

Hertta Perikangas-Hentunen

U-2 OS -solun proteosomi- ja translaatiogeenien hiljentämisen vaikutus apoptoosiin

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko

Laboratorioalan ko.

Opinnäytetyö

21.11.2012

Tekijä Otsikko	Hertta Perikangas-Hentunen U-2 OS -solun proteosomi- ja translaatiogeenien hiljentämisen vaikutus apoptoosiin
Sivumäärä Aika	27 sivua + 1 liite 21.11.2012
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaajat	Lehtori, Tiina Soininen Väitöskirjan tekijä, FM Mikko Turunen
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopistossa Jussi Taipaleen systeemibiologian tutkimusryhmässä. Työn tavoitteena oli hiljentää osteosarkoomasolun proteosomi- ja translaatiogeenit ja tarkastella vaikutusta solun apoptoosiin.</p> <p>Apoptoosi eli ohjelmoitu solukuolema on prosessi, jossa solu tappaa itsensä hallitusti saatuaan mitokondriolta tai solukalvon reseptorilta käskyn kuolla. Molempien käskyjen seurauksena DNA fragmentoituu ja solun tukiranka ja tumakalvo hajoavat. Monisoluiset organismit tarvitsevat apoptoosia vahingoittuneiden tai tarpeettomien solujen poistamiseen. Apoptoosissa solun morfologiset ja biokemialliset muutokset ovat pääosin kaspasi-proteiinien aiheuttamia.</p> <p>Tässä opinnäytetyössä hiljennettiin RNA-interferenssitekniikan avulla ihmisen osteosarkoomasolu U-2 OS:n proteosomiin ja ribosomin rakenteeseen ja biogeneesiin vaikuttavat geenit ja tarkasteltiin vaikutusta apoptoosiin. Hiljennyksen seurauksena solun translaation ja proteolyysin oletettiin häiriintyvän. Hiljennykseen käytettiin pieniä kaksijuosteisia RNA-molekyylejä, siRNA:ita, jotka ovat spesifisiä valitulle kohdegeenille. siRNA-transfektion seurauksena mRNA fragmentoituu ja geenin ilmentyminen estyy.</p> <p>Apoptoositasoa tarkasteltiin fluoresenssia ja luminesenssia mittaavien kittien avulla. Fluoresenssin mittaaminen Cell titer-blue -kitillä indikoi näytteessä olevien elävien solujen määrää ja luminesenssin mittaaminen Caspase 3/7 -kitillä solujen kaspasiaktiivisuutta. Apoptoosin perustasona käytetään näytettä, joka on transfektoitu negatiivikontrolli siRNA:lla, joka ei ole spesifi millekkään ihmisen mRNA:lle. Kun saadut fluoresenssi- ja luminesenssiarvot suhteutetaan negatiivikontrolliin ja tämän jälkeen kaspasiaktiivisuus jaetaan fluoresenssiarvoilla, saadaan tulokseksi suhdeluku, jolla voidaan arvioida apoptoosiaktiivisuutta suhteessa normaalisolun vastaavaan.</p> <p>Työn lopputuloksena löydettiin useita geenejä, joiden hiljentämisellä oli apoptoosiin joko voimakas pro-apoptoottinen tai anti-apoptoottinen vaikutus. Tuloksia tullaan hyödyntämään jatkotutkimuksissa tutkittaessa apoptoosin säätelymekanismeja translaation tasolla. Seuraava tutkimuksen askel voisi olla esimerkiksi erilaisten proteiini-proteiini-interaktioiden tarkastelu.</p>	
Avainsanat	Apoptoosi, RNA-interferenssi, Cell titer-blue, Caspase 3/7, translaatio, proteolyysi

Author(s) Title Number of Pages Date	Hertta Perikangas-Hentunen Silencing the proteosomal and translational genes of the U-2 OS cell and its effect on apoptosis 27 pages + 1 appendice 21 November 2012
Degree	Bachelor of Science
Degree Programme	Laboratory Services
Specialisation option	
Instructor(s)	Mikko Turunen, M.sc. Tiina Soininen, Lecturer
<p>This Bachelor's thesis was done in University of Helsinki in system biology laboratory lead by Jussi Taipale. The aim of this thesis was to silence osteosarcoma cell's translational and proteosomal genes and to analyze its impact to the apoptosis of the cell.</p> <p>Multicellular organisms use apoptosis to dispose damaged or unnecessary cells. Apoptosis or programmed cell death is the process where the cell kills itself after receiving a command from mitochondrion or receptors of the plasma membrane. In consequence of either command DNA becomes fragmented and the cytoskeleton and nuclear membrane becomes degraded. The major morphological and biochemical changes are mainly caused by an increased level of caspase proteins inside a cell.</p> <p>In this thesis proteosomal and ribosomal genes of human osteosarcoma cell U-2 OS were silenced using RNA-interference and its influence on apoptosis was detected. Translation and proteolysis of the cell was assumed to be disturbed in result of knockdown. Small double-stranded RNA molecules, siRNAs, were used in silencing. These siRNAs were specific to selected target genes with the result that target mRNA was fragmented and gene expression was inhibited.</p> <p>The level of apoptosis was measured with kits that detect fluorescence and luminescence. Fluorescence measurement was done with Cell titer-blue assay. The amount of fluorescence indicates the amount of living cells in the sample. Luminescence assay Caspase 3/7 indicates caspase activity in the sample. The basic level of apoptosis was determined by using negative control siRNA, that is unspecific to all human genes. Detected fluorescence and luminescence values were proportioned to negative control siRNA and after that caspase activity was divided by fluorescence values. The result was a ratio that can be used to estimate apoptosis activity in relation to the equivalent of a normal cell.</p> <p>As the end result several genes were found, whose silencing had either strong pro-, or anti-apoptotic impact to the apoptosis. These results will be utilized in future studies in relation to regulation mechanism of apoptosis in translational level. The next step of the research could be for example examination of different kind of protein-protein-interactions.</p>	
Keywords	Apoptosis, RNA-interference, Cell titer-blue, Caspase 3/7, translation, proteolysis

ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopistossa tutkimusjohtaja Jussi Taipaleen tutkimusryhmässä lääketieteellisen tiedekunnan genomibiologian tutkimusohjelmassa. Taipaleen ryhmän laboratorio on systeemibiologian laboratorio, jossa päämääränä on oppia ymmärtämään erilaisten laajojen seulontojen kautta, mitkä solun signaalit/geenit vaikuttavat solun kasvuun ja jakautumiseen ja sitä kautta esimerkiksi syövän syntyyn.

Haluan kiittää erityisesti ohjaajaani filosofian maisteri Mikko Turusta kärsivällisestä ja asiantuntevasta ohjauksesta. Suuret kiitokset myös koko muulle tutkimusryhmälle avusta ja tuesta, jota olen työni aikana saanut. Haluan kiittää myös ohjaajaani ja opettajaani lehtori Tiina Soinista ohjauksesta ja kannustuksesta.

Kiitän erityisesti aviomiestäni, joka on ollut tukenani koko opintojeni ajan.

Helsingissä 12.11.2012

Hertta Perikangas-Hentunen

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	2
2.1	Apoptoosi	2
2.2	Translaatio	6
2.3	RNA-interferenssi	7
2.4	Proteolyysi	10
3	Materiaalit ja menetelmät	12
3.1	Vuokaavio	12
3.2	U-2 OS -solut	14
3.3	Transfektio	14
3.4	Apoptoosimittaukset	17
3.4.1	Cell titer-blue -fluoresenssimittaus	17
3.4.2	Caspase 3/7 -kaspasiaktiivisuuden määrittäminen	17
4	Tulokset ja tulosten analysointi	18
5	Yhteenveto	24
	Lähteet	25

Liitteet

Liite 1. Kaikkien niiden geenien negatiiviseen kontrolliin verrannolliset suhdeluvut, jotka hajoavat alle 1,5 mediaanin absoluuttista hajoamaa triplikaattien mediaanista.

Lyhenteet

AIF	apoptosis inducing factor, apoptoosia indusoiva tekijä
APAF-1	apoptotic protease activating factor-1, apoptoottinen proteaasi aktivointitekijä 1
BID-proteiini	Bcl2 interacting-protein, Bcl2-proteenin kanssa vuorovaikutava proteiini
CAD	caspase-activated DNase, kaspasiiaktivoitu DNAasi
CHX	sykloheksimidi
dATP	deoksiadenosiinitrifosfaatti
DISC-kompleksi	death inducing signal complex, kuolemaa indusoiva signaalikompleksi
dsRNA	double stranded RNA, kaksijuosteinen RNA
FADD-proteiini	FAS associated death protein, FASiin liittyvä kuolemaproteiini
FAS-reseptori	solukalvolla toimiva kuolonreseptori
ICAD	inhibitor of caspase activated DNase, kaspasiiaktivoidun DNasen
lncRNA	long non-coding RNA, pitkä ei-koodaava RNA
miRNA	micro RNA, mikro-RNA
mRNA	messenger RNA, lähetti-RNA
NK-solu	natural killer cell, luonnollinen tappajasolu

piRNA	piwi-interacting RNA, Piwiin vuorovaikuttava RNA
RNAi	RNA-interferenssi
siRNA	small interfering RNA, pieni häiritsevä RNA
UBL	ubiquitin-like domain, ubikitiinin alue

1 Johdanto

Apoptoosin eli ohjelmoidun solukuoleman vastustaminen on yksi kuudesta Douglas Hanahanin ja Robert A. Weinbergin esittämästä syövän tunnusmerkistä. Ne koostuvat kuudesta ihmisen kasvainten kehityksen monivaiheisessa prosessissa vaadittavasta biologisesta ominaisuudesta. Viisi muuta Hanahanin ja Weinbergin esittämää syövän tunnusmerkkiä ovat jatkuva solunjakautuminen, syöpäsolujen toimintaa estävien solujen karttaminen, angiogeneesin eli uusien verisuonten syntymisen indusointi, invaasion ja metastaasin aktivointi ja solun replikaation pysähtymättömyys. Nämä kuusi syövän tunnusmerkkiä muodostavat yhdessä perustan kasvainsairauksien erilaistumisen ymmärtämiselle. [1.]

Apoptoosi on solussa normaalisti tapahtuvaa ohjelmoitua kuolemaa. Vahingoittuneet tai tarpeettomat solut tapetaan hallitusti aiheuttamatta elimistölle tulehdustilaa. Joskus kuitenkin solut muuntuvat apoptoosia vastustaviksi, ja sen seurauksena tapahtuu solun hallitsematonta jakaantumista ja lopulta kasvaimen synty. Apoptoosin säätelymekanismit eivät ole vielä täysin tunnettuja, ja aihe on suosittu lääketieteellisessä tutkimuksessa. Apoptoosin säätelyä esimerkiksi transkription tasolla on tutkittu paljon, mutta geenien ilmentymisen seuraavan vaiheen eli translaation vaikutus apoptoosiin tunnetaan huonommin.

Aikaisemmissa tutkimuksissa on osoitettu translaatiovaiheessa tapahtuvalla säätelyllä olevan ratkaiseva vaikutus syövän kehittymiseen ja etenemiseen. Ribosomin rakenteeseen ja biogeneesiin vaikuttavien proteiinien yli- tai aliekspressoitumisesta on löydetty yhteys erilaisten syöpäsolujen syntyyn. [2.]

Eräässä tutkimuksessa on havaittu proteosomien toimintahäiriöiden voivan johtaa solusyklin epänormaaliin säätelyyn, hallitsemattomaan solunjakautumiseen ja edelleen kasvaimen syntyyn. [3.] Proteosomit ovat proteiinikomplekseja, jotka normaalitilassa huolehtivat viallisten tai tarpeettomien proteiineiden hävittämisestä solussa.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, kuinka osteosarkoomasolun translaatiogeenien eli ribosomin rakenteeseen ja säätelyyn vaikuttavien geenien sekä proteosomien toimintaan vaikuttavien geenien hiljentäminen vaikuttaa solun apoptoosiin.

Tutkituista geeneistä haluttiin löytää sellaisia, joiden hiljentämisellä on voimakas pro- tai anti-apoptoottinen vaikutus. Tämän työn tuloksena löydettyjä geenejä voidaan jatkossa hyödyntää kohdegeeneinä apoptoosin säätelyä translaatiotasolla tutkittaessa.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Apoptoosi

Apoptoosi eli ohjelmoitu solukuolema on prosessi, jossa solu tappaa itsensä hallitusti. Erona nekroosiin eli akuuttiin patologiseen solukuolemaan, joka tapahtuu solun vaurioitua ulkoapäin, ohjelmoitu solukuolema on solun sisäinen prosessi, jossa solu saa tuhoutumissignaalin joko mitokondriolta tai solukalvon reseptorilta. Apoptoosissa kuoleva solu ei hajota solukalvoa, toisin kuin nekroosissa, eikä näin ollen yleensä aiheuta tulehdusreaktiota elimistössä.

Apoptoottiseen kuolemaan kykenevät ainoastaan monisoluiset organismit. Ne tarvitsevat apoptoosia iäkkäiden solujen poistamiseen ja solunjakautumisen hallitsemiseen. Ohjelmoitu solukuolema on tarpeen myös, kun soluja ei enää syystä tai toisesta tarvita elimistössä. Esimerkiksi sammakonpoikasen kasvaessa aikuiseksi yksilöksi häviää sen häntä apoptoosin kautta. [4, s.1010 - 1011.]

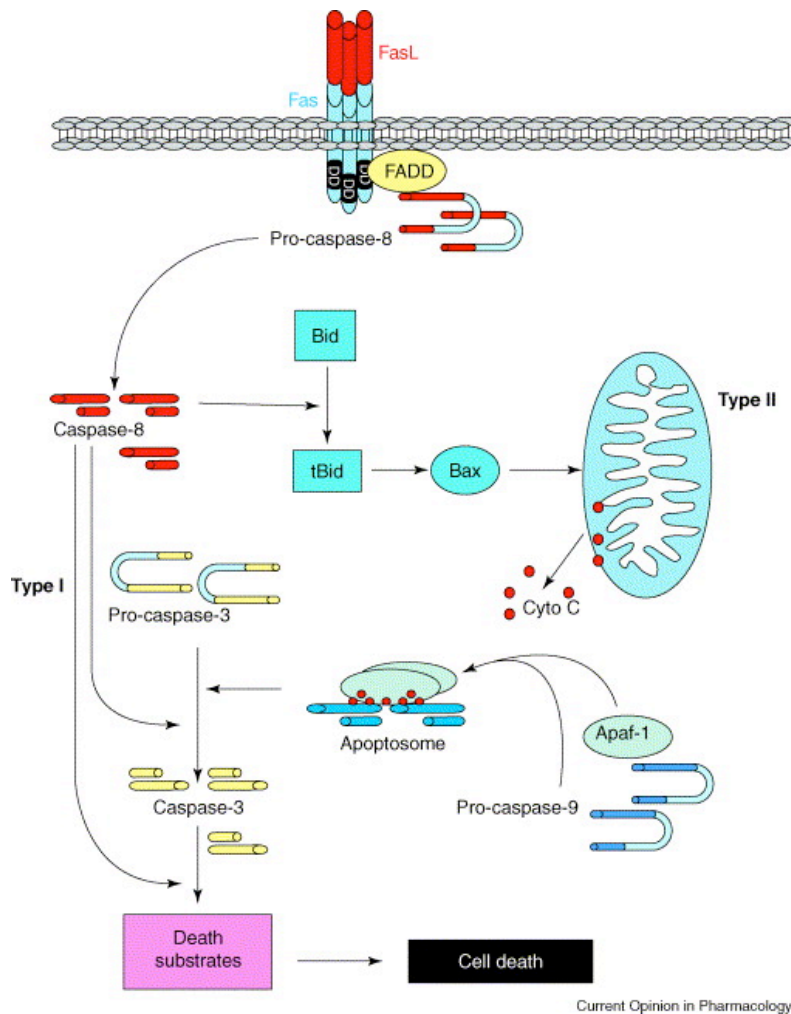
Apoptoosi voi siis aktivoitua kahdella tavalla; solukalvon reseptorien kautta tai solun sisällä mitokondriaalisesti. Molempien reittien lopputuloksena solu kutistuu ja tiivistyy. Sen tukiranka ja tumakalvo hajoavat ja DNA fragmentoituu. Kutistunut solu hävitetään solusyönnin kautta, ja kuolleen solun syönyt solu hyödyntää jäljelle jääneet soluorganellit. [5.]

Ohjelmoidun solukuoleman ulkoinen reitti aktivoituu, kun kohdesolun pinnalla olevaan kuolonreseptoriin kiinnittyy esimerkiksi NK-soluista eli luonnollisista tappajasoluista peräisin oleva FAS-ligandi. Kuolonreseptoreita solukalvolla ovat esimerkiksi FAS-reseptori ja TRAIL-reseptori. FAS-ligandien aggregoituminen reseptoriin kohdesolun solukalvolla saa aikaan solun sisällä FAS-reseptoriin liittyvän kuoleman proteiinin eli FADD-proteiinin muodostumisen. Tämän jälkeen FADD-proteiini liittyy prokaspasi-8-proteiiniin ja samalla hetkellä muodostuu DISC-kompleksi eli kuolemaa indusoiva hil-

jennyskompleksi. DISC-kompleksi aiheuttaa prokaspasi-8-proteiinin autokatalyyttisen aktivoitumisen kaspasi-8-proteiiniksi.

Aktivoitu kaspasi-8 aktivoi kaspasi-3:n kahdella eri tavalla. Ensimmäisessä reitissä kaspasi-8 pilkkoo Bcl-2-proteiinin kanssa vuorovaikuttavan proteiinin eli BID-proteiinin ja proteiinin C-terminaalinen osa siirtyy mitokondrioon, jossa se laukaisee sytokromi c:n vapautumisen. Vapautunut sytokromi c sitoutuu APAF1:een eli apoptoottiseen proteaasien aktivointitekijä 1:een deoksiadenosiinitrifosfaatin eli dATP:n ja pro-kaspasi-9:n kanssa, ja se aktivoi kaspasi-9:n. Tämä taas pilkkoo pro-kaspasi-3:n ja aktivoi kaspasi-3:n.

Toisessa reitissä kaspasi-8 pilkkoo pro-kaspasi-3:n heti ja aktivoi kaspasi-3:n. Kaspasi-3 pilkkoo kaspasiaktivoidun DNasen inhibiittorin eli ICAD:n heterodimeeriseen muotoon, joka koostuu CAD:sta eli kaspasiaktivoidusta DNasesta ja pilkotusta ICAD:sta. ICAD irrottautuu CAD:sta ja näin indusoi CAD:n oligomerisaatiota ja DNasen aktiivisuutta. Aktiivinen CAD-oligomeeri aiheuttaa tumansisäisen DNA:n fragmentoitumisen. Kuvassa 1 on esitetty kaspasien toimintaa apoptoosin ulkoisessa signaalinvälityсреitissä.



Kuva 1 Ohjelmoidun solukuoleman ulkoinen signaalinvälitysreitti [6].

Kaspaasi-8-proteiinin muodostuminen laukaisee varsinaisen solun kuoleman aktivoimalla useita muita kaspaaseja. Nämä kaspaasit aktivoivat sytoplasmisia endonukleaaseja ja proteaaseja, jotka hajottavat tumen rakenteita ja solutukirangan proteiineja. Kaspaasi-3, kaspaasi-7 ja kaspaasi-9 pilkkovat useita substraatteja kuten sytokeratiineja ja näin aiheuttavat kuolevan solun morfologiset ja biokemialliset muutokset. [7.]

Apoptoosin sisäinen eli mitokondriaalinenreitti käynnistyy solujen stressaantuessa. Stressitekijät, jotka voivat aiheuttaa apoptoosin, ovat gamma- ja uv-säteily, sytotoksisilla kemikaaleilla käsittely ja sytokiiniin puuttuminen. Kaspaasien aktivoituminen sisäisessä reitissä on osittain yhteydessä bcl-proteiinien aiheuttamaan mitokondrion ulkokalvon läpäisevyyden lisääntymiseen, sillä mitokondrion ulkokalvon läpäisevyyden häiriöt päästävät useita normaalisti mitokondrion ulko- ja sisäkalvon välissä sijaitsevia proteiineja sytosoliin.

2.2 Translaatio

Translaatio eli proteiinisynteesi on geeninilmentymisen kolmas vaihe. Translaatio tapahtuu solulimassa ribosomien pinnalla ja se johtaa lopulta uuden polypeptidiketjun syntymiseen. Translaation vaiheet voidaan jakaa aloitukseen, elognaatioon eli pidentymiseen ja lopetukseen.

Translaation aloitus voidaan jakaa kahteen eri tapaan, mitkä ovat cap-riippuvainen aloitus ja capista riippumaton aloitus. Translaation cap-riippuvaisessa aloituksessa proteiinit eIF3 eli eukaryoottinen aloitustekijä 3, met eli metioniini, eIF4 eli eukaryoottinen aloitustekijä 4 ja tRNA eli siirtäjä-RNA muodostavat yhdessä ribosomin 40S-alayksikön kanssa kompleksin, joka kiinnittyy mRNA:n eli lähetti-RNA:n 5'-päässä sijaitsevaan cap-nukleotidirakenteeseen. eIF3 säätelee 40S-alayksikköä ja estää isompaa 60S-alayksikköä kiinnittymästä kompleksiin liian aikaisin.

eIF3 on vuorovaikutuksessa myös eIF4F-kompleksin kanssa, joka koostuu kolmesta muusta aloitukseen vaikuttavasta proteiinista, jotka ovat eIF4E, eIF4A ja eIF4G. Nämä proteiinit vaikuttavat esimerkiksi eIF4F-kompleksin vuorovaikutukseen aloituskompleksin kanssa sekä aloituskompleksin kiinnittymiseen 5' cap-rakenteeseen.

Ribosomin 40S-alayksikön ja tRNA:n liittoa kutsutaan 43S-alayksiköksi. 43S-alayksikkö sekä siihen liittyneet proteiinit liikkuvat pitkin mRNA-juostetta 5' cap-rakenteesta lähtien kohti mRNA:n 3'-päättä. 43S-alayksikkö etsii mRNA-juosteesta translaation aloituskodonin, joka on tyypillisesti AUG. Eukaryoottisolulla AUG-aloituskodoniin liittyy aina metioniini-aminohappo.

Metioniini-varautunut tRNA kiinnittyy aloituksessa 40S-alayksikön peptidylyli-tRNA-kohtaan eli P-kohtaan. tRNA:n kulkeutumista ribosomille säätelee proteiini eIF2 eli eukaryoottinen aloitustekijä 2. eIF2 myös antaa signaalin aloituskompleksin osille irtaantua 40S-alayksiköstä, ja tämä johtaa ribosomin 60S-alayksikön kiinnittymiseen ja kokonaisen 80S-ribosomin muodostumiseen. Valmis 80S-ribosomi jatkaa polypeptidiketjun pidentämistä sekvenssien mukaisilla aminohapoilla aloituskodonin ja lopetuskodonin välissä.

Cap-riippumattomassa translaation aloituksessa ribosomikompleksin ei tarvitse aloittaa mRNA-juosteen tulkitsemista 5' cap-rakenteesta vaan aloituskompleksi voidaan kuljettaa suoraan aloituskodonille ITAF-proteiinin avustuksella.

Aloituksen jälkeen translaatiossa seuraa pidentyminen. Elognaatio eli pidentyminen on riippuvainen solussa toimivista eukaryoottisista elognaatiotekijöistä, joita ovat esimerkiksi eEF-1 ja eEF-2.

Elognaatio jatkuu kunnes jokin kolmesta lopetuskodonista, UAA, UAG tai UGA, tulee ribosomin A-kohtaan. Tästä seuraa translaation terminaatiovaihe. Yksikään tRNA ei tunnista lopetuskodoneja, vaan vapautustekijäproteiinit RF1 ja RF2 tunnistavat lopetuskodonit. Nämä proteiinit laukaisevat esterisidosten hydrolyysin ja vapauttavat translaatiossa syntyneen aminohappoketjun. Kolmas vapautustekijä RF3 katalysoi RF1:en ja RF2:en vapautumisen ribosomikompleksista terminaation päätteeksi. [10.]

2.3 RNA-interferenssi

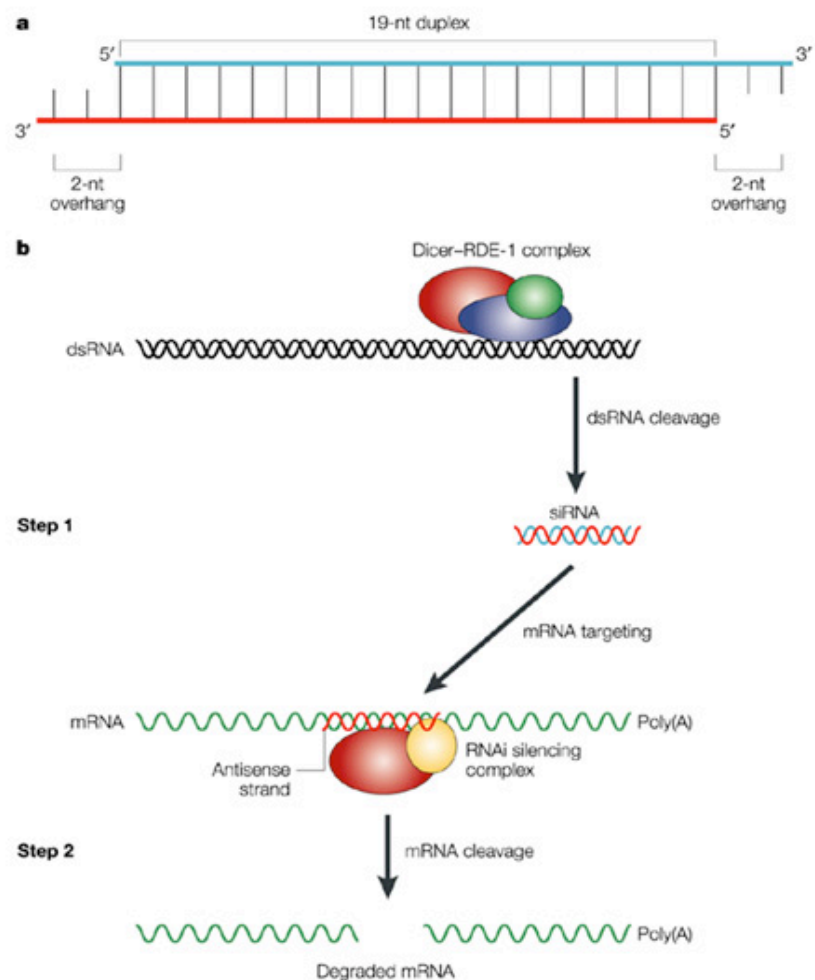
RNA-interferenssi eli RNAi on Andrew Firen ja Craig Mellon vuonna 1998 löytämä signaalinvälitysreitti, joka perustuu geenin ekspression hiljentämiseen kaksijuosteisen RNA:n eli dsRNA:n avulla. RNAi:n kautta eukaryoottisolut säätelevät geeninsä ilmentymisen aktiivisuutta. Se onkin ilmeisesti alun perin ollut solujen keino suojautua ulkopuoliselta, viruksista lähtöisin olevalta dsRNA:lta. Andrew Fire ja Craig Mello saivat vuonna 2006 Nobel-palkinnon RNAi-tutkimuksestaan.

RNAi-tekniikoita on viimeisen vuosikymmenen aikana tutkittu paljon, ja tutkimuksissa soluilta on löydetty useita erilaisia RNAi-signaalinvälitysreittejä. Näiden kaikkien päämääränä on hiljentää kohdegeenin ekspressoituminen. Tutkimustulosten perusteella on pystytty kehittämään siRNA-transfektio menetelmä, jossa synteettiset tai esimerkiksi viruksista peräisin olevat siRNA:t voidaan kohdistaa mihin tahansa geeniin spesifisesti ja tehokkaasti transfektiolla, ja tämän jälkeen seurata sen aiheuttamia muutoksia solussa.

siRNA transfektoidaan solun sisään kaksijuosteisena. Se koostuu yleensä kahdesta noin 21 nukleotidia pitkästä RNA-juosteesta, jotka muodostavat yhdessä 19 nukleotidia pitkän kaksijuosteisen RNA:n, jonka 3'-päihin jää kahden nukleotidin yksijuosteiset

ylijäämät. Solun sisällä muodostuu dsRNA:n fragmentoiva kompleksi, jonka pääosassa on Rnase III -entsyymiperheeseen kuuluva endoribonukleaasi Dicer. Dicer-kompleksi pilkkoo dsRNA:n pieniksi siRNA:iksi. Tämän jälkeen siRNA:n koodaava juoste hajoaa ja vastinjuoste kiinnittyy mRNA:han muodostaen useiden proteiinien kanssa RISC-kompleksin, joka fragmentoi mRNA:n ja estää sen etenemisen translaatioon. [11.]

Kuvassa 3 on esitetty siRNA:n muodostuminen kaksijuosteisesta RNA:sta ja mekanismit, jotka johtavat mRNA:n pilkkoutumiseen RNA-interferenssissä.



Nature Reviews | Genetics

Kuva 3 siRNA:n muodostuminen ja mRNA:n pilkkominen RNA-interferenssissä [12].

siRNA-transfektiota käytetään yleensä tutkittaessa geenien toimintaa kohdeorganismissa. Proteiinien roolia ja toimintaa kohdeorganismissa voidaan tutkia vähentämällä sen ekspressoitumisen määrää. Koska siRNA ei poista geenin ekspressiota kokonaan, tavataan sitä kutsua knockdowniksi erotukseksi knockoutista, jossa kohdegeeni on kokonaan poistettu tai sen sekvenssi on tuhottu genomista.

RNA-interferenssiin kuuluu lisäksi micro RNA:t eli miRNA:t, Piwiin sitoutuvat RNA:t eli piRNA:t ja lncRNA:t eli pitkät ei-koodaavat RNA:t. miRNA on noin 22 nukleotidia pitkä yksijuosteinen RNA-molekyyli, joka on endogeenin osa solun post-transkriptionaalista säätelyä. miRNA:t muodostetaan solun sisällä kaksijuosteisesta pre-miRNA:sta, jonka Dicer-kompleksi hajottaa yksijuosteisen. miRNA kiinnittyy mRNA-juosteeseen ja tavallisesti kohdegeenin ilmentyminen estyy. miRNA:n ei humaanisoluissa tyypillisesti kiinnity täysin komplementaarisesti mRNA:han. Tästä syystä genomissa 1000 miRNA:ta koodaavaa geeniä pystyy hiljentämään jopa 60 % ihmisen geeneistä. [13.]

piRNA-molekyyli ja PIWI-proteiini muodostavat kompleksin, piRNP:n, joka voi hiljentää ituradan sekvenssejä ja osallistua epigeneettiseen säätelyyn. piRNP-kompleksin muodostuminen alkaa, kun piRNA-molekyylin esiaste transkriptoidaan tumassa. piRNA:n esiaste siirtyy solulimaan, jossa se prosessoidaan valmiiksi piRNA-molekyyliksi, joka kiinnittyy PIWI-proteiiniin.

lncRNA:t ovat noin 200 nukleotidia pitkiä RNA-molekyyliä, jotka eivät koodaa proteiineja. Niiden tehtävänä on osallistua transkription säätelyyn, joskin mekanismit ovat vielä huonosti tunnettuja. On esitetty, että lncRNA:t voisivat esittää miRNA:n kohdesekvenssiä ja näin säädellä miRNA:n toimintaa. lncRNA:t voivat myös yhdistää useita proteiineja ja näin luoda ribonukleoproteiineja. Jotkut lncRNA:t voivat yksinkertaisesti olla transkription oheistuotteita. [14.]

2.4 Proteolyysi

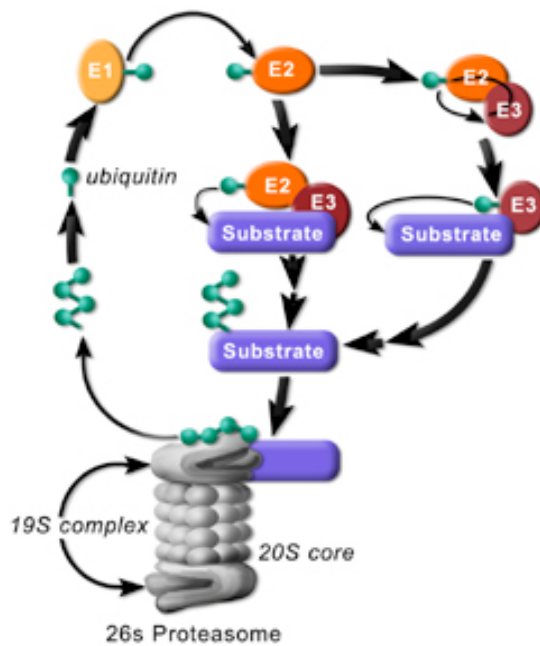
Proteosomit ovat proteiinikomplekseja, jotka eukaryoottisolulla sijaitsevat tumassa ja solulimassa. Niiden pääasiallinen tehtävä on hajottaa tarpeettomia, vahingoittuneita tai väärin laskostuneita soluja proteolyysin kautta. Proteolyysissä proteaasientsyymit hajottavat aminohappoketjun peptidisidoksia. Proteolyysi voi tapahtua solussa kahden eri signaalinvälitysreitin kautta, mitkä ovat ubikitiini-proteosomi-reitti sekä lysosomaalinen proteolyysi. Tässä työssä keskitytään tarkastelemaan proteosomeja sekä ubikitiini-proteosomi-reitin teoreettista perustaa.

Proteosomi-ubikitiini-reitissä hajotettavat solut merkitään pienellä ubikitiini-proteiinilla aminohappoketjun sivuketjun lysiinitähteeseen. Tämän jälkeen kohdeproteiiniin liitetään useita ubikitiineja, joista muodostuu polyubiikitiiniketju. Merkitsemisreaktiota katalysoivat ubikitiini-ligaasit. Proteosomit hajoittavat merkityt proteiinit. [15.]

Proteiinien tietyt ominaisuudet vaikuttavat siihen, kuinka nopeasti ne tulevat ubikinoituksi. Tällaisia ominaisuuksia ovat esimerkiksi soluliman proteiinejen N-termiinalinen aminohappotähde, sen varaus ja koko. Joissakin proteiineissa erityiset aminohapposekvenssit ohjaavat proteiinit nopeasti proteosomin hajotettaviksi. [16.] Monien proteiinien stabiilisuus määritetäänkin sen perusteella, kuinka nopeasti ne tulevat ubikinoituiksi.

Ubikinaatio on monivaiheinen prosessi, johon osallistuu kolme eri ubikitiini-entsyymiä. Ensimmäisessä vaiheessa ubikitiini-entsyymi E1 hydrolysoi ATP:ta ja adenyloi ubikitiini molekyylin eli muodostaa fosforiesterisidoksen ubikitiinin hydroksyyliiryhmän ja adenoosiinimonofosfaattinukleotidin välille.

Tämän jälkeen ubikitiini siirretään toiselle ubikitiinientsyymille E2. Samaan aikaan E3-ligaasit tunnistavat ubikinoitavan kohdeproteiinin ja katalysoivat ubikitiinin siirron E2 entsyymiltä kohdeproteiiniin. Vaihtoehtoisesti ubikitiini voidaan siirtää E2-entsyymiltä E3-ligaasilla, ja tämä kuljettaa ubikitiinin substraatille. Kuvassa 4 on havainnollistettu proteiinin ubikinaatiota ja proteosomin rakennetta.



Kuva 4 Proteiinin ubikinaatio ja 26S proteosomin rakenne [17].

Kohdeproteiini täytyy merkitä vähintään 4:llä ubikitiinilla, jotta proteosomi pystyisi tunnistamaan ja hajottamaan sen. Mekanismia, jolla proteosomi tunnistaa polyubikinoituneen proteiinin, ei täysin tunneta.

Ubikinoinnin jälkeen proteosomin 19S säätelyalue sitoo hajotettavan proteiinin ATP:tä vaativassa reaktiossa. Substraattiproteiinin täytyy tämän jälkeen sitoutua myös proteosomin 20S-alueelle, jotta se pääsisi kontaktiin proteolyttisesti aktiivisten osien kanssa. 20S-alueelle kiinnittyessään proteiinin täytyy olla ainakin osittain avautunut laskoksestaan. Substraattiproteiinin liittymistä 20S-ytimeen kutsutaan translokaatioksi.

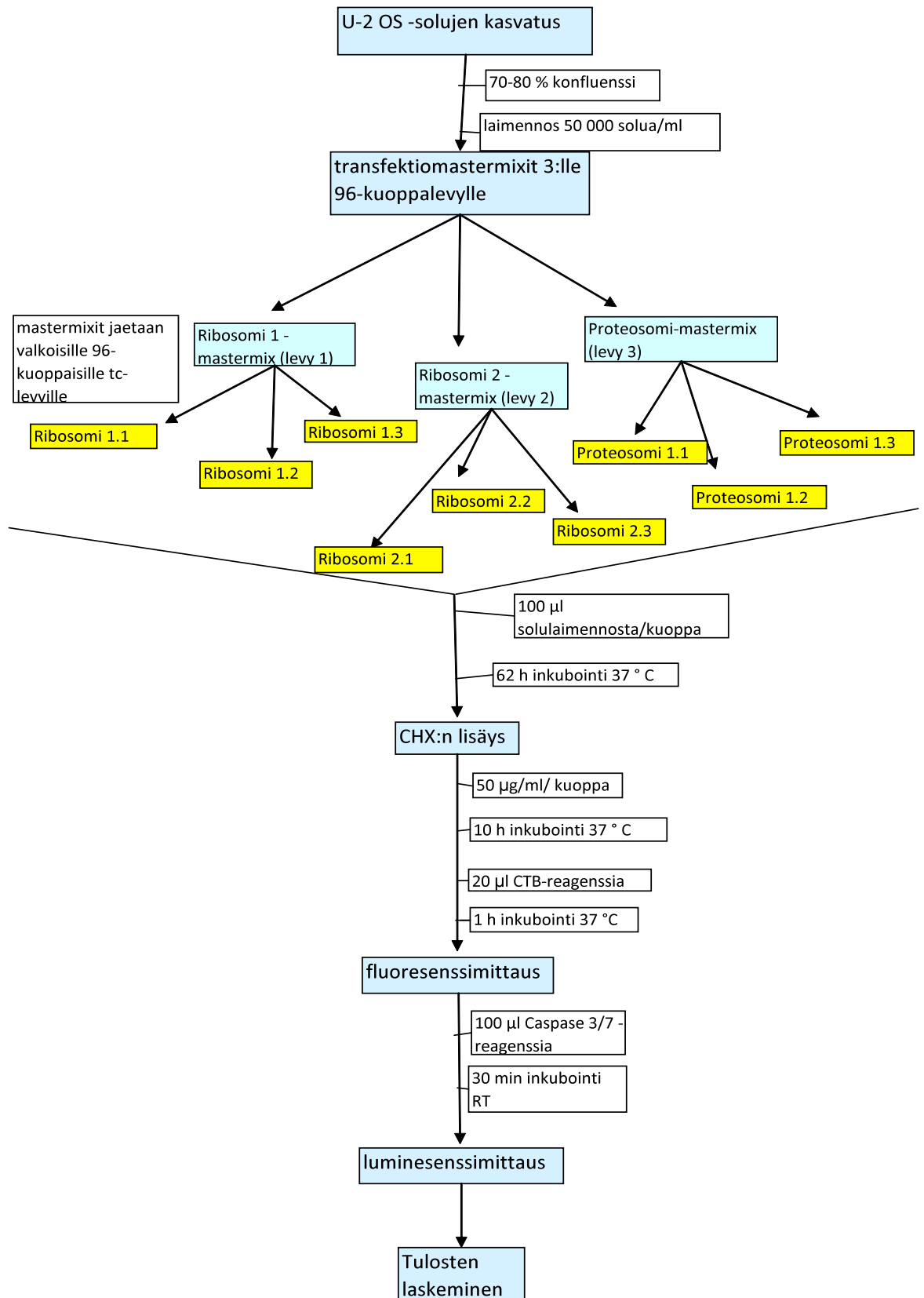
Proteiinien hajotus tapahtuu proteosomin 20S ydinosassa. Hajotuksen tuloksena syntyy yleensä 7-9 aminohappoa pitkiä polypeptidejä, mutta koko voi vaihdella 4:stä 25:een aminohappoon organismista ja substraatista riippuen. [18.]

Vaikka kaspasit ovat pääroolissa apoptoosissa, on myös proteosomeilla merkittävä osa solun ohjelmoidussa kuolemassa. Proteosomien rooli apoptoosissa havaitaan kohonneina ubikinaatio, E1, E2 ja E3 –konsentraatioina hetkeä ennen apoptoosia. Apoptoosin aikana tumassa sijaitsevien proteosomien on havaittu siirtyvän kuolevaan soluun muodostuvien rakkuloiden ulkokalvolle. [19.]

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 Vuokaavio

Kuvassa 5 on esitetty vuokaavio työn vaiheista ja etenemisestä.



Kuva 5 Vuokaavio työn etenemisestä.

3.2 U-2 OS -solut

U-2 OS -solut ovat J. Pontenen ja E. Sakselan vuonna 1964 eristämiä epiteelisoluja. Ne ovat lähtöisin 15-vuotiaan osteosarkoomaa sairastaneen tytön sääriluun luuytimestä. Solun metaboliatuotteita ovat osteosarkoomaperäiset kasvutekijät (ODGF) ja reseptoreja insuliinin kaltainen kasvutekijä I (IGF-I) ja insuliinin kaltainen kasvutekijä II (IGF II). U-2 OS -soluja käytetään laajasti transfektion isäntäsoluina.

Tässä työssä soluviljelyyn käytettiin nisäkässolujen viljelyyn tarkoitettua DMEM-kasvatusliuosta (Dulbecco's modified eagle medium) (Gibco, cat. Nr. 12491-015), johon lisättiin 10 % inaktivoitua FBS:a, 3 % L-glutamiinia sekä antibiooteiksi 1 % penisilliiniä ja streptomysiiniä. [20.]

3.3 Transfektio

Ennen transfektiota U-2 OS -solut laimennettiin oikeaan tiheyteen. 10 cm²-soluviljelymaljalta poistettiin kasvatusmedia ja tilalle pipetoitiin 10 ml PBS-liosta solujen pesemiseksi. Maljaa ravisteltiin kevyesti ja PBS-liuos poistettiin maljalta. Maljalle pipetoitiin 2 ml trypsiini-EDTA-liuosta (200 mg/l EDTA, 170 000 U/l trypsiini) ja soluja inkuboitiin 20 minuuttia lämpökaapissa 37 asteessa 5-prosentin hiilidioksidipitoisuudessa. Inkuboinnin jälkeen irronneet solut laskettiin Bürker-lasissa mikroskoopin alla. Solut laimennettiin DMEM-kasvatusmediaan niin, että lopullinen tiheys oli 50 000 solua/ml kasvatusmediaa.

Solujen laimentamisen jälkeen tehtiin HiPerfect (Qiagen, cat. nr. 301705) transfektioareagenssista ja opti-MEM-kasvatusmediasta (Life technologies, cat nr. 31985-062) mastermix. Transfektioareagenssin tarve yhtä reaktiokuoppaa kohden 96-kuoppalevyformaattissa oli 0,7 µl. Kasvatusmediaa käytettiin 25 µl reaktiokuoppaa kohden. Mastermixissä HiPerfectin ja kasvatusmedian suhde oli 1:35,7.

Mastermix pipetoitiin kolmelle 96-kuoppaiselle PCR-levylle. Jokaiseen kuoppaan pipetoitiin mastermixiä 3,5:een reaktioon tarvittava määrä. Reaktiota kohden pipetoitiin 25 µl, joten lopullinen volyyymi kuoppaa kohden oli 87,5 µl. Tämän jälkeen PCR-levylle

pipetoitiin hiljennyksen kohdegeeneille sekvenssispesifiset siRNA:t Qiagenin kaupallista kirjastosta. siRNA:t pipetoitiin 3,5-kertaisina. Yhden reaktion vaatima siRNA-määrä oli noin 18 µM. siRNA:t olivat laimennettuina 833 nM, ja tästä pipetoitiin 2,25 µl reaktiota kohden eli yhteensä 7,9 µl. Näytteet sekoitettiin hyvin ja reaktioseoksen annettiin inkuboitua 10 minuuttia huoneenlämmössä

Seuraavissa kuvissa 6–8 on esitetty mallit pipetoituista 96-kuoppalevyistä. Kuvissa 6 ja 7 on ribosomiin ja ribosomin toiminnan säätelyyn vaikuttavien siRNA:iden kohdegeenit. Kuvassa 8 on proteosomeihin vaikuttavien geenien siRNA:t. Jokaiselle levyille pipetoitiin myös optimointivaiheessa määritetyt kontrollit (Qiagen):

- plk1, pro-apoptoottinen kontrolli
- siControl1, negatiivinen kontrolli
- siControl2, negatiivinen kontrolli
- casp7, anti-apoptoottinen kontrolli
- casp3, anti-apoptoottinen kontrolli
- casp3+7, anti-apoptoottinen kontrolli.

Yhteensä hiljennyksen kohdegeenejä kontrollit mukaanlukien oli 203.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	siContrl2	neg.ssirna	neg.sirna	EIF6	RPS19	VEGFC	XPO1	RPLP2	PGF	RPL36	FIGF	media
B	TBL3	FRAP1	NOL6	TP53BP2	VEGFA	MDM2	MYC	TCOF1	RICTOR	IGF1	TP53BP1	WDR3
C	RAN	INS	RPL38	RPP38	DKC1	TSC2	TP53	VEGFB	RPL10	MAX	MAX	MDM4
D	BRAF	AKT1	CSNK2A1	AKT2	CSNK2A2	PIK3R2	PIK3CA	PIK3CB	PIK3CD	PIK3CG	PIK3R1	RPS6KA3
E	PRKAA1	RPS6KB1	PRKAA2	RPS6KB2	MAPK1	MAPK3	RPS6KA1	RPS6KA2	PIK3R3	STK11	ULK1	ULK2
F	AKT3	RPS6KA6	ULK3	STRADA	RIOK2	RIOK1	FRAP1	NXT2	RPP40	SBDS	HEATR1	RPS27L
G	HIF1A	KIAA1303	NVL	NAT10	MPHOSPH10	RCL1	BMS1	POP4	NOP5/NOP58	UTP15	GNL3L	MDN1
H	casp3+7	UTP18	CAB39L	RBM28	RPL37	casp3	casp3	casp7	plk1	plk1	sicontrol1	sicontrol1

Kuva 6 Ribosomaalisia siRNA:n kohdegeenejä 96-kuoppalevyllä (levy 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	siControl2	neg.siRNA	neg.siRNA	NOL5A	SPATA5	WDR75	GNL3	XRN2	CIRH1A	RPL15	RPS23	media
B	XRN1	WDR36	c15orf15	POP1	RICTOR	RPL32	RNASEN	RPL28	EIF4B	RHEB	NXF3	PWP2
C	EFTUD1	LSG1	CAB39	FCF1	RPS21	RPL8	UTP14A	EIF4E2	RPS20	RPL31	RPL34	RPLP0
D	RPS24	RPL37A	RPL3	EIF4EBP1	RPS6	DDIT4	RPS12	C9orf23	RPL35A	REXO2	UTP6	NOP10
E	REXO1	NHP2	NXT1	RPS17	NMD3	RPP25	NXF5	RPL41	RPL23	NXF1	RPS3	IMP4
F	GAR1	RPL30	NHP2L1	TSC1	RPL23A	POP5	RPL5	FBL	GBL	RPS7	RPS14	RPS11
G	IMP3	RPS5	RPL11	RPL19	RPL39	RPL23	RPS3	RPL5	RPL26	RPL27A	RPS6	RPS15
H	casp3+7	RPS7	RPS20	WDR43	EIF4E1B	casp3	casp3	casp7	plk1	plk1	siControl1	siControl1

Kuva 7 Ribosomaalisia siRNA:n kohdegeenejä 96-kuoppalevyllä (levy 2)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PSMA1	PSMB4	PSMA2	PSMA4	PSMD2	PSMB3	PSMA5	PSMA6	PSMA7	PSMB1	PSMB5	PSMB6
B	PSMB7	PSMB8	PSMC3	PSMB9	PSMB10	PSMC1	PSMC2	PSMC3IP	PSMC4	PSMD14	PSMC5	PSMC6
C	PSME3	PSMD1	PSMD3	PSMF1	PSMD4	PSMD5	PSMD11	PSMD6	PSMD13	PSME4	PSMD7	PSMD8
D	PSMD9	PSMD10	PSMD12	PSME1	PSME2							
E	siControl2	plk1	plk1	casp3+7	casp3	casp3	casp7	siControl1	siControl1			
F												
G												
H												

Kuva 8 Proteosomeihin vaikuttavien siRNA:iden kohdegeenit 96-kuoppalevyllä (levy 3)

10 minuutin inkuboinnin jälkeen PCR-levyillä olevat mastermixit jaettiin valkoisille 96-kuoppaisille soluviljelylevyille. Jokaisesta reaktiokaivosta tehtiin tripikaatiit pipetoimalla kolmelle levyille 24,5 µl reaktioseosta. Lopputuloksena oli siis 3 kuvien 6–8 kaltaista valkoista soluviljelylevyä. Levyille annettiin nimet ribosomi 1.1, 1.2, 1.3 (rinnakkaiset levyiltä 1) ribosomi 2.1, 2.2 ja 2.3 (rinnakkaiset levyiltä 2) sekä proteosomi 3.1, 3.2 ja 3.3 (rinnakkaiset levyiltä 3). Näytteet sekoitettiin ja inkubointia huoneenlämmössä jatkettiin vielä 10 minuuttia.

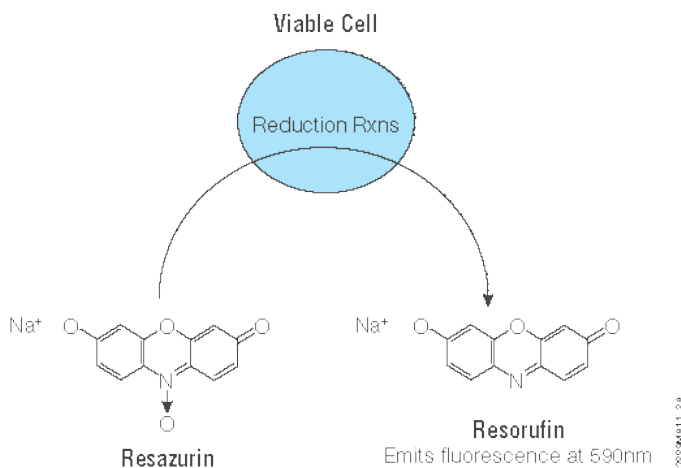
Inkuboinnin jälkeen jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 100 µl solut sisältävää kasvatusmediaa. Lopullinen solumäärä levyillä kuoppaa kohden oli noin 5000 solua. Näytteet sekoitettiin huolellisesti ja niitä inkuboitiin yhteensä 72 tuntia soluinkubaattorissa 37 asteessa 5-prosentin hiilidioksiidipitoisuudessa.

62 tunnin inkubaation jälkeen soluihin lisättiin apoptoosille herkistävä sykloheksimidi (CHX). CHX:ä pipetoitiin jokaiseen kaivon 50 µg/ml kuopan totaalitylavuuden ollessa 125 µl. Tämän jälkeen inkubointia jatkettiin samoissa olosuhteissa edelleen 10 tuntia.

3.4 Apoptoosimittaukset

3.4.1 Cell titer-blue -fluoresenssimittaus

Cell titer-blue -määrityksessä mitataan elävien solujen määrää, joka on verrannollinen näytteen lähettämään fluoresenssisignaaliin. Solunäytteisiin pipetoidaan resazuriinia sisältävää reagenssia, jonka elävät solut kykenevät muokkaamaan resorufiiniksi. Resorufiini emittoi fluoresenssia aallonpituudella 590 nm. (Kuva 9.) [21.]



Kuva 9 Resazuriinin metabolointi resorufiiniksi elävässä solussa [21].

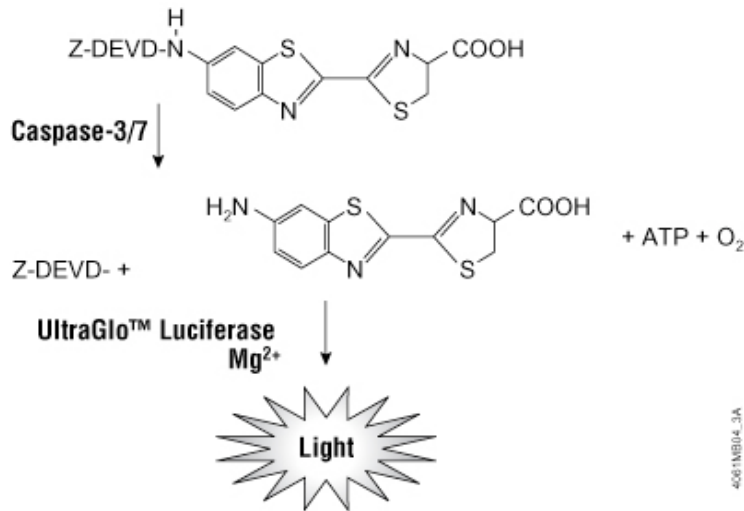
72 tunnin inkubaation jälkeen levyiltä mitattiin elävien solujen emittoima fluoresenssi Cell titer-blue -kitin avulla. Cell titer-blue -reagenssi laimennettiin 1:4 nukleaaasivapaaseen veteen ja jokaiseen reaktiokaivoon pipetoiitiin 20 µl reagenssiä. Näytteet sekoitettiin huolellisesti ja niitä inkuboititiin tunti +37 asteessa.

Tunnin kuluttua levyiltä mitattiin fluoresenssit FluoStar-fluoresenssilevylukijalla. Eksikaatioaallonpituudeksi asetettiin 544 nm ja emissioaallonpituudeksi 590 nm (kitin ilmoitetut viitearvot olivat 560_{ex}/590_{em}).

3.4.2 Caspase 3/7 -kaspasiaktiivisuuden määrittäminen

Caspase 3/7 -kiti mittaa solujen kaspasi 3:n ja kaspasi 7:n aktiivisuutta. Tässä mittausmenetelmässä lusiferaasientsyymiin substraattia on modifioitu lisäämällä siihen DEVD-entsyymi. Lusiferaasi ei sellaisenaan kykene käyttämään yhdistettyä substraattia vaan kaspasientsyymi pilkkoo DEVD:n ensin pois yhdisteestä. Mitä enemmän

näytteessä on kaspasiaktiivisuutta, sitä enemmän substraattia vapautuu lusiferaasin käyttöön ja sitä enemmän valoa näyte emittoi ja sen luminesenssi voidaan luminometrillä detektoida. (Kuva 10.) [22.]



Kuva 10 Caspase 3/7:n kemiallinen reaktio. Solun kaspasiaktiivisuus pilkkoo modifioidun lusiferaasientsyymin substraatin lusiferaasin käyttöön. [22.]

Fluoresenssimittauksien jälkeen levyille pipetoitiin kaspasiaktiivisuutta mittaavat reagenssit. Reagenssit valmisteltiin kitin ohjeiden mukaan [22]. Reagenssia pipetoitiin 100 µl kuoppaa kohden. Näytteet sekoitettiin ja niitä inkuboitiin huoneenlämmössä puoli tuntia. Inkuboinnin jälkeen levyiltä mitattiin luminesenssit TopCount-luminometrillä.

4 Tulokset ja tulosten analysointi

Tulokset-osiossa käsitellään esimerkin omaisesti levyä Ribosomi 1.1 datan analysoinnin välivaiheiden osalta. Kaikkien 9 eri levyjen luminesenssi- ja fluoresenssidatat käsiteltiin yhtäläisesti. Kuvissa 11 ja 12 on esitetty luminesenssien ja fluoresenssien raakadat levytä Ribosomi 1.1.

	Raw Data (544, 590)			Ribosomi 1.1								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2781	3623	3756	4017	2480	3330	3155	2190	2295	1503	2767	740
B	3358	3057	2925	2996	2800	3053	2864	3107	3548	3018	3120	2877
C	3299	4131	3739	3667	3684	2500	2876	3146	4249	3123	3147	2537
D	2795	3133	3545	3363	3763	4229	4064	3628	3301	31718	2491	52107
E	2437	2985	3511	3755	2968	3584	3273	3433	4025	4450	4008	3412
F	2879	4144	3131	3220	2276	2004	2753	3109	3137	3833	2222	2673
G	2433	2664	2722	2580	3096	2593	4166	3232	2834	3003	2289	2482
H	2550	3238	3997	3625	2762	3337	2146	2642	2012	1840	3306	3412

Kuva 11 Fluoresenssimittauksen raaka-arvot levyiltä Ribosomi 1.1. Analyysin kontrollit on laatikoitu kuvassa. Punaisella merkityt lukuarvot ovat selkeästi virheellistä fluoresenssisignaalia.

	Ribosomi											
	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1
A	49409	122011	118023	122793	50345	122248	201958	104740	34454	41437	57806	274
B	80838	987518	682284	721447	83693	773025	192826	576619	112354	144514	95911	71555
C	198351	131865	125334	113475	195812	686710	84623	154543	293176	794111	53648	56946
D	868759	081618	096646	874203	09711	80867	101886	868571	749925	2805	95294	4266
E	82031	106643	177952	93739	192373	142352	798641	135730	87283	102210	135050	59380
F	113724	154682	049299	286310	227572	043272	159272	818188	109654	065727	580830	128786
G	132704	892701	086612	258159	113153	111456	163196	146874	103348	528038	55606	949966
H	310269	51515	114865	100076	754541	453608	741385	984576	694588	137193	86097	91549

Kuva 12 Luminesenssimittausten raaka-arvot levyiltä Ribosomi 1.1 Analyysin kontrollit on laatikoitu kuvassa. Punaisella merkityt lukuarvot ovat selvästi virheellistä fluoresenssisignaalia.

Fluoresenssi- ja luminesenssimittauksien tulokset analysoitiin suhteuttamalla saadut arvot samalla levyillä olleisiin negatiivikontrollien fluoresenssi- ja luminesenssikeskiarvoihin jakamalla raakafluoresenssit ja -luminesenssit negatiivikontrollien keskiarvoilla. Näin triplikaattien tuloksia voitaisiin vertailla keskenään. Kuvissa 13 ja 14 on esitetty saadut suhteelliset arvot. Fluoresenssiarvojen suhteuttamiseen käytettiin negatiivikontrollien keskiarvoa 3359 ja luminesenssiarvojen suhteuttamiseen negatiivikontrollien keskiarvoa 938234.

	Ribosomi 1.1											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,8	1,079	1,1182	1,1959	0,738315	0,9914	0,9393	0,652	0,683	0,4475	0,8238	740
B	1	0,91	0,8708	0,8919	0,833581	0,9089	0,8526	0,925	1,056	0,8985	0,9288	0,857
C	1	1,23	1,1131	1,0917	1,096755	0,7443	0,8562	0,9366	1,265	0,9297	0,9369	0,755
D	0,8	0,933	1,0554	1,0012	1,120274	1,259	1,2099	1,0801	0,983	31718	0,7416	52107
E	0,7	0,889	1,0453	1,1179	0,883596	1,067	0,9744	1,022	1,198	1,3248	1,1932	1,016
F	0,9	1,234	0,9321	0,9586	0,677583	0,5966	0,8196	0,9256	0,934	1,1411	0,6615	0,796
G	0,7	0,793	0,8104	0,7681	0,921703	0,772	1,2403	0,9622	0,844	0,894	0,6815	0,739
H	0,8	0,964	1,1899	1,0792	0,822269	0,9935	0,6389	0,7865	0,599	0,5478	0,9842	1,016

Kuva 13 Fluoresenssiarvot levyiltä Ribosomi 1.1 suhteutettuna negatiivikontrollien keskiarvoon. Kontrollit on laatikoitu kuvassa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,53	1,30	1,26	1,31	0,54	1,30	2,15	1,12	0,37	0,44	0,62	0,00
B	0,86	0,93	0,88	1,29	1,00	1,84	0,99	0,82	1,20	1,54	1,02	0,76
C	1,15	1,41	1,34	1,21	1,13	0,92	0,90	1,65	2,06	1,00	0,57	0,61
D	0,73	0,87	1,17	0,79	1,17	0,86	1,19	0,73	0,53	0,01	1,02	0,00
E	0,87	1,14	1,90	1,00	0,98	1,52	1,05	1,45	0,93	1,09	1,23	0,63
F	1,21	1,65	1,59	3,05	2,43	1,53	1,70	3,39	1,17	1,77	0,86	1,37
G	1,41	0,99	1,16	0,62	1,21	1,19	1,74	1,57	1,10	0,30	0,59	0,53
H	0,11	0,55	1,22	1,17	0,58	0,57	0,44	0,90	1,01	1,25	1,02	0,98

Kuva 14 Luminesenssiarvot levyiltä Ribosomi 1.1 suhteutettuna negatiivikontrollien keskiarvoon. Kontrollit on laatikoitu kuvassa.

Luminesenssimittauksissa saadut suhteelliset arvot jaettiin fluoresenssimittauksissa saaduilla suhteellisilla arvoilla. Nämä arvot on esitetty kuvassa 15.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,64	1,21	1,12	1,09	0,73	1,31	2,29	1,71	0,54	0,99	0,75	
B	0,86	1,02	1,01	1,45	1,20	2,03	1,16	0,88	1,13	1,71	1,10	0,89
C	1,18	1,14	1,20	1,11	1,03	1,24	1,05	1,76	1,63	1,08	0,61	0,80
D	0,88	0,93	1,11	0,79	1,04	0,68	0,99	0,68	0,54	0,00	1,37	0,00
E	1,21	1,28	1,81	0,89	1,11	1,42	1,08	1,42	0,78	0,82	1,03	0,62
F	1,41	1,34	1,71	3,18	3,58	2,56	2,07	3,66	1,25	1,55	1,30	1,72
G	1,95	1,25	1,43	0,81	1,31	1,54	1,40	1,63	1,31	0,33	0,87	0,72
H	0,14	0,57	1,03	1,09	0,71	0,58	0,69	1,15	1,68	2,28	1	1

Kuva 15 Luminesenssimittausten negatiivikontrolliin suhteutetut arvot jaettuna fluoresenssimittausten negatiivikontrolliin suhteutetuilla arvoilla. Kontrollit ovat laatikoitu kuvassa.

Triplikaattien arvoja vertailtiin keskenään laskemalla mediaani ja absoluuttinen hajonta. Mediaanin absoluuttisen hajonnan, eli keskimmäisen luvun absoluuttisista hajonnoista, perusteella määriteltiin pienimmät ja suurimmat hyväksyttävät arvot, kun ne, jotka hajoivat yli 1,5 mediaanin absoluuttista hajontaa mediaanista jätettiin huomiotta. Laskutoimitusta havinnollistetaan seuraavassa esimerkissä.

Esimerkki 1. AKT1

replikaatti 1 0,93

replikaatti 2 1,96

replikaatti 3 3,44

Replikaattien mediaani eli lukujonon keskimäinen luku on 1,96. Jokaiselle replikaatille laskettiin absoluuttinen hajonta mediaanista.

$$\text{replikaatti 1 } |0,93 - 1,96| = 1,03$$

$$\text{replikaatti 2 } |1,96 - 1,96| = 0$$

$$\text{replikaatti 3 } |3,44 - 1,96| = 1,48$$

Mediaanin absoluuttinen hajonta on keskimäinen luku absoluuttisista hajonnoista, eli tässä esimerkkitapauksessa luku 1,03.

Seuraavaksi laskettiin pienimmät ja suurimmat arvot, jotka triplikaateista otettiin huomioon eli luvut, jotka hajasivat alle 1,5 mediaanin absoluuttista hajontaa triplikaattien mediaanista.

Pienin hyväksyttävä arvo:

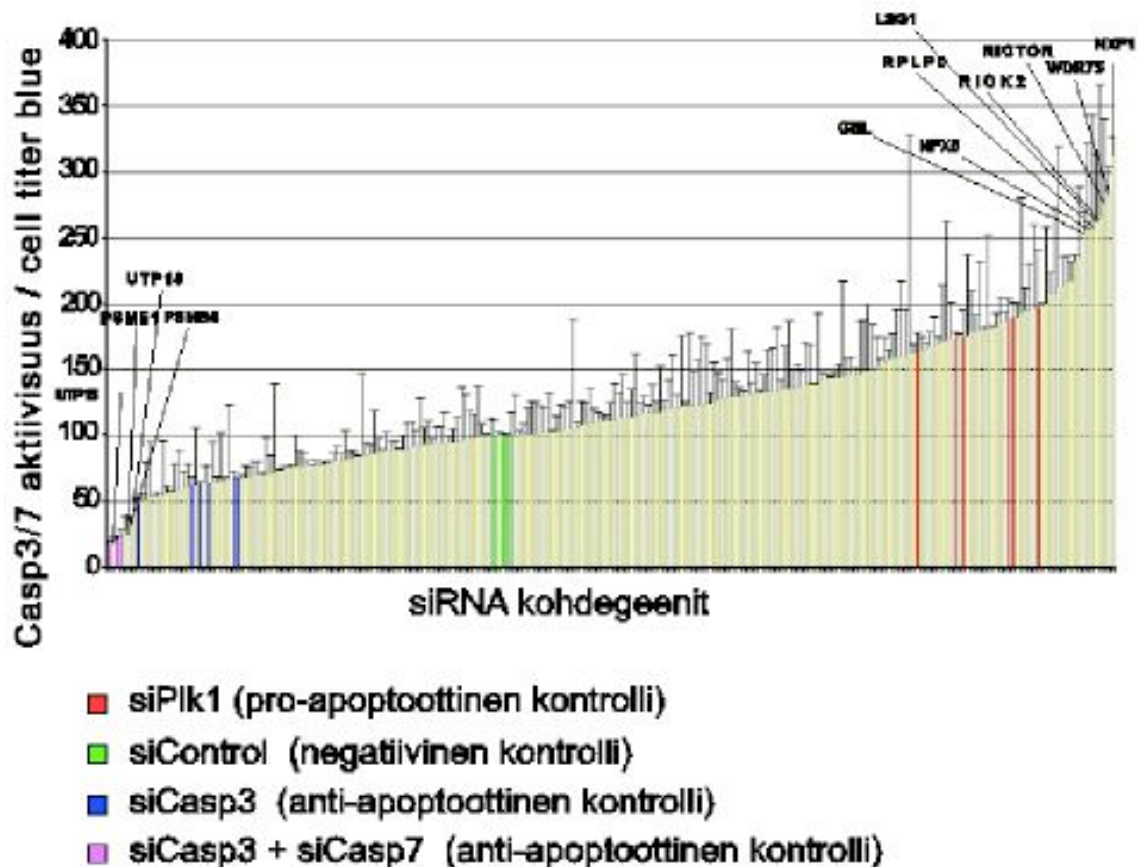
$$1,96 - 1,5 * 1,03 = 0,42$$

Suurin hyväksyttävä arvo:

$$1,96 + 1,5 * 1,03 = 3,51$$

Näin ollen tässä esimerkkitapauksessa kaikki triplikaattien lukuarvot otetaan analyseissä huomioon. Liitteessä 1 on esitetty kaikkien geenien hiljentämisestä saadut arvot, jotka ovat hajonneet alle 1,5 mediaanin absoluuttista hajontaa triplikaattien mediaanista. Hyväksytyille replikaateille laskettiin myös keskiarvot ja keskihajonnat.

Kuvassa 16 on esitetty kuvaaja, jossa x-akselilla on kaikki siRNA-hiljennyksen 203 kohdegeeniä ja y-akselilla arvot, jotka on laskettu edellä esitetyn esimerkin mukaan. Arvot on muutettu prosenteiksi kertomalla ne 100-prosentilla. Kuvaajaan on nimetty vahvimmat anti- ja pro-apoptoottiset geenit sekä kontrollit.



Kuva 16 Kohdegeenien kaspasiaktiivisuus suhteessa elävien solujen fluoresenssiin. Kuvaa on merkitty apoptoosimittausten kontrollit, 4 vahvimmin anti-apoptoottista geeniä (UTP15, PSME1, UTP18 a PSMB5) sekä 8 pro-apoptoottisinta geeniä (NFX1, WDR75, RICTOR, RIOK2, LSG1, RPLP0, GBL, NFX5) ja näiden keskihajonnat.

Geenienhiljennyksen voidaan katsoa onnistuneen, sillä analyyseissä käytetyt kontrollit ovat asettuneet kuvan 16 kuvaajassa oikeille paikoilleen. Kaspasi-3 ja yhdistelmä-kontrolli kaspasi-7 ja kaspasi-3 ovat toimineet anti-apoptoottisesti verrattuna negatiiviseen kontrolliin. Erityisen hyvin apoptoosia ehkäisee kaspasi-7 ja kaspasi-3 -geenien samanaikainen knockdown. Anti-apoptoottisissa kontrolleissa apoptoosia tapahtuu keskimäärin noin puolet vähemmän kuin apoptoosin negatiivikontrollissa.

Myös pro-apoptoottinen kontrolli plk1 on toiminut määrityksissä odotusten mukaisesti. plk1-geenin hiljentäminen lisää solun apoptoosia puolella tai jopa kaksinkertaistaa sen negatiivikontrolliin verrattuna. Lisäksi kontrolleina käytettyjen geenien keskihajonnat ovat hyvät pieniä, joten tämä lisää tulosten luotettavuutta.

Taulukossa 1 on esitetty vahvimmat löydetty anti- ja pro-apoptoottiset geenit, näiden koodaamat proteiinit, sekä suhdeluvut ja keskihajonnat. Anti-apoptoottisista geeneistä taulukoitiin kaikki, jotka olivat vähentäneet apoptoosia alle puoleen negatiivikontrolliin verrattuna. Pro-apoptoottisista geeneistä taulukoitiin kaikki, jotka olivat nostaneet apoptoosin tasoa yli 2,5-kertaiseksi negatiivikontrolliin verrattuna.

Taulukko 1 Vahvimmat pro- ja anti-apoptoottiset geenit, niiden koodaamat proteiinit, suhdeluvut ja keskihajonnat.

Geeni	Geenin koodaama proteiini	Pro- vai anti-apoptoottinen	Suhdeluku	Keskihajonta
UTP15	U3 ribonukloproteiini, pre-18S-ribosomaalisen RNA:n käsittely	anti	0,35	0,029
UTP18	U3 ribonukloproteiini, pre-18S-ribosomaalisen RNA:n käsittely	anti	0,18	0,040
PSME1	immunoproteosomin 11S-säätelyosan alfa-alayksikön proteiini	anti	0,29	0,084
PSMB5	proteosomin 20S-alayksikön proteiini	anti	0,43	0,088
LSG1	GTPaasi-entsyymi, pre-60S-ribosomaalisen alayksikön kuljettaminen tumasta solulimaan	pro	2,6	0,83
RPLP0	Ribosomin 60S-alayksikön proteiini	pro	2,63	0,50
GBL	mTORC1- ja mTORC2-proteiinikompleksien alayksikön proteiini	pro	2,56	0,13
NFX5	TAP-like proteiini 1, osallistuu mRNA:n kuljettamiseen tumasta solulimaan	pro	5,28	0,64
NFX1	Tip-associated-protein, osallistuu mRNA:n kuljettamiseen tumasta solulimaan	pro	3,25	0,21
RICTOR	mTORC2-proteiinikompleksin alayksikön proteiini	pro	2,86	0,17
WDR7	WDR75-proteiini, pre-mRNA:n prosessointi	pro	2,79	0,61
RIOK2	RIOK2-proteiinikinaasi, pre-40S-ribosomin pilkkominen	pro	2,66	0,99

5 Yhteenveto

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää U-2 OS -solujen proteosomi- ja translaatiogeenien vaikutusta solun apoptoosiin. 5000 solua sisältävä näyte transfektoitiin yhden kohdegeenin hiljentävällä siRNA:lla. Hiljennykset tehtiin yhteensä 208 eri geenille ja negatiivi-, pro- ja anti-apoptoottisille kontrolleille. 10 tuntia ennen transfektion 72 tunnin inkubaatioajan täyttymistä, solut herkistettiin kuolemalle lisäämällä 96-kuoppaisen soluviljelylevyn kuoppiin translaatioinhibiittorikemikaali sykloheksimidiä.

Apoptoosi deteketoitiin inkubaatioajan jälkeen mittaamalla soluista fluoresenssit, jotka indikoivat elävien solujen määrää, sekä luminesenssit, jotka indikoivat solujen kaspasiaktiivisuutta. Tämän jälkeen fluoresenssi- ja luminesenssiarvot suhteutettiin samoilla levyillä olleiden negatiivikontrollien fluoresenssien ja luminesenssien keskiarvoihin. Suhteutettu kaspasiaktiivisuus jaettiin saman levyn suhteutetulla fluoresenssiarvolla. Näin saatiin vertailtavia lukuja triplikaattilevyille.

Opinnäytetyössä päästiin asetettuun tavoitteeseen. Analyysi proteosomi- ja translaatiogeenien vaikutuksesta apoptoosiin suoritettiin onnistuneesti. Lopputuloksena voitiin osoittaa osalla tutkittavista geeneistä olleen voimakas apoptoottinen vaikutus ja osalla vahva anti-apoptoottinen vaikutus.

Työn onnistumista ja tulosten luotettavuutta arvioitiin kontrollien sijoittumisella mittauksissa sekä niiden keskihajontoja tarkastelemalla. Kontrollit asettuivat odotusten mukaisesti keskelle ja noin 50-prosentin ja 200-prosentin kohdille. Keskihajonnat olivat kontrolleilla erittäin pieniä. Yksittäisten ribosomaalisten ja proteosomaalisten geenien keskihajonnat olivat suuria. Tämän vuoksi seuraavaksi olisi hyvä toistaa analyysi tulosten varmentamiseksi.

Tämän työn tuloksena tiedetään proteosomi- ja translaatiogeenien vaikutus apoptoosin määrään. Aikaisempaa tutkimustietoa näiden geenien yhteydestä apoptoosin säätelyyn translaatiotasolla ei ole julkaistu. Työn tuloksena löydettyjä voimakkaasti apoptoosiin vaikuttavia geenejä tullaan hyödyntämään tutkimuskohteina, kun apoptoosin säätelymekanismeja translaation tasolla tutkitaan syvemmin tulevaisuudessa esimerkiksi proteiini-proteiini-interaktioihin keskittyvillä tutkimuksilla.

Lähteet

- [1] Hanahan, D. & Weinberg, R. Hallmarks of cancer: the next generation. Verkkodokumentti. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411001279>. Luettu 08.11.2012.
- [2] Translational control in cancer. Silvera, D., Formenti, S. & Schneider, R. <http://www.nature.com/nrc/journal/v10/n4/abs/nrc2824.html>. Luettu 08.11.2012.
- [3] The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. Mani, A. & Gelmann, E. Verkkodokumentti. <http://jco.ascopubs.org/content/23/21/4776>. Luettu 08.11.2012.
- [4] Alberts, B. ym. 2002. 4. painos. Molecular biology of cell. New York: Garland science, a member of the Taylor and Francis group.
- [5] Apoptotic pathway. Verkkodokumentti. <http://www.biooncology.com/research-education/apoptosis/pathways/index.html>. Luettu 22.05.2012.
- [6] The Fas signalling pathway and its role in pathogenesis of cancer. Houston, E. & O'Connell, J. Verkkodokumentti. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489204000888>. Luettu 07.11.2012.
- [7] Apoptosis: a review of programmed cell death. Elmore S. Verkkodokumentti. <http://tpx.sagepub.com/content/35/4/495.full>. Luettu 22.05.2012.
- [8] Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. Fulda, S. & Debatin, K-M. Verkkodokumentti. <http://www.nature.com/onc/journal/v25/n34/full/1209608a.html>. Luettu 18.06.2012.
- [9] Apoptosis I. Verkkodokumentti. http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR00_ApoptosisI.aspx. Luettu 08.11.2012.
- [10] The molecular mechanics of eucaryotic translation. Verkkodokumentti. <http://www.microbio.uab.edu/ptrm/thompson/review2.pdf>. Luettu 15.10.2012.

- [11] National institutes of health. Verkkodokumentti.
<http://www.nigms.nih.gov/News/Extras/RNAi/factsheet.html>. Luettu 22.05.2012.
- [12] Nature reviews. Verkkodokumentti.
http://www.nature.com/nrg/journal/v3/n10/fig_tab/nrg908_F1.html. Luettu 26.06.12.
- [13] Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Verkkodokumentti. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2612969/>. Luettu 08.11.2012.
- [14] Vähärautio Anna. Luentomateriaali.
- [15] Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States. Verkkodokumentti.
<http://jasn.asnjournals.org/content/17/7/1807.full>. Luettu 26.10.2012.
- [16] Solunetti: proteosomit. Verkkodokumentti.
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteosomit/2/>. Luettu 22.10.12.
- [17] Verkkodokumentti. http://drugline.org/img/term/ubiquitination-15537_1.jpg. Luettu 22.10.12.
- [18] The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. Verkkodokumentti.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1171061/pdf/007151.pdf>. Luettu 22.10.2012.
- [19] Removal of proteasomes from the nucleus and their accumulation in apoptotic blebs during programmed cell death. Pitzer, F., Dantes, A., Fuchs, T., Baumeister, W & Amsterdam, A. Verkkodokumentti.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8925925>. Luettu 28.10.2012.
- [20] ATCC. Verkkodokumentti.
<<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-96&Template=cellBiology>>. Luettu 22.05.2012.
- [21] Promega. Verkkodokumentti.
<http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/101/celltiter-blue%20cell%20viability%20assay%20protocol.pdf?la=en>. Luettu 13.06.2012.

- [22] promega. Verkkodokumentti.
<http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/Caspase-Glo%203%207%20Assay%20Protocol.ashx>.
Luettu 13.6.2012.

Kaikkien niiden geenien negatiiviseen kontrolliin verrannolliset suhdelut, jotka hajoavat alle 1,5 mediaanin absoluuttista hajoamaa triplikaattien mediaanista

siRNA				average	stdr.deviation	%
AKT1	0,93	1,96	NA	1,45	72,832	145
AKT2	0,79	1,21	NA	1,00	29,698	100
AKT3	1,41	NA	1,45	1,43	2,828	143
BMS1	1,4	0,86	1,93	1,40	53,501	140
BRAF	0,88	1,28	1,85	1,34	48,748	134
C15orf15	1,99	NA	2,73	2,36	52,326	236
C9orf23	1,32	1,29	NA	1,31	2,117	131
CAB39	1,49	1,43	NA	1,46	4,374	146
CAB39L	0,57	0,84	0,73	0,71	13,390	71
casp3	0,55	0,72		0,64	12,021	64
casp3	0,46	0,51		0,48	3,760	48
casp3	0,57	0,66		0,62	6,059	62
casp3	0,70	0,63		0,67	5,032	67
casp3	0,64	0,63		0,63	0,928	63
casp3	0,67	0,67		0,67	0,446	67
casp3+7	0,19	0,27		0,23	5,223	23
casp3+7	0,18	0,14		0,16	2,538	16
casp3+7	0,22	0,17		0,20	3,436	20
casp7	1,15	0,86		1,00	20,110	100
casp7	0,78	0,79		0,79	1,011	79
casp7	1,03	0,75		0,89	19,945	89
CIRH1A	NA	1,98	2,00	1,99	1,472	199
CIRH1A	1,73	NA	1,99	1,86	18,647	186
CSNK2A1	1,11	1,55	NA	1,33	31,229	133
CSNK2A2	1,04	1,46	NA	1,25	29,671	125
DDIT4	0,74	0,75	NA	0,75	0,701	75
DKC1	1,03	1,20	NA	1,12	12,444	112
EFTUD1	1,58	1,13	NA	1,35	31,935	135
EIF4B	2,01	1,40	NA	1,71	43,249	171
EIF4E1B	0,73	0,86	0,80	0,80	6,257	80
EIF4E2	1,85	1,34	NA	1,60	36,349	160
EIF6	1,09	1,06	1,52	1,22	25,569	122
EIF4EBP1	0,98	0,92	NA	0,95	4,091	95
FBL	2,08	NA	2,28	2,18	14,646	218
FCF1	1,32	1,44	1,59	1,45	13,219	145
FIGF	0,75	0,71	NA	0,73	2,444	73

FRAP1	1,02	1,32	NA	1,17	20,773	117
FRAP1	2,07	NA	1,84	1,96	16,189	196
GAR1	NA	0,46	0,54	0,50	5,404	50
GBL	2,65	NA	2,46	2,56	13,224	256
GNL3	NA	0,78	0,86	0,82	5,763	82
GNL3	NA	1,19	2,01	1,60	57,863	160
GNL3L	0,87	NA	0,89	0,88	1,085	88
HEATR1	NA	0,84	1,00	0,92	10,690	92
HIF1A	1,95	1,62	2,30	1,96	34,273	196
IGF1	1,71	NA	1,45	1,58	18,412	158
IMP3	0,68	0,60	0,80	0,70	9,967	70
IMP4	1,83	1,09	2,33	1,75	62,496	175
INS	1,14	1,27	NA	1,21	9,137	121
KIAA1303	1,25	0,79	1,83	1,29	51,801	129
LSG1	3,28	1,68	2,85	2,60	82,815	260
MAPK1	1,11	0,98	1,18	1,09	10,127	109
MAPK3	1,42	1,05	1,34	1,27	19,433	127
MAX	1,08	1,49	NA	1,29	29,304	129
MAX	0,61	0,99	1,37	0,99	37,889	99
MDM2	2,03	NA	2,30	2,17	19,497	217
MDM4	0,80	0,94	NA	0,87	9,795	87
MDN1	0,72	0,48	0,59	0,60	11,822	60
MPHOSPH10	1,31	0,72	1,04	1,02	29,484	102
MYC	1,16	0,93	1,33	1,14	20,402	114
NAT10	0,81	NA	0,90	0,86	6,821	86
NHP2	2,59	1,42	2,00	2,00	58,473	200
NHP2L1	1,23	0,81	1,31	1,12	27,056	112
NMD3	1,71	1,09	1,37	1,39	31,058	139
NOL5A	0,71	NA	0,70	0,70	0,361	70
NOL5A	NA	0,99	1,72	1,36	51,227	136
NOL6	1,01	1,35	1,65	1,33	32,054	133
NOP10	1,56	0,91	NA	1,23	45,556	123
NOP5/NOP58	1,31	1,40	NA	1,35	6,595	135
NVL	1,43	NA	1,44	1,43	0,735	143
NXF1	3,25	NA	3,25	3,25	0,211	325
NXF3	0,93	0,80	1,05	0,93	12,367	93
NXF5	3,18	1,90	2,65	2,58	64,013	258
NXT1	1,77	NA	1,90	1,83	9,767	183
NXT2	NA	1,51	1,83	1,67	22,703	167
PGF	0,54	0,54	NA	0,54	0,001	54
PIK3CA	0,99	1,47	NA	1,23	33,903	123
PIK3CB	0,68	1,17	NA	0,92	35,052	92
PIK3CD	0,54	0,73	NA	0,63	13,073	63

PIK3CG	0,00	1,56	3,31	1,62	165,404	162
PIK3R1	1,37	1,22	NA	1,30	10,468	130
PIK3R2	0,68	0,84	NA	0,76	11,296	76
PIK3R3	0,78	0,79	NA	0,78	1,050	78
plk1	1,68	2,28		1,98	42,225	198
plk1	1,82	1,98		1,90	11,359	190
plk1	1,79	2,00		1,89	14,947	189
plk1	1,59	1,89		1,74	21,559	174
plk1	1,76	1,70		1,73	4,112	173
plk1	1,53	1,73		1,63	14,130	163
POP1	1,51	1,37	NA	1,44	9,300	144
POP4	1,63	NA	1,53	1,58	6,725	158
POP5	1,39	NA	1,39	1,39	0,153	139
PRKAA1	NA	0,73	0,88	0,80	10,908	80
PRKAA2	1,81	NA	1,92	1,87	7,695	187
PSMA1	0,97	NA	0,67	0,82	21,103	82
PSMA2	0,90	NA	0,52	0,71	26,576	71
PSMA4	0,82	1,47	NA	1,14	46,504	114
PSMA5	0,91	1,17	NA	1,04	18,523	104
PSMA6	0,71	NA	0,32	0,51	27,578	51
PSMA7	0,86	NA	0,43	0,64	30,015	64
PSMB1	0,83	0,71	NA	0,77	8,814	77
PSMB10	1,18	NA	1,59	1,39	28,867	139
PSMB3	0,91	NA	0,40	0,65	36,156	65
PSMB4	0,90	1,19	NA	1,05	20,288	105
PSMB5	NA	0,50	0,37	0,43	8,811	43
PSMB6	0,67	0,62	NA	0,65	3,445	65
PSMB7	0,72	NA	0,45	0,58	19,222	58
PSMB8	1,38	NA	1,19	1,28	13,558	128
PSMB9	1,02	NA	1,09	1,06	4,524	106
PSMC1	0,78	0,77	NA	0,77	0,244	77
PSMC2	0,86	NA	0,80	0,83	4,342	83
PSMC3	0,93	NA	0,84	0,88	6,277	88
PSMC3IP	0,91	NA	0,96	0,94	3,402	94
PSMC4	0,84	NA	0,83	0,84	0,430	84
PSMC5	0,52	NA	0,56	0,54	2,392	54
PSMC6	0,59	0,53	NA	0,56	4,629	56
PSMD1	1,06	NA	0,27	0,66	56,095	66
PSMD10	0,86	1,02	NA	0,94	11,710	94
PSMD11	1,00	1,26	NA	1,13	18,588	113
PSMD12	0,75	0,99	0,54	0,76	22,839	76
PSMD13	0,96	0,50	0,15	0,53	41,033	53
PSMD14	1,20	NA	0,99	1,09	14,921	109

PSMD2	0,79	NA	0,39	0,59	28,489	59
PSMD3	0,83	NA	0,25	0,54	40,910	54
PSMD4	0,93	NA	0,32	0,62	43,045	62
PSMD5	1,11	0,97	NA	1,04	10,102	104
PSMD6	0,90	1,36	NA	1,13	32,301	113
PSMD7	1,00	0,99	NA	1,00	0,880	100
PSMD8	1,03	1,89	0,23	1,05	83,348	105
PSMD9	0,73	NA	0,49	0,61	16,899	61
PSME1	NA	0,23	0,35	0,29	8,423	29
PSME2	0,65	NA	0,67	0,66	1,736	66
PSME3	1,19	NA	0,25	0,72	66,647	72
PSME4	1,16	0,88	NA	1,02	19,713	102
PSMF1	0,87	1,44	0,20	0,84	62,030	84
PWP2	1,18	0,84	NA	1,01	24,080	101
RAN	1,18	1,29	NA	1,24	8,418	124
RBM28	1,03	NA	1,02	1,02	0,639	102
RCL1	1,54	1,08	NA	1,31	32,441	131
REXO1	1,70	NA	1,88	1,79	12,650	179
REXO2	2,14	1,42	2,68	2,08	62,936	208
RHEB	1,96	NA	2,19	2,08	16,127	208
RICTOR	1,13	1,09	NA	1,11	3,376	111
RICTOR	2,74	NA	2,98	2,86	17,000	286
RIOK1	NA	0,92	1,48	1,20	39,485	120
RIOK2	3,58	1,60	2,80	2,66	99,565	266
RNASEN	1,02	0,98	NA	1,00	2,632	100
RPL10	1,63	1,68	NA	1,66	4,036	166
RPL11	NA	0,84	0,93	0,88	6,285	88
RPL15	1	0,92	1,08	1,00	8,063	100
RPL15	1,59	0,84	NA	1,22	53,091	122
RPL19	1,20	0,88	1,06	1,05	16,149	105
RPL23	1,82	NA	1,98	1,90	11,252	190
RPL23	1,17	0,76	0,98	0,97	20,750	97
RPL23A	2,66	0,87	1,63	1,72	90,102	172
RPL26	NA	0,81	0,96	0,89	10,338	89
RPL27A	1,45	NA	1,39	1,42	4,351	142
RPL28	0,78	0,78	NA	0,78	0,180	78
RPL3	0,77	0,75	NA	0,76	1,099	76
RPL30	1,10	0,74	0,89	0,91	18,317	91
RPL31	2,17	1,43	NA	1,80	52,387	180
RPL32	1,15	1,06	NA	1,10	6,642	110
RPL34	1,93	1,52	NA	1,72	28,895	172
RPL35A	1,15	0,89	NA	1,02	18,729	102
RPL36	0,99	1,01	NA	1,00	1,761	100

RPL37	1,09	1,14	NA	1,11	3,892	111
RPL37A	0,90	0,87	NA	0,88	1,528	88
RPL38	1,20	0,95	NA	1,08	17,641	108
RPL39	NA	1,11	1,21	1,16	7,285	116
RPL41	1,24	NA	1,49	1,36	17,523	136
RPL5	1,73	NA	1,66	1,69	5,274	169
RPL5	1,86	1,18	1,45	1,50	34,380	150
RPL8	1,17	0,75	1,77	1,23	51,363	123
RPLP0	2,27	NA	2,98	2,63	50,142	263
RPLP2	1,71	1,76	NA	1,73	3,204	173
RPP25	1,55	1,03	1,82	1,47	39,797	147
RPP38	1,11	0,86	NA	0,98	17,563	98
RPP40	NA	0,78	0,84	0,81	4,144	81
RPS11	1,05	NA	1,35	1,20	21,487	120
RPS12	1,01	0,88	NA	0,95	9,550	95
RPS14	1,15	NA	1,48	1,31	22,869	131
RPS15	1,56	NA	1,49	1,52	5,345	152
RPS17	1,14	NA	1,24	1,19	7,079	119
RPS19	0,73	0,73	NA	0,73	0,401	73
RPS20	1,91	1,36	2,62	1,96	63,554	196
RPS20	1,21	1,03	1,27	1,17	12,118	117
RPS21	1,42	NA	1,24	1,33	12,630	133
RPS23	1	1,08	0,91	0,99	8,410	99
RPS23	1,21	0,73	NA	0,97	33,912	97
RPS24	1,83	NA	1,81	1,82	1,539	182
RPS27L	1,72	1,37	1,57	1,55	18,002	155
RPS3	1,18	0,84	NA	1,01	23,719	101
RPS3	0,85	0,75	0,94	0,85	9,479	85
RPS5	NA	0,62	0,74	0,68	8,541	68
RPS6	1,29	NA	1,45	1,37	11,706	137
RPS6	0,80	0,76	NA	0,78	2,522	78
RPS6KA1	1,08	0,85	1,35	1,09	24,975	109
RPS6KA2	1,42	NA	1,46	1,44	3,174	144
RPS6KA3	NA	1,34	1,85	1,59	36,530	159
RPS6KA6	1,34	1,26	NA	1,30	5,649	130
RPS6KB1	1,28	1,55	1,72	1,52	22,357	152
RPS6KB2	NA	0,64	0,73	0,68	6,033	68
RPS7	1,59	NA	1,67	1,63	5,548	163
RPS7	NA	1,14	1,21	1,17	4,944	117
SBDS	1,55	NA	1,37	1,46	12,571	146
sicontrol1	1	1		1,00	0,000	100
sicontrol1	0,92	1,08		1,00	10,876	100
sicontrol1	1,08	0,91		1,00	12,402	100

sicontrol1	0,99	1,01		1,00	1,086	100
sicontrol1	0,88	1,12		1,00	16,971	100
sicontrol2	2,01	1,56		1,79	31,499	179
sicontrol2	0,64	1,09		0,86	32,029	86
sicontrol2	0,83	1,61		1,22	54,891	122
SPATA5	0,58	NA	0,57	0,58	0,122	58
SPATA5	2,77	1,04	2,00	1,94	86,545	194
STK11	0,82	1,07	NA	0,95	17,784	95
STRADA	3,18	1,08	2,13	2,13	105,275	213
TBL3	NA	1,12	1,23	1,17	8,179	117
TCOF1	NA	1,25	1,37	1,31	8,055	131
TP53	1,05	0,81	NA	0,93	17,549	93
TP53BP1	1,10	0,79	NA	0,94	22,031	94
TP53BP2	1,45	1,26	NA	1,36	13,262	136
TSC1	1,99	0,98	1,51	1,49	50,574	149
TSC2	1,24	0,67	NA	0,96	40,318	96
ULK1	1,03	0,86	NA	0,94	12,164	94
ULK2	0,62	0,77	NA	0,69	10,096	69
ULK3	1,71	NA	1,57	1,64	9,775	164
UTP14A	1,74	1,60	NA	1,67	10,487	167
UTP15	0,33	0,38	NA	0,35	2,910	35
UTP18	0,14	0,22	0,17	0,18	3,984	18
UTP6	2,36	NA	2,29	2,33	4,974	233
WDR3	0,89	0,74	1,01	0,88	13,691	88
WDR36	1,83	1,12	2,51	1,82	69,616	182
WDR43	0,79	0,75	NA	0,77	2,590	77
WDR75	0,69	NA	0,66	0,67	2,214	67
WDR75	2,36	NA	3,22	2,79	60,877	279
VEGFA	1,20	1,24	NA	1,22	3,218	122
VEGFB	1,76	1,21	NA	1,48	38,719	148
VEGFC	1,31	1,33	NA	1,32	1,287	132
XPO1	2,29	1,98	NA	2,14	21,849	214
XRN1	1,21	1,06	NA	1,14	10,599	114
XRN2	NA	1,82	1,79	1,80	2,116	180
XRN2	1,42	0,93	NA	1,17	34,339	117