

Annika Ekelund

IL28B-geenipolymorfismi HCV-potilailla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikka

Opinnäytetyö

15.4.2013

Tekijä(t) Otsikko	Annika Ekelund IL28B-geenipolymorfismi HCV-potilailla
Sivumäärä Aika	20 sivua 15.4.2013
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalyttikko
Ohjaajat	osastonylilääkäri Maija Lappalainen opettaja Pia Jokela
<p>Yhtä emästä koskevan IL28B-geenin polymorfismin on todettu vaikuttavan hepatiitti C - potilaan hoitovasteeseen. CC-genotyyppi voidaan yhdistää parempaan hoitovasteeseen kuin CT- tai TT-genotyypit. Potilaan genotyypin tutkiminen tukee hoidon suunnittelua. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia suomalaisten potilaiden genotyyppiä IL28B rs12979860 -geenipolymorfismin suhteen.</p> <p>Tutkimus suoritettiin käyttämällä LightCycler-kemiaan pohjautuvaa reaaliaika-PCR-menetelmää. Monistustuote osoitettiin kaupallisen pakkauksen spesifisillä koettimilla sulamiskäyräanalyyseissä. Potilasnäytteitä tutkittiin 80.</p> <p>Potilaista suurin osa, 51,25 %, oli genotyyppiä CC. Genotyyppiä CT oli 41,25 %, ja genotyyppiä TT oli 7,5 %. Tulokset vastaavat osaltaan aiemmin tehtyjä analyysejä.</p> <p>Tulokset osoittavat, että suomalaisista potilaista suurella osalla on IL28B-geenin alleeli, jonka kantajilla on todettu hyvä hoitovaste hepatiitti C:n lääkityksessä. Käytetyt menetelmät osoittautuivat toimiviksi genotyyppaustutkimusta varten.</p>	
Avainsanat	HCV, genotyyppi, eristys, reaaliaikainen PCR

Author Title	Annika Ekelund Genetic polymorphism of IL28B in hepatitis C patients
Number of Pages Date	20 pages 15 April 2013
Degree	Bachelor of health care
Degree Programme	Biomedical laboratory science
Specialisation option	Biomedical laboratory science
Instructors	Maija Lappalainen, head of department Pia Jokela, lecturer
<p>A single nucleotide polymorphism of the IL28B gene has been proven to associate with response to the treatment of patients with hepatitis C. The response is better in patients with genotype CC compared with CT or TT. Analyzing the patient's genotype supports treatment planning. The objective of this study was to analyze the genotypes of Finnish patients regarding IL28B rs12979860 genetic polymorphism.</p> <p>The study was carried out using the LightCycler chemistry-based real-time PCR method. The sequence of the multiplied product was indicated using melting curve analysis and the specific probes of a commercial kit. 80 patient samples were analyzed.</p> <p>Most of the patients, 51,25%, had the CC allele. 41,25% had the CT allele and 7,5% had the TT allele. The results correlate to previous studies.</p> <p>The results showed that a majority of the Finnish patients had such a genotype of IL28B gene, which is associated with response to medicinal therapy of hepatitis C. The methods used in this study proved functional for the genotyping analysis.</p>	
Keywords	HCV, genotype, extraction, real-time PCR

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Hepatiitti C -virus	1
2.1	Hepatiitti C -viruksen rakenne ja lisääntyminen	1
2.2	Hepatiitti C taudinaiheuttajana	3
2.2.1	Lääkehoito	3
2.2.2	IL28B-geenipolymorfismi	4
3	Geenimonistusmenetelmät	5
3.1	Magneettipartikkelieristys	6
3.2	Polymeraasiketjureaktio	8
3.3	Reaaliaikainen PCR	9
4	Työn tarkoitus	11
5	Työn toteutus	11
5.1	Nukleiinihappoeristys	12
5.2	Reaaliaikainen PCR	12
6	Tulokset ja niiden tarkastelu	13
7	Pohdinta	15
	Lähteet	17

1 Johdanto

Hepatiitti C -virus (HCV) on merkittävin kroonisten maksasairauksien aiheuttaja länsimaissa (Färkkilä 2010). On osoitettu, että polymorfismi IL28b-geenin lähellä vaikuttaa hepatiittipotilaan lääkehoidon vasteeseen. Lisäksi peginterferoni-ribaviriinilääkitys saattaa aiheuttaa voimakkaita sivuvaikutuksia. (Hu ym. 2011: 163–172.) Potilaan hoidon suunnittelussa on syytä pohtia lääkehoidolla saavutettavaa todennäköistä hyötyä suhteessa sen aiheuttamiin haittoihin ja kustannuksiin.

Tässä työssä tutkitaan suomalaisten C-hepatiittia sairastavien potilaiden genotyyppiä IL28B:n suhteen. Mittaukset toteutettiin HUSLAB virologian ja immunologian osastolla maaliskuussa 2013. Työelämäohjauksesta vastaa osastonylilääkäri Maija Lappalainen.

2 Hepatiitti C -virus

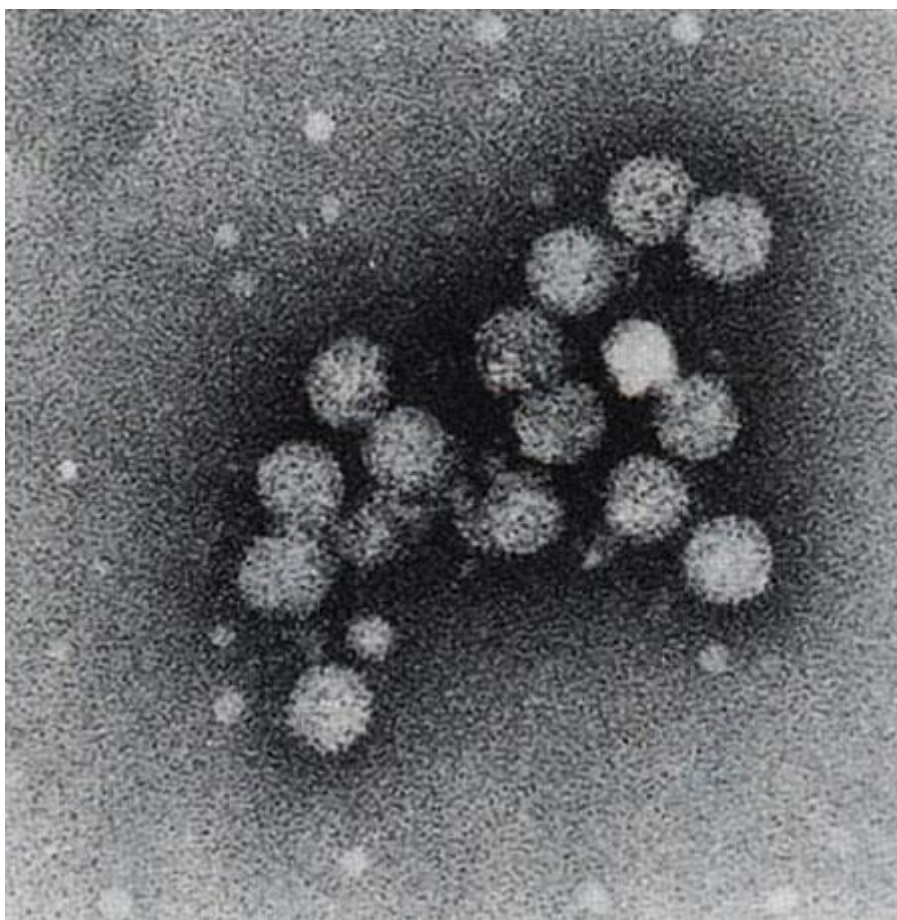
Hepatiitti C kuuluu flaviviruksiin perustuen genomien rakenteeseen ja fysiokemiallisten ominaisuuksiin. Muiden flavivirusten joukossa se muodostaa kuitenkin oman ryhmänsä. Se tarttuu veren ja eritteiden välityksellä. (World Health Organization 2013; Lappalainen – Färkkilä 2010: 578; Lappalainen – Lumio 2003: 500.)

HCV-tartunta verensiirtoinfektiona on harvinainen, sillä Suomessa verenluovuttajat ja verituotteet tutkitaan viruksen suhteen. Suonensisäisten huumeiden käyttäjillä tartunnat ovat yleisiä. (Lappalainen – Färkkilä 2010: 579.)

2.1 Hepatiitti C -viruksen rakenne ja lisääntyminen

Hepatiitti C on halkaisijaltaan noin 50 nm:n kokoinen RNA-virus. Viruksen genotyyppiä on löydetty yksitoista, jotka voidaan jakaa edelleen alatyyppeihin. Genotyyppien välillä ei ole suurta eroa virulenssin tai patogeenisyyden suhteen, mutta rokotteiden kehittämistä se hidastaa. HCV:n genotyyppi vaikuttaa muun muassa sen viruslääkeherkkyyteen ja lääkehoidon suunnitteluun. (World Health Organization 2013; Lappalainen – Färkkilä 2010: 578; Lappalainen – Lumio 2003: 500–502.) Genotyyppiä 1, 2 ja 3

esiintyy maailmanlaajuisesti, yleisimpinä tyypit 1a ja 1b, jotka aiheuttavat arviolta 60 % kaikista infektiosta (World Health Organization 2013). Suomessa genotyyppi 3a aiheuttaa eniten tartuntoja, noin 46 %. Genotyypin 1a ja 1b virus aiheuttaa 35 %, ja genotyypin 2 virus aiheuttaa 17 % infektiosta. (Färkkilä 2010.) Genotyyppien eroavaisuudet sijaitsevat useissa eri genomin kohdissa. Nukleinihapon osoittamiseen PCR-menetelmällä soveltuvat viruksen genomin konservoituneet ei-koodaavat alueet sen 5'- ja 3' päissä. (World Health Organization 2013.)



Kuvio 1. Hepatiitti-C-virus elektronimikroskooppikuvassa (The C. Everett Koop Institute 2013).

Viruksen replikaatiosykliä ei tunneta hyvin. Oletetaan, että se replikoituu samalla lailla kuin muutkin virukset, joilla on positiivisjuosteinen RNA-genomi. HCV:n genomi on yksijuosteinen, ja siinä on yksi pitkä lukukehys. Virus tunkeutuu soluun, ja sen genomi pääsee esiin sytoplasmassa. Genomin transkription seurauksena syntyy komplementaarinen RNA-juoste, joka toimii templaattina positiivisjuosteiselle RNA:lle. (World

Health Organization 2013.) Replikaatio tapahtuu pääsääntöisesti maksasoluissa (Lappalainen – Färkkilä 2010: 578).

2.2 Hepatiitti C taudinaiheuttajana

HCV:n inkubaatioaika voi vaihdella kahdesta kahteentoista viikkoon tartunnasta. Suurin osa infektioista on oireettomia, niistä 85–90 % kroonistuu. Oireinen hepatiitti kehittyy noin 10–15 %:lle infektion saaneista, näistä 48–75 % kroonistuu. (Färkkilä 2010.) Virus aiheuttaa maksasairauksia ja altistaa maksasyövälle. Sen ydinproteiini vaurioittaa mitokondrioita ja lisää oksidatiivista stressiä sekä maksan rasvoittumista. Potilaista miehillä, yli 40-vuotiailla, alkoholinkuluttajilla ja tupakoijilla maksavaurio etenee usein nopeammin. Tavallisin maksansiirron aihe Euroopassa sekä Yhdysvalloissa on C-hepatiitin aiheuttama maksakirroosi. (World Health Organization 2013.)

Maailmassa on arviolta 180 miljoonaa viruksen kantajaa. (Färkkilä 2010; Lappalainen – Lumio 2003: 500–502.) Suomessa ilmoitettiin vuonna 2011 1132 uutta tartuntaa, joista 63 % miehillä ja 37 % naisilla. Tapaukset liittyvät pääosin suonensisäisten huumeiden käyttöön. (Tartuntataudit Suomessa 2011.)

2.2.1 Lääkehoito

Hoitosuositus krooniselle HCV-infektioon on pegyloitu alfainterferoni ja ribaviiriini. Hoitajakson pituus riippuu viruksen genotyypistä. Hoidon suunnittelemisessa ja seurannassa tutkitaan kvantitatiivisesti viruksen nukleinihappoa. (Färkkilä 2010.) Interferonilääkkeen toiminta perustuu antiviraaliseen ja antifibroottiseen vaikutukseen. Ribonukleaaseja aktivoivat proteiinit vapautuvat, jolloin viruksen mRNA hajoaa. Pegyloinnissa interferoniin liitetään polyetyleeniglykoliketju kovalenttisillä sidoksilla, joka pidentää lääkkeen vaikutusaikaa hidastamalla sen imeytymistä ja poistumaa. Kansainvälisessä mittakaavassa monet potilaat eivät reagoi hoitoon. Pegyloidun lääkkeen teho on parempi ja sivuvaikutukset vähäisemmät. Interferonilääke annostellaan subkutaanikudokseen. Ribaviiriini on nukleosidianalogi, joka muistuttaa rakenteellisesti guanosiinia. Se otetaan suun kautta. (Keränen 2006.) Tartuntalain mukaan hoito on potilaalle ilmaista (Tartuntatautilaki 1986/583).

Lääkehoito saattaa aiheuttaa voimakkaita sivuvaikutuksia, jotka saattavat pahimmillaan estää hoidon jatkamisen. (Hu ym. 2011: 163.) Interferonilääkityksen tavallisimpia sivuvaikutuksia ovat flunssan kaltaiset oireet, pahoinvointi, ruokahaluttomuus, ripuli, unettomuus, ärtyisyys, masennus, hiustenlähtö, kuiva iho ja ihon kutina. Leukosytopenian ja neutropenian riskin vuoksi verenkuvat ja neutrofiilit tutkitaan säännöllisesti laboratoriotutkimuksilla. Ribaviriinin kertyminen elimistön punasoluihin voi aiheuttaa hemolyyttistä anemiaa. Lääkeaineen poistumista vähentää munuaisten vajaatoiminta. Ribaviriinin teratogeenisten ominaisuuksien vuoksi on huolehdittava luotettavasta ehkäisystä. (Keränen 2006.) Yhdistelmähoidon vasta-aiheita ovat päihderiippuvuus, sydämen vajaatoiminta, masennus tai psykoosi, neutro- tai trombopenia, epästabili epilepsia, epätsapainoinen diabetes, autoimmuunisairaudet, vaikea sepelvaltimotauti, dekompensoitunut kirroosi, raskaus tai imetys, munuaisten vaikea vajaatoiminta, anemia, hemoglobiнопатiat ja kontrolloimaton verenpainetauti (Färkkilä 2010).

Uudempia spesifisiä viruslääkkeitä, joita käytetään genotyypin 1 viruksen hoitoon, ovat hepatiittiviruksen NS3/4a-proteasiin estäjät telapreviiri ja bosepreviiri. Tutkimustulosten mukaan proteasiinestäjälääkitys yhdistettynä pegyloituun interferoniin ja ribaviriiniin parantaa aiemmin hoitamattomien HCV-potilaiden hoitovastetta 25–30 % ja relapsipotilaiden hoitovastetta 35–64 %. Kolmoislääkityksen myötä lisääntyvät kuitenkin myös sivuvaikutukset ja kustannukset. Uusia spesifisiä lääkkeitä kliiniseen käyttöön on kehitteillä. (Färkkilä 2012.)

2.2.2 IL28B-geenipolymorfismi

IL28-geeni sijaitsee kromosomissa 19 ja koodaa interferoni λ -3:a (Geng ym. 2012: 200–201; Hu ym. 2011: 163–172). Geneettinen yhtä emästä koskeva DNA:n rakenteen muutos eli polymorfismi (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) geenin lähellä vaikuttaa HCV-infektion hoitovasteeseen (Chen ym. 2012: 91–103; Geng ym. 2012: 200; Zhifang ym. 2012; Hu ym. 2011: 163; Aula – Kääriäinen – Palotie 2006). Vaikutuksen mekanismia ei vielä tunneta. Geenin rs12979860- ja rs8099917-SNP:n alleeleja voidaan käyttää ennustamaan hoidon vaikutusta. (Chen ym. 2012 91–103; Zhifang ym. 2012; Geng ym. 2012: 200; Hu ym. 2011: 163–172.)

IL28B-geenipolymorfismin ja HCV:n hoitovasteen välinen yhteys on todettu meta-analyseissa. Tutkijat Chen, Liu, Mahato, Wang, Xu ja Zhao raportoivat IL28B-

polymorfismia koskevassa analyysissään, että rs12979860:n genotyyppi CC liittyy viruksen poistumiseen potilaan seerumista (engl. sustained virological response, SRV) peginterferoni-ribaviriinihoitoa saavilla potilailla. Hu ym. saivat samanlaisia tuloksia analyysistään. Lisäksi analyysin perusteella CT-genotyypin potilaiden hoitovaste oli parempi kuin TT-potilaiden. Myös Geng Wang ja Wu raportoivat CC-genotyypin potilaiden saavuttavan huomattavasti useammin SRV:n lääkehoidon avulla. Kansainvälisesti Aasialaisilla potilailla esiintyy eniten rs12979860 genotyyppiä CC, joka liittyy parempaan hoitovasteeseen. Myös eurooppalaisilla potilailla esiintyy tätä genotyyppiä huomattavasti useammin kuin afrikkalaisilla. (Hu ym. 2011: 163)

HCV-infektion hoitovasteen ennustaminen perustui potilaan genotyypityksen lisäksi myös viruksen genotyypin tutkimiseen. Genotyypin 2 ja 3 potilaiden lääkehoidolla saavutetaan todennäköisemmin hyvä hoitovaste kuin genotyypin 1 virusta sairastavien potilaiden hoidolla (Hu ym. 2011: 164; Färkkilä 2010). Genotyypausmenetelmien kehittäminen ja väestön genotyypin selvittäminen tukee tällöin potilaiden hoidon suunnittelua.

3 Geenimonistusmenetelmät

Virologian rutiinidiagnostiikan osana ovat jo vuosia olleet geenimonistusmenetelmät. Ne ovat herkempiä kuin muut virusdiagnostiikan menetelmät, ja niiden avulla voidaan potilasnäytteestä monistaa pienikin määrä nukleiinihappoa. (Hedman ym. 1999.)

Näytteessä olevan DNA:n tai RNA:n eristämiseen käytettäviä menetelmiä ovat fenolikloroformiuutto ja silikapylväsmenetelmä (Suominen – Ollikka 2003: 63). Automatisoidulla laitteella voidaan eristää nukleiinihappoja käyttäen magneettipartikkeleihin perustuvaa menetelmää. (Haajanen – Pelkonen – Pärssinen – Suominen 2010: 166.)

Eristämisen jälkeen valittu geenialue monistetaan ja detektoidaan. Geeni voidaan monistaa useilla eri menetelmillä, joista yleisimmin käytetään polymeraasiketjureaktiota (PCR), ligaasiketjureaktiota (LCR) ja transkriptiovälitteistä menetelmää. Kohdegeeniin sitoutuvan koettimen lähettämän signaalin monistumista voidaan myös mitata. (Hedman ym. 1999.)

Laboratorioympäristön tulee täyttää analytiikan asettamat vaatimukset nukleiinihappo-analyseissä (Hopkins 2008: 22). Geenimonistustyöskentelyssä on otettava huomioon kontaminaatoriskin minimoiminen. Näytteeseen saattaa joutua esimerkiksi aerosoli-kontaminaation seurauksena ulkopuolista nukleiinihappoa. Kontaminantti monistuu PCR-menetelmällä ja aiheuttaa tutkimuksen epäonnistumisen. Kontaminaation välttämiseksi on myös tärkeää erottaa toisistaan tilat, joissa näytteitä käsitellään ennen monistusta ja sen jälkeen. (Hopkins 2008: 22–23.) Taulukossa 1 on esitelty geenimonistustyössä käytettyjä varotoimenpiteitä, joilla ehkäistiin kontaminaation syntymistä.

Taulukko 1. Varotoimenpiteet geenimonistustyössä.

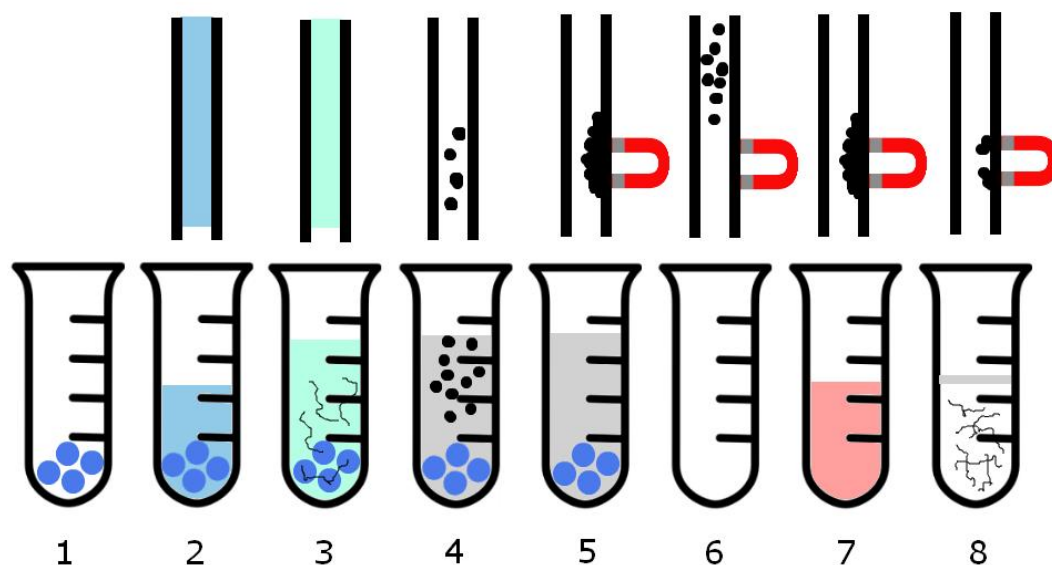
tilojen puhtausasteen huomioiminen
työskentely laminaarikaapissa
filtterilliset pipetinkärjet
negatiiviset kontrollit
suojakäsineet
työtakki
näyteputkien käsitteleminen sentrifugointi korkissa olevien pisaroiden poistamiseksi korkin avaaminen imukykyisen lapun avulla
laitteiden sekä tilojen puhdistaminen ennen ja jälkeen työskentelyn emäksiset detergentit UV-valo

Myös turvallisuus työskentelyssä on syytä ottaa huomioon. Turvallinen työympäristö tukee laadun ylläpitämistä. Hyviin laboratoriokäytäntöihin kuuluu muun muassa liuosten käsittely ja jätehuolto turvallisesti. (Hopkins 2008: 22–23; Bustin – Nolan 2004. Good laboratory practice!: 126.) Vaarallisten aineiden käsittelemisen vähentämiseksi suositetaan usein kaupallisia tuotteita, jotka on valmiiksi optimoitu tietylle näytteelle (Rossi – Saunders 2008: 59).

3.1 Magneettipartikkelieristys

Ennen monistamista verinäytteen DNA eristetään ja puhdistetaan monistamista varten lasisten magneettipartikkeleiden käyttöön perustuvalla menetelmällä. Verisolujen nukleiinihappo eristetään Rothen valmistamalla MagNA Pure LC -

magneettipartikkeliautomaatilla. Tällöin lasipartikkelit on päällystetty silikalla, joka sitoo DNA:ta. DNA erottuu magneetin avulla. DNA:n nukleiinihapot denaturoituvat ja tarttuvat partikkelin pintaan. Pesemällä poistetaan ylimääräiset aineet, jonka jälkeen DNA eluoidaan. (MagNa Pure LC Operator's Manual 2007; Fiebelkorn ym. 2002.)



Kuvio 2. DNA:n eristäminen magneettipartikkelimenetelmällä (MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Large Volume 2011: 19–20).

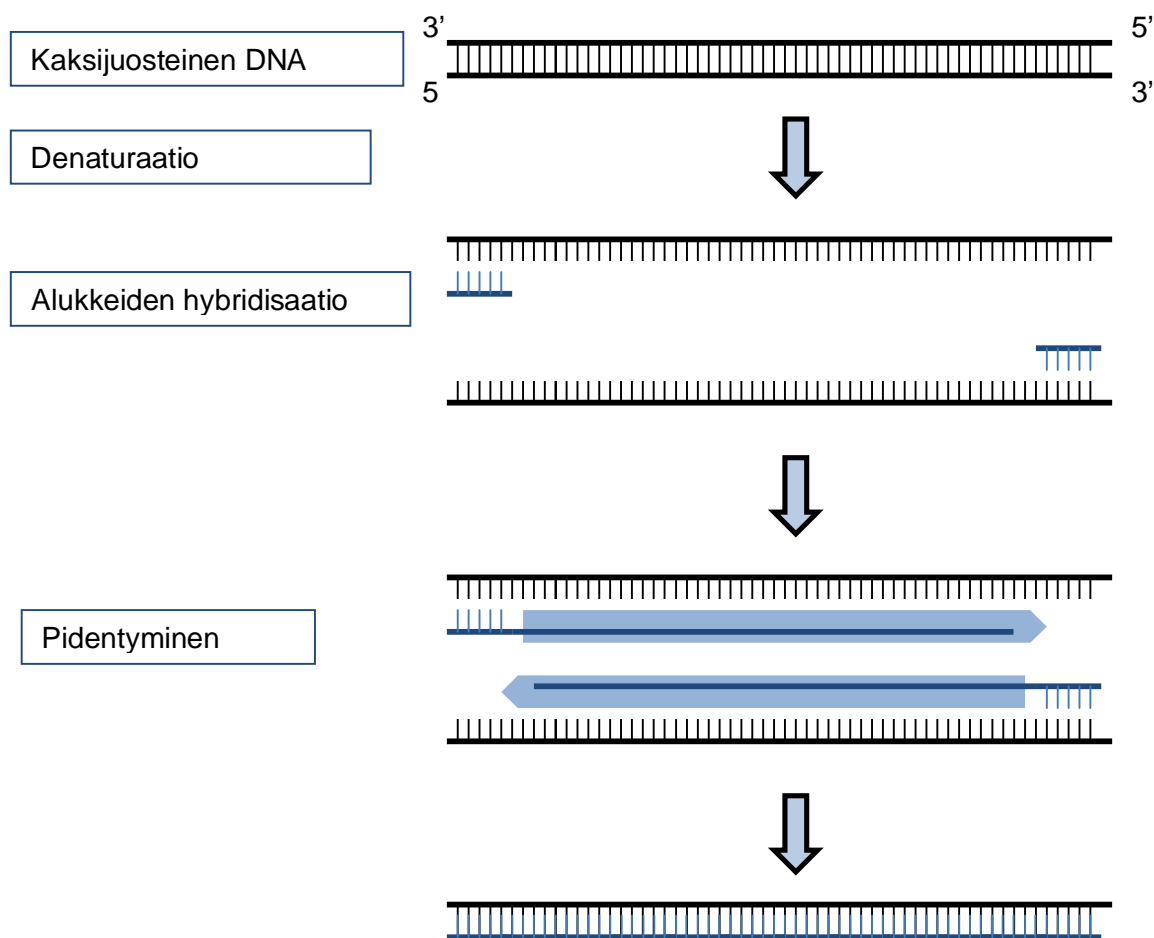
Kuviossa 2 on kuvattu menetelmän periaate. Näyte on asetettu analysaattoriin näyteastiaan (1). Näytteeseen lisätään proteinaasi K, jolloin proteiinit hajoavat (2). Näyteastiaan lisätään lyysispuskuri, joka hajottaa solujen kalvorakenteet vapauttaen nukleiinihapon ja denaturoi nukleaasientsyymien (3). DNA sitoutuu näyteastiaan lisättäviin magneettipartikkeleihin. Partikkeleiden suolapitoisuus, isopropanoli ja lyysispuskurin ionivahvuus aiheuttavat sitoutumisen (4). Partikkelit erotetaan magneetilla jäännösnäytteestä (5). Toistuva partikkelien peseminen poistaa sitoutumattomat aineet ja laskee kaatrooppista suolakonsentraatiota (6). Partikkelit erotetaan pesun jälkeen magneettisesti pesupuskurista (7), jonka jälkeen puhdistettu DNA eluoidaan magneettipartikkeleista näyteastiaan (8). (MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Large Volume 2011: 19–20.)

3.2 Polymeraasiketjureaktio

PCR on menetelmä, jossa DNA-jakso monistuu lähes eksponentiaalisesti (Teophilus 2005: 63). Polymeraasiketjureaktion spesifisyys, nopeus ja herkkyys ovat tehneet menetelmästä yhä yleistyvemmän erityisesti virusdiagnoosikassa. Sen yleistyminen puolestaan on aiheuttanut suuria muutoksia molekyylibiologiaan. (Bustin 2004: 5.) Menetelmän kehitystä on kiihdyttänyt siihen tarvittavien erilaisten entsyymien eristäminen ja käyttöönsoveltaminen (Rapley 2005: 1).

PCR-monistusreaktiota varten valmistetaan reaktioliuos, Master Mix, joka sisältää näyttää lukuun ottamatta kaikki ainesosat, jotka tarvitaan monistusreaktioon. Tavallisimmin liuoksessa on alukkeet, nukleotidit, polymeraasientsyymi, koettimet, puskuri ja kationi, kuten magnesiumkloridi. Alukkeet ovat nukleotidijaksoja, jotka kiinnittyvät monistettavan geenialueen päähän, jonka jälkeen dNTP-nukleotideistä muodostuu uusi juoste. Polymeraasi monistaa geenin, ja fluoresenssileimatut koettimet kiinnittyvät monistettuun tuotteeseen. Puskuri säätelee reaktion pH-olosuhteet. Kationit, kuten magnesium, muodostavat kompleksin dNTP:n kanssa ja tekevät polymeraasientsyymille substratin. Magnesiumkonsentraatio määrää reaktion spesifisyyden, suuri pitoisuus johtaa epäspesifiin reaktioon. (Haajanen ym. 2010: 162; Keer 2008: 146–147; Teophilus 2005: 63–65.)

PCR-monistus tapahtuu sykleissä, joissa toistuvat kolme eri lämpötiloissa tapahtuvaa vaihetta: denaturaatio, jossa DNA:n juosteet irtoavat toisistaan, alukkeiden hybridisointuminen (engl. annealing) sekä pidentyminen, jolloin DNA-templaatile syntyy vastinjuoste. Syklejä toistetaan kunnes on saavutettu tarvittava määrä kopioita. Monistettava DNA-jakso määräytyy monistettavaan malli-DNA-juosteeseen sitoutuvien oligonukleotidialukkeiden mukaan. (Teophilus 2005: 63–65.)



Kuvio 3. PCR:n vaiheet

Yksinkertaisimmillaan PCR-monistuksessa syntynyt tuote voidaan osoittaa agarosigeelielektroforeesissa, missä saadaan selville syntyneen monistustuotteen pituus. Kuitenkin monistustuotteen oikean sekvenssin varmistamiseksi osoituksessa käytetään useimmiten koetinta. Southern blot -analyysissä elektroforeesilla erotellut DNA:n fragmentit siirretään kalvolle, ja niihin hybridisoituu komplementaarinen koetin. Monistustuotteen osoittaminen koettimen avulla voidaan tehdä myös ilman elektroforeesia esim. liuoshybridisaatiolla. (Rapley 2005: 4–5.)

3.3 Reaaliaikainen PCR

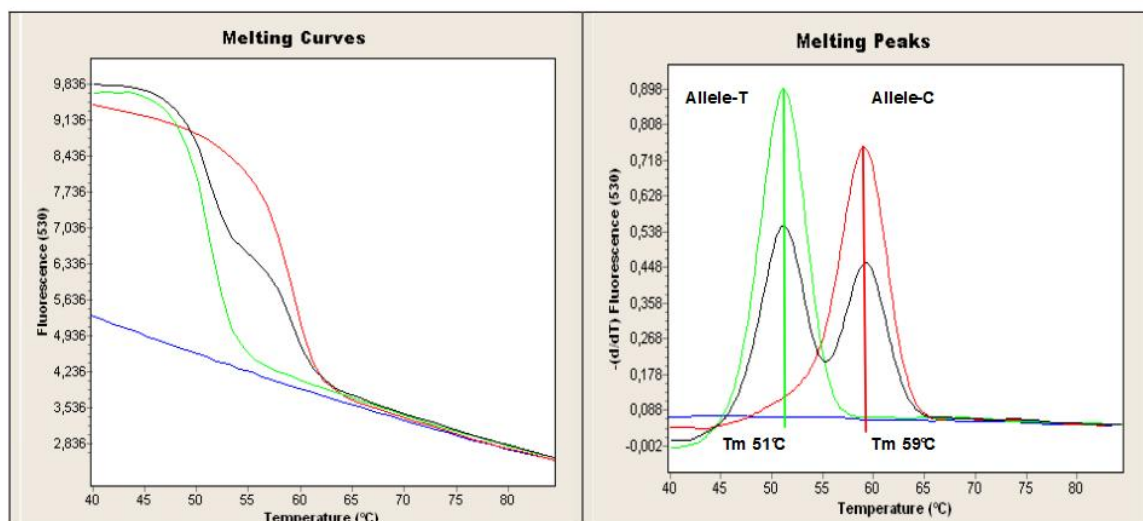
Reaaliaikainen PCR yhdistää monistamisen ja fluoresenssidetektion, jolloin jokaisen syklin jälkeen voidaan havaita DNA:n määrä. Fluoresenssiemission määrä on suoraan verrannollinen monistustuotteen määrään, ja sen perusteella voidaan tulkita monistu-

mista reaaliajassa. Fluoresenssin aiheuttaa DNA:han sitoutunut leimattu koetin tai fluorofori. Leima voi sitoutua kaksijuosteiseen DNA:han epäspesifisesti tai hybridisoitua spesifisesti kohdealueelle. (Ponchel 2006: 139; Sudgen 2005: 328–329.)

Hydrolyysikoetin TaqMan on käytetyimpiä detektiomenetelmiä reaaliaika-PCR:ssä. Tyypillisimmin koettimen 5'-päähän on liitetty fluorofori ja 3'-päähän vaimennin. Laitteen valonlähde virittää fluoroforin, jolloin vaimennin vaimentaa sen emittoiman fluoresenssin fluoresenssi-resonanssi-energiansiirtoilmiön (engl. fluorescence resonance energy transfer, FRET) avulla. Kun fluorofori ja vaimennin ovat toistensa läheisyydessä, fluoresenssisignaalia ei synny. Koetin hybridisoituu PCR-syklin toisessa vaiheessa. Taq-polymeraasi valmistaa synteettisen juosteen pidennysvaiheessa, jolloin sen eksonukleaasiaktiivisuus heikentää koettimen, ja fluorofori irtoaa. Kun fluorofori etäänny vaimentimesta, vaimennus loppuu. Laite havaitsee fluoresenssin, jonka määrä on suoraan verrannollinen DNA-templaatin määrään reaktiossa. (Sudgen 2005: 332–334; Bustin & Nolan 2004. *Chemistries*: 244–245.)

LightCycler-menetelmässä koetin on leimattu SimpleProbe 519 -leimalla (TIB MOLBIOL 2012: 3). HybProbe-teknologiassa käytetään kahta oligonukleotidiä, joissa on fluoreseiini- ja fluoroforileimat. Koettimet hybridisoituvat kohdealueelle vierekkäin PCR-syklin toisessa vaiheessa. Laitteen valonlähde virittää fluoreseiinin, joka emittoi vihreää fluoresoivaa valoa. Fluoreseiinin energia virittää fluoroforin FRET-ilmiön avulla. Fluorofori emittoi punaista fluoresoivaa valoa, jota mitataan aina alukkeiden hybridisoitumisvaiheen lopussa. (LightCycler FastStart DNA Master HybProbe 2011: 18–19.) LightCycler on monikanavalaite, joka mittaa fluoresenssiä kuudella eri aallonpituudella: 530, 560, 610, 640, 670 ja 705 nm. Lasikapillaarien käyttäminen mahdollistaa nopean reaktion, sillä tavoitelämpötilan saavuttamiseen kuluu vain vähän aikaa. (Roche Diagnostics 2006: 72).

Sulamiskäyräanalyysi selvittää monistustuotteen sekvenssin. Analyysissa lämpötilaa lasketaan monistamisen jälkeen, jolloin spesifi koetin irtoaa vetysidosten määrän mukaisesti, ja fluoresenssi vähenee. Laitteen ohjelmisto ilmaisee fluoresenssin määrän kuvaajan avulla. (TIB MOLBIOL 2012: 8; Keer 2008: 139–140.) Kuviossa 4 on kuvattu sulamiskäyräanalyysin mukainen kuvaaja.



Kuvio 4. Tyypillinen sulamiskäyrä ja sulamishuiput kontrolleille IL28B-määrittämisessä (TIB MOLBIOL 2012: 4).

Sulamiskäyrä laskee kullekin genotyypille tyypillisesti samalla kun näytteen lämpötila laskee. Sulamishuiput kuvaavat muutosta fluoresenssin määrässä suhteessa lämpötilaan.

4 Työn tarkoitus

Työn tavoitteena on selvittää suomalaisten hepatiitti-C-potilaiden genotyyppijakaumaa pienellä otoksella IL28B:n suhteen tutkimalla 80: potilaan genomia. Genotyypin perusteella voidaan arvioida lääkehoidon onnistumista ja sitä kautta tarpeellisuutta.

Tällaista tutkimusta ei ollut aiemmin tehty Suomessa. Tavoitteena oli, että työn tuloksena saataisiin aineistoa, jonka avulla voitaisiin arvioida suomalaisen HCV-potilaan lääkettä jatkossa.

5 Työn toteutus

Näytteiden valmistelu ja työn mittaukset suoritettiin HUSLAB virologian ja immunologian osastolla. Työn suoritusta ohjasi osastonylilääkäri Maija Lappalainen.

Näytteitä tutkittiin yhteensä 80 kappaletta. Näytteistä osa oli HUS:n gastroenterologian klinikan potilaiden näytteitä, ja osa oli geenimonistuslaboratoriossa aiemmin tutkittuja näytteitä. Näyteastioissa antikoagulanttina oli EDTA. Osa näytteistä oli tuoreita, ja osa oli pakastettuja.

5.1 Nukleiinihappoeristys

Eristämiseen käytettiin Rochen MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Large Volume - tuotepakkausta. Näytteet laimennettiin ennen eristämistä Rochen lyysispuskuriinlyyrispuskuriin, joka hajotti solurakenteita. Laimennussuhde oli 1:2. Pakkaus sisälsi pesupuskurit, joilla poistetaan tuotteesta PCR-estäjät, suolat sekä proteiinit. Pakkauksen lyysispuskuri hajotti solut ja sitoi DNA:n. DNA sitoutui magneettipartikkelien silikaan ja se eluoiitiin eluointipuskurin avulla näyteastiaan. Proteinaasi K poisti proteiineja. (Roche Applied Science 2011: 3.)

Laimennettua näytettä pipetoitiin 400 µl kuoppalevyille, josta kone eristi 100 µl DNA-templaattia. Templaattit analysoitiin genotyypin suhteen vuorokauden kuluessa eristyksestä.

5.2 Reaaliaikainen PCR

Analysointiin käytettiin valmista LightMix Kit IL28B T-3176C -tuotepakkausta, jota valmistaa TIB MOLBIOL. Tuotepakkausta käytetään rs12979860-SNP:n alleelin määrittämiseen DNA-näytteestä. Yhdessä tuotepakkauksessa on materiaalia 64:ä reaktiota varten. Tuotepakkaukseen kuuluu alukkeet, koettimet ja kolme vakiota, joiden avulla genotyyppi määritetään. Ne liuotettiin käyttövalmiiksi PCR-tutkimusta varten. Vakioita ovat heterotsygootti CT-alleeli, TT-alleeli ja CC-alleeli. (TIB MOLBIOL 2012.) Vakiot valmistettiin rekombinaatiolaboratoriossa kontaminaation välttämiseksi.

Tutkimuksessa käytettävä Master Mix -liuos valmistettiin käyttämällä Rochen LightCycler FastStart DNA Master HybProbe -tuotepakkausta, joka sisältää polymeraasientsyymiä, puskurin, magnesiumkloridin ja dNTP:t (LightCycler FastStart DNA Master

HybProbe 2011: 3). LightMix-tuotepakkauksen alukkeet ja koettimet lisättiin liuokseen. Master Mix valmistettiin puhtaassa tilassa.

Tutkimusta varten DNA-templaattit analysoitiin genotyypin selvittämiseksi Rochen valmistamalla LightCycler 2.0 -reaaliaika-PCR-laitteella. LightMix-tuotepakkauksen spesifisten alukkeiden avulla monistettiin 139 emäsparia pitkä juoste. SimpleProbe 519 -reagenssilla leimattu koetin on fluoresoiva silloin kun se on sitoutunut vastinjuosteesseen. Koetin sitoutuu mutaatiokohtaan. Sulamiskäyräanalyysissä koetin irtoaa lämpötilan vähenemisen seurauksena. Tällöin koettimen emittoima fluoresenssi vähenee tuotteessa. Monistustuotteen sulamispisteen mukaan määritetään monistustuotteen genotyyppi tunnettujen vakioden avulla. (TIB MOLBIOL 2012: 8.) Analyysissä fluoresenssia mitataan aallonpituudella 530 nm. Jokaisen reaaliaika-PCR-analyysin tuli sisältää negatiivinen kontrolli (H₂O) sekä vakiot.

LightCycler-laitteen hallinnoimiseen käytettiin valmistajan tietokoneohjelmistoa, LightCycler Software Version 4.0. Sen avulla laitteelle tehtiin nelivaiheinen ohjelma, jossa ensin näyte denaturoidaan ja entsyymi aktivoidaan, sitten monistetaan kohdesekvenssi, tunnistetaan sekvenssi sulamisanalyysin avulla ja jäädytetään lopuksi laite. (TIB MOLBIOL 2012: 10.)

Taulukko 2. LightCyclerin monistusohjelman vaiheet.

	Vaihe 1	Vaihe 2	Vaihe 3	Vaihe 4
Syklit	1	45	1	1
Kohdelämpötila (° C)	95	95–60–72	95–43–75	40
Kesto (s.)	10	5–10–15	20–20–0	30

8 µl Master Mix -liuosta pipetoitiin lasikapillaareihin, jonka jälkeen näytettä lisättiin 2 µl. Kapillaarit sentrifugoitiin, jotta materiaali asettui kapillaarin alaosaan. Tietokoneohjelmiston avulla määritettiin genotyyppaukseen käytettävä aallonpituus, kontrollit ja vakiot.

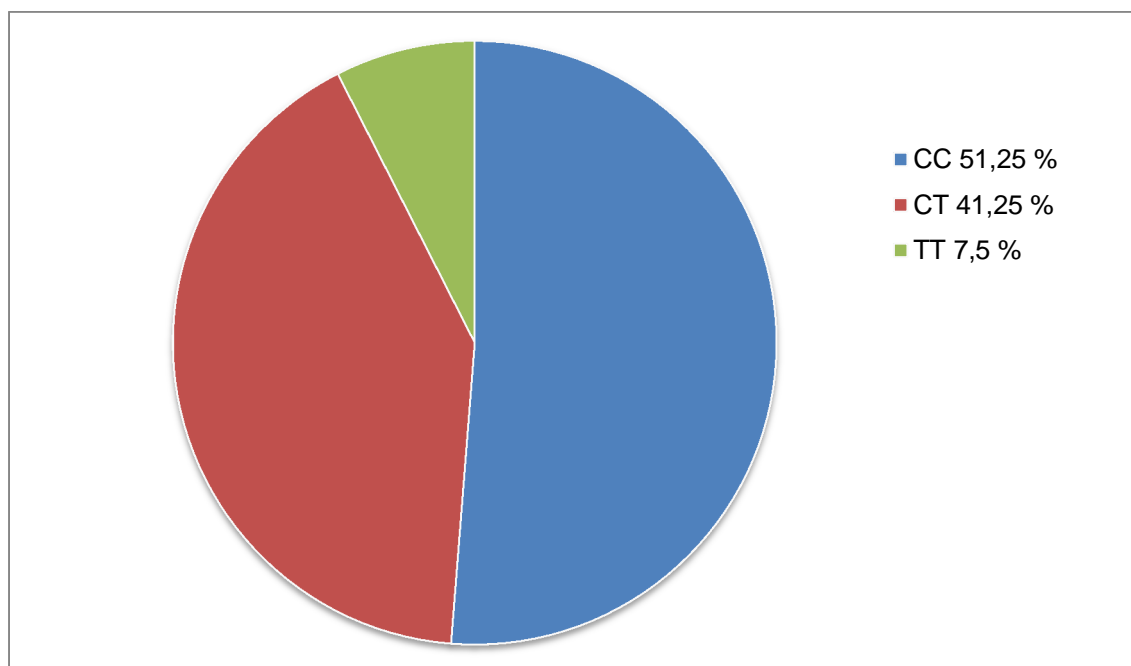
6 Tulokset ja niiden tarkastelu

Näytteitä analysoitiin yhteensä 80 kappaletta. Näistä hieman yli puolella (51,25 %) oli CC-alleeli, joka voidaan yhdistää hyvään hoitovasteeseen. 41,25 % potilaiden genomeista oli CT-alleelia, ja 7,5 % oli TT-alleelia. Tulokset on esitelty taulukossa 3.

Taulukko 3. Kaikkien näytteiden tulokset kappalemäärittäin.

CC	CT	TT	yht.
41 (51,25 %)	33 (41,25 %)	6 (7,5 %)	80

Chen ym. ovat meta-analyysissä tutkineet myös pohjoismaisia potilaita. Tutkimuksessa raportoiduista 441:sta norjalaisista ja ruotsalaisista HCV-potilaista 39,7 % (175 kpl) oli CC-genotyyppiä. 60,3 % potilasta oli vastaavasti CT- tai TT-genotyyppiä. Lääkehoidon avulla 292 potilasta oli saavuttanut SRV:n. Näistä 47,6 % (139 kpl) oli genotyyppiä CC ja 52,4 % (153 kpl) genotyyppiä CT tai TT. Tutkimusmateriaalista käy ilmi, että CC-genotyyppin potilailla oli todennäköisemmin hyvä hoitovaste. 79,4 % näistä potilaista saavutti SRV:n. Otoksen hepatiittipotilaista CC-genotyyppin potilaita oli lähes kaksi viidestä. Tässä tutkimuksessa CC-genotyyppin potilaita oli 51,25 %, eli vähemmän kuin toisista pohjoismaalaisista potilasta koostuvassa otoksessa. CT- ja TT-genotyyppin potilaita oli yhteensä 48,75 %. Otoksen genotyyppien jakautuminen on esitelty kuviossa 5.



Kuvio 5. Alleelien esiintyvyys tutkimustulosten mukaan.

23 tutkitun HCV-potilaan genotyypit jakautuvat seuraavasti: CC-genotyyppin potilaita oli 10 (43,48 %), CT genotyyppin potilaita oli 11 (47,83 %) ja TT-genotyyppin potilaita oli 2 (8,7 %). Potilaiden jakauma viruksen genotyyppien mukaan on kuvattu taulukossa 4.

Taulukko 4. HCV-potilaiden genotyypit viruksen genotyypin mukaan

	GT1b (6 kpl)	GT2b (8 kpl)	GT3a (9 kpl)
CC	2	6	2
CT	3	2	6
TT	1	0	1

Virusinfektiota sairastavien potilaiden tulokset genotyypin suhteen vastaavat hyvin koko otoksen tuloksia. On silti otettava huomioon, että tutkittujen HCV-potilaiden määrä on huomattavasti pienempi kuin koko otoksen määrä.

7 Pohdinta

Tämän työn tavoitteeksi oli asetettu suomalaisten potilaiden genotyypin selvittäminen IL28B-geenipolymorfismin suhteen. Geneettinen polymorfismi yhdistetään hepatiitti C:n viruslääkehoidon hoitovasteeseen.

Tavoitteen mukaan työssä oli tarkoitus tutkia 80 HCV-potilaan kokoverinäytteet. Tutkimukseen oli määrä ottaa 40 näytettä potilaista, jotka sairastavat genotyypin 1 HCV:tä, 15 genotyypin 2 näytettä, 15 genotyypin 3 näytettä sekä 10 tervettä kontrollinäytettä. Näytteiden keräämisessä kohdattiin kuitenkin vaikeuksia, ja todellisuudessa HCV-potilaiden näytteitä oli 23 kappaletta. Näytteiden saamisen pitkittyessä tutkimusmateriaaliksi otettiin muiden potilaiden kokoverinäytteitä. Näytteille oli geenimonistuslaboratoriossa tehty HHV6-viruksen nukleiinihapon osoitus. 57 genotyyppiä tutkittiin muista virologian osaston geenimonistuslaboratorion kokoverinäytteistä. Oletetaan, että tutkimuksen kannalta tällä ei ole merkitystä, sillä virusinfektio ei vaikuta ihmisen genotyyppiin.

LightMix-tuotepakkaukseen kuuluvaa Master Mix -liuosta oli 128 reaktioon, mutta jokaiseen analyysiin sisältyi neljä kontrollia ja vakiota. Lisäksi ensimmäinen PCR-monistus epäonnistui, sillä vakioissa tapahtui kontaminaatio. Myös pipetoinnissa tapahtuva liuoksen hukka vähensi Mixin määrää. Näistä syistä tutkimustuloksia saatiin vain 80 näytteelle. 80 oli kuitenkin potilastuloksille asetettu tavoite, joka täyttyi tutkimuksessa.

Tulosten perusteella potilaskannasta suurella osalla on rs12979860-alleelin CC-genotyyppi, jolla on todettu hyvä hoitovaste. Näiden potilaiden kohdalla lääkehoidolla voidaan todennäköisemmin saavuttaa viruksen poistuminen potilaan seerumista.

Tutkimuksessa käytetty menetelmä oli toimiva ja antoi luotettavia tuloksia. Ensimmäinen monistusanalyysi epäonnistui pipetointivirheen vuoksi, jolloin kontrollisulamiskäyrät eivät vastanneet tavoitetta. Muut PCR:t onnistuivat moitteettomasti huolellisen työskentelytavan ansiosta. Jatkossa klinikoilla saattaa olla tavoitteena tutkia potilaiden IL28B-genotyyppiä Suomessa ja yhdistää tutkimustulokset suoraan potilaan hoitoon. Spesifisyyden ja tehokkuuden puolesta tutkimusta varten käytetty menetelmä sopii potilaiden genotyypin määrittämiseen.

Lähteet

Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.) 2006. Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Duodecim, 3. uudistettu painos.

Bustin, Stephen A. 2004. Quantification of nucleic acids by PCR. Teoksessa Bustin, Stephen A. (toim.) 2004. A–Z of quantitative PCR. La Jolla (CA). International university line.

Bustin, Stephen A. – Nolan, Tania 2004. Chemistries. Teoksessa Bustin, Stephen A. (toim.) 2004. A–Z of quantitative PCR. La Jolla (CA). International university line.

Bustin, Stephen A. – Nolan, Tania 2004. Good laboratory practice! Teoksessa Bustin, Stephen A. (toim.) 2004. A–Z of quantitative PCR. La Jolla (CA). International university line.

Chen, Y. – Liu, X.-X. – Mahato, R. I. – Wang, L.-J. – Xu, H.-X. – Zhao Y.-R. 2012. Meta-analysis: IL28B polymorphisms predict sustained viral response in HCV patients treated with pegylated interferon- α and ribavirin. *Alimentary pharmacology and therapeutics* 36.

Fiebelkorn, Kristin R. – Lee, Brenda G. – Caliendo, Angela M. – Nolte, Frederick S. 2002. Clinical Evaluation of an Automated Nucleic Acid Isolation System. *Clinical Chemistry* 48 (9), 1613. Luettavissa sähköisesti osoitteessa <<http://www.clinchem.org/content/48/9/1613.full>>.

Färkkilä, Martti 2010. C-hepatiitin hoito: miten ja milloin? *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 126 (1), 41–8. Luettavissa sähköisesti osoitteessa <<http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo98526.pdf>>.

Färkkilä, Martti 2012. Uusia lääkkeitä kroonisen C-hepatiitin hoitoon. *Suomen Lääkärilehti* 24, 1926–1930. Luettavissa sähköisesti osoitteessa <http://www.laakarilehti.fi/files/nostot/2012/nosto24_3.pdf>.

Geng, Xiao-Ping – Wang, Hong – Wu, Li-Sheng 2011. Two IL28B polymorphisms are associated with the treatment response of different genotypes of hepatitis C in different racial populations: A meta-analysis. *Experimental and therapeutic medicine* 2012: 3.

Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani – Pärssinen, Raimo – Suominen, Ilari 2010. *Geenitekniikka*. Turku. Turun ammattikorkeakoulu.

Hedman, Klaus – Hyypiä, Timo – Koskiniemi, Marjaleena – Lappalainen, Maija – Mannonen, Laura – Piiparinen, Heli – Puolakkainen, Mirja – Suni, Jukka – Söderlund, Maria – Vaheri Antti – von Bonsdorff, Carl-Henrik 1999. *Geenimonistusmenetelmät virusdiagnoosissa*. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim*. 115(9):1031.

Hopkins, Sally L. 2008. *Quality in the analytical molecular biology laboratory*. Teoksessa Birch, Lyndsey – Keer, Jacquie (toim.) 2008. *Essential of nucleic acid analysis – a robust approach*. Cambridge. The royal society of chemistry.

Hu, Huai-Dong – Hu, Peng – Li, Shiyong – Liu, Ying-Hong – Ren, Hong – Zhang, Da-Zhi – Zhang, Qin-Qin 2011. Single nucleotide polymorphisms of the IL28B and sustained virologic response of patients with chronic hepatitis C to PEG-interferon/ribavirin therapy: A meta-analysis. *Hepatitis Monthly* 11 (3). 163–172.

Keer, Jacquie 2008. *Quantitative real-time PCR analysis*. Teoksessa Birch, Lyndsey – Keer, Jacquie (toim.) 2008. *Essential of nucleic acid analysis – a robust approach*. Cambridge. The royal society of chemistry.

Keränen Marja-Leena 2006. *Hepatiitti C*. Oulun yliopisto Sisätautien klinikka. Tiivistelmä. Luettavissa sähköisesti osoitteessa <<http://cc.oulu.fi/~sisawww/esit/060914.htm>>

Lappalainen, Maija – Färkkilä, Martti 2010. *Hepatiittivirukset ja virushepatiitit*. Teoksessa Hedman, Klaus – Heikkinen, Terho – Huovinen, Pentti – Järvinen, Asko – Meri, Seppo – Vaara, Martti (toim.) 2010. *Mikrobiologia – Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 1. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Lappalainen, Maija – Lumio, Jukka 2003. *Hepatiittivirukset ja virushepatiitit*. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valto-

nen, Ville (toim.) 2003. Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja 1. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

LightCycler FastStart DNA Master HybProbe 2011. Roche Applied Science version 15. Käyttömanuaali.

MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Large Volume 2011. Roche Applied Science version 10. Käyttömanuaali.

MagNa Pure LC Operator's Manual 2007. Roche Applied Science version 3.0 – Addendum 3 syyskuu 2007. Käyttömanuaali.

Ponchel, Frederique 2006. Real-time PCR using SYBR Green. Teoksessa Dorak, Tefvik (toim.) 2006. Real-time PCR. New York (NY.) Taylor & Francis.

Rapley, Ralph 2005. Basic techniques in molecular biology. Teoksessa Rapley, Ralph – Walker, John M. (toim.) 2005. Medical biomethods handbook. Totowa (NJ). Humana Press.

Roche Diagnostics 2006. Instruments and biochemicals catalog. Tuoteluettelo.

Rossi, Jennifer – Saunders, Ginny 2008. DNA extraction. Teoksessa Birch, Lyndsey – Keer, Jacquie (toim.) 2008. Essential of nucleid acid analysis – a robust approach. Cambridge. The royal society of chemistry.

Sudgen, David 2005. Quantitative PCR. Teoksessa Rapley, Ralph – Walker, John M. (toim.) 2005. Medical biomethods handbook. Totowa (NJ). Humana Press.

Tartuntataudit Suomessa 2011. Raportti 36/2012. Terveystieteiden tutkimuskeskus (THL), Tartuntatautiseurannan ja -torjunnan osasto, Helsinki.

Tartuntatautilaki 1986/583 3 §. Asetettu 14.11.2003/935.

Teophilus, Bimal D. M. 2005. Principals and medical applications of the polymerase chain reaction. Teoksessa Rapley, Ralph – Walker, John M. (toim.) 2005. Medical bi-omethods handbook. Totowa (NJ). Humana Press.

The C. Everett Koop Institute 2013. The Hepatitis C Virus. Verkkodokumentti. <<http://www.epidemic.org/theFacts/hepatitisC/hepatitisC.php>>. Luettu 25.3.2013.

TIB MOLBIOL 2012. LightMix in-vitro diagnostics kit IL28B. Käyttömanuaali.

World Health Organization (WHO) 2013. Hepatitis C. Verkkodokumentti. <<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/index2.html>>. Luettu 25.3.2013

Zhifang Jia – Yanhua Ding – Suyan Tian – Junqi Niu – Jing Jiang 2012. Test of IL28B Polymorphisms in Chronic Hepatitis C Patients Treated with PegIFN and Ribavirin Depends on HCV Genotypes: Results from a Meta-Analysis. PLOS ONE. Luettavissa sähköisesti osoitteessa <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0045698>>.