



METADHERIN-GEENIN ILMENTYMINEN HAAVAKUDOKSESSA

Kristiina Lindroos

Opinnäytetyö
Joulukuu 2011
Laboratorioalan koulutusohjelma
Tampereen ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

LINDROOS, KRISTIINA:
Metadherin-geenin ilmentyminen haavakudoksessa

Opinnäytetyö 51 s., liitteet 4 s.
Joulukuu 2011

Metadherin (MTDH) -geeni ilmentyy kaikissa normaaleissa kudoksissa. Geeniä on tutkittu aikaisemmin lähinnä eri syöpäsairauksissa. Näissä tutkimuksissa geenin on havaittu yli-ilmentyvän syöpäkasvaimissa ja geenin koodaaman proteiinin, metadheriinin, stimuloivan muun muassa angiogeneesiä ja solujen migraatiota kasvaimissa useiden solusignaalintireittien kautta. Angiogeneesi eli uusien kapillaarisuonien muodostuminen haavanpohjaan on edellytys haavan paranemiselle. Solujen migraatio puolestaan on keskeinen tekijä haavan sulkeutumisessa.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia *MTDH*-geenin ilmentymistä haavakudoksessa mRNA- ja proteiinitasolla koe-eläinmallien avulla. Tutkimusmenetelminä käytettiin reaaliaikaista kvantitatiivista polymeraasiketjureaktiota sekä immunohistokemiaa. Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston lääketieteen yksikössä LT, dosentti Tero Järvisen toimeksiannosta. Tutkimuksen tavoitteena oli saada informaatiota *MTDH*-geenin ilmentymisestä haavakudoksessa ja haavan paranemisen aikana.

Proteiinitasolla *MTDH*-geenin ilmentyminen oli voimakkainta viidennen, seitsemän ja kymmenennen päivän haavakudoksessa. Ilmentyminen oli voimakasta epidermiksessä, granulaatiokudoksessa ja muodostuvissa kapillaarisuonissa. Myös normaalissa ihokudoksessa geeni ilmentyi epidermiksessä, etenkin karvatupissa. Lähetti-RNA-tasolla geenin ilmentymisessä ei havaittu suurta eroa haavakudoksen ja normaalin ihokudoksen välillä.

Tutkimustulokset immunohistokemian osalta viittaavat siihen, että *MTDH*-geeni osallistuu angiogeneesin säätelyyn myös haavan paranemisprosessissa. Kvantitatiivisessa PCR:ssa havaittiin ongelmia, minkä vuoksi tutkimustuloksia sen osalta ei voida pitää täysin luotettavina. Tulevaisuudessa *MTDH*-geenin osuutta angiogeneesin ja solujen migraation säätelyssä haavakudoksessa halutaan tutkia tarkemmin geenisiirtojen avulla.

Avainsanat: *Metadherin (MTDH)*, immunohistokemia, reaaliaikainen kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio, haava, angiogeneesi, epitelisaatio.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Science

LINDROOS, KRISTIINA:
Expression of *Metadherin* in Wound Tissue

Bachelor's thesis 51 pages, appendices 4 pages
December 2011

Metadherin (MTDH) is a gene that is expressed in all normal tissues. Previously it has been detected that *MTDH* is over-expressed in various cancers. The protein coded by the gene is involved in regulating several cell signaling pathways and has been shown to regulate e.g. angiogenesis and cell migration in tumors. Angiogenesis is a vital process for wound healing, as migration is a key factor for closure of the wound.

The purpose of this study was to examine the expression of *MTDH* in wound tissue. The gene expression was studied both in mRNA and protein levels using real-time quantitative polymerase chain reaction and immunohistochemistry as research methods. This study was performed for MD, docent Tero Järvinen at the School of Medicine in the University of Tampere. The objective of this study was to gather information about the expression of *MTDH* during wound healing.

In the protein level, gene expression was strong in five, seven and ten days post injury. *Metadherin* was strongly expressed in the sprouting angiogenesis, granulation tissue and proliferating epidermis. Gene expression was also detected in normal tissue, particularly in the hair follicle. In the mRNA level, the difference in gene expression between normal tissue and wound tissue was not as great as expected.

The results obtained by immunohistochemistry indicated that *MTDH* takes part in regulating angiogenesis in wound healing. Problems with the real-time quantitative polymerase chain reaction affected the reliability of the results in that part. In the future, there are plans to study more closely the role of *MTDH* in regulating angiogenesis and cell migration in wound tissue by using gene transfers.

Key words: *Metadherin (MTDH)*, immunohistochemistry, real-time quantitative polymerase chain reaction, wound, angiogenesis, epithelization.

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	6
2 KUDOSVAURIO JA HAAVA	7
3 METADHERIN	12
4 REAALIAIKAINEN KVANTITATIIVINEN POLYMERAASIKETJUREAKTIO ..	14
4.1 Detektointikemiat.....	17
4.2 Tulosten analysointi reaaliaikaisessa kvantitatiivisessa polyme- raasiketju- reaktiossa	20
4.2.1 Normalisointi	20
4.2.2 Monistuskäyrä, kynnystaso ja kynnysyksi	21
4.2.3 Laimennossarja ja tehokkuus	23
4.2.4 Sulamiskäyräanalyysi	24
5 IMMUNOHISTOKEMIA	27
5.1 Vasta-aineet	27
5.2 Leimat.....	29
5.2.1 Entsymaattiset leimat.....	29
5.2.2 Fluoresoivat leimat	30
5.3 Immunohistokemiallinen prosessi.....	30
5.3.1 Fiksaatio	30
5.3.2 Prosessointi ja leikkaaminen.....	31
5.3.3 Värjäys.....	32
6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	34
6.1 Näytteet ja niiden käsittely.....	34
6.2 Geenin ilmentymisen tutkiminen reaaliaikaisen kvantitatiivisen polyme- raasiketjureaktion avulla.....	34
6.3 Geenin ilmentymisen tutkiminen immunohistokemian avulla.....	36
7 TUTKIMUSTULOKSET	38

7.1 <i>Metadherin</i> -geenin ilmentyminen mRNA-tasolla	38
7.2 <i>Metadherin</i> -geenin ilmentyminen proteiinitasolla.....	38
8 POHDINTA	41
LÄHTEET	43
LIITTEET.....	47

1 JOHDANTO

Haava on usein jonkin ulkoisen tekijän aiheuttama kudonvaurio ihossa tai ihonalaiskudoksessa. Haavan paraneminen on monimutkainen biologinen prosessi, johon osallistuu useita elimistön solutyyppisiä ja proteiineja. *Metadherin* (*MTDH*) on geeni, jonka ilmentymistä ja sen koodaaman proteiinin, metadheriinin, toimintaa on tutkittu aiemmin lähinnä eri syöpäsairauksissa.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää *MTDH*-geenin ilmentymistä haavakudoksessa ja haavan paranemisessa koe-eläinmallien avulla. Geenin ilmentymistä tutkittiin lähetti-RNA- eli mRNA-tasolla reaaliaikaisen kvantitatiivisen polymeerasiketjureaktion avulla sekä proteiinitasolla immunohistokemian avulla. Opinnäytetyö tehtiin syksyllä 2011 Tampereen yliopiston lääketieteen yksikössä LT, dosentti Tero Järvisen toimeksiannosta.

Tavoitteena oli saada informaatiota *MTDH*-geenin ilmentymisestä haavakudoksessa ja haavan paranemisen aikana. Aihe on kiinnostava, koska aikaisempien syöpäsairauksiin liittyvien tutkimustulosten perusteella voidaan olettaa metadheriinin osallistuvan myös haavan paranemisprosessiin säätelyyn. Tutkimuksen alussa hypoteesi oli, että *metadherin* ilmentyy voimakkaimmin viidennen ja seitsemännen päivän haavakudoksessa. Opinnäytetyössä saatuja tuloksia voidaan käyttää osana tieteellistä artikkelia.

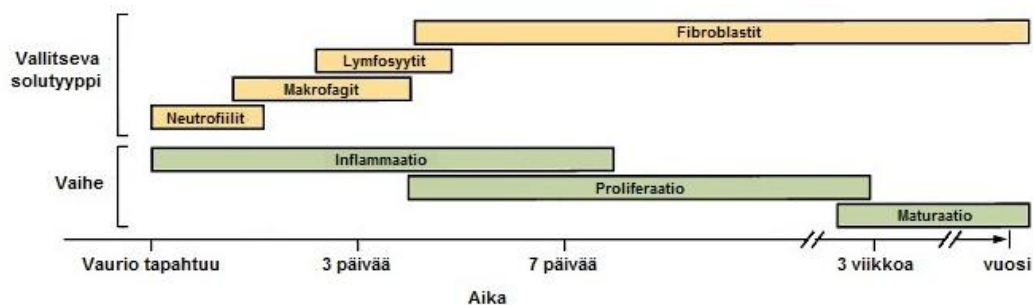
2 KUDOSVAURIO JA HAAVA

Ihon kudonvauriot eli haavat voidaan jakaa niiden aiheuttajan, paranemisprosessin ja iän perusteella akuutteihin ja kroonisiin haavoihin. Akuutti haava syntyy joko trauman tai leikkauksen seurauksena ja krooninen haava yleensä sairauden seurauksena. Akuutti haava voi muuttua krooniseksi infektion seurauksena. Pinnallisessa haavassa (vasemmalla kuviossa 1) vain ihon uloin kerros (epidermis eli orvaskesi) on vaurioitunut. Tällaisissa pinnallisissa ihovaurioissa iho paranee yleensä täydellisesti. Syvä haava (oikealla kuviossa 1) ulottuu ihonalaiskudokseen (subcutis) saakka tai syvemmällekin. (Hietanen, Iivanainen, Seppänen & Juutilainen 2002, 11, 17, 19, 22; Saarelma 2011)



KUVIO 1. Kaaviokuva pinnallisesta ja syvästä haavasta (mukaiillen Hietanen ym. 2002,17)

Haavan paranemiseen osallistuu liukoisia peptidivälittäjäaineita eli sytokiineja, verisoluja, parenkymaalisia soluja ja soluväliaine. Haavan paranemisessa voidaan erottaa kolme selkeästi tunnistettavaa vaihetta, jotka ovat osin päällekkäisiä ja toisistaan riippuvaisia. Nämä vaiheet ovat inflammaatio- eli tulehdusvaihe, proliferaatio- eli uudelleenmuodostusvaihe ja maturaatio- eli kypsymisvaihe. (Singer & Clark 1999, 738; Hietanen ym. 2002, 28; Vaalasti 2002, 33.) Haavan paranemisen vaiheet ja kulloinkin vallitsevat solutyypit on esitetty kuviossa 2 sivulla 8.



KUVIO 2. Haavan paranemisen vaiheet ja vallitsevat solutyyppit (mukaillen Galiano & Mustoe 2010)

Elimistön ensimmäinen reaktio kudonvauriolle on inflammaatiovaihe, jonka ensisijaisena tarkoituksena on puhdistaa haava kuolleista soluista, soluväliaineesta sekä mahdollisista infektion aiheuttajista ja siten suojella elimistöä lisävaurioilta (Hietanen ym. 2002, 28). Inflammaatiovaiheen alussa tapahtuu hemostaasi, eli verenvuodon tyrehtyminen. Hemostaasin saa aikaan vaurioituneiden verisuonten supistuminen, verihiihaleetulan muodostuminen ja veren hyytyminen. Vaurion tapahduttua verisuonet haavan ympäristössä supistuvat, jolloin verenhukka vähenee. Veri pääsee haavassa kosketuksiin paljastuneen sidekudoksen, kuten kollageenin, kanssa, mikä aktivoi veren hyytymistä. Aktivoidut verihiihaleet kerääntyvät verisuonten vauriokohtiin ja muodostavat yhdessä veren hyytymisjärjestelmän kanssa tilapäisen tulpan. (Hietanen ym. 2002, 28; Kallio 2007, 617–619.)

Verisuonten supistuminen kestää 10–15 minuuttia, minkä jälkeen verisuonet laajenevat ja verenkierto haavassa lisääntyy. Verisuonten laajenemisen saa aikaan vaurioituneesta kudoksesta vapautuneet välittäjäaineet, etenkin histamiini. Verisuonten laajenemisen seurauksena haavan ympäristössä havaitaan tyypillisiä tulehduksen merkkejä, kuten punoitusta, kuumotusta ja turvotusta. (Hietanen ym. 2002, 30; Monaco & Lawrence 2003, 3.)

Hyytymisen edetessä aktivoituneiden verihiihaleiden granuloista vapautuu biologisesti aktiivisia aineita ja kasvutekijöitä, kuten verihiihaleperäinen kasvutekijä (platelet-derived growth factor, PDGF), transformoiva kasvutekijä β (transforming growth factor, TGF- β) sekä epidermaaliset kasvutekijät (epidermal growth factor, EGF) ja insuliininkaltaiset kasvutekijät (insulin-like growth factor, IGF).

Ne toimivat kemotaksisina välittäjäaineina veren tulehdusoluille ja stimuloivat muun muassa solujen proliferaatiota, migraatiota ja proteiinisynteesiä. Verisuonten supistuessa haavan ympäristössä verenvuoto vähenee ja muodostunut hyytymä vahvistuu. Veren hyytyessä veressä normaalisti olevasta fibrinogeenistä muodostuu fibriiniverkko. Hyytymisketjun seurauksena muodostuu haavan väliaikaisesti sulkeva rupi, joka koostuu pääasiassa verihiutaleista ja fibriinistä. (Hietanen ym. 2002, 30; Baum & Arpey 2005, 674–675; Galiano & Mustoe 2010.)

Muutaman tunnin kuluessa vaurion syntymisestä kemialliset välittäjäaineet aikaansaavat polymorfonukleaaristen leukosyyttien (neutrofiilit ja monosyytit) siirtymisen kapillaareista haavalle. Inflammatoriset leukosyytit (neutrofiilit, makrofagit ja lymfosyytit) puhdistavat haavanpohjaa bakteereista ja kuolleesta kudoksesta. Ensimmäisenä haavaan tulevat neutrofiilit. Tuumorinekroositekijää α (tumor necrosis factor α , TNF- α) pidetään neutrofiilien kiinnittymisen ja aktivaation päätekijänä. (Hietanen ym. 2002, 30; Galiano & Mustoe 2010.)

Noin kahden päivän kuluessa vaurion syntymisestä haavaan tulevat monosyytit, jotka erilaistuvat kudoksessa makrofageiksi. Makrofagien tehtävä on suojella haavaa tuhoten kuollutta kudosta, bakteereja ja haavaan joutuneita vieraita aineita. Makrofagit myös syntetisoivat ja erittävät yli 30 erilaista kasvutekijää ja sytokiinia, kuten fibroblastikasvutekijät (fibroblast growth factor, FGF), EGF ja TGF. Ne stimuloivat muun muassa fibroblastisolujen proliferaatiota, angiogeneesia, sidekudoksen tuotantoa ja aktivoivat uusia makrofagisoluja. Tässä vaiheessa makrofagien osuus haavan paranemiselle on tärkein, koska haavan paranemisen eteneminen edellyttää haavanpohjan puhdistumista. Haavan paraneminen häiriintyy vakavasti, jos makrofagien toiminta estetään esimerkiksi steroideilla tai vasta-aineilla. Makrofagien myötä haavaan tulee myös lymfosyyttejä, jotka aktivoivat makrofagien toimintaa. Lymfosyyttien osuutta haavan paranemiseen ei tunneta täysin, mutta niillä ei uskota olevan ratkaisevaa vaikutusta akuutin haavan paranemisessa. (Hietanen ym. 2002, 30–31; Galiano & Mustoe 2010.)

Proliferaatiovaiheessa muodostuu granulaatiokudosta, tapahtuu epitelisaatio, eli epiteelin yhteenkasvaminen ja granulaatiokudoksen kontraktio, eli haavan reunojen lähentyminen. Proliferaatiovaiheessa vallitsevina soluina haavassa ovat fibroblastit, jotka pystyvät toimimaan vähähappisessa ympäristössä. Fibroblastit tulevat haavalle toisena päivänä vaurion tapahtumisesta, jakautuvat ja kulkeutuvat haavan reunoilta kohti sen keskustaa sitä mukaa, kun uudet verisuonet kasvavat haavanpohjaan. Uusien verisuonten kasvu eli angiogeneesi edellyttää makrofagien toimintaa, koska ne vapauttavat angiogeneesiä aktivoivia kasvutekijöitä, tärkeimpinä verisuonen endoteelin kasvutekijät (vascular endothelial growth factor, VEGF), FGF ja TGF- β . Haavanpohjassa aluksi vallitseva hapen ja ravinteiden puute korjaantuu, kun haavanpohjaan muodostuu kapillaarisuonia. (Hietanen ym. 2002, 31; Baum & Arpey 2005, 679.)

Granulaatiokudos eli jyväiskudos muodostuu uusista kapillaarisuonista, kollageenisäikeistä, fibroblasteista, leukosyyteistä ja sidekudoksesta (Hietanen ym. 2002, 31). Granulaatiokudoksessa on myös makrofageja, jotka tuottavat verisuonten ja sidekudoksen muodostumista stimuloivia kasvutekijöitä. Granulaatiokudoksen muodostuminen alkaa noin neljän päivän kuluttua vaurion syntymisestä. (Singer & Clark 1999, 740.) Fibroblastien syntetisoimaa kollageenia alkaa muodostua jo toisena päivänä haavan synnystä. Aluksi muodostuu tyypin III kollageenia, joka myöhemmin korvautuu ihon vallitsevalla tyypin I kollageenilla. Tyypin I kollageeni antaa haavalle sen vetolujuuden. Kollageenisäikeet ovat aluksi geelimäisiä ja joustavia, mutta säikeiden vetolujuus kasvaa vähitellen tyypin I kollageenin määrän lisääntyessä ja kollageenisäikeiden välille muodostuvien siltojen ansiosta. Proliferaatiovaiheen lopussa haavan vetolujuus on noin 25 % normaalin vahingoittumattoman ihon vetolujuudesta. (Hietanen ym. 2002, 31–32.)

Epitelisaatiossa ruven alle kasvaa uusi epiteeli. Epitelisaatio alkaa muutaman tunnin kuluessa haavan syntymisestä. Pinnallisissa haavoissa uusi epiteeli kasvaa tyvikalvon päälle myös haavan keskeltä. Jos tyvikalvo on rikkoutunut, uusi epiteeli kasvaa vain haavan reunoilta pääasiassa fibriinistä ja fibronektiinistä muodostuvan väliaikaisen soluväliaineen päälle. Epiteeli kasvaa noin 0,2 mm päivässä, kunnes epiteelisolukot yhdistyvät. Epiteelisolujen migraatio edellyttää

soluväliaineen pilkkoutumista, jota säätelee erilaiset soluväliaineen metalliproteinaasit (MMP). Eitelisaatiota sääteleviä kasvutekijöitä ovat muun muassa FGF ja EGF. (Singer & Clark 1999, 739–740; Hietanen ym. 2002, 32; Monaco & Lawrence 2003, 6; Baum & Arpey 2005, 680.)

Kontraktiossa ympäröivä iho kuroutuu pienentäen haavan pinta-alaa. Kontraktio tapahtuu yhtä aikaa eitelisaation kanssa ja alkaa noin viikon kuluessa haavan syntymisestä. (Hietanen ym. 2002, 32.) Kontraktio on soluvälitteinen prosessi, jonka saa aikaan fibroblasteista erilaistuneet myofibroblastit. Kontraktiota säätelee muun muassa kasvutekijä TGF- β . (Monaco & Lawrence 2003, 8.)

Maturaatiovaihe alkaa noin kolmen viikon kuluessa haavan syntymisestä. Se kestää useita kuukausia, jopa vuosia. Maturaatiovaiheessa väliaikainen soluväliaine korvautuu lopullisesti tyypin I kollageenilla ja kollageenisäikeiden välille muodostuu siltoja, jolloin sidekudoksen rakenne kiinteytyy ja vahvistuu. Tapahumaa säätelevät erilaiset metalloproteinaasit. Arpikudos saavuttaa maturaatiovaiheen aikana lopullisen vetolujuutensa, joka on noin 70 % normaalin ihon vetolujuudesta. (Hietanen ym. 2002, 32; Monaco & Lawrence 2003, 8–9; Baum & Arpey 2005, 682.) Taulukkoon 1 on koottu haavan paranemiseen oleellisesti vaikuttavia kasvutekijöitä ja niiden pääasialliset vaikutuskohteet.

TAULUKKO 1. Haavan paranemiseen vaikuttavia kasvutekijöitä (mukaillen Vaalasti 2002, 34)

Kasvutekijä	Vaikutuskohde
Verihiutalekasvutekijä (PDGF)	Neutrofiilien, monosyyttien ja fibroblastien migraatio, fibroblastien proliferaatio
Transformoiva kasvutekijä β (TGF- β)	Kemotaksis, sidekudoksen muodostuminen
Sidekudoskasvutekijä (CTGF)	Fibroblastien migraatio ja proliferaatio, angiogeneesi
Epidermaalinen kasvutekijä (EGF)	Keratinosyyttien, fibroblastien ja endoteelisolujen proliferaatio, keratinosyyttien migraatio
Insuliinin kaltainen kasvutekijä (IGF)	Eitelisaatio
Tuumorinekroositekijä α (TNF- α)	Neutrofiilien aktivaatio
Fibroblastikasvutekijä (FGF)	Solujen migraatio ja proliferaatio
Verisuonen endoteelin kasvutekijä (VEGF)	Angiogeneesi
Metalloproteinaasit (MMP)	Soluväliaineen muokkaus

3 METADHERIN

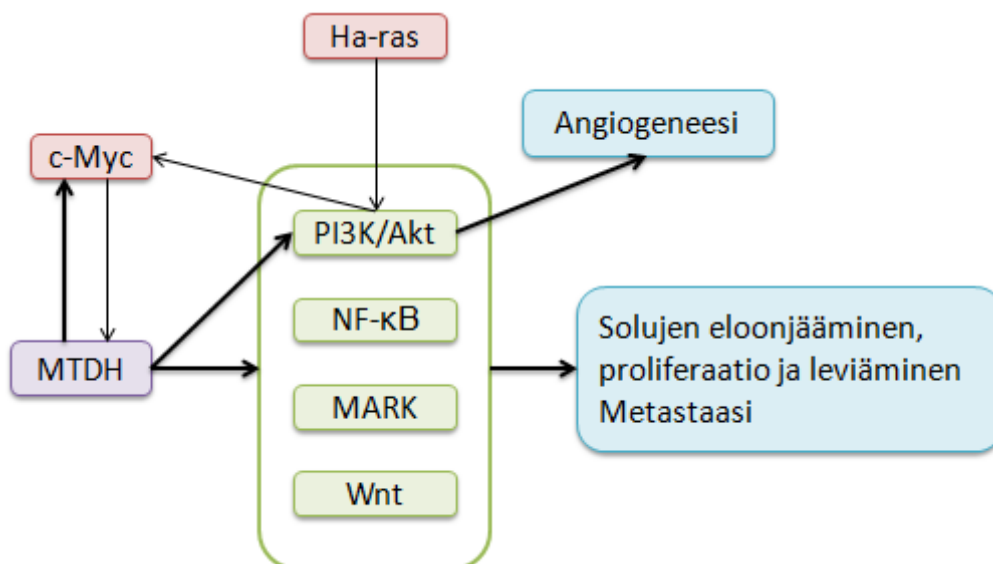
Metadherin (MTDH) -geeni sijaitsee ihmisellä kromosomissa 8q22. Geeni tunnetaan myös nimillä AEG-1 (astrocyte elevated gene), LYRIC ja 3D3. *MTDH*-geenin koko on 86 kiloemäsparia (kb). Se sisältää 11 intronia ja 12 koodaavaa eksonia. (Kang ym. 2005, 10; UCSC Genome Browser 2009; National Center for Biotechnology Information 2011.) *MTDH*-geeni koodaa 582 aminohapon pituista proteiinia, jonka laskettu molekyylimassa on 64 kDa. (Kang ym. 2005, 10; UniProt 2011.)

Metadherin-geeni tunnistettiin alun perin sikiön astroosyyteissä, kun tutkittiin HIV-1-infektion vaikutusta geenien ilmentymiseen (Su ym. 2002, 3594–3595). Geenin koodaaman proteiinin on havaittu vaikuttavan etäpesäkkeiden muodostumiseen (metastaasi) keuhkoihin rintasyövässä ja se on tunnistettu myös epiteelikudoksen tiivisliitoksista. (Britt ym. 2004, 135; Brown & Ruoslahti 2004, 366–367.)

Metadherin-geeni ilmentyy mRNA-tasolla kaikissa normaaleissa kudoksissa, mutta luustolihaksissa, sydämessä ja endokriinisissä rauhasissa sen ilmentyminen on runsaampaa (Kang ym. 2005, 10). Tutkimuksissa on myös havaittu, että geeni yli-ilmentyy kaikissa niissä syövissä, joissa sen ilmentymistä on tutkittu, kuten heptosellulaarinen karsinooma (maksasolusyöpä, HCC), rintasyöpä, eturauhassyöpä ja melanooma (Li ym. 2008, 3323–3324; Yoo ym. 2009, 467–468; Yoo ym. 2011, 2–4).

Metadheriini liittyy useiden solusignaalintireittien säätelyyn. Osa metadheriinin säätelykohteista on esitetty kuviossa 3 sivulla 13. Metadheriini aktivoi fosfatidyliinositoli-3-kinaasi/proteiinikinaasi B (PI3K/Akt) -signaalintireitin ja säätelee sen kautta angiogeneesiä. Muita metadheriinin aktivoimia signaalintireittejä ovat NF- κ B (nuclear factor kappa B), mitogeeniaktivoitu proteiinikinaasi (MAPK) ja Wnt, jotka yhdessä PI3K/Akt-reitin kanssa säätelevät solujen eloonjäämistä, proliferaatiota ja migraatiota sekä metastaasia. (Lee ym. 2006, 17390–17393; Emdad ym. 2009, 21030; Yoo ym. 2011, 4–5.) Metadheriinin yhteys NF- κ B-

signalointireittiin, joka on tärkeä proinflammatoristen eli tulehdusta voimistavien sytokiinien säätelijä, osoittaa, että se osallistuu mahdollisesti myös tulehdusprosessiin säätelyyn (Khuda ym. 2009, e705; Yoo ym. 2011, 6).

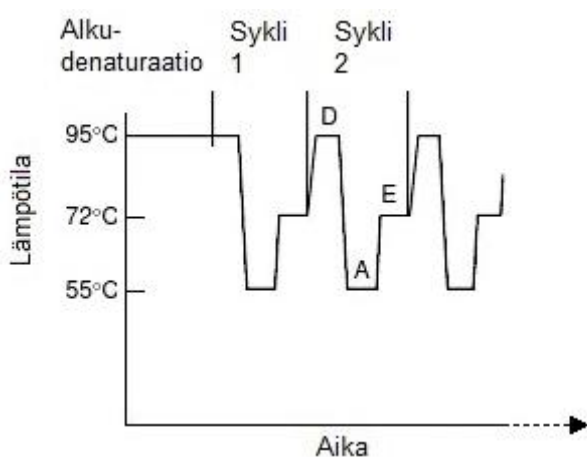


KUVIO 3. Metadheriinin säätelykohteita, paksut nuolet osoittavat metadheriinin säätlemiä mekanismeja ja ohuet nuolet metadheriiniä säätelviä mekanismeja (mukaillen Yoo ym. 2011, 3)

4 REAALIAIKAINEN KVANTITATIIVINEN POLYMERAASIKETJUREAKTIO

Polymeraasiketjureaktiolla (polymerase chain reaction, PCR) voidaan laboratorio-olosuhteissa monistaa lyhyitä DNA-fragmentteja käyttäen replikaatioprosessin peruselementtejä (McPherson & Møller 2000, 4). PCR:lla yksittäinen DNA-molekyyli voidaan monistaa miljooniksi kopioiksi. Reaktioon tarvitaan monistettava templaatti-DNA, alukkeet, lämpöä kestävä DNA-polymeraasientsyymi, nukleotidejä (dNTP) ja magnesiumioneja sisältävä puskuriliuos (Kubista ym. 2006, 97). Reaktio tapahtuu termosyklarissa, joka pystyy nopeasti lämmittämään ja jäähdyttämään reaktioputkia ja ylläpitämään halutun lämpötilan ennalta asetetun lämpötilaohjelman mukaisesti (McPherson & Møller 2000, 53).

Polymeraasiketjureaktio voidaan lämpötilan mukaan jakaa kolmeen vaiheeseen, denaturaatio-, annealing- ja ekstensiovaiheisiin, joita sovelluksesta riippuen toistetaan sykleissä tavallisesti 25–40 kertaa. Eri vaiheet on havainnollistettu kuviossa 4. Ensimmäisessä vaiheessa (D) lämpötila nostetaan niin korkeaksi, että DNA:n kaksijuosteinen rakenne purkautuu. Toisessa vaiheessa (A) lämpötilaa lasketaan, jolloin alukkeet sitoutuvat spesifisesti DNA-templaattiin ja entsyymi alkaa rakentaa nukleotideistä uutta DNA-juostetta alukkeiden perään. Annealing-vaiheen lämpötila riippuu käytettävistä alukkeista. Kolmannessa vaiheessa (E) lämpötila nostetaan lähelle DNA-polymeraasin optimilämpötilaa, jotta DNA-synteesi olisi mahdollisimman tehokasta. (McPherson & Møller 2000, 5; Kubista ym. 2006, 97.)



KUVIO 4. PCR-reaktion vaiheet (mukaillen McPherson & Møller 2000,11)

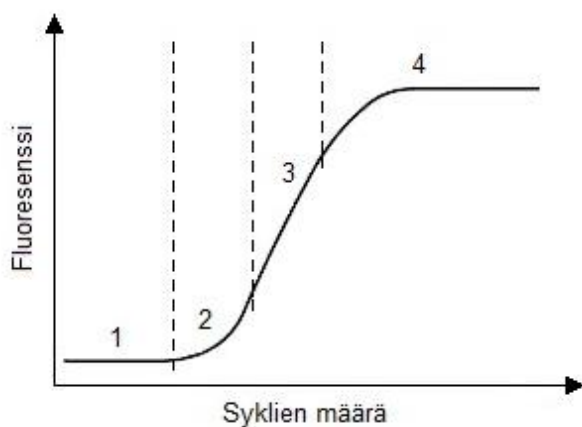
Reaaliaikaisen kvantitatiivisen PCR:n eli qPCR:n perusperiaate on sama kuin perinteisellä PCR:llä. Erona on käytettävä laitteisto ja reaktioseokseen lisättävä fluoresoiva väriaine, joka mahdollistaa PCR-tuotteen detektoimisen ja mittaamisen jokaisen syklin lopussa (Kubista ym. 2006, 98). qPCR-laite kerää väriaineen antaman fluoresenssisignaalin useiden syklien ajan ja muuttaa sen numeriseen muotoon. Fluoresenssin lisääntyminen on suoraan verrannollista monistuvan PCR-tuotteen määrään. Fluoresoivat molekyylit absorboivat valoa kapealla aallonpituusalueella. Aallonpituutta, jolla molekyyli absorboi valoa maksimaalisesti, kutsutaan eksitaatioaallonpituudeksi. Eksitaatio siirtää molekyylin hetkellisesti korkeammalle energiatasolle. Kun molekyyli palaa takaisin perusenergiatasolle, se emittoi valoa pidemmällä aallonpituudella, emissioaallonpituudella. Kullekin fluoresoivalle väriaineelle on oma optimaalinen eksitaatio- ja emissioaallonpituus. Väriaineet eli fluoroforit voidaan detektoida kapealla aallonpituusalueella näiden optimaalisten aallonpituuksien lähellä. (Shiple 2006, 3, 10.)

Reaaliaikaisessa kvantitatiivisessa PCR:ssä käytettävän laitteiston pääkomponentit ovat valonlähde, detektointijärjestelmä ja termosykleri (Shiple 2006, 12). Käytettävät valonlähteet voivat olla joko laajaspektrisiä tai kapeaspektrisiä. Laajaspektrisiä valonlähteitä ovat tungstenhalogeenilamppu, kvartsitungstenhalogeenilamppu ja ksenonlamppu. Ne mahdollistavat laajemman fluoroforivalikoiman käytön kuin kapeaspektriset argonionilaser ja LED (light-emitting diode). Joissakin laitteissa on yhdistetty useita eri aallonpituudella eksitoivia LED-lamppuja, jolloin useampien fluoroforien käyttö on mahdollista. Fluoresenssisignaalin muutokset havaitaan laitteen sisäisellä fluorometrillä. (Logan & Edwards 2009, 19.) Useimmat termosyklerit perustuvat lämpötilan säätelyyn lämpöblokin avulla. On kehitetty myös laitteita, joissa lämmittäminen ja jäähdyttäminen tapahtuvat ilman välityksellä, jolloin analyysiin kuluva aika lyhenee (Saunders 2009, 3). Esimerkkinä qPCR-laitteistosta on kuvassa 1 sivulla 16 esitetty ABI Prism 7000 Sequence Detection System -laitteisto (Applied Biosystems).



KUVA 1. ABI Prism 7000 Sequence Detection System -laitteisto (Kuva: Kristiina Lindroos 2011)

Minkä tahansa PCR-reaktion kinetiikka voidaan jakaa neljään selvästi havaittavaan vaiheeseen, jotka on havainnollistettu kuviossa 5. Ensimmäisten syklien aikana qPCR-laite ei erota fluoresenssisignaalia taustafluoresenssista, vaan se jää pohjaviivan (1) alle. Näiden syklien aikana tapahtuu kuitenkin jo eksponentiaalista monistumista, vaikkei laite sitä vielä pysty detektoimaan. Eksponentiaalisen monistumisen vaihe (2) alkaa, kun fluoresenssisignaali kasvaa laitteen havaitsemalle tasolle. Linearisessa vaiheessa (3) monistumistehokkuus alkaa vähitellen vähentyä, mutta fluoresenssisignaali voimistuu edelleen jyrkästi. Plateu-vaiheessa (4) monistumistehokkuus laskee jyrkästi, eikä monistumista lopulta tapahdu lainkaan. (Pfaffl 2004, 93; Shipley 2006, 9.)



KUVIO 5. PCR-reaktion kinetiikka (mukailleen McPherson & Møller 2000,15)

Reaaliaikaisen kvantitatiivisen PCR:n käyttökohteita ovat muun muassa SNP-analyysit (yhden nukleotidin polymorfismit), mRNA-ekspression analysointi, kliininen mikrobiologia ja kliininen virologia. Menetelmää käytetään myös elintarvikkeanalytiikassa esimerkiksi geneettisesti muunneltujen organismien tunnistamisessa. (Bustin 2004, 17; Wiseman 2009, 253)

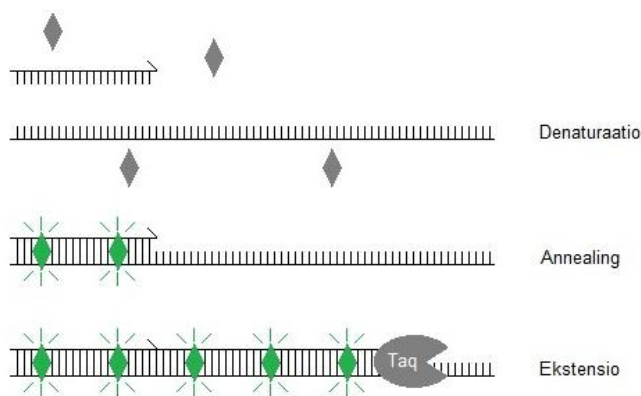
4.1 Detektointikemiat

On olemassa kolme fluoresoiviin väriaineisiin perustuvaa perusmenetelmää, joita käytetään yleisesti nukleiinihappojen havaitsemiseksi qPCR:ssa (Shiplely 2006, 16). Menetelmät voidaan jakaa epäspesifisiin ja spesifisiin detektointikemioihin. Epäspesifinen detektointi perustuu usein reaktioseoksessa vapaana olevaan väriaineeseen, joka sitoutuu reversiibelisti muodostuvaan kaksijuosteiseen DNA:han. (Bustin & Nolan 2004, 219–220.) Väriaineen taustafluoresenssi on hyvin matala sen ollessa vapaana reaktioseoksessa. Väriaineen sitoutuessa kaksijuosteiseen DNA-molekyylisiin sen fluoresenssi kasvaa moninkertaiseksi. Epäspesifisiä detektointikemioita ovat myös erilaiset fluoresoivilla väriaineilla leimattuihin alukkeisiin perustuvat menetelmät. (Shiplely 2006, 16, 19.) Tällaiset väriaineet mahdollistavat niin sanotut multiplex-reaktiot, eli usean amplikonin monistumisen samassa reaktiossa käyttäen useampaa kuin yhtä alukeparia, mikä ei ole mahdollista reaktioseoksessa vapaana olevilla väriaineilla (Arya ym. 2005, 214; Shiplely 2006, 19).

Spesifinen detektointi perustuu erilaisiin fluoresoivilla väriaineilla leimattuihin koettiin, jotka ovat templaatti-DNA:lle komplementaarisia oligonukleotidisekvenssejä. Koettimet suunnitellaan erikseen jokaiselle monistettavalle DNA-jaksolle eli amplikonille. Menetelmän etuna aikaisempiin verrattuna on se, että sillä havaitaan vain haluttu PCR-tuote. (Shiplely 2006, 20–21.) Myös multiplex-reaktiot ovat mahdollisia spesifisillä detektointikemioilla (Bustin & Nolan 2004, 240; Shiplely 2006, 22).

Epäspesifiseen detektointiin soveltuvia väriaineita ovat muun muassa SYBR Green I, BOXTO ja Light Upon eXtension (LUX). SYBR Green I sitoutuu kaksi-

juosteiseen DNA:han sen kaksoiskierteen pienempään kierteeseen. SYBR Green I -kemian etuja ovat sen edullisuus, helppokäyttöisyys ja mahdollisuus saman detektointimenetelmän käyttöön kaikissa analyyseissä. Haittapuolena ovat väriaineen antamat väärät positiiviset signaalit, jotka johtuvat epäspesifisestä sitoutumisesta ampikonin lisäksi myös muihin reaktiossa muodostuviin kaksijuosteisiin DNA-molekyyleihin. Sen vuoksi alukkeiden suunnitteluun tulee kiinnittää erityistä huomiota. (Shiplely 2006, 16–19.) Oikean tuotteen monistuminen reaktiossa voidaan havaita analysoimalla muodostuneen tuotteen sulamiskäyrä (Bustin & Nolan 2004, 219). SYBR Green I:n toimintaperiaate on esitetty kuviossa 6. Kun DNA on denaturoituneena, SYBR Green I on vapaana reaktioseoksessa, jolloin sen antama fluoresenssisignaali on hyvin matala. Alukkeen sitoutuessa templaattiin annealing-vaiheessa muodostuu kaksijuosteista DNA:ta, johon SYBR Green I sitoutuu ja fluoresenssisignaali kasvaa moninkertaiseksi. Ekstension aikana fluoresenssisignaali voimistuu useampien SYBR Green I -molekyyliden sitoutuessa muodostuvaan PCR-tuotteeseen. (Shiplely 2006, 18.)

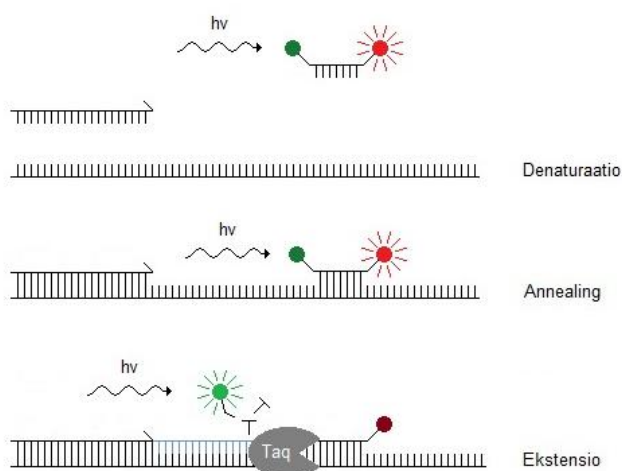


KUVIO 6. SYBR Green I:n toimintaperiaate (mukaiillen Shiplely 2006, 18)

Spesifisiä detektointisovelluksia on useita, muun muassa TaqMan-, Molecular Beacon- ja hybridisaatiokoettimet. Yhteistä kaikille menetelmille on fluoresenssi-resonanssienergiansiirtoilmion (fluorescence resonance energy transfer, FRET) hyödyntäminen. (Shiplely 2006, 22.) Koettiin on liitetty kaksi molekyyliä, reportteri ja vaimennin. Kun reportterimolekyyli palaa eksitaation jälkeen perusenergiatasolle, se emittoi valoa aallonpituudella, joka vastaa vaimenninmolekyylin eksitaatioaallonpituutta. Reportterimolekyylin energia siirtyy vaimentimelle

sen sijaan, että syntyisi laitteen havaitsema fluoresenssi. FRET-ilmiön tapahtuminen edellyttää, että reportteri- ja vaimenninmolekyylit ovat toistensa lähietäisyydellä. (Shiplely 2006, 11; Lee, Squirrell, Leslie & Brown 2009, 28.) Vaimennin voi olla fluoresoiva molekyyli tai niin sanottu pimeä vaimennin, joka vaimentaa reportterin signaalin, muttei emittoi itse valoa (Bustin & Nolan 2004, 245; Shipley 2006, 11–12).

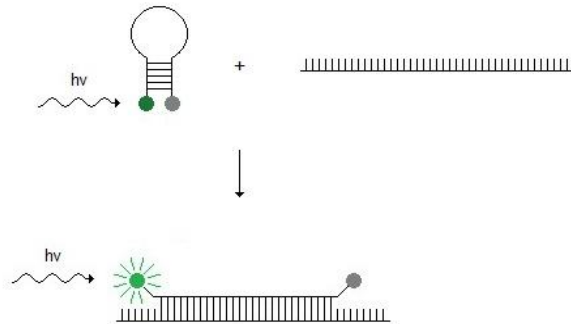
Suosituimpia detektointimenetelmiä qPCR:ssa on hydrolyysikoetin TaqMan, jonka toimintaperiaate on esitetty kuviossa 7. TaqMan-koettimet on perinteisesti leimattu 5'-päästä reportterimolekyylillä (vihreä) ja 3'-päästä vaimenninmolekyylillä (punainen). Kun reportteri ja vaimennin ovat lähietäisyydellä, FRET-ilmiö vaimentaa reportterimolekyylin signaalin. Annealing-vaiheessa koetin sitoutuu korkeamman sulamislämpötilan vuoksi templaattiin ennen alukkeita. Ekstension aikana 5'-nukleaasiaktivisuuden omaava DNA-polymeraasi katkaisee koettimen rakentaessaan uutta DNA-juostetta, jolloin reportteri- ja vaimenninmolekyylit vapautuvat liuokseen ja laite havaitsee reportterin fluoresenssisignaalin. (Bustin & Nolan 2004, 244–245; Shipley 2006, 22–23.)



KUVIO 7. TaqMan-koettimien toimintaperiaate (mukaillen Shipley 2006, 22)

Molecular Beacon -koettimien toiminta perustuu niiden silmukkamaiseen rakenteeseen. Koettimien toimintaperiaate on esitetty kuviossa 8 sivulla 20. Koettimien 5'- ja 3'-päihin suunnitellaan 4–6 emäksen komplementaariset sekvenssit, jolloin koetin sitoutuu itsensä kanssa muodostaen niin sanotun hiusneularakenteen. Ollessaan vapaana liuoksessa reportterimolekyylin signaali vaimenee

FRET-ilmiöön perustuen reportterin ja vaimentimen ollessa lähietäisyydellä. Kun koetin annealing-vaiheessa sitoutuu DNA-templattiin, hiusneularakenne avautuu erottaen reportterin ja vaimentimen, jolloin qPCR-laite havaitsee reportterin fluoresenssisignaalin. (Bustin & Nolan 2004, 253–255; Shipley 2006, 23.)



KUVIO 8. Molecular Beacon -koettimien toimintaperiaate (mukaillen Shipley 2006, 24)

4.2 Tulosten analysointi reaaliaikaisessa kvantitatiivisessa polymeraasiketjureaktiossa

Perinteisessä PCR:ssa tulosten analysointi tapahtuu yleensä analysoimalla PCR-tuotteen kokoa agarosigeelielektroforeesilla (McPherson & Møller 2000, 17). Kvantitatiivisessa PCR:ssa tuloksia voidaan analysoida qPCR-laitteen mitaamien parametrien avulla. Usein tulosten analysointi voidaan suorittaa suoraan laitteen mukana tulevalla ohjelmistolla tai kaupallisten ohjelmistojen avulla. (Saunders 2009, 4.)

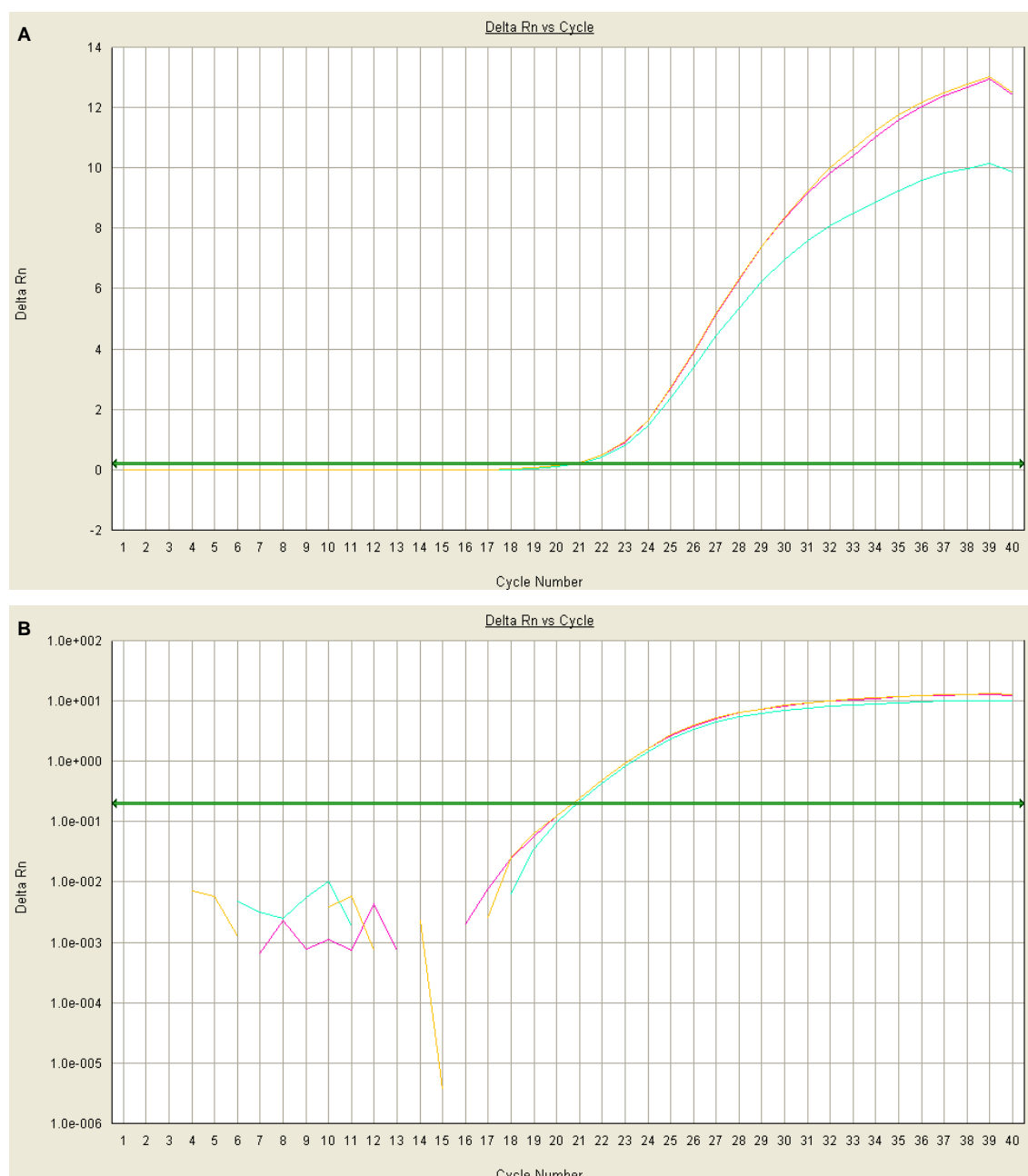
4.2.1 Normalisointi

Reaktioputkien tai kuoppalevyn kaivojen väliset pienet fluoresenssivaihtelut voidaan normalisoida passiivisen referenssiväriaineen avulla. Referenssiväriaine ei vaikuta PCR-reaktioon. Fluoresenssivaihtelu voi johtua esimerkiksi laitteen optisesta vaihtelusta, ilmakuplista tai pipetointivirheestä. Normalisoitu reportterisignaali (R_n) saadaan jakamalla reportterin fluoresenssisignaali referenssiväriaineen fluoresenssisignaalilla. Kun normalisoidusta reportterisignaalista vä-

hennetään taustaan osuus, saadaan normalisoidun reportterisignaalin muutos kussakin aikapisteessä, delta Rn (ΔR_n). (Shiplely 2006, 12; Adams 2006, 40; Lee ym. 2009, 31.) Normalisoinnilla varmistetaan, että kaivojen signaalit ovat keskenään vertailukelpoisia. Yleisimmin käytetty referenssiväriaine on 6-karboksi-X-rodamiini (ROX), mutta myös muita soveltuvia väriaineita voidaan käyttää (Shiplely 2006, 12).

4.2.2 Monistuskäyrä, kynnystaso ja kynnysyksi

Monistuskäyrä on graafinen esitys normalisoidusta qPCR-laitteen ajon aikana keräämästä fluoresenssisignaalista. Monistuskäyrä voidaan esittää y-akselin suhteen joko lineaarisessa muodossa, jolloin reaktion lineaarinen vaihe näkyy lineaarisena, tai logaritmisessa muodossa, jolloin reaktion eksponentiaalinen vaihe näkyy lineaarisena. Kuviossa 9 sivulla 22 on esimerkki monistuskäyrästä eri tavoin esitettynä.



KUVIO 9. Esimerkki monistuskäyristä esitettynä y-akselin suhteen lineaarisessa (A) ja logaritmisessa (B) muodossa

Kynnystaso (vihreä linja kuviossa 9) on taso, jolla fluoresenssisignaali kohoaa taustafluoresenssin yläpuolelle ja on detektoitavissa. Kynnystaso voi olla laitteen automaattisesti asettama tai käyttäjän manuaalisesti asettama. Eri ohjelmistoissa kynnystaso määritellään eri tavoin, esimerkiksi kymmenen kertaa pohjaviivan keskihajontana (Adams 2006, 50). Kynnyssykli (C_t) on sykli, jolloin näytteen fluoresenssi ylittää asetetun kynnystason (Adams 2006, 40). Kynnyssykli riippuu muun muassa templaatin määrästä ja monistumisen tehokkuudes-

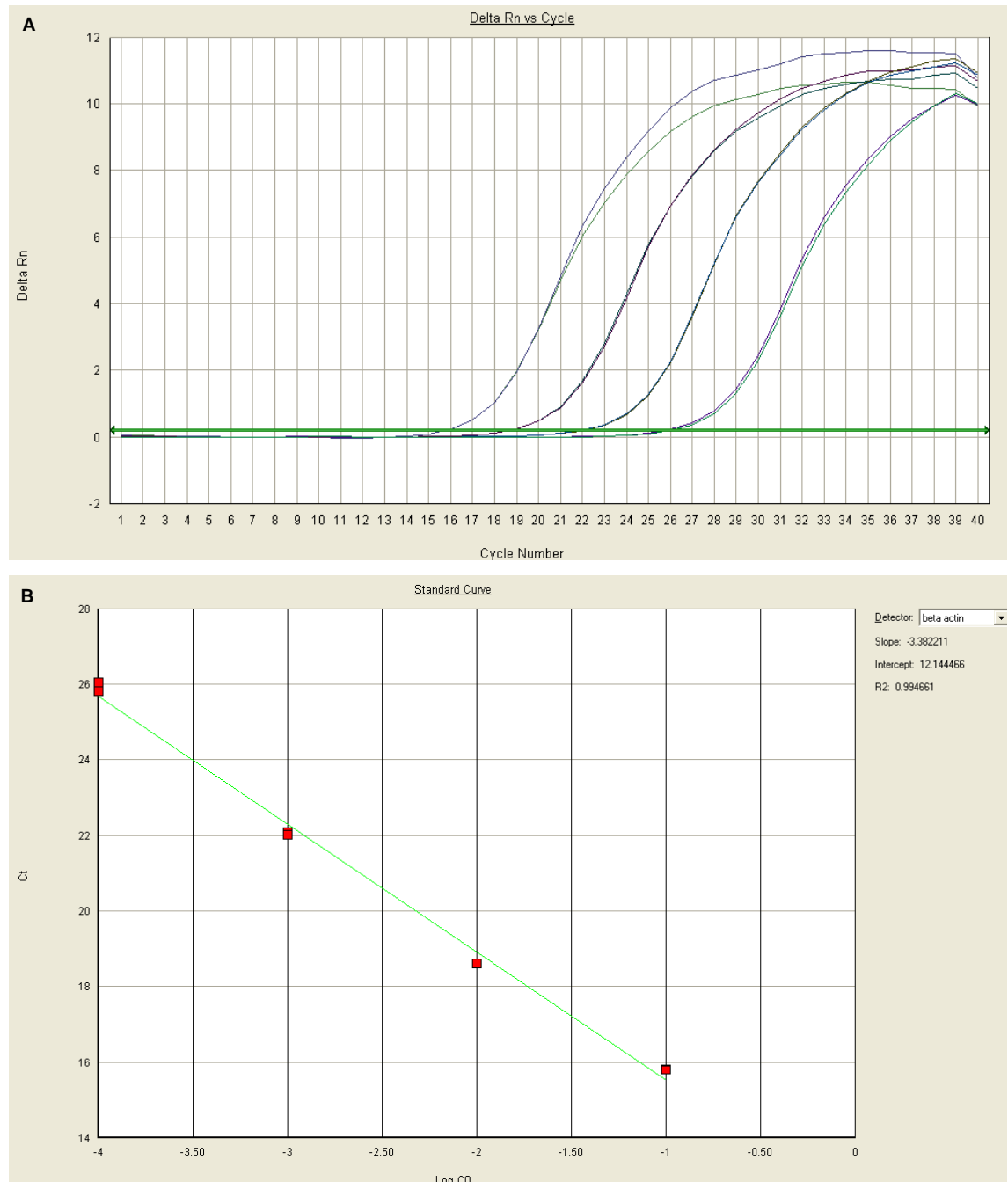
ta. Mitä enemmän templaattia näytteessä on, sitä aikaisemmin tuote monistuu ja sitä pienempi on C_t -arvo. (Bustin 2004, 15.)

4.2.3 Laimennossarja ja tehokkuus

Teoriassa PCR-tuotteen määrä kaksinkertaistuu jokaisen syklin aikana, kun yhdestä kaksijuosteisesta DNA-molekyylistä syntetisoidaan kaksi DNA-molekyyliä. Monistuminen on tällöin eksponentiaalista ja monistumistehokkuus 100 %. Todellisuudessa tehokkuus on kuitenkin harvoin 100 %. (Shiplely 2006, 9; Bustin 2004, 6–7.) PCR-reaktion tehokkuus voidaan laskea laimennossarjasta piirretyn kalibrointikäyrän (kuvio 10 sivulla 24) kulmakertoimen avulla kaavan (1) mukaan

$$E = 10^{(-1/k)} - 1, \tag{1}$$

jossa E on tehokkuus ja k kalibrointikäyrän kulmakerroin (Kubista ym. 2006, 100; Pfaffl 2006, 70). Yleensä hyväksyttävä PCR-reaktion tehokkuus on 90–110 %, mikä vastaa kalibrointikäyrän kulmakerrointa -3,59...-3,10 (Applied Biosystems 2011).



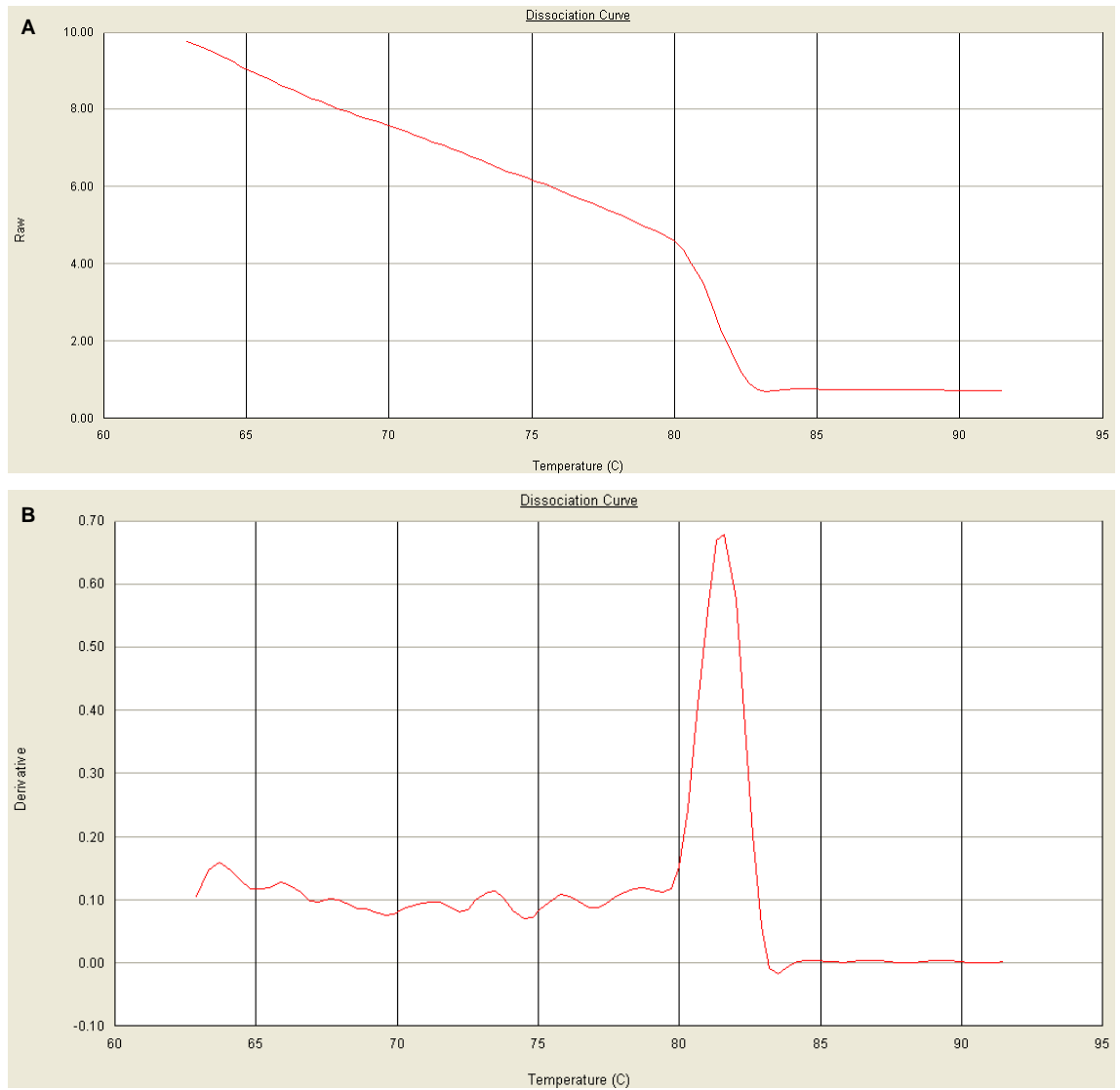
KUVIO 10. Laimennossarjan monistuskäyrät (A) ja kalibrointikäyrä (B)

4.2.4 Sulamiskäyräanalyysi

Sulamiskäyräanalyysiä käytetään varmistamaan halutun PCR-tuotteen monistuminen etenkin epäspesifisiä detektointikemioita käytettäessä (Ponchel 2006, 146; Lee ym. 2009, 26–27). Jokaisella DNA-molekyylillä on sille ominainen sulamislämpötila (T_m), jolloin kaksijuosteinen DNA denaturoituu. Sulamislämpöti-

laan vaikuttaa muun muassa DNA-molekyylin guaniini-sytosiinipitoisuus ja pituus. (Ririe, Rasmussen & Wittwer 1997, 154; Lee ym. 2009, 27.) Sulamiskäyräanalyysi suoritetaan yleensä PCR-reaktion jälkeen nostamalla lämpötilaa hitaasti noin 50 °C:sta 95 °C:een seuraten samalla fluoresenssin muutosta. Fluoresenssi laskee kaksijuosteisen DNA:n denaturoituessa, kun DNA:han sitoutunut väriaine vapautuu reaktioseokseen. (Ponchel 2006, 146; Lee ym. 2009, 26–27.)

Polymeraasiketjureaktion tuotteen sulamiskäyrä saadaan mittaamalla fluoresenssi lämpötilan funktiona. Sulamiskäyrä esitetään yleensä derivaattamuodossa negatiivinen ensimmäinen derivaatta ($-dF/dT$) lämpötilan funktiona. Derivaattamuodossa PCR-tuotteen sulamislämpötila on sulamiskäyrän huippukohdassa. (Kubista ym. 2006, 103; Ponchel 2006, 146.) Kuviossa 11 sivulla 26 on esitetty esimerkki sulamiskäyrästä kahdella eri tavalla piirrettynä.



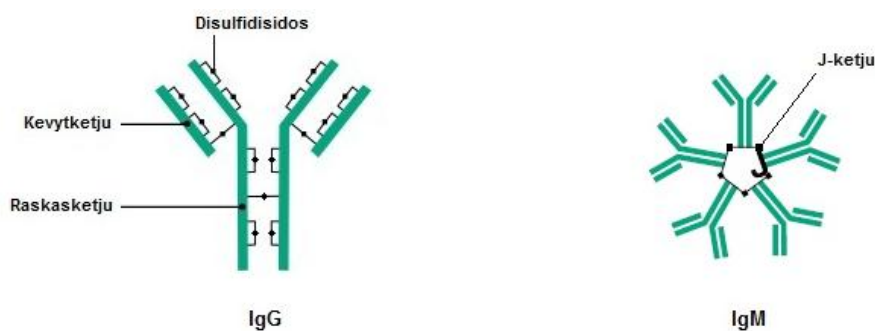
KUVIO 11. Esimerkki saman PCR-tuotteen sulamiskäyrästä piirrettynä fluoressensi lämpötilan funktiona (A) sekä derivaattamuodossa (B)

5 IMMUNOHISTOKEMIA

Immunohistokemia on menetelmä, jolla voidaan osoittaa kudosleikkeestä tietty molekyyli, antigeeni, sille spesifisellä vasta-aineella. Vasta-aineen sitoutumis-kohtaa antigeenissa kutsutaan epitoopiksi. Vasta-aine visualisoidaan mikroskoopilla havaittavaksi joko leimaamalla se suoraan tai käyttämällä monivaiheista leimausmenetelmää. Visualisointi voi tapahtua esimerkiksi entsyymaattisen tai fluoresoivan leiman avulla. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 133; Renshaw 2007a, 1.)

5.1 Vasta-aineet

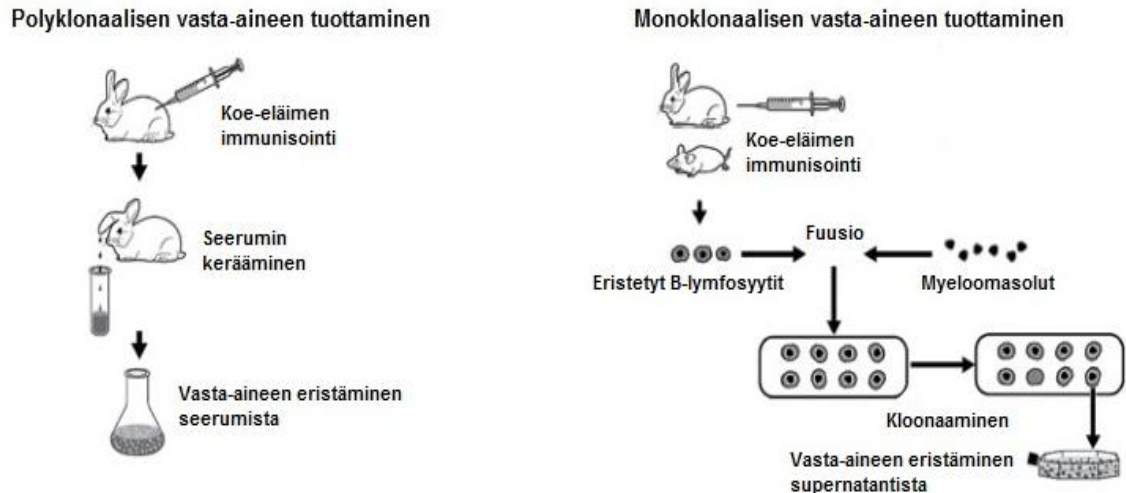
Vasta-aineet ovat plasmasolujen tuottamia seerumin glykoproteiineja, immunoglobuliineja. Immunoglobuliinit jaetaan viiteen luokkaan, jotka ovat IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. Immunohistokemiassa käytetään yleensä IgG- ja IgM-luokkien vasta-aineita. IgG-molekyyli koostuu neljästä polypeptidiketjusta, kahdesta keskenään identtisestä niin sanotusta raskasketjusta ja kahdesta keskenään identtisestä kevytketjusta. Raskas- ja kevytketjut ovat asettuneet Y-kirjaimen muotoon (vasemmalla kuviossa 12). Ketjujen välillä on disulfididisidoksia. IgM-molekyyli koostuu viidestä Y-kirjaimen muotoisesta alayksiköstä, jotka ovat kiinnittyneet J-ketjuun (oikealla kuviossa 12). (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 134; Onley 2007, 3–4.)



KUVIO 12. IgG- ja IgM-molekyylien rakenne (mukaillen Boenisch 2009, 1, 3)

Vasta-aineet jaetaan polyklonaalisiin ja monoklonaalisiin vasta-aineisiin. Polyklonaaliset vasta-aineet ovat heterogeenisiä vasta-aineiden seoksia, jotka kykenevät tunnistamaan useita epitooppeja. Polyklonaaliset vasta-aineet tuotetaan immunoisoimalla koe-eläin puhdistetulla immunogeenisellä antigeenillä, jolle vasta-aine halutaan tuottaa. Yleisimmin vasta-ainetuotannossa käytetty koe-eläin on kani, mutta myös muita nisäkkäitä, kuten vuohta, sikaa ja aasia, käytetään. Koe-eläimessä syntyy humoraalinen immuunivaste, jolloin immuunijärjestelmän B-lymfosyytit aktivoituvat ja tuottavat immunoglobuliineja. Haluttu vasta-aine eristetään eläimen seerumista ja puhdistetaan. Puhdistusmenetelminä käytetään affiniteettikromatografiaa, ioninvaihtokromatografiaa, kiinteäfaasiabsorptiota, ammoniumsulfaattisaostusta, immunodiffuusiota ja geelielektroforeesia. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 135; Boenisch 2009, 3.)

Monoklonaaliset vasta-aineet ovat homogeenisiä, vain yhden epitoopin tunnistavia immunoglobuliineja. Ne valmistetaan hybridoomatekniikalla. Monoklonaalisten vasta-aineiden tuotannossa käytetään koe-eläimenä yleisimmin hiirtä, rottaa tai kania. Immunisoidun koe-eläimen pernasta eristetään B-lymfosyyttejä, jotka yhdistetään myeloomasoluihin. Myeloomasoluilla on kyky proliferoitua jatkuvasti. Muodostunut hybridi tuottaa *in vitro* teoriassa rajattomasti tiettyä vasta-ainekloonina, joka voidaan eristää supernatantista. Monoklonaaliset vasta-aineet voidaan tuottaa myös aiheuttamalla myeloomatuumori injisoimalla koe-eläimeen hybridoomasoluja, jolloin eläimen seerumista voidaan eristää tuumorin erittämää homogeenistä vasta-ainetta. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 135; Boenisch 2009, 4.) Polyklonaalisen ja monoklonaalisen vasta-aineen tuottamisen vaiheet on esitetty yksinkertaistettusti kuviossa 13 sivulla 29.

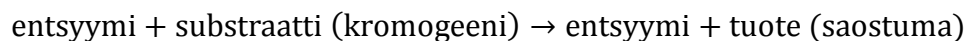


KUVIO 13. Vasta-aineiden tuottaminen (mukailien Boenisch 2009, 4–5)

5.2 Leimat

5.2.1 Entsymaattiset leimat

Entsyymit ovat immunohistokemiassa yleisesti käytettyjä merkkiaineita. Käytetyimpiä entsyymejä ovat piparjuuren peroksidaasi (horseradish peroxidase, HRP) ja alkalinen fosfataasi (alkaline phosphatase, AP). Entsyymi voidaan liittää vasta-aineeseen suoraan konjugoimalla, muodostamalla entsyymi-vasta-ainekomplekseja tai avidiini-biotiini-entsyymikomplekseja. Kun entsyymileimalla vasta-aineella inkuboitu kudisleike altistetaan ylimäärälle kromogeenia, muodostuu kromogeenista valomikroskoopilla havaittava värillinen saostuma kuviossa 14 esitetyn reaktion mukaisesti. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 138; Mardle 2007, 33–34.)



KUVIO 14. Entsyymireaktio.

Reaktiossa käytettävä entsyymi-kromogeenipari vaikuttaa muodostuvan saostuman väriin. Esimerkiksi lisäämällä HRP-konjugoidulla vasta-aineella inkuboidulle kudisleikkeelle 3,3'-diaminobentsidiinitetrahydrokloridia (DAB) muo-

dostuu ruskea saostuma. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 138; Mardle 2007, 33–34.)

5.2.2 Fluoresoivat leimat

Fluoresoivat merkkiaineet eli fluorokromit absorboivat korkeaenergistä lyhytaaltoista säteilyä, käyttävät osan sen energiasta sisäiseen elektroninsiirtoon ja emittoivat matalaenergistä säteilyä näkyvän valon aallonpituudella (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 136). Fluorokromeista käytetyimpiä ovat fluoreskeiini-isotiosyanaatti (FITC) ja rodamiini. Fluorokromien visualisointiin tarvitaan fluoresenssimikroskooppi tai konfokaalimikroskooppi. Fluorokromien fluoresenssi haalistuu vähitellen mikroskopoitessa. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 136; Jackson & Blythe 2008, 433.)

5.3 Immunohistokemiallinen prosessi

5.3.1 Fiksaatio

Fiksaation tarkoitus on estää kudoksen hajoaminen autolyysin ja mikrobitoiminnan seurauksena sekä säilyttää kudoksen rakenne mahdollisimman samankaltaisena, kuin se elävässä kudoksessa on. Fiksaatio aiheuttaa kuitenkin konformaatiomuutoksia proteiinien tertiäärirakenteessa, mikä vaikuttaa vasta-aineen antigeeniin sitoutumiseen. (Rantala, Naukkarinen, Helin 1998, 65; Renshaw 2007b, 47–48.) Hyvän fiksatiivin tulee säilyttää näytteen kudostamofologia ja antigeenisuus, estää antigeenin siirtyminen ja diffuusiointi kudoksessa eikä se saa vaikeuttaa antigeenin ja vasta-aineen välistä reaktiota (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 148).

Parafiinileikkeille käytetään fiksatiivina yleisimmin formaldehydiä. Formaldehydin 40 % vesiliuosta, formaliinia, on saatavana kaupallisesti. Fiksaatioon voidaan käyttää formaliinin 10 % laimennosta, joka on laimennettu puskuriliuoksella. Formaldehydi on neutraalissa pH:ssa monohydraattimuodossa metyleenigly-

kolina. Myös puskuroitua paraformaldehydiliuosta voidaan käyttää fiksaatioon. Paraformaldehydi on kiinteä polymeeri, joka vesiliuoksessa on monomeerinä. Formaliinin ja paraformaldehydinin aldehydyryhmät muodostavat metyleenisidoksia polypeptidiketjujen välille stabiloiden kudosta. (Rantala ym. 1998, 65–66; Renshaw 2007b, 50.)

5.3.2 Prosessointi ja leikkaaminen

Näytteen prosessointi eli kuljetus sisältää veden poistamisen näytteestä, kirkastamisen ja valamisen tukiaineeseen (Rantala ym. 1998, 68). Immunohistokemiallisen näytteen tulee olla riittävän ohut, paksuudeltaan noin 5 μm , jotta sitä on mahdollista tutkia mikroskoopilla (Kiernan 2008, 1). Tukiaine kovettaa kudoksen ja mahdollistaa siten ohuiden leikkeiden leikkaamisen. Käytetyin tukiaine on parafiini. Prosessointi voidaan tehdä manuaalisesti, mutta etenkin suuria määriä kuljettaessa käytetään automaattisia kuduskuljetuslaitteistoja (kuva 2). (Rantala ym. 1998, 68.)



KUVA 2. Kuduskuljetuslaitteisto (Kuva: Kristiina Lindroos 2011)

Veden poistaminen näytteestä on välttämätöntä, koska parafiini on hydrofobista. Veden poistoon käytetään tavallisesti alkoholisarjaa, jossa konsentraatio nousee 70 % etanolista absoluuttiseen etanoliin. (Renshaw 2007b, 56.) Kirkastusvaiheessa etanoli korvataan liuottimella, johon sekä etanoli että parafiini liukenevat hyvin. Yleisesti käytetään ksyleeniä, mutta on olemassa myös vaihtoehtoisia kirkastusaineita, kuten tolueeni, ja kaupallisia ksyleenin substituentteja. (Rantala ym. 1998, 68; Kiernan 2008, 57.) Kirkastusaine korvataan nestemäisellä parafiinilla. Histologiassa käytettävän parafiinin sulamispiste vaihtelee tyyppillisesti 52–58 °C:een välillä. (Kiernan 2008, 53.) Kiinteän parafiinin kovuus lisääntyy sulamispisteen noustessa. Kovasta parafiiniblokista saadaan helpommin ohuita leikkeitä, kuin pehmeästä. (Rantala ym. 1998, 68.) Korkeammassa lämpötilassa voidaan kuitenkin menettää osa näytteen antigeenisyydestä proteiinien denaturoituessa (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 148; Renshaw 2007b, 56). Kun parafiini on imeytetty kudokseen, valetaan näyte parafiiniblokiksi metallisen muotin avulla (Rantala ym. 1998, 68).

Parafiiniblokista leikataan leikkeitä joko rotaatio- tai liukumikrotomilla. Rotaatiomikrotomissa telineeseen asetettu blokki liikkuu ja veitsi on paikallaan, kun taas liukumikrotomissa veitsi liikkuu ja parafiiniblokki on paikallaan. (Rantala ym. 1998, 70.) Nykyään käytetään yleisemmin rotaariomikrotomia (Kiernan 2008, 2). Edustavan parafiinileikkeen tulee olla tasaisen ohut, ehjä ja rypyttömä. Leikkaamisen jälkeen leike siirretään siveltimen avulla oikeenemaan vesihauteeseen, jonka lämpötila on noin 10 °C parafiinin sulamislämpötilaa matalampi. Leikkeet kerätään vesihauteesta objektilasille. (Rantala ym. 1998, 72.) Parafiinileikkeet kiinnitetään objektilaseille lämmittämällä niitä lämpökaapissa noin 60 °C:ssa (Renshaw 2007b, 46).

5.3.3 Värjäys

Ennen värjäystä leikkeistä poistetaan parafiini ksyleenillä ja ne viedään läpi laskevan alkoholisarjan tislattuun veteen. Formaliinifiksoiduissa parafiinileikkeissä antigeeniepitoopit peittyvät usein ristsidosten alle. Antigeenin immunoreaktiivisuus voidaan palauttaa lämpökäsittelyn tai proteolyyttisen entsyymikäsittelyn

avulla. Optimaalinen esikäsitteily antigeenin paljastamiseksi täytyy testata erikseen jokaiselle antigeenille. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 150; Renshaw 2007b, 59.) Antigeenin paljastaminen lämpökäsittelyn avulla (heat-induced epitope retrieval, HIER) suoritetaan kuumentamalla kudokset puskuriliuoksessa. Entsyymattainen antigeenin paljastaminen suoritetaan inkubamalla leikkeitä entsyymiliuoksessa, esimerkiksi trypsiinissä. (Renshaw 2007b, 59–60.)

Värjäys suoritetaan kosteassa kammiossa, jotta leikkeet eivät kuivu inkubaatioiden aikana (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 154). Antigeeni voidaan havainnollistaa kudokset usealla eri värjäysmenetelmällä. Suorassa menetelmässä käytetään vain yhtä vasta-ainetta, joka on leimattu joko entsyymillä tai fluorokromilla. Menetelmä on nopea ja helppokäyttöinen, mutta sen antama signaali on yleensä heikko. Epäsuorassa menetelmässä käytetään kahta vasta-ainetta. Leimaamaton primäärivasta-aine reagoi antigeenin kanssa ja se visualisoidaan leimatun sekundäärivasta-aineen avulla. Epäsuorassa menetelmässä käytetään yleisimmin HRP-leimattua sekundäärivasta-ainetta. Epäsuora menetelmä on suoraa menetelmää herkempi. Muita värjäysmenetelmiä ovat esimerkiksi immunokultamenetelmä, jossa käytetään leimana kolloidaalista kultaa, ja avidiini-biotiinin menetelmä, jossa hyödynnetään avidiinin korkeaa affiniteettia biotiinia kohtaan. (Jackson & Blythe 2008, 438.)

Immunohistokemiassa käytetään usein vastavärjäykseen hematoksyliiniä, joka värjää tumat sinimustaksi. Hematoksyliiniä voidaan eristää *Haematoxylon campechianum* -puusta. Hematoksyliini itsessään ei värjää kudosta, vaan sen päähapettumistuote hemateiini on varsinainen väriaine. Hematoksyliini hapettuu luonnollisesti altistuessaan ilmalle ja valolle. Luonnollinen hapettumisprosessi kestää useita kuukausia, joten usein hematoksyliiniin lisätään kemiallisia hapettimia hapettumisprosessin nopeuttamiseksi. Hemateiini on anioninen molekyyli, minkä vuoksi sen kudosaaffiniteetti on huono. Huonoa kudosaaffiniteettia parenetaan usein mordantilla. Käytetyimpiä mordantteja ovat alumiini, rauta- ja tungstenuolat. (Rantala ym. 1998, 75; Renshaw 2007, 61–62; Gamble 2008, 121.)

6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

6.1 Näytteet ja niiden käsittely

Tutkimuksessa käytettiin tutkimusryhmän koe-eläinmalleista saamia kudospäytteitä. Käytetty koe-eläin oli hiiri (kanta C57BL/6) ja näytteet olivat epiteelikudosta. Hiirille oli tuotettu kokeellisesti pyöreä haava 6 mm biopsia-laitteella ja kudospäytteet oli kerätty eri aikapisteissä. Kudospäytteistä oli eristetty RNA qPCR:ää varten RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit -eristyskitillä (Qiagen). Immunohistokemiaa varten näytteet oli fiksoitu 4 % paraformaldehydillä (PFA) yön yli, viety läpi kuduskuljetuksen ja valettu lopuksi parafiiniin. Immunohistokemialliset värjäykset tehtiin valmiille 5 µm formaliinifiksoiduille parafiinileikkeille. Tutkimuksessa käytettyjen reagenssien tuotetiedot on esitetty liitteessä 1.

6.2 Geenin ilmentymisen tutkiminen reaaliaikaisen kvantitatiivisen polymeerasiketjureaktion avulla

Eristetty RNA käännettiin käänteistranskription avulla cDNA:ksi. Käänteistranskriptioreaktiossa käytettiin Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR -kittiä (Fermentas Life Sciences). Reaktioon käytettiin 1 µg RNA:ta. Reaktioseos pipetoitiin steriiliin, RNAasi-vapaaseen putkeen taulukon 2 mukaisesti.

TAULUKKO 2. Käänteistranskriptioreaktion pipetointi

5X Reaction Mix	4 µl
Maxima™ Enzyme Mix	2 µl
RNA-templaatti	1 µg
H ₂ O, nukleasivapaa	20 µl:aan asti
Kokonaistilavuus	20 µl

cDNA laimennettiin 1:100. qPCR-reaktioissa käytettiin Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) -kittiä (Fermentas Life Sciences). Reaktioseos pipetoitiin 96-kuoppalevylle sivulla 35 esitetyn taulukon 3 mukaisesti. Tutkimuksessa käytetyt alukkeet on listattu taulukossa 4 sivulla 35.

TAULUKKO 3. qPCR-reaktion pipetointi

Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	12,5 µl
5 µM alukeseos	1,0 µl
cDNA-templaatti	1,0 µl
H ₂ O, nukleasivapaa	25 µl:aan asti
Kokonaistilavuus	25 µl

TAULUKKO 4. Tutkimuksessa käytetyt alukkeet

Nimi	Sekvenssi	T _m °C
MTDH long forward	5'-TTC CTC CTG CTA TCT CTG-3'	53,7
MTDH long reverse	5'-CAT TTG ACT TGG GCT TGT-3'	51,4
Beta actin forward	5'-GAC AGG ATG CAG AAG GAG AT-3'	57,3
Beta actin reverse	5'-TTG CTG ATC CAC ATC TGC TG-3'	57,3

Ajot suoritettiin ABI Prism 7000 Sequence Detection System -qPCR-laitteella (Applied Biosystems) taulukossa 5 esitetyn ohjelman mukaisesti.

TAULUKKO 5. Käytetty qPCR-ohjelma

Vaihe	Lämpötila	Aika	
Alkudenaturaatio	95°C	10 min	
Denaturaatio	95°C	15 s	} 40 x
Annealing/ekstensio	57°C	60 s	

MTDH-geenin ilmentyminen referenssigeeniin verrattuna laskettiin kaavan (2) avulla

$$R = \frac{E_{\text{kohde}}^{\Delta C_t \text{ kohde}(\text{kontrolli-näyte})}}{E_{\text{ref}}^{\Delta C_t \text{ ref}(\text{kontrolli-näyte})}} \quad (2)$$

, jossa

R = suhdeluku,

E_{kohde} = tutkittavan geenin tehokkuus,

E_{ref} = referenssigeenin tehokkuus,

$\Delta C_t \text{ kohde}$ (*kontrolli – näyte*) = tutkittavan geenin kynnysyökin muutos, kontrollin ja näytteen keskiarvojen erotus ja

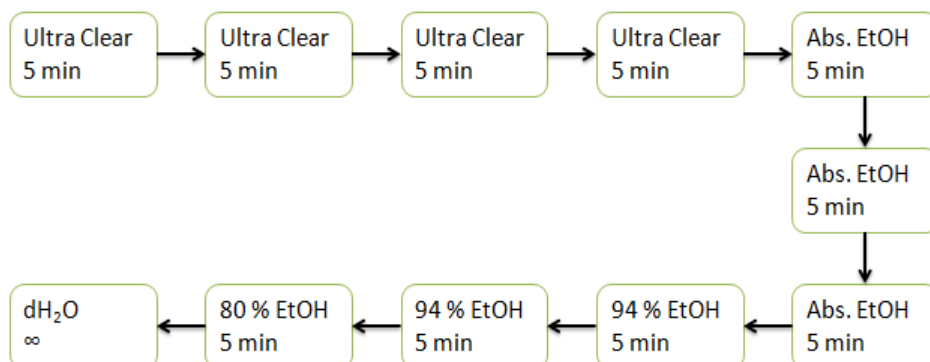
$\Delta C_t \text{ ref}$ (*kontrolli – näyte*) = referenssigeenin kynnysyökin muutos, kontrollin ja näytteen keskiarvojen erotus.

Kontrollina käytettiin normaalin ihon cDNA:ta, joka käsiteltiin samoin kuin näytteet.

Alukkeiden tehokkuus selvitettiin tekemällä laimennossarja kolmen eri aikapistteen cDNA:sta. Laimennossarjojen qPCR-ajo suoritettiin β -actin- ja MTDH-alukkeilla taulukossa 5 esitetyn ohjelman mukaisesti. Kullekin laimennossarjalle piirrettiin oma kalibrointikäyrä, joiden kulmakertoimista laskettiin keskiarvo erikseen β -actin- ja MTDH-alukkeille. Kulmakertoimen avulla laskettiin alukkeiden tehokkuus sivulla 23 esitetyn kaavan (1) mukaisesti. Tehokkuuden laskeminen on esitetty tarkemmin liitteessä 2.

6.3 Geenin ilmentymisen tutkiminen immunohistokemian avulla

Parafiinileikkeet kiinnitettiin laselle pitämällä niitä lämpökaapissa +58 °C:ssa tunnin ajan. Kiinnityksen jälkeen suoritettiin parafiininpoisto (kuvio 15) koneella (Varistain 23, Shandon Elliot Ltd.). Näytteet esikäsiteltiin HIER pH 9 -menetelmällä kuumentamalla niitä puskuriliuoksessa (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 9) mikrossa 5 minuuttia. Kuumentamisen jälkeen haihtunut puskuriliuos korvattiin tislatulla vedellä ja näytteiden annettiin jäähtyä puskuriliuoksessa tunnin ajan. Näytteet siirrettiin tislattuun veteen ja pestiin pesuliuoksella (PBS, jossa 0,01 % Tween 20) ennen värjäyksen aloittamista.



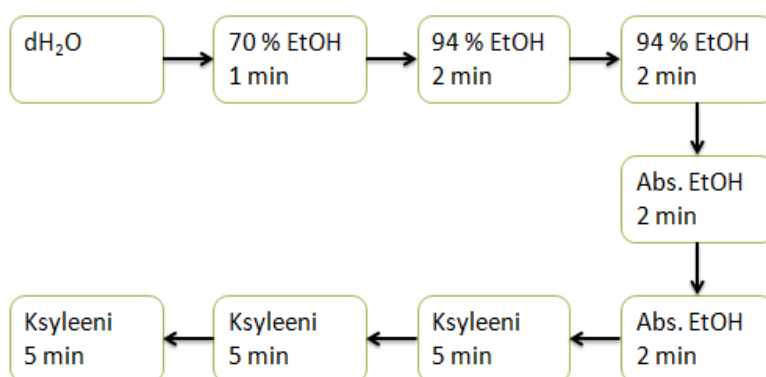
KUVIO 15. Parafiininpoistossa käytetty ohjelma

Näytteille tehtiin endogeenisen peroksidaasin blokkaukseen (REAL Peroxidase Blocking Solution, Dako) inkuboimalla huoneenlämmössä viisi minuuttia. Inku-

boinnin jälkeen näytteet pestiin pesuliuksella kolme kertaa. Vasta-aineen epäspesifisen sitoutumisen ehkäisemiseksi näytteet blokattiin inkuboimalla niitä blokkausliuksessa (10 % Normal Goat Serum, Invitrogen, johon lisätty 5 % rasvatonta maitojauhetta ja 3 % BSA:ta) huoneenlämmössä tunnin ajan. Blokkausliuos ravisteltiin laseilta pois ja näytteille pipetoitiin primäärivasta-aine (Rabbit anti-Metadherin, Invitrogen) laimennettuna 1:250 PBS:llä, jossa 0,1 % BSA:ta. Negatiiviseen IgG-kontrolliin jätettiin blokkausliuos primäärivasta-aineen inkuboinnin ajaksi. Näytteitä inkuboitiin primäärivasta-aineessa + 4 °C:ssa yön yli. Inkuboinnin jälkeen näytteet pestiin pesuliuksella kolme kertaa.

Pesujen jälkeen näytteille pipetoitiin sekundäärivasta-aine (Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP, Dako) laimennettuna 1:100 PBS:llä, jossa 0,1 % BSA:ta. Näytteitä inkuboitiin sekundäärivasta-aineessa huoneenlämmössä tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen näytteet pestiin pesuliuksella kolme kertaa. Pesujen jälkeen näytteitä inkuboitiin DAB-kromogeeniliuksella (Liquid DAB Substrate Chromogen System, Dako) huoneenlämmössä 5 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen näytteet pestiin neljä kertaa tislattulla vedellä.

Vastavärjäys suoritettiin kastamalla lasit nopeasti hematoksyliiniliukseen (Papanicolaou's solution 1a Harris' hematoxylin solution, Merck). Vastavärjäyksen jälkeen näytteitä pestiin 10 minuuttia juoksevassa vesijohtovedessä. Pesun jälkeen näytteet siirrettiin tislattuun veteen. Näytteistä poistettiin vesi viemällä ne läpi nousevan alkoholisarjan ja viimeiseksi ksyleeniin (kuvio 16). Peitinlasit kiinnitettiin näytelaseille Pertex-liuksen avulla. Näytteiden annettiin kuivua ennen mikroskopointia.

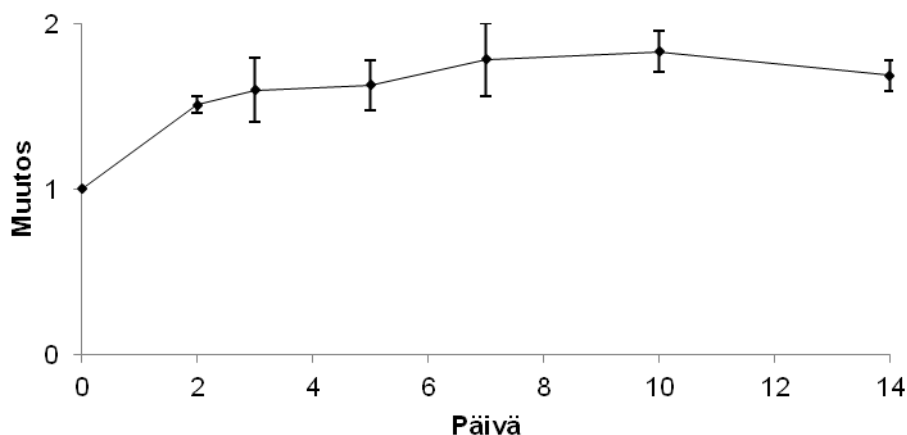


KUVIO 16. Veden poistoon käytetty protokolla

7 TUTKIMUSTULOKSET

7.1 *Metadherin*-geenin ilmentyminen mRNA-tasolla

Rinnakkaisten näytteiden ja kontrollien kynnyssykleistä laskettiin keskiarvo. Kontrollin ja näytteen kynnyssyklarotuksesta laskettiin kynnyssyklin muutos referenssigeenille ja tutkittavalle geenille. *Metadherin*-geenin ilmentyminen referenssigeeniin verrattuna laskettiin Pfafflin menetelmällä sivulla 35 esitetyn kaavan (2) avulla. Kaavassa käytetty alukkeiden tehokkuus β -actin-alukkeille oli 1,974 ja MTDH long -alukkeille 2,099. Eri päivien näytteille lasketut tulokset on esitetty liitteessä 3. Kuviossa 17 on esitetty kuvaaja, joka on piirretty kunkin aikapisteen tulosten keskiarvon muutoksena verrattuna normaaliin ihoon (päivä 0), jolle annettiin arvoksi 1. Keskihajonta kussakin aikapisteessä on esitetty virhepalkeilla.

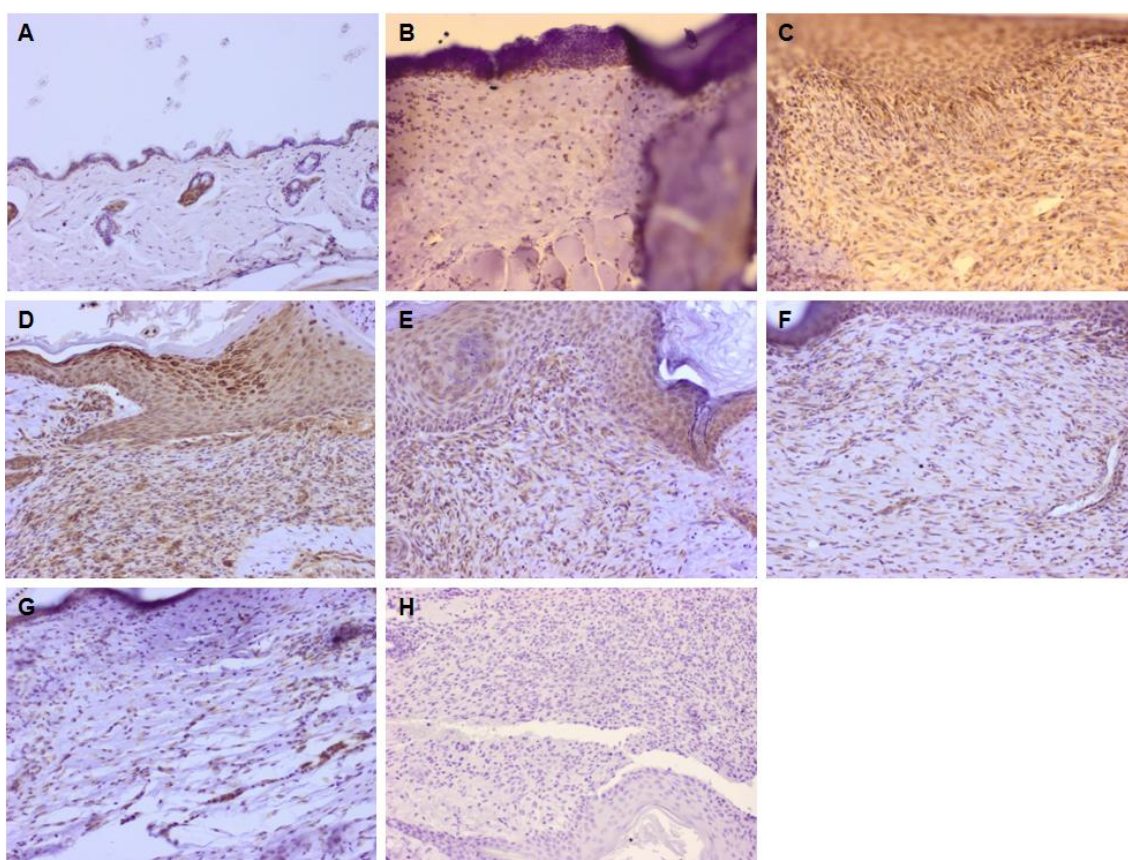


KUVIO 17. *MTDH*-geenin ilmentyminen haavakudoksessa, keskiarvo \pm keskihajonta

7.2 *Metadherin*-geenin ilmentyminen proteiinitasolla

Värjätyistä kudokset havaittiin, että metadheriiniä esiintyy normaalissa ihokudoksessa etenkin karvatupissa (kuva 3A sivulla 39). Toisen päivän haavakudoksessa havaittiin vähäistä esiintymistä dermiksessä (kuva 3B). Viidennen, seitsemännen ja kymmenennen päivän haavakudoksessa metadheriinin esiin-

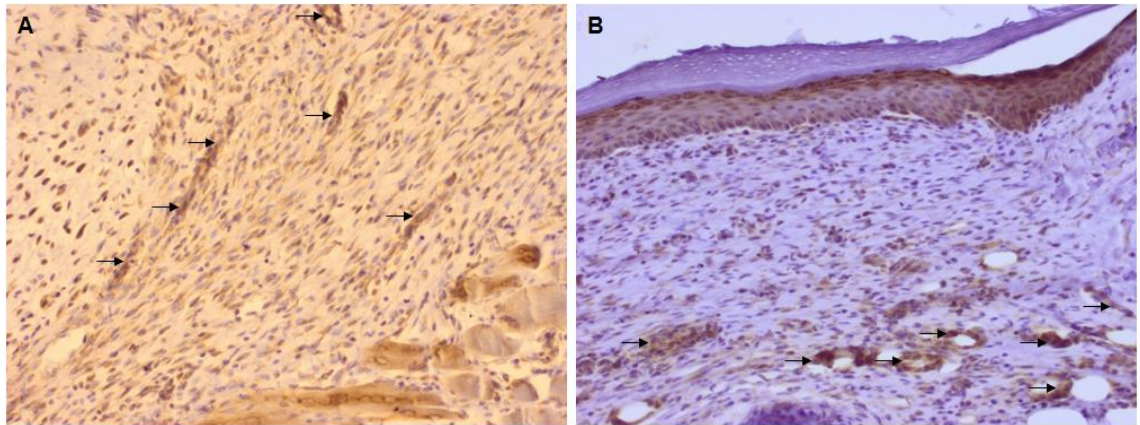
tyminen on voimakasta muodostuvissa kapillaarisuonissa, granulaatiokudoksessa sekä epidermiksessä (kuva 3C–E). Neljännen päivän haavakudoksessa metadheriinin esiintyminen laskee huomattavasti granulaatiokudoksessa ja epidermiksessä (kuva 3F). Kahdennenkymmenennen päivän haavakudoksessa metadheriiniä havaitaan edelleen kapillaarisuonissa, mutta arpikudoksesta ja epidermiksestä se on hävinnyt lähes kokonaan (kuva 3G). Kuvassa 3 on esitetty myös IgG-kontrolli seitsemännen päivän haavakudoksesta (H), johon ei ole lisätty lainkaan primäärivasta-ainetta. Tero Järvinen on kuvannut värjäämäni kudosleikkeet.



KUVA 3. Metadherinin ilmentyminen haavakudoksessa, normaali iho (A), 2. päivän haava (B), 5. päivän haava (C), 7. päivän haava (D), 10. päivän haava (E), 14. päivän haava (F), 21. päivän haava (G) ja IgG-kontrolli, 7. päivän haava (H) (Kuva: Tero Järvinen 2011)

Kuvassa 4 sivulla 40 on esitetty tarkemmin metadheriinin esiintymistä verisuonissa. Viidennen päivän haavakudoksessa (A) havaitaan voimakasta esiintymistä granulaatiokudokseen muodostuvissa kapillaarisuonissa, jotka on osoi-

tettu nuolilla. Myös kehittyvissä lihassoluissa, myotuubeissa, havaitaan metadheriiniä. Kymmenennen päivän haavakudoksessa (B) metadheriinin esiintyminen on edelleen voimakasta kapillaarisuonissa.



KUVA 4. Metadheriinin esiintyminen verisuonissa, 5. päivän haava (A) ja 10. päivän haava (B) (Kuva: Tero Järvinen 2011)

8 POHDINTA

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää *MTDH*-geenin ilmentymistä haavakudoksessa mRNA- ja proteiinitasolla. Tavoitteena oli saada informaatiota geenin ilmentymisestä haavan paranemisen aikana. Aiheesta ei ole julkaistuja tutkimuksia, mutta geenin ilmentymistä on tutkittu aiemmin eri syöpäsairauksissa. Näiden tutkimusten perusteella hypoteesi tutkimuksen alussa oli, että *MTDH*-geeni ilmentyy runsaimmin viidennen ja seitsemännen päivän haavakudoksessa, jolloin angiogeneesi on huipussaan.

Tutkittaessa geenin ilmentymistä proteiinitasolla immunohistokemian avulla saadut tulokset olivat hypoteesin kaltaisia. Geenin ilmentyminen oli runsasta vielä kymmenennen päivän haavakudoksessa, mutta laski sen jälkeen huomattavasti. Tutkimuksessa havaittiin metadheriinin esiintyvän runsaana granulatiokudokseen muodostuvissa verisuonissa. Tämä viittaa siihen, että metadheriini stimuloi angiogeneesiä myös haavan paranemisessa. Aiemmin on osoitettu, että metadheriini säätelee angiogeneesiä kasvaimissa (Emdad ym. 2009, 21303).

Tutkittaessa geenin ilmentymistä mRNA-tasolla qPCR:n avulla geenin ilmentymisessä ei havaittu suurta eroa normaalin ihokudoksen ja haavakudoksen välillä. Tutkimusta sekoittava tekijä voi olla se, että geeni ilmentyy mRNA-tasolla kaikissa kudoksissa (Kang ym. 2005, 10). Immunohistokemialla havaittiin, että geeni ilmentyy proteiinitasolla normaalissa ihokudoksessa etenkin karvatupissa ja epidermiksessä.

Kvantitatiivisessa polymeerasiketjureaktiossa käytettyjen alukkeiden tehokkuus oli 97,4 % (β -actin) ja 109,9 % (*MTDH* long). Yleensä hyväksyttävä tehokkuus on 90–110 % (Applied Biosystems 2011). *MTDH* long -alukkeiden tehokkuus oli aivan hyväksyttävän tehokkuuden ylärajalla. Luotettavan tehokkuuden testausten tulisi kattaa kaikki qPCR:llä tutkittava cDNA (Pfaffl 2004, 100). Tässä tutkimuksessa tehokkuuden testaus suoritettiin näytemateriaalin vähyyden vuoksi vain kolmesta eri cDNA:sta.

Kvantitatiivisessa polymeraasiketjureaktiossa käytetty detektointikemia SYBR Green I sitoutuu epäspesifisesti kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han (Shibley 2006, 16). Tutkimuksessa havaittiin jonkin verran epäspesifisten PCR-tuotteiden muodostumista, mistä ei täysin päästy eroon edes reaktio-olosuhteita muuttamalla. Laite detektoi signaalin myös epäspesifisistä PCR-tuotteista, joten ne ovat ongelma PCR-tuotteen kvantitoinnissa, mikä vaikuttaa menetelmän luotettavuuteen. Myös menetelmän toistettavuudessa havaittiin joitakin ongelmia. Tämän vuoksi tutkimuksessa saadut qPCR-tulokset olisi hyvä varmistaa käyttäen spesifistä detektointikemiaa, jolloin laite havaitsee vain halutun PCR-tuotteen. Vaihtoehtoisesti voisi vielä yrittää optimoida reaktio-olosuhteita sekä käytettävää alukekonsentraatiota.

Tulevaisuudessa Tero Järvisen tutkimusryhmässä on tarkoitus tutkia tarkemmin *MTDH*-geenin roolia angiogeneesin säätelyssä. Tutkimusryhmässä on suunnitelmassa tutkia haavan sulkeutumisen nopeuttamista *MTDH*-geenisiiroilla. Haavan sulkeutumista halutaan tutkia geenisiirtojen avulla myös diabeettisessä haavassa, jossa angiogeneesi on usein paranemista rajoittava tekijä. Lisäksi anti-*MTDH* scFv (single-chain variable fragment) -vasta-aineella halutaan tutkia, voiko vasta-aine kulkeutua verenkierron välityksellä haavakudokseen tarttumalla metadheriiniin.

LÄHTEET

Adams, P. S. 2006. Data analysis and reporting. Teoksessa Dorak M. T. (toim.) Real-time PCR. USA: Taylor & Francis Group, 39–62.

Applied Biosystems. 2011. Real-time PCR: Understanding Ct. Tulostettu 5.7.2011.

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_053906.pdf.

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. & Patel, H. R. H. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5 (2), 209–219.

Baum, C. L. & Arpey, C. J. 2005. Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events. *Dermatologic Surgery* 31 (6), 674–686.

Boenisch, T. 2009. Antibodies. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) *Dako Educational Guide: Immunohistochemical Staining Methods*. 5. painos. USA: Dako North America, 1–10.

Britt, D. E., Yang, D. F., Yang, D. Q., Flanagan, D., Callanan, H., Lim, Y. P., Lin, S. H. & Hixson D. C. 2004. Identification of a novel protein, LYRIC, localized to tight junctions of polarized epithelial cells. *Experimental Cell Research* 300 (1), 134–148.

Brown, D. M. & Ruoslahti, E. 2004. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell* 5 (4), 365–374.

Bustin, S. A. 2004. Quantification of Nucleic Acids by PCR. Teoksessa Bustin, S. A. (toim.) *A–Z of Quantitative PCR*. USA: International University Line, 3–46.

Bustin, S. A. & Nolan, T. 2004. Chemistries. Teoksessa Bustin, S. A. (toim.) *A–Z of Quantitative PCR*. USA: International University Line, 215–278.

Emdad, L., Lee, S. G., Su, Z. Z., Jeon, H. Y., Boukerche, H., Sarkar, D. & Fisher, P. B. 2009. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) functions as an oncogene and regulates angiogenesis. *PNAS* 106 (50), 21300–21305.

Galiano, R. D. & Mustoe, T. A. 2010. Wound Healing. Tulostettu 4.10.2011.

http://www.amazon.com/Greenfields-Surgery-Scientific-Principles-Mulholland/dp/078175626X#reader_B004Z931V2.

Gamble, M. 2008. The Hematoxylin and Eosin. Teoksessa Bancroft, J. D. & Gamble, M. (toim.) *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6. painos. UK: Churchill Livingstone, 121–134.

Hietanen, H., Iivanainen, A., Seppänen, S. & Juutilainen, V. 2002. Haava. Helsinki: WSOY.

Jackson, P. & Blythe, D. 2008. Immunohistochemical Techniques. Teoksessa Bancroft, J. D. & Gamble, M. (toim.) Theory and Practice of Histological Techniques. 6. painos. UK: Churchill Livingstone 433–472.

Kallio, J. 2007. Veren hyytymiseen vaikuttavat lääkeaineet. Teoksessa Koulu, M. & Tuomisto, J. (toim.) Farmakologia ja toksikologia. 7. uudistettu painos. Kuopio: Medicina, 617–640.

Kang, D.C., Su, Z. Z., Sarkar, D., Emdad, L., Volsky, D. J. & Fisher P. B. 2005. Cloning and characterization of HIV-1-inducible astrocyte elevated gene-1, AEG-1. *Gene* 353 (1), 8–15.

Khuda, I. I. E., Koide, N., Noman, A. S. M., Dagvadorj, J., Tumurkhuu, G., Naiki, Y., Komatsu, T., Yoshida, T. & Yokochi, T. 2009. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) is induced by lipopolysaccharide as toll-like receptor 4 (TLR4) ligand and regulates TLR4 signalling. *Immunology* 128 (1pt2), e700–e706.

Kiernan, J. A. 2008. Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice. 4. painos. UK: Scion Publishing Ltd.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. & Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27 (2–3), 95–125.

Lee, M. A., Squirrell, D. J., Leslie, D. L. & Brown, T. 2009. Homogenous Fluorescent Chemistries for Real-Time PCR. Teoksessa Logan, J., Edwards, K. & Saunders, N. (toim.) Real-time PCR. Current Technology and Applications. UK: Caister Academic Press, 23–45.

Lee, S. G., Su, Z. Z., Emdad, L., Sarkar, D. & Fisher P. B. 2006. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) is a target gene of oncogenic Ha-ras requiring phosphatidylinositol 3-kinase and c-Myc. *PNAS* 103 (46), 17390–17395.

Li, J., Zhang, N., Song, L. B., Liao, W. T., Jiang, L. L., Gong, L. Y., Wu, J., Yuan, J., Zhang, H. Z., Zeng, M. S. & Li, M. 2008. Astrocyte Elevated Gene-1 is a Novel Prognostic Marker for Breast Cancer Progression and Overall Patient Survival. *Clinical Cancer Research* 14 (11), 3319–3326.

Logan, J. M. J. & Edwards, K. J. 2009. An Overview of PCR Platforms. Teoksessa Logan, J., Edwards, K. & Saunders, N. (toim.) Real-time PCR. Current Technology and Applications. UK: Caister Academic Press, 7–22.

Mardle, S. 2007. The selection of reporter labels. Teoksessa Renshaw, S. (toim.) Immunohistochemistry: Methods Express. UK: Scion Publishing Ltd., 33–44.

McPherson, M. J. & Møller, S. G. 2000. PCR. UK: BIOS Scientific Publishers.

Monaco, J. L. & Lawrence, W. T. 2003. Acute wound healing: An overview. *Clinics in Plastic Surgery* 30 (1), 1–12.

Naukkarinen, A. & von Boguslawsky, K. 1998. Immunohistokemia. Teoksessa Rantala, I. & Lounatmaa, K. (toim.) *Biologinen valomikroskopia*. Helsinki: Yliopistopaino, 133–159.

National Center for Biotechnology Information. 2011. MTDH metadherin [*Homo sapiens*]. Päivitetty 6.11.2011. Luettu 9.11.2011.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=92140>.

Onley, C. 2007. Antibodies for immunochemistry. Teoksessa Renshaw, S. (toim.) *Immunohistochemistry: Methods Express*. UK: Scion Publishing Ltd., 3–31.

Pfaffl, M. W. 2004. Quantification Strategies in Real-Time PCR. Teoksessa Bustin, S. A. (toim.) *A–Z of Quantitative PCR*. USA: International University Line, 87–120.

Pfaffl, M. W. 2006. Relative quantification. Teoksessa Dorak M. T. (toim.) *Real-time PCR*. USA: Taylor & Francis Group, 63–82.

Ponchel, F. 2006. Real-time PCR using SYBR[®] Green. Teoksessa Dorak M. T. (toim.) *Real-time PCR*. USA: Taylor & Francis Group, 139–154.

Rantala, I., Naukkarinen, A. & Helin, H. 1998. Histologia. Teoksessa Rantala, I. & Lounatmaa, K. (toim.) *Biologinen valomikroskopia*. Helsinki: Yliopistopaino, 65–80.

Renshaw, S. 2007a. Introduction. Teoksessa Renshaw, S. (toim.) *Immunohistochemistry: Methods Express*. UK: Scion Publishing Ltd., 1–2.

Renshaw, S. 2007b. Immunochemical staining techniques. Teoksessa Renshaw, S. (toim.) *Immunohistochemistry: Methods Express*. UK: Scion Publishing Ltd., 45–96.

Ririe, K. M., Rasmussen, R. P. & Wittwer, C. T. 1997. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* 245 (2), 154–160.

Saarelma, O. 2011. Haava. Päivitetty 18.5.2011. Tulostettu 6.10.2011. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00215.

Saunders, N. A. 2009. An Introduction to Real-Time PCR. Teoksessa Logan, J., Edwards, K. & Saunders, N. (toim.) *Real-time PCR. Current Technology and Applications*. UK: Caister Academic Press, 1–5.

Shiple, G. L. 2006. An introduction to real-time PCR. Teoksessa Dorak M. T. (toim.) *Real-time PCR*. USA: Taylor & Francis Group, 1–37.

Singer, A. J. & Clark, R. A. F. 1999. Cutaneous Wound Healing. *The New England Journal of Medicine* 341 (10), 738–746.

Su, Z. Z., Kang, D. C., Chen, Y., Pekarskaya, O., Chao, W., Volsky, D. J. & Fisher, P. B. 2002. Identification and cloning of human astrocyte genes displaying elevated expression after infection with HIV-1 or exposure to HIV-1 envelope glycoprotein by rapid subtraction hybridization, RaSH. *Oncogene* 21 (22), 3592–3602.

UCSC Genome Browser. 2009. Human Gene MTDH. Päivitetty 8.10.2009. Luettu 9.11.2011. <http://genome.ucsc.edu/>.

UniProt. 2011. Protein LYRIC - *Homo sapiens* (Human). Päivitetty 21.9.2011. Luettu 9.11.2011. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q86UE4>.

Vaalasti, A. 2002. Kasvutekijöiden merkitys haavan paranemisessa. Teoksessa Hietanen, H., Iivanainen, A., Seppänen, S. & Juutilainen, V. Haava. Helsinki: WSOY, 33–34.

Wiseman, G. 2009. Real-time PCR: Application to Food Authenticity and Legislation. Teoksessa Logan, J., Edwards, K. & Saunders, N. (toim.) Real-time PCR. Current Technology and Applications. UK: Caister Academic Press, 253–267.

Yoo, B. K., Emdad, L., Lee, S. G., Su, Z. Z., Santhekadur, P., Chen, D., Gredler, R., Fisher, P. B. & Sarkar, D. 2011. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1): A multifunctional regulator of normal and abnormal physiology. *Pharmacology & Therapeutics* 130 (1), 1–8.

Yoo, B. K., Emdad, L., Su, Z. Z., Villanueva, A., Chiang, D. Y., Mukhopdhyay, N. D., Mills, A. S., Waxman, S., Fisher, R. A., Llovet, J. M., Fisher, P. B. & Sarkar, D. 2009. Astrocyte elevated gene-1 regulates hepatocellular carcinoma development and progression. *The Journal of Clinical Investigation* 119 (3), 465–477.

LIITTEET

Liite 1: Tutkimuksessa käytettyjen reagenssien tuotetiedot

Liite 2: Alukkeiden tehokkuuden laskeminen

Liite 3: qPCR-tulokset Pfafflin menetelmällä laskettuna

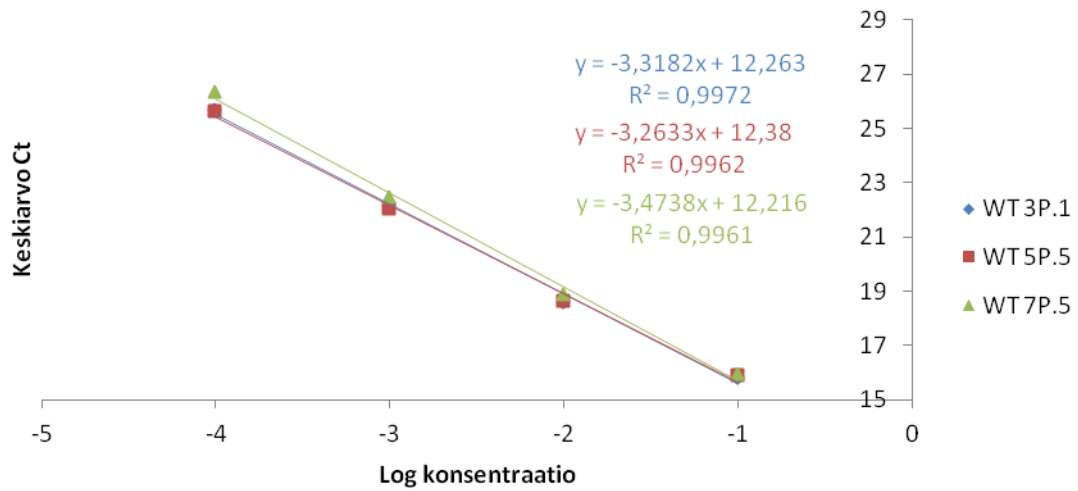
LIITE 1

TUTKIMUKSESSA KÄYTETTYJEN REAGENSSEIEN TUOTETIEDOT

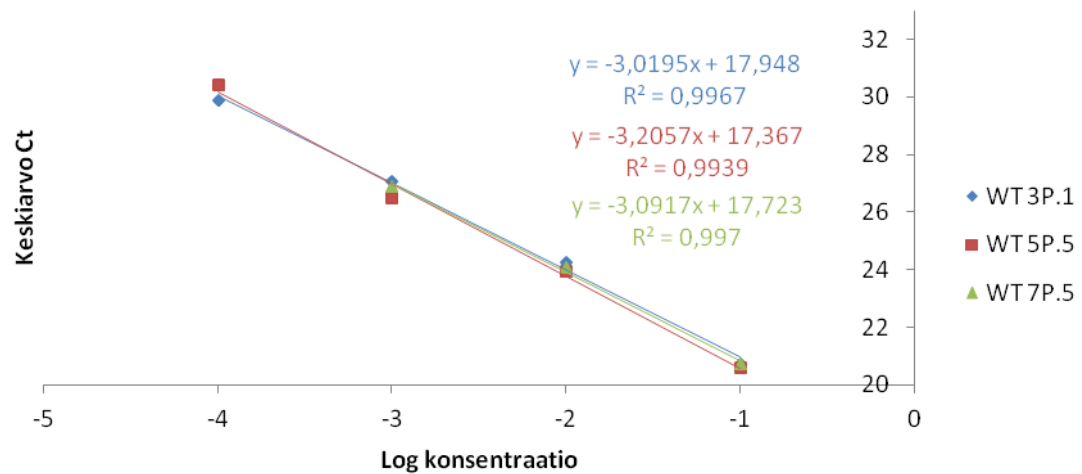
Tuotenimi	Valmistaja	Tuotenumero	Käyttökohde
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen	74704	RNA:n eristys
Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Fermentas Life Sciences	K1642	käänteistranskriptio
Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	Fermentas Life Sciences	K0222	qPCR
REAL Peroxidase Blocking Solution	Dako	S2023	endogeenisen peroksidaasin blokkauk
10 % Normal Goat Serum	Invitrogen	50-062Z	taustavärjäytymisen blokkauk
Rabbit anti-Metadherin	Invitrogen	40-6500	primäärivasta-aine
Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako	P0448	sekundäärivasta-aine
Liquid DAB Substrate Chromogen System	Dako	K3465	kromogeeni
Papanicolaou's solution 1a Harris' hematoxylin solution	Merck	109253	vastavärjäys

ALUKKEIDEN TEHOKKUUDEN LASKEMINEN

β -actin- ja MTDH long -alukkeiden kalibrintikäyrät on esitetty kuvioissa 1 ja 2.



KUVIO 1. β -actin-alukkeiden kalibrintikäyrät.



KUVIO 2. MTDH long -alukkeiden kalibrintikäyrät.

(jatkuu)

LIITE 2: 2 (2)

β -actin-alukkeiden alukkeiden kalibrointikäyrän kulmakertoimen keskiarvo oli kaavan (1) mukaisesti -3,3851 ja tehokkuus kaavan (2) mukaisesti 1,974. MTDH long -alukkeiden kalibrointikäyrän kulmakertoimen keskiarvo oli kaavan (3) mukaisesti -3,1056 ja tehokkuus kaavan (4) mukaisesti 2,099.

$$\frac{(-3,3182)+(-3,2633)+(-3,4738)}{3} = -3,3851 \quad (1)$$

$$10^{(-1/-3,3851)} - 1 = 0,974 = 97,4 \% \quad (2)$$

$$\frac{(-3,0195)+(-3,2057)+(-3,0917)}{3} = -3,1056 \quad (3)$$

$$10^{(-1/-3,1056)} - 1 = 1,099 = 109,9 \% \quad (4)$$

QPCR-TULOKSET PFAFFLIN MENETELMÄLLÄ LASKETTUNA

Näyte	Kontrolli β -actin	Kontrolli MTDH	Näyte β -actin	Näyte MTDH	Ct kontrolli - Ct näyte MTDH	Yhtälön osoittaja	Ct kontrolli - Ct näyte β -actin	Yhtälön nimittäjä	Suhde MTDH/ β -actin
WT P2.2	18,64	22,98	16,47	21,86	1,12	2,29	2,18	4,39	0,52273
WT P2.3	18,64	22,98	16,43	22,08	0,90	1,95	2,22	4,51	0,43213
WT P2.4	18,64	22,98	16,46	21,99	0,99	2,08	2,19	4,42	0,47148
WT P2.5	18,64	22,98	16,91	22,19	0,79	1,80	1,74	3,25	0,55408
WT P2.6	18,64	22,98	17,02	22,28	0,71	1,69	1,63	3,02	0,55857
WT 3P.1	18,64	22,98	16,64	21,77	1,21	2,45	2,01	3,91	0,62728
WT 3P.2	18,64	22,98	16,18	22,91	0,07	1,05	2,47	5,35	0,19702
WT 3P.2	18,64	22,98	16,87	21,61	1,37	2,76	1,78	3,34	0,82588
WT 3P.3	18,64	22,98	17,30	22,23	0,75	1,75	1,34	2,49	0,70365
WT 3P.4	18,64	22,98	17,30	22,42	0,57	1,52	1,34	2,49	0,61118
WT 3P.6	18,64	22,98	16,88	22,01	0,97	2,05	1,77	3,32	0,61811
WT 5P.2	18,64	22,98	17,53	22,33	0,65	1,63	1,12	2,13	0,76139
WT 5P.3	18,64	22,98	16,83	21,92	1,06	2,19	1,82	3,44	0,63867
WT 5P.4	18,64	22,98	17,64	22,73	0,25	1,21	1,00	1,97	0,61202
WT 5P.5	18,64	22,98	16,55	21,92	1,07	2,20	2,10	4,16	0,52990
WT 5P.6	18,64	22,98	16,73	22,52	0,46	1,41	1,92	3,68	0,38242
WT 5P.6	18,64	22,98	17,71	22,35	0,64	1,60	0,94	1,89	0,84787
WT 7P.1	18,64	22,98	17,21	21,85	1,14	2,32	1,44	2,65	0,87430
WT 7P.2	18,64	22,98	16,99	22,38	0,60	1,56	1,65	3,07	0,50802
WT 7P.3	18,64	22,98	17,03	22,24	0,74	1,73	1,61	2,99	0,57914
WT 7P.4	18,64	22,98	17,45	22,22	0,77	1,76	1,19	2,25	0,78501
WT 7P.5	18,64	22,98	16,57	21,81	1,18	2,39	2,07	4,09	0,58478
WT 7P.5	18,64	22,98	17,34	21,94	1,04	2,16	1,30	2,42	0,89319
WT 7P.6	18,64	22,98	15,06	19,40	3,58	14,22	3,58	11,41	1,24584
WT 7P.6	18,64	22,98	15,81	20,69	2,30	5,48	2,84	6,88	0,79746
WT 10P.1	18,64	22,98	16,82	21,93	1,06	2,19	1,83	3,46	0,63200
WT 10P.2	18,64	22,98	17,47	22,16	0,82	1,84	1,18	2,22	0,82914
WT 10P.3	18,64	22,98	17,09	21,78	1,20	2,43	1,55	2,87	0,84845
WT 10P.4	18,64	22,98	17,22	21,60	1,38	2,78	1,43	2,64	1,05562
WT 10P.5	18,64	22,98	17,18	21,88	1,11	2,27	1,47	2,71	0,83780
WT 10P.6	18,64	22,98	16,89	21,71	1,28	2,57	1,76	3,30	0,78025
WT 14D.10	18,64	22,98	17,09	22,14	0,85	1,87	1,55	2,87	0,65210
WT 14D.11	18,64	22,98	17,18	22,21	0,77	1,77	1,46	2,70	0,65576
WT 14D.12	18,64	22,98	17,51	22,17	0,82	1,83	1,13	2,16	0,84859
WT 14D.13	18,64	22,98	17,59	22,71	0,28	1,23	1,05	2,04	0,60040
WT 14D.14	18,64	22,98	17,39	22,21	0,77	1,77	1,25	2,34	0,75642
WT 14D.15	18,64	22,98	16,69	21,90	1,09	2,24	1,96	3,78	0,59153

Kontrolli β -actin = keskiarvo C_t (normaali iho) β -actin-primereilla

Kontrolli MTDH = keskiarvo C_t (normaali iho) MTDH-primereilla

Näyte β -actin = keskiarvo C_t (näyte) β -actin-primereilla

Näyte MTDH = keskiarvo C_t (näyte) MTDH-primereilla