

Antti Kiviaho

KEMIKAALIT ANGIOGENEESISSÄ

Differentiaalisen geeniekspression analyysi

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Kandidaatintutkielma
04/2021

TIIVISTELMÄ

Antti Kiviaho: ”Kemikaalit angiogeneesissä – Differentiaalisen geeniekspression analyysi”
Kandidaatintutkielma
Tampereen yliopisto
Bioteknologian tutkinto-ohjelma
04/2021

Verisuonimuodostuksen eli angiogeneesin säätelyllä on elintärkeä rooli kudosten ja kokonaisten organismien kehityksessä. Luonnollisen kehityksen lisäksi myös monet sairaudet ovat riippuvaisia muodostuvista verisuonista. Angiogeneettisiin prosesseihin vaikuttamalla voidaan esimerkiksi pysäyttää syöpäkasvaimen hapensaanti, parantaa sydänkohtauspotilaan ennustetta tai taistella silmänpohjan rappeumaa vastaan. Uusia angiogeneesiä rajoittavia tai edistäviä kemikaaleja etsitään jatkuvasti.

Tässä tutkimuksessa tarkasteltiin 7 eri kemikaalin vaikutusta ihmiskudosperäisen verisuonimallin angiogeneettisiin prosesseihin. Tutkimuksessa hyödynnettiin kemikaaleille altistetusta verisuonimallista eristettyä RNA:ta ja siitä sekvensoimalla tuotettua dataa. Sekvensointidatan analyysillä selvitettiin näytteissä ilmestyvät geenit eli geeniekspressio. Kemikaalien vaikutusta arvioitiin tilastollisen testauksen keinoin vertaamalla kemikaalialtistusnäytteiden ja kontrollinäytteiden geeniekspressiota eri aikapisteissä. Ilmentymiseltään merkitsevästi muuttuneiden eli differentiaalisesti ekspressoituneiden geenien yhteyttä angiogeneesiin tutkittiin edelleen ylirepresentaatioanalyysillä.

Tutkituista kemikaaleista 4 vaikutti merkitsevästi verisuonimallin geeniekspressioon. Ekspressioltaan muuttuneiden geenien todettiin olevan merkitsevästi yhteydessä angiogeneettisiin prosesseihin. Suurin vaikutus sekä geeniekspressioon, että angiogeneettisiin prosesseihin havaittiin haloperidolilla. Myös kversetiinin, reserpiinin ja isotretinoinin vaikutus geeniekspressioon oli merkitsevä, erityisesti pisimmällä aikavertailuvälillä. Tarkempi analyysi kemikaalien vaikutuksen laadusta ja mekanismeista vaativat laajamittaisempaa analyysia.

Avainsanat: angiogeneesi, verisuonimalli, RNA-sekvensointi, differentiaalinen ekspressio, ylirepresentaatioanalyysi, digoksiini, haloperidoli, ibuprofeeni, isotretinoini, kversetiini, reserpiini, valproiinihappo

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ALKUSANAT

Tämä kandidaatintutkielma on tehty Tampereen yliopiston lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunnassa. Tutkielma on tehty osana tutkimusprojektia professori Matti Nykterin laskennallisen biologian tutkimusryhmässä. Kiitän TKT Juha Kesseliä loistavasta ohjauksesta ja laskennallisen biologian menetelmien opettamisesta. Kiitän prof. Nykteriä kannustavasta ilmapiiristä ja mielenkiintoisesta tutkielman aiheesta. Kiitos myös FICAM-tutkimusinstituutin prof. Tuula Heinoselle ja FT Tarja Toimelalle suostumuksesta käyttää tutkielmassa FICAM:n dataa.

Tampereella, 19.4.2021

Antti Kiviaho

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	4
1.1 Angiogeneesi	4
1.2 RNA-sekvensointi ja differentiaalinen geeniekspressio	4
2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	5
2.1 Data ja sen valmistelu	5
2.2 Differentiaalisen geeniekspression analyysi	6
2.3 Ylirepresentaatioanalyysi	7
3. TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	8
3.1 Datan ominaisuudet	8
3.2 Differentiaalisesti ekspressoituneet geenit	9
3.3 Vaikutus angiogeneettisiin prosesseihin	10
4. YHTEENVETO	11
5. LÄHTEET	12

1. JOHDANTO

1.1 Angiogeneesi

Angiogeneesi eli verisuonten kehittyminen jo olemassa olevista verisuonista on tärkeä osa biologisten organismien kudoksen kehitystä. Se on tarkkaan säädelty hierarkkinen prosessi, jota lukuisat eri kasvutekijät ja viestimolekyylit edistävät ilmentymällä oikea-aikaisesti. Ketjureaktion omassa tapahtumasarjassa säätelyketjun alkupään geenien ekspressio on erityisen kriittisessä roolissa.

Nykykäsityksen mukaan angiogeneesiä tapahtuu pääsääntöisesti haarautumalla (Carmeliet ja Jain 2011, Senger ja Davis 2011). Haarautuvassa angiogeneesissä (sprouting angiogenesis) kudoksen hapenpuute laukaisee vaskulaaristen endoteelikasvutekijöiden (vascular endothelial growth factor, VEGF) ilmentymisen. Tämä stimuloi läheisen verisuonen endoteelisoluja, jotka aloittavat jakautumisen kohti kasvutekijöitä ilmentävää kudosta. Samanaikaisesti endoteelisolut ilmentävät ympäröivää kudosta hajottavia proteaaseja, jotka mahdollistavat verisuonen tunkeutumisen sitä ympäröivän tyvikalvon läpi.

Kudoksen kehittymisen kannalta elintärkeä angiogeneesi on myös patologistesti merkittävä tapahtuma (Carmeliet ja Jain 2011). Tavallisen kudoksen tapaan myös haitallinen kudos, kuten erilaiset syöpäkasvaimet, tarvitsevat happea. Ilman kattavaa verisuonitusta kasvain voi levittäytyä vain hyvin rajatulle alueelle ja on näin ollen riippuvainen angiogeneesistä. Hallitsematon angiogeneesi edesauttaa lukuisia haitallisia kudostransformaatioita, joilla on havaittu yhteys ainakin sydänkohtauksiin, moniin syöpätyyppeihin, silmäsairauksiin, sekä erilaisiin immuunisairauksiin (Folkman 2007).

Kliinisen merkittävyytensä vuoksi angiogeneesi on tärkeä lääketutkimuksen ja -kehityksen kohde. Tarve tutkia erilaisten kemikaalien toimintaa verisuoniympäristössä on synnyttänyt erilaisia tapoja mallintaa ihmisen verisuonistoa (Kim ym. 2013, Nguyen ym. 2013). Lukuisat *in vitro* kudostallit ovat kehittyneet nopeasti viimeisten vuosien aikana ja täten nousseet eläinmallien rinnalle prekliinisen lääkeainetestauksen vaihtoehdona (Song ym. 2018). Nopeasta kehityksestä huolimatta kudostalleilla prekliinisessä vaiheessa saavutetut tulokset korreloivat kuitenkin vielä heikosti kliinisen vaiheen tulosten kanssa (Khalil ym. 2020).

1.2 RNA-sekvensointi ja differentiaalinen geeniekspressio

2000-luvun aikana nopeasti yleistynyt RNA-sekvensointi on tutkimusmenetelmä, jolla voidaan mitata organismien geeniekspressiota (Reuter ym. 2015). Se perustuu tutkittavasta näytteestä eristettävien lähetti-RNA (mRNA) molekyylien määrän mittaamiseen. Yleisimmin käytetyssä metodissa

näytteistä eristetty RNA pilkotaan, muunnetaan käänteisellä transkriptiolla DNA:ksi ja sekvensoidaan hyödyntämällä fluoresoituja nukleotideja sekä DNA-replikaatiota (Bentley ym. 2008). Sekvensoidut DNA fragmentit linjataan referenssigenomiin, jonka perusteella voidaan erotella geeneistä transkriptiossa muodostuneet mRNA-molekyylit totaali-RNA:sta (Dobin ym. 2013). Laskemalla jokaista geeniä vastaavien transkriptien määrä saadaan kvantitatiivista geeniekspressiodataa, jonka perusteella voidaan tehdä päätelmiä tutkittavan näytteen sisäisistä biologisista prosesseista.

Pelkistä geenien hetkellisistä ekspressiotasoista on yhä vaikeaa tehdä laajamittaisia päätelmiä. Informatiivisempaa on muodostaa vertailuja esimerkiksi eri aikapisteiden välille. Tällaisten vertailujen tueksi on kehitetty lukuisia laskennallisia työkaluja, jotka hyödyntävät matemaattisia malleja ja tilastollisia testausmenetelmiä merkitsevien erojen havaitsemiseksi (Robinson ym. 2010, Love ym. 2014, Ritchie ym. 2015).

Valikoimalla geenit muutoksen voimakkuuden sekä tilastollisen merkitsevyyden mukaan voidaan valtavasta geenimäärästä suodattaa vain muutamien kymmenien tai satojen merkitsevästi muuttuneiden geenien lista. Tätä listaa voidaan edelleen verrata johonkin biologiseen prosessiin liittyvien geenien joukkoon ja tämän avulla määrittää, ovatko ekspressioltaan muuttuneet geenit kytköksissä tutkittavaan prosessiin (Subramanian ym. 2005).

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on tarkastella 7 eri kemikaalin vaikutusta verisuonimallissa tapahtuviin angiogeneettisiin prosesseihin. Kemikaalien vaikutusta arvioidaan tilastollisella testillä, jolla testataan kemikaalialtistusnäytteissä tapahtuvaa aikapisteiden välistä geeniekspression muutosta kontrollinäytteessä tapahtuvaan muutokseen suhteutettuna. Merkitsevästi muuttuneiden geenien yhteyttä angiogeneettisiin prosesseihin tutkitaan ylirepresentaatioanalyysia käyttäen.

Tutkimuksessa käytetään Finnish Centre for Alternative Methods (FICAM) asiantuntijakeskuksen dataa, joka on tuotettu keskuksen kehittämää *in vitro* verisuonimallia käyttäen (Huttala ym. 2015). Malli perustuu ihmiskudosperäisten solujen yhteisviljelmiin.

2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 Data ja sen valmistelu

Analyysin datana käytettiin kvantitatiivista geeniekspressiodataa FICAM:n verisuonimallin 7 eri kemikaalin altistustesteistä. Testeissä RNA:n määrä mitattiin altistusnäytteissä 3 ja kontrollissa 4 eri aikapisteessä. Replikaatteja oli yhdessä näytekategoriassa 4 (kversetiini, päivä 1), muissa 3.

Data oli kirjoitettu 60669 x 76 ekspressiomatriisiin, jonka yksi rivi vastasi yhtä geeniä ja yksi sarake yhtä näytettä. Jokaisessa matriisin solussa oli kokonaisluku, joka vastasi kyseisen geenin sekvensoimalla laskettujen mRNA-molekyylien lukumäärää. Tämän lisäksi analyysissä käytettiin toista, 76 näytteen metatiedot sisältävää matriisia.

Ekspressiomatriisin geenit suodatettiin kahta eri kriteeriä käyttäen. Ensimmäinen suodatus tehtiin geenin biologisen funktion perusteella käyttämällä biomaRt portaalia (Smedley ym. 2015). Jatkoanalyysiin kelpuutettiin vain geenit, jotka oli merkitty proteiinia koodaaviksi ensembl-tietokannassa (Yates ym. 2020). Toisen suodatuksen kriteerinä oli sekvensoimalla määritettyjen mRNA-molekyylien määrä. Geenit, joiden keskiarvo oli alle 5 suodatettiin pois. Suodatuksen tarkoituksena oli poistaa vain vähän informaatiota sisältävät geenit jatkoanalyysistä.

Data normalisoitiin DESeq2-ohjelmiston parametrissa dispersioestimaatiota hyödyntävällä *vst*-funktiolla (Love ym. 2014). Normalisoidut näytteet piirrettiin 2-ulotteiseen koordinaatistoon käyttämällä pääkomponenttianalyysia (PCA) dimension redusointitekniikkana. Menetelmällä pyrittiin hahmottamaan replikaattien keskinäisiä suhteita, sekä arvioimaan lääkeainealtistusnäytteiden ja kontrollien geeniekspression kehityksen eroa eri aikapisteissä. PCA:n tarkoituksena oli ensisijaisesti näytteiden laadullinen arviointi, ei yksittäisten geenien tunnistaminen.

2.2 Differentiaalisen geeniekspression analyysi

Eri näytteiden välillä differentiaalisesti ilmentyneiden geenien tilastollinen testaaminen suoritettiin DESeq2 ohjelmistoa käyttäen (Love ym. 2014). Ohjelmiston menetelmä perustuu yleistettyyn lineaariseen malliin, jossa data sovitetaan negatiiviseen binomijakaumaan. Testi suoritettiin laskemalla ensin kemikaalialtistusnäytteen kahden aikapisteen välinen geeniekspression muutos. Vastaavan aikapistevälin yhden geenin ekspression muutos laskettiin myös kontrollinäytteessä. Näiden kahden muutoksen suhteelle suoritettiin Waldin testi (Kuva 1). Nollahypoteesi oli, että geeniekspression muutos on yhtä suuri tutkittavan kemikaalialtistusnäytteen ja kontrollin vastaavan aikaväliverailun kohdalla.



Kuva 1: Kaavakuva yksittäisen geenin muutoksen testaamisesta.

Geeniekspression muutosta testattiin jokaisen näytteen jokaisen geenin kohdalla kolmen eri aikapisteen välillä. Lopputuloksena jokaiselle testille oli mittaustason ja vertailutason osamäärän 2-kantainen logaritmi (\log_2FC) sekä Waldin testin Benjamini-Hochberg menetelmällä korjattu p-arvo (Benjamini & Hochberg 1995).

Testin tunnuslukujen perusteella määritettiin merkitsevästi differentiaalisesti ekspressoituneet geenit (DE-geenit). Kriteereinä käytettiin testin korjattua p-arvoa ($< 0,05$), sekä ekspressiotason muutosta ($\log_2FC > 1$ tai $\log_2FC < -1$).

2.3 Ylirepresentaatioanalyysi

Ylirepresentaatioanalyysi suoritettiin käyttämällä Fisherin tarkkaa testiä kahden populaation dikotomiseen muuttuunaan. Analyysissa verrattiin toisiinsa kaikkien proteiinia koodaavien geenien ja merkitsevästi muuttuneiden geenien joukkoja 10 GO-BP-termin (Gene Ontology, Biological Process) osalta (Ashburner ym. 2000, The Gene Ontology Consortium 2019). Merkitsevästi yliedustetun termin kynnysehtona käytettiin BH-menetelmällä korjattua p-arvoa ($< 0,05$).

Kymmenen termin joukkoon valittiin angiogeneesiin ja sen säätelyyn liittyviä GO-BP-termejä (taulukko 1). Termit jaettiin kahteen kategoriaan: Angiogeneesiin ja sen säätelyyn (1A-F), sekä haarautuvaan angiogeneesiin ja sen säätelyyn (2A-F). Säätelyyn liittyvistä termeistä valittiin oleellisesti solumigraatioon vaikuttavat termit kyseisen prosessin korkean biologisen merkittävyyden vuoksi.

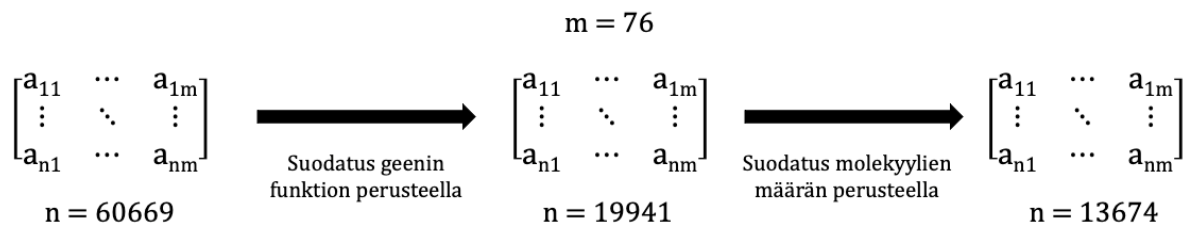
Taulukko 1 Kymmenen valittua angiogeneesiin liittyvää GO-BP-termiä.

Tunniste	Termin nimi	Geenien lkm.
1A	angiogenesis	545
1B	positive regulation of angiogenesis	176
1C	negative regulation of angiogenesis	133
1D	positive regulation of blood vessel endothelial cell migration	54
1E	negative regulation of blood vessel endothelial cell migration	46
2A	sprouting angiogenesis	128
2B	positive regulation of sprouting angiogenesis	46
2C	negative regulation of sprouting angiogenesis	29
2D	positive regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis	22
2E	negative regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis	15

3. TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

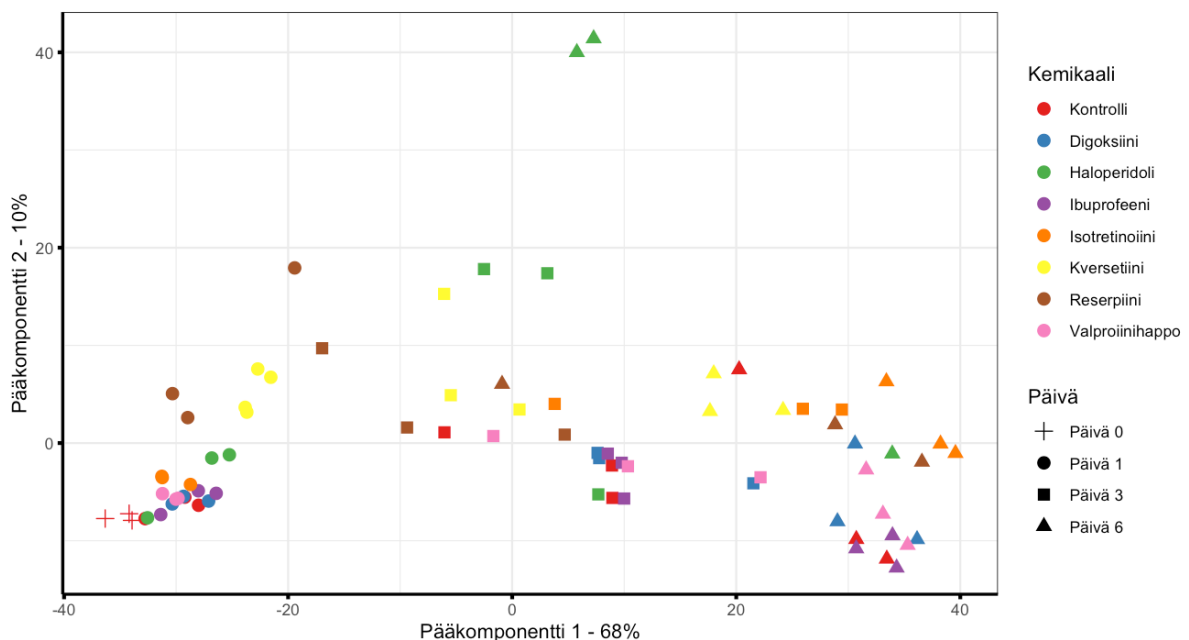
3.1 Datan ominaisuudet

Ekspressiomatriisin ensimmäisen geenisuodatuksen jälkeen geneejiä oli jäljellä 19941 ja toisen jälkeen 13674 (Kuva 2). Biologisen funktion perusteella geneeistä sivuutettiin n. 67% ja näistä edelleen transkriptien määrän perusteella n. 31%. Sarakkeiden, eli näytteiden määrä oli vakio, 76.



Kuva 2 Kaavakuva ekspressiomatriisin suodatuksen vaiheista.

Pääkomponenttianalyysin tulosten perusteella piirrettiin näytteiden keskinäisiä suhteita kuvaava kaksiulotteinen esitys (Kuva 3). Kuvassa pääkomponentti 1 on vaaka-akselilla ja pääkomponentti 2 on pystyakselilla. Nämä kaksi ensimmäistä pääkomponenttia selittävät 78% datan varianssista. Kuvaajassa on havaittavissa trendi, jossa varhaisemmat aikapisteet ovat koordinaatiston vasemmassa reunassa ja myöhäisemmät oikeassa. Replikaattien väliset etäisyydet ovat paikoittain suuria. Erityisesti hajontaa esiintyy haloperidolin kuudennen päivän näytteissä.

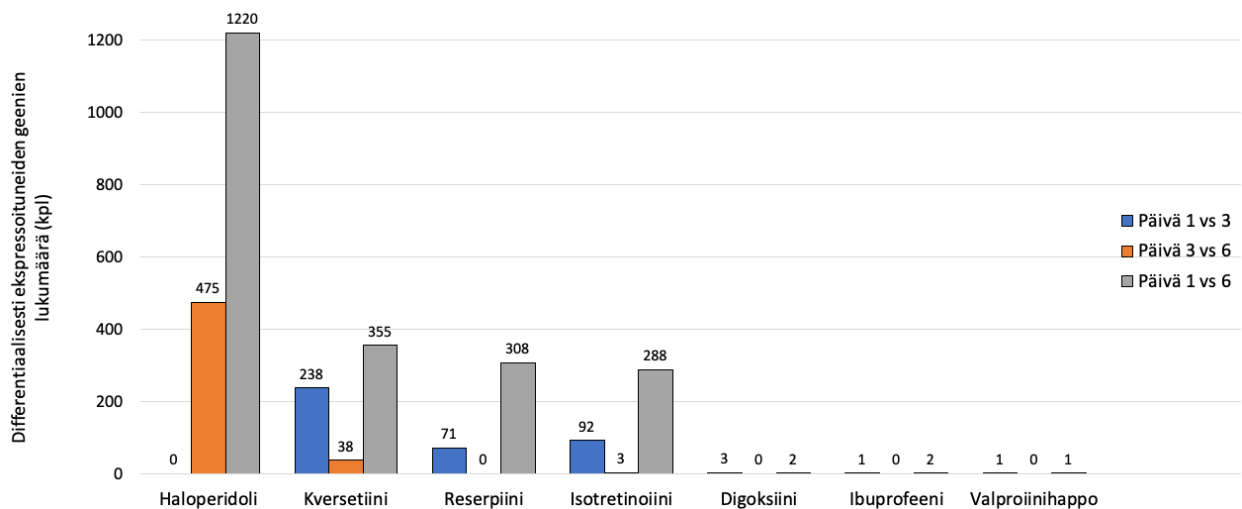


Kuva 3 Datasetin näytteet kaksiulotteisessa avaruudessa pääkomponenttien avulla esitettynä.

Kontrollien replikaattien välillä on havaittavissa jonkin verran hajontaa aikapisteissä 3 ja 6. Erot kontrollinäytteiden ja vastaavan päivän kemikaalinäytteiden välillä ovat pitkälti tulkinnanvaraisia. Ainakin kversetiinin päivien 1 ja 3, reserpiinin päivän 3, sekä haloperidolin päivien 3 ja 6 näytteet ovat selvästi erottuneet kontrollin vastaavien aikapisteiden näytteistä. Pisteiden välinen etäisyys kuvaa kemikaalialtistusnäytteen ja kontrollin aikapisteiden keskenään erilaista geeniekspressiota. On kuitenkin tärkeää huomata, että kuvaaja ei sisällä kaikkea tietoa datan varianssista.

3.2 Differentiaalisesti ekspressoituneet geenit

Kemikaalialtistusnäytteissä ja kontrollissa DE-geenien lukumäärät vaihtelivat suuresti kemikaalien välillä (Kuva 4). Digoksiinin, ibuprofeenin ja valproiinihapon altistusnäytteistä voitiin tunnistaa vain muutamia DE-geenejä. Haloperidolin, kversetiinin, reserpiinin ja isotretinoiinin altistusnäytteissä DE-geenejä oli useita satoja. Myös saman kemikaalialtistusnäytteen eri aikapisteiden välisen geeniekspressiomuutoksen mittakaavassa oli suuria eroja. Aikapisteiden mittausväleihin viitataan myöhemmin järjestyksessä ensimmäinen mittausväli (päivä 1 vs 3), toinen mittausväli (päivä 3 vs 6) ja kolmas mittausväli (päivä 1 vs 6).



Kuva 4 Eri aikavälivertailujen DE-geenien lukumäärä kemikaalikohtaisesti.

Kversetiinin ja isotretinoiinin altistusnäytteiden jokaisessa aikapistevertailuissa havaittiin vähintään yksi DE-geeni. Haloperidoli- ja reserpiinialtistusnäytteissä DE-geenejä tunnistettiin vain kahdessa aikapistevertailusta. Tulosten perusteella voidaan päätellä, ettei haloperidoli vaikuta geeniekspressioon ensimmäisellä mittausvälillä, eikä reserpiini toisella mittausvälillä. Vastaavasti kversetiini ja isotretinoiini vaikuttavat geeniekspressioon jokaisella mittausvälillä, joskin isotretinoiinin tapauksessa DE-geenien lukumäärä toisella mittausvälillä on vain 3. Digoksiinin, ibuprofeenin ja valproiinihapon vaikutus mitattuun geeniekspressioon on lähes merkityksetön.

3.3 Vaikutus angiogeneettisiin prosesseihin

Ylirepresentaatioanalyysillä määritettiin korjattu p-arvo jokaiselle suoritetulle Fisherin testille. Testi toteutettiin kaikkien 7 kemikaalin 3 eri muutosvälille 10 eri termin osalta. Täten testi suoritettiin yhteensä 210 kertaa. Testeistä 17 alitti korjatun p-arvon merkitsevyyssynnyksen (Taulukko 2). Taulukossa on esitetty ainoastaan ne vertailut, joissa oli vähintään yksi merkitsevyyssynnyksen alittanut termi. Merkitsevien p-arvojen ($< 0,05$) solut on värjätty vihreäksi. Koodeja vastaavat termit on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 2 Fisherin testin korjatut p-arvot testikohtaisesti.

Vertailu	1A	1B	1C	1D	1E	2A	2B	2C	2D	2E
Haloperidoli 1 vs 6	0,00	0,00	0,01	0,05	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01
Haloperidoli 3 vs 6	0,19	0,05	0,32	0,23	0,03	0,30	0,12	0,02	0,02	0,15
Kversetiini 1 vs 6	0,11	1,00	1,00	0,32	0,53	0,02	1,00	1,00	1,00	1,00
Reserpiini 1 vs 6	0,00	0,23	0,22	0,09	1,00	0,27	0,24	1,00	1,00	0,19
Isotretinoiini 1 vs 3	0,09	1,00	0,03	0,79	0,57	0,70	1,00	1,00	1,00	1,00
Isotretinoiini 1 vs 6	0,01	0,19	0,08	0,08	1,00	0,11	0,05	1,00	1,00	0,17

Voimakkain yhteys angiogeneettisten termien ja DE-geenien välillä havaittiin haloperidolinäytteissä. Ensimmäisellä mittausvälillä mitatut DE-geenit olivat yliedustettuina kaikissa paitsi yhdessä (positive regulation of endothelial cell migration) GO-BP-termissä. Täten on perusteltua päätellä, että haloperidoli vaikuttaa angiogeneesiin, haarautuvaan angiogeneesiin sekä molempien sääteilyyn. Toisella mittausvälillä merkitsevästi yliedustettuja termejä tunnistettiin vähemmän ja ne liittyivät angiogeneesiin ja haarautuvan angiogeneesiin säätelyyn.

Kversetiininäytteiden DE-geenit olivat yliedustettuina ainoastaan kolmannen mittausvälin vertailussa, siinäkin vain yhden termin osalta. Huomionarvoista on, että kyseinen termi on haarautuva angiogeneesi (sprouting angiogenesis). Sen kattotermi angiogeneesi ei kuitenkaan ole merkitsevästi yliedustettu.

Reserpiini- ja isotretioniininäytteiden kolmannen mittausvälin vertailun DE-geenit olivat yliedustettuina ainoastaan angiogeneesi-termin osalta. Myös isotretioniininäytteiden ensimmäisellä mittausvälillä muuttuneet DE-geenit olivat yliedustettuina vain yhdessä termissä (negative regulation of angiogenesis).

Tuloksia tulkitessa on syytä varovaisuuteen, sillä replikaattien pieni määrä heikentää tilastollisten testien tehokkuutta ja nostaa tyyppin I ja tyyppin II virheiden mahdollisuutta. Testien p-arvon korjaus BH-metodilla vähentää etenkin tyyppin I virheiden määrää, mutta ei kuitenkaan poista niitä kokonaisuudessaan. Lisäksi pääkomponenttianalyysissä havaitut replikaattien väliset eroavaisuudet ovat omiaan lisäämään testien lopputuloksen epävarmuutta.

4. YHTEENVETO

Tässä tutkimuksessa tarkasteltiin 7 eri kemikaalin vaikutusta *in vitro* verisuonimallin angiogeneettisiin prosesseihin RNA-sekvensointi menetelmää hyödyntäen. Tutkimuksessa pyrittiin tunnistamaan ekspressioltaan merkitsevästi muuttuneita geenejä käyttämällä matemaattisia malleja sekä tilastollisen hypoteesin testausmenetelmiä. Merkitsevästi muuttuneiden geenien joukon suhdetta angiogeneettisiin prosesseihin tutkittiin niin ikään tilastollisen hypoteesin testaamista ja laajaa biologista tietokantaa hyödyntäen.

Differentiaalisen geeniekspression analyysillä pystyttiin erottamaan geenien ilmentymiseen vaikuttavat kemikaalit (4/7) niistä, joilla ei ollut vaikutusta. Aikapistevertailulla tunnistettiin ne ajanjaksot, joilla suurin muutos oli tapahtunut. Ylirepresentaatioanalyysillä pystyttiin myös tunnistamaan ne kemikaalit, jotka vaikuttivat oleellisesti angiogeneettisiin prosesseihin.

Haloperidoli, kversetiini, reserpiini ja isotretinoiini vaikuttivat kaikki angiogeneettisiin prosesseihin osallistuvien geenien ilmentymiseen. Näistä neljästä haloperidolin vaikutus geeniekspressioon oli ylivoimaisesti suurin. Kemikaalien vaikutusmekanismeista tai vaikutuksen seurauksista ei kuitenkaan voida tämän tutkimuksen perusteella tehdä päätelmiä, vaan ne vaativat tarkempaa analyysia.

5. LÄHTEET

Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, et al. 2000. "Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. the Gene Ontology Consortium." *Nature Genetics* 25 (1): 25-29. doi:10.1038/75556 [doi].

Benjamini, Yoav and Yocef Hochberg. 1995. "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57 (1): 289-300.

Bentley, D. R., S. Balasubramanian, H. P. Swerdlow, et al. 2008. "Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry." *Nature* 456 (7218): 53-59. doi:10.1038/nature07517 [doi].

Carmeliet, P. & R. K. Jain. 2011. "Molecular Mechanisms and Clinical Applications of Angiogenesis." *Nature* 473 (7347): 298-307. doi:10.1038/nature10144 [doi].

Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, et al. 2013. "STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner." *Bioinformatics (Oxford, England)* 29 (1): 15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635 [doi].

Folkman, J. 2007. "Angiogenesis: An Organizing Principle for Drug Discovery?" *Nature Reviews Drug Discovery* 6 (4): 273-286. doi:nrd2115 [pii].

Huttala, O., H. Vuorenperä, T. Toimela, et al. 2015 "Human vascular model with defined stimulation medium – a characterization study", *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, 32(2), pp. 125-136. doi: 10.14573/altex.1411271.

Khalil, A. S., R. Jaenisch, and D. J. Mooney. 2020. "Engineered Tissues and Strategies to Overcome Challenges in Drug Development." *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi:S0169-409X(20)30136-8 [pii].

Kim, S., H. Lee, M. Chung, et al. 2013. "Engineering of Functional, Perfusable 3D Microvascular Networks on a Chip." *Lab on a Chip* 13 (8): 1489-1500. doi:10.1039/c3lc41320a [doi].

Love, M. I., W. Huber & S. Anders. 2014. "Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2." *Genome Biology* 15 (12): 550-8. doi:s13059-014-0550-8 [pii].

Nguyen, D. H., S. C. Stapleton, M. T. Yang, et al. 2013. "Biomimetic Model to Reconstitute Angiogenic Sprouting Morphogenesis in Vitro." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (17): 6712-6717. doi:10.1073/pnas.1221526110 [doi].

Reuter, J. A., D. V. Spacek & M. P. Snyder. 2015. "High-Throughput Sequencing Technologies." *Molecular Cell* 58 (4): 586-597. doi:10.1016/j.molcel.2015.05.004 [doi].

Ritchie, Matthew E., Belinda Phipson, D. I. Wu, et al. 2015. "Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies." *Nucleic Acids Research* 43 (7): e47.

Robinson, M. D., D. J. McCarthy & G. K. Smyth. 2010. "edgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data." *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (1): 139-140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616 [doi].

Senger, D. R. & G. E. Davis. 2011. "Angiogenesis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (8): a005090. doi:10.1101/cshperspect.a005090 [doi].

Smedley, D., S. Haider, S. Durinck, et al. 2015. "The BioMart Community Portal: An Innovative Alternative to Large, Centralized Data Repositories." *Nucleic Acids Research* 43 (W1): 589. doi:10.1093/nar/gkv350 [doi].

Song, H. G., R. T. Rumma, C. K. Ozaki, et al. 2018. "Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise." *Cell Stem Cell* 22 (3): 340-354. doi:S1934-5909(18)30071-7 [pii].

Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, et al. 2005. "Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (43): 15545-15550. doi:0506580102 [pii].

The Gene Ontology Consortium. 2019. "The Gene Ontology Resource: 20 Years and Still GOing Strong." *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D330-D338. doi:10.1093/nar/gky1055 [doi].

Yates, A. D., P. Achuthan, W. Akanni, et al. 2020. "Ensembl 2020." *Nucleic Acids Research* 48 (D1): D682-D688. doi:10.1093/nar/gkz966 [doi].