

**Embigiinin tehtävien kartoitus siRNA-hiljennyksen avulla -
munuaisten sekä putkimaisten rakenteiden kehitys**

Pro Gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Molekulaarisen solubiologian tutkinto-ohjelma (FM)

2021

Roni Leppäkoski

TURUN YLIOPISTO
Bioteknologian laitos

LEPPÄKOSKI RONI: Embigiinin tehtävien kartoitus siRNA-hiljennyksen avulla - munuaisten sekä putkimaisten rakenteiden kehitys

Pro gradu -tutkielma, 58 s.

Molekulaarinen solubiologia

toukokuu 2021

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Embigiini (GP70) on transmembraaninen glykoproteiini. Embigiiniä on löydetty kiveksistä, lisäkiveksistä, munuaisista, ihosta sekä keuhkoista. Hiirillä embigiiniä ilmenee alkionkehityksen aikana paljon ja iän myötä sen ilmentyminen vähenee, joten se on oletettavasti alkionkehityksessä tärkeä proteiini. On myös huomattu, että se edistää solusta soluväliaineeseen tapahtuvaa vuorovaikutusta. Tiedetään, että se toimii avustavana proteiinina monokarboakylaattitransportteri-2:lle (MCT2) ja uusia biologisia prosesseja, joihin embigiini vaikuttaa, selvitetään tässä tutkimuksessa. Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää, miten embigiinin hiljennys vaikuttaa solun geeniekspressioprofiiliin sekä tutkia proliferaatiokokeilla hiljennyksen vaikutusta solujen kykyyn jakautua erilaisilla pinnoilla.

Tässä työssä embigiiniä hiljennettiin kahdella eri siRNA:lla hiiren IMBCA keratinosyyteistä. Hiljennyksien annettiin vaikuttaa 48 h jonka jälkeen solujen RNA eristettiin. Hiljennyksien onnistuminen tarkistettiin western blotilla. RNA-näytteet sekvensoitiin uuden sukupolven sekvensointimenetelmällä. Sekvensointidata analysoitiin kolmella eri geenirikastusohjelmalla. Hiljennettyjen solujen jakautumista seurattiin myös eri pinnoilla. Kuoppalevyt päällystettiin poly-l-lysiinillä, fibronektiinillä tai annettiin kasvaa käsittelemättömällä muovipinnalla. Solujen määrä mitattiin 450 nm absorbanssissa hiljennyksen jälkeen 48 h, 72 h ja 96 h aikapisteissä. Mittaus perustuu elävien solujen määrään kuopissa.

Geeninrikastusanalyseistä huomattiin munuaisten kehityksen sekä urogenitaalijärjestelmän kehityksen geenien rikastuneen hiljennyksen vuoksi. Myös muita huomionarvoisia rikastuneita biologisia prosesseja olivat esimerkiksi putkimaisten rakenteiden kehitys, verisuonirakenteiden kehitys, migraatio ja solun lokalisatio. Proliferaatiokokeessa havaittiin hiljennyksen vaikutuksen lakkaavan 72 h hiljennyksen jälkeen. Hiljennettyjen solujen jakautuminen ja kasvu fibronektiinipinnalla oli hitaampaa kuin kontrollisolujen, mikä tukee havaintoa siitä, että embigiini edistää solunjakautumista.

Asiasanat: embigiini, RNA-interferenssi, RNA-sekvensointi, proliferaatio, alkionkehitys

Sisällys

1. Hiiren alkionkehityksen pääpiirteet	6
1.1. Hiiren munuaisten kehitys.....	7
1.1.1. Pronefros toimii pohjana metanefrokselle	8
1.1.2. Mesonefroksesta muodostuu uretersilmu ja metanefriininen mesenkyymi	8
1.1.3. Metanefroksesta muodostuu lopulta toiminnalliset munuaiset.....	10
1.2. Hiiren urogenitaalijärjestelmän kehitys	10
1.2.1. Wolffin tiehyt muodostavat uroksilla lisääntymiselinten rakenteet.....	11
1.2.2. Müllerin tiehyistä muodostuu naarailta lisääntymiselinten rakenteet	11
2. Basigiini, neuroplastiini ja embigiini kuuluvat IgSF-superperheeseen	12
2.1. Basigiini on tärkeä proteiini verkkokalvon kehitykselle	14
2.2. Neuroplastiini osallistuu hermoston kehitykseen.....	14
2.3. Embigiini on tärkeä proteiini hiiren alkionkehityksessä.....	15
3. Embigiinin tehtävät	16
3.1. Embigiinin arvellaan olevan osana soluvälitteisessä adheesiossa	16
3.2. Embigiini on MCT2:n avustava proteiini	16
3.3. Embigiiniä on löydetty hermo-lihasliitoksista ja se saattaa edistää niiden muodostumista	18
3.4. Embigiini saattaa liittyä hematopoieesin säätelyyn.....	19
3.5. Embigiini syövissä	19
3.5.1. Embigiini saattaa vaimentaa rintasyövän etenemistä ja tuumorinmuodostusta.....	19
3.5.2. Embigiini yhdessä MCT2:n kanssa saattaa edistää haimasyövän etenemistä	20
3.5.3. Embigiini saattaa vaikuttaa edistävästi eturauhassyövän etenemiseen S100A:n kautta.....	21
4. Työn tavoitteet	23
5. Materiaalit ja menetelmät	24
5.1. Embigiinin hiljennyksessä käytetyt solut ja hiljennys siLentFectillä	24
5.2. Hiljennyksien onnistumisen tarkastus western blotilla	25
5.3. Proliferaatiokoe	25
5.3.1. Solujen valmistelu ja kuoppalevyjen päällystys	25
5.3.2. Absorbanssimittaukset ja western blot -näytteet	26

5.4.	RNA:n sekvensointi ja rikastusanalyysit	26
5.4.1.	Western blotit ja RNA:n eristys soluista	26
5.4.2.	Chipster ja datan suodatus Excelissä	27
5.4.3.	Geenirikastusanalyysit	28
5.4.4.	Tilastollinen analysointi.....	29
6.	Tulokset	30
6.1.	Embigiini saattaa vaikuttaa munuaisten sekä urogenitaalialueiden kehitykseen	30
6.1.1.	Embigiinin hiljennys onnistui Western blottien mukaan	30
6.1.2.	RNA-näytteiden laatu tarkistettiin ja lähetettiin sekvensoitaviksi	33
6.1.3.	RNA-näytteiden sekvensointi NGS-menetelmällä	33
6.1.4.	Sekvensointidatan laadunvarmistus sekä suodatuksen oikeellisuuden varmistus.....	34
6.1.5.	Geenirikastusanalyseistä huomattiin munuaisten kehityksen sekä urogenitaalijärjestelmän kehityksen geenien rikastuneen hiljennyksen vuoksi.....	37
6.1.6.	Embigiinin hiljennys vaikuttaa monen eri biologisen prosessin geeniosuuksiin 39	
6.1.7.	Munuaisten kehityksen geenien suurimmat muutokset ovat putkimaisten rakenteiden kehityksen geneeissä.....	41
6.2.	Proliferaatiokokeen tulokset	42
6.2.1.	Soluviljelymuovilla kasvaneet solut vastasivat soluviljelyssä havaittua kasvua 43	
6.2.2.	Hiljennyksen vaikutus lakkaa 72 h jälkeen.....	43
7.	Tulosten tarkastelu	45
7.1.	Embigiini vaikuttaa mahdollisesti putkimaisten rakenteiden muodostukseen	45
7.2.	Embigiinin hiljennys vaikuttaa munuaisten kehitykseen osallistuvien geenien ilmentymiseen	47
7.3.	Embigiini edistää mahdollisesti solunjakautumista	49
8.	Yhteenveto	51

Lyhenteet

	Suomeksi	Englanniksi
Ace	angiotensiini 1:tä konvertoiva entsyymi	angiotensin 1 converting enzyme
Acta2	aktiini α 2	actin α 2
Angpt2	angiopoietiini 2	angiopoietin 2
Aqp1	akvaporiiini 1	aquaporin1
BMP	luun morfogeeninen proteiini	bone morphogenic protein
Bmper	BMP:tä sitova endoteelinen säätelijä	BMP-binding endothelial regulator
BSA	naudan seerumin albumiini	bovine serum albumin
cDNA	komplementaarinen DNA	complementary DNA
Cep55	sentrosomaalinen proteiini 55	centrosomal protein 55
DMEM	Dulbeccon Modifioitu Eagle Mediumi	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Emb	embigiini	embigin
EMT	epiteelin mesenkymaalinen transitio	epithelial to mesenchymal transition
FDR	virheellisten löytöjen osuus	false discovery rate
FFGC	Finnish functional genomics -keskus	Finnish functional genomics centre
GDNF	gliasolulinjaperäinen hermokasvutekijä	glial-derived neurotrophic factor

Hox	homeobox	homeobox
IgSF	immunoglobuliini superperhe	immunoglobulin superfamily
Itgb4	integriini β 4	integrin β 4
logFC	logaritminen muutoskerroin	logarithmic fold change
MCT	monokarboksylaattitransportteri	monocarboxylate transporter
MMP	matriksin metalloproteiinaasi	matrix metalloproteinase
mRNA	lähetti-RNA	messenger RNA
NCAM	hermosoluadheesiomolekyyl	neural cell adhesion molecule
NGS	uuden sukupolven sekvensointi	new generation sequencing
Npnt	nephronectin	nefronektiini
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos	phosphate buffered saline
PCA	pääkomponenttianalyysi	principal components analysis
PDAC	haiman duktaalinen adenokarsinoma	pancreatic ductal adenocarcinoma
Pdgfrb	verihituleperäinen kasvutekijäreseptori β	Platelet-derived growth factor receptor beta
SDS-	natriumdodekyylisulfaatti	sodium dodecyl sulphate ployacrylamide
PAGE	polyakryyliamidigeelielektroforeesi	gel electrophoresis
siRNA	pieni häiritsevä RNA	small interfering RNA

TBST	Tris-puskuroitu suolaliuos, Tween-20	Tris-buffered saline, Tween-20
TGF- β	transformoiva kasvutekijä- β	transforming growth factor- β
Wnt7b	Wingless-tyypin MMTV integraatiokohdan jäsen 7b	wingless-type MMTV integration site family 7b
Yap1	yes-linkitetty proteiini 1	yes-associated protein 1

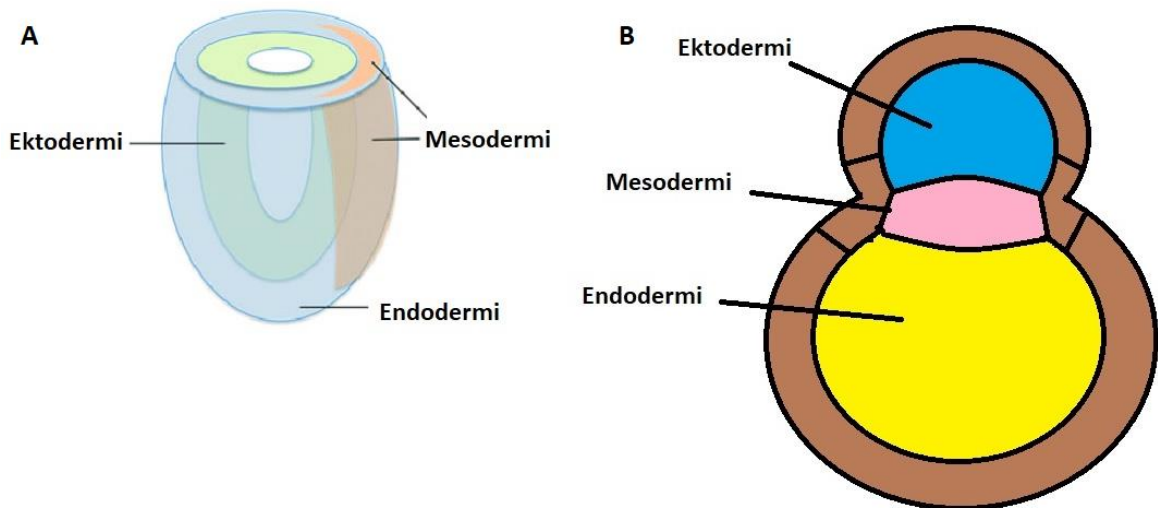
1. Hiiren alkionkehityksen pääpiirteet

Ennen kuin keskitytään enemmän embigiiniin, tarkastellaan hiiren alkionkehitystä. Embigiiniä on löydetty alkionkehityksen alkuvaiheesta ja kokeiden tulosten perusteella embigiini on sidoksissa urogenitaalijärjestelmän, erityisesti munuaisten, kehitykseen.

Hiiren alkionkehitys alkaa hedelmöityksestä. Hedelmöitysprosessi on tarkkaan säädelty, jotta vain yksi munasolu ja siittiö yhdistyvät. Tästä muodostunut tsygootti muodostaa blastulan, joka siirtyy gastrulaatiovaiheeseen nopeasti. Hiiren gastrulaatio poikkeaa muista nisäkkäistä suhteellisen paljon, vaikka samat alkiokerrokset muodostuvatkin.

Kohdun seinämään kiinnittymisen eli implantaation jälkeen hiiren alkio on kupin muotoinen ontto sylinteri, jonka sisäpuoli koostuu epiblastista. Alkionkehityksen jatkuttua kuusi ja puoli päivää (E6.5) alkujuoste (engl. *primitive streak*) muodostuu alkion posterioriseen puoleen. Alkujuosteen edetessä kohti alkion ääripäätä osa sisäkerroksen epiblastisoluista tunkeutuu sen läpi. Tätä tapahtumaa kutsutaan epiteelin mesenkymaaliseksi transitioksi (engl. *Epithelial to mesenchymal transition*, EMT). Nämä epiblastisolut muodostavat pohjan mesodermin ja endodermin muodostumiselle. Solut, jotka jäävät epiblastiin muodostavat ektodermin. Hiiren seitsemännen alkionkehityspäivän jälkeen (E7.5) gastrulaatiossa muodostuvat alkionkehitykselle ominaiset kolme alkiokerrosta: ektodermi, mesodermi ja endodermi (kuva 1).

Ektodermistä muodostuu hermosto ja epidermin solut. Mesodermistä muodostuu luu, rusto, poikkijuovaiset lihassolut, verinahka ruumiinontelo, sydän ja verisuonet sekä munuaiset. Endodermistä muodostuu ruuansulatuskanavan eri osia ja useiden eri elinten epiteelit. Eri osien erilaistuminen toiminnalliseksi kokonaisuuksiksi vaatii suuren joukon signaalintimolekyylejä ja erilaisia signaalinvälitysreittejä. Gastrulaation loppuvaiheessa alkio siirtyy organogeneesivaiheeseen, jolloin hermostoputki ja sisäelimet alkavat muodostua. (Wolter 2012; Peng ja Jing 2017)



Kuva 1. Nisäkkäiden gastrulaation alkiokerrokset. Ektodermistä muodostuvat hermosto ja epidermin solut. Mesodermistä muodostuvat luu, rusto, poikkijuovaiset lihassolut, verinahka, ruumiinontelo, sydän ja verisuonet sekä munuaiset. Endodermistä muodostuu ruuansulatuskanavan eri osia ja useiden eri elinten epiteelit. A: Hiiren gastrulaation alkiokerrokset muodostuvat ontosta sylinterimallisesta gastrulaatiosta. (Muokattu kuvasta Liu ja muut 2018) Hiiren gastrulaatio poikkeaa muista nisäkkäistä suhteellisen paljon, vaikka samat alkiokerrokset muodostuvatkin. B: Muiden nisäkkäiden, yleisempi, gastrulaatiomalli yksinkertaistettuna.

Seuraavissa kappaleissa otetaan lähempään tarkasteluun hiiren munuaisten sekä urogenitaalijärjestelmän kehittyminen alkionkehityksen aikana aloittaen munuaisten kehityksestä.

1.1. Hiiren munuaisten kehitys

Munuaisten tehtävänä on suodattaa verestä kuona-aineita sekä ylläpitää pH-, vesi- ja suolatasapainoa elimistössä. Hiiren kummassakin kehittyneessä munuaisessa on 12 000 - 16 000 nefronia. Ihmisellä nefroneja on vastaavasti 200 000 – 1 800 000. Hiiren munuaiset alkavat muodostua välimesodermistä kahdeksantena alkionkehityspäivänä (E8). Välimesodermin osaa, josta munuaiset alkavat muodostua, kutsutaan nefrogeeniseksi juosteeksi. Nisäkkäillä munuaiset muodostuvat kolmessa vaiheessa, jotka ovat pronefros, mesonefros ja metanefros. Pronefros ja mesonefros surkastuvat pois munuaisten

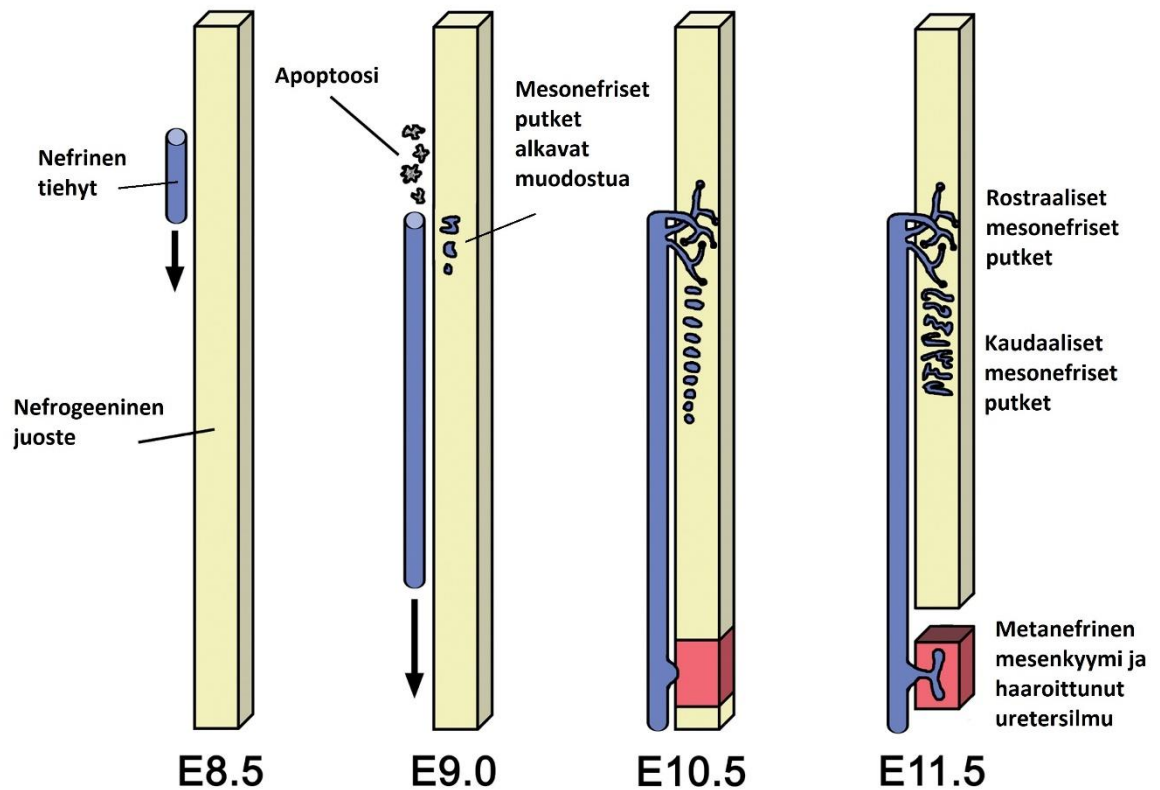
kehityksen edetessä ja lopulliset munuaiset muodostuvat metanefroksesta. Kehityksen tärkeimpiä säätelymolekyylejä ovat Pax2, Pax8 Gata3, Lhx1 sekä gliasolulinjaperäinen hermokasvutekijä (engl. *Glial-derived neurotrophic factor*, GDNF). Kehityksen säätelyyn kuuluu kuitenkin iso joukko muitakin säätelytekijöitä. (Davidson 2009; Little ja McMahon 2012)

1.1.1. Pronefros toimii pohjana metanefrokselle

Hiiren munuaisten kehitys alkaa nefrisen tiehyen muodostumisesta nefrogeenisen juosteen rinnalle alkionkehityspäivänä 8 (E8) (kuva 2.) Muodostuneella pronefroksella ei ole juurikaan toiminnallista merkitystä nisäkkäillä, vaan se toimii enemmänkin pohjana mesonefrosen muodostukselle. Muilla kuin nisäkkäillä, esimerkiksi vesieläimillä, pronefros voi olla toiminnallinen jo esiastemunuaisena. (Torres ja muut 1995; Kuure ja muut 2000)

1.1.2. Mesonefroksesta muodostuu uretersilmu ja metanefrinen mesenkyymi

Yhdeksäntenä alkionkehityspäivänä (E9) pronefroksesta alkaa muodostua mesonefros. Nefrisen tiehyen rostraaliosa poistetaan apoptoosilla ja kaudaaliosat saavat aikaan mesonefristen putkien muodostumisen nefrogeeniseen juosteeseen. Nefrinen tiehyt kasvaa kohti kloaakkia ja sen saavutettuaan siitä muodostuu mesonefrinen tiehyt, joka tunnetaan myös Wolffin tiehyenä. Muodostuneesta mesonefroksesta alkionkehityspäivänä 10 (E10) alkaa muodostua uretersilmu GDNF-kasvutekijän indusoimana. Metanefrinen mesenkyymi koostuu nefrogeenisen juosteen soluista, jotka ovat erilaistuneet tuottamaan GDNF-kasvutekijää. Uretersilmu kasvaa nefrisestä tiehyestä metanefrisen mesenkyymin sisäpuolelle, jossa se alkaa haaroittua. Uretersilmun ja metanefrisen mesenkyymin väliset vuorovaikutukset saavat uretersilmun haaroittumaan toistuvasti ja metanefriset nefronit muodostumaan. Mesonefrisestä tiehyestä muodostuu uroksilla testosteronin vaikutuksesta sukupuolielimien osia, esimerkiksi siemenjohtimet (Torres ja muut 1995; Davidson 2009). Naarilla tiehyet surkastuvat (Torres ja muut 1995; Hannema ja Hughes 2007; Davidson 2009)



Kuva 2. Hiiren munuaisen kehityksen pääpiirteet. Nefriinien tiehyt alkaa muodostua nefrogeenisen juosteen rinnalle kahdeksannen alkionkehityspäivän (E8) jälkeen rostraalipäästä kohti kloaakkia. Nefriinien tiehyen rostraaliset osat alkavat tuhoutua apoptoosilla ja kaudaalinen osa jatkaa kasvua. Nefriinien tiehyt saa aikaan mesonefristen putkien muodostumisen nefrogeeniseen juosteeseen. Jäljellä oleva nefriinien tiehyt liittyy nefrogeeniseen juosteeseen yläosastaan. Uretersilmu kasvaa GDNF-kasvutekijän indusoimana nefrogeenisen juosteen alueen sisälle (metanefriininen mesenkyymi, kuvassa punaisella), joka koostuu nefrogeenisen juosteen erilaistuneista soluista. Uretersilmun ja metanefriinisen mesenkyymien väliset vuorovaikutukset saavat uretersilmun haaroittumaan toistuvasti ja metanefriiniset nefronit muodostumaan. E=alkionkehityspäivä. (muokattu kuvasta Davidson 2009)

1.1.3. Metanefroksesta muodostuu lopulta toiminnalliset munuaiset

Metanferos alkaa muodostua 11. alkionkehityspäivänä (E11) kun metanefrinen mesenkyymi ja uretersilmu yhdistyvät. Uretersilmusta muodostuu virtsanjohdin ja sen haaroittumisen ansiosta se muodostaa munuaisten kokoojaputket mesenkyymin sisään. Uretersilmun haaroittuneisiin päihin alkaa muodostua nefronit metanefrisen mesenkyymin ja uretersilmun vuorovaikutuksesta. Uretersilmun haaroittuneiden päiden ympärillä oleva mesenkyymi on erilaistunut muusta metanefrisestä mesenkyymistä (engl. *cap mesenchyme*), ja ne tuottavatkin eri transkriptiofaktoreita mahdollistaen nefronien muodostumisen. Monimutkaisten signaalintireittien ja -prosessien sekä vuorovaikutusten kautta toiminnalliset nefronit lopulta muodostuvat. (Torres ja muut 1995; Davidson 2009; McMahon 2016)

1.2. Hiiren urogenitaalijärjestelmän kehitys

Urogenitaalijärjestelmän kehitys on kiinteästi sidoksissa hiiren ja muidenkin nisäkkäiden munuaisten kehitykseen. Urogenitaalijärjestelmään kuuluu munuaisten lisäksi sukupuolirauhaset, virtsanjohtimet sekä lisääntymiselimet. Järjestelmällä on useita päällekkäisiä transkriptiofaktoreita ja signaalintimolekyylejä; mikäli jokin puuttuu, esimerkiksi Pax2, voi seurauksena olla munuaisten sekä genitaalijohtimien puuttuminen (Bouchard ja muut 2002). Urogenitaalijärjestelmän osat alkavat kehittyä välimesodermistä nopeasti gastrulaation jälkeen, esimerkiksi Wolffin tiehyt alkavat kehittyä hiirillä noin yhdeksännen alkionkehityspäivän (E9) tienoilla välimesodermistä (Hannema ja Hughes 2007).

Ennen sukupuolien eriytymistä alkiolla on sekä Wolffin tiehyt sekä Müllerin tiehyt. Müllerin tiehyt alkavat muodostua Wolffin tiehyen rinnalle 11 alkionkehityspäivän (E11.5) jälkeen (Behringer ja Kobayashi 2003). Ainoastaan toinen tiehyistä jatkaa kehittymistä, mikä määräytyy kivesten tai munasarjojen kehityksen alkamisella. Müllerin tiehyitä surkastuttava hormoni (engl. *Müllerian inhibiting substance*) ja testosteroni saavat aikaan Müllerin

tiehyiden surkastumisen ja mikäli näitä kivesten alkumuodon tuottamia hormoneja ei ole läsnä Wolffin tiehyet surkastuvat. (Capel 2000)

1.2.1. Wolffin tiehyt muodostavat uroksilla lisääntymiselinten rakenteet

Wolffin tiehyt muodostavat urosten lisääntymiselimien rakenteet, joita ovat muun muassa lisäkivekset, siemenjohdin sekä rakkularauhanen. Wolffin tiehyt muodostuu pronefrisestä tiehyestä (edellä mesonefrinen tiehyt) ja kasvaa kaudaalisesti kohti kloaakkia. Uretersilmu haarautuu Wolffin tiehyestä metanefriseen mesenkyymiin muodostamaan munuaista. Wolffin tiehyen muodostukseen osallistuu joukko geenejä, muun muassa Pax2, Pax8, Lim1 ja Emx8. (Bouchard ja muut 2002; Behringer ja Kobayashi 2003; Hannema ja Hughes 2007) Pax2 osallistuu mesonefristen tiehyiden, munuaisten ja genitaalitiehyiden muodostukseen. Pax8 osallistuu yhdessä Pax2:n kanssa urogenitaalialueiden muodostukseen, mutta yksinään Pax8 ei pysty toimimaan. Yhdessä Pax2 ja Pax8 ovat tarpeellisia EMT:ssä. Lim1:tä tarvitaan Müllerin tiehyiden ja Wolffin tiehyiden erilaistumisen alkuvaiheessa. (Torres ja muut 1995; Bouchard ja muut 2002)

Myös homeobox-geenit osallistuvat genitaalialueiden säätelyyn ja erilaistumiseen. Uroshiirellä homeobox-a9 (Hoxa9) ja Homeobox-d9 (Hoxd9) ilmentyy lisäkiveksissä ja siemenjohtimessa. Hoxa10:ä ja Hoxd10: ilmentyy lisäkiveksien kaudaaliosassa sekä siemenjohtimessa, jossa on myös Hoxa11:a. Hoxa13:a ja Hoxd13:a ilmentyy Wolffin tiehyen kaudaaliosassa ja rakkularauhasissa. (Hannema ja Hughes 2007)

1.2.2. Müllerin tiehyistä muodostuu naarailla lisääntymiselinten rakenteet

Müllerin tiehyistä muodostuu vastaavasti naaraiden lisääntymiselinten rakenteet, joita ovat munanjohdin, kohtu, kohdunkaula sekä emättimen yläosa. (Behringer ja Kobayashi 2003) Wolffin tiehyt oletettavasti ovat välttämättömät Müllerin tiehyen muodostukselle: jos Wolffin tiehyen kasvaminen kaudaalisesti estetään, Müllerin tiehyt eivät kehity (Hannema ja Hughes 2007). Müllerin tiehyet eriytyvät eri geenien vaikutuksista munanjohdimiksi,

kohduksi, kohdunkaulaksi sekä emättimen yläosaksi. Müllerin tiehyen tarvitsemia transkriptiofaktoreita sekä signaalintimolekyylejä ovat muun muassa Pax2, Pax8, Lim1 ja Emx2. (Torres ja muut 1995; Bouchard ja muut 2002)

Pax2 ja Pax8 tarvitaan Wolffin tiehyen sekä pronefroksen muodostumiseen (Bouchard ja muut 2002). Lim1:n puuttuessa munanjohtimet, kohtu ja kohdun yläosa eivät kehity. Emx2:n puuttuessa sukuelimet, sukurauhaset sekä munuaiset eivät kehity. (Behringer ja Kobayashi 2003)

Vastaavasti kuten uroksilla, myös naarailla Hox-geenit osallistuvat genitaalialueiden erilaistumiseen ja kehityksen säätelyyn. Hoxa9:ää on ilmentynyt munanjohtimissa, Hoxa10:ä kohdussa, Hoxa11:a kohdussa sekä kohdunkaulassa ja Hoxa13:a kohdunkaulassa ja kohdun yläosassa. Hoxa-geenien ilmenemisen sijainnista voidaan päätellä näiden geenien vaikuttavan kyseisten alueiden kehitykseen ja säätelyyn. (Behringer ja Kobayashi 2003)

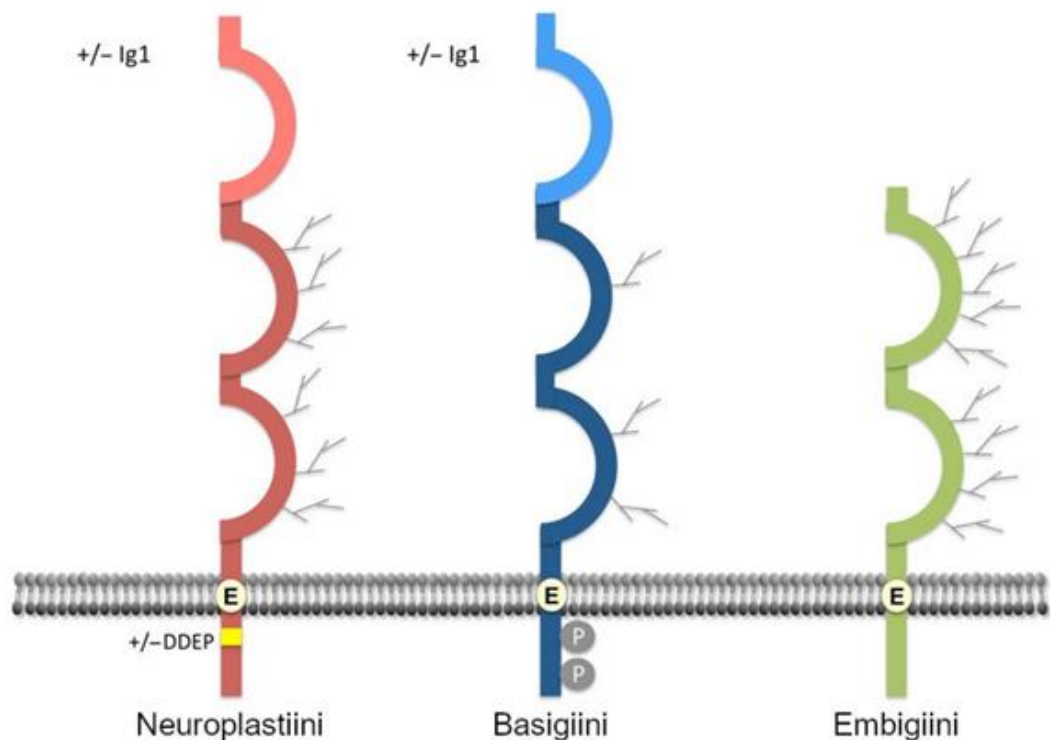
Hiiren munuaisten sekä urogenitaali järjestelmän kehityksessä on siis useita eri vaiheita ja siihen osallistuu useita erilaisia säätelytekijöitä. Kuten edellä huomattiin, monet geenit ja vaiheet ovat päällekkäisiä kummankin järjestelmän kehityksessä ja näin ollen yhden säätelytekijän puutos tai muuttuminen vaikuttaa olennaisesti alkionkehitykseen. Seuraavaksi tarkastellaan yhtä oletettua hiiren alkionkehityksen säätelytekijää: embigiiniä.

2. Basigiini, neuroplastiini ja embigiini kuuluvat IgSF-superperheeseen

Immunoglobuliini superperhe (engl. *immunoglobulin superfamily*, IgSF) on yksi isoimmista ja laajimmista proteiiniperheistä ja siihen kuuluu 765 proteiinia. Tämän perheen proteiineille tyypillistä on yksi tai useampi Ig-domaini, joka koostuu kahdesta vastakkaissuuntaisesta β -laskoksesta, jotka ovat stabilisoitu disulfidisillalla. IgSF-proteiinit välittävät kalsiumista riippumatonta adheesiota. (Wai Wong ja muut 2012). Monet IgSF-superperheen proteiineista osallistuvat pääasiassa solujen välisiin vuorovaikutuksiin ja niiden

immunoglobuliineille tyypilliset rakenteet ovat erikoistuneet molekyylien tunnistamiseen sekä soluadheesioon. (Huang ja muut 1990; Juliano 2002; Wai Wong ja muut 2012)

Embigiini (Emb, GP70) kuuluu IgSF-superperheeseen basigiinin ja neuroplastiinin kanssa (Beesley ja muut 2014). Embigiini, basigiini ja neuroplastiini ovat keskenään samankaltaisia rakenteeltaan ja muodostavatkin IgSF-perheen sisällä oman selkeän ryhmänsä (kuva 3). Embigiini on perheen ensimmäiseksi löydetty jäsen. Basigiinia on tutkittu enemmän ja se tunnetaan paremmin sekä fysiologisesti että patologisesti kuin embigiini, jonka vuoksi ryhmä on nimetty basigiiniperheeksi. (Muramatsu 2016)



Kuva 3. Basigiiniperheeseen kuuluvan neuroplastiinin, basigiinin ja embigiinin rakenne. Embigiinillä on havaittu vain kaksi Ig-domainia, kun taas neuroplastiinilla ja basigiinilla on havaittu olevan mahdollisesti jopa kolme (+/- Ig1). Kaikilla kolmella on glutamaatti (kuvassa E) samassa kohdassa solukalvon läpäisevässä osassa. Harmaat väkäset ovat arvioidut glykosylaatiokohdat hiirellä ja ihmisellä. Basigiinille on löydetty myös fosforylaatiokohdat solun sisäpuolisessa osassa, mutta neuroplastiinille ja embigiinille vastavia ei ole löydetty. (muokattu kuvasta Beesley ja muut 2014)

2.1. Basigiini on tärkeä proteiini verkkokalvon kehitykselle

Basigiiniperheen nimikkoproteiinin, basigiinin, koko on glykosyloituna 43-66 kDa ja sen ydinproteiinin koko on 28 kDa. Basigiinista on kaksi isomuotoa: toisessa on 2 Ig-domainia ja toisessa on 3 Ig-domainia. Basigiinilla, kuten muillakin basigiiniperheen proteiineilla, Ig-domainit ovat solukalvon ylittäviä ja sillä on solukalvon läpäisevässä osassa glutamaatti, joka on harvinainen ominaisuus vain kerran solukalvon läpäiseville proteiineille. (Beesley ja muut 2014). Basigiinia ilmentyy useissa eri kudoksissa alkioilla sekä aikuisilla (Muramatsu ja Miyauchi 2003). Basigiini on tärkeä proteiini silmän verkkokalvon kehitykselle. Sen puuttuminen vaikuttaa sauva- ja tappisoluihin negatiivisesti sekä verkkokalvo ei kehity kunnolla (Hori ja muut 2000)

Basigiinin tehtävänä on lisäksi kuljettaa monokarboxylaattitransportteri 1 (MCT 1), MCT3 ja MCT4 solukalvolle (Philp ja muut 2003). Basigiinia löytyy lisäksi myös kiveksistä ja lisäkiveksistä. Basigiini on lisäksi todennäköisesti erittäin tärkeä proteiini sulusolujen kehitykselle ja erilaistumiselle. (Bi ja muut 2013)

2.2. Neuroplastiini osallistuu hermoston kehitykseen

Neuroplastiinia on kahta muotoa: Np65 ja Np55. Muotojen koot ovat glykosyloituna 65 kDa ja 55 kDa ja niiden ydinproteiinien koot ovat 40 kDa ja 28 kDa (Beesley ja muut 2014). Ne muodostuvat yhdestä geenistä vaihtoehtoisella silmukoinnilla ja ovat muuten identtisiä keskenään, paitsi että Np65:llä on sille spesifinen Ig-domaini N-terminuksessa (Langnaese ja muut 1997). Neuroplastiinien rakenteet ovat samanlaisia kuin basigiinilla: niillä on kaksi solukalvon ylittävää Ig-domainia ja solukalvon läpäisevässä osassa on glutamaatti. Np65 on pääsääntöisesti ilmentynyt aivojen alueella. Sitä on löydetty aivokuoresta, pikkuaivoista ja hippokampuksesta. Np55:ttä on myös löydetty muistakin elimistä, esimerkiksi munuaisista, pernasta, lihaksista ja kateenkorvasta. Sitä on myös koko aivojen alueella. (Langnaese ja muut 1997; Smalla ja muut 2000)

Neuroplastiinit todennäköisesti osallistuvat hermoston kehitykseen ja ylläpitoon. Np55 vaikuttaisi olevan synapsien modulaatiossa mukana. Np55 nostaa synapsien välistä Ca²⁺

konsentraatiota aktivoimalla FGFR1:een liittyvän signalointireitin (engl. *FGFR-associated pathway*) (Owczarek ja muut 2010; Owczarek ja Berezin 2012). Np65 välittää homofiilisiä interaktioita ja sitä kautta edistää soluadheesiota. Se myös edistää neuriittien haaroittumista ja hippokampuksen synaptista plastisuutta (Owczarek ja muut 2011). Neuroplastiinit osallistuvat myös neuronaaliseen erilaistumiseen FGFR-reseptorin aktivaatiosta riippuvaisesti (Gerrow ja El-Husseini 2006). Neuroplastiinit toimivat lisäksi avustavana proteiinina MCT2:lle, joka on pääasiallinen neuronaalinen MCT jyrksijöillä. (Halestrap 2012; Wilson ja muut 2013)

2.3. Embigiini on tärkeä proteiini hiiren alkionkehityksessä

Embigiini tunnistettiin ensimmäisen kerran teratokarsinoomatutkimuksissa vuonna 1988, jolloin sitä kutsuttiin GP70:ksi. Ozawa ja muut (Ozawa ja muut 1988) arvioi silloin koko glykoproteiinin kooksi 62-90 kDA ja ydinproteiinin kooksi 37 kDA. Sen koko voi siis vaihdella glykolysaation takia paljonkin. Sillä on kaksi solukalvon ylittävää transmembraanista Ig-domainia, solukalvon läpäisevässä osassa glutamaatti ja sytoplasman puolella useita glykosylaatiokohtia. (Ozawa ja muut 1988; Muramatsu 2000; Beesley ja muut 2014)

Suurinta osaa IgSF-perheen proteiineista ei ole löydetty alkuvaiheessa olevista alkiosoluista mutta embigiiniä niistä on löydetty. Tämän vuoksi embigiini on todennäköisesti tärkeä proteiini alkionkehityksessä. Sen ilmenemisen on havaittu olevan koholla alkiovaiheessa ja sen määrän on todettu olevan vain vähäinen aikuisissa hiirissä. Embigiiniä on havaittu jo viidentenä päivänä hedelmöityksestä. 7-9 päivää hedelmöityksestä (E7-E9) on huomattu olevan embigiinin tuotolle parhainta aikaa alkiosoluissa, minkä jälkeen sen tuotto laskee lähes olemattomaksi ja sitä on erittäin vähän enää 10.-15. päivinä (E10-E15). Embigiiniä on havaittu endodermisissä implantaation jälkeisessä vaiheessa sekä somiittien muodostusvaiheessa. Embigiinin tuotto jatkuu kuitenkin koko eliniän, mikä saattaa tarkoittaa sitä, että pieni embigiinin tuoton ylläpito on tärkeää jo erilaistuneissa soluissa. Alkionkehityksen alkuvaihe on kuitenkin sen ilmentymiselle suurin piikki ja sen jälkeen sen ilmentyminen hiipuu organogeneesistä eteenpäin. (Huang ja muut 1990; Fan ja muut 1998).

Seuraavaksi tarkastellaan vielä lähemmin tämän tutkielman pääproteiinia, embigiiniä, sen arveltujen tehtävien, vaikutusten ja interaktiopartnereiden kautta.

3. Embigiinin tehtävät

Embigiinin tehtävät tunnetaan vielä verrattain huonosti. Se on erittäin konservoitunut proteiini ja sen homologia löytyy monista eri lajeista, esimerkiksi banaanikärpäsestä, ihmisestä, hiirestä sekä kanasta. Embigiiniä on löydetty useista erilaisista kudoksista, kuten kiveksistä, sydäimestä, maksasta, keuhkoista, munuaisista ja aivoista. Embigiinin ekspressiotrendi ja konservoituneisuus evoluutiossa tarkoittanee sitä, että embigiini on osana tärkeitä biologisia prosesseja, kuten kehityksessä, soluvälitteisessä adheesiossa, solunjakautumisessa ja erilaistumisessa sekä tuumorinmuodostuksessa. (Guenette ja muut 1997; Pridans ja muut 2008; Schaum ja muut 2018)

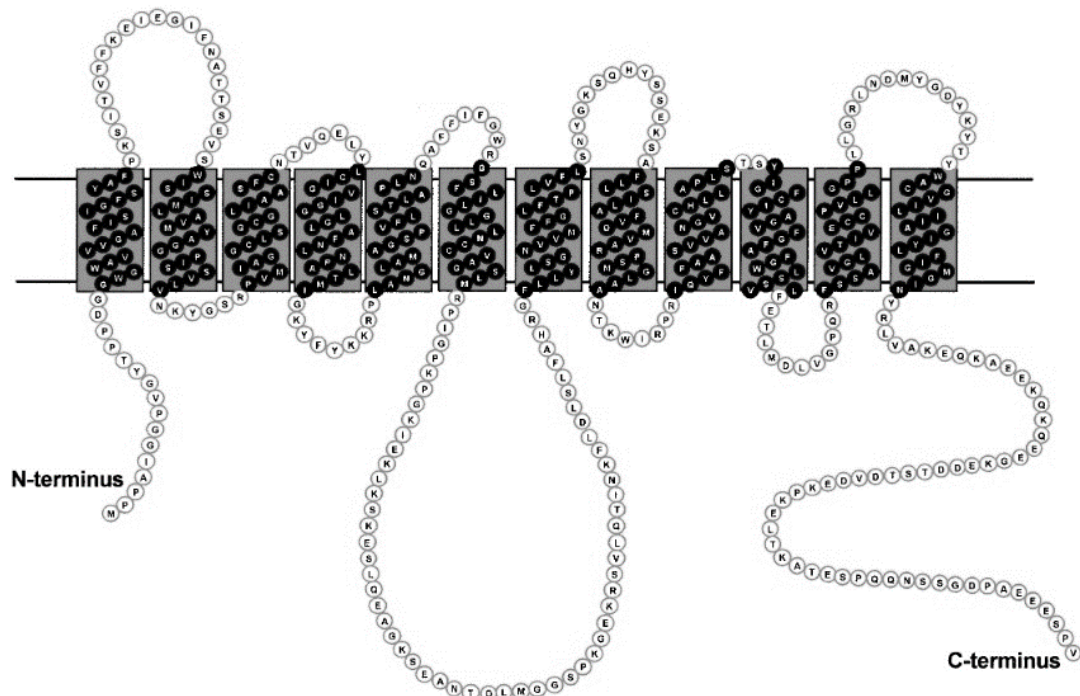
3.1. Embigiinin arvellaan olevan osana soluvälitteisessä adheesiossa

Embigiini saattaa olla osana soluvälitteisessä adheesiossa soluväliaineen proteiinien sekä integriinien kautta (Huang ja muut 1993; Guenette ja muut 1997). Huangin tutkimusryhmä vuonna 1993 transfektoi hiiren L-fibroblasteja embigiinin cDNA:lla. L-fibroblastit eivät normaalisti tuota embigiiniä. He saivat tuotettua transfektion jälkeen embigiiniä ilmentäviä soluja ja huomasivat niitä tutkiessaan, että näillä embigiiniä ilmentävillä soluilla on kohonnut soluadheesiokyky. He epäilivät soluadheesiokyvyn parannuksen perustuvan embigiinin ja integriinien välisiin vuorovaikutuksiin ja siihen, että embigiini mahdollistaisi vähäistenkin integriinimäärien toiminnan. (Huang ja muut 1993; Guenette ja muut 1997)

3.2. Embigiini on MCT2:n avustava proteiini

Embigiinin ja MCT2:n välinen vuorovaikutus on parhaiten tutkittu embigiinin tehtävä. MCT-proteiiniperheeseen kuuluu 14 transportteria, joista MCT:t 1-4 vastaavat

monokarboksylaattien passivisesta kuljetuksesta solukalvon yli. Näitä ovat esimerkiksi laktaatti, ketoaineet ja palorypälehapo. Nämä varaukselliset monokarboksylaatit eivät kykene siirtymään solukalvon yli ilman MCT:iden passiivista kuljetusta, joka tarvitsee toimiakseen ainoastaan gradienttieron solun ulko- ja sisäpuolen välille. Koska MCT:t kuljettavat useita aineenvaihdunnalle tärkeitä monokarboksylaatteja, ne ovat nisäkkäiden metabolian keskeisiä proteiineja ja ovat kriittisiä solujen välisessä kommunikaatiossa. MCT:illä transmembraanisten domainien määrä on 10-12. MCT1:llä sekä MCT2:lla on 12 domainia (kuva 4). 12 transmembraanisen domainin rakenne löytyy myös GLUT-transporttereilta. (Halestrap ja Price 1999; Halestrap 2012; Mannowetz ja muut 2012)



Kuva 4. MCT-proteiiniperheen proteiinien rakenne ihmisellä. MCT:illa transmembraanisten domainien määrä on 10-12. MCT1:llä ja MCT2:lla on 12 domainia. Kuvassa MCT1. (Muokattu kuvasta Halestrap ja Price 1999)

Embigiini on MCT2:n avustava proteiini (Wilson ja muut 2005). MCT2:lla on korkein affiniteetti laktaatille ($K_m = 0,1 \text{ mM}$) ja palorypälehapolle ($K_m = 0,74 \text{ mM}$). Affiniteetit ovat korkeammat verrattuna MCT1:een, jolla vastaavat K_m -luvut ovat 1 mM ja $3,5 \text{ mM}$ (Halestrap 2012). Avustavien proteiinien tehtävänä on auttaa MCT:t solukalvolle ja saada

niille oikea laskostuminen. Basigiini, jota on enemmän ilmentyneenä kudoksissa kuin embigiiniä, on MCT 1, MCT3 ja MCT4:n avustava proteiini ja embigiini on MCT2:n (Pérez-Escuredo ja muut 2016). MCT1 voi myös hyödyntää embigiiniä vastaavasti kuin MCT2 mikäli sen avustavaa proteiinia, basigiinia, ei ole tarjolla (Ovens ja muut 2010; Halestrap 2012)

Embigiiniä ja basigiiniä on myös havaittu kiveksissä ja lisäkiveksissä. Embigiiniä on lisäksi havaittu siittiösoluissa. MCT1 ja MCT2 on myös löydetty hiiren lisääntymiselimistä. MCT2:a on pääasiallisesti ilmentyneenä sertolin soluissa ja siittiösoluissa. Tästä voidaan päätellä että embigiini osallistuu yhdessä basigiinin, MCT1:n ja MCT2:n kanssa sperman muodostukseen. (Mannowetz ja muut 2012)

3.3. Embigiiniä on löydetty hermo-lihasliitoksista ja se saattaa edistää niiden muodostumista

Uusia hermo-lihas -interaktiota tutkittaessa huomattiin, että erään hermosoludheesiomolekyylin, NCAM:in, ja tenascin-C:n poistaminen ei vaikuttanut olennaisesti hermo-lihasliitoksen muodostukseen vaikka niiden määrän tiedetään olevan denervaation jälkeen koholla. Kokonais-mRNA:ta vertailtiin hiiren ja rotan kantalihaksesta, jossa on hermot tallella sekä 4 päivää vanhasta kantalihaksesta, jossa denervatio on tapahtunut. Huomattiin, että embigiinin mRNA:n määrä on vahvasti koholla hermottomassa lihaksessa sekä Northern blot että qRT-PCR -tekniikoilla. (Lain ja muut 2009)

Lain tutkimusryhmä havaitsi tutkimuksessaan, että embigiiniä ilmentyy kehittyvässä lihaksessa ja sen on keskittynyt hermo-lihasliitoksen alueelle syntymän aikoihin. Sen määrä kuitenkin vähenee kehityksen aikana, mutta se pysyy hermo-lihasliitoksen alueella. Embigiinin määrän huomattiin kohoavan denervaatiossa, koska lihas ei saa impulsseja. Se saattaa olla mukana myös hermo-lihasadheesiossa yhdessä NCAM:in kanssa, jossa nämä proteiinit vuorovaikutuksessa keskenään estävät metalloproteaaseja solukalvon pinnalla katkaisemasta solukalvon ulkopuolista osaa. (Lain ja muut 2009)

3.4. Embigiini saattaa liittyä hematopoieesin säätelyyn

Embigiinin on huomattu olevan Pax5:n hillitsemä geeni. Pax5 on tärkeä hematopoieesin transkriptiofaktori, joka vaikuttaa useaan tärkeään B-solun kehitymisprosessiin, joita ovat esimerkiksi B-solujen erilaistuminen ja *Igh*-lokuksen V-DJ rekombinaatio (Pridans ja muut 2008). B-soluilla on yleisesti vähän tai ei lainkaan embigiiniä. Myeloidisissa soluissa ilmentyy paljon embigiiniä ja T-solut ilmentävät embigiiniä jonkin verran. Normaalisissa hematopoieesissa T-soluissa ja myeloidisissa soluissa ilmentyy embigiiniä ja B-soluissa ei ilmenny. Embigiinin on kuitenkin havaittu tavallisten B-solujen erilaistumisen loppupuolella indusoituvan ja sen ilmentymisen jatkuvan plasmassoluissa. Embigiini saattaa siis osallistua B-solujen erilaistumiseen Pax5:n kautta. Embigiinin poissaolo B-soluista on myös hyvä merkki siitä, että Pax5 toimii kunnolla (Pridans ja muut 2008) Embigiinin on havaittu myös säätelevän hematopoieettisten kantasolujen lokalisaatiota ja niiden uinumisvaihetta (engl. *quiescence*). (Silberstein ja muut 2016)

3.5. Embigiini syövissä

Embigiinin vaikutuksia syöpään on tutkittu vähän ja on epäselvää, mihin kaikkeen embigiini syövissä vaikuttaa. Sillä on huomattu olevan sekä edistävää että heikentävää vaikutusta. Ristiriitaiset vaikutukset saattavat johtua siitä, että embigiinillä on oletettavasti monia eri interaktiopartnereita, joita edelläkin on jo kuvailtu.

3.5.1. Embigiini saattaa vaimentaa rintasyövän etenemistä ja tuumorinmuodostusta

HOXC8 kuuluu homeobox-geeniperheeseen ja se on osallisena useissa eri fysiologisissa sekä patologisissa prosesseissa, joita ovat esimerkiksi hiiren alkionkehitys sekä ihmisen tuumorigeneesi. HOXC8:n ilmentymisen on todettu edistävän erilaisia syöpiä, muun muassa rintasyöpää, kohdunkaulansyöpää, eturauhassyöpää ja ruokatorven syöpää. HOXC8:n on myös todettu säätelevän eri geenien määriä, mukaanlukien embigiinin määrää. HOXC8 inhiboi embigiiniä sitoutumalla sen promoottorialueeseen ja estäen embigiinin transkriptiota. Matalan embigiinitason omaavilla rintasyöpää sairastavilla on

todennäköisesti korkeampi riski saada tuumoreita sekä heikentynyt selviytymismahdollisuus. (Lei ja muut 2005; Chao ja muut 2015)

Chaon tutkimusryhmä huomasi tutkimuksessaan, että embigiinin määrän väheneminen syöpäsoluissa lisää niiden solunjakautumista, kasvualustasta riippumatonta kasvua sekä syöpäsolujen migraatiota. Tämä saattaa osoittaa, että embigiinin kohonnut määrä voi vaikuttaa hidastavasti rintasyövän etenemiseen. (Chao ja muut 2015)

3.5.2. Embigiini yhdessä MCT2:n kanssa saattaa edistää haimasyövän etenemistä

Haiman duktaalinen adenokarsinoma (engl. *Pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) on todella ärhäkkä haimasyöpä. Sen sairastavilla on huono todennäköisyys eloonjäämiselle, sillä sitä ei voida kunnolla hoitaa. Embigiinin vaikutusta solun migraatioon ja invaasioon tutkittiin haimasyöpäsoluissa ja tutkimuksesta huomattiin, että embigiinin ilmentyminen on koholla haimasyöpää sairastavien haiman soluissa verrattuna normaaleihin haiman soluihin. Kokeessa vain kahdella 12:sta haimasyöpäpotilaasta ei ollut embigiinin määrä koholla. Immunohistokemikaalinen analyysi osoitti myös sen, että embigiiniä ilmentyy vähän normaaleissa haiman rauhasrakkulasoluissa sekä olemattoman vähän normaaleissa duktaalisoluihin, joten se ei ole duktaalisoluille spesifinen proteiini. (Jung ja muut 2016; Ansari ja Andersson 2017)

Jungin tutkimusryhmä testasi embigiinin hiljennystä haimasyöpäsoluista shRNA:lla. Hiljennys vähensi solun migraatio- ja invaasiokykyä verrattuna kontrolliryhmään pitkäaikaisessa hiljennyksessä shRNA:lla sekä in vivo että in vitro. Transformoiva kasvutekijä- β (engl. *Transforming growth factor- β* , TGF- β) -käsitellyillä soluilla embigiinin ilmentyminen kasvoi ja sen hiljennys vaikutti heikentävästi TGF- β -signalointireitin alavirran signaaleihin. TGF- β -signalointireitti on kytkeytyneenä EMT:hen. EMT tapahtuu alkionkehityksen sekä syövän etenemisen aikana, jolloin epiteelisolut menettävät solu-solu -adheesiokykynsä sekä polarisuutensa mutta solut pystyvät silloin migraatioon sekä invaasioon. Matriksin metalloproteiinaasi 2:n (engl. *matrix metalloproteinase*, MMP) ja MMP-9:n määrän väheneminen embigiinihiljennetyissä soluissa vähensi lisää invaasiota,

mikä saattaa osoittaa embigiinin osallistuvan myös solun liikkumisen säätelyyn. Embigiinin hiljennys vähensi myös laktaatin kuljetusta, sillä se on MCT2:n avustava proteiini ja sen päätehtävä on laktaatin kuljetus. Syöpäsolut tuottavat ylimäärin laktaattia ja pyruvaattia kasvaakseen ja lisääntyäkseen, mikä saattaakin selittää embigiinin hiljennyksen heikentävät vaikutukset syöpäsoluihin. (Jung ja muut 2016)

3.5.3. Embigiini saattaa vaikuttaa edistävasti eturauhassyövän etenemiseen S100A:n kautta

S100A4 kuuluu S100-proteiiniperheeseen, joka sitoo kalsiumia. Sillä on todettu olevan tuumorin etenemiseen edistäviä vaikutuksia solun sisällä, esimerkiksi se edistää tuumorin liikkuvuutta, invaasiokykyä ja apoptoosia. Se voi solun ulkopuolella edistää angiogeneesiä, stimuloida solun liikkumista, säädellä matriksin metalloproteaseja sekä tuumoriin liittyviä transkriptiofaktoreja. (Helfman ja muut 2005)

Ruman tutkimusryhmä tutki S100A4:n ja embigiinin vaikutuksia syövän etenemisessä ja saivat selville, että embigiinin mRNA-ekspressiotaso on koholla lähes kolminkertaisesti sekä haima- että eturauhassyöpää sairastavilla. He huomasivat myös, että embigiini sitoutuu S100A4:ään ainoana S100-proteiineista ja embigiinillä on S100A4:n kanssa paljon vaikutusta syöpien etenemisessä. S100A4:n sitoutuminen embigiiniin tehostaa eturauhassyöpäsolujen invaasiokykyä huomattavasti, mutta embigiini voi edistää invaasiota myös S100A4:stä riippumattomasti. Embigiini saattaa osallistua S100A4:n NF- κ B:n aktivointiin ja matriksin metalloproteasien säätelyyn MMP-9:n ilmenemisen säätelyn kautta. He huomasivat, että embigiinin sytoplasminen osa saattaa olla tärkeä eturauhassyövän solujen proliferaatiolle, sillä se yhdessä S100A4:n kanssa edistää eturauhassyövän etenemistä AMPK-signalointireitin (AMP-aktivoitu proteiinikinaasi) toiminnan estämisen kautta. AMPK-signalointireitin estyminen johtaa lopulta proliferaation indusointiin ja autofagian inhibointiin. (Ruma ja muut 2018)

Tiivistettynä embigiinillä on siis useita erilaisia tehtäviä. Embigiinin on todettu ilmentyvän erityisesti hiiren alkionkehityksen aikana ja sen on havaittu vaikuttavan esimerkiksi syöpien kehitykseen sekä edistävasti että heikentävästi, mikä tekeekin siitä hyvän tutkimuskohteen

ristiriitaisten tutkimustulosten vuoksi. Embigiiniä on tutkittu vielä vähän, joten tämä ristiriitaisuus on ymmärrettävää. Lisätutkimukset embigiinistä ja sen tehtävistä saattavat jatkossa auttaa esimerkiksi syöpien hoidossa. Embigiinin tehtävien kartoitus voi auttaa myös ymmärtämään alkiokehityksen biologisia prosesseja paremmin. Seuraavaksi siirrytään itse tutkimukseen, jossa tutkittiin miten embigiinin hiljennys soluista vaikuttaa solujen geenien ilmentymiseen sekä solunjakautumiseen.

4. Työn tavoitteet

Työn tavoitteena on hiljentää embigiiniä hiiren keratinosyyttisoluista kahdella eri embigiini-siRNA:lla ja selvittää, miten embigiinin hiljennys vaikuttaa solujen geeniekspressioprofiiliin sekä tutkia proliferaatiokokeilla hiljennyksen vaikutusta solunjakautumiseen ja solun toimintaan. Hiljennetyistä soluista eristetään RNA ja ne lähetetään sekvensoitaviksi Finnish Functional Genomics Centreen (FFGC). Geeniekspressioprofiilin muuttumista tutkitaan sekvensointidatasta eri geenirikastustyökaluilla. Solunjakautumista seurataan erilaisilla pinnoilla sekä eri aikapisteissä hiljennyksen jälkeen värinmuodostusreaktion avulla, jossa elävien solujen proteiinit muuttavat lisätyn reagenssin oranssinväriseksi formazaaniksi. Tavoitteena on löytää mahdollisesti uusia, ennestään tuntemattomia biologisia prosesseja, joihin embigiini vaikuttaa sekä selvittää, miten embigiinin hiljennys vaikuttaa solun koko geeniekspressioprofiiliin sekä solunjakautumiseen.

5. Materiaalit ja menetelmät

5.1. Embigiinin hiljennyksessä käytetyt solut ja hiljennys siLentFectillä

Hiiren keratinosyyttisoluja (IMBCA) kasvatettiin maljoilla FAD-mediumissa (DMEM (12-709F, Lonza) ja 25 % F-12 Nutrient Mix (21765-029, gibco) johon lisättiin vielä 10 % FCS (Biowest), 2 mM glutamiini (Ultraglutamine1, BE17-605E/U1m, Lonza), 1 % pen/strep (DE17-602E, Lonza), 200 µM adeniini, 5 µg/ml insuliini (human insulin solution 19278-5 ml, Sigma-Aldrich), 10 ng/ml EGF (E5036-200 ug, Sigma-Aldrich), 16,8 ng/ml koleratoksiini (C8052, Sigma-Aldrich) ja 0,5 µg/ml hydrokortisoni (Sigma-Aldrich)).

Keratinosyyttejä kasvatettiin inkubaattorissa, jossa oli 37 °C ja 5 % CO₂. Solujen ylläpitämiseksi maljat jaettiin yleisesti 80 - 90 % konfluenssissa tarpeen ja kokeen mukaan. Solut irrotettiin aina trypsiini-EDTA:lla (Lonza). Solujen irrotusta maljoilta testattiin aluksi raaputtamalla lastalla PBS:ään, mutta huonon solumäärän vuoksi siirryttiin käyttämään pelkästään trypsiiniä solujen irrottamiseen. Solujen kappalemäärien laskuun käytettiin TC10 Automated Cell Counteria (Bio-Rad).

Embigiiniä hiljennettiin soluista siLentFectillä (Bio-Rad) valmistajan ohjeen mukaan niin, että transfektiossa oli 75 nm siRNA:n konsentraatio ja solumäärä valittiin niin, että konfluenssi olisi siRNA:n lisäyksen aikoihin noin 50 % (6 cm maljat, jossa 260 000 solua tai vastaavasti 10 cm maljat, joissa 700 000 solua). Maljat valmistettiin 24 h ennen transfektiota. Mm_Emb_1 (emb1, QIAGEN) ja Mm_Emb_4 Flexitube (emb4, QIAGEN) siRNA:ita käytettiin tässä kokeissa hiljennyksiin. Negatiivisena kontrollina kokeissa käytettiin AllStars-siRNA:a (QIAGEN). Transfektion jälkeen solujen annettiin kasvaa maljoilla 24 h ja sen jälkeen ne jaettiin edelleen 85 - 90 % konfluenssissa. Proliferaatiokokeisiin solut irrotettiin maljoilta 24 h transfektioista ja mitattiin ensimmäisen kerran 48 h jälkeen hiljennyksestä. Sekvensointikokeiden hiljennyksien tarkistus tehtiin 48 h transfektion jälkeen.

5.2. Hiljennyksien onnistumisen tarkastus western blotilla

Hiljennyksien onnistumisen tarkastukset tehtiin western blotilla. Western blotteja varten valmistettiin 10 % SDS-PAGE -geeli. Proteiininäytteet lyysattiin SDS-näytepuskurissa (5% glyseroli; 1,7 % SDS; 1,6 % DTT; 0,002 % bromofenoli sininen; 0,05 M Tris-HCl pH 6,8) ja näytteet keitettiin 5 min, +100 °C. Geelille laitettiin näytteiden lisäksi kokomarkkeriksi BlueStar Plus Prestained Protein Marker (Nippon Genetics). Geelit ajettiin laitteen valmistajan (Bio-Rad) ohjeen mukaan: 60 V, 30 min, jonka jälkeen 120 V geelin alareunaan asti. Ajon jälkeen proteiinit siirrostettiin nitroselluloosamembraanille yön yli 32 V, +4 °C.

Siirrostuksen jälkeen membraani blokattiin maito-TBST:ssä (5 % maitojauhe, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 10 mM Tris-HCl) 30 – 60 min. Blokkauksen jälkeen membraani laitettiin 2 h kevyeen sekoitukseen putkessa, johon lisättiin primäärivasta-aineet maito-TBST:ssä (Embigin G7.43.1 eBioscience, 1:1000; β -aktiini Sigma-Aldrich 1:200000.) Sekoituksen jälkeen membraani pestiin TBST:llä (150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 10 mM Tris-HCl) neljä kertaa 3 – 5 min. Pesun jälkeen membraani siirrettiin maito-TBST:hen, johon lisättiin sekundäärivasta-aineet (1:15000 Odyssey anti-rat IRDye 800CW (LI-COR); 1:15000 Odyssey anti-mouse IRDye 680ER (LI-COR)) ja annettiin sekoittua kevyesti 1 h valolta suojattuna. Tämän jälkeen membraani pestiin edelleen valolta suojattuna TBST:llä neljä kertaa 3 – 5 min. Lopuksi membraanit skannattiin (Odyssey CLx) ja kuvat käsiteltiin sekä proteiinien määrät kvantitoitiin Image Studio-ohjelmalla (LI-COR).

5.3. Proliferaatiokoe

5.3.1. Solujen valmistelu ja kuoppalevyjen päällystys

Proliferaatiokokeissa embigiiniä hiljennettiin soluista (kohta 5.1.) negatiivisella kontrollilla, emb1- sekä emb4-siRNA:illa ja annettiin kasvaa 24 h hiljennyksestä, jonka jälkeen solut siirrettiin kuoppiin ja maljoille FAD-mediumissa. Kolmelle 96-kuoppalevyille jokaiseen tehtiin yön yli +4 °C 5 μ g/cm² fibronektiinipäällystys (F1141-5MG, Sigma-Aldrich) ja poly-L-lysiinipäällystys 5 μ g/cm² (P9155-5MG, Sigma-Aldrich), minkä jälkeen kuoppiin lisättiin 100 μ l soluja. Soluja laitettiin kuoppalevyn kaivoihin 2000 solua/100 μ l. Ilman päällystystä

oleviin kuoppiin lisättiin kontrolli, emb1-hiljennettyjä ja emb4-hiljennettyjä soluja niin, että jokaisesta tuli kolme rinnakkaista näytettä. Päälystetyille kuopille lisättiin myös soluja niin, että jokaisesta näytteestä tuli kolme rinnakkaista. Päälystetyt kuopat huuhdeltiin vielä ennen soluja PBS:ssä, jossa 0,1 % BSA, jotta solut eivät tarttuisi levyn pohjaan tyhjiin kohtiin kiinni. Samaan aikaan tehtiin maljat western blottia varten, joilla voidaan tarkistaa solujen hiljentymisen onnistuminen eri aikapisteissä: 48 h, 72 h ja 96 h hiljennyksen jälkeen.

5.3.2. Absorbanssimittaukset ja western blot -näytteet

24 h maljoille siirrostuksen jälkeen (48 h hiljennyksestä) tehtiin ensimmäinen absorbanssimittaus. Mittaukseen käytettiin Cell counting8 -kittiä (Dojindo). Elävien solujen absorbanssit mitattiin kitin valmistajan ohjeen mukaan kuoppalevylukijalla (Victor3, Perkin Elmer) 450 nm:ssä 1 h ja 2 h reagenssin lisäyksen jälkeen. Tästä mittapisteestä solut irrotettiin maljoilta western blottia varten. Solut irrotettiin trypsiinillä. Noin 400000 solua sentrifugoitiin (500 x g, 3 min) ja lyysattiin 80 µl SDS-näytepuskuriin. Sen jälkeen näytteet siirrettiin -70 °C. Sama työ toistettiin vielä 72 h ja 96 h jäkeen hiljennyksestä, jolloin saatiin kolmesta mittapisteestä sekä western blot -näytteet että absorbanssimittaukset kuoppalevyillä.

5.4. RNA:n sekvensointi ja rikastusanalyysit

5.4.1. Western blotit ja RNA:n eristys soluista

Sekvensointia varten embgiiniä hiljennettiin soluista kuten edellä 5.1.-kohdassa. Solut irrotettiin maljoilta 48 h hiljennyksen jälkeen (70 – 85 % konfluenssissa) ja näytteiden embgiinin hiljennyksen onnistuminen tarkastettiin western blotilla. Western blot -näytteen (noin 400000 solua/80 µl SDS-näytepuskurissa) valmistamisen jälkeen loppusolumäärästä eristettiin RNA. Solumassa sentrifugoitiin (500 x g, 3 min). RNA:n eristykseen käytettiin Nucleospin-RNA -kittiä (Macherey-Nagel) valmistajan ohjeen mukaan. RNA-näytteiden pitoisuus tarkistettiin Nanodropilla (ND-2000, Thermo Scientific). RNA-näytteitä valmistettiin neljä rinnakkaista erää, jotka tehtiin eri päivinä. Näytteet pakastettiin -70 °C.

100 ng/ μ l RNA-näytteet valmistettiin ja pakastettiin -70 °C ennen sekvensointiin lähetystä. Näytteiden pitoisuus ja puhtaus tarkistettiin vielä Nanodropilla.

Näytteet lähetettiin Finnish Functional Genomics Centreen (FFGC) sekvensointia varten. FFGC tarkisti näytteiden laadun Agilent Bioanalyzer 2100:lla. Näytteiden konsentraatiot tarkastettiin Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) ja/tai Nanodropilla (ND-2000, Thermo Scientific.) FFGC valmisti sekvensointinäytteet Illumina TruSeq® Stranded mRNA Sample Preparation Kitillä ja 300 ng näytteet analysoitiin Illumina NovaSeq 6000 SP:llä.

5.4.2. Chipster ja datan suodatus Excelissä

FFGC lähetti sekvensointidatan .fastq.gz-tiedostoina, jotka ladattiin Chipster-palveluun (Kallio ja muut 2011). Sekvensointidatan laatu tarkistettiin FastQC:llä (Andrews 2017) sekä MultiQC-työkaluilla (Ewels ja muut 2016). Sekvenssit rinnastettiin (engl. *alignment*) käyttäen STAR for paired end reads -työkalua (Dobin ja muut 2013). Referenssigenomina oli *Mus musculus.GRCm38.95*, joka on saatavilla Chipsterissä. Yhdelle geenilukemalle määriteltiin maksimirinnastuksien määräksi 10 ja lukemien yhteensopimattomien rinnastuksien sallittu määrä oli 10, jolloin jos lukemalle tuli yli 10 yhteensopimatonta rinnastusta ne suodattuivat pois.

Alignauksesta saadut .bam-tiedostot vietiin HTSeq-työkalulle (Anders ja muut 2015), joka laskee lukemien määrät joka geenille. Asetukset pidettiin muuten oletuksina paitsi koska datassa oli molemmat juosteet (engl. *stranded data*), valittiin käänteinen (engl. *reverse*) vaihtoehto, jolloin työkaluun toiseksi syötetyn tiedoston lukema sijoittuu samalle juosteelle kuin geeni ja ensimmäisen tiedoston lukemien on sijoitettava vastinjuosteelle. Referenssigenomiksi valittiin *Mus_musculus.GRCm38.95*. Tuloksena saatiin .tsv-tiedosto jossa on on geenilukemat taulukossa. Saaduille .tsv-tiedostoille tehtiin oletusasetuksilla pääkomponenttianalyysi PCA and heatmap -työkalulla (Love ja muut 2014), josta nähtiin, että jokaisen näytteen ensimmäisen replikaatin tulokset poikkesivat muista. Tämän perusteella ne jätettiin pois ja loppumääritykset tehtiin kolmella replikaatilla.

HTSeq:sta saatu .tsv-tiedostomuodossa olevat kaikkien näytteiden taulukot yhdistettiin Define NGS experiment -työkalulla, joka tekee yhteistaulukosta myös phenodata-tiedoston. Työkaluun vaihdettiin kokeen tyyppi RNA-seq, muuten käytettiin oletusasetuksia. Phenodata-tiedostoon määritettiin ryhmät negatiiviselle kontrollille (ryhmä 1), emb1-hiljennetyille soluille (ryhmä 2) sekä emb4-hiljennetyille soluille (ryhmä 3).

Yhdistetty .tsv-tiedosto siirrettiin edgeR for multivariate experiments -työkaluun (Robinson ja muut 2010) differentiaali geeniekspressioanalyysia varten. Työkalu vertaa muita ryhmiä kontrolliryhmään ja saa vertailusta laskettua logaritmisia muutokertoimia (engl. *logarithmic fold change*, logFC) sekä virheellisten löydösten osuudet (engl. *false discovery rate*, FDR) eri ryhmille. Työkalu normalisoi datan TMM-menetelmällä (Trimmed Mean of M-values), joka laittaa lähinnä keskiarvoa olevat lukemat vertailuarvoksi ja vertaa muita lukemia näihin arvoihin.

Saatuun edgeR-taulukkoon lisättiin tunnistet hiiren geneille Annotate Ensembl identifiers -työkalulla (Huber ja muut 2009), minkä jälkeen .tsv-tiedostomuodossa oleva taulukko ladattiin Chipsteristä ja avattiin Excelillä.

Excelissä datan suodatus tehtiin LogFC ja FDR mukaan niin, että näkyviin jää ainoastaan ne geenit, joiden logFC arvot ovat $>0,6$ ja $<-0,6$ sekä FDR-arvo on $<0,05$. LogFC as factor group2-palkki vertaa kontrollisolujen (ryhmä1) geenien lukemia emb1-hiljennettyjen solujen (ryhmä2) geenien lukemiin. Samat suodatukset voidaan lisätä emb4-hiljennettyjen solujen (ryhmä3) sarakkeeseen, jolloin saadaan vastaava vertailu kontrollisolujen ja emb4-hiljennettyjen solujen välille. Datasta tehtiin myös Volcano kuvaajat Originissa emb1-sarakkeille ja emb4-sarakkeille, joista nähtiin, että nämä suodatukset ovat hyväksyttäviä ja mielekkäitä käyttää.

5.4.3. Geenirikastusanalyysit

Suodatetusta taulukosta saatiin ne geenit, joiden lukemat ovat muuttuneet merkittävästi. Geenien nimilista ladattiin WebGestaltiin (Liao ja muut 2019). Tässä kokeessa valittiin yliedustusanalyysi (engl. *over-representation analysis*) ja geeniontologiasta biologiset

prosessit tarkasteluun. Tarkastelualueeksi valittiin 15 geenilukemaltaan tilastollisesti merkittävimmin muuttuneet biologiset prosessit. Samanlainen rikastusanalyysi kuin WebGestaltilla tehtiin myös Metascapella (Zhou ja muut 2019), johon ladattiin sama geenilista ja sama geeniontologia, biologiset prosessit, otettiin tarkasteluun.

Kolmas ohjelma mitä käytettiin oli PantherDB (Mi ja muut 2019). PantherDB:hen ladattiin sama geenilista ja siitä saatiin tuloksena eri biologisten prosessien osuudet soluissa. Geenirikastusanalyyseistä saadut kuvaajat tehtiin vielä uudelleen Originilla selkeyden ja suomennoksen vuoksi. Taustana kaikissa geenirikastusohjelmissa käytettiin suodattamatonta geenilistaa (edgeR:stä saatu taulukko .tsv-muodossa, 5.3.2.), jossa kaikki geenit ovat näkyvissä.

5.4.4. Tilastollinen analysointi

Hiljennyksen tilastollinen analysointi sekvensointinäytteiden western bloteista tehtiin riippumattomalla kahden otoksen t-testillä. Analysointi tehtiin kolmesta toistosta, jotka tehtiin eri päivinä. T-testi tehtiin käyttäen IBM SPSS Statistics 27 -ohjelmaa. Tilastollinen merkitsevyys saavutetaan p-arvolla 0,05.

6. Tulokset

Tämä työ koostui kahdesta kokonaisuudesta, sekvensointidatan analysoinnista sekä proliferaatiokokeesta. Laboratorio-osuus suoritettiin Turun yliopistossa biokemian laitoksen tiloissa alkuvuodesta 2020. Kummatkin työt saatiin tehtyä melko hyvin loppuun koronapandemian aiheuttamasta yliopiston sulkemisesta huolimatta. Ainoastaan proliferaatiokokeen hiljennyksen tarkistus western blotilla sekä kokeen toistamiset jäivät tekemättä tilanteen vuoksi.

6.1. Embigiini saattaa vaikuttaa munuaisten sekä urogenitaali alueiden kehitykseen

Embigiinin hiljennyksen vaikutuksia geeniekspressioprofiiliin alettiin tutkia keräämällä RNA-näytteet hiljennetyistä soluista. Hiiren keratinosyyttisolujen embigiini hiljennetään siRNA-menetelmällä (engl. *small interfering RNA*.) Menetelmä perustuu lyhyisiin RNA-sekvensseihin, jotka ovat komplementaarisia embigiinin geenisekvenssille. Nämä lyhyet RNA-sekvenssit saavat aikaan embigiinin lähetti-RNA:n pilkkoutumisen, jolloin embigiinin ilmentyminen estyy. Hiljennyksiin käytettiin kahta eri valmiiksi suunniteltua siRNA:ta (emb1- ja emb4-siRNA). Negatiivisena kontrollina oli AllStars-siRNA samalta valmistajalta. Kummastakin hiljennyksestä sekä kontrollista tehtiin neljä replikaattia, jokainen eri päivänä, jotta saadaan mahdollisimman kattavaa ja luotettavaa dataa sekä minimoitua tavallisimpien virheiden aiheuttamat muutokset tuloksiin.

6.1.1. Embigiinin hiljennys onnistui Western blottien mukaan

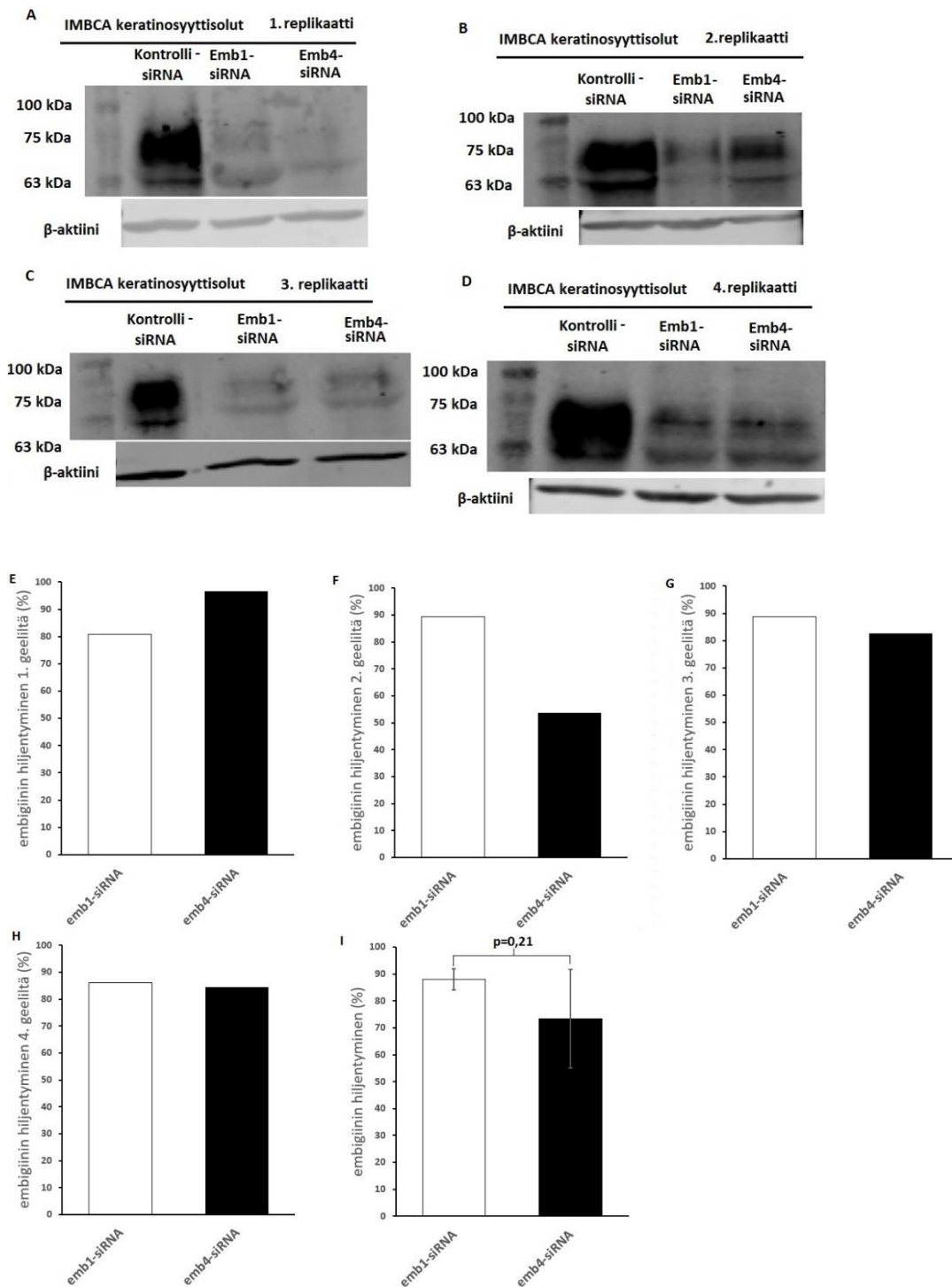
Näytteiden embigiinin hiljentymisen onnistumista tarkasteltiin ennen sekvensointia Western blotilla. Näytteet tehtiin soluista, joista eristettiin RNA 48 h hiljennyksen jälkeen. Aluksi ensimmäisten näytteiden valmistuksessa käytettiin vahvempaa SDS-näytepuskuria proteiinien lyysaukseen, mutta sen huomattiin hankaloittavan näytteiden käsittelyä muuttaen ne liian viskooseiksi. Tämän vuoksi siirryttiin käyttämään puolet laimeampaa näytepuskuria käsittelyn helpottamiseksi.

Western blotit onnistuivat ja tuloksista nähdään, että embigiinin hiljennys yleisesti onnistui (kuva 5 A-H). Embigiini glykosyloituu noin 70 kDA:n tienoille, ja sen ydinproteiinin koko on noin 37 kDA. Emb1-siRNA vähensi embigiiniä neljässä eri replikaatissa keskimäärin noin $86 \pm 3,9$ % ja emb4-siRNA noin 79 ± 18 % (keskiarvo \pm keskihajonta). Hiljennys oli siis huomattavaa kummallakin siRNA:lla verrattuna kontrolliin. Geelikuvien kvantitoinnin normalisointi tehtiin β -aktiinin suhteen. Tulokset osoittavat, että emb1-siRNA hiljensi tehokkaammin embigiiniä soluista kuin emb4-siRNA mutta erot ovat todella vähäiset. Kaikkien muiden replikaattien geelikuvat olivat vastaavanlaisia, paitsi ensimmäisten, jossa emb4-siRNA oli hiljentänyt embigiiniä tehokkaammin kuin emb1-siRNA (kuva 5 A). Lisäksi toisessa replikaatissa on hieman alhaisempi embigiinin hiljennys kuin muissa emb4-siRNA:lla hiljennettyjen solujen replikaateissa (kuva 5 B). Nämä seikat aiheuttavat suurehkon hajonnan emb4-siRNA:n hiljennyksen keskiarvoon.

Replikaatissa 1 embigiini väheni hiljennyksen vaikutuksesta emb1-siRNA:lla noin 81 % ja emb4-siRNA:lla noin 97 %. Replikaatissa 2 vastaavat luvut olivat 89 % ja 53 %, replikaatissa 3 89 % ja 83 % sekä replikaatissa 4 86 % ja 84 % (kuva 5 E-H).

Ensimmäisen replikaattisarjan western bloteissa emb4-siRNA hiljensi embigiiniä tehokkaammin kuin emb1-siRNA mutta myöhemmin saadusta sekvensointidatasta tehdyllä pääkomponenttianalyysillä se tullaan rajaamaan pois tarkasteluista, koska siitä huomataan ensimmäisen replikaatin tuloksien poikkeavan muista replikaateista. Eroavaisuudet saattavat johtua SDS:n lisäyksestä aiheutuvasta näytteen viskoosiudesta tai siitä, että näytteet olivat pidempään -70 °C kuin muut replikaatit.

Kun ensimmäinen replikaatti jätetään pois tulosten tarkastelusta, saadaan embigiinin vähenemisen uusiksi keskiarvoiksi emb1-siRNA:lla $88 \pm 1,8$ % ja emb4-siRNA:lla 73 ± 17 % (keskiarvo \pm keskihajonta). Tilastollinen analyysi embigiinin hiljennyksistä tehtiin riippumattomalla kahden otoksen t-testillä, josta saatiin että tulos ei ole tilastollisesti merkittävä p-arvolla 0,21. Tämä tarkoittaa, että molemmat siRNA:t hiljentävät embigiiniä käytännössä yhtä tehokkaasti (kuva 5 I).



Kuva 5. Embigiinin hiljennys onnistui. A-D: Replikaattien 1-4 geelikuvat. Embigiini glykolysoituu näissä soluissa noin 70 kDa:n tienoille, mikä näkyy western bloteissa vahvana mustana alueena. E-H: Embigiinin hiljentyminen prosentteina 1-4 geeleiltä. I: 2-4 replikaattien hiljentymisen keskiarvot, $p=0,21$ (ei tilastollista merkitsevyyttä.) Kuvassa keskiarvo \pm keksihajonta. Normalisoitu β -aktiinin suhteen.

6.1.2. RNA-näytteiden laatu tarkistettiin ja lähetettiin sekvensoitaviksi

Western blot -menetelmällä osoitetun embigiinin hiljennyksen jälkeen soluista eristettiin RNA. RNA eristettiin Nucleospin-kitillä valmistajan ohjeen mukaan. Eristys perustuu RNA:n kykyyn sitoutua putkessa olevaan kalvoon, jonka jälkeen näytettä pestään pesupuskureilla ja lopuksi puhdas RNA irrotetaan vedellä, jossa ei ole RNAasia, pois putkesta. Näytteiden pitoisuus ja puhtaus tarkistettiin tässä kohtaa Nanodropilla, jotta voidaan varmistua että RNA on saatu eristettyä onnistuneesti eikä se ole kontaminoitunut. Saatujen RNA-näytteiden A260/A280 -suhteet olivat hyväksytyllä 2,08 – 2,20 välillä ja ne pakastettiin -70 °C odottamaan lähetystä. Kun kaikki neljä replikaattia oli tehty, näytteiden pitoisuus ja puhtaus tarkistettiin vielä Nanodropilla. Näytteistä laimennettiin 100 ng/μl -näytteet sekvensointia varten ja laimennosten puhtaus tarkistettiin samoin kuin edellä.

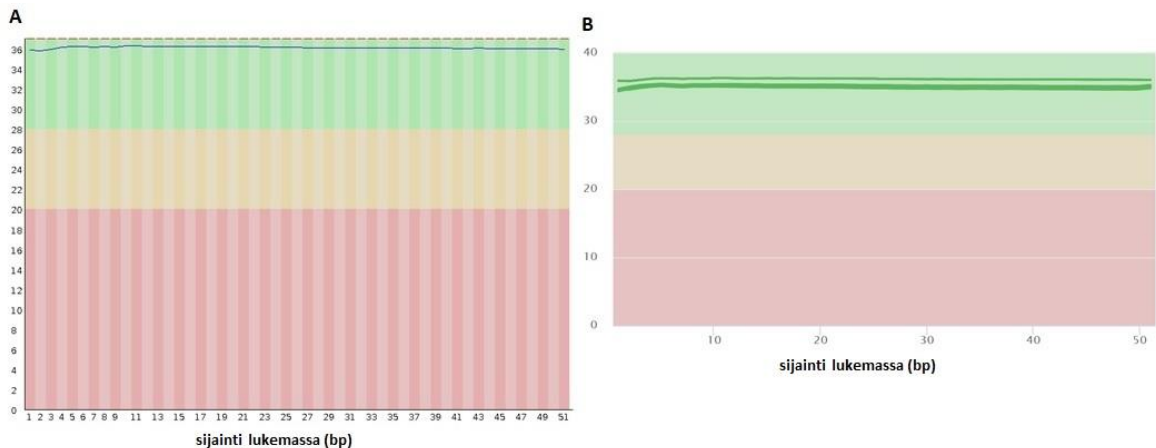
6.1.3. RNA-näytteiden sekvensointi NGS-menetelmällä

Näytteet lähetettiin Finnish Functional Genomic Centreen (FFGC) sekvensoitaviksi. Sekvensointiin käytettiin New Generation Sequencing (NGS) -tekniikkaa. Menetelmän perusperiaate on sama kuin perinteisessä Sangerin sekvensoinnissa mutta NGS:ssa ei käytetä dideoksinukleotidejä sekvensointiin. Aluksi sekvensoitavasta RNA:sta valmistetaan cDNA:ta. cDNA paloitellaan entsyymeillä tai ultraäänellä tarvittaessa. Tämän jälkeen saadut palat monistetaan paikallisesti ja nämä kirjastot sekvensoidaan sykleissä. Sekvensointi perustuu massiiviseen rinnakkaissekvensointiin, jolla voidaan sekvensoida samanaikaisesti miljoonia pätkiä kerralla. Tämä on helpompaa ja nopeampaa kuin perinteisemmät sekvensointimetodit.

FFGC tarkisti näytteiden puhtauden (A260/A280 arvot välillä 2,16 – 2,20), sekvensoi näytteet käyttäen edellä mainittua NGS-tekniikkaa ja lähettivät sen jälkeen sekvensoinnin tulokset .fastq.gz -tiedostoina. Lähetetyt näytteet olivat puhtaita ja sekvensointi onnistui muutenkin hyvin ilman ongelmia.

6.1.4. Sekvensointidatan laadunvarmistus sekä suodatuksen oikeellisuuden varmistus

Sekvensointidatan oikeellisuus varmistettiin latauksen yhteydessä vertaamalla jokaisen tiedoston tiivisteet (engl. *hash values*) FFGC:n lähettämään tiedostotiivistelistaan. Tiivisteiden luku muuttuu, jos tiedoston sisältö ei ole sama kuin lähettäjällä. Näin varmistettiin, että tiedostot eivät ole vioittuneet tai muuttuneet latauksesta. Sen jälkeen tiedostot ladattiin Chipster-palveluun. Palvelu mahdollistaa näytteiden datan laadunvarmistuksen yksitellen FastQC:llä (Andrews ja muut 2010) sekä MultiQC:lla (Ewels ja muut 2016) kaikki nipussa. Näytteiden laatu tarkistettiin kummallakin työkalulla, jotta voidaan olla varmoja siitä, että näytteissä ei ole vikaa ja että tällä datalla on mielekästä jatkaa analyysyjä. Työkaluista saatujen raporttien mukaan kaikkien näytteiden laatu oli hyvä, koska kuvaajassa data ei kertaakaan mennyt vihreältä alueelta keltaiselle tai punaiselle, mikä tarkoittaisi jo epävarmuutta datassa. Kaikkien näytteiden kuvaajat näyttivät samanlaisilta (kuva 6).

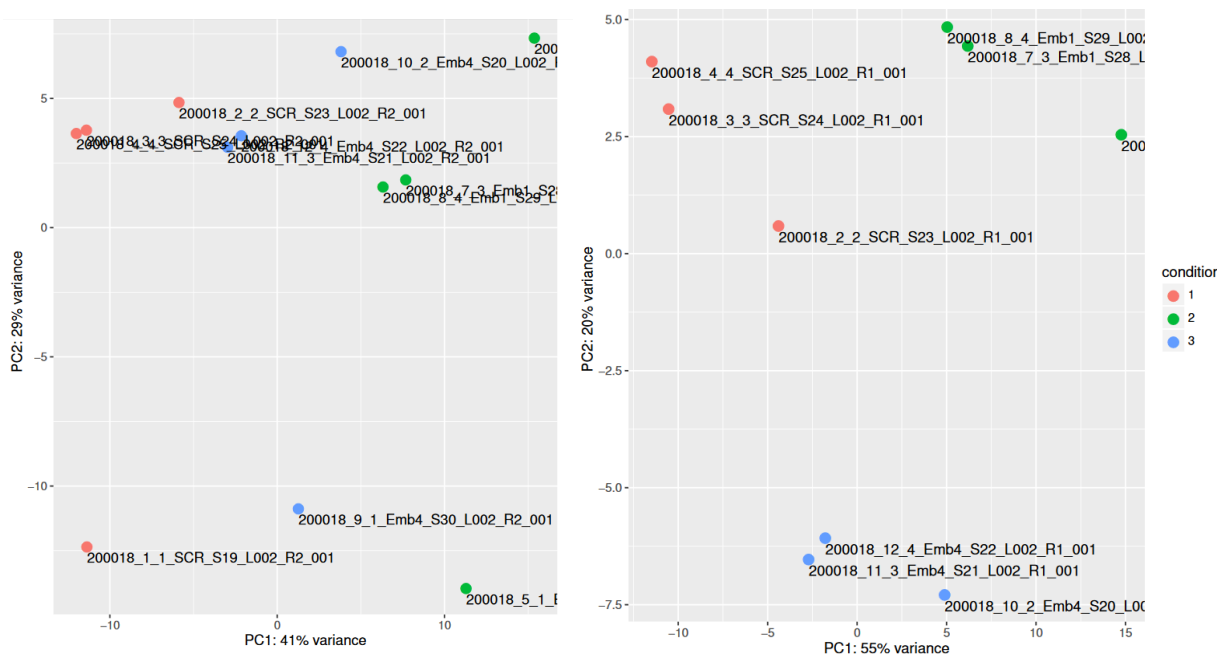


Kuva 6. Datan laatu oli hyvää FastQC ja MultiQC-työkaluilla tarkistettuna. A: FastQC:sta saadun yhden näytteen kuvaaja (Sanger / Illumina 1.9. koodaus). Kuvassa tyypillinen esimerkki. B: MultiQC:sta saatu kuvaaja kaikista näytteistä samassa kuvaajassa.

Pääkomponenttianalyysissä (engl. *Principle component analysis, PCA*) datasta etsitään ne keskenään riippumattomat komponentit, jotka ovat keskenään samankaltaisia ja sen perusteella voidaan poistaa poikkeavat datapisteet. PCA-työkalu käyttää näytteen geenilukemia ja normalisoi tämän datan. Työkalu laskee normalisoidulle datalle geometrisen keskiavon joka geenille näytteissä ja sen jälkeen jakaa geenilukemat tällä

arvolla. PCA-kuvaajaan saadaan silloin pisteet joka näytteelle riippumattomasti muista näytteistä. Mitä lähempänä pisteet ovat toisiaan kuvaajassa sitä enemmän ne ovat samankaltaisia keskenään.

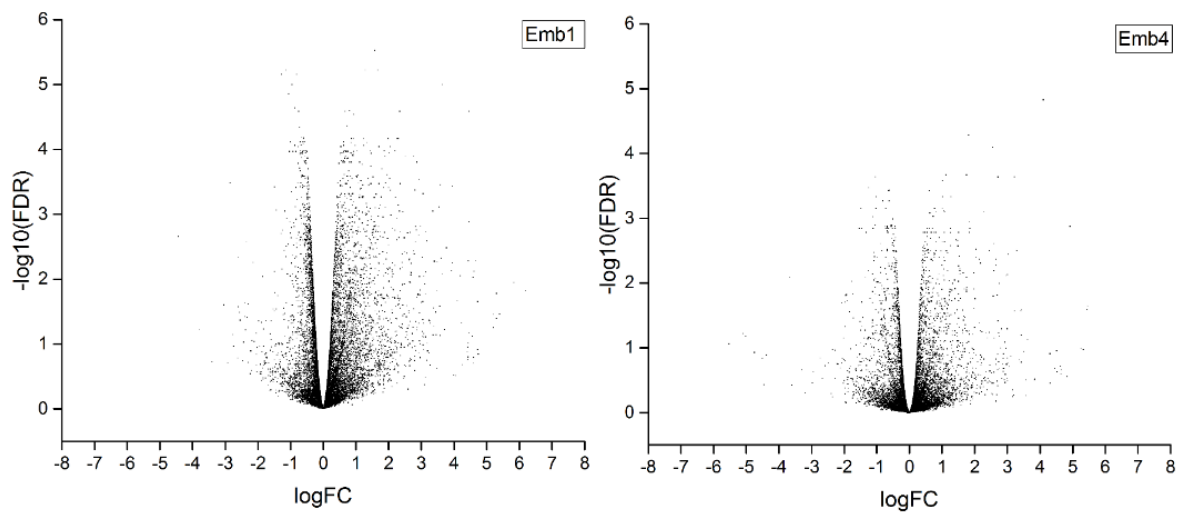
Pääkomponenttianalyysin tulokset osoittivat, että ensimmäisen replikaattisarjan tulokset poikkesivat muista (kuva 7). Vasemmasta kuvasta nähdään, että ensimmäisen replikaattisarjan kaikki kolme pistettä ovat paljon erillään muista. Oikeanpuoleisessa kuvaajassa on poistettu ensimmäinen replikaattisarja, jolloin pisteet ovat kaikki siististi samoilla alueilla. Tämän perusteella ensimmäisen replikaatin näytteet poistettiin jatkoanalyysistä. Ensimmäisen replikaattisarjan eroavaisuudet muista sarjoista saattaa johtua siitä, että ensimmäisen replikaatin embigiini-siRNA:t olivat eri erää kuin loppuhiljennykset sekä ne olivat -70 °C pakastimessa odottamassa pidempään lähetystä kuin muut replikaatit. Myös western blot -tulokset näyttivät poikkeavilta hiljennyksien suhteen. Näiden syiden perusteella ne jätettiin pois ja loppumääritykset tehtiin kolmella replikaattisarjalla.



Kuva 7. Pääkomponenttianalyysi osoittaa ensimmäisen replikaatin hiljennysten poikkeavan muista. Punaiset pisteet ovat kontrollinäytteitä, vihreät pisteet ovat emb1-siRNA:lla hiljennetyt näytteet ja siniset pisteet ovat emb4-siRNA:lla hiljennetyt näytteet.

Excelissä data suodatettiin niin, että vain tilastollisesti merkityksellisimmät muutokset geenien lukemissa sisällytetään. LogFC as factor group2-sarake vertaa negatiivisen kontrollin (ryhmä 1) geenien lukemia emb1-hiljennettyjen solujen (ryhmä 2) geenien lukemiin. LogFC-arvo kertoo kuinka moninkertaisesti lukema on kasvanut. Esimerkiksi logFC:n arvolla 1, geeninlukema on kasvanut kaksinkertaiseksi. FDR (p-arvo) kuvastaa tilastollista merkitsevyyttä. Käytetyllä suodatuksella saadaan vain tilastollisesti merkittävät muutokset geenilukemissa sisällytettyä tarkasteluihin. Korkeampi logFC luku tarkoittaa suurempaa ilmenemistä ja päinvastoin. Negatiivinen luku tarkoittaa, että geenin ilmentyminen on vähentynyt. Näillä suodatuksilla sisällytetään tarkasteluun ainoastaan ne geenit, joiden ilmentäminen on muuttunut vähintään 1,5-kertaisesti joko vähenevästi tai nousevasti verrattuna kontrollinäytteeseen. Myös geenien raakadatan lukumääriä suodatettiin niin, että geenillä pitää olla vähintään 50 geenilukemaa edes yhdessä näytteessä, jotta geeni sisällytetään tarkasteluun. Näin pyritään varmistamaan, että geenin muutos on oikeasti merkittävä, eikä sattumaa. Lisäksi geenin pitää olla kummassakin ryhmässä, sekä emb1-siRNA:lla että emb4-siRNA:lla hiljennetyissä soluissa, samansuuntaisesti muuttuneita tullakseen sisällytetyksi. Esimerkiksi transgelin-geenin logFC-arvot ovat emb1-hiljennetyissä sekä emb4-hiljennetyissä soluissa arvoltaan negatiivisia, jolloin se otetaan mukaan analyysiin. Koska emb1-siRNA oli tehokkaampi hiljentämään embiginiä, sen ryhmän tuloksia verrattuna kontrolliin käytettiin pääsääntöisesti tässä tutkimuksessa.

Suodatuksiin käytetyt raja-arvot tarkistettiin vielä tekemällä Volcano kuvaajat sekä emb1-hiljennettyjen solujen että emb4-hiljennettyjen solujen geenilistoista (kuva 8). Volcano kuvaajista näkyy, että käytetty $>0,6$ ja $<-0,6$ logFC:n arvo on kummallakin hiljennyksellä mielekäs käyttää ja rajaa pois tilastollisesti ei-merkittävästi muuttuneet geenit. Volcano ploteista nähdään, että valittujen logFC:n arvojen $0,6$ sekä $-0,6$ välissä on suuri joukko vähiten määrältään muuttuneita geenejä, jolloin ne voidaan rajata pois kummastakin siRNA-hiljennyksestä. Mielenkiintoisimmat ja tilastollisesti merkittävimmin muuttuneet geenit löytyvät kuvaajista mahdollisimman kaukaa keskiosasta ja ylhäältä.

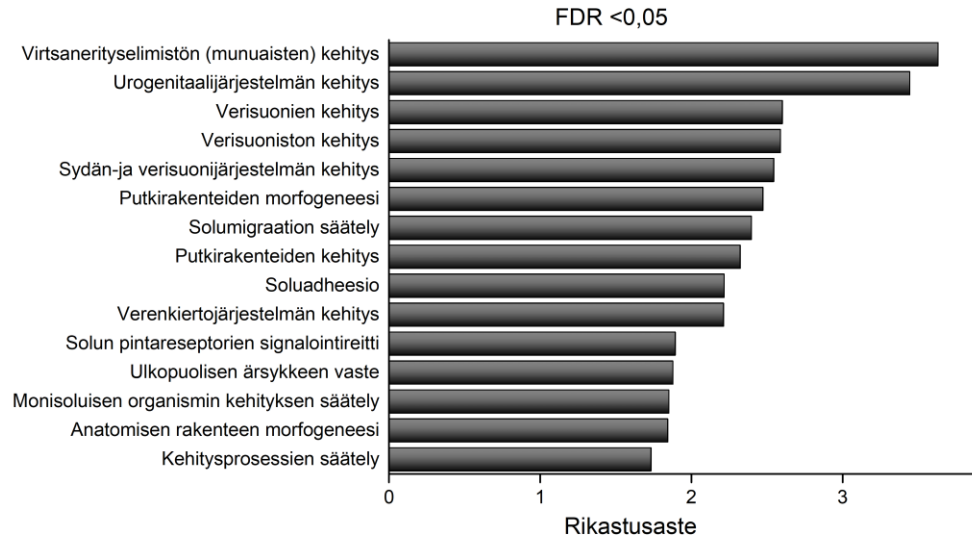


Kuva 8. LogFC:n arvoja 0,6 ja -0,6 on kummallakin hiljennyksellä mielekäs käyttää. Volcano kuvaajissa musta piste kuvaa yhtä geeniä.

6.1.5. Geenirikastusanalyseistä huomattiin munuaisten kehityksen sekä urogenitaali järjestelmän kehityksen geenien rikastuneen hiljennyksen vuoksi

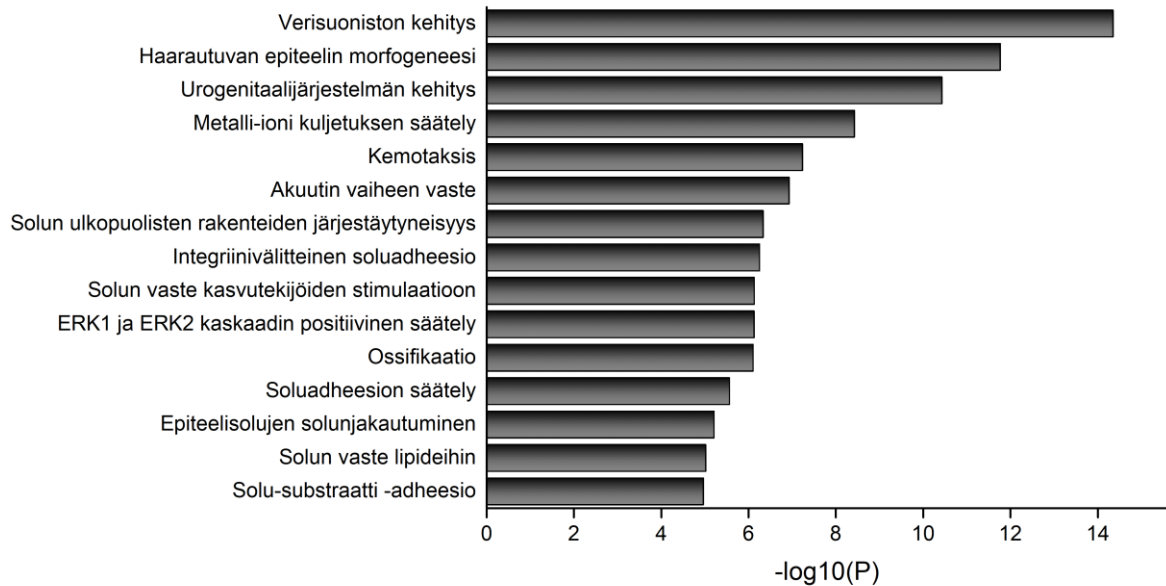
Webgestaltissa tehty yliedustusanalyysi kertoo paljonko tietyn kategorian geenit ovat yli- tai aliedustettuina ohjelmaan ladatussa geenilistassa. Tässä kokeessa valittiin geeniontologiasta biologiset prosessit tarkasteluun. Biologiset prosessit kertovat, mihin kaikkiin suurempiin kokonaisuuksiin proteiini kuuluu. Yksittäinen proteiini voi kuulua useampaankin kategoriaan, esimerkiksi proteiini voi kuulua samanaikaisesti sekä verisuoniston kehitykseen että verisuonien kehitykseen. Tarkasteluun valittiin 15 tilastollisesti merkittävintä geenimäärältään muuttunutta biologista prosessia, jotka ovat muuttuneet hiljennetyissä soluissa verrattuna kontrollisoluihin. Geenirikastusanalyysi ei ota kantaa, onko geenien lukemat kasvaneet vai vähentyneet.

Webgestaltista saaduista tuloksista nähdään, että munuaisten ja urogenitaali alueiden kehityksen geenit ovat rikastuneet merkittävästi embigiinin hiljennyksen vaikutuksesta (kuva 9). Tulokset osoittavat, että embigiinin hiljennyksellä on vaikutusta erilaisiin kehitysprosesseihin.



Kuva 9. Webgestalt-rikastusanalyysin tulokset, biologiset prosessit geeninontologiana. Embigiinin hiljennyksen rikastamia mielenkiintoisten prosessien genejä ovat munuaisten kehitys, urogenitaalijärjestelmän kehittyminen sekä useiden biologisten putkirakenteiden kehitykset.

Metascape antaa tuloksen rikastuneista geeneistä eri biologisissa prosesseissa (klustereissa). Log10P kuvastaa tilastollista merkitsevyyttä: mitä pienempi arvo, sitä tilastollisesti merkittävämpi tulos on. Metascape antoi hieman eri tuloksen kuin Webgestalt mutta kuitenkin molemmat olivat samansuuntaisia ja kummassakin on samat tai samantyylliset prosessit listan kärjessä (kuva 10). Tuloksissa verisuoniston kehityksen (engl. *vasculature development*) ja haaroittuvan epiteelin morfogeneesin geenit ovat rikastuneet eniten. Myös solun ulkopuolisen rakenteiden järjestäytyneisyyteen liittyvät geenit ja metalli-ionikuljetuksen geenit ovat rikastuneet, mikä saattaa viitata matriksin metalloproteiinaaseihin ja niiden säätelyyn osallistumisesta.

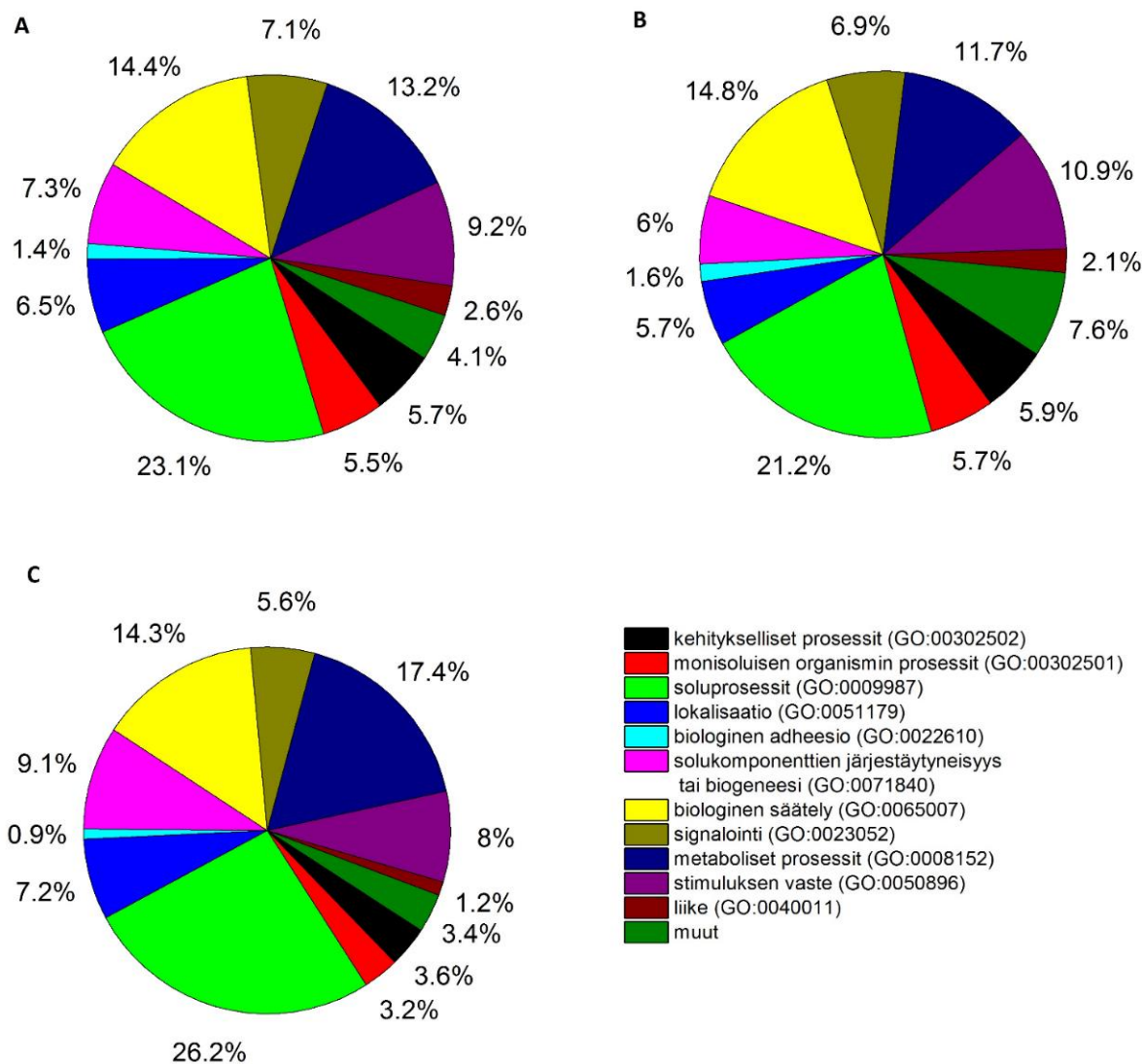


Kuva 10. Metascope-geeninrikastusohjelmasta saatu 15:den eniten rikastuneen biologisen prosessin kuvaaja. Metascopeen ladattiin sama geenilista kuin Webgestaltiin. Geeniontologiana on sama biologiset prosessit kuin edellä WebGestaltissa.

6.1.6. Embigiinin hiljennys vaikuttaa monen eri biologisen prosessin geeniosuuksiin

Panther DB -geeninrikastusohjelmasta tuloksena saatiin piirakkadiagrammi, jossa näkyy minkä biologisten prosessien geenien määrät ovat muuttuneet. Panther DB:hen ladattiin sama geenilista kuin edellä ja sen jälkeen ohjelma jakoi geenit niiden biologisten prosessien toiminnan perusteella. Tuloksista nähdään, että lokalisatoin, solukomponenttien järjestäytyneisyyden, biogeneesin sekä soluprosessien geeniosuudet ovat vähentyneet. Vastaavasti huomionarvoisia prosesseja, joissa geeniosuudet ovat kasvaneet, ovat signaalointi, biologinen adheesio, stimuluksen vaste sekä kehitykselliset prosessit.

Embigiinillä on havaittu olevan vaikutusta solun liikkeeseen ja migraatioon syövässä (Chao ja muut 2015; Jung ja muut 2016). Tästä on kuitenkin ristiriitaista tietoa, että vaikuttaako se edistävästi vai estävästi. Eriävä tulos aikaisemmissa tutkimuksissa saattaa johtua kokeissa käytetyistä erilaisista syöpäsolulinjoista. Geenien osuuksien väheneminen tässä opinnäytetyössä voisi viitata liikkeen sekä migraation estämiseen mutta lisätutkimukset aiheesta ovat tarpeen.



Kuva 11. PantherDB:stä saadut tulokset, joista nähdään embigiinin hiljennyksen vaikutukset eri biologisten prosessien prosenttiosuuksiin keratinosyöttisolussa. A: Emb1-siRNA:lla hiljennettyjen solujen biologisten prosessien osuudet. B: Emb4-siRNA:lla hiljennettyjen solujen biologisten prosessien osuudet. C: Kaikki geenit sekvensoinnista. Normaalitilanne kontrollisolussa, joissa ei ole embigiinin hiljennystä.

6.1.7. Munuaisen kehityksen geenien suurimmat muutokset ovat putkimaisten rakenteiden kehityksen geneeissä

Aiemmista tuloksista nähdään, että munuaisten kehityksen geenit ovat rikastuneet embigiinin hiljennyksen vuoksi. Tämän vuoksi Webgestaltin tuloksista rajattiin pelkästään munuaisten kehityksen geenit tarkasteluun (taulukko 1). Tässä tarkasteluun otettiin ne geenit, joiden logFC arvot ovat >1 tai <0, jolloin esimerkiksi logFC:n arvolla 1 geenilukema on kasvanut kaksinkertaiseksi. Tulokset osoittavat, että integriinin β 4:n geenilukemat ovat kasvaneet eniten emb1-hiljennetyissä soluissa suhteessa kontrolliin ja sentrosomaalinen proteiini 55:n geenilukemat vastaavasti vähentyneet. Näistä useat geenit osallistuvat putkimaisten rakenteiden kehitykseen, esimerkkinä juuri sentrosomaalinen proteiini 55. Lisäksi myös verisuonituksen, niiden kehityksen sekä vasokonstriktion geenilukemat ovat kasvaneet, esimerkkinä angiotensiiniä konvertoiva entsyymi.

Taulukko 1. Munuaisten kehityksen geenien logFC-arvot, emb1-hiljennetyissä soluissa verrattuna kontrollisoluihin. Taulukoituna ne geenit, joiden logFC >1 tai <0.

Lyhenne	Nimi	logFC
Itgb4	integriini β 4	1,82
Bmper	BMP:tä sitova endoteelinen säätelijä	1,71
Aqp1	akvaporini 1	1,69
Ace	angiotensiini 1:tä konvertoiva entsyymi	1,68
Pdgfrb	verihitaleperäinen kasvutekijäreseptori beta	1,57
Fat4	FAT epätyypillinen kadheriini 4	1,48
Cited1	Cbp/p300-vuorovaikuttava transaktivaattori, jossa Glu/Asp-rikas karboksiterminaalinen domain 1	1,40
Ass1	arginiinisukkinaatti syntetaasi 1	1,25
Sulf1	sulfataasi 1	1,23
Ednra	endoteliinireseptori, tyyppi A	1,17
Has2	hyaluronaani syntaasi 2	1,15
Angpt2	angiopoietiini 2	1,11
Grem1	gremlin 1	1,07
Glis2	GLIS perheen sinkkisormiproteiini 2	-0,62
Smo	smoothened, luokan F reseptori	-0,71
Npnt	nefronektiini	-0,83
Wnt7b	wingless-tyypin MMTV integraatiokohdan jäsen 7B	-0,89
Hnf1b	HNF1 homeobox B	-0,94
Yap1	yes-linkitetty proteiini 1	-0,97
Acta2	aktiini α 2	-1,07
Cep55	sentrosomaalinen proteiini 55	-1,14

6.2. Proliferaatiokokeen tulokset

Solunjakautuminen on nisäkkäiden kehitykselle tärkeä tapahtuma, sillä kaikki kehitys ja kasvu tarvitsee solunjakautumista tapahtuakseen. Esimerkiksi erilaiset putkimaiset rakenteet, kuten munuaistiehyt, vaativat solunajakutumista muodostuakseen ja kehittyäkseen. Proliferaatiokokeilla tutkitaan solujen solunajakautumiskykyä. Koetta käytetään solujen toiminnan selvittämiseen eri olosuhteissa. Solut laitetaan erilaisiin ympäristöihin tai niitä käsitellään jollakin tavalla. Proliferaatiokokeilla voidaan tarkastella ja vertailla esimerkiksi solujen määrän muutosta ajan suhteen, solujen jakautumisten lukumäärää, metabolista aktiivisuutta tai DNA:n synteesiä.

Western blotteja, joilla hiljennyksen onnistuminen olisi tarkastettu, ei voitu ajaa koronavirustilanteen vuoksi. Koetta olisi myös toistettu mikäli tilanne olisi ollut erilainen. Western blot -näytteet joka aikapisteestä (48 h, 72 h ja 96 h hiljennyksen jälkeen) tehtiin valmiiksi -70 °C:een. Tässä työssä oletetaan hiljennyksen onnistuneen, koska hiljennys tehtiin samalla tavalla kuin sekvensointityössä ja siinä hiljennykset onnistuivat hyvin.

Tässä kokeessa käytetyn Cell Counting Kit-8:n mittaus perustuu elävien solujen dehydrogenaasien toimintaan, joka muuttaa kitin mukana tulevan reagenssin oranssinväriseksi formazaaniksi. Absorbanssi voidaan mitata 450 nm 96-kuoppalevyllä, jolloin voidaan arvioida elävien solujen määrää. Mitä enemmän väriä muodostuu, sitä enemmän eläviä soluja kuopassa on.

Proliferaatiokokeessa käytettyyn solumäärään päädyttiin testaamalla ennen varsinaista koetta pelkällä käsittelemättömällä kuoppalevyllä, missä kuopissa oli 1000, 2000 ja 3000 solua/100 ul. Tästä käsittelemättömällä soluviljelymuovilla tehdystä kokeesta nähtiin, että 2000 solua/100 ul on sopiva määrä kuopissa, sillä siitä saatiin isompi määrä soluja ja tila riitti vielä kuopissa ilman että solut kuolivat tilanpuutteeseen. Tällä solumäärällä jatkettiin varsinaiseen proliferaatiokokeeseen, jossa kuopat päällystettiin fibronektiinillä tai poly-l-lysiinillä. Lisäksi jätettiin yksi päällystämätön solurivi, josta nähdään vastaako kasvut soluviljelyssä havaittuja kasvutrendejä. Jokaisen eri pinnan kaivoihin laitettiin kolme rinnakkaista näytettä jokaisesta siRNA-käsittelystä. Absorbanssit mitattiin sekä 1 h ja 2 h

reagenssin lisäyksen jälkeen. 1 h ja 2 h mittapisteiden välillä ei ollut merkittävää eroa absorbanseissa, joten tässä työssä valittiin 1 h mittapiste tarkasteluun.

6.2.1. Soluviljelymuovilla kasvaneet solut vastasivat soluviljelyssä havaittua kasvua

Käsittelemättömällä soluviljelymuovilla kasvaneet solut kasvoivat samoin kuin soluviljelyissäkin (kuva 12 A). Yleisesti emb1-hiljennetyt solut kasvavat hieman hitaammin kuin emb4-solut ja kontrollisolut kasvavat selkeästi tehokkaimmin. Emb4-hiljennetyt solut kasvavat melkein yhtä hyvin kuin kontrollisolut joissain tapauksissa, mitä ei soluviljelystä oikeastaan huomattu kertaakaan.

6.2.2. Hiljennyksen vaikutus lakkaa 72 h jälkeen

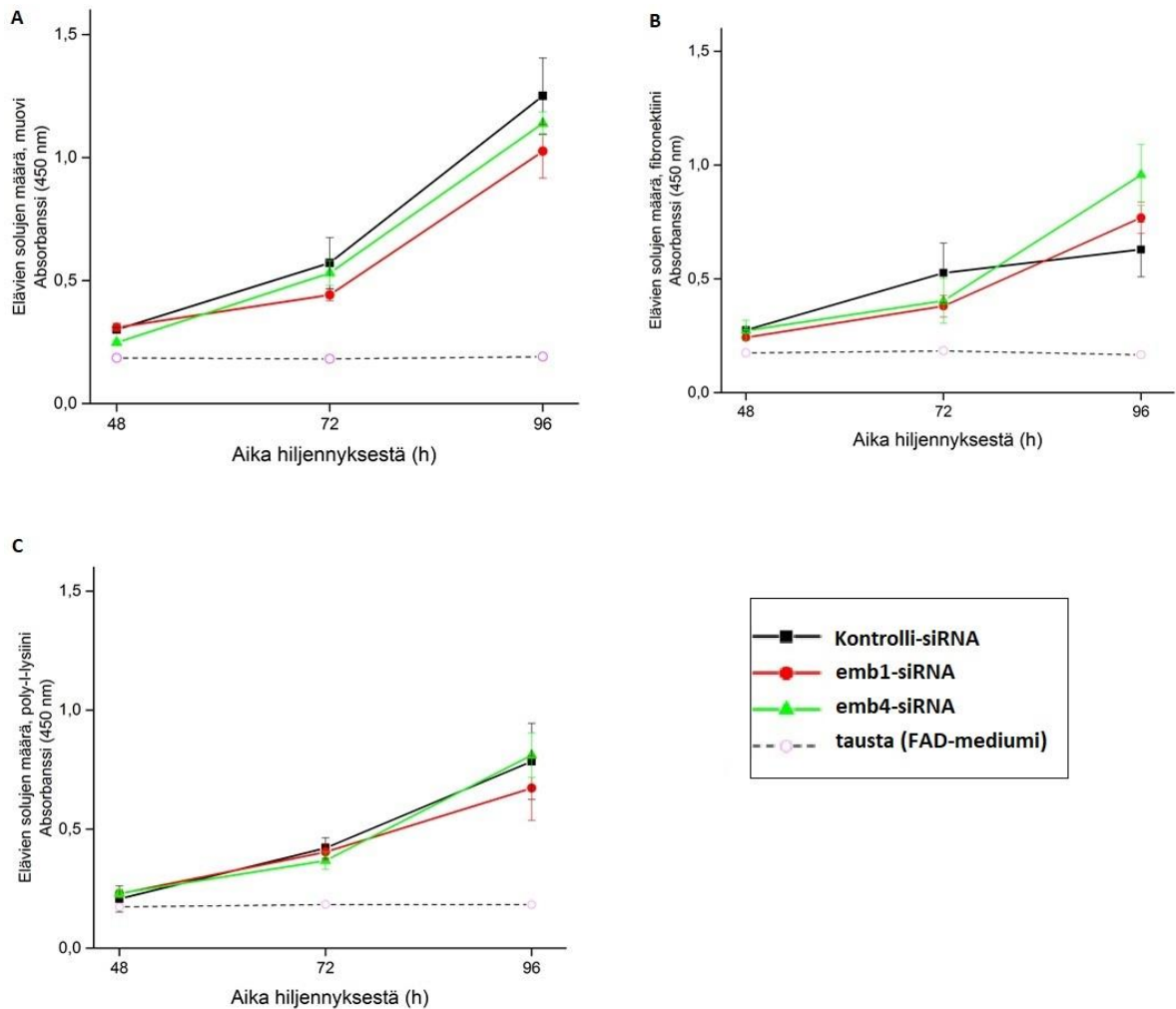
Fibronectiinipinnalla huomattiin jo vähän eroa kontrollisolujen ja hiljennettyjen solujen välillä. Embigiinin on huomattu sitoutuvan fibronectiiniin ja tuloksista huomataan, että sen hiljennys vaikuttaa solujen kykyyn jakautua tällä pinnalla. Tulosten mukaan 96 h kohdalla kontrollisolut kasvaisivat vähemmän kuin emb1- ja emb4-hiljennetyt solut, mutta luultavasti kuopissa on loppunut tila kesken, jolloin elävien solujen määrä on vähentynyt (kuva 12 B).

Fibronectiinipinnalla emb4-hiljennetyt solut jakautuvat hieman enemmän kuin emb1-hiljennetyt solut (kuva 12 B.) Tulokset osoittavat, että emb1- ja emb4-hiljennettyjen solujen jakautuminen hiipuu hieman fibronectiinin päällä verrattuna kontrollisoluihin 72 h kohdalla. Kuvaajasta nähdään myös, että solumäärällisesti emb1-hiljennettyjä soluja on vähemmän kuin emb4-hiljennettyjä soluja. Tämä on ymmärrettävää, sillä western bloteista edellä havaittiin emb1-siRNA:n hiljentävän embigiiniä tehokkaammin kuin emb4-siRNA (kuva 5 A-D.)

Poly-l-lysiinikuopat olivat kontrollikuoppia, joista tarkistettiin, että solut eivät ole kärsineet käsittelyistä. Solujen tiedetään kiinnittyvän ja jakautuvan sen päällä ja interaktio ei ole riippuvainen tutkittavasta proteiinista. Kuvaaja näyttää, että solut ovat toimintakuntoisia ja

ettei solujen jakautumisessa tapahtunut lasku fibronectiiniin päällä johdu esimerkiksi siitä, että solut olisivat kärsineet käsittelyistä. Tässä kokeessa solut kasvoivat poly-l-lysiinin päällä ilman ongelmia, joten voidaan olettaa, että solut eivät ole kärsineet käsittelyistä. (kuva 12

C)



Kuva 12. Keratinosyyttisolujen jakautuminen heikentyy embigiinin hiljennyksen myötä ja hiljennyksen vaikutus lakkaa 72 h jälkeen. Kuvissa esitetty yhden kokeen keskiarvo \pm keskihajonta, kolmesta replikaatista ($n=3$, tekninen replikaatti). Absorbanssit mitattu 450 nm, 1 h reagenssin lisäyksen jälkeen. A: Käsittelemättömällä soluviljelymuovilla kasvaneet solut. B: Fibronectiinipinnalla kasvaneet solut. C: Poly-l-lysiinipinnalla kasvaneet solut.

7. Tulosten tarkastelu

Embigiinin tehtävät tunnetaan vielä huonosti. Tutkimuksen tavoitteena oli avata mihin biologisiin prosesseihin embigiinin hiljennys vaikuttaa ja saada lisää selvyyttä embigiinin tehtävistä. Embigiinin tehtävät ovat vielä pitkälti hämärän peitossa, mutta tämä tutkimus pyrkii tuomaan lisää tietoa embigiinin osasta alkionkehityksessä ja siitä missä biologisissa prosesseissa embigiiniä saattaa ilmentyä. Tutkimus tukee myös edeltäviä havaintoja embigiinin arvelluista tehtävistä alkionkehityksessä.

7.1. Embigiini vaikuttaa mahdollisesti putkimaisten rakenteiden muodostukseen

Tämän kokeen tuloksien perusteella voidaan sanoa, että embigiini saattaa osallistua erilaisten putkimaisten rakenteiden muodostumiseen. Professori Jyrki Heinon tutkimusryhmä Turun yliopistosta on onnistunut näyttämään, että embigiiniä on putkimaisten rakenteiden ympärillä alkionkehityksen aikana. Sitä ilmentyy muun muassa kiveksissä, lisäkiveksissä ja munuaisissa sekä keuhkoissa (julkaisematon tutkimus). Myös Tabula Muriksesta löytyvästä hiiren geeniekspressiokartasta embigiiniä ilmentyy esimerkiksi juuri näissä edellämainituissa putkimaisten rakenteiden kudoksissa. Tabula Murikseen on koottu hiiren transkriptomidata yksittäisten solujen RNA:n sekvensoinneista (engl. *single cell RNA sequencing*), josta voi tarkastella tietyn geenin ilmentymistä eri kudoksissa. (Schaum ja muut 2018)

Tämän opinnäytetyön rikastusanalyysituloksien perusteella embigiinin ilmentyminen vaikuttaisi erityisesti munuaisiin sekä urogenitaali alueisiin. Sekä WebGestalt että Metascape geenirikastusanalyysien tulokset antavat viitteitä siitä, että embigiinillä on vaikutusta munuaisten, urogenitaali järjestelmän sekä tubulaarirakenteiden kehityksessä. Lisäksi putkimaisten rakenteiden kehityksen sekä putkimaisten rakenteiden morfogeneesin geenit ovat rikastuneet embigiinin hiljennyksen myötä.

Embigiinin määrä on suurimmillaan alkionkehityksen alkuvaiheessa, mikä saattaa selittää osaltaan sen, että monet kehitysprosessit sekä erilaisten elinten ja putkirakenteiden muodostumisen geenit ovat rikastuneet. Tämä saattaa selittää myös miksi embigiinin

hiljennys rikastaa useita kehitykseen liittyviä biologisia prosesseja. Myös solun migraation ja soluadheesion geenit ovat rikastuneet. Embigiinin on arveltu olevan yhteistyössä soluadheesioproteiinien, esimerkiksi integriinien kanssa, joten tämä tulos ei yllätä. (Guenette ja muut 1997)

Tämä tulos osoittaa, että embigiini osallistuu ehkä solujen erilaistumiseen sekä putkimaisten rakenteiden muodostumiseen ja haaroittumiseen. Edeltävät havainnot embigiinin toiminnasta ja mikä sen tehtävän on arveltu olevan tukevat tätä tulosta. Embigiiniä on aiemmin löydetty etenkin alkionkehityksen alkuvaiheista ennen organogeneesivaihetta (Huang ja muut 1990; Pridans ja muut 2008). Embigiiniä on myös löydetty lisääntymiselimistä yhdessä MCT2:n kanssa (Mannowetz ja muut 2012). Embigiinillä on havaittu jo aikaisemmin olevan vaikutusta solun ulkopuolisen matriksin järjestäytyneisyyteen ja matriksin metalloproteinaaseihin (Lain ja muut 2009; Jung ja muut 2016).

Stuart ja muut (Stuart ja muut 2003) tutkivat geenien ilmentymistä munuaisen eri kehitysvaiheissa. Heidän tutkimus erityisesti kohdistui uretersilmuun sekä metanfriseen mesenkyymiin. Heidän tutkimuksessa viiden päivän ikäisestä (E5) rotan uretersilmukasvatuksesta in vitro huomattiin embigiinin ilmentyneen vahvasti. Uretersilmu on putkimainen rakenne, joka haaroittuu voimakkaasti. He arvioivat, että embigiini toimisi uretersilmun kehityksessä solun ja solun ulkopuolisen matriksin vuorovaikutuksia edistävänä tekijänä (Stuart ja muut 2003). Stuartin kokeen tutkimustulokset vaikuttavat tukevan tämän opinnäytetyön rikastusanalyysien tuloksia, joista huomattiin hiljennyksen johdosta erityisesti muutoksia munuaisten kehityksen geneeissä sekä putkimaisten rakenteiden kehityksen geneeissä. Tämän opinnäytetyön tuloksien perusteella embigiinin tehtävänä saattaa olla kaiken muun lisäksi munuaisten ja urogenitaalialueiden putkimaisten rakenteiden kehittyminen ja niiden haaroittumisen edistäminen.

Silbersteinin tutkimustulokset (Silberstein ja muut 2016) tukevat tämän tutkimuksen tuloksia, joiden mukaan embigiini osallistuu hematopoieesiin. Tämän opinnäytetyön tutkimustuloksista nähdään verenkiertojärjestelmän kehityksen sekä verisuonituksen kehityksen geenien rikastuneen. Tabula Muriksesta tarkastettuna embigiiniä myös ilmentyy

luuytimen useassa eri solussa, mikä vahvistaa tämän työn tuloksien varmuutta. (Schaum ja muut 2018.) Silbersteinin tutkimuksessa on lisäksi huomattu, että naapurisolut estävät embigiiniä (Silberstein ja muut 2016). Estäminen saattaa vaikuttaa heikentävästi esimerkiksi solunjakautumiseen, putkimaisten rakenteiden haaroittumisen ja niiden pitenemisen edistämiseen.

7.2. Embigiinin hiljennys vaikuttaa munuaisen kehitykseen osallistuvien geenien ilmentymiseen

Tulosten perusteella tarkasteltiin vielä lisäksi miten sekvensoinnista saatu aineisto solujen geenilukemista ja niiden logFC-arvoista munuaisten kehityksessä sekä putkimaisten rakenteiden kehityksessä tukee edellä tehtyjä havaintoja. Tarkasteluun otettiin geenirikastusanalyyseistä saatu munuaisten kehityksen (engl. *renal system development*) geenilista (taulukko 1), josta nähdään mihin yksittäisiin geeneihin embigiinin hiljennys vaikuttaa munuaisen kehitykseen osallistuvien geenien osalta. Kaikkien seuraavaksi mainittujen proteiinien tehtävien selvittämiseen käytettiin Uniprot-tietopankkia (The UniProt Consortium 2021) ellei muuta lähdettä ole mainittu.

Geenilukemista kolme suurinta logFC:n negatiivista muutosta ovat sentrosomaalinen proteiini 55 (engl. *centrosomal protein 55*, Cep55, logFC -1,14), Aktiini $\alpha 2$ (engl. *actin, alpha2, smooth muscle, aorta*, Acta2, logFC -1,07) sekä yes-linkitetty proteiini 1 (engl. *yes-associated protein 1*, Yap1, logFC -0,97). Cep55 osallistuu aivojen ja munuaisten kehitykseen. Acta2 osallistuu solun tukirannan muodostukseen useissa eri solutyypeissä. Yap1 on transkription säätelijä ja sen säätely vaikuttaa elinten kokoon sekä tuumorin suppressioon apoptoosin ja solunjakautumisen säätelyn kautta. Muut paitsi Yap1 liittyy suoraan putkimaisiin rakenteisiin. Yap1 liittyy tosin solunjakautumisen säätelyyn, mihin embigiininkin on todettu liittyvän.

Vähentyneistä geenilukemista kolmen eniten vähentyneen lisäksi huomataan nefronektiiniin (engl. *Nephronectin*, Npnt, logFC -0,83) lukemien vähenneen. Nefronektiini on solun ulkopuolisen matriksin proteiini, joka on liitetty Wolffin tiehyeen sekä uretersilmun kehitykseen ja haaroittumiseen (Miner 2001). Se on myös integriini α -8/ β -1 -

ligandi ja osallistuu lisäksi integriinivälitteisesti soluadheesioon, leviämiseen sekä selviytymiseen. Wingless-tyypin MMTV integraatiokohdan jäsen 7B (*wingless-type MMTV integration site family*, *Wnt7b*, logFC -0,87) on myös vähentynyt. *Wntb7* on yhdistetty samankaltaisiin tehtäviin elimistöissä kuin embigiini: se osallistuu keuhkojen, silmien, dendriittien ja luun muodostukseen sekä munuaisten kehitykseen. Molempien geenien lukemien väheneminen tukee tulosta siitä, että embigiini osallistuisi erilaisten putkimaisten rakenteiden muodostukseen ja niiden kehitykseen. Saattaa myös olla että embigiini on vuorovaikutuksessa näiden proteiinien kanssa munuaisten kehityksen yhteydessä.

Geenilukemista kolme suurinta logFC:n positiivista muutosta ovat integriini β 4:llä (engl. *integrin β 4*, *Itgb4*, logFC 1,82), BMP:tä sitovalla endoteelisellä säätelijällä (engl. *BMP-binding endothelial regulator*, *Bmper*, logFC 1,7) sekä akvaporini 1:llä (engl. *aquaporin1*, *Aqp1*, logFC 1,69). *Itgb4* on laminiinireseptori ja se on tärkeä epiteelisolujen hemidesmosomille. *Bmper* on luun morfogeenisen proteiinin (BMP) inhibiittori, joka saattaa säädellä BMP-vastetta osteoblasteissa ja rustossa. Akvaporini1 on munuaisten akvaporini ja sitä on erityisesti punasoluissa sekä munuaisten putkirakenteissa.

Kolmen suurimman muutoksen lisäksi olevia mielenkiintoisia positiivisia muutoksia geenilukemissa hiljennyksen johdosta nähdään geeneissä, joiden proteiinit vaikuttavat vasokonstriktioon, esimerkiksi angiotensiini 1:tä konvertoivassa entsyymissä (angiotensin 1 converting enzyme, *Ace*, logFC 1,68) ja angiopoietiini 2:ssa (engl. *angiopoietin 2*, *Angpt2*, logFC 1,11). Lisäksi myös verihitaleperäinen kasvutekijäreseptori β (engl. *Platelet-derived growth factor receptor beta*, *Pdgfrb*, logFC 1,57), jonka tehtäviin lukeutuu alkionkehityksen säätely, solunjakautuminen, selviytyminen, erilaistuminen, kemotaksis sekä solun migraatio, on geenilukemaltaan kasvanut. Embigiini saattaa siis osallistua näiden biologisten prosessien säätelyyn yhteisvaikutuksessa näiden proteiinien kanssa ja osaan näistä tehtävistä embigiini onkin ennen jo yhdistetty (Jung ja muut 2016; Silberstein ja muut 2016).

7.3. Embigiini edistää mahdollisesti solunjakautumista

Proliferaatiokokeissa kontrollisolut jakautuvat kaikilla pinnoilla eniten verrattuna hiljennettyihin soluihin. Samanlaista kasvua huomattiin myös soluviljelyssä: emb1- ja emb4-siRNA:lla hiljennettyjä soluja oli aina vähemmän kuin kontrollisoluja. Tästä voidaan päätellä, että embigiini saattaa edistää solunjakautumista ja osallistuu sen säätelyyn, sillä sen poissaolo vaikuttaa negatiivisesti solujen jakautumiskykyyn eri pinnoilla. Solunjakautumisen edistäminen tukisi myös edeltäviä havaintoja embigiinistä tärkeänä proteiininä putkirakenteiden kehitykselle. Putkirakenteiden kehitykseen kuuluu olennaisena osana solunjakautuminen, sillä kaikki solun kasvaminen ja rakenteiden kehitys vaatii solunjakautumista. Embigiini on ennenkin yhdistetty solujen jakautumisen edistämiseen. Esimerkiksi Lain tutkimusryhmä (Lain ja muut 2009) huomasi embigiinin edistävän hermo-lihasliitosten muodostumista ja Ruman tutkimusryhmä (Ruma ja muut 2018) huomasi myös embigiinin edistävän solunjakautumista ja tätä kautta edistävän haimasyövän etenemistä. Nämä havainnot tukevat tämän opinnäytetyön tuloksia embigiinin tehtävästä solunjakautumisen edistäjänä. (Lain ja muut 2009; Ruma ja muut 2018)

Fibronectiinipinnalla tehdystä kokeesta ei odotettu massiivista vaikutusta embigiinin hiljennyksellä, sillä soluilla on muitakin fibronectiinireseptoreita kuin embigiini. Turun yliopiston biokemian laitoksella tehdyissä Professori Jyrki Heinon tutkimusryhmän tutkimuksissa embigiinin on todettu olevan fibronectiinireseptori, joten kasvamisen hidastuminen fibronectiinipinnoilla hiljennyksen vuoksi tukisi tätä havaintoa (vielä julkaisematon tutkimus.) Edeltävät havainnot embigiinistä fibronectiinireseptorina tukevat tämän opinnäytetyön tuloksia, joissa hiljennyksen myötä solujen jakautumiskyky heikkenee hieman fibronectiinipinnalla.

Fibronectiinipinnalla huomattiin kontrollisolujen jakautumismäärän vähenevän huomattavasti 72 h hiljennyksen jälkeen. Syynä tähän saattaa tosiaan olla yksinkertaisesti tilanpuute, jolloin solut alkavat kuolla. Muuten voisi olettaa, että kontrollisolujen määrä olisi huomattavasti isompi verrattuna embigiinihiljennettyihin soluihin, sillä on huomattu,

että fibronektiini on embigiinille tärkeä sitoutumiskohde. Tosin saattaa olla myös mahdollista, että solut ovat takertuneet fibronektiiniin ja eivätkä sen takia enää jakaudu.

Jatkossa solunjakautumiskokeen voisi toistaa siten, että aloittaisi mittaukset sekä ottaisi western blot -näytteet jo 24 h kohdalla hiljennyksestä. Tässä kokeessa 96 h saattoi olla liian pitkä aika, koska hiljennys alkoi jo hiipumaan 72 h kohdilla. Kokeessa myös olisi voinut olla lisäksi mukana kollageenipäällysteisiä kuoppia sekä BSA-päällysteisiä kuoppia. Solujen ei pitäisi tarttua BSA-kuoppiin. Kollageenikuopista nähtäisiin embigiinin hiljennyksen vaikutukset solujen kykyyn jakautua toisen solun ulkopuolisen proteiinin kanssa. Tässä kokeessa hiljennykset tehtiin soluille ennen solujen pipetoimista kaivoihin. Hiljennykset voisi tehdä suoraan kaivoihin, millä voitaisiin ehkä vähentää kaivojen välisiä eroja. Näillä muutoksilla ja toistolla saataisiin lisävarmuutta saatuihin tuloksiin sekä saatettaisiin huomata jotain uutta embigiinistä ja sen toiminnasta.

8. Yhteenveto

Tämän tutkimuksen tavoitteina oli hiljentää hiiren keratinosyyttisoluista embigiiniä kahdella eri siRNA:lla ja selvittää hiljennyksen vaikutukset solujen geeniekspressioon sekä solunjakautumiseen. 1.) Hiljennettyjen solujen RNA:n sekvensoinnin tuloksista selvitettiin geenirikastusanalyysillä miten embigiinin hiljennys vaikuttaa solun geeniekspressioprofiiliin. 2.) Proliferaatiokokeilla tutkittiin embigiinin hiljennyksen vaikutuksia solunjakautumiseen erilaisissa ympäristöissä.

1.) Geenirikastusanalyyseistä huomattiin munuaisten kehityksen sekä urogenitaali järjestelmän kehityksen geenien rikastuneen hiljennyksen vuoksi. Lisäksi embigiinin hiljennys saattaa vaikuttaa erilaisiin putkimaisiin rakenteisiin, esimerkiksi munuaisissa. Myös muita huomionarvoisia rikastuneita biologisia prosesseja olivat esimerkiksi putkimaisten rakenteiden kehitys, verisuonirakenteiden kehitys, migraatio ja solun lokalisaatio. Kaikki edellä mainitut biologiset prosessit on liitetty embigiiniin aiemminkin, joten edeltävät havainnot embigiinin tehtävistä tukevat tätä tulosta.

Embigiinin hiljennys onnistui hyvin. Emb1-siRNA:lla hiljennetyt solut hiljensivät keskimäärin embigiiniä vähän tehokkaammin ($86 \pm 3,9 \%$) kuin emb4-siRNA:lla ($83 \pm 21 \%$) hiljennetyt solut.

2.) Proliferaatiokokeessa embigiinihiljennettyjen solujen jakautuminen ja kasvu fibronektiinipinnalla oli oletettavasti hitaampaa kuin kontrollisolujen, vaikka kontrollisolujen määrä putosi. Syynä tähän lienee kontrollisolujen liian nopea kasvu, jolloin tila kuopassa loppui kesken. Embigiini on oletettavasti fibronektiinireseptori (julkaisematon tutkimus) ja tämä tulos tukee myös olettamusta siitä, että solut joissa on embigiiniä jakautuvat fibronektiinipinnalla nopeammin kuin hiljennetyt solut. Tämä tulos tukee oletusta siitä, että embigiini edistää solunjakautumista sekä osallistuu jakautumisen säätelyyn. Solunjakautumista tarvitaan kaikkeen solun kasvuun ja esimerkiksi putkimaisten rakenteiden muodostumiseen. Käsittelemättömältä soluviljelymuovilta havaittiin, että emb1-siRNA:lla hiljennetyt solut kasvoivat heikommin kuin emb4-hiljennetyt solut, mikä vastasi soluviljelyssä havaittua kasvua. Näistä kokeista huomataan myös, että jokaisessa kokeessa kontrollisolut kasvoivat tehokkaammin kuin kummallakaan siRNA:lla

hiljennetyistä soluista. Tulos tukee oletusta siitä, että embiginiin tehtävänä saattaa olla solunjakautumisen edistäminen. Kokeissa havaittiin myös hiljennyksen vaikutuksen lakkaavan 72 h jälkeen.

Lähteet

- Anders, S., Pyl, P.T. & Huber, W. (2015) HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**:166-169.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Andrews, S. (2017) FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (luettu 20.5.2021)
- Ansari, D. & Andersson, R. (2017) Pancreatic ductal adenocarcinoma: is a cure possible? *Future oncology (London, England)* **13**:863-865.
- Beesley, P.W., Herrera-Molina, R., Smalla, K. & Seidenbecher, C. (2014) The Neuroplastin adhesion molecules: key regulators of neuronal plasticity and synaptic function. *Journal of neurochemistry* **131**:268-283.
- Behringer, R.R. & Kobayashi, A. (2003) Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature reviews. Genetics* **4**:969-980.
- Bi, J., Li, Y., Sun, F., Saalbach, A., Klein, C., Miller, D.J., Hess, R. & Nowak, R.A. (2013) Basigin null mutant male mice are sterile and exhibit impaired interactions between germ cells and Sertoli cells. *Developmental biology* **380**:145-156.
- Bouchard, M., Souabni, A., Mandler, M., Neubüser, A. & Busslinger, M. (2002) Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes & development* **16**:2958-2970.
- Capel, B. (2000) The battle of the sexes. *Mechanisms of development* **92**:89-103.
- Chao, F., Zhang, J., Zhang, Y., Liu, H., Yang, C., Wang, J., Guo, Y., Wen, X., Zhang, K., Huang, B., Liu, D. & Li, Y. (2015) Embigin, regulated by HOXC8, plays a suppressive role in breast tumorigenesis. *Oncotarget* **6**:23496-23509.
- Davidson AJ. (2009) Mouse kidney development. *In: StemBook [Internet]*. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27080/> (luettu 1.2.2021)
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M. & Gingeras, T.R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)* **29**:15-21.
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. & Käller, M. (2016) MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics (Oxford, England)* **32**:3047-3048.

Fan, Q., Kadomatsu, K., Uchimura, K. & Muramatsu, T. (1998) Embigin/basigin subgroup of the immunoglobulin superfamily: Different modes of expression during mouse embryogenesis and correlated expression with carbohydrate antigenic markers. *Development, growth & differentiation* **40**:277-286.

Gerrow, K. & El-Husseini, A. (2006) Cell adhesion molecules at the synapse. *Frontiers in bioscience* **11**:2400-2419.

Guenette, R.S., Sridhar, S., Herley, M., Mooibroek, M., Wong, P. & Tenniswood, M. (1997) Embigin, a developmentally expressed member of the immunoglobulin super family, is also expressed during regression of prostate and mammary gland. *Developmental Genetics* **21**:268-278.

Halestrap, A.P. & Price, N.T. (1999) The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochemical journal* **343 Pt 2**:281-299.

Halestrap, A.P. (2012) The monocarboxylate transporter family—Structure and functional characterization. *IUBMB life* **64**:1-9.

Hannema, S.E. & Hughes, I.A. (2007) Regulation of Wolffian Duct Development. *Hormone research in paediatrics* **67**:142-151.

Helfman, D.M., Kim, E.J., Lukanidin, E. & Grigorian, M. (2005) The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *British journal of cancer* **92**:1955-1958.

Hori, K., Katayama, N., Kachi, S., Kondo, M., Kadomatsu, K., Usukura, J., Muramatsu, T., Mori, S. & Miyake, Y. (2000) Retinal Dysfunction in Basigin Deficiency. *Investigative ophthalmology & visual science* **41**:3128-3133.

Huang, R., Ozawa, M., Kadomatsu, K. & Muramatsu, T. (1993) Embigin, a Member of the Immunoglobulin Superfamily Expressed in Embryonic Cells, Enhances Cell-Substratum Adhesion. *Developmental biology* **155**:307-314.

Huang, R., Ozawa, M., Kadomatsu, K. & Muramatsu, T. (1990) Developmentally regulated expression of embigin, a member of the immunoglobulin superfamily found in embryonal carcinoma cells. *Differentiation (London)* **45**:76-83.

Huber, W., Durinck, S., Spellman, P.T. & Birney, E. (2009) Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nature protocols* **4**:1184-1191.

Juliano, R.L. (2002) Signal Transduction by Cell Adhesion Receptors and the Cytoskeleton: Functions of Integrins, Cadherins, Selectins, and Immunoglobulin-Superfamily Members. *Annual review of pharmacology and toxicology* **42**:283-323.

- Jung, D.E., Kim, J.M., Kim, C. & Song, S.Y. (2016) Embigin is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates cell motility through epithelial to mesenchymal transition via the TGF- β pathway. *Molecular carcinogenesis* **55**:633-645.
- Kallio, M.A., Tuimala, J.T., Hupponen, T., Klemela, P., Gentile, M., Scheinin, A.I., Koski, M., Korpelainen, E.I. & Käki, J. (2011) Chipster: user-friendly analysis software for microarray and other high-throughput data. *BMC genomics* **12**:507.
- Kuure, S., Vuolteenaho, R. & Vainio, S. (2000) Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mechanisms of development* **92**:31-45.
- Lain, E., Carnejac, S., Escher, P., Wilson, M.C., Långmo, T., Gajendran, N. & Brenner, H.R. (2009) A Novel Role for Embigin to Promote Sprouting of Motor Nerve Terminals at the Neuromuscular Junction. *The Journal of biological chemistry* **284**:8930-8939.
- Langnaese, K., Beesley, P.W. & Gundelfinger, E.D. (1997) Synaptic Membrane Glycoproteins gp65 and gp55 Are New Members of the Immunoglobulin Superfamily. *The Journal of biological chemistry* **272**:821-827.
- Lei, H., Wang, H., Juan, A.H. & Ruddle, F.H. (2005) The Identification of Hoxc8 Target Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* **102**:2420-2424.
- Liao, Y., Wang, J., Jaehnig, E.J., Shi, Z. & Zhang, B. (2019) WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic acids research* **47**:W199-W205.
- Little, M.H. & McMahon, A.P. (2012) Mammalian kidney development: Principles, progress, and projections. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**:a008300.
- Liu, C., Peng, G. & Jing, N. (2018) TGF- β signaling pathway in early mouse development and embryonic stem cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **50**:68-73.
- Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology (Online Edition)* **15**:550.
- Mannowetz, N., Wandernoth, P. & Wennemuth, G. (2012) Basigin interacts with both MCT1 and MCT2 in murine spermatozoa. *Journal of cellular physiology* **227**:2154-2162.
- McMahon, A.P. (2016) Development of the mammalian kidney. *Current topics in developmental biology* **117**:31-64.
- Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X. & Thomas, P.D. (2019) PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic acids research* **47**:D419-D426.
- Miner, J.H. (2001) Mystery solved: discovery of a novel integrin ligand in the developing kidney. *J Cell Biol* **154**:257-260.

- Muramatsu, T. & Miyauchi, T. (2003) Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histology and histopathology* **18**:981-987.
- Muramatsu, T. (2000) Protein-bound carbohydrates on cell-surface as targets of recognition: An Odyssey in understanding them. *Glycoconj J* **17**:577-595.
- Muramatsu, T. (2016) Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *Journal of biochemistry (Tokyo)* **159**:481-490.
- Ovens, M.J., Manoharan, C., Wilson, M.C., Murray, C.M. & Halestrap, A.P. (2010) The inhibition of monocarboxylate transporter 2 (MCT2) by AR-C155858 is modulated by the associated ancillary protein. *Biochemical journal* **431**:217-225.
- Owczarek, S. & Berezin, V. (2012) Neuroplastin: Cell adhesion molecule and signaling receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**:1-5.
- Owczarek, S., Kiryushko, D., Larsen, M.H., Kastrup, J.S., Gajhede, M., Sandi, C., Berezin, V., Bock, E. & Soroka, V. (2010) Neuroplastin-55 binds to and signals through the fibroblast growth factor receptor. *The FASEB Journal* **24**:1139-1150.
- Owczarek, S., Soroka, V., Kiryushko, D., Larsen, M.H., Yuan, Q., Sandi, C., Berezin, V. & Bock, E. (2011) Neuroplastin-65 and a mimetic peptide derived from its homophilic binding site modulate neuritogenesis and neuronal plasticity. *Journal of Neurochemistry* **117**:984-994.
- Ozawa, M., Huang, R.P., Furukawa, T. & Muramatsu, T. (1988) A teratocarcinoma glycoprotein carrying a developmentally regulated carbohydrate marker is a member of the immunoglobulin gene superfamily. *The Journal of biological chemistry* **263**:3059-3062.
- Peng, G & Jing, N. (2017) The genome-wide molecular regulation of mouse gastrulation embryo. *Science China. Life sciences* **60**:363-369.
- Pérez-Escuredo, J., Van Hée, V.F., Sboarina, M., Falces, J., Payen, V.L., Pellerin, L. & Sonveaux, P. (2016) Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* **1863**:2481-2497.
- Philp, N.J., Ochrietor, J.D., Rudoy, C., Muramatsu, T. & Linser, P.J. (2003) Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 Expression in the Retinal Pigment Epithelium and Neural Retina of the 5A11/Basigin-Null Mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* **44**:1305-1311.
- Pridans, C., Holmes, M.L., Polli, M., Wettenhall, J.M., Dakic, A., Corcoran, L.M., Smyth, G.K. & Nutt, S.L. (2008) Identification of Pax5 Target Genes in Early B Cell Differentiation. *The Journal of immunology (1950)* **180**:1719-1728.

Robinson, M.D., McCarthy, D.J. & Smyth, G.K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**:139-140.

Ruma, I.M.W., Kinoshita, R., Tomonobu, N., Inoue, Y., Kondo, E., Yamauchi, A., Sato, H., Sumardika, I.W., Chen, Y., Yamamoto, K., Murata, H., Toyooka, S., Nishibori, M. & Sakaguchi, M. (2018) Embigin Promotes Prostate Cancer Progression by S100A4-Dependent and-Independent Mechanisms. *Cancers* **10**:239.

Schaum, N., Neff, N.F., May, A.P., Quake, S.R., Darmanis, S., Batson, J., Chen, M.B., Chen, S., Green, F., Penland, L., Pisco, A.O., Sit, R.V., Stanley, G.M., Webber, J.T., Zanini, F., Baghel, A.S., Bansal, I., Berdnik, D., Bilen, B., Brownfield, D., Cain, C., Cho, M., Darmanis, S., Demers, A., Demir, K., de Morree, A., Divita, T., du Bois, H., Dulgeroff, L.B.T., et al. (2018) Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. *Nature (London)* **562**:367-372. <https://tabula-muris.ds.czbiohub.org/>

Silberstein, L., Goncalves, K., Kharchenko, P., Turcotte, R., Kfoury, Y., Mercier, F., Baryawno, N., Severe, N., Bachand, J., Spencer, J., Papazian, A., Lee, D., Chitteti, B., Srour, E., Hoggatt, J., Tate, T., Lo Celso, C., Ono, N., Nutt, S., Heino, J., Sipilä, K., Shioda, T., Osawa, M., Lin, C., Hu, G. & Scadden, D. (2016) Proximity-Based Differential Single-Cell Analysis of the Niche to Identify Stem/Progenitor Cell Regulators. *Cell stem cell* **19**:530-543.

Smalla, K.-., Matthies, H., Langnase, K., Shabir, S., Bockers, T.M., Wyneken, U., Staak, S., Krug, M., Beesley, P.W. & Gundelfinger, E.D. (2000) The Synaptic Glycoprotein Neuroplastin Is Involved in Long-Term Potentiation at Hippocampal CA1 Synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* **97**:4327-4332.

Stuart, R.O., Bush, K.T. & Nigam, S.K. (2003) Changes in gene expression patterns in the ureteric bud and metanephric mesenchyme in models of kidney development. *Kidney international* **64**:1997-2008.

The UniProt Consortium (2021) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research* **49**:D480-D489.

Torres, M., Gomez-Pardo, E., Dressler, G.R. & Gruss, P. (1995) Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development (Cambridge)* **121**:4057-4065.

Wai Wong, C., E. Dye, D. & Coombe, D.R. (2012) The Role of Immunoglobulin Superfamily Cell Adhesion Molecules in Cancer Metastasis. *International journal of cell biology* **2012**:340296-9.

Wilson, M.C., Kraus, M., Marzban, H., Sarna, J.R., Wang, Y., Hawkes, R., Halestrap, A.P. & Beesley, P.W. (2013) The Neuroplastin Adhesion Molecules Are Accessory Proteins That Chaperone the Monocarboxylate Transporter MCT2 to the Neuronal Cell Surface. *PLoS one* **8**:e78654.

Wilson, M.C., Meredith, D., Fox, J.E.M., Manoharan, C., Davies, A.J. & Halestrap, A.P. (2005) Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70). *The Journal of biological chemistry* **280**:27213-27221.

Wolter, J.M. (2012) Gastrulation in *Mus musculus* (common house mouse). *Embryo Project Encyclopedia*, ISSN:1940-5030, <http://embryo.asu.edu/handle/10776/3942> (luettu 12.2.2021)

Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A.H., Tanaseichuk, O., Benner, C. & Chanda, S.K. (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature communications* **10**:1523.