12,5 päiväisillä sikiöillä.</p> <p>Tutkittuja geenejä oli kymmenen: VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-2, VEGFR-3, sVEGFR-2, NRP-2, ANG-1, ANG-2, TIE-1 ja TIE-2. Ilmentymistasot pysyivät hyvin samanlaisina lähes kaikilla tutkituilla geeneillä, ja osa tuloksista oli ristiriitaisia eri näytteiden välillä. VEGFR-2 ja sVEGFR-2 geenien ilmentymistasot olivat hieman koholla, mikä osaltaan saattaisi selittää VSNL1 poistogeenisten hiirten fenotyypin, sillä VEGFR-2 indusoi endoteelisolujen proliferaatiota. Kasvutekijä VEGF-D:n mRNA:n ilmentymistasot olivat selkeästi koholla E12,5 sikiöillä. VEGF-D:n tiedetään indusoivan imusuonten muodostusta ja sen on todettu aiheuttavan imusuonten laajentumista sekä kudosten turpoamista, joten sen kohonnut ilmentyminen VSNL1-poistogeenisillä hiirillä voisi olla varteenotettava selitys muutoksiin VSNL1-poistogeenisissä sikiöissä.</p>	
Avainsanat	RT qPCR, angiogeneesi, vaskulogeneesi, lymfangiogeneesi, sikiönkehitys, poistogeeninen

Author(s) Title Number of Pages Date	Solja Eurola Analysis of the effect of VSNL1 knockout on mouse angiogenesis 60 pages + 9 appendices 8 Oct 2013
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedicine
Instructor(s)	Hannu Sariola, Professor of Developmental biology Titta Pirkola, Lecturer
<p>Visinin-like1, also known as VSNL1 is localized in chromosome region 2p24 and is a member of the neuronal calcium sensor (NCS) family. VSNL1 is abundantly expressed in the neuronal cells in the central and in the peripheral nervous system. It is also expressed in many other organs such as liver, kidney, heart and skin especially during the embryogenesis. VSNL1 is found to be involved in heart development and it is expressed in the developing heart tissues and in the developing venous system. The endothelial cells of veins where from lymphatic vessels start to develop also express VSNL1.</p> <p>VSNL1 knockout mice have disorders in lymphangiogenesis. They display subcutaneous edema and hemorrhage and their lymphatic vessels are hyper plastic and filled with blood. Embryos die around the age of 15 embryonic days. Further studies are needed to reveal the cellular and molecular mechanisms responsible for phenotype to increase understanding of function and influence of VSNL1. To investigate the molecular mechanisms the real time quantitative polymerase chain reaction (RT qPCR) was performed in this study. With RT qPCR was aimed to identify possible altered mRNA levels of proteins which have influence on angiogenesis using VSNL1 knockout mouse E11,5 and E12,5 embryos as samples.</p> <p>The study included ten genes: VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-2, VEGFR-3, sVEGFR-2, NRP-2, ANG-1, ANG-2, TIE-1 and TIE-2. The expression levels of mRNA were observed to stay approximately the same between wild type mouse embryos and knockout mouse embryos of almost all genes investigated and part of the results were contradictory within samples. The expression levels of VEGFR-2 and sVEGFR-2 were slightly raised which could be the explanation to the altered phenotype, because VEGFR-2 is described to induce the proliferation of endothelial cells. The expression levels of growth factor VEGF-D mRNA were distinctly raised in E12,5 embryos. VEGF-D is established to induce the formation of lymphatic vessels and it has been discovered to cause dilating of lymphatic vessels and edema so its over expression in VSNL1 knockout mice could be a possible explanation to changes in VSNL1 knockout embryos.</p>	
Keywords	RT-qPCR, angiogenesis, vasculogenesis, lymphangiogenesis, embryogenesis, knockout

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Sikiön verisuonten kasvu	2
2.1	Sikiön kehitys	2
2.2	Sikiön verisuonten muodostus	5
2.3	Verisuonten muodostumiseen vaikuttavat tekijät	8
2.4	Veri- ja imusuonijärjestelmä	10
2.5	Imusuonten muodostukseen vaikuttavat tekijät	12
3	Hiiret tutkimuksen malliorganismeina	13
3.1	Hiiren sikiönkehitys	13
3.2	Geenimuuntelu tutkimuskäytössä	15
3.2.1	Siirtogeeniset hiiret	17
3.2.2	Poistogeeniset hiiret	20
4	Geenien ilmentymisen tutkiminen	23
4.1	Tutkimusmenetelmät	23
5	VISININ-LIKE1 (VSNL1)	23
5.1	VSNL1:n tehtävät yksilönkehityksessä	24
5.2	Vaikutus angiogeneesiin	26
5.3	VSNL1-poistogeeniset hiiret	27
6	Työn tausta ja tavoitteet	28
6.1	Tavoitteet	29
7	Materiaalit ja menetelmät	30
7.1	Hiiret	30
7.1.1	DNA:n eristys	30
7.1.2	PCR ja genotyyppitys	30
7.2	RNA	33
7.2.1	RNA:n eristys	33
7.2.2	RNA:n puhdistus	33
7.3	Tutkitut geenit	35

7.3.1	Alukkeiden suunnittelu ja testaus	35
7.4	Kvantitatiivinen reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio (RT qPCR)	36
7.4.1	Ohjelman suunnittelu ja optimointi	41
7.4.2	Master mix	42
7.5	Geenien ilmentymistasojen tutkiminen	43
7.5.1	BIO-RAD CFX Manager 2.0	43
7.6	Parafiinileikkeet	44
7.6.1	Vasta-ainevärjäykset eli immunofluoresenssi ja immunohistokemia	44
8	Tulokset ja niiden pohdinta	45
8.1	Immunofluoresenssi ja Immunohistokemia	45
8.2	RNA:n eristäminen ja puhdistaminen	47
8.3	Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR	50
8.4	Geenien ilmentymistasot	51
9	Yhteenveto	56
	Lähteet	58
	Liitteet	
	Liite 1. DNA:n eristys	
	Liite 2. PCR	
	Liite 3. RNA:n eristys	
	Liite 4. RNA:n puhdistaminen	
	Liite 5. Käänteistranskriptaasi	
	Liite 6. Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR (RT qPCR)	
	Liite 7. Parafiinileikkeet ja niiden värjäys	
	Liite 8. Alukkeet	
	Liite 9. Bio-Rad CFX Manager 2.0 esimerkki tulosdatasta (PDF)	

Lyhenteet

ANG-1	Angiopoietiini-1, kasvutekijä.
ANG-2	Angiopoietiini-2, kasvutekijä.
cDNA	Komplementaarinen deoksiribonukleiinihappo.
DAPI	4',6-Diaminido-2-phenylindole, dihydrochloride.
DNA	Deoksiribonukleiinihappo.
DNaasi	Deoksiribonukleaasi.
dNTP	Deoksiribonukleotidi.
DTT	Ditiotreitoli.
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈).
E12,5	12,5 vuorokauden ikäinen sikiö (engl. embryonic day).
FGF2	Fibroblastikasvutekijä.
HET	Heterotsygootti.
KO	Poistogeeninen.
mRNA	Lähettilä RNA (engl. messenger RNA).
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (engl. Phosphate buffered saline).
PBST	PBS, mihin lisätty 0,05 % Tween20 (Sigma-Aldrich).
PCR	Polymeraasiketjureaktio.
RLT	RLT-puskuri (QIAGEN)

RNA	Ribonukleiinihappo.
RNAasi	Ribonukleaasi.
RPE	RPE-puskuri (QIAGEN).
RT	Käänteistranskriptaasi.
RT qPCR	Reaaliaikainen kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio.
sVEGFR-2	Suonten muodostukseen vaikuttava reseptori.
TAE	Tris-asetaatti-EDTA-puskuri.
TBP	TATA box binding protein.
TIE-1	Suonten muodostukseen vaikuttava reseptori.
TIE-2	Suonten muodostukseen vaikuttava reseptori.
VEGF	Vascular endothelial growth factor.
VEGF-C	Vascular endothelial growth factor C.
VEGF-D	Vascular endothelial growth factor D
VEGFR-2	VEGF:n reseptori.
VEGFR-3	VEGF-C:n ja VEGF-D:n reseptori.
WT	Villityyppi.

1 Johdanto

ionkehitystä säätelevät geenit ja mekanismit ovat pääosin hyvin samankaltaisia eri eläinlajeina, mikä näkyy varsinkin kehityksen vSikarhaisvaiheiden ja elinten kehityksen samankaltaisuutena. Ihmisen sikiönkehityksestä ja siihen vaikuttavista geeneistä on opittu paljon tutkimalla muun muassa banaanikärpystä ja sukkulamatoa. Viime vuosikymmeninä on sikiönkehityksestä ja siihen vaikuttavista geeneistä saatu huomattavasti tietoa käyttämällä hiirtä malliorganismina. Hiiri on yleisesti käytetyin sikiönkehityksen tutkimuksen malli, sillä se on geneettisesti hyvin samankaltainen kuin ihminen. Geenien toiminnasta ja niiden vaikutuksesta kehitykseen on saatu paljon tietoa tutkimalla muuntogeenisiä hiiriä, sillä tällaisten hiirien avulla voidaan geenien toimintaa tutkia fysiologisissa olosuhteissa ja yksilönkehityksen aikana.

Sikiön veri- ja imusuonten kehityksestä on olemassa runsaasti tutkimuksia, joissa suonten muodostukseen vaikuttavia tekijöitä on löydetty useita. Erityisesti imusuoniston muodostuksen eli lymfangiogeneesin on viime aikoina todettu olevan kompleksisempi tapahtuma kuin mitä aiemmin oletettiin. Vaskulogeneesiin, angiogeneesiin sekä lymfangiogeneesiin vaikuttavat useat eri kasvutekijät yksin tai yhdessä, niiden reseptorit sekä transkriptiotekijät, joiden kaikkien toiminta on tarkoin säädeltyä. Tärkeimpiä kasvutekijöitä ovat FGF2, VEGF -proteiiniperhe ja angiopoietiinit sekä näiden reseptorit.

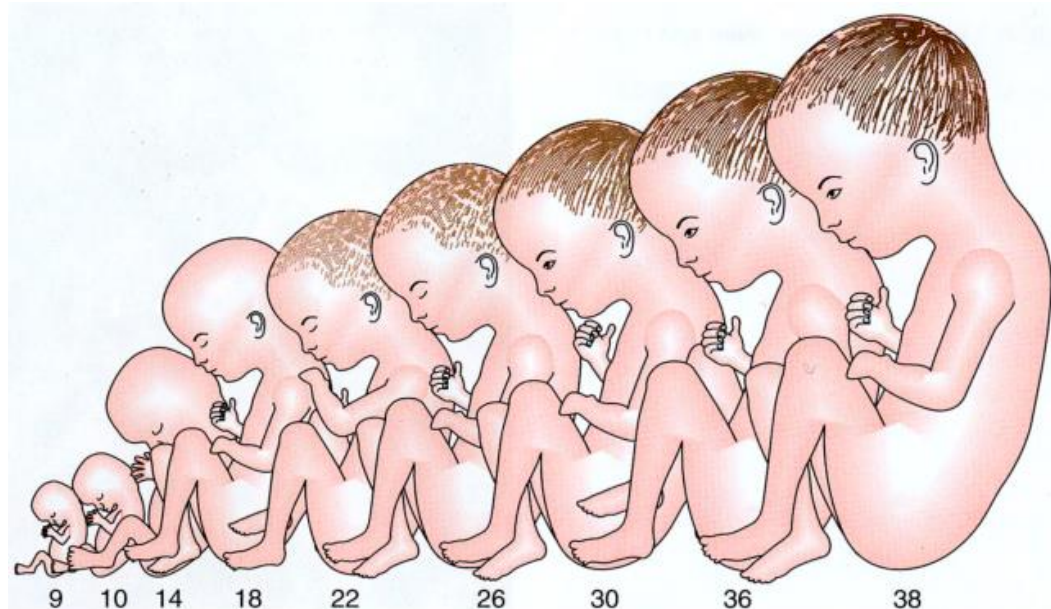
VSNL1 geenin on todettu vaikuttavan sikiönkehityksen aikana useiden eri elinten ja kudosten kehitykseen. Se muodostaa myös komplekseja muiden geenien kanssa ja vaikuttaa sekä inhibiittorina että indusoijana erilaisissa yhteyksissä. VSNL1 geenillä on todettu olevan keskeinen rooli munuaisten sekä sydämen kehityksessä. Sen vaikutuksesta suonten muodostukseen ei ole varsinaisia tutkimustuloksia, mutta geeniä ilmentetään muiden kudosten lisäksi sikiöaikana kehittyvien laskimorakenteiden endoteelisoluissa, mistä myös imusuonisto lähtee kehittymään. Lisäksi VSNL1 poistogeenisillä hiirillä on todettu ihonalaista turvotusta ja ne kuolevat sikiöaikana.

Tämän työn tarkoituksena oli selventää VSNL1 geenin vaikutusta suonten muodostukseen tutkimalla VSNL1 poistogeenisten hiirien geenin ilmentymistasoja sellaisten geenien osalta, joiden on todettu vaikuttavan suonten muodostukseen. Työ suoritettiin Helsingin yliopiston kehitysbiologian tutkimusryhmässä, jonka johtajana toimii kehitysbiologian professori Hannu Sariola.

2 Sikiön verisuonten kasvu

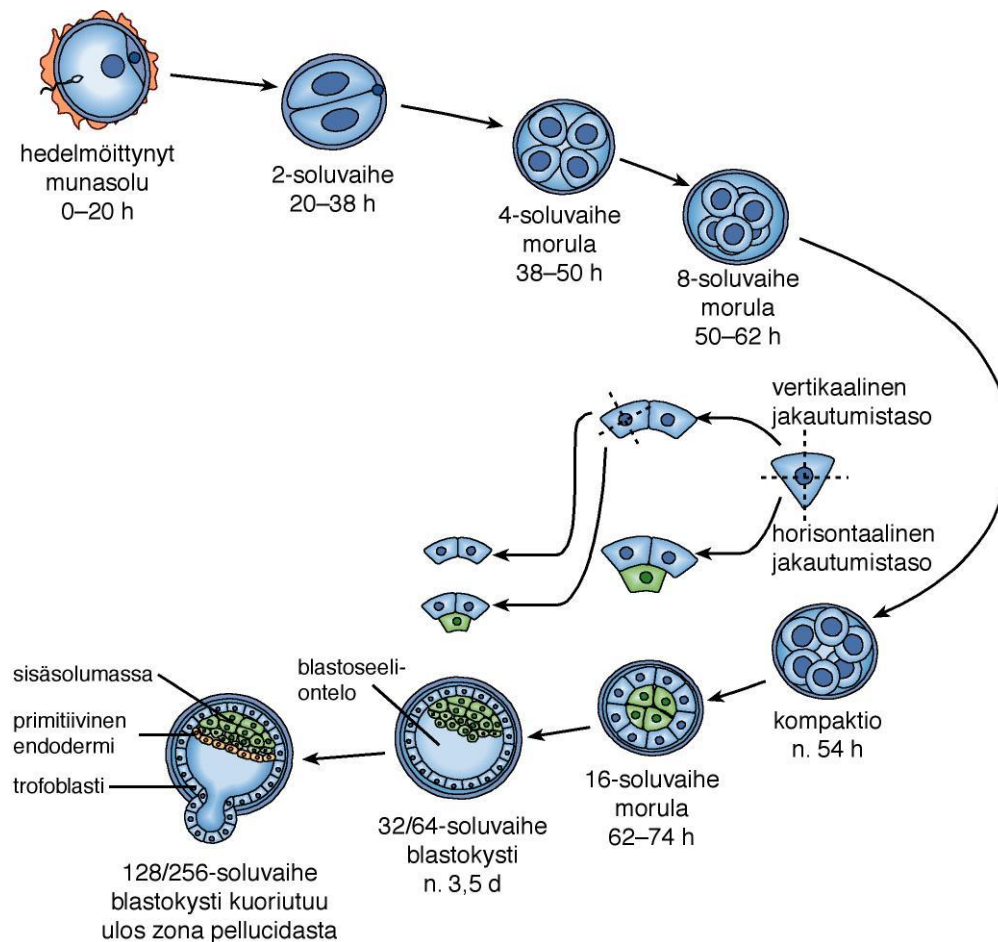
2.1 Sikiön kehitys

Sikiön kehitys voidaan jakaa kolmeen kehitysvaiheeseen; blastogeneesiin, organogeneesiin ja fetogeneesiin. Blastogeneesin aikana sikiön solut jakautuvat muodostaen blastokystin, joka implantoituu ja käy läpi gastrulaation (Sariola ym. 2003: 154). Organogeneesi alkaa neljännellä sikiöviikolla ja sen aikana kehittyy valtaosa sikiön elimistä. Fetogeneesin aikana sikiö kasvaa nopeasti ja kehittyy toiminnallisesti. Tämä vaihe alkaa yhdeksännellä viikolla ja kestää raskauden loppuun saakka. (Sariola ym. 2003: 154.) (ks. kuva 1) Kehityksen perustapahtumia ovat: kasvu, jolloin solut jakautuvat ja kasvavat, erilaistuminen, mikä mahdollistaa eri solutyypin kehityksen, muodostuminen, jossa eri elimet ja ruumiinosat saavat tyypillisen kokonsa ja muotonsa, sekä kaavoittuminen, millä tarkoitetaan kolmiulotteisen rakenteen kehitystä (Sariola ym. 2003: 16–18). Eri perustapahtumat ajoittuvat usein samanaikaisesti ja nivoutuvat läheisesti toisiinsa. Näitä tapahtumia säätelevä tärkein yksittäinen mekanismi on induktiivinen viestintä solujen ja eri kudosten välillä (Sariola ym. 2003: 45).



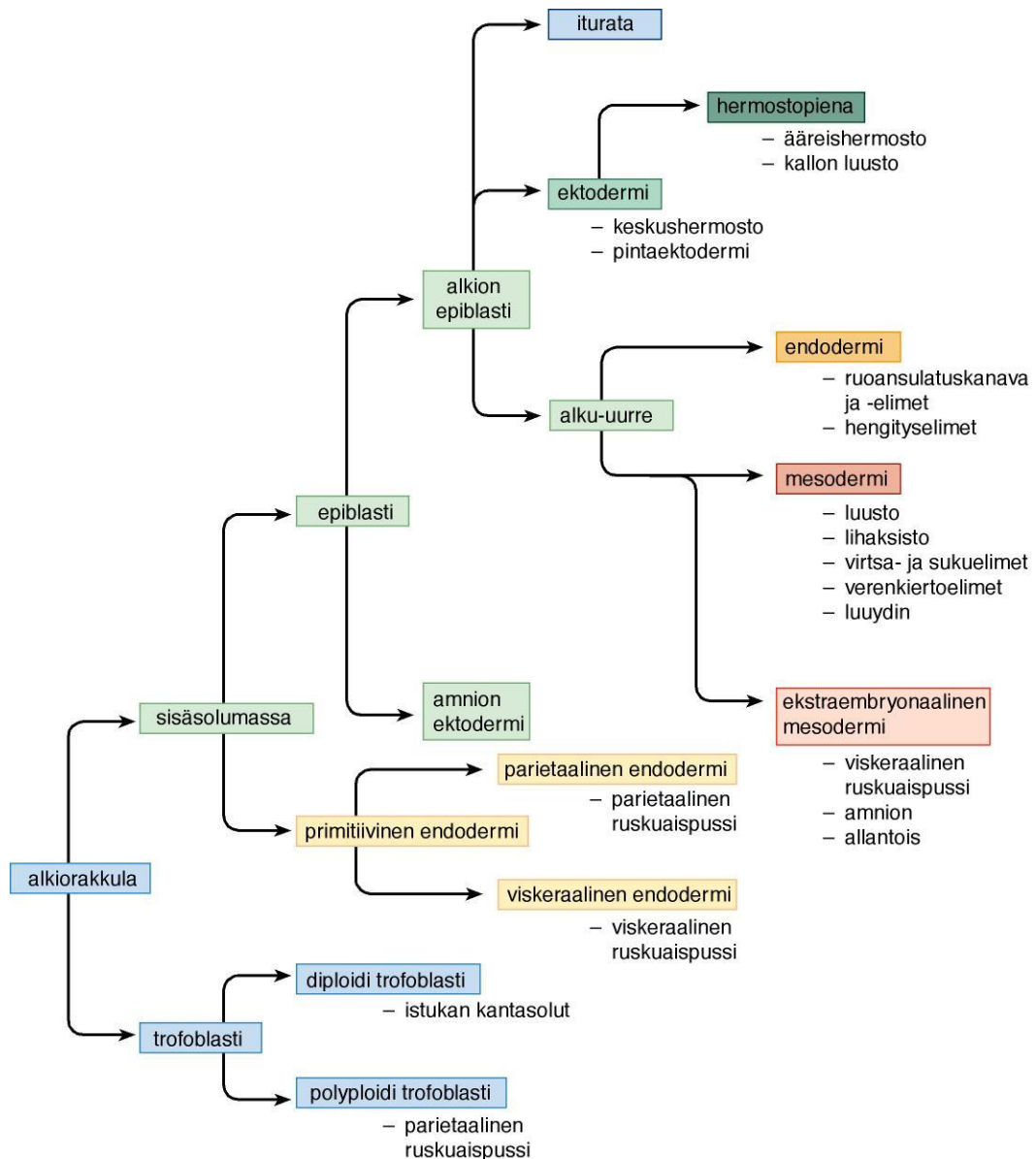
Kuva 1. Sikiön kehitys voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen; blastogeneesiin 0 - 4 viikkoa, organogeneesiin 4 - 9 viikkoa sekä fetogeneesiin 9 - 38 viikkoa. Sikiön kasvu on nopeimmillaan fetogeneesin alkuvaiheessa. (Sariola ym. 2003)

Sikiön kehitys alkaa munasolun hedelmöityksestä, jolloin siittiö tunkeutuu munasoluun ja siittiön kromosomisto siirtyy munasolun sisään muodostaen koiraan esituman. Siittiön tunkeutuminen saa aikaan myös haploidin naaraan esituman muodostumisen ja näiden esitumien yhdistyessä syntyy tsygootin diploidi tuma, joka sisältää molempien vanhempien kromosomiston. Tämä on välttämätöntä normaalille sikiön kehitykselle. (Sariola ym. 2003: 23–24.) Hedelmöitymisen jälkeen alkaa solujen jakautumisvaihe, jolloin munasolu jakautuu useaksi tytärsoluksi eli blastomeeriksi muodostaen morulan (Sariola ym. 2003: 27). Morulavaiheen jälkeen alkavat ensimmäiset erilaistumistapahumat; blastomeerit polarisoituvat ja muodostavat 64-soluvaiheeseen mennessä kaksi solutyyppiä, pintakerroksen solut eli trofoblastin sekä sisäkerroksen solut eli sisäsolumassan. Alkiosta on muodostunut alkiorakkula eli blastokysti. (Sariola ym. 2003: 28.) (ks. kuva 2) Alkiorakkulan kehitys tapahtuu samanaikaisesti kun alkio siirtyy munanjohdinta pitkin kohtuun, mikä kestää ihmisellä noin neljä päivää. Tämän jälkeen tapahtuu implantaatio, jolloin alkio kiinnittyy kohdun seinämään. (Sariola ym. 2003: 30.)



Kuva 2. Blastokystin kehittyminen hedelmöityneestä munasolusta eli tsygootista (Sariola ym. 2003).

Osasta sisäsolumassan solukkoa muodostuu epiblasti, josta kehittyvät yksilön kaikki kudokset (ks. kuva 3). Tästä yksikerroksisesta epiblastisolukosta muodostuu gastrulaation aikana kolme alkiokerrosta; ektodermi, mesodermi ja endodermi. Ektodermistä kehittyvät hermosto, mesodermistä luusto, lihaksisto, virtsa- ja sukupuolielimet, verenkiertoelimet ja luuydin. Endodermistä kehittyvät ruoansulatuskanava ja -elimet sekä hengityselimet.



Kuva 3. Alkiorakkulassa on kahdentyyppisiä soluja; sisäsolumassa ja trofoblastisolut. Sisäsolumassasta erilaistuvat primitiivinen endodermi ja epiblasti. Epiblastista erilaistuvat kaikki kudokset. (Sariola ym. 2003.)

Sikiön kehitystä hedelmöityksestä syntymään säätelevät geenit, joiden oikeanaikainen ilmeneminen on välttämätöntä normaalille yksilönkehitykselle (Sariola ym. 2003: 80). Lähes kaikki yksilön solut sisältävät samat perintötekijät, mutta geenien ilmentymisen säätelyn avulla solut pystyvät kehittymään, kasvamaan ja erilaistumaan juuri oikeanlaisiksi oikeassa paikassa. Solujen erilaistuminen perustuu mekanismeihin, jotka säätelevät eri geenien ilmentymistä eri kehitysvaiheissa, paikoissa ja eri soluissa. Hedelmöityneessä munasolussa on oma mekanisminsa, mikä määrää mitä genejä ilmentetään, mutta kehityksen jatkuessa geenien ilmentämiseen vaikuttavat ennen kaikkea niin sanotut epigeneettiset eli solun ulkopuoliset tekijät. (Sariola ym. 2003: 19.)

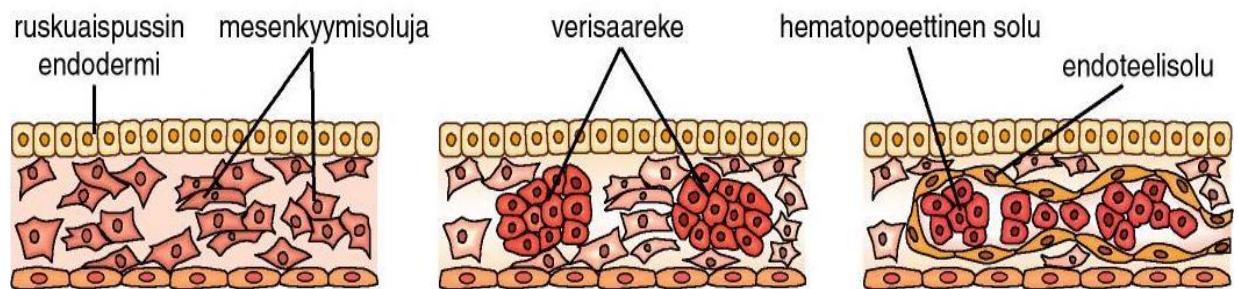
Geenien hallittu ilmentymisen säätely on oleellista monisoluisien eliöiden kehitykselle ja toiminnalle (Sariola ym. 2003: 84). Geenien ilmenemiseen vaikuttavat useat erilaiset säätelymekanismit, joista oleellisimpia ovat transkriptio eli DNA:n sisältämän informaation kopiointi esiaste-RNA:ksi sekä sen säätely, RNA:n muokkaaminen ja kuljetus, translaatio sekä valmiin proteiinin muokkaaminen. (Sariola ym. 2003: 84–91.) Geenin luku eli transkription aloittaminen vaatii aktivaation, eli solun ulkopuolelta tulevan viestin, ja vastaavasti geenin luku voidaan myös inaktivoida. Geenejä aktivoivia tekijöitä kutsutaan nimellä transkriptiotekijät. (Sariola ym. 2003: 84.) Transkriptiotekijöiden ja muiden säätelijäproteiinien määrät vaihtelevat eri kudoksissa ja kehitysvaiheissa, ja vaikuttavat näin geeniaktiivisuuteen joko aktivoimalla tai inaktivoimalla geenien lukua (Sariola ym. 2003: 86).

Suurin osa geeneistä ilmentyy useammassa kuin yhdessä kudoksessa tai solutyypissä, mutta osa geeneistä ilmentyy ainoastaan yhden kudostyyppin soluissa ja osa geeneistä on niin sanottuja ”housekeeping” – geenejä, joita ilmentetään lähes kaikissa kudoksissa. Sikiönkehityksen aikana geeneille on tyypillistä että niitä ilmentetään voimakkaasti vain tietyssä kehitysvaiheessa. (Sariola ym. 2003: 146)

2.2 Sikiön verisuonten muodostus

Sikiön verisuonten ja verisolujen muodostus alkaa kolmannella kehitysviikolla ruska-aispussin verisaarekkeista, jotka muodostuvat kun hemangioblastit aggregoituvat. Hemangioblastit kehittyvät mesenkymaalisesta solukosta viskeraalisen endodermin vaikutuksesta (Goldie ym. 2008) ja ne ovat sekä verisuonten seinämien endoteelisolujen että hematopoieettisen solukon kantasoluja eli hemangioblasteja. Verisaarekkeiden

uloimmat hemangioblastit erilaistuvat endoteelin kantasoluiksi eli angioblasteiksi ja sisemmät solut hematopoeetiseksi solukoksi. (Sariola ym. 2003: 260; Gilbert 2003: 501–503.) (ks. kuva 4) Verisaarekkeet yhdistyvät aluksi sattumanvaraisesti putkiksi ja muodostavat primitiivisen hiussuonten verkoston (Sariola ym. 2003: 260). Verisuonisto kehittyy itsenäisesti ja linkittyy kehittyvään sydämeen pian alkukehityksensä jälkeen (Gilbert 2003: 500). Sydän on sikiön ensimmäinen toimiva elin, jonka lyönnit voidaan havaita jo 22 päivän ikäisessä sikiössä. Verisuonisto puolestaan on ensimmäinen toiminnallinen yksikkö (Sariola ym. 2003: 260). (ks. kuva 5)



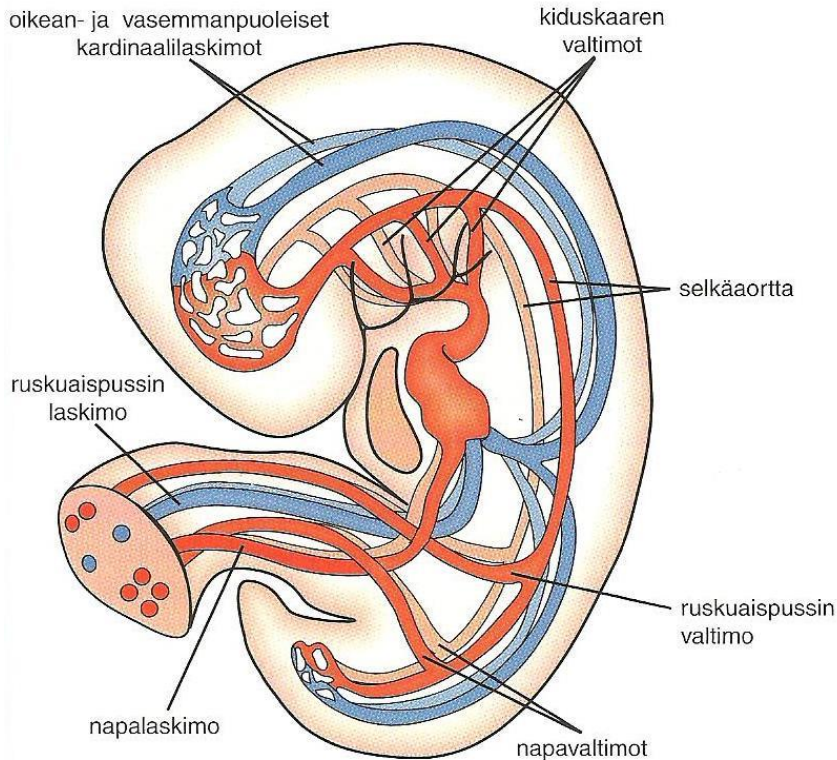
Kuva 4. Vaskulogeenisissä mesenkyymisolut erilaistuvat ensin hemangioblasteiksi, jotka muodostavat verisaarekkeita. Verisaarekkeista muodostuvat hematopoeettiset solut ja endoteelisolujen yhdistyessä muodostuu primitiivinen hiussuonten verkosto. (Sariola ym. 2003)

Sikiön verisuonisto toimii hyvin eri tavalla kuin aikuisen yksilön. Sen tehtävä on huolehtia kaikesta kuljetuksesta (happi, ravinteet, kuona-aineet) sikiön elimistössä. Nämä toiminnalliset vaatimukset ohjaavat pitkälti kehittyvän verisuoniston muodostusta ja rakennetta. (Gilbert 2003: 500.) Verisuonisto kasvaa, kehittyy ja muokkaantuu useita kertoja sikiön kehityksen aikana eri elinten muodostuessa (Sariola ym. 2003: 262; Unsicker & Kriegelstein 2006: 910).

Primitiivistä verisuonten muodostusta mesenkymaalista esisolukosta kutsutaan vaskulogeeniseksi. Vaskulogeeni alkaa kolmannella kehitysviikolla ruskuaispussissa ja jatkuu sikiössä pitkälle raskauden puoleen väliin. (Sariola ym. 2003: 261.) Vaskulogeenisistä voidaan erottaa kolme vaihetta; ensimmäisessä vaiheessa hemangioblastit kehittyvät ja muodostavat verisaarekkeita sekä erilaistuvat angioblasteiksi ja hematopoeettisiksi soluiksi. Toisessa vaiheessa angioblastit erilaistuvat endoteelisoluihin ja kolmannessa vaiheessa nämä muodostavat putkimaisia rakenteita ja primitiivinen ve-

risuonisto kehittyä. (Gilbert 2003: 501.) Vaskulogeneesi voidaan myös jakaa kahteen erilliseen tapahtumaan; niin sanottuun sikiön ulkoiseen vaskulogeneesiin, jolla tarkoitetaan suonten muodostusta ruskuaispussin verisaarekkeista, sekä sikiön sisäiseen vaskulogeneesiin, jossa suonia muodostuu sikiön mesodermistä eri elinten ympärillä usein elimen itsensä indusoimana (Gilbert 2003: 503). Valtaosa suurista verisuonista kehittyä vaskulogeneettisesti (Sariola ym. 2003: 261).

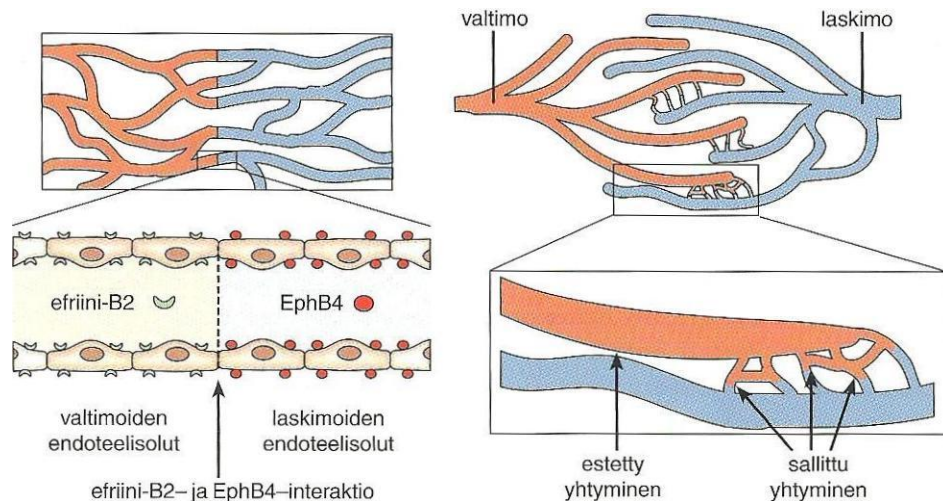
C. 4. viikko



Kuva 5. Neljän viikon ikäiselle sikiölle on jo kehittynyt yhtenäinen sydänputki sekä alkeellinen valtimo- ja laskimojärjestelmä. Sekä sydän että verenkiertojärjestelmä ovat jo toiminnassa (Sariola ym. 2003: 268).

Primitiivisen verisuoniston muodostuttua vaskulogeneettisesti alkaa suonten muodostus myös angiogeneesin avulla. Angiogeneesillä tarkoitetaan suonten muodostusta jo olemassa olevista suonista joko endoteelisoluihin muodostuvasta silmusta tai juosteesta. (Sariola ym. 2003: 261; Gilbert 2003: 503.) Kudosten regeneroituessa sekä haavojen parantuessa verisuonet muodostuvat pääasiassa angiogeneettisesti ja sillä on ratkaiseva merkitys syöpäkasvainten kehittymisessä (Sariola ym. 2003: 261). Angiogeneesissä muodostuvat myös valtimot ja laskimot kahdesta erilaisesta endoteelisolutyypistä. Valtimoiden esiasteiden endoteelisoluissa ilmentyy solukalvolla efrini-B2-molekyylejä, kun taas laskimoiden esiasteiden solukalvoilla tämän molekyylin re-

septoreita, EphB4 tyrosiini kinaaseja. (Sariola ym. 2003: 262; Wang ym. 1998.) (ks. kuva 6) Efriini-B2 säätelee myös pienten kapillaarien yhdistymistä ja estää valtimoiden ja laskimoiden yhdistymisen suurien verisuonten kohdalla (Sariola ym. 2003: 262). Efriini-B2 poistogeenisillä hiirillä vaskulogeneesi etenee normaalisti, mutta angiogeneesiä ei tapahdu lainkaan (Sariola ym. 2003: 262; Gilbert 2003: 504). Valtimoiden ja laskimoiden erottumiseen sekä siihen, mistä kapillaareista jää kapillaareja vaikuttavat myös veren virtausnopeus ja paine eli hemodynaamiset tekijät (Sariola ym. 2003: 261). Valtimoiden ja laskimoiden kehittyessä suonten seinämiin muodostuu sileälihassolukkoa ympäröivästä mesenkyymistä yksi tai useampi kerros riippuen suonen koosta. Pienissä kapillaarisuonissa ei tällaista lihassolukkoa ole ympärillä, vaan niiden seinämät muodostuvat pelkästään endoteelisoluista. (Unsicker & Krieglstein 2006: 909.)



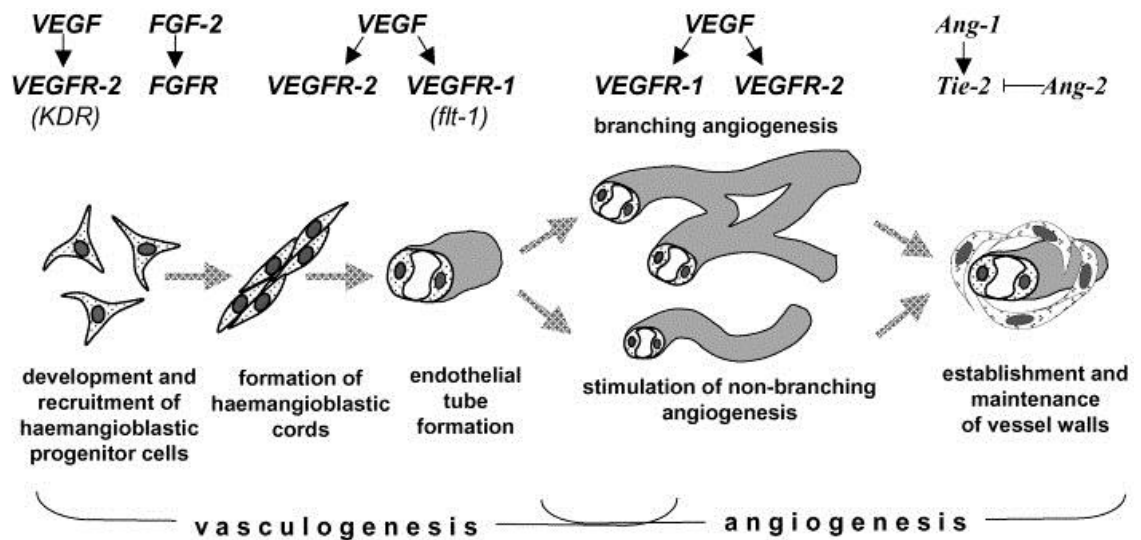
Kuva 6. Valtimoiden ja laskimoiden muodostukseen vaikuttavat muun muassa Efriini-B2 ja sen reseptori EphB4. Efriini-B2 ilmentyy valtimoiden esiasteiden seinämissä ja EphB4 laskimoiden endoteelisoluissa. (Sariola ym. 2003: 262)

2.3 Verisuonten muodostumiseen vaikuttavat tekijät

Vaskulogeneesiin ja angiogeneesiin vaikuttavat useat eri kasvutekijät, niiden reseptorit sekä transkriptiotekijät (ks. kuva 7), joiden toiminta on tarkoin säädeltyä. Osa niistä indusoi suonten kasvua tai muita suonen muodostukseen vaikuttavia tekijöitä ja osa toimii inhibiittoreina. Kolme tärkeintä kasvutekijää ovat fibroblastikasvutekijä-2 FGF2, basic fibroblast growth factor, mikä kuuluu laajaan fibroblastikasvutekijöiden perheeseen (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), jonka proteiiniperheeseen kuuluu ainakin seitsemän eri proteiinia (VEGF, PlGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-

E ja VEGF-F), sekä angiopoietiinit Ang1, Ang2 ja Ang4. (Gilbert 2003: 503; Sariola ym. 2003: 262; Unsicker & Krieglstein 2006: 911–915.)

FGF:t osallistuvat lähes kaikkien kudosten kehitykseen sekä fysiologisiin prosesseihin nisäkkäiden sikiöissä ja ne säätelevät muun muassa solujen lisääntymistä, liikkumista ja erilaistumista (Unsicker & Krieglstein 2006: 722). Suonten muodostuksessa FGF2 säätelee muun muassa hemangioplastien kehittymistä mesodermistä ja ilman sen läsnäoloa ei muodostu verisaarekkeita eivätkä endoteeliset solut erilaistu (Gilbert 2003: 503). Se saa aikaan myös VEGF:n reseptorin VEGFR-2:n ilmentymisen lisääntymisen, mikä edesauttaa vaskulogeneesin tärkeimmän kasvutekijän VEGF:n toimintaa. (Goldie ym. 2008.) VEGF ja sen reseptorit ovat tärkeimpiä tekijöitä sekä vaskulogeneesin että angiogeneesin säätelyssä (Unsicker & Krieglstein 2006: 912,914). VEGF säätelee angioplastien erilaistumista ja jakautumista sekä primäärisen verisuoniston muodostusta (Gilbert 2003: 503), mutta VEGF:n on myös osoitettu säätelevän muun muassa elinten verisuoniston kehitystä sekä suonten muodostusta hermostoputkeen (Unsicker & Krieglstein 2006: 914). VEGF-poistogeenisten tai sen pääreseptorin VEGFR-2-poistogeenisten hiiren sikiöt eivät selviä hengissä, sillä niiden ruskuaispussiin ei muodostu verisaarekkeita (Gilbert 2003: 503; Sariola ym. 2003: 262). Pienikin muutos, jopa yhden emäksen pistemutaatio VEGF:ssä, voi aiheuttaa sikiön kuoleman (Unsicker & Krieglstein 2006: 913). Toisen reseptorin, VEGFR-1:n puuttuessa muodostuu verisaarekkeita ja endoteelisoluja, mutta ne eivät pysty muodostamaan suonia (Gilbert 2003: 503) tai suonet ovat laajentuneita johtuen endoteelisten solujen liikakasvusta. VEGF kasvutekijän aktiivisuuteen vaikuttavat molemmat sen reseptorit; VEGFR-2 säätelee endoteelisolujen toimintaa, muun muassa proliferoitumista ja liikkumista ja VEGFR-1 toimii joko aktivaattorina tai inhibiittorina vaskulogeneesille. (Unsicker & Krieglstein 2006: 913.) Neuropilin (Nrp) reseptori toimii myös yhteistyössä VEGFR-2:n kanssa ja tehostaa VEGF:n toimintaa. Kolmas kasvutekijäryhmä angiopoietiinit säätelee endoteelisolujen ja perisytyttien eli verisuonten sileiden lihassolujen keskinäistä vuorovaikutusta. Angiopoietiinin tai niiden reseptoreiden mutaatiot aiheuttavat suonien epämuodostusta tai perisytyttien puuttumista niiden ympäriltä. (Gilbert 2003: 503.)



Kuva 7. Vaskulogeneesiin ja angiogeneesiin vaikuttavia kasvutekijöitä, niiden reseptoreita ja tehtäviä. (Charnock-Jones ym. 2004)

Valtimoiden ja laskimoiden erilaistumiseen vaikuttavat hemodynaamisten tekijöiden ohella useat geenit, joista osa on reseptori-ligandi systeemejä, kuten edellä mainitut endoteelisolujen solukalvolla sijaitsevat efiriini-B2 ja sen reseptori EphB4 ja osa transkriptionaalisia säätelijöitä. Useiden eri ligandien (muun muassa VEGF:n) kanssa toimivia reseptoreita ovat Nrp-1 ja Nrp-2, joista Nrp-1 ilmenee ensisijaisesti valtimoissa ja Nrp-2 vastaavasti laskimoissa. (Unsicker & Krieglstein 2006: 916; Gu ym. 2003.) Nrp-1 poistogeenisten hiirten on todettu kuolevan sikiöaikana välillä E12,5 ja E13,5 verisuoniston epänormaalin muodostuksen takia, ja molempien neuropilin reseptoreiden puuttuessa sikiöt kuolevat jo E8,5 ikäisinä, sillä niille ei muodostu toimivaa verisuonistoa (Goldie ym. 2008). Notch-signaloinnilla sekä Hey1 ja Hey2 geneilla näyttäisi myös olevan omat roolinsa suonien erilaistumisessa. Tutkimuksissa on osoitettu että Notch1 poistogeenisillä hiirillä ei ilmene valtimoiden efiriini-B2 ligandia eikä Nrp-1 reseptoria ja Hey1 sekä Hey2 poistogeenisillä hiirillä valtimoiden erilaistuminen on heikentynyt. (Unsicker & Krieglstein 2006: 916.)

2.4 Veri- ja imusuonijärjestelmä

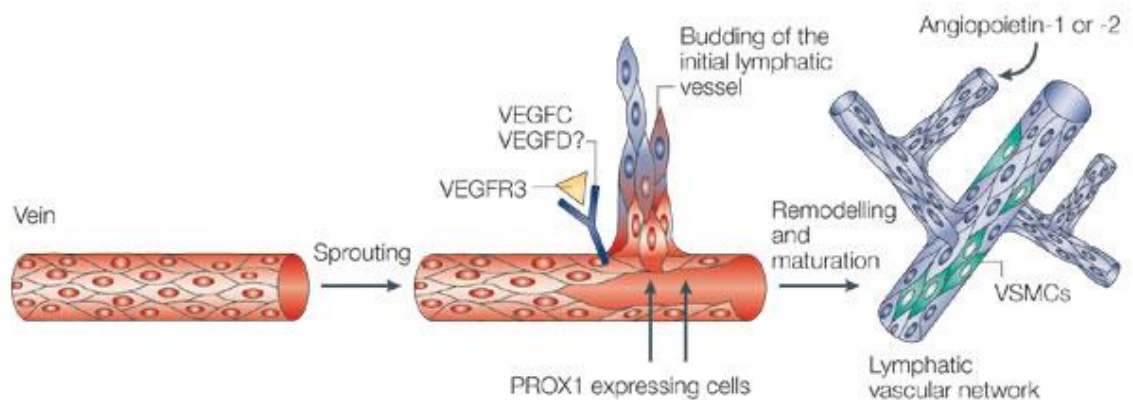
Verisuoniverkoston tehtävä elimistössä on kuljettaa kaikkialle elimistöön ravinteita ja happea sekä erilaisia proteiineja, muun muassa hormoneja. Sikiöaikana sen on myös

huolehdittava kuona-aineiden poistosta ennen kuin niistä huolehtivat elimet kehittyvät (munuaiset, keuhkot). Imusuonijärjestelmän tärkeimpiä tehtäviä on kuljettaa verestä muualle elimistöön diffundoituva plasma ja sen mukana kulkeutuneet solut ja valkuaisaineet imusolmukkeiden kautta takaisin verenkiertoon. Imusolmukkeet muodostuvat imusoluista eli lymfosyyteistä ja niissä nesteestä suodattuvat pois ylimääräiset epäpuhtaudet ennen kuin imuneste eli lymfa kulkeutuu imusuonia pitkin ja laskee takaisin verenkiertoon vasemman vena subclavian ja vena jugularis internan haarautumakohtaan. (Sariola ym. 2003: 266; Alitalo ym. 2005.) Imusuonijärjestelmä on tärkeä osa elimistön immuunipuolustusta ja se huolehtii myös elimistön nestetasapainosta yhdessä verisuoniston ja munuaisten kanssa. Imusuonistoa on lähes kaikkialla elimistössä lukuun ottamatta keskushermostoa, luuydintä ja sydänkudosta. (Alitalo ym. 2005.) Kapillaaristen imusuonten seinämät ovat ohuita ja muodostuvat vain endoteelisista soluista, kun taas suurempien imusuonten seinämien ympärillä on sileälihassolukkoa.

Imusuonten kehitystä kutsutaan lymfangiogeneesiksi ja siitä on olemassa useita erilaisia teorioita, joista vanhimpien mukaan imusuonet erilaistuvat joko sikiön laskimoista angiogeneesin kaltaisesti tai toisen teorian mukaan vaskulogeneettisesti sikiön mesenkymaalisesta solukosta. Kolmannen teorian mukaan imusuonisto kehittyy molemmilla tavoilla. (Sariola ym. 2003: 266; Alitalo ym. 2005.) Uusimpien tutkimusten valossa (Francois ym. 2012) näyttäisi siltä että Florence Sabinin yli sata vuotta sitten esittämä hypoteesi pitää paikkansa (Sariola ym. 2003: 266; Alitalo ym. 2005; Unsicker & Kriegstein 2006: 915). Sabinin (1902) sekä Francois ym. (2012) mukaan primaariset lymfapussit eli imusuonten esiasteet kehittyvät sikiöaikana päälaskimon (cardinal vein) endoteelisolukosta angiogeneettisesti. Francois ym. (2012) osoittivat että osa laskimon endoteelisolukosta erilaistuu uudestaan muodostaen imusuonten endoteelisolukkoa. Solut kulkeutuvat ensin pois päin laskimoista kerääntyäkseen uudestaan muodostaen imusuonten esiasteita. He eivät pystyneet kuitenkaan todistamaan teoriaansa aukottomasti. Imusuoniston kehitys alkaa sikiöllä kuudennella kehitysviikolla primaaristen lymfapussien muodostuksella ja imusuonisto leviää näistä kaikkialle elimistöön muodostaen lukemattomia kapillaareja, joista muodostuu myös isompia suonia sekä lopulta myös rintatiehyet (thoracic duct) (Sariola ym. 2003: 266; Alitalo ym. 2005).

2.5 Imusuonten muodostukseen vaikuttavat tekijät

Imusuonten muodostukseen eli lymfangiogeneesiin vaikuttavia tekijöitä ovat kasvutekijät VEGF-C ja VEGF-D, niiden reseptorit VEGFR-3 ja Nrp-2, kasvutekijät Ang-1 ja Ang-2, niiden reseptorit Tie1 ja Tie2, FGF2, verihutaleperäinen kasvutekijä (PDGF-B) sekä hepatosyyttikasvutekijä (HGF). Näiden kasvutekijöiden lisäksi imusuonten erilaistumista säätelevät transkriptiotekijät Prox1 sekä FOXC2. (Sariola ym. 2003: 266; Alitalo ym. 2005; Unsicker & Krieglstein 2006: 914.) Imusuonten erilaistumista kapillaareiksi tai suuremmiksi imusuoniksi eli imusuonirungoiksi säätelevät efrini-B2 ja sen reseptorit (Alitalo ym. 2005). Imusuonten endoteelissä ilmentyvät myös hyaluronaanireseptori LYVE-1 (lymphatic vessel hyaluronan receptor-1) ja musiini-tyyppinen transmembraaninen glykoproteiini Podoplanin. (Unsicker & Krieglstein 2006: 914.) Myös kasvutekijä VEGF-A (VEGF) ja sen reseptori VEGFR-2 vaikuttavat imusuonten muodostukseen ainakin sekundaarisesti säätelemällä suonten seinämien läpäisevyyttä ja aktivoimalla VEGF-C:tä ja VEGF-D:tä tuottavia soluja (Alitalo ym. 2005). Lisäksi angiopoietiinit Ang-1 ja Ang-2 sekä niiden reseptorit Tie-1 ja Tie-2 vaikuttavat imusuonten kehitykseen (Unsicker & Krieglstein 2006: 915; Alitalo ym. 2005). (ks. kuva 8)



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Kuva 8. Lymfangiogeneesiin vaikuttavia tekijöitä (Cao 2005).

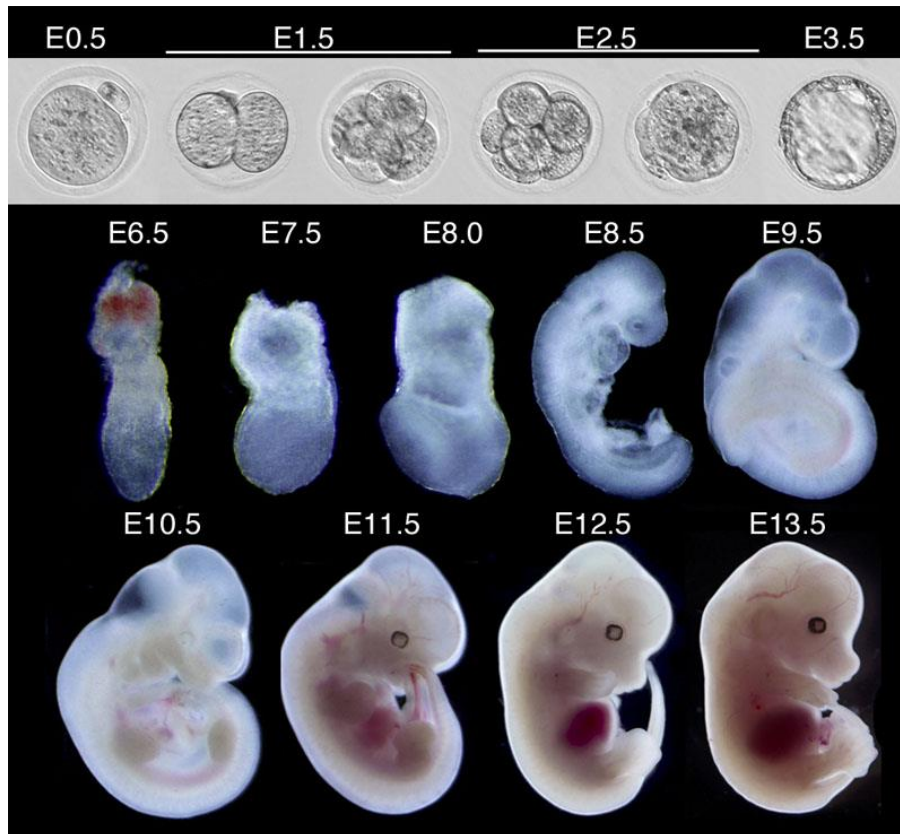
Imusuonten muodostuminen on osoittautunut monimutkaisemmaksi tapahtumaksi kuin mitä aiemmin luultiin. Kasvutekijöiden VEGF-C ja VEGF-D on osoitettu indusoivan imusuonten kehitystä endoteelisoluista yhdessä Nrp-2 ja VEGFR-3 reseptoreiden kanssa. (Unsicker & Krieglstein 2006: 914; Alitalo ym. 2005.) Näiden päätekijöiden

lisäksi imusuonten muodostumiseen ja erilaistumiseen vaikuttavat useat kompleksiset signaalintisyteemit eri reseptoreiden, kasvutekijöiden ja transkriptiotekijöiden välillä. Poistogeenisillä hiirillä tehtyjen kokeiden avulla on pystytty osoittamaan, että lähes minkä tahansa näiden tekijöiden puuttuminen aiheuttaa vakavia kehityshäiriöitä sikiön imusuonten muodostuksessa ja voi johtaa sikiön kuolemaan. Esimerkiksi VEGF-C ja Prox1 poistogeenisille hiirille ei kehity lainkaan imusuonistoa ja Nrp-2 poistogeenisillä hiirillä se kehittyy puutteellisesti. (Alitalo ym. 2005.) Mutaatiot imusuonten kehitykseen ja muodostukseen liittyvissä geeneissä johtavat useimmiten imusuonten puutteelliseen kehitykseen ja voivat aiheuttaa lymfedeemaa eli imunesteen keräytymisestä johtuvaa turvotusta (Sariola ym. 2003: 266).

3 Hiiret tutkimuksen malliorganismeina

3.1 Hiiren sikiönkehitys

Hiiren sikiönkehitys on pääosin hyvin samankaltainen kuin ihmisellä ja muillakin nisäkkäillä. Siinä on erotettavissa samat sikiönkehityksen vaiheet. Hiirellä sikiönkehitys tapahtuu vain huomattavasti nopeammin kuin ihmisellä: Ihmisen sikiönkehitys kestää normaalisti noin 38 viikkoa, kun hiirellä vastaava aika on 19 vuorokautta. Kuvassa 9 nähdään hiiren eri kehitysvaiheita E0,5 ikäisestä alkioista E13,5 ikäiseen sikiöön.



Kuva 9. Hiiren sikiönkehitys E0,5-E13,5 (Zhang 2012).

Ihmissikiöllä ensimmäinen vaihe eli blastogeneesi, jonka aikana hedelmöittyneestä munasolusta muodostuu blastokysti ja se käy läpi implantaation ja gastrulaation, kestää neljännelle viikolle. Hiirellä gastrulaatio on valmis E7,5 ikäisellä sikiöllä, ja jo seuraavan vuorokauden aikana seuraava vaihe eli varhainen organogeneesi alkaa (Kaufman & Bard 1999: 33). Ihmissikiöllä elinten muodostus eli organogeneesi alkaa neljännellä viikolla ja kestää yhdeksännelle viikolle, jonka jälkeen sikiö kasvaa ja kehittyä toiminnallisesti. Hiiren elimet ja kudokset ovat pääosin kehittyneet sikiön ollessa 17,5 vuorokautta, mutta kaikkein nopeinta kehitys on 9 - 12,5 vuorokauden ikäisillä sikiöillä (Kaufman & Bard 1999: 33).

Verisuonten muodostus eli vaskulogeneesi hiirillä alkaa jo ennen gastrulaation päättymistä. Jo E6,5 ikäisillä sikiöillä voidaan erottaa verisaarekkeitä ja angioblasteja ruskauspussissa, missä myös ensimmäiset hematopoieettiset solut muodostuvat (E7,0), kun taas sikiön sisäinen vaskulogeneesi alkaa E7,3 ikäisenä. (Drake & Fleming 2000; Kaufman & Bard 1999: 26.) Draken ja Flemingin (2000) mukaan dorsaalinen aortta voidaan myös havaita jo E7,6 sikiöillä. Heidän tutkimuksensa mukaan hiirten vaskulogeneesi on aktiivisimmillaan E7,0 - E7,8 sikiöillä. Sisäisen ja ulkoisen primitiivisen ve-

risuoniston yhdistyminen toisiinsa tapahtuu yleensä E8,0 - E8,5 sikiöillä, jolloin sikiön verisuonisto on kehittynyt primitiiviseen muotoonsa ja on valmis toimimaan. (Drake & Fleming 2000; Kaufman & Bard 1999: 38.) Tällöin voidaan erottaa ensimmäiset primitiiviset punasolut sikiön verenkierron (Kaufman & Bard 1999: 38). Samaan aikaan (E8,0) voidaan myös havaita primitiivisen sydämen muodostuminen ja ensimmäiset epäsäännölliset sydämen sykkeet havaitaan vain puoli vuorokautta myöhemmin (E8,5) (Kaufman & Bard 1999: 38). Sydän ja verenkierto ovat hiirellä kuten ihmiselläkin ensimmäinen toimiva elin ja toiminnallinen yksikkö.

Imusuoniston muodostumisesta voidaan havaita ensimmäiset merkit E9,5 ikäisillä sikiöillä, joiden laskimon (cardinal vein) endoteelisoluissa ilmennetään LYVE-1 reseptoria, mikä liittyy imusuonien kehitykseen. E10,5 ikäisillä sikiöillä voidaan havaita imusuonten esiasteita ja lymfaattiset endoteelisolut (engl. *lymphatic endothelial cell*) ilmentävät VEGF-C:tä ja sen reseptoria VEGFR-3:sta. (Kreuger ym. 2006.)

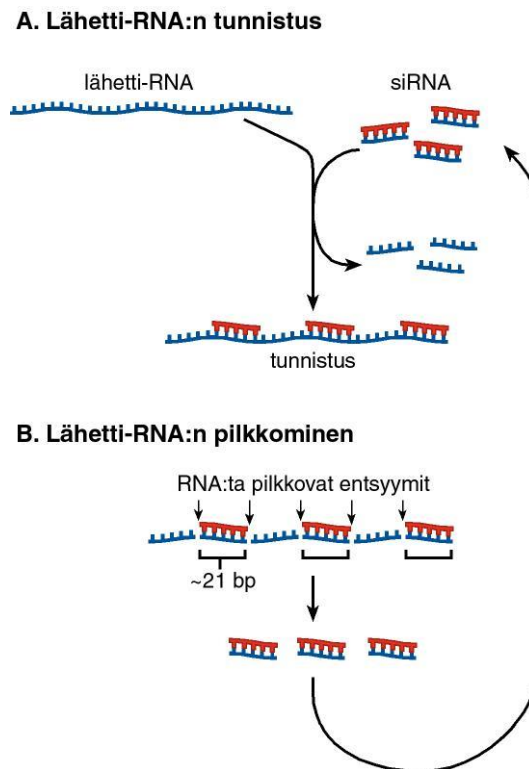
Hiirien suonten muodostukseen vaikuttavat pääosin samat kasvutekijät ja transkriptiotekijät sekä niiden reseptorit kuin ihmiselläkin. Valtaosa siitä tiedosta, mitkä tekijät vaikuttavat ihmisen veri- ja imusuoniston kehitykseen, on saatu käyttämällä eri eläinlajeja. Hiiri on käytetyistä eläinlajeista yleisin johtuen hiiren ja ihmisen geenien ja sikiönkehityksen samankaltaisuudesta (Sariola ym. 2003: 98; Slack 2001: 91–92).

3.2 Geenimuuntelu tutkimuskäytössä

Eri eläinmallien ja muuntogeenisten eläinten käyttö tutkimuksessa on lisääntynyt huomattavasti erilaisten tekniikoiden kehittyttyä, ja niiden käyttö onkin yksi tärkeimpiä nykyisen biolääketieteen menetelmiä. Eri lajien rakenteellisista ja toiminnallisista eroista huolimatta perusmekanismit kehityksessä sekä kehityksen geneettinen säätely ovat samanlaisia. Viime vuosikymmenien aikana on sikiönkehityksestä ja siihen liittyvistä häiriöistä saatu valtava määrä tietoa erityisesti hiirien tutkimisen avulla. (Sariola ym. 2003: 107, 112.) Muuntogeenisten organismien avulla voidaan tutkia erilaisten sairauksien ja kehityshäiriöiden syntymekanismeja ja syitä käyttämällä organismia tautimallina, ja yrittää näiden pohjalta kehittää parannus- tai hoitokeinoja. Käyttämällä kudosspesifisiä geenien säätelyelementtejä voidaan siirtogeenien ilmentyminen suunnata valikoiden johonkin kudokseen. Tämä mahdollistaa kudosspesifisten tautimallien kuten erilaisten syöpien mallien kehittämisen. Varsinkin jyrsijöiden käyttö tällaisina tautimallina

on yleistä. Lisäksi muuntogeenisten organismien avulla on mahdollista saada arvokasta tietoa eri geenien toiminnasta ja vaikutuksista fysiologisissa olosuhteissa ja yksilönkehityksen aikana (Sariola ym. 2003: 115). Siirtogeenisten eläinten avulla on myös pyritty tuottamaan esimerkiksi lääke- tai vasta-aineita eläimen vereen tai maitoon, josta se on mahdollista eristää.

Geenimuuntelun menetelmiä ovat muun muassa geenin kloonaminen, geenin siirto organismiin ja geenin poisto tai hiljentäminen. Geeni voidaan siirtää organismiin muun muassa transfektion, morula aggrigaation, retrovirusten tai mikroinjektion avulla, joista mikroinjektio on yleisin tapa siirtogeenisillä eläimillä. Siinä haluttu geeni ruiskutetaan suoraan hedelmöittyneen munasolun tumaan mikroinjektiolla. (Gilbert 2003: 99–100; Slack 2001: 55.) Transfektiota käytettäessä hiiren sikiön kantasoluja (ES) inkuboidaan liuoksessa mikä sisältää haluttua geeniä sisältävää vektoria. Transfekoituneet solut valikoidaan esimerkiksi antibioottiresistanssin perusteella, jonka jälkeen näitä soluja injektoidaan hedelmöittyneeseen munasoluun ja saadaan aikaiseksi niin sanottu ki-meerinen hiiri, jonka kaikki solut sisältävät halutun geenin. (Gilbert 2003: 100–101.) Retrovirusten käyttö siirtogeenisiä hiiriä tuotettaessa on hankalaa, sillä hiiren immunologinen järjestelmä on hyvin kehittynyt (Sariola ym. 2003: 112). Poistogeenisiä organismeja saadaan aikaan aiheuttamalla haluttuun tai sattumanvaraiseen kohtaan geeniä mutaatio korvaamalla osa alkuperäistä geeniä tai koko geeni halutulla DNA:lla (Sariola ym. 2003: 115; Slack 2001: 56; Gilbert 2003: 100). Geenien toiminta voidaan myös hiljentää käyttämällä esimerkiksi antisense RNA:ta tai RNA interferenssiä (RNAi) (ks. kuva 10) (Sariola ym. 2003: 118-119; Gilbert 2003:101; Slack 2001: 56–57).



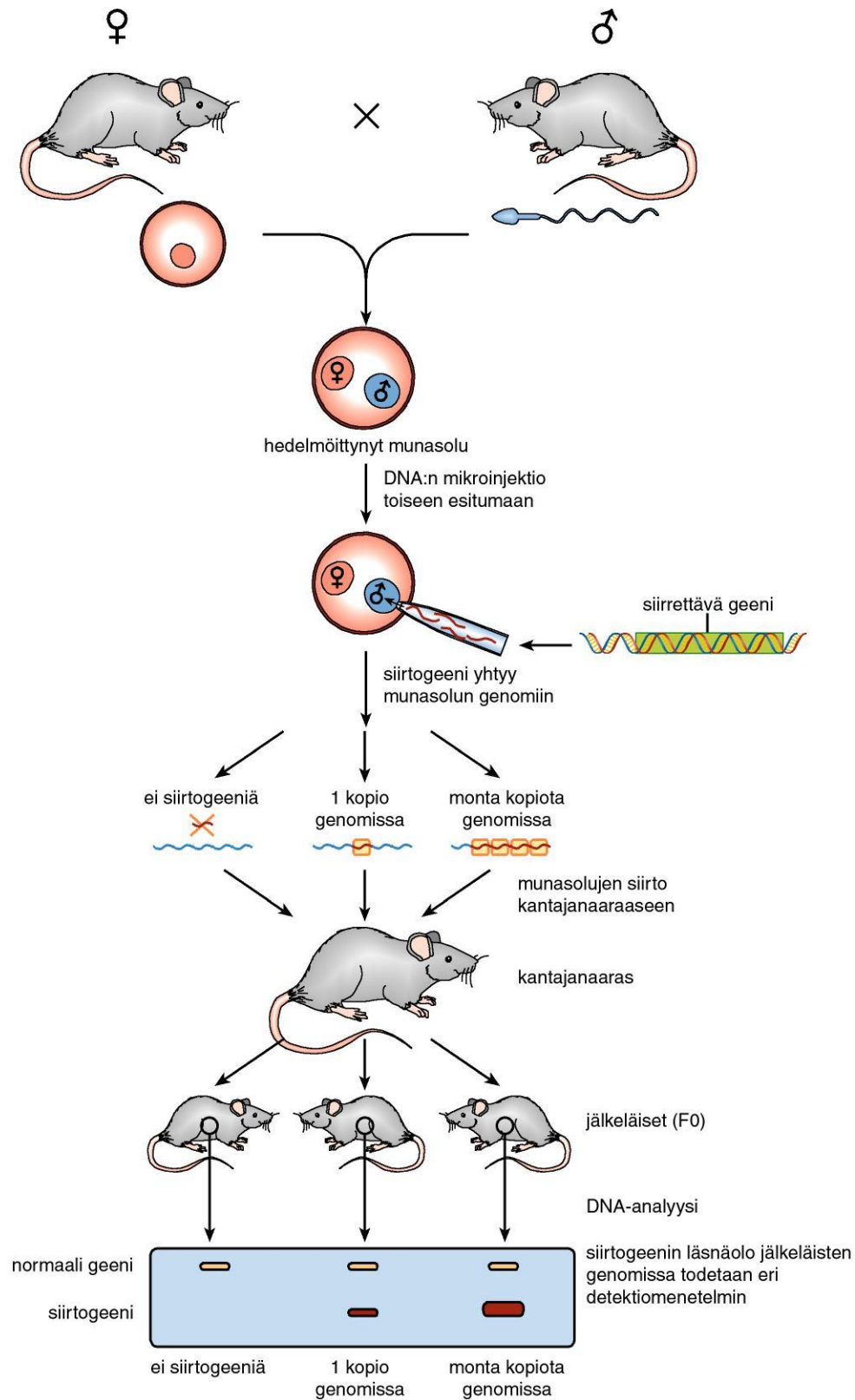
Kuva 10. RNAi-menetelmä. Soluun viedään lyhyitä kaksijuosteisia RNA molekyylijää (siRNA), mitkä sitoutuvat kohdegeenin lähetti-RNA:han (A). RNAi-koneiston entsyymit pilkkovat lähetti-RNA:n niistä kohdista, joihin siRNA on liittynyt (B). (Sariola ym. 2003.)

3.2.1 Siirtogeeniset hiiret

Siirtogeenisten eläinten avulla tutkitaan useimmiten geenin vaikutusta kun sitä ilmentetään normaalista poikkeavassa kudoksessa tai sen ilmentymismäärä on poikkeuksellisen suuri (Sariola ym. 2003: 116). Hiiri on yleisimmin tutkimuksessa käytetty siirtogeeninen organismi. Ensimmäiset mikroinjektion avulla tuotetut siirtogeeniset hiiret syntyivät 1980. Siirtogeenisiä hiiriä käytetään perustutkimuksessa tutkittaessa eri geenien toimintaa ja säätelyä muun muassa sikiönkehityksen aikana. Ne ovat myös erinomaisia tautimalleja esimerkiksi syövän tutkimuksessa, sillä niiden avulla voidaan tutkia tautien syntymekanismeja, leviämistä ja kehittää niiden hoitomuotoja. Tautimalleilla voidaan myös lääkekehittelyn lisäksi tutkia jo olemassa olevien lääkkeiden sivuvaikutuksia. Siirtogeenisten hiirien avulla on mahdollista kehittää ja tutkia myös erilaisia geeniterapian menetelmiä.

Siirtogeeniset eli transgeeniset hiiret tehdään useimmiten mikroinjektoimalla haluttua genomista DNA:ta suoraan hedelmöittyneen munasolun esitumaan. (Sariola ym. 2003:

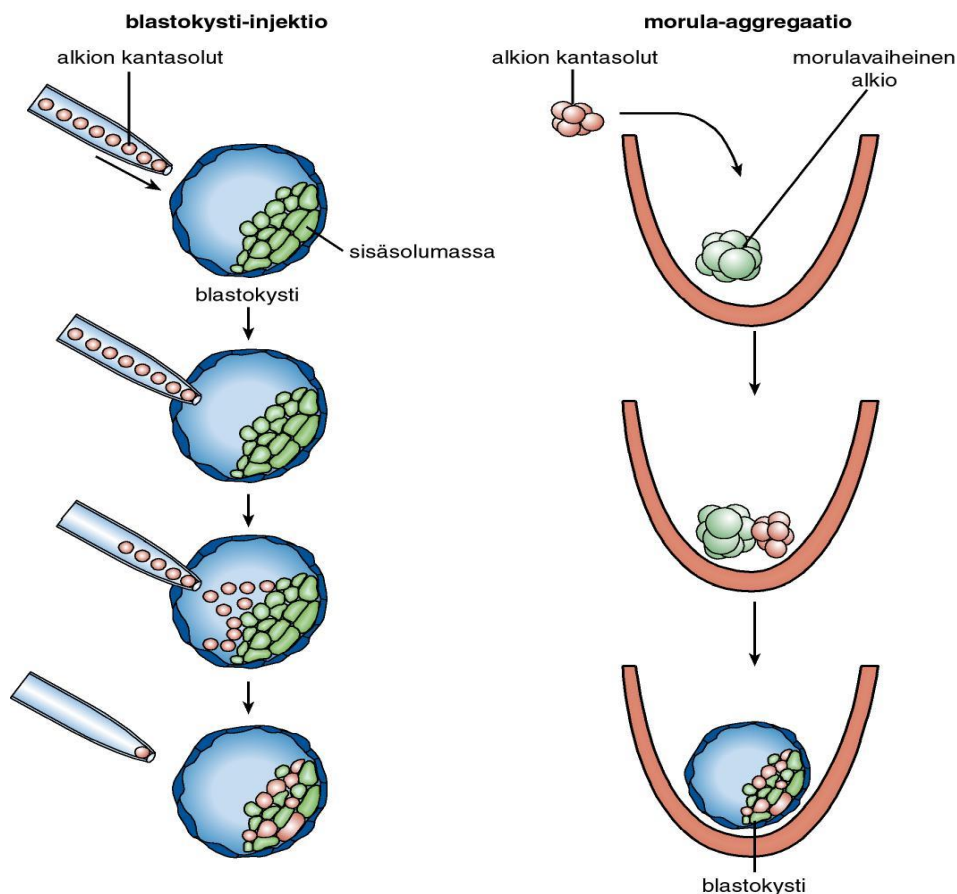
116; Slack 2001: 149.) Hedelmöittyneitä munasoluja kerätään hiiren munajohtimesta, minkä jälkeen niihin injektoidaan haluttua rekombinanttitekniikalla tuotettua DNA:ta. Injektoidut munasolut implantoidaan takaisin hiiren munatorveen tai kohtuun. (ks. kuva 11) Vieras DNA integroituu sattumanvaraisesti hiiren genomiin (Sariola ym. 2003: 116; Slack 2001: 149), jolloin tuloksena saadaan heterotsygootteja jälkeläisiä, joiden kaikissa soluissa on geenimuunnos. Tällainen heterotsygootti risteytetään villityypin kanssa ja syntyneet poikaset genotyyppataan PCR:n avulla. Syntyneistä poikasista valitaan heterotsygoottiset yksilöt, joista saadaan luotua haluttua geeniä ilmentävä hiirikanta. (Sipilä 2012.)



Kuva 11. Siirtogeenisten hiiren teko mikroinjektoimalla (Sariola ym. 2003).

3.2.2 Poistogeeniset hiiret

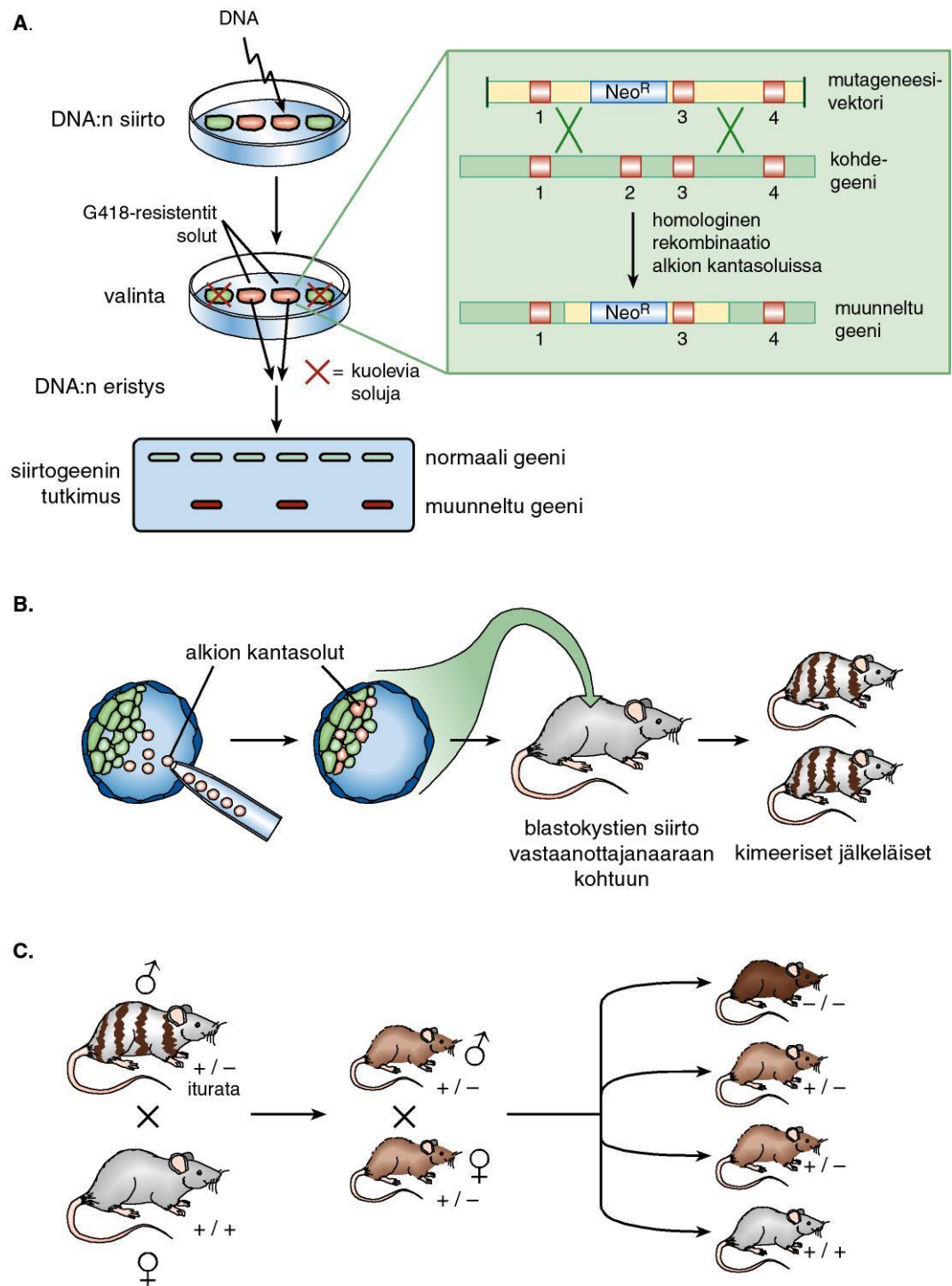
Poistogeeninen hiiri (engl. *knockout*) saadaan aikaan kuten siirtogeeninenkin, mutta siinä uuden DNA:n lisäämisen sijaan villityypin alleeli korvataan mutatoidulla alleelilla, joka aikaansaa geenin hiljentämisen (Gilbert 2003: 100). Hiiren perimästä tuhoetaan näin haluttu geeni tai sen toiminnallinen osa, jolloin kyseisen geenin tuottamaa proteiinia ei synny tai proteiini ei ole toiminnaltaan normaali. Hiirtä, jonka yksittäinen geeni on täysin inaktivoitu, kutsutaan poistogeeniseksi. Tämän lisäksi voidaan geeniin aiheuttaa niin sanottuja pistemutaatioita, jolloin geenituotteen toiminta muuttuu. (Sariola ym. 2003: 120.) Poistogeenisen hiiren teko perustuu alkion kantasoluviljelmiin ja homologiseen rekombinaatioon, jonka avulla geenimuunnos voidaan kohdistaa haluttuun kohtaan perimää. Tällöin puhutaan kohdennetusta mutageneesistä. Homologista rekombinaatiota tapahtuu normaalisti meiosisin aikana vastinkromosomien välillä, jolloin kaksi samaa emäsjärjestystä sisältävää DNA-rihmaa pariutuu ja juosteet vaihtuvat. (Sariola ym. 2003: 120–121; Slack 2001: 153; Sipilä 2012.) Tätä luonnollista koneistoa käytetään hyödyksi, jotta saadaan vietyä mutatoitu geeni osaksi alkion perimää (Sariola ym. 2003: 121). Kohdennetun mutageneesin lisäksi käytetään sattumanvaraista mutageneesiä haluttaessa tutkia geenejä, joiden vaikutusta kehitykseen ei vielä tunneta tarkasti. Tällöin mutaatio voidaan aiheuttaa esimerkiksi kemiallisesti. (Sariola ym. 2003: 122.)



Kuva 12. Muunneltuja alkion kantasoluja voidaan siirtää osaksi kehittyvää hiiren alkioita kahdella menetelmällä; 1) blastokysti-injektioilla, jolloin kantasoluja ruiskutetaan mikroinjektioneulalla blastokystivaiheen alkion sisään, sekä 2) Morula-aggregaatiolla, missä rykelmä kantasoluja laitetaan morulavaiheisen alkion viereen pieneen kuoppaan, jolloin kantasolut aggregoituvat osaksi alkioita. (Sariola ym. 2003.)

Tehtäessä poistogeenisiä hiiriä tarvitaan ensin poistettavan geenin sisältävä kloni, josta kloonataan targetointikonstruktin, joka tuhoaa geenin ja mahdollistaa kaksoisselektion (Sipilä 2012). Kaksoisselektiolla rikastetaan ES-soluista ne, joissa haluttu geeni on hiljennetty. Tällaisia targetoituja mutaatioita ja geeni trappeja on mahdollista tilata internetin välityksellä kantasolupankeista. Hiiren alkion kantasolut transfektoidaan DNA-konstruktilla, jonka jälkeen valikoidaan transfektoituneet solut niin sanotun markkerin avulla. Tämän jälkeen nämä heterotsygoottiset solut joko injektoidaan blastokystivaiheessa olevaan munasoluun, mikä siirretään hiiren kohtuun, tai ne aggregoidaan morulavaiheen alkion kanssa (ks. kuva 12). (Sariola ym. 2003: 121; Sipilä 2012.) Syntyneet hiiret ovat kimeerejä eli niiden jokaisessa solussa on oman perimän lisäksi haluttu mutaatio. Tällainen kimeerinen hiiri paritetaan villityypin hiiren kanssa, jolloin syntyy hete-

rotsygoottisia jälkeläisiä. Kun heterotsygootteja risteytetään keskenään, poikueesta noin 25 % on poistogeenisiä hiiriä (ks. kuva 13). (Sipilä 2012; Slack 2001: 154.)



Kuva 13. Poistogeenisen hiirikannan tekeminen (kohdennettu mutageneesi) (Sariola ym. 2003).

Perinteisten poistogeenimallien ongelmana on se, että poistettava/hiljennettävä geeni inaktivoituu kaikissa kudoksissa ja soluissa, jolloin se voi johtaa hiiren kuolemaan jo

sikiöaikana. Tämä vaikeuttaa geenien toiminnan tutkimista ja sen vuoksi on kehitetty erilaisia konditionaalisia tai kudosspesifisiä poistogeenihiiriä (Sipilä 2012). Tämä voidaan toteuttaa esimerkiksi Cre-rekombinaation avulla, jolloin on mahdollista rajoittaa geenin hiljentäminen tiettyihin soluihin tai kudoksiin, aktivoida geneja vasta halutussa iässä, aiheuttaa pistemutaatioita, muokata kromosomeja sekä tehdä indusoitavia poistogeenisiä hiiriä. (Sariola ym. 2003: 122; Sipilä 2012.)

4 Geenien ilmentymisen tutkiminen

4.1 Tutkimusmenetelmät

Geenien ilmentymisen paikan ja ajan perusteella voidaan tutkia kyseisten geenien toimintaa (Sariola ym. 2003: 147). Mikäli geeniä ilmentetään esimerkiksi vain sikiönkehityksen aikana primäärisessä verisuonistossa, voidaan päätellä sen vaikuttavan verisuonten kehitykseen. Geenin toiminnasta voidaan saada tietoa myös tutkimalla sen ilmentämismäärää tietyssä kehitysvaiheessa.

Geenin ilmentymisen paikkaa ja määrää voidaan tutkia muun muassa Northern-hybridisaation, RNA:n *in situ* -hybridisaation, kvantitatiivisella, reaaliaikaisella polymeerasiketjureaktion (RT qPCR) ja mikrosirutekniikan avulla. Näillä menetelmillä pystytään paikantamaan lähetti-RNA soluista tai tutkimaan sen määrää. Geenituotteiden eli proteiinien paikkaa ja määrää voidaan tutkia Western blotting-menetelmällä, vasta-ainevärjäyksillä joko immunosytokemiallisesti tai immunohistokemiallisesti, sekä mikrosirumenetelmillä. (Sariola ym. 2003: 147–152.)

5 VISININ-LIKE1 (VSNL1)

Visinin-like 1 eli VSNL 1-geeni sijaitsee kromosomissa 2p24 (ks. kuva 12) ja se koodaa VSNL1-proteiinia, mikä tunnetaan myös nimellä VILIP-1. VSNL 1-proteiini kuuluu NCS-perheeseen (Neuronal Calcium sensor) eli hermosolujen kalsium sensoreihin (Braunewell and Gundelfinger, 1999), sillä VSNL1 sitoo kalsiumia ja sen aktiivisuus riippuu pitkälti kalsiumin läsnäolosta (Braunewell & Klein-Szanto 2009). NCS-perheeseen kuuluu kaiken kaikkiaan noin 40 proteiinia, joista viisi kuuluu VSNL-perheeseen; VSNL1, VSNL2, VSNL3, Hippocalcin ja Neurocalcin- δ (Braunewell & Klein-Szanto 2009).



Kuva 14. VSNL1 geenin sijainti 2p24 kromosomissa.

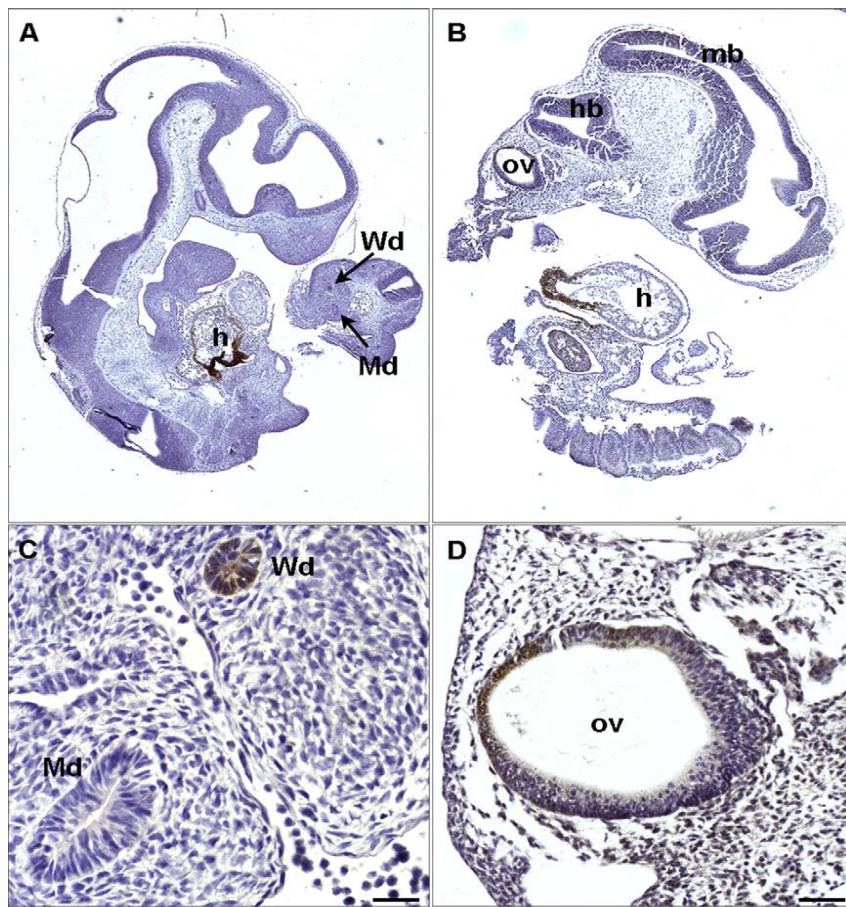
Aikaisempien tutkimusten mukaan VSNL 1-geeniä ilmentetään runsaasti aivojen hermosoluissa, keskushermostossa sekä ääreishermostossa. Sitä ilmentetään myös muissa elimissä, muun muassa maksassa, munuaisissa, sydämessä ja ihossa etenkin yksilön kehityksen aikana (Ola 2012: 24–25). VSNL 1-proteiini osallistuu useisiin erilaisiin tehtäviin elimistössä. Se muun muassa indusoi tiettyjen solujen erilaistumista, muokuttaa insuliinin eritystä ja vaikuttaa solusykliä sääteleviin geeneihin (Braunewell & Klein-Szanto 2009). Useissa tutkimuksissa on todettu proteiinin toimivan vuorovaikutuksessa muiden proteiinien ja reseptoreiden kanssa (Ola 2012: 25) ja pystyvän muodostamaan myös eräänlaisen signaalintekompleksin muiden proteiinien ja reseptoreiden kanssa (Chaumont ym. 2008).

VSNL 1 toimii markkerina erilaisissa neurologisissa sairauksissa kuten skitsofreniassa (Braunewell ym. 2011). Useissa tutkimuksissa myös aivohalvaus ja Alzheimer potilailla on havaittu korkeita VSNL 1 ilmentämistasoja (Laterza ym. 2006). Syövän tutkimuksissa sillä on todettu olevan kahdenlainen vaikutus kasvaimiin toimimalla joko kasvun estäjänä tai onkogeeninä (Ola 2012: 26).

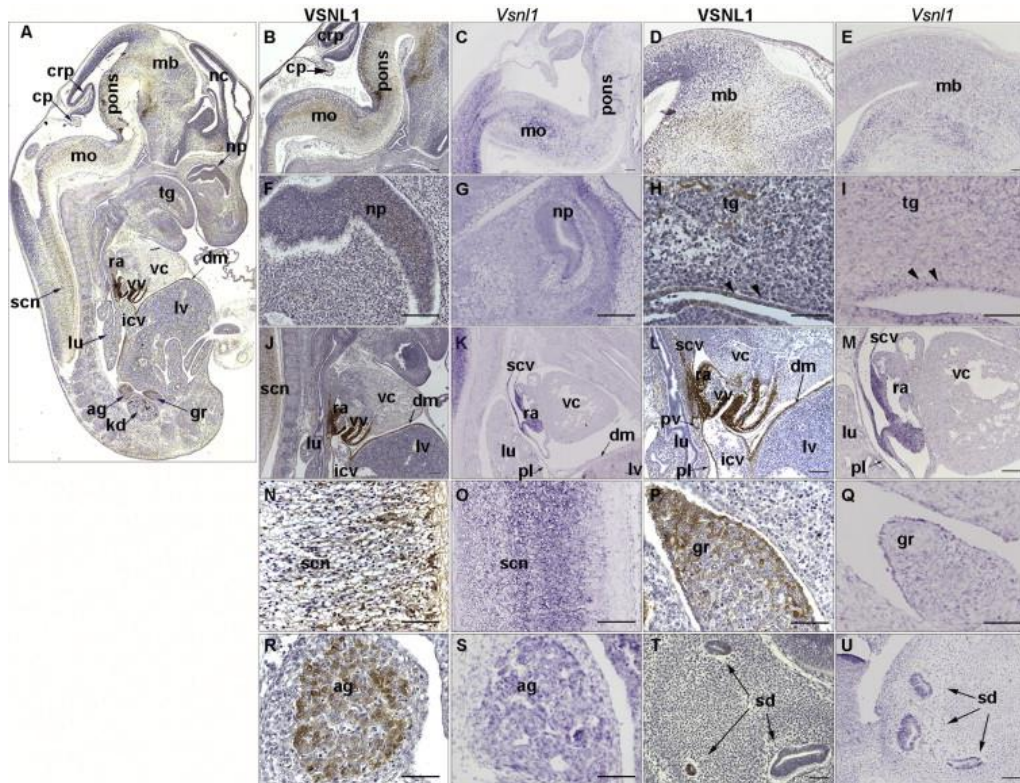
5.1 VSNL1:n tehtävät yksilönkehityksessä

VSNL1-geenin toimintaa on tutkittu paljon aikuisilla, etenkin keskushermostoon ja erilaisiin neurologisiin sairauksiin liittyen (Ola ym. 2012). Sen rooli yksilönkehityksen aikana on kuitenkin jäänyt vähäisemmälle huomiolle, vaikka sillä mitä ilmeisimmin on merkittävä rooli useiden eri elinten kehityksessä sikiönkehityksen eri vaiheissa. (ks. kuvat 15 ja 16) Ainoastaan sen osallisuutta munuaisen kehitykseen on tutkittu tarkemmin ja VSNL1:n on todettu ilmentyvän munuaisen alkukehitysvaiheissa, muun muassa virtsaputken silmun kärjessä (Ola 2012: 43). Ola ym. (2012) tutkivat VSNL1:n roolia sikiönkehityksessä in situ hybridisaation ja immunohistokemian avulla. Heidän mukaansa VSNL1 geeniä ilmentetään sikiönkehityksen aikana muun muassa sydämessä, verisuonistossa, munuaisissa, lisämunuaisissa, ihossa, sylkirauhasissa, makusilmuissa ja

joissakin korvan osissa. Olan ym. (2012) tutkimus osoitti, että VSNL1 geeniä voitaisiin käyttää hyvänä markkerina tutkittaessa sydämen ja verisuoniston kehitystä.



VSNL1-geenin ilmentyminen E10,5 sikiössä. Nuolet osoittavat VSNL1:n ilmentymisen sydämessä (A, B) ja Wolffin tiehyessä (C,D) Scale bars: 50 μ m. h: heart, hb: hindbrain, mb: midbrain, Md: Müllerian duct, ov: otic vesicle, Wd: Wolffian duct. (Ola ym. 2012)

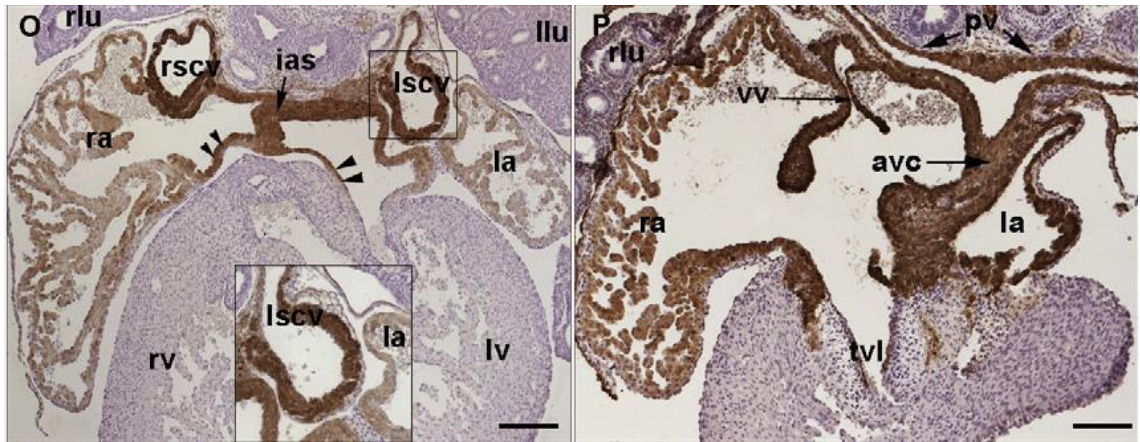


Kuva 15. VSNL1-geenin ilmentyminen E13,5 sikiössä. Nuolet osoittavat VSNL1:n ilmentymisen useissa eri kehittyvissä kudoksissa. Muun muassa aivoissa (B-E), nenän aiheessa (F, G); kielessä(H-I), sydämessä (J-M), selkäytimen neuroneissa (N, O), lisämunuaisessa (R, S) ja genitaalialueella (P, Q) Scale bars: 50 μ m. ag: adrenal gland, cp: choroid plexus, crp: cerebellar primordium, dm: diaphragm, gr: genital ridge, icv: inferior cava vein, kd: kidney, lu: lung, lv: liver, mb: medulla oblongata, nc: neocortex, np: nasal processes, pl: pleura, pv: pulmonary vein, ra: right atrium, scn: spinal cord neurons, sd: semicircular ducts of the inner ear, scv: superior cava vein, tg: tongue, vc: ventricular chamber, vv: venous valve. (Ola ym. 2012).

5.2 Vaikutus angiogeneesiin

VSNL1-geenin on todettu vaikuttavan sydämen kehitykseen sikiöaikana, sillä se ilmentyy voimakkaasti sydämen aiheessa ja kaikki sydänlihaksen solut, joista myöhemmin kehittyvät laskimorakenteet, ilmentävät VSNL1:tä (Ola 2012). Ola (2012) havaitsi VSNL1 geenin ilmentymisen heti gastrulaation jälkeen kudoksissa, joista sydän lähtee muodostumaan. VSNL1-geeni ilmentyy sekä sydämen kehityksen aikana (ks. kuvat 15 ja 16) että aikuisessa sydämessä (Ola 2012: 46–49; Ola ym. 2012). VSNL1-geenin vaikutusta angiogeneesiin ei ole juurikaan tutkittu, mutta on todennäköistä että se osallistuu myös suonienmuodostukseen sillä se ilmentyy niin voimakkaasti kehittyvässä sydämessä ja erityisesti sydämen kehittyvissä laskimorakenteissa. Ola ym. (2012) kuitenkin osoittivat (ks. kuva 17) että VSNL1-geeniä ilmennetään voimakkaasti sikiönkehi-

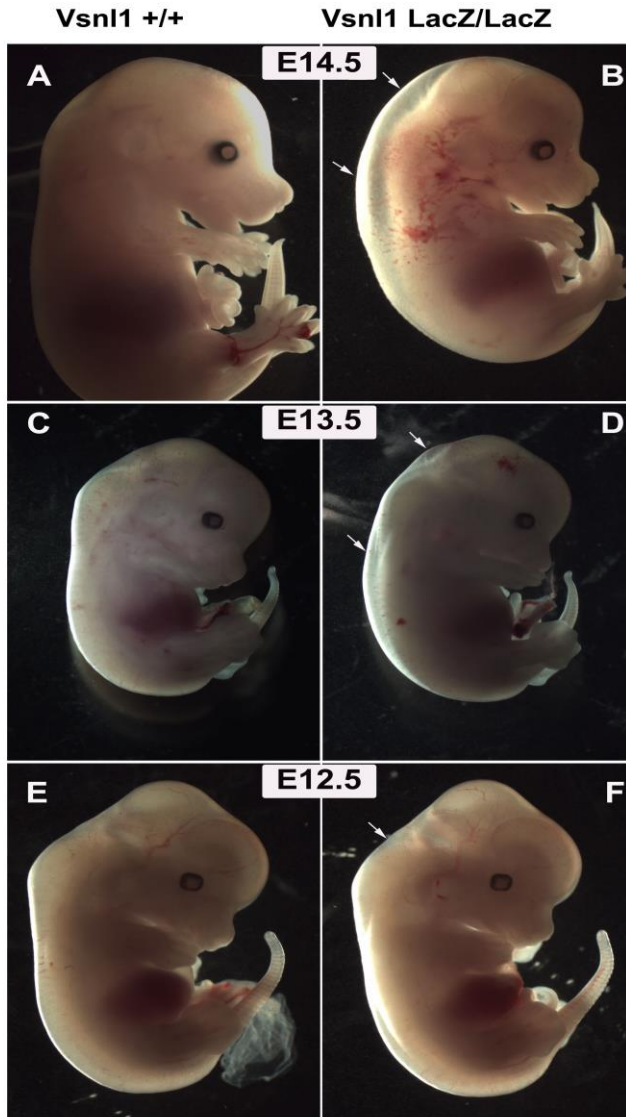
tyksen aikana monissa suurissa suonissa, esimerkiksi yläonttolaskimoissa (lscv ja rscv) ja keuhkolaskimoissa (pv).



Kuva 16. E11,5 sikiöiden parafiinileikkeille on tehty immunohistokemiallinen värjäys (IHC) VSRL1-vasta-aineella, joka värjää ruskeaksi ne alueet missä geeniä ilmenny. (Ola ym. 2012)

5.3 VSRL1-poistogeeniset hiiret

VSRL1-poistogeenisten hiirten kanta on kehitetty kohdennetun mutageneesin avulla siirtämällä normaalin geenin paikalle LacZ-geeni (Ola 2013). VSRL1-poistogeenisillä hiirillä huomattiin muutoksia muun muassa suonten muodostuksessa eli angiogeneesissä. VSRL1-poistogeenisillä hiirillä on ihonalaista turvotusta (ks. kuva 18) ja verenvuotoa ja sikiöt kuolevat sikiöaikana noin 15 vuorokauden ikäisinä. Niiden imusuonet ovat hyperplastisia ja ne ovat täyttyneet verellä. Poikkeava fenotyyppi on nähtävissä jo 12 päivän ikäisillä sikiöillä.



Kuva 17. Kuvassa vasemmassa sarakkeessa villityypin E14,5, E13,5 ja E12,5 ikäiset sikiöt sekä oikeassa sarakkeessa samanikäiset VSNL1-poistogeeniset sikiöt. Poistogeenisillä sikiöillä on nähtävissä ihonalaisia ödeemiä (nuolet).

6 Työn tausta ja tavoitteet

VSNL1-geenin vaikutusta kehityksessä tutkittiin hiirillä poistogeenisten hiirien (VSNL1 knockout) avulla. VSNL1-poistogeenisillä hiirillä on huomattu muutoksia muun muassa suonten muodostuksessa eli angiogeneesissä, missä VSNL1-geenin vaikutuksesta ei ole tehty tutkimusta. Muuntuneen fenotyypin taustalla olevista solun sisäisistä ja molekylaarisista mekanismeista tarvitaan lisää tietoa, jotta geenin toimintaa ja vaikutusta pystytään ymmärtämään tarkemmin. Molekylaaristen mekanismien tutkimiseksi tässä

työssä pyrittiin selvittämään geenien ilmentymistasojen mahdollinen muutos niiden geenien osalta, joiden on aikaisemmissa tutkimuksissa todettu vaikuttavan veri- ja imusuonten kehitykseen. Muutosta pyrittiin havainnollistamaan mittaamalla reaaliaikaisen, kvantitatiivisen PCR:n (engl. Real Time qPCR) avulla mRNA:n määrää ja sitä kautta geenien ilmenemistasoja tutkittavien geenien osalta.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää VSNL1:n vaikutusmekanismi suonten kasvuun vertailemalla transkriptien ilmentämistä VSNL1-poistogeenisten ja villityypin hiirten välillä kohdegeenien osalta. Tutkimuksessa pyrittiin selvittämään molekylaarisia mekanismeja VSNL1-poistogeenisten hiirien ilmiänsun taustalla ja tutkimaan valittujen kohdegeenien mahdollista vaikutusta sikiöiden kuolemiin. Näytteinä tutkimuksessa käytettiin C57BL/6 hiirten villityypin sikiöiden ja VSNL1 homotsygoottien poistogeenisten sikiöiden kudosta.

Kohdegeenejä oli kymmenen; vaskulaariset endoteliaaliset faktorit C ja D (VEGF-C/D), niiden vastaava reseptorigeeni VEGFR3, Neuropilin 2 (Nrp2), joka vaikuttaa sekä veri- että imusuonten kehitykseen, Angiopoietiini Ang1 ja Ang2, näiden reseptorit Tie1 ja Tie2, VEGF-A:n proangiogeneettinen reseptori VEGFR2, sekä sVEGFR-2. Näytteiden sisäistä ja keskinäistä vaihtelua mRNA:n määrän osalta sekä RT-qPCR:n tehokkuuden osalta pyrittiin kontrolloimaan käyttämällä ns. kalibraattorigeeneinä beta aktiinia sekä TBP:tä (TATA binding protein). Lisäksi mRNA:n määrä VSNL1-geenin osalta analysoitiin sekä RT qPCR:n että immunohistokemian avulla, jotta saatiin varmistettua poistogeenisyys näytteiden osalta.

6.1 Tavoitteet

- Menetelmän kehittäminen mRNA:n eristämiseksi sikiön kudoksesta.
- Alukkeiden suunnittelu valituille kohdegeeneille kirjallisuuden ja NCBI tietokantojen avulla.
- Real Time qPCR kokeiden suunnittelu niin, että saadaan parhaalla mahdollisella tavalla määritettyä mRNA:n ilmentämisen tasot hiiren alkion kudoksista.
- Vertailla mRNA:n ilmentymistä kohdegeenien osalta poistogeenisten ja normaaliin hiirten välillä Roche The LightCycler® 480 Real-Time PCR System:llä tai Bio-radin CFX manager 2.0:n avulla.

7 Materiaalit ja menetelmät

7.1 Hiiret

Tutkimuksessa käytettiin C57BL/6 hiirten villityypin sikiöiden ja Vsn1 homotsygoottien poistogeenisten sikiöiden kudosta. Sikiöt olivat iältään E11,5 ja E12,5. Niiden ikä määriteltiin hedelmöityksen seurauksena naaraan vaginaan muodostuvan vahatulpan avulla; kun vahatulppa näkyy, on raskaus kestänyt 0,5 vuorokautta.

7.1.1 DNA:n eristys

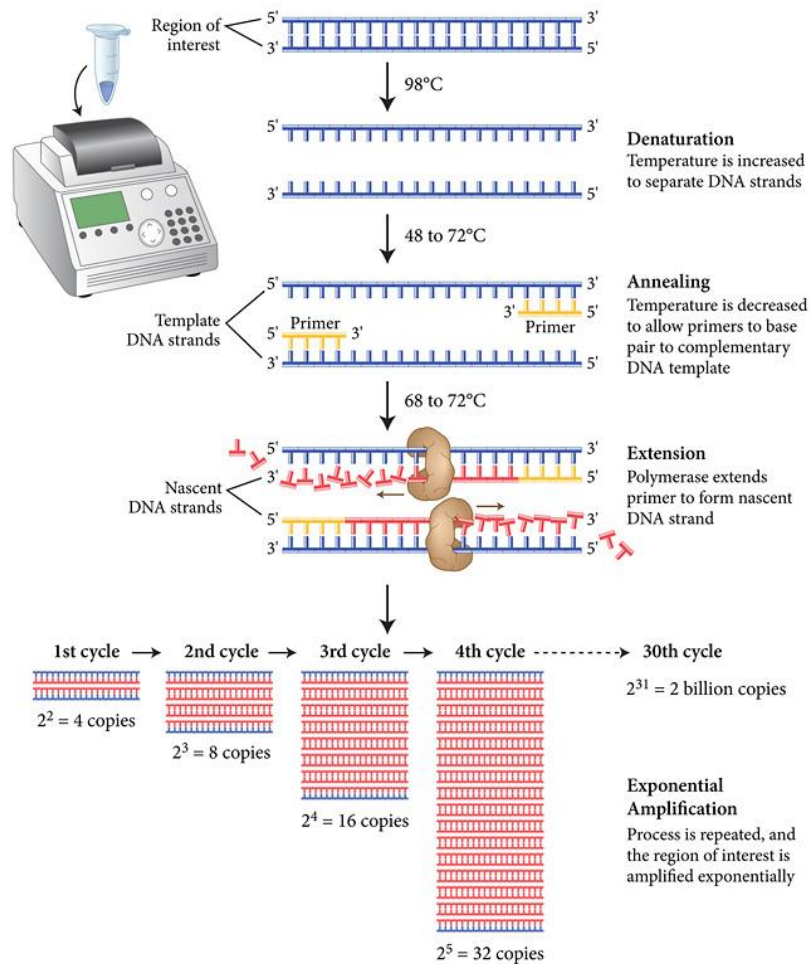
Sikiöistä otettiin näytepalat hännästä, joista eristettiin DNA. Kudos hajotettiin ensin niin sanotussa lyysauspuskurissa proteinaasi-K:n avulla, jonka jälkeen liuoksen proteiinit saostettiin suolan avulla, jolloin DNA jäi kirkkaaseen faasiin. Tämän jälkeen DNA saostettiin ja pestiin etanolin avulla ja syntynyt DNA-pelletti liuotettiin steriiliin veteen. (ks. Liite 1)

7.1.2 PCR ja genotyypitys

Polymeraasiketjureaktion eli PCR:n kehitti Kary Mullis, ja hän sai tämän johdosta Nobel-palkinnon vuonna 1993. PCR on yksi tärkeimmistä molekyylibiologian menetelmistä. Sen avulla on mahdollista monistaa haluttua geenisekvenssiä eksponentiaalisesti. PCR:ä voidaan käyttää myös muun muassa perinnöllisten sairauksien etsimiseen, yksilöiden tunnistamiseen geneettisten sormenjälkien avulla, infektiosairauksien diagnosointiin ja geenien kloonamiseen.

PCR-reaktiossa monistettava DNA eli templaatti DNA denaturoidaan ensin eli sen juosteet saadaan erilleen nostamalla lämpötila hetkellisesti korkeaksi (noin 94-98 °C). Tämän jälkeen lämpötilaa lasketaan noin 45–65 °C alukkeista riippuen, jolloin molempien juosteiden päihin sitoutuvat spesifiset alukkeet, toinen toisen juosteen 5'-päähän ja toinen toisen juosteen 3'-päähän. Lämpötila nostetaan noin 72 °C, jonka jälkeen DNA-polymeraasi tekee molemmille juosteille uudet vastinjuosteet. Näin alkuperäisestä templaattista syntyy kaksi kopiota, jotka voivat molemmat toimia taas templaattina uudelle synteisireaktiolle. PCR toistetaan yleensä noin 30 syklin ajan, joista jokaisella syklillä syntyneet templaattit kahdentuvat ja näin saadaan monistettua alkuperäistä

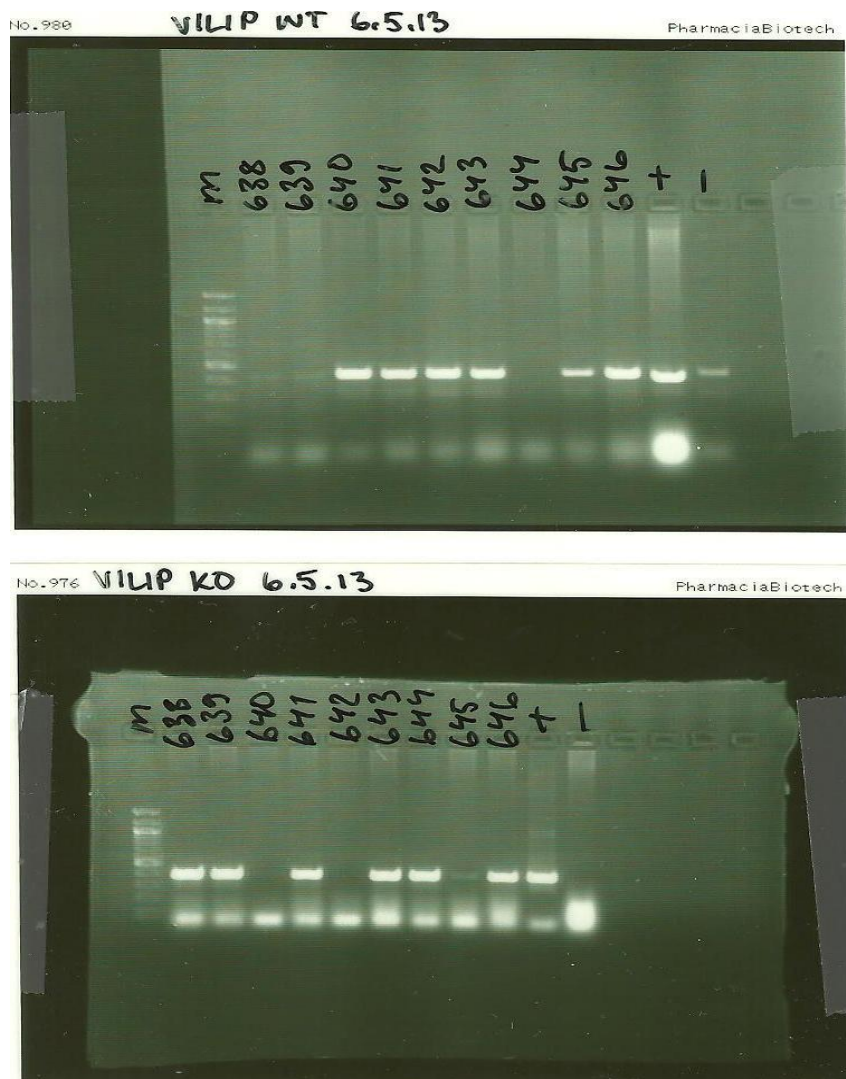
DNA:ta monikertaisesti (ks. kuva 19). Monistettu fragmentti voidaan tämän jälkeen nähdä etidiumbromidilla värjättyllä agarosigeelillä. Monistetut DNA-näytteet ajetaan geielektroforeesilla sähkövirrassa, jolloin negatiivisesti varautuneet DNA-molekyylit kulkeutuvat positiivista napaa kohden ja fragmentit erottuvat niihin sitoutuneen etidiumbromidin ansiosta UV-valossa (ks. kuva 20).



Kuva 18. PCR-reaktiossa toistuvat vaiheet 1) denaturaatio (engl. *denaturation*), jolloin juosteet saadaan erilleen, 2) alukkeiden liittyminen (engl. *annealing*) ja 3) ekstensiovaihe (engl. *elongation tai extension*), jolloin DNA polymeraasi tekee uudet vastinjuosteet. Jo neljännen syklin jälkeen kopioiden määrä on 32.

Tässä työssä näytteille tehtiin genotyypitys PCR-tekniikan avulla. Kullekin näytteelle tehtiin kaksi erillistä PCR-reaktiota, jotta saataisiin selville, mitkä sikiöistä olivat villityyppejä (+/+, wt), mitkä heterotsygotteja (+/-, het) ja mitkä homotsygotteja (-/-, ko) VILIP1- geenin osalta. Toisessa PCR-reaktioissa, "Vilip wt" (ks. Liite 2), käytettiin alukkeita, mitkä sitoutuvat villityypin geeniin (VILIP1), kun taas toisessa, "Vilip ko", alukkei-

ta, mitkä sitoutuvat poistogeenisen hiiren genomissa olevaan mutatoituun geeniin. Alukkeiden sekvenssit on lueteltu liitteessä 8. Villityypin sikiöillä VILIP1-geeni on molemmissa alleeleissa normaali ja se muodostaa agarosigeelillä näkyvän fragmentin Vilip wt -reaktiossa, mutta ei Vilip ko -reaktiossa. Homotsygooteilla eli VILIP1-poistogeenisillä sikiöillä on mutatoitu geeni molemmissa alleeleissa, ja sen DNA:sta saadaan agarosigeelillä näkyvä fragmentti Vilip ko -reaktiossa, mutta ei Vilip wt -reaktiossa. Heterotsygooteilla saadaan näkyvät fragmentit molempien PCR-reaktioiden tuloksena. (ks. kuva 20) PCR:n tulosten perusteella valittiin käytettäviksi näytteiksi villityypin ja VILIP1 poistogeenisiä sikiöitä, joita tutkimuksessa verrattiin keskenään.



Kuva 19. Sikiöiden 638–646 genotyypitys. Kuvassa kaksi agarosigeeliä, joista ylemmässä Vilip wt ja alemmassa Vilip ko PCR -reaktion tuotteet on ajettu geelielektroforeesilla. Kuvasta nähdään, että esimerkiksi 642 on villityyppi, 643 hetero ja 644 poistogeeninen. Jokaiseen PCR -reaktioon laitetaan mukaan niin sanotut positiivinen ja negatiivinen kontrolli, joiden avulla varmistetaan reaktion toimiminen halutulla tavalla.

7.2 RNA

7.2.1 RNA:n eristys

Kun geeniä ilmennetään kudoksissa tai soluissa, DNA:n sisältämän perinnöllisen informaation pohjalta syntetisoidaan ilmennettävälle geenille komplementaarinen RNA-juoste eli lähetti-RNA (mRNA). Tätä kutsutaan transkriptioksi. Transkription jälkeen lähetti-RNA kuljetetaan solun sytoplasmaan, missä syntetisoidaan proteiini lähetti-RNA:n mallin mukaan (translaatio). (Sariola ym. 2003: 80–92; Künnapuu 2010.) Tutkittaessa geenien ilmentymistasoja on kudoksista eristettävä siinä esiintyvä kokonais-RNA, joka puhdistetaan ja käännetään cDNA:ksi, jota syntetisoidaan lähetti-RNA:sta käänteistranskriptaasi-entsyymien avulla. Näin syntetisoidun cDNA:n määrä on verrannollinen geenin ilmentymismäärään: Mitä enemmän geeniä ilmennetään, sitä enemmän syntetisoitua cDNA:ta saadaan. cDNA:n määriä voidaan tutkia qPCR:n avulla, josta saadaan laskettua kudoksissa tai soluissa ilmennettävän geenin määrä.

Tässä tutkimuksessa RNA eristettiin E11,5 ja E12,5 hiiren sikiöistä, joista otettiin näytteiksi ylävartalo kainaloista kaulaan, jolloin myös sydän saatiin näytteisiin mukaan. Näytteiden paino oli noin 50 µg ja ne jäädettiin välittömästi -80 °C:een näytteenoton jälkeen. Genotyyppityksen perusteella valitut näytteet homogenisoitiin TRI Reagentin (Applied Biosystems) avulla ja niistä eristettiin RNA (ks. Liite 3). Näytteiden RNA-pitoisuus ja puhtaus mitattiin Nanodropilla (Nanodrop 8000, Thermo Scientific).

7.2.2 RNA:n puhdistus

Eristettyä RNA:ta voitaisiin käyttää myös sellaisenaan cDNA:n synteisiin, mutta jotta saataisiin mahdollisimman tarkat ja luotettavat tulokset, saatu RNA puhdistettiin DNaa-sin ja kaupallisen puhdistuskitin avulla. Puhdistuksen tavoitteena on poistaa RNA-näytteestä mahdolliset kontaminoivat biomolekyylit, kuten DNA, proteiinit, hiilihydraatit ja lipidit.

DNaasi

DNaasi eli deoksiribonukleaasi on entsyymi, joka pilkkoo DNA:ta hydrolyyttisesti. Inku-boimalla 10 µg näytteitä DNase I -entsyymien (Invitrogen) ja sen puskurin kanssa vesi-

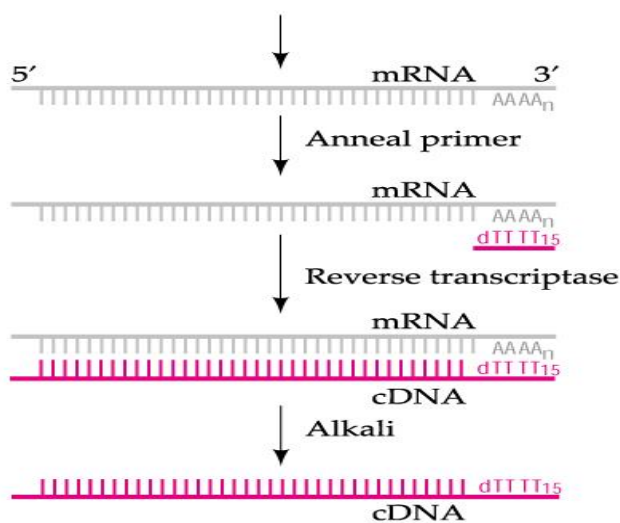
liuoksessa, saatiin jäljelle jäänyt DNA poistettua. (ks. Liite 4) Reaktioseoksen määrät sekä inkubointiajat ja -lämpötilat valittiin entsyymin valmistajan ohjeiden mukaan.

Puhdistuskitti

DNaasi käsittelyn jälkeen näytteet puhdistettiin kaupallisella RNA:n puhdistuskittillä (RNeasy Mini Kit, Qiagen), jonka jälkeen näytteiden RNA-pitoisuus ja puhtaus mitattiin Nanodropilla (Nanodrop 8000, Thermo Scientific). Puhdistettaessa RNA:ta seurattiin kitin valmistajan ohjeita ja käytettiin myös ylimääräistä puhdistusvaihetta (ks. Liite 4, RNA purification kit). Puhdistettu RNA säilytettiin $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa.

Käänteistranskriptaasi

Kvantitatiivista polymeraasiketjureaktiota varten on puhdistettu RNA käännettävä komplementaariseksi DNA:ksi eli cDNA:ksi, jota monistetaan qPCR -reaktiossa eksponentiaalisesti. Käänteistranskriptaasi on entsyymi, joka tekee yksijuosteiselle mRNA:lle vastinjuosteen eli cDNA:n (ks. kuva 21). Tässä työssä käytettiin käänteistranskriptaasientsyyminä Super Script® II Reverse transcriptase:a (Invitrogen). Näytteistä mitattiin 1 - 1,5 μg puhdistettua RNA:ta reaktioseokseen, johon lisättiin alukeseosta, nukleotideja, puskuria sekä käänteistranskriptaasientsyymiä. Reaktioseoksen määrät sekä inkubointiajat ja -lämpötilat valittiin entsyymin valmistajan ohjeiden mukaan. Syntetisoitu cDNA laimennettiin 1:10 ja säilytettiin $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa.



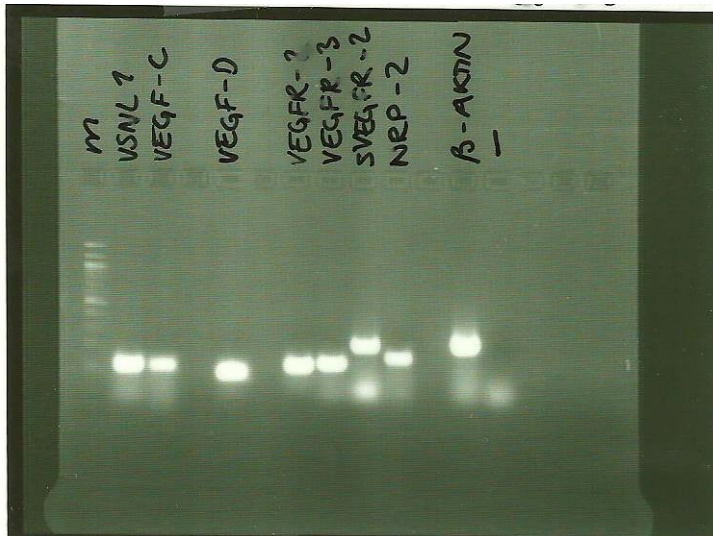
Kuva 20. Lähetti-RNA:sta syntetisoidaan komplementaarinen cDNA-juoste käänteistranskriptaasientsyymillä. (devbio.com)

7.3 Tutkitut geenit

Tähän tutkimukseen valittiin sellaiset geenit, joiden tiedettiin osallistuvan verisuonten tai imusuonten muodostukseen sikiöaikana aikaisempien tutkimusten perusteella. Valittuja geenejä oli kymmenen; VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-2, VEGFR-3, sVEGFR-2, Nrp-2, Ang1, Ang2, Tie1 ja Tie2, joiden ilmentymistasojen mahdollista muutosta pyrittiin tutkimaan VSNL1-poistogeenisillä hiirillä. Kalibraattorigeeneiksi valittiin beta-aktiini (ACTB), jota ilmennetään kaikissa soluissa muun muassa solun tukirangassa, sekä TBP (TATA-box-binding protein), joka on yleinen transkriptiotekijä. Kalibraattorigeenien avulla tulosten geenien ilmentymistasot saatiin normalisoitua.

7.3.1 Alukkeiden suunnittelu ja testaus

Alukkeet tulisi suunnitella siten, että niiden välinen sulamislämpötilaero ei saisi ylittää 5 °C:a, niiden koon tulisi olla välillä 18–28 emäsparia ja ne eivät saisi olla keskenään hyvin samankaltaisia (Invitrogen, 27). Beta-aktiinin, VEGF-C:n, VEGF-D:n, VEGFR-2:n, VEGFR-3:n, sVEGFR-2:n ja Nrp-2:n alukkeet (TAG Copenhagen A/S) saatiin artikkelista (Dicke ym. 2011) ja TBP:n artikkelista (Pombo-Suarez ym. 2008) (TAG Copenhagen A/S). Ang1:n, Ang2:n, Tie1:n ja Tie2:n alukkeiden (Oligomer) sekvenssit saatiin toiselta tutkimusryhmältä (Alitalo ym.) ja VSNL1 geenin alukkeet (TAG Copenhagen A/S) suunniteltiin käyttäen NBCI:n alukkeiden suunnitteluohjelmaa. Alukkeiden tarkat sekvenssit on lueteltu liitteessä 8.

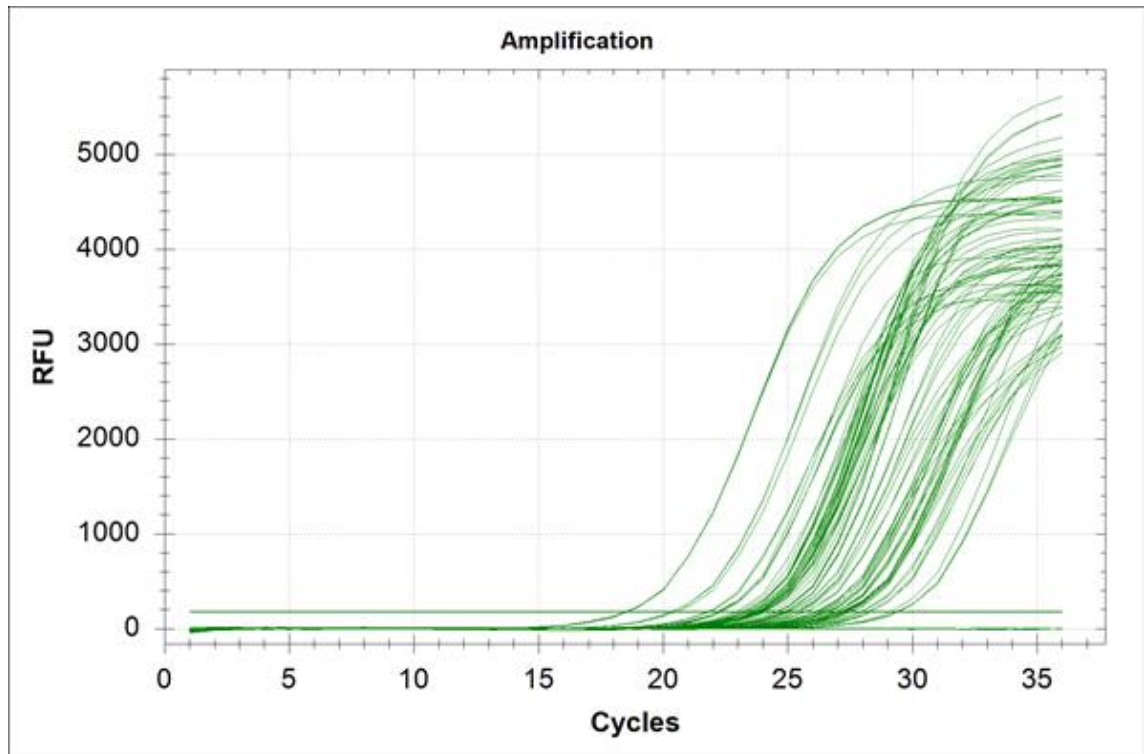


Kuva 21. Alukkeiden testaaminen villityypin sikiöstä saadulla cDNA:lla. Negatiivisena kontrollina käytettiin cDNA:ta, mikä oli käännetty ilman käänteistranskriptaasientsyymiä.

Alukkeiden testaukseen käytettiin PCR-reaktiota. Ensin eristettiin RNA villityypin sikiön ylävartalosta, puhdistettiin ja käännettiin cDNA:ksi. Suunniteltiin PCR-reaktio alukkeiden sulamislämpötilojen ja käytetyn entsyymin perusteella (ks. Liite 6, alukkeet). Reaktiossa käytettiin Taq -polymeraasia (Invitrogen) ja reaktioseos tehtiin valmistajan ohjeiden mukaan (Liite 6, alukkeet). PCR-reaktion jälkeen näytteet ajettiin agarosigeelillä (ks. kuva 22). Kaikki geenit muodostivat selkeän fragmentin.

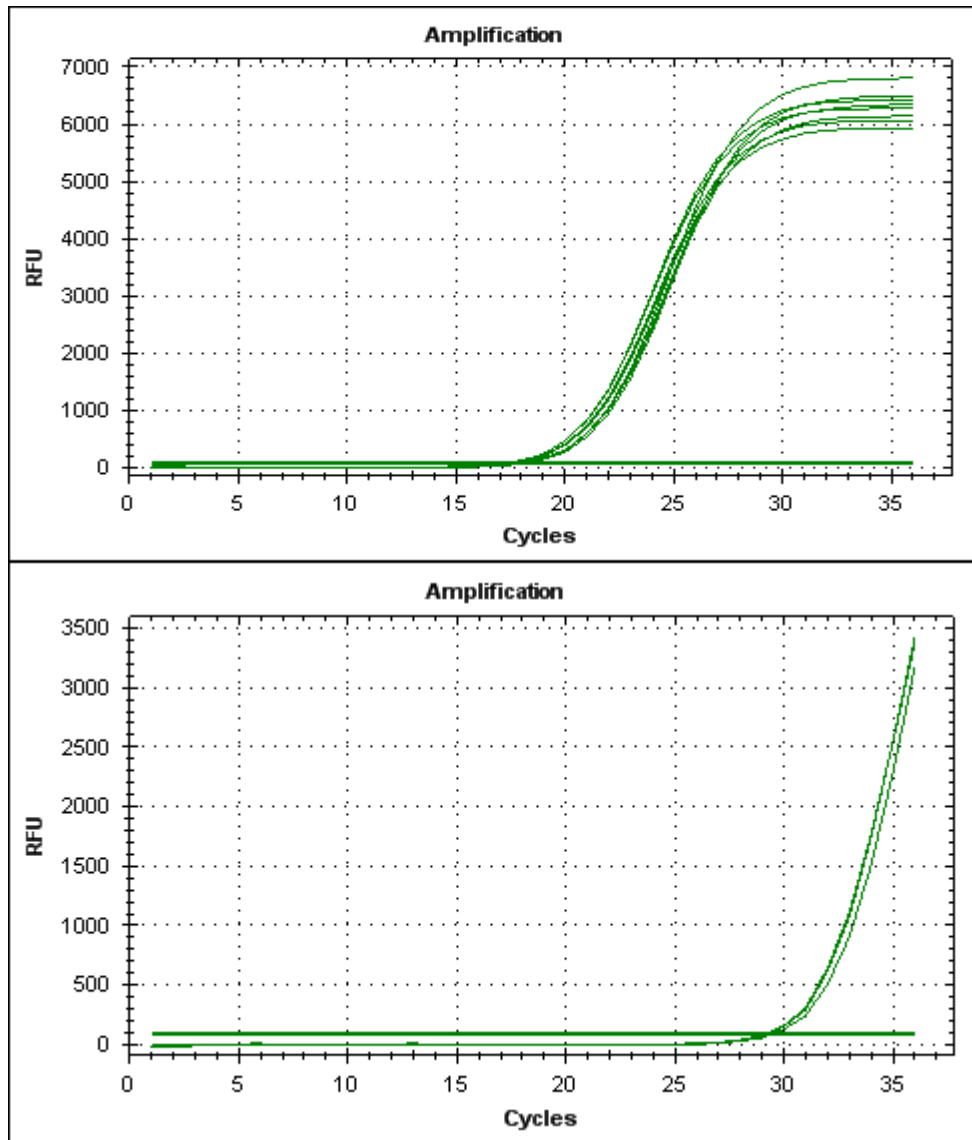
7.4 Kvantitatiivinen reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio (RT qPCR)

Kvantitatiivisella reaaliaikaisella polymeraasiketjureaktiolla (engl. quantitative real time polymerase chain reaction) tarkoitetaan sellaista PCR-reaktiota, missä PCR-tuotteen muodostusta seurataan ajan funktiona. RT qPCR:llä voidaan monistaa sekä DNA:ta että RNA:ta. PCR-tuotteen määrä mitataan jokaisen syklin jälkeen siihen sitoutuvan fluoresoivan leiman avulla. Tuotteen eli syntyvien amplikonien määrä on suoraan verrannollinen fluoresenssiin. Fluoresenssisignaali ilmoitetaan laitekohtaisena fluoresenssiyksikkönä (RFU, engl. *relative fluorescence unit*). (ks. kuva23) Fluoresoiva leima voi olla yleisesti kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuva (SYBR Green), jolloin fluoresenssi kasvaa mitä enemmän tuotetta syntyy. Fluoresoiva leima voi myös sijaita templaatti-DNA:han spesifisesti sitoutuvassa alukkeessa tai probissa. (Invitrogen, 3.)

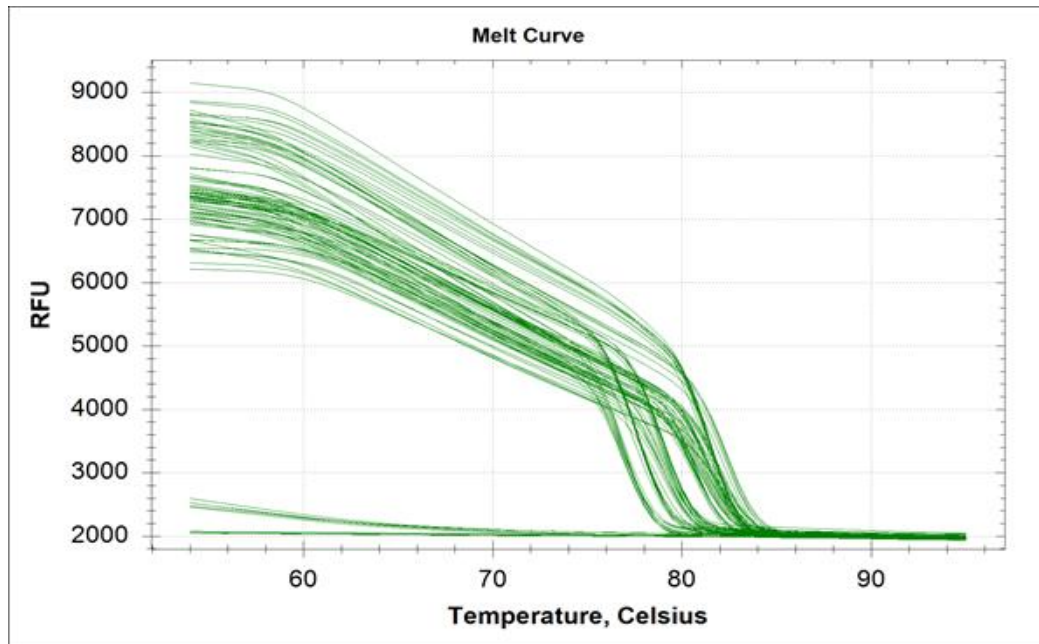


Kuva 22. Laitteen antama kuva (Bio-Rad CFX Manager 2.0) reaaliaikaisen qPCR:n monistus-käyrästä 10 eri geenin ja negatiivisten kontrollien osalta (näkyvät suorana viivana nollassa). Y-akselilla näkyy mitatun fluoresenssin määrä ja x-akselilla PCR -sykliä määrä.

Amplikonien määrä kasvaa eksponentiaalisesti PCR -reaktion aikana, jolloin RT qPCR -laite mittaa sekä fluoresenssia että PCR -syklejä (ks.kuva 23). Syntyneiden amplikonien määrän ja nopeuden, eli millä syklillä amplikonien määrä ylittää tietyn raja-arvon (Ct, engl. *threshold cycle*), perusteella voidaan laskea kyseisen geenin ilmentymismäärä. (ks. kuva 24) Mikäli amplikonien määrä eli fluoresenssi ylittää Ct-arvon aikaisissa sykleissä, kyseistä geeniä on ollut näytekuoksessa paljon (ks. kuva 24), mikäli Ct-arvo taas ylittyy myöhään, on kyseisen geenin määrä ollut vähäinen. (Invitrogen, 4.) Ct-arvo voidaan asettaa manuaalisesti ja se tulisi asettaa niin, että käyrät ylittävät sen eksponentiaalisessa vaiheessa. Eksponentiaalista vaihetta kutsutaan myös logaritmisiksi vaiheeksi, sillä silloin fluoresenssin määrä kasvaa lineaarisesti verrattuna syntyvän PCR-tuotteen määrään.



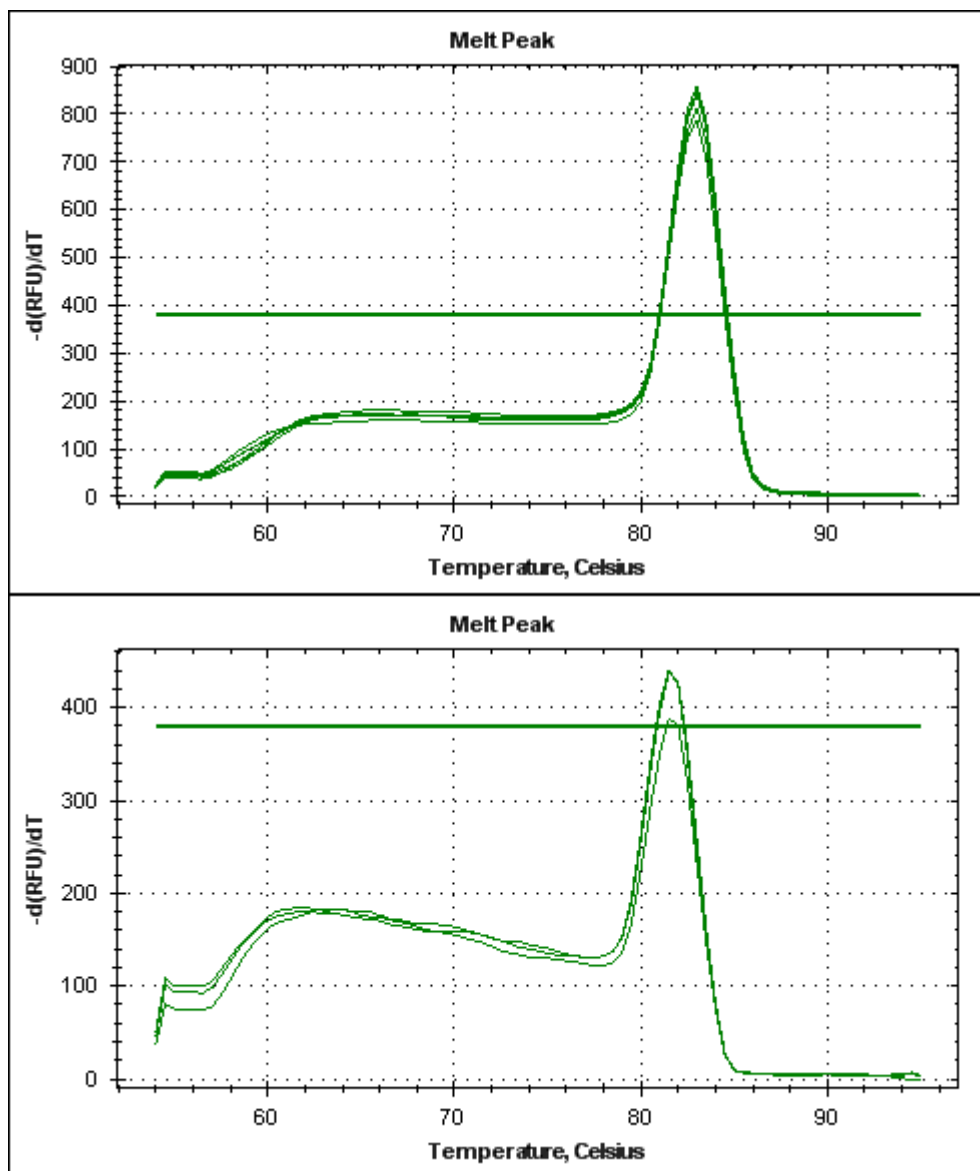
Kuva 23. Syntyvän fluoresenssin (RFU) ylittäessä tietyn raja-arvon (Ct), voidaan syklien määrää tällä hetkellä verrata kyseisen geenin ilmentymistasoon, sillä fluoresenssin määrä kasvaa lineaarisesti verrattuna syntyvän PCR -tuotteen määrään. Ylemmässä kuvassa on beta-aktiinin muodostama käyrä (wt, het ja ko) ja alemmassa VILIP1 geenin käyrät poistogeenisten sikiöiden näytteistä. Alemman kuvan käyrät ylittävät Ct-arvon niin myöhäisillä sykleillä, että tästä voidaan päätellä kyseisen geenin hyvin alhainen ilmentyminen tai sitä ei ilmenneä lainkaan.



Kuva 24. Sulamiskäyräanalyysi. Y-akselilla näkyy fluoresenssi ja x-akselilla lämpötila. (Bio-Rad CFX Manager 2.0) Lämpötila nousee 54,0 °C:sta 95,0 °C:een 0,5 °C 0,05 sekunnin välein, jolloin kaksijuosteiset DNA-rihmat denaturoituvat ja fluoresoiva leima vapautuu.

RT qPCR:ssä toistetaan samoja reaktiovaiheita kuin tavallisessa PCR:ssäkin; denaturointi, alukkeiden liittyminen ja ekstensio. Tämän jälkeen laite mittaa fluoresenssin määrän. Syklejä toistetaan yleensä 30–40 kertaa, jonka jälkeen laite tekee vielä näytteille sulamiskäyräanalyysin (engl. *melting curve*), jonka avulla tarkistetaan PCR-tuotteen puhtaus ja oikeellisuus. Sulamiskäyräanalyysissä lämpötilaa nostetaan esimerkiksi 54,0 °C:sta 95,0 °C:een puoli astetta 0,05 sekunnin välein (ks. kuva 25). Lämmitettäessä kaksijuosteisen DNA:n juosteet erkanevat toisistaan sekvenssille ominaisessa lämpötilassa, jolloin kaksijuosteiseen DNA:han sitoutunut merkkiaine (SYBR green) vapautuu muodostaen fluoresenssisignaaliinkin (ks. kuva 26). Kuvassa 26 on beta-aktiinin sulamiskiikki (ylempi kuva) selkeästi korkeampi kuin VILIP1-geenin (alempi kuva), mikä tarkoittaa sitä, että beta-aktiinia ilmennetään runsaasti ja VILIP1:stä hyvin vähän. Kummassakaan kuvassa ei näy alukedimeerien muodostusta.

Kontrolligeenien tai kalibraattorigeenien käyttö on suositeltavaa tutkittaessa geenien ilmentymistasoja RT qPCR:llä. Niiden avulla saadaan geenien ilmentymistasojen erot normalisoitua eri reaktioiden välillä sekä normalisoitua kokonais-RNA:n osuuskien erotus näytteissä. (Invitrogen, 20.)



Kuva 25. Fluoresenssisulamispiekki, josta nähdään muodostuneiden PCR -tuotteiden oikeellisuus ja puhtaus. Sulamispiekin tulee olla selkeästi yhdessä kohdassa ja riittävän korkea. Mikäli varsinaista piekkiä ennen näkyy ylimääräinen matalampi piekki, se tarkoittaa että reaktiossa on syntynyt myös niin sanottuja alukedimeereja eli alukkeet ovat sitoutuneet toisiinsa, ja mikäli piekki on hyvin matala, on PCR -tuotetta syntynyt hyvin vähän. Ylemmässä kuvassa on beta-aktiinin sulamispiekit villityypin, heterotsygootin ja poistogeenisen sikiön näytteistä ja alemmassa VILIP1 geenin sulamispiekit poistogeenisen sikiön kolmen rinnakkaisnäytteen osalta. (Bio-Rad CFX Manager 2.0)

Tässä työssä reaaliaikaista kvantitatiivista polymeerasiketjureaktiota käytettiin tutkittaessa geenien ilmentymistasoja valittujen kohdegeenien osalta. Jokaisen kohdegeenin alukkeet pyrittiin valitsemaan niin, että niiden sulamislämpötilojen erotus oli korkeintaan 2 °C. Templaattina käytettiin villityypisen, heterotsygoottisen ja poistogeenisen hiiren sikiöistä eristetystä RNA:sta käännettyä cDNA:ta. Templaattina käytetystä cDNA:sta tehtiin ensin laimennussarja, millä suoritettiin PCR-ajo kontrolligeenien kanssa (ks. Liite

9; standardisuorat). Standardisuoran avulla pyrittiin päättämään templaatin sopiva määrä reaktioon. Tämän perusteella päädyttiin käyttämään 1:10 laimennusta, joten cDNA laimennettiin RT qPCR -reaktiota varten 1:10 steriilillä vedellä (Amresco). Fluoresoivana leimana käytettiin SYBR Green:ä (FastStart SYBR Green Master, version 09, Roche), joka fluoresoi sitoutuessaan kaksijuosteiseen DNA:han. RTqPCR -laite, jolla reaktiot suoritettiin, oli BioRadin (Bio-Rad CFX) ja tulosten tulkinnassa käytettiin ohjelmaa Bio-Rad CFX Manager 2.0. Ohjelman avulla pystyttiin laskemaan kohdegeenien ilmentymistasot näytteistä.

7.4.1 Ohjelman suunnittelu ja optimointi

Ohjelmaa suunniteltaessa otettiin huomioon amplikonien koko, mikä oli valittujen kohdegeenien osalta 100–200 emäsparia. Amplikonit eivät saisi olla kovin suuria, ei mielellään yli 250 emäsparia, sillä silloin reaktion tehokkuus kärsii. Tehokkuudella tarkoitetaan sitä, että syntyvät PCR-tuotteet ovat kopioituneet mahdollisimman täydellisesti. (Invitrogen, 23) Templaattina käytettiin puhdistamatonta cDNA:ta, minkä johdosta ohjelmaan lisättiin alkuinkubointiaika normaalin denaturaatioajan lisäksi; 10 min 95 °C, mikä toistetaan vain kerran reaktion alussa (ks. Liite 6, PCR MIX RT-PCR). Alku-denaturaatio aktivoi myös reaktiossa käytetyn polymeraasientsyymien. (FastStart SYBR Green Master, version 09, Roche.) Alukkeiden sulamislämpötilojen avulla ohjelmaan valittiin alukkeiden liittymislämpötila (engl. *annealing*), minkä tulisi olla noin 5 °C alempi kuin alukkeiden sulamislämpötila. Ekstensiovaiheen lämpötilan valintaan vaikuttavia tekijöitä ovat templaatin pituus, määrä ja käytetty polymeraasi. Useimmin käytetty lämpötila on 70–72 °C.

PCR-ohjelman toimivuutta joudutaan usein kokeilemaan ennen kuin löydetään kullekin templaatille ja alukkeelle sopiva ohjelma. Testivaiheessa näytteenä käytettiin E12,5 villityypin sikiöiden RNA:sta käännettyä cDNA:ta sekä E13,5 sikiöiden cDNA:ta, jolloin näytteet olivat villityypisistä, heterotsygoottisesta sekä poistogeenisestä sikiöstä. Ensin kokeiltiin ohjelmaa, missä alukkeiden kiinnittymisvaiheen lämpötila oli 60 °C ja alukkeiden kiinnittymisvaiheen kesto 15 s. Ekstensiovaiheen lämpötila oli 72 °C ja sen kesto 15 s. Tällaisella ohjelmalla PCR -tuotteita syntyi hitaasti ja vähän, joten ohjelmaa muutettiin niin, että kiinnittymisvaiheen lämpötila laskettiin 55 °C:een ja ekstensiovaiheen 60 °C:een ja molempien vaiheiden kestot muutettiin 30 s:iin (ks. Liite 6, PCR MIX RT-PCR). Tällä muokatulla ohjelmalla tu-

lokset paranivat huomattavasti ja sitä käytettiin kaikissa PCR -reaktioissa tutkittaessa näytteitä.

7.4.2 Master mix

RT qPCR -reaktiossa käytettiin entsyymien valmistajan (FastStart SYBR Green Master, version 09, Roche) suosittelemaa reaktioseosta (ks. Liite 6, PCR MIX RT-PCR). Reaktioseosta pipetoitiin 96-kuoppalevylle (Biotop) 20 µl/kuoppa. Alukkeiden käyttökonsentraatio oli 5 µM jolloin lopulliseksi konsentraatioksi seoksessa saatiin 250 nM. Templaattia pipetoitiin 2 µl/kuoppa, jolloin veden osuus reaktioseoksessa jäi 6 µl:aan. Kuoppalevy pidettiin pipetoinnin aikana jäiden päällä, jotta reaktioseos ei lämpenisi liikaa. Kun kaikki kuopat oli pipetoitu, kuoppalevy peitettiin suojakalvolla, joka estää seoksen haihtumisen PCR -reaktion aikana. Jokaista PCR -ajoa varten kuoppalevystä tehtiin ”kartta”, minkä avulla näytteet ja tutkittavat geenit pipetoitiin (ks. kuva 27). Jokaisesta näytteestä tehtiin aina kolme rinnakkaista, jotta saatiin mahdollisimman hyvin poistettua esimerkiksi pipetointi tms. mittausrvirheet ja jokaiseen ajoon lisättiin negatiivisiksi kontroleiksi master mix -reaktioseos kuten muilla, mutta templaatin tilalla käytettiin steriiliä vettä.

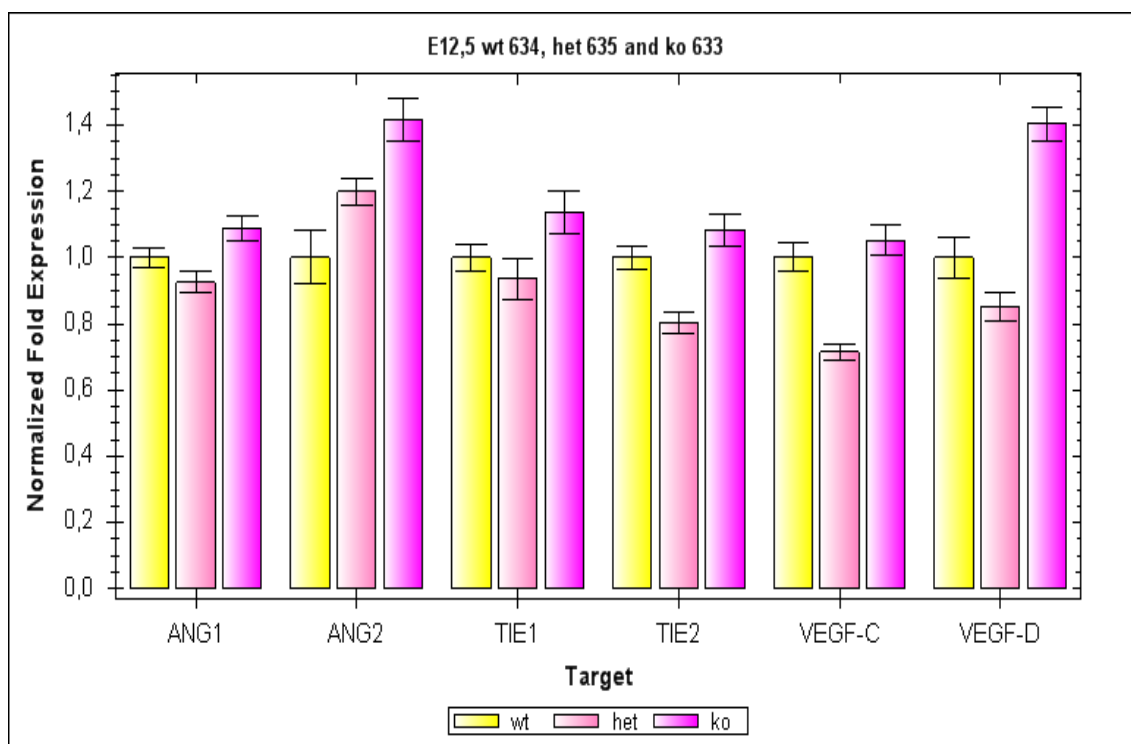
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TIE1	A	wt	wt	wt	het	het	het	ko	ko	ko	beta-actin + wt	beta-actin + wt	beta-actin + wt
TIE2	B	wt	wt	wt	het	het	het	ko	ko	ko	beta-actin + het	beta-actin + het	beta-actin + het
ANG1	C	wt	wt	wt	het	het	het	ko	ko	ko	beta-actin + ko	beta-actin + ko	beta-actin + ko
ANG2	D	wt	wt	wt	het	het	het	ko	ko	ko	beta-actin + H2O	beta-actin + H2O	
VEGF-C	E	wt	wt	wt	het	het	het	ko	ko	ko	TBP + wt	TBP + wt	TBP + wt
VEGF-D	F	wt	wt	wt	het	het	het	ko	ko	ko	TBP + het	TBP + het	TBP + het
	G										TBP + ko	TBP + ko	TBP + ko
	H												

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nrp2	A	wt	wt	wt	het	het	het	ko	ko	ko	beta-actin + wt	beta-actin + wt	beta-actin + wt
VSNL1	B	wt	wt	wt	het	het	het	ko	ko	ko	beta-actin + het	beta-actin + het	beta-actin + het
sVEGFR-2	C	wt	wt	wt	het	het	het	ko	ko	ko	beta-actin + ko	beta-actin + ko	beta-actin + ko
VEGFR-2	D	wt	wt	wt	het	het	het	ko	ko	ko	beta-actin + H2O	beta-actin + H2O	
VEGFR-3	E	wt	wt	wt	het	het	het	ko	ko	ko	TBP + wt	TBP + wt	TBP + wt
	F										TBP + het	TBP + het	TBP + het
	G										TBP + ko	TBP + ko	TBP + ko
	H												

Kuva 26. Kartta kahta 96-kuoppalevyä varten. Koska kaikista näytteistä haluttiin ajaa kolme rinnakkaista näytettä, kaikki geenit eivät mahtuneet samalle kuoppalevylle.

7.5 Geenien ilmentymistasojen tutkiminen

Geenien ilmentymistasoja tutkittiin käyttämällä Bio-Radin ohjelmaa (Bio-Rad CFX Manager 2.0), mikä laskee geenien ilmentymistasot suoraan ja sen avulla ne on myös mahdollista normalisoida. Kuvassa 28 on tutkittu kuuden kohdegeenin osalta ilmentymistasoja E12,5 villityypin, heterotsygootin ja poistogeenisen hiiren sikiöiden kudoksissa. Geenien ilmentymistasot on normalisoitu käyttäen sekä beta-aktiinia että TBP:tä. Referenssinäytteeksi on valittu villityyppi, jonka geenien ilmentymistasot laite asettaa arvoon 1 ja vertaa muiden näytteiden tasoa tähän.



Kuva 27. Beta-aktiinilla ja TBP:llä normalisoidut geenien ilmentymistasot villityypin (wt), heterotsygootin (het) ja poistogeenisen (ko) hiiren kudoksista. Y-akselilta voidaan lukea geenin ilmentämismäärä ja x-akselilla ovat tutkitut geenit. (Bio-Rad CFX Manager 2.0)

7.5.1 BIO-RAD CFX Manager 2.0

Bio-Rad CFX Manager 2.0 -ohjelma on suunniteltu käytettäväksi Bio-Radin RT qPCR -laitteella tehtyjen PCR -ajojen analysointia varten. Ohjelma antaa PCR -reaktiosta kaikki mittaustulokset (ks. Liite 9) ja laskee geenien ilmentymistasot sekä normalisoi geenit valituilla kontrolligeeneillä. Tutkittaessa geenien ilmentymistasoja laite käyttää kuvassa 29 esitettyjä kriteerejä mittaustulosten oikeellisuuden arvioimiseen. Laite ei

esimerkiksi hyväksy kolmen rinnakkaisnäytteen vertailussa 0,2 suurempaa keskihajontaa (alin rivi, engl. *standard deviation*).

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells
Negative control with a Cq less	38	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
NTC with a Cq less than	38	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
NRT with a Cq less than	38	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Positive control with a Cq greater	30	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Unknown without a Cq	N/A	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Standard without a Cq	N/A	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Efficiency greater than	110,0	<input checked="" type="checkbox"/>		
Efficiency less than	90,0	<input checked="" type="checkbox"/>		
Std Curve R ² less than	0,980	<input checked="" type="checkbox"/>		
Replicate group Cq Std Dev greater	0,20	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

Kuva 28. Bio-Rad CFX Manager 2.0 -ohjelman mittauskriteerit.

7.6 Parafiinileikkeet

E12,5-E13,5 ikäisistä sikiöistä tehtiin parafiinileikkeitä fiksaamalla ne ensin 4 % PFA:lla 1 - 3 päivää +4 °C, jonka jälkeen ne dehydroitiin etanolisarjan ja xyleenin avulla. Tämän jälkeen sikiöt valettiin parafiinimuottiin pystyasennossa, jolloin leikkeet saadaan poikkileikkauksina. Muoteista leikattiin mikrotomilla 5 µm:n paksuisia leikkeitä, jotka siirrettiin objektilaseille. Joka viides objektilasi värjättiin hematoksilliini-eosiinivärjäyksellä, jotta osattiin valita halutusta kohdasta olevat leikkeet.

7.6.1 Vasta-ainevärjäykset eli immunofluoresenssi ja immunohistokemia

Osa objektilaseista valittiin vasta-aineilla tehtävää immunofluoresenssi-värjäystä varten, ja ne käsiteltiin ja värjättiin kuten liitteessä 7 (immunofluoresenssi) on esitelty. Värjäysten avulla pyrittiin osaltaan selvittämään syitä sille, että VSNL1 poistogeenisillä hiirillä on todettu muuttunut fenotyyppi, muun muassa ihonalaista turvotusta ja kuolleisuutta sikiöaikana. Osalle leikkeistä tehtiin immunohistokemiallinen värjäys VILIP1-vasta-aineella (Liite 7, immunohistokemia), jolla varmistettiin poistogeenisten sikiöiden

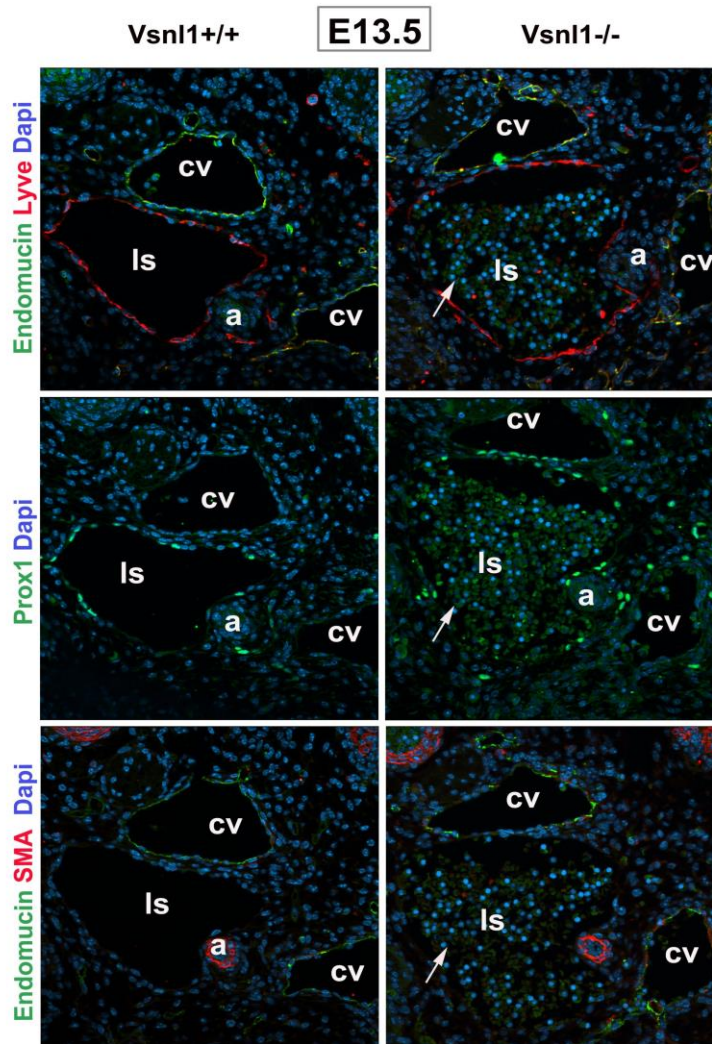
olevan poistogeenisiä. Poistogeenisten sikiöiden ei pitäisi ilmentää lainkaan hiljennettyä geeniä, joten vasta-aineen ei pitäisi sitoutua niistä tehtyihin leikkeisiin ollenkaan.

8 Tulokset ja niiden pohdinta

Insinöörityön tarkoituksena oli tutkia ja mahdollisesti selventää solun sisäisiä mekanismeja ja molekylaarisia muutoksia VSNL1 poistogeenisten hiirten muuttuneen fenotyypin taustalla pääasiassa vertailemalla villityypin ja poistogeenisten hiirien geenien ilmentymistasoja. Tavoitteena oli myös optimoida menetelmä mRNA:n eristämiseen ja puhdistamiseen jäädytetyn sikiön kudoksista, sekä optimoida RT qPCR -ohjelma haluttujen geenien ilmentymisen tutkimiseen.

8.1 Immunofluoresenssi ja Immunohistokemia

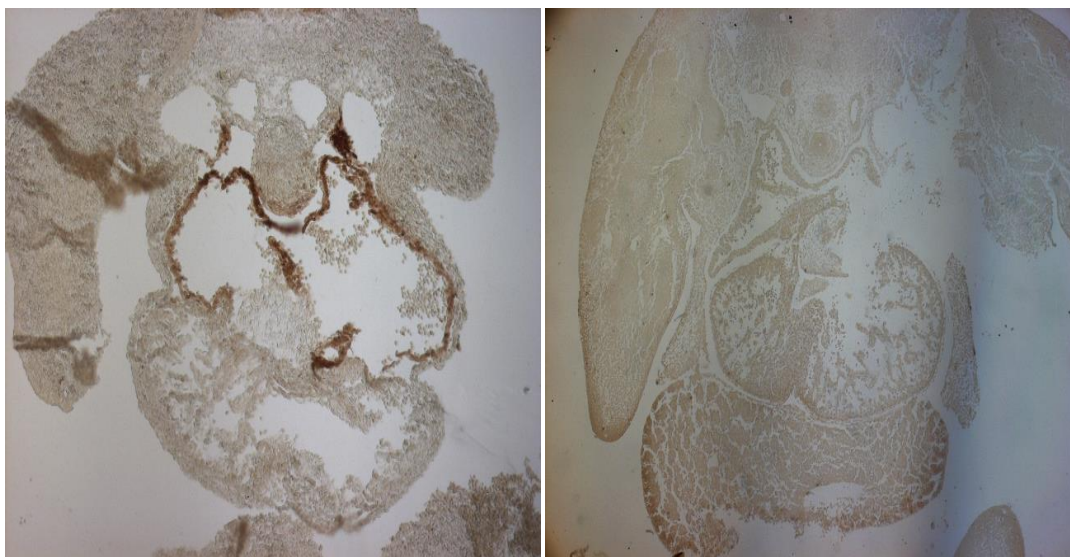
VSNL1-poistogeenisten sikiöiden kudokset vertailtiin vasta-ainevärjäysten (immunofluoresenssi) avulla villityypin kudokset. Värjäysten avulla pyrittiin selvittämään ulospäin näkyvää fenotyyppiä eli ihonalaista turvotusta sekä sikiöaikaista kuolemaa. Kuvassa 30 on tehty immunofluoresenssi-värjäys E13,5 ikäisten sikiöiden parafiinileikkeille. Vasemmanpuoleisessa sarakkeessa on villityypin sikiö ja oikeanpuoleisessa sarakkeessa VSNL1-poistogeeninen sikiö. Kaikissa kuvissa näkyvä sininen väri johtuu käytetystä peitinaineesta (engl. mounting media) (Vectashield DAPI, Vector laboratories), mikä värjää solujen tumat sinisiksi. Ensimmäisessä rivissä olevissa kuvissa on käytetty primäärinä vasta-aineina endomysiiniä (vihreä) ja LYVE1:stä (punainen). Endomysiini ilmentyy verisolujen endoteelissa ja LYVE1 imusuonten endoteelissa soluissa. Toisessa rivissä on käytetty primäärivasta-aineena ainoastaan PROX1:stä (vihreä), joka ilmentyy imusuonissa (normaalisti vain niiden endoteelisolussa), sillä se on imusuoniston erilaistumista säätelevä transkriptiotekijä (ks. kuva 8 luku 2.5). Kolmannessa rivissä on käytetty primäärivasta-aineena endomysiiniä (vihreä) ja SMA:ta (punainen). SMA:ta ilmentetään perisyhteissä eli verisuonten sileälisoluissa. Vasta-aineet ja niiden laimennukset sekä käytetty menetelmä ovat liitteessä 7.



Kuva 29. Immunofluoresenssilla värjättyjä E13,5 sikiöiden parafiinileikkeitä. ls=lymphatic sac, a=aorta, cv=cardinal vein. Kuvista nähdään että VSNL1-poistogeenisillä sikiöillä primaariset lymfapussit (ls) ovat täyttyneet verellä (nuolet).

Kuvasta 30 nähdään, että poistogeenisillä hiirillä primaariset lymfapussit ovat täyttyneet ilmeisesti verellä tai sitten endoteelisoluilla. Villityypin leikkeissä lymfapussin sisäpuolella ei ole lainkaan soluja, sillä DAPI värjää tumat sinisellä, kun taas poistogeenisen sikiön leikkeissä lymfapussin sisäpuoli on täynnä soluja, mitkä ilmentävät myös Prox1:stä ja LYVE1:stä. Näiden geenien tulisi normaalikudoksissa ilmentyä vain suonien seinämissä. Lisäksi lymfapussit ovat poistogeenisellä sikiöllä turvoksissa verrattaessa villityypin sikiöön. Nämä ilmiöt saattavat johtua esimerkiksi epänormaalista lisääntyneestä endoteelisolujen proliferaatiosta.

Immunohistokemian (IHC) avulla pyrittiin varmistamaan että tutkimuksessa käytetyt VILIP1 poistogeeniset sikiöt olivat todella poistogeenisiä, sillä joskus geenin hiljentäminen onnistuu vain osittain. Tämän varmistamiseksi tehtiin osalle parafiinileikkeistä immunohistokemiallinen värjäys VSNL1 -vasta-aineella. Poistogeenisten sikiöiden ei pitäisi ilmentää ollenkaan hiljennettyä geeniä, joten sille spesifisellä vasta-aineella tehdyssä IHC värjäyksessä ei pitäisi näkyä mitään värin muodostusta. Kuvassa 31 vasemmanpuoleinen leike on villityypin sikiöstä ja siinä erotetaan ruskea väri sikiön sydämen kudoksissa. Oikeanpuoleinen leike on VSNL1-poistogeenisestä sikiöstä ja siinä ei tällaista värinmuodostusta esiinny lainkaan. IHC toistettiin useilla VSNL1-poistogeenisistä sikiöistä otetuilla leikkeillä, ja tulos oli jokaisessa hyvin selkeä: Todettiin geenin hiljennyksen olevan onnistunut VSNL1-geenin osalta.



Kuva 30. Immunhistokemiallinen värjäys VSNL1-vasta-aineella E12,5 sikiöiden parafiinileikkeille. Vasemmanpuoleisessa kuvassa on villityypin sikiöstä tehty leike, missä ruskea väri näkyy selkeästi ja oikeanpuoleinen on VSNL1-poistogeenisestä sikiöstä tehty leike.

8.2 RNA:n eristäminen ja puhdistaminen

Korkealaatuisen ja vahingoittumattoman RNA:n eristäminen on ensimmäinen ja usein myös kriittisin vaihe monissa molekyylibiologisissa menetelmissä, kuten tässä työssä käytetyssä RT qPCR:ssä. RNA on hyvin herkkä erilaisille kontaminaatioille ja se saattaa muuttua tai hajota käsittelyjen aikana. RNA:ta pilkkovaa ribonukleaasia on lähes kaikkialla; iho ja huonepölyn mahdollisesti sisältämät bakteerit ja homeet ovat potentiaalisia ribonukleaasien lähteitä. Myös laboratoriovälineistä kuten pipetinkärjistä

tä, koeputkista ja reagensseista voi aiheutua kontaminaatio näytteisiin. Tämän vuoksi aseptinen työskentely on erittäin tärkeää työskennellessä RNA:n kanssa.

RNA eristettiin sikiöiden jäädytetystä kudoksesta. Tähän työhön valittiin TRI reagenssi näytteiden homogenisointiin (TRI Reagent® RNA Isolation Reagent) ja sen valmistajan (Ambion) suosittelema menetelmä. Homogenisoinnin onnistuminen on oleellista RNA:n eristyksessä, sillä mitä paremmin kudoksesta saadaan hajotettua tasalaatuisesti, sitä parempi on RNA:n saanto. Menetelmää kokeiltiin ennen varsinaisia näytteitä niitä vastaavilla kudoksilla, E12,5 villityypin sikiöiden ylävartaloilla. Saatu RNA mitattiin spektrofotometrisesti Nanodropilla (Nanodrop 8000, Thermo Scientific), jolloin saatiin selville RNA:n konsentraatio sekä puhtaus.

Puhtautta mitataan absorbanssin avulla; RNA absorboi tyypillisesti aallonpituudella 260, DNA ja proteiinit aallonpituudella 280. Laitte laskee mitatusta näytteestä konsentraation lisäksi suhdeluvut A_{260}/A_{280} ja A_{260}/A_{230} , joista ensimmäinen kertoo RNA:n ja DNA:n suhdeluvun ja jälkimmäinen on niin sanottu sekundaarinen suhdeluku. RNA:n ja DNA:n suhteen pitäisi olla lähellä kahta, jolloin näyte on RNA:ta. Jälkimmäisen suhdeluvun pitäisi myös olla lähellä kahta. Mikäli A_{260}/A_{280} on alhaisempi kuin 1,85, näyte sisältää myös muita biomolekyylejä, kuten DNA:ta, proteiineja ja lipidejä (mikäli näyte on puhdasta DNA:ta, suhdeluku on noin 1,8), mitkä absorboivat aallonpituudella 280. Mikäli sekundaarinen suhdeluku on alhainen, on näytteessä epäpuhtauksia. Korkea suhdeluku taas voi viitata oligonukleotidiketjuihin. (Nanodrop, Technican support bulletin, 2007.) Kuvassa 32 on Nanodrop -laitteen mittaustulokset kolmelle näytteelle, joiden kaikkien A_{260}/A_{280} suhdeluku on välillä 1,85–2,1 ja joiden konsentraatio on riittävä (yli 1 µg/µl). Sekundaariset suhdeluvut ovat heikohkoja, mutta RNA:ta ei ole vielä puhdistettu. Hyvän saannon ja suhdeluvun perusteella todettiin TRI reagenssin ja menetelmän olevan hyvä. Kaikista näytteistä eristetyt RNA:t mitattiin samalla tavalla.

Plots Report Testtype: NucleicAcid 15.5.2013 12:17 Exit

Report Name Report Full Mode Ignore

Sample ID	User ID	Date	Time	Conc.	Units	A260	A280	260/280	260/230
E11,5 upperRNA 642wt14.5	Default	15.5.2013	12:14	1131	ng/ul	28,271	14,369	1,97	0,85
E11,5 upperRNA 643het14.5	Default	15.5.2013	12:15	1262	ng/ul	31,546	15,658	2,01	1,21
E11,5 upperRNA 644ko 14.5	Default	15.5.2013	12:16	1210	ng/ul	30,249	15,528	1,95	0,65

Kuva 31. Kolmesta näytteestä eristettyjen RNA:n mittaustulos Nanodropilla.

RNA puhdistettiin sekä DNA:lla (Invitrogen) että RNA Purification kitillä (RNeasy Mini Kit, Qiagen) ja puhdistuksessa seurattiin kitin ohjeita. Puhdistetut näytteet mitattiin Nanodropilla (ks. kuva 33). Puhdistuksen jälkeen konsentraatio oli selkeästi pienempi, mutta näytteet saatiin puhtaammiksi, jolloin tulosten luotettavuus paranee. RT qPCR:n tuloksiin vaikuttava DNA saatiin puhdistettua mahdollisimman hyvin, sillä molemmat suhdeluvut olivat lähellä kahta. Kaikki näytteet mitattiin puhdistuksen jälkeen ennen kuin niistä käännettiin cDNA:ta.

ts Report Testtype: NucleicAcid 16.5.2013 12:22 Exit

Report Name Report Full Mode Ignore

Sample ID	User ID	Date	Time	Conc.	Units	A260	A280	260/280	260/230	Conc. Factor (ng/ul)
E11,5 purRNA 642wt15.5	Default	16.5.2013	12:20	164,4	ng/ul	4,111	1,990	2,07	1,71	40,00
E11,5 purRNA 643het15.5	Default	16.5.2013	12:21	227,2	ng/ul	5,679	2,757	2,06	1,81	40,00
E11,5 purRNA 644ko 15.5	Default	16.5.2013	12:22	211,1	ng/ul	5,277	2,522	2,09	1,96	40,00

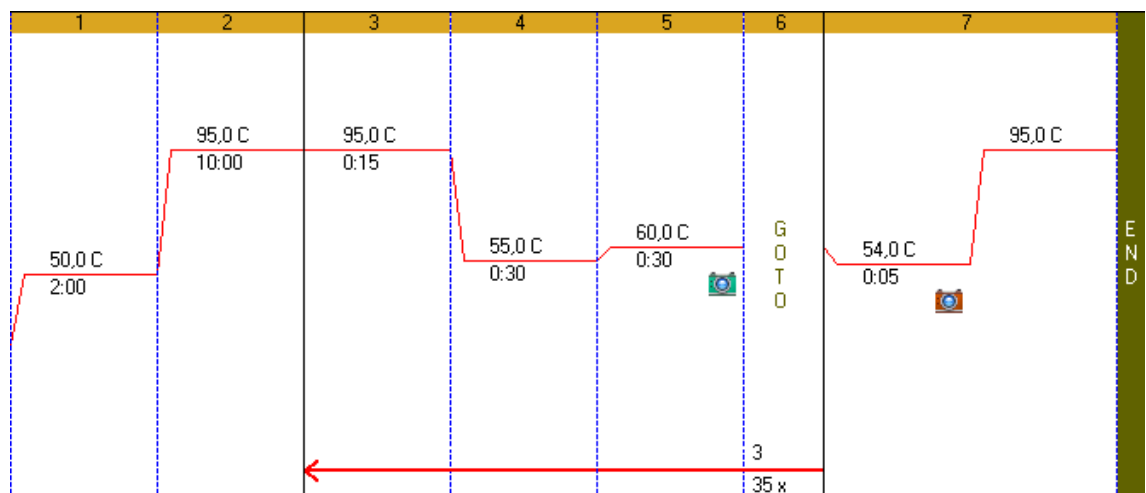
Kuva 32. Puhdistettu RNA.

Mittausten perusteella voidaan päätellä, että niin työssä käytetty RNA:n eristysmenetelmä, kuin RNA:n puhdistusmenetelmäkkin toimivat hyvin. Kaikista näytteistä saatiin riittävä saanto (konsentraatio) ja ne olivat riittävän puhtaita, sillä näytteistä mitatut suhdeluvut olivat hyväksyttävissä rajoissa.

8.3 Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR

Yksi työn tavoitteista oli optimoida RT qPCR-ohjelma tätä työtä varten. Aluksi käytettiin toista RT qPCR-laitetta (Roche The LightCycler® 480 Real-Time PCR System) sekä sen vaatimaa entsyymiä (SYBR Green version 12, Roche). Useista yrityksistä ja erilaisista PCR -ohjelmista huolimatta tällä laitteella ja entsyymillä ei saatu kunnollisia tuloksia geenien ilmentymisestä. Reaktio ei toiminut hyvin ja näytteet ylittivät Ct -arvon niin myöhäisillä sykleillä, että PCR -tuotetta syntyi hyvin vähän. Tällöin geenien ilmentymisen luotettava analysointi ei ole mahdollista. Tämän johdosta kokeiltiin toista laitetta (Bio-Rad) ja entsyymiä (FastStart SYBR Green Master, version 09, Roche), mitkä todettiin toimiviksi.

Ensin kokeiltiin ohjelmaa niin sanotuilla oletusarvoilla, joita sitten muutettiin reaktion ja PCR-tuotteen muodostuksen parantamiseksi. Alukkeiden liittymislämpötilan ja -ajan sekä ekstensiovaiheen lämpötilan ja ajan muuttaminen tuottivat toivotun tuloksen ja reaktio saatiin tehokkaaksi (ks. kuva 34). Lämpötiloja ja aikoja suunniteltiin ja arvioitiin alan kirjallisuuden sekä muiden laboratorion tutkijoiden avustuksella, jotka olivat tehneet vastaavanlaista tutkimusta.

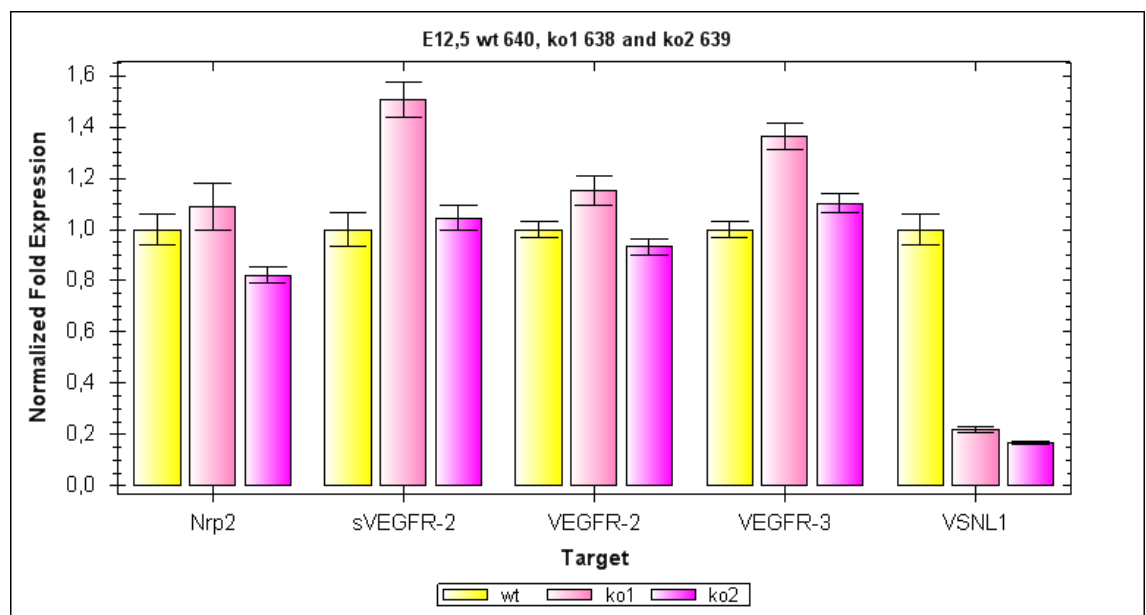


Kuva 33. RT qPCR -ohjelma (Bio-Rad CFX Manager 2.0).

8.4 Geenien ilmentymistasot

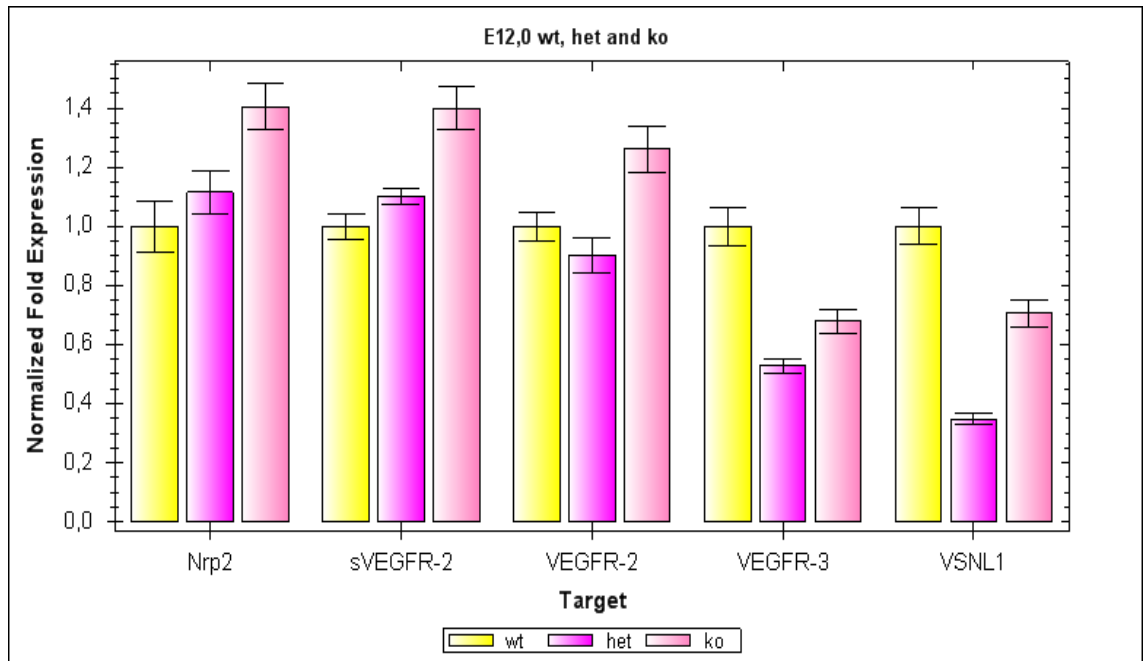
Kvantitatiivinen PCR on menetelmä, minkä avulla voidaan tutkia geenien ilmenemistä mRNA -tasolla, sillä reaktiossa käytetään templaattina mRNA:sta käännettä cDNA:ta. Geenien ilmentymistä proteiinitasolla voidaan tutkia esimerkiksi Western blotting -menetelmällä. (Sariola ym. 2003: 147–151.)

Näytteinä tässä tutkimuksessa käytettiin E11,5 ja E12,5 hiirten sikiöitä, joista pyrittiin valitsemaan kuhunkin PCR-ajoon yksi villityyppi, yksi heterotsygootti ja yksi poistogeeninen samasta poikueesta. Tämän vuoksi näytteiden saanti oli hankalaa, sillä poikueita ei ollut kovin paljon käytettävissä ja kaikissa poikueissa ei esimerkiksi ollut yhtään VILIP1 poistogeenistä sikiötä. Tällöin kyseistä poikuetta ei tässä työssä voitu käyttää. Heterotsygootin sikiön kudosta ei välttämättä olisi tarvittu, sillä analyyseissa vertailtiin pääasiassa villityypin ja poistogeenisen sikiön geenien ilmentymistasoja. Tutkimuksessa verrattiin neljän E12,5 VSNL1 poistogeenisen sikiön geenien ilmentymistasoja villityypin kanssa, mutta E11,5 sikiöistä ei saatu kuin kaksi poistogeenistä yksilöä, joten E11,5 sikiöiden tuloksista ei voitu tehdä varsinaisia tieteellisiä päätelmiä.



Kuva 34. Viiden verisuonten muodostukseen vaikuttavan geenin ilmentymistasot normalisoituna beta-aktiinilla ja TBP:llä, missä näytteinä on käytetty yhtä villityypin sikiötä ja kahta poistogeenistä samasta E12,5 poikueesta. Kuvassa nähdään poistogeenisten hiirten alhaiset VSNL1 geenin ilmentymistasot (punaiset pylväät oikeassa reunassa).

VSNL1-geenin osalta haluttiin varmistaa, että poistogeeniseksi genotyyppitetyt näytteet olivat poistogeenisiä, sillä tavallisella PCR:llä tehdyt genotyyppitykset eivät ole täysin luotettavia. RT qPCR -ajoissa käytettiin tutkittavien geenien lisäksi eräänlaisena kontrollina VSNL1-geeniä: Mikäli geenin hiljentäminen on onnistunut ja kyseinen sikiö on poistogeeninen, VSNL1-geenin ilmentymistasojen tulisi olla hyvin alhaiset qPCR:ssä. Kuvasta 35 nähdään, että kahden VSNL1-poistogeenisen sikiön geenin ilmentymistasot ovat hyvin alhaiset, mikä tarkoittaa sitä, että nämä kaksi sikiötä ovat poistogeenisiä ja geenin hiljentäminen on onnistunut. Kuvassa 36 on esimerkki qPCR -ajon tuloksista, missä VSNL1-poistogeeniseksi genotyyppitetty sikiö ei olekaan poistogeeninen, sillä sen VSNL1-geenin ilmentymistaso on korkeampi kuin heterotsygoottisella. Tämän poikkeuksen tuloksia ei otettu huomioon analysoitaessa muiden geenien ilmentymistasoja.



Kuva 35. Viiden geenin ilmentymistasot E12,5 sikiöillä, joista yksi on villityppi, yksi heterotsygootti ja yhden pitäisi olla VSNL1-poistogeeninen. Kuvasta nähdään kuitenkin että poistogeenisen sikiön VSNL1-geenin ilmentymistaso on selvästi korkeampi kuin heterotsygootin, joten se ei voi olla poistogeeninen.

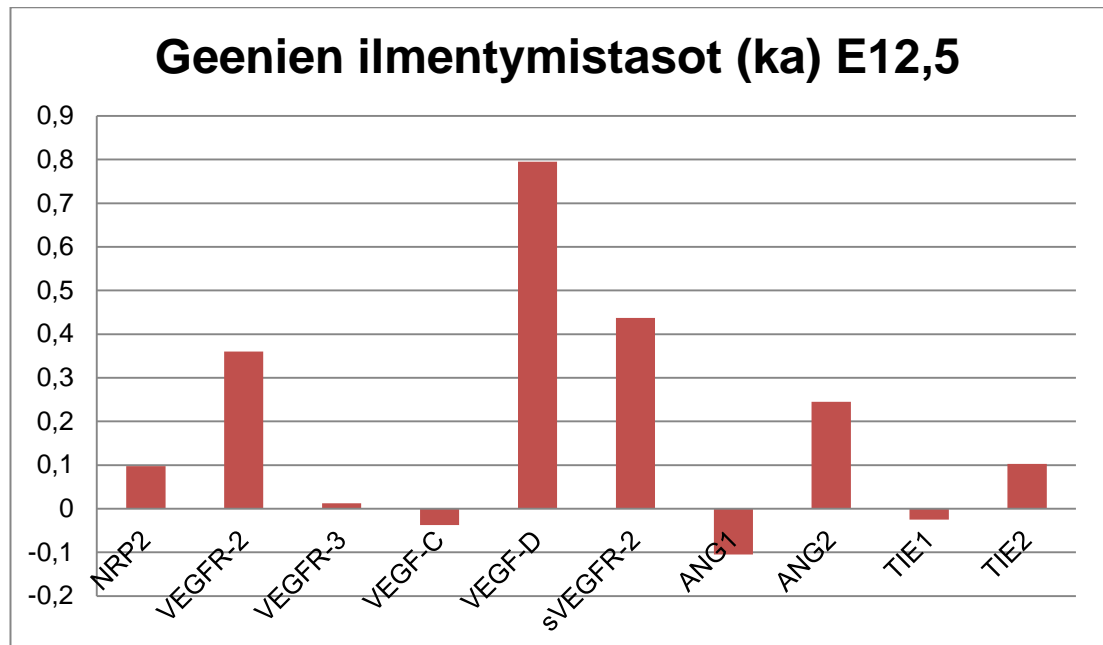
Taulukko 1. Geenien ilmentymistasojen muutokset neljällä E12,5 poistogeenisellä sikiöllä verrattuna villityypin sikiöön.

NRP2	0,41	0,16	0	-0,18
VEGFR-2	0,52	0,77	0,15	0
VEGFR-3	1,12	-0,41	0,36	0,1
VEGF-C	-0,27	0	0,12	0
VEGF-D	0,1	0,4	1,76	0,92
sVEGFR-2	0,99	0,25	0,51	0
ANG1	-0,1	0	0	-0,32
ANG2	0	0,42	0,67	-0,11
TIE1	-0,27	0,14	0,3	-0,27
TIE2	-0,14	0	0,67	-0,12

Taulukossa 1 on esitelty neljän eri poistogeenisen sikiön geenien ilmentymistasojen muutokset kaikkien tutkittujen geenien osalta. Kontrolligeneineinä tässä on käytetty sekä beta-aktiinia että TBP:tä ja geenien ilmentymistasoja on verrattu samojen poikueiden villityypin sikiöiden geenien ilmentymistasoihin (merkitty arvolla 1). Kuvassa 37 on näistä arvoista laskettu keskiarvot ja piirretty niistä pylväsdiagrammi. Taulukosta nähdään että useimpien geenien osalla ilmentymistasoissa voidaan havaita vain hyvin pieniä muutoksia tai muutokset ovat ristiriitaisia eri sikiöiden välillä. Toisissa näytteissä geenien ilmentymistasot ovat esimerkiksi laskeneet poistogeenisillä hiirillä, kun taas toisilla ne ovat kohonneet. Esimerkiksi imusuonten muodostukseen vaikuttavan reseptorin VEGFR-3:n geenin ilmentymistaso on kolmella poistogeenisellä sikiöllä kohonnut ja yhdellä laskenut. Tämän vuoksi tuloksista laskettu keskiarvo näyttää siltä kuin geenin ilmentymistaso ei olisi muuttunut lainkaan (ks. kuva 37). Imusuontenmuodostuksessa vaikuttavan kasvutekijän VEGF-C:n muutokset ovat niin vähäisiä, että tuloksista voidaan päätellä sen ilmentymisen olevan samanlaista villityyppisellä ja VSNL1-poistogeenisellä hiirellä.

Ainoastaan imusuonten muodostuksessa vaikuttavan toisen kasvutekijän VEGF-D:n ilmentymistaso on muuttunut huomattavasti. Sen ilmentymistaso on kohonnut noin 80 % verrattaessa villityypin kanssa (ka 0,8, ks. kuva 37). VEGF-D:n on todettu indusoivan imusonten kehitystä yhdessä VEGF-C:n kanssa. (ks. luku 2.5) Rissanen ym. (2003) totesivat tutkimuksessaan sen liiallisen ilmentymisen aiheuttavan pienten imusuonien voimakasta laajentumista sekä turvotusta kudoksissa. Myös sVEGFR-2:n ja VEGFR-

2:n ilmentymistasot ovat jonkin verran koholla. VEGFR-2:n tiedetään vaikuttavan endoteelisolujen proliferoitumiseen suonten muodostuksessa, joten sen lisääntynyt ilmentyminen VSNL1-poistogeenisillä hiirillä saattaisi olla yksi selittävä tekijä fenotyypin muutoksille (ks. 8.1 kuva 30).



Kuva 36. Geenien ilmentymistasojen keskiarvot neljän E12,5 sikiön kudoksista.

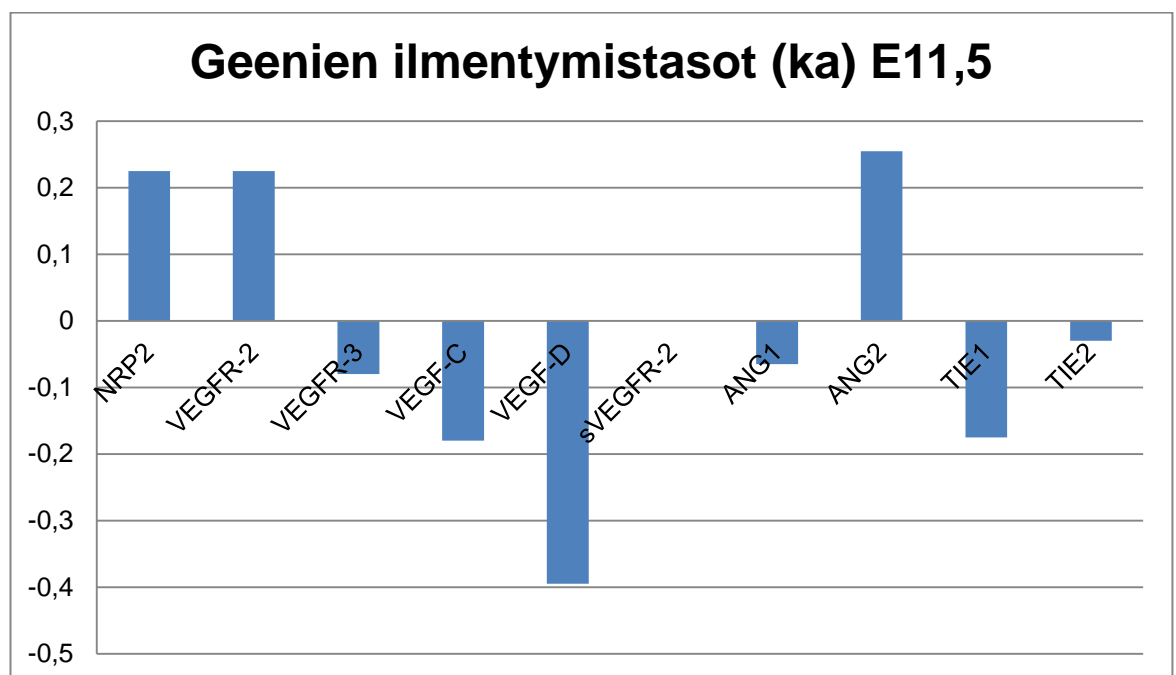
Saaduista tuloksista voidaan näiden näytteiden perusteella sanoa että ainoastaan kasvutekijä VEGF-D:n osalta on tapahtunut selkeä muutos geenin ilmentymistasossa VSNL1-poistogeenisillä hiirillä. Toistoja tulisi tehdä enemmän, jotta voitaisiin nähdä mihin suuntaan esimerkiksi VEGFR-3:n tasojen heilahtelut menisivät, eli onko tässä tutkimuksessa saatu negatiivinen tulos (ilmentymistaso laskenut) yhden näytteen osalta virheellinen.

E11,5 poikueita ei saatu enempää ja saaduista poikueista löytyi vain kaksi VSNL1-poistogeenistä sikiötä, joten tuloksista ei voida sanoa tieteellisesti mitään varmaa. Tulokset on esitelty taulukossa 2 sekä kuvassa 38, missä on laskettu keskiarvot ilmentymistasojen muutoksista kuten E12, 5 näytteilläkin. Vaikka tuloksia ei voidakaan tieteellisesti tarkastella, sillä näytteitä on liian vähän, on silti merkillepantavaa että molemmilla VSNL1 poistogeenisillä sikiöillä on VEGF-D:n ilmentymistaso laskenut (ka noin 40 %). Vuorokautta vanhemmilla sikiöillä VEGF-D oli ainoa geeni, jonka ilmentymistaso oli selkeästi kohonnut, noin 80 %. Muuttunut fenotyyppi havaitaan E12,5 sikiöillä (ks. kuva

18, luku 5.3), joten on mahdollista että geenien ilmentyminen poikkeaa huomattavastikin näiden kahden iän välillä. Näytteitä tarvittaisiin kuitenkin lisää, jotta tuloksista voitaisiin tehdä varmoja päätelmiä.

Taulukko 2. Geenien ilmentymistasojen muutokset kahdella E11,5 poistogeenisellä sikiöllä verrattuna villityypin sikiöön.

NRP2	0,91	-0,46
VEGFR-2	0	0,52
VEGFR-3	-0,16	0
VEGF-C	-0,36	0
VEGF-D	-0,12	-0,67
sVEGFR-2	0	0
ANG1	-0,38	0,25
ANG2	-0,32	0,83
TIE1	-0,35	0
TIE2	-0,25	0,19



Kuva 37. Geenien ilmentymistasojen keskiarvot kahden E11,5 sikiön kudoksista.

9 Yhteenveto

VSNL1-geenin on todettu vaikuttavan sikiöaikana useiden eri elinten ja kudosten muodostukseen, muun muassa munuaisten muodostukseen sekä sydämen kehitykseen. Geenin toimintaa on tutkittu VSNL1-poistogeenisten hiirien avulla, mitkä tehtiin korvaamalla normaali geeni LacZ-geenillä, jolloin VSNL1-geeni saatiin hiljennettyä. Poistogeenisillä hiirillä on huomattu muutoksia suonten muodostuksessa eli angiogeneesissä ja lymfangiogeneesissä. Nämä fenotyypin muutokset on havaittu E12,5 sikiöillä, joilla on todettu ihonalaista turvotusta eli ödeemia ja sikiöt kuolevat noin 15 vuorokauden ikäisinä. Vasta-ainevärjäysten avulla todettiin turvotuksen johtuvan ainakin osittain laajentuneista primaarisista lymfapusseista, mistä sikiön imusuonisto lähtee muodostumaan. Verisuonissa ei havaittu poikkeavaa fenotyyppiä vasta-ainevärjäysten perusteella. Primaaristen lymfapussien laajentuminen saattaa johtua endoteelisolujen lisääntyneestä proliferaatiosta tai niiden lisääntyneestä erilaistumisesta.

Muuttuneen fenotyypin taustalla vaikuttavista molekylaarisista tekijöistä tarvitaan lisää tietoa, jotta VSNL1-geenin toimintaa ja vaikutusta erityisesti lymfangiogeneesiin eli imusuonten muodostukseen pystytään ymmärtämään paremmin. Molekylaaristen mekanismien selventämiseksi tässä työssä pyrittiin selvittämään geenien ilmentymistasojen mahdollinen muutos niiden geenien osalta, joiden on aikaisemmissa tutkimuksissa todettu vaikuttavan imusuonten kehitykseen. Tutkimusmenetelmäksi valittiin RT qPCR, sillä sen avulla on mahdollista havainnollistaa geenien ilmentymistasojen muutosta mRNA-tasolla.

Tutkittavia geneeja valittiin kymmenen, joiden kaikkien on todettu vaikuttavan verisuonten ja imusuonten kehitykseen sikiöaikana; VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-2, VEGFR-3, sVEGFR-2, ANG-1, ANG-2, TIE-1 ja TIE-2. Kontrolligeneiksi valittiin yleisesti kudoksissa ilmentyvät beta-aktiini ja TBP. Näytteiksi valittiin E11,5 ja E12,5 villityypin, heterotsygootin ja poistogeenisen sikiöiden kudosta, joista lähinnä villityyppiä ja poistogeenistä verrattiin keskenään.

E12,5 sikiöiden geenien ilmentymistasot tutkittujen geenien osalta olivat pääosin hyvin samankaltaisia villityypin ja poistogeenisen sikiön välillä eli muutosta geenin ilmentymisessä ei ollut tapahtunut tai muutokset eri näytteiden välillä olivat niin ristiriitaisia, että niistä laskettu muutoksen keskiarvo oli lähellä nollaa. Ilmentyminen oli hivenen koholla geenien sVEGFR-2 ja VEGFR-2 osalta, mutta muutos ei ole kovin merkittävä.

Imusuonten muodostusta indusoivan kasvutekijän VEGF-D:n ilmentymistaso oli sen sijaan selkeästi koholla, noin 80 %. VEGF-D:n normaalia suurempi ilmentyminen saattaisi olla yksi selitys turvotuksella ja laajentuneille primaarisille lymfapusseille. Sen on todettu indusoivan imusuonten kehitystä ja muissa tutkimuksissa on osoitettu sen aiheuttavan imusuonten laajentumista ja ödeemien muodostusta kudoksiin (Rissanen ym. 2003). Myös VEGFR-2:n koholla oleva ilmentyminen voi osaltaan vaikuttaa muuttuneeseen fenotyyppiin, sillä sen on todettu vaikuttavan endoteelisolujen proliferaatioon sekä liikkumiseen.

E11,5 sikiöiden tutkimustuloksia ei voida tarkastella tieteellisesti, sillä tutkimukseen saaduista poikueista löytyi vain kaksi poistogeenistä sikiötä. Kahden yksilön perusteella on mahdoton tehdä varmoja päätelmiä, mutta näiden tutkimustulosten perusteella voidaan geenien ilmentymistasojen päätellä olevan hyvin erilainen kuin E12,5 sikiöillä. Kaiken kaikkiaan sekä E11,5 että E12,5 sikiöitä olisi pitänyt tutkia suurempi määrä, jotta tuloksista voitaisiin tehdä todellisia johtopäätöksiä. Suuremman määrän avulla voitaisiin esimerkiksi saada ristiriitaisiin tuloksiin selvyttä. Ristiriitaisia tuloksia saatiin esimerkiksi imusuonten muodostuksessa toimivan reseptorin, VEGFR-3:n osalta.

Tässä tutkimuksessa käytetyt kontrolligeenit valittiin kirjallisuuden perusteella. Jotta geenien ilmentymistasoja voitaisiin ehdottoman luotettavasti tutkia, olisi näiden geenien oltava juuri siihen tutkimukseen valittuja ja testattuja. Tutkimuksessa ilmeni useissa PCR -ajoissa vaihtelua kontrolligeenien ilmentymistasoissa eri näytteiden välillä. Vaihtelun pitäisi olla hyvin pientä, jotta muiden geenien ilmentymistasojen normalisointi onnistuisi mahdollisimman luotettavasti. Tämän tutkimuksen ajallisesti rajoitetuissa puitteissa kontrolligeenien optimointi tai tasojen vaihtelun syiden selvittäminen ei kuitenkaan ollut mahdollista.

Tämän tutkimuksen tulokset tukevat aikaisempien tutkimusten tuloksia ja tehtyjä havaintoja siitä, että VSNL1-geeni vaikuttaa angiogeneesiin ja lymfangiogeneesiin. Sen ei ole todettu vaikuttavan suoraan, mutta se näyttäisi toimivan yhteistyössä eri suonten- ja imusuontenmuodostukseen vaikuttavien tekijöiden kanssa. Geenin toiminnasta tarvittaisiin lisää tämänkaltaista tutkimusta, jotta vaikutusmekanismeja voitaisiin ymmärtää paremmin. Tällaista tietoa voitaisiin mahdollisesti käyttää hyväksi joko perustutkimuksessa tai kehiteltäessä hoitomuotoja sellaisiin sairauksiin, missä suonten muodostumella on keskeinen merkitys, esimerkiksi syöpään.

Lähteet

Alitalo, K., Tammela, T., Petrova, TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):946-53.

Braunewell KH, Gundelfinger ED. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res*. 1999 Jan;295(1):1-12.

Braunewell K.H. and Klein-Szanto A.J. Visinin-like proteins interaction partners and emerging functions in signal transduction of a subfamily of neuronal Ca²⁺ sensor proteins. *Cell tissue Res*. 335: 301-16, 2009.

Cao, Y. Emerging mechanisms of tumor lymphangiogenesis and lumphatic metastasis. 2005. *Nature Reviews Cancer* 5: 735-743.

Charnock-Jones, DS, Kaufmann, P, Mayhew, TM. 2004. Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. I. Molecular regulation. Volume 25, Issue 2: 103-113.

Chaumont, S., Compan, V., Toulme, E., Richler, E., Housley, G.D., Rassendren, F. and Khakh, B.S. Regulation of P2X2 receptors by the neuronal calcium sensor VILIP1. *Sci Signal*. 1: ra8, 2008.

Devbio.com. Techniques of Molechylar Biology. Verkkodokumentti. , <<http://9e.devbio.com/article.php?ch=4&id=32>>. Luettu 15.8.2013-

Dicke, N. et al. Peripheral lymphangiogenesis in mice depends on ectodermal connexin-26 (Gjb2). *J Cell Sci*.124, 2806-2815, 2011.

Drake, C. J. and Fleming, P. A. . Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. 2000. *Blood* March 1, 2000 vol. 95 no. 5 1671-1679

François, M. Short, K. Secker, GA. Combes, A. Schwarz, Q. Davidson, TL. Smyth, I. Hong, YK. Harvey, NL. Koopman, P. Segmental territories along the cardinal veins generate lymph sacs via a ballooning mechanism during embryonic lymphangiogenesis in mice. *Dev Biol*. 2012 Apr 15;364(2):89-98. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.12.032. Epub 2011 Dec 29.

Gilbert, SF. 2003. *Developmental Biology*. Seventh edition. Sunderland: Sinauer Associates Inc.

Goldie, LC. Nix, MK. and Hirschi, KK. Embryonic vasculogenesis and hematopoietic specification. *Organogenesis*. 2008 Oct-Dec; 4(4): 257–263.

- Gu, C. Rodriguez, ER. Reimert, DV. Shu, T. Fritzsche, B. Richards, LJ. Kolodkin, AL. Ginty, DD. Neuropilin-1 Conveys Semaphorin and VEGF Signaling during Neural and Cardiovascular Development. *Dev Cell*. 2003 Jul;5(1):45-57.
- Kaufman, MH. & Bard, JBL. 1999. The anatomical basis of mouse development. San Diego: Academic press.
- Kreuger, J. Nilsson, I. Kerjaschki, D. Petrova, T. Alitalo, K. Claesson-Welsh, L. 2006. Early Lymph Vessel Development From Embryonic Stem Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
- Laterza, OF. Modur, VR. Crimmins, DL. Olander, JV. Landt, Y. Lee, JM. Ladenson, JH. 2006. Identification of novel brain biomarkers. *Clin Chem*. 52: 1713-21.
- Ola, R. Novel genes in mesodermal development. Väitöskirja. Helsingin yliopisto. 2012.
- Ola, R. Lefebvre, S. Braunewell, K-H. Sainio, K. Sariola, H. 2012. The expression of Visinin-like 1 during mouse embryonic development. *Gene expression patterns* 12: 53-62.
- Pombo-Suarez, M. Calaza, M. Gomez-Reino, JJ: Gonzales, A. 2008. Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. *BMC Molecular Biology* 9.
- Rissanen, T. Markkanen, JE. Gruchala, M. Heikura, T. Puranen, A. Kettunen, M. Kholová, I. Kauppinen, RA. Achen, MG. Stacker, SA. Alitalo, K. Ylä-Herttuala, S. 2003. VEGF-D Is the Strongest Angiogenic and Lymphangiogenic Effector Among VEGFs Delivered Into Skeletal Muscle via Adenoviruses. *Circulation Research*, 92: 1098-1106.
- Roskams, J. (Editor). Rodgers, L. (Editor). Lab Ref, Volume 1: A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench (Handbooks) [Spiral-bound]. 2002.
- Sariola, H. Frilander, M. Heino, T. Jernvall, J. Partanen, J. Sainio, K. Salminen, M. Thesleff, I. 2003. *Solusta yksilöksi*. Kehitysbiologia. Helsinki: Duodecim.
- Slack, J. 2001. *Essential Developmental Biology*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Sipilä, P. Luentomateriaali. GM-eläimet. Koe-eläinkurssi. 2012.
- Stratagene. 2004. *Introduction to Quantitative PCR, Methods and Applications Guide*.
- TRI Reagent® Solution Protocol (PN 9738M Rev D).
- Unsicker, K. and Kriegstein, K. 2006. *Cell Signaling and Growth Factors in Development. From Molecules to Organogenesis*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.

Wong, ML. and Medrano, JF. Real time PCR for RNA quantification. *BioTechniques* 39:___-___, 2005.

<www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome>. Verkkodokumentti. Luettu 15.1.2013.

Zhang, Y. 2012. Mechanism and function of epigenetic modifications. Verkkodokumentti. <<http://www.hhmi.org/research>>. Luettu 14.8.2012.

DNA:n eristys

- Genotyypitettävien sikiöiden hännistä otetaan näytepalat, jotka pakastetaan -0 °C 1,5 ml:n eppendorffputkissa.
- Kuhunkin eppendorffputkeen pipetoidaan 300 µl lyysauspuskuriä (ohje alla), johon on lisätty 4 µl Proteinaasi K:ta (Thermo Fisher), jonka jälkeen putket laiteetaan ravistelijaan 56 °C 800 rpm 1-2 tunniksi, kunnes näytepalat ovat täysin liuenneet puskuriin.
- Eppendorffputkiin pipetoidaan 90 µl ylikylläistä NaCl₂ – liuosta, sekoitetaan huolella ja sentrifugoidaan 45 min 14 000 rpm.
- Uusiin eppendorffputkiin pipetoidaan 500 µl jääkylmää 100 % etanolia ja jokaisesta näyteputkesta pipetoidaan omaan putkeen 320 µl supernatantista. Tämän jälkeen sentrifugoidaan 30 min 14000 rpm.
- Etanoli kaadetaan pois ja putkiin pipetoidaan 500 µl jääkylmää 70 % etanolia ja sentrifugoidaan 5 min 14 000 rpm.
- Etanoli kaadetaan pois ja loppu etanoli poistetaan pienellä pipetin kärjellä ja haihduttamalla.
- DNA-pelletti liuotetaan 45 µl steriiliä vettä (Nuclease free water, Amresco) naputtelemalla putkia kevyesti ja pitämällä niitä 30 min huoneenlämmössä.
- Säilytetään + 4 °C:ssa.

LYYSAUSPUSKURI (200 ml)

- 670 µl 3 M Tris-HCl pH 8,0
- 800 µl 0,5 M EDTA pH 8,0
- 80 ml 1M NaCl
- 10 ml 20 % SDS
- 108,53 ml H₂O (MQ)

PCR

- Näytteiden DNA:lle tehdään kaksi eri PCR:ää, jotta saadaan selville mitkä näytteistä ovat homotsygootteja, heterotsygootteja tai villityyppiä tutkitun geenin (Vsn1) suhteen.

VILIP KO PCR mix:

H₂O (MQ) 8,05 µl

5 x puskuri 2,5 µl

dNTP 2 mM 1,25 µl

SU fwd 20 pM 0,25 µl (Oligomer Oy)

LacZ rev 20 pM 0,25 µl (Oligomer Oy)

Phusion (Thermo Scientific) 0,2 µl kokonaistilavuus 12,5 µl/tuubi

Näytettä (DNA) 0,4 µl/tuubi

Ohjelma:

1. 5 min 98 °C

2. 10 s 98 °C

3. 30 s 66 °C

4. 30 s 72 °C

toistetaan vaiheet 2-4 30x

5. 4 s 72 °C

6. 4 °C

VILIP wt PCR mix:

H₂O (MQ) 13,7 µl

10 x puskuri 2 µl

dNTP 2mM 2 µl

Se2 0,5 µl (Oligomer Oy)

Anti1 0,5 µl (Oligomer Oy)

Dynazyme (Thermo Scientific) 0,3 µl kokonaistilavuus 19,0 µl/tuubi

Näytettä (DNA) 1,0 µl/tuubi

Ohjelma:

1. 4 min 98 °C
2. 30 s 98 °C
3. 30 s 60 °C
4. 3 min 45 s 68 °C toistetaan vaiheet 2-4 35x
5. 10 min 68 °C
6. 4 °C

- Agaroosigeeli 1,5 %
 - 1 x TAE 50 ml
 - 0,75 g Agaroosi (Bioline)
 - 10 µl etidium bromidi (Amresco)

RNA:N ERISTYS TRI Reagent solution (Applied Biosystems)

- Näytteinä jäädytetyt hiirten sikiöiden yläosat (kainaloista kaulaan) sydän mukaan lukien, paino noin 50 µg. Näytteet 1,5 µl eppendorffputkissa.
- Eppendorffputkiin pipetoidaan 1 ml TRI Reagent –liuosta, jonka jälkeen kudosta hajotetaan manuaalisesti muovisen tikun avulla ja pipetoidaan edestakaisin kunnes kudokset on täysin hajonnut ja liuos homogenisoitunut. Tämän jälkeen inkuboidaan huoneenlämmössä 5 min.
- Putkiin pipetoidaan 200 µl kloroformia ja vorteksoidaan 15 s.
- Putkia sentrifugoidaan 12 000 rcf 15 min +4 C°, jolloin liuoksesta erottuu kolme faasia.
- Kirkas faasi pipetoidaan uusiin eppendorffputkiin ja niihin lisätään 500 µl isopropanolia (2-propanol) ja vorteksoidaan 5-10 s. Inkuboidaan huoneenlämmössä 5-10 min.
- Sentrifugoidaan 12 000 rcf 8 min +4 C°, jonka jälkeen supernatantti kaadetaan varovasti pois. RNA muodostaa eppendorffputken pohjalle pelletin.
- Pipetoidaan putkiin 1 ml 75 % etanolia ja sekoitetaan kevyesti.
- Sentrifugoidaan 7 500 rcf 5 min +4 C°, jonka jälkeen etanoli kaadetaan pois. Putket sentrifugoidaan nopeasti pienellä sentrifuugilla, jonka jälkeen jäljelle jäänyt etanoli poistetaan mahdollisimman tarkasti pienellä pipetin kärjellä. Loppu etanoli poistetaan haihduttamalla 3-5 min huoneenlämmössä.
- Syntynyt RNA-pelletti liuotetaan 40 µl steriiliä vettä (Nuclease free water, Amresco) pipetoimalla edestakaisin ja inkuboimalla 10 min +65 C°.
- Näytteiden RNA-pitoisuus ja puhtaus mitataan Nanodropilla (Nanodrop 8000, Thermo Scientific).
- RNA säilytetään pakastimessa, -80 C°:ssa.

RNA:n PUHDISTAMINEN

- DNAasi
 - Pipetoidaan 10 µg kustakin näytteestä 0,5 ml eppendorffputkeen ja lisätään steriiliä vettä (Nuclease free water, Amresco) niin että tilavuudeksi tulee 8,5 µl.
 - Pipetoidaan putkiin 1 µl 10 x puskuria ja 0,5 µl DNase I – entsyymiä (Invitrogen)
 - Inkuboidaan +37 °C:ssa 1 h
- RNA Purification kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen, RNA cleanup)
 - Pipetoidaan DNAasilla käsiteltyihin eppendorffputkiin 90 µl steriiliä vettä, jolloin kokonaistilavuudeksi tulee 100 µl.
 - Lisätään 350 µl RLT -puskuria mihin on lisätty β-Mercaptoetanolia 10 µl/1 ml puskuria.
 - Lisätään 250 µl 96 % etanolia, sekoitetaan pipetoimalla edestakaisin.
 - Pipetoidaan liuokset (700 µl) RNeasy kolumneihin ja sentrifugoidaan 15 s 8000 rcf > +20 °C:ssa.
 - Siirretään kolumnit uusiin keräystuubeihin (2 ml) ja pipetoidaan kolumneihin 500 µl RPE -puskuria, mihin on lisätty 96 % etanolia 4 ml/ 1 ml puskuria. Sentrifugoidaan kuten edellä.
 - Läpätullut puskuri kaadetaan pois ja kolumniin pipetoidaan uudestaan 500 µl RPE –puskuria, sentrifugoidaan 2 min 8000 rcf > +20 °C:ssa.
 - Siirretään kolumnit uusiin keräystuubeihin (2 ml) ja sentrifugoidaan 1 min 14 000 rcf.
 - Siirretään kolumnit uusiin 1,5 ml eppendorffputkiin ja pipetoidaan suoraan kolumnien silica geelikalvojen päälle 30 µl steriiliä vettä. Sentrifugoidaan 1 min 8000 rcf.
 - Mitataan puhdistetut RNA-näytteet Nanodropin (Nanodrop 8000, Thermo Scientific) avulla.
 - Säilytetään -80 °C:ssa

KÄÄNTEISTRANSKRIPTAASI (Super Script® II Reverse transcriptase, Invitrogen)

- Pipetoidaan 0,5 ml eppendorftuubeihin 1- 1,5 µg puhdistettua RNA:ta ja lisätään steriiliä vettä niin että tilavuudeksi tulee 10 µl.
- Pipetoidaan tuubeihin 1 µl 50 ng/ µl alukesekoitusta ja 1 µl 10 mM dNTP, jonka jälkeen inkuboidaan 5 min 65 °C:ssa.
- Jäähdytetään tuubit jäällä ja lisätään 4 µl 5 x puskuria ja 2 µl 0,1 M DTT, sekoitetaan pipetoimalla edestakaisin ja inkuboidaan huoneenlämmössä 2 min.
- Lisätään 0,5 µl SuperScript II RT/ tuubi, sekoitetaan pipetoimalla ja sentrifugoidaan nopeasti. Inkuboidaan huoneenlämmössä 10 min, +42 °C:ssa 50 min ja 70 °C:ssa 15 min.
- Laimennetaan saatu cDNA 1:10 steriilillä vedellä ennen real time qpcr:ää.
- Säilytetään – 80 °C:ssa.

Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR (RT qPCR)

- ALUKKEET
 - Osa alukkeista saatiin artikkelista (Dicke ym., 2011) ja loput suunniteltiin NBCI:n alukkeiden suunnitteluohjelman avulla.
 - TBP, VSNL1, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-2, VEGFR-3, Nrp2, β -Actin ja Svegr-2 (TAG Copenhagen A/S), Ang1, Ang2, Tie1 ja Tie2 (Oligomer Oy)
 - Alukkeet testattiin todellisia näytteitä vastaavalla cDNA:lla (villityyppi) tekemällä PCR.
 - PCR Master Mix (Platinum®TaqPCRxDNAPolymerase, Invitrogen)
 - tehdään jäällä 0,5 ml eppendorffputkiin
 - Steriili H₂O 38 μ l
 - 10 x puskuri ilman MgCl₂ 5 μ l
 - 10 mM dNTP 1 μ l
 - 50 mM MgCl₂ 1,5 μ l
 - 10 μ M alukkeet rev + fwd 1 μ l + 1 μ l
 - Taq polymeraasi 0,5 μ l
 - templaatti DNA 2 μ l
 - Negatiivisina kontrolleina ”cDNA”, joka oli valmistettu ilman käänteistranskriptaasia sekä templaatin tilalla pelkkä vesi.
 - Ohjelma (Master cycler, Eppendorf):
 1. 2 min 94 °C
 2. 30 s 94 °C
 3. 30 s 55 °C
 4. 20 s 72 °C
 5. 4 °CToistetaan vaiheita 2-4 35x
 - Näytteistä pipetoidaan 15 μ l 1,5 % agarosigeelille ja ajetaan geeli.

- PCR MIX RT-PCR (FastStart SYBR Green Master, version 09, Roche)
 - Pipetoidaan jäällä 96-kuoppalevyllä (Biotop), suojataan valolta
 - Steriili H₂O 6 µl
 - Alukkeet 5 µM (fwd + rev) 1 µl + 1 µl
 - Master Mix 2 x conc 10 µl kokonaistilavuus 18 µl/kuoppa
 - Templaatti cDNA (laimennettu 1:10) 2 µl/ kuoppa
 - Sekoitetaan pipetoimalla edestakaisin
 - Peitetään kuoppalevy suojakalvolla, mikä tekee siitä ilmatiiviin ja sentrifugoidaan pikaisesti, jotta saadaan kaikki reagenssit kuoppien pohjalle.
 - Ajetaan näytteet real-time PCR –laitteella (Bio-Rad)
 - Ohjelma:
 1. 2 min 50 °C
 2. 10 min 95 °C
 3. 15 s 95 °C
 4. 30 s 55 °C
 5. 30 s 60 °C, levyn luku
 6. Sulamiskäyrä 54 °C:sta 95 °C:een, lisäys 0,5 °C, levyn lukuToistetaan vaiheita 3-5 35x
- Tulokset analysoidaan Bio-Rad CFX Manager 2.0 –ohjelman avulla.

PARAFIINILEIKKEET JA NIIDEN VÄRJÄYS

- Sikiöt valetaan parafiinimuotteihin pystyasennossa, jotta saadaan poikittaisia leikkeitä.
- Kun muotit ovat jäähtyneet, ne leikataan mikrotomilla 5-7 µm paksuisiksi viipa-leiksi, jotka siirretään varovasti objektilaseille ja kiinnitetään lämmön avulla. Laseja inkuboidaan yön yli +37 °C:ssa.

Immunofluoresenssi:

- Laseista valitaan halutusta kohdasta olevat leikkeet ja ne deparafinisoidaan seuraavasti:
 - 5 min xyleeni x 2
 - 5 min 100 % etanoli x 2
 - 5 min 70 % etanoli
 - 5 min 50 % etanoli
 - 5 min steriloitu H₂O x 2
- Lämmitetään mikrossa 0,01 M sitraattipuskuria n. 2 min jonka jälkeen objektilasit siirretään siihen ja lämmitetään ensin täydellä teholla kunnes puskuri kiehuu, jonka jälkeen pienellä teholla, yhteensä 10 min. Annetaan jäähtyä.
- Tehdään laseilla olevien näytteiden ympärille rasvatussilla ympyrät ja pestään lasit PBS:llä 2 x 5 min.
- Pipetoidaan tussiympyröihin 1:3 laimennettua blocking donkey seerumia niin että leikkeet peittyvät kokonaan ja inkuboidaan huoneenlämmössä 0,5 h kostean paperin päällä suljetussa laatikossa, niin että leikkeet eivät pääse kuivumaan.
- Pestään lasit 2 x PBS 5 min.
- Pipetoidaan tussiympyröihin primäärivasta-aineet n. 10–30 µl, niin että leikkeet peittyvät. Inkuboidaan joko 1 h huoneenlämmössä tai yön yli + 4 °C:ssa kostean paperin päällä laatikossa. Vasta-aineet laimennetaan 0,05 % PBS Tween :llä.
 - Prox 1 (goat) 1:50 (R&D Systems)
 - Lyve 1(rabbit) 1:1000 (R&D Systems)
 - Sma (mus) 1:400 (Promega)
 - Endomycin (rat)1:1000 (Hycult Biotech)
- Pestään lasit 3 x PBS 5 min.

- Pipetoidaan tussiympyröihin sekundäärivasta-aineet kuten primäärit ja inkuboidaan kuten edellä valolta suojattuna. Laimennetaan 1:300 0,05 % PBS Tween :llä
 - Eri ympyröihin riippuen primäärivasta-aineesta:
 - alexa fluor 488 α -goat (vihreä) (Invitrogen)
 - alexa fluor 563 α -mus (punainen) (Invitrogen)
 - alexa fluor 488 α -rat (vihreä) (Invitrogen)
 - alexa fluor 568 α -rabbit (punainen) (Invitrogen)
 - alexa fluor 488 α -rabbit (vihreä) (Invitrogen)
- Pestään lasit 3 x PBS 5 min.
- Pudotetaan lasien päälle pari pisaraa peitinainetta (Vectashield DAPI, Vector Laboratories) ja asetetaan peitinlasi varovasti päälle, suojataan valolta niin paljon kuin mahdollista pitämällä foliota lasien päällä.
- Kuvataan lasit fluoresenssimikroskooppiin liitetyllä kameralla. (Zeiss Axioplan II microscope).

Immunohistokemia:

- Deparafinisointi kuten immunofluoresenssissa.
- Inkuboidaan 10 min 3 % H₂O₂, huuhdellaan MQ-vedellä.
- Jatketaan kuten immunofluoresenssilasien kanssa sitraattipuskuri, pesut, tussi sekä blokkaukset ja pesut.
- Pipetoidaan primäärivasta-ainetta VILIP1 10–25 μ l/ ympyrä.
- Inkuboidaan yön yli +4 °C:ssa kostean paperin päällä laatikossa.
- Pestään lasit 2 x PBSTween 0,05 % 5 min ja 1 x PBS 5 min.
- Pipetoidaan ympyröihin sekundaarivasta-aine α -rabbit HRP (ImmPRESS™ REAGENT KIT peroxidase, Vector laboratories).
- Inkuboidaan huoneenlämmössä noin 40 min.
- Pestään lasit 2 x PBSTween 0,05 % 5 min ja 1 x PBS 5 min.
- Sekoitetaan eppendorf-putkessa 1 ml H₂O, 45 μ l DAB A ja 45 μ l DAB B (Immuno Vision Technologies). Seoksen annetaan vaikuttaa 2-10 min samalla seuraten värinmuodostusta mikroskoopin alla.
- Huuhdellaan juoksevalla vedellä 10 min.

- Laitetaan leikkeiden päälle pari pisaraa peitinainetta (Polyvinyl alcohol mounting medium with DABCO®, Sigma-Aldrich). Asetetaan peitinlasi päälle.
- Kuvataan lasit fluoresenssimikroskooppiin liitetyllä kameralla.(Zeiss Axioplan II microscope).

Alukkeet

PCR: (Oligomer)

vilip anti1 (wt fwd) 5'-TAG AGC TGC TGG AAC TCC TC-3' Tm 59,4 °C

vilip1 se2 (wt rev) 5'-GCT CCC ATA TAC CTA ACA TG-3' Tm 55,3 °C

SU (vilip ko fwd) 5'-CAG GAA CAA TAG CTG TCT GG-3' Tm 57,3 °C

LacZ (vilip ko rev) 5'-GCT GGC TTG GTC TGT CTG TCC TA-3' Tm 64,2 °C

RT qPCR: (Oligomer)

Ang1 fw 5'-CAT TCT TCG CTG CCA TTC TG-3' Tm 57,3 °C

Ang1 rev 5'-GCA TGC CCA TGT TGA ATC-3' Tm 57,9 °C

Ang2 fw 5'-TTA GCA CAA AGG ATT CGG ACA AT-3' Tm 57,1 °C

Ang2 rev 5'-TTT TGT GGG TAG TAC TGT CCA TTC A-3' Tm 59,7 °C

Tie1 fw 5'-CAA GGT CAC ACA CAC GGT GAA-3' Tm 59,8 °C

Tie1 rev 5'-GCC AGT CTA GGG TAT TGA AGT AGG A-3' Tm 63,0 °C

Tie2 fw 5'-ATG TGG AAG TCG AGA GGC GAT-3' Tm 59,8 °C

Tie2 rev 5'-CGA ATA GCC ATC CAC TAT TGT CC-3' Tm 60,6 °C

TAG Copenhagen A/S:

Beta-actin fw 5'-ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG AAA A-3' Tm 63,0 °C

Beta-actin rev 5'-TAC GGC CAG AGG CGT ACA GGG ATA G-3' Tm 67,9 °C

Nrp2 fw 5'- TCA GGT AGA CCT GGG GAC AC-3' Tm 61,4 °C

Nrp2 rev 5'-TCC CAG TCC TTG CCA TTT AG-3' Tm 57,3 °C

sVEGFR-2 fw 5'-CAC CAG TTTGCA AGA ACT TGG ATG CT-3' Tm 63,2 °C

sVEGFR-2 rev 5'-CAA TTC TGT CAC CCA GGG ATG C-3' Tm 62,1 °C

TBP fw 5'-TGC ACA GGA GCC AAG AGT GAA-3' Tm 59,8 °C

TBP rev 5'-CAC ATC ACA GCT CCC CAC CA-3' Tm 61,4 °C

VEGF-C fw 5'-TGT GTC CAG CGT AGA TGA GC-3' Tm 59,4 °C

VEGF-C rev 5'-TCC CCT GTC CTG GTA TTG AG-3' Tm 59,4 °C

VEGF-D fw 5'-GTG CAA GTA GAA AGC CAG CC-3' Tm 59,4 °C

VEGF-D rev 5'-CAA GGG TTC TCC TGG CTG TA-3' Tm 59,4 °C

VEGFR-2 fw 5'-ACC ATT GAA GTG ACT TGC CC-3' Tm 57,3 °C

VEGFR-2 rev 5'-CCG GTT CCC ATC TCT CAG TA-3' Tm 59,4 °C

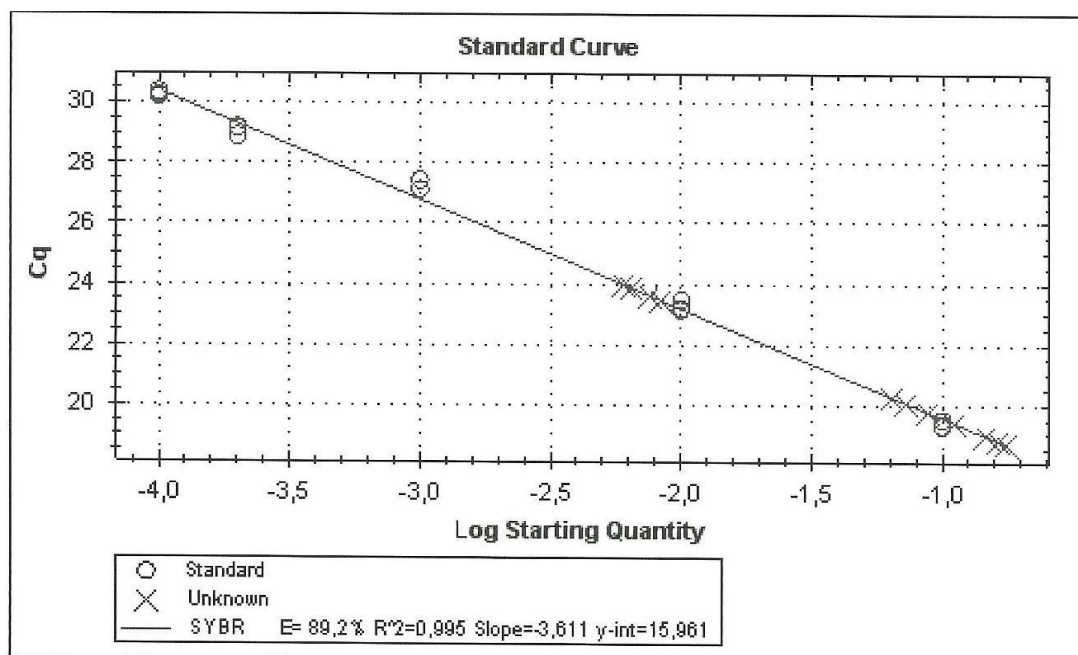
VEGFR-3 fw 5'-ACG CTG ATG ATA GTC CAC CC-3' Tm 59,4 °C

VEGFR-3 rev 5'-CTT CAT CCT GGA AGA GCC TG-3' Tm 59,4 °C

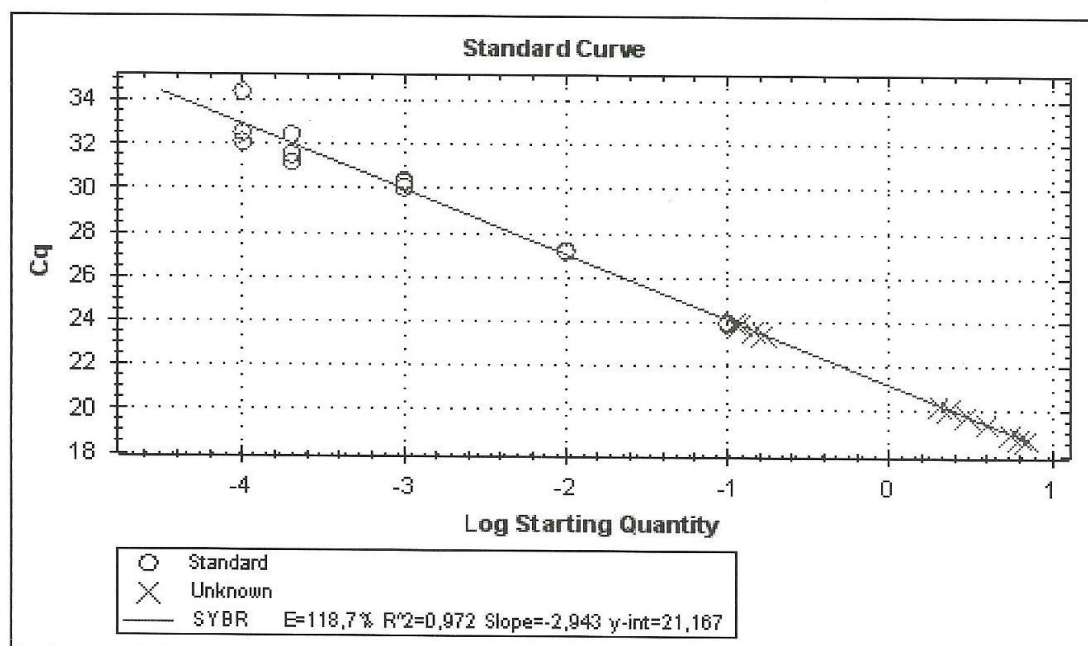
VSNL1 fw 5'-AGA TTC ACC CGA GCG TGT TG-3' Tm 59,4 °C

VSNL1 rev 5'-GCT AAA CCG TCT CTG CGA GT-3' Tm 59,4 °C

Bio-Rad CFX Mnager 2.0 Esimerkki tulosdatasta (PDF)



Beta-actin 1:10, 1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10000



TBP 1:10, 1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10000

Kuva 38. Standardisuorat; cDNA-laimennokset 1:10, 1:100, 1:1000, 1:5000 ja 1:10000

29.04.13.pcrd

30.8.2013 13:46

Report Information

User: BioRad/admin
 Data File Name: Angio with 6 primers and beta-actin +TBP 29.04.13.pcrd
 Data File Path: E:\Results\Reports\Tuloksia Biorad
 Well Group Name: All Wells
 Report Differs from Last Save: No

Run Setup

Run Information

Run User: admin
 Run Date: 29.4.2013 11:21
 ID:
 Notes:
 Sample Volume: 20
 Temperature Control Mode: Calculated
 Lid Temperature: 105
 Base Serial Number: CT004512
 Optical Head Serial Number: 785BR8542

Protocol

1: 50,0°C for 2:00
 2: 95,0°C for 10:00
 3: 95,0°C for 0:15
 4: 55,0°C for 0:30
 5: 60,0°C for 0:30
 Plate Read
 6: GOTO 3, 35 more times
 7: Melt Curve 54,0°C to 95,0°C : Increment 0,5°C 0:05
 Plate Read

Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk-1 TIE1 wt	Unk-1 TIE1 wt	Unk-1 TIE1 wt	Unk-2 TIE1 het	Unk-2 TIE1 het	Unk-2 TIE1 het	Unk-3 TIE1 ko	Unk-3 TIE1 ko	Unk-3 TIE1 ko	NTC Beta-actin	*Unk SYBR	*Unk SYBR
B	Unk-4 TIE2 wt	Unk-4 TIE2 wt	Unk-4 TIE2 wt	Unk-5 TIE2 het	Unk-5 TIE2 het	Unk-5 TIE2 het	Unk-6 TIE2 ko	Unk-6 TIE2 ko	Unk-6 TIE2 ko	NTC Beta-actin	*Unk SYBR	*Unk SYBR
C	Unk-7 ANG1 wt	Unk-7 ANG1 wt	Unk-7 ANG1 wt	Unk-8 ANG1 het	Unk-8 ANG1 het	Unk-8 ANG1 het	Unk-9 ANG1 ko	Unk-9 ANG1 ko	Unk-9 ANG1 ko	*Unk SYBR	*Unk SYBR	*Unk SYBR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	Unk-10 ANG2 wt	Unk-10 ANG2 wt	Unk-10 ANG2 wt	Unk-11 ANG2 het	Unk-11 ANG2 het	Unk-11 ANG2 het	Unk-12 ANG2 ko	Unk-12 ANG2 ko	Unk-12 ANG2 ko	*Unk SYBR	*Unk SYBR	*Unk SYBR
E	Unk-13 VEGF-C wt	Unk-13 VEGF-C wt	Unk-13 VEGF-C wt	Unk-14 VEGF-C het	Unk-14 VEGF-C het	Unk-14 VEGF-C het	Unk-15 VEGF-C ko	Unk-15 VEGF-C ko	Unk-15 VEGF-C ko	*Unk SYBR	*Unk SYBR	*Unk SYBR
F	Unk-16 VEGF-D wt	Unk-16 VEGF-D wt	Unk-16 VEGF-D wt	Unk-17 VEGF-D het	Unk-17 VEGF-D het	Unk-17 VEGF-D het	Unk-18 VEGF-D ko	Unk-18 VEGF-D ko	Unk-18 VEGF-D ko	*Unk SYBR	*Unk SYBR	*Unk SYBR
G	Unk-19 TBP wt	Unk-19 TBP wt	Unk-19 TBP wt	Unk-20 TBP het	Unk-20 TBP het	Unk-20 TBP het	Unk-21 TBP ko	Unk-21 TBP ko	Unk-21 TBP ko	*Unk SYBR	*Unk SYBR	*Unk SYBR
H	Unk-22 Beta-actin wt	Unk-22 Beta-actin wt	*Unk-22 Beta-actin wt	Unk-23 Beta-actin het	Unk-23 Beta-actin het	Unk-23 Beta-actin het	Unk-24 Beta-actin ko	Unk-24 Beta-actin ko	Unk-24 Beta-actin ko	*Unk SYBR	*Unk SYBR	*Unk SYBR

Quantification

Step #: 5

Analysis Mode: Fluorophore

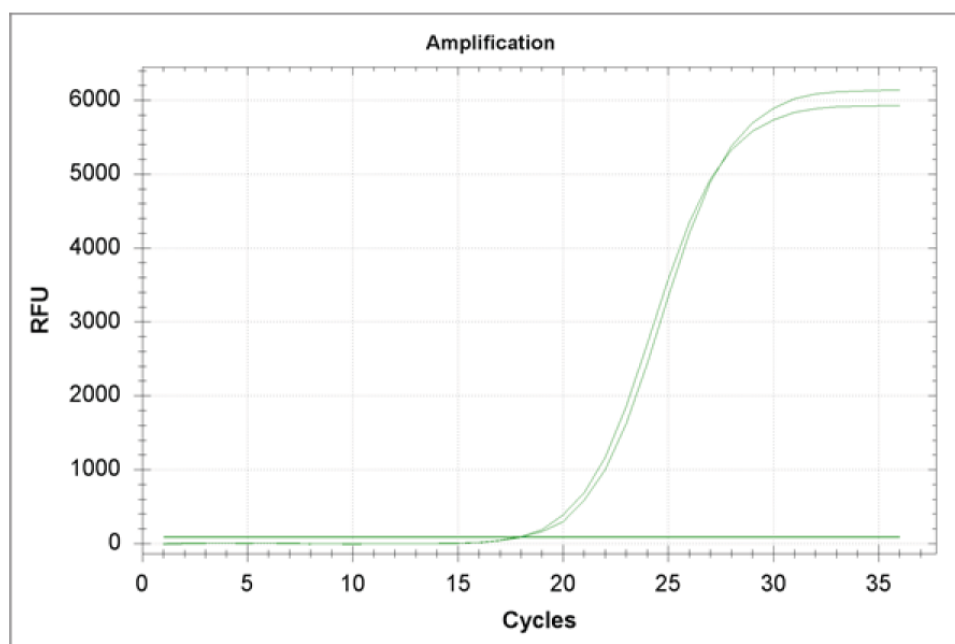
Cq Determination: Single Threshold

Baseline Method:

SYBR: Auto Calculated

Threshold Setting:

SYBR: 89,61, User Defined



Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A01	SYBR	TIE1	Unkn-01	wt	23,19	23,20	0,074

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
A02	SYBR	TIE1	Unkn-01	wt	23,13	23,20	0,074
A03	SYBR	TIE1	Unkn-01	wt	23,28	23,20	0,074
A04	SYBR	TIE1	Unkn-02	het	23,05	22,91	0,140
A05	SYBR	TIE1	Unkn-02	het	22,77	22,91	0,140
A06	SYBR	TIE1	Unkn-02	het	22,91	22,91	0,140
A07	SYBR	TIE1	Unkn-03	ko	23,16	23,29	0,118
A08	SYBR	TIE1	Unkn-03	ko	23,34	23,29	0,118
A09	SYBR	TIE1	Unkn-03	ko	23,37	23,29	0,118
A10	SYBR	Beta-actin	NTC		N/A	0,00	0,000
B01	SYBR	TIE2	Unkn-04	wt	23,21	23,25	0,059
B02	SYBR	TIE2	Unkn-04	wt	23,32	23,25	0,059
B03	SYBR	TIE2	Unkn-04	wt	23,23	23,25	0,059
B04	SYBR	TIE2	Unkn-05	het	23,23	23,18	0,062
B05	SYBR	TIE2	Unkn-05	het	23,19	23,18	0,062
B06	SYBR	TIE2	Unkn-05	het	23,11	23,18	0,062
B07	SYBR	TIE2	Unkn-06	ko	23,51	23,41	0,089
B08	SYBR	TIE2	Unkn-06	ko	23,39	23,41	0,089
B09	SYBR	TIE2	Unkn-06	ko	23,34	23,41	0,089
B10	SYBR	Beta-actin	NTC		N/A	0,00	0,000
C01	SYBR	ANG1	Unkn-07	wt	24,03	24,03	0,041
C02	SYBR	ANG1	Unkn-07	wt	24,07	24,03	0,041
C03	SYBR	ANG1	Unkn-07	wt	23,98	24,03	0,041
C04	SYBR	ANG1	Unkn-08	het	23,74	23,75	0,022
C05	SYBR	ANG1	Unkn-08	het	23,78	23,75	0,022
C06	SYBR	ANG1	Unkn-08	het	23,74	23,75	0,022
C07	SYBR	ANG1	Unkn-09	ko	24,20	24,18	0,039
C08	SYBR	ANG1	Unkn-09	ko	24,21	24,18	0,039
C09	SYBR	ANG1	Unkn-09	ko	24,14	24,18	0,039
D01	SYBR	ANG2	Unkn-10	wt	28,03	27,83	0,191
D02	SYBR	ANG2	Unkn-10	wt	27,65	27,83	0,191
D03	SYBR	ANG2	Unkn-10	wt	27,80	27,83	0,191
D04	SYBR	ANG2	Unkn-11	het	27,20	27,18	0,020
D05	SYBR	ANG2	Unkn-11	het	27,16	27,18	0,020
D06	SYBR	ANG2	Unkn-11	het	27,17	27,18	0,020
D07	SYBR	ANG2	Unkn-12	ko	27,70	27,60	0,085
D08	SYBR	ANG2	Unkn-12	ko	27,56	27,60	0,085
D09	SYBR	ANG2	Unkn-12	ko	27,55	27,60	0,085
E01	SYBR	VEGF-C	Unkn-13	wt	25,12	25,17	0,087
E02	SYBR	VEGF-C	Unkn-13	wt	25,28	25,17	0,087
E03	SYBR	VEGF-C	Unkn-13	wt	25,13	25,17	0,087
E04	SYBR	VEGF-C	Unkn-14	het	25,31	25,27	0,030
E05	SYBR	VEGF-C	Unkn-14	het	25,26	25,27	0,030
E06	SYBR	VEGF-C	Unkn-14	het	25,25	25,27	0,030
E07	SYBR	VEGF-C	Unkn-15	ko	25,29	25,38	0,079
E08	SYBR	VEGF-C	Unkn-15	ko	25,41	25,38	0,079
E09	SYBR	VEGF-C	Unkn-15	ko	25,44	25,38	0,079
F01	SYBR	VEGF-D	Unkn-16	wt	28,88	28,82	0,144
F02	SYBR	VEGF-D	Unkn-16	wt	28,93	28,82	0,144
F03	SYBR	VEGF-D	Unkn-16	wt	28,66	28,82	0,144

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev
F04	SYBR	VEGF-D	Unkn-17	het	28,75	28,67	0,088
F05	SYBR	VEGF-D	Unkn-17	het	28,57	28,67	0,088
F06	SYBR	VEGF-D	Unkn-17	het	28,68	28,67	0,088
F07	SYBR	VEGF-D	Unkn-18	ko	28,65	28,61	0,047
F08	SYBR	VEGF-D	Unkn-18	ko	28,62	28,61	0,047
F09	SYBR	VEGF-D	Unkn-18	ko	28,56	28,61	0,047
G01	SYBR	TBP	Unkn-19	wt	22,69	22,65	0,032
G02	SYBR	TBP	Unkn-19	wt	22,64	22,65	0,032
G03	SYBR	TBP	Unkn-19	wt	22,63	22,65	0,032
G04	SYBR	TBP	Unkn-20	het	22,15	22,26	0,099
G05	SYBR	TBP	Unkn-20	het	22,33	22,26	0,099
G06	SYBR	TBP	Unkn-20	het	22,30	22,26	0,099
G07	SYBR	TBP	Unkn-21	ko	22,85	22,95	0,093
G08	SYBR	TBP	Unkn-21	ko	22,96	22,95	0,093
G09	SYBR	TBP	Unkn-21	ko	23,04	22,95	0,093
H01	SYBR	Beta-actin	Unkn-22	wt	17,89	17,97	0,118
H02	SYBR	Beta-actin	Unkn-22	wt	18,05	17,97	0,118
H04	SYBR	Beta-actin	Unkn-23	het	17,74	17,59	0,136
H05	SYBR	Beta-actin	Unkn-23	het	17,53	17,59	0,136
H06	SYBR	Beta-actin	Unkn-23	het	17,49	17,59	0,136
H07	SYBR	Beta-actin	Unkn-24	ko	18,20	18,23	0,116
H08	SYBR	Beta-actin	Unkn-24	ko	18,35	18,23	0,116
H09	SYBR	Beta-actin	Unkn-24	ko	18,13	18,23	0,116

Gene Expression

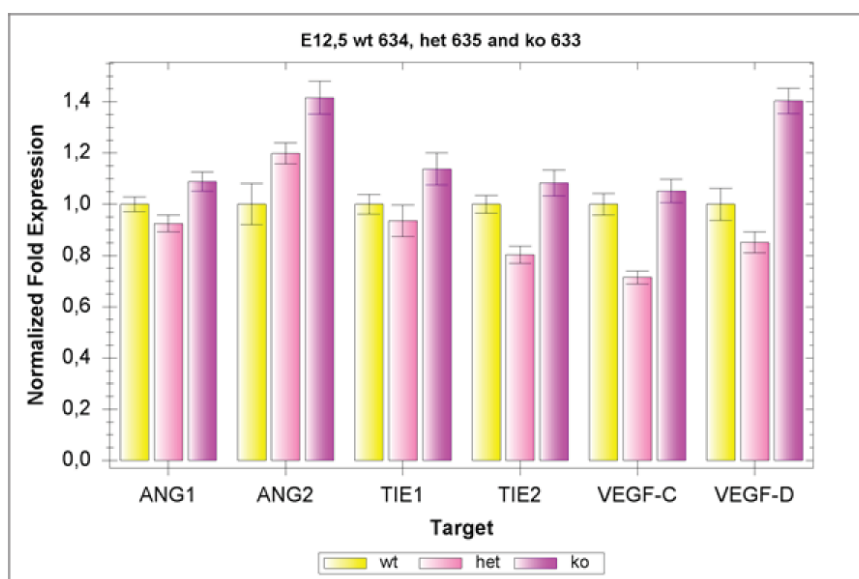
Analysis Parameters

Analysis Mode: Normalized expression ($\Delta\Delta Cq$)

Chart Data: Relative to zero

Scaling options:

Chart Error: $\pm 1,0$ SEMs



Sample Names

Name	Full Name	Control
wt	wt	Yes
het	het	No
ko	ko	No

Gene Expression Data

Data Set	Target	Sample	Relative Quantity	Relative Quantity SD	Corrected Relative Quantity	Corrected Relative Quantity SEM	Unscaled Expression	Unscaled Expression SD	Corrected Unscaled Expression	Corrected Unscaled Expression SEM	Expression	Expression SD	Corrected Expression	Corrected Expression SD	Expression SEM	Corrected Expression SEM	W	M	C	C
1-SY BR	ANG1	het	1,21043	0,01855	0,01855	0,01071	0,92504	0,05576	0,05576	0,03220	0,03220	0,92504	0,05576	0,05576	0,03220	0,03220	3	2	0,02177	0,01277
1-SY BR	ANG1	ko	0,89796	0,02454	0,02454	0,01417	1,08855	0,06348	0,06348	0,03665	0,03665	1,08855	0,06348	0,06348	0,03665	0,03665	3	2	0,03138	0,02276
1-SY BR	ANG1	wt*	1,00000	0,02846	0,02846	0,01643	1,00000	0,05099	0,05099	0,02944	0,02944	1,00000	0,05099	0,05099	0,02944	0,02944	3	2	0,04033	0,02371
1-SY BR	ANG2	het	1,56838	0,02162	0,02162	0,01248	1,19859	0,07181	0,07181	0,04146	0,04146	1,19859	0,07181	0,07181	0,04146	0,04146	3	2	0,01198	0,01148
1-SY BR	ANG2	ko	1,16806	0,06846	0,06846	0,03953	1,41598	0,11049	0,11049	0,06379	0,06379	1,41598	0,11049	0,11049	0,06379	0,06379	3	2	0,06660	0,04882
1-SY BR	ANG2	wt*	1,00000	0,13246	0,13246	0,07648	1,00000	0,13905	0,13905	0,08028	0,08028	1,00000	0,13905	0,13905	0,08028	0,08028	3	2	0,08803	0,11033

Data Set	Target	Sample	Relative Quantity	Relative Quantity SD	Corrected Relative Quantity SD	Relative Quantity SEM	Corrected Relative Quantity SEM	Unscaled Expression	Unscaled Expression SD	Corrected Unscaled Expression SD	Unscaled Expression SEM	Corrected Unscaled Expression SEM	Expression	Expression SD	Corrected Expression SD	Expression SEM	Corrected Expression SEM	Wavelength	Cq	Cq SEM
1-SY BR	Beta-actin	het	1.30389	0.12299	0.12299	0.07101	0.07101	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	317.59	0.13608	0.07857
1-SY BR	Beta-actin	ko	0.83699	0.06716	0.06716	0.03877	0.03877	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	318.23	0.11576	0.06683
1-SY BR	Beta-actin	wt	1.00000	0.08163	0.08163	0.05772	0.05772	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	217.97	0.11779	0.08327
1-SY BR	TBP	het	1.31317	0.09002	0.09002	0.05197	0.05197	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	322.6	0.09892	0.05710
1-SY BR	TBP	ko	0.81301	0.05254	0.05254	0.03034	0.03034	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	322.95	0.09394	0.05383
1-SY BR	TBP	wt	1.00000	0.02224	0.02224	0.01284	0.01284	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	322.65	0.03206	0.01853
1-SY BR	TIE1	het	1.22369	0.11889	0.11889	0.06864	0.06864	0.93517	0.10596	0.10596	0.06118	0.06118	0.93517	0.10596	0.10596	0.06118	0.06118	322.91	0.14017	0.08093
1-SY BR	TIE1	ko	0.93872	0.07666	0.07666	0.04426	0.04426	1.13796	0.10987	0.10987	0.06343	0.06343	1.13796	0.10987	0.10987	0.06343	0.06343	323.9	0.11781	0.06802
1-SY BR	TIE1	wt	1.00000	0.05121	0.05121	0.02957	0.02957	1.00000	0.06642	0.06642	0.03835	0.03835	1.00000	0.06642	0.06642	0.03835	0.03835	323.0	0.07382	0.04266
1-SY BR	TIE2	het	1.05156	0.04524	0.04524	0.02612	0.02612	0.80362	0.05823	0.05823	0.03362	0.03362	0.80362	0.05823	0.05823	0.03362	0.03362	323.18	0.06201	0.03584
1-SY BR	TIE2	ko	0.89356	0.05530	0.05530	0.03193	0.03193	1.08321	0.08722	0.08722	0.05036	0.05036	1.08321	0.08722	0.08722	0.05036	0.05036	323.41	0.08924	0.05155

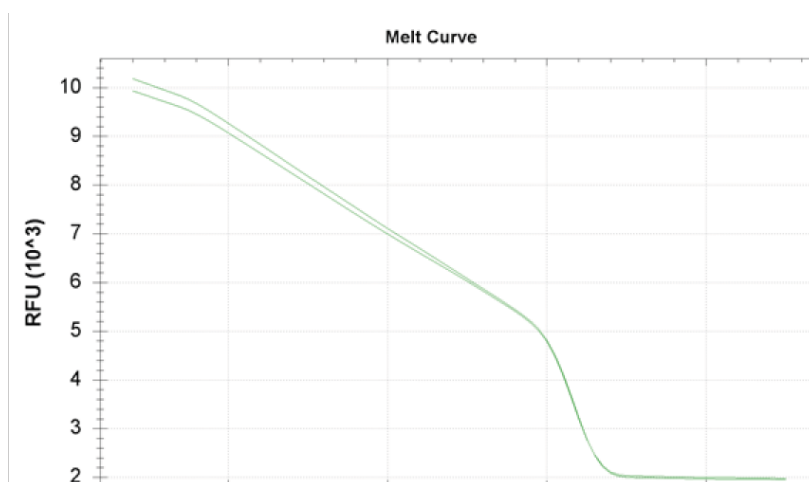
Data Set	Target	Sample	Relative Quantity	Relative Quantity SD	Corrected Relative Quantity SD	Relative Quantity SEM	Corrected Relative Quantity SEM	Unscaled Expression	Unscaled Expression SD	Corrected Unscaled Expression SD	Unscaled Expression SEM	Corrected Unscaled Expression SEM	Expression	Expression SD	Corrected Expression SD	Expression SEM	Corrected Expression SEM	Weight	Quality	Quantity	SEM
1-SY BR	TIE2	wt	1,0000	0,04110	0,0410	0,02373	0,02373	1,0000	0,05898	0,05898	0,03405	0,03405	1,0000	0,05898	0,05898	0,03405	0,03405	32	0,059293	0,03423	
1-SY BR	VEG F-C	height	0,93519	0,01913	0,01913	0,01105	0,01105	0,71469	0,04416	0,04416	0,02549	0,02549	0,71469	0,04416	0,04416	0,02549	0,02549	32	0,029514	0,01704	
1-SY BR	VEG F-C	ko	0,86755	0,04749	0,04749	0,02742	0,02742	1,05168	0,07905	0,07905	0,04564	0,04564	1,05168	0,07905	0,07905	0,04564	0,04564	32	0,078937	0,04560	
1-SY BR	VEG F-C	wt	1,0000	0,06046	0,06046	0,03491	0,03491	1,0000	0,07379	0,07379	0,04260	0,04260	1,0000	0,07379	0,07379	0,04260	0,04260	32	0,057212	0,03036	
1-SY BR	VEG F-D	height	1,11394	0,06826	0,06826	0,03941	0,03941	0,85130	0,07200	0,07200	0,04157	0,04157	0,85130	0,07200	0,07200	0,04157	0,04157	32	0,08604	0,05104	
1-SY BR	VEG F-D	ko	1,15780	0,03759	0,03759	0,02170	0,02170	1,40354	0,08546	0,08546	0,04934	0,04934	1,40354	0,08546	0,08546	0,04934	0,04934	32	0,046844	0,02704	
1-SY BR	VEG F-D	wt	1,0000	0,09994	0,09994	0,05770	0,05770	1,0000	0,10853	0,10853	0,06266	0,06266	1,0000	0,10853	0,10853	0,06266	0,06266	32	0,081495	0,05325	

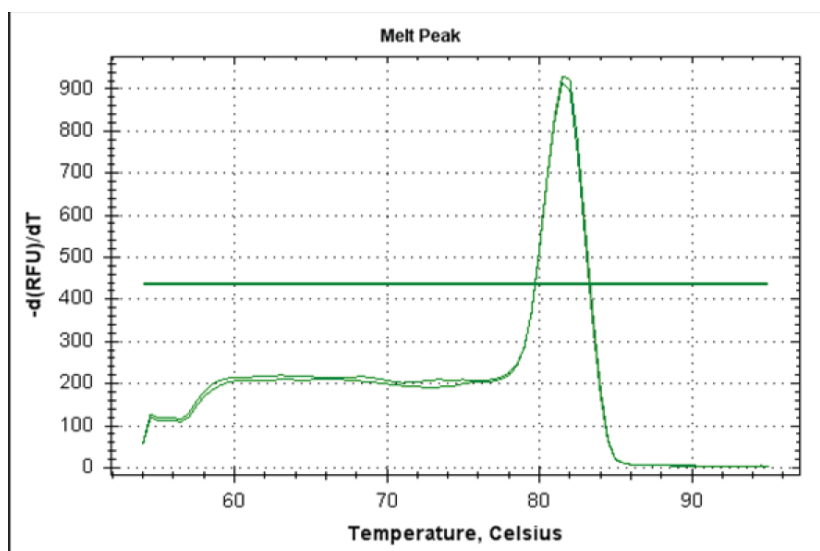
Target Stability

Target	Coefficient Variance	M-Value
TBP	0,0096	0,0276
Beta-actin	0,0096	0,0276

Average Coefficient Variance: : 0,0096

Average M-Value: : 0,0276





Melt Curve Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Melt Temp
H01	SYBR	Beta-actin	Unkn-22	wt	81,50
H02	SYBR	Beta-actin	Unkn-22	wt	81,50

End Point

Fluorophore/Target: SYBR

End Cycles to Average: 5

Mode: Percentage of Range - 10

Lowest RFU Value: -2,68

Highest RFU Value: 6775

Cut Off Value:

Well	Fluor	Content	Sample	End RFU	Call
H01	SYBR	Unkn-22	wt	5915	
H02	SYBR	Unkn-22	wt	6119	

QC Parameters

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Negative control with a Cq less than	38	True		False	
NTC with a Cq less than	38	True		False	
NRT with a Cq less than	38	True		False	
Positive control with a Cq greater than	30	True		False	
Unknown without a Cq	N/A	True		False	

Description	Value	Use	Results	Exclude Wells	All excluded wells
Standard without a Cq	N/A	True		False	
Efficiency greater than	110,0	True			
Efficiency less than	90,0	True			
Std Curve R ² less than	0,980	True			
Replicate group Cq Std Dev greater than	0,20	True		False	

