

Marika Tuukkanen

Mikro-RNA:iden vaikutus nisäkässolujen solukalvon fosfolipidihomeostasiaan

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

19.5.2013

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika | Marika Tuukkanen Mikro-RNA:iden vaikutus nisäkässolujen solukalvon fosfolipidihomeostasiaan 47 sivua + 2 liitettä 19.5.2013 |
| Tutkinto | insinööri (AMK) |
| Koulutusohjelma | bio- ja elintarviketekniikka |
| Suuntautumisvaihtoehto | biolääketiede |
| Ohjaaja(t) | filosofian tohtori Kati Hokynar päätoiminen tuntiopettaja Titta Pirkola |
| <p>Tämä insinöörityö tehtiin osana Helsingin Yliopiston lipiditutkimusryhmän miRNA-projektia. Projektin tavoitteena on tutkia, ovatko mikro-RNA:t osallisina solukalvon fosfolipidihomeostasian ylläpidossa.</p> <p>Nisäkässoluja ja niiden soluorganelleja ympäröi solukalvo, joka muodostuu kaksoislipidikerroksesta. Suurin osa nisäkässolujen lipideistä on glyserofosfolipidejä (GPL). Näistä yleisimmin esiintyvät fosfatidyylikoliini (PC) ja fosfatidyylietanoliini (PE) valittiin tämän työn kohteiksi. Tiedetään, että solukalvon lipidikoostumus on hyvin tarkasti säädeltyä, mutta varmuutta siitä, mitkä tekijät ovat osallisina tässä säätelyssä, ei vielä tiedetä.</p> <p>Mikro-RNA:t ovat pieniä, yksijuosteisia, ei-koodaavia RNA:ita. Ihmisen miRNA:iden arvelaan kontrolloivan yli 60 %:a kaikista proteiinia koodaavista geeneistä. miRNA:iden on osoitettu kontrolloivan useita biologisia toimintoja, kuten kehitystä, erilaistumista, metaboliaa, kasvua, lisääntymistä ja apoptoosia. Mikro-RNA:iden on todettu olevan osallisina esimerkiksi kolesterolihomeostasian säätelyssä, joten nyt tutkittiin, olisiko niillä samantyyppisiä vaikutuksia myös fosfolipidihomeostasiaan.</p> <p>Mikro-RNA:iden mahdollisia vaikutuksia solukalvon fosfolipidihomeostasiaan tutkittiin hiljennämällä HeLa-soluista miRNA-biogeneesireitin keskeiset entsyymit Dicer ja Drosha. Western blot -menetelmän avulla tutkittiin, onko Dicer- ja Drosha- hiljennetyissä soluissa tapahtunut muutoksia fosfolipidien synteesisireittien entsyymien ekspressiossa. Samalla tavalla tutkittiin myös keskeisten fosfolipaasien ekspressiotasoa. Lisäksi tutkittiin, miten eksogeeniset fosfolipidit vaikuttavat fosfolipaasien ja synteettisten entsyymien toimintaan.</p> <p>Western blot -menetelmällä tutkittiin yhteensä yhdeksän eri entsyymin ilmenemistasot. Dicer- ja Drosha-hiljennetyissä soluissa yhden synteettisen entsyymin, fosfokoliinisytidylylitransferaasin (CT), ekspressio kohosi merkittävästi. Eksogeenisistä lipideistä fosfatidyylieteriiniin (PS) havaittiin vaikuttavan solukalvon fosfolipidihomeostasiaan siten, että kun solussa on ylimäärin PS:ää, CDP-etanoliiniireitin entsyymien eksperssio laskee ja fosfatidyylietanoliiniä (PE) tuotetaan ensisijaisesti dekarboksiloimalla PS:ä.</p> | |
| Avainsanat | fosfolipidihomeostasia, mikro-RNA:t, miRNA-biogeneesi, Western blot |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Author(s) Title | Marika Tuukkanen The effect of microRNAs on the phospholipid homeostasis of mammalian cell membranes |
| Number of Pages Date | 47 pages + 2 appendices 19 May 2013 |
| Degree | Bachelor of Engineering |
| Degree Programme | Biotechnology and Food Engineering |
| Specialisation option | Biomedicine |
| Instructor(s) | Kati Hokynar, Doctor of Philosophy Titta Pirkola, Lecturer |
| <p>This thesis project was carried out as a part of miRNA-project at lipid research group in University of Helsinki. The purpose of the project was to study if the micro-RNAs are involved in the phospholipid homeostasis.</p> <p>Mammalian cells are surrounded by a cell membrane which consists of a lipid bilayer. The most abundant phospholipids in all membranes are glycerophospholipids (GPLs). Two of these, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine were chosen for this study. The lipid composition of membranes is accurately controlled, but it is not known which factors are involved in this controlling.</p> <p>MicroRNAs are a class of single-stranded non-coding RNAs. Human miRNAs are predicted to control over 60 % of all the protein-coding genes. miRNAs control several biological functions such as development, differentiation, growth, proliferation and apoptosis. miRNAs are involved in the regulation of cholesterol homeostasis and in this project it was studied if they are also involved in the phospholipid homeostasis.</p> <p>The possible effect of miRNAs on the phospholipid homeostasis was examined by silencing two key enzymes of the miRNA-biogenesis, Dicer and Drosha. If the knock-out of either one has an effect on the expression of synthetic enzymes on the Kennedy-pathway and/or phospholipases it should be seen by Western blotting. The effect of loading exogenous lipids was also studied with this method.</p> <p>Overall the expression levels of nine different enzymes were examined by Western blotting. One synthetic enzyme, phosphocholine cytidyltransferase (CT) showed increased expression level in the Dicer- and Drosha-knock-out cells.</p> <p>When phosphatidylserine (PS) was loaded into the cells, the expressions of the enzymes on the Kennedy-pathway were decreased. This indicates that under such circumstances the cells use the PS-decarboxylation pathway rather than the Kennedy-pathway.</p> | |
| Keywords | microRNAs, miRNA-biogenesis, phospholipid homeostasis, Western blotting |

Sisällys

Lyhenteet

| | | |
|-------|------------------------------------------------|----|
| 1 | Johdanto | 1 |
| 2 | Solukalvon lipidit | 2 |
| 2.1 | Fosfolipidit | 2 |
| 2.2 | Fosfolipidien synteesi | 3 |
| 2.2.1 | Fosfatidihappo | 3 |
| 2.2.2 | Fosfatidyylikoliini | 5 |
| 2.2.3 | Fosfatidyylietanoliamiini | 6 |
| 2.2.4 | Fosfatidyyliiseriini | 8 |
| 2.2.5 | Asyyliketjujen uudelleen muovaus | 9 |
| 2.3 | Fosfolipiditasapainon säätely | 9 |
| 2.3.1 | Synteesin säätely | 9 |
| 2.3.2 | Degradaatio | 10 |
| 3 | Mikro-RNA:t | 12 |
| 3.1 | Mikro-RNA:iden rakenne | 12 |
| 3.2 | Mikro-RNA:iden biogeneesi | 13 |
| 3.2.1 | Kanooninen reitti | 13 |
| 3.2.2 | Mikro-RNA:iden biogeneesin säätely | 14 |
| 3.2.3 | Mikro-RNA:iden vaihtoehtoiset synteesisireitit | 15 |
| 3.3 | Mikro-RNA:iden kohdealueet | 16 |
| 3.4 | Mikro-RNA:t ja lipidien metabolia | 16 |
| 4 | RNA-interferenssi | 18 |
| 5 | Työn tausta ja tavoitteet | 19 |
| 6 | Materiaalit ja menetelmät | 20 |
| 6.1 | Soluviljely | 20 |
| 6.2 | Vesikkelien lataaminen soluun | 20 |
| 6.3 | siRNA-välitteinen RNA-interferenssi | 21 |
| 6.4 | Massaspektrometria | 22 |
| 6.5 | qPCR | 22 |

| | | |
|-------|--------------------------------------------------|----|
| 6.6 | Proteiinimääritys | 23 |
| 6.7 | SDS-PAGE | 25 |
| 6.8 | Western blot | 27 |
| 7 | Tulokset ja tulosten tarkastelu | 32 |
| 7.1 | Massaspektrometria | 32 |
| 7.2 | qPCR | 34 |
| 7.3 | Western blot -menetelmä | 35 |
| 7.3.1 | Testaus | 35 |
| 7.3.2 | Koliinikinaasit | 37 |
| 7.3.3 | Fosfokoliinisytydylylitransferaasi | 38 |
| 7.3.4 | Diasyyliglyserolikoliinifosfotransferaasi | 38 |
| 7.3.5 | Etanoliamiinikinaasi | 39 |
| 7.3.6 | Fosfoetanoliamiinisytydylylitransferaasi | 40 |
| 7.3.7 | Diasyyliglyserolietanoliamiinifosfotransferaasi. | 41 |
| 7.3.8 | iPLA:t | 42 |
| 8 | Pohdinta | 43 |
| 9 | Yhteenveto | 44 |
| | Lähteet | 45 |
| | Liitteet | |
| | Liite 1. Vesikkeleiden koostumus | |
| | Liite 2. 10 % SDS-PAGE -geelien valmistus | |

Lyhenteet

| | |
|------|----------------------------------------------------------------------|
| A | Ampeeri. |
| ATP | Adenosiinitrifosfaatti. |
| BSA | Naudan seerumialbumiini (engl. Bovine Serum Albumin) |
| cDNA | Komplementaarinen deoksiribonukleiinihappo. |
| CK | Koliinikinaasi. |
| CPT | Diasyyliglyserolikoliinifosfotransferaasi. |
| CT | Fosfokoliinisytydylylitransferaasi |
| CTP | Sytidiinitrifosfaatti. |
| CTRL | Kontrolli. |
| DAG | Diasyyliglyseroli. |
| DMEM | HeLa-solujen kasvatusmedia (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium). |
| DNA | Deoksiribonukleiinihappo. |
| EK | Etanoliamiinikinaasi. |
| ET | Fosfoetanoliamiinisytydylylitransferaasi. |
| EPT | Diasyyliglyserolietanoliamiinifosfotransferaasi. |
| FBS | Naudan alkion seerumi (engl. Fetal Bovine Serum). |
| GPL | Glyserofosfolipidi. |

| | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------|
| HeLa | Henrietta Lax -nimisen naisen kohdunkaulan syövästä eristetty solulinja. |
| HRP | Piparjuuriperoksidaasi (engl. Horseradish Peroxidase) |
| iPLA | Kalsiumista riippuva fosfolipaasi. |
| kDa | Kilodalton. |
| LPA | Lyso-fosfatidihappo. |
| miRNA | Mikro-RNA. |
| NADPH | Nikotiiniamidi-adeniinidinukleotidifosfaatti. |
| PA | Fosfatidihappo. |
| PC | Fosfatidyylikoliini. |
| PCR | Polymeraasiketjureaktio |
| PE | Fosfatidyylietanoliamiini |
| Pen/Strep | Penisilliini-streptomysiini. Antibiootti. |
| PLA | Fosfolipaasi A. |
| PLC | Fosfolipaasi C. |
| PLD | Fosfolipaasi D. |
| POPC | Palmityylioelyylifosfatidyylikoliini. |
| POPG | Palmityylioelyylifosfatidyyliglyseroli. |
| PS | Fosfatidyyliiseriini. |
| PVDF | Polyvinylidini-fluoridi |

| | |
|----------|-----------------------------------------------------------------|
| qPCR | Kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio |
| RISC | RNA-Induced Silencing Complex. |
| RNAi | RNA-interferenssi eli RNA-häirintä. |
| RT | Kääntesikopioijaentsyymi (engl Reverse Transcriptase) |
| SDS-PAGE | Natriumdodekyylisulfaatti-polyakryliamidigeelielektroforeesi. |
| siRNA | Pieni häiritsevä RNA (engl. Small Interfering RNA). |
| SREBF | Engl. Sterol Regulatory Element Binding Factor. |
| SREBP | Engl. Sterol Regulatory Element Binding Protein. |
| TAG | Triasyyliglyseroli. |
| UTR | alue, jota ei koodata proteiiniksi (engl. UnTranslated Region). |

1 Johdanto

Nisäkässoluja ja niiden soluorganelleja ympäröi solukalvo, joka muodostuu kaksoislipidikerroksesta. Solukalvon rakennekomponentteja ovat fosfo- ja sfingolipidit, kolesteroli ja proteiinit. Suurin osa solukalvon lipideistä on fosfolipidejä. Fosfo- ja sfingolipidit koostuvat vesiliukoisesta osasta ja kahdesta rasvahaposta. Näiden rasvahappojen tyydyttyneisyys vaihtelee, ja se vaikuttaa solukalvojen jäykkyyteen, läpäisevyyteen ja toimintaan. Kaikissa kalvoissa lipidit ovat asettuneet kaksoiskalvoksi siten, että rasvamolekyylin toinen pää on hydrofobinen eli vettä hylkivä ja toinen on hydrofiilinen eli vesihakuinen (= polaarinen pää). Polaariset ryhmät, kuten kolesterolin hydroksyyli-ryhmä ja fosfolipidien polaarinen pää ovat, kaksoiskalvon pinnalla molemmiin puolin.

Mikro-RNA:t ovat pieniä, yksijuosteisia, ei-koodaavia RNA:ita. Ne ovat tärkeitä mRNA:iden stabiiliuden ja translaation säätelyssä. miRNA:iden on havaittu olevan osallisina esimerkiksi kolesterolin ja glukoosin tasapainon säätelyssä. Tämän insinööriyön tarkoituksena oli tutkia, vaikuttavatko mikro-RNA:t tiettyjen solukalvon fosfolipidien synteesin ja hajotuksen säätelyyn proteiinitasolla. Käytännön työ tehtiin Helsingin yliopiston biolääketieteen laitoksella dosentti Pentti Somerharjun lipiditutkimusryhmässä.

Tutkimusta tehtiin pääasiassa Western blot-menetelmällä. Tämän menetelmän avulla voidaan spesifisten vasta-aineiden avulla tunnistaa SDS-PAGE:lla eroteltuja proteiineja. Työssä käytettiin kahdenlaisia näytteitä: soluja, joista oli hiljennetty miRNA-biosynteesireitin keskeiset entsyymit, sekä soluja, joihin oli ladattu ylimäärä tiettyä fosfolipidiä vesikkeleiden avulla.

2 Solukalvon lipidit

2.1 Fosfolipidit

Fosfolipidit ovat luokka lipidejä, jotka muodostuvat kahdesta rasvahappomolekyylistä, jotka liittyvät glyserolin sn-1- ja sn-2-asemiin esterisidoksella. Niiden pääryhmä on sitoutunut sn-3-asemaan fosfaatin avulla. Pääryhmä muodostaa hydrofobisen alueen ja määrittää fosfolipidin luokan. (Kelly & Jacobs 2011)

Nisäkässoluissa on satoja eri fosfolipidilajeja, lukuisia glykolipidejä sekä kolesterolia. Syytä koostumuksen moninaisuuteen ei ole saatu osoitettua, mutta se luultavasti liittyy lukuisiin membraaniin liittyviin toimintoihin, joista jokainen asettaa spesifisiä kemiallisia ja fysikaalisia vaatimuksia solukalvolle. Solukalvojen lipidikoostumus on siis tarkasti säädelty. (Kainu et al. 2008: 3676) Fosfolipidihomeostasian ylläpito nisäkässoluissa on vaativa tehtävä, koska solukalvolla on satoja erilaisia molekyylejä. Lisäksi lipidikoostumus riippuu sellaisista ilmiöistä kuin biosynteesi, uudelleen muovaus, degradaatio (hajotus) sekä solujen välinen kuljetus. (Hermansson et al. 2011: 240)

Eukarioottien solukalvon lipidit voidaan jakaa kolmeen pääryhmään: glyserofosfolipidit, sfingolipidit ja sterolit. Suurin osa nisäkässolujen lipideistä on glyserofosfolipidejä (GPL). Nisäkässoluissa esiintyy yli kymmentä eri glyserofosfolipidilajia, jotka eroavat toisistaan pääryhmänsä mukaan. Pääluokat ovat fosfatidyylikoliinit (PC), fosfatidyylietanoliamiinit (PE), fosfatidyyli-inositolit (PI), fosfatidyyliiseriinit (PS) sekä kardioliipiinit (CL). Jokaiseen fosfolipidiluokkaan kuuluu useita molekyylilajeja eli molekyylejä, joilla on sama pääryhmä, mutta erilaiset asyyliketjut. Alkyyliketjussa on tyypillisesti 14-24 hiiltä ja kaksoissidoksia on 0-6. Koska alkyyliketjuja on lukuisia erilaisia, jokaisessa GPL-luokassa on satoja eri molekyylilajeja. (Hermansson et al. 2011: 241)

Suurinta osaa glyserofosfolipidejä esiintyy kaikilla solukalvoilla, mutta niiden suhteelliset määrät vaihtelevat merkittävästi eri organellien välillä. Esimerkiksi mitokondrioiden sisämembraanilla on enemmän fosfatidyylietanoliamiinia kuin muissa soluelimissä, mutta vain vähän, jos lainkaan fosfatidyyliiseriiniä. Glyserofosfolipidit syntetisoidaan endoplasmisessa retikulumissa (ER) tai Golgin laitteessa, joten ne on kuljetettava sieltä muihin organelleihin. (Hermansson et al. 2011: 241)

Nisäkässolut pitävät glyserofosfolipidien konsentraatiot hyvin tarkkojen rajojen sisällä, mikä viittaa siihen, että poikkeamat optimikoostumuksesta ovat tuhoisia (Kainu et al. 2008: 3676). On havaittu, että fosfolipidien biosynteesireittien tärkeimpien entsyymien hiljentäminen (knock-out) on hiiren alkioille letaalia tai vahingoittaa niiden elintärkeitä toimintoja. Toistaiseksi tiedetään hyvin vähän solukalvon fosfolipidikoostumusta ylläpitävistä mekanismeista eli biosynteesistä, uudelleen muovauksesta, degradaatiosta ja solujen välisestä kuljetuksesta. (Hermansson et al. 2011: 241)

Fosfatidyylikoliinia tarvitaan esimerkiksi hermoston tärkeän välittäjäaineen, asetyylikoliinin, muodostumiseen. Fosfatidyylikoliinin saanti on myös yhteydessä muistin terävyyteen ja mielialaan sekä lihasten toimintaan.

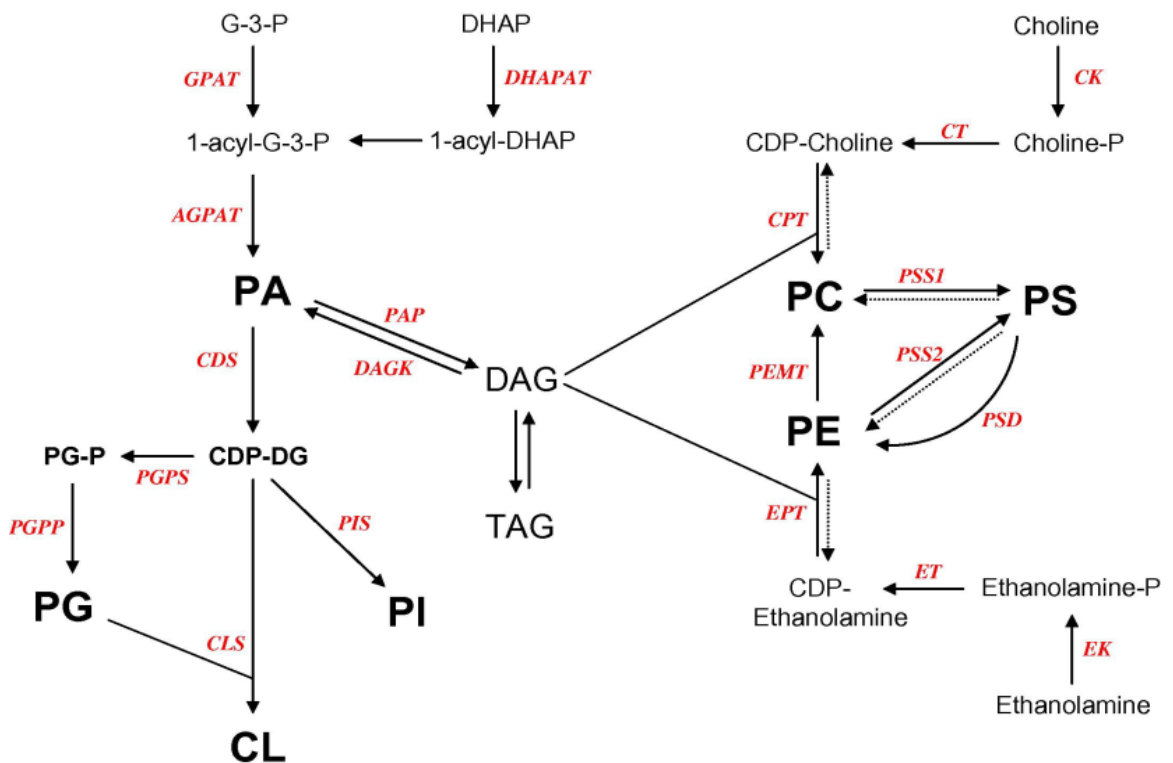
Fosfatidyylietanoliamiini on monien biologisesti aktiivisten molekyylien esiaste. Sillä on keskeinen rooli solunjakautumisessa, jossa se varmistaa sytokineesin oikean etenemisen. PE on myös hyvin tärkeä mitokondrioiden sisäkalvolla. Hiirillä mitokondrioiden PE:n tuotannon eliminointi ja siitä seuraavan PE:n määrän vähentymisen on havaittu johtavan mitokondrioiden epänormaaliuteen ja alkoiden kuolemaan. (Gibellini et al. 2010: 417)

2.2 Fosfolipidien synteesi

2.2.1 Fosfatidihappo

Fosfatidihappo (PA) on kaikkien glyserofosfolipidien (GPL) esiaste (Vance & Vance 2004:114). Vaikka riittävä fosfatidihapon konsentraatio on selvästi kriittinen fosfolipidien oikean tason ylläpidossa kokonaisuutena, on epätodennäköistä, että PA:n *de novo*-biosynteesi olisi säätelevä tekijä glyserofosfolipidien pitoisuuksissa. PA:n synteessin ensimmäinen vaihe on glyseroli-3-fosfaatin sn-1-aseman asylaatio, jolloin muodostuu lysosfosfatidihappo (LPA). Reaktion katalysoi glyseroli-3-fosfaattiasyyliitransferaasi. Seuraavassa vaiheessa LPA asyloidaan, jolloin muodostuu PA:ta. Paitsi *de novo*-biosynteesin kautta PA:ta voidaan myös tuottaa fosforyloimalla diasyyli glyserolia (DAG). Tätä reaktiota katalysoi diasyyli glyserolikinaasi (DAGK). (Hermansson et al. 2011: 241; Kelly & Jacobs 2011)

Fosfatidihappoa (PA) voidaan käyttää muiden glyserofosfolipidien synteesiin kahden eri mekanismin avulla. PA voidaan defosforyloida diasyylyglyseroliksi (DAG) PA-fosfataasien toimesta. DAG:sta voidaan syntetisoida fosfatidyylikoliinia (PC), fosfatidyylietanoliiniä (PE) ja fosfatidyyliiseriiniä (PS) tai triasyylyglyserolia (TAG). Vaihtoehtoisesti PA voidaan muuttaa CDP-diasyylyglyseroliksi CDP-diasyylyglyserolisyntaasin (CDS) avulla. Tästä voidaan syntetisoida happamia fosfolipideitä, eli fosfatidyyliinositoilia (PI), fosfatidyylyglyserolia (PG) ja kardiolipiinejä (CL). (Vance & Vance 2004:114) Toisiinsa liittyvät reaktiot PAP, CDS ja DAGK vaikuttavat DAG/PA-suhteeseen, joten nämä entsyymit ovat potentiaalisia säätelyn kohteita (Hermansson et al. 2011: 242.).



Kuva 1. Glyserofosfolipidien synteesireitit. (Hermansson et al. 2011:242)

Kuvassa 1 on esitetty glyserofosfolipidien biosynteesireitit nisäkässoluissa. Synteesireittien entsyymit on kirjoitettu kuvaan punaisella. Tämän työn kannalta merkittävät synteesireitit eli ne, joihin tutkimus keskittyy, ovat kuvassa oikealla olevat fosfatidyylikoliini (PC), fosfatidyylietanoliini (PE) sekä fosfatidyyliiseriini (PS). Nämä synteesireitit ja niihin liittyvät entsyymit on kuvattu tarkemmin luvuissa 2.3.2, 2.3.3 ja 2.3.4.

2.2.2 Fosfatidyylkoliini

Fosfatidyylkoliini on eukariotisolujen solukalvolla yleisimmin esiintyvä fosfolipidi. 95 % kudosten kokonaiskoliinista syntetisoidaan kolmivaiheisen CDP-koliini- eli Kennedy-reitin avulla. Ensimmäisessä vaiheessa koliini fosforyloidaan koliinikinaasin (CK) toimesta fosfokoliiniksi. Seuraavaksi fosfokoliini-sytidylyylitransferaasi (CT) katalysoi fosfokoliinin ja sytidiinitrifosfaatin (CTP) tiivistymisen, jolloin muodostuu CDP-koliinia. Viimeisessä reaktiossa fosfokoliini siirretään diasyylylglyserolikoliinifosfotransferaasin (CPT) avulla CDP-koliinilta diasyylylglyserolille, jolloin muodostuu fosfatidyylkoliinia. (Hermansson et al. 2011: 242)

Koliinikinaasi (CK) fosforyloi koliinin fosfokoliiniksi käyttäen ATP:tä fosfaatin luovuttajana. Nisäkkäillä esiintyy kahta eri koliinikinaasigeeniä; *CHK1* koodaa CK α :aa ja *CHK2* koodaa CK β :aa. Kumpaakin esiintyy kaikkialla elimistössä, mutta ekspressiotaso vaihtelee eri kudosten välillä. CK α on välttämätön hiirten kehitykselle, koska geneettinen häiriö *Chk1*-geenissä on hiiren alkioille letaalia. Hiiret, joilta puuttuu CK β , ovat elinkelpoisia, mutta niille kehittyy etenevä takaraajojen lihasrappeuma ja vastasyntyneen luiden epämuodostumia. Surkastuminen johtuu ilmeisesti PC:n alentuneesta biosynteesistä ja lisääntyneestä hajotuksesta. Sitä, miksi degraadatio KO (knock-out) hiirissä kasvaa, ei vielä tiedetä. Yleisesti CT-reaktiota pidetään PC:n synteesin nopeutta rajoittavana, mutta CK:n katalysoima koliinin fosforylaatio saattaa olla rajoittava tekijä tietyissä olosuhteissa. (Hermansson et al. 2011: 242)

CTP:fosfokoliinisytidylyylitransferaasi (CT) katalysoi CDP-koliinin muodostumisen koliinista ja CTP:stä. Tätä reaktiota pidetään Kennedy-reitin nopeutta rajoittavana reaktiona ja siten PC:n synteesin säätelijänä. (Vance & Vance 2004: 116) On olemassa kaksi nisäkkäiden geeniä, jotka koodaavat CT:tä: *Pcyt1a*, joka koodaa CT α :aa ja *Pcyt1b*, joka koodaa CT β :aa. (Kelly & Jacobs 2011) CT α on hallitseva muoto, ja sitä esiintyy kaikkialla elimistössä. CT β esiintyy myös useimmissa kudoksissa, mutta erityisesti aivoissa, keuhkoissa ja sukurauhasissa. CT:n inhibointi aiheuttaa apoptoosia viljellyissä soluissa, mikä viittaa siihen, että CT α on tärkeä solun henkinjäämisen kannalta. Vastaavasti *Pcyt1a*-geenin häirintä on hiiren alkioille letaalia. Hiirillä, joilta puuttuu CT β , on normaali PC-taso, mikä myös viittaa CT α :n hallitsevaan rooliin PC:n synteesissä. (Hermansson et al. 2011: 242-243)

CDP-koliini:1,2-diasyyglyserolikoliinifosfotransferaasi (CPT) katalysoi Kennedy-reitin viimeisen reaktion (Vance & Vance 2004: 117). On tunnistettu kaksi ihmisen geeniä, jotka koodaavat sellaista proteiinia, jolla on CPT-aktiivisuutta. *CPT1* koodaa CDP-koliinille spesifistä entsyymiä (CPT), kun taas *CEPT1*:n geenituote voi käyttää substraattinaan sekä CDP-koliinia että CDP-etanoliamiinia. *CEPT1*-geeni ilmenee kaikkialla elimistössä, kun taas *CPT1*:n ekspressio vaihtelee eri kudosten välillä, esiintyen runsaimmin kiveksissä, koolonissa (lynkkysuoli), suolistossa, sydämessä sekä pernassa. Sekä CPT että CEPT ovat kiinteitä membraaniproteiineja. CPT:tä esiintyy Golgin laitteissa ja CEPT:tä ER:ssa. Syytä juuri tälle solunsisäiselle jaolle ei tiedetä. (Hermansson et al. 2011: 243)

Useissa tutkimuksissa on todettu, että soluissa on ylimäärin CPT-aktiivisuutta, joten tämä reaktio ei yleensä ole fosfatidylikoliinin synteessin nopeutta rajoittava. Tätä näkökulmaa tukee se, että CEPT:n tai CPT:n yliekspressointi ei vaikuta PC:n synteisiin. Tämä reaktio voi olla nopeutta rajoittava, jos DAG:tä ei ole riittävästi saatavilla. (Hermansson et al. 2011: 243) CPT ja CEPT ovat sijoittuneet eri soluelimiin, joten näillä entsyymeillä on luultavasti eri tehtävät.

Fosfatidylikoliinin synteessireitin entsyymeistä tutkittiin lähes kaikki. Työn ulkopuolelle jäivät CT β ja *CPT1*-geenin koodaama CPT. CT β jätettiin tästä työstä pois, koska CT α :n tiedetään olevan hallitseva muoto tästä geenistä ja näin ollen säätely kohdistuu todennäköisesti siihen. CPT-reaktion ei uskota olevan PC:n synteessin nopeutta rajoittava ja *CEPT1*:n geenituotteella on myös CPT-aktiivisuutta, joten *CPT1*:n geenituote jätettiin pois.

2.2.3 Fosfatidylietanoliini

Nisäkässolujen solukalvon fosfolipideista noin 20-40 % on fosfatidylietanoliiniä. Nisäkässoluissa fosfatidylietanoliiniä syntetisoidaan kahdella eri tavalla, joko CDP-etanoliamiini- eli Kennedy-reittiä tai dekarboksyloimalla fosfatidyliseriiniä. (Vance & Vance 2004: 119) Nämä reitit eivät ole toisiaan korvaavia, sillä kumman tahansa reitin geneettinen häiriö on hiiren alkioille letaalia (Hermansson et al. 2011: 243.).

CDP-etanoliamiinireitti koostuu kolmesta entsyymaattisesta vaiheesta. Aluksi etanoliamiinikinaasi (EK) katalysoi ATP:stä riippuvan etanoliamiinin fosforylaation. Reaktiossa

muodostuu fosfoetanoliamiini ja sivutuotteena ADP:tä. Toisessa vaiheessa, jota pidetään CDP-etanoliamiinireitin nopeutta rajoittavana, CTP:fosfoetanoliamiinisytidylyylitransferaasi (ET) käyttää fosfoetanoliamiinia ja CTP:tä, joista se muodostaa CDP-etanoliamiinia (korkea energianluovuttaja) ja samalla vapautuu pyrofosfaattia. Reitin viimeisen reaktion katalysoi CDP-etanoliamiini:1,2-diasyyliglyseroli-etanoliamiinifosfotransferaasi (ETP). Se käyttää reaktiossa CDP-etanoliamiinia ja lipidiankkuria, kuten diasyyliglyserolia (DAG) tai alkyyli-asyyliglyserolia (AAG), joista se muodostaa PE:tä. Sivutuotteena muodostuu CMP:tä. (Gibellini et al. 2010: 414; Kelly & Jacobs 2011)

Etanoliamiinikinaasi (EK) katalysoi etanoliamiinin fosforylaation fosfoetanoliamiiniksi (Vance & Vance 2004: 119). On löydetty neljä eri nisäkäsgeeniä, jotka koodaavat EK-aktiivisia proteiineja. *Etnk1* ja *Etnk2* koodaavat etanoliamiinispesifisiä kinaaseja EK1 ja EK2. Lisäksi koliinikinaasit CK α ja CK β voivat fosforyloidia myös etanoliamiinia. Vaikka etanoliamiinin fosforylaatiota ei pidetä rajoittavana reaktionä CDP-etanoliamiinireitillä, EK1:n yliekspressointi HeLa-soluissa kiihdyttää PE:n synteesiä merkittävästi. Koska PE:n synteesi EK1-yliekpressiosoluissa lisääntyy, kun kasvatusmediassa on etanoliamiinia, etanoliamiinin saatavuus ja EK saattavat yhdessä säädellä CDP-etanoliamiinireittiä. (Hermansson et al. 2011: 243)

On tunnistettu joitain nisäkkäiden koliinikinaaseja, jotka voivat fosforyloidia myös etanoliamiinia. Jotkin fosfotransferaasit voivat käyttää sekä CDP-koliinia että CDP-etanoliamiinia PC:n ja PE:n synteesiin. Fosfokoliini-sytidylyylitransferaasi (CT) ja fosfoetanoliamiini-sytidylyylitransferaasi (ET) ovat kuitenkin hyvin spesifisiä fosfokoliinille ja fosfoetanoliamiinille. (Gibellini et al. 2010: 414)

Fosfoetanoliamiinisytidylyylitransferaasi (ET) katalysoi fosfoetanoliamiinin ja CTP:n kondensaation, joka tuottaa CDP-etanoliamiinia. Nisäkkäillä on vain yksi geeni, *Pcyt2*, joka tuottaa ET:tä. (Vance & Vance 2004: 119) Häiriö *Pcyt2*:ssa on hiiren alkioille letaalista, mikä viittaa siihen, että ET on elintärkeä kehitykselle. Vaikka hiiret, joilla on ehdollinen ET-knock-out maksassa, ovat elinkelpoisia, niiden maksan ET-pitoisuus laskee 50 %. (Hermansson et al. 2011: 243-244) Tämä viittaa siihen, että CDP-etanoliamiinireitti on välttämätön normaalin PE-pitoisuuden ylläpitämisessä.

ET-reaktio saattaa olla CDP-etanoliamiinireitin nopeutta rajoittava reaktio, mikäli tarpeellinen määrä DAG:tä on saatavilla. Kuitenkaan ET:n yliekspressointi ei kiihdytä

PE:n synteesiä, vaan johtaa CDP-etanoliamiinin kerääntymiseen. Tämä viittaa siihen, että viimeinen reaktio saattaa olla rajoittava tekijä, johtuen mahdollisesti DAG:n riittämättömyydestä. Toisaalta PE:n synteessin kiihtyminen HeLa-soluissa, joissa yliekspressoitiin EK1:tä, viittaa siihen, että EK olisi rajoittava, eikä ET. (Hermansson et al. 2011: 244) Ei siis ole varmaa, että ET säätelee PE:n synteesiä CDP-etanolamiinireitillä.

ET:n säätelyyn liittyen on saatavilla hyvin vähän informaatiota. Merkittävä ero verrattuna CT:hen on se, että ET ei vaadi liittymistä membraaniin ollakseen aktiivinen. Se ei myöskään vastaa membraanin lipidikoostumuksen muutoksiin. ET:n transkription rooli PE:n tasapainossa on epäselvä, koska PE:n pitoisuuden tuplaaminen B-lymfosyyttien erilaistumisen aikana ei liity CDP-etanolamiinireitin geenien transkription kiihtymiseen. (Hermansson et al. 2011: 244) Vaikuttaa siltä, että *Pcyt2*-geenin transkriptio ei ole PE:n synteessin säätelevä tekijä CDP-etanolamiinireitillä.

Diasyyliglyseroli-etanolamiinifosfotransferaasi (EPT) katalysoi fosfatidylietanoliiniin (PE) Kennedy-reitin viimeisen reaktion. Reaktiossa etanolamiinifosfaatti siirtyy diasyyliglyserolille (DAG). Nisäkkäillä on havaittu kaksi geeniä, jotka koodaavat EPT-aktiivisia proteiineja: *CEPT*, joka käyttää sekä CDP-koliinia että -etanoliiniä, ja *EPT1*, joka on selektiivinen CDP-etanolamiinin suhteen. (Hermansson et al. 2011: 244)

Suurimmassa osassa bakteereita fosfatidylietanoliini (PE) on membraanien pääkomponentti, ja se syntetisoidaan pääosin dekarboksyloimalla fosfatidyyliiseriiniä (PS). Vaikka Kennedy-reitti ei ole toimiva bakteereilla, joitain sen entsyymaattisia komponentteja käytetään fosfokoliinin muokkauksessa. (Gibellini et al. 2010: 415) Fosfatidyyliiseriinin dekarboksylaatio tapahtuu fosfatidyyliiseriinidekarboksylaasin (PSD) toimesta (Vance & Vance 2004: 120).

Myös fosfatidylietanoliiniin synteeseihin entsyymeistä tutkittiin lähes kaikki. Työn ulkopuolelle jäivät EK2 ja *EPT1*:n geenituote.

2.2.4 Fosfatidyyliiseriini

Nisäkkäillä fosfatidyyliiseriini (PS) syntetisoidaan kalsiumista riippuvan emästenvaihtoreaktion avulla joko fosfatidyylikoliinista (PC) tai fosfatidylietanoliinista (PE). Reak-

tiossa fosfolipidin pääryhmä korvataan L-seriinillä. (Vance & Vance 2004:120) Fosfatidyyliiseriinisyntaasi 1 (PSS1) käyttää substraattina PC:tä ja fosfatidyyliiseriinisyntaasi 2 käyttää PE:tä. (Kelly & Jacobs 2011)

PSS1:n ja PSS2:n yliekspressointi vaikuttaa lipidien metaboliaan eri tavoilla. Soluissa, joissa yliekspressoitetaan PSS2:tä, PS:n synteesi ei kiihdy, kun taas jos yliekspressoitetaan PSS1:tä, PS:n synteesi kiihtyy merkittävästi. (Vance & Vance 2004:121)

Fosfatidyyliiseriinin synteesireitin entsyymeitä ei tässä työssä tutkittu, mutta PS oli yksi niistä lipideistä, jota ladattiin HeLa-soluihin vesikkeleiden avulla.

2.2.5 Asyyliketjujen uudelleen muovaus

De novo -synteesin jälkeen monet fosfolipidit käyvät läpi asyyliketjujen uudelleenmuovauksen. Asyyliketjujen uudelleenmuovauksella on merkittävä rooli fosfolipidihomeostasiassa. (Kainu et al. 2008: 3676) Prosessiin tarvitaan fosfolipaasi A:tta, joka katalysoi asyyliketjun siirtämisen glyserolin *sn1* (PLA₁) tai *sn2* (PLA₂) paikalta, sekä asyyli-transferraasia tai transasylaasia, joka välittää reasylation eri rasvahapolla. (Hermansson et al. 2011: 246)

Fosfolipaasi A:t (PLA) ovat glyserofosfolipidien (GPL) uudelleenmuovauksen tärkeimmät entsyymit. PLA:ita on lukuisia erilaisia, mutta niitä, jotka liittyvät GPL:ien uudelleenmuovaukseen, ei ole saatu vahvistettua. Ca²⁺-riippumattomat fosfolipaasit (iPLA:t) saattavat olla osallisena tässä. (Hermansson et al. 2011: 246)

2.3 Fosfolipiditasapainon säätely

2.3.1 Synteesin säätely

Nisäkkäiden lipidihomeostasiaa säätelee membraaniin sitoutuneiden transkriptiotekijöiden joukko, nimeltään SREBPs (sterol regulatory element-binding proteins). SREBP:t aktivoivat suoraan yli 30 geenin ekspressoitumisen, jotka ovat osallisina kolesterolin,

rasvahappojen, triglyseridien ja fosfolipidien sekä kofaktori NADPH:n, jota tarvitaan näiden molekyylien synteisiin, synteessissä ja talteenotossa. Nisäkkäiden genomi koodaa kolmea SREBP-isoformia, SREBP-1a, SREBP-1c ja SREBP-2. SREBP-1 on osallisena rasvahappojen metabolian ja *de novo* -lipogeneesin geenien aktivoinnissa. SREBP-2 puolestaan vaikuttaa kolesterolihomeostasiaan liittyviin geeneihin. SREBP:n lisäksi kolesterolin metaboliaa säätelee maksan X-reseptorit (LXRs). (Fernandez-Hernando et al. 2011: 87)

Koska CT α :n tiedetään olevan PC:n synteessin nopeutta rajoittava entsyymi, sen säätelyä on tutkittu hyvin paljon. CT α :n transkriptiota säädellään monin eri tavoin. Edellä mainittujen SREBP-transkriptiotekijöiden ja LXR:ien lisäksi CT α :n transkriptiota säätelevät muutkin transkriptiotekijät, kuten sp1, Ets-1 ja Net. CT:n säätelyn on myös havaittu olevan yhteydessä solusykliin, solun kasvuun ja sen erilaistumiseen. (Sugimoto et al. 2008: 205-210)

2.3.2 Degradaatio

Fosfolipaaseilla on merkittävä rooli solukalvojen rakenteen ja toiminnan ylläpidossa (Cedars et al. 2009: 277). Jos PC:n synteesiä kiihdytetään yliekspressoimalla CT:tä, samalla myös PC:n deasylaatio glyserofosfokoliiniksi kiihtyy ja PC:n määrä pysyy kutakuinkin ennallaan (Glynn 2005:89). Biosynteesiin verrattuna fosfolipidien degradaatiosta eli hajotuksesta tiedetään yllättävän vähän. On ilmeistä, että fosfolipidit matkaavat lysosomeihin ja ne hajotetaan siellä, mutta lysosomaalisen reitin myötävaikutus kaikkien fosfolipidien kiertonopeuteen ei ole tiedossa. Luultavasti suurin osa fosfolipidien hajotuksesta tapahtuu ei-lysosomaalisten fosfolipaasien toimesta. (Hermansson et al. 2011: 246)

Nisäkkäiden fosfolipaasit voidaan jakaa kolmeen pääluokkaan, riippuen siitä millaisen sidoksen ne hajottavat. Fosfolipaasi A:t (PLAs) vapauttavat rasvahapon glyserolin *sn*-1 tai *sn*-2-asemasta, jolloin muodostuu lysofosfolipidi ja vapaa rasvahappo. Fosfolipaasi C:t (PLCs) hydrolysoivat fosfaatin ja glyserolin välisen sidoksen, jolloin muodostuu DAG:tä ja fosforyloitu pääryhmä. Fosfolipaasi D:t (PLDs) hydrolysoivat fosfaatin ja pääryhmä välisen sidoksen, jolloin muodostuu PA ja vapaa pääryhmä. (Cedars et al. 2009: 279)

iPLA tarkoittaa Ca^{2+} -riippumatonta IV-ryhmän fosfolipaasia A_2 . iPLA-perheessä on kuusi jäsentä: iPLA₂β (VIA), iPLA₂γ (VIB), iPLA₂δ (VIC), iPLA₂ε (VID), iPLA₂ζ (VIE) ja iPLA₂η (VIF). iPLA₂β ja iPLA₂δ ovat aidosti fosfolipaaseja ja niillä on sekä PLA₁-, PLA₂-että lyso-PLA-aktiivisuuksia. iPLA₂ε, iPLA₂ζ ja iPLA₂η osoittavat vain heikkoa PLA₁- ja PLA₂-aktiivisuutta, mutta niillä on korkea TAG-lipaasiaktiivisuus. iPLA₂δ osoittaa myös vain heikkoa PLA₁- ja PLA₂-aktiivisuutta, mutta sen lyso-PLA-aktiivisuus on korkea. (Hermansson et al. 2011: 247) Useissa tutkimuksissa iPLA₂β on yhdistetty fosfolipidihomeostasiaan. CHO (Chinese Hamster Ovary) -soluissa, joissa PC:n synteesiä oli tehostettu yliekspressoimalla CT:tä, havaittiin iPLA₂-aktiivisuuden kasvu kaksinkertaiseksi. (Glynn 2005: 90)

Fosfolipaaseista iPLA₂β ja iPLA₂δ otettiin mukaan tutkimukseen, koska niiden on epäilty olevan osallisina solukalvon fosfolipidihomeostasian ylläpidossa. (Hermansson et al. Toistaiseksi julkaisematon materiaali)

3 Mikro-RNA:t

3.1 Mikro-RNA:iden rakenne

Mikro-RNA:t ovat pieniä, yksijuosteisia, ei-koodaavia RNA:ita, jotka löydettiin ensimmäisenä sukkulamadosta (*Caenorhabditis elegans*). Ne ovat tärkeitä mRNA:iden stabiiliuden ja translaation säätelyssä. Mikro-RNA:ita koodaavia alueita löytyy useimpien eukariotien ja joidenkin virusten genomista. (Fernandez-Hernando et al. 2011 s.87) miRNA:ita sijaitsee kaikkialla genomissa, geenien introneissa ja eksoneissa sekä geenien välisellä alueella. RNA-polymeraasi II on vastuussa lähes kaikkien eläinkunnan miRNA:iden transkriptiosta. (Moore et al. 2010 s. 700) Ihmisen genomi koodaa jopa yli 1000 miRNA:ta. Osa niistä muodostaa miRNA-perheitä, joilla on samankaltaisia tai täysin identtisiä sekvenssejä. (Bommer & MacDougald 2011: 242)

Mikro-RNA:t ovat valmiissa muodossaan yksijuosteisia. Ne ovat tärkeitä geenien ilmenemisen post-transkriptionaalisia säätelijöitä. Satoja miRNA-molekyylejä on tunnistettu kloonamalla ja sekvensoimalla koon perusteella eroteltuja RNA:ita, syväsekvensointitekniikoilla sekä laskennallisilla ennustamismenetelmillä. (Moore et al. 2010: 700) miRNA:illa on tuhansia eri kohteita. Häiriöt miRNA:iden säätelyssä voivat johtaa suuriin mullistuksiin solussa ja jopa kasvainten kehittymiseen. miRNA-profiilien onkin todettu muuttuneen useissa syövissä, ja miRNA:iden yliekspressointi voi johtaa kasvaimen muodostumiseen. (Pillai 2005: 1753)

Tyypillisesti miRNA:t kontrolloivat niiden kohdegeenien ekspressiota sitoutumalla epätäydellisesti kohteen 3'UTR-alueeseen ja näin saavat aikaan kohde-mRNA:n repressi-
on. Tällainen inhibiittorivaikutus tapahtuu joko hajottamalla mRNA, estämällä translaatio tai näiden kahden toiminnan yhdistelmällä (Kim 2005: 376). Ihmisen miRNA:iden arvellaan kontrolloivan yli 60 %:a kaikista proteiinia koodaavista geneistä. miRNA:iden on osoitettu kontrolloivan useita biologisia toimintoja, kuten kehitystä, erilaistumista, metaboliaa, kasvua, lisääntymistä ja apoptoosia. (Moore et al. 2010: 700)

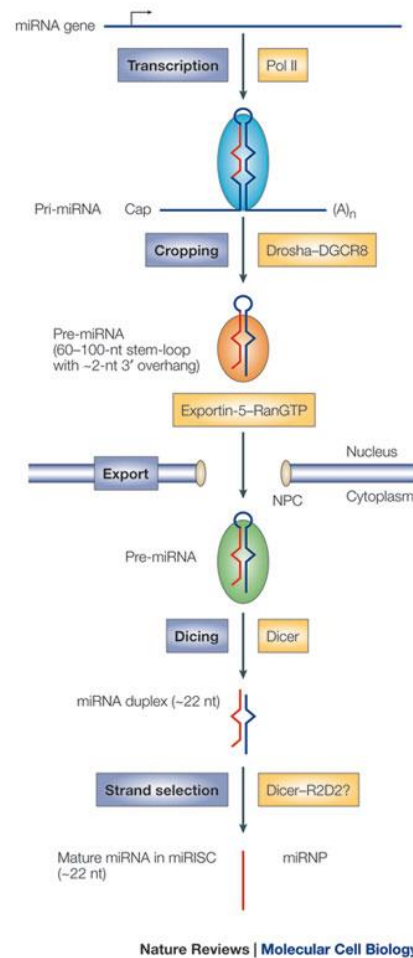
3.2 Mikro-RNA:iden biogeneesi

3.2.1 Kanooninen reitti

RNA-polymeraasi II saa aikaan mikro-RNA:n esiasteen pri-miRNA:n transkription. Pri-miRNA:t muodostuvat pitkänä transkriptinä, jotka muodostavat kantasilmukan. Drosha, ribonukleaasi III:a sisältävä mikroprosessorikompleksi, prosessoi pri-miRNA:ta tumassa. Drosha pilkkoo tumassa pri-miRNA:sta noin 60–100 nukleotidia pitkän, hiuspinnimäisen rakenteen eli pre-miRNA:n. (Pillai 2005: 1754) RNAasi III:n pilkkominen jättää pre-miRNA:n 3'-päähän noin kahden nukleotidin pituisen yksijuosteisen ulokkeen, jonka Exportin 5 tunnistaa (Lynn 2009: 452; Westholm & Lai 2011:1897-1898.). Pre-miRNA kuljetetaan sytoplasmaan Exportin 5:n ja Ran-GTP:n toimesta. Sytoplasmassa toinen RNAasi III –entsyymi, Dicer, prosessoi pre-miRNA:sta noin 22 nukleotidiparia pitkän kaksijuosteisen miRNA:n (miRNA:miRNA*). (Davis-Dusenbery & Hata 2010: 381)

miRNA:miRNA*-rakenne jakautuu valmiiksi yksijuosteiseksi miRNA:ksi ja sille komplementaariseksi juosteeksi. Komplementaarinen (miRNA*) juoste hajotetaan. Valmis juoste toimii yhteistyössä Ago-proteiiniperheen jäsenten kanssa ribonukleoproteiini-kompleksi RISC:ssä. Osana RISC-kompleksia miRNA ohjaa sen RNA-kohteeseensa Watson-Crick-emäspariutumisen avulla, ja tämä toiminta säätelee proteiinisynteesiä. Eläimissä suurin osa miRNA:ista sitoutuu epätäydellisesti mRNA-kohteensa 3'UTR-alueelle ja estää sen translaation ja/tai hajottaa mRNA:n. (Bommer & MacDougald 2011: 242; Moore et al. 2010: 701; Westholm & Lai 2011:1898) Jos miRNA:n ja sen kohteen välinen komplementaarisuus on vähäistä, miRNA usein estää translaation (Lynn 2009: 452).

Ago-proteiinit ovat RISC-kompleksin pääasiallinen komponentti (Davis-Dusenbery & Hata 2010: 388). Ago2, argonauttiproteiini, joka on osa sitä kompleksia, joka asettaa linjaan miRNA:n ja mRNA:n, voi muodostaa miRNA:miRNA*-kompleksin Dicerin sijasta. (Moore et al. 2010: 701) Kaikki ihmisen Ago-proteiinit sitoutuvat sekä siRNA- että miRNA-molekyyleihin. Kuitenkin, ainoastaan Ago2:ta sisältävät kompleksit tukevat mRNA:n pilkkomista. miRNA:iden proteiinisynteesin inhibition mekanismi ei ole vielä täysin selvillä. (Pillai 2005: 1754)



Kuva 2. Mikro-RNA-biogeneesi. (Kim 2005:380)

Kuvassa 2 on esitetty miRNA:n biogeneesi miRNA-geenin transkriptiosta valmiin miRNA:n RISC-kompleksiin liittymiseen asti.

3.2.2 Mikro-RNA:iden biogeneesin säätely

Mikro-RNA:iden biogeneesin säätelyssä merkittävin vaihe on transkriptio. Useat miRNA-geenien promoottoreille tunnusomaiset piirteet, kuten CpG-saarekkeiden määrä, TATA-boxit, initiaatiotekijät ja histonimodifikaatiot, ovat samanlaisia kuin proteiinia koodaavien geenien promoottoreilla. DNA:ta sitovat tekijät, jotka säätelevät miRNA:iden transkriptiota, samoin kuin solutyypille spesifiset transkriptiotekijät, ovat hyvin paljon samanlaiset kuin proteiinia koodaavilla geneillä. Pri-miRNA:iden transkriptiota voidaan säädellä transkriptiotekijöiden avulla. (Davis-Dusenbery & Hata 2010: 381)

Epigeneettisten mekanismien, kuten DNA:n metyloinnin ja histonimodifikaatioiden, jotka säätelevät proteiinia koodaavien geenien transkriptiota, on havaittu säätelevän myös miRNA-geenejä. Esimerkiksi useat miRNA-geenilokukset on hypermetyloitu tiettyissä syövissä. Lisäksi miRNA-geenien promoottoreita säädellään histonimodifikaatioilla. (Davis-Dusenbery & Hata 2010: 383)

Droshan kokonaismäärä solussa on tarkasti säädelty, ja sillä saattaa olla merkitystä pri-miRNA:n prosessoinnin säätelyssä. Droshan ekspressiotason on havaittu nousevan kohdunkaulan syövän myöhäisessä vaiheessa, ja se liittyy huonoon paranemisennusteeseen ruokatorven syövässä. Myös Dicerin muuttunut ekspressiotaso on liitetty joihinkin syöpiin. Toisin kuin Drosha, joka vaatii useita kofaktoreita toimiakseen, Dicer-vaiheessa miRNA-biogeneesin säätely vaatii Dicer-aktiivisuuden inhiboinnin. (Davis-Dusenbery & Hata 2010: 383-387)

3.2.3 Mikro-RNA:iden vaihtoehtoiset synteesireitit

Suurin osa eläinten miRNA:ista muodostuu Drosha- ja Dicer-nimisten RNAasi III -entsyymien toimesta. Hiljattain on löydetty muutamia vaihtoehtoisia miRNA-synteesireittejä, joista lupaavin korvaa Droshan pilkkomisen silmukoinnilla. (Westholm & Lai 2011: 1897) Näitä lyhyitä intronisia miRNA:ita kutsutaan mirtroneiksi (Moore et al. 2010: 701).

Mirtronit toimivat kuten tyypilliset miRNA-luokkaan kuuluvat säätelevät RNA:t. Niiden esiasteiden pituus on lyhyempi kuin miRNA:iden, jotka syntetisoidutvat kanoonista reittiä, koska ne koostuvat ainoastaan miRNA/miRNA*-kaksoisjuosteesta. Mirtron-reitti tuottaa pre-miRNA:ta jäljitteleviä rakenteita silmukoimalla lyhyitä introneita, joilla on potentiaalia muodostaa hiuspinni-rakenteita. Silmukoitu introni ei ole lineaarinen, mutta se voidaan laskostaa muistuttamaan pre-miRNA:ta, jolloin se siirretään sytoplasmaan, Dicer pilkkoo sen ja se voi liittyä Ago-proteiineihin. (Westholm & Lai 2011: 1898)

3.3 Mikro-RNA:iden kohdealueet

Se, että miRNA:iden ja niiden kohteiden välillä ei tarvitse olla täydellistä komplementaarisuutta, hankaloittaa miRNA:iden kohdegeenien tunnistamista. Yhdellä miRNA:lla voi olla yli sata mRNA-kohdetta. (Fernandez-Hernando et al. 2011: 87-88) Toiminnallisesti tärkeiden miRNA:iden kohdegeenien tunnistaminen on välttämätöntä, jotta voitaisiin ymmärtää miRNA:iden vaikutus solun toimintoihin. Tämä on haastavaa, koska miRNA:t sitoutuvat kohteisiinsa yleensä epätäydellisesti. (Moore et al. 2010: 701) Suurin osa eläinten miRNA:ista sitoutuu osittain komplementaarisesti kohdegeeniensä 3'UTR-alueelle (Pillai 2005: 1754). miRNA:t voivat myös repressoida mRNA-kohteensa sitoutumalla muille alueille, kuten 5'UTR-alueelle tai proteiinia koodaavaan eksoniin. (Moore et al. 2010: 700)

Nisäkkäillä yhtenäisin vaatimus, joskaan ei aivan välttämätön, on vierekkäinen ja täydellinen sitoutuminen miRNA:n nukleotidien 2-8 välillä eli "seed"-alueella. Useissa tapauksissa "seed"-alue vaikuttaa määrittävän tunnistuksen. Joissain tapauksissa on myös muita ratkaisevia tekijöitä, kuten riittävä komplementaarisuus miRNA:n 3'-puolikkaaseen, jotta yhteistoiminta on tarpeeksi stabiilia. Lisäksi jotkin muut 3'UTR-alueen ominaisuudet lähellä sitoutumiskohtaa voivat vaikuttaa miRNA:n tehokkuuteen. Tällaisia ominaisuuksia ovat esimerkiksi AU-riikkaat sekvenssit, jotka sijaitsevat 3'UTR-alueella vähintään 50 nukleotidiparin päässä stop-kodonista ja poissa keskeltä pitkiä UTR-alueita. (Moore et al. 2010: 701)

On löydetty myös toinen miRNA:iden kohdealue. Tämä nk. "keskusalue" on sellainen, jolla ei ole komplementaarisuutta "seed"-alueen kanssa eikä 3'-pään kompensoivaa pariutumista, vaan 11-12 vierekkäistä Watson-Crick-paria keskellä miRNA:ta. (Moore et al. 2010: 701)

3.4 Mikro-RNA:t ja lipidien metabolia

Jo jonkin aikaa on tiedetty, että SREBP-transkriptiotekijät säätelevät nisäkkäiden lipidihomeostasiaa. Hiljattain on havaittu miRNA:iden säätelevän lipidien metaboliaan liittyviä geenejä, jotka ovat osallisina kolesterolin homeostasiassa ja rasvahappojen hapeutuksessa. (Fernandez-Hernando et al. 2011: 86) On löydetty kaksi miRNA:ta, miR-33a ja miR-33b, jotka ovat sulautuneet SREBP-geeneihin *Srebp2* ja *Srebp1*. miR-33a ja

miR-33b syntetisoidaan samanaikaisesti isäntägeeniensä *Srebp2:n* ja *Srebp1:n* kanssa ja ne toimivat yhteistyössä ja säätelevät kolesterolin ja rasvahappojen metaboliaa. (Fernández-Hernando & Moore 2012: 2378)

miR-33a:n kohdegeenit liittyvät kolesterolin kuljetukseen. miR-33a:n sekvenssi ja sijoituminen genomissa ovat hyvin samanlaiset eri lajien välillä, mikä viittaa sen tärkeään merkitykseen. miR-33b:tä puolestaan esiintyy vain ihmisillä. (Sacco & Adeli 2012: 221) miR-33a ja miR-33b eroavat toisistaan vain kahden nukleotidin kohdalla. Niiden "seed"-alueen sekvenssit ovat kuitenkin identtiset, mikä viittaa siihen, että niillä on hyvin samanlaiset kohdegeenit. (Fernández-Hernando & Moore 2012: 2379)

Maksassa eniten ilmentyvä miRNA on miR-122, missä se kattaa jopa 70 % kaikista miRNA:ista (Fernández-Hernando et al. 2011: 88). miR-122:n hiljentäminen hiirillä laskee kolesterolin biosynteesireitin tärkeiden geenien ekspressiota. miR-122:n vaikutus kolesterolin metaboliaan on kuitenkin epäsuoraa, eikä ole varmaa, mitkä miR-122:n suorat kohteet ohjaavat sitä. (Lynn 2009: 455)

On hyvinkin mahdollista, että miRNA:t säätelevät myös solun fosfolipiditasapainoa. Vielä ei tiedetä, mihin miRNA:iden säätely kohdistuu. Myös sitä, mikä/mitkä miRNA:t ovat osallisina tässä säätelyssä, ei vielä tiedetä.

4 RNA-interferenssi

RNA-interferenssi (RNAi), eli RNA-häirintä tarkoittaa ilmiötä, jossa kaksijuosteinen RNA (dsRNA) hajottaa mRNA-molekyylejä sekvenssispesifisesti ja estää näin translaatiota. Solut käyttävät RNA-interferenssiä mm. geenien ekspression säätelyyn. RNAi:tä voidaan hyödyntää käytännössä, mm. solun toiminnan ja erilaistumisen säätelyn tutkimisessa sekä hoitokeinojen kehittäessä erilaisiin sairauksiin.

Kaksijuosteisten RNA-virusten infektoiman solun sytoplasmassa syntyy viruksen genomia eli dsRNA:ta (engl. double stranded RNA), jota solussa oleva dicer-entsyymi pilkkoo ns. siRNA:ksi (engl. small interfering RNA). SiRNA on noin 20-25 nukleotidiparin mittainen kaksijuosteinen RNA, jossa on molemmissa 3'-päissä kahden nukleotidin mittaiset yksijuosteiset päät. (Kim 2005: 378) Tästä toinen, ns. ohjaava juoste sitoutuu RISC-kompleksiin (engl. RNA induced RNA silencing complex), jonka aktiivinen komponentti, argonauttiproteiini, on RNA:ta pilkkova entsyymi. siRNA:n ohjaava juoste, ja samalla koko aktiivinen RISC-kompleksi, sitoutuu tiettyyn kohtaan tiettyssä mRNA:ssa sekvenssispesifisesti. Jos sitoutuminen on täysin komplementaarista, argonauttiproteiini aktivoituu ja katkaisee mRNA-juosteen, mikä estää sen toimimisen templaattina translaatiossa. (Pillai 2005: 1753) Aina sitoutuminen ei johda mRNA:n katkaisemiseen, mutta näissä tapauksissa RISC-kompleksi pysyy kiinnittyneenä mRNA:han ja translaatio pysähtyy ennenaikaisesti.

siRNA:t ja miRNA:t toimivat periaatteessa samalla tavalla, mutta miRNA:t kohdistavat toimintansa vähemmän spesifisesti kuin siRNA:t. Tietty siRNA sitoutuu yleensä hyvin spesifisesti tiettyyn mRNA:han, kun taas miRNA:t voivat sitoutua useisiin eri mRNA:ihin ja vaikuttaa siten monien transkriptien toimintaan samanaikaisesti.

5 Työn tausta ja tavoitteet

Fosfolipidien synteesireitit ja niiden entsyymit tunnetaan hyvin tarkasti. Entsyymeistä eniten tutkittu on CT (fosfokoliinisytydylylotransferaasi). Sen tiedetään olevan PC:n (fosfatidyylikoliini) synteesin nopeutta säätelevä tekijä. CT:n säätelyä on tutkittu paljon ja sen säätelyyn tiedetään liittyvän useita tekijöitä.

Mikro-RNA:iden on havaittu säätelevän esimerkiksi kolesterolin ja glukoosin metaboliaa, ja nyt haluttiin tutkia, onko niillä vaikutusta myös fosfolipidien metaboliaan. Yleensä miRNA:t hillitsevät proteiinien translaatiota. miRNA:iden vaikutusta fosfolipidihomeostasian säätelyyn tutkittiin hiljentämällä miRNA:iden synteesireitiltä Dicer ja Drosha. Oletettiin, että jos miRNA:t ovat osallisina tässä säätelyssä, translaatio kiihtyy, koska miRNA:ita ei enää muodostu ja niiden vaimentava säätely poistuu.

Ekspressiotasojen muutosta tutkittiin proteiinitasolla Western blot -menetelmällä ja mRNA-tasolla qPCR-menetelmällä. Jos Dicer- ja/tai Drosha-hiljennetyissä soluissa tapahtuu ekspression muutos proteiinitasolla, se ei välttämättä näy mRNA-tasolla. Jos mRNA-tasolla ei havaita muutosta, mutta proteiinitaso nousee, niin translaatio on tehostunut. Tällöin transkriptioon ei ole ollut vaikutusta, koska muutosta ei näy mRNA-tasossa. Jos taas mRNA-taso kasvaa, niin transkriptio on tehostunut. Tämä taas ei välttämättä näy proteiinitasolla.

Mikäli transkription taso nousee, syynä voi olla jokin transkriptiotekijä. Jos taas translaatio tehostuu eli muutos havaitaan proteiinitasolla, mutta ei mRNA:ssa, syynä voi olla miRNA. Mikäli jostain näistä löytyy selkeä ekspressiotason muutos, olisi tärkeää selvittää, onko säätelevä tekijä miRNA, ja jos on, niin mikä/mitkä miRNA:t ovat kyseisen entsyymin säätelyn takana.

miRNA-välitteisen säätelyn lisäksi tutkittiin, vaikuttaako muutos solun PC/PE/PS-suhteessa synteettisten entsyymien ja fosfolipaasien ekspressioon. Kun soluun ladataan esimerkiksi PC:tä, looginen päätelmä olisi, että joko PE:n ja PS:n synteesi tai PC:n degradaatio kiihtyisi, jotta niiden keskinäiset suhteet pysyisivät vakiona. Tätä tutkittiin lataamalla soluihin vesikkeleiden avulla fosfolipideitä ja tarkastelemalla entsyymien ekspression muutoksia sekä proteiini- että mRNA-tasolla.

6 Materiaalit ja menetelmät

6.1 Soluviljely

Soluviljely on keinotekoisista solujen kasvattamista koeputkessa tai maljalla. Näissä kokeissa käytettiin HeLa-soluja. HeLa-solulinja on ihmisen jatkuva solulinja eli jatkuvasti jakautuva solupopulaatio, jonka elinikä on rajaton. HeLa-solut on alun perin eristetty Henrietta Lacks -nimisen naisen kohdunkaulassa olleesta kasvaimesta. HeLa-solulinja on ensimmäinen koskaan viljelty ihmisen jatkuva solulinja. HeLa-soluja viljeltiin 3,5 tai 6 cm:n maljoilla DMEM (DMEM 500 ml, Pen/strep 10 ml, L-glutamiini 5 ml, FBS 50 ml) -elatusaineessa.

A431-solulinja, jota käytettiin menetelmän optimoinnissa, on myös ihmisen syöpäsolulinja. Se on alun perin eristetty 85-vuotiaan naisen karsinoomasta. (TGR BioSciences)

6.2 Vesikkelien lataaminen soluun

Tutkittiin eksogeenisten fosfolipidien vaikutusta iPLA:ien ja synteettisten entsyymien ekspressioon HeLa-soluissa. Kahden päivän maljalla kasvatuksen jälkeen soluja inkuboitiin 6 tuntia isotooppileimattujen vesikkeleiden kanssa. Lähes kaikissa vesikkeliladatuilla soluilla tehdyissä kokeissa kontrollina käytettiin POPC:tä (palmityylioelyylifosfatidyylikoliini) ja kolesterolia sisältäviä vesikkeleitä. Kun soluihin ladattiin fosfolipideitä, vesikkelissä oli mukana isotooppileimattua fosfolipidiä (di16:1-PC tai di16:PE). Viimeisissä kokeissa käytettiin kontrollina POPG:tä (palmityylioelyylifosfatidyylylglyceroli), kolesterolia ja di20:1-PC:tä. Kun näillä ladattiin soluihin lipideitä, käytettiin samalla tavalla isotooppileimattuja fosfolipideitä (di16:1-PC, di16:PE tai di16:1-PS), kuin POPC-vesikkeleiden kanssa. Uudenlaisiin vesikkelihin siirryttiin, koska POPC-vesikkeleistä saattaa siirtyä jonkin verran PC:tä soluihin, vaikka haluttaisiin siirtää esimerkiksi PE:tä.

Kontrollista (POPC tai CTRL) nähdään, vaikuttaako pelkkä vesikkelin lataaminen soluun jollain tavalla tutkittavien entsyymien ekspressoitumiseen. Vertaamalla muiden näytteiden ekspressiotasoja siihen saadaan luotettavampia tuloksia ekspression muutoksista. Liitteessä 1 on kerrottu tarkemmin vesikkeleiden koostumukset.

6.3 siRNA-välitteinen RNA-interferenssi

Dicer- ja Drosha-siRNA:iden transfektiota varten HeLa-soluja kasvatettiin 3,5 cm:n maljoilla siten, että yhdelle maljalle laitettiin noin 300 000 solua. Solujen määrä laskettiin solulaskurilla. Transfektointi tehtiin samana päivänä. Dicer- ja Drosha-siRNA:iden lisäksi tehtiin transfektio Allstars-siRNA:lla, joka on epäspesifinen siRNA, eli se ei hiljennä mitään geeniä kohdesolusta. Allstars siRNA:lla käsitellyt solut toimivat kontrollina, josta nähdään, vaikuttaako siRNA-käsittely itsessään proteiinien ekspressioon jollain tavalla.

Jokaisesta siRNA:sta sekä transfektioreagenssista valmistettiin laimennokset seuraavasti:

Dicer / Drosha / Allstars (14 maljaa + 1,5 mittatappioihin)

$$\text{siRNA:} \quad v_1 = \frac{5 \text{ nM} \times 2500 \mu\text{l}}{10\,000 \text{ nM}} \times 15,5 = \mathbf{19,4 \mu\text{l}}$$

$$\text{Opti-MEM: } 250 \mu\text{l} \times 15,5 \mu\text{l} - 19,4 = \mathbf{3856 \mu\text{l}}$$

LipofectamineRNAiMAX 47,5 X

$$\text{LF} \quad 47,5 \times 5 \mu\text{l} = \mathbf{237 \mu\text{l}}$$

$$\text{Opti-MEM} \quad 47,5 \times 250 \mu\text{l} - 237 \mu\text{l} = \mathbf{11\,638 \mu\text{l}}$$

Yhdistettiin siRNA- ja transfektioreagenssin laimennokset lisäämällä 3875 μl LF-laimennosta siRNA-laimennoksen sekaan, jolloin transfektiomixin lopputilavuudeksi tuli 7750 μl . Transfektiomix lisättiin soluille seuraavasti:

- 1375 μl seerumitonta mediaa /malja
- 500 μl transfektiomixiä/malja
- 2 – 4 h kuluttua 625 μl 4 x seerumi-media

Solut kerättiin maljoilta kahden vuorokauden kuluttua.

6.4 Massaspektrometria

Massaspektrometria on menetelmä, jolla voidaan määrittää yhdisteen molekyylipaino. Massaspektrometria perustuu kemialliseen manipulaatioon, jossa neutraaleja molekyyliä ionisoidaan pommittamalla niitä esimerkiksi elektroneilla tai kaasumaisilla ioneilla, ja muodostuneet ionit punnitaan. Massaspektrometrian avulla voidaan reaktionseurannassa todeta, onko haluttua tuotetta saatu eli löytyykö toivottua massapiikkiä. Massaspektrometri on usein liitettyä kromatografiin, jolloin seoksen eri komponentit saadaan eroteltua ja analysoitua erikseen. Massaspektristä saadaan selville yhdisteen molekyylipaino sekä tietoa molekyylin rakenteesta yhdisteen pilkkoutumisen perusteella. (Virtuaalinen laboratorio-opas 2005) Massaspektrometrialla saadut tulokset on kerrottu luvussa 7.

6.5 qPCR

Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction) on herkkä, spesifinen ja toistettava menetelmä, jonka avulla voidaan kvantitoida nukleinihappoja (Arya et al. 2005:209). Koska tässä työssä monistettavat alueet olivat mRNA:ta, ne on qPCR:ta varten ensin käännetty cDNA:ksi käänteiskopioijaentsyymien avulla. cDNA toimii templaattina PCR-reaktiossa. Reaktiossa on mukana DNA:han sitoutuvia fluoresoivia detektoreita, tässä tapauksessa SYBR Green I.

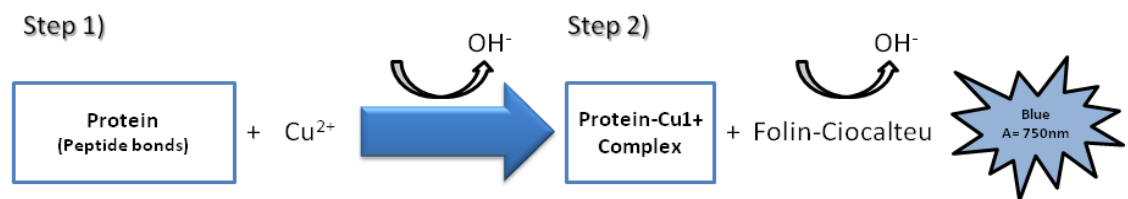
PCR aloitetaan alkudenaturaatiolla, joka aktivoi polymeraasientsyymien. Tätä seuraa denaturaatio-, annealing- ja ekstensiovaiheet sekä fluoresenssin luku. Näitä vaiheita toistetaan tietty määrä syklejä. Seuraavaksi tehdään sulamispisteanalyysi, jolla analysoidaan monistuneet tuotteet. Sulamiskäyrästä nähdään, onko monistunut tuote oikea vai onko tuotteeseen tullut kontaminaatio. Viimeiset vaiheet ovat loppuekstensio ja jäädytys. (Soininen 2010)

Alun jälkeen PCR:ssä saavutetaan logaritminen vaihe, jossa fluoresenssin määrä kasvaa lineaarisessa suhteessa monistuneen tuotteen määrään. Logaritminen vaihe kestää vain muutaman syklin ajan, minkä jälkeen kopioiden määrä saturoituu. (Soininen 2010)

qPCR-menetelmällä tutkittiin, onko siRNA-käsittelyissä soluissa tapahtunut ekspresion muutoksia fosfolipidien synteeseireittien entsyymeissä ja fosfolipaaseissa mRNA-tasolla. qPCR:llä käytiin läpi kaikki Western blot -menetelmällä tutkitut entsyymit, eikä missään ollut merkittävää eroa. Tarkemmat tulokset on kerrottu luvussa 7.

6.6 Proteiininmääritys

Näytteistä määritettiin proteiinkonsentraatio DC Protein Assay -kitillä (Bio-rad), joka on kolorimetrinen analyysi proteiinkonsentraation määrittämiseen. Kuvassa 3 on esitelty proteiininmäärityksen peruseriaate. Analyysissä on kaksi vaihetta, jotka johtavat värinmuodostukseen: proteiinin ja kuparin välinen reaktio ja Folinin reagenssin pelkistymisen kuparilla käsitellyn proteiinin toimesta. (DC Protein Assay Instruction Manual: 1)



Kuva 3. Proteiininmääritys perustuu proteiinin ja kuparitartraattiliuoksen sekä Folinin reagenssin väliseen reaktioon. Tuloksena on sininen väri. (Labome Protein Quantitation 2013)

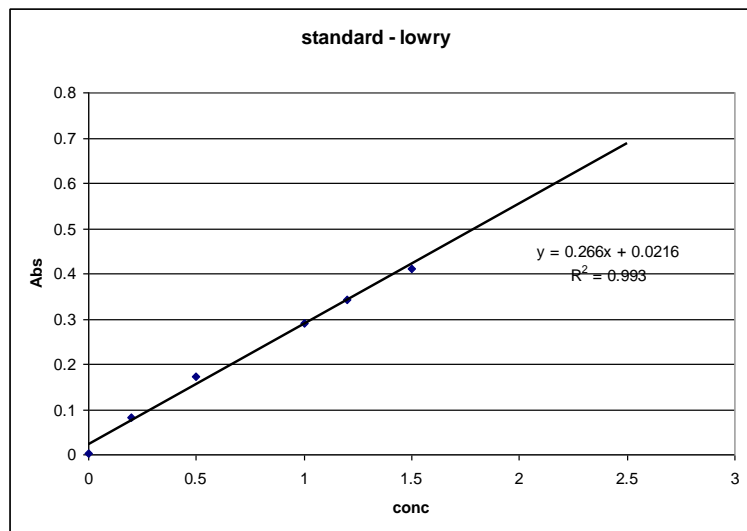
Solulysaateista tehtiin laimennokset 1:10 ja 1:20. BSA-standardeista tehtiin laimennokset 0, 0,2, 0,5, 1,0, 1,2 ja 1,5 mg/ml. Koska näytteet olivat RIPA-puskurissa (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 0,1 % SDS, 1,0 % Triton x-100, 1,0 % Deoxycholate, 5mM EDTA), myös standardilaimennokset tehtiin RIPA-puskuriin. Pipetoitiin 20 μl näytelaimennoksia ja standardeita kertakäyttökoeputkiin. Lisättiin 100 μl reagenssia A' (reagenssi A 100 μl /putki, reagenssi S 20 μl /1 ml reagenssi A:ta) jokaiseen putkeen ja vorteksoitiin. Lopuksi lisättiin reagenssi B, vorteksoitiin välittömästi ja inkuboitiin huoneenlämmössä 15 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen kaadettiin näytteet kyvetteihin ja mitattiin absorbanssit aallonpituudella 750 nm. Standardeista tehtiin standardisuora, jonka avulla voidaan laskea näytteiden proteiinipitoisuudet.

Taulukko 1.

Standardien proteiinipitoisuudet ja niistä mitatut absorbanssit

| c | A |
|-----|-------|
| 0 | 0.002 |
| 0.2 | 0.082 |
| 0.5 | 0.173 |
| 1 | 0.29 |
| 1.2 | 0.342 |
| 1.5 | 0.411 |

Taulukossa 1 on standardien pitoisuudet ja mitatut absorbanssit.



Kuva 4. Taulukon 1 arvojen perusteella piirretty standardisuora.

Kuvassa 4 on taulukon 1 perusteella piirretty standardisuora, jonka avulla on laskettu Allstars-, Dicer- ja Drosha-näytteiden proteiinipitoisuudet.

Taulukko 2.

Allstars-, Dicer- ja Drosha-näytteiden proteiinipitoisuudet

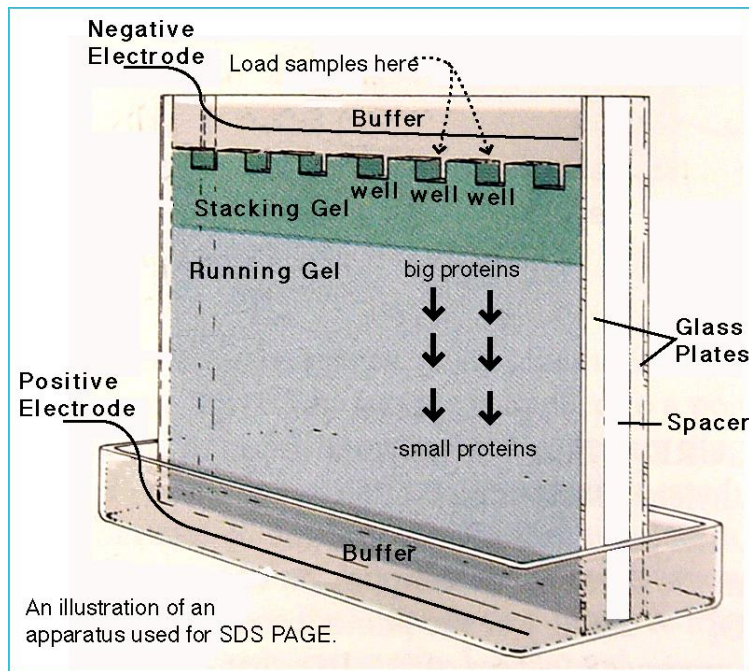
| | abs | c | ka_c | c x laimennos | ug/ul |
|---------------|-------|--------|--------|------------------|-------|
| Allstars 1:10 | 0.181 | 0.5966 | 0.6058 | 6.1 | |
| | 0.186 | 0.6151 | | | |
| Allstars 1:20 | 0.102 | 0.3038 | 0.3075 | 6.2 | 6.1 |
| | 0.104 | 0.3112 | | | |
| Dicer 1:10 | 0.267 | 0.9152 | 0.8985 | 9 | |
| | 0.258 | 0.8819 | | | |
| Dicer 1:20 | 0.157 | 0.5076 | 0.5224 | 10.4 | 9.7 |
| | 0.165 | 0.5373 | | | |
| Drosha 1:10 | 0.192 | 0.6373 | 0.6614 | 6.6 | |
| | 0.205 | 0.6855 | | | |
| Drosha 1:20 | 0.128 | 0.4002 | 0.4057 | 8.1 | 7.35 |
| | 0.131 | 0.4113 | | | |

Taulukkoon 2 on laskettu Allstars-, Dicer- ja Drosha-näytteiden proteiinipitoisuudet.

6.7 SDS-PAGE

SDS-PAGE eli natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi (engl. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) on menetelmä, jolla proteiinit erotellaan kokonsa perusteella. Proteiinit tunnistetaan membraanilta käyttäen proteiineille spesifisiä vasta-aineita. Tässä työssä käytettiin itse valettuja 10 % SDS-PAGE-geelejä (liite 2)

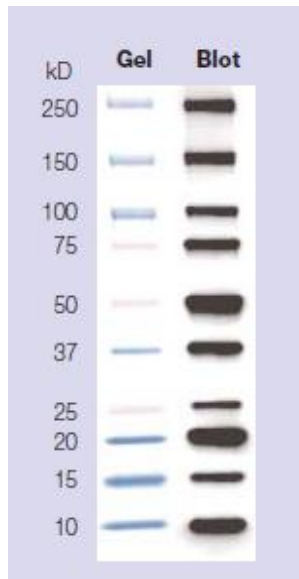
Ennen ajoa näytteet käsitellään lisäämällä β -merkaptotetanolia ja natriumdodekyylisulfaattia (SDS) sisältävää näytepuskuria (4 ml 0,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 0,8 g SDS, 0,04 g Bromophenol blue, 2 ml Millipore-vesi, 4 ml glyseroli, merkaptotetanoli 10 μ l /190 μ l) ja kuumentamalla ne 98 °C:seen 10 minuutiksi. Käsittelyllä proteiinin rakenne denatroidaan lineaarisiksi ja proteiinille muodostuu negatiivinen varaus SDS:n vaikutuksesta. β -merkaptotetanoli hajottaa proteiinien rikkisillat, jolloin proteiinin kolmiulotteinen rakenne tuhoutuu. SDS on voimakkaasti anioninen detergentti, jota sitoutuu proteiineihin vakiomäärä suhteessa proteiinin massaan (Chemistry 2001). Näin kaikkien näytteen proteiinien massan ja varauksen suhde on vakio ja ne liikkuvat sähkökentässä massastaan riippuvalla nopeudella. (Sheehan 2009: 156-158)



Kuva 5. SDS-PAGE:n perate. Näytteet pipetoidaan ylemmässä geelissä (konsentroitigeeli) oleviin kaivoihin. Kun geeli laitetaan sähkövirtaan, proteiinit kulkeutuvat geelillä alaspäin kohti positiivista elektrodiä ja erottuvat molekyylipainonsa mukaan. (Chemistry 2001)

Kuvassa 5 näkyy SDS-PAGE -geeli, joka on kaksiosainen. Ylempänä oleva konsentroitigeeli on huokoskooltaan isompi, kuin alempana oleva, ja sen tarkoitus on nimensä mukaisesti konsentroida näytteet ennen varsinaista erottelua. Näytteet pipetoidaan konsentroitigeelissä oleviin kaivoihin. Alempi geeli on huokoskooltaan pienempi, ja siinä tapahtuu proteiinien erottuminen. Kun geeli asetetaan sähkövirtaan, negatiivisesti varautuneet proteiinit kulkeutuvat kohti positiivista elektrodiä erottuen fraktioiksi molekyylipainonsa mukaisessa järjestyksessä. Pienet molekyylit kulkeutuvat geelillä isompia molekyylejä nopeammin.

Näytteiden proteiinit eroteltiin SDS-PAGE:lla käyttäen 4 prosentista konsentroitigeeliä ja 10 prosentista erottelugeeliä. Näytekaivoihin pipetoitiin 5-75 µg proteiinia tutkitusta proteiinista riippuen. Ennen näytteiden pipetointia näytteitä kuumennettiin 98 °C:ssa 10 minuuttia. Koon arvioimiseksi käytettiin Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards -molekyylipainomarkkeria (Bio-Rad). Geelille pipetoituja näytteitä ajettiin ajopuskurissa (3,03 g Tris, 14,4 g Glysiini, 1,0 g SDS. Täytä 1 l:aan millipore-vedellä) 80 V jännitteellä kunnes näyterintama oli konsentroitigeelin alareunassa, minkä jälkeen ajoa jatkettiin 150 V:n jännitteellä noin tunnin ajan, jolloin näyterintama oli erotusgeelin alareunassa.

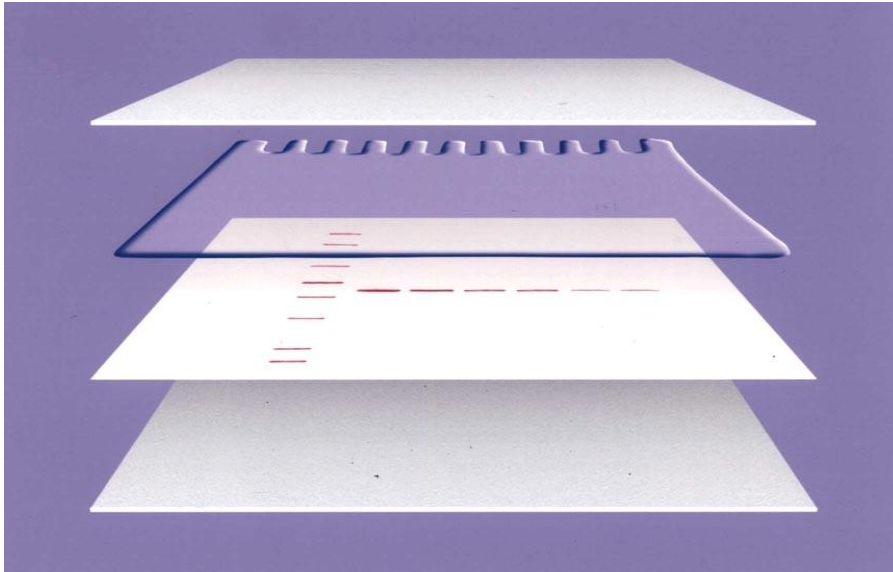


Kuva 6. Tässä työssä käytetty Precision Plus Protein™ WesternC™ Standardards -molekyylipainomarkkeri (Bio-Rad Laboratories).

Molekyylipainostandardiin (kuva 6) vertaamalla nähdään, ovatko membraanilta tunnistetut näytteiden proteiinit oikeassa kohdassa. Membraanille siirrostuksen jälkeen molekyylipainostandardin punaisena näkyvät 25, 50 ja 75 kDa:n bandit voidaan merkitä membraaniin, jotta ne erottuvat paremmin Western blot -ajon jälkeenkin.

6.8 Western blot

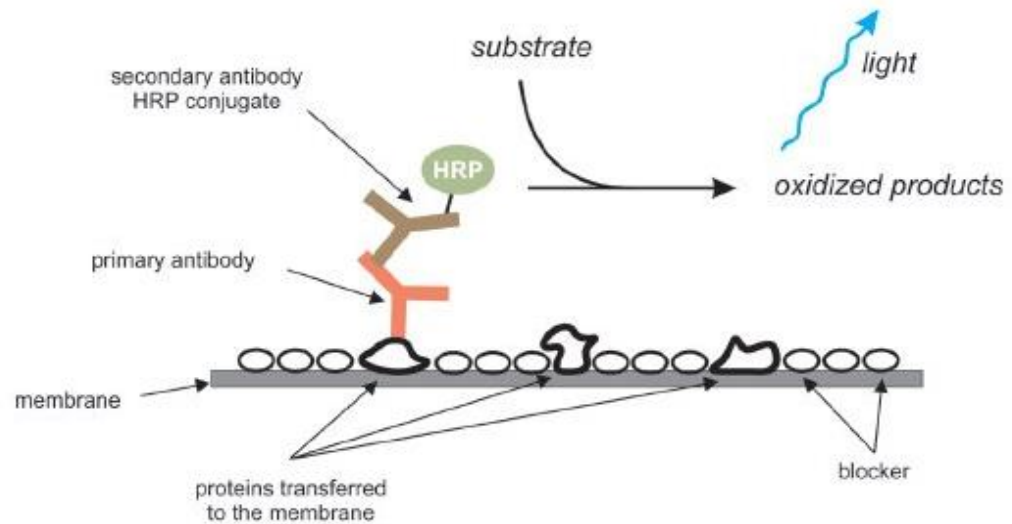
SDS-PAGE:lla erotellut proteiinit siirrostetaan elektroforeettisesti geeliltä nirtosellulosa-, polyvinyliidiinifluoridi- (PVDF) tai nylonmembraanille. Elektroforeettisessa blotauksessa proteiinit siirretään geeliltä membraanille sähkövirran avulla joko vaakatasossa puolikuivalla (semidry) blottausmenetelmällä tai pystysuorassa asettamalla geeli ja membraani tiukasti toisiaan vasten pakattuna siirtopuskurilla täytettyyn kammioon. Puolikuivassa blottausmenetelmässä geeli ja membraani asetetaan toisiaan vasten siirtopuskuriin kastettujen suodatinpapereiden väliin ja muodostunut blottausleipä (kuva 7) asetetaan kahden elektrodilevyn väliin. (Sheenan 2009: 190)



Kuva 7. Blottausleipä, jossa alimmaisena kolme suodatinpaperia, niiden päällä membraani ja geeli. Päällimmäisenä on vielä kolme suodatinpaperia. Blottausleipä on kasteltu siirrostuspuskurilla. (ThomasNet/News 2002)

Proteiinien siirto geeliltä nitroselluloosamembraanille (Millipore) tehtiin puolikuivalla blottausmenetelmällä. Geeli sekä samankokoinen membraani ja kuusi suodatinpaperia kastettiin siirrostuspuskuriin (3,03 g Tris, 14,4 g Glysiini, 1,0 g SDS, 200 ml metanoli. Täytä 1 l:aan millipore-vedellä) ja niistä rakennettiin blottausleipä, joka asetettiin blottauslaitteistoon (Hofer TE 70X Semi-Dry Transfer Unit). Proteiinien siirtoon käytettävä virta oli 0,06 A/geeli ja käytetty aika oli 1 tunti ja 10 minuuttia.

Kun proteiinit on siirretty geeliltä membraanille, siitä sidotaan kaikki epäspesifiset vasta-aineen sitoutumiskohdat käsittelemällä membraania epäspesifistä proteiinia sisältävällä blokkauksiliuksella (Sheenan 2009: 191). Blokkauks voidaan tehdä esimerkiksi maitojauheesta, naudan seerumin albumiinista (BSA, bovine serum albumin) tai kaseiinista valmistetulla liuksella. Blokkauks on tärkeä vaihe, sillä vasta-aineiden epäspesifinen sitoutuminen membraaniin vaikeuttaa tutkittavan proteiinin havainnointia. Epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi membraania inkuboitiin rasvatonta maitojauhetta (5 %) sisältävässä TBS/T-liuoksessa (1,21 g TRIS, 8,77 g NaCl, pH 8.0 (HCl), 1 ml Tween. Täytä 1 l:ksi millipore-vedellä) tunnin ajan huoneenlämmössä sekoittajassa.



Kuva 8. Western blot -menetelmän periaate. Tutkittavat proteiinit siirrostetaan SDS-PAGE-geeliltä membraanille. Membraanin tyhjät kohdat blokataan maitojauheella, minkä jälkeen membraania inkuboidaan primäärisen vasta-aineen kanssa. Primäärinen vasta-aine sitoutuu tutkittavaan proteiiniin. Sitoutumaton 1. vasta-aine pestään pois ja membraania inkuboidaan sekundäärisen, HRP:llä leimatun vasta-aineen kanssa. 2. vasta-aine sitoutuu 1. vasta-aineeseen. Lopuksi lisätään entsyymille substraatti, joka aiheuttaa valoreaktion, joka voidaan mitata. (Biocompare 2012)

Blokkauksen jälkeen membraanille lisätään tutkittavalle proteiinille spesifistä vasta-ainetta eli primäärivasta-ainetta, joka tunnistaa tutkittavan proteiinin ja sitoutuu siihen. Primäärivasta-ainekäsittelyn jälkeen membraani pestään sitoutumattoman ja epäspesifisesti sitoutuneen primäärivasta-aineen poistamiseksi. Pesupuskuri sisältää ionitonta detergenttiä, joka häiritsee vasta-ainekäsittelyn aikana syntyneitä primäärisen vasta-aineen ja epäspesifisten proteiinien välisiä hydrofobisia vuorovaikutuksia. Pesun jälkeen membraania käsitellään primäärivasta-aineeseen sitoutuvalla sekundäärisellä vasta-aineella, joka on usein leimattu helposti havaittavalla radioaktiivisella, fluoresoivalla tai entsyymaattisella leimalla. Sekundääriseen vasta-aineeseen sidottu entsyymi voi olla esimerkiksi piparjuuriperoksidaasi (horseradish peroxidase, HRP) tai alkalinen fosfataasi. Epäspesifisesti sitoutuneen ja sitoutumattoman sekundäärisen vasta-aineen pois pesun jälkeen sekundääriseen vasta-aineeseen sidottu entsyymi, kuten HRP, voidaan havaita membraanilta substraatin avulla. (Sheenan 2009: 191-192) Kuvassa 8 on esitetty Western blot -menetelmän periaate.

Tässä työssä käytetyt primääriset ja sekundääriset vasta aineet sekä niistä käytetyt laimennokset on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Työssä käytetyt primääriset ja sekundaariset vasta-aineet sekä niiden laimennokset.

| geeni | tutkittava entsyymi | 1. vasta-aine | laimennos | 2. vasta-aine | laimennos |
|--------|---------------------|-------------------------------------------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------|-----------|
| CHKA | CK | Anti-CHKA (Sigma) | 1:100 | Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)-HRP Conjugate (Bio-Rad) | 1:5000 |
| CHKB | CK | Anti-CHKB (Sigma) | 1:500 | Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)-HRP Conjugate (Bio-Rad) | 1:5000 |
| PCYT1A | CT | Anti-PCYT1A (Sigma) | 1:200 | Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)-HRP Conjugate (Bio-Rad) | 1:5000 |
| CHPT1 | CPT | CHPT1(N-13): sc-242437 (Santa Cruz Biotechnology) | 1:200 | Donkey Anti-Goat IgG-HRP Conjugate (Santa Cruz Biotechnology) | 1:5000 |
| ETNK1 | EK | Anti-EK11 (Sigma) | 1:200 | Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)-HRP Conjugate (Bio-Rad) | 1:5000 |
| PCYT2 | ET | Anti-PCYT2 (Sigma) | 1:700 | Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)-HRP Conjugate (Bio-Rad) | 1:5000 |
| CEPT1 | EPT/CPT | CEPT1(N-14): sc-133421 (Santa Cruz Biotechnology) | 1:200 | Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)-HRP Conjugate (Bio-Rad) | 1:5000 |
| PLA2G6 | iPLA2 β | group VI iPLA2 (A-10): sc-137189 (Santa Cruz Biotechnology) | 1:200 | Goat Anti-Mouse IgG(H+L)-HRP Conjugate (Bio-Rad) | 1:2500 |
| PNPLA6 | iPLA2 δ | NTE(H-200): sc-48739 (Santa Cruz Biotechnology) | 1:200 | Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)-HRP Conjugate (Bio-Rad) | 1:5000 |

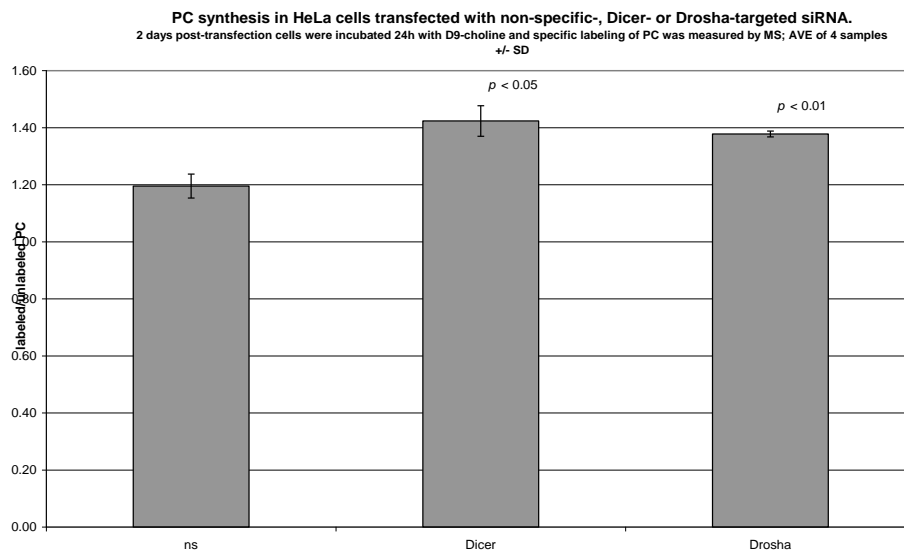
Primäärivasta-aineista valmistettiin laimennokset rasvatonta maitojauhetta (5 %) sisältävään TBS/T-liuokseen. Membraania inkuboitiin primäärivasta-aineliuoksessa kylmähuoneessa yön yli sekoituksessa. Sitoutumattoman ja epäspesifisesti sitoutuneen vasta-aineen poistamiseksi membraania pestiin neljä kertaa 15 minuutin ajan TBS/T-liuoksella huoneenlämmössä sekoituksessa. Sekundaarisista vasta-aineista valmistettiin laimennokset 5 % rasvatonta maitojauhetta sisältävään TBS/T-liuokseen ja membraania inkuboitiin vasta-aineliuoksessa 60 minuuttia huoneenlämmössä sekoituksessa. Membraani pestiin neljä kertaa 15 minuutin ajan TBS/T-liuoksella. Tutkittavien proteiinien ekspressiotasot määritettiin membraanilta detektioreagenssilla (Amersham TM ECL Plus Western Blotting Detection System).

Membraani kuvattiin Fuji-Film FLA 900 -laitteella. Kuvia muokattiin Multi Gauge -ohjelman avulla. Kuvista esimerkiksi säädettiin kontrastia ja häivytettiin ylimääräistä taustaa, jotta niitä pystyttiin tulkitsemaan paremmin. Kuvien muokkauksessa on muistettava, ettei oleellista informaatiota saa poistaa (Rossner & Yamada 2004).

7 Tulokset ja tulosten tarkastelu

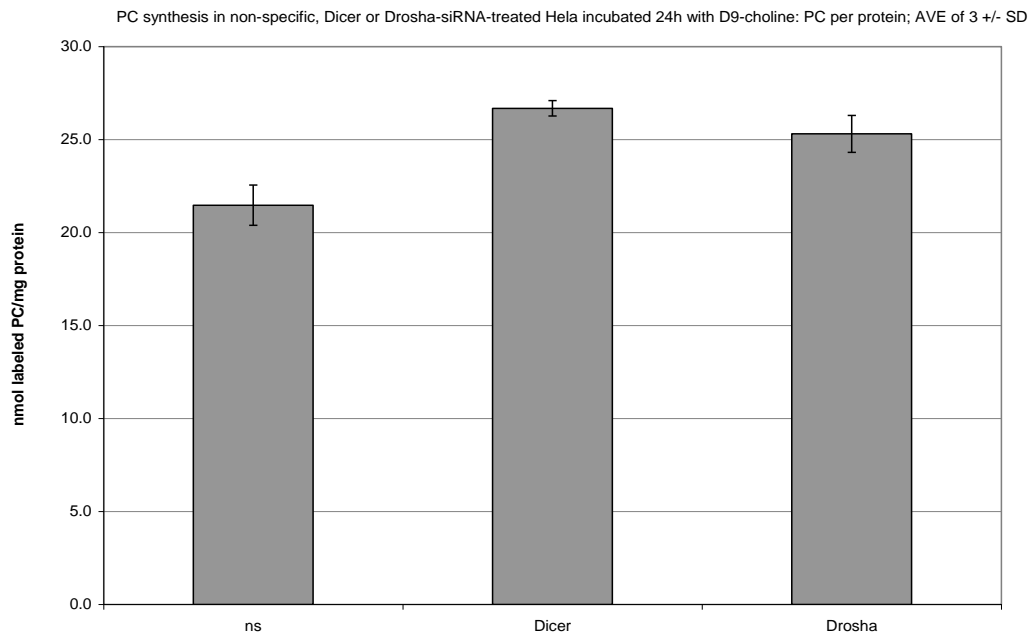
7.1 Massaspektrometria

Massaspektrometrialla tutkittiin, miten Dicer- ja Drosha-entsyymien hiljentäminen vaikuttaa PC:n synteesiin.



Kuva 9. PC:n synteesi HeLa-soluissa, jotka on transfektoitu ei-spesifisellä, Dicer- ja Drosha-siRNA:lla. Neljän näytteen keskiarvo.

Kuvassa 9 on pylväsdiagrammi, joka kuvaa fosfatidylikoliinin synteesin muutosta siRNA-käsitellyissä soluissa. Transfektion jälkeen soluja inkuboitiin D9-koliinin kanssa ja leimatun fosfatidylikoliinin määrä mitattiin MS:lla. Ensimmäinen pylväs kuvaa PC:n synteesiä soluissa, joihin on transfektoitu epäspesifinen siRNA eli siRNA, jolla ei ole mitään kohdetta. Nämä solut toimivat kokeessa kontrollina. Toinen pylväs kuvaa PC:n synteesiä soluissa, joihin on transfektoitu Dicer-siRNA, joka hiljentää mikro-RNA:iden biogeneesireitin toisen RNAasi III-entsyymin. Viimeinen pylväs kuvaa PC:n synteesiä soluissa, joihin on transfektoitu Drosha-siRNA. Drosha-siRNA hiljentää miRNA-biogeneesireitin ensimmäisen RNAasi III:n eli Droshan.



Kuva 10. PC:n synteesi ei-spesifillä, Dicer- ja Drosha- siRNA-käsitellyillä HeLa-soluilla. 24 h:n inkubointi D9-koliinin kanssa: PC per proteiini. Kolmen näytteen keskiarvo. Nmol:a leimattua PC:tä/mg proteiinia.

Kuvan 10 pylväsdiagrammi kuvaa PC:n synteesiä siRNA-käsitellyissä soluissa. Transfektion jälkeen soluja inkuboitiin D9-koliinin kanssa ja leimatun fosfatidyylikoliinin määrä mitattiin MS:lla. Ensimmäinen pylväs kuvaa PC:n synteesiä soluissa, joihin on transfektoitu epäspesifinen siRNA. Toinen pylväs kuvaa PC:n synteesiä soluissa, joihin on transfektoitu Dicer-siRNA. Viimeinen pylväs kuvaa PC:n synteesiä soluissa, joihin on transfektoitu Drosha-siRNA.

Kuvista 9 ja 10 nähdään, että Dicerin ja Droshan hiljentäminen kiihdyttää PC:n synteesiä.

7.2 qPCR

Massaspektrometriaan käytetyistä näytteistä eristettiin RNA ja käänteiskopioitiin se cDNA:ksi, minkä jälkeen niistä määritettiin RT-qPCR-menetelmällä eri fosfolipaasigeenien ja synteettisten entsyymien ekspressiot. Missään siRNA-käsitellyistä näytteistä ei havaittu merkittävää eroa mRNA-tasolla. siRNA-käsiteltyjen näytteiden mRNA-tasot on koottu taulukkoon 4.

Taulukko 4. Dicer- ja Drosha-hiljennetyistä soluista määritetyt entsyymien mRNA-tasot.

| DICER KD | mRNA expression (%) | SD | n |
|------------------------------|---------------------|----------------------|---|
| DICER1 | 15 | 3 | 5 |
| PLA2G6 / iPLA ₂ β | 108 | 17 | 4 |
| PNPLA6 / iPLA ₂ δ | 114 | 11 | 4 |
| PCYT1A /CT | 97 | 10 | 4 |
| PCYT2 / ET | 104 | 29 | 3 |
| CHKA / CKα | 69 | 4,4 | 4 |
| CHKB / CKβ | 95 | | 1 |
| CHPT1 / CPT | 101 | | 1 |
| CEPT1 / CPT/EPT | 118 | | 1 |
| ETNK1 / EK1 | 96 | | 1 |
| DROSHA KD | mRNA expression (%) | SD | n |
| DROSHA | 15 | 2 | 4 |
| PLA2G6/ iPLA ₂ β | 91 | 25 | 4 |
| PNPLA6/ iPLA ₂ δ | 104 | 19 | 4 |
| PCYT1A/CT | 106 | 7 | 4 |
| PCYT2/ ET | 99 | 34 | 3 |
| CHKA/CKα | 90 | | 1 |
| CHKB/CKβ | 111 | | 1 |
| CHPT1/ CPT | 128 | | 1 |
| CEPT1/ EPT | 151 | ei toistunut 28.5.12 | 1 |
| ETNK1/ EK1 | 117 | | 1 |

Koska menetelmä ei ole idiottivarma, qPCR-tuloksista luotettiin vain niihin, jotka olivat yli 1,5-kertaisia ja toistuivat useammin kuin kerran. Esimerkiksi EPT:n ekspressiotaso oli yhdessä kokeessa 151 %, mutta tulos ei toistunut enää myöhemmin.

qPCR-menetelmällä määritettiin myös lipidiladattujen solujen ekspressiot. Niistä saadut tulokset olivat ristiriitaisia keskenään, jopa samasta näytteestä tehdyillä rinnakkaisilla kokeilla.

Taulukko 5. Lipidiladattujen solujen mRNA-tasot

| | di-16:1-PC | di-16:1-PE |
|--------------------|------------|------------|
| CHKA / CK α | 0,870 | 0,883 |
| CHKB / CK β | 0,973 | 1,001 |
| PCYT1A / CT | 0,783 | 0,817 |
| CHPT1 / CPT | 1,173 | 1,086 |
| CEPT1 / EPT | 0,864 | |
| ETNK1 / EK1 | 0,973 | 1,092 |

Taulukkoon 5 on kerätty lipidiladattujen solujen mRNA-tasot. qPCR-määritykset on tehty soluista, joihin on ladattu PC-, PE- ja kontrollivesikkeleitä. Taulukossa 6 puolestaan on ET:n ekspression määrittäminen kahdesta eri vesikkelisolulyysaatista. Ekspressiotasoissa on melkoinen ero eri kokeiden välillä.

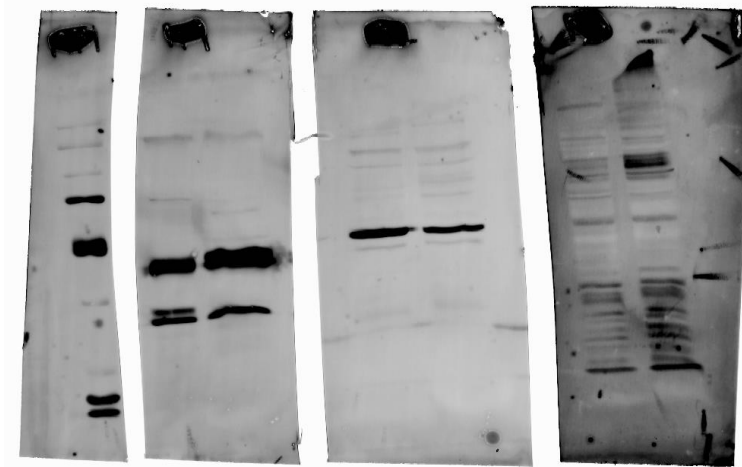
Taulukko 6. ET:n tulos kahdessa eri kokeessa

| | di-16:1-PC | di-16:1-PE | di-16:1-PS |
|---------------------|------------|------------|------------|
| Experiment 4/2012 | 2,03353 | 1,44987 | 1,28585 |
| Experiment 5.9.2012 | 0,77513 | 0,84766 | 0,70896 |

7.3 Western blot -menetelmä

7.3.1 Testaus

Aluksi testattiin vasta-aineiden toimivuutta sekä HeLa- että A431-soluissa. Vasta-aineiden valmistajan (Sigma) mukaan vasta-aineiden kohdeproteiinien pitäisi ekspressoitua A431-solulinjassa. Testi tehtiin kolmella eri vasta-aineella: PCYT2, CHPT1 ja CEPT1. Haluttiin nähdä, toimivatko vasta-aineet samalla tavalla kummassakin solulinjassa.

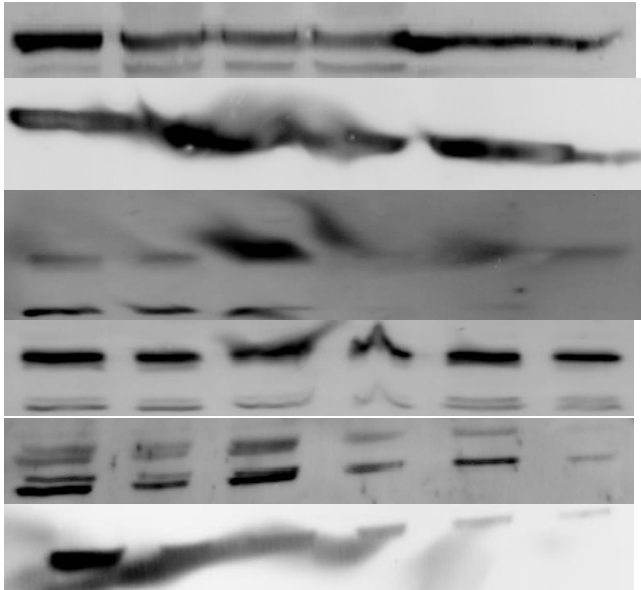


Kuva 11. HeLa- ja A431-soluissa tehty testiajo. Vasemmalta katsottuna ensimmäisessä membraanisuikeleessa on molekyylipainostandardi. Kolmessa muussa osassa on vasemmalla puolella A431-näyte ja oikealla puolella HeLa-näyte.

Kuvassa 11 näkyvät testiajon tulokset. Membraani leikattiin siirrostuksen jälkeen neljään osaa. Ensimmäisessä osassa on molekyylipainostandardi Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards (bio-rad). Seuraava osa on leimattu PCYT2-vasta-aineella, kolmas CHPT1-vasta-aineella ja viimeinen CEPT1-vasta-aineella.

Koska vasta-aineiden kohdeproteiinien ekspressiotasot näyttävät varsin tasaisilta, tämän ensimmäisen testiajon jälkeen päädyttiin käyttämään HeLa-solulinjaa. Lisäksi kaikki muut tähän työhön liittyvät kokeet (massaspektrometria, qPCR) oli tehty HeLa-solulinjassa.

Jotta eri Western blot -ajojen tuloksia pystyttiin vertailemaan keskenään, tutkittavan vasta-aineen rinnalla tehtiin aina myös samasta näytteestä toinen Western blot -ajo, jossa käytettiin β -aktiini-vasta-ainetta. β -aktiinin ilmenemistaso pysyy vakiona olosuhteista riippumatta, mikä tekee siitä hyvän kontrollin.



Kuva 12. Esimerkkejä huonosti onnistuneista siirrostuksista.

Kuvassa 12 on kokoelma huonosti siirrostuneita proteiineja. Ongelmana oli se, että yhdellä laitteella yritettiin siirrostaa proteiinit neljältä geeliltä samanaikaisesti, mutta laitteen kapasiteetti ei ollut ilmeisesti riittävä. Ongelma korjaantui, kun otettiin käyttöön toinen laite ja kummallakin siirrostettiin samanaikaisesti vain kaksi geeliä.

7.3.2 Koliinikinaasit

Nisäkkäillä on kaksi eri koliinikinaasigeeniä; *CHK1*, joka koodaa CK α :aa ja *CHK2*, joka koodaa CK β :aa. Testattiin kummallekin proteiinille spesifistä vasta-ainetta.



Kuva 13. CHKA-vasta-aineella tehty ajo siRNA-käsitellyillä soluilla.

Kuvassa 13 on yksi Anti-CHKA-vasta-aineella (CK α :n vasta-aine) tehty Western blot -ajo. Anti-CHKA-vasta-aineella tehtiin kolme eri ajoa siRNA-käsitellyillä soluilla. Yhdessä ajossa näkyi aavistus eroa intensiteeteissä, mutta tulos ei toistunut muilla kerroilla. Näiden kokeiden perusteella ei nähdä merkittävää eroa CK α :n ekspressiossa. Myöskään mRNA-tasolla ei havaittu merkittävää muutosta.

Testattiin myös Anti-CHKB-vasta-aine (CK β :n vasta-aine). Tuloksena oli proteiinifraktio, joka oli kuitenkin väärällä kohdalla, joten sen tulos jätettiin pois. CK β :n koko on noin 45 kDa ja saatu proteiinifraktio oli noin 60 kDa:n kohdalla. Käytössä ei ollut kontrolliproteiinia, josta näkisi, onko signaali oikea vai väärä. CK β :n mRNA-tasot olivat myös muuttumattomat.

7.3.3 Fosfokoliinisytydylylitransferaasi

Fosfokoliinisytydylylitransferaasi (CT) on CDP-koliinireitin nopeutta rajoittavan entsyymi. Tämän entsyymin toiminnasta tehtiin kokonaan oma työ (Aarnio 2013), joten sitä ei nyt käsitellä tarkemmin.



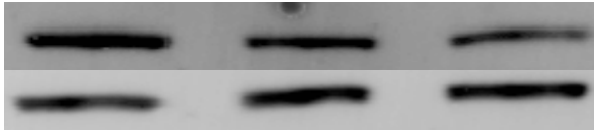
Kuva 14. Anti-PCYT1A-vasta-aineella tehty Western blot -ajo. Näytteinä oli siRNA-käsiteltyjä soluja.

Kuvassa 14 on esimerkki Anti-PCYT1A-vasta-aineella tehdystä Western blot -ajosta. Näytteinä oli siRNA-käsiteltyjä soluja. Tässä näkyy hyvin selkeä ero proteiinifraktioiden intensiteeteissä: sekä Dicer-, että Drosha-hiljennetyissä soluissa CT:n ekspressio on kohonnut merkittävästi. Anti-PCYT1A-vasta-aineella tehtiin seitsemän toistoa siRNA-käsitellyillä soluilla ja kolme toistoa vesikkeliladatuilla soluilla. Lähes jokaisessa ajossa, joka tehtiin tällä vasta-aineella, saatiin vastaavanlainen tulos.

mRNA-tasolla CT:n ekspressiossa ei kuitenkaan havaittu minkäänlaista muutosta. Tämä tarkoittaa sitä, että Dicer- ja Drosha-entsyymien hiljentämisellä ei ole ollut vaikutusta transkriptioon, mutta translaatio on tehostunut. Vaikuttaa siis siltä, että CT:tä säätelee jokin miRNA. Se, mikä miRNA on kyseessä, on vielä selvítettävä.

7.3.4 Diasyyliglyserolikoliinifosfotransferaasi

Diasyyliglyserolikoliinifosfotransferaasi (CPT) katalysoi CDP-koliinireitin viimeisen reaktion.



Kuva 15. CHPT-vasta-aineella tehty Western blot -ajo, jossa näytteet Allstars, Dicer ja Drosha.

Kuvassa 15 on CHPT1-vasta-aineella (CPT:n vasta-aine) tehty Western blot -ajo. Tässä kuvassa on esimerkin vuoksi myös β -aktiini, joka tehtiin aina varsinaisen ajon rinnalla. Koska β -aktiini oli mukana vain vertailun vuoksi, kuvat on jätetty nyt pois tuloksista.

CHPT1-vasta-aineella Western blot -ajo toistettiin neljä kertaa siRNA-käsitellyillä soluilla ja kerran vesikkeliladatuilla soluilla. Yhdessäkään ajossa ei havaittu merkittävää muutosta. Tämän entsyymin kohdalla muutosta ei siis nähdä tällä menetelmällä. Tätä tukee myös se, ettei mRNA-tasolla ollut tapahtunut merkittävää muutosta.

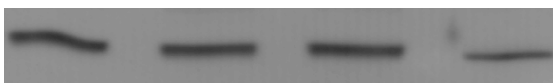
7.3.5 Etanoliamiinikinaasi

Etanoliamiinikinaasi (EK) katalysoi CDP-etanoliamiinireitin ensimmäisen reaktion. Kuvassa 16 on Anti-EK11-vasta-aineella (EK:n vasta-aine) tehty blotti.



Kuva 16. Anti-EK11-vasta-aineella tehty Western blot -ajo, jossa näytteet Allstars, Dicer ja Drosha.

Anti-EK11-vasta-aineella tehtiin vain yksi ajo siRNA-käsitellyillä soluilla. Tässä näyttää siltä, että proteiinimäärä vähenee. Jos kyseessä on miRNA-välitteinen säätely, niin tämä miRNA toimii päinvastaiseen suuntaan, kuin oletettiin.



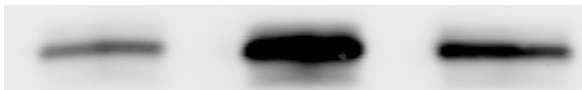
Kuva 17. Anti-EK11-vasta-aineella tehty ajo, jossa näytteet ctrl, PC, PE ja PS.

Kuvassa 17 on Anti-EK11-vasta-aineella tehty Western blot -ajo, jossa näytteinä on vesikkeliladatut solut. Tämän kuvan perusteella näyttäisi siltä, että kun soluihin on la-

dattu ylimäärin PS:ää, EK:n ekspressio vähenee. Myös vesikkeliladatuilla soluilla Anti-EK11-vasta-ainetta käytettiin vain kerran. Jotta mitään varmaa tuloksesta voisi sanoa, olisi ajo toistettava vielä uudelleen.

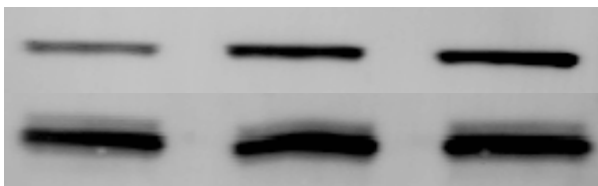
7.3.6 Fosfoetanoliäminisytydylyylitransferaasi

ET:n on epäilty olevan fosfatidyylietanoliamiinin synteesireitin "rate-limiting"-entsyymi, joten sitä tutkittiin muita tarkemmin. Anti-PCYT2-vasta-aineella (ET:n vasta-aine) tehtiin yhteensä 9 Western blot -ajoa siRNA-käsitellyillä soluilla ja 5 ajoa vesikkeliladatuilla soluilla. Osasyynä oli myös se, että samaan aikaan tämän työn kanssa tehtiin toista insinööriyötä, jossa havaittiin CT:n (fosfokoliinisytydylyylitransferaasi) vasta-aineella muutoksia samoissa näytteissä (Aarnio 2013).



Kuva 18. Anti-PCYT2-vasta-aineella tehty Western blot -ajo, jossa näytteet Allstars, Dicer ja Drosha.

Kuvassa 18 on yksi saatu tulos, joka vaikutti hyvin lupaavalta. Kuvassa näkyy hyvin selvästi Dicer-hiljennetyssä näytteessä kohonnut intensiteetti. Tulos toistui kerran, hieman heikommin, kun samasta solulysaatista tehtiin uusi näyte. Mutta kun näytteet tehtiin eri solulysaatista, tulos ei enää toistunut.



Kuva 19. Ylemmässä kuvassa Anti-PCYT2-vasta-aineella ja alemmassa kuvassa β -aktiinilla tehty Western blot -ajo. Kummassakin näytteet Allstars, Dicer ja Drosha.

Kuvassa 19 on hyvä esimerkki siitä, miksi kontrolli kannattaa tehdä joka kerta. Ylemmässä kuvassa on PCYT2-vasta-aineella tehty ajo, joka näyttää siltä, kuin Dicer- ja Drosha-näytteiden intensiteetit olisivat nousseet. Kun kuvaa vertaa vastaavaan β -aktiiniin, huomaa, että näytteiden intensiteetit ovat suhteessa yhtä voimakkaat.



Kuva 20. Anti-PCYT2-vasta-aineella tehty ajo, jossa on näytteet Allstars, Dicer ja Droscha.

Kuvassa 20 on yleisimmin Anti-PCYT2-vasta-aineella saatu tulos eli tasainen rivistö proteiinifraktioita. Kun siRNA-käsitellyillä näytteillä tehtiin yhteensä yhdeksän ajoa, niistä seitsemän oli tällaisia. Näiden kokeiden perusteella vaikuttaa siltä, että miRNA:t eivät ole osallisina tämän säätelyssä. Ainakaan sitä ei pystytä näillä kokeilla osoittamaan. Muutosta ei ollut myöskään mRNA-tasolla.

Anti-PCYT2-vasta-aineella tehtiin neljä Western blot -ajoa PC-, PE- ja kontrollivesikkeleillä. Näissä ei havaittu ekspressiotason muutoksia.



Kuva 21. Anti-PCYT2-vasta-aineella tehty ajo, jossa näytteet ctrl, PC, PE, PS.

Anti-PCYT2-vasta-aineella tehtiin yksi Western blot -ajo vesikkeliladatuilla soluilla, joissa oli edellisissä kokeissa käytettyjen PC-, PE- ja kontrollivesikkelin lisäksi PS-vesikkeliä. Sen ajon tulos on kuvassa 21, ja siinä näkyy samanlainen ilmiö kuin Anti-EK11-vasta-aineella tehdyssä ajossa. Kun soluihin on ladattu PS:ää, myös ET:n ekspressio vähenee.

7.3.7 Diasyyliglyserolietanoliamiinifosfotransferaasi.

Diasyyliglyserolietanoliamiinifosfotransferaasi (EPT) katalysoi CDP-etanoliamiinireitin viemisen reaktion.



Kuva 22. CEPT1-vasta-aineella tehty ajo siRNA-käsitellyillä soluilla.

CEPT1-vasta-aineella tehtiin yhteensä neljä toistoa siRNA-käsitellyillä soluilla. Kuvassa 22 on tällä vasta-aineella saatu tyypillinen tulos. Vaikka proteiinia käytettiin paljon, intensiteetti on hyvin heikko. Merkittävää eroa ei näytteiden intensiteeteissä kuitenkaan ole. EPT-entsyymin qPCR-tuloksissa näkyi kerran noin 50 %:n nousu ekspressiotasossa. Muulloin tämä tulos ei toistunut.

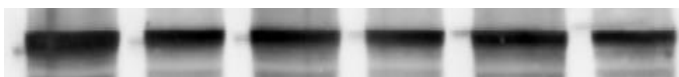
7.3.8 iPLA:t

iPLA:t ovat kalsiumista riippumattomia fosfolipaasi A2-ryhmän fosfolipaaseja.



Kuva 23. Group VI iPLA₂-vasta-aineella tehty Western blot -ajo, jossa on näytteet Allstars, Allstars, Dicer, Dicer, Drosha, Drosha (kaikki näytteet on tehty kahdella eri proteiinipitoisuudella).

Kuvassa 23 on iPLA₂ β :n vasta-aineella, Group VI iPLA₂:lla, tehty Western blot -ajo. iPLA₂ β :n ekspressio havaitaan yleisesti ottaen huonosti HeLa-soluista, eikä se tässäkään tee poikkeusta. Ryhmässä on testattu useita eri vasta-aineita iPLA₂ β :lle ja nyt käytetty Group VI iPLA₂ on toiminut parhaiten. Silti merkittävää muutosta intensiteeteissä ei ole havaittavissa. Ekspressiotasoissa ei ole myöskään mRNA-tasolla havaittu muutoksia.



Kuva 24. NTE-vasta-aineella tehty ajo, jossa näytteet Allstars, Allstars, Dicer, Dicer, Drosha, Drosha (kaikki näytteet on tehty kahdella eri proteiinipitoisuudella)

Kuvassa 24 on iPLA₂ δ :n vasta-aineella (NTE) tehty Western blot -ajo. Tämänkään entsyymin ekspressiotasossa ei havaittu muutoksia proteiini- tai mRNA-tasolla.

8 Pohdinta

Western blot –menetelmä on parhaimmillaankin vain semi-kvantitatiivinen. Tässä työssä detektiomenetelmänä käytettiin entsyymireaktiota, mutta reaktiokinetiikkaa ei otettu oikein huomioon. Tästä syystä vähäiset intensiteettimuutokset oli jätettävä huomiotta, koska ne saattoivat aiheutua entsyymien vaihtelevista inkubaatioajoista. Näin ollen voitiin luottaa vain sellaisiin intensiteettimuutoksiin, jotka ”hyppäävät silmille” eli ovat hyvin voimakkaita. Huomioon olisi voinut ottaa sellaiset vähäisemmät muutokset, jotka toistuvat ajosta toiseen, mutta sellaisia ei näillä vasta-aineilla havaittu.

Oman ongelmansa käytetyssä menetelmässä aiheuttaa sen epäsuoruus. miRNA:iden vaikutusta arvioitiin hiljentämällä miRNA-synteesireitin entsyymit Dicer ja Drosha. Oletuksena tässä oli, että näiden hiljentämisen seurauksena yhtään toimivaa miRNA:ta ei muodostuisi. Tätä oletusta ei ole millään tavalla pystytty varmistamaan. Lisäksi, koska solu on monimutkainen kokonaisuus, on olemassa lukuisia muitakin tekijöitä, jotka voivat vaikuttaa fosfolipidien synteesiin. Mikro-RNA:iden vaikutus tutkittuihin entsyymeihin saattaa myös olla niin vähäistä, ettei tulosta tällä menetelmällä saada.

Tämän työn kanssa samaan aikaan tehtiin toinen insinööriö, jossa havaittiin samalla menetelmällä Anti-PCYT1A-vasta-aineella tehdyissä kokeissa muutoksia sekä siRNA-että vesikkelikäsitellyillä soluilla. Mikäli miRNA:t vaikuttaisivat esim. ET:iin, olisi tuloksia pitänyt saada. Toisaalta, koska Pcyt1a:lla saatiin tuloksia, mutta millään muulla tutkitulla vasta-aineella ei, saattaa olla, että säätely kohdistuu nimenomaan PC:n synteesiin.

Kun soluihin ladattiin fosfatidyyliiseriiniä, sekä EK1:n että ET:n ekspressiotasot madaltuivat. Vaikuttaa siltä, että kun soluissa on ylimäärin PS:ää, ne siirtyvät käyttämään PS:n dekarboksylaatioreittiä ja Kennedy-reitti poistuu käytöstä. Tältä osin tutkimus jäi vielä kesken. PE:n synteesireitiltä ei siis löydetty miRNA-välitteistä säätelyä, mutta havaittiin, että synteesireitin entsyymien määrää säätelemällä säädellään PE:n synteesiä.

Vaikka tätä työtä varten tutkittiin lähes kaikki PC:n ja PE:n synteesireittien entsyymit, osa jäi vielä täysin koskemattomiksi ja osa tarvitsee vielä lisätutkimusta. Selvitetäväksi jäi myös, mikä kaikista mahdollisista miRNA:ista säätelee CTα:n ekspressiota.

9 Yhteenveto

Tämän insinöörityön tavoitteena oli tutkia, ovatko mikro-RNA:t osallisina solukalvon fosfolipidihomeostasian ylläpidossa. Tiedetään, että solukalvon lipidikoostumus on hyvin tarkasti säädeltyä, mutta varmuutta siitä, mitkä tekijät ovat osallisina tässä säätelyssä, ei vielä tiedetä.

Mikro-RNA:iden mahdollisia vaikutuksia solukalvon fosfolipidihomeostasiaan tutkittiin hiljentämällä HeLa-soluista miRNA-biogeneesireitin keskeiset entsyymit Dicer ja Drosha. Western blot -menetelmän avulla tutkittiin, onko Dicer- ja Drosha-hiljennetyissä soluissa tapahtunut muutoksia fosfolipidien synteesireittien entsyymien ekspressiossa. Samalla tavalla tutkittiin myös keskeisten fosfolipaasien ekspressiotasoja. Lisäksi tutkittiin, miten eksogeeniset fosfolipidit vaikuttavat fosfolipaasien ja synteettisten entsyymien toimintaan.

Western blot-menetelmällä tutkittiin yhteensä yhdeksän eri entsyymin ilmenemistasot. Dicer- ja Drosha- hiljennetyissä soluissa yhden synteettisen entsyymin, fosfokoliinisytydylyylitransferaasin (CT), ekspressio kohosi merkittävästi. Fosfatidylyletanoliamiinin synteesireitillä vastaavan entsyymin, fosfoetanoliiniinisytydylyylitransferaasin (ET), ekspressio oli kohonnut yhdessä kokeessa, mutta tulos ei toistunut muissa kokeissa. Minkään muun entsyymin kohdalla ekspressiotasoissa ei havaittu muutoksia.

Eksogeenisistä lipideistä fosfatidyyliseriinin (PS) havaittiin vaikuttavan solukalvon fosfolipidihomeostasiaan. Kun solussa on ylimäärin PS:ää, CDP-etanoliamiinireitin entsyymien, etanoliamiinikinaasin (EK1) ja etanoliamiinisytydylyylitransferaasin (ET), ekspressio laskee. Tämän perusteella vaikuttaa siltä, että fosfatidylyletanoliamiinia (PE) tuotetaan tällöin ensisijaisesti dekarboksyloimalla PS:ää. Muilla eksogeenisillä lipideillä ei ollut vaikutusta synteettisiin entsyymeihin tai fosfolipaaseihin.

Fosfatidyyliseriinin latauksen vaikutus PE:n synteesiin on varmistettava toistamalla kokeet vielä uudelleen. On myös tutkittava kirjallisuudesta, onko joku muu tutkinut aihetta ja saanut samanlaisia tuloksia. Tutkittavaksi jää myös se, onko CT:n säätelyn takana miRNA vai johtuuko sen määrän lisääntyminen jostain muusta tekijästä.

Lähteet

- Aarnio, Noora. 2013. Fosfokoliinisytidilyylitransferaasin mikro-RNA-välitteinen säätely ja sen osallisuus nisäkässolujen fosfolipidihomeostaasin ylläpidossa. *Insinööriyö Metropolia Ammattikorkeakoulu*.
- Arya, Mani, Shergill, Iqbal S., Williamson, Magali, Gommersall, Lyndon, Arya, Neehar & Patel, Hitendra RH. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5(2), s. 209-219.
- Biocompare. 2012. WesternBright™ Quantum- Quantify Chemiluminescent Western Blots Over a Wide Dynamic Range. Verkkodokumentti. <http://www.biocompare.com/Application-Notes/43643-WesternBright-Quantum-Quantify-Chemiluminescent-Western-Blots-Over-a-Wide-Dynamic-Range/> Luettu 5.4.2013
- Bio-Rad Laboratories. Instruction Manual Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards. Verkkodokumentti. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10008761B.pdf> Luettu 5.4.2013.
- Bommer, Guido T. & MacDougald, Ormond A. 2011. Regulation of lipid homeostasis by the bifunctional *SREBF2-miR33a* locus. *Cell Metabolism*, s. 241-247.
- Cedars, Ari, Jenkins, Christopher M., Manusco, David J. & Gross, Richard W. 2009. Calcium Independent Phospholipases in the Heart: Mediators of Cellular Signaling, Bioenergetics and Ischemia-induced Electrophysiologic Dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 53(4), s. 277-289.
- Chemistry. 2001. SDS-Page Gel Electrophoresis. Verkkodokumentti. http://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html. Luettu 8.4.2013
- Davis-Dusenbury, Brandi N. & Hata, Akiko. 2010. Mechanisms of control of microRNAs biogenesis. *The Journal of Biochemistry* 148 (4), s. 381-392.
- DC Protein Assay Instruction Manual. Bio-rad. Ohjekirja s. 1-3.
- Ebert, Margaret S., Neilson, Joel R. & Sharp, Phillip A. 2007. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nature methods*, vol 4 no 9, 2007, s. 721-726.
- Fernández-Hernando, Carlos & Moore, Cathryn J. 2011. MicroRNA Modulation of Cholesterol Homeostasis. *Atherosclerosis, Thrombosis. and Vascular Biology* 31/2011, s. 2378-2382.
- Fernández-Hernando, Carlos, Suarez, Yajaira, Rayner, Katey J. & Moore, Cathryn J. 2011. MicroRNAs in lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology* 2011, s. 86-92.
- Gibellini, Federica & Smith, Terry K. 2010. The Kennedy Pathway-*De Novo* Synthesis of phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine. *Life* 62/6, s.414-428.

Glynn, Paul. 2005. Neuropathy target esterase and phospholipid deacylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1736 (2005), s. 87-93.

Hermansson, Martin, Hokynar, Kati & Somerharju, Pentti. 2011. Mechanisms of glycerophospholipid homeostasis in mammalian cells. *Progress in Lipid Research* 50 (2011), s. 240-257.

Kainu, Ville, Hermansson, Martin & Somerharju, Pentti. 2008. Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Exogenous Heavy Isotope-labeled Lipid Species Provide Detailed Information on Aminophospholipid Acyl Chain Remodeling. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 283, no. 6, s. 3676-3687.

Kelly, Karen & Jacobs, René. 2011. Phospholipid biosynthesis. Verkkodokumentti. <http://lipidlibrary.aocs.org/animbio/phospholipids/index.htm>. Luettu 16.2.2013.

Kim, V. Narry. 2005. MicroRNA Biogenesis: Coordinate Cropping and Dicing. *Molecular Cell Biology* 6/2005, s 376-385

Labome Protein Quantitation. 2013. Lowry Protein Assay (Rnage 10-1000 ug/ml). Verkkodokumentti. <http://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html>. Luettu 8.4.2013

Lynn, Francis C. 2009. Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism. *Cell Press* 09/2009, s. 452-459.

Moore, Kathryn J., Rayner, Katey J., Suarez, Yajaira & Fernandez-Hernando, Carlos. 2010. microRNAs and cholesterol metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 12/2010, s. 699-706.

Pillai, Ramesh S. 2005. MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* volume 11, number 12, 2005, s. 1752-1761.

Rossner, Mike & Yamada, Kenneth M. 2004. What's in a picture? The temptation of image manipulation. *The Journal of Cell Biology*, vol 166 nro 1, s. 11-15.

Sacco, Jeniffer & Adeli, Khosrow. 2012. MicroRNAs: emerging roles in lipid and lipoprotein metabolism. *Current Opinion in Lipidology* volume 23, number 3, 2012, s. 220-225.

Sheenan, David. 2009. *Physical Biochemistry: Principals and Applications*. Wiley-Blackwell 2009.

Soininen, Tiina. 2010. Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR (qPCR). Opetusmateriaali. Metropolia Ammattikorkeakoulu.

Sugimoto, Hiroyuki, Banchio, Claudia & Vance, Dennis E. 2008. Transcriptional regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Progress in Lipid Research* 47 (2008), s. 204-220.

TGR BioSciences. A431 cells. Verkkosokumentti. <http://www.tgrbio.com/cancer-cell-lines-primary-cell-cultures/cell-models-a431-cells.html>. Luettu 17.4.2013

ThomasNet/News. 2002. Membrane Sandwiches make western blotting easier. Verkkodokumentti. <http://news.thomasnet.com/fullstory/Membrane-Sandwiches-make-western-blotting-easier-13151> Luettu 5.4.2013

Vance, Jean E. & Vance, Dennis E. 2004. Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochemical Cell Biology* 82, s. 113-128.

Virtuaalinen laboratorio-opas. 2005. Laitteistot ja menetelmät > Reaktion seuranta > MS. Orgaanisen kemian laboratorio-opas. Verkkodokumentti. <http://virtuaali.tkk.fi/organinenkemia/labrapas/metelmät/reakseuranta/MS/MS.htm>. Luettu 25.3.2013

Westholm, Jacob O. & Lai, Eric C. 2011. Mirtrons: microRNAs biogenesis via splicing. *Biochimie* 93 (2011), s. 1897-1904.

Vesikkeleiden koostumus

Taulukossa 1 on vesikkeleiden koostumus, jotka on ladattu soluihin. Soluja inkuboitiin vesikkeleiden kanssa 6 h.

Taulukko 1. Soluihin ladattujen vesikkeleiden koostumukset

| PS-vesikkelit | nmol | mM | ul/malja | > 6 maljaa |
|---------------|------|------|----------|---------------|
| Di20:1-PC | 350 | 12 | 29,2 | 175,2 |
| Di16:1-PS | 100 | 7,11 | 14,1 | 84,6 |
| POPG | 50 | 3,13 | 16 | 96 |
| Kolesteroli | 500 | 2,59 | 19,3 | 115,8 |

| PC-vesikkelit | nmol | mM | ul/malja | > 6 maljaa |
|---------------|------|------|----------|---------------|
| Di20:1-PC | 350 | 12 | 29,2 | 175,2 |
| Di16:1-PC | 100 | 7,11 | 14,1 | 84,6 |
| POPG | 50 | 3,13 | 16 | 96 |
| Kolesteroli | 500 | 2,59 | 19,3 | 115,8 |

| PE-vesikkelit | nmol | mM | ul/malja | > 6 maljaa |
|---------------|------|------|----------|---------------|
| Di20:1-PC | 350 | 12 | 29,2 | 175,2 |
| Di16:1-PE | 100 | 7,11 | 14,1 | 84,6 |
| POPG | 50 | 3,13 | 16 | 96 |
| Kolesteroli | 500 | 2,59 | 19,3 | 115,8 |

| CTRL-vesikkelit | nmol | mM | ul/malja | > 6 maljaa |
|-----------------|------|------|----------|---------------|
| Di20:1-PC | 350 | 12 | 2,92 | 175 |
| POPG | 50 | 3,13 | 16 | 95,8 |
| Kolesteroli | 500 | 2,59 | 19,3 | 115,8 |

Ensimmäisissä kokeissa käytettiin vesikkeleitä, joissa oli POPC:tä, kolesterolia ja isotooppileimattuja di16:1-PC:tä tai di16:1-PE:tä. Näiden kontrollivesikkeleissä oli pelkästään POPC:a ja kolesterolia.

10 % SDS-PAGE -geelien valmistus

Valmista alageeli (4,1 ml millipore-vesi, 3,3 ml 30 % Akryyliamidi/Bis, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 100 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % APS, 5 µl temed). Vala alageeli geelikelkkaan lasien väliin ja jätä hiukan tilaa ylägeelille (konsentroitigeeli).

Täytä alageelin päälle jäänyt tila vedellä, jotta geelin pinnasta tulee tasinen, eikä siihen jää ilmakuplia.

Anna alageelin jähmettyä noin 30 minuuttia.

Imeytä alageelin päälle pipetoitu vesi imupaperiin.

Valmista ylägeeli (2,4 ml millipore-vesi, 528 µl 30 % akryyliamidi/Bis, 1000 µl 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 40 µl 10 % SDS, 20 µl 10 % APS, 4 µl temed) ja pipetoi se alageelin päälle. Laita kammat nestemäiseen ylägeeliin ja anna jähmettyä.