

Emmi Hokkanen, Milja Tikkanen

EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittaminen parafiinileikkeestä FISH-menetelmän avulla adenokarsinooman diagnostiikassa

Tulosten vertaaminen immunohistokemian avulla saatuihin tuloksiin.

Tekijät Otsikko Sivumäärä Aika	Emmi Hokkanen, Milja Tikkanen EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittaminen parafiinileikkeestä FISH-menetelmän avulla adenokarsinooman diagnostiikassa. Tulosten vertaaminen immunohistokemian avulla saatuihin tuloksiin. 42 sivua +3 liitettä 26.10.2011
Tutkinto	Sosiaali- ja terveystieteiden ammattikorkeakoulututkinto, Bioanalytiikka (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Lehtori Päivi Haapasalmi Professori Sakari Knuutila Lehtori Irma Niittymäki
<p>Keuhkosyöpä on maailman yleisin syöpä niin ilmaantuvuuden kuin kuolleisuuden suhteen ja sen suurin riskitekijä on tupakointi. Keuhkosyöpä jaetaan kahteen pääryhmään, pienisoluisen karsinoomaan ja ei-pienisoluisen karsinoomaan. Adenokarsinooma on yksi ei-pienisoluisen karsinooman alatyyppeistä, johon potilaan tupakointihistorian on todettu vaikuttavan vähiten. Mutaatio EML4:n (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) ja ALK:n (anaplastic lymphoma kinase) välillä on huomattu olevan yksi adenokarsinoomaa aiheuttava tekijä, jonka aktivaatio aiheuttaa syöpäsolukon synnyn. Tämä aktivaatio voidaan pysäyttää pienimolekyylisellä inhibiittorilla, crizotinibilla.</p> <p>Suoritimme opinnäytetyömme Haartman Instituutin sytomolekyyli-genetiikan tutkijaryhmässä Helsingissä syksyllä 2011. Työn tarkoituksena oli osoittaa EML4-ALK-fuusio-onkogeneeni adenokarsinoomapotilaiden kudospäätteistä fluoresenssi in situ hybridisaatio-menetelmän avulla (FISH) ja lopuksi vertailla saamiamme tuloksia immunohistokemian (IHC) avulla saatuihin tuloksiin, jotka saimme HUSLABin keskuspatologian laboratorion kautta. Tavoitteena oli myös selvittää FISH-menetelmän toimivuutta EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamisessa uudella Vysis ALK Break Apart FISH Probe -reagenssipakkauksella tehtynä.</p> <p>Tutkimme FISH-menetelmän avulla 31 näytettä, joista yksi oli EML4-ALK-positiivinen ja 30 oli EML4-ALK-negatiivisia. Löytämämme positiivinen näyte tulkittiin immunohistokemian menetelmän avulla negatiiviseksi. Tämän tuloksen vertaamisen jälkeen EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittaminen IHC:lla päätettiin lopettaa, sillä se ei ollut riittävän spesifinen tutkimusmenetelmä.</p> <p>Saatujen tuloksien myötä voimme todeta, että IHC-menetelmää tulisi kehittää ja testata lisää, jotta sitä voitaisiin käyttää luotettavasti EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamiseen. Meidän kokemuksiemme mukaan uutta FISH-reagenssipakkausta voidaan käyttää luotettavasti EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamiseen, sillä kaikki valmistamamme FISH-valmisteet onnistuivat ja olivat analysoitavissa.</p>	
Avainsanat	adenokarsinooma, EML4-ALK-fuusio-onkogeneeni, fluoresenssi in situ hybridisaatio, immunohistokemia

Authors	Emmi Hokkanen and Milja Tikkanen
Title	Comparing FISH Assay to IHC Assay in Detecting EML4-ALK Fusion Oncogene in the Diagnostics of Adenocarcinoma.
Number of Pages	42 pages + 3 appendices
Date	26 October 2011
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Päivi Haapasalmi, Senior Lecturer Sakari Knuutila, Professor Irma Niittymäki, Senior Lecturer
<p>Lung cancer is the most common and fatal cancer in the whole world and smoking is the leading cause to it. Lung cancer is divided into two main groups which are small cell carcinoma and non-small cell carcinoma. Adenocarcinoma is a subtype of non-small cell carcinoma and smoking history is less likely relevant in this sense. The mutation between EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) and ALK (anaplastic lymphoma kinase) has been noticed as one of the factors that cause adenocarcinoma by activating cell proliferation. This activation can be stopped by a small molecular inhibitor, crizotinib.</p> <p>Our study was performed at the Laboratory of Cytomolecular Genetics, Haartman Institute, Helsinki, Finland, during autumn 2011. The aim was to detect EML4-ALK fusion oncogene from lung tissue samples and compare two different assays to each other. At the moment, there is not any research method which could be considered as a golden standard. To detect the fusion oncogene, we used the Fluorescence in situ Hybridization (FISH) assay. At the end of our study, we compared our results to the results of immunohistochemistry (IHC) which were performed by the Pathology Department, Helsinki University Central Hospital, Finland. The Vysis ALK Break Apart FISH Probe -assay we used was new, so one of the purposes was to get more experiences in it.</p> <p>We examined 31 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples with the FISH assay. The results showed one EML4-ALK positive sample and 30 negative samples. The one positive sample we examined was negative with the IHC assay. After comparing these results, it was determined to stop detecting EML4-ALK fusion oncogene with IHC since it was clear that it was not specific enough. Our study showed that the FISH assay is more specific than the IHC assay as we expected based on previous studies.</p> <p>The results lead to the conclusion that the IHC assay needs to be improved and tested more so that it could be a reliable research method for detecting EML4-ALK fusion oncogene. By our experience the new FISH assay works reliably in detecting EML4-ALK fusion oncogene from FFPE samples, because all of the samples we prepared with the new assay succeeded.</p>	
Keywords	adenocarcinoma, EML4-ALK fusion oncogene, fluorescence in situ Hybridization, immunohistochemistry

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Syövän synty ja onkogeenit	3
2.1	Syövän synty ja vaiheet	3
2.2	Onkogeenin rooli syövän synnyssä	4
3	Aikaisemmat EML4-ALK-fuusio-onkogeeniin liittyvät tutkimukset	6
4	Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet	7
4.1	CMG:n tutkijaryhmän tutkimusprosessi	8
4.2	Opinnäytetyön tavoitteet	9
5	Keuhkosyöpä ja adenokarsinooma	11
5.1	Keuhkosyövän yleisyys, riskitekijät ja luokittelu	11
5.2	Keuhkosyövän oireet, diagnostiikka ja hoito	12
5.3	Adenokarsinooman diagnostiikka ja hoito	15
6	EML4-ALK-fuusio-onkogeeni ja sen diagnosointimenetelmät	17
6.1	EML4-ALK-fuusio-onkogeeni	18
6.2	Diagnosointimenetelmät	19
6.2.1	Fluoresenssi in situ hybridisaatio (FISH)	20
6.2.2	FISH-valmisteen tekeminen parafiinileikkeestä	22
6.2.3	Immunohistokemia (IHC)	23
7	Xalkori (crizotinib) – täsmälääke EML4-ALK-fuusio-onkogeenin aiheuttaman adenokarsinooman hoitoon	25
8	Opinnäytetyön toteutus	27
8.1	Näytteiden käsittely	27
8.2	Näytteiden analysointi	29
9	Tulokset	32
10	Työprosessin ja tulosten luotettavuuden arviointi	33

11	Pohdinta	34
	Lähteet	38
	Liitteet	
	Liite 1. FISH-valmisteiden vastauslomake	
	Liite 2. FISH- JA IHC- menetelmien avulla saadut EML4-ALK tulokset	
	Liite 3. Laboratoriopäiväkirja	

1 Johdanto

Solun toimintaa säätelevät ulkoiset tekijät, joiden käskystä solu jakautuu, erilaistuu tai kuolee. Solu saattaa muuntua niin, että sen toiminta ei ole enää riippuvaista ulkoisista tekijöistä, vaan se alkaa jakaantua kontrolloimattomasti. Kontrolloimattomasti kasvavaa solukkoa, jolla on oma verisuonitus ja joka pystyy tunkeutumaan ympäröivään kudokseen, kutsutaan syöväksi ja sen syntyminen johtuu DNA:n muutoksista. DNA-polymeraasi ei ole erehtymätön monistaessaan DNA:ta, vaan tekee myös virheitä, jotka saattavat johtaa DNA:n muutoksiin. Solut saattavat myös altistua tekijöille, jotka lisäävät DNA-vaurion riskiä, kuten kemikaaleille, säteilylle ja tietyille virusinfektioille. Pahaalaatuisen syöpäsolukon syntymiseen tarvitaan kuitenkin useampi DNA-muutos samassa solussa. (Heino – Vuento 2002: 279–280.)

Normaali solu on riippuvainen kasvutekijöiden aikaansaamista viesteistä. Syöpäsolun luonteeseen kuuluu riippumattomuus näistä tekijöistä, ja tätä kautta kiihtynyt solun jakautuminen. Syöpäsolun itsenäisyys johtuu kasvutekijävaikutusta välittävien tiedonsiirtopolkujen pysyvästä aktivoitumisesta, jonka DNA:n mutaatio on aiheuttanut. (Heino – Vuento 2002: 282.) Tällöin puhutaan onkogeeneistä, eli syöpägeeneistä, jotka saavat alkunsa, kun solun normaalille toiminnalle keskeinen proto-onkogeeni muuntuu esimerkiksi mutaation kautta. Tällöin solujakautuminen aktivoituu pysyvästi ja kasvainsolukko pääsee lisääntymään. Proto-onkogeenien koodaamia proteiineja ovat muun muassa kasvutekijät, kasvutekijöiden reseptorit tai solulimassa toimivia kasvusignaaleja tumaan välittävät proteiinit. (Aaltonen 2002: 197–198.)

Molekyylibiologian tutkimusmenetelmien avulla pystytään tulevaisuudessa kehittämään parempia täsmälääkkeitä, jotka vaikuttavat suoraan syöpäsoluun, eivätkä niinkään tuumorin ympärillä olevaan terveeseen kudokseen (Kallioniemi – Mäkelä 2006). Tietogeenin tehtävistä karttuu koko ajan, minkä ansiosta käsitys kasvaimien synnystä ja kehityksestä on selkiytynyt. Uusien kasvaingeenien tunnistus on vielä meneillään, ja lähitulevaisuudessa pyritään ymmärtämään näiden geenien koodittamien proteiinien toimintaa. (Aaltonen 2002: 197.)

Keuhkosityöpä on maailman yleisin syöpä niin ilmaantuvuuden kuin kuolleisuudenkin suhteen. Suomessa keuhkosityöpä on miehillä toiseksi yleisin ja naisilla neljänneksi yleisin syöpä. Keuhkosityöpään sairastumisen riskiä lisäävät muun muassa tupakointi, asbesti, ionisoiva säteily sekä keuhkohtaumatauti. Keuhkosityöpä on alkuvaiheessa oireeton ja oireiden ilmaantuessa usein hoidon ulottumattomissa. Näin ollen syövän toteaminen varhaisessa vaiheessa parantaisi sairastuneen henkilön ennustetta. (Mali – Ojala – Salo 2007: 276–279.) Keuhkosityöpä jaetaan kahteen eri pääluokkaan, ei-pienisoluisen karsinoomaan ja pienisoluisen karsinoomaan. Ei-pienisoluisen karsinooma jaetaan edelleen kolmeen alatyyppeihin, levyepiteeli-, adeno- ja suurisoluisen karsinoomaan. (Knuutila 2005: 573.)

EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) ja ALK (anaplastic lymphoma kinase) onkogeeneiden välillä tapahtuvan mutaation on huomattu olevan yksi adenokarsinooman aiheuttajista. Tätä muuntunutta onkogeeniä kutsutaan fuusio-onkogeeniksi, ja se on useimmiten löydetty sellaisilta keuhkosityöpäpotilailta, jotka eivät tupakoi. EML4-ALK-fuusio-onkogeeni on löydetty vuonna 2007, jonka jälkeen siihen liittyen on tehty useita tutkimuksia ympäri maailmaa. Vielä ei ole saatu selville, millä tutkimusmenetelmällä geenimuutos varmimmin löydetään. (Sasaki ym. 2010.) EML4-ALK-fuusio-onkogeenin löytäminen on tärkeää, sillä sitä vastaan on kehitetty täsmälääke, joka tutkimuksien mukaan inhiboi solujen lisääntymistä ja saa aikaan solusyklin pysähtymisen, solukuoleman ja kasvaimen häviämisen (Li ym. 2010).

Koska EML4-ALK-fuusio-onkogeenin diagnosointiin ei ole vielä vakiintunutta tutkimusmenetelmää, Haartman Instituutin sytomolekyyli-genetiikan tutkijaryhmä (CMG Research Group) antoi meille tehtävän liittyen EML4-ALK-fuusio-onkogeenin diagnosointiin. Liityimme heidän ryhmäänsä elokuussa 2011 yhdeksän viikon ajaksi ja pääohjaajinamme toimivat professori Sakari Knuutila ja lääkäri Ioana Borze. Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää, kuinka FISH-menetelmän avulla saadut tulokset vastaavat immunohistokemian avulla saatuja tuloksia. Tehtävänäme projektissa on tehdä FISH-valmisteita, tulkita niitä ja myös aikaisemmin tehtyjä FISH-valmisteita. Saatuja tuloksia verrataan immunohistokemian tuloksiin, jotka saamme HUSLABin keskuspatologian laboratorion. Tavoitteena on myös selvittää FISH-menetelmän toimivuutta EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamisessa uudella Vysis ALK Break Apart FISH Probe -reagenssipakkauksella tehtynä.

2 Syövän synty ja onkogeenit

Tässä kappaleessa kerromme syövän syntyyn liittyvistä vaiheista, sekä eri mutaatiotyypeistä, jotka saattavat vaikuttaa syöpäsolukon kehittymiseen. Kerromme myös onkogeenien merkityksestä syövän synnyssä.

2.1 Syövän synty ja vaiheet

Syövän synty on monivaiheinen tapahtuma, joka on seurausta DNA-vaurioista. Syöpä saa alkunsa yhdestä solusta, joka vaurioituttuaan alkaa jakautua kontrolloimattomasti. DNA-vauriot eli mutaatiot siirtyvät syntyviin tytärsoluihin, minkä seurauksena syntyvä solukko saa kasvuedun ympäristössään. (Isola 2007: 22.) Syövän synnyn voidaan ajatella olevan prosessi, jossa solut kehittävät itselleen mutaatioiden kautta kasvukyvyn, jonka ansiosta ne jakautuvat ja pääsevät tunkeutumaan ympäristöönsä paremmin kuin muut solut (Coleman - Tsongalis 2006: 350).

Mutaatioita syntyy elimistössä kaiken aikaa, mutta harva niistä kuitenkaan johtaa syövän kehittymiseen. Elimistöllä on mutaatioita eliminoivia korjausentsyymejä, jotka havaitsevat DNA-ketjun virheelliset emäkset, leikkaavat ne pois ja korjaavat vaurion emäsjärjestykseltään alkuperäiseksi. DNA-vaurioiden korjausmekanismin pettäminen onkin yksi keskeinen mekanismi syöpien synnyssä. (Isola 2007: 22–23.) Myös monet kemikaalit, säteily ja virukset vaurioittavat solujen DNA:ta ja kromosomeja, ja altistavat syövälle. (Knuutila 2002: 54–55.)

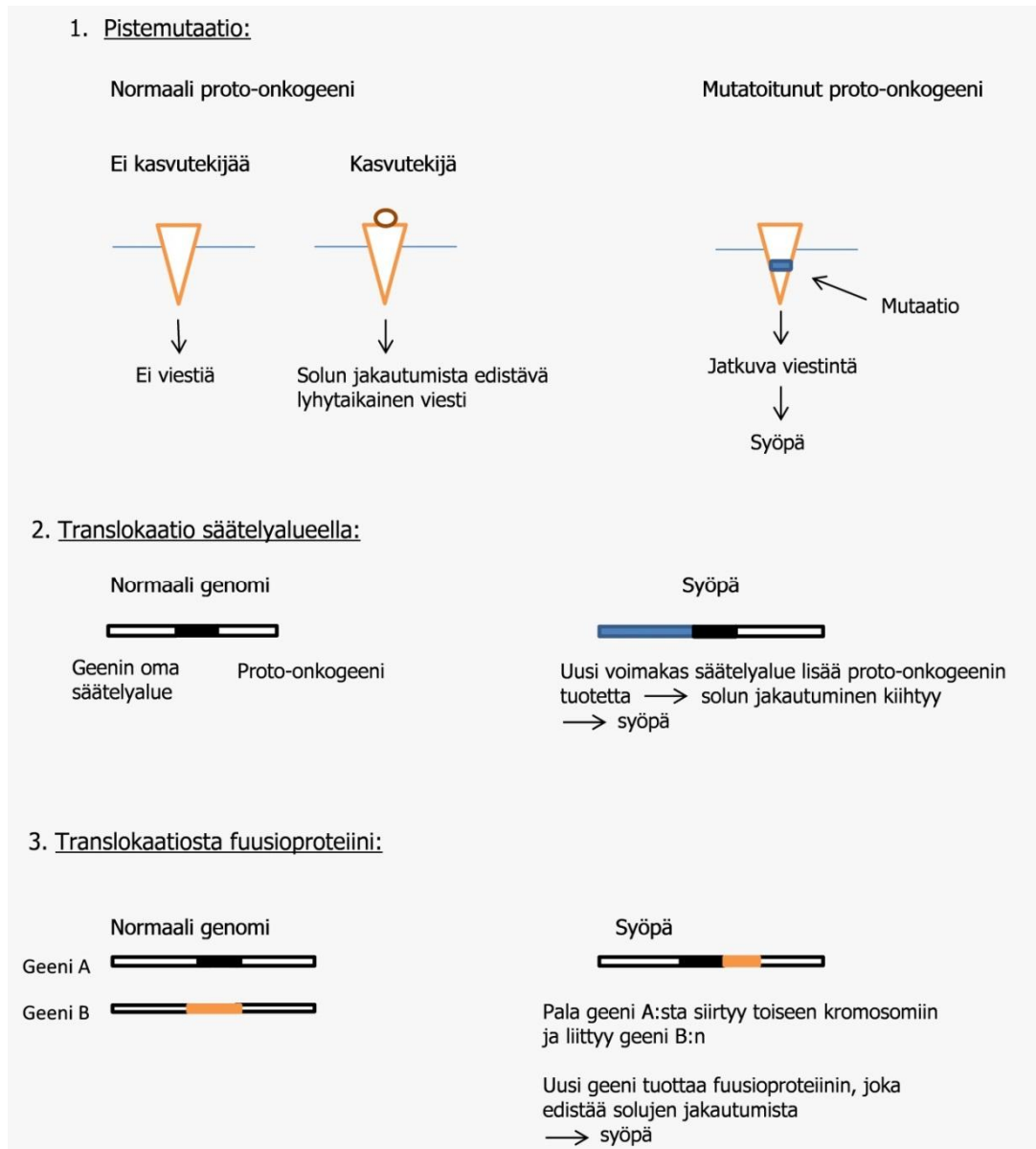
Syöpäsolu voi syntyä erilaisista molekyyliomuutoksista kuten deleetioista, insertioista ja pistemutaatioista (Coleman – Tsongalis 2006: 349). Geenivirhe voi siis aiheutua vain yhden emäksen muutoksesta tai jopa miljoonien emäsparien virheistä. Mutaatiot voidaan luokitella ryhmiin niiden rakenteensa perusteella. Osa mutaatioista aiheuttaa muutoksia DNA:n pituuteen. Tällaisia mutaatioita ovat insertiot eli lisäykset DNA:han, deleetiot eli häviämät DNA:sta ja duplikaatiot eli jonkin DNA:n osan kahdentumat. Toisen ryhmän mutaatiot ovat sellaisia, joissa DNA-molekyylin pituus ei muutu. Näitä ovat pistemutaatiot, jolloin yksi emäs on muuttunut toiseksi tai mutaatio, jossa useampi emäs on korvautunut toisilla emäksillä. Inversiossa osa DNA:ta on kääntynyt suunnaltaan päinvastaiseksi. (Kere 2002: 91–93.)

Syövän synnylle keskeiset mutaatiot eivät kohdistu sattumanvaraisesti ihmisen geomiin, vaan sellaisiin geeneihin, joiden virheellinen toiminta johtaa välivaiheiden kautta malignistumisprosessiin. Näitä geenejä kutsutaan syöpägeeneiksi ja ne jaetaan kahteen päätyyppiin: onkogeeneit, joiden toiminnan pysyvä aktivoituminen johtaa syövän syntyyn ja kasvurajoitegeeneit, joiden toiminnan häviäminen vaikuttaa syövän syntyyn. (Isola 2007: 25.)

2.2 Onkogeenin rooli syövän synnyssä

Onkogeeneit ovat solun normaalille toiminnalle keskeisten proto-onkogeenein muuntuneita muotoja. Kun proto-onkogeeni muuntuu esimerkiksi mutaation kautta, voidaan sitä kutsua onkogeeneiksi. Tällöin solujakautuminen aktivoituu pysyvästi ja kasvainso-lukko pääsee lisääntymään. Proto-onkogeenein koodaamia proteiineja ovat esimerkiksi kasvutekijät, kasvutekijöiden reseptorit tai solulimassa toimivia kasvusignaaleja tumaan välittävät proteiinit. (Aaltonen 2002: 197–198.) Yhteistä kaikkien onkogeenein aktivoitumiselle on, että toisen alleelin vaurioituminen riittää syöpää aiheuttavan vaikutuksen aikaansaamiseksi. DNA-vaurion seurauksena onkogeenein toiminta lisääntyy moninker-taiseksi tai muuttuu vääränlaiseksi. (Isola 2007: 25.)

Onkogeenein aktivoitumiseen on useita eri syitä, joita on esitetty kuviossa 1. Pistemu-taatiossa yhden aminohapon muutos johtaa pysyvästi aktiivisen proteiinin tuotantoon, ja tätä kautta solujen jakautumiseen. Myös suuremmat geenimuutokset, kuten translo-kaation kautta tapahtuva mutaatio, voivat aiheuttaa onkogeenein synnyn. Mikäli translo-kaatio tapahtuu geenin säätelyalueella ja proto-onkogeeni joutuu uuden voimakkaam-min toimivan säätelyalueen alaisuuteen, alkaa solu jakautua säätelyalueen signaalista tarpeettomasti. Translokaation aiheuttamat mutaatiot voivat aiheuttaa myös uuden proteiinin synnyn (fuusioproteiini), joka kiihdyttää solujen jakautumista. (Heino – Vuen-to 2002: 282–283.)



Kuvio 1. Onkogeenien aktivoitumistapoja.

Tyrosiinikinaasit ovat joukko normaaleissa soluissa olevia proteiineja, jotka säätelevät solun toimintaa. Onkogeenien fuusiomekanismit ovatkin saaneet lisääntyvästi huomiota, sillä moni fuusioista johtaa tyrosiinikinaasin aktivaatioon erityyppisissä syövässä. Onkoproteiineiksi tullaan tyrosiinikinaasit käyvät läpi aktivoivan mutaation tai rakenteellisen muutoksen, esimerkiksi translokaation, inversion tai insertion kautta. Tällaisessa tapauksessa tyrosiinikinaasi fuusioituu ja syntyy onkoproteiini. (Sandberg – Meloni-Ehrig 2010.) Syöpäsoluissa tyrosiinikinaasien aktiivisuuden hallinta on usein häiriintynyt. Suurentunut kinaasiaktiivisuus voi lisätä pahanlaatuisten solujen jakautumista, elinikää ja kykyä tunkeutua ympäröivään kudokseen. (Elonen – Elomaa 2007: 187.)

Lopputuloksena solu alkaa lisääntyä, ja syöpäsolukko pääsee kehittymään (Sandberg – Meloni-Ehrig 2010). Tässä työssä tutkimuksen kohteena on inversion kautta syntynyt EML4-ALK-fuusio-onkogeeni, joka aiheuttaa tyrosiinikinaasin pysyvän aktivaation.

3 Aikaisemmat EML4-ALK-fuusio-onkogeeniin liittyvät tutkimukset

Molekyylibiologian menetelmillä voidaan tutkia syöpäsolun jakautumista ja solukuolemaa sekä erityisesti onkogeenien ja kasvurajoitegeenien muodostamia signaalintiverkkoja. Yksityiskohtainen informaatio edistää syöpälääkkeiden kehittämistä oikeaan suuntaan. Tänä päivänä suurin mielenkiinto on kohdistunut syövässä mutatoituneisiin kinaaseihin, joita vastaan on jo kehitetty toimivia inhibiittoreita. Kinaasien rakenteet ovat entuudestaan hyvin tiedossa ja se mahdollistaa spesifisten estäjämolekyylien kehittämisen. (Kallioniemi – Mäkelä 2006.) Aikaisempina vuosina on keskitytty tutkimaan EGFR-mutaatiota, jonka on todettu olevan yksi merkittävimmistä molekyylitason mutaatiosta ei tupakoivien ja erityisesti aasialaisten ei-pienisoluista keuhkosyöpää sairastavien potilaiden perimän muutoksissa. (Sasaki ym. 2010.)

EML4-ALK-fuusio-onkogeeni löydettiin Japanissa vuonna 2007. Tämän tutkimuksen myötä on alettu tutkimaan erilaisia ALK-kinaasin inhibiittoreita, joista voi tulevaisuudessa olla merkittävä hyöty ei-pienisoluista keuhkosyöpää sairastaville potilaille, joilla on EML4-ALK-mutaatio. (Soda ym. 2007.) Näitä inhibiittoreita testataan niin in vitro kuin in vivo, ja on osoitettu, että tietyt inhibiittorit aiheuttavat syöpäsolujen apoptoosin in vitro ja pienentävät tuumoria in vivo (Sasaki ym. 2010).

Vuonna 2009 tehtiin USA:ssa Massachusettsin keskussairaalassa tutkimus, jossa verrattiin ei-pienisoluista keuhkosyöpää sairastavien potilaiden kliinisiä tutkimus- ja syöpähoitojen tuloksia. Heistä osalla oli todennettu EML4-ALK-fuusio-onkogeeni ja osalla ei. Potilaat oli valittu seuraavin kriteerein, joista heidän tuli täyttää vähintään kaksi. Potilaan oli oltava mielellään nainen, aasialainen, tupakoimaton tai erittäin vähän tupakoinut sekä keuhkosyövän tuli olla alalajiltaan adenokarsinooma. Tutkimuksen tuloksista kävi ilmi, että 13 prosentilla (n=141) todettiin EML4-ALK-mutaatio, 22 prosentilla oli EGFR-mutaatio ja 65 prosentilla ei ollut kumpaakaan edellä mainituista mutaatioista. Samoin muutamia erityispiirteitä huomattiin niillä potilailla, jotka olivat EML4-ALK-

fuusio-onkogeenin suhteen positiivisia. He olivat yleensä miehiä, selkeästi nuorempia, ei tupakoivia ja he eivät reagoineet EGFR-kinaasin inhibiittoreihin. Lopputuloksena tutkijat totesivat, että potilaat, joilla on EML4-ALK-fuusio-onkogeeni, eivät hyödy samasta hoidosta kuin he, joilla on EGFR-mutaatio. Näin ollen on erittäin tärkeää saada potilaille oikea diagnoosi. (Shaw ym. 2009.)

Vuodesta 2007 lähtien tutkijat ovat miettineet, mikä olisi luotettavin sekä kustannustehokkain tutkimusmenetelmä EML4-ALK-fuusio-onkogeenin määrittämiseen. Vertailemme tässä opinnäytetyössä FISH-valmisteista saatuja tuloksia immunohistokemian avulla saatuihin tuloksiin ja samaa on tutkittu aiemminkin USA:ssa Minnesotan Mayo-klinikalla. Tutkimusryhmä keräsi tutkimusta varten 101 keuhkosyöpäpotilaan kudokset, joista oli tehty parafiinileikkeet. Kaikille näytteille tehtiin sekä FISH-tutkimus, jonka on ajateltu olevan niin sanottu kultainen standardi ALK-mutaatioiden etsimisessä, että immunohistokemian vasta-ainetutkimus. Kaikki tutkimukseen valitut potilaat sairastivat adenokarsinoomaa ja he eivät olleet koskaan tupakoineet. FISH:n ja immunohistokemian menetelmät suoritettiin eri laboratorioissa ja toisen menetelmän tuloksia tietämättä. Tutkijaryhmä vertaili tuloksia lopulta keskenään ja lopputuloksesi saatiin, että heidän käyttämänsä immunohistokemiallinen tutkimusmenetelmä on yhtä luotettava kuin sytogenetiikassa käytetty FISH. Tutkijaryhmä kuitenkin painottaa, että jatkotutkimuksia aiheeseen liittyen vaaditaan vielä paljon enemmän. (Yi ym. 2011.) Suomessa tällaisen tutkimuksen on aloittanut Haartman Instituutin CMG:n tutkijaryhmä, mistä kerromme seuraavassa osiossa.

4 Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet

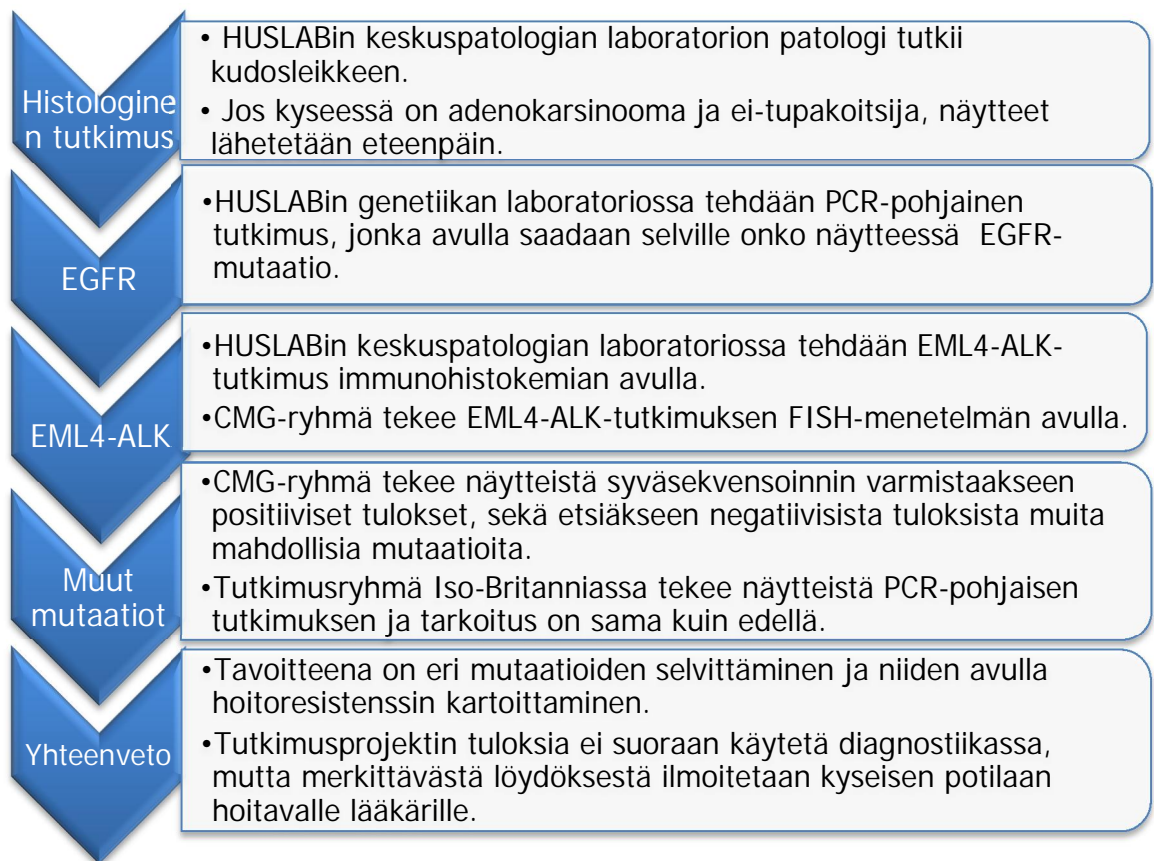
Haartman Instituutin sytomolekyyli-genetiikan tutkijaryhmä (CMG) on jo vuosia tutkinut syövälle merkittäviä biomarkkereita kuten soluja tai biomolekyyleja, jotka kertovat elimistön biologisista tapahtumista, esimerkiksi sairauden kehittymisestä tai reagoimisesta annettuun lääkkeeseen. (Paasikivi 2010.) CMG:n tutkijaryhmä on käynnistänyt vuonna 2011 tutkimuksen, jonka tarkoituksena on selvittää syitä ei-pienisoluisen keuhkosyöpäpotilaiden hoitoresistenssiin. Tässä kappaleessa esittelemme kyseisen tutkimuksen sekä osuutemme tähän prosessiin liittyen.

4.1 CMG:n tutkijaryhmän tutkimusprosessi

Ei-pienisoluisen keuhkosityöpöpotilaiden hoitoresistenssiä kartoittavan tutkimuksen näyttemateriaalina on keuhkosityöpöpotilaista otetuista kudospaloista tehtyjä parafiinileikkkeitä, jotka tulevat HUSLABin keskuspatologian laboratorionista. Näytteet on valikoitu kahden kriteerin perusteella: keuhkosityöpä on tyypiltään adenokarsinooma ja potilas ei ole tupakoinut. Kuviossa 2 on esitelty tutkimuksen vaiheiden kulku.

Patologian keskuslaboratoriossa tehdään leikkeistä tarvittavat värjäykset, joiden avulla patologi lausuu, onko kyseisessä leikkeessä kasvainsolukkoa. Mikäli kasvainsolukkoa löytyy, tehdään näytteestä useita eri tutkimuksia. EGFR-mutaatiota määrittävä tutkimus tehdään HUSLABin genetiikan laboratoriossa PCR-pohjaisella menetelmällä. EML4-ALK-mutaation tutkimukset tehdään kahdella eri menetelmällä: HUSLABin keskuspatologian laboratorio tekee tutkimuksen immunohistokemiallisen menetelmän avulla ja CMG:n tutkijaryhmä FISH-menetelmän avulla. EGFR- ja EML4-ALK-mutaatiot ovat toinen toisensa poissulkevia tekijöitä, mutta silti molemmat mutaatiot tutkitaan, koska asiaa ei ole todennettu laajojen aineistojen avulla. CMG:n tutkijaryhmä suorittaa näytteille myös syväsekvensoinnin, minkä avulla varmistetaan aiemmista tutkimusmenetelmistä saadut positiiviset tulokset. Negatiivisista näytteistä pyritään löytämään muita mahdollisia mutaatioita, jotka olisivat voineet aiheuttaa adenokarsinooman ei-tupakoivalle potilaalle. Ulkopuolinen tutkijaryhmä Iso-Britanniassa kehittää parhaillaan PCR-pohjaista tutkimusmenetelmää, jolla näytteet tullaan myös analysoimaan. Tämän tutkimusmenetelmän tarkoitus on sama kuin syväsekvensoinnin tarkoitus.

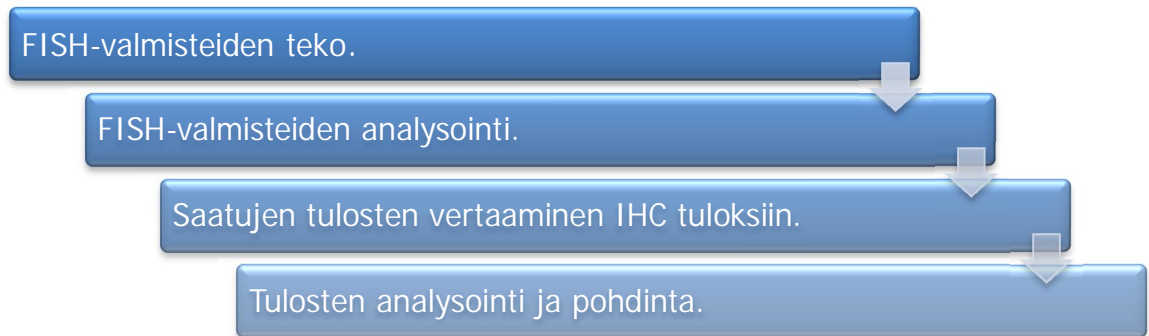
Hypoteesina CMG:n tutkijaryhmällä on, että mikäli näyte on negatiivinen EGFR:n ja EML4-ALK:n suhteen, jossakin muussa solun signalointireitin geenissä on mutaatio. Nämä mutaatiot saattavat olla hyvin pieniä, kuten pistemutaatioita, jolloin vain yksi emäs on muuttunut toiseksi. Tällöin parhaimpina tutkimusmenetelminä pidetään syväsekvensointia, jonka avulla voidaan genomia tutkia laajasti, sekä PCR-pohjaista tutkimusmenetelmää, jota Iso-Britannian tutkimusryhmässä kehitetään. Tutkimusprojektin tuloksia ei suoraan käytetä diagnostiikassa, mutta merkittävästä löydöksestä ilmoitetaan kyseisen potilaan hoitavalle lääkärille.



Kuvio 2. Tutkimusprosessin kulku.

4.2 Opinnäytetyön tavoitteet

Opinnäytetyömme, jonka vaiheet on esitetty kuviossa 3, on osa CMG:n tutkijaryhmän edellä kuvattua suurempaa tutkimusta. Koska standardimenetelmää EML4-ALK-fuusio-onkogeenin diagnosointiin ei vielä ole, tutkimustehtävänä on selvittää, miten FISH-menetelmän avulla saadut tulokset vastaavat immunohistokemian avulla saatuja tuloksia. Tehtävänä on tehdä FISH-valmisteita, tulkita niitä ja myös aikaisemmin tehtyjä FISH-valmisteita. Lopuksi vertaamme saamiamme tuloksia HUSLABin keskuspatologian laboratorion saattuihin immunohistokemian tuloksiin.



Kuvio 3. Opinnäytetyön eteneminen.

CMG:n tutkijaryhmä on saanut käyttöönsä uuden ALK-reagenssipakkauksen, jonka avulla valmistamme FISH-lasit. Tavoitteena on myös selvittää FISH-menetelmän toimivuutta EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamisessa uudella Vysis ALK Break Apart FISH Probe -reagenssipakkauksella tehtynä. Kyseinen reagenssipakkaus ollaan siirtämässä HUSLABin genetiikan laboratorioon mahdollisesti vuoden 2011 aikana. Tehtävänä on myös luotettavien tulosten saaminen valmistamamme FISH-laseista, jotta CMG:n tutkijaryhmä voisi käyttää tuloksia heidän projektinsa myöhemmässä vaiheessa.

Näiden tavoitteiden ja tehtävien perusteella muodostimme seuraavat tutkimuskysymykset:

1. Kuinka FISH-menetelmän avulla saadut tulokset vastaavat IHC-menetelmän avulla saatuja tuloksia EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamisessa adenokarsinooman diagnostiikassa?
2. Kuinka FISH-menetelmä toimii Vysis ALK Break Apart FISH Probe -reagenssipakkauksella tehtynä EML4-ALK-fuusio-onkogeeni osoittamisessa?

Lisäksi henkilökohtaisina tavoitteinamme on toimia osana kansainvälistä tutkijaryhmää ja näin ollen kehittää englannin kielen taitoja sekä yhteistyö- ja vuorovaikutustaitoja. Opinnäytetyön työstäminen suunnitelmiseen ja toteutukseen on suurin yksittäinen projekti ammattikorkeakoulussa ja tarkoituksenamme on oppia hallitsemaan oma aihe perusteellisesti, sekä hyödyntämään koulutuksen aikana saatua tietotaitoa niin loppuraportin kirjoittamisessa kuin käytännön osuuden suorittamisessa.

5 Keuhkosityöpä ja adenokarsinooma

Opinnäytetyömme keskittyy adenokarsinoomaan, joka on ei-pienisoluisen keuhkosityövän alatyyppejä. Tässä osiossa kerromme keuhkosityövän ja adenokarsinooman oireista, diagnostiikasta ja hoidosta.

5.1 Keuhkosityövän yleisyys, riskitekijät ja luokittelu

Keuhkosityöpä on tällä hetkellä maailman yleisin syöpä, johon sairastuu ja menehtyy yli miljoona ihmistä vuosittain. Suomessa keuhkosityöpä on miehillä toiseksi ja naisilla neljänneksi yleisin syöpä. Suurin keuhkosityöpää aiheuttava tekijä on säännöllinen tupakointi ja erityisesti naisten keuhkosityöpätapaukset ovat vuosikymmenien aikana lisääntyneet tupakoinnin yleistymisen seurauksena. Sitä vastoin miesten vähennettyä tupakointiaan on heidän sairastuvuuskin laskenut. Tupakoitsijan riski sairastua keuhkosityöpään on jopa noin 15-20 kertaa suurempi kuin tupakoimattoman henkilön ja myös passiivinen tupakointi nostaa riskin noin 2-3-kertaiseksi. Keuhkosityöpä on yleensä alussa melko oireeton, minkä vuoksi syöpä diagnosoidaan vasta myöhäisessä vaiheessa ja sen hoitaminen on vaikeaa ja ennuste huono. (Mali – Ojala – Salo 2007: 277–279.)

Keuhkosityöpä jaetaan histologisen rakenteensa perusteella WHO:n vuonna 1999 määrittelmien luokittelukriteerien mukaan eri syöpälajeihin. Näitä ovat pienisolukarsinooma, levyepiteelikarsinooma, adenokarsinooma, suurisoluisen karsinooma sekä muut harvinaisemmat karsinoomat. (Taskinen – Salmenkivi - Anttila 2005: 125.) Syöpätyyppien suhteelliset osuudet on lueteltu taulukossa 1. Yleensä syöpätyypit jaotellaan pelkästään kahteen päätyyppiin, jotka ovat pienisoluiset ja ei-pienisoluiset karsinoomat. Olemme tässä työssä keskittyneet pelkästään adenokarsinoomaan, joka kuuluu levyepiteeli- ja suurisoluisen karsinooman ohella ei-pienisoluisiin karsinoomiin ja johtuu yleensä tupakoinnista. Huomattavaa kuitenkin on, että kaikki ne potilaat, jotka eivät ole koskaan tupakoineet ja sairastuvat keuhkosityöpään, sairastavat lähes aina adenokarsinoomaa. (Mali – Ojala – Salo 2007: 279–280.)

Taulukko 1. Keuhkokasvaimien suhteelliset osuudet v. 1980–1987 (Taskinen – Salmenkivi - Anttila 2005: 126).

Keuhkosyöpätyyppi	Maailmassa (%)	Suomessa (%)
Levyepiteelikarsinooma	25–51	43
Pienisolukarsinooma	3-28	22
Adenokarsinooma	6-41	18
Suurisolainen karsinooma	4-19	16
Adeno-levyepiteelikarsinooma		1
Harvinaiset karsinomat		<1

Kasvainten luokittelu perustuu histologisen rakenteen tutkimiseen valomikroskoopilla, minkä vuoksi kudokset valmistetaan preparaattilasit värjätään hematoksyliini-eosiinilla ja joskus tehdään lisäksi eri limavärjäksiä ja immunosytokemiallisia värjäksiä luokittelun täsmentämiseksi. Muun muassa keuhkojen primaarikasvainten ja etäpesäkkeiden erotteluun käytetään immunosytokemiallisia värjäksiä. Usein keuhkokasvaimissa on nähtävissä monille keuhkosyöpätyypeille tyypillisiä rakenteita ja WHO onkin korostanut luokittelukriteereissään, että se syöpätyyppi, jolla on huonoin ennuste, vaikuttaa eniten syöpätyypin luokitteluun. (Taskinen – Salmenkivi - Anttila 2005: 125–126.) Pienisolainen keuhkosyöpä on ennusteeltaan kaikkein huonoin, sillä yleensä se on jo diagnoosin selvityksessä levinnyt ja elinaikaa on keskimäärin jäljellä vain 6-8 viikkoa. Ei-pienisolainen syövän ennuste on levinneisyydestä riippuen noin muutamasta kuukaudesta vuoteen. (Mali – Ojala – Salo 2007: 288–291.)

5.2 Keuhkosyövän oireet, diagnostiikka ja hoito

Keuhkosyöpäpotilaat osaavat hakeutua hoitoon useimmiten liian myöhäisessä vaiheessa, koska ensioireet ovat hyvin epämääräisiä ja niiden ajatellaan aiheutuvan vähemmän vaarallisista sairauksista. Tällaisia oireita ovat muun muassa pitkittynyt yskä, rintakipu ja hengenahdistus. (Souhami – Tobias 2005: 200.) Ensioireiden lisäksi keuhkosyövän yksi merkittävimmistä potilaan oireista on veriyskä, sillä sitä esiintyy noin puolella kaikista keuhkosyöpäpotilaista. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin asettama työryhmä on vuonna 2008 määrittänyt keuhkosyövän hoitosuositukset, joissa käydään läpi perusteellisesti keuhkosyövän epidemiologiaa, diagnostiikkaa, hoitovaihtoehtoja ja niiden kehitystä. (Käypä hoito 2008.)

Keuhkosityövän diagnostiikassa on erityisen tärkeää suorittaa huolellinen anamneesi. Potilasta on haastateltava tarkkaan ja tarkoituksena on selvittää muun muassa tupakointihistoria, asbestialtistus, oireet, muut sairaudet, aiemmat syövätkä arvioida potilaan yleiskunto (Mali – Ojala – Salo 2007: 283). Anamneesin jälkeen tehdään kliiniset tutkimukset, joihin kuuluvat sydän- ja keuhkoäänien kuuntelu, kainaloiden imusolmukkeiden, kaulan ja soliskuoppien tunnistelu sekä maksan koon arviointi. (Käypä hoito 2008). Potilas lähetetään keuhkosairauksien klinikalle, missä hänelle tehdään keuhkojen natiiviröntgenkuvaus sekä thoraxin ja ylävatsan tietokonetomografia. Näillä peruskuvantamistutkimuksilla pyritään määrittämään mahdollisen keuhkokasvaimen paikka, koko, levinneisyys ja kasvutapa. (Mali – Ojala – Salo 2007: 283)

Erikoissairaanhoidon piirissä selvitetään keuhkosityövän histologinen rakenne ja tyyppi, levinneisyys sekä potilaan toimintakyky. Näitä kaikkia tietoja tarvitaan, sillä ei-pienisoluisille ja pienisoluisille karsinoomille on olemassa omat hoitolinjat. Potilaalle tehdään oireista riippuen keuhkoputkien ja välikarsinan tähystys, luuston isotooppitutkimus, pleuranestepunktio ja keuhkofunktio tutkimukset: spirometria ja diffuusikapasiteettimittaus. Keuhkoputkien tähystys on yksi tärkeimmistä perustutkimuksista keuhkosityöpöpotilaan kohdalla, sillä sen avulla saadaan biopsianäyte tai imu-/harjanäyte histologian ja sytologian mikroskooppisia tutkimuksia varten. Keuhkosityövän osalta ei ole olemassa spesifisiä kasvainmerkkiaineita, joten verinäytteistä suositellaan analysoitavaksi ainakin CRP, ASAT, ALAT, AFOS, albumiini, seerumin kreatiniini, kalium, natrium ja kalsium. (Käypä hoito 2008.)

Kun potilaan keuhkosityövän tyyppi on tunnistettu ja levinneisyys selvitetty, voidaan päättää millaista hoitoa hänelle annetaan ja arvioidaan myös sairauden ennuste. Kaikki keuhkosityövän hoitomuodot vaikuttavat potilaan hengityskapasiteettiin ja sen vuoksi yleiskunnon ja toimintakyvyn määrittäminen on välttämätöntä. Syöpähoitot ovat rankkoja aiheuttamiensa sivuoireiden takia ja eivät näin ollen sovellu heikkokuntoisille potilaille. (Käypä hoito 2008.)

Pienisoluista keuhkosityöpää sairastavaa potilasta hoidetaan pääsääntöisesti solunsalpaajilla ja sädehoidolla. Leikkaus on harvinaisempi vaihtoehto, koska sairaus diagnosoidaan yleensä niin myöhään, ettei kasvaimen leikkaamista suositella. Ei-pienisoluisen

keuhkosityöpä leikataan aina, kun se on vaan mahdollista, sillä sen on todettu olevan toimiva hoitomuoto lähes kolmannekselle kyseistä keuhkosityöpätyyppiä sairastavista potilaista. Duodecimin antamissa hoitosuosituksissa suositellaan myös solunsalpaaja-hoitoa ja sädehoitoa yhdessä tai erikseen joko ennen tai jälkeen leikkauksen. Jotta näitä hoitoja voidaan antaa leikkauksen jälkeen, on potilaan oltava hyvässä kunnossa ja mitä aiemmin sädehoito aloitetaan, sitä parempia ovat hoitotulokset. Toimintakykyä voidaan luokitella eri tavoin ja taulukossa 2 onkin esitelty yksi yleisimmistä vaihtoehtoista, Karnofskyn toimintakykyluokitus. (Käypä hoito 2008.)

Taulukko 2. Karnofskyn toimintakykyluokitus (Käypä hoito 2008).

Kriteerit	Luokka (%)
Kykenee normaaliin toimintaan, ei oireita taudista	100
Kykenee normaaliin toimintaan, vähäisiä löydöksiä tai oireita taudista	90
Normaalitoiminta ponnistuksin, joitakin löydöksiä tai oireita taudista	80
Ei kykene normaaliin toimintaan eikä työhön, pystyy huolehtimaan itsestään	70
Tarvitsee ajoittain apua, mutta kykenee huolehtimaan useimmista tarpeistaan	60
Tarvitsee huomattavaa apua ja usein lääkinnällistä hoitoa	50
Kykenemätön huolehtimaan itsestään, tarvitsee erityistä apua ja lääkinnällistä hoitoa	40
Vakavasti toimintakyvytön, sairaalahoito aiheellista	30
Hyvin sairas, laitoshoido ja aktiivinen tukihoido välttämätöntä	20
Terminaalivaihe, elintoiminnot heikkenevät nopeasti	1

Jos potilaan sairaus uusii tai etenee ensimmäisen hoitovasteen jälkeen, voidaan harkita uutta solunsalpaajahoidoa. Silloin tulee ottaa huomioon potilaan ensimmäisen hoidon kesto, suorituskyky, hoitovasteen laajuus ja haittavaikutukset. Noin puolet sellaisista potilaista, jotka ovat saaneet vähintään kolmen kuukauden hoitovasteen ensimmäisistä hoidoista, saa myös hoitovasteen toisesta hoitosyklistä. Potilaita, jotka saavat solunsalpaajahoidoa, tulee tarkkailla noin kahden kuukauden välein ja arvioida hoitojen haittavaikutukset ja sen teho. Jos näkyvää tehoa ei ole ja haittavaikutukset ovat suuria, on hoidon jatkaminen hyödytöntä eikä se ole myöskään potilaan oman edun mukaista. (Käypä hoito 2008.) Ei-pienisoluista keuhkosityöpää on nykyään mahdollista hoitaa myös uusilla täsmähoitolääkkeillä, jotka vaikuttavat molekyyllitasolla kasvaimen toimintaan.

Lääkkeitä annetaan yksittäin tai useita kerrallaan niin sanottuna yhdistelmähoitona. (Knuuttila 2005: 583.)

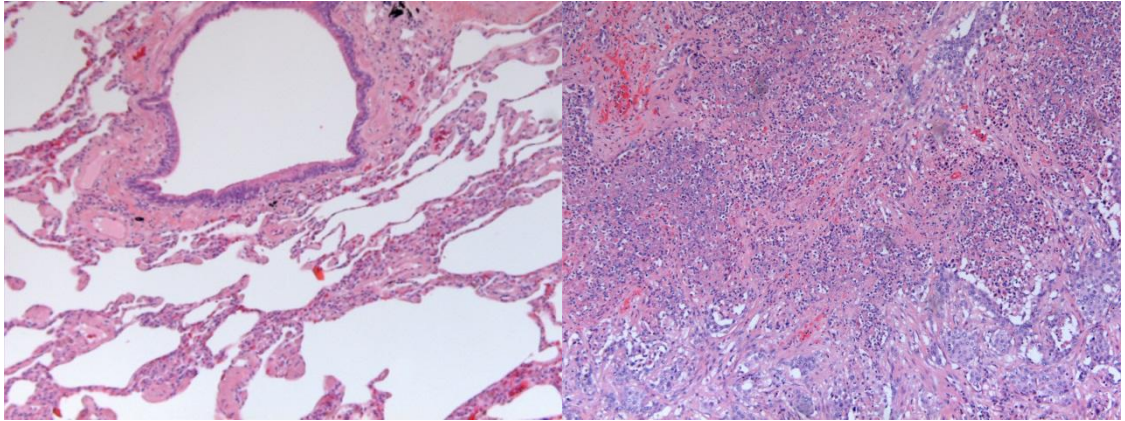
5.3 Adenokarsinooman diagnostiikka ja hoito

Adenokarsinooma on ei-pienisoluisiin karsinomiin kuuluva keuhkosyöpätyyppi, jonka yleisyys vaihtelee maantieteellisesti ja on selkeästi yleistymässä kaikkialla maailmassa. Euroopassa adenokarsinoomien osuus on noin 30 % ja USA:ssa se on jo yleisin ei-pienisoluisista karsinoomista kattaen 50 % kaikista tapauksista. (Knuuttila 2005: 574.) Adenokarsinooma on muiden keuhkosyöpien tapaan useimmiten tupakoinnin aiheuttama kasvain, mutta se on myös yleisin syöpätyyppi ei-tupakoivien keuhkosyöpäpotilaiden keskuudessa (Mali – Ojala – Salo 2007: 279–280). Adenokarsinooman on todettu olevan hieman yleisempi naisilla kuin miehillä ja yleensä potilaat ovat nuorempia, kuin esimerkiksi levyepiteelikarsinoomaa sairastavat potilaat. (Skarin – Blanco 1996: 63).

Adenokarsinoomat jaetaan useisiin alalajeihin, joista yleisimpiä ovat asinaariset, papillaariset ja bronkioalveolaariset adenokarsinoomat. Asinaarinen adenokarsinooma lähtee etenemään keuhkojen limarauhasista, mikä on myös tyypillistä levyepiteelikarsinoomalle, ja tästä syystä molempia kutsutaan sentraalisiksi karsinoomiksi. Papillaarinen adenokarsinooma on perifeerinen kasvain, joka tunkeutuu sen lähellä oleviin solurakenteisiin ja lähettää etäpesäkkeitä erityisesti aivoihin. Bronkioalveolaarinen adenokarsinooma on perifeerinen kasvain, joka taas etenee keuhkojen alveoleja pitkin. (Mali – Ojala – Salo 2007: 279–280.) Adenokarsinooman primaarikasvain on yleensä hyvinkin pienikokoinen, mutta se tunkeutuu helposti verenkiertoon ja onnistuu lähettämään etäpesäkkeitä jo sairauden varhaisessa vaiheessa (Knuuttila 2005: 574).

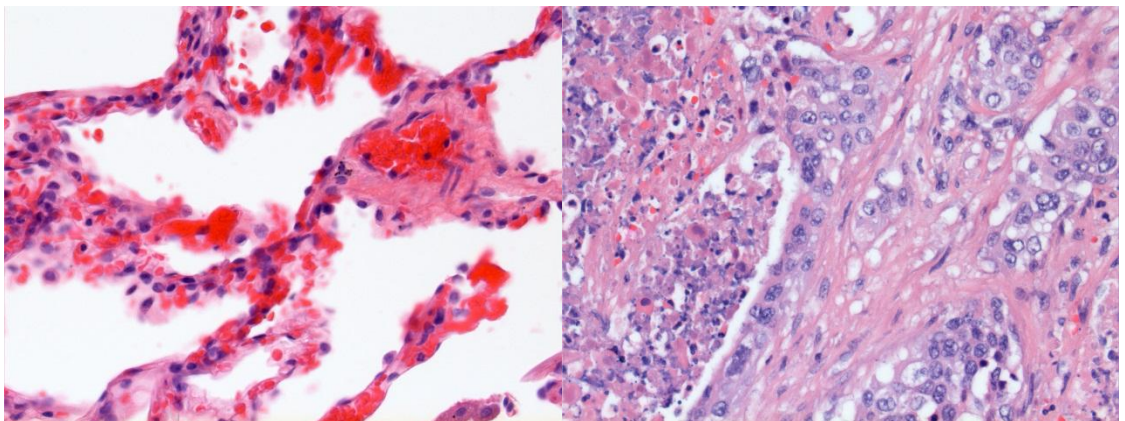
Terveen keuhkokudoksen histologista rakennetta tarkasteltaessa on nähtävissä keuhkolle tyypillinen rikkonainen rakenne tyhjän ilmatilan vuoksi. Mikroskoopin avulla on myös erotettavissa selkeästi erikokoiset ilmatiet kuten alveolit, ilmetiehyet ja bronkukset sekä keuhkoa ympäröivä sidekalvo. (Solunetti 2006a.) Isojen keuhkoputkien ympärillä on rustoa ja pienempien keuhkoputkien pinnalla on respiratorista epiteeliä, jonka alla on sileää lihaskudosta. (Solunetti 2006b). Edellä mainittuja rakenteita olemme kuvanneet kuvioissa 4 ja 6. Adenokarsinooman tavallisimpia histologisia piirteitä ovat

rauhasmaiset rakkulat ja tiehyet, sidekudoksen ja liman muodostaminen, solujen suuri koko sekä niiden runsas sytoplasma (Taskinen – Salmenkivi - Anttila 2005: 127). Näitä rakenteita on nähtävissä kuvioissa 5 ja 7.



Kuvio 4. Terve keuhkokudos (10x).

Kuvio 5. Adenokarsinooma (10x).



Kuvio 6. Terve keuhkokudos (40x).

Kuvio 7. Adenokarsinooma (40x).

Adenokarsinoomapotilaan diagnosointi jatkuu kliinisten tutkimusten ja syöpätyypin tunnistuksen jälkeen kaikille ei-pienisoluista keuhkosityöpää sairastaville potilaille tehtävällä TNM-luokituksella (tumor node metastasis). Tällä luokituksella on tarkoitus kuvata kasvaimen kokoa ja levinneisyyttä, imusolmukkeiden statusta ja mahdollisia etäpesäkkeitä. Tämän jälkeen voidaan valita potilaalle sopivin hoitolinja. TNM-luokituksen sijasta voidaan keuhkosityöpä myös luokitella rajoittuneeksi tai levinneeksi syöväksi. Rajoittunut syöpä esiintyy yhdessä puoliskossa keuhkoista ja sillä voi olla etäpesäkkeitä lähialueen imusolmukkeissa. Levinneessä syövässä sairaus on edennyt näiden rajojen ulkopuolelle. (Käypä hoito 2008.)

Rajoittuneen adenokarsinooman ensisijainen hoito on leikkaus ja jos se ei ole mahdollista, annetaan potilaalle kuratiivinen sädehoito, jolla tarkoitetaan sädehoidon kohdistamista suoraan primaarikasvaimeen eikä mahdollisiin etäpesäkkeisiin. Leikkauksesta hyvin toipuneille potilaille suositellaan platinapohjaista solunsalpaaja-hoitoa, joka aloitetaan noin 5-8 viikon kuluttua leikkauksesta. Solunsalpaajat annetaan kolmessa tai neljässä syklissä. (Käypä hoito 2008.)

Laajemmalle alueelle levinneiden adenokarsinoomien hoitolinjat eivät ole yksiselitteisiä ja hoitopäätös perustuu syövän levinneisyyden arviointiin keuhkojen välikarsinassa. Leikkaus on harvoin paras vaihtoehto tällaisille potilaille, vaan useimmiten heille annetaan solunsalpaajia ja sädehoitoa yhdistelmähoitoina. Jos potilas ei saa hoitovastetta ensimmäisistä solunsalpaajahoidoista, ei häntä tule tässä tapauksessa leikata. Kaikkein vakavimmin sairastuneet adenokarsinoomapotilaat eivät hyödy leikkaushoidosta vaan heidän oireitaan ja elämänlaatua pyritään pidentämään sekä parantamaan pelkästään solunsalpaajahoidoilla. Jos potilaan suorituskyky on huonontunut ja hän ei kestä solunsalpaajia, pyritään hänen oireitaan helpottamaan tehokkaasti muilla keinoilla. (Käypä hoito 2008.)

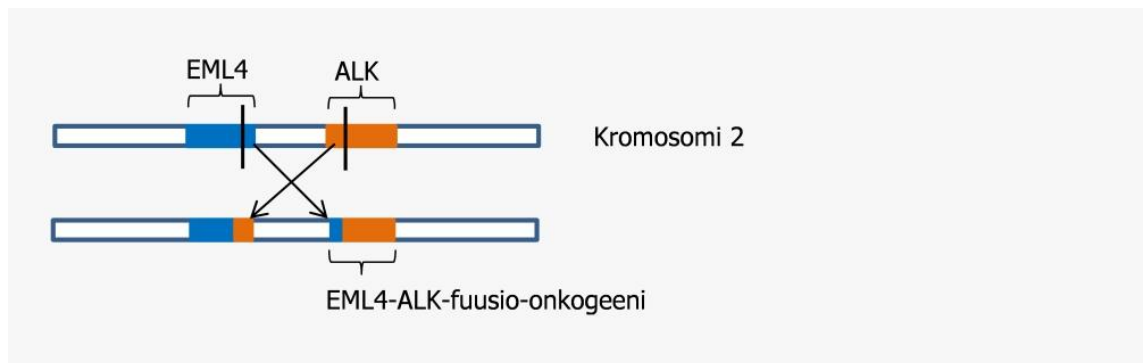
Adenokarsinoomaa voidaan hoitaa myös erilaisilla täsmälääkkeillä, jos potilas ei ole reagoinut ensimmäisen tai toisen linjan hoitoihin. Viime vuosina on käytetty EGFR-tyrosiinikinaasin estäjää erlotinibia, josta on saatu hyviä tuloksia erityisesti ei-tupakoivien adenokarsinoomapotilaiden keskuudessa. (Käypä hoito 2008.)

6 EML4-ALK-fuusio-onkogeneeni ja sen diagnosointimenetelmät

Yksi uusimmista tutkimuksien kohteena olevista tyrosiinikinaaseista on EML4-ALK-fuusio-onkogeneeni, josta kerromme enemmän tässä osiossa. Käymme myös läpi yleisimmät EML4-ALK-fuusio-onkogeneenin diagnosointiin käytettävät tutkimus-menetelmät ja kerromme perusteellisemmin FISH- ja IHC-menetelmistä.

6.1 EML4-ALK-fuusio-onkogeeni

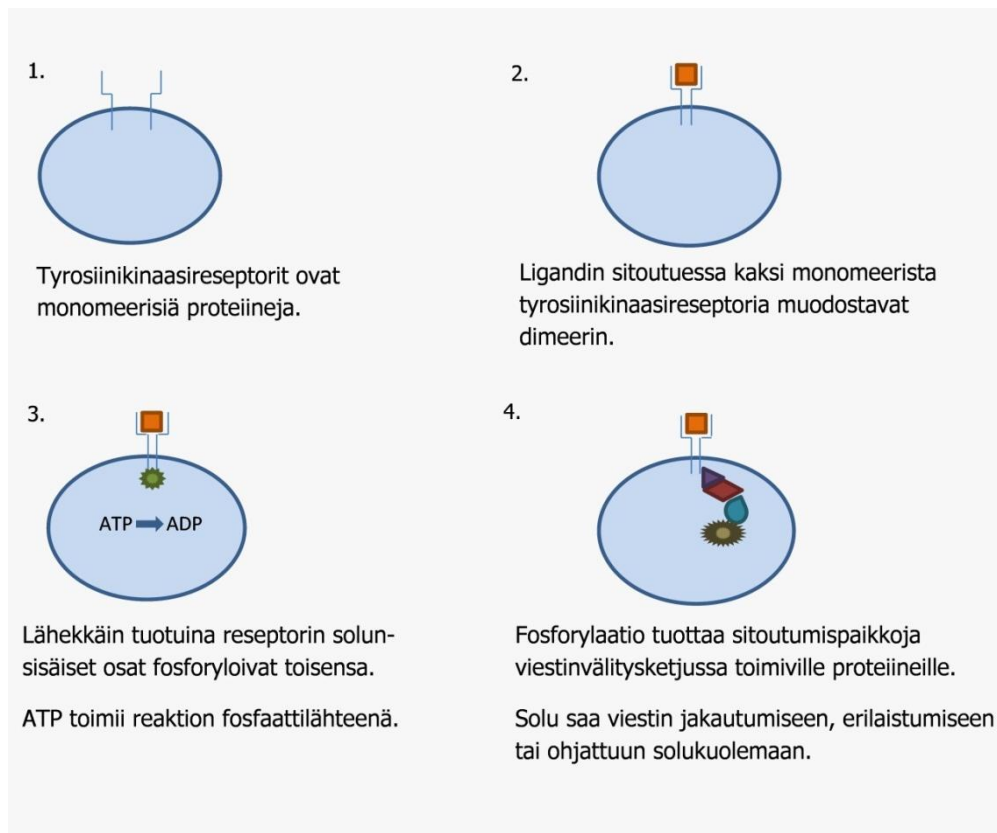
EML4-ALK-fuusio-onkogeeni on yksi ei-pienisoluisen keuhkosyövän kohdemolekyyleistä, josta kerrottiin ensimmäisen kerran vuonna 2007. Fuusio-onkogeeni on pienen inversion lopputulos, joka tapahtuu kromosomissa 2p (kuvio 8). (Shaw ym. 2009; Sasaki ym. 2010.) EML4-ALK-fuusio-onkogeeni on useimmiten löydetty ei-tupakoivilta henkilöiltä, joilla on keuhkosyöpä. Muutamassa tutkimuksessa on samaa fuusio-onkogeeniä löydetty myös muiden syöpien yhteydessä, kuten rinta- ja kolorektaalisyövässä. (Sasaki ym. 2010.) Inversio johtaa tyrosiinikinaasiproteiinin muodostumiseen, josta aiheutuu voimakas onkogeeninen aktiivisuus (in vitro ja in vivo) (Shaw ym. 2009). Inversio ei kuitenkaan tapahdu aina samassa paikassa, vaan useita eri EML4-ALK-mutaatioiden variaatioita on löydetty. Vuonna 2010 variaatioita oli löydetty 11, joista kaksi oli selvästi muita yleisempiä (yhteensä 62 % kaikista variaatioista). Eri variaatioiden kliinisiä merkityksiä ei ole vielä määritetty. (Sasaki ym. 2010.)



Kuvio 8. Inversion kautta syntynyt EML4-ALK-fuusio-onkogeeni (Mukaillen Mano 2007).

ALK on rakenteeltaan klassinen esimerkki tyrosiinikinaasireseptorista, jonka toimintaperiaate on havainnollistettu kuviossa 9. Tällä reseptorilla on solunulkoisen ligandija sitova osa, solukalvon läpäisevä jakso, sekä solunsisäinen osa, jossa reseptorin entsyymiaktiivisuus sijaitsee (Palmer ym. 2009). Tyrosiinikinaasireseptorit ovat monomeerisiä proteiineja, jotka ligandin sitoutuessa muodostavat reseptoripareja eli dimerisoituvat. Lähekkäin tuotuna reseptorin solunsisäiset osat fosforyloivat toisensa, missä ATP toimii reaktion fosfaattilähteenä. Fosforylaatio tuottaa edelleen sitoutumispaikkoja viestinvälitusketjussa toimiville proteiineille. Näiden proteiinien kautta välittyvät kasvutekijöiden vaikutukset solujen jakautumiseen ja erilaistumiseen ja monien onkogeenien aktivaatioon. (Scheinin 2001: 57-58.) EML4-ALK-fuusio-onkogeeni saa aikaan tämän signaalintii-

reitit pysyvän aktivaation, mikä saadaan kuitenkin tehokkaasti pysäytettyä pienimolekyylisellä inhibiittorilla, jonka kohteena on ALK (Shaw ym. 2009).



Kuvio 9. Tyrosiinikinaasireseptorin toiminta.

ALK-geenin uudelleenjärjestäytymistä on tutkittu jo 15 vuotta ja useat diagnostiset menetelmät on todettu olevan sensitiivisiä ja spesifisiä, kun selvitetään tämän kasvaintyyppin geneettisen vaurion luonnetta. Kuitenkaan tällä hetkellä ei ole standardimenetelmää EML4-ALK-fuusio-onkogeenin löytämiseen ei-pienisoluisessa keuhkosyövässä. Useamman menetelmän käytettävyyttä arvioidaan tällä hetkellä. (Sasaki ym. 2010.)

6.2 Diagnosointimenetelmät

EML4-ALK-fuusio-onkogeenin diagnosointiin on käytetty eri menetelmiä, joista yleisimmät ovat PCR (polymerase chain reaction), IHC (immunohistochemistry) ja FISH (fluorescence in situ hybridization). PCR on todettu olevan hyvin sensitiivinen menetelmä, jonka avulla löytyvät ALK-geenin eri mutaatiotyypit. Ongelmana ovat kuitenkin olleet monet eri variaatiot mutaatioista, minkä takia tutkimukseen tulee sisällyttää kaikki tie-

dossa olevat alukkeet liittyen ALK-geenifuusioihin. FISH:in on todettu olevan spesifiempi tutkimusmenetelmä ALK-geenifuusioiden löytämiseen. Ongelmana tässä menetelmässä on, että eri variaatioita EML4-ALK-fuusio-onkogeeneistä ei pystytä erottamaan toisistaan, kuten esimerkiksi PCR:n avulla. IHC:n sensitiivisyys ja spesifisyys on todettu olevan riittävä, kun se tehdään suurisoluisen lymfooman ALK-statusen selvittämisen rutiinitutkimuksena. Silloin kun halutaan diagnosoida ALK-mutaatiota keuhkojen adenokarsinoomassa, IHC:n on todettu olevan riittämätön, sillä kaikki ALK-geenin suhteen positiiviset näytteet eivät ole kuitenkaan värjäytyneet positiivisiksi. Syy tähän on vielä selvittämättä. (Sasaki ym. 2010.)

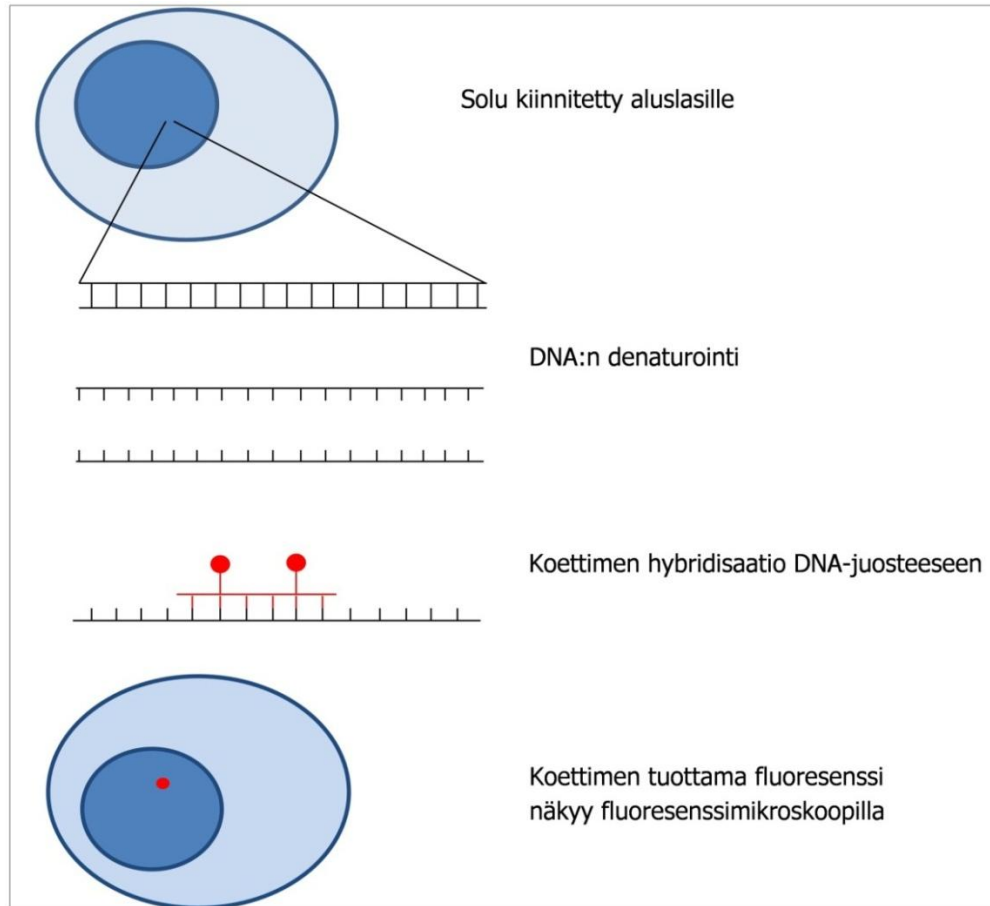
6.2.1 Fluoresenssi in situ hybridisaatio (FISH)

Molekyylisytogenetiikka perustuu in situ -hybridisaatioon, jossa DNA-koetin yhdistyy (hybridisoituu) sen emäsjaksoja vastaavaan DNA:n alueeseen. Koettimen kiinnittyminen havaitaan mikroskooppisesti joko entsyymaattisen reaktion synnyttämän värin tai fluoresoivan väriaineen aiheuttaman fluoresenssin perusteella. Pääsääntöisesti käytössä on fluoresoivia havainnointimenetelmiä, mistä syystä molekyylisytogenetiikalle on tullut miltei yleisnimeksi FISH. (Knuutila 2002. 55–57.)

DNA koostuu kahdesta nukleenihiappojuosteesta, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa vetysidosten avulla emäspariutumisperiaatteen mukaisesti (Ulmanen ym. 2001: 11–12). Nämä vetysidokset ovat melko heikkoja, joten ne saadaan hajotettua korkean lämpötilan tai pH:n avulla, eli denaturoimalla DNA. Kun lämpötilaa tai pH:n arvoa lasketaan, reaktio palautuu, jolloin juosteet kiinnittyvät toisiinsa jälleen emäspariutumissäännön mukaisesti, eli hybridisoituvat. Denaturaatio ja hybridisaatio ovatkin DNA-teknologian perusta. FISH-menetelmässä solut siirretään mikroskoopin aluslasille, denaturoidaan solut ja annetaan leimattujen koettimien hybridisoitua auenneeseen DNA:han. (Read – Donnai 2007: 84–87).

Hybridisaation jälkeen koettimien ylimäärä pestään pois ja katsotaan koettimien tuottamat signaalit fluoresenssimikroskoopilla (Read – Donnai 2007: 87). FISH-menetelmän periaate on esitetty kuviossa 10. Fluoresenssimikroskoopissa käytetään tavallisen valon sijasta ultraviolettivaloa, joka saa näytteessä aikaan fluoresenssivaloa. Fluoresenssi ilmenee, kun koettimen fluorokromin molekyylit virittyvät tietyllä aallonpituudella ja

palautuvat toisella aallonpituudella virittymättömään tilaan. Fluorokromien tuottama valo on rajallinen varsinkin pienissä koettimissa. Tästä syystä mikroskopoinnin tulee tapahtua riittävän nopeasti, ettei valo himmene kokonaan. (Min 2003: 195.)



Kuvio 10. FISH-menetelmän periaate.

Hybridisaation onnistumiseen vaikuttavat eri olosuhteet, kuten lämpötila, hybridisaatio-puskurin suolapitoisuus (pH) ja koettimen pituus. Tästä syystä olosuhteet tulisi optimoida niin, että koetin sitoutuisi mahdollisimman tehokkaasti haluttuun kohteeseen. Koettimelle on myös olemassa tiettyjä kriteerejä, jotka vaikuttavat hybridisaation onnistumiseen. Esimerkiksi koettimen syysiini- ja guaniinipitoisuuksien tulisi olla riittävän korkeat, sillä niiden välille syntyy kestävämpi sidos kuin adeniinin ja tymiinin välille. Hybridisaation jälkeen lopputulokseen voidaan vaikuttaa myös pesujen kautta optimoimalla niissäkin lämpötila ja ionivahvuus (pH) mahdollisimman sopiviksi. (Suominen – Ollikka 2004: 114–117.)

Yksi FISH-menetelmän hyvistä ominaisuuksista on, että sen avulla voidaan tutkia interfaasivaiheessa (solun toimintavaiheessa) olevia soluja, jolloin solujen stimulointia saadakseen ne matafaasivaiheeseen (jakautumisvaiheeseen) ei tarvita. Stimulointi kestäisi viikon ajan, joten FISH-menetelmän avulla tulokset saadaan nopeasti valmiiksi. (Jorde ym. 2006: 110–111.) FISH-periaatetta voidaan soveltaa kromosomitutkimuksissa monella eri tapaa. Lokusspesifisessä FISH-tutkimuksessa käytetään pienen kromosomialueen, jopa yhden geenin tunnistavaa koetinta. Kromosomimaalaus-menetelmässä käytetään koko tietyn kromosomin alueelle hybridisoituvaa koetinta. Multicolor-FISH-menetelmässä jokainen kromosomi maalataan erivärisiksi koettimien avulla. (Knuutila 2002: 55–57.) Telomeerialueen FISH-menetelmä on vähemmän käytössä oleva tutkimustapa, mutta sen avulla voidaan määrittää muun muassa epätasapainoisia translokaatioita, jotka sijaitsevat kromosomien päissä (Min – Swansbury 2003: 180–181). Käytämme opinnäytetyössämme lokusspesifistä FISH-tutkimusta, joka tehdään parafiinileikkeestä.

6.2.2 FISH-valmisteen tekeminen parafiinileikkeestä

FISH-menetelmää käytetään muun muassa kromosomivaurioiden analysointiin kasvainkudoksessa (Suominen ym. 2010: 203). Sen avulla saadaan visualisoitua haluttu nukleenihiapposekvenssi solupreparaatissa (Abbot Laboratories 2011).

FISH-valmistetta varten kudokset fiksoidaan mikroskooppilasille (Suominen ym. 2010: 203). Tämän jälkeen leikkeestä poistetaan parafiini Thermobrite-lämpölevyn sekä Hemo-De- ja esikäsitteilyliuoksien avulla (Abbot Laboratories 2011). Kun parafiini on saatu poistettua, kudoksen solut käsitellään proteinaasi K-entsyymillä, joka lisää solujen läpäisevyyttä. Tämän seurauksena koetin pääsee helpommin solujen sisään. (Suominen ym. 2010: 203.) Esikäsitteilyjen jälkeen DNA denaturoidaan yksijuosteiseen muotoon ja annetaan koettimien hybridisoitua DNA:han (Abbot Laboratories 2011). Hybridisaatio tehdään yleensä yön yli (Suominen ym. 2010: 203). Käyttämämme Vysis ALK Break Apart FISH Probe -reagenssipakkaus pitää sisällään kaksi eri koetinta, joista toinen koetin on leimattu oranssilla ja toinen vihreällä fluoresoivalla merkkiaineella. Nämä koettimet ovat suunniteltu siten, että ne kiinnittyvät ALK-geenin katkoskohdan vastakkaisille puolille (Abbot Laboratories. 2011). Hybridisaation jälkeen sitoutumattomat koettimen pestään pois (Suominen ym. 2010: 203; Abbot Laboratories 2011). Lopuksi

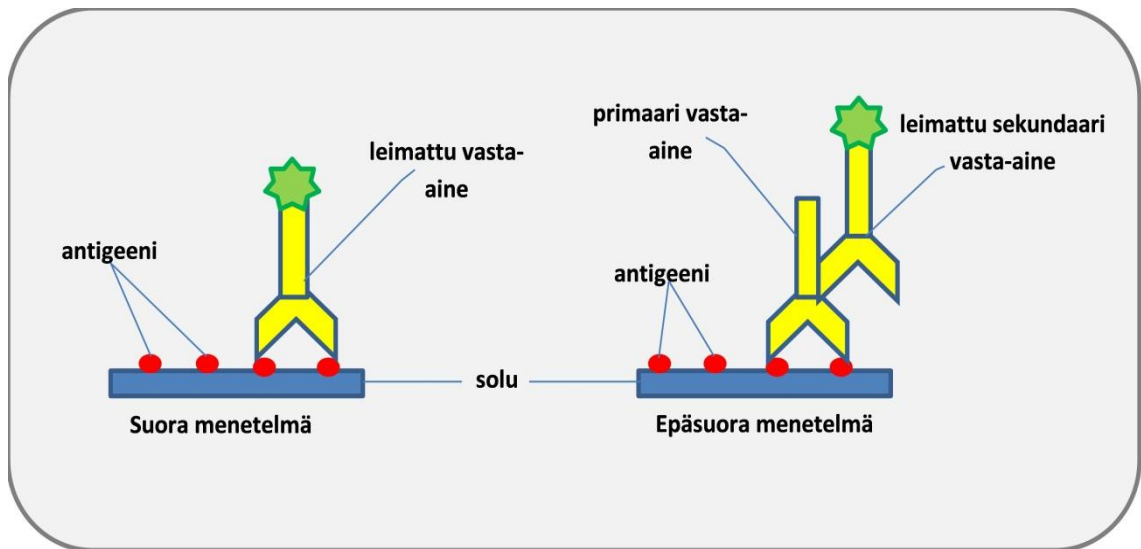
tumat värjätään DAPI:lla eli taustavärillä, joka fluoresoi sinistä (Abbot Laboratories 2011).

Hybridisoidut koettimet havaitaan fluoresenssimikroskoopilla, jossa on tarvittavat filteerit fluoresoivien signaalien havaitsemiseksi. Kun hybridisaatio on tehty Vysis ALK Break Apart FISH Probe -reagenssipakkauksella, oranssit ja vihreät signaalit näkyvät normaalissa solussa vierekkäin tai päällekkäin, jolloin signaalit yhdistyessään näkyvät keltaisena, eli fuusiosignaalina. Mikäli solussa on tapahtunut EML4-ALK-fuusio, oranssi ja vihreä signaali näkyvät selvästi erillään toisistaan eli niin sanottuna split-signaalina. Tällöin signaalien tulee olla sen verran erillään, että niiden väliin voisi kuvitella mahtuvan kaksi signaalia. (Abbot Laboratories 2011.) Tarkemmat työvaiheet sekä tarvittavat liuokset on esitetty kappaleissa 8.1–8.2.

6.2.3 Immunohistokemia (IHC)

Immunohistokemiallisia menetelmiä käytetään erityisesti kasvaintyyppien arvioinnissa. Sen avulla on mahdollista erottaa muun muassa karsinoomat, sarkoomat ja lymfoomat toisistaan. (Franssila 2007: 91) Immunohistokemiassa kuten myös immunosytokemiasa tarkoituksena on etsiä antigeenejä erilaisten vasta-aineiden avulla kudoksista ja soluista. (Orton 2005: 159). Yleensä vasta-aineet leimataan fluoresoivilla merkkiaineilla tai entsyymeillä, jotka sitoutuvat antigeeneihin. Sitoutumisen jälkeen kompleksit ovat nähtävissä värireaktion myötä joko fluoresenssimikroskoopilla tai valomikroskoopilla. (Buchwalow – Böcker 2010: 31.)

Antigeenit voidaan tunnistaa kahdella eri tavalla, joko suorasti tai epäsuorasti. Suorassa menetelmässä leimattu primaari vasta-aine sitoutuu suoraan kohdeantigeeniin ja sitoutumisen myötä syntynyt värireaktio voidaan havaita mikroskoopissa. Epäsuorassa menetelmässä käytetään sekundaarisia ja primaarisia vasta-aineita. Primaari vasta-aine sitoutuu antigeeniin, jonka jälkeen leimattu sekundaari vasta-aine sitoutuu tähän kompleksiin ja syntyy mikroskoopissa havaittava vahvempi värireaktio. (Gartner – Hiatt 2001: 4–6.) Epäsuoran menetelmän on todettu olevan sensitiivisempi suoraan menetelmään verrattuna. (Hunt ym. 2006: 204–205.) Molemmat periaatteet on havainnollistettu kuviossa 11.



Kuvio 11. Immunohistokemian periaate.

Vertailussa käyttämämme IHC-tulokset olivat saatu epäsuoraa polymeeri-menetelmää käyttäen. Tällöin sekundaari vasta-aineeseen on kiinnitetty polymeerirunko, jossa puolestaan on kiinni leimana toimiva entsyymi. Tämän avulla saadaan vahvemmat ja intensiivisemmät signaalit, jotka on helpompi havaita mikroskoopissa. (Kero 2011.)

HUSLABin patologian keskuslaboratoriossa primaari vasta-aineena käytetään Dakon valmistamaa hiirimonoklonaalista ALK-vasta-ainetta (CD246), joka on optimoitu tässä toimipisteessä suurisoluisen anaplastisen lymfooman diagnostiikkaan. Ennen primaari vasta-aineen lisäämistä parafiinileikkeet deparafinoidaan, jonka jälkeen ne esikäsitellään mikroaaltouunissa Tris-EDTA- puskurilla (pH 9,0). Tämän tarkoituksena on aukais-ta formaliinin muodostamat metyleeniristisillat ja näin mahdollistaa vasta-aineen pääsy kohdeantigeeninsä luo. (Kero 2011.)

Itse värjäys tapahtuu LabVisionin immunoautomaatissa. Ensin laite tekee endogeenisen peroksidaasin blokeerauksen, jonka jälkeen lisätään primaari vasta-aine ja annetaan inkuboitua 30 minuuttia. Seuraavaksi laite pesee laselilta ylimääräisen sitoutumattoman vasta-aineen pois ja lisää sekundaari vasta-aineen. Näytteitä inkuboidaan jälleen 30 minuuttia, jonka jälkeen suoritetaan toinen pesu. Laite lisää laselle DAB-reagenssin, jota inkuboidaan 10 min. Tämän reagenssin tehtävä on tuottaa värireaktio vasta-aineen leiman kanssa. Inkubaation jälkeen laite huuhtelee DAB-reagenssin pois ja lisää laselle tumavärin, hematoksyliinin. Lopuksi näytteet käsitellään nousevalla alkoholisar-

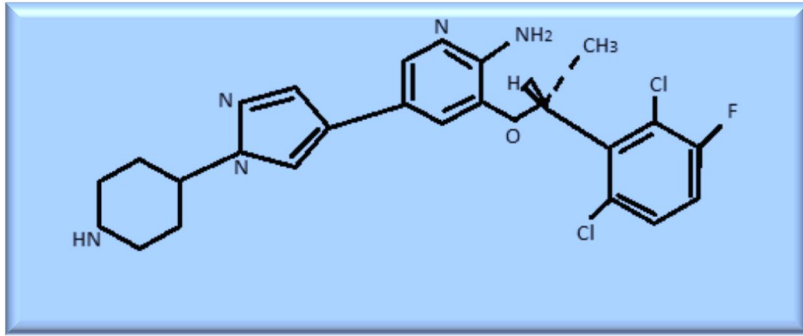
jalla sekä upotetaan ksyleeniin. Tämän jälkeen lasit ovat valmiita peiteltäviksi ja mikroskoipoitavaksi. (Kero 2011.)

Kasvainten immunohistokemiallisissa tutkimuksissa käytettäviä vasta-aineita on olemassa jo satoja ja niitä kehitetään koko ajan lisää. IHC-tutkimuksissa voidaan yleensä käyttää tavallisia parafiinivalmisteita, jotka on ensin fiksoitu formaliinissa. Muutamat vasta-ainemääritykset vaativat näytemateriaaliksi jääleikkeitä. IHC on tärkeä osa histologisia tutkimuksia, mutta yksistään sen perusteella ei ole suotavaa tehdä diagnoosia. Kasvainten immunohistokemiassa ja tulosten tulkinnassa on vielä paljon virhelähteitä ja kokemuksia on kerättävä lisää. (Franssila 2007: 91–92.)

7 Xalkori (crizotinib) – täsmälääke EML4-ALK-fuusio-onkogeenin aiheuttaman adenokarsinooman hoitoon

Luotettavan EML4-ALK-fuusio-onkogeenin diagnosointimenetelmän selvittäminen on tärkeää, koska tämän onkogeenin suhteen positiivisille adenokarsinoomapotilaille on USA:ssa kehitetty täsmälääke, jonka tarpeellisuutta kartoitetaan parhaillaan Suomessa.

Xalkori on lääkeyritys Pfizerin ensimmäinen anaplastisen lymfooma kinaasin (ALK) aktivaatiota vastaan kehitetty inhibiittori (crizotinib), jonka kemiallinen kaava on esitetty kuviossa 12. Lääke virallistettiin elokuussa 2011 ja on ensimmäinen USA:n markkinoille päässyt keuhkosityöpään kehitetty lääke yli kuuteen vuoteen. (Pfizer 2011.) Lääkettä testattiin kolmessa vaiheessa ja jo kahden ensimmäisen vaiheen tuloksista kävi ilmi, että useimmat potilaista reagoivat lääkkeeseen suotuisalla tavalla ja heidän elinikänsä piteni. Lääkehoidosta odotetaan olevan hyötyä suurimmalle osalle ei-pienisoluista keuhkosityöpää sairastavista potilaista, joilla on EML4-ALK-fuusio-onkogeneeni. (Chustecka 2011.)



Kuvio 12. Crizotinibin ($C_{21}H_{22}Cl_2FN_5O$) rakennekaava (Mukaiillen WHO: Drug Information 2010 Vol. 24 No. 2).

Xalkorin virallistaminen perustuu 255 ei-pienisoluista ja ALK-positiivista keuhkosityöpää sairastavan potilaan hoitotuloksiin. Ensimmäisessä testauksessa mukana olleiden potilaiden keskimääräinen hoitovasteen kesto oli noin 42 viikkoa. Hoito kesti noin 22 viikkoa ja hoitovaste saavutettiin suurimmassa osassa potilaista kahdeksan ensimmäisen hoitoviikon aikana. Toisessa tutkimuksessa potilaiden hoitovaste kesti keskimäärin 48 viikkoa ja puolet testaukseen osallistuneista saavutti sen kahdeksannella hoitoviikolla. Kolmannessa vaiheessa keskityttiin tutkimaan erityisesti Xalkorin turvallisuutta. Pfizerin kliinisissä tutkimuksissa käytettiin ALK-fuusiogeenin todentamiseen Abbottin Vysis ALK Break Apart FISH Probe -reagenssipakkausta, jota myös käytettiin tässä opinnäytetyössä. (Pfizer 2011.)

Crizotinibin eli kauppanimeltään Xalkorin toiminta ei-pienisoluisten keuhkosityöpäpotilaiden hoidossa perustuu solujen signalointireittien estämiseen, minkä on huomattu vähentävän ja joskus jopa kokonaan lopettavan malignin syöpäsolukon kasvamisen ja leviämisen (Pfizer 2010). Lääkkeen sisältämä inhibiittori kilpailee ATP:n kanssa reseptorin sitoutumispaikasta, jolloin fosforylaatiota ja tyrosiinikinaasin aktivaatiota ei tapahdu, ja signalointireitti katkeaa. (Knuutila 2011.) ALK-positiivisilla keuhkosityöpäpotilailla Xalkori estää ALK-tyrosiinikinaasin aktivaation, jonka uskotaan olevan yksi ei-pienisoluista keuhkosityöpää aiheuttavista molekyyli-tason tekijöistä (Pfizer 2011). Crizotinib-lääkehoidon avulla on mahdollista lieventää EML4-ALK-fuusio-onkogeenin suhteen positiivisten keuhkosityöpäpotilaiden oireita ja pidentää elinikää muutamasta kuukaudesta vuoteen. Xalkori ei vielä kuulu korvattavan hoidon piiriin Suomessa. (Knuutila 2011.)

8 Opinnäytetyön toteutus

Opinnäytetyö toteutettiin Helsingin yliopiston Haartman Instituutin sytomolekyylogeneetiikan tutkijaryhmässä elo- ja syyskuun aikana vuonna 2011. Näyttemateriaalin saimme HUSLABin keskuspatologian laboratoriosta, jossa ne valittiin asetettujen kriteerien mukaisesti. Tutkimusluvut potilasmateriaalin käyttöön olivat jo valmiiksi hankittu CMG:n tutkijaryhmän toimesta niin eettiseltä toimikunnalta kuin Valviralta.

Näytteet olivat formaliinifiksoituja ja parafiiniin valettuja kudospaloja. Parafiiniblokeista tehdyt kudosteokset olivat kiinnitetty aluslasille. Kudostenäytteet oli otettu ei tupakoitsevilta ja adenokarsinoomaa sairastavilta keuhkosyöpöpotilailta. Samasta blokista oli tehty useampia leikkeitä värjättäviksi, joista patologi oli tarkistanut, että kudostenäytteestä löytyy syöpäsolukkoa. Analysoimamme näytemäärä oli 31 kappaletta, joista itse käsitelimme analyysia varten 27 ja tutkijaryhmä oli käsitellyt neljä. Seuraavissa kappaleissa kerromme näytteiden käsittelystä ja analysoinnista.

8.1 Näytteiden käsittely

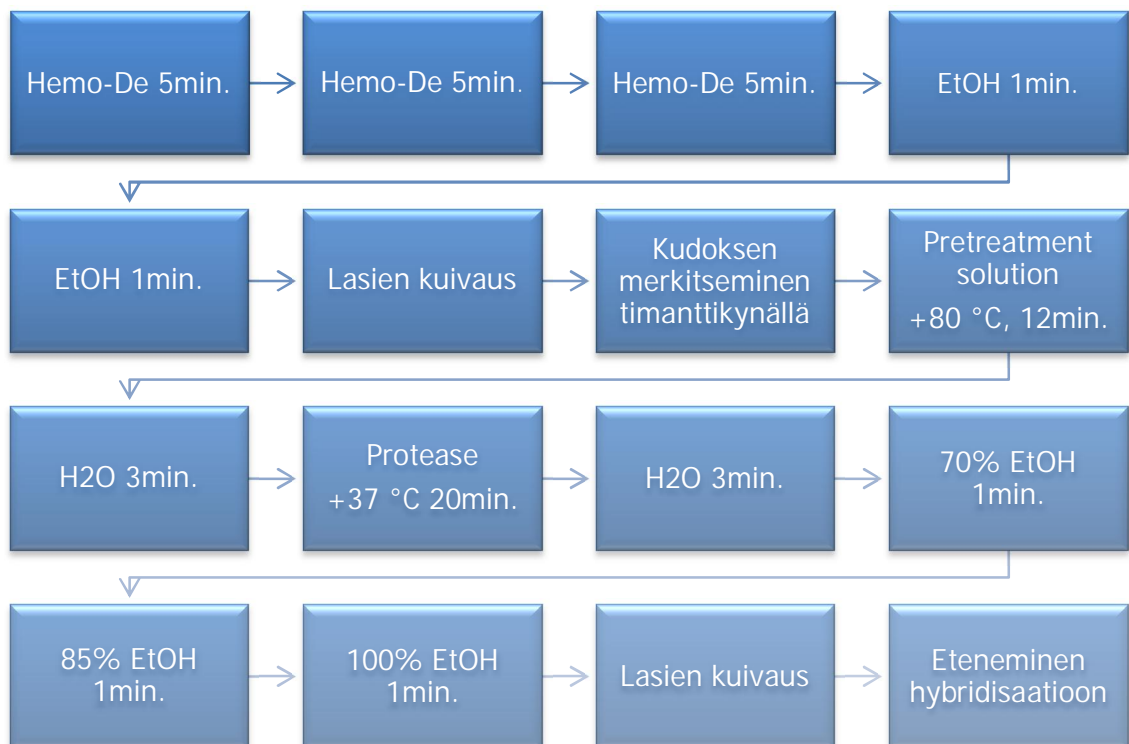
Näytteet käsiteltiin fluoresenssimikroskoopilla tehtävää analyysia varten viidessä erässä samaa reagenssipakkausta käyttäen. Jokaiseen erään sisällytettiin reagenssipakkauksen omat kaupalliset positiivinen ja negatiivinen kontrolli. Käsittely alkoi sulattamalla parafiini pois näytelaseilta siihen tarkoitetulla ThermoBrite-lämpölevyllä. Sulatuslämpötila oli +60 °C ja sulatusaika keskimäärin 22 tuntia. Sulatuksen jälkeen parafiinin poistoa ja solujen esikäsittelyä jatkettiin eri liuosten avulla, kuten kuviossa 13 esitetään.

Solujen esikäsittelyyn tarvittavat liuokset:

1. Hemo-De. Liuos, jota käytetään ksyleenin tilalla. Poistaa sulatuksen jälkeen jäljelle jäänyttä parafiinia näytelasilta. Liuosta kaadetaan maljaan ja säilytetään huoneenlämmössä, missä se säilyy viikon ajan.
2. Pretreatment solution. Esikäsittelyliuos, jonka tarkoituksena on myös poistaa parafiinia. Liuos kaadetaan maljaan, joka laitetaan +80 °C vesihauteseen. Säilyy käyttökelpoisena yhden päivän.
3. Protease solution. Proteaasijauhe yhdistetään proteaasipuskuriin ja sekoitetaan hyvin. Liuos kaadetaan maljaan, joka laitetaan +37 °C vesihauteseen ja anne-

taan tasaantua 60 minuuttia ennen käyttöä. Sekoitettu liuos säilyy yhden päivän.

4. Tislattu vesi. Käytetään huoneenlämpöisenä Pretreatment ja Protease käsittelyjen jälkeen. Vaihdetaan joka käytön jälkeen.
5. Etanoliliuokset. Työssä tarvitaan 70%, 80% ja 100% etanolia. 100% etanolia käytetään näytteiden dehydraatioon. 70%, 80% ja 100% etanolin sarjaa käytetään esikäsiteltäessä näytteitä hybridisaatiota varten. Maljoihin kaadettuna etanoliliuokset säilyvät yhden viikon. (Abbot Laboratories. 2011.)



Kuvio 13. Parafiinin poisto ja solujen esikäsitely.

Esikäsitelyn jälkeen koetinseosta pipetoitiin 10 µl näytelasille ja aseteltiin peitinlasi päälle. Peitinlasin reunojen päälle laitettiin paksu kerros kumiliimaa, joka esti haihtumista. Seuraavaksi näytelasit laitettiin Thermobrite-lämpölevylle, jossa tapahtui DNA:n denaturaatio (+73 °C ja 3 min.), jonka jälkeen koetin pääsi sitoutumaan auenneeseen DNA-juosteeseen. Hybridisaatioaika oli noin 22 tuntia +37 °C, jonka jälkeen sitoutumattomat koettimet pestiin pois kuviossa 14 esitetyllä tavalla.

Pesuvaiheessa tarvittavat liuokset:

1. Wash Buffer I. Pesuliuos, jonka avulla peitinlasi saadaan irtoamaan aluslasista. Käytetään huoneenlämpöisenä, jolloin säilyy yhden päivän.
2. Wash Buffer II. Pesuliuos, jonka avulla saadaan pestyä koettimien ylimäärä pois. Liuos kaadetaan maljaan ja laitetaan +74 °C vesihauteeseen ja annetaan tasaantua 30 minuuttia. Tämän jälkeen liuos säilyy yhden päivän. (Abbot Laboratories. 2011.)



Kuvio 14. Ylimääräisten koettimien pesu.

Lopuksi näytelaseille lisättiin 10 µl DAPI:a eli fluoresoivaa taustaväriä ja laitettiin peitinlasit päälle. Tämän jälkeen lasit olivat valmiita mikroskoitavaksi.

8.2 Näytteiden analysointi

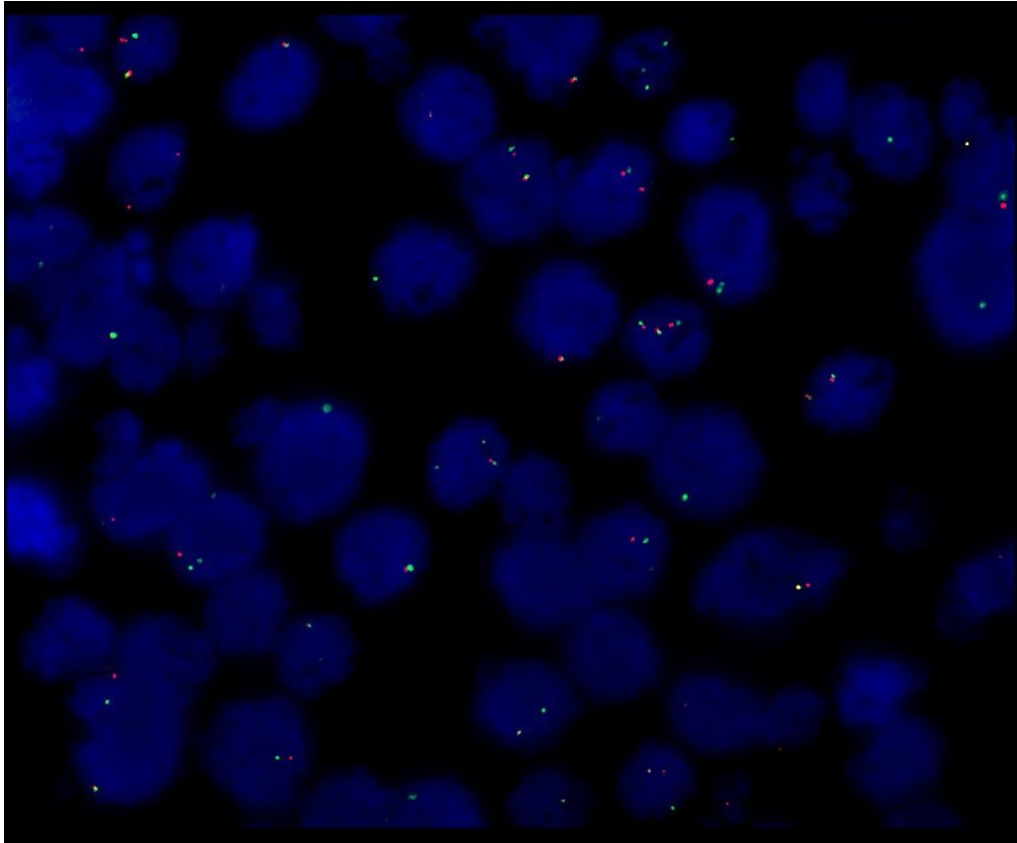
Näytteiden analysointi suoritettiin fluoresenssimikroskoopilla, jossa oli neljä eri suodattinta. Ensimmäisellä suodattimella katsottiin tuman rakenne DAPI:n avulla, toisella suodattimella katsottiin vihreät signaalit ja kolmannella suodattimella katsottiin oranssit signaalit. Neljäs suodatin oli yhdistelmäsuodatin, jonka avulla voitiin nähdä vihreä ja oranssi signaali samanaikaisesti. Tämän suodattimen avulla etsittiin näytteestä EML4-ALK-fuusio-onkogeenin aiheuttamaa split-signaalia, joka tarkistettiin vihreän ja oranssin suodattimien avulla.

Mikroskoipoimme ensin kaikki 31 FISH-näytelasia ja arvioimme olivatko ne onnistuneita. Kirjasimme ylös signaalien määrän, alustavan vastauksen ja muut huomiota herättäneet seikat. Tämän jälkeen ohjaajamme professori Sakari Knuutila mikroskopsi näytelasi ja kertoi niistä oman näkemyksensä. Lopuksi laskimme jokaisesta näytteestä 50 yksittäisen solun signaalit ja kirjasimme ne erilliselle vastauslomakkeelle (liite 1). Saimme HUSLABin keskuspatologian laboratoriosta vastaavien näytteiden immunohis-

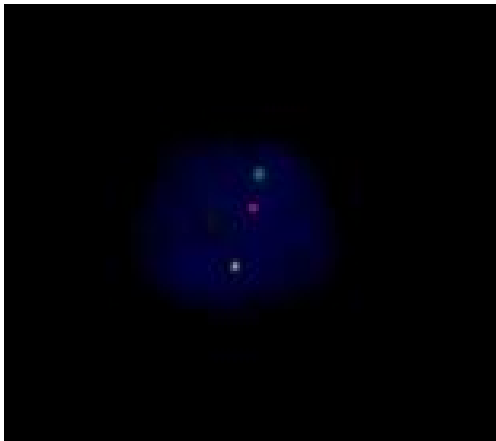
tokemian tulokset, joihin vertasimme FISH-menetelmän avulla saatuja tuloksia ja teimme yhteenvedon kaikkien näytteiden tuloksista (liite 2).

Mikroskopoidessamme FISH-valmisteita, vastaanme tuli muutama erikoisempi näyte, joissa signaalit poikkesivat työhöjeen antamista vaihtoehtoista. Analysoimme tällaiset tapaukset yhdessä ohjaajamme kanssa. Havainnollistaaksemme analysointituloksia valitsimme muutamia erilaisia näytelaseja, joista otimme kuvia opinnäytetyötämme varten. Jokaisen kuvan ottamiseen käytettiin kolmea eri suodatinta. Ensimmäisen suodattimen avulla kuvattiin tuman taustaväri, eli DAPI. Toisella suodattimella kuvattiin vihreä signaali ja kolmannella suodattimella kuvattiin oranssi signaali, joka näkyy kuvissa punaisena. Kuvioissa 15-17 on esitetty EML4-ALK-fuusio-onkogeenin suhteen positiiviset ja negatiiviset malliesimerkit sekä kuvioissa 18-21 vastaan tulleet erikoisemmat tapaukset.

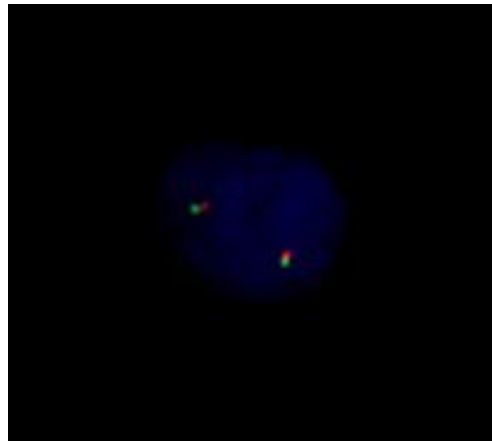
Kuviossa 18 on esitetty mahdollinen ALK-geenin translokaatio, sillä oranssi ja vihreä signaali ovat liian kaukana toisistaan ollakseen inversion kautta syntynyt EML4-ALK-fuusio-onkogeeni. Kuviossa 19 on jättisolun solu, joka sisältää useita signaaleja ja on merkki ALK-geenin monistumisesta. Meidän käyttämämme FISHin avulla ei voida sanoa, onko kyseessä koko kromosomin 2 tai jopa koko kromosomiston monistuminen. Kuviossa 20 on nähtävissä mahdollinen vihreän signaalin deleetio, sillä oranssille signaalille ei ole vastaavaa vihreää signaalia havaittavissa. Tämä ilmiö toistui suurimmassa osassa näytteen soluista. Kuviossa 21 on vastaavasti nähtävissä oranssin signaalin deleetio, joka myös toistui suurimassa osassa näytteen soluista.



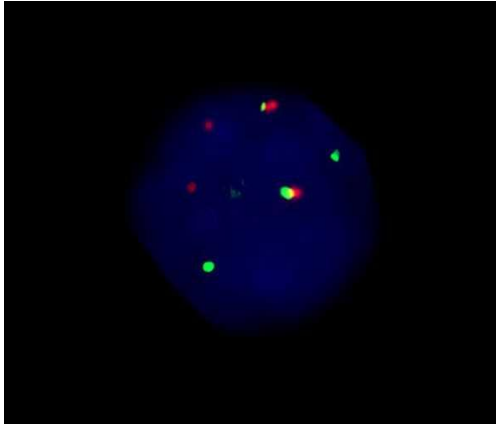
Kuvio 15. Yleisnäkymä EML4-ALK-positiivisesta FISH-valmisteesta.



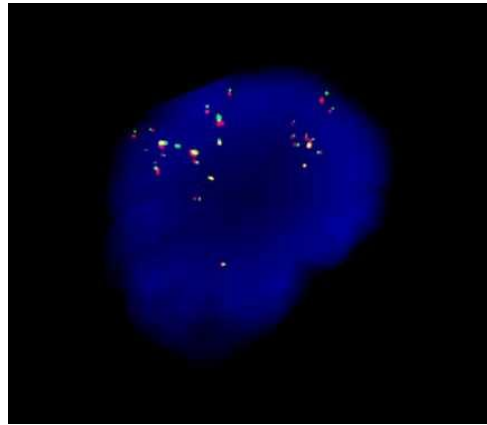
Kuvio 16. EML4-ALK-positiivinen solu.



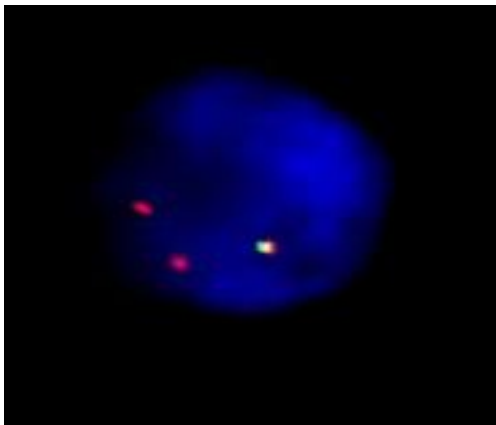
Kuvio 17. EML4-ALK-negatiivinen solu.



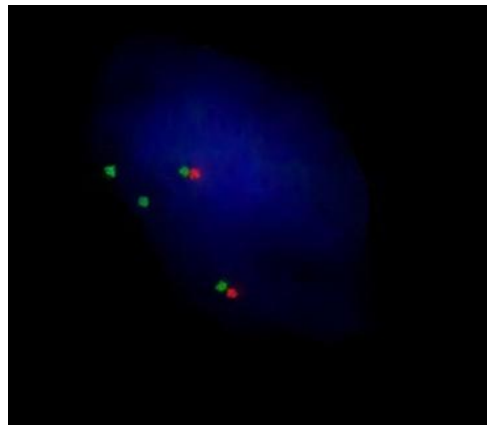
Kuvio 18. Mahdollinen ALK-geenin translokaatio.



Kuvio 19. Jättisolun.



Kuvio 20. Vihreän signaalin deleetio.



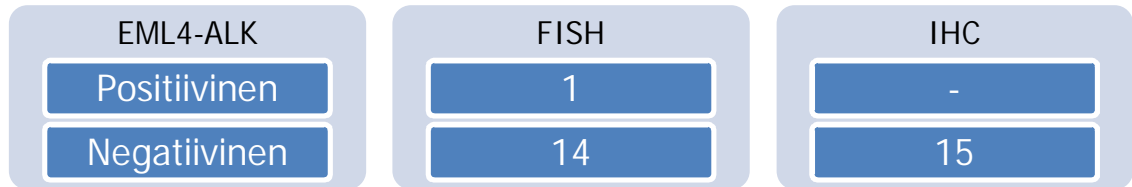
Kuvio 21. Oranssin signaalin deleetio.

9 Tulokset

Tässä luvussa tarkastellaan saatuja tuloksia. Opinnäytetyömme tarkoituksena oli vertailla, kuinka FISH-menetelmän avulla saadut tulokset vastaavat immunohistokemian avulla saatuja tuloksia, sekä arvioida FISH-menetelmän toimivuutta EML4-ALK-fuusio-onkogeneenin osoittamisessa uudella Vysis ALK Break Apart FISH Probe -reagenssipakkauksella tehtynä.

Teimme Vysis ALK Break Apart FISH Probe -reagenssipakkauksen avulla yhteensä 31 FISH-valmistetta, joista 15:stä tehtiin myös immunohistokemiallinen määrittäminen. Immu-

nohistokemiallisen tutkimuksen tekeminen EML4-ALK-fuusio-onkogeenin löytämiseksi päätettiin lopettaa kesken opinnäytetyömme, sillä sen todettiin olevan epäluotettava tutkimusmenetelmä. Tämä tuli ilmi, kun ensimmäinen FISH-menetelmän avulla saatu EML4-ALK-positiivinen tulos oli IHC-menetelmällä negatiivinen. Tästä johtuen vertailusamme oli mukana vain 15 näytettä, jotka on esitetty kuviossa 22.



Kuvio 22. FISH- ja IHC-menetelmien vertailutulokset.

Immunohistokemiallinen tutkimusmenetelmä ei ole EML4-ALK-fuusio-onkogeenin suhteen tarpeeksi spesifinen, sillä käytössä olevan vasta-aineen avulla ei pystytty osoittamaan positiivisessa näytteessä ollutta fuusio-onkogeeniä. Kokemuksiemme perusteella FISH-menetelmä on toimiva EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamisessa uudella reagenssipakkauksella tehtynä, sillä kaikki valmistamamme FISH-kontrollit ja -näytteet olivat analysoitavissa.

10 Työprosessin ja tulosten luotettavuuden arviointi

Työprosessin luotettavuuteen pyrittiin vaikuttamaan suunnittelemalla työvaiheet etukäteen sekä toimimalla kaikissa näissä vaiheissa työohjeiden mukaisesti. Opinnäytetyötä varten laaditut tutkimuskysymykset ja tavoitteet varmistivat, että toteutus vastaa juuri sitä, mitä on ollut tarkoitus tutkia.

Suoritimme ennen käytännön työn toteutusta perehtymisjakson, jolloin tutustuimme laboratorion tiloihin, tarvikkeisiin sekä työtappoihin. Harjoittelimme FISH-menetelmän suorittamista ohjaajan avustuksella, kunnes olimme saavuttaneet varmuuden työskennellä itsenäisesti. Tämä oli tärkeää, koska emme olleet aikaisemmin käyttäneet kyseistä menetelmää ja tehtävämme oli valmistaa opinnäytetyössämme analysoidut FISH-valmisteet itse. Pidimme laboratoriopäiväkirjaa (liite 3), johon merkitsimme tekemiemme kudosleikkeiden näytenumerot, työvaiheet ja tarvikkeet. Tarkoituksenamme oli

myös merkitä kaikki poikkeavuudet, mutta niitä ei työskentelymme aikana ilmennyt. Suoritimme työn niin, että sama henkilö teki kaikki työvaiheet alusta loppuun yhdelle näytesarjalle, minkä tarkoituksena oli minimoida käsialan aiheuttamat eroavaisuudet. Sisällyitimme jokaiseen näytesarjaan myös reagenssipakkauksen mukana tulleet positiivisen ja negatiivisen kontrollin, joiden avulla reagenssien toimivuus varmistettiin.

Luotettavuutta lisää se, että kokenut patologi valitsi edustavat kudokset FISH-valmisteita varten ja varmisti, että kudoksenäytteistä löytyy syöpäsolukkoa. Esikäsittelyssä käytetyt liuokset vaihdettiin työohjeessa annettujen väliaikojen mukaisesti ja lämpöhauteiden lämpötilat tarkistettiin erillisellä lämpömittarilla. Näiden toimenpiteiden avulla varmistettiin liuosten toimivuus. Jokaisen näyte-erän parafiinin sulatus- ja hybridisaatioajat olivat työohjeen määrittelemissä rajoissa ($22 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$), mikä vaikutti FISH-valmisteiden onnistumiseen. Olemme pyrkineet esittämään opinnäytetyön toteutuksen niin tarkasti, että se olisi toistettavissa raportin perusteella.

Tulosten luotettavuutta puoltaa, että jokaisen näytesarjan yhteydessä tehtiin sekä positiivinen että negatiivinen kontrolli. Kaikissa FISH-valmisteissa signaalit näkyivät hyvin ja niistä sai laskettua 50 solua. Opinnäytetyöhön valittu otoskoko on sen verran pieni, että tuloksia ei voitu tarkastella tilastollisin menetelmin eikä saamiamme tuloksia näin ollen voida yleistää. Otoskoko ei voitu kasvattaa opinnäytetyöhön annetun ajan rajallisuuden takia. Tämän vuoksi vastaavanlaisia tutkimuksia olisi tehtävä jatkossa lisää suuremmalla otoskolla.

11 Pohdinta

Keuhkosityöpöpotilaan ennuste on yleensä huono, minkä vuoksi on tarpeellista löytää ne potilaat, jotka hyötyisivät EML4-ALK-fuusio-onkogeneeniin suunnitellusta täsmälääkkeestä, Xalkorista. Tämän lääkkeen avulla on mahdollista lievittää potilaan oireita ja pidentää heidän elinikäänsä tilanteesta riippuen muutamasta kuukaudesta vuoteen. Lääke on vasta hyväksytty markkinoille, ja se ei kuulu vielä Suomessa korvattavan hoidon piiriin. Mikäli täsmälääke hyväksyttäisiin korvattavan hoidon piiriin, mielestämme jokainen hoidosta hyötyvä potilas ansaitsisi mahdollisuuden saada tätä hoitoa. Tämän vuoksi on tärkeää saada tietoa täsmälääkkeen tarpeellisuudesta korvauspäätöksiä tekeville

tahoille, mikä edellyttää myös EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamiseen käytettävien diagnosointimenetelmien tutkimista ja kehittämistä.

EML4-ALK-fuusio-onkogeeni on yksi adenokarsinoomaa aiheuttavista molekyyli- ja geenitaso tekijöistä, jonka diagnosointiin ei ole vielä vakiintunutta tutkimusmenetelmää. Tämän perusteella muodostimme seuraavat tutkimuskysymykset, joihin pyrimme saamaan luotettavat vastaukset.

1. Kuinka FISH-menetelmän avulla saadut tulokset vastaavat IHC-menetelmän avulla saatuja tuloksia EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamisessa adenokarsinooman diagnostiikassa?
2. Kuinka FISH-menetelmä toimii Vysis ALK Break Apart FISH Probe -reagenssipakkauksella tehtynä EML4-ALK-fuusio-onkogeeni osoittamisessa?

Aikaisempien tutkimuksien perusteella oletuksena oli, että FISH-tutkimusmenetelmä on immunohistokemiallista tutkimusmenetelmää luotettavampi. Saimme tekemistämme 31 FISH-valmisteesta yhden EML4-ALK-fuusio-onkogeenin suhteen positiivisen tuloksen, joka oli tulkittu IHC-menetelmällä negatiiviseksi. Tämän vuoksi EML4-ALK-fuusio-onkogeenin määrittäminen IHC-menetelmällä lopetettiin kesken opinnäytetyöprosessimme ja saimme vertailuun vain 15 näytettä. Näin ollen voimme todeta, että käytössä ollut IHC-menetelmä ei ollut riittävän luotettava EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamiseen, vaan uutta spesifisempää vasta-ainetta tulisi kehittää ja testata sen jälkeen uudestaan. Mikäli toimiva vasta-aine saataisiin kehitettyä, uskoisimme IHC-menetelmän olevan kustannustehokkaampi kuin FISH-menetelmä, sillä se on automatisoidumpi ja nopeampi. Tästä johtuen myös henkilökunnan palkkakulut olisivat pienempiä. Emme voineet vertailla tutkimusmenetelmissä käytettävien reagenssien hintoja, sillä emme saaneet niistä tarkkoja tietoja.

Yksi positiivinen löydös 31 näytteestä oli odotettavissa ollut tulos, sillä aikaisempien tutkimusten mukaan adenokarsinoomista vain noin 3-5 % ovat EML4-ALK-positiivisia. Omien kokemusiemme mukaan FISH-menetelmä on toimiva EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoituksessa uudella ALK-reagenssipakkauksella tehtynä, sillä kaikki tekemämme 31 näytettä sekä positiiviset ja negatiiviset kontrollit olivat analysoitavissa työohjeen mukaisesti. Kaikissa näytteissä signaalit olivat hyvin nähtävissä ja näin ollen

voidaan todeta, että denaturaatio ja hybridisaatio olivat onnistuneita. Näiden perusteella FISH-menetelmä ja -reagenssipakkaus ovat luotettavia ja ne voidaan mielestämme siirtää diagnostiikan puolelle. Tämän laajuisessa projektissa otoskoko on pidettävä melko pienenä, jotta työ saataisiin tehtyä sille annettujen resurssien puitteissa. Suuremman otoskoon avulla olisimme voineet saada vielä luotettavampaa tietoa EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamisesta kyseisellä reagenssipakkauksella.

Vaikka tarkoituksenamme oli etsiä ainoastaan EML4-ALK-fuusio-onkogeeniä, oli osassa näytteistä havaittavissa myös deleetion ja mahdollisesti translokaation myötä syntyneitä mutaatioita. Näiden kliinistä merkitystä ei pystytä arvioimaan FISH-menetelmän avulla, vaan näytteille tullaan tekemään syväsekventointi, jonka tulokset julkaistaan myöhemmin. FISH-menetelmän avulla ei ole myöskään mahdollista määrittää, mikä EML4-ALK-fuusio-onkogeenin variaatio on kyseessä, kuten PCR:n tai syväsekvensoinnin avulla. Eri variaatioiden kliinistä merkitystä syöpähoitojen kannalta ei kuitenkaan vielä tiedetä, joten ei ole varmuutta onko niiden selvittäminen ylipäätään tarpeellista.

Opinnäytetyömme oli osa CMG:n tutkijaryhmän käynnistämää suurempaa projektia, jossa etsitään eri menetelmien avulla ei-pienisoluista keuhkosyöpää aiheuttavia mutaatioita ja tutkitaan niiden vaikutusta potilaiden lääkehoitoon. Opinnäytetyöstämme saatiin suuntaa antavaa tietoa EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamiseen käytettävistä tutkimusmenetelmistä, joiden soveltuvuutta tulisi jatkossa tutkia lisää. Myös Xalkoritäsmälääkkeen tarpeellisuutta Suomessa olisi hyvä kartoittaa isomman otoskoon avulla, sillä tällä hetkellä ei ole tarkkaa tietoa, kuinka moni ei-pienisoluista keuhkosyöpää sairastavista potilaista hyötyisi lääkkeestä.

Opinnäytetyömme tavoitteena oli saada luotettavia tuloksia, joista olisi konkreettista hyötyä CMG:n tutkijaryhmälle. Esittelemme saadut tulokset tutkijaryhmän viikoittaisessa tapaamisessa marraskuussa 2011. Koimme opinnäytetyön tekemisen ja kansainvälisessä tutkijaryhmässä työskentelyn erittäin mielekkäänä ja innostavana. Saimme paljon uusia kokemuksia laboratoriotyöskentelystä ja erityisesti tutkimuslaboratorion työskentelytavoista, sillä emme olleet aikaisemmin toimineet osana tutkijaryhmää. Henkilökohtaisena tavoitteenamme oli työskennellä sujuvasti kansainvälisessä tutkijaryhmässä ja onnistuimmekin kehittämään niin englannin kielen taitoja kuin yhteistyö- ja vuorovaikutustaitoja. Opinnäytetyö oli hyvä oppimiskokemus, jonka myötä opimme käyttämään

lähdemateriaalia monipuolisesti ja kriittisesti, sekä hahmottamaan tutkimuksen tekemisen kokonaisuudessaan. Sisäistimme myös oman aiheemme perusteellisesti ja pääsimme hyödyntämään koulutuksen aikana saatua tietotaitoa sekä teorian että käytännön osuuden toteutuksessa.

Lähteet

- Aaltonen, Lauri A. 2002. Syövän genetiikka. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Leisti Jaakko (toim.): Perinnöllisyyslääketiede 2. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim. 197–212.
- Abbot Laboratories 2011. Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Käyttöohje. Päivitetty 27.9.2011. <http://www.abbottmolecular.com/static/cms_workspace/pdfs/US/Vysis_ALK_FISH_Probe_Kit_PI.pdf>. Luettu 10.10.2011.
- Buchwalow, Igor B. – Böcker, Werner 2010. Immunohistochemistry. Basics and Methods. Saksa: Springer.
- Chustecka, Zosia 2011. Crizotinib Coming Soon for ALK-Positive NSCLC. Verkkodokumentti. <<http://www.medscape.com/viewarticle/746217>>. Luettu 26.2.2011.
- Coleman, William B. – Tsongalis, Gregory J. 2006. Molecular Pathogenesis of Human Cancer. Teoksessa Coleman, William B. – Tsongalis, Gregory J. (toim.): Molecular Diagnostics. For the Clinical Laboratorian. 2nd Edition. New Jersey, USA: Humana Press Inc. 349–374.
- Elonen, Erkki – Elomaa, Inkeri 2007. Solunsalpaajahoito. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen, Mikko (toim.): Syöpätaudit 3. painos. Helsinki: Duodecim. 161–190.
- Franssila, Kaarle 2007. Syövän patologia. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen, Mikko (toim.): Syöpätaudit 3. painos. Helsinki: Duodecim. 82–94.
- Gartner, Leslie P. – Hiatt, James L. 2001. Color Textbook of Histology. 2nd Edition. USA: W.B. Saunders Company
- Heino, Jyrki – Vuento Matti 2002. Solubiologia 1. painos. Helsinki: WSOY.
- Hunt, John – Davydova, Larissa – Cartun, Richard W. – Baiulescu, Maria 2006. Immunohistochemistry. Teoksessa Coleman, William B. – Tsongalis, Gregory J. (toim.): Molecular Diagnostics for the Clinical Laboratorian. 2nd Edition. New Jersey: Humana Press Inc. 203–218.
- Isola, Jorma 2007. Syövän synty, kasvu ja leviäminen. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen, Mikko (toim.): Syöpätaudit 3. painos. Helsinki: Duodecim. 16–33.
- Jorde, Lynn B. – Carey, John C. – Bamshad, Michael J. – White, Raymond L. 2006. Medical Genetics 3rd Edition. Missouri: Mosby.

- Kallioniemi, Olli – Mäkelä, Tomi 2006. Syöpälääkkeiden haasteet ja näkymät. Lääketutkimus. Duodecim 2006; 122: 985–94.
- Kere, Juha 2002. Geenivirheet, geenisairaudet ja mutaatiodiagnostiikka. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Leisti Jaakko (toim.): Perinnöllisyyslääketiede 2. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim. 89–103.
- Kero, Mia 2011. Sairaalamikrobiologi. HUSLAB. Helsinki. Kirjallinen tiedonanto 5.10.2011.
- Knuutila, Sakari 2011. Professori. Helsinki. Suullinen tiedonanto 3.5.2011.
- Knuutila, Sakari 2002. Kromosomien rakenne ja toiminta. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Leisti Jaakko (toim.): Perinnöllisyyslääketiede 2. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim. 44–64.
- Knuutila, Aija 2005. Thoraxalueen kasvaimet. Teoksessa Kinnula, Vuokko – Brander, Pirkko E. – Tukiainen, Pentti (toim.): Keuhkosairaudet 3. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim. 569–596.
- Käypä hoito 2008. Keuhkosityöpä. Hoitosuositukset. Verkojulkaisu. < <http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suositukset/naytaartikkeli/tunnus/hoi06050?hakusana=keuhkosy%C3%B6p%C3%A4>>. Luettu 18.9.2011.
- Li, Yongjun – Ye, Xiaofen – Liu, Jinfeng – Zha, Jiping – Pei, Lin 2010. Evaluation of EML4-ALK Fusion Proteins in Non-Small Cell Lung Cancer Using Small Molecule Inhibitors. Neoplasia 2011. Vol 13/1. 1–11.
- Mali, Pekka – Ojala Antti – Salo Jarmo A. 2007. Keuhkosityöpä. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen, Mikko (toim.): Syöpätaudit 3. painos. Helsinki: Duodecim. 277-294.
- Mano, Hiroyuki 2007. Discovery and clinical application of the gene responsible for lung cancer. Verkkodokumentti. Päivitetty 16.8.2010. <<http://www.jst.go.jp/EN/seika/01/seika18.html>>. Luettu 24.10.2011.
- Min, Toon 2003. FISH Techniques. Teoksessa Swansbury, John (toim.): Cancer Cytogenetics. Methods and Protocols. New Jersey: Humana Press Inc. 193–212.

- Min, Toon – Swansbury, John 2003. Cytogenetic Studies Using FISH. Teoksessa Swansbury, John (toim.): Cancer Cytogenetics. Methods and Protocols. New Jersey: Humana Press Inc. 173–191.
- Orton, Susan 2005. Immunoassays and Nucleic Acid Probe Techniques. Teoksessa Bishop, Michael L. – Fody, Edward P. – Schoeff, Larry E. (toim.): Clinical Chemistry 5th edition. USA: Lippincott Williams & Wilkins. 145–167.
- Paasikivi, Riikka 2010. Oikea lääke oikealle potilaalle. Biomarkkerit vievät kohti täsmähoitoja. Kemia 8.
- Palmer, Ruth H – Vernersson, Emma – Grabbe, Carolina – Hallberg, Bengt 2009. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. Biochemical Journal vol. 402. 345–361.
- Pfizer 2010. Crizotinib (PF-02341066) Fact Sheet. Verkkodokumentti. <http://www.pfizer.com/files/news/asco/crizotinib_02341066_fact_sheet_2010.pdf>. Luettu 15.8.2011.
- Pfizer 2011. U.S. Food And Drug Administration Approves Pfizer’s XALKORI® (crizotinib) As First And Only Therapy Specifically For Patients With Locally Advanced Or Metastatic ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. Verkojulkaisu. <http://www.pfizer.com/news/press_releases/pfizer_press_releases.jsp#guid=20110826005815en&source=RSS_2011&page=2>. Luettu 20.9.2011.
- Read, Andrew – Donnai Dian 2007. New Clinical Genetics. Oxfordshire, UK: Scion Publishing Ltd.
- Sandberg, Avery A. – Meloni-Ehrig, Aurelia M. 2010. Cytogenetics and genetics of human cancer; methods and accomplishments. Cancer Genetics and Cytogenetics vol.203. 102–126.
- Sasaki, Takaaki – Rodig, Scott J. – Chirieac, Lucian R. – Jänne, Pasi A. 2010. The Biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. European Journal of Cancer. 46. 1773–1778
- Scheinin, Mika 2001. Lääkeaineiden vaikutusmekanismit, Reseptorit. Teoksessa Koulu, Markku – Tuomisto, Jouko (toim.): Farmakologia ja toksikologia 6. painos. Kuopio: Medicina. 27–66.
- Shaw, Alice T. – Yeap, Beow Y. – Mino-Kenudson, Mari – Digumarthy, Subba R. - Costa, Daniel B. – Heist, Rebecca S. – Solomon, Benjamin – Stubbs, Hannah – Ad-

mane, Sonal – McDermott, Ultan – Settleman, Jeffrey – Kobayashi, Susumu – Mark, Eugene J. – Rodig, Scott J. – Chirieac, Lucian R. – Kwak, Eunice L. – Lynch, Thomas J. – Iafrate, John A. 2009. Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK. *Journal of Clinical Oncology* vol 27. 4247–4253.

Skarin, Arthur J. – Blanco, Ramon 1996. Lung Cancer and Tumors of the Heart and Mediastinum. Teoksessa Skarin, Arthur J – Canellos, George P (toim.): *Atlas of Diagnostic Onkology* 2. painos. 63-110.

Soda, Manabu – Choi, Young Lim – Enomoto, Munehiro – Takada, Shuji – Yamashita, Yoshiro – Ishikawa, Shunpei – Fujiwara, Shin-ichiro – Watanabe, Hideki – Kurashina, Kentaro – Hatanaka, Hisashi – Bando, Masashi – Ohno, Shoji – Ishikawa, Yuichi – Aburatani, Hiroyuki – Niki, Toshira – Sohara, Yasunori – Sugiyama, Yukihiko – Mano, Hiroyuki 2007. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007. Vol 448/2. 561–565.

Solunetti 2006a. Histologia Keuhko. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/lunga/>>. Luettu 8.10.2011.

Solunetti 2006b. Histologia. Keuhkoputki. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/keuhkoputki/>>. Luettu 8.10.2011.

Souhami, Robert – Tobias, Jeffrey 2005. Cancer and its management. 5. painos. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.

Suominen, Ilari – Ollikka, Pauli 2004. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Helsinki: Opetushallitus.

Suominen, Ilari – Pärssinen, Raimo – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani 2010. Geeniteknikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Taskinen, Eero – Salmenkivi, Kaisa – Anttila, Sisko 2005. Keuhkopatologiaa. Teoksessa Kinnula, Vuokko – Brander, Pirkko E. – Tukiainen, Pentti (toim.): *Keuhkosairaudet* 3. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim. 93–134.

Ulmanen, Ismo – Tenhunen, Jukka – Yläne, Jari – Valste, Juha – Viitanen, Pertti 2001. *Biologia Geeni*. Helsinki: WSOY.

WHO 2010. Drug Information: International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances. Verkkodokumentti. <http://www.who.int/medicines/publications/druginformation/INN_PL103.pdf>. Luettu 15.9.2011.

Yi, Eunhee Y. – Boland, Jennifer M. – Maleszewski, Joseph J. – Roden, Anja C. – Oliveira, Andre M. – Aubry, Marie-Christine – Erickson-Johnson, Michele R. – Caron, Bolette L. – Li, Yan – Tang, Hui – Stoddard, Shawn – Wampfler, Jason – Kulig, Kimary – Yang, Ping 2011. Correlation of IHC and FISH for ALK Gene Rearrangement in Non-small Cell Lung Carcinoma. *Journal of Thoracic Oncology* 2011. Vol. 6/3. 459–465.

FISH-valmisteiden vastauslomake

Programme biomarqueurs émergents - translocation EML4-ALK
Version 1; November 2010

APPENDIX B

Pos. Control
30-505035
LOT: 432051
Exp: 2012-05-17

SPECIMEN ENUMERATION WORKSHEET

Patient Identification

INITIALS PATIENT # SITE # SPECIMEN #

ALK FISH Start Date: ___/___/20___ (dd/mm/yyyy)
Enumeration Date: 08/26/2011 (dd/mm/yyyy)

Is this a second enumeration for an equivocal slide? 1. No 2. Yes

Record the signal patterns of 50 Nuclei below.

Specimen Type: kontrolli pos.

Nuclei #	# paired signals	# single orange signals	# single green signals	Cell classification	Nuclei #	# paired signals	# single orange signals	# single green signals	cell classification
1	2	3	3	pos. +	26	2	4	4	pos. +
2	2	3	3	pos. +	27	2	3	3	pos. +
3	3	3	3	neg. -	28	1	2	2	pos. +
4	4	4	4	neg. -	29	2	3	3	pos. +
5	1	2	2	pos. +	30	4	4	4	neg. -
6	2	3	3	pos. +	31	3	3	3	neg. -
7	2	3	3	pos. +	32	2	3	3	pos. +
8	2	3	3	pos. +	33	2	3	3	pos. +
9	4	4	4	neg. -	34	3	4	4	pos. +
10	2	3	3	pos. +	35	2	2	2	neg. -
11	1	2	2	pos. +	36	4	4	4	neg. -
12	3	3	3	neg. -	37	4	4	4	neg. -
13	5	5	5	neg. -	38	2	3	3	pos. +
14	4	5	5	pos. +	39	3	4	4	pos. +
15	2	3	3	pos. +	40	2	3	3	pos. +
16	3	4	4	pos. +	41	2	2	2	neg. -
17	2	3	3	pos. +	42	2	3	3	pos. +
18	4	4	4	neg. -	43	3	4	4	pos. +
19	2	3	3	pos. +	44	4	4	4	neg. -
20	2	3	3	pos. +	45	3	3	3	neg. -
21	1	3	3	pos. +	46	2	3	3	pos. +
22	1	3	3	pos. +	47	2	3	3	pos. +
23	3	3	3	neg. -	48	2	3	3	pos. +
24	3	3	3	neg. -	49	3	3	3	neg. -
25	2	3	3	pos. +	50	3	3	3	neg. -

Total number of negative cells	18	Total number of paired signals	126
Total number of positive cells	32	Total number of single orange signals	161
		Total number of single green signals	161

INSTRUCTIONS TO INVESTIGATOR:

PLEASE SIGN THE BOTTOM OF THIS FORM AND RETURN THE WHITE AND YELLOW COPY TO ABBOTT MOLECULAR INC.

COMPLETED BY: Emmi Hokkanen DATE 16.08.2011 (MM/DD/YYYY)

CONFIDENTIAL MATERIAL - 10 -

This material is the property of Abbott Molecular and must not be disclosed or used except as authorized in writing by Abbott Molecular

Programme biomarqueurs émergents - translocation EML4-ALK
Version 1; November 2010

APPENDIX A

Slide Adequacy

PATIENT IDENTIFICATION

Patient Identification

INITIALS PATIENT # SITE # SPECIMEN#

SLIDE ADEQUACY

Please check the box that represents the slide quality.

Specimen type: _____

TESTING DATE: 26/08/2011 (MM/DD/YYYY)

<input checked="" type="checkbox"/>	Slide is Evaluable
<input type="checkbox"/>	Less Than 50 Enumerable Cells
<input type="checkbox"/>	Under Digestion
<input type="checkbox"/>	Over Digestion
<input type="checkbox"/>	Weak FISH Signals
<input type="checkbox"/>	No FISH Signals
<input type="checkbox"/>	Borders of Nuclei Not Distinguishable
<input type="checkbox"/>	Debris/High Background

INSTRUCTIONS TO INVESTIGATOR:

PLEASE SIGN THE BOTTOM OF THIS FORM AND RETURN THE WHITE AND YELLOW COPY TO ABBOTT MOLECULAR INC.

COMPLETED BY: Emmi Hokkanen DATE 26/08/2011 (MM/DD/YYYY)

CONFIDENTIAL MATERIAL 9

This material is the property of Abbott Molecular and must not be disclosed or used except as authorized in writing by Abbott Molecular

FISH- JA IHC- menetelmien avulla saadut EML4-ALK tulokset

Näytenro	EML4-ALK FISH	EML4-ALK IHC
1	Negatiivinen	Negatiivinen
2	Negatiivinen	Negatiivinen
3	Negatiivinen	Negatiivinen
4	Positiivinen	Negatiivinen
5	Negatiivinen	Negatiivinen
6	Negatiivinen	Negatiivinen
7	Negatiivinen	Negatiivinen
8	Negatiivinen	Negatiivinen
9	Negatiivinen	Negatiivinen
10	Negatiivinen	Negatiivinen
11	Negatiivinen	Negatiivinen
12	Negatiivinen	Negatiivinen
13	Negatiivinen	Negatiivinen
14	Negatiivinen	Negatiivinen
15	Negatiivinen	Negatiivinen
16	Negatiivinen	
17	Negatiivinen	
18	Negatiivinen	
19	Negatiivinen	
20	Negatiivinen	
21	Negatiivinen	
22	Negatiivinen	
23	Negatiivinen	
24	Negatiivinen	
25	Negatiivinen	
26	Negatiivinen	
27	Negatiivinen	
28	Negatiivinen	
29	Negatiivinen	
30	Negatiivinen	
31	Negatiivinen	

Laboratoriopäiväkirja

Maanantai 22.8.2011

- FISH-valmisteiden valmistaminen parafiinileikkeistä Vysis ALK Break Apart FFPE FISH Probe -reagenssipakkausta käyttäen.
 - Parafiinin sulatus ThermoBrite-uunissa 60 °C yön yli.
 - Näytesarjassa oli 7 näytettä sekä positiivinen ja negatiivinen kontrolli.
 - ALK Neg. Control, LOT: 430221, exp: 2012-02-22
 - ALK Pos. Control, LOT: 432051, exp: 2012-05-17
- Työskentely tapahtui Vysis ALK -kitin työohjeen mukaisesti.

Tiistai 23.8.2011

- FISH-valmisteiden teko jatkui 23 tunnin parafiinin sulatuksen jälkeen.
 - Näytelasien esikäsitteily jatkui parafiinin poistolla, jossa käytetään Vysis ALK -kitin omia sekä laboratorion erikseen tilaamia valmisteita: HemoDe 3x5min, EtOH 2x1min, Vysis Pretreatment Solution 12min, H₂O 3min, Vysis Protease Buffer 20min, H₂O 3min, 70% EtOH 1min, 85% 1min, 100% EtOH 1min
 - Näytelasit kuivataan ja niihin lisätään kitin sisältämää Hybridisaatio Probe Mix-valmistetta 10 mikrolitraa ja peitetään ne peitinlasilla.
 - Peitinlasi liimataan kiinni kumisementillä.
 - Lasit laitetaan ThermoBrite-uuniin denaturaatiota ja hybridisaatiota varten: denaturaatio 73°C 3min, hybridisaatio 37°C 14-24h.
 - HemoDe, LOT: 41310, exp: 31-04-2013, avattu: 15.6.2011
 - Vysis Pretreatment Solution, LOT: 0300C362, exp. 2011-12-02, avattu: 23.8.2011
 - Vysis Protease Buffer, LOT: 431121, exp: 2012-04-06, avattu: 23.8.2011

→Vysis Protease IV, LOT: 431084, exp: 2011-08-31, avattu. 23.8.2011

→Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart FFPE Probe, LOT: 427791, exp: 2012-10-08, avattu: 19.7.2011

- Työskentely tapahtui Vysis ALK -kitin työohjeen mukaisesti.

Keskiviikko 24.8.2011

- FISH-valmisteiden teko jatkui 21 tunnin hybridisaation jälkeen.
 - Näytelasit otettiin pois uunista ja poistettiin kumisilikoni peitinlasien päältä.
 - Lasit pestiin Vysis ALK-kitin omissa pesuliuksissa: Wash Buffer I 3-5min, 74°C Wash Buffer II 2min.
 - Lasit kuivataan pimeässä ja niihin lisätään 10 mikrolitraa DAPI I Counter Stain-valmistetta ja peitetään lasi peitinlasilla.
 - FISH-valmiste pakastetaan tai mikroskopoidaan heti fluoresenssimikroskopilla.

→Vysis Wash Buffer I, LOT: 431085, exp: 2012-04-05, avattu: 27.7.2011

→Vysis Wash Buffer II, LOT: 431394, exp: 2012-04-20, avattu: 27.7.2011

→Vysis DAPI I Counter Stain: LOT: 429415, exp: 2012-01-14, avattu: 19.7.2011

- Työskentely tapahtui Vysis ALK -kitin työohjeen mukaisesti.
- FISH-valmisteista etsittiin solujen split-signaaleja, joissa näkyy sekä vihreä, että oranssin signaali erillään keltaisen fuusiosignaalin lisäksi. Jos split-signaaleja on yli 50 %, on näyte EML4-ALK onkogeenin suhteen positiivinen, jos taas split-signaaleja oli alle 10 %, on näyte negatiivinen. Silloin kun split-signaaleja on nähtävillä 10–50%, on toisen henkilön myös laskettava näyte ja heidän keskiarvo jää tulokseksi. Jos keskiarvo jää alle 15 %, on näyte negatiivinen.
- Tulokset luettavissa erillisestä liitteestä.

Maanantai 29.8.2011

- FISH-valmisteiden valmistaminen parafiinileikkeistä Vysis ALK Break Apart FFPE FISH Probe -reagenssipakkausta käyttäen.
 - Parafiinin sulatus ThermoBrite-uunissa 60°C yön yli.
 - Näytesarjassa oli 8 näytettä sekä positiivinen ja negatiivinen kontrolli.
 - ALK Neg. Control, LOT: 430221, exp: 2012-02-22
 - ALK Pos. Control, LOT: 432051, exp: 2012-05-17
- Työskentely tapahtui Vysis ALK-kitin työohjeen mukaisesti.

Tiistai 30.8.2011

- FISH-valmisteiden teko jatkui 23 tunnin parafiinin sulatuksen jälkeen.
 - Näytelasien esikäsitteily jatkui parafiinin poistolla, jossa käytetään Vysis ALK -kitin omia sekä laboratorion erikseen tilaamia valmisteita: HemoDe 3x5min, EtOH 2x1min, Vysis Pretreatment Solution 12min, H₂O 3min, Vysis Protease Buffer 20min, H₂O 3min, 70% EtOH 1min, 85% 1min, 100% EtOH 1min
 - Näytelasit kuivataan ja niihin lisätään kitin sisältämää Hybridisaatio Probe Mix-valmistetta 10 mikrolitraa ja peitetään peitinlasilla.
 - Peitinlasi liimataan kiinni kumisementillä.
 - Lasit laitetaan ThermoBrite-uuniin denaturaatiota ja hybridisaatiota varten: denaturaatio 73°C 3min, hybridisaatio 37°C 14-24h.
 - HemoDe, LOT: 41310, exp: 31-04-2013, avattu: 15.6.2011
 - Vysis Pretreatment Solution, LOT: 0300C362, exp. 2011-12-02, avattu: 30.8.2011
 - Vysis Protease Buffer, LOT: 431121, exp: 2012-04-06, avattu: 30.8.2011
 - Vysis Protease IV, LOT: 431084, exp: 2011-08-31, avattu. 30.8.2011

→Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart FFPE Probe, LOT: 427791, exp: 2012-10-08, avattu: 23.8.2011

- Työskentely tapahtui Vysis ALK -kitin työohjeen mukaisesti.

Keskiviikko 31.8.2011

- FISH-valmisteiden teko jatkui 21 tunnin hybridisaation jälkeen.
 - Näytelasit otettiin pois uunista ja poistettiin kumisilikoni peitinlasien päältä.
 - Lasit pestiin Vysis ALK -kitin omissa pesuliuksissa: Wash Buffer I 3-5min, 74°C Wash Buffer II 2min.
 - Lasit kuivataan pimeässä ja niihin lisätään 10 mikrolitraa DAPI I Counter Stain-valmistetta ja peitetään lasi peitinlasilla.
 - FISH-valmiste pakastetaan tai mikroskopoidaan heti fluoresenssimikroskopilla.

→Vysis Wash Buffer I, LOT: 431085, exp: 2012-04-05, avattu: 27.7.2011

→Vysis Wash Buffer II, LOT: 431394, exp: 2012-04-20, avattu: 27.7.2011

→Vysis DAPI I Counter Stain: LOT: 429415, exp: 2012-01-14, avattu: 19.7.2011

- Työskentely tapahtui Vysis ALK -kitin työohjeen mukaisesti.
- FISH-valmisteista etsittiin solujen split-signaaleja, joissa näkyy sekä vihreä, että oranssi signaali erillään keltaisen fuusiosignaalin lisäksi. Jos split-signaaleja on yli 50 %, on näyte EML4-ALK onkogeenin suhteen positiivinen, jos taas split-signaaleja oli alle 10 %, on näyte negatiivinen. Silloin kun split-signaaleja on nähtävillä 10–50%, on toisen henkilön myös laskettava näyte ja heidän keskiarvo jää tulokseksi. Jos keskiarvo jää alle 15 %, on näyte negatiivinen.
- Tulokset luettavissa erillisestä liitteestä.

Maanantai 12.9.2011

- FISH-valmisteiden valmistaminen parafiinileikkeistä Vysis ALK Break Apart FFPE FISH Probe -reagenssipakkausta käyttäen.
 - Parafiinin sulatus ThermoBrite-uunissa 60°C yön yli.
 - Näytesarjassa oli 6 näytettä sekä positiivinen ja negatiivinen kontrolli.
 - ALK Neg. Control, LOT: 430221, exp: 2012-02-22
 - ALK Pos. Control, LOT: 432051, exp: 2012-05-17
- Työskentely tapahtui Vysis ALK -kitin työohjeen mukaisesti.

Tiistai 13.9.2011

- FISH-valmisteiden teko jatkui 23 tunnin parafiinin sulatuksen jälkeen.
 - Näytelasien esikäsitteily jatkui parafiinin poistolla, jossa käytetään Vysis ALK -kitin omia sekä laboratorion erikseen tilaamia valmisteita: HemoDe 3x5min, EtOH 2x1min, Vysis Pretreatment Solution 12min, H2O 3min, Vysis Protease Buffer 20min, H2O 3min, 70% EtOH 1min, 85% 1min, 100% EtOH 1min
 - Näytelasit kuivataan ja niihin lisätään kitin sisältämää Hybridisaatio Probe Mix-valmistetta 10 mikrolitraa ja peitetään peitinlasilla.
 - Peitinlasi liimataan kiinni kumisementillä.
 - Lasit laitetaan ThermoBrite-uuniin denaturaatiota ja hybridisaatiota varten: denaturaatio 73°C 3min, hybridisaatio 37°C 14-24h.
 - HemoDe, LOT: 41310, exp: 31-04-2013, avattu: 15.6.2011
 - Vysis Pretreatment Solution, LOT: 0300C362, exp. 2011-12-02, avattu: 13.9.2011
 - Vysis Protease Buffer, LOT: 431121, exp: 2012-04-06, avattu: 13.9.2011
 - Vysis Protease IV, LOT: 431084, exp: 2011-08-31, avattu. 13.9.2011

→Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart FFPE Probe, LOT: 427791, exp: 2012-10-08, avattu: 13.9.2011

- Työskentely tapahtui Vysis ALK -kitin työohjeen mukaisesti.

Keskiviikko 14.9.2011

- FISH-valmisteiden teko jatkui 21 tunnin hybridisaation jälkeen.
 - Näytelasit otettiin pois uunista ja poistettiin kumisilikoni peitinlasien päältä.
 - Lasit pestiin Vysis ALK-kitin omissa pesuliuksissa: Wash Buffer I 3-5min, 74°C Wash Buffer II 2min.
 - Lasit kuivataan pimeässä ja niihin lisätään 10 mikrolitraa DAPI I Counter Stain-valmistetta ja peitetään lasi peitinlasilla.
 - FISH-valmiste pakastetaan tai mikroskopoidaan heti fluoresenssimikroskopiolla.

→Vysis Wash Buffer I, LOT: 431085, exp: 2012-04-05, avattu: 27.7.2011

→Vysis Wash Buffer II, LOT: 431394, exp: 2012-04-20, avattu: 27.7.2011

→Vysis DAPI I Counter Stain: LOT: 429415, exp: 2012-01-14, avattu: 19.7.2011

- Työskentely tapahtui Vysis ALK -kitin työohjeen mukaisesti.
- FISH-valmisteista etsittiin solujen split-signaaleja, joissa näkyy sekä vihreä, että oranssi signaali erillään keltaisen fuusiosignaalin lisäksi. Jos split-signaaleja on yli 50 %, on näyte EML4-ALK onkogeenin suhteen positiivinen, jos taas split-signaaleja oli alle 10 %, on näyte negatiivinen. Silloin kun split-signaaleja on nähtävillä 10–50%, on toisen henkilön myös laskettava näyte ja heidän keskiarvo jää tulokseksi. Jos keskiarvo jää alle 15 %, on näyte negatiivinen.
- Tulokset luettavissa erillisestä liitteestä.

Maanantai 19.9.2011

- FISH-valmisteiden valmistaminen parafiinileikkeistä Vysis ALK Break Apart FFPE FISH Probe -reagenssipakkausta käyttäen.
 - Parafiinin sulatus ThermoBrite-uunissa 60°C yön yli.
 - Näytesarjassa oli 6 näytettä sekä positiivinen ja negatiivinen kontrolli.
 - ALK Neg. Control, LOT: 430221, exp: 2012-02-22
 - ALK Pos. Control, LOT: 432051, exp: 2012-05-17
- Työskentely tapahtui Vysis ALK -kitin työohjeen mukaisesti.

Tiistai 20.9.2011

- FISH-valmisteiden teko jatkui 23 tunnin parafiinin sulatuksen jälkeen.
 - Näytelasien esikäsitteily jatkui parafiinin poistolla, jossa käytetään Vysis ALK -kitin omia sekä laboratorion erikseen tilaamia valmisteita: HemoDe 3x5min, EtOH 2x1min, Vysis Pretreatment Solution 12min, H2O 3min, Vysis Protease Buffer 20min, H2O 3min, 70% EtOH 1min, 85% 1min, 100% EtOH 1min
 - Näytelasit kuivataan ja niihin lisätään kitin sisältämää Hybridisaatio Probe Mix-valmistetta 10 mikrolitraa ja peitetään peitinlasilla.
 - Peitinlasi liimataan kiinni kumisementillä.
 - Lasit laitetaan ThermoBrite-uuniin denaturaatiota ja hybridisaatiota varten: denaturaatio 73°C 3min, hybridisaatio 37°C 14-24h.
 - HemoDe, LOT: 41310, exp: 31-04-2013, avattu: 15.6.2011
 - Vysis Pretreatment Solution, LOT: 0300C362, exp. 2011-12-02, avattu: 20.9.2011
 - Vysis Protease Buffer, LOT: 431121, exp: 2012-04-06, avattu: 20.9.2011
 - Vysis Protease IV, LOT: 431084, exp: 2011-08-31, avattu. 20.9.2011

→Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart FFPE Probe, LOT: 427791, exp: 2012-10-08, avattu: 13.9.2011

- Työskentely tapahtui Vysis ALK -kitin työohjeen mukaisesti.

Keskiviikko 21.9.2011

- FISH-valmisteiden teko jatkui 21 tunnin hybridisaation jälkeen.
 - Näytelasit otettiin pois uunista ja poistettiin kumisilikoni peitinlasien päältä.
 - Lasit pestiin Vysis ALK-kitin omissa pesuliuksissa: Wash Buffer I 3-5min, 74°C Wash Buffer II 2min.
 - Lasit kuivataan pimeässä ja niihin lisätään 10 mikrolitraa DAPI I Counter Stain-valmistetta ja peitetään lasi peitinlasilla.
 - FISH-valmiste pakastetaan tai mikroskopoidaan heti fluoresenssimikroskopilla.

→Vysis Wash Buffer I, LOT: 431085, exp: 2012-04-05, avattu: 21.9.2011

→Vysis Wash Buffer II, LOT: 431394, exp: 2012-04-20, avattu: 21.9.2011

→Vysis DAPI I Counter Stain: LOT: 429415, exp: 2012-01-14, avattu: 21.9.2011

- Työskentely tapahtui Vysis ALK -kitin työohjeen mukaisesti.
- FISH-valmisteista etsittiin solujen split-signaaleja, joissa näkyy sekä vihreä, että oranssi signaali erillään keltaisen fuusiosignaalin lisäksi. Jos split-signaaleja on yli 50 %, on näyte EML4-ALK onkogeenin suhteen positiivinen, jos taas split-signaaleja oli alle 10 %, on näyte negatiivinen. Silloin kun split-signaaleja on nähtävillä 10–50%, on toisen henkilön myös laskettava näyte ja heidän keskiarvo jää tulokseksi. Jos keskiarvo jää alle 15 %, on näyte negatiivinen.
- Tulokset luettavissa erillisestä liitteestä.