



Antitrombiini Cambridge I- ja II -
mutaatioiden osoittaminen suomalaisessa
väestössä

Bioanalytiikan
koulutusohjelma,
bioanalyttikko
Opinnäytetyö
21.10.2008

Sanna Metsä-Ketelä
Laura Salmela

Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikan koulutusohjelma			
Tekijä/Tekijät			
Sanna Metsä-Ketelä ja Laura Salmela			
Työn nimi			
Antitrombiini Cambridge I- ja II -mutaatioiden osoittaminen suomalaisessa väestössä			
Työn laji		Aika	Sivumäärä
Opinnäytetyö		Syksy 2008	41
TIIVISTELMÄ			
<p>Veren hyytyminen perustuu hyytymisjärjestelmään, joka sisältää erilaisia hyytymistekijöitä. Osa tekijöistä edistää veren hyytymistä ja osa taas estää sitä. Antitrombiini III on eräs veren hyytymistekijöitä inhiboiva faktori. Sitä koodittavassa geenissä tunnetaan monia tunnettuja mutaatiota. Tässä työssä keskitytään näistä mutaatioista kahteen muutokseen, joita kutsutaan antitrombiini Cambridge I- ja II -mutaatioiksi. Aikaisempien tutkimustulosten perusteella kyseisten mutaatioiden epäillään lisäävän tromboosin eli veritulpan riskiä.</p> <p>Opinnäytetyö toteutettiin Suomen Punaisen Ristin Veripalvelun toimeksiannosta. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia, esiintyykö suomalaisessa väestössä antitrombiini Cambridge I- tai II -mutaatioita. Tutkimusaineisto koostui 687 näytteestä sekä lisäaineisto 166 näytteestä. Kyseisten mutaatioiden olemassaoloa on aikaisemmin tutkittu vain brittiläisessä, espanjalaisessa ja ranskalaisessa väestössä, jonka takia Veripalvelu kiinnostui aloittamaan tämän tutkimustyön ensimmäisenä Suomessa. Työn menetelminä käytettiin valmiiksi eristetyn DNA:n monistamista polymeerasiketjureaktiolla (PCR), digestiota sekä agaroosigeelielektroforeesia. Tulokset luettiin suoraan geeliltä ja ne kuvattiin kameralla.</p> <p>Suuresta näytemäärästä (n=853) huolimatta ei yhtään mutaatiota tutkimusaineistosta pystytty osoittamaan. Vaikka aikaisemmissa tutkimuksissa näille mutaatioille on löydetty suhteellisen suuri ilmaantuvuus, ei tutkimustemme mukaan mutaatioiden olemassaoloa voida osoittaa tällä näytemäärällä Suomessa.</p> <p>Ei voida todeta, että antitrombiini Cambridge I- ja II -mutaatiot lisääisivät tromboosiriskiä suomalaisilla, sillä yhtään mutaation kantajaa ei aineistosta löytynyt.</p>			
Avainsanat			
veren hyytyminen, antithrombin Cambridge I- ja II, mutaatio, PCR			

Degree Programme in		Degree
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care
Authors		
Sanna Metsä-Ketelä and Laura Salmela		
Title		
Antithrombin Cambridge I- and II -Mutations in the Finnish Population		
Type of Work	Date	Pages
Final Project	Autumn 2008	41
<p>ABSTRACT</p> <p>Blood clotting is based on a coagulation system which includes several coagulation factors. Some of these factors promote blood clotting, while some inhibit it. Antithrombin III is a factor, which inhibits coagulation factors. The gene coding for antithrombin, comprises many known mutations. Two of these mutations are called Antithrombin Cambridge I- and II -mutations. Previous studies suggest that these mutations could increase the risk for thrombosis.</p> <p>This final project was implemented through the assignment of the Finnish Red Cross Blood Service. The purpose of this study was to investigate, if we could point out these mutations from our research material. The existence of these mutations has previously been investigated only in British, Spanish and French populations. The methods used in this study were multiplying the DNA using the polymerase chain reaction (PCR), digestion and gel electrophoresis.</p> <p>In spite of the large number of samples (n= 853), not a single mutation could be assigned from our research material. Even though previous studies have been able to assign relatively high existence for these mutations, we could not identify any mutation in the Finnish population.</p> <p>Despite the assumption that these mutations could be a genetic risk factor for thrombosis, we could not point out that Antithrombin Cambridge I- and II -mutations would increase the risk for thrombosis among Finnish people.</p>		
Keywords		
blood clotting, antithrombin Cambridge I and II, mutation, PCR		

SISÄLLYS

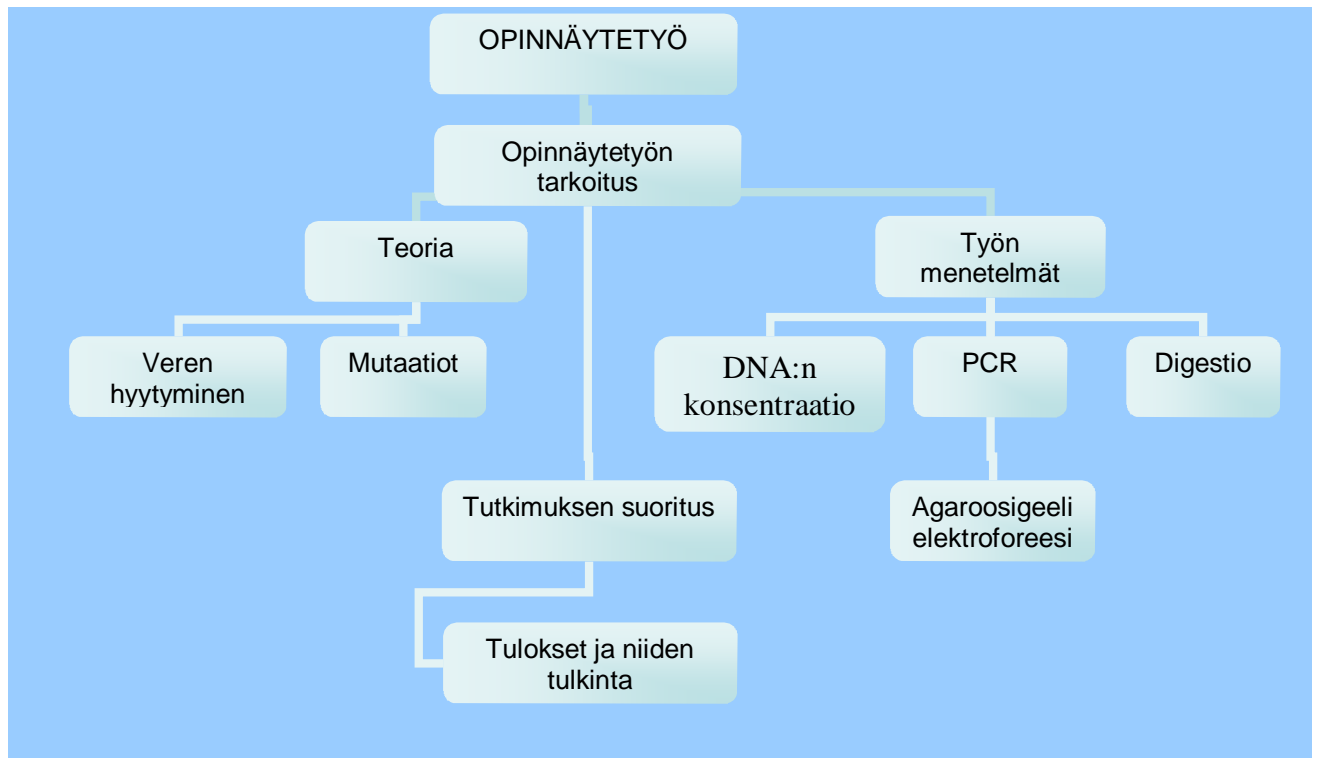
1	JOHDANTO.....	3
2	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS.....	4
3	VEREN HYYTYMINEN JA SEN HÄIRIÖT.....	5
3.1	Tromboosit.....	8
3.2	Tukostaipumus.....	10
3.3	Antitrombiini (III).....	11
4	MUTAATIOT.....	12
4.1	Cambridge-mutaatiot.....	14
4.2	Cambridge I -mutaatio ja sen tutkimus.....	15
4.3	Cambridge II -mutaatio ja sen tutkimus.....	16
5	MUTAATIOIDEN OSOITTAMISEN MENETELMÄT.....	17
5.1	DNA:n konsentraation mittaaminen NanoDrop®-laitteella.....	18
5.2	PCR.....	18
5.3	Digestio.....	22
5.4	Agaroosigeelielektroforeesi.....	22
6	MUTAATIOIDEN OSOITTAMINEN.....	23
6.1	Aineisto.....	24
6.2	Tutkimuksen suoritus.....	25
7	TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA.....	32
7.1	Tulosten onnistuminen.....	32
7.2	Mutaatioiden esiintyvyys.....	34
7.3	Tulosten luotettavuuden arviointi.....	34
8	POHDINTA.....	36
	LÄHTEET.....	38

1 JOHDANTO

Veren hyytymisen ja hyytymän hajottamisen pitää olla tasapainossa, ettei synny verenvuototilannetta tai vaarallista veritulppaa. Tämän vuoksi liiallista hyytymistä estävät hyytymistekijöiden inhibiittorit, joita ovat muun muassa proteiini C ja antitrombiini III. (Koski - Vilpo 2005: 160–161.) Antitrombiini on tärkein hyytymisen säätelijä plasmassa ja se estää trombiinin lisäksi monia hyytymistekijöitä (Lassila 2007: 40).

Antitrombiinia koodittavassa geenissä sijaitsee useita tunnettuja mutaatiota, joista tässä opinnäytetyössä keskitytään antitrombiini Cambridge I- ja II -mutaatioihin (Perry ym. 1991: 248). Myöhemmin opinnäytetyössä mutaatioista puhuttaessa käytetään lyhyempää muotoa Cambridge I- ja II -mutaatiot. Kyseisten mutaatioiden uskottiin jo 16 vuotta sitten lisäävän tromboosien riskiä, mutta kiistatonta näyttöä ei siitä ole (Perry ym. 1991: 249). Viimeisimmän tutkimustuloksen aiheesta julkaisseet espanjalaiset totesivat Cambridge II-mutaation esiintyvyydeksi espanjalaisessa väestössä 0,2 %. Heidän tutkimusmateriaalissaan Cambridge II-mutaatio oli laskimotromboosien riskitekijä. (Corral ym. 2007.)

Opinnäytetyön tavoitteena oli osoittaa Cambridge I- ja II -mutaatioiden olemassaolo tai niiden puuttuminen suomalaisessa tutkimusaineistossa polymeerasiketjureaktio- eli PCR-pohjaista menetelmää käyttäen. Opinnäytetyön teoriaosiossa kerrotaan veren hyytymisestä ja mutaatioista. Veren hyytymisen perusmekanismin ymmärtäminen on edellytys sille, että voidaan ymmärtää tromboosien syntymistä ja niiden riskitekijöitä. Myös erilaiset mutaatiotyypit ja niiden seuraukset on hyvä tuntea, että voi ymmärtää millaisista muutoksista Cambridge I- ja II -mutaatioissa on kyse. Tämän jälkeen esitellään työssä käytetyt menetelmät ja esitellään saadut tutkimustulokset. Lopuksi arvioidaan niiden luotettavuutta. Seuraavalla sivulla on kaaviokuva työn rakenteesta (kuvio 1).



KUVIO 1. Opinnäytetyön rakenne (Salmela 2008).

2 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS

Opinnäytetyö tehtiin Suomen Punaisen Ristin Veripalvelun toimeksiannosta. Veripalvelun laboratorioiden asiantuntijuutta ylläpidetään ja parannetaan monilla tutkimus- ja kehitysprojekteilla, joiden aktiivisina tutkimuskohteina ovat muun muassa hyytymistekijät sekä elin- ja kantasolusiirtojen kudossopeutuvuustekijät (Veripalvelu 2005). Veripalvelu suorittaa Suomessa hemostaasin häiriöihin liittyviä erikoistutkimuksia. Tämän ja julkaistujen kansainvälisten tutkimustulosten vuoksi, Veripalvelu oli kiinnostunut tutkimaan Cambridge I- ja II -mutaatioiden esiintymistä Suomessa. Näiden mutaatioiden tutkimustuloksia kansainvälisesti ovat aikaisemmin julkaisseet britannialaiset, espanjalaiset ja ranskalaiset tutkimusryhmät. Jos opinnäytetyön tutkimustuloksilla voidaan todeta, että suomalaisilla esiintyy kyseisiä

mutaatioita, saatetaan Cambridge-mutaatiotutkimukset lisätä Veripalvelun jo nyt kattavaan tukostaipumustutkimusvalikoimaan.

Tutkimustulos on kansainvälisesti merkittävä ja se julkaistaan riippumatta siitä, löytyykö mutaatioita. Kansainvälinen merkittävyys johtuu siitä, että mutaatioita on aiemmin tutkittu vain muutamassa maassa. Jos suomalaisilta pystytään osoittamaan kyseisiä mutaatioita, tutkijat toivovat niiden selittävän edes joitain vielä tuntemattomia hyytymishäiriöiden taustalla olevia syitä. Suomessa on monia hyytymishäiriön omaavia potilaita, eikä läheskään kaikkien hyytymishäiriöiden aiheuttajaa vielä tunneta. Veripalvelun mukaan (Kliiniset laboratoriotutkimukset 2008) vain noin joka viidennellä valikoimattomista laskimotukospotilaista todetaan jokin tietty laskimotukoksia aiheuttava tekijä. Lisäksi tukostaipumusta aiheuttava hemostaasin häiriö pystytään nykyisin laboratoriomenetelmin toteamaan vain noin 50–60 %:lla niistä potilaista, joiden suvussa esiintyy tukoksia.

Opinnäytetyön tarkoituksena on etsiä kyseisiä mutaatioita suomalaisesta tutkimusaineistosta. Työ suoritetaan monistamalla tutkittava DNA-näyte käyttäen PCR:ta, pilkkomalla tuote restriktioentsyymien avulla sekä ajamalla tuote agarosigeelielektroforeesilla.

Opinnäytetyössä haetaan vastauksia seuraaviin kysymyksiin:

- Minkälainen frekvenssi Cambridge I- ja II -mutaatioiden esiintyvyydelle saadaan suomalaisessa väestössä?
- Mikä on näytteiden monistumisen onnistumisprosentti PCR-ajojen jälkeen? Mitä päätelmiä tästä voidaan tehdä?

3 VEREN HYYTYMINEN JA SEN HÄIRIÖT

Verisuonivaurion syntyessä hyytymisjärjestelmä aktivoituu, kun kudostekijä ja kollageeni aiheuttavat verihiutaleiden eli trombosyyttien kerääntymisen paikalle. (Wartiovaara-Kautto - Syrjälä 2004: 265.) Trombosyytit tarttuvat vaurioituneen

Veren täytyy pysyä elimistössä juoksevana sen kiertäessä verisuonistossa, sillä veren hyytyminen aiheuttaisi tukoksia verisuonissa. Tästä pitää huolen elimistön hemostaasijärjestelmä. Jos verisuonen seinämä vaurioituu, hemostaasijärjestelmä pysäyttää verenvuodon muodostamalla hyytymän vauriokohtaan. Hemostaasijärjestelmä myös hajottaa tarpeettomaksi käyneen hyytymän, kun vaurio on korjaantunut. (Mahlamäki 2004: 310.)

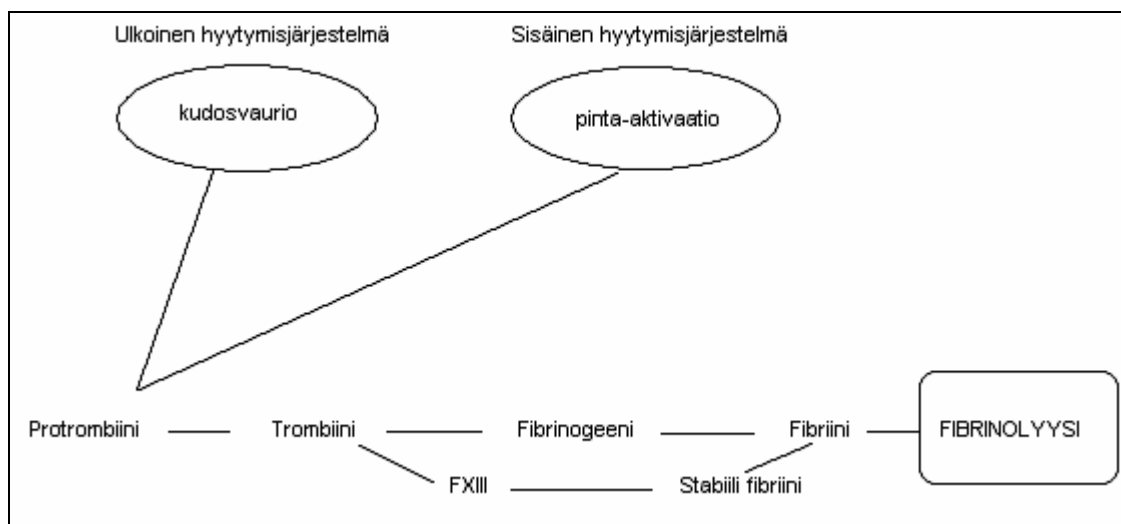
Veren hyytymisjärjestelmä koostuu monista erilaisista hyytymistekijöistä, jotka numeroidaan I – XII (Armstrong 2006: 21). Taulukossa 1 esitetään hyytymistekijöiden I – XII tärkeimmät tehtävät hyytymisjärjestelmässä.

TAULUKKO 1. Veren hyytymistekijöiden I - XII tehtävät (Mukailen Armstrong 2006: 22).

Tekijä	Nimi	Tehtävä
I	Fibrinogeeni	Muutetaan fibriniiksi (verihyytymän osa)
II	Protrombiini	Aktivoidaan trombiiniksi, joka muuttaa fibrinogeenin fibriniiksi
III	Kudostekijä	Kofaktori VIIa:lle
IV	Kalsium	
V		Kofaktori Xa:lle
VII	Prokonvertiini	Aktivoi IX ja X kudostekijän kanssa
VIII	Antihemofiilinen globuliini A	Kofaktori (Ixa)
IX	Antihemofiilinen tekijä B	IXa aktivoi X
X	Stuart-Prower-tekijä	Xa edistää trombiinin syntyä
XI	Antihemofiilinen tekijä C	XIa aktivoi IX:tä
XII	Hagemanin tekijä	Sitoutuu kollageeniin, aktivoi XI:ta
XIII		Stabiloi fibriniä

Yksinkertaistettuna veren hyytyminen perustuu hyytymistekijäjärjestelmään, joka voidaan jakaa ulkoiseen ja sisäiseen järjestelmään. Ulkoinen järjestelmä aktivoituu kudovaurion yhteydessä, jolloin syntyy kudostromboplastiinia. Sisäinen hyytymisjärjestelmä käynnistyy verisuonen pinnalla olevien negatiivisesti varautuneiden pintojen vaikutuksesta. (Koski - Vilpo 2005: 160–161.)

Molemmat järjestelmät aloittavat hyytymiskaskadin, jossa jonkin entsyymattisen aineen aktivoituminen muuttaa ketjun seuraavan proentsyymin aktiiviseen muotoon. Jos jokin osa jää aktivoitumatta, seuraavatkin jäävät. Trombiinin muodostus riippuu kahdesta eri hyytymistekijäkompleksista, tenaasista (hyytymistekijät X, VIIIa ja IXa), joka aktivoi tekijä X:n, ja protrombinaasista (hyytymistekijät II, Va ja Xa), joka asettuu verihiutaleen pinnalle tuottaakseen protrombiinista trombiinia. Trombiini synnyttää hyytymän muuttamalla fibrinogeenin fibriiniksi. Fibrinolyttinen järjestelmä aktivoituu hyytymisen käynnistyttyä ja osaltaan pitää hyytymistasapainoa yllä elimistössä, sillä se liuottaa hyytymän. Veressä on myös hyytymistekijöiden inhibiittoreita, joiden tehtävänä on huolehtia siitä, ettei veri hyydy hallitsemattomasti. Näitä inhibiittoreita ovat esimerkiksi proteiini C ja antitrombiini III. (Koski - Vilpo 2005: 160–161; Mahlamäki 2004: 312 - 313; Wartiovaara-Kautto - Syrjälä 2004: 265; Lassila 2007: 33.) Kuviossa 3 havainnollistetaan ulkoisen ja sisäisen hyytymisjärjestelmän yhteyttä.



KUVIO 3. Ulkoinen ja sisäinen hyytymisjärjestelmä päättyy samaan lopputulokseen; fibrinolyysin syntymiseen erilaisten välivaiheiden kautta (Salmela 2008).

3.1 Tromboosit

Tromboosilla tarkoitetaan verisuonitukosta, jossa verisuonen sisälle muodostuu verihyytymä. Verisuonitukos tunnetaan kansankielellä myös veritulppana. (Lääketieteen termit 2002: 684.) Tromboosi on patologinen prosessi, jossa hemostaasi on häiriintynyt (Armstrong 2006: 18). Se syntyy, kun veren hyytymisjärjestelmä tai siihen kuuluvat

tekijät eivät toimi kunnolla. Nämä häiriöt voivat liittyä hyytymisominaisuuksien muutoksiin, endoteelisolujen toimintaan tai veren virtauksen häiriöihin.

Hyytymistä edistävät tilat voidaan jakaa primaarisiin ja sekundaarisiin tiloihin. Geneettinen häiriö, joka edistää hyytymistä ja vaikuttaa jonkin hyytymisjärjestelmän valkuaisaineen toimintaan, on yleensä primaaristen tilojen syynä. Erilaiset ympäristötekijät ja sairaudet ovat sekundaaristen tilojen taustalla, esimerkiksi pitkä vuodelepo tai eräät lääkkeet edistävät hyytymistä ja täten tromboosien syntyä. (Soini 2005: 257 - 258.) Yleensä tukoksen syntyminen edellyttää useampaa samanaikaista riskitekijää, mutta tukoksia voi myös syntyä täysin spontaanisti (Koski – Sinisalo – Vilpo 2005: 172). Alla on taulukko (taulukko 2) muutamista laskimotukokselle altistavista tekijöistä.

TAULUKKO 2. Joitakin tunnettuja laskimotukoksille altistavia riskitekijöitä (Mukaillen Koski – Sinisalo – Vilpo 2005: 172).

<u>HANKINNAISET SYYT</u>	<u>PERIYTYVÄT SYYT</u>
Korkea ikä	Alentunut antitrombiinin aktiivisuus
Aiemmat tukokset	Proteiini C:n vajaus
Vuodelepo ja leikkaukset	Proteiini S:n vajaus
Ehkäisytabletit ja raskaus	APC-resistenssi
Lihavuus	Hyytymistekijä II-mutaatio

Laskimotukokset ovat niin tavallisia, että jopa 1/1000 ihmisestä sairastaa tukoksen vuosittain (Koski – Sinisalo – Vilpo 2005: 171). Eläkeikäisillä tromboosien esiintyvyys on jo paljon korkeampi, 1/100 asukasta kohden (Puurunen - Syrjälä 2007: 574). Tästä voidaan todeta, että tromboosien riski kasvaa iän mukana.

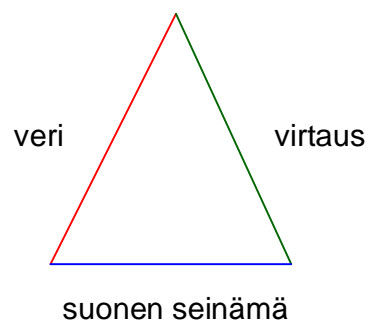
3.2 Tukostaipumus

Trombofilia tarkoittaa usein perinnöllisestä syystä johtuvaa alttiutta sairastua trombooseihin eli toisin sanoen tukostaipumusta (Lääketieteen termit 2002: 684).

Tukostaipumus liittyy Virchow'in triadin mukaan johonkin seuraavista syistä:

1. Laskimon seinämävaurio
2. Muutos veren virtauksessa
3. Muutos veren koostumuksessa (Koski – Sinisalo – Vilpo 2005: 171).

Virchow'in triadi on peräisin vuodelta 1856 ja perusmekanismi on edelleen voimassa. Hyytymistapahtuma perustuu veren hyytymisominaisuuksiin, suonien seinämästä paljastuviin rakenteisiin ja virtausolosuhteisiin, jotka esitetään kuviossa 4. (Lassila 2004: 10 – 11.)



KUVIO 4. Virchowin triadi (Mukaillen Lassila 2004: 11).

Corralin ym. (2007: 4258) mukaan trombooseihin sairastumista pystyttäisiin merkittävästi pienentämään, jos riskiryhmiin kuuluvat potilaat pystyttäisiin ajoissa identifioimaan ennen kuin sairauden hoito vaatisi kliinisiä toimenpiteitä. Verisuonitukoksille altistavia riskitekijöitä on tutkittu jo yli 40 vuotta. Vuonna 1965 Egeberg havaitsi antitrombiinin puutoksen tromboosin riskitekijänä. Tämän jälkeen tutkijat ovat kuvanneet monia geneettisiä muutoksia ja puutoksia, jotka altistavat trombooseille. Kun faktori V:n (FV Leiden) ja protrombiini geenin (G20210A) geneettiset muutokset havaittiin vuosina 1994 ja 1996, muuttui samalla dramaattisesti koko molekylaarinen käsitys laskimotukoksista. Vielä 40 vuotta sitten ajateltiin

trombofilian eli perinnöllisen tromboosialttiuden, johtuvan yhden geenin välittämästä mutaatiosta. 1990-luvulla tultiin kuitenkin siihen päätelmään, että trombofilia on pikemminkin monen geenin välittämä muutos, koska huomattiin monen oireilevan potilaan kantavan useampaa kuin yhtä geneettistä riskitekijää. Tämän lisäksi ymmärrettiin trombofilian perinnöllisen taipumuksen olevan vuorovaikutuksessa ympäristötekijöiden kanssa, jonka vuoksi trombofilian voidaan sanoa olevan monimuotoinen ja monitekijäinen tauti. (Corral ym. 2007: 4258.)

3.3 Antitrombiini (III)

Antitrombiini III tunnetaan nykyään lyhemmin nimellä antitrombiini (AT). Plasman antitrombiini sisältää 432 aminohappoa ja sen molekyylipaino on 58 000. (Rajan 2007.) Antitrombiini on maksan syntetisoima glykoproteiini, joka neutraloi ja inhiboi useita hyytymisjärjestelmän entsyymejä, muun muassa trombiinia. Se inhiboi trombiinia muodostaen sen kanssa inaktiivisen kompleksin. (Kliiniset laboratoriotutkimukset 2008; Koski – Sinisalo – Vilpo 2005: 172.)

AT:n toiminnallinen vajeus aikaansaa suuren riskin verisuonitukosten syntymiselle (Imperial College London 2007), ja sen voidaankin sanoa aiheuttavan laskimotukostaipumuksen (Kliiniset laboratoriotutkimukset 2008). AT:n vajeusta voidaan pitää jopa yhtenä vaikeimmista trombofilioista, koska se inaktivoi trombiinin lisäksi myös hyytymistekijöitä IX, X, XI, XII, plasmiinia, kallikreiniä (Puurunen - Syrjälä 2007: 577). Antitrombiinin, proteiini C:n ja proteiini S:n pitoisuuksien määritykset kuuluvat nuorella iällä ilmaantuvan tai vaikean tukostaipumuksen selvittelyyn. Geenivirheet, kuten protrombiinin eli hyytymistekijä II:n mutaatio (G20210A), tekijä V Leiden mutaatio (FV Leiden, R506Q) sekä siihen liittyvä proteiini C:n resistenssi (APC-resistenssi) ovat yleisimmät tekijät, jotka selittävät tukostaipumusta. (Lassila 2007: 43.)

Antitrombiinia koodittava geeni on pystytty paikallistamaan kromosomiin 1q23-25. Antitrombiini kuuluu proteiiniperheeseen, joka yhteisesti tunnetaan serpiiniryhmänä eli seriiniproteinaasin inhibiittoreina. Suurin osa tästä ryhmästä ovat inhibiittoreita, jotka kontrolloivat veren entsyymien proteolyysiä. (Imperial College London 2007.)

4 MUTAATIOIT

Deoksiribonukleiinihappo eli DNA on elävien solujen ominaisuuksien koodikirja, johon yksilön perimä sisältyy. 1800-luvun lopulla, josta saakka DNA on tunnettu, pidettiin sitä turhanaikaisena molekyylinä. (Salkinoja-Salonen 2002:297). DNA:n rakenteen ratkaisivat 1950-luvulla Cambridgen yliopistossa vaikuttaneet James D. Watson sekä Francis Crick, jotka julkaisivat artikkelinsa aiheesta Nature-lehdessä huhtikuussa 1953 (Watson – Crick 1953: 737.)

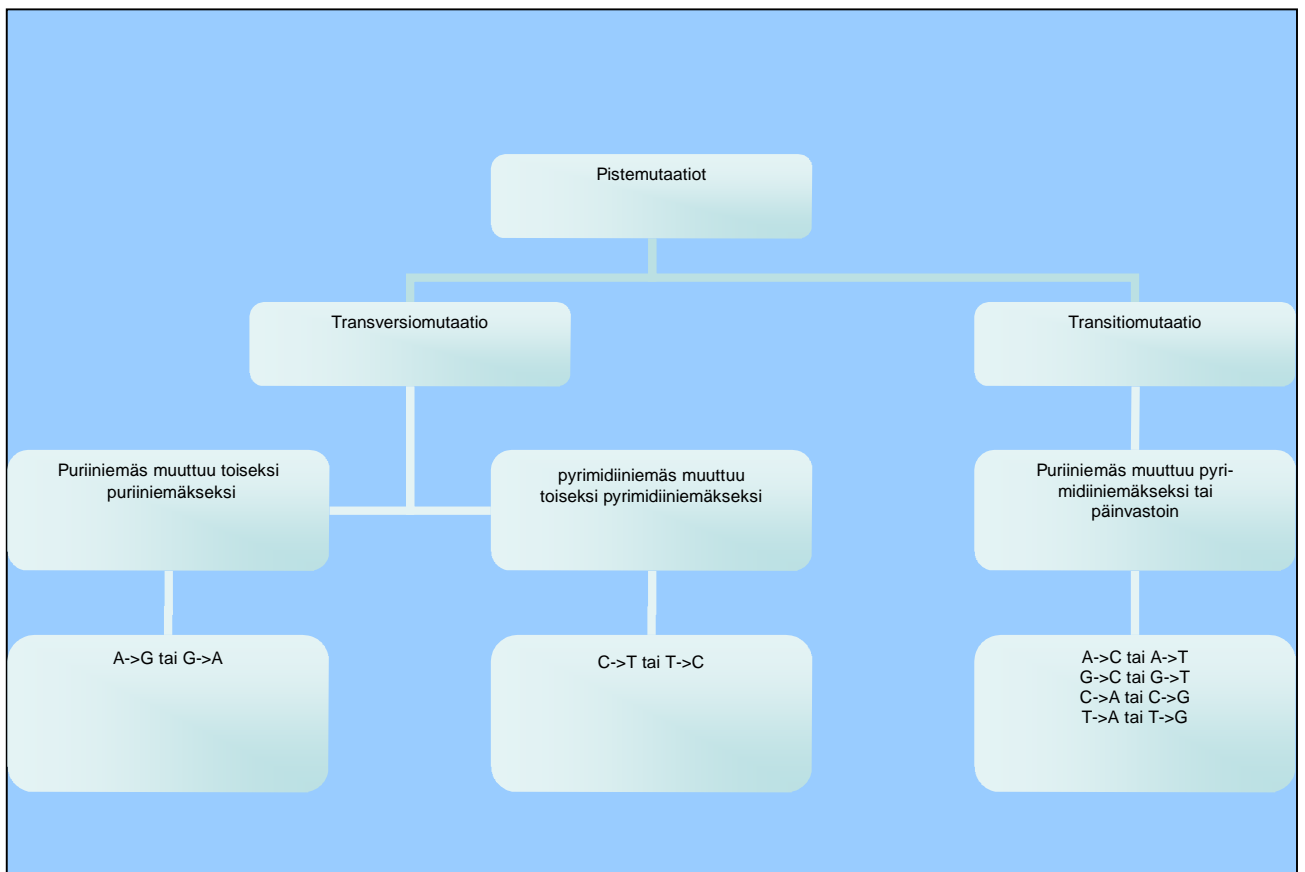
DNA koostuu nukleotideista, jotka muodostuvat sokeri-, fosfaatti- ja emäsosasta (Aula – Kääriäinen – Palotie 2006: 356). Nukleotidit muodostavat kaksi ketjua, jotka liittyvät yhteen kahden emäksen välille syntyvän vetysidoksen voimalla. Emäkset ovat adeniini (A), tymiini (T), sytosiini (C) sekä guaniini (G). Ne pariutuvat siten, että A ja T pariutuvat keskenään, ja C ja G keskenään. (Frilander 2006: 15.) Emäkset jaetaan rakenteensa mukaan puriini- ja pyrimidiiniemäksiin. Puriiniemäksiä ovat adeniini ja guaniini, kun taas pyrimidiiniemäksiä ovat sytosiini ja tymiini. (Solunetti 2006.)

Mutaatioita eli DNA:n rakenteen muutoksia voi olla hyvin erilaisia. Mutaatio voi olla joko periytyvään sairauteen johtava geenivirhe, monitekijäiselle sairaudelle altistava variaatio tai harmiton polymorfismi. Mutaatioiden ansiosta geeneistä on olemassa erilaisia alleeleja eli geenin vaihtoehtoisia muotoja. Polymorfismit eivät aiheuta ilmiasun muutoksia ja ne voivat olla vain yhden emäksen vaihtumisia tai eripituisten DNA-jaksojen toistumia. (Kere – Kivirikko 2006: 60.) Geneetikon näkökulmasta mutaatio on vain muutos, joka voi olla hyvän- tai pahanlaatuinen. Mutaatioita voidaan jaotella ryhmiin esimerkiksi niiden rakenteen mukaan, joita on esitelty taulukossa 3.

TAULUKKO 3. Mutaatiotyypit (Mukaillen Kere – Kivirikko 2006: 63).

<u>MUTAATIOT, JOILLA ON VAIKUTUSTA DNA:N PITUUTEEN</u>	<u>MUTAATIOT, JOILLA EI OLE VAIKUTUSTA DNA:N PITUUTEEN</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Insertiot eli DNA:n lisäykset 	<ul style="list-style-type: none"> • Pistemutaatiot, joissa yksi emäs muuttunut toiseksi
<ul style="list-style-type: none"> • Deleetiot eli DNA:n häviämät 	<ul style="list-style-type: none"> • Inversiot eli DNA-jakson kääntymät
<ul style="list-style-type: none"> • Duplikaatiot eli jonkun osan kahdentumat 	<ul style="list-style-type: none"> • Useamman emäksen korvautuminen toisella sekvenssillä

Pistemutaatio tarkoittaa sitä, että yksi emäs muuttuu DNA-jaksossa. Yksittäisiä pistemutaatioita tapahtuu soluissamme jatkuvasti, ja useimmat niistä osuvat geenien ei-koodittaville alueille. Jos pistemutaatio osuu valkuaisaineita koodittavalle alueelle, ei sekään aina aiheuta muutoksia syntyvässä valkuaisaineessa. Tämä johtuu siitä, että aminohappoja koodittavien kolmen emäksen mittaisten kodonien kaksi ensimmäistä emästä usein määräävät tarvittavan aminohapon. Kuitenkin täytyy muistaa, että osa pistemutaatioista aiheuttaa joskus hyvinkin suuria muutoksia tuotettavassa valkuaisaineessa. (Solubiologian Web-oppikirja 2001.) Pistemutaatioiden kemiallinen luokitus tapahtuu jaottelamalla transitiomutaatiot ja transversiomutaatiot erilleen. Transitiomutaatiossa puriiniemäs muuttuu pyrimidiiniemäkseksi tai toisin päin. Transversiomutaatiossa puriiniemäs muuttuu toiseksi puriiniemäkseksi tai pyrimidiiniemäs toiseksi pyrimidiiniemäkseksi. (Kere – Kivirikko 2006: 63), kuten kuviossa 5 on esitetty.



KUVIO 5. Pistemutaatiot (Mukaiillen Kere – Kivirikko 2006: 63).

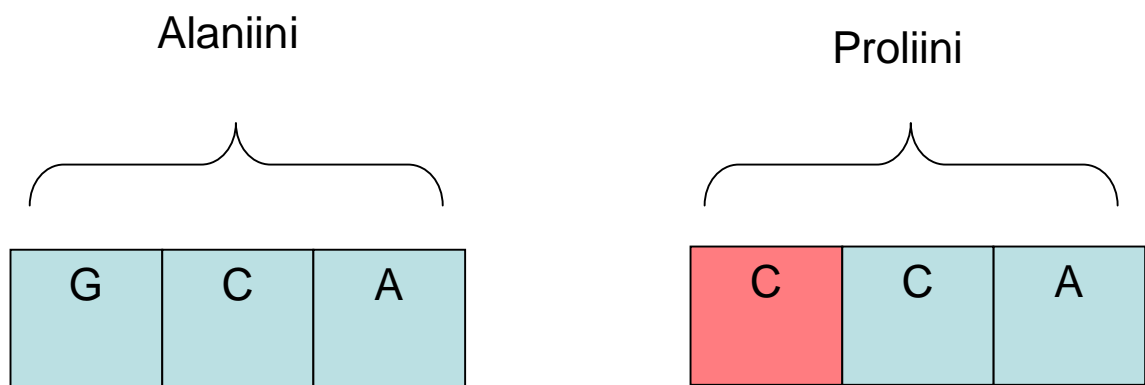
4.1 Cambridge-mutaatiot

Cambridge I- ja II -mutaatiot ovat antitrombiinin mutaatioita. Ne sijaitsevat saman geenin samassa kohdassa kodonissa 384. (Corral ym. 2007: 4260; Perry – Harper – Fairham – Daly – Carrell 1989: 174 - 175.) Tämän vuoksi opinnäytetyössä käytettävällä menetelmällä voidaan vain todeta, mutaation olemassaolo, mutta ei pystytä erottamaan onko kyseessä Cambridge I- vai II -mutaatio, koska DNA:n emäsjärjestys ei selviä tutkimuksessa. Tarkemman tiedon selvittämiseksi näytteestä tulisi tehdä sekvensointi, eli selvittää DNA:n emäsjärjestys, jolloin nähdään, kumpi mutaatio on tapahtunut. Mahdollisten mutaatioiden löydyttyä Veripalvelu huolehtii sekvensoinnista.

4.2 Cambridge I -mutaatio ja sen tutkimus

Cambridge I -mutaatio löydettiin Cambridgen yliopistossa vuonna 1989 naiselta, jolla oli nuorena toistuvia trombooseja. Antitrombiini, jossa mutaatio on tapahtunut, sitoo normaalisti hepariinia, mutta on menettänyt kykynsä inhiboida trombiinia. (Perry ym. 1989: 175 - 176.)

Cambridge I -mutaatio on pistemutaatio, jossa guaniini (G) on muuttunut sytosiiniksi (C). Villi tyyppi on siis G/G, heterotsygoottinen mutaatio on G/C ja homotsygoottinen mutaatio C/C. Mutaation nimi A384P tulee siitä, että aminohappo vaihtuu alaniinista proliiniksi kodonissa 384. (Perry ym. 1989: 174 - 175.) Syntynyt mutaatio on transversiomutaatio, jossa puriiniemäs muuttuu pyrimidiiniemäkseksi (esitetty kuviossa 6) (Kere – Kivirikko 2006: 63).

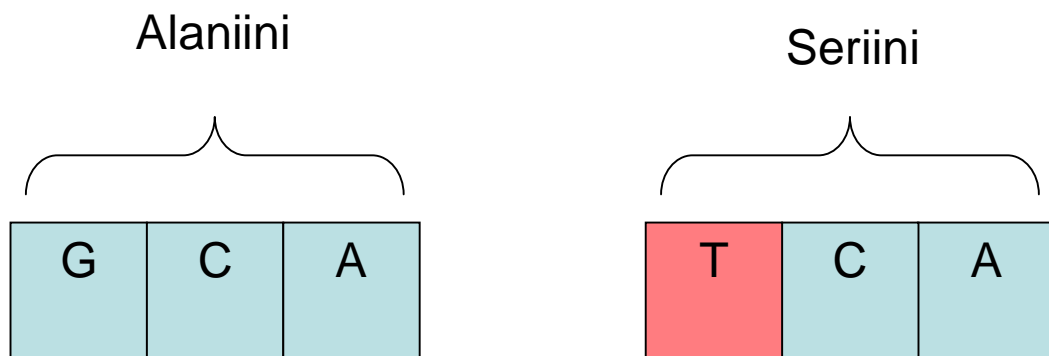


KUVIO 6. Cambridge I -mutaatio, jossa alaniini muuttuu transversiomutaation johdosta proliiniksi (Metsä-Ketelä 2008).

Länsiskotlantilaisilla verenluovuttajilla tehdyssä tutkimuksessa löytyi kaksi Cambridge I -mutaatiota. Tutkittavina oli 9669 verenluovuttajaa (n=9669). (Tait ym.1994: 106.) Suomessa Cambridge I -mutaatiota ei ole tutkittu aiemmin (Jaatinen 2008). Cambridge I -mutaatio on hyvin harvinainen ja mutaation aiheuttama muutos AT:n toiminnassa tulee esiin jo antitrombiinin funktionaalisessa määrittämisessä. Koska muutos proteiinissa on niin suuri, että se voidaan havaita jo funktionaalisessa määrittämisessä, ei erillistä Cambridge I -mutaatiotutkimusta pidetä tarpeellisena (Hiltunen 2008).

4.3 Cambridge II -mutaatio ja sen tutkimus

Cambridge II -mutaatio löydettiin Cambridgen yliopistossa vuonna 1991 (Perry ym. 1991: 248 – 250). Cambridge II -mutaatio on pistemutaatio, jossa guaniini (G) on vaihtunut tyymiiniksi (T). Tällöin villi tyyppi on G/G, heterotsygoottinen mutaatio G/T ja homotsygoottinen mutaatio T/T. Mutaation nimi A384S tulee siitä, että aminohappo vaihtuu alaniinista seriiniksi kodonissa 384. (Corral ym. 2007: 4260.) Kyseessä on transversiomutaatio, jossa puriiniemäs muuttuu pyrimidiiniemäkseksi (esitetty kuviossa 7) (Kere – Kivirikko 2006: 63).



KUVIO 7. Cambridge II -mutaatio, jossa alaniini muuttuu transversiomutaation johdosta seriiniksi (Metsä-Ketelä 2008).

Cambridge II A384S -mutaation esiintyvyyttä on aiemmin tutkittu brittiläisessä (Länsi-Skotlannissa), espanjalaisessa ja ranskalaisessa väestössä. Ensimmäisen kerran mutaatiosta on raportoitu vuonna 1991 brittiläisten tutkijoiden toimesta. (Perry ym. 1991: 248 - 250.) Länsi-Skotlannissa mutaatiolle todettiin korkea frekvenssi (1/600) vuonna 1994. Tutkittavana oli 9669 verenluovuttajaa, joista neljällätoista todettiin tyyppin kaksi mutaatio eli Cambridge II -mutaatio. (Tait ym.1994: 106.)

Espanjalaisilla löydettiin matala frekvenssi (0,2 %) mutaatiolle vuonna 2007. Tutkimuksessa tutkittiin tromboosipotilaita ja kontrolliryhmänä verenluovuttajia. Molemmissa ryhmissä oli 1018 tutkittavaa. Verenluovuttajien joukosta 1018 henkilöstä, kahdelta löytyi mutaatio. Tromboosipotilaiden ryhmästä mutaatio löytyi 17:sta potilaalta. Kaikki löytyneet mutaatiot olivat heterotsygoottisia. Tutkimuksen mukaan mutaatio aiheuttaa 8.63- kertaisen riskin saada tromboosi. (Corral ym. 2007: 4260.)

Myös ranskalaiset ovat julkaisseet lyhyen yhteenvedon tutkimuksestaan, jonka tutkittavat kuuluvat pariisilaiseen tromboositutkimusaineistoon (patients from the case-control Paris Thrombosis Study, PATHROS). Tästä aineistosta löytyi 473 näytteen joukosta kaksi heterotsygoottisen mutaation omaavaa naispotilasta. (Picard ym. 2007: 2777 – 2778.)

Cambridge II -mutaatiota pidetään kaukaasialaisten yleisimpänä yksittäisenä antitrombiinin vajauksen syynä. Mutaatio ei vaikuta antigeeni – eikä anti-Xa-aktiivisuuteen. (Barba - Santamaría - Tirado - Martí - Fontcuperta 2008: 443; Perry ym. 1991: 249.) Mutatoituneella antitrombiinilla on normaali affiniteetti hepariiniin sekä normaali inhibiitovoimakkuus. Kuitenkin täyspitkän hepariinin läsnä ollessa Cambridge II:ta tulee substraatti faktori Xa:lle sekä trombiinille. (Mushunje - Zhou - Carrell - Huntington 2003: 2030.)

Veripalvelun tutkijat olettavat mutaation löytyvän suomalaisilta, mutta sen frekvenssin olevan matala. Kuitenkin on muistettava, että oli tutkimustulos mikä tahansa, on se merkittävä löydös. Tulos tullaan julkaisemaan Veripalvelun toimesta heti, kun se on mahdollista. Veripalvelun tutkijat odottavat mahdollisesti löytyvän Cambridge I- tai II -mutaation selittävän edes osan niistä hyytymisjärjestelmän häiriöistä, joille ei vielä tänä päivänä ole löydetty syytä.

5 MUTAATIOIDEN OSOITTAMISEN MENETELMÄT

Mutaatioiden osoittamisessa käytetään DNA:n konsentraatiomittausta, PCR-monistusmenetelmää, digestiota eli DNA:n katkaisua restriktioentsyymillä sekä agarosigeelielektroforeesia. Seuraavassa syvennyttään tarkemmin jokaisen työvaiheen menetelmiin teoriaosan avulla.

DNA:n eristys on yksi keskeisimmistä menetelmistä geenitekniikan alalla. Ennen kuin kohde-DNA:ta voidaan käsitellä esimerkiksi restriktioentsyymeillä, täytyy DNA eristää soluista tai kudoksista ja ainakin suunniteltuja reaktioita häiritsevät tekijät tulee poistaa. Tosin PCR-tekniikat ovat kehittyneet nykyään niin, ettei PCR:ää varten DNA:ta tarvitse

aina eristää ja puhdistaa. Usein saattaa riittää, että DNA saadaan vapautumaan solun sisältä monistamista varten. (Suominen – Ollikka 1999: 61.) Opinnäytetyössä tutkimusmateriaalin DNA oli valmiiksi eristetty Veripalvelun potilaslaboratoriossa käytössä olevilla rutiinimenetelmillä (Jaatinen 2008), joten DNA:n eristämisen teoriaa ei ole oleellista käsitellä tässä opinnäytetyössä tarkemmin.

5.1 DNA:n konsentraation mittaaminen NanoDrop®-laitteella

NanoDrop ND-1000 laite on spektrofotometri, joka mittaa DNA-pitoisuuksia aallonpituuksilla 220 – 750 nm. Laite mittaa DNA-pitoisuuden 1 µl:sta näytettä, ja ND-1000 laite mahdollistaa DNA-pitoisuuden mittaamisen (kaksisäikeisestä DNA:sta) jopa 3700 ng/µl:aan asti laimentamatta. (NanoDrop 2007.)

Saimme koulutuksen NanoDrop ND-1000-laitteen käyttöön Veripalvelun laboratorioasiantuntija Jaatisen toimesta, ja mittaustyötä tehdessämme käytimme Veripalvelun virallista työohjetta.

5.2 PCR

Työssä monistimme DNA:ta käyttäen PCR-menetelmää. Kyseisen menetelmän on kehittänyt ja kuvannut Kary Mullis tutkimusryhmineen vuonna 1986 (Mullis ym.1986). Mullis sai PCR:n kehittämisestä Nobelin kemian palkinnon vuonna 1993 (McPherson – Møller 2000: 3). PCR on nykyään laboratorioiden geenimonistuksen perusmenetelmä.

DNA:n monistaminen putkessa PCR-menetelmällä perustuu samaan periaatteeseen, jolla DNA kahdentuu solussa. Kaksijuosteinen DNA avataan PCR-reaktiossa lämmön avulla. (McPherson – Møller 2000: 4.) Solun sisällä avautuminen tapahtuu helikaasientsyymien avulla (Heino – Vuento 2004: 252). Avautuneen DNA:n mallijuosteen rinnalle kootaan toinen juoste polymeeraasin avulla, käyttäen rakennuspalikoina vapaita nukleotidejä. PCR-menetelmässä käytetään siis samoja peruselementtejä kuin elävässä solussa. (McPherson – Møller 2000: 4.)

PCR-menetelmässä DNA:ta monistetaan käyttäen tutkittavalle geenille tai geenialueelle spesifisiä alukkeita, jotka ovat kaksi erilaista nukleotidijärjestykseltään tarkasti tunnettua DNA-jaksoa, joille on komplementaariset alueet monistettavassa DNA:ssa (Suominen - Ollikka 1999: 107 - 108; Kramer - Coen 2001). Tutkittavasta DNA:sta

täytyy siis tietää emäsjärjestystä sen verran, että alukkeet voidaan valita (Klug – Cummings 2003: 473). Alukkeet kiinnittyvät monistettavan DNA:n juosteisiin DNA-alueen vastakkaisiin päihin. Väliin jää monistettava alue. (Suominen - Ollikka 1999: 107 - 108; Kramer - Coen 2001.)

Lisäksi tarvitaan DNA-polymeraasia, jonka tulee kestää lähes 100 °C lämpöä. Lämmönkestäviä polymeraaseja saadaan eristettyä muun muassa kuumissa lähteissä elävistä bakteereista, kuten *Thermus Aquaticus* – bakteerista, josta saadaan *Taq*-polymeraasia. (Suominen - Ollikka 1999: 107 - 108; Kramer - Coen 2001.)

PCR-reaktiota varten tarvitaan myös deoksinukleotideja eli dNTP:tä. Deoksinukleotideja tulee olla kaikkia neljää emästä (T, A, C ja G) saman verran, jotta PCR-reaktion tarkkuus ei kärsi. (McPherson, M. J. – Møller, S. G. 2000: 25.) Kopioitava DNA-juoste rakentuu PCR-seoksessa vapaana olevista deoksinukleotideista. Kopioituminen perustuu emästen pariutumissääntöihin, joissa adeniini (A) pariutuu aina tyymiiniin (T) kanssa ja sytosiini (C) guaniiniin (G) kanssa. Mallina oleva DNA-juoste siis määrää kopioituvan juosteen emäsjärjestyksen omalla emäsjärjestyksellään. (McPherson, M. J. – Møller, S. G. 2000: 4.)

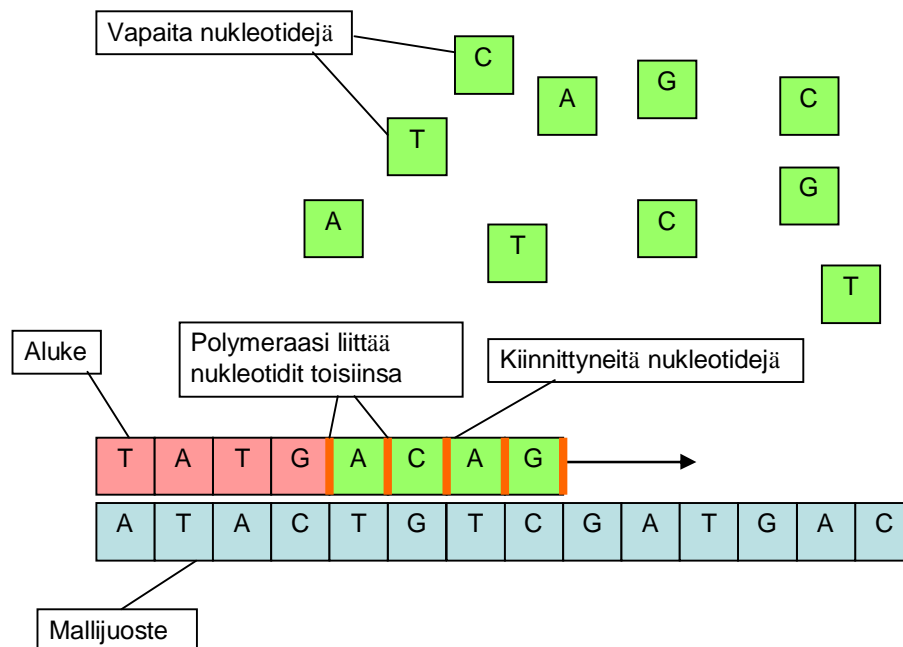
PCR-reaktio vaatii tarkoin määritellyt olosuhteet. PCR-seokseen lisätään puskuria, joka sisältää muun muassa magnesiumia ja luo edulliset olosuhteet PCR-reaktiolle. (McPherson – Møller 2000: 23 -24.)

Edellä mainituista reagensseista tehdään seos mikrosentrifuugiputkiin. Alukkeita ja nukleotideja on liuoksessa ylimäärä, jotta reaktio pystyy etenemään loppuun asti. Tällä varmistetaan siis, että seoksessa on tarpeeksi uusien DNA-juosteiden rakennusaineita. Seos laitetaan mikrosentrifuugiputkessa PCR-laitteeseen, johon ohjelmoidaan PCR-ohjelma. (Suominen - Ollikka 1999: 107 - 108; Kramer - Coen 2001.)

PCR-ohjelmassa on kolme osaa, joista ensimmäinen on noin 94 °C:ssa tapahtuva denaturoiminen. Kaksijuosteinen DNA avautuu kahdeksi erilliseksi juosteeksi, kun korkea lämpötila katkaisee DNA-juosteiden väliset vetysidokset. (McPherson – Møller 2000: 3.) Tämä tehdään siksi, että alukkeet voisivat sitoutua DNA-juosteisiin (Suominen - Ollikka 1999: 107; Kramer - Coen 2001).

Tätä seuraa alemmassa lämpötilassa (noin 55 °C) tapahtuva nopea alukkeiden kiinnittymisvaihe eli annealing. Koska DNA pyrkii taas sulkeutumaan lämpötilan laskettua, täytyy alukkeiden kiinnittyä nopeasti. Tämä onnistuu niiden pienen koon ansiosta. (Suominen - Ollikka 1999: 107 - 108; Kramer - Coen 2001.) Kiinnittyneet alukkeet toimivat aloituskohtana, josta uudet juosteet alkavat muodostua (Klug - Cummings 2003: 473 - 474).

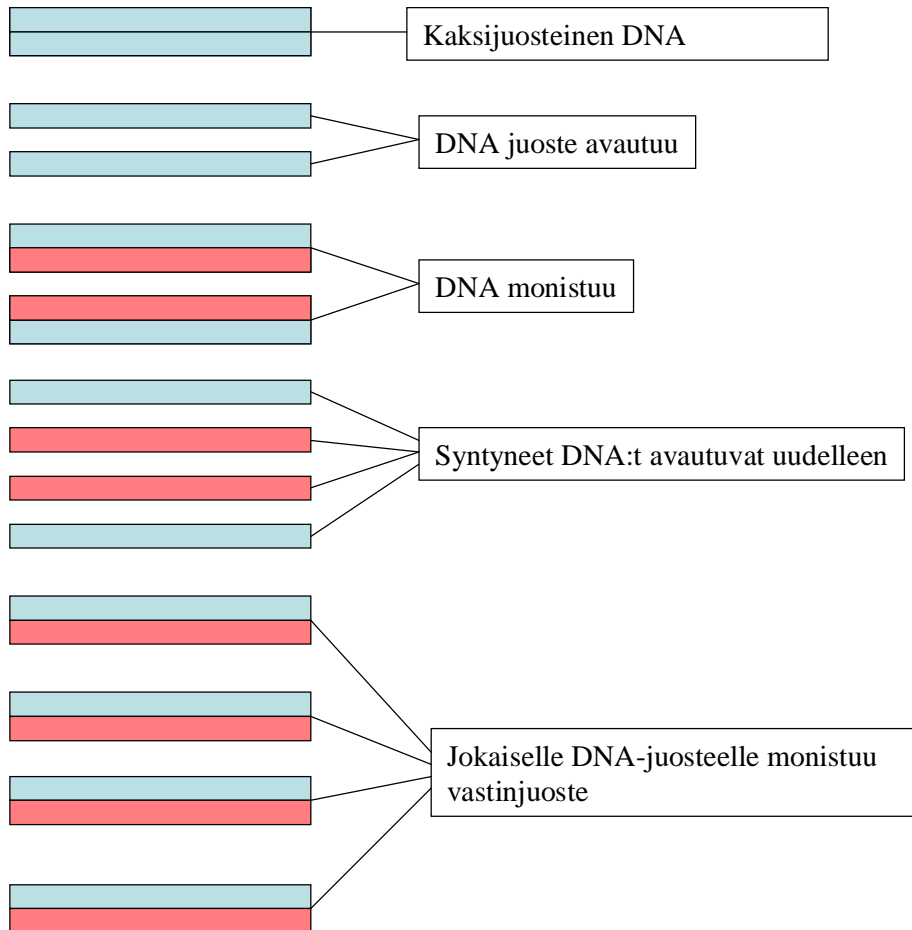
Viimeisenä on pidennysvaihe eli elongation, joka tarvitsee lämpötilakseen noin 72 °C. DNA-polymeraasi liittää reaktioliuoksessa vapaana olevia nukleotidejä 5'->3'-suunnassa lähtien alukseen 3'-päästä, alkuperäisen DNA-juosteen mallin mukaan. (Suominen - Ollikka 1999: 108; Taylor 1991: 1.) Molemmille DNA-juosteille muodostuu näin alukkeidensa avulla vastinjuoste monistettavalle alueelle (Suominen - Ollikka 1999: 108; Kramer - Coen 2001). Kuviossa kahdeksan on esitetty PCR:n toimintaperiaate yksinkertaistettuna.



KUVIO 8. PCR:n toimintaperiaate (Metsä-Ketelä 2008).

DNA-juosteiden määrä kasvaa monistettaessa eksponentiaalisesti, kuten kuviossa yhdeksän esitetään. PCR-sykliä toistetaan niin monta kertaa, että saadaan riittävästi

monistettua DNA:ta. (Suominen - Ollikka 1999: 108; Kramer - Coen 2001.) DNA:ta voitaisiin monistaa periaatteessa loputtomasti, mutta monistettavan määrän rajaa alukkeitten ja nukleotidien määrä PCR-seoksessa (Klug – Cummings 2003: 473 – 474). Yleensä 25 – 35 sykliä riittää tuottamaan tarvittavan määrän DNA:ta (Taylor 1991: 2).



KUVIO 9. DNA:n määrä kasvaa eksponentiaalisesti monistuksen edetessä (Metsä-Ketelä 2008).

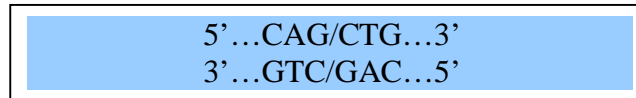
PCR-työskentelyssä tulee ottaa huomioon kontaminaation mahdollisuus. Kontaminaatio voi tapahtua näytteiden välillä, tai välineiden ja reagenssien kautta. (Erlich 1989: 4.) Työskentelytilassa leijailevat näytteeseen kuulumattomat DNA:t saattavat kontaminoida monistettavan PCR-reaktion, jolloin monistuu väärää DNA:ta. Kontaminaatioiden estämiseksi PCR:n tekemiseen on hyvä olla erillinen hyvin ilmastoitu ja eristetty puhdastila. Reaktioseokset tulisi valmistaa laminaarivirtauskaapissa ja käyttää työssä filterillisiä pipetinkärkiä. Puhtaaseen tilaan, jossa PCR:ää tehdään, ei mielellään

mentäisi enää saman päivän aikana takaisin PCR- tuotteiden käsittelyyn varatusta tilasta. (Suominen - Ollikka 1999: 111 – 112.)

5.3 Digestio

Monistetut PCR-tuotteet katkaistaan halutusta kohdasta restriktioentsyymillä, eli niille tehdään digestio. Restriktioentsyymejä saadaan bakteereista, joista kullakin lajilla on oma restriktioendonukleaasinsa eli restriktioentsyyminsä. Entsyymit tunnistavat tiettyjä jaksoja DNA:ssa emäsjärjestyksen perusteella ja katkaisevat itselleen vieraan DNA:n kyseisestä kohdasta. Bakteerien oma DNA on suojassa katkeamiselta, koska niillä on katkeamiskohdassa metyylyryhmä, joka suojaa bakteeria niiden omien restriktioentsyymien toiminnalta. Entsyymien käyttö perustuu siihen, että ne pystyvät tunnistamaan missä tahansa DNA:ssa tietyn 4-8 nukleotidiparin mittaisen nukleotidijärjestyksen. Ne katkaisevat DNA-juosteen tunnistamastaan kohdasta tai sen lähetyviltä. (Suominen - Ollikka 1999: 68 – 69.)

Käyttämämme restriktioentsyymi on New England Biolabsin Pvu II, jonka tunnistama ja katkaisema kohta on seuraava:



Restriktioentsyymeille suositellaan tiettyä puskuria, joka tässä tapauksessa on 1xNEBuffer 2. Puskuri luo digestiolle otolliset olosuhteet ja se sisältää NaCl:ia, Tris-HCl, ja MgCl₂, sekä DTT:tä. (New England Biolabs®)

5.4 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosi on merilevästä saatava polysakkaridi, joka liukenee veteen kiehautettaessa ja jähmettyy jäähtyttyään. Agarosigeelin valmistus tapahtuu sekoittamalla haluttu määrä agarosijauhetta veteen ja geelipuskuriin sekä kiehauttamalla seosta mikroaaltouunissa,

kunnes agarooosi on sulanut. (Suominen - Ollikka 1999: 72 – 73.) Saatu agarooisigeeli on huokoista, verkkomaista materiaalia, jossa nukleinihapot pääsevät liikkumaan (Klug – Cummings 2003: 243).

DNA:n liikkuminen agarooisigeelillä perustuu siihen, että nukleinihapot ovat negatiivisesti varautuneita, jolloin ne kulkeutuvat sähkökentässä positiivista napaa kohden. DNA kulkeutuu agarooisigeelin verkkorakenteessa sitä hitaammin mitä isompi molekyyli on. (Suominen - Ollikka 1999: 72.) Jos ajautumaan laitetaan kaksi samanmuotoista ja kokoista näytettä, liikkumisnopeus riippuu myös siitä, kummalla on suurempi kokonaisvaraus. Geelin vahvuus, eli kuinka huokoista se on, vaikuttaa myös ajautumisen nopeuteen. (Klug – Cummings 2003: 243.) Näin saadaan erotettua erikokoiset DNA:t ja niille ominainen vyöhyke eli bändi, joita työssä tarkasteltiin (Suominen - Ollikka 1999: 72).

Agarooisigeeliin lisätään valmistusvaiheessa etidumbromidia, koska se sitoutuu DNA:han ja tekee sen näkyväksi agarooisigeelillä, ultraviolettivalolla (UV) katsottaessa. Etidumbromidi on karsinogeeni ja sitä käsiteltäessä tulee käyttää nitrilikäsineitä sekä vetokaappia sekoitettaessa etidumbromidi lämpimään agarooisiin, koska etidumbromidi haihtuu siinä hieman. Etidumbromidia sisältävät jätteet kerätään omaan jäteastiaan. (Suominen - Ollikka 1999: 72 – 73.)

Monistetun DNA:n näkyminen UV-valolla katsottaessa perustuu siihen, että nukleinihapot absorboivat ultraviolettivaloa. Parhaiten tämä tapahtuu aallonpituuksilla 254–260 nm. UV-valon absorptio perustuu UV-valon ja puriinien ja pyrimidiinien rengasrakenteiden väliseen vuorovaikutukseen. (Klug – Cummings 2003: 238.)

6 MUTAATIOIDEN OSOITTAMINEN

Työssä analysoitiin kahta erilaista aineistoa, alkuperäistä aineistoa (n=687) sekä lisäaineistoa (n=166). Yhteensä työn koko aineisto eli näytemäärä oli 853. Koko aineiston DNA oli eristetty Veripalvelun potilaslaboratoriossa käytössä olevilla rutiinimenetelmillä (Jaatinen 2008).

6.1 Aineisto

Alkuperäisen aineiston näytteet olivat osa isoa väestöpohjaista tapaus-verrokkitutkimusta, jonka tarkoituksena oli selvittää periytyvän tukostaipumuksen merkitystä raskauskomplikaatioissa. Aineistossa oli 46 naista, joilla oli ollut raskauden aikana syvä tai pinnallinen laskimotukos ja 641 naista, joiden raskaus oli sujunut normaalisti ilman komplikaatioita. Kyseisellä tutkimuksella on Veripalvelun eettisen toimikunnan (18.2.1997) ja Sosiaali- ja terveysministeriön lupa (Dnro 18/08/97). Lisäksi jokaiselta tutkimushenkilöltä on saatu allekirjoitettu lupa heidän näytteittensä tutkimiseen. (Hiltunen 2008.) Tutkimusaineiston 91 näytteestä DNA:n konsentraatio oli entuudestaan tiedossa ja pitoisuudet olivat välillä 3.2 – 189.8 ng/μl. Muiden näytteiden konsentraatiot mitattiin ensimmäisen PCR-ajon jälkeen, jos näyte ei monistunut (Jaatinen 2008). Tutkimusaineiston näytteet numeroitiin juoksevin numeroin välille 1 – 687.

Koska yhtään mutaatiota ei tutkimustyön edetessä havaittu, tuli tämän vuoksi aiheelliseksi tutkia lisääaineistoa. Tämä lisääaineisto koostui otoksesta näytteitä, jotka oli lähetetty Veripalvelun hemostaasitutkimusyksikköön keväällä 2008 tukostaipumuksen selvittelyä varten. Lisääaineiston näytteet valittiin sillä perusteella, että niissä antitrombiinin aktiivisuus oli alle 90 % (Hiltunen 2008). AT-aktiivisuuden viiteväli on 87 % - 111 % (Kliiniset laboratoriotutkimukset 2008). Lisääaineiston tutkimiseen ei eettisen toimikunnan lupaa Cambridge-mutaatiotutkimuksia varten tarvittu, koska näytteet tutkittiin osana tukostaipumuksen laajempia selvittelyjä. Potilasmateriaali numeroitiin juoksevin numeroin välille A1 – A166.

Lisääaineiston 166 näytteen joukosta oli Veripalvelun suorittamissa tutkimuksissa löytynyt 16 heterotsygoottista FV Leiden mutaation kantajaa sekä 2 heterotsygoottista FII eli protrombiinin mutaation kantajaa. Kyseisillä tutkittavilla oli kuitenkin vain toinen mutaatioista, eikä yhdelläkään aineiston tutkittavalla todettu kahta eri geenimutaatiota. 148:lla tutkittavista ei todettu kummankaan jo tunnetun geenivirheen selittävän heidän kliinisiä oireitaan.

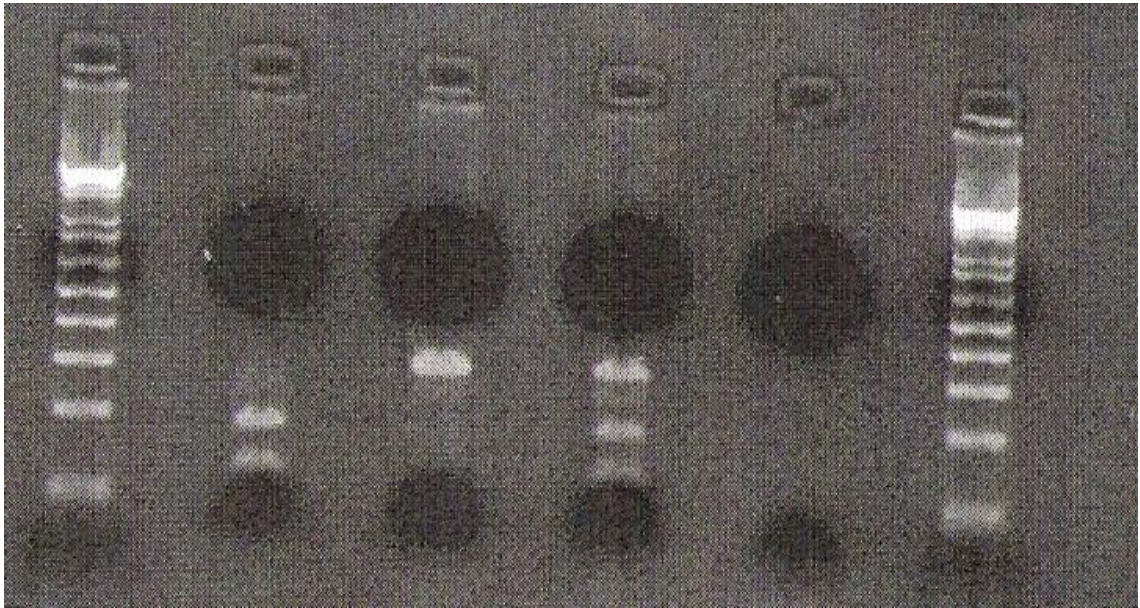
Tehtäväksi tuli vielä hakea vastausta seuraavaan kysymykseen:

- Minkälainen antitrombiini Cambridge I- ja II -mutaatioiden osuus on potilaan kliinisten oireiden taustalla, kun FV Leiden ja FII -mutaatiot eivät pysty oireita selittämään?

6.2 Tutkimuksen suoritus

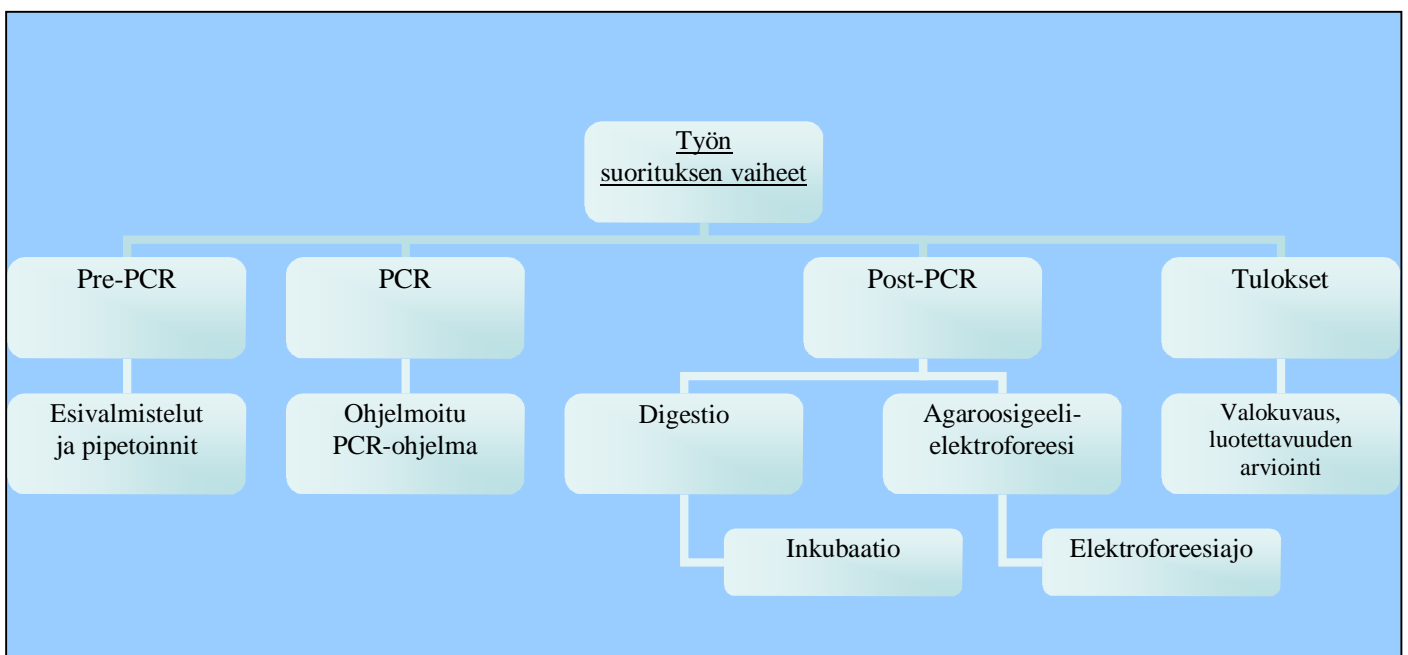
Tutkimuksen suoritus aloitettiin perehdytyksellä, josta huolehtivat laboratorioasiantuntija Taina Jaatinen sekä bioanalytikko Jonna Clancy. Jaatinen ja Clancy olivat etukäteen optimoineet PCR-ohjelman. He olivat testanneet optimaalisen reaktiovolyymien, digestiovolyymien sekä elektroforeesiajon ajan ennalta käsin. He olivat myös testanneet espanjalaiselta tutkimusryhmältä (Corral ym. 2008) saadut kontrollinäytteet, jotta ne monistuisivat myös heidän optimoimallaan PCR-ohjelmalla.

Espanjalainen tutkimusryhmä osoitti suurta kiinnostusta suomalaista tutkimusta kohtaan ja luovutti omasta aineistostaan kolme DNA-näytettä, joissa olivat mukana Cambridge-mutaation omaavat näytteet (hetero- ja homotsygoottinen) sekä niin sanottu villi tyyppi eli normaali tyyppi. Kuviossa 10 nähdään näiden kontrollinäytteiden tulokset, vasemmalla molekyylipainomarkkerin jälkeen villi tyyppi ("normaali"), keskellä homotsygoottinen mutaatio ja oikealla heterotsygoottinen mutaatio. Ennen molekyylipainomarkkeria oikealla on vesikontrolli. Kuvasta havaitaan myös, että PCR-ohjelma ja reaktiovolyymit toimivat, sillä PCR-tuote monistuu selvästi.



KUVIO 10. Tulos agarosigeeliltä. Vasemmasta reunasta alkaen kuvassa on molekyylipainomarkkeri, villi tyyppi, homotsygoottinen mutaatio, heterotsygoottinen mutaatio, vesikontrolli ja uudelleen molekyylipainomarkkeri (Clancy 2008).

Työlle ei ole olemassa työohjeita, koska tutkimus ei ole rutiinikäytössä. Opinnäytetyön tutkimuksen suorittamiseen tarvittavat ohjeet ja perehdytys saatiin Clancyilta ja Jaatiselta. Kuviossa 11 on havainnollistettu käytännön työskentelyn eri vaiheet.



KUVIO 11. Työn suorituksen vaiheet (Salmela 2008).

Yhteen reaktioon (10 μ l) tarvittava PCR- seos on esitetty alla.

<u>PCR-seos 10 μl</u>	
1.0 μ l	Puskuri 10x
0.2 μ l	dNTP 10mM
0.1 μ l	Ampli Taq DNA polymeraasi (entsyymi) 5 U/ μ l
1 μ l	DNA-näyte
0.5 μ l	Aluke AT6F2 10 pmol/ μ l
0.5 μ l	Aluke AT6B 10 pmol/ μ l
6.7 μ l	Vesi
Yhteensä yhteen reaktioon (10 μ l) tarvitaan:	
<u>9 μl PCR-seosta/putki + 1 μl DNA</u>	

Riippuen näytteiden määrästä, kullakin kerralla laskettiin PCR-seos sopivaksi, ottaen huomioon pipetointivara ja vesikontrolli. Käytännön syistä tehtiin enimmillään 94 näytettä kerralla, koska silloin tarvittiin PCR-ajoon vain yksi PCR-laite. Veripalvelun työntekijät tarvitsivat muut PCR-laitteet potilasnäytteitä varten. PCR-laitteeseen mahtuu 96 näytettä kerralla, joten näytteitä mahtuu sinne yhteensä 94 kappaletta + 2 kappaletta vesikontrollia. Molemmat opiskelijat tekivät siis oman vesikontrollinsa, josta tarkastettiin tulosten luotettavuus.

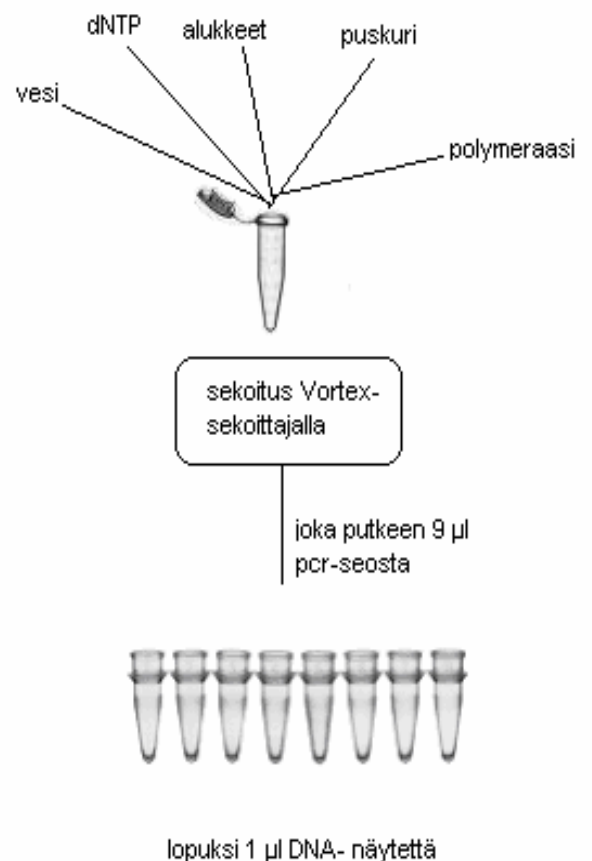
Aluksi tarvittavat näytteet ja reagenssit, sekä pienissä erissä pakastettu vesi otettiin sulamaan. Poikkeuksena oli polymeraasientsyymi, joka otettiin suoraan pakkasesta kun sitä tarvittiin ja palautettiin heti pakkaseen pipetoinnin jälkeen. Lisäksi huolehdittiin työpaikalle muut tarvittavat välineet, kuten suoja-alusta, pipetit, filterilliset pipetinkärjet, telineet, roskakori, merkkaukset, ”strippejä” eli näyteputkia, ja ”stripin” kansia sekä eppendorfputkia PCR-seoksen valmistukseen. ”Strippi” on ikään kuin näyteputkijono (näyteputket ja kannet esitetty kuviossa 12), jossa on kahdeksan näytepaikkaa. Lisäksi pre-PCR -tilassa työskennellessä tarvitaan Vortex-sekoitinta ja minisentrifuugia.



KUVIO 12. PCR ”strippejä” alhaalla ja ”striippien” kannet ylhäällä (Mukailen LightLabs 2008).

Näyteputket merkattiin juoksevin numeroin, jotka on etukäteen päätetty jokaiselle potilasnäytteelle. Näin ollen analysoidaan näytteet 1 – 687. Kun päivän näytteet on tehty, siirretään jo tehdyt näytteet pakkasessa eri laatikkoon kuin missä tekemättömät ovat.

Ensin pipetoitiin vesi seosputkeen, koska sitä on suurin määrä, jolloin sen saa hyvin putken pohjalle. Sen jälkeen pipetoitiin sulaneet, Vortex-sekoittajalla sekoitetut ja nopeasti sentrifugoidut reagenssit eli dNTP, alukkeet ja puskuri. Viimeisenä otettiin pakkasesta viskoosi polymeraasi, joka pipetoitiin sentrifugoinnin jälkeen reaktioseokseen. Tämän jälkeen viedään reagenssit heti takaisin pakkaseen ja sekoitetaan reaktioseos tasaiseksi Vortex-sekoittimella. Sekoituksen jälkeen seosputki sentrifugoidaan nopeasti, jotta pienetkin pisarat saadaan putken pohjalle. PCR-seoksen valmistaminen on esitetty kuviossa 13.



KUVIO 13. PCR-seoksen valmistaminen (Salmela 2008).

PCR- reaktioseos jaettiin merkityille näytepaikoilleen strippeihin, 9 μ l jokaiseen putkeen. Tämän jälkeen lisättiin joka putkeen valmiiksi eristetty DNA-näyte, 1 μ l, jonka jälkeen reaktiotilavuudeksi saadaan 10 μ l. Tässä vaiheessa piti olla erittäin tarkka, että pipetoi oikean näytteen oikeaan paikkaan. Tähän on hyvä kehittää itselleen hyvä muistijärjestelmä, jonka avulla voi olla varma, että näyte on siellä missä pitää. Pipetoinnin jälkeen on myös hyvä tarkistaa silmämääräisesti, että kaikissa näytepaikoissa on saman verran seosta. Pipetoinnit tulisi saada putken pohjalle niin, ettei nestepisaroita olisi putken reunoilla. Jos nestettä jää putken reunoille, on vaarana se, ettei PCR-ohjelman aikana kaikkia tarvittavia aineita ole riittävästi ja määrittäminen sen vuoksi epäonnistuu.

Seuraavaksi näytteet siirrettiin PCR-laitetilaan huoneiden välissä olevan luukun kautta. Luukun molemmin puolin huoneissa on omat ovet, joita ei saa pitää auki samanaikaisesti. Kun näytteet on siirretty luukusta sisään, työntekijä itse kävelee pre-PCR-tilasta PCR-tilaan eri reittiä. Pre-PCR-tilan suojavaatteet riisutaan. Näytteet laitetaan PCR-laitteeseen, valitaan koneeseen ohjelmoitu PCR-ohjelma ja käynnistetään kone. Opinnäytetyössä käytettiin seuraavanlaista PCR-ohjelmaa:

- Alkudenaturaatio: 96 °C, 2 minuuttia
 - Denaturaatio: 94 °C, 30 sekuntia
 - Alukkeiden kiinnittyminen: 51 °C, 30 sekuntia
 - Pidennysvaihe: 72 °C, 30 sekuntia
- x 30 sykliä
- Lisäpidennys: 72 °C, 30 sekuntia
 - Jäähdytys 4 °C, niin kauan kunnes näytteet haetaan jatkotoimenpiteisiin

Digestioseoksen valmistaminen on käytännössä helppoa. Digestio sekä loput työvaiheet suoritetaan post-PCR-tilassa, johon näytteet siirretään PCR-ohjelman loputtua. Seuraavassa on digestioseoksen ohje laskettuna yhdelle näytteelle (10 μ l):

- 6 μ l Vesi
- 2 μ l Puskuri (x10)
- 2 μ l PVU II- restriktioentsyymi 10,000 U/ml

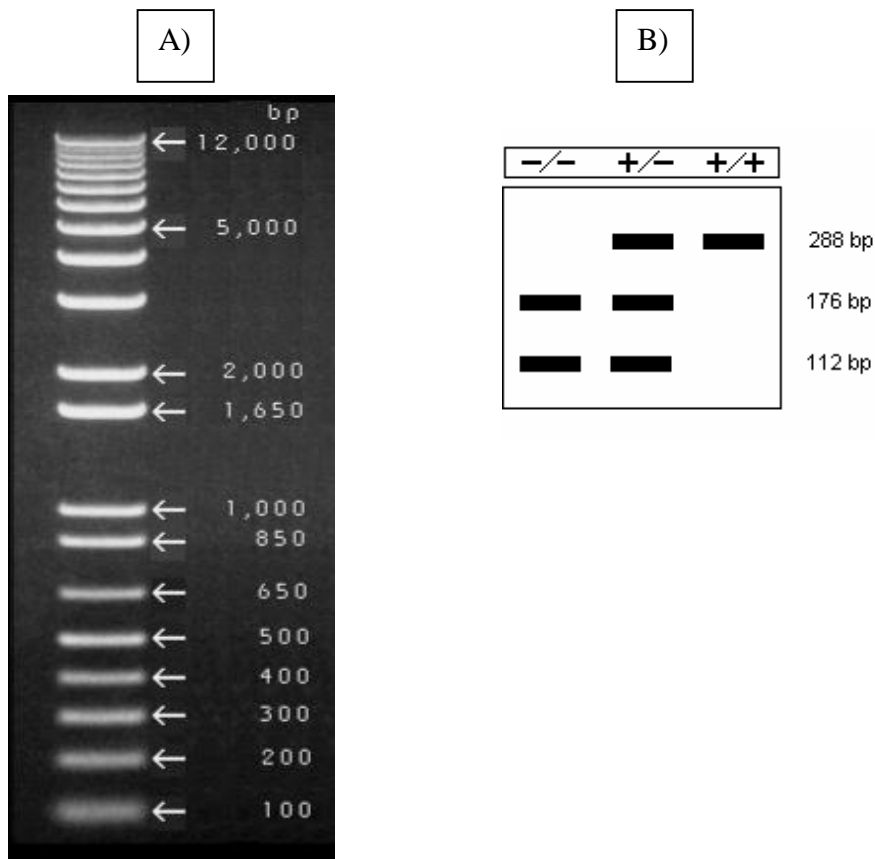
Digestioseos lasketaan näytteiden määrän mukaan, kertomalla materiaalit sopivalla kertoimella. Digestioseos voidaan pipetoida suoraan PCR-putkiin, joissa näytteet ovat jäähtyneet PCR-ohjelman jälkeen. PCR-tuotetta on putkissa ennen digestioseoksen lisäämistä 10 μ l, ja seoksen lisäämisen jälkeen lopputilavuudeksi saadaan yhteensä 20 μ l. Digestio tapahtuu tunnin inkubaation aikana +37 °C:ssa erillisessä lämpökaapissa.

Inkubaation aikana voidaan pipetoida 2 μ l latauspuskuria uusiin strippeihin. Niihin siirretään inkuboinnin jälkeen 10 μ l digestiotuotetta, jolloin kokonaistilavuus on 12 μ l. Latauspuskurin tarkoitus on muuttaa näytteen viskositeettia niin, että se on agarosigeelijaon aikana raskaampaa kuin käytetty ajopuskuri. Näyte pysyy sen avulla näytekolossaan. Lisäksi latauspuskuriin on lisätty väriainetta, jolloin näytteiden ajautumista voi seurata. (Suominen - Ollikka 1999: 73.)

Lisäksi valmistetaan 2 % agarosigeeli elektroforeesiajoa varten, joka voidaan tehdä sopivan tauon aikana. Veripalvelussa agarosigeeliä tehdään valmiiksi pulloihin, jossa se sulatetaan uudelleen mikrossa. Siihen lisätään kaksi tippaa etidiumbromidia tippapullostta vetokaapissa ja kaadetaan geelikelkkaan. Pehmeään geeliin lisätään näytekammat, jotka tekevät näytekotot geelin jähmettyessä. Etidiumbromidia ei tulisi koskaan lisätä kuumaan agarosiin, sillä se on karsinogeeni ja höyrystyessään aiheuttaa työturvallisuusriskin työntekijöille vetokaapista huolimatta.

Digestiotuotetta pipetoidaan agarosigeelille näytepaikkoihin 11 μ l, sekä joka riville yksi molekyylipainomarkkeri, jota pipetoidaan 5 μ l. Molekyylipainomarkkeria

(kuviossa 14) käytetään tunnettuna kokostandardina, johon näytteiden ajautumista ja pituutta verrataan. Lopuksi näytteitä ajetaan puskurilla täytetyssä ajoaltaassa sähkökentässä 13 minuuttia 200 voltilla. Tulosten tulkintaa on havainnollistettu alla olevassa kuviossa 14, jossa a-kohdassa on molekyylipainomarkkeri ja b-kohdassa piirretty kuvio tutkimuksen tuloksista. Monistuneiden tuotteiden kokoa verrataan tunnettuun kokostandardiin eli molekyylipainomarkkeriin, jolloin voidaan olla varmoja siitä, että on saatu monistettua oikeaa tuotetta. (kuvioissa 14 on käytetty englanninkielistä termiä bp eli base pair, suomennettuna emäspari, ep)



KUVIO 14. A) Molekyylipainomarkkeri (Invitrogen™). B) -/- esittää villiä tyyppiä, +/- heterotsygoottista mutaatiota ja +/+ homotsygoottista mutaatiota (Salmela 2008).

Tuloksia tarkastellaan ultraviolettivalopöydällä ja tulokset voidaan lukea suoraan geeliltä. Lisäksi kaikista näytteistä otetaan ja tulostetaan kuva, joka liimataan työkirjaan, johon kerätään kaikki tiedot tutkimuksen suorittamisesta. Näin tuloksista saadaan tallennettua dokumentti, jota säilytetään Veripalvelussa. Tuloksia voidaan tällä tavalla tarkastella myös vuosien päästä. Geelille muodostuneista viivoista voidaan tulkita tulos vertaamalla DNA-juosteiden pituutta molekyylipainomarkkeriin. Jos viiva on vain 288 emäsparin eli ep kohdalla, on kyseessä homotsygoottinen mutaatio. Jos viiva on 288 ep:n 176 ep:n ja 112 ep:n kohdalla kyseessä on heterotsygoottinen mutaatio. Viivat 176 ep:n ja 112 ep:n kohdalla kuvaavat villiä tyyppiä eli on niin sanotusti ”normaali”. (Corral ym. 2007: 4260.)

7 TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA

Asetettujen tutkimusongelmien mukaisesti tulosten tulkinnessa kiinnitetään huomiota PCR-ajojen onnistumiseen. Toinen analysoitava asia on mutaatioiden esiintyvyys suomalaisessa väestössä.

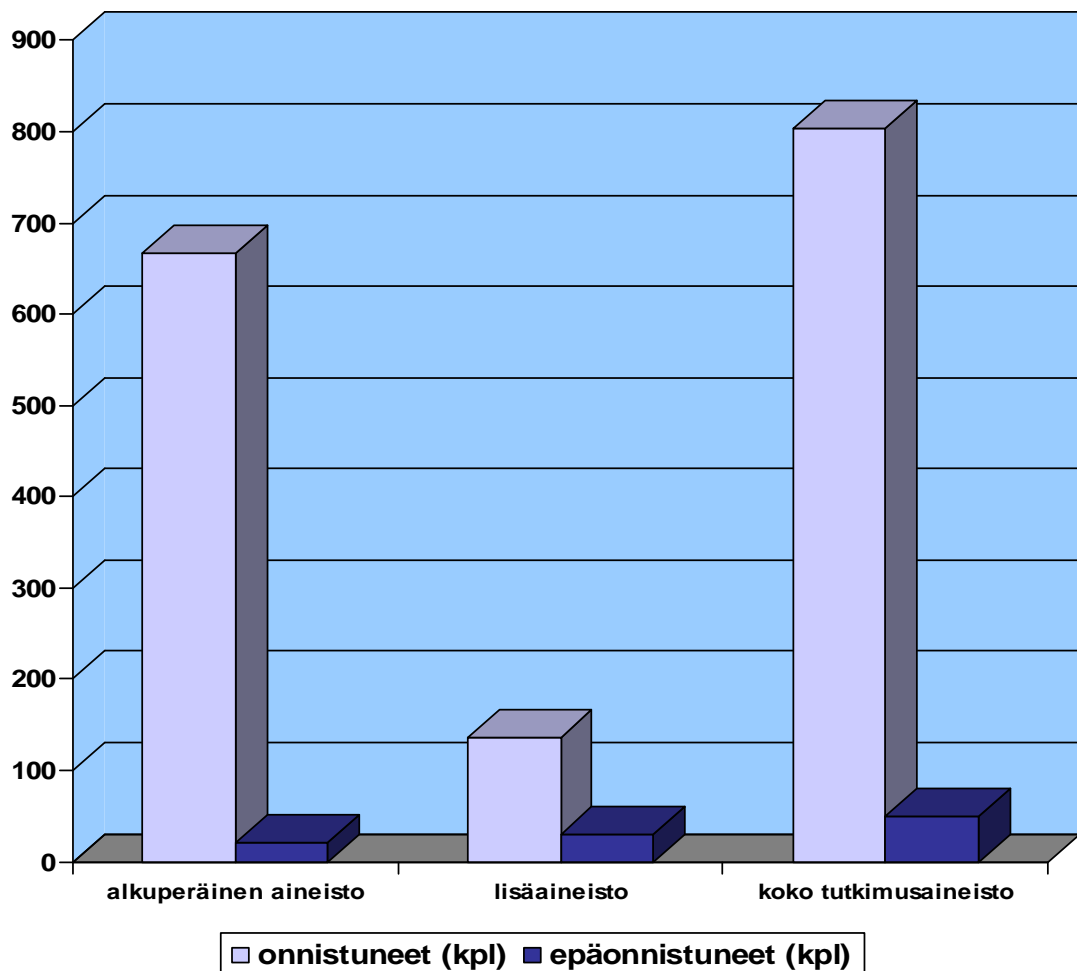
7.1 Tulosten onnistuminen

Alkuperäiselle aineistolle suoritettuna ensimmäisen PCR-ajon onnistumisprosentti oli koko työssä erinomainen. Ensimmäisen PCR-ajon jälkeen 687 näytteestä oli monistunut onnistuneesti 636. Ensimmäisen PCR-ajon onnistumisprosentiksi saatiin siis 92,6 %. Tämä on erittäin hyvä onnistumisprosentti, ottaen huomioon sen, että DNA:n pitoisuudet olivat suurilta osin tuntemattomia ennen työn aloitusta. Näin hyvä tulos viittaa siihen, että käytetty PCR-protokolla ei ole kovin herkkä. Se monistaa hyvin eri DNA-pitoisuuksia, eikä työskentelijän pipetointikäsiä vaikuta suuresti tulokseen.

Niistä 51 näytteestä, joista ensimmäisen PCR-ajon jälkeen ei saatu tulosta, päätettiin mitata DNA:n pitoisuudet käyttäen NanoDrop®-konsentraatiomittauslaitetta. Konsentraatiot olivat mittauksissa välillä 2,67 ng/μl ja 230,43 ng/μl. Yhdentoista näytteen konsentraatio oli melko matala eli alle 25 ng/μl.

Toisessa PCR-ajossa 51 näytteestä saatiin tulokset 31:stä. Näin ollen toisen PCR-ajon onnistumisprosentti oli 60,8 %. Tässä vaiheessa on kuitenkin hyvä muistaa, että näiden 51 näytteen joukossa oli vain sellaisia näytteitä, jotka olivat syystä tai toisesta epäonnistuneet ensimmäisellä kerralla. Koko alkuperäisestä 687 näytteen aineistosta tulos jäi saamatta vain 20 näytteestä.

Lisäaineistolle suoritettiin vain yksi PCR-ajo, jonka onnistumisprosentti oli 82 %, eli 136 näytettä 166:sta monistui onnistuneesti. Näytteiden DNA:n konsentraatioita ei tiedetty, eikä niitä mitattu. Onnistuminen oli siis hyvä myös lisänäytteiden osalta. Kuviossa 15 esitetään tulosten onnistuminen alkuperäisen aineiston ja lisäaineiston osalta, sekä molemmat yhdistettynä.



KUVIO 15. Tutkimusaineiston näytteiden onnistuminen. Vasemmalla alkuperäisen aineiston onnistuneet (636) ja epäonnistuneet (20) näytteet, keskellä lisäaineiston onnistuneet (133) ja epäonnistuneet (30) näytteet ja oikealla yhdistettynä koko tutkimusaineiston onnistuneet (803) ja epäonnistuneet (50) näytteet. (Salmela 2008.)

7.2 Mutaatioiden esiintyvyys

Kaikki saamamme tulokset olivat villin tyypin edustajia, eli mutaatioita ei havaittu. Tutkittaessa tutkimusaineiston näytteitä saatiin yksi väärä positiivinen tulos, kun eräs tulos näytti olevan heterotsygoottinen mutaatio. Uusinta-analyysissä näyte kuitenkin osoittautui villin tyypin edustajaksi. Positiivinen tulos johtui epätäydellisestä digestiosta eli DNA:n katkeamisesta. (Jaatinen 2008).

Lisäaineistossa oli 148 potilasta, joiden oireiden taustalla ei ole FV Leiden- tai FII - mutaatiot. Ei myöskään voida todeta Cambridge I- ja II -mutaatioiden olevan näiden potilaiden oireiden taustalla, sillä mutaatioita ei löydetty.

7.3 Tulosten luotettavuuden arviointi

Työskentely on pyritty tekemään mahdollisimman tarkasti, etteivät monistettavat DNA:t kontaminoidu. Työskentely PCR-reaktiota pipetoitaessa tehdään pre-PCR-tilassa. Näytteitä suojataan työskentelijän ihon kontaminanteilta suojavaattein ja hanskoin. Pipeteissä käytetään filterillisiä pipetinkärkiä, ettei aerosoloituva DNA pääse pipettiin ja kontaminoi seuraavia näytteitä.

Kontaminaatiota tarkastellaan joka sarjassa tehtävällä vesikontrollilla, joka tehdään muuten samoin kun näytteet, mutta DNA:n sijaan putkeen laitetaan vettä. Putkessa ei siis ole mitään minkä pitäisi monistua. Agarosigeelielektroforeesissa vesikontrollin paikalla tulee siis olla tyhjää. Kaikki tehdyt vesikontrollit ovat olleet puhtaita, joten PCR-reaktiot eivät ole kontaminoituneet.

Ohjaaja on aina tarkastanut saadut tulokset, virhetulkinnoilta on vältytty. Tulosten luotettavuutta on osaltaan lisännyt se, että työskentely on aina tapahtunut rauhallisessa tahdissa, sillä työ aloitettiin hyvissä ajoin. Huolimattomuudesta johtuvia virheitä pyrittiin ennaltaehkäisemään pitämällä riittävästi taukoja työskentelyn välissä ja suunnittelemaan aikataulu joustavaksi. Tässä onnistuttiin hyvin, sillä tutkimuksen suorittamiseen varatulla ajalla, ennätettiin tutkia lisänäytteitä 166 kappaletta, ilman kiireen tuntua.

Näytteiden huono DNA:n laatu heikensi tulosten onnistumista, sillä Jaatisen mukaan toiset näytteet saattoivat olla jo hyvinkin kauan aikaa sitten eristettyjä. Tämän vuoksi 20

kappaleesta alkuperäisestä tutkimusaineiston näytteestä jäi tulos saamatta. Opinnäytetyön luonteen ja tutkimustulosten saavuttamisen kannalta ei nähty kuitenkaan oleelliseksi käyttää tuoreita näytteitä, jotka olisi jouduttu eristämään opinnäytetyötä aloittaessa. Jos kaikki näytteet olisi eristetty ennen tutkimustyön aloittamista, ei opinnäytetyöhön olisi ehditty analysoida samaa määrää näytteitä. Veripalvelunkin kannalta oli mielekkäämpää saada riittävästi tutkimustuloksia, ja varautua siihen, että kaikki näytteet eivät ehkä monistu.

Tutkimuksen näytemäärä oli kohtuullisen suuri, $n=853$ ja näistä 803 kappaleesta saatiin hyväksyttävä ja luotettava tulos. Näin suurella tutkimusaineistolla saavutettiin erittäin hyvä tulos, jota voidaan pitää merkittävänä.

Cambridge I- ja II -mutaatioita on esiintynyt aikaisemmissa tutkimuksissa eniten niiden tutkittavien joukosta, joilla on todettu laskimotukoksia. Opinnäytetyöhön käytetty tutkimusaineisto oli kerätty aikaisemmin raskaustutkimusta varten, ja sitä päätettiin käyttää hyödyksi myös tähän opinnäytetyöhön. Näin ei aikaa kulunut opinnäytetyön tekemisessä aineiston keräämiseen ja DNA:n eristämiseen. Aineistosta vain murto-osalla eli 46:lla aineistoa kerätessä raskaana olevalla naisella oli aiemmin sairastettu laskimotukos. Tämä tarkoittaa sitä, että merkittävä osa, eli 641 naista ei ollut koskaan sairastanut laskimotukosta. Opinnäytetyössä haluttiin tutkia nimenomaan Cambridge I- ja II -mutaatioiden esiintymistä suomalaisessa väestössä. Käytetty aineisto sopi tähän tarkoitukseen hyvin, sillä tarkoituksena ei ollut tutkia pelkästään potentiaalisten mutaatioiden kantajien (tukostaipumuspotilaiden) näytteitä. Tällä aineistolla päästiin lopputulokseen, joka kuvasti Cambridge-mutaatioiden esiintyvyyttä suomalaisessa väestössä tällä näytemäärällä. Saavutetut tutkimustulokset olisivat saattaneet siis olla toisenlaiset, jos aineisto olisi koostunut esimerkiksi 687 tukostaustaisesta potilaasta, mutta työn tarkoituksen vuoksi tällaista aineistoa ei haluttu tutkia.

Lisäaineistosta ei tiedetty opinnäytetyötä tehdessä muuta kuin se, että näiden potilaiden antitrombiiniaktiivisuus oli alentunut ja että heidän näytteensä olivat saapuneet Veripalveluun tukostaipumusselvittelyyn. Täten tutkittavaksi saatiin edellisten 46 tukoksen sairastaneen naisen lisäksi nyt 166 kappaletta potilaiden näytteitä, joilla oli historiaa tukoksista. Voidaan todeta, että uuden potilasaineiston sisällyttäminen tutkimukseen osoittautui järkeväksi ratkaisuksi, sillä se lisäsi tulosten luotettavuutta nostamalla tutkimusaineiston monipuolisuutta ja tukostaipumuspotilaiden lukumäärää.

8 POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli etsiä Cambridge I- ja II -mutaatioita suomalaisesta väestöstä. Työn edetessä päätettiin alkuperäisen tutkimusaineiston lisäksi tutkimukseen sisällyttää lisänäytteitä, sillä se oli tieteellisesti perusteltua ja aikataulullisesti mahdollista. Näin tutkimukseen saatiin lisää näytteitä sekä monipuolisuutta tutkimusaineistoon.

Kyseisten mutaatioiden esiintymistä Suomessa tutkittiin nyt ensimmäistä kertaa. Olimme todella innostuneita ja kiitollisia saatuamme tilaisuuden osallistua tällaiseen tutkimukseen. Saatoimme alusta asti olla varmoja siitä, että tutkimustulosten valmistumista odotetaan mielenkiinnolla ja tulos julkaistaan kansainvälisesti.

Työelämästä saatu tuki ja opastus Jonna Clancyn ja Taina Jaatisen osalta on ollut tärkeää ja hyvin monipuolista. Käytännön työskentely Veripalvelun laboratoriossa sujui ongelmitta ja epäselvissä tilanteissa saimme aina kysyä apua ohjaajiltamme tai muulta henkilökunnalta. Työilmapiiri Veripalvelussa oli todella hyvä, jolloin sinne oli helppo mennä aamuisin aloittamaan päivän urakka. Koska tutkittavien näytteiden määrä oli suuri, oli jaksamisen kannalta tärkeää saada joka päivä uusia tuloksia. Tutkimustyötä tehdessä huomasimme myös muiden työntekijöiden olevan kiinnostuneita tuloksistamme, ja monesti kotiin lähtiessä kerroimme löytyikö tänään mutaatioita. Tosin joka kerta vastaus oli sama, mutta silti muut jaksoivat kannustaa meitä eteenpäin.

Tiedonhaku sujui hyvin, koska varsinkin Cambridge II -mutaatiosta oli tuoreita tutkimustuloksia. Työmme teoriatausta, kuten veren hyytyminen ja käyttämämme menetelmät kuuluivat jo koulun perusopintoihin. Työtä tehdessämme olemme päässeet perehtymään tarkemmin kyseisiin aiheisiin ja moni koulussa epäselväksi jäänyt asia on kirkastunut. Olemme saaneet myös paljon kokemusta PCR-työskentelystä, mistä on varmasti hyötyä työelämässä. Pyrimme kokoamaan työmme teoriaosuuden siten, että se tukisi työmme tarkoituksen ja tutkimuksen suorittamisen ymmärtämistä.

Työn tekeminen aloitettiin hyvissä ajoin sekä käytännön työn, että kirjallisen työn osalta. Kaikki näytteet oli tutkittu jo toukokuun lopussa 2008, vaikka työ palautettiin vasta saman vuoden lokakuussa. Olemme saaneet työstää tekstiämme pitkään, eikä minkäänlaista kiirettä työn valmistumisen kanssa tullut. Kesälomasta johtunut tauko työn tekemisessä olisi voinut olla lyhyempi, ettei niin paljon olisi unohtunut. Toisaalta

oli hyvä päästä irrottautumaan työstä hetkeksi kokonaan, sillä sen jälkeen näki työn aivan uusin silmin.

Aiemmissa Cambridge II-mutaatiotutkimuksissa aineistot ovat koostuneet joko verenluovuttajista tai tromboosipotilaista. Näytteitä on ollut enemmän kuin meidän tutkimuksessamme, lukuun ottamatta pariisilaista tutkimusta, jossa näytemäärä oli 473 tromboositutkimuspotilasta. Länsi-Skotlannissa tehdyssä tutkimuksessa näytemäärä oli 9669 verenluovuttajaa ja espanjalaisten tutkimuksessa tutkittiin 1018 tromboosipotilasta ja 1018 verenluovuttajaa. Näistä aiemmista tutkimuksista mutaatioita on löytynyt enemmän tromboosipotilaita tutkittaessa, mutta myös verenluovuttajien joukosta on mutaation kantajia havaittu. Voidaan siis olettaa Cambridge II-mutaation rikastuvan tukospotilaiden joukossa, tosin sitä esiintyy myös ”normaali” väestön joukossa.

Cambridge I- ja II -mutaatiota on nyt tutkittu suomalaisessa väestössä. Yhtään etsittyjen mutaatioiden kantajaa ei aineistosta löytynyt. Tutkimallamme näytemäärällä ei voida todeta, ettei Cambridge-mutaatioita voisi löytyä suomalaisilta. Voimme tässä yhteydessä kuitenkin todeta, ettei kyseisiä mutaatioita voitu osoittaa suomalaisessa väestössä tällä näytemäärällä ja aineistolla.

Viitaten aiempiin ulkomaalaisiin tutkimuksiin, olisi aloittamaamme tutkimusta Suomessa mielenkiintoista jatkaa. Seuraava askel saattaisikin olla kyseisten mutaatioiden etsiminen esimerkiksi verenluovuttajien (viitaten länsiskotlantilaiseen tutkimukseen) tai tromboosipotilaiden keskuudesta (espanjalaiset ja ranskalaiset). Nähtäväksi jää, jos jatkotutkimuksia aiheesta suoritetaan, millaisia tutkimustuloksia suomalaisista vielä tulevaisuudessa voidaan saavuttaa.

LÄHTEET

- Armstrong, Elina 2006: Veren hyytymismekanismit. Teoksessa Aarnio, Pertti et al: Angiologia. Recallmed Oy. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy. 18 – 27.
- Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno 2006. Sanasto. Perinnöllisyyslääketiede. 3. uudistettu painos. Duodecim. Hämeenlinna. Karisto Oy. 351 – 358.
- Barba, Pere – Santamaria, Amparo - Tirado, Isabel – Martí, Edelmira, Fontcuberta, Jordi 2008: Antithrombin Cambridge II mutation as a risk factor to develop cerebral venous thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis* 99 (2): 443 – 444.
- Clancy, Jonna 2008. Bioanalyttikko. Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu. Helsinki. Valokuva 21.2.
- Corral, Javier - Hernandez-Espinosa, David - Soria, Jose Manual - Gonzalez-Conejero, Rocio - Ordonez, Adriana - Gonzalez-Porras, Jose Ramon - Perez-Ceballos, Elena - Lecumberri, Ramon - Sanchez, Ignacio - Roldan, Vanessa - Mateo, Jose - Minano, Antonia - Gonzalez, Marcos - Alberca, Ignacio - Fontcuberta, Jordi - Vicente, Vicente 2007: Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood* 109(10). 4258 – 4263.
- Erlich, A. Henry 1989: Basic Methodology. PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification. Macmillan publishers LTD. United Kingdom. 1 – 5.
- Frilander, Mikko 2006: DNA ja geenisäätelyn periaatteet. Perintötekijöiden organisaatio. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.): Perinnöllisyyslääketiede. 3. uudistettu painos. Duodecim. Hämeenlinna. Karisto Oy. 14 – 30.
- Heino, Jyrki – Vuento, Matti 2004: Solubiologia. Solysykli ja solunjakautuminen. S-vaiheessa DNA-polymeraasit kahdentavat kromosomien DNA:n. WS Bookwell Oy. Porvoo. 250 – 258.
- Hiltunen, Leena 2008. Asiantuntijalääkäri. Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu. Helsinki. Kirjallinen tiedonanto 3.6.
- Jaatinen Taina 2008. Laboratorioasiantuntija. Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu. Helsinki. Suullinen tiedonanto 21.5.
- Kere, Juha – Kivirikko, Sirpa 2006: DNA:n muutokset: mutaatiot ja polymorfismit. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.): Perinnöllisyyslääketiede. 3. uudistettu painos. Duodecim. Hämeenlinna. Karisto Oy. 60 – 71.
- Kliiniset laboratoriotutkimukset 2008: Tukostaipumustutkimukset. P-antitrombiini III. Suomen Punainen Risti Veripalvelu. Verkkodokumentti. Päivitetty 8.4.2008. <http://www.terveysportti.fi/kotisivut/sivut.koti?p_sivusto=906>. Luettu 28.9.2008.

- Klug, S. William – Cummings, R. Michael 2003: Concepts of genomes. Pearson Education Inc. Upper Saddle River. New Jersey.
- Koski, Tomi – Vilpo, Juhani 2005: Veren hyytyminen ja verenvuototaipumus. Teoksessa Ilmari Palvan veritaudit. Toim. Vilpo, Juhani. 2005. Medivil Oy 2005. Helsinki. 158 – 170.
- Koski, Tomi – Sinisalo, Marjatta – Vilpo, Juhani 2005. Laskimotukostaipumus. Teoksessa Ilmari Palvan veritaudit. Toim. Vilpo, Juhani. Medivil Oy 2005. Helsinki. 171 – 180.
- Kramer, Martha F. – Coen, Donald M. 2001: Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. Current Protocols in Molecular Biology. Verkkodokumentti. <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=18265115&log\\$=activity](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=18265115&log$=activity)>. Luettu 1.4.2008.
- Imperial College London 2007: Antithrombin Mutation Database. Faculty of Medicine. Verkkodokumentti. <<http://www1.imperial.ac.uk/medicine/about/divisions/is/haemo/coag/antithrombin/>>. Luettu 14.5.2008.
- Invitrogen™. 1 Kb Plus DNA Ladder. Tuoteseloste. USA.
- Lassila, Riitta 2004: Leikkauspotilaan hemostaasi. Leiraksen käytännön lääkäri. 47(3). 10 – 14.
- Lassila, Riitta 2007: Veren hyytyminen ja fibrinolyysi. Teoksessa Ruutu, Tapani - Rajamäki, Allan - Lassila, Riitta - Porkka, Kimmo (toim.): Veritaudit. Kolmas uudistettu painos. Duodecim. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy. 32 - 44.
- LightLabs 2008: Microcentrifuge Tubes, PCR, TPP Tissue Culture. Verkkodokumentti. <<http://www.lightlabsusa.com/product.php?productid=16150&cat=253&page=1>>. Luettu 20.9.2008.
- Lääketieteen termit 2002: Teoksessa Nienstedt, Walter – Rautiainen, Eija – Pernaa, Minna – Salmi, Ulla – Pirttimaa, Hannele: Lääketieteen termit. Duodecimin selittävä suursanakirja. Duodecim. 4. uudistettu painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Mahlamäki, Eila 2004: Hemostaasi. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim): Kliiniset laboratoriotutkimukset. Ensimmäinen painos. Helsinki: WSOY. 310 – 321.
- McPherson, M. J. – Møller, S. G. 2000: PCR. BIOS Scientific Publishers Ltd. Springer-Verlag New York Inc., 175 Fifth Avenue, New York. USA.
- Mullis, K. - Faloona, F. - Scharf, S. - Saiki, R. - Horn, G. - Erlich, H. 1986: Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology L1. Cold Spring Harbor, New York, USA. 263 – 273.
- Mushunje, Alec - Zhou, Aiwu - Carrell, Robin W. - Huntington, James A. 2003: Heparin-induced substrate behavior of antithrombin Cambridge II. Blood 102 (12). 4028 – 4034.

- NanoDrop 2007: NanoDrop Technologies, Inc. ND- 1000 Spectrophotometer. V3.5 User's Manual. Verkkodokumentti. <<http://www.nanodrop.com/techsupport/nd-1000-users-manual.pdf>>. Luettu 27.5.2008.
- New England Biolabs®. PvuII. Tuoteseloste.
- Perry, David J. – Harper, Paul L. – Fairham, Stuart – Daly, Martina – Carrell, Robin W. 1989: Antithrombin Cambridge, 384 Ala to Pro: a new variant identified using the polymerase chain reaction. *Febs Letters* 254(1-2). 174 – 176.
- Perry, D.J. – Daly, M. – Harper, P.L. – Tait, R.C. – Price, J. – Walker, I.D. – Carrell, R.W. 1991: Antithrombin Cambridge II, 384 Ala to Ser: Further evidence of the role of the reactive centre loop in the inhibitory function of the serpins. *Febs Letters* 285(2). 248 – 250.
- Picard, Véronique – Présot, Isabelle – Scarabin, Pierre-Yves – Aiach, Martine – Emmerich, Joseph – Alhenc-Gelas, Martine 2007: Antithrombin Cambridge II (A384S): prevalence in patients of the Paris Thrombosis Study (PATHROS). *Blood* 110 (7). 2777 – 2778.
- Puurunen, Marja - Syrjälä, Martti 2007: Hankinnainen ja perinnöllinen tukostaipumus. Teoksessa Ruutu, Tapani - Rajamäki, Allan - Lassila, Riitta - Porkka, Kimmo (toim.): Veritaudit. Kolmas uudistettu painos. Duodecim. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy. 572 – 581.
- Rajan, Arun 2007: Antithrombin Deficiency. eMedicine. Verkkodokumentti. Päivitetty 4.6.2007. <<http://www.emedicine.com/med/TOPIC150.HTM>>. Luettu 20.5.2008.
- Salkinoja-Salonen, Mirja 2002: Mikrobien geneettiset ominaisuudet. Teoksessa Salkinoja-Salonen, Mirja (toim.): Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy. 297 – 303.
- Soini, Ylermi 2005: Verenkierron häiriöt. Teoksessa Karttunen, Tuomo – Soini, Ylermi – Vuopala, Katri: Tautioppi. Ensimmäinen painos. Helsinki. Edita Prima Oy. 245 – 272.
- Solubiologian Web-oppikirja 2001: Pistemutaatio. University of Kuopio. Department of Anatomy. Verkkodokumentti. Päivitetty 5.9.2001. <<http://www.uku.fi/anatomia/sob/en/pistemut.htm>>. Luettu 19.5.2008.
- Solunetti 2006: Sanasto. Puriiniemäs. Pyrimidiiniemäs. <<http://www.solunetti.fi/fi/sanasto/p/>>. Luettu 29.9.2008.
- Suominen, Ilari - Ollikka, Pauli 1999: Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3. painos. Helsinki. Opetushallitus.
- Tait, RC – Walker, ID - Perry, DJ – Islam, SI – Daly, ME – McCall, F – Conkie, JA – Carrell, RW 1994: Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. : *British Journal of Haematology*. 1994 May; 87(1).106-112.
- Taylor, R. Graham 1991: Polymerase chain reaction: basic and automation. The polymerase chain reaction. Teoksessa McPherson, J. Michael – Quirke, Philip – Graham, R. Taylor.(toim.) PCR A Practical Approach. Oxford University press, New York. United States. 1 – 14.

- Veripalvelu 2005: Tutkimus- ja tuotekehitys. Punainen Risti Veripalvelu. Verkkodokumentti. Päivitetty 21.5.2008. <<http://www.veripalvelu.fi/asp/system/empty.asp?P=20&VID=default&SID=308382410944297&S=0&C=26047>>. Luettu 19.5.2008.
- Wartiovaara-Kautto, Ulla - Syrjälä, Martti 2004: Laskimotukostaipumuksen laboratoriodiagnostiikka. Katsausartikkeli. Suomen lääkirilehti 59 (4). 265 – 269.
- Watson, J.D – Crick, F.H.C 1953: Molecular structure of nucleic acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature 171(4356). 737 – 738.