

Antipsykoottisen lääkkeen pitkäaikaiset vaikutukset
rotan etuivokuorella DNA-sirumenetelmällä tutkittuna

Juha Eljas A. Knuutila
Pro gradu –tutkielma
Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Joulukuussa 2005

ALKUSANAT

Pro gradu –tutkielman työosa on suoritettu A. I. Virtanen instituutissa Kuopiossa kesällä 2001 professori Eero Castrénin laboratoriossa. Data-analyysiin palattiin vuonna 2005, jolloin analyysimenetelmät olivat kehittyneet huomattavasti sitten vuoden 2001. Työskentelyäni kesällä 2001 ohjasi vielä silloinen filosofian maisteri Outi Kontkanen, jonka oman väitöskirjatyön jatkoa kyseinen projekti on. Kiitokset Outille opastuksesta laboratoriotyöskentelyyn. Sain paljon hyviä eväitä tieteen tekemiseen. Kaikille muillekin laboratorion ihmisille lämpimät kiitokset.

Kiitos myös Eero Castrénille, joka on jaksanut luottaa siihen, että saan tämän työselostuksen ennen pitkään kirjoitettua. Kiitoksia myös siitä, että olen päässyt tutustumaan neurobiologiaan. Joskin aluksi oli vain sattumaa, että työhöni liittyi nerobiologiaa on siitä sittemmin tullut minulle innoituksen lähde tehdä tiedettä.

Kiitokset Sigrid Jusélius säätiölle projektin rahoittamisesta.

A. I. Virtanen instituutin ilmapiiriä on mukava muistella ja olen onnellinen siitä, että sain viettää elämästäni muutaman vuoden Kuopiossa mukavien ihmisten keskellä. Erityisesti mielessä ovat aurinkoiset kesät ja Neulamäen mäkikin muistuu jo kultaisena mieleen.

Vanhemmille kiitokset kannustuksesta eteenpäin – ilman sitä urakka olisi tuntunut suuremmalta.

Tekijä: Juha Eljas A. Knuutila
Tutkielman nimi: Antipsykoottisen lääkkeen pitkäaikaiset vaikutukset rotan etuaivokuorella DNA-sirumenetelmällä tutkittuna
English title: Long term effects of antipsychotic drug in rat prefrontal cortex: A microarray study
Päivämäärä: 23.12.2005 **Sivumäärä:** 64 + 6
Laitos: Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine: Molekyylibiologia
Tutkielman ohjaaja: Eero Castrén

Tiivistelmä:

Tässä tutkimuksessa selvitetään antipsykoottisen lääkeaineen vaikutusta rotan etuaivokuorikudoksessa tapahtuvaan geenien ilmentymiseen DNA-sirumenetelmällä. Geenien ilmentymistutkimuksen eri vaiheet kokeen lähtökohdista tulosten tulkittamiseen selostetaan molekyylibiologista taustaa vasten.

Työn tarkoituksena oli saada selville millaisia prosesseja soluissa aktivoituu tai kytkeytyy pois päältä lääkeaineen vaikutuksesta ja näin ymmärtää paremmin lääkkeen vaikutusmekanismeja. Tällainen informaatio on arvokasta kehiteltäessä tehokkaampaa ja nopeampaa hoitoa. Yleisemmällä tasolla tässä työssä myös testataan menetelmän soveltuvuutta neurobiologiseen tutkimukseen.

Vertaamalla *in vivo* lääkeainekäsiteltyjä eläimiä verrokkiryhmään saamme selville geenien suhteellisen ilmentymisen erilaisissa tilanteissa. Kokeessa käytettiin kahdeksan rottaa, joista neljälle annettiin päivittäin kolmen viikon ajan klotsapiinia (antipsykoottinen lääke) ja neljälle kontrolli rotalle annettiin vastaavasti fysiologista suolaliuosta. Eläimet lopetettiin ja etuaivokuori leikattiin RNA-eristystä varten. Näytteet analysoitiin DNA-sirumenetelmällä mahdollisten geenien ilmentymismuutosten havaitsemiseksi. DNA-sirudatasta etsittiin funktionaalisia luokkia, joihin kuuluvien geenien ilmenemisessä olisi tapahtunut muutoksia.

Aineistosta tuli esille useita mielenkiintoisia geeniryhmiä, jotka ovat yhdensuuntaisia muihin tutkimuksiin antipsykoottisten lääkkeiden kanssa. Mm. kalsiumin signalointireitin, MAP-kinaasi signalointireitin, sekä Wnt-signalointireitin geeneissä havaittiin mahdollisia muutoksia. Lisäksi muutamia yksittäisiä geenejä nousi esille, jotka ovat relevantteja kyseisessä tutkimuksessa. Tällaisia olivat mm. dopamiinireseptorit ja synaptiset proteiinit.

DNA-sirutekniikalla saadun aineiston tulkinta on haastavaa, joskin uudet työkalut auttavat erilaisten ilmiöiden havaitsemisessa aineistoista. Saadut tulokset kertovat menetelmän toimivuudesta, joskaan yksittäisen DNA-sirukokeen tuloksia ei voida pitää kiistattomina. Tulokset antavat hyvän lähtökohdan jatkotutkimuksille, joka tämän tyyppisen seulontamenetelmän funktio onkin.

Avainsanat: DNA-siru, antipsykoottiset lääkkeet, klotsapiini, skitsofrenia

Author: Juha Eljas A. Knuutila
Title of thesis: Long term effects of antipsychotic drug in rat prefrontal cortex:
A Microarray study
Finnish title: Antipsykoottisen lääkkeen pitkäaikaiset vaikutukset rotan etuivokuorella
DNA-sirumenetelmällä tutkittuna
Date: 23.12.2005 **Pages:** 64 + 6
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Molecular biology
Supervisor(s): Eero Castrén

Abstract:

This research is trying to elucidate the actions of antipsychotic drugs to gene expression in rat's prefrontal cortex using microarray chips. Gene expression study from its starting point to data-analysis is being reported in a context of molecular biology.

This kind of study can reveal what kinds of processes is activated or deactivated in cells by a drug. This helps to better understand how the drug is achieving its efficacy. This information can be valuable in the development of new drugs with more effective and faster acting features. In more general perspective the method's suitability for neurobiological research was evaluated.

By comparing *in vivo* treated animals to control animals we can gain information about the relative expression levels of genes in different conditions. Eight rats were used. Four rats were given clozapine, an antipsychotic drug, for three weeks and another four rats were given saline. Animals were sacrificed and prefrontal cortical area was dissected for RNA extraction. Samples were analyzed with microarray chips to find-out possible alterations in gene expression. Data was further analyzed to see if there would be any functional groups overrepresented among the genes that showed differential gene expression.

Data showed various interesting gene groups which are in agreement with other studies done in this field. For example calcium signaling, MAPK signaling and Wnt signaling showed potential modulation. Further more some relevant individual genes were detected as potentially differentially expressed. These include dopamine receptors and some synaptic proteins.

Microarray data analysis can be challenging although new tools can help in detecting various features from the data. Results are assuring that the method is valid. This data alone is not convincing but gives a good starting point for further studies – as it was intended.

Keywords: Microarray, antipsychotic drugs, clozapine, schizophrenia

SISÄLLYSLUETTELO

ALKUSANAT.....	2
PRO GRADU –TUTKIELMAN TIIVISTELMÄ.....	3
ABSTRACT OF MASTER’S THESIS.....	4
SISÄLLYSLUETTELO.....	5
LYHENTEET JA SANANSELITYKSIÄ.....	7
I. KOKO PERIMÄN LAAJUINEN GEENIEN ILMENTYMISTUTKIMUS NEUROBIOLOGIASSA.....	9
1 JOHDANTO.....	9
1.1 GEENIEN ILMENTYMINEN	10
1.2 SKITSOFRENIA	12
1.3 ANTIPSYKOOTTISET LÄÄKKEET	13
1.4 ELÄINMALLIT JA IHMISTUTKIMUS	14
2 DNA-SIRUTEKNIKASTA	15
2.1 PERIAATE	15
2.2 HISTORIA.....	17
2.3 DNA-SIRUTEKNIKAN KEHITYS	17
2.3.1 Yleistä	17
2.3.2 DNA-sirumenetelmän käytön yleisyydestä	18
2.3.3 DNA-sirukokeiden vertailukelpoisuudesta.....	19
2.4 DNA-SIRUMENETELMÄN TYYPIT	20
2.4.1 DNA-sirut, joissa käytetään in situ synteesiä.....	20
2.4.2 DNA-sirut, joissa käytetään valmiiksi syntetisoituja oligonukleotideja tai cDNA:ta	21
2.5 DNA-SIRUKOKEEN KOMPONENTIT.....	22
2.5.1 Alusta	22
2.5.2 Geenejä edustavat pitkät oligonukleotidit.....	23
2.5.3 RNA-näyte	24
2.5.4 Alukkeet cDNA:n valmistuksessa.....	25
2.5.5 Käänteiskopiointientsyymi.....	26
2.5.6 Fluoresoivat leimausmolekyylit	27
2.5.7 Kokeessa tarvittavat reagenssit ja välineet.....	28
2.5.7.1 Skanneri.....	28
2.6 DATA-ANALYYSISTÄ.....	29

II.	MATERIAALIT JA METODIT.....	30
3	KLOTSAPIINIKOKEEN VAIHEET	30
	3.1 LÄÄKEAINEKÄSITTELY.....	30
	3.2 LOPETUKSET JA ETUAIVOKUOREN DISSEKTIOT	31
	3.3 RIBONUKLEIINIHAAPON ERISTYS.....	32
	3.3.1 Eristysmenetelmän kuvaus.....	32
	3.3.2 RNA:n eristysprotokolla	33
	3.4 KOETTIMEN VALMISTUS	37
	3.5 HYBRIDISAATIO JA HUUHTELUT.....	41
	3.6 ILMENEMISTASOJEN LUKEMINEN JA MITTAUSARVOJEN NIMEÄMINEN	42
	3.7 DATA-ANALYYSI.....	43
	3.7.1 Normalisaatiot	43
	3.7.2 Geenilistojen tulkinta.....	43
	3.8 DNA-SIRUKOKEEN TEKNISEN ONNISTUMISEN ARVIOINTI.....	44
	3.8.1 Hajontakuviot	44
	3.8.2 DNA-sirukokeen laaduntarkkailu.....	47
4	TULOKSET: ANTIPSYKOOTTISEN LÄÄKKEEN PITKÄAIKAISET VAIKUTUKSET ROTAN ETUAIVOKUORELLA DNA-SIRUMENETELMÄLLÄ TUTKITTUNA	49
	4.1 YLEISTÄ	49
	4.1.1 Rikastuneet biokemialliset reitit (KEGG) säädeltyneiden geenien joukossa.....	51
5	TULOSTEN TARKASTELU	53
	5.1 RIKASTUNEISTA PROSESSEISTA.....	53
	5.1.1 MAP-kinaasi signalointireitti.....	54
	5.1.2 Kalsiumin signalointi.....	54
	5.1.3 Wnt-signalointireitti.....	54
	5.2 MUIDEN YKSITTÄISTEN GEENIEN MUUTOKSET KLOTSAPIINIKOKEESSA	55
	5.3 TULOSTEN VARMISTUKSESTA	56
	5.3.1 Entsyymiaktiivisuusmittaukset.....	57
	5.3.2 Proteiinin määrän mittaus	57
	5.3.3 Lähetti-RNA:n määrän mittaus	57
6	JOHTOPÄÄTÖKSET.....	59
	LÄHDELUETTELO.....	60
	LIITE 1: DNA-SIRUN TEKNISET TIEDOT	65
	LIITE 2. GEENILISTAT	67

LYHENTEET JA SANANSELITYKSIÄ

DNA	deoksiribonukleiinihappo
RNA.....	ribonukleiinihappo
EST.....	ilmenevän geenin osa (<i>expressed sequence tag</i>). Solun tietystä tilassa ilmenevän geenin satunnaisesti ja usein vain osittain sekvensoitu cDNA-kloon
hybridisaatio.....	komplementaaristen ja antiparalleelisten DNA tai RNA-juosteiden yhdistyminen
komplementaarinen	DNA-sekvensissä adenosiini on komplementaarinen tymidiinille ja guanosiini on komplementaarinen sytidiinille
antiparalleelinen	Vastakkaissuuntainen DNA-juoste; DNA-kaksoiskiarteessä juosteet ovat rakentuneet vastakkaisiin suuntiin
sekvenssi	tässä yhteydessä emäsjärjestys DNA tai RNA-juosteessa
dUTP.....	2'-deoksiuridiini 5'-trifosfaatti
aminoallyyli dUTP	5-[3-aminoallyyli]-2'-deoksiuridiini-5'-trifosfaatti
oligonukleotidi	korkeintaan muutamia kymmeniä emäksiä sisältävä DNA-sekvenssi
geeniontologia.....	geenien käsitteistö
antisense-juoste	geenille vastakkainen DNA-sekvenssi, joka toimii RNA:n mallina transkriptiossa
LD ₅₀	annosmäärä, jossa puolet aineelle altistuneet yksilöt menehtyvät
intraperitoneaalisesti.....	lääkeaineen vieminen elimistöön injektoimalla se vatsaonteloon
pelletti	koeputken pohjalle sedimentoitunut sakka
inkubaatio	haudottaminen, haudotus
DEPC.....	dietyylipyrokarbonaatti
AGPC protokolla.....	guanidiini-tiosyanaattihappo – fenoli – kloroformi RNA-eristysmenetelmää
ontologiatermi	käsite, jolla kuvataan mihin biologiseen prosessiin geeni kuuluu, mihin geenin tuote lokalisoituu solussa tai millaisia molekylaarisia funktiota geenin tuotteella on
kromatiini.....	kromosomien olomuoto interfaasissa eli siinä vaiheessa kun solussa tapahtuu aineenvaihduntaa ilman näkyviä merkkejä solujakaantumisesta; solun perintöaineksen (DNA) ja histoniproteiinien sisältämä tuman osa
transkriptio	RNA:n entsyymattainen synteesi DNA-mallin mukaan
genominen DNA	DNA, jonka on peräisin solun kromosomeista ei siis käänteiskopiointientsyymillä tuottamaa DNA-juostetta

blokkaus.....reaktiivisten ryhmien inaktivoiminen reagenssilla
täplätiettyä geeniä edustava alue DNA-sirun pinnalla, koostuu
DNA-juosteista, vastine englanninkieliselle sanalle *spot*

Tässä käytetty lähteenä mm. CSC - Tieteellinen laskenta Oy:n julkaisemaa Bioinformatiikan sanastoa (Heikkinen, E. ym., 2002) sekä Biologian sanakirjaa (Tirri, R. ym., 1995).

I. KOKO PERIMÄN LAAJUINEN GEENIEN ILMENTYMISTUTKIMUS NEUROBIOLOGIASSA

1 JOHDANTO

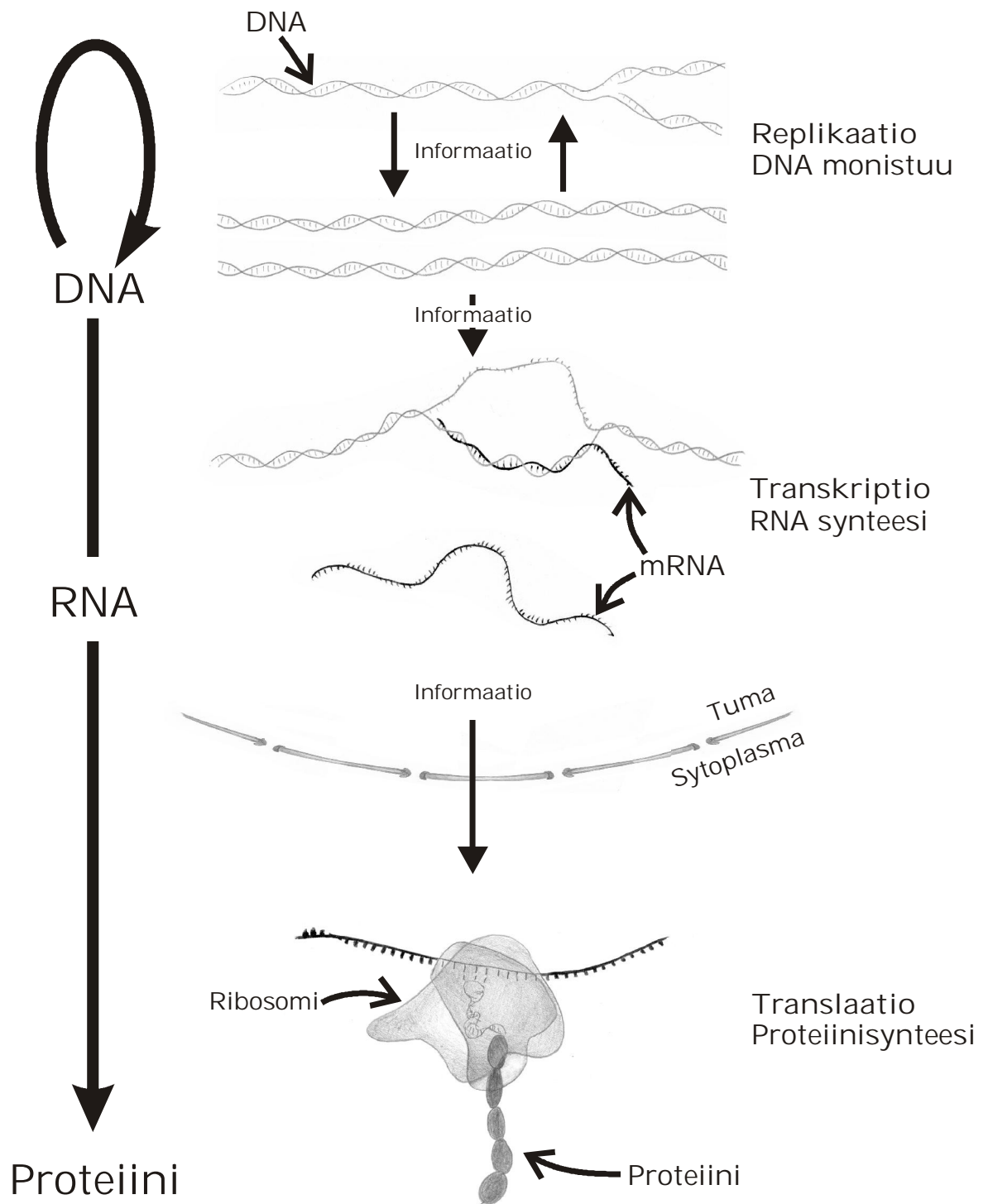
Kehittääksemme parempia hoitomuotoja hermostollisiin sairauksiin on meidän ymmärrettävä miten aivojen hermosolut toimivat ja miten signaalit välittyvät hermosolusta toiseen. Elimistömme solut reagoivat ulkopuolisiin ärsykkeisiin monin eri tavoin. Se, millaisia vasteita solu tuottaa erilaisille ärsykkeille, määräytyy solussa olevien komponenttien määrästä, laadusta ja sijainnista. Keskeisien komponenttien eli erilaisten katalyyttien määrää, laatua ja sijaintia ohjaa ulkoisiin signaaleihin mukautuen perimäaineen DNA-juosteessa oleva informaatio. Jokaisella geenillä on säätelytekijänsä ja DNA-juosteesta löytyy emäsparijärjestyksiä, joihin näillä säätelytekijöillä on tietty affiniteetti. DNA-juosteen luentaan vaikuttavat muutkin seikat kuin DNA-juosteen nukleotidisekvenssi, sillä myös kromatiinin rakenne ja solun jo sisältämät komponentit vaikuttavat perimäaineen luentaan. Tarkastelemalla millaisia muutoksia biokemiallisten prosessien aktiivisuudessa tapahtuu geenien ilmentymisen tasolla voimme saada vastauksia lääkkeiden vaikutusmekanismeihin, sekä lääkeaineen aiheuttamiin sivuvaikutuksiin ja näin luoda pohjaa uusien lääkeainemolekyylien löytymiselle (Gunther, E.C. ym., 2003).

Solujen biokemiallisissa reaktioissa aktiivisina komponentteina toimivat proteiinit ja tietyt ribonukleiinihappojuosteiden ja proteiinien kompleksit, joten kattavin kuva solun toiminnasta saataisiin määrittämällä sen sisältämien proteiinien ominaisuudet kuten lokalisaatio, aktiivisuus ja määrä. Tämä on kuitenkin käytettävissä olevilla menetelmillä vielä toistaiseksi varsin haastavaa ja vain erittäin pieni osa proteiineista pystytään

havaitsemaan (Choudhary, J., ja Grant, S.G., 2004). Tätä vastoin pystymme parhaimmassa tapauksessa mittaamaan geenien ilmenemistasoja, jopa vain yhdestä soluista eristetystä lähetti-RNA:sta käyttämällä molekyylibiologian perustekniikoita (Wagatsuma, A. ym., 2005).

1.1 Geenien ilmentyminen

Organismien jokainen tumallinen solu sisältää kopion koko genomista. Vain tietyt geenit ovat aktiivisia tiettyinä hetkinä tietyissä soluissa. Geenien aktiivisuus on tarkasti säädeltyä erilaisten palautejärjestelmien välityksellä, joiden signaalit saavat geenin transkription ribonukleiinihapoksi joko lisääntymään tai vähenemään. Solu on jatkuvassa vuorovaikutussuhteessa ympäristönsä kanssa, johon solu reagoi välittömästi jo solussa olevien aktiivisten molekyylien välityksellä. Solun toimintojen ylläpitämiseksi solu tarvitsee jatkuvasti uusia työkaluja aktiivisutensa menettäneiden työkalujen tilalle. Näiden työkalujen eli proteiinien ja tiettyjen ribonukleiinihappojuosteiden rakennusmallit löytyvät genomisen DNA:n emäsparijärjestyksestä. Solun täytyy jatkuvasti sopeutua ympäristöönsä ja solun ulkopuolisten olosuhteiden muutokset vaikuttavatkin solun sisäisiin toimintoihin. Erilaiset signaalinsiirtoketjut vievät informaatioita solun ulkopuolisesta tilanteesta solun sisälle ja osa signaaleista päättyy solun tumaan, josta käynnistyy transkriptiotekijöiden välityksellä geenien luenta. Lopputuotteena on uusia solun komponentteja, joiden avulla solu paremmin sopeutuu ympäristöönsä (ks. kuva 1).



Kuva 1
Molekyylibiologian keskusdogmi

Kaikilla ihmisillä on samat geenit perimässään. Meillä on kuitenkin geneettisiä eroja, jotka selittävät mm. hiustemme tai silmiemme värin. Samaiset geneettiset erot määrittelevät myös osan alttiudesta erilaisille sairauksille, kuten esimerkiksi monille neuropsykiatrisille

sairauksille. Osa geneettisistä eroista osuu genomisen DNA:n proteiinia koodaavalle alueelle. Tällaiset erot aiheuttavat itse geenin lopputuotteeseen eli proteiiniin eroavia ominaisuuksia. Suurempi osa biologisesta variaatiosta lajin sisällä selittyy kuitenkin geenien ilmentymismuutosten kautta (Wray, G.A. ym., 2003). Tässäkin tapauksessa muutokset ovat lähtöisin genomisen informaation variaatiosta. Mutaatiot, jotka sijoittuvat geenin säätelyalueelle, eivät muuta itse lopputuotetta vaan potentiaalisesti joko lisäävät tai vähentävät kyseisen geenin lopputuotteen määrää. Jos toisia geenejä säätelevän transkriptiotekijän määrässä tapahtuu kyseisiä muutoksia, ovat muutokset laajamittaisempia. Nämä seikat tekevät geenien ilmentymisen keskeiseksi tutkimuskohteeksi molekyylibiologiassa.

1.2 Skitsofrenia

Skitsofrenia on krooninen sairaus, jota sairastaa noin 1% ihmisistä ympäri maailmaa (Jablensky, A. ym., 1992). Joskin alempiakin (0,4 % riski sairastua koko elinaikana) yleisyyksiä on esitetty (Saha, S. ym., 2005). 82.5% skitsofrenia diagnooseista tehdään 15 – 35-vuotialle (Sartorius, N. ym., 1986). Alttius sairastua skitsofreniaan näyttäisi oleva perinnöllistä. Todennäköisyys sairastua skitsofreniaan jos identtisellä kaksoissisarella on todettu skitsofrenia on 83% (Cannon, T.D. ym., 1998). Monia kromosomaalisia alueita on yhdistetty sairauteen (Baron, M., 2001). Skitsofrenian tyypillisimpiä oireita ovat harha-aistimukset (hallusinaatiot), harhaluulot ja vainoharhaisuus (paranoia). Näiden ns. ”positiivisten” oireiden lisäksi potilailla on ”negatiivisia” oireita, kuten eristymistä omiin oloihin, tunnereaktioiden vaimentumista, autismia ja vähittäistä dementoitumista. Yleisemmällä tasolla voitaisiin vielä oireisiin lisätä ajattelun hajanaisuus ja toiminnan epätarkoituksenmukaisuus (Pelkonen, O., ja Ruskoaho, H., 1998).

1.3 Antipsykoottiset lääkkeet

Antipsykoottiset lääkkeet on löydetty sattumalta tutkittaessa vuonna 1947 mm. prometatsiinin vaikutusta leikkauspotilaiden stressiin, jolloin havaittiin että rauhoittavat ominaisuudet johtuvat jostain muustakin kuin lääkkeen väsyttävästä vaikutuksesta. Uusi antipsykoottinen lääke on ollut suurelta osalta vaikuttamassa siihen, että 50-luvulla mielisairaaloiden potilasmäärät laskivat rajusti.

Antipsykoottiset lääkkeet jaetaan kahteen päätyyppiin: klassisiin eli tyypillisiin ja uudempiin ns. atyyppisiin antipsykoottisiin lääkkeisiin. Atyyppisillä lääkkeillä (kuten tässä työssä käytetty klotsapiini) on tyypillisistä lääkkeistä poikkeavat affiniteetit erilaisiin reseptoreihin ja siten myös oletettavasti jossain määrin erilainen vaikutusmekanismi. Kaikki antipsykoottiset lääkkeet sitoutuvat dopamiinireseptoreihin (erityisesti D₂ reseptoriin), joskin eri lääkeaineilla on erilaisia affiniteetteja eri reseptorialatyyppeihin. Esimerkiksi klotsapiini kiinnittyy dopamiinireseptorien lisäksi myös serotoniinireseptoreihin ja sillä on erityinen affiniteetti D₄ dopamiinireseptoriin. Vaikutusmekanismi ei kuitenkaan voi kokonaisuudessaan olla pelkästään reseptoriin kiinnittymisessä, sillä vaikka lääkeaine pääsee aivoihin nopeasti (muutamassa minuutissa - muutamassa tunnissa) menee sairauden oireiden helpottumiseen useita viikkoja. (Pelkonen, O., ja Ruskoaho, H., 1998)

Antipsykoottisilla lääkkeillä on myös sivuvaikutuksia, jotka luonnollisesti vaikuttavat myös tässä työssä esiteltyyn kokeeseen ja etsittäessä lääkeaineen terapeuttisia vaikutuksia on myös pidettävä mielessä, että esiin voi tulla myös sivuvaikutusten syntymekanismit. Atyyppisten antipsykoottisten lääkkeiden vahvuutena on niiden vähäisemmät sivuvaikutukset. Esimerkiksi tardiivi dyskinesia (pakkoliikkeitä) on vakavin neurologinen haitta. Myös allergiset reaktiot ovat mahdollisia ja voivat johtaa jopa potilaan kuolemaan. (Pelkonen, O., ja Ruskoaho, H., 1998)

1.4 Eläinmallit ja ihmistutkimus

Skitsofreniaa sairastavilta henkilöiltä on mahdollista saada aivokudosnäyte vasta henkilön kuoltua. Lisäksi on vaikeaa koota joukkoa ihmisiä, joilla olisi yhtenevä sairaushistoria ja joita olisi hoidettu samoilla lääkkeillä. Alkoholien ja muiden nautintoaineiden käyttö saattaa myös hankaloittaa koeryhmän keräämistä. Skitsofreniaan altistavia geenejä on raportoitu useita (Harrison, P.J., ja Weinberger, D.R., 2005) ja onkin selvää että sairauden puhkeamisen taustalla on useita yhtä aikaa vaikuttavia geneettisiä tekijöitä, jotka vaikuttavat siihen miten aivojemme kehittyminen ja toiminta on yhteydessä ympäristötekijöihin. Tällaisen taudin mallintaminen eläimillä on vaikeaa ja kehitetyt mallit tarkastelevatkin sairautta usein vain yhden geneettisen tekijän perspektiivistä. Perinnöllisistä eroista eri skitsofreniapotilaiden välillä kertoo mm. se että eri potilailla on erilaisia vasteita eri antipsykoottisiin lääkkeisiin. Huolimatta ihmismateriaalilla työskentelyn hankaluudesta on onnistuttu löytämään skitsofreenikoilla poikkeavasti toimivia geenejä (Middleton, F.A. ym., 2005).

Koe-eläiminä käytettyjen eläinten geneettinen variaatio on saatu rajattua kapealle alueelle pitämällä eläinlinjaa sisäsiittoisena. Koe-eläinten elinolosuhteet on myös helppo vakioda ja kokeessa käytettävien eläinten määrän lisäyksellä voidaan tuoda tuloksiin tilastollista varmuutta.

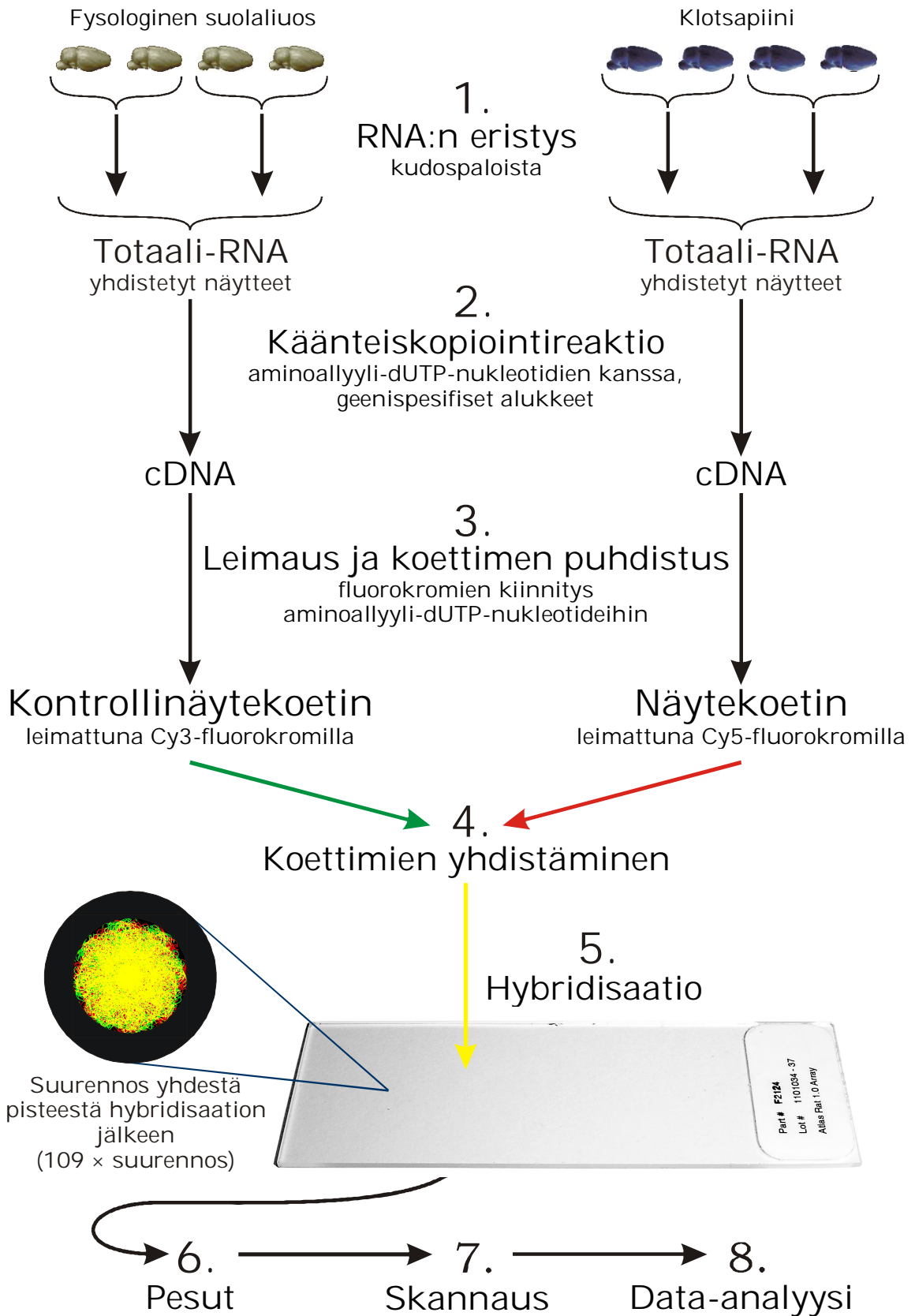
Skitsofrenialle ei ole yleisesti hyväksyttyä eläinmallia, joskin useita malleja on esitetty kirjallisuudessa.

2 DNA-SIRUTEKNIKASTA

2.1 Periaate

Ribonukleiinihappojuosteen (RNA-juoste) ja deoksiribonukleiinihappojuosteen (DNA-juosteen) (Watson, J.D., ja Crick, F.H., 1953) kemiallis-fysikaaliset ominaisuudet mahdollistavat niiden tutkimisen. Näiden molekyylien luontainen ominaisuus muodostaa vetysidosten välityksellä tietyissä olosuhteissa vakaita kaksoisjuosteita komplementaaristen ja antiparalleelisten sekvenssien välille (yhdistyminen, myöhemmin hybridisaatio) tekee niiden analysoimisesta varsin suoraviivaista. Hybridisaatioreaktiot ovat DNA-sirukokeen perusta.

Kiinteälle alustalle kiinnitetty komplementaarinen juoste (kohde, *target*) juoste pariutuu liuoksessa olevan fluorokromileimatun komplementaarisen juosteen kanssa (koetin, *probe*; näitä termejä käytetään toisinaan myös päinvastoin). Tässä työssä käytetyssä DNA-sirukokeessa alustalle kiinnitetylle komplementaariselle juosteelle voi hybridisoitua joko näytteestä peräisin oleva koetin tai kontrollikoetin. Se, kumpi näistä koettimista hybridisoituu todennäköisemmin ja runsaimmin kohteeseen, riippuu siitä, kumpaa koetinta reaktioseoksessa on enemmän. Jo hybridisoitunut kohde-koetin pari ei voi enää sitoa toista juostetta. Markkinoilla on DNA-siruja, joille on saatu mahtumaan mm. kaikkien tunnettujen hiiren geenien komplementaariset juosteet, jolloin yhdellä DNA-sirukokeella voimme periaatteessa saada geenien ilmentymisinformaatiota kaikista tunnetuista geneeistä, sekä myöskin niistä geneeistä, joita ei vielä ole määritelty tarkemmin, kuten esimerkiksi niin sanotuista EST geneeistä (Adams, M.D. ym., 1991). DNA-sirutekniikalla emme kuitenkaan pysty havaitsemaan niiden geenien aktiivisuustasoja, joiden ilmenemistasot ovat erittäin alhaisia.



Kuva 2

Kaksiväri- DNA-sirukokeen vaiheet klotsapiinikoikkeessa

2.2 Historia

DNA-sirukoe perustuu samoihin periaatteisiin, joita Edwin Mallor Southern käytti kehittäessään DNA-juosteiden määrittämiseen käytetyn Southern-blot menetelmän Oxfordin yliopistossa jo 70-luvulla (Southern, E.M., 1975). Hiukan myöhemmin kehitetyssä *dot blot* -hybridisaatiomenetelmässä, kuten myös DNA-sirukokeessa alustalle kiinnitetään DNA-juosteita, jotka toimivat materiaalin päälle esiteltävän liuoksen sisältämien komplementaaristen juosteiden pyydyksinä. Erona klassiseen *dot blot* -hybridisaatiokokeeseen on se, että DNA-sirukokeessa alustan tiettyihin kohtiin (täplät) kiinnitetään homogeenisiä sekvenssiltään tarkasti tunnettuja sekvenssejä ja täplän päälle esiteltävässä liuoksessa on tuntemattomat komponentit kun taas *dot blot* -menetelmässä tuntemattoman materiaalin päälle esitellään tunnettu koetin. Ensimmäisissä DNA-sirukokeissa käytettiin alustana nylon filttareita (termi siru ei tässä tapauksessa ole aivan täsmällinen). Seikka mikä tekee DNA-sirutekniikasta kiinnostavan analyysimenetelmän verrattuna aikaisempiin menetelmiin on lähinnä se, että lasialustalle on saatu mahtumaan tuhansia täpliä näin mahdollistaen rinnakkaisten analyysien teon yhdessä kokeessa. Lisäksi filtteripohjaisessa menetelmässä käytetyistä radioaktiivisista leimoista on siirrytty käyttämään erilaisia fluorokromeja, jotka mahdollistavat näytteen ja kontrollin analysoimisen samanaikaisesti. Ensimmäiset lasialustalle tehdyt DNA-sirut kehiteltiin 90-luvun alussa Patrick Brownin laboratoriossa Stanfordin yliopistossa (Schena, M. ym., 1995, Shalon, D. ym., 1996).

2.3 DNA-sirutekniikan kehitys

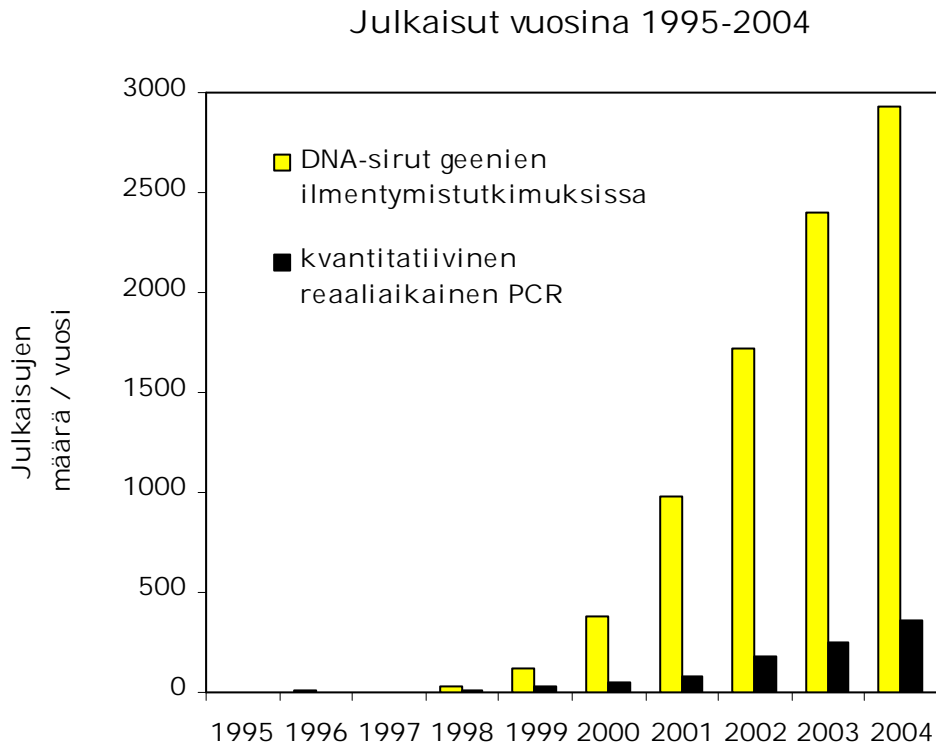
2.3.1 Yleistä

Geenien ilmentymistä on tutkittu DNA-sirutekniikalla jo noin kymmenen vuotta ja tässä ajassa menetelmä on kehittynyt merkittävästi ensimmäisistä DNA-sirukokeista. DNA-

sirujen valmistuksessa on päästy tasaisempaan laatuun ja sirujen suunnittelussa voidaan nykyään käyttää laajempaa tietämystä genomien rakenteesta ja yksittäisistä geeneistä. Uudet materiaalit, reaktioiden standardointi ja optimointi ovat myös vieneet menetelmää merkittävästi eteenpäin. DNA-sirumenetelmän lisäksi on kehitetty muita geenien ilmentymisen mittaamenetelmiä, jotka kuitenkin vaativat huomattavasti suuremman työmäärän geeniä kohden kuin DNA-sirumenetelmä ja näin lähinnä soveltuvatkin DNA-sirukokeiden mittaustulosten varmistamiseen yksittäisten geenien osalta.

2.3.2 DNA-sirumenetelmän käytön yleisyydestä

Artikkeleita, joissa mainitaan DNA-sirumenetelmä geenien ilmentymistutkimisen yhteydessä, on julkaistu vuodesta 1995 vuoteen 2004 jo 8581, joka kertoo menetelmän suosioista. Kuvassa 1 kuvattuna vuosittain julkaistujen artikkeleiden määrä. DNA-sirumenetelmää on käytetty myös mm. patogeenien havaitsemiseen ja määrittämiseen, genotyyppien määrittämiseen, sekvensointiin (esim. yhden emäksen monimuotoisuuden mittaaminen), DNA kopiomäärän määrittämiseen ja DNA - proteiini interaktioiden tutkimiseen.



Kuva 3

Julkaisujen määrä vuosittain, joissa mainitaan DNA-sirumenetelmä geenien ilmentymistutkimuksen yhteydessä. Vertailun vuoksi ohessa esitetty kvantitatiivisen reaaliaikaisen PCR menetelmän käyttö julkaisuissa (suhteellisen uusi yksittäisten geenien lähetti-RNA:n mittaamiseen käytetty menetelmä).

Hakusanalausekkeet, joita käytetty PubMed (Nimetön 2005) tietokannan hauissa:

("gene expression" OR "mRNA levels" OR "mRNA expression") AND (Microarray OR "DNA-array" OR "filter array" OR "cDNA array" OR "oligo array" OR Microarrays OR "DNA-arrays" OR "filter arrays" OR "cDNA arrays" OR "oligo arrays")

"quantitative real time pcr" OR "real time quantitative pcr" OR "RT-Q-PCR" OR "Q-RT-PCR"
NOT "quantitative reverse transcriptase" NOT competitive

2.3.3 DNA-sirukokeiden vertailukelpoisuudesta

Eri laboratorioissa ja eri DNA-sirutekniikoilla saatujen mittaustulosten vertailu on hankalaa osittain siitä syystä, että tarvittavaa informaatiota tietojen vertailuun ei aina ole saatavissa ja osittain siitä syystä, että pienetkin muutokset koasetelmissä aiheuttavat merkittäviä eroja mittaustuloksiin (Järvinen, A.K. ym., 2004, Wang, H. ym., 2005). Eri alustoilla samaa geeniä mittaava sekvenssi voi olla eri kohdasta lähetti-RNA-sekvenssiä, jolloin mm. vaihtoehdoisen pujonnan seurauksena saadaan poikkeavia tuloksia. On työlästä selvittää tarkalleen mitä kohtaa lähetti-RNA-sekvenssistä on käytetty pohjana suunniteltaessa sirulle kiinnitettäviä DNA-pyydyksiä, koska tämä informaatio ei ole välttämättä julkisesti saatavilla ja virheitäkin on myöhemmin tullut esille (Knight, J.,

2001). Esimerkiksi yksittäisten geenien osalta DNA-sirujen spesifikaatioissa on usein ongelmia annotoinnissa eli numeeristen mittausarvojen nimeämisessä edustamaan jotain tiettyä lähetti-RNA-populaatiota. Nykyisin on käytössä standardeja DNA-sirutulosten julkaisemisesta ja alustat ovat paremmin määriteltyjä. DNA-sirukokeen vähimmäistiedot (*Minimum information about a microarray experiment*, MIAME) määrittelevät seikkaperäisesti millainen informaatio on liitettävä DNA-sirudataan (Brazma, A. ym., 2001).

2.4 DNA-sirumenetelmän tyypit

Yleisesti ottaen DNA-sirut voidaan jakaa kahteen luokkaan, DNA-siruihin, joissa kohde sekvenssi rakennetaan alustalle *in situ* nukleotidi nukleotidiltä ja niihin, jossa valmis kohdesekvenssi applikoidaan alustalle täpliksi. Lisäksi eri valmistajilla on omat versionsa siitä minkä pituisia sekvenssejä laseille on kiinnitetty, minkä kokoisia täpliä ja millaisilla väleillä täplät sijaitsevat toisistaan. Seuraavassa käydään pääpiirteittäin läpi erilaiset sirutyypit.

2.4.1 DNA-sirut, joissa käytetään *in situ* synteesiä

Oligo array nimitystä käytetään tavallisesti DNA-siruista, joiden pinnalle kohdesekvenssi on rakennettu *in situ*, nukleotidi nukleotidiltä, joskin valmiita oligonukleotideja myös applikoidaan suoraan alustalle (ks. 2.4.2). Yleisemmin käytetään fotolitografista menetelmää (Fodor, S.P. ym., 1991), jossa valonsäteitä päästetään vain tiettyihin kohtiin alustaa. Toinen vaihtoehto on käyttää mikroskooppisen pieniä peilejä ohjaamaan valonsäteet tiettyihin kohtiin (Singh-Gasson, S. ym., 1999). Ainoastaan ne sekvenssit alustalla, jotka ovat altistuvat valolle voivat sitoa seuraavan nukleotidin päähänsä. Affymetrix valmistaa tällä hetkellä eniten käytettyä oligonukleotidi-sirutyyppeä nimeltä GeneChip (Golub, T.R. ym., 1999, Lockhart, D.J. ym., 1996), mutta markkinoilla on myös muita vaihtoehtoja kuten esimerkiksi NimbleGenin sirut (Nuwaysir, E.F. ym., 2002).

Etuna tässä menetelmässä on se, että ainakin periaatteessa tiedetään minkälaisia sekvenssejä mihinkin kohtaan alustaa tulee ja rinnakkaiset sekvenssipopulaatiot voivat olla hyvinkin lähellä toisiaan. Huonoina puolina tällaisessa menetelmässä on se, että näin saadaan suhteellisen luotettavasti aikaiseksi vain noin 25 nukleotidin mittaisia oligonukleotideja. Tätä pidempien sekvenssien tuottaminen aiheuttaa enenevässä määrin väärin nukleotidisekvenssien muodostumista. Niinpä näissä menetelmissä yhtä geeniä kohden alustalla onkin useita rinnakkaisia sekvenssejä 200-300 emäsparin suuruiselta alueelta geeniä (Affymetrix) (Lipshutz, R.J. ym., 1999). Valmistuskustannukset ovat kuitenkin verrattain suuria ja bioinformatiikka on varsin monimutkaista (Harbig, J. ym., 2005) käytettäessä useita sekvenssejä geeniä kohden.

2.4.2 DNA-sirut, joissa käytetään valmiiksi syntetisoituja oligonukleotideja tai cDNA:ta

Niin sanotulla spottaus-tekniikalla voidaan applikoida alustalle valmiiksi monistettuja ja puhdistettuja sekvenssejä (joko PCR monistettuja oligonukleotideja tai cDNA-sekvenssejä). Applikaatio voidaan tehdä kahdella eri tavalla. Toisessa tekniikassa kohde siirretään alustalle terävän neulan avulla, joka siis ensin kastetaan kohdesekvenssin sisältämään liukeseen ja sitten tarkasti viedään lasin pinnan välittömään läheisyyteen, jolloin negatiivisesti varautunut neste tarttuu kiinni lasiin. Toisessa tekniikassa (ink-jet) kohdesekvenssin sisältämä liuos suihkautetaan lasinpinnalle tarkkaan säädellyn neula-venttiilin läpi. Ensimmäisestä tekniikasta on olemassa myös versio, jossa neula kevyesti koskettaa alustan pintaa. Ongelmana näissä tekniikoissa on se, että painojälki vaihtelee hiukan lasista toiseen; Applikoitava neste saattaa kuivua liian nopeasti, alustassa olevat epätasaisuudet estävät tasaisen täplän muodostumisen, nesteessä olevan sekvenssin konsentraatio vaihtelee, epäpuhtauksia pääsee lasille tai nesteen määrä vaihtelee täplästä toiseen. Menetelmä on kuitenkin suhteellisen halpa verrattuna *in situ* synteisiin ja mahdollistaa tilausvalmisteisten DNA-sirujen tuotannon. Etuna tässä tekniikassa on myös se, että periaatteessa täplään saadaan homogeenistä sekvenssiä juuri oikean mittaisena. Tässä tekniikassa on myös mahdollista käyttää pidempiä sekvenssejä kuin *in situ* synteisissä, joka luonnollisesti parantaa hybridisaation spesifisyyttä. Täplä muodostuu kun lasin pinnalle applikoidaan pisara DNA-liuosta, joka sitten kuivuu lasinpinnalle, jolloin sekvenssit kiinnittyvät alustalle.

Markkinoille on tullut myös kolmas sirutyypin (Illuminan Sentrix[®] BeadChip) (Walt, D.R., 2000), jossa oligonukleotidisekvenssit esitellään alustalle pienien helmien (3 µm) pinnalle kovalenttisesti kiinnittyneinä. Eri sekvenssiä sisältävät helmipopulaatiot hakeutuvat pieniin riveissä oleviin kaivoihin satunnaisesti, jonka jälkeen määritetään kunkin sekvenssin sijainti sirulla niin sanotun osoite sekvenssin avulla. Kaivojen määrä tällä alustalla on saatu äärimmäisen suureksi, jolloin yhdelle sirulle saadaan mahtumaan useita itsenäisiä DNA-sirukokeita.

2.5 DNA-sirukokeen komponentit

DNA-sirukokeen komponentit poikkeavat toisistaan riippuen siitä millaista sirutyypin käytetään. Tässä kappaleessa on kuvattu klotsapiinikokeessa käytetyn kaksoisväri DNA-sirukokeen komponentteja. Komponentit ovat pääpiirteissään samanlaisia kuin useiden muiden DNA-siruvalmistajien tuotteet muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta.

2.5.1 Alusta

Mikroskooppilasi (75 × 25 × 1 mm) on ensin käsitelty aminoryhmän sisältävän trietoksysilaanin johdoksella. Tämän käsittelyn tarkoituksena on tehdä pinnasta positiivisesti varautunut, jolloin negatiivisesti varautunut kohdesekvenssi kiinnittyy siihen sähköstaattisesti sokeri-fosfaattirungostaan. Yksi näin pinnoitetun lasin ominaisuus on hydrofobisuus, joka mahdollistaa pienten täplien applikoimisen lasinpinnalle. Applikoidut lasit vielä blokataan taustan eliminoimiseksi fluoresenssimittauksessa.

Käytetyssä DNA-sirussa on 1090 erilaista rotan DNA-fragmenttia kiinnitettynä omille paikoilleen lasin pinnalle riveihin ja sarakkeisiin. Sirulla on yhteensä 24 alaruudukkoa, jotka muodostuvat jokainen 7 x 7 ruudukoista (49 täplää per ruudukko). Täplän koko on noin 200 µm ja täplien keskipisteiden välinen etäisyys on 600 µm. Sirulla on myös 29 täplää, joihin on applikoitu Cy3-värillä leimattua oligonukleotidia (nämä helpottavat navigointia sirun digitaalikuvassa), 24 täplää, joihin on applikoitu pelkkää puskuria,

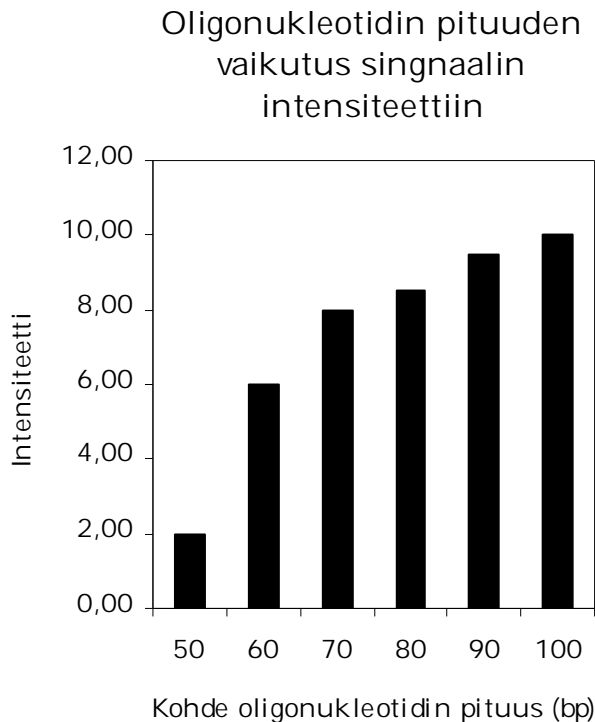
kahdeksan bakteriofagi λ DNA-sekvenssi kontrollitäplää (negatiivikontrolleina), cDNA-synteesikontrollitäplä, sekä leimausreaktiokontrollitäplä. Lisäksi 23 täplän paikkaa on tyhjiä. Yhteensä siis 1176 täplää on mahdutettu 2 x 3 cm kokoiselle alueelle.

2.5.2 Geenejä edustavat pitkät oligonukleotidit

Jokaista DNA-sirulla olevaa täplää varten syntetisoidaan tiettyä geeniä edustavaa sekvenssiä. Kyseisessä sirutyypissä tämä sekvenssi on identtinen pätkälle genomisen DNA:n (+)-juostetta (koodaava juoste, *sense strand*, *non-template strand*), joka on siten komplementaarinen lähetti-RNA:sta käänteiskopioidulle cDNA-sekvenssille.

Jotta saataisiin riittävästi materiaalia yksittäistä täplää varten, pitää applikoitavaa sekvenssiä monistaa. Tämä tehdään polymeerasiketjureaktiolla (PCR), jota on modifioitu niin että lopullisessa tuotteessa on lähinnä vain yksijuosteista koodaavaa juostetta vastaavaa sekvenssiä. Joissakin DNA-sirumenetelmissä käytetään myös tavallista kaksijuosteista PCR tuotetta, mutta yksijuosteisen DNA-fragmentin etuna on se, että näin täplässä on vain oikeata kohdesekvenssiä ja takaisinhybridisoituminen samassa täplässä olevan komplementaarisen juosteen kanssa on eliminoitu (Wei, Q. ym., 2004). Lisäksi monistettu sekvenssi on puhdistettava huolellisesti sillä jo 0,01 % kontaminaatio aiheuttaa epäspesifistä signaalia.

Valmiiden applikoitavien sekvenssien pituus on noin 80 nukleotidia, joista noin 70 nukleotidia vastaa geenin sekvenssiä. Jäljelle jäävät 12 nukleotidia ovat merkkisekvenssiä, joita valmistaja käyttää sekvenssin käsittelyssä mm. kontrollijuosteen (*antisense* juoste) valmistukseen. Lisäsekvenssi myös hiukan vahvistaa kohteen kiinnittymistä pinnoitettuun lasialustaan. Kohdesekvenssin nukleotideja ei tässä tapauksessa ole modifioitu millään tavalla, kuten joissain muissa DNA-sirutypeissa. Sirun valmistaja on näin pyrkinyt välttämään DNA-sirun enneaikaista vanhenemista johtuen modifioitujen sekvenssien epävakaudesta.



Kuva 4

Lähde: BD Atlas™ Ready-to-Print Long Oligos esite (2002)

Kun sekvenssi liuos applikoidaan lasille, kiinnittyy se elektrostaattisesti negatiivisesti varautuneesta sokeri-fosfaattirungostaan positiivisesti varautuneeseen aminoryhmään. Tällainen sidos ei kestä kovinkaan suuria lämpötiloja ja alhaisia suolakonsentraatioita, joka estää lasin uudelleen käytön useita hybridisaatiokokeita varten.

2.5.3 RNA-näyte

Yksittäisen DNA-sirun kustannus on siinä määrin suuri, että sirulle kannattaa hybridisoida vain parhaasta lähtömateriaalista valmistettu koetin, jonka biologinen tausta on pystytty kontrolloimaan mahdollisimman tarkkaan, jolloin käsittelyn aiheuttamat erot on huomattavasti helpompi erottaa biologisesta variaatiosta (Wei, C. ym., 2004). RNA-näytteen eristyksen ja itse kokeen suorittamisen väliin ei tulisi jättää pitkiä säilytysaikoja, sillä RNA-näyte hajoaa ajan myötä myös pakastettuna, joskin on olemassa menetelmiä, joilla saadaan RNA säilymään ehjänä pidempiäkin aikoja. Myös arkistoiduista parafiininäytteistä on tehty onnistuneita DNA-sirukokeita, joskin näissä tapauksissa varmasti osa informaatiosta on menetetty RNA:n hajoamisen vuoksi. Useissa DNA-

sirualustoissa on käytetty kohde sekvenssin suunnittelussa geenin 3' päätä, jolloin lähetti-RNA:n hajoaminen ei ole niinkään haitallista sillä pääsääntöisesti lähetti-RNA:n 5' pää pilkkoutuu ennen 3' päätä. DNA-sirukokeet ruumiinavausnäytteistä ovat osoittaneet, että vielä hyvinkin huonolaatuiseksi määritelty RNA-näyte on kelvollista DNA-sirukokeisiin (Lee, J. ym., 2005). RNA-molekyylien hajoaminen on kuitenkin sekvenssispesifistä, jolloin yhteistä puoliintumisvakiota ei voida määrittää. Noin puolella lähetti RNA-sekvensseistä on kuuden tunnin puoliintumisaika ja toisella puoliskolla noin 24 tuntia vastaten keskimääräistä solusykliä. Joissakin erilaistuneissa soluissa lähetti-RNA puoliintumisajat tietyille transkripteille voivat olla tätäkin huomattavasti pidempiä.

Koettimen valmistuksessa voidaan lähteä joko totaali-RNA näytteestä tai lähetti-RNA näytteestä jossa lähetti-RNA on puhdistettu muista RNA-populaatioista poly(A)-hännän perusteella. Käytettäessä totaali-RNA-näytettä koettimen valmistuksessa tulee muistaa, että suurin osa RNA:sta on ribosomaalista-RNA:ta ja vain noin 1-3 % totaali-RNA:sta on lähetti-RNA:ta.

RNA:n puhdistuksen yhteydessä näytteeseen voi jäädä jäämiä käytetyistä reagensseista, jotka saattavat häiritä cDNA-synteesiä. Tämän vuoksi on suositeltavaa, että RNA-näytteen konsentraatio on mahdollisimman suuri, jolloin pystytään minimoimaan näiden reagenssien pääsy seuraaviin vaiheisiin. Ylimääräiset presipitaatiot on kuitenkin syytä jättää väliin elleivät ole aivan välttämättömiä, sillä RNA:n käsittely aina jonkin verran hajottaa sitä. RNA-näytteiden käsittely kontrollista ja näytteestä tulisi olla täysin identtinen. Parhain tulos saadaankin valmistamalla näytteet rinnakkain.

2.5.4 Alukkeet cDNA:n valmistuksessa

cDNA:n valmistus RNA:sta voidaan tehdä käyttäen joko geenispesifisiä alukkeita, kuuden nukleotidin mittaisia satunnaissekvessejä tai poly(T) alukkeita. Tässä työssä on käytetty geenispesifisiä alukkeita. Jokaista lasille kiinnitettyä kohdesekvenssiä vastaavaa aluketta lisätään cDNA-synteesireaktioon. Tällainen menettely minimoi hybridisaatioliuoksesta ylimääräisiä cDNA-sekvenssejä, joille ei löydy komplementaarista sekvenssiä lasilta. Näin vältetään jossain määrin väärin sekvenssien hybridisoitumiselta lasille.

Jos DNA-sirulla olevat koettimet on suunniteltu geenin 3' päähän, on poly(T) alukkeet vartenotettava vaihtoehto. Jos kuitenkin jatkossa on tarkoitus käyttää samaa materiaalia esimerkiksi kvantitatiivisessa PCR menetelmässä on satunnaissekvenssien käyttö perusteltua sillä usein joudutaan suunnittelemaan PCR:n alukeparit hyvinkin kauaksi 3' päästä, jolloin mahdollisuus oikean templaatin läsnäoloon kasvaa käytettäessä alukkeita, jotka aloittavat käänteiskopioinnin monista eri kohdista lähetti-RNA-sekvenssiä.

2.5.5 Käänteiskopiointientsyymi

Käänteiskopiointi on retrovirusten käyttämä menetelmä, jossa viruksen perintöaineksen sisältämä RNA-sekvenssi kopioidaan DNA:ksi. Muodostunut DNA-sekvenssi toimii sitten templaattina lähetti-RNA-synteesille, joka tuottaa viruksen tarvitsemia proteiineja. Muodostunut DNA-sekvenssi voi myös inkorporoitua genomiseen DNA:han, jolloin siitä tulee osa solun perimää.

Useiden eri viruksien käänteiskopiointi entsyymit on kloonattu ja niitä pystytään tuottamaan erilaisissa isäntä organismeissa. Tässä työssä käytetty MMLV (Gerard, G.F. ym., 1997) (*Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*) on tuotettu *Escherichia coli* bakteerissa, joka kantaa MMLV entsyymiä koodaavaa geeniä plasmidissaan. Markkinoilla on myös geneettisesti muunneltuja käänteiskopiointientsyymejä, jotka paremmin pystyvät kopioimaan lähetti-RNA:n cDNA:ksi. Esimerkiksi toleranssia RNA:n sekundäärirakenteen suhteen on saatu parannettua. RNA:n silmukkarakenteet voivat estää käänteiskopiointientsyymien etenemisen, jolloin tuloksena on vain pätkä halutusta cDNA-sekvenssistä (Brooks, E.M. ym., 1995). MMLV entsyymiä käytettäessä lämpötila ei voi olla kovinkaan korkea, koska entsyymi menettää aktiivisuutensa korotetuissa lämpötiloissa, kun taas esimerkiksi paranneltu linnun myeloblastoosi viruksen käänteiskopiointientsyymi (*enhanced avian myeloblastosis virus RT-enzyme*, Sigma-Aldrich) säilyttää toimintakykyään vielä +65°C asteessa.

Käänteiskopiointientsyymi käyttää templaattinaan yksijuosteista-RNA-molekyyliä ja luettuaan yhden molekyylin on se vapaa kääntämään toisen molekyylin cDNA:ksi. Näin reaktion edetessä tapahtuu lineaarista monistusta. Käänteiskopiointi on kuitenkin jossain määrin sekvenssispesifistä, jolloin joidenkin geenien mittauksissa on tyytyminen pienempään materiaalmäärään, joka aiheuttaa hiljaisilla geneilla mittaus epätarkkuutta.

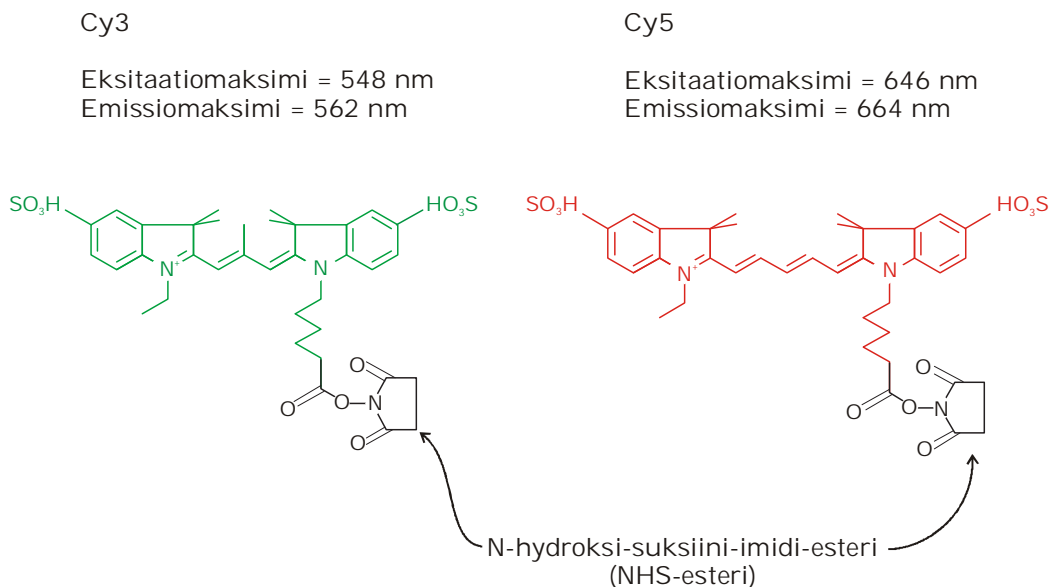
2.5.6 Fluoresoivat leimausmolekyylit

Hybridisoitu siru tulee skannata mahdollisimman pian, koska fluorokromit eivät kestä pitkiä säilytysaikoja ja ovat herkkiä mm. hapelle (Fare, T.L. ym., 2003). Fluorokromit myös himmenevät valon vaikutuksesta, jolloin jokaisen skannauksen yhteydessä osa signaalista menetetään.

Koska testinäytteen ja kontrollinäytteen leimauksessa käytetyt fluorokromit poikkeavat jonkin verran ominaisuuksiltaan, hajontakuvio painottunut johonkin suuntaan (katso kuva 9 sivulla 46; punaiset pistepilvet).

Fluoresoivien molekyylien ollessa pakkautuneena tiiviisti, perustilassa oleva fluorokromi voi vastaanottaa virittyneen molekyylin energian, jolloin energia ei vapaudu fluoresenssin muodossa eli fluoresenssi pienenee. Tästä ilmiöstä johtuen hybridisoituneen materiaalin määrä ei aivan ole suoraan verrannollinen fluoresenssin määrään kirkkaimmilla täplillä.

Leimausmolekyylin tulee olla aktivoitu eli siinä pitää olla N-hydroksi-suksiini-imidi-esteri-ryhmä, joka leimausreaktiossa korvautuu näytteen aminoryhmällä (substituutioreaktio: katso kuva 8 sivulla 39).



Kuva 5

Aktivoidut Cy3 ja Cy5 väriaine molekyylit.

2.5.7 Kokeessa tarvittavat reagenssit ja välineet

Suurin osa DNA-sirujen valmistajista myy sirujen mukana kaikki koettimen valmistuksessa tarvittavat reagenssit (poislukien RNA:n eristyksessä tarvittavat materiaalit), jotka on optimoitu toimimaan käsillä olevan tuotteen kanssa. Tässä tapauksessa väriaineet (fluorokromit) oli hankittava erikseen. Suurin osa reagensseista löytyy tavallisesta molekyylibiologian laboratoriosta. Ainoa laite, joka poikkeaa tavallisen laboratorion välineistöstä on konfokaalifluoresenssiskanneri, jolla hybridisoidut lasit luetaan. Tarvittavat välineet ja reagenssit on varattava ja järjestettävä niin että koettimen valmistuksessa ja hybridisaatiossa ei pääse tapahtumaan poikkeuksia. Kontrolli ja näyte on käsiteltävä rinnakkain teknisen variaation minimoimiseksi.

2.5.7.1 Skanneri

Tässä työssä on käytetty *ScanArray5000 Microarray Scanning Equipment* laitteistoa (GSI Lumonics / PerkinElmer, Wellesley, Massachusetts, Yhdysvallat):

ScanArray5000 on skannaava laser konfokaalimikroskooppi, jolla voidaan mitata fluoresenssi voimakkuuksia DNA-sirun pinnalta. Skannauksen lopputuloksena on digitaalinen kuva DNA-sirusta, jonka kuvapistet kuvaavat fluoresenssi-intensiteettejä DNA-sirulla. Skannerin pääkomponentit ovat: eksitaatiolähde, emissio-optiikka, valonmonistusputki, sekä näytelasin siirtomekanismi. Eksitaatiolähteenä on useita lasereita eli aallonpituuksille varustettuna säteen tarkennusoptiikalla, sulkimilla, sekä tarvittavilla suodattimilla. Optiikka pysyy paikallaan ja lasia siirretään alustan päällä skannauksen edetessä. Alusta liikkuu myös ylös ja alas, jotta lasin pinta saataisiin oikeaan tarkennussyvyyteen. Emissio-optiikka kerää emittoituvan fluoresenssin valonmonistusputkelle päästäen läpi vain halutut valonaallonpituudet. Ilmaisimena käytetty valonmonistusputki muuttaa emissio säteilyn jännitteeksi, jota voimistetaan ja määrä rekisteröidään numeeriseen muotoon esitettäväksi kaksiulotteisena karttana (digitaalikuvana).

2.6 Data-analyysistä

DNA-siruilla saadaan valtava määrä eri geenien ilmentymistaso mittauksia lyhyessä ajassa ja tämä asettaakin erityisiä haasteita merkittävän informaation seulomiseen. Kokeita on toistettava ja DNA-siruista saatuja tuloksia on varmennettava riippumattomilla menetelmillä. Mittaustuloksissa havaittu niin biologinen varianssi kuin myös tekniikasta aiheutuva varianssi on johtanut aineiston analysointi menetelmien huikeaan kehitykseen sitten ensimmäisten DNA-sirukokeiden. Lisäksi viimeisen kymmenen vuoden aikana on tietomme eri geenien sekvensseistä ja niiden funktiosta on parantunut huomattavasti, joskin kehitettävää riittää vielä vuosikymmeniksi eteenpäin. Perinteiset tilastolliset menetelmät eivät välttämättä sellaisenaan sovellu DNA-siruaineiston analysoimiseen tai ainakaan perinteiset menetelmät eivät pysty hyödyntämään yhä syventyvää tietämystä perintöaineksemme toiminnasta. Mittaustulosten automaattinen luokittelu perustuen yksittäisten geenien samankaltaiseen käyttäytymiseen ja näiden luokkien vertaaminen ennalta tiedettyyn informaatioon geenien toiminnasta on tehokas keino seuloa merkittävä informaatio usein vajavaisesta mittausaineistosta. Vaikka mittaustuloksia saadaan yksittäisestä kokeesta hyvinkin paljon niin usein kuitenkin yksittäiselle geenille mittausten toistot jäävät vähäisiksi. DNA-siruille on kuitenkin saatu mahtumaan useita edustajia geneistä, jotka toimivat samoissa prosesseissa ja näin ollen tarkastelemalla prosessiin liittyvien geenien keskimääräistä käyttäytymistä erilaisissa tilanteissa voidaan saada lisävarmistusta muutosten laadulle.

Materiaalit ja metodit osuudessa (kappaleessa 3.7 sivulla 43) on kuvattu data-analyysiä yksityiskohtaisemmin.

II. MATERIAALIT JA METODIT

3 KLOTSAPIINIKOKEEN VAIHEET

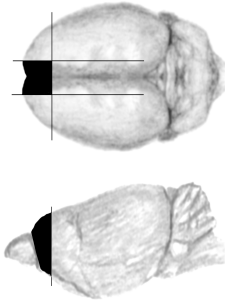
3.1 Lääkeainekäsittely

Kokeessa käytettiin täysikasvuisia koirasrottia (*Rattus norvegicus*, paino: ~227 g, linja: Wistar, väri: valkoinen/albiino). Kokeen alussa eläimet olivat 19 viikon ikäisiä. Neljälle rotalle annettiin päivittäin seitsemäntoista päivän ajan (aamupäivästä ennen kello kymmentä) intraperitoneaalisesti pistos klotsapiinia (Ampulli, *Leponex*, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Saksa). Neljälle kontrollirotalle annettiin vastaavasti päivittäin pistos fysiologista suolaliuosta. Injektoidun nesteen tilavuus oli keskimäärin 208 µl (25 mg/ml) riippuen yksilön painosta. Painoa tarkkailtiin, jonka perusteella lääkeannos määriteltiin 25 milligrammaan rotan painokiloa kohden (25 mg/kg). Paino kasvoi kontrollieläimillä keskimäärin kokeen aikana 66,0 grammaa kun taas klotsapiinia saaneet rotat kasvoivat vain 10,3 grammaa, joka saattaa kertoa lääkeainekäsiteltyjen eläinten lievistä ruokahaluttomuudesta tai pahoinvoinnista. Ihmiselle maksimiannos klotsapiinia on 300 milligrammaa päivässä pistoksena annettuna (vastaa siis 4,3 mg/kg, jos henkilö on 70-kiloinen), mutta koska aikaisemmissa kokeissa, sekä muussa kirjallisuudessa on käytetty rotille suurempia määriä päädyimme 25 mg/kg/päivä annokseen (Kontkanen, O. ym., 2002). Jos annoskoko suhteutetaan ruumiin pinta-alaan on rotille annettava annos hyvin lähellä ihmisen maksimiannosta ($300 \text{ mg/päivä} = 167 \text{ mg/m}^2$ 70 kg/180 cm ihmiselle, 5,68

mg/päivä = 169 mg/m^2 227 g painavalle rotalle). Lisäksi rotan aineenvaihdunta on tehokkaampaa kuin ihmisellä, jolloin lääkeaine poistuu elimistöstä nopeammin. Rotilla LD_{50} on 58 mg/kg suonensisäisesti, jonka alle tämän kokeen annostus jää. Yksikään eläin ei kuollut käsittelyn seurauksena, joskin pistoskohdat ärtyivät kokeen loppua kohden. Käyttäytymistä ei erityisemmin seurattu, eikä kontrolli ja lääkeaine ryhmässä havaittu suurempia eroja muuta kuin se, että lääkeainepistoksen jälkeen eläimet nukahtivat herkemmin kuin kontrolli ryhmän eläimet. Eläimet tottuivat pistoihin varsin nopeasti. Pistosten antaminen on helpointa suorittaa avustajan pidellessä eläintä aloillaan.

3.2 Lopetukset ja etuaivokuoren dissektiot

Eläimet lopetettiin CO_2 anestesiolla ja sitä heti seuraavalla dekapitaatiolla kuuden päivän kuluttua viimeisestä pistoksesta. Kallo aukaistiin nopeasti ja aivot huuhdeltiin upottamalla ne kerran noin $1^\circ C$ fosfaattipuskuroituun isotoniseen suolaliuokseen ($1 \times PBS$), jonka jälkeen etuaivokuoren palat dissekoitiin PBS:ään kostutetun imupaperin päällä, jonka alla jäämurskalla täytetty petrimalja. Kaikki dissekoinnissa käytetyt välineet oli pyritty puhdistamaan mahdollisimman hyvin RNAasi kontaminaatioiden välttämiseksi. Kudospalat siirrettiin 1,5 ml Eppendorf putkiin, joihin valmiiksi pipetoituna *RNAlater* reagenssia (Qiagen GmbH, Hilden, Saksa), joka inhiboi RNAasit ja stabiloi RNA-molekyylin. Kudospaloja inkuboitiin yön yli *RNAlater* reagenssissa, jonka jälkeen neste pipetoitiin pois ja kudokset siirrettiin odottamaan RNA:n eristystä $-75^\circ C$ pakastimeen.



Kuva 6

Dissekoinnin yhteydessä tehdyt viillot. Näytteeseen otettiin mukaan vain aivokuorta välttämättä syvempien aivo-osien mukaantuloa. Tässä työssä käytetty aivoalue tummennettuna.

3.3 Ribonukleiinihapon eristys

3.3.1 Eristysmenetelmän kuvaus

RNA:n eristyksessä käytettiin guanidiini-tiosyanaattihappo – fenoli – kloroformi eristysmenetelmää (AGPC protokolla) (Chomczynski, P., ja Sacchi, N., 1987) TRIzol reagenssi seoksen muodossa (Invitrogen life technologies, Carlsbad, Kalifornia, Yhdysvallat), joka on monofaasinen liuos fenolia ja guanidiini-tiosyanaattia.

Kudospalojen päälle pipetoitiin TRIzol reagenssia, jonka jälkeen kudospalat homogenisoitiin *Polytron* homogenisaattorilla (Brinkmann, Westbury, New York, Yhdysvallat). Jotta saataisiin samanlaisia RNA saantoja eri näytteistä on homogenisointi erityisen tärkeä vaihe. Jokaista kudospalaa tulee homogenisoida juuri sama sekuntimäärä ja näytteen lämpötilan ei saisi nousta. TRIzol reagenssi estää endogeenisten RNAasien toiminnan heti tästä vaiheesta eteenpäin.

Guanidiini-tiosyanaatti on voimakas proteiinien denaturantti; sekä guanidiini-kationi että tiosyanaatti-anioni ovat ns. kaotrooppisia suoloja, jotka estävät vesimolekyylien järjestäytymisen hydrofobisten voimien avulla proteiinien ympärille mahdollistaen näin proteiinien suuremman rakenteellisen vapauden ja sitä kautta proteiinien denaturaation. Kaotrooppisten suolojen seurauksesta RNAasi-entsyymit inhiboituvat, jolloin säästytään

RNA:n hajoamiselta. Guanidiini-tiosyanaatti saa myös RNA:n irtoamaan proteiineista. Eristyksessä käytettävät orgaaniset liuottimet, fenoli ja kloroformi liuottavat proteiinit ja lipidit itseensä jättäen näin hydrofiiliset nukleinihapot vesifaasiin. Orgaaniset liuottimet edelleen denaturoivat RNAaseja. Fenolin pitää olla RNA:n eristystä varten hapanta (pH 4,7), jolloin RNA jää vesifaasiin ja genomisen-DNA saadaan sokeri-fosfaattirungon protonaation vuoksi orgaaniseen faasiin. Eristykseen voi lisätä myös pienen määrän isoamyylialkoholia vaahtoamisen estämiseksi.

Eristyksen jälkeen RNA puhdistetaan eristysreaktiokomponenttien jäämistä sakkaamalla se ensin isopropanolilla ja pesemällä pellettiä etanolilla.

3.3.2 RNA:n eristysprotokolla

- Kolme vuorokautta -75°C pakkasessa säilytetyt kudospalat punnittiin jäisinä ja kaksi palaa laitettiin samaan putkeen, jotta saataisiin eristysprotokollan mukainen määrä lähtömateriaalia.

Käsittely	Eläimen numero	Etuaivokuoripalojen yhteispaino (mg)
Klotsapiini 17 päivää	1 ja 2	99
	3 ja 4	109
Fysiologinen suolaliuos 17 päivää	5 ja 6	123
	7 ja 8	110

Taulukko 1

- Kudospaloja sulatetaan TRIzol reagenssissa noin puoli minuuttia ennen homogenisointia, sillä homogenisaattorin terä ei pysty jäiseen kudospalaan. Näytteitä pidetään jäällä. Kudospalojen homogenisointi 1200 mikrolitrassa TRIzol reagenssia 2 ml Eppendorf putkissa 30 sekuntia / putki.
- Inkubaatio huoneen lämpötilassa 5 minuuttia, jonka aikana guanidiini tiosyanaatti hajottaa nukleoproteiinikompleksit ja fenoli liuottaa lipidejä ja proteiineja orgaaniseen faasiin
- Lisätään 240 μl kloroformia, ravistetaan voimakkaasti käsissä 15 sekuntia ja inkuboidaan 2 minuuttia huoneenlämmössä. Tässä vaiheessa kloroformi edelleen

liottaa proteiineja ja lipidejä orgaaniseen faasiin ja RNA-molekyylit jäävät vesifaasiin.

- 15 minuutin sentrifugaatio maksimissaan $12000 \times g$, $+4 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Sentrifugaation jälkeen seos jakautuu kolmeen faasiin, joista ylimpään kirkkaaseen faasiin jää RNA-molekyylit. Vesifaasi, jonka tilavuus tässä vaiheessa on noin 60% alkuperäisestä TRIzol reagenssin määrästä eli noin $720 \text{ } \mu\text{l}$ pipetoidaan talteen. Välifaasiin jää rasvoja ja proteiineja ja fenoli-kloroformi faasiin jää DNA:ta ja proteiineja. Tässä vaiheessa tulee välttää fenolin tulemistakaan, sillä se inhiboi mm. käänteiskopiointientsyymireaktiota. Jos näytteeseen on vielä jäänyt tai putkissa on RNAaseja on RNA suojaton hajoamista vastaan, joten näytteitä käsiteltäessä eteenpäin pidetään niitä mahdollisimman paljon jäillä.
- Vesifaasiin lisätään $600 \text{ } \mu\text{l}$ isopropanolia ja inkuboidaan huoneenlämpötilassa 10 minuuttia
- Sentrifugaatio 10 minuuttia $12000 \times g$, $+4 \text{ }^\circ\text{C}$
- Supernatantti pipetoidaan pois ja pelletti pestään 75% etanolilla ($\sim 1200 \text{ } \mu\text{l}$). Näytettä ravistetaan 20 sekuntia, jonka jälkeen pelletin kasataan sentrifugoimalla $7500 \times g$, $+4^\circ\text{C}$, 5 minuuttia. Pelletti kuivatetaan varoen kuitenkin kuivattamatta liikaa sillä dehydroitunutta RNA:ta on vaikea saada liukenemaan veteen. Kuivaus voidaan tehdä lämpöblokillä ($+65^\circ\text{C}$)
- Pelletti liuotetaan $30 \text{ } \mu\text{l}$ vettä (DEPC käsitelty). Liukenemista voi edistää inkuboimalla näytettä $+65^\circ\text{C}$ 10 minuuttia. Tässä lämpötilassa RNAasit eivät ole aktiivisia, joten parempi liuottaa korkeassa lämpötilassa kuin huoneenlämmössä. Näyte voidaan varastoida -75°C pakastimeen lyhytaikaisesti. Säilyvyyttä voidaan parantaa lisäämällä näytteeseen RNAasin inhibiittoreita.

TRIzol menetelmällä eristetyssä totaali-RNA-näytteessä on jonkin verran jäämiä genomisesta DNA:sta, joka voisi potentiaalisesti aiheuttaa vääristymää heikosti ilmenevien geenien ilmenemistason mittauksissa toimimalla templaattina käänteiskopiointientsyymi reaktiossa. DNA-kontaminaatio saadaan pois käsittelemällä näyte DNAasi-entsyymillä,

joka pilkkoo kaksoiskierteistä genomista DNA:ta pilkkomatta RNA:ta. Genomisen DNA:n poistaminen näytteestä absoluuttisesti on lähes tulkoon mahdotonta, mutta esimerkiksi syöpäkasvaimista AGPC protokollalla eristetyssä totaali-RNA-näytteessä saattaa olla jopa 7% genomista DNA:ta (Kitlinska, J., ja Wojcierowski, J., 1995), jolloin DNAasi-käsittelyn merkitys on selvä.

DNAasi-käsittely:

- Näytteeseen (25 µl) lisätään 2,5 µl 10×DNAasi I reaktiopuskuria ja 1 µl DNAasi I entsyymiä
- Sekoitetaan varovasti (näytettä ei pidä sekoittaa voimakkaasti pipetoimalla RNA:n hajoamisen välttämiseksi)
- Inkuboidaan +37°C, 30 minuuttia
- Sekoitetaan DNAasin inaktivaatioreagenssiseos ravistamalla putkea ja lisätään seosta näytteeseen 5 µl. Sekoitetaan hyvin ja inkuboidaan huoneenlämpötilassa 2 minuuttia välillä sekoittaen.
- Sentrifugoidaan sakka pohjalle, johon DNAasi I entsyymi ja kaksiarvoiset kationit ovat kiinnittyneet. Pipetoidaan supernatantti uuteen putkeen varoen ottamasta sakkaa mukaan, sillä se saattaa inhiboida seuraavia reaktioita. Lopputulos on noin 30 µl totaali-RNA-näytettä.

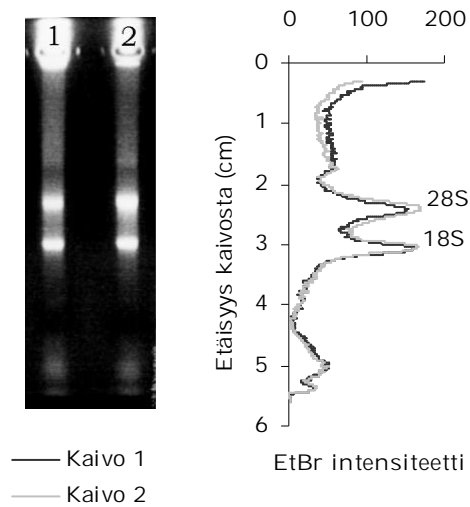
Absorbanssi mittauksia ennen ja jälkeen DNAasi-käsittelyn:

Laimennos 1µl+99µl	Eläimen numero	Ennen DNAasi-käsittelyä	DNAasi-käsittelyn jälkeen	Muutos %
A ₂₆₀ nm	1+2+3+4	1.045	0.873	
A ₂₆₀ nm	5+6+7+8	1.325	0.988	
A ₂₈₀ nm	1+2+3+4	0.552	0.440	
A ₂₈₀ nm	5+6+7+8	0.704	0.504	
A ₂₆₀ /A ₂₈₀ -suhde	1+2+3+4	1.892	1.984	5 %
A ₂₆₀ /A ₂₈₀ -suhde	5+6+7+8	1.884	1.960	4 %
Konsentraatio* µg/µl	1+2+3+4	4.596	3.841	-16 %
Konsentraatio* µg/µl	5+6+7+8	5.830	4.347	-25 %

Taulukko 2

* $A_{260} \times 100$ laimennoskerroin $\times 0,044 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ muuntokerroin yksijuosteiselle **lyhyelle** nukleinihapolle

DNAasi-käsittely laimentaa näytettä, mutta A_{260}/A_{280} suhdeluku lähestyy puhtaan RNA:n suhdelukua 1,9 – 2,1. Kudospalan kokoon suhteutettuna totaali-RNA:ta saatiin talteen 1,3 µg / 1 mg kudosta, joka on TRIzol menetelmällä normaali saantomäärä aivokudoksesta (1-1,5 µg/mg).



Kuva 7

RNA:n eheys määritettynä denaturoivalla agarosigeelillä. Geelillä näkyy selvästi ribosomaaliset-RNA:t 28S ja 18S. Heikkona vyöhykkeenä näkyy vielä 5S ribosomaalinen-RNA ja siirtäjä-RNA:ta. 28S vyöhyke on kummassakin näytteessä isompi kuin 18S vyöhyke. Eheän RNA-näytteen 28S ja 18S vyöhykkeiden intensiteettien suhde tulisi olla $\sim 1,5-2,5$.

Kontrolli näytteen (kaivo 1) vyöhykkeiden suhde (28S/18S) on $\sim 1,2$ ja näytteen (kaivo 2) $\sim 1,6$. Kummassakaan näytteessä ei näy selvää RNA:n hajoamista ja vaikka kontrolli näytteen suhdeluku jääkin hieman alhaiseksi.

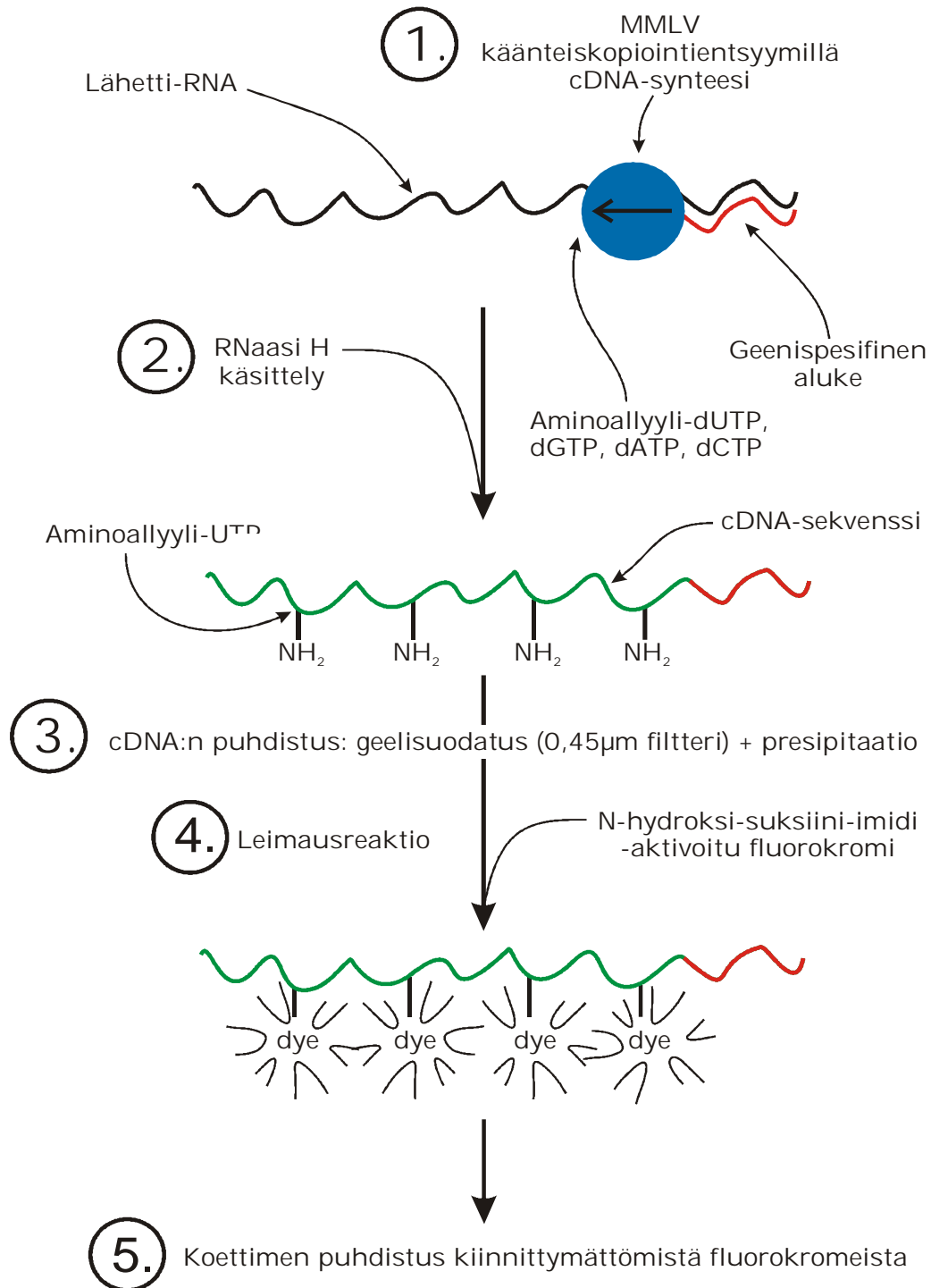
Geelikuvan perusteella RNA-näyte tulkittiin kelpaavaksi koettimen valmistukseen.

3.4 Koettimen valmistus

Leimatun koettimen valmistuksessa voidaan joko valita menetelmä, jossa cDNA-synteesin yhteydessä jokin nukleotidi sisältää valmiiksi fluoresoivan leiman tai leimata muodostunut cDNA-juoste jälkikäteen. Ensimmäisessä menetelmässä huonona puolena on se, että käänteiskopiointientsyymi ei pysty optimaalisesti liittämään kasvavaan cDNA-juosteeseen isoja fluorokromeja sisältäviä nukleotideja näin vähentäen, sekä koettimen määrää, että leiman määrää. Tavallisista nukleotideista koostuva cDNA voidaan leimata, mutta tehokkaampaa on käyttää tymidiini-nukleotidin sijasta modifioitua aminoallyyli-uridiini-nukleotidia cDNA-synteesissä, jolloin leima saadaan kiinnittymään kovalenttisesti

aminoryhmään. Aminoryhmä ei vaikuta olennaisesti käänteiskopiointientsyymien toimintaan. Lähtömaterialina käytettävän RNA:n määrä säädetään samaksi näytteelle sekä kontrollinäytteelle. Tällä on keskeinen merkitys kilpailevassa hybridisaatiokinetiikassa (ks. kappale 2.)

Leimausreaktiossa sekä kontrollinäyte, että näyte sitovat itseensä saman määrän fluorokromi molekyyliä huolimatta siitä, että eri fluorokromeilla on hiukan erilaiset ominaisuudet ja koot. Tämä siksi, että kuhunkin aminoallyyli-uridiini-nukleotidiin kiinnittyy potentiaalisesti yksi värimolekyyli.



Kuva 8

Koettimen synteesi. 1. käänteiskopiointientsyymi muodostaa yksijuosteiselle lähetti-RNA:lle DNA-komplementin, jossa jokainen uridiini-nukleotidi on aminoallyyli-modifioitu (uridiini korvaa muodostuvassa cDNA:ssa normaalin tymidiini-nukleotidin). 2. poistetaan muodostuneista cDNA-RNA-komplekseista RNA-juoste RNAasi H:lla. 3. muodostuneet cDNA-juosteet puhdistetaan irtoneisista nukleotideista, sekä muista reaktiokomponenteista. 4. Leimausreaktio, jossa Cy3- tai Cy5- NHS-esterei reagoi aminoallyyli-uridiinin kanssa leimaten näin sekvenssin jokaisen uridiini-nukleotidin. 5. Leimattu koetin on puhdistettava huolellisesti ylimääräisistä värimolekyyleistä taustan minimoimiseksi.

Valmiin koettimen laatu tarkistetaan ennen lasille hybridisointia. Taulukossa 3 on esitetty kaikkien kahdentoista valmistetun koettimen absorbanssimittaukset ennen kontrollinäytteen ja näytteen yhdistämistä. Nukleiinihapon kokonaismäärästä kertovan A_{260} -arvon vertaus leiman (Cy3 A_{650} ja Cy5 A_{550}) arvoon antaa käsityksen leimautuneen cDNA määrästä suhteessa kokonais- cDNA määrään. Suhdelukujen ollessa suuria voidaan epäillä koettimen olevan huonosti leimautunut tai fluorokromin menettäneen aktiivisuutensa. Sitä vastoin pienet suhdeluvut kertovat koettimen paremmasta leimautumisesta tai siitä että näytteessä on paljon kiinnittymätöntä fluorokromia. Odotetut arvot absorbanssien suhdeluvuille olivat Cy3-leimatuille näytteille 8-15 ja Cy5-leimatuille näytteille 10-20 DNA-sirun valmistajan ohjeiden mukaan. Mitatut arvot poikkeavat odotetuista todennäköisimmin johtuen spektrofotometrin herkkyyden tultua vastaan laimennetuilla näytteillä.

DNA-siru	Näyte	Leima	Laimennoskerroin	A_{260}	A_{650}	A_{550}	suhde
1	kontrollinäyte	Cy3	100	0.008	0.001		8.0
	näyte	Cy5	100	0.003		0.001	3.0
2	näyte	Cy3	100	0.011		0.004	2.8
	kontrollinäyte	Cy5	100	0.019	0.002		9.5
3	kontrollinäyte	Cy3	100	0.013		0.003	4.3
	näyte	Cy5	100	0.011	0.003		3.7
4	näyte	Cy3	100	0.028		0.001	28.0
	kontrollinäyte	Cy5	100	0.017	0.002		8.5
5	kontrollinäyte	Cy3	1	3.100		0.15	20.7
	näyte	Cy5	1	3.450	0.225		15.3
6	näyte	Cy3	1	3.450	0.234		14.7
	kontrollinäyte	Cy5	1	2.950		0.157	18.8

Taulukko 3

Koettimilla on tavalliselle spektrofotometrille siinä määrin matalat absorbanssi arvot, että mittauksissa tulisi käyttää laimentamatonta koetinta.

Parempi käsitys koettimen laadusta saadaan mittaamalla koko spektri 200-800 nm alueella. Muodostuvasta kuvaajasta voidaan nähdä näytteen puhtaus ja vertailu muihin näytteisiin

helpottuu. Markkinoilla on myös laitteita (NanoDrop, NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, Yhdysvallat), joilla mittaukset voidaan tehdä erittäin pienestä määrästä koetinta, jolloin mahdollisesti pilaantunutta absorbanssinäytettä ei tarvitse ottaa enää mukaan itse DNA-sirun hybridisaatioon.

3.5 Hybridisaatio ja huuhtelut

Hybridisaatiota varten kontrollikoetin ja näytekoetin yhdistetään samassa suhteessa toisiinsa ja lisätään +50°C asteista hybridisaatiopuskuria niin, että saadaan yhteensä 1800 µl hybridisaatioliuosta. Hybridisaatio tapahtuu esilämmitetyssä kapselissa, jossa on tilaa juuri 1800 µl:lle DNA-sirun päällä. Kapseli suljetaan tiiviisti ja inkuboidaan +50°C asteisessa uunissa vähintään 16 tuntia.

Erilaisissa peitinlasi / kalvo systeemeissä on vaarana, että hybridisaatioliuos ei pääse tasaisesti levittäytymään lasin pinnalla, joka näkyy epätasaisena hybridisaationa. Erityinen valmistajan tarjoama hybridisaatiokapseli eliminoi tätä ongelmaa.

Hybridisaation jälkeisten huuhteluiden tarkoitus on poistaa sirulta kaikki kiinnittymätön koetin, sekä irrottaa epäspesifisesti hybridisoitunut materiaali laskemalla asteittain suolakonsentraatiota. Lopuksi lasi huuhdellaan nopeasti tislatulla vedellä ja kuivataan nopeasti välttämättä veden kuivamista lasin pinnalle ja siten muodostuvia kuivumisjälkiä. Tämä voidaan suorittaa sentrifugoimalla lasia 2000×g 5 minuuttia sopivasti tuettuna (tässä kokeessa käytetty menetelmä). Sentrifugaation seurauksena lasille kuitenkin jää helposti valumajälkiä, joten lasin kuivaus puhaltamalla lasille inerttiä kaasua kuten typpeä, neonia tai argonia on vartenotettava vaihtoehto. Paineilma ei välttämättä ole hyvä vaihtoehto sillä fluorokromit ovat herkkiä hapelle (Fare, T.L. ym., 2003).

3.6 Ilmenemistasojen lukeminen ja mittausarvojen nimeäminen

Geenien ilmenemistasot luetaan DNA-siruilta geeniä edustavan täplän fluoresenssin voimakkuutena. Täplään kiinnittyneen koettimen määrä on periaatteessa suoraan verrannollinen fluoresenssin määrään, joskin fluorokromien ominaisuudet rajoittavat oletuksen käyttökelpoisuutta (ks. kappale 2.5.6). Lisäksi konfokaalilaserskannereilla on rajoituksensa vahvojen intensiteettien mittauksissa. Näistä syistä johtuen mitatut intensiteetit eivät välttämättä ole suoraan verrannollisia sitoutuneen koettimen määrään (Ramdas, L. ym., 2001, Shi, L. ym., 2005), jolloin joudutaan tukeutumaan mittausaineistoin normalisointiin (ks. kappale 3.7.1).

Kaksoisvärjästekniikassa (ks. kuva 2 sivulla 16) yhtäaikaan hybridisoitavilla näytteellä on kummallakin oma leimansa, joiden emissiomaksimit selvästi eroavat toisistaan. Ennen varsinaisia skannauksia siruista otetaan esiskannauksia alhaisemmalla resoluutiolla, joiden avulla tarkennetaan optiikka lasin pintaan. DNA-siru skannataan konfokaalilaserskannerilla 10 μm resoluutiolla (ks. 2.5.7.1) kahteen kertaan ensimmäisellä kerralla eksitoimalla toista fluorokromia ja seuraavalla kerralla toista. Kummastakin skannauksesta tallentuu 16-bittinen mustavalkoinen kuva.

Kvantitaatio-ohjelma (ScanAlyze 2.50, Michael Eisen, Stanfordin yliopisto, Yhdysvallat) yhdistää kuvat ns. pseudovärikuvaksi (ks. kuva 9 sivulla 46; pikkukuvat), jota käytetään mitattavien alueiden rajaamiseen. Täplien paikantamisen yhteydessä merkitään myös selvästi vialliset täplät eli sellaiset joiden muodosta voidaan päätellä kohdesekvenssin applikaation epäonnistuneen (esim. kuplat aiheuttavat vain renkaan muotoisia kuvioita) tai jossa artefaktit peittävät varsinaisen täplän. Varsinaisen kvantitaation ohjelma kuitenkin tekee alkuperäisistä tiedostoista. Mittausarvot tallentuvat taulukkomuotoon, jossa taulukon jokainen rivi edustaa yhtä geeniä. Tässä vaiheessa taulukkoon mittausarvot nimetään Genbank-numeroilla, sekä muilla mahdollisilla käsitteillä. Genbank-numeroiden ja muiden käsitteiden avulla mittausarvoihin voidaan myöhemmin voi liittää lisäinformaatiota kuten ontologiatermiä. Nimeämisvaiheessa on syytä tehdä muutama pistotarkistus siitä, että sirunvalmistajan tarjoama lista geneistä on samassa järjestyksessä kuin kvantitaatio-ohjelman tulostamassa taulukossa.

3.7 Data-analyysi

3.7.1 Normalisaatiot

Johtuen käytettyjen fluorokromien toisistaan poikkeavista ominaisuuksista toinen näyte saa yleensä keskimäärin pienempiä mittausarvoja kuin toinen. Ero ei ole lineaarinen vaan heikosti ilmenevillä geeneillä ero on suurempi kuin voimakkaasti ilmenevillä geeneillä.

Mittausaineisto ladattiin *GeneSpring* (Agilent, Palo Alto, Kalifornia, Yhdysvallat) DNA-sirudatan analyysiohjelmaan. *LOWESS* (*locally weighted regression scatter plot smoothing*) suora sovitettiin hajontakuviioon (ks. kappale 3.8.1), jota käytettiin jokaisen mittauksen kontrollinäytteen intensiteettiä normalisointiin (Cleveland, W.S., 1979, Yang, Y.H. ym., 2002). Kuva 9 sivulla 46 kuvaa normalisaation vaikutusta hajontakuviioon. Tulokset esitetään näytteen fluoresenssi-intensiteetin suhteena kontrollinäytteen fluoresenssi-intensiteettiin, jolloin yli yhden (>1) suhdeluvut kuvaavat geenin aktivoitumista ja alle yhden (<1) geenin supressoitumista. Käytännössä kuitenkin suhdeluvut lähellä yhtä ($0,769 < x < 1,3$) kuvaavat geenejä, joiden aktiivisuudessa ei katsota olevan muutosta.

3.7.2 Geenilistojen tulkinta

DNA-sirukokeen data-analyysin tulos on tavallisesti lista geenejä (ks. liite 2), jotka ilmenemisprofiileidensa puolesta on pystytty jakamaan homogeenisiksi luokiksi (klusterointi). Yksinkertaisimmillaan tällainen luokittelu voidaan tehdä niihin geeneihin, jotka ovat aktivoituneet, niihin geeneihin, joiden aktiivisuus on laskenut ja niihin joiden ilmenemistasossa ei ole tapahtunut muutosta. Tyypillisessä DNA-sirukokeessa suurin osa geneistä kuuluu viimeiseksi mainittuun luokkaan ja ainoastaan pieni osa geneistä osoittaa merkkejä muuntuneesta aktiivisuudesta. Kuvassa 10 sivulla 50 on kuvattu klotsapiinikokeen kaikkien geenien ilmenemistason muutokset kerrannaisina kontrollista.

Saatuja geenilistoja (klusterit) voidaan verrata erilaisiin geeniontologiatermiin. Tietyn geenin kuvaavan käsitteen esiintyminen geenilistassa useammin kuin mitä todennäköisyyslaskelman perusteella olisi odotettavissa, kertoo käsitteen rajaaman signaalintireitin, funktion tai soluorganellin merkittävyydestä koeasetelmassa. Saatavilla

on useita ohjelmia (Khatri, P., ja Draghici, S., 2005), joiden avulla voi nopeasti löytää geenilistoille biologisia selityksiä ilman, että tarvitsee tuntea jokaista geeniä erikseen, joka vaatisi usein pitkällistä kirjallisuuteen perehtymistä.

Kappaleessa 4 geenilistoja on analysoitu *Onto-tools* analyysiohjelmapaketin *Pathway Express* osalla, joka on vapaasti käytettävissä internetiselaimen kautta (Draghici, S. ym., 2003, Khatri, P. ym., 2002, Khatri, P. ym., 2005).

3.8 DNA-sirukokeen teknisen onnistumisen arviointi

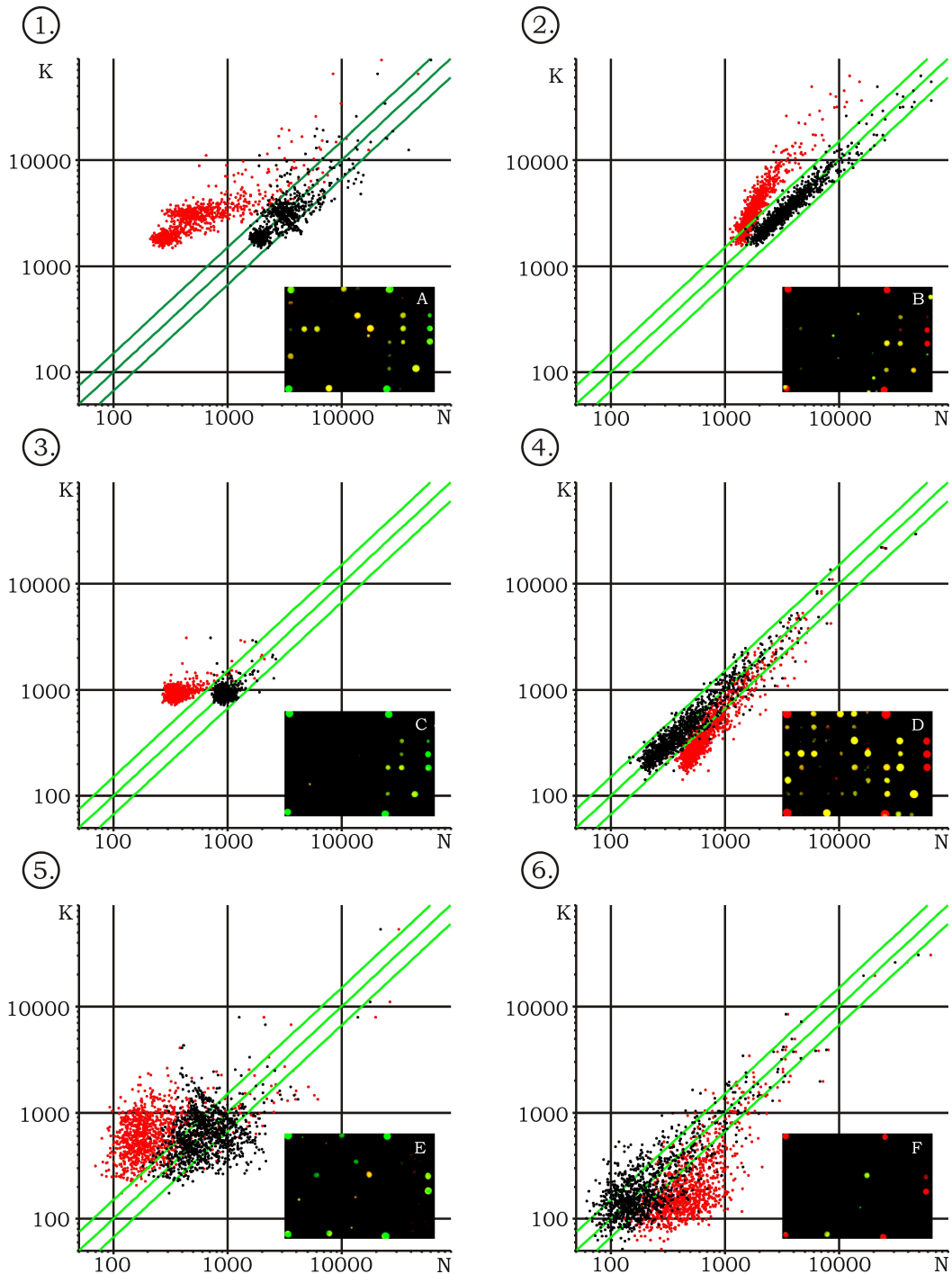
DNA-sirukokeen työlän vaihe on usein mittaustulosten analysointi. Mittausarvoista voidaan nopeasti poimia geenit, joiden ilmenemistasot ovat potentiaalisesti eniten muuttuneita käsittelyn vaikutuksesta. Tulosten biologinen tulkinta vaatii kirjallisuuden läpikäymistä ja mittaustulosten vertaamista muihin vastaaviin kokeisiin. Biologisen tulkinnan pohjalla täytyy olla huolellisesti kuvattuja genejä eli geneistä tulee kerätä kaikki mahdollinen informaatio. Mittaustulosten analysointiin on olemassa myös yhä kasvava määrä erilaisia analysointimenetelmiä ja mittausvirheiden karsintaan on olemassa hyvinkin hienostuneita algoritmeja. Ottaen huomioon, että sirukokeet ovat usein lähtökohtana jatkotutkimuksille, joissa keskitytään mahdollisesti vain kouralliseen genejä, on tehtävä kaikki, jotta lopullinen data olisi mahdollisimman laadukasta ja systemaattisten virheiden määrä on minimoitava.

3.8.1 Hajontakuviot

Mittaustulokset voidaan esittää hajontakuviossa, jossa x-akselilla on esitettyinä kontrollinäytteen intensiteetti arvot ja y-akselilla näytteen intensiteetti arvot. Tavallisesti mitta-asteikko on esitetty logaritmisena (kantalukena 2), jolloin pystytään helpommin havaitsemaan epälineaarisuudet mitta-arvojen hajonnassa (Dudoit, S. ym., 2000). Kuvaajasta pystytään yhdellä silmäyksellä katsomaan eri intensiteettiarvojen hajonta, sekä se, kuinka paljon riippuvuutta näytteiden välillä on. Jos samalle lasille hybridisoitaisiin

identtiset näytteet olisi hajontakuvioteoriassa suora viiva. Kohtisuora etäisyys hajontakuvion läpi piirretystä viivasta kuvaa näytteessä tapahtuneen muutoksen suuruutta. Kuvassa 9 sivulla 46 on esitettyä kuuden eri sirukokeen hajontakuvioita.

Kuvaajasta voidaan myös helposti huomata poikkeamia odotetusta hajontakuvion muodosta, kuten esimerkiksi epäjatkuvuudet mittausarvoissa kuvan 9 sivulla 46 kohdassa 1. Kuvan kohdat 2, 3, 5 ja 6 kuvaavat sirukokeita, joissa taustan ja signaalin suhdeluvut ovat jääneet pieniksi ainakin toisella fluorokromilla, joskin intensiteettiarvoja on saatu nostettua lisäämällä skannauksessa käytettävää lasertehoa. Lasertehon kasvattaminen lisää kuitenkin myös epäspesifisen signaalin määrää. Sirujen 5 ja 6 kokeessa on leimaa kiinnittynyt huomattavan paljon taustaan, mikä kertoo sirun pinnoitteen blokkauksen vaillinaisuudesta tai koettimen riittämättömästä puhdistuksesta.



Kuva 9

Hajontakuviot kuudesta erillisestä sirukokeesta (punaisella normalisoimattomat arvot ja mustalla *LOWESS* normalisoidut arvot), sekä pseudovärikuva suurennos osasta sirua.

K = kontrollinäytteen intensiteetti arvo, N = näytteen intensiteetti arvo.

Kohdan 1 kuvaajassa näkyy kaksi erillistä pilvää. Skannattu lasi oli rikkiäinen toisesta laidastaan, joka aiheutti heijastuman noin kolmasosalle lasia, jolloin näemme kaksi erillistä mittausarvo joukkoa. Nämä joukot tulisi mahdollisesti normalisoida erikseen, koska näiden kahden hajontakuvion läpi ei voida vetää yhtä suoraa.

Kohdassa 4 on sirukoe, joka selvästi poikkeaa muista kokeista siinä, että tämän sirun kuvasta (D) pystyy silmällä havaitsemaan selvästi enemmän täpliä kuin muista kuvista

3.8.2 DNA-sirukokeen laaduntarkkailu

Yhteensä kuusi erillistä sirukoetta suoritettiin. Kaikki kokeet suoritettiin samasta koeasetelmasta. Hypoteesi oli, että jokainen siru tuottaisi samansuuntaisia tuloksia ja kuuden toiston keskiarvon laskeminen toisi mittauksille tilastollista merkitsevyyttä. Tilastollisen merkitsevyyden saamiseksi hajonnan tulisi olla huomattavan vähäistä käytettäessä kuutta sirua. Lisäksi, jos otamme huomioon perushypoteesin siitä, että geenien ilmenemisessä ei todennäköisesti ole suuria eroja, vaatimus toistojen määrästä vain kasvaa (Wei, C. ym., 2004). Toistojen alhainen määrä ja kokeiden tulosten poikkeavuus toisistaan kiinnitti huomion kokeiden tekniseen onnistumiseen, sillä laskettaessa keskiarvoja voi huonosti onnistunut sirukoe kontaminoida mittaustulokset (Park, T. ym., 2005). Kuudesta suoritetusta DNA-sirukokeesta voidaan poimia yksi, joka täyttää useimmat onnistuneen kokeen tunnusmerkit:

- a) molemmat fluorokromit näkyvät saman vahvuusina hybridisoidulla lasilla
- b) täplien intensiteetit ovat selvästi taustaa voimakkaampia
- c) täplien intensiteeteissä ei ole korrelaatiota sirun eri alueiden kanssa (esim. reuna-alueiden himmeys)
- d) näyte/kontrolli-suhdeluvut geeneille jakautuvat normaalijakauman mukaisesti
- e) alkuperäisissä intensiteettiarvoissa on edustettuna sekä pieniä että suuria arvoja
- f) hajontakuviot ovat muodoltaan tyypillinen DNA-sirukokeelle (Park, T. ym., 2005) (katso kuva 9 kohta 4)
- g) DNA-sirulla olevat kontrollitäplät ovat selvästi havaittavissa (negatiivikontrollitäplät tyhjiä) ja kontrollitäplissä ei havaita eroja näytteen ja kontrollin välillä*

*) Käänteiskopiointikontrollitäplä: Ennen käänteiskopiointireaktiota RNA-näytteeseen lisätään synteettistä RNA:ta, joka on valmistettu spesifisestä bakteriofagi λ :n DNA-sekvenssistä ja jolle on omat alukkeensa käänteiskopiointireaktiota varten. Leimausreaktiokontrollitäplä: Käänteiskopiointireaktion jälkeen näytteeseen lisätään spesifistä bakteriofagi λ cDNA sekvenssiä, jossa on jo valmiina aminoryhmät väriainesubstituutioreaktiota varten. Näillä kontrollisekvensseillä ei ole homologiaa minkään rotan sekvenssin kanssa ja eivät siten häiritse muiden sekvenssien hybridisaatiota.

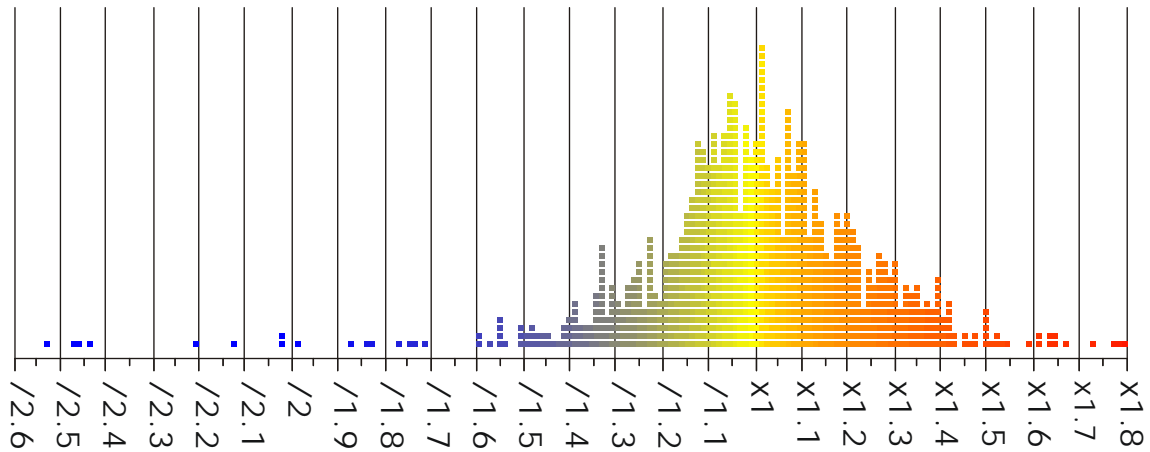
Normalisaatiolla saadaan useimmat mittaustulokset sovitettua haluttuun muottiin, mutta vaarana on se, että tuloksia normalisoidaan liikaa, jolloin analysoitavaksi jää vain satunnaisvaihtelua.

Jatkoanalyysin lähtökohdaksi olen valinnut parhaimmin onnistuneen kokeen. Muissa kokeissa jää jokin tai useammat onnistuneen kokeen tunnusmerkit saavuttamatta. Näin rajattu aineisto jäisi sellaisenaan tarkasteltuna epäluotettaviksi varsinkin kun otetaan huomioon, että havaitut muutokset ovat varsin pieniä. Huolimatta toistojen puuttumisesta aineisto on analysoitu käyttämällä hyväksi tietoa geenien funktionaalisesta luokittelusta. Tämä on perusteltua, koska hyvinkin pienellä toistomäärällä ja marginaalisilla geenien ilmentymismuutoksilla voidaan saada biologisesti mielenkiintoista informaatiota (Knuutila, J.E.A. ym., 2004).

4 TULOKSET: ANTIPSYKOOTTISEN LÄÄKKEEN PITKÄAIKAISET VAIKUTUKSET ROTAN ETUAIVOKUORELLA DNA- SIRUMENETELMÄLLÄ TUTKITTUNA

4.1 Yleistä

Geenit jaettiin kolmeen eri klusteriin: Potentiaalisesti ylös säädelyneet geenit, potentiaalisesti alas säädelyt geenit ja geenit, joiden ilmenemistasossa ei havaittu muutosta. Raja-arvoina käytettiin 1,3-kertaista muutosta. Näin saatiin 194 potentiaalisesti käsittelyssä säädeltynyttä geeniä (normalisoitujen suhdelukujen $0 - 0,769$ ja $1,3 - \infty$ välille jäävät geenit), joiden joukosta lähdettiin etsimään korrelaatiota biologisiin systeemeihin. 1,3-kertainen muutos mitattuna DNA-sirukokeella on epävarma tulos yksittäiselle geenille, mutta tarkasteltaessa geenilistoja yhdessä funktionaalisten luokittelujen kanssa saattaa aineistoista löytyä mielenkiintoista informaatiota. Konservatiivisemmalla rajauksella geenilistassa olevien geenien määrä laskee jyrkästi, jolloin funktionaalisten luokkien sovittaminen aineistoon menettää mielekkyytensä. 1,5 raja-arvolla potentiaalisesti säädelyneitä genejä on enää yhteensä 47.



Kuva 10

Geenien ilmenemistason muutokset kroonisessa klotsapiinikäsittelyssä kuuden päivän jälkeen viimeisestä pistoksesta. Suurin osa geneista sijoittuu lähelle lukua 1 eli ei muutosta ilmenemisessä. Aktiivisuuttaan laskeneiden geenien joukossa on suurempia muutoksia kuin ylöspäin menneissä, joskin tämä ilmiö saattaa johtua leimojen epätasaisista ominaisuuksista.

Jokaiselle geenille voidaan antaa joukko käsitteitä (annotointi), jotka kuvaavat mm. missä geeni toimii solussa ja millaisiin molekyylibiologisiin prosesseihin geenin toiminta on liitetty. Tarkastelemalla mitä käsitteitä esiintyy esimerkiksi kiinnostavien geenien klusterissa, on mahdollista tehdä johtopäätöksiä siitä assosioituuko jokin tietty funktio juuri tähän geenilistaan (Kontkanen, O. ym., 2002, Törönen, P., 2004). Molekyylibiologisissa prosesseissa toisilla geneilla on kokonaisprosessia edistävä funktio ja toisilla saattaa olla prosessia suppressoiva funktio, jolloin on perusteltua analysoida ylipäättänsä säädeltyneet geenit yhdessä riippumatta muutoksen suunnasta. Kappaleen 4.1.1 taulukossa tarkastellaan molekyylibiologisesta prosessista kertovien käsitteiden esiintymistä säädeltyneiden geenien joukossa. Käsitteistö on haettu KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) tietokannasta, josta löytyy informaatio siitä mihin biologiseen prosessiin tai signaalintireittiin mikäkin geeni kuuluu (Kanehisa, M., 1997, Kanehisa, M., ja Goto, S., 2000). Toisena vaihtoehtona olisi ollut standardoidut geeniontologia luokat (Ashburner, M. ym., 2000), jotka kertoisivat missä osassa solua geeni toimii, millainen molekulaarinen funktio geenillä on ja siitä mihin biologiseen prosessiin geeni kuuluu. KEGG tietokannan vahvuutena on kuitenkin se, että prosessit voidaan esittää kaavioina, josta näkee missä kohdassa biologista prosessia kiinnostava geeni toimii.

194 geeniä analysoitiin *Onto-Tools* paketin *Pathway Express* (Khatri, P. ym., 2005) analyysiohjelmalla, joka on vapaasti käytettävissä verkkoselaimen kautta. Geenien

annotointi on jatkuvasti kehittyvä prosessi ja monet geenitietueet ovat vuosien varrella poistettu virheellisten sekvenssien tai muiden epäselvyyksien vuoksi. Tästä johtuen 194:stä geenistä vain 170 onnistuttiin tarkasti identifioimaan. Samoin kokonaisaineistoin 1090 geeniä on pienentynyt 946:teen samasta syystä. *Pathway Express* käy läpi geenilistan ja määrittää löytyykö sellaisia biologisia prosesseja, joiden komponentteja listassa esiintyy poikkeuksellisen paljon eli onko jokin tietty reitti rikastunut tarkasteltavassa geenilistassa.

4.1.1 Rikastuneet biokemialliset reitit (KEGG) säädelyneiden geenien joukossa

Pathway Express ohjelma laskee jokaiselle geenilistan geenille niin sanotun muutoskertoimen (perturbation factor). Muutoskerroin ottaa huomioon geenin ilmenemismuutoksen ja prosessissa alavirtaan olevien geenien määrän ja sen millaisia muutoskertoimia näillä geneillä on. Muutoskerroin siis kertoo jokaisen säädelyneen geenin suhteellisesta merkittävydestä. Seuraavaksi ohjelma laskee kokonaiselle prosessille vaikuttavuuskertoimen (impact factor), joka ottaa huomioon säädelyneiden geenien määrän prosessissa, sekä näiden geenien muutoskertoimet. Vaikuttavuuskerrointa käytetään järjestettäessä prosessit tärkeysjärjestykseen (Khatri, P. ym., 2005). Ohjelma laskee jokaiselle prosessille myös ns. *p*-arvon, joka kertoo siitä kuinka suurella mahdollisuudella saataisiin esille vastaavat prosessit valitsemalla satunnaisesti genejä tutkittavien geenien joukosta. *P*-arvo ei kuitenkaan ota huomioon geenien ilmenemisinformaatiota.

Järjestys	Prosessi	Vaikutuskerroin	Prosessin jäseniä yhteensä	Prosessin jäseniä geenilistassa	DNA-sirulla esiintyvät prosessin jäsenet	Prosessin jäseniä geenilistassa verrattuna prosessin jäsenten määrään yhteensä %	Prosessin jäseniä geenilistassa verrattuna geenilistan kokonaismäärään (170) %	p-arvo
1	Kalsiumin signalointireitti	32,944	185	15	94	8,824	8,108	0,355
2	Fokaali adheesio	29,228	124	7	33	4,118	5,645	0,228
3	MAPK-signalointireitti	25,685	165	12	70	7,059	7,273	0,498
4	Neuroaktiivinen ligandi-reseptori vuorovaikutus	22,479	260	13	124	7,647	5,000	0,011
5	Tiivisliitos	16,821	112	6	16	3,529	5,357	0,014
6	Sytokiini-sytokiinireseptori vuorovaikutus	14,077	136	5	41	2,941	3,676	0,224
7	Wnt-signalointireitti	12,565	91	7	22	4,118	7,692	0,030

Taulukko 4

Rikastuneet prosessit 1,3/-1,3 -kertaista tai suurempaa muutosta osoittavien geenien joukossa

Ohjelma listasi yhteensä 16 prosessia, joista seitsemän oli sellaisia, jossa säädelyneiden geenien listasta löytyi viisi tai enemmän jäseniä. Liitteessä 2 on jokaisen prosessin sisältämien säädelyneiden geenien listat.

5 TULOSTEN TARKASTELU

DNA-sirukoe antaa mahdollisuuden seuloa valtavasta joukosta geenejä sellaisia, jotka potentiaalisesti liittyvät tutkittavaan asiaan. Olemme etsineet geenejä, jotka kertoisivat klotsapiinin vaikutusmekanismeista siinä vaiheessa kun itse lääkeaine ei enää ole läsnä kuuden päivän jälkeen viimeisestä pistoksesta. Oletuksena oli se, että emme näkisi kovinkaan suuria poikkeavuuksia geenien ilmenemistasoissa. Tämä asettaa DNA-sirukokeen tarkkuuden koetukselle, sillä perinteisesti merkittävänä tuloksina on pidetty ainoastaan kolminkertaisia ja sitä suurempia muutoksia, joskin tarkkuus on vuosien varrella parantunut.

5.1 Rikastuneista prosesseista

Analyysin onnistumisen kriteerinä voitaisiin pitää sitä, että analyysissä tulee esille sellaisia ilmiöitä jotka ovat jo aikaisemmin liitetty kyseiseen tutkimusasetelmaan. Tällaiset ”varmistukset” antavat lisäarvoa siten muille löydöksille, joita ei ole raportoitu aikaisemmin. Tällaisia antipsykoottisiin lääkkeisiin ja skitsofreniaan jo aikaisemmin assosioituneeksi raportoituja systeemejä ovat MAP-kinaasi signalointireitti (Cussac, D. ym., 2002, Kyosseva, S.V., 2004), Kalsiumin signalointi (Lidow, M.S., 2003) sekä Wnt-signalointireitti (Alimohamad, H. ym., 2005), jotka tässäkin kokeessa tulivat esille.

Rikastuneiden prosessien listasta löytyy myös solujen adheesioon liittyviä prosesseja, joilla luonnollisesti on oma keskeinen merkityksensä aivojen rakenteessa. Se miten hermosolut

kiinnittyvät toisiinsa ja keskushermoston muihin soluihin on keskeistä erilaisten hermoverkkojen rakentumisessa. Skitsofreniapotilailla on esimerkiksi arveltu olevan ongelmia eri aivoalueiden välisissä kontakteissa, jolloin luonnollisesti tällaisten solu-solu interaktioiden merkitys tässä kontekstissa tulee tärkeäksi ja antipsykoottisella lääkkeillä voi olla funktio nimenomaan näiden mekanismien modifioimisessa.

5.1.1 MAP-kinaasi signalointireitti

MAP-kinaasi (mitogeeniaktivoituva proteiinikinaasi) signalointireitin on havaittu useissa kokeissa olevan keskeisessä asemassa keskushermoston fysiologiassa. Toisaalta kuitenkin on vielä suhteellisen vähän tietoa siitä miten tämä signalointireitti on yhteydessä skitsofreniaan. On kuitenkin tuloksia, jotka osoittavat MAP-kinaasi signalointireitin toimivan poikkeavalla tavalla skitsofreenikkojen aivoissa (Kyyseva, S.V., 2004). Tämän lisäksi antipsykoottisilla lääkkeillä on osoitettu olevan vaikutusta MAP-kinaasin fosforylaatioon (Cussac, D. ym., 2002). Antipsykoottisten lääkkeiden yhden vaikutusmekanismin on arveltu liittyvän dopamiinireseptoreihin, joiden tiedetään olevan yhteydessä myös MAPK-signalointireittiin. Näiden tulosten pohjalta on mielenkiintoista huomata, että klotsapiinikoe toi myös esille MAP-kinaasi signalointireitin.

5.1.2 Kalsiumin signalointi

Pathway Express ohjelma sijoitti kalsiumin signaloinnin ensimmäiselle sijalle mielenkiintoisten prosessien listassa. Kalsiumin signaloinnin muutoksia onkin ehdotettu tekijäksi, joka voisi olla yhteinen nimittäjä lähes kaikissa skitsofrenian syihin ja antipsykoottisten lääkkeiden toimintaan viittaavissa teorioissa (Lidow, M.S., 2003). Kalsiumin signalointi on kuitenkin valitettavasti varsin monessa signaloinnissa mukana, joten mekanismeja miten kalsiumin signalointi todellisuudessa liittyy skitsofrenian hoitoon ja sen syntymekanismeihin on vaikea lähestyä.

5.1.3 Wnt-signalointireitti

Wnt-signalointireitti on liitetty aivokuoren kehitykseen ja plastisuuteen. Muutamat keskeiset Wnt-signalointireitin geenit toimivat poikkeavasti skitsofreenikoilla (Beasley, C. ym., 2002) ja myös antipsykoottisten lääkkeiden vaikutusta Wnt-signalointireitin geneihin on havaittu (Alimohamad, H. ym., 2005). Tässä kokeessa esille tulleet Wnt-

signaalintireitin geenit eivät ole samoja mitä kirjallisuudessa on mainittu, mutta reitin esille tuleminen tässä yhteydessä on mielenkiintoista.

5.2 Muiden yksittäisten geenien muutokset klotsapiinikokeessa

Joskaan koeasetelma ei anna mahdollisuutta tarkastella yksittäisten geenien ilmenemismuutoksia sellaisenaan ilman tulosten liittämistä suurempiin kokonaisuuksiin on kuitenkin perusteltua mainita muutamia mielenkiintoisia geenejä, jolla on osoitettu olevan merkitystä antipsykoottisten lääkkeiden mahdollisissa vaikutusmekanismeissa. Esimerkiksi kaksi dopamiinireseptorigeeniä (*Drd4* ja *Drd2*) osoittivat yli 40% lisäystä lähetti-RNA:n ilmenemisessä. Kaikilla antipsykoottisilla lääkkeillä on havaittu affiniteettia dopamiinireseptoreihin varsinkin D₂ reseptorityyppiin (Kapur, S., ja Mamo, D., 2003). Klotsapiinilla on dopamiinireseptoriantagonisti aktiivisuutta sekä D₂ ja D₄ reseptorityyppeihin. Lääkeaine siis sitoutuu dopamiinin paikalle kuitenkin aktivoimatta reseptoria. Solut kuitenkin yrittävät pitää herkkyytensä ligandiin vakiona, jolloin antagonistin ollessa läsnä solu yrittää mahdollisesti tuottaa lisää reseptoreita solukalvolle (sensitaatio). Dopamiinireseptoreiden ilmenemisessä on havaittu muutoksia antipsykoottisten lääkkeiden vaikutuksesta (Florijn, W.J. ym., 1997, Lidow, M.S. ym., 1998).

Skitsofrenia potilailla on arveltu olevan muutoksia synapsien toiminnassa ja onkin mielenkiintoista huomata, että koeasetelmassamme tuli esille useita synaptisia proteiineja, joita jo aikaisemminkin on liitetty antipsykoottisten lääkkeiden vaikutusmekanismeihin. Tällaisia geenejä ovat mm. Synaptotagmiini 3, Rab3a sekä Rab11a (katso liite 2) (Kontkanen, O. ym., 2002).

5.3 Tulosten varmistuksesta

Yleisesti DNA-sirukokeiden tuloksia analysoitaessa kiinnitetään päähuomio niihin geeneihin, joiden aktiivisuus on muuttunut eniten ja lähdetään varmistamaan tuloksia muilla riippumattomilla menetelmillä. Kuitenkin valitettavan usein nämä geenit, joiden kontrollin ja näytteen välinen ero näyttää olevan kaikista suurin, ovat niin sanottuja vääriä positiivisia eli tulosta ei saada varmistettua jatkokokeissa. Mahdollisia syitä tällaiseen ovat esimerkiksi DNA-sirujen suunnittelussa tai tuotannossa tapahtuneet virheet. On viitteitä jopa siitä että noin 30 % DNA-siruilla olevista kohde sekvensseistä mittaavat jonkin muun geenin toimintaa kuin mitä valmistaja kertoo niiden mittaavan (Knight, J., 2001). Jo pelkästään tämän vuoksi ei ole mielekäästä valita vain sokeasti geenejä, joiden ilmenemistasossa näyttää olevan suurimmat muutokset vaan yrittää ensin löytää näille eniten muuttuneille geeneille joitain yhteisiä nimittäjiä. Esimerkiksi jos eniten aktivoituneiden geenien joukosta löytyy paljon sellaisia geenejä, jotka kuuluvat samaan metaboliareittiin voidaan suhteellisen yksinkertaisesti laskea todennäköisyys sille, ettei tämä lista ole muodostunut vain sattumalta. Tällainen lähestymistapa vähentää varmennettavien geenien lukumäärää ja antaa viitteitä koeasetelman biologisesta taustasta. Näin ollen jatkokokeita silmälläpitäen tulemmekin keskittymään niihin molekyylibiologisiin prosesseihin, joiden aktiivisuudessa näemme eniten eroja ja joiden funktion pystymme liittämään hypoteesiin lääkeaineiden vaikutusmekanismeista. Tavallaan tässä tapauksessa DNA-sirukoetta on käytetty siis lähinnä sivistyneen arvauksen tukena, mutta sellaisenaankin on arvokas ottaen huomioon, että mahdollisia vaikutusmekanismeja voidaan hahmotella lähes loputtomiin.

DNA-sirukokeiden varmistukseen on valittavana useita menetelmiä. Menetelmän valinta riippuu siitä miltä tasolta halutaan varmennusta tuloksiin saada. Kaikissa menetelmissä on kiinnitettävä erityistä huomiota siihen, että näyte ja kontrolli ovat vertailukelpoisia ja käyttää mahdollisuuksien mukaan sisäisiä kontrolleja tulosten normalisaatioon. Seuraavassa lyhyesti esiteltynä erilaisia tekniikoita.

5.3.1 Entsyymiaktiivisuusmittaukset

Funktionaalisen tuotteen mittaamiseen tarvitaan aktiivisuusmittauksia, joka on räätälöitävä jokaiselle geenille erikseen. Tällaisia ovat esimerkiksi erilaiset zymografiset mittaukset, jossa entsyymien aktiivisuutta mitataan tarjoamalla entsyymille substraattia, jonka hajoamista voidaan seurata värireaktion välityksellä (Snoek-van Beurden, P.A., ja Von den Hoff, J.W., 2005). Tällaiset mittaukset kertovat eniten siitä onko todella geenin aktiivisuudessa tapahtunut muutosta vai näemmekö vain lähetti-RNA:n määrän lisääntymistä ilman, että lopullista funktionaalista tuotetta ilmaantuisi yhtään sen enempää tai vähempää kuin kontrollisakaan.

5.3.2 Proteiinin määrän mittaus

Kaikille geenituotteille ei voida tehdä aktiivisuusmittauksia vaan on tyydyttävä mittaamaan proteiinin määrää esim. Western-blot menetelmällä (Towbin, H. ym., 1979). Proteiinin määrää voidaan mitata myös kolorimetrisesti värireaktion välityksellä (ELISA) (Kemeny, D.M., ja Challacombe, S.J., 1988). Fosforyloituneen proteiinin määrää voidaan myös mitata Western-blot menetelmällä käyttämällä vasta-aineita, jotka tunnistavat fosforyloituneen pintarakenteen. Proteiinin määrän määrittäminen antaa jo varsin hyvän kuvan siitä onko jokin tietty prosessi aktivoitunut. Fosforylaatiotason määrittäminen kertoo mahdollisesti vielä tarkemmin siitä onko kyseinen proteiini mahdollisesti aktivoitunut tai inhiboitunut.

5.3.3 Lähetti-RNA:n määrän mittaus

Lähetti-RNA:n määrän tarkempaan mittaukseen on käytettävissä myös useita menetelmiä, joista herkin on kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR-menetelmä (Ståhberg, A. ym., 2004). Templaatin määrä PCR reaktion alussa määrittää sen kuinka nopeasti PCR-reaktio saavuttaa eksponentiaalisen tuotteen monistumisen. Fluoresoivien väriaineiden avulla voidaan seurata tuotteen kiertymistä näyte-cDNA:ta tai kontrolli-cDNA:ta sisältävässä PCR-reaktiossa. Tuotteen kiertymisnopeudesta voidaan ekstrapoloida se kummassa reaktiossa (näytteessä vai kontrollissa) on ollut enemmän templaattia alussa. Menetelmä on herkkä teknisille virhelähteille, joten sisäiset kontrollit ovat ehdottoman tärkeitä tässä menetelmässä.

Tarkempaa tietoa lähetti-RNA:n lokalisaatiosta aivokudoksessa saadaan käyttämällä *in situ* -hybridisaatiomenetelmää (Wisden, W., ja Morris, B.J., 2002), jossa lasialustalle kiinnitettyjen kudosleikkeiden päälle esitellään lähetti-RNA:lle komplementaarinen koetin eli cDNA-koetin tai cRNA-koetin. Koetin voi olla leimattu joko radioaktiivisesti tai fluoresoivalla signaalimolekyylillä. Kudosleikkeessä olevaan lähetti-RNA:han hybridisoituneen koettimen määrä tietyissä kohdissa kudosleikettä voidaan sitten mitata autoradiografisesti tai fluorometrisesti.

Lähetti-RNA mittaukset antavat hyvän käsityksen siitä onko DNA-sirulla oleva sekvenssi todellakin mitannut tutkittavaa geeniä. Lisäksi näillä menetelmillä voidaan lähestyä kysymystä siitä onko mahdollisesti jokin tietty vaihtoehdoisen silmukoinnin tuote lisääntynyt lääkeainekäsittelyssä.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä työssä käytetty DNA-sirualusta on vuodelta 2000 ja tuolloin DNA-sirujen käyttö oli vasta alussa ja sirualustan teknisessä toteutuksessa oli vielä puutteita. Tästä huolimatta työskentely DNA-sirujen parissa jo näinkin varhaisessa vaiheessa on auttanut ymmärtämään tekniikan mahdollisuudet ja haasteet DNA-sirukokeissa. Monia seikkoja, joita ei välttämättä tulisi nykyään ottaneeksi huomioon, on ollut helpompi havaita, kun on päässyt seuraamaan DNA-siru tekniikan kehitystä.

Aineistosta saatiin esille useita jo antipsykoottisten lääkkeiden vaikutusmekanismeihin liitettyjä piirteitä ja tämän pohjalta voidaan todeta, että menetelmä pystyy mittaamaan lääkeaineiden vaikutusta aivokudoksen geenien ilmenemiseen. Tällaisenaan koe ei riitä kertomaan klotsapiinin vaikutusmekanismista mitään kiistatonta, mutta antaa hyvin pohjaa jatkotutkimuksia varten. Antipsykoottisten lääkkeiden vaikutusmekanismeista on olemassa suuri kirjo erilaisia teorioita ja jääkin nähtäväksi pystytäänkö löytämään jotain yhteistä erityyppisten lääkkeiden vaikutusmekanismeista. On toivottavaa, että kumuloituvasta geenien ilmenemisaineistosta alkaisi lopulta hahmottua kiistattomia todisteita jonkin tietyn molekyylibiologisen funktion osuudesta antipsykoottisten lääkkeiden vaikutusmekanismeihin ja mahdollisesti tätä kautta myös skitsofrenian etiologiakin alkaa selvitä.

LÄHDELUETTELO

- Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., sekä Moreno, R.F. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*. 252:1651-1656.
- Alimohamad, H., Sutton, L., Mouyal, J., Rajakumar, N., sekä Rushlow, W.J. 2005. The effects of antipsychotics on beta-catenin, glycogen synthase kinase-3 and dishevelled in the ventral midbrain of rats. *J.Neurochem*. 95:513-525.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., sekä Sherlock, G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat.Genet*. 25:25-29.
- Baron, M. 2001. Genetics of schizophrenia and the new millennium: progress and pitfalls. *Am.J.Hum.Genet*. 68:299-312.
- Beasley, C., Cotter, D., sekä Everall, I. 2002. An investigation of the Wnt-signalling pathway in the prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Schizophr.Res*. 58:63-67.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C.A., Causton, H.C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F.C., Kim, I.F., Markowitz, V., Matese, J.C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze-Kremer, S., Stewart, J., Taylor, R., Vilo, J., sekä Vingron, M. 2001. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat.Genet*. 29:365-371.
- Brooks, E.M., Sheflin, L.G., sekä Spaulding, S.W. 1995. Secondary structure in the 3' UTR of EGF and the choice of reverse transcriptases affect the detection of message diversity by RT-PCR. *BioTechniques*. 19:806-12, 814-5.
- Cannon, T.D., Kaprio, J., Lonqvist, J., Huttunen, M., sekä Koskenvuo, M. 1998. The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort. A population-based modeling study. *Arch.Gen.Psychiatry*. 55:67-74.
- Chomczynski, P., ja Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem*. 162:156-159.
- Choudhary, J., ja Grant, S.G. 2004. Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nat.Neurosci*. 7:440-445.
- Cleveland, W.S. 1979. Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots. *Journal of the American Statistical Association*. 74:829-836.
- Cussac, D., Duqueyroi, D., Newman-Tancredi, A., sekä Millan, M.J. 2002. Stimulation by antipsychotic agents of mitogen-activated protein kinase (MAPK) coupled to cloned, human (h)serotonin (5-HT)(1A) receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 162:168-177.
- Draghici, S., Khatri, P., Bhavsar, P., Shah, A., Krawetz, S.A., sekä Tainsky, M.A. 2003. Onto-Tools, the toolkit of the modern biologist: Onto-Express, Onto-Compare, Onto-Design and Onto-Translate. *Nucleic Acids Res*. 31:3775-3781.

- Dudoit, S., Yang, Y.,H., Callow, M.,J., sekä Speed, T.,P. 2000. *Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments.. Department of Statistics, University of California at Berkeley Publication.*
- Fare, T.L., Coffey, E.M., Dai, H., He, Y.D., Kessler, D.A., Kilian, K.A., Koch, J.E., LeProust, E., Marton, M.J., Meyer, M.R., Stoughton, R.B., Tokiwa, G.Y., sekä Wang, Y. 2003. Effects of atmospheric ozone on microarray data quality. *Anal.Chem.* 75:4672-4675.
- Florijn, W.J., Tarazi, F.I., sekä Creese, I. 1997. Dopamine receptor subtypes: differential regulation after 8 months treatment with antipsychotic drugs. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 280:561-569.
- Fodor, S.P., Read, J.L., Pirrung, M.C., Stryer, L., Lu, A.T., sekä Solas, D. 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science.* 251:767-773.
- Gerard, G.F., Fox, D.K., Nathan, M., sekä D'Alessio, J.M. 1997. Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Mol.Biotechnol.* 8:61-77.
- Golub, T.R., Slonim, D.K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., Coller, H., Loh, M.L., Downing, J.R., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D., sekä Lander, E.S. 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* 286:531-537.
- Gunther, E.C., Stone, D.J., Gerwien, R.W., Bento, P., sekä Heyes, M.P. 2003. Prediction of clinical drug efficacy by classification of drug-induced genomic expression profiles in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100:9608-9613.
- Harbig, J., Sprinkle, R., sekä Enkemann, S.A. 2005. A sequence-based identification of the genes detected by probesets on the Affymetrix U133 plus 2.0 array. *Nucleic Acids Res.* 33:e31.
- Harrison, P.J., ja Weinberger, D.R. 2005. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol.Psychiatry.* 10:40-68; image 5.
- Heikkinen, E., Korpi, M., Mattila, K., Porali, I., sekä Vihinen, M. 2002. Bioinformatiikan sanasto.
- Jablensky, A., Sartorius, N., Ernberg, G., Anker, M., Korten, A., Cooper, J.E., Day, R., sekä Bertelsen, A. 1992. Schizophrenia: manifestations, incidence and course in different cultures. A World Health Organization ten-country study. *Psychol.Med.Monogr.Suppl.* 20:1-97.
- Järvinen, A.K., Hautaniemi, S., Edgren, H., Auvinen, P., Saarela, J., Kallioniemi, O.P., sekä Monni, O. 2004. Are data from different gene expression microarray platforms comparable? *Genomics.* 83:1164-1168.
- Kanehisa, M. 1997. A database for post-genome analysis. *Trends Genet.* 13:375-376.
- Kanehisa, M., ja Goto, S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28:27-30.
- Kapur, S., ja Mamo, D. 2003. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry.* 27:1081-1090.
- Kemeny, D.M., ja Challacombe, S.J. 1988. ELISA and other solid phase immunoassays : theoretical and practical aspects. John Wiley & Sons, Chichester. 367 pp.
- Khatri, P., ja Draghici, S. 2005. Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics.*

- Khatri, P., Draghici, S., Ostermeier, G.C., sekä Krawetz, S.A. 2002. Profiling gene expression using onto-express. *Genomics*. 79:266-270.
- Khatri, P., Sellamuthu, S., Malhotra, P., Amin, K., Done, A., sekä Draghici, S. 2005. Recent additions and improvements to the Onto-Tools. *Nucleic Acids Res.* 33:W762-5.
- Kitlinska, J., ja Wojcierowski, J. 1995. RNA isolation from solid tumor tissue. *Anal.Biochem.* 228:170-172.
- Knight, J. 2001. When the chips are down. *Nature*. 410:860-861.
- Knuutila, J.E.A., Törönen, P., sekä Castrén, E. 2004. Effects of antidepressant drug imipramine on gene expression in rat prefrontal cortex. *Neurochem.Res.* 29:1235-1244.
- Kontkanen, O., Törönen, P., Lakso, M., Wong, G., sekä Castrén, E. 2002. Antipsychotic drug treatment induces differential gene expression in the rat cortex. *J.Neurochem.* 83:1043-1053.
- Kyosseva, S.V. 2004. Differential expression of mitogen-activated protein kinases and immediate early genes fos and jun in thalamus in schizophrenia. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry.* 28:997-1006.
- Lee, J., Hever, A., Willhite, D., Zlotnik, A., sekä Hevezi, P. 2005. Effects of RNA degradation on gene expression analysis of human postmortem tissues. *FASEB J.*
- Lidow, M.S. 2003. Calcium signaling dysfunction in schizophrenia: a unifying approach. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 43:70-84.
- Lidow, M.S., Williams, G.V., sekä Goldman-Rakic, P.S. 1998. The cerebral cortex: a case for a common site of action of antipsychotics. *Trends Pharmacol.Sci.* 19:136-140.
- Lipshutz, R.J., Fodor, S.P., Gingeras, T.R., sekä Lockhart, D.J. 1999. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat.Genet.* 21:20-24.
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., sekä Brown, E.L. 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat.Biotechnol.* 14:1675-1680.
- Middleton, F.A., Peng, L., Lewis, D.A., Levitt, P., sekä Mirnics, K. 2005. Altered expression of 14-3-3 genes in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 30:974-983.
- Nimetön 2005. PubMed®, the U.S. National Library of Medicine's (NLM™) journal literature search system.
- Nuwaysir, E.F., Huang, W., Albert, T.J., Singh, J., Nuwaysir, K., Pitas, A., Richmond, T., Gorski, T., Berg, J.P., Ballin, J., McCormick, M., Norton, J., Pollock, T., Sumwalt, T., Butcher, L., Porter, D., Molla, M., Hall, C., Blattner, F., Sussman, M.R., Wallace, R.L., Cerrina, F., sekä Green, R.D. 2002. Gene expression analysis using oligonucleotide arrays produced by maskless photolithography. *Genome Res.* 12:1749-1755.
- Park, T., Yi, S.G., Lee, S., sekä Lee, J.K. 2005. Diagnostic plots for detecting outlying slides in a cDNA microarray experiment. *BioTechniques.* 38:463-471.
- Pelkonen, O., ja Ruskoaho, H. 1998. Skitsofrenian ja muiden psykoosien hoitoon käytettävät lääkkeineet. : Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Duodecim, Helsinki. 545-554.
- Ramdas, L., Coombes, K.R., Baggerly, K., Abruzzo, L., Highsmith, W.E., Krogmann, T., Hamilton, S.R., sekä Zhang, W. 2001. Sources of nonlinearity in cDNA microarray expression measurements. *Genome Biol.* 2:RESEARCH0047.

- Saha, S., Chant, D., Welham, J., sekä McGrath, J. 2005. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med.* 2:e141.
- Sartorius, N., Jablensky, A., Korten, A., Ernberg, G., Anker, M., Cooper, J.E., sekä Day, R. 1986. Early manifestations and first-contact incidence of schizophrenia in different cultures. A preliminary report on the initial evaluation phase of the WHO Collaborative Study on determinants of outcome of severe mental disorders. *Psychol.Med.* 16:909-928.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., sekä Brown, P.O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 270:467-470.
- Shalon, D., Smith, S.J., sekä Brown, P.O. 1996. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.* 6:639-645.
- Shi, L., Tong, W., Su, Z., Han, T., Han, J., Puri, R.K., Fang, H., Frueh, F.W., Goodsaid, F.M., Guo, L., Branham, W.S., Chen, J.J., Xu, Z.A., Harris, S.C., Hong, H., Xie, Q., Perkins, R.G., sekä Fuscoe, J.C. 2005. Microarray scanner calibration curves: characteristics and implications. *BMC Bioinformatics.* 6 Suppl 2:S11.
- Singh-Gasson, S., Green, R.D., Yue, Y., Nelson, C., Blattner, F., Sussman, M.R., sekä Cerrina, F. 1999. Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat.Biotechnol.* 17:974-978.
- Snoek-van Beurden, P.A., ja Von den Hoff, J.W. 2005. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques.* 38:73-83.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98:503-517.
- Ståhberg, A., Håkansson, J., Xian, X., Semb, H., Pfaffl, M.W., Åman, P., sekä Kubista, M. 2004. Advanced quantitative real-time PCR in clinical diagnostics and cDNA micro-array validation. *Symposium Abstracts: 1st International qPCR Symposium & Application Workshop.*
- Tirri, R., Lehtonen, J., Lemmettyinen, R., Pihakaski, S., sekä Portin, P. 1995. Biologian sanakirja. Otava, Helsinki. 607 pp.
- Towbin, H., Staehelin, T., sekä Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76:4350-4354.
- Törönen, P. 2004. Selection of informative clusters from hierarchical cluster tree with gene classes. *BMC Bioinformatics.* 5:32.
- Wagatsuma, A., Sadamoto, H., Kitahashi, T., Lukowiak, K., Urano, A., sekä Ito, E. 2005. Determination of the exact copy numbers of particular mRNAs in a single cell by quantitative real-time RT-PCR. *J.Exp.Biol.* 208:2389-2398.
- Walt, D.R. 2000. Techview: molecular biology. Bead-based fiber-optic arrays. *Science.* 287:451-452.
- Wang, H., He, X., Band, M., Wilson, C., sekä Liu, L. 2005. A study of inter-lab and inter-platform agreement of DNA microarray data. *BMC Genomics.* 6:71.
- Watson, J.D., ja Crick, F.H. 1953. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 171:737-738.

Wei, C., Li, J., sekä Bumgarner, R.E. 2004. Sample size for detecting differentially expressed genes in microarray experiments. *BMC Genomics*. 5:87.

Wei, Q., Liu, S., Huang, J., Mao, X., Chu, X., Wang, Y., Qiu, M., Mao, Y., Xie, Y., sekä Li, Y. 2004. Comparison of hybridization behavior between double and single strands of targets and the application of asymmetric PCR targets in cDNA microarray. *J.Biochem.Mol.Biol.* 37:439-444.

Wisden, W., ja Morris, B.J. 2002. In situ hybridization protocols for the brain. Academic Press, Amsterdam. 272 pp.

Wray, G.A., Hahn, M.W., Abouheif, E., Balhoff, J.P., Pizer, M., Rockman, M.V., sekä Romano, L.A. 2003. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol.Biol.Evol.* 20:1377-1419.

Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., sekä Speed, T.P. 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* 30:e15.

LIITE 1: DNA-SIRUN TEKNISET TIEDOT

Tuote 1:

Atlas™ Glass Rat 1.0 Microarray, CLONTECH Laboratories Inc.

(markkinoille heinäkuussa 2000)

Tuotenumero:

7902-1

Tuotekuvaus:

Atlas Glass Rat 1.0 Microarray sisältää 1081 rotan DNA-fragmenttia, yhdeksän ylläpitogeeniä sekä negatiivi ja positiivi kontrolleja kiinnitettynä mikroskooppilasille. Pakkaus sisältää kaksi identtistä Atlas lasia, sekä sekoituksen spesifisiä alukkeita cDNA-synteesiä varten.

Pakkauksen sisältö:

- *Atlas Glass Array* käyttäjän opas (PT3453-1)
- *Atlas Glass Rat 1.0 Microarray* geenilista (PT3572-3)

Laatikko 1.:

- 2 × *Atlas Glass Rat 1.0 Microarray* (Atlas Glass hybridisaatio säiliöiden sisällä)
- 50 ml *GlassHyb™* hybridisaatioliuosta
- 200 ml *GlassHyb™* pesuliuosta
- 4 Pesu säiliötä

Laatikko 2.:

- 25 µl *Glass Rat 1.0 CDS Primer Mix* (Aluke seos)

Säilytys

- *CDS Primer Mix* -20°C
- *GlassHyb* hybridisaatioliuos ja pesuliuos huoneenlämmössä ja pimeässä
- Muut reagenssit huoneenlämmössä

Laadun tarkastus

Rotan aivojen totaali-RNA:sta valmistetulla Cy3 leimatulla cDNA-koettimella saatiin oletettu hybridisaatiokuvio *Atlas Glass Array*:lla.

Huomautus:

Kaikki mahdollinen on tehty, jotta sekvenssit jotka tälle sirulle on applikoitu olisivat oikeita. Perustuen laaduntarkkailuumme alle yksi prosentti sekvensseistä tällä lasilla on puutteellisesti/väärin syntetisoituja.

Tuote 2:

Atlas™Glass Fluorescent Labeling Kit, CLONTECH Laboratories Inc.

(markkinoille helmikuussa 2000)

Tuotenumero:

K1037-1 (10 reaktiota)

Tuotekuvaus:

Atlas™Glass Fluorescent Labeling Kit sisältää reagenssit korkealaatuisen fluoresoidusti leimatun cDNA-koettimen synteesiin ja puhdistukseen lasi DNA-siruja varten. Pakkauksen reagenssit on optimoitu käytettäväksi *Atlas™ Glass Microarray* tuotteiden kanssa, mutta ovat myös soveltuvia muihin DNA-siru systeemeihin.

Sisältö:

Laatikko 1.:

- 25 µl MMLV käänteiskopiointientsyymiä (200 yksikköä/µl)
- 50 µl 10×dNTP-seosta (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, aminoallyyli-dUTP)
- 100 µl 5×cDNA-synteesipuskuria
- 100 µl 2×Fluoresenssileimauspuskuria
- 5 µl RNase H (10 yksikköä/µl)
- 20 µg Ihmisen istukan totaali RNA-kontrolli (1 µg/µl)
- 10 µl cDNA-synteesikontrolli
 - 0,1 µg/µl RNA (bakteriofagi λ:n DNA:sta syntetisoitu)
 - 0,1 µM cDNA-synteesialuke
- 5 µl Kiinnitysreaktio kontrolli oligo (0,1 µM)
- 3 ml Deionisoitua vettä

Laatikko 2.:

- 340 µl Natriumasetaatti (NaOAc; 3 M, pH 5,5)
- 500 µl DMSO
- 200 µl *QuickClean* puhdistus hartsia
- 0,45 µm linkous filteriä + keräysputket
- 1 *Atlas NucleoSpin®* eristyspakkaus
 - *NucleoSpin* eristys linkous pylväitä
 - 2 ml keräysputkia
 - NT2 puskuria
 - NT3 puskuria (lisää 16 ml 95% etanolia ennen käyttöä)
 - NE puskuria

LIITE 2. GEENILISTAT

Genbank tietokannan tunnus	Kerrannais- muutos	Geenin lyhenne	Geenin englanninkielinen nimi	Kalsiumin signaalintireitti	Fokaalinen adheesio	MAPK signaalintireitti	Neuroaktiivinen ligandi-reseptori vuorovaikutus	Tiivislitos	Sytokini-sytokinireseptori vuorovaikutus	Wnt-signaalintireitti
L31619	1,792	Chrna7	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7	•						
L34067	1,781	Gpc1	glypican 1							
M64797	1,769	Pfkfb4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4							
M24105	1,729	Vamp2	vesicle-associated membrane protein 2							
M83678	1,666	Rab13	RAB13, member RAS oncogene family				•			
U07683	1,650	Ugt8	UDP-glucuronosyltransferase 8							
M13979	1,650	Slc2a1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1							
M32167	1,634	Vegf	vascular endothelial growth factor		•					
U17133	1,630	Slc30a1	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1							
U76379	1,613	Slc22a1	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1							
J05460	1,608	Cyp7a1	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1							
M95058	1,588	Srd5a2	steroid 5-alpha-reductase 2							
K02422	1,548	Cyp1a2	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2							
M21208	1,532	Cyp17a1	cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1							
M17526	1,523	Gnao	guanine nucleotide binding protein, alpha o							
D10026	1,511	Gstt2	glutathione S-transferase, theta 2							
M86389	1,503	Hspb1	heat shock 27kDa protein 1			•				
M12516	1,502	Por	P450 (cytochrome) oxidoreductase							
U07952	1,502	Gdi1	guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1							
M26643	1,500	Scn4a	sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha polypeptide							
D32249	1,496	Pja2	praja 2, RING-H2 motif containing							
M84009	1,480	Drd4	dopamine receptor 4				•			
L03554	1,479	Ppp3r1	protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform,type 1	•	•	•			•	
M25890	1,460	Sst	somatostatin				•			
L19699	1,449	Ralb	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B							
D26180	1,448	Pkn1	protein kinase N1							
M60525	1,427	Vgf	VGF nerve growth factor inducible							
K03242	1,417	Mpz	myelin protein zero							
X67654	1,417	Gstt1	glutathione S-transferase theta 1							
X57018	1,417	Fgr	FGR							
J05231	1,415	Chrna5	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 5							
U09870	1,415	Mvp	major vault protein							
U17978	1,412	Slc2a3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3							
M36831	1,409	Drd2	dopamine receptor 2				•			
D83349	1,405	Cdh22	cadherin 22							
M29853	1,401	Cyp4b1	cytochrome P450, family 4, subfamily b, polypeptide 1							
M10149	1,399	Aldob	aldolase B							
D37880	1,398	Tyro3	TYRO3 protein tyrosine kinase 3							
L32591	1,396	Gadd45a	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha		•					
U75581	1,395	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte							
M27812	1,394	Syn1	synapsin I							
M83675	1,393	Mel	mel transforming oncogene (derived from cell line NK14)- RAB8							
J02627	1,391	Cyp2e1	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1							
U97143	1,389	Gfra2	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2							
D31874	1,388	Limk2	LIM motif-containing protein kinase 2							

Genbank tietokannan tunnus	Kerrannais- muutos	Geenin lyhenne	Geenin englanninkielinen nimi	Kalsiumin signaalintireitti	Fokaalinen adheesio	MAPK signaalintireitti	Neuroaktiivinen ligandi-reseptori vuorovaikutus	Tiivishitos	Sytokini-sytokinireseptori vuorovaikutus	Wnt-signaalintireitti
M35991	1,388	Fabp1	fatty acid binding protein 1, liver							
D30040	1,387	Akt1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1		•	•		•		
X77933	1,386	Scnn1g	sodium channel, nonvoltage-gated 1 gamma							
M32748	1,377	Lif	leukemia inhibitory factor						•	
M10072	1,373	Ptpnc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C							
U25651	1,372	Pfkm	phosphofruktokinase, muscle							
L08227	1,372	Chrna6	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 6							
J02791	1,371	Acadm	acetyl-coenzyme A dehydrogenase, medium chain							
AF019973	1,365	Eno2	enolase 2, gamma							
U76205	1,365	Scarb1	scavenger receptor class B, member 1							
D42117	1,363	Tnfrsf8	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8							
J03145	1,356	Slc2a2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2							
X06889	1,356	Rab3a	RAB3A, member RAS oncogene family							
U69278	1,352	Epha3	Eph receptor A3							
L46791	1,350	Ces3	carboxylesterase 3							
J02999	1,349	Rab2	RAB2, member RAS oncogene family							
J03752	1,346	Mgst1	microsomal glutathione S-transferase 1							
M17525	1,346	Gnas	GNAS complex locus	•						
M88595	1,345	Slc6a9	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9							
M92905	1,345	Cacna1b	calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	•						
M31477	1,342	Tacr1	tachykinin receptor 1	•			•			
U27201	1,341	Timp3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3							
J05156	1,337	Cyp11a1	cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1							
D13963	1,336	Grm6	glutamate receptor, metabotropic 6				•			
M22412	1,333	Kcne1	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1							
Y13380	1,332	Bin1	myc box dependent interacting protein 1							
AB000113	1,330	Slc7a3	solute carrier family 7, member 3							
M88751	1,325	Cacnb3	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit							
X97041	1,325	Kcnj11	potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11							
M61875	1,324	Cd44	CD44 antigen							
M15327	1,324	Adh1	alcohol dehydrogenase 1							
D28512	1,323	Syt3	synaptotagmin 3							
D90109	1,322	Acs11	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1							
M24104	1,321	Vamp1	vesicle-associated membrane protein 1							
U09793	1,312	Kras2	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue 2 (active)		•	•		•		
D28498	1,310	Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1		•				•	
L31620	1,307	Chrna4	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4							
D83044	1,306	Slc22a2	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2							
AF007789	1,305	Plaur	plasminogen activator, urokinase receptor							
U63971	1,304	Rhok	rhodopsin kinase							
M33648	1,302	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2							
X81193	1,300	Csrp3	cysteine-rich protein 3							
X52712	-1,303	Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2							
M63334	-1,304	Camk4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	•						
X62908	-1,306	Cfl1	cofilin 1							
U50194	-1,307	Tpp2	tripeptidyl peptidase II							
M64300	-1,311	Mapk1	mitogen activated protein kinase 1		•	•				

Genbank tietokannan tunnus	Kerrannais- muutos	Geenin lyhenne	Geenin englanninkielinen nimi	Kalsiumin signaalintireitti	Fokaalinen adheesio	MAPK signaalintireitti	Neuroaktiivinen ligandi-reseptori vuorovaikutus	Tiivishitos	Sytokini-sytokinireseptori vuorovaikutus	Wnt-signaalintireitti
D82363	-1,313	Psen1	presenilin 1							
M85037	-1,313	Gria4	glutamate receptor, ionotropic, 4				•			
M72422	-1,314	Gad2	glutamate decarboxylase 2							
X71071	-1,315	Cnn1	calponin 1							
U22424	-1,316	Hsd11b2	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2							
M23591	-1,323	Ppp2cb	protein phosphatase 2a, catalytic subunit, beta isoform					•		•
D29683	-1,326	Ece1	endothelin converting enzyme 1							
U03734	-1,326	Ace	angiotensin 1 converting enzyme 1							
AF010464	-1,327	Il7	interleukin 7						•	
X87106	-1,327	Rpl10	ribosomal protein L10							
D38530	-1,327	Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3							
M80633	-1,329	Adcy4	adenylate cyclase 4	•						
D10763	-1,331	Epo	erythropoietin						•	
M19967	-1,333	Anxa1	annexin A1							
L14851	-1,334	Nrxn3	neurexin 3							
U62897	-1,334	Cpd	carboxypeptidase D							
U51153	-1,337	Slc13a2	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate							
M83561	-1,337	Grik1	glutamate receptor, ionotropic, kainate 1				•			
D83598	-1,337	Abcc9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9							
U61696	-1,338	Rnpep	arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)							
U57715	-1,339	Frag1	FGF receptor activating protein 1							
M91562	-1,347	Grin2b	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B				•			
L27112	-1,348	Mapk9	stress activated protein kinase alpha II		•	•				•
L12407	-1,348	Dbh	dopamine beta hydroxylase							
U04738	-1,359	Sstr4	somatostatin receptor 4							
M19007	-1,362	Prkcb1	protein kinase C, beta 1	•	•	•		•		•
M33936	-1,365	Cyp4a14	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide I4							
U32990	-1,371	Lnpep	aminopeptidase Vp165							
L12382	-1,375	Arf3	ADP-ribosylation factor 3							
M84416	-1,379	Ywhae	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation							
M80550	-1,381	Adcy2	adenyl cyclase 2	•						
J03552	-1,384	Mug1	alpha(1)-inhibitor 3, variant I							
U13368	-1,385	Adra1a	adrenergic receptor, alpha 1a	•			•			
M83298	-1,386	Ppp2r2a	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform					•		•
U66478	-1,388	Madh1	MAD homolog 1 (Drosophila)							
L12385	-1,389	Arf6	ADP-ribosylation factor 6							
U51898	-1,401	Pla2g6	phospholipase A2, group VI							
M76705	-1,401	Pcsk1	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1							
U67909	-1,403	Mcpt6	mast cell protease 6							
M88469	-1,413	Sponf	f-spondin							
D64085	-1,413	Fgf5	fibroblast growth factor 5			•				
M91466	-1,414	Adora2b	adenosine A2B receptor	•			•			
J02752	-1,427	Acox1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl							
J02657	-1,433	Cyp2c	Cytochrome P450, subfamily IIC (mephenytoin 4-hydroxylase)							
D23676	-1,449	Reg3a	regenerating islet-derived 3 alpha							
M18335	-1,457	Cyp2c39	cytochrome P450, 2c39							
D88752	-1,463	Ptger1	prostaglandin E receptor 1	•			•			

Genbank tietokannan tunnus	Kerrannais- muutos	Geenin lyhenne	Geenin englanninkielinen nimi	Kalsiumin signaalireitti	Fokaalinen adheesio	MAPK signaalireitti	Neuroaktiivinen ligandi-reseptori vuorovaikutus	Tiivishitos	Sytokini-sytokinireseptori vuorovaikutus	Wnt-signaalireitti	
M58593	-1,468	Psm3	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 3								
AB004454	-1,479	Psen2	presenilin-2								
J02941	-1,479	Ren1	renin 1								
L31883	-1,481	Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1								
M15527	-1,494	Gnrh1	gonadotropin-releasing hormone 1				•				
M31602	-1,497	Cpe	carboxypeptidase E								
L03201	-1,498	Ctss	cathepsin S								
M29275	-1,501	Ppp3ca	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	•	•				•		
U09357	-1,507	Ptprz1	protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1								
U58858	-1,540	Jup	junction plakoglobin								
D63149	-1,547	Slc15a2	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2								
AF007775	-1,547	Aqp8	aquaporin 8								
J02720	-1,548	Arg1	arginase 1								
M16736	-1,549	Gap43	growth associated protein 43								
M85214	-1,568	Ntrk1	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1			•					
M68880	-1,593	Kcnc1	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 1								
D10666	-1,599	Vsn1	visinin-like 1								
L02615	-1,710	Pkia	protein kinase inhibitor, alpha								
J03754	-1,739	Atp2b2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 2	•							
X13817	-1,822	Calm3	calmodulin 3	•							
L12383	-1,841	Arf4	ADP-ribosylation factor 4								
D13125	-1,868	Nvjp2	neural visinin-like Ca ²⁺ -binding protein type 2								
D17615	-1,988	Ywhaz	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation								
L02926	-2,025	Il10	interleukin 10					•			
D13126	-2,026	Hpcal1	neural visinin-like Ca ²⁺ -binding protein type 3								
L27843	-2,126	Ptp4a1	protein tyrosine phosphatase 4a1								
U23443	-2,210	Pak1	p21 (CDKN1A)-activated kinase 1			•					
V01228	-2,440	Calca	calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha								
M75153	-2,454	Rab11a	RAB11a, member RAS oncogene family								
D17445	-2,472	Ywhah	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation								
M31076	-2,526	Tgfa	transforming growth factor alpha								
				Yhteensä	15	7	12	13	6	5	7