

Opinnäytetyö (AMK)  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Solu- ja molekyylibiologia  
2012

Petri Rummukainen

# PCR-MENETELMÄN VALIDOINTI

– translokaation (6;9)(p23;q34) osoitus RNA:sta



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytiikan koulutusohjelma | Solu- ja molekyylibiologia

Toukokuu 2012 | 32+5

Mika Venojärvi, Tuija Lundán

Petri Rummukainen

## PCR-MENETELMÄN VALIDOINTI – translokaation (6;9)(p23;q34) osoitus RNA:sta

Akuutissa myelooisessa leukemiassa verta muodostaviin soluihin kertyy erilaisia solujen toimintaa muuttavia mutaatioita, normaalien myelooisen sarjan solujen tuotanto on estynyt ja epäkypsät solut ilmaantuvat vereen ja muualle elimistöön. Yksi tällainen muutos on translokaatio (6;9)(p23;q34), jonka tuloksena syntyy fuusiogeeni DEK-NUP214.

t(6;9)(p23;q34)-positiivisessa AML:ssä voi olla monosyyttisiä piirteitä ja yleisiä löydöksiä potilaalta ovat basofilia sekä monilinjainen dysplasia. t(6;9)(p23;q34)-positiivinen AML luokitellaan huonon ennusteen ja korkean relapsiriskin luokkaan. Varhaisella hematopoieettisten kantasolujen siirrolla on kuitenkin havaittu olevan ennustetta parantava vaikutus.

Opinnäytetyössä tuotettiin materiaali PCR-menetelmän validoimiseksi translokaation (6;9)(p23;q34):n osoittamiseksi RNA:sta, jonka tuli olla sekä spesifinen kyseiselle mutaatiolle, että riittävän herkkä jäännöstautitutkimukseksi. Näytemateriaalia oli käytettävissä validointiin 50 potilaalta joko mononukleaarisisina soluina tai RNA:na.

Käytettävissä oli yhden aikaisemmin t(6;9)(p23;q34)-positiiviseksi todetun AML-potilaan näyte, jota käytettiin positiivisena kontrollina. Tunnetusta positiivisesta näytteestä tehtiin laimennossarja, jolla tutkittiin menetelmän herkkyyttä. Kaikkien näytteiden RNA:n eheys varmistettiin rinnakkaisella ABL-geenin tutkimuksella.

50 potilaan näytteistä kahdessa todettiin DEK/NUP214-fuusiogeeni. Molemmilla potilailla oli myös kromosomitutkimuksessa voitu osoittaa t(6;9)(p23;q34)-muutos. Toisen positiivisen potilaan seurantanäytteistä tutkittiin DEK-NUP214 -fuusiogeenin määrä kvantitatiivisella PCR-menetelmällä, ja tuloksia verrattiin aiemmin käytetyn seurantamarkkerin määrään.

Kahden DEK/NUP214-positiivisen potilaan diagnoosivaiheen luuydinnäytteistä tehtiin log-lineaarinen laimennossarja analyysin herkkyystason määrittämiseksi. Menetelmän herkkyystasoksi saavutettiin 1/100 000. Menetelmä osoittautui siis sekä spesifiseksi DEK/NUP214-fuusiogeenin osoittamisessa että riittävän herkäksi käytettäväksi jäännöstautitutkimuksena.

ASIASANAT:

GEENITUTKIMUS, LEUKEMIA, MOLEKYYLIGENETIIKKA, MUTAATIO, RNA

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in Biomedical Laboratory Science | Cell and Molecular Biology

May 2012 | 32+5

Mika Venojärvi, Tuija Lundán

Petri Rummukainen

## THE VALIDATION OF A PCR ASSAY – Detection of the translocation (6;9)(p23;q34) in RNA

In acute myeloid leukemia mutations accumulate in the blood forming cells altering the functionality, production of normal cells of the myeloid series is interrupted and abnormal cells appear in blood and in other tissues. One of these changes is the translocation (6;9)(p23;q34), which results in a fusion gene DEK-NUP214.

t(6;9)(p23;q34) -positive AML can have monosytic features, and it is often associated with basophilia and multilineage dysplasia. t(6;9)(p23;q34) -positive AML is classified to the poor prognosis and group of the high relapse risk. Early stage hematopoietic stem cell transplant improve the prognosis.

In this bachelor's thesis material was produced for the validation of a PCR-assay to detect the translocation (6;9)(p23;q34) from RNA. The PCR-assay should be both specific to the chosen translocation and sensitive enough to be used as a molecular residual disease assay. Sample material was available to the validation from 50 patients, either as mononuclear cells or as RNA.

In this study a positive control was used, which had been previously diagnosed positive for the translocation (6;9)(p23;q34). This positive sample was used in a dilution series to determine the sensitivity of the used assay. The preservation of RNA in every sample and the cDNA manufactured from it was assured by a parallel ABL-gene PCR-assay.

Of the samples of 50 patients subjected, 2 were proven positive for the fusion gene DEK/NUP214. Both of these patients had been found positive for translocation (6;9)(p23;q34) cytogenetically. Several follow-up samples were tested for the DEK-NUP214 fusion gene from one of these two patients using a quantitative PCR assay, and the resulting level of the fusion gene was then compared to the level of the MRD-marker used previously.

Log-linear dilution series of diagnosis phase samples from two DEK/NUP214 fusion gene positive patients were used to determine the sensitivity of the assay. The sensitivity of the assay was proven to be 1/100 000. The assay was therefore proven to be both specific to the fusion gene DEK/NUP214 and sensitive enough to be used as a molecular disease assay.

KEYWORDS:

GENETIC RESEARCH, LEUKEMIA, MOLECULAR GENETICS, MUTATIONS, RNA

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO</b>	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>2 AKUUTTI MYELOINEN LEUKEMIA JA JÄÄNNÖSTAUTITUTKIMUKSET</b>	<b>10</b>
2.1 Mutaatiot leukemiadiagnostiikassa	10
2.2 Jäännöstautidiagnostiikka AML:ssa	13
2.2.1 Jäännöstaudin seuranta	13
2.2.2 Jäännöstautidiagnostiikassa käytettävät menetelmät	14
2.2.3 Kvantitatiivinen PCR	15
<b>3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT</b>	<b>17</b>
<b>4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS</b>	<b>18</b>
4.1 Tutkimuksen kulku	18
4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	22
4.3 Opinnäytetyön eettisten näkökohtien tarkastelu	22
<b>5 TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA</b>	<b>24</b>
5.1 Tunnistaako menetelmä luotettavasti potilaan RNA:sta t(6;9)(p23;q34)-mutaation?	24
5.2 Sopiiko kehitetty menetelmä myös jäännöstautianalytiikkaan?	25
<b>6 POHDINNAT</b>	<b>29</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>30</b>

## LIITTEET

- Liite 1. SHY:n geneettinen riskiluokitus 2012
- Liite 2. Aiempien tutkimusten alukkeiden vertailu
- Liite 3. Tutkimuslupa

## KUVAT

Kuva 1. t(6;9)(p23;q34)-mutatoituneet kromosomit (Translocatios - chromosome 6, 2012).	9
Kuva 2. Criteriongeelillä erotellut geenituotteet.	24
Kuva 3. Sekvensoitu positiivinen kontrollinäyte.	25
Kuva 4. Laimennossarja herkkyden määrittämiseksi.	26
Kuva 5. qPCR:llä monistunut tuote ja positiivinen kontrolli.	27
Kuva 6. Positiivisen potilaan seurantanäyte laimennossarjan rinnalla.	27

## KUVIOT

Kuvio 1. Vuokaavio tutkimuksen etenemisestä.	20
Kuvio 2. FLT3-ITD:n ja DEK/NUP214-fuusiogeenin määrä seurantanäytteissä diagnoosivaiheen näytteeseen suhteutettuna.	28

## TAULUKOT

Taulukko 1. WHO:n vuoden 2008 luokittelun AML with recurrent abnormalities - mukaisia mutaatioita (Swerdlow ym. 2008, 29).	11
--	----

# KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

Lyhenne	Lyhenteen selitys (Lähdeviite)
Allogeeninen kantasolusiirto	Toisen ihmisen luovuttama kantasolusiirre, jossa hyödynnetään siirteen immunologisten solujen vaikutusta pahanlaatuisen taudin parantamiseksi (Ruutu 2007, 492).
Autologinen kantasolusiirto	Potilaalle annetaan potilaalta itseltään aiemmin kerättyä veren kantasolusiirrettä tai luuydintä. Ennen kantasolujen keräämistä annetaan solunsalpaaja- ja kasvutekijähoitoa tautisolukuorman vähentämiseksi ja kantasolujen mobilisoimiseksi verenkiertoon. (Ruutu 2007, 492-495.)
DEK-geeni	Proto-onkogeeni, jonka tuottama proteiini säätelee transkriptiota, mRNA:n käsittelyä ja kromatiinin uudelleen käsittelyä (Sitwala, Adamas & Markowitz 2002, 8862).
Ensembl	Ensembl-projekti on aloitettu vuonna 1999. European Bioinformatics Institutin (EBIn), European Molecular Biology Laboratoryn (EMBLin) ja Wellcome Trust Sanger Institutin (WTSIn) yhteisprojektiin on kerätty DNA-sekvenssejä ja kokoonpanoja tutkimuksista ympäri maailman. Sivustolla on 58 lajin genomit, joista voi hakea geenin tai proteiinin nimellä tai sijainnilla kromosomistossa. (Ensembl, 2011.)
FLT3-ITD	FMS-like tyrosine kinase 3 - Internal Tandem Duplication. FLT3-geenin pieni sisäinen duplikaatio, joka saa aikaan tyrosiinikinaasin jatkuvan aktiivisuuden ja stimuloi soluproliferaatiota epänormaalia signaalitietä. (Elonen 2007, 290.)
Fuusiogeeni	Kahden geenin yhdistymästä syntyvä, proteiinia koodaava uusi geeni (Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2010, 88).
Klonaalinen	Yhdestä solusta lähtöisin oleva, perimältään yhtenevä solujoukko (Clone definition, 2012). Syövät ovat monoklonaalisia tauteja joten syöpäsolut ovat samankaltaisia uudelleenjärjestymisensä suhteen (Knuutila 2000, 1833).

MRD	Minimal Residual Disease eli jäännöstauti. Akuutissa myeloisessa leukemiassa jäännöstaudiksi määritellään alle 5% osuus sairaita soluja luuytimessä tai perifeerisessä veressä (Jorgensen & Chen 2011, S49).
NUP214/CAN	Nukleoporiini 214kDa. Nukleoporiinin tehtävä on estää suurten proteiinien diffuusiota tuman ja soluliman välillä. 214kDa on proteiinin atomimassa, yksikkönä kilodalton. (Patel, Belmont, Sante & Rexach 2007, 83.) Aiemmin NUP214-geeniä on kutsuttu nimellä CAN (Swerdlow ym. 2008, 116).
p-haara	Sentromeerin jakaman kromosomin lyhyt haara (Knuutila, Kairisto & Porkka 2007, 118).
Proto-onkogeeni	Proto-onkogeenit voivat aktivoitua onkogeneiksi eli syöpää aiheuttaviksi geeneiksi niihin kohdistuvien mutaatioiden vaikutuksesta. Proto-onkogeenit koodaavat yleensä solun kasvua ja erilaistumista sääteleviä proteiineja. (Koulu, Mervaala & Tuomisto 2007, 129.)
q-haara	Sentromeerin jakaman kromosomin pitkä haara (Knuutila, Kairisto & Porkka 2007, 118).
Translokaatio	Siirtymä, jossa DNA-jakso siirtyy kromosomistossa paikasta toiseen (Suominen ym. 2010, 42).

# 1 JOHDANTO

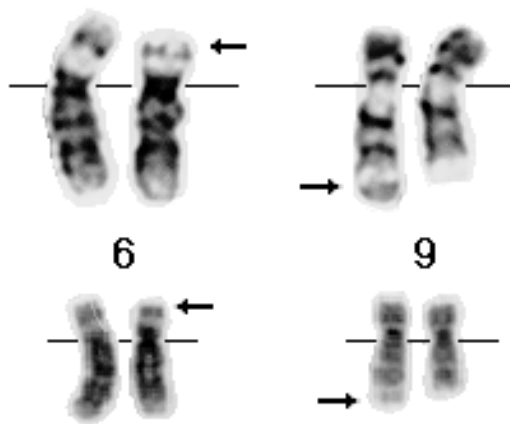
Epäiltäessä akuuttia leukemiaa potilaasta otetaan veri- ja luuydinnäytteitä sekä selvitetään minkälaisia yleisoireita potilaalla on. Yleisiä oireita ovat väsymys, suorituskyvyn lasku, selittämättömät mustelmat, verenvuoto nenästä, ikenistä ja suolestä, infektiot ja pitkittynyt tai toistuva kuumeilu. Joskus akuutti leukemia todetaan oireettoman henkilön veren kuvasta sattumalöydöksenä. (Elonen 2007, 290.)

Akuutissa leukemiassa veri- ja luuydinnäytteiden erittelylaskennan yleisimpiä poikkeavia löydöksiä ovat jonkin solutyypin ylipopulaatio tai epäkypsät, leukeemiset blastisolut. Veressä blastisoluja on osoitettavissa noin 90 %:lla leukemiapotilaista. Blastisolujen lisääntyminen luuytimessä on diagnostinen löydös: jos blasteja on vähintään 20 % luuytimen soluista, kyseessä on akuutti myeloinen leukemia, AML. AML voidaan todeta myös vaikka blastisoluja olisi alle 20 %, jos blastisoluista löydetään AML:lle tyypillinen WHO-luokituksen kromosomipoikkeavuus. (Elonen 2007, 291-294.) WHO:n viimeisimpien ohjeiden mukaan alle 20 % blastisoluosuudella AML-diagnosiin johtavia kromosomimuutoksia on neljä,  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $inv(16)(p13.1;q22)$ ,  $t(16;16)(p13.1;q22)$  ja  $t(15;17)(q22;q12)$  (Swerdlow ym. 2008, 110).

Diagnoosin lisäksi kromosomimuutokset vaikuttavat merkittävästi taudin riskiluokitukseen ja myös hoitoon. Esimerkiksi kromosomin 3 osan q21 inversio,  $inv(3)(q21q26.2)$ , muuttaa taudin luokituksen suomalaisessa leukemia-luokituksessa heti suuren riskin ryhmään, jossa hoidot ovat raskaampia (Suomen Hematologiyhdistys Ry 2011). Liitteessä 1 on Suomen Hematologiyhdistyksen vuoden 2012 geneettinen riskiluokitus. Toinen tällainen kromosomipoikkeavuus on kromosomien 6 ja 9 välinen translokaatio  $t(6;9)(p23;q34)$ , jossa kromosomin 6 lyhyen varren raidan 23 kohdalta alkaen irronnut pala on vaihtanut paikkaa kromosomin 9 pitkän varren raidan 34 kohdalta katkenneen palan kanssa, joka on nähtävissä kuvassa 1. Molekyyylitasolla translokaation seurauksena on kromosomissa 6 sijaitsevan



DEK-geenin ja kromosomissa 9 sijaitsevan NUP214-geenin fuusioituminen kimeeriseksi DEK/NUP214-fuusiogeeniksi. (Garçon ym. 2005, 1341-1343.) Taudin morfologisia piirteitä ovat luuytimen ja perifeerisen veren basofilia. DEK/NUP214-positiiviseen AML:ään liittyy heikko ennuste sekä lapsille että aikuisille. (Swerdlow ym. 2008, 115-116; Hamaguchi ym. 1998, 1249.) Varhaisen vaiheen luuydinsiirrolla on kuitenkin saatu aikaan parempi ennuste (Garçon ym. 2005, 1341-1343).



Kuva 1. t(6;9)(p23;q34)-mutatoituneet kromosomit (Translocatios - chromosome 6, 2012).

Tämän opinnäytetyön tavoite on nopeuttaa AML:aa sairastavan potilaan diagnostiikkaa sekä tuloksista riippuen ohjata potilaan taudin riskiluokitusta. TYKSLABin Molekyyli-genetiikan laboratorio palvelee tutkimuksillaan koko maan hoitoyksiköitä ja tämä tutkimus täydentäisi tutkimusvalikoimaa kehittyvällä molekyyli-genetiikan alalla. Opinnäytetyön tarkoitus on validoida luotettava kvantitatiivinen PCR-menetelmä TYKSLABin käyttöön (6;9)(p23;q34)-translokaatioon liittyvän DEK/NUP214-fuusiogeenin osoittamiseksi RNA:sta diagnoosivaiheen ja seurantavaiheen näytteistä. Menetelmän avulla potilaan taudin diagnostiikka ja jäännöstaudin seuranta parantuisivat entisestään.

## 2 AKUUTTI MYELOOINEN LEUKEMIA JA JÄÄNNÖSTAUTITUTKIMUKSET

### 2.1 Mutaatiot leukemiadiagnostiikassa

Akuutti myeloinen leukemia on klonaalinen, varhaisesta kantasolusta lähtöisin oleva pahanlaatuinen verisairaus (Elonen ym. 2007, 285). Taudissa luuytimen normaali verisolujen muodostus on järkkynyt, ja epäkypsät blastisolut valtaavat luuytimen ja lopulta ilmaantuvat myös perifeeriseen vereen tai muihin kudoksiin. Potilaiden keski-ikä diagnoosihetkellä on 65 vuotta. (Swerdlow ym. 2008, 27-28.)

Leukemiasolujen toiminnan säätely ei toimi normaalisti. Keskeistä leukemiasoluille on jatkuva jakautumiskyky. Leukemioiden patogeneesiä tutkittaessa kromosomien rakenteellisten ja lukumäärällisten muutosten lisäksi kromosomitutkimuksessa näkymättömät geenimuutokset ovat paljastuneet solukon pahanlaatuistumisen syyksi. Tarkkaan ei kuitenkaan tiedetä, mitkä poikkeavuudet ovat avainasemassa normaalin solun muuttuessa leukeemiseksi. (Elonen ym. 2007, 287-288.)

Viimeaikaisten tutkimusten valossa on kehitetty kahden mutaatiotyypin mallihypoteesi, jossa leukemian laukaisevissa soluissa täytyy olla kahteen luokkaan jaettavia muutoksia, jotka toimivat yhdessä leukemian kehittyessä. Luokan 1 mutaatiot antavat solulle jakautumis- ja selviytymisedun vaikuttamalla kinaasisignaalintipolkuihin, luokan 2 mutaatiot taas saavat aikaan heikentyneen erilaistumisen. Luokan 1 ja 2 mutaatiot esiintyvät yleensä melko tyypillisinä, samanaikaisina mutaatiopareina, kuten FLT3-geenin sisäinen tandem-duplikaatiomutaatio (internal tandem mutation, ITD) ja NPM1-geenin mutaatio. (Betz & Hess 2010, 1427-1433.) sekä FLT3-ITD tai JAK2-geenin mutaatiot ja AML1-ETO-fuusiogeneeni (Schneider ym. 2007, 2199-2201).

Noin 45 prosentilla akuuttia leukeamiaa sairastavien potilaiden luuydinnäytteen kromosomitutkimuksessa havaitaan poikkeava karyotyyppi jota luonnehtii jokin toistuva, kyseiselle taudille tyypillinen kromosomimuutos (Betz & Hess 2010, 1427-1433). AML:lle tyypillisiä toistuvia kromosomipoikkeavuuksia, joiden esiintyminen määrittelee taudin omaksi WHO-luokituksen alatyypiksi, on esitetty taulukossa 1. Noin 15 prosentilla potilaista todetaan kromosomitutkimuksessa vähintään kolme poikkeavuutta eli kompleksi karyotyyppi (Betz & Hess 2010, 1427-1433).

Syöpäsoluissa on usein havaittavissa erilaisia alaklooneja, joiden kehityksestä voidaan nähdä geenin monistumisen voimistuminen. Tutkimuksissa on havaittu translokaatioita, joissa immunoglobuliinien aktiivinen promoottori on siirtynyt mutatoituneen geenin eteen, edistäen sen monistumista. Jos solun säätelymekanismit ovat siinä määrin vaurioituneet että ne sallivat perimän muuntelun, seurauksena on genomin ylläpidon epäjärjestys jolla voi olla laajoja vaikutuksia koko perimään. Joskus taas vaikutukset voivat rajoittua vain tiettyyn kromosomiin. Telomeraasien säätelyn heikkeneminen poistaa kontrollin solunjakautumiskerroista. Syövän solulinjojen uudelleenjärjestyneet kromosomit voivat olla hyvin tasapainoisia, jolloin eräänlainen vääristynyt Darwinilainen kehitys saa aikaan syöpäsolun nopean jakautumisen ja leviämisen uusilla, paremmilla ominaisuuksillaan. (Bernheim 2010, 309-318.)

Taulukko 1. WHO:n vuoden 2008 luokittelun AML with recurrent abnormalities - mukaisia mutaatioita (Swerdlow ym. 2008, 29).

Kromosomimuutos	Syntyvä fuusiogeeni
t(6;9)(p23;34)	DEK-NUP214
t(15;17)(q11;q12)	PML-RARA
t(8;21)(q22;q22)	RUNX1-RUNX1T1

(jatkuu)

Taulukko 1 (jatkuu).

inv(3)(q21q26.2) tai t(3;3)(q21;q26.2)	RPN1-EV11
inv(16)(p13.1q22) tai t(16;16)(p13.1;q22)	CBFB-MYH11
t(9;11)(p22;q23)	MLLT3-MLL
t(1;22)(p13;q13)	RBM15-MKL1

Translokaatiossa (6;9)(p23;q34) DEK-geenin eksoni 9 fuusioituu NUP214-geenin eksonin 18 kanssa. Translokaation (6;9)(p23;q34) tuotteena syntyy DEK/NUP214-fuusiogeneeni, aiemmalta nimeltään DEK/CAN-fuusiogeneeni. (Garçon ym. 2005, 1341-1343). DEK-geeni on proto-onkogeeni joka normaalisti korjaa DNA:n virheitä. Yliekspressoituessaan DEK estää solukuolemaa. (Kavanaugh ym. 2011, 7465-7466.) DEK-geenin on useissa autoimmuunisairauksissa todettu toimivan autoantigeeninä ja se on yhdistetty akuutin myeloosin leukemian lisäksi kolmeen syöpäsairauteen: maksakarsinomaan, glioblastomaan sekä melanomaan (Sitwala ym. 2002, 8862-8870). NUP214:n on todettu säätelevän D-vitamiinireseptoria solun sisällä (Miyachi ym. 2009, 1090). Se on paikallistettu tumahuokoskompleksin sytoplasman puoleiseksi osaksi (Kraemer, Wozniak, Blobel & Radu 1994, 1519-1523.) DEK/NUP214-fuusioproteiini taas toimii epänormaalina transkriptiotekijänä sekä säätelee tuman liikennettä sitoutumalla liukoisiin kuljetustekijöihin (Swerdlow ym. 2008, 116).

## 2.2 Jäännöstautidiagnostiikka AML:ssa

### 2.2.1 Jäännöstaudin seuranta

Jäännöstaudiksi luokitellaan 5% osuus tautisoluja luuytimessä tai perifeerisessä veressä, joka vastaa morfologisen tutkimuksen herkkyyttä (Jorgensen & Chen 2011, S49). WHO:n vuoden 2008 luokitukseensa ottamalla molekyylibiologisilla menetelmillä (Swerdlow ym. 2008, 18) päästään kuitenkin tästä paljon suurempiin herkkyysiin, jopa 0,0001% asti. Herkällä menetelmällä havaittavan jäännöstaudin on todettu olevan tärkeä ennuste tautivapaalle ja/tai elossapysymisajalle. Seurantamarkkerin ekspressiotason vähäinen aleneminen tai uudelleenilmeneminen voivat ennustaa lähenevää relapsia. Tällainen erittäin herkkä seurantamenetelmä mahdollistaa hoidon lisäämisen joko kemoterapian muutoksella tai kantasolusiirrolla kuukausia ennen kuin sen tarve tulisi havaittavaksi morfologisesti. (Betz & Hess 2010, 1427-1433; Jorgensen & Chen 2011, S49-50.)

Suomessa AML:n jäännöstautia seurataan AML:n kansallisten hoito-ohjeiden mukaisesti. Luuydinnäytteitä otetaan induktiohoidon jälkeen 14. päivänä, 28. päivänä sekä jos 28. päivän näyte on hypoplastinen, veri sytopeninen eikä seuraavaa solunsalpaajahoitoa voida aloittaa, otetaan luuydinaspiraationäytteitä noin viikon välein. Jokaisen konsolidaatiohoidon jälkeen otetaan luuydinaspiraationäyte ja konsolidaatiohoitojen jälkeen ensimmäiset kaksi vuotta luuydinaspiraationäytteitä otetaan kolmen kuukauden välein. Tämän jälkeen luuytimen aspiraatiotutkimus tehdään mikäli oireet tai soluarvot antavat aiheutta. (AML seuranta ja vastearvio 2012.)

Leukemiasolulle spesifisten fuusiogeenien vakaus tekee niistä erinomaisia markkereita hoidon tehokkuuden seurantaan ja jäännöstaudin tunnistamiseen (Buccisano ym. 2012, 333-335). DEK/NUP214-fuusiogeeni on hyvin vakaa, ja se on todettavissa uudelleen remission jälkeen relapsitapauksissa, jolloin se on

hyvä seurantamarkkeri jäännöstautitutkimukseen (Garçon ym. 2005, 1341-1343).

### 2.2.2 Jäännöstautidiagnostiikassa käytettävät menetelmät

Virtaussytometriset menetelmät perustuvat leukemiaan liittyvien immunofenotyyppien ilmenemiseen solujen pinnalla, joita ei terveessä luuytimessä ole ollenkaan, tai niitä on hyvin vähän. Virtaussytometriaa voidaan soveltaa laajasti, jopa 85%:lla AML-potilaista, sen käyttö on nopeaa ja menetelmässä poissuljetaan kuolleet solut ja luuytimen jäämät. Nykyaikaisilla, useilla lasereilla varustetuilla laitteilla voidaan samanaikaisesti tunnistaa 6-9 eri antigeeniä, jolloin yhdestä ajosta saadaan paljon tietoa solujen fenotyypistä. Vielä kiistanalainen on kuitenkin käytettävä raja MRD-positiivisen ja MRD-negatiivisen tuloksen erottamiseen ja raja vaihtelee tutkimuksittain. (Buccisano ym. 2012, 335-336.)

Jäännöstautidiagnostiikassa käytetään qPCR-menetelmien lisäksi virtaussytometriaa sekä harvemmin fragmenttianalyysiä. Fragmenttianalyysissä tutkitaan insertion tai deleetion aiheuttamia PCR-amplikonin koon muutoksia käyttäen kapillaarielektroforeesia. Fragmenttianalyysiä voidaan käyttää esimerkiksi FLT3-ITD:n toteamiseen. Myös luuydinsiirron jälkeen tutkittaessa kimerismiä käytetään yleisesti fragmenttianalytiikkaa. (Jorgensen & Chen 2011, S52.)

Fragmenttianalyysillä päästään noin 1% herkkyteen. Vaikka menetelmää käytetään hoidon tehokkuuden arviointiin ja jäännöstaudin seurannan mahdollistamiseen, jäännöstautitutkimukselta vaaditaan vähintään 0,1% herkkyystaso, johon päästään vain PCR- ja virtaussytometrisillä menetelmillä. (Jorgensen & Chen 2011, S50.)

### 2.2.3 Kvantitatiivinen PCR

Reaaliaikainen kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio (PCR) on nykyisin paljon käytetty analyysimenetelmä. PCR:llä monistetaan kahden tunnetun jakson välistä DNA-aluetta. (Suominen ym. 2010, 153-170.) Monistamiseen käytetään termostabiilia DNA-polymeerasia, joka kestää miltei 100 °C lämpötilaa. PCR-syklin alussa lämpötilaa nostamalla irroitetaan juosteet toisistaan. Denaturoinnin jälkeen lämpötilaa lasketaan, mahdollistaen alukkeiden tarttumisen kiinni vastinjuosteisiin. Lopuksi lämpötilaa nostetaan, jolloin DNA-polymeerasi tekee vastinjuosteesta vastinkappaleen alukkeista lähtien. (Knuutila ym. 2007, 125-126.)

TaqMan-pohjaisissa menetelmissä reaktioseoksessa on alukkeiden lisäksi spesifisesti johonkin monistettavalle alueelle kiinnittyvä, fluoresoivalla reportterilla, esimerkiksi Fam, ja vaimentimella leimattu koetin, esimerkiksi Tamra. Koettimessa 3'pään vaimennin estää 5' pään reportteria lähettämästä fluoresoivaa signaalia. Koetin on suunniteltu siten, että sen sulamislämpö,  $T_m$  on noin 10°C korkeampi kuin alukkeilla. Korkeammasta sulamislämmöstään johtuen se kiinnittyy ennen alukkeita monistettavalle alueelle. Alukkeiden kiinnittyttyä templaattiin polymeerasientsyymi alkaa syntetisoimaan vastinjuostetta. Koettimen kohdalle päästessään polymeerasientsyymi irroittaa sen templaattista vapauttaen reportterin vaimentimen vaikutuksesta, jolloin syntyy mitattava signaali. (Taqman and SYBR Green Chemistries, 2012.)

Reaaliaikaisesta kvantitatiivisesta PCR:stä käytetään useimmin lyhennettä qPCR tai vaihtoehtoisesti RT-qPCR. qPCR:n kvantitointi voi olla joko suhteellista tai absoluuttista. Absoluuttisessa kvantitointimetodissa kohdegeenin ja samanaikaisesti tutkittavan referenssigeenin pitoisuudet määritetään sijoittamalla ne tunnetuista pitoisuuksista lasketuille standardisuorilleen. Yleisemmässä, suhteellisessa kvantitointimetodissa verrataan kohdegeenin määrää referenssigeeniin monistumissignaalien sykliarvojen avulla. Referenssigeenin tulee olla kaikissa näytteissä ja vakaa kaikissa kudoksissa ja

olosuhteissa. (Suominen ym. 2010, 169-170; Absolute vs Relative Quantification, 2012.)

qPCR-menetelmä on kehitetty niin, että fluoresenssin suureneminen on suhteessa PCR-tuotteen pitoisuuteen. PCR-sykliden lukumäärä, jolla ylitetään sovittu kynnyksiarvo, on kääntäen verrannollinen näytteen DNA-vastinjuosteiden pitoisuuteen ennen PCR-reaktiota. Kvantitatiivisissa PCR-pohjaisissa analyyseissä tulosten tulkintaan vaaditaan vertailukohtaksi potilaan diagnoosivaiheen näytettä. Tulokseksi saadaan yleensä logaritminen vähenemä diagnoosivaiheen näytteeseen verrattuna. Diagnoosinäytteen avulla määritetään myös PCR-jäännöstautianalytiikalla saavutettavissa oleva korkein mahdollinen herkkyystaso. qPCR:llä voi mitata näytteiden välillä jopa miljardiluokkaa olevia pitoisuuseroja, mutta pienien erojen mittaukseen menetelmä ei erityisesti sovellu, vaan pitoisuuden tulee vähintään puoliintua tai kaksinkertaistua. Kliinisesti merkittävänä voidaan pitää vasta yhden login eli kymmenkertaista pitoisuusmuutosta. (Knuutila ym. 2007, 126-128.)

PCR-menetelmän rajoitukset asettavat omat vaatimuksensa tutkimuskohteille. Fuusiogenejä tutkittaessa menetelmän herkkyys on niin suuri, että joitain fuusiogenejä seurattaessa tulos jää positiiviseksi hyvin matalalla tasolla, vaikka potilaat kliinisesti ovatkin remissiossa (Jorgensen & Chen 2011, S50-51). qPCR-menetelmällä voidaan kuitenkin ennakoita tulevaa relapsia tason nousulla (Buccisano ym. 2012, 333).



### 3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Opinnäytetyön tarkoitus on validoida luotettava kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen PCR-menetelmä TYKSLABin käyttöön translokaation (6;9)(p23;q34) myötä muodostuvan DEK/NUP214 - fuusiogeenin osoittamiseksi luuydinnäytteen mononukleaarista soluista eristetystä RNA:sta. Menetelmä tulee TYKSLAB osasto 931 Molekyyligenetiikan laboratorion diagnostiseen käyttöön. Tavoitteena on nopeuttaa AML:aa sairastavan potilaan diagnostiikkaa sekä tuloksista riippuen ohjata potilaan taudin riskiluokitusta.

Tutkimusongelmat ovat:

1. Tunnistaako menetelmä luotettavasti potilaan RNA:sta t(6;9)(p23;q34)-mutaation?
2. Sopiiko kehitetty menetelmä myös jäännöstautianalytiikkaan?

## 4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

### 4.1 Tutkimuksen kulku

#### **Tutkimuslupa**

Tutkimukseen haettiin tutkimuslupa TYKSLABin ylihoitaja Benita Paloheinältä VSSH:n Hoitotyön tutkimus- ja opinnäytetyölomakkeella marraskuussa 2011. Tutkimus tehtiin TYKSLAB Molekyyli­genetiikan laboratorion tiloissa syksyn 2011 ja kevään 2012 aikana. Tutkimuksessa käytettiin 50 potilaan näytteitä, jotka olivat pakastettuina TYKSLAB Molekyyli­genetiikan laboratorion tiloissa. Tutkimuksen eteneminen tästä eteenpäin kuviossa 1.

#### **Alukesuunnittelu**

Opinnäytetyön suoritus aloitettiin etsimällä geenipankki Ensembl.org:sta DEK- ja NUP214-geenien emäs­järjestys. Tämän jälkeen etsittiin aiemmissa t(6;9)(p23;q34)-mutaatiota koskevissa tutkimuksissa käytettyjen alukkeiden ja TaqMan-koettimen emäs­jär­jestyksiä, joiden sijoittumista eksoneihin verrattiin. Alukkeiden ja koettimien emäs­jär­jestykset on taulukoitu liitteeseen 2. Näistä viiden tuottaman monistustuotteen kokoa verrattiin keskenään tuotteen koon vaihdellessa 73-290 emäsparin välillä. Lopputuloksena päädyttiin suunnittelemaan omat alukeet ja TaqMan-koetin joita käyttää, koska tarkoituksena oli paitsi saada käyttöön qPCR:ssä optimaalinen tuotekoko, myös varmistaa menetelmän toimivuus sekvensoimalla. Monistettavan alueen tuli täten olla riittävän pitkä sekvensointivarmistusta ajatellen, mutta ei niin pitkä, että monistumistehokkuus heikkenisi qPCR-reaktiossa.

Alukeet ja TaqMan-koetin suunniteltiin Primer Express –ohjelmalla käyttäen ohjelman perusasetuksia. Perusasetuksilla monistuvan tuotteen pituus on 50-150 emäsparia jotta monistuminen olisi tehokasta, ja alukkeiden  $T_m=58-60^{\circ}\text{C}$

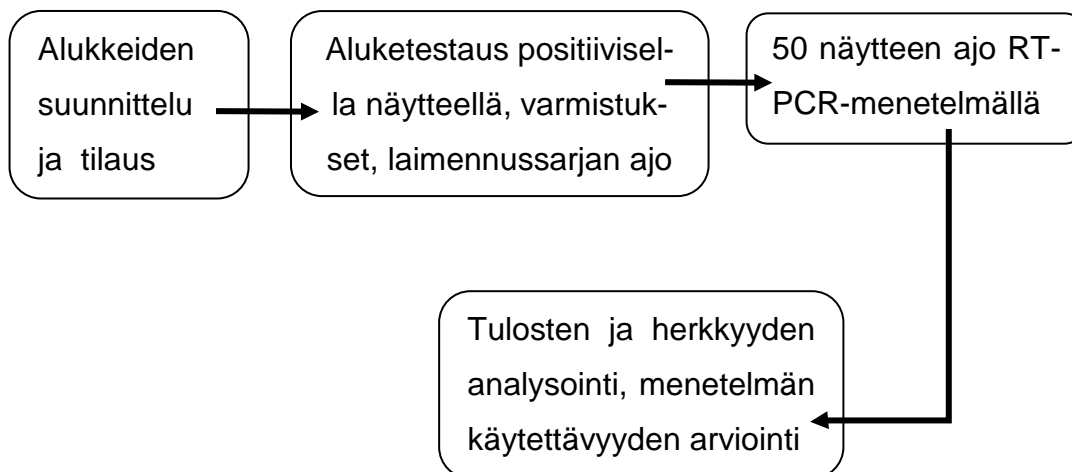
sekä alukkeiden välistä eroa  $T_m$ :llä saa olla enintään 2°C epäspesifisen monistumisen estämiseksi. Lisäksi alukkeen 3'-päässä saa olla viidestä viimeisestä emäksestä enintään 2 guaniinia tai sytosiinia.

### **Potilasmateriaali**

Tutkimuksessa käytettiin 50 potilaan diagnoosivaiheen näytteitä, sekä yhden fuusiogeenin DEK/NUP214 suhteen positiivisen AML-potilaan viittä seuranta-näytettä. Tutkimuksessa käytetyt näytteet olivat TYKSin, OYSin ja HYKSin hematologian klinikoilla otettuja AML-potilaiden diagnoosivaiheen luuydinnäytteitä. Näytteistä oli eristetty tavallisen toimintatavan mukaisesti mononukleaariset solut jotka oli säilytetty -70°C lämpötilassa.

### **RNA:n eristys**

RNA:n eristykseen mononukleaarisisista soluista käytettiin tavallisesti laboratoriossa kyseiseen tehtävään käytettävää, kolonnipohjaista Qiagenin RNeasy Mini kit:iä. cDNA-synteesissä käytettiin Reverse Transcriptase –entsyymiä, jolla Random Hexameriä ja dNTP-seosta käyttäen valmistetaan vastin-DNA (cDNA), joka on ominaisuuksiltaan paljon vakaampaa kuin RNA. RNA:ta pipetoitiin reaktioseokseen 1 µg ja reaktioseoksen kokonaistilavuus oli 20 µl. Reaktion jälkeen tuotteeseen lisättiin 30µl steriiliä aquaa.



Kuvio 1. Vuokaavio tutkimuksen etenemisestä.

### **Menetelmän toimivuuden varmistus reaaliaikaisella PCR-menetelmällä**

Suunniteltujen alukkeiden toimivuus varmistettiin käyttämällä Turun yliopiston Lääketieteellisen genetiikan osaston kromosomilaboratorion kromosomitutkimuksessa t(6;9)(p23;q34):n osalta positiiviseksi todettua näytettä positiivisena kontrollina. Positiivinen kontrolli, negatiivinen cDNA-kontrollipuuli eli usealta terveeltä ihmiseltä otetuista verinäytteistä eristystä, yhdistetystä RNA:sta valmistettu cDNA sekä reagenssikontrolli tutkittiin tilatuilla alukkeilla käyttäen Applied Biosystems'in 7500 Real-Time PCR Thermocycleriä. Vertailugeeninä käytettiin ABL-geeniä RNA:n eheyden tarkistamiseksi sekä tuloksen normalisoimiseksi. Menetelmässä käytettiin Thermo Scientificin Maxima qPCR Master Mixiä sekä Taqman-koetinta, jotka ovat laboratoriossa vastaavissa tutkimuksissa käytössä. Tutkimuksessa käytetyt alukkeet ja TaqMan-koetin toimitettiin 100 pmol/l konsentraationa jota pidettiin varastoliuoksena, ja niistä laimennettiin 1:10 käyttöliuoseriä, joiden pitoisuus oli siis 10 pmol/l. Tutkimuksessa käytettiin reaktioseostilavuutena 25µl:aa, jossa oli 7,5 pmol alukkeita/reaktio, 5 pmol TaqMan-koetinta/reaktio sekä templaattia 1µl.

## **Geelija jo ja sekvensointi**

PCR-tuotteiden spesifisyys varmistettiin ajamalla ne geelielektroforeesilaitteella, eristämällä tuotteet ja sekvensoimalla ne Applied Biosystems'in 3500DX Genetic Analyzer-sekvensointilaitteella. Kaikkiin tehtäviin käytettiin laboratorion käytössä olevia menetelmiä. Positiivisesta kontrollista tutkittiin myös laimennossarjan avulla menetelmän herkkyys laimentamalla näytettä cDNA-kontrollipuulilla 1:100 000 laimennokseen asti.

## **Potilasaineiston tutkiminen**

50 potilaan diagnoosivaiheen näytteet ajettiin 5-8 näytteen erissä käyttäen varmistettua positiivista näytettä positiivisena kontrollina, cDNA-kontrollipuulia negatiivisena kontrollina sekä steriiliä aquaa reagenssikontrollina. Kontrolligeeninä käytettiin ABL-geeniä. Kaikki näytteet ajettiin sekä DEK-NUP214-alukkeilla että ABL-alukkeilla duplikaatteina.

## **Jäännöstautianalyysit**

DEK/NUP214-fusion suhteen positiiviseksi todetun potilaan 5 seurantanäytteestä tutkittiin DEK/NUP214-fuusiogeenin taso diagnoosinäytteeseen verraten käyttäen kontrolligeeninä ABL-geeniä. ABL-geenin avulla normalisoitiin laimennossarjasta saatu pitoisuus RNA:n määrään näytteessä. Diagnoosivaiheen näytteestä tehtiin DEK/NUP214-fuusiogeenin tason määrittämistä varten laimennossarja johon tehtiin laimennokset 1:10, 1:100, 1:1000, 1:2000, 1:10 000, 1:20 000 ja 1: 100 000 cDNA-kontrollipuuliin laimentamalla. ABL-geenin tason määrittämiseksi käytettiin laimentamatonta diagnoosivaiheen näytettä ja tehtiin laimennokset 1:10 ja 1:100 steriiliin veteen laimentamalla. Laimennossarjassa DEK/NUP214-fuusiogeenin tason tutkimiseksi käytettiin kolmea rinnakkaista näytettä laimennossarjasta, ABL-geenin tason tutkimiseksi käytettiin kahta rinnakkaista näytettä. Templaattia pipetoitiin jäännöstautianalyyseissä 5µl:aa.

## 4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Tutkimuksessa on kokeellisia, kvantitatiivisia ja kvalitatiivisia piirteitä. Kuten usein validointiprosessissa, ensin tulee tarkistaa menetelmän toimivuus yksittäisellä, tunnetulla näytteellä ja vasta sitten alkaa massa-ajo jossa tuotetaan riittävästi tietoa menetelmän tarkkuuden ja herkkyyden mittaukseen ja arviointiin (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 134-136).

Kokeellisen menetelmän tyypillisiä piirteitä ovat näytteen valitseminen tietyistä populaatiosta, näytteen analysointi erilaisten koejärjestelyjen valoissa ja muiden muuttujien kontrollointi. Kvalitatiivinen tutkimus taas voi edeltää kvantitatiivista niin sanottuna esikokeena, jossa tarkistetaan tutkimuksen jatkon järkevyys ja tarkoituksenmukaisuus. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 134-136.)

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa keskeistä ovat johtopäätökset aiemmista tutkimuksista sekä otoksen valinta tutkittavista henkilöistä eli perusjoukosta (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 140).

## 4.3 Opinnäytetyön eettisten näkökohtien tarkastelu

Opinnäytetyön aiheena olevalla menetelmällä todettava sairaus, DEK/NUP214-positiivinen AML on hyvin vaikea sairaus, jolla on huono ennuste. Näin ollen DEK/NUP214-fuusiogeenin osoittaminen mahdollisimman pian potilaan diagnoosivaiheen näytteestä olisi merkittävää, jotta potilas saisi tautiinsa tehokkaimman mahdollisen hoidon. Yhtä, kaikille saatavilla olevaa parantavaa hoitoa ei tällä hetkellä ole olemassa, mutta tutkimusten mukaan diagnoosin jälkeen nopeasti annattu hematologinen kantasolusiirre vaikuttaa erityisen positiivisesti potilaan ennusteeseen (Østergaard ym. 2004, 28. 1213-1215; Garçon ym. 2005, 19. 1338-1344).

Tutkimuksessa käytettäviä näytteitä lähettäneiden sairaaloiden OYS, TYKS, HYKS hematologian klinikoiden ylilääkäreiltä on pyydetty lupa näytteiden käyttämiseen. Lain lääketieteellisestä tutkimuksesta (488/1999) mukaan

näytteistä saatavia terveydentilaa tai henkilökohtaisia oloja kuvaavia tietoja ei saa ilmaista sivulliselle. Käytetyissä näytteissä ja näytetunnisteissa ei ollut henkilötunnuksia, eikä näytemateriaalin tietosuojaa vaarannettu opinnäytetyön suoritusvaiheessa eikä raportointivaiheessa. Näytteiden tunnistamiseen pakastetuista solunäytteistä käytettiin näytteiden saapumispäivää, käsittelypäivää sekä nimeä.

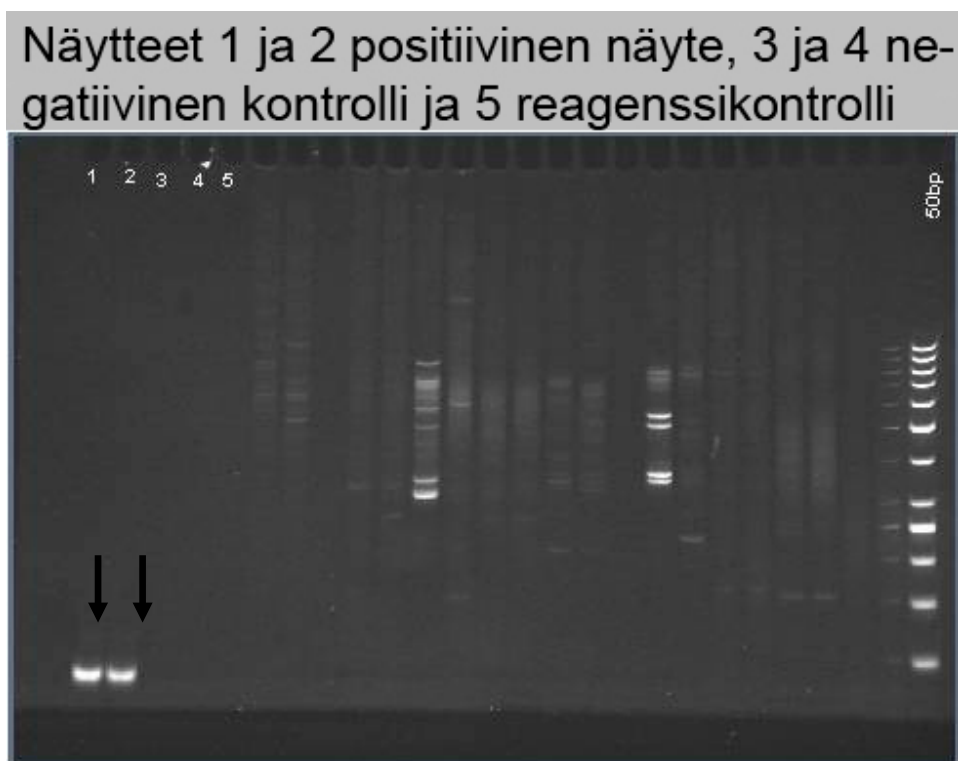
Terveydenhuollon ammattilaisina olemme velvollisia noudattamaan eettisiä ohjeita, joiden peruseriaatteita ovat hyvän tekeminen, vahingoittamisen välttäminen ja elämän arvokkuuden korostaminen (ETENE 2001). Näitä peruseriaatteita noudatetaan myös tässä tutkimuksessa. Tutkimukseen on haettu lupa TYKSLABin ylihoitaja Benita Paloheinältä VSSH:n Hoitotyön tutkimus- ja opinnäytetyölomakkeella 22.11.2011 ja se myönnettiin 24.11.2011. Tutkimuslupa on nähtävissä liitessä 3.

Saadut tulokset käsiteltiin sellaisinaan. Mitään tuloksia ei poistettu tulostason muuttamiseksi tai tulkintojen vääristämiseksi ja näytteet uusittiin vain, jos kontrollinäytteiden tulokset eivät olleet johdonmukaiset.

## 5 TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA

### 5.1 Tunnistaako menetelmä luotettavasti potilaan RNA:sta t(6;9)(p23;q34)-mutaation?

Tunnetun positiivisen näytteen PCR-tuotteista oli selvästi havaittavissa monistunut, alle sadan emäsparin kokoinen amplikoni. Negatiivisesta kontrollista ja reagenssikontrollista ei saatu minkäänlaista monistunutta tuotetta. Geeliin lisättiin tunnistet 1-2 positiivisille näytteille, 3-4 negatiivisille kontrolleille ja 5 yhdistetylle reagenssikontrollille. Kuvassa 2 nähtävän alimman kokostandardin vyöhykkeen koko on 100 emäsparia.

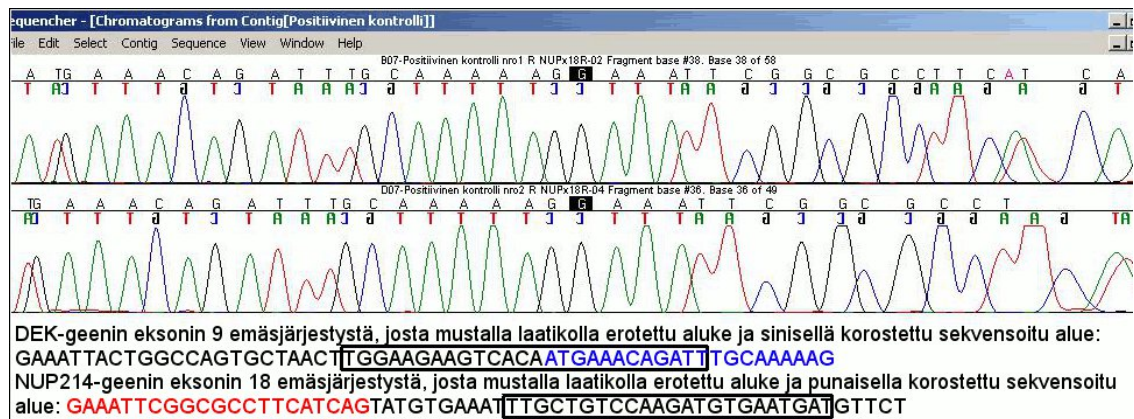


Kuva 2. Criteriongeelillä erotellut geenituotteet.

Geeliltä stanssattiin sekvensointia varten paloja. Näyte sekvensointiin duplettina forward- ja reverse-suuntiin. Sekvensoinnista saatua emäsjärjestystä verrattiin tunnettuihin DEK-geenin ja NUP214-geenin emäsjärjestyksiin, jolloin tunnistet-



tiin kyseessä olevan DEK/NUP214-fuusiogeeni, jossa fuusiokohta oli DEK-geenin eksonin 9 ja NUP214-geenin eksonin kohdalla (kuva 3).

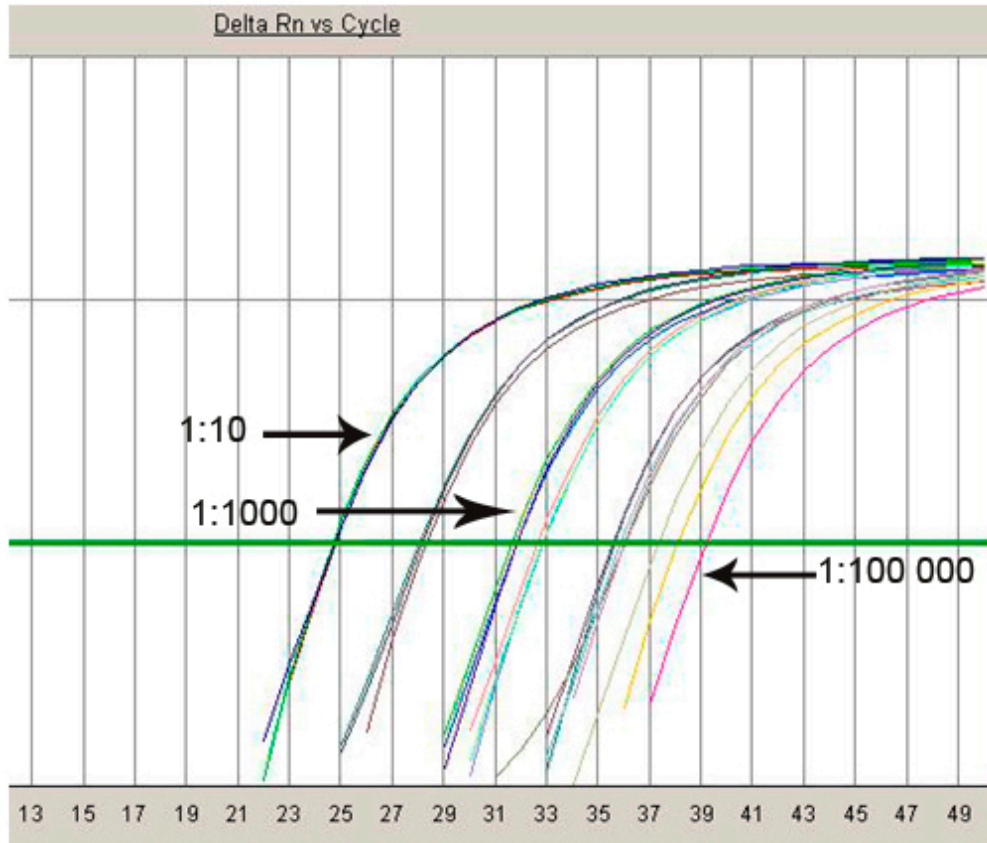


Kuva 3. Sekvensoitu positiivinen kontrollinäyte.

Menetelmällä saatiin siis monistettua vain tunnetun positiivisen potilaan näytteestä nukleinihappoja ja monistuminen oli spesifistä sekä tunnistettiin halutuksi DEK/NUP214-fuusiogeeniksi. Menetelmä siis tunnistaa luotettavasti potilaan RNA:sta t(6;9)(p23;q34)-mutaation.

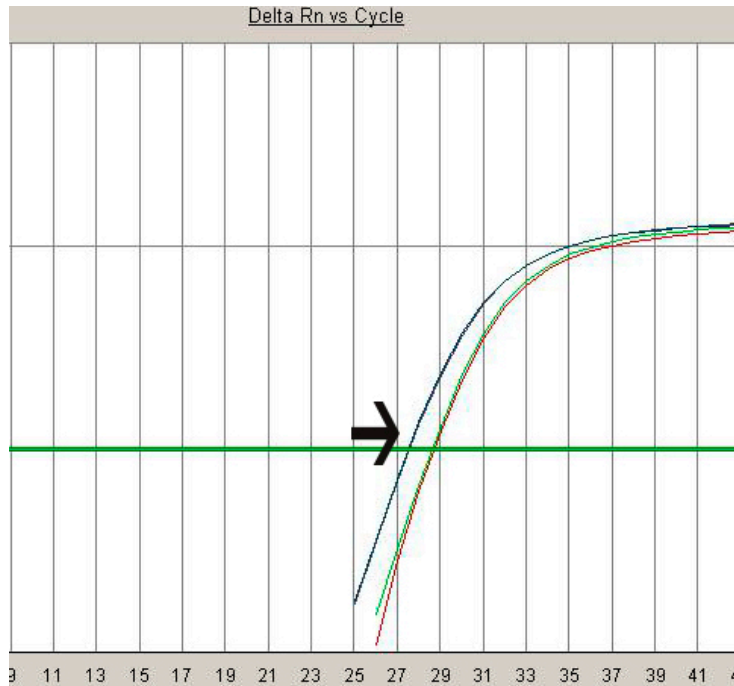
## 5.2 Sopiiko kehitetty menetelmä myös jäännöstautianalytiikkaan?

Tunnetusta positiivisen potilaan näytteestä sekä toisen positiiviseksi todetun potilaan näytteestä valmistettiin log-lineaarinen laimennossarja menetelmän herkkyuden määrittämiseksi. Laimennossarjassa näytteitä laimennettiin cDNA-kontrollipuuliin 1:100 000 laimennokseen asti. Laimennossarjan ajo reaaliaikaisella PCR-menetelmällä on nähtävissä kuvassa 4. Tunnetun positiivisen potilaan näytteestä valmistetulla laimennossarjalla päästiin 1:100 000 herkkyuteen asti.



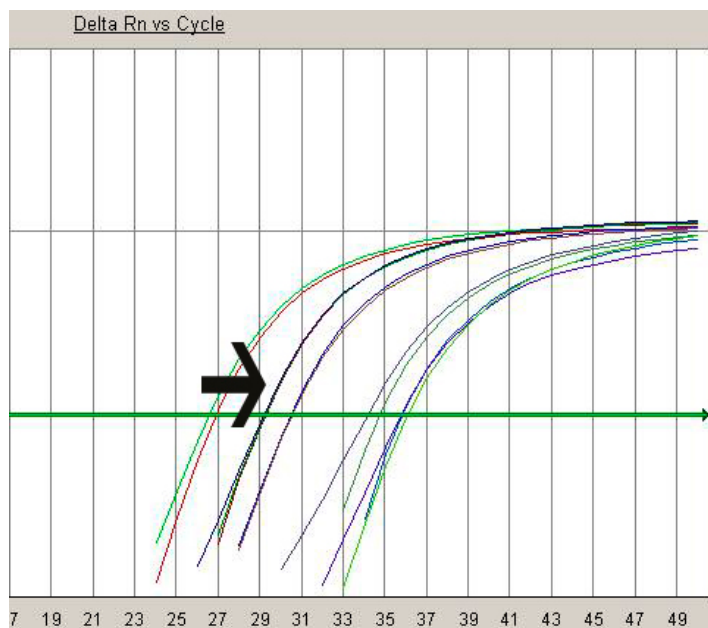
Kuva 4. Laimennossarja herkkyuden määrittämiseksi.

Tutkituista 50:stä diagnoosivaiheen näytteestä 3 potilaan näytteet osoittautuivat positiivisiksi DEK/NUP214-fuusiogeenin osalta. Kuvassa 5 on nähtävissä monistunut näyte positiivisen kontrollin rinnalla.



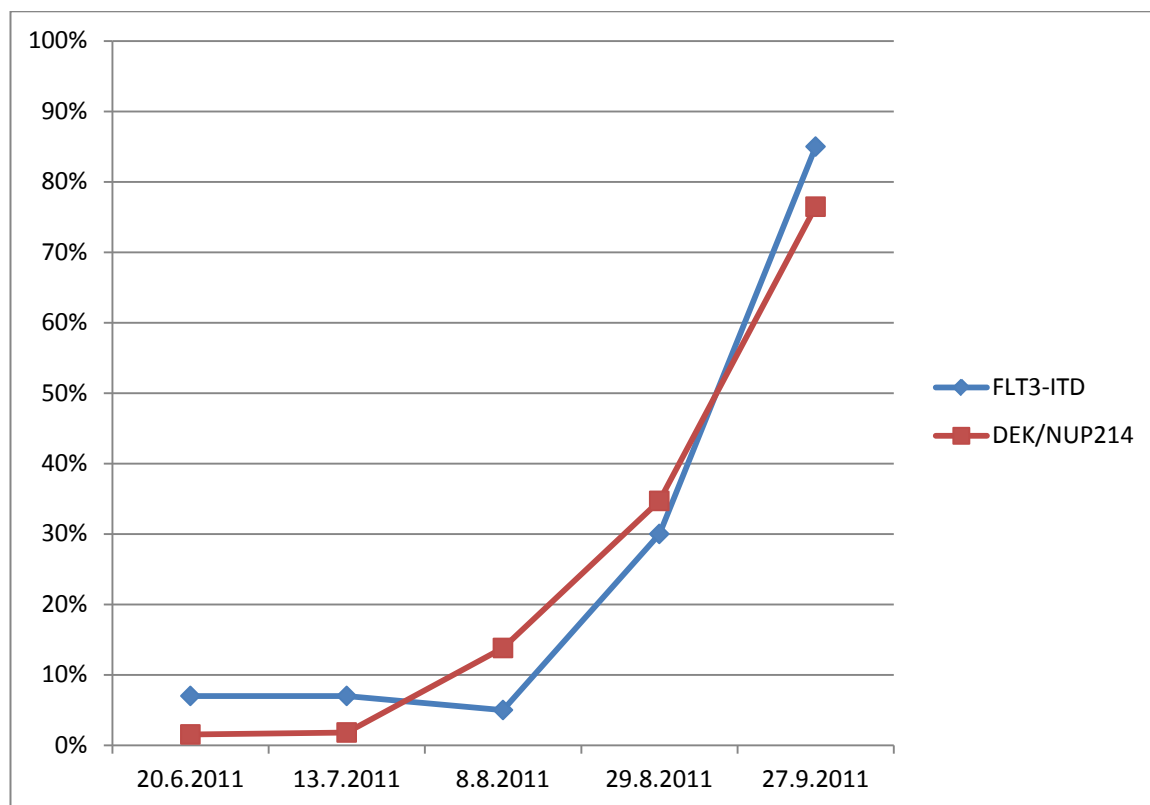
Kuva 5. qPCR:llä monistunut tuote ja positiivinen kontrolli.

Toisesta positiivisesta potilaasta ei ollut seurantanäytemateriaalia käytettävissä. Toisen potilaan seurantanäytteitä oli diagnoosivaiheen näytteen lisäksi käytettävissä viisi. Kuvassa 6 on nähtävissä seurantanäyte laimennossarjan rinnalla reaaliaikaisessa PCR-ajossa.



Kuva 6. Positiivisen potilaan seurantanäyte laimennossarjan rinnalla.

Toisen positiiviseksi todetun potilaan diagnoosivaiheen näytteestä valmistetun laimennossarjan perusteella PCR-menetelmän herkkyystasoksi saatiin 1:20 000. Viidestä seurantanäytteestä oli tutkittu myös FLT3-ITD:n jäännöstautiosuus, jota verrattiin DEK/NUP214-fuusiogeeniosuuteen. Vertailussa normalisoidut pitoisuudet seuraavat hyvin toisiaan, eli DEK/NUP214-fuusiogeeni toimisi vähintään yhtä hyvänä jäännöstautimarkkerina kuin FLT3-ITD. Kuviosta 2 on nähtävissä molempien markkereiden tason nousu lähelle diagnoosivaiheen tasoa, eli molekyyligeneettisesti on havaittavissa relapsi.



Kuvio 2. FLT3-ITD:n ja DEK/NUP214-fuusiogeenin määrä seurantanäytteissä diagnoosivaiheen näytteeseen suhteutettuna.

Menetelmällä saatiin vastaavat tulokset kuin käytössä olevaa seurantamarkkeria käyttäen. Menetelmän herkkyudeksi saatiin ensimmäisestä, tunnetun positiivisen potilaan laimennossarjasta 1:100 000 ja jälkimmäisestä, positiiviseksi todetun potilaan diagnoosivaiheen näytteestä valmistetusta laimennossarjasta 1:20 000 eli menetelmä soveltuu myös jäännöstautianalytiikkaan.

## 6 POHDINNAT

Tutkimus oli erittäin spesifinen translokaatiolle (6;9)(p23;q34) ja fuusiogeeniposiitiiviset näytteet monistuiivat voimakkaasti qPCR-menetelmällä. Positiivisten potilaiden esiintyvyys oli tutkimukseen valikoiduissa näytteissä 4%, joka on hieman korkeampi kuin aiemmissa tutkimuksissa saadut tulokset (Østergaard ym. 2004; 1213, Chi, Lindgren, Quigley & Gaitonde 2008; 1835, Swerdlow ym. 2008; 115). Menetelmällä päästiin herkkyteen 0,005 - 0,001%, joka on hyvä taso jäännöstauditutkimukselle.

Menetelmää validoitaessa reagenssit ja laitteet toimivat erinomaisesti ilman puutteita ja alukkeet toimivat tunnetulla positiivisella näytteellä spesifisesti. Osa näytesarjoista uusittiin johtuen epätarkasta pipetoinnista. Varsinaisessa käytössä menetelmässä ei synny vastaavaa ongelmaa laboratorion henkilöstön ollessa työhönsä erikoistunutta, perehdytettyä ja osaavaa.

Menetelmä otetaan kevään 2012 aikana käyttöön TYKSLABin rutiinitutkimuksissa, ja siitä tulee kiinteä osa akuutin myelooisen leukemian molekyylogeneettistä diagnostiikkaa. Etsittäessä kyseistä mutaatiota TYKSLABissa, saadaan tulos nopeammin kuin kromosomitutkimusmenetelmillä, jolloin diagnostiikka ja hoidon aloitus nopeutuu.

Menetelmä saatiin tämän tutkimuksen tuottaman tiedon perusteella validoitua ja sen spesifisyys ja herkkyys ovat riittävät, joten sen osalta ei jatkotutkimusaiheita löydy. Vastaavia uusien menetelmien validointeja TYKSLAB Molekyylogenetikan laboratorio toki kaipaa tulevaisuudessa useita, varsinkin nyt koko genomin sekvensoinnin yleistyessä ja tutkimustiedon lisääntyessä voimakkaasti.

## LÄHTEET

Absolute vs Relative Quantification. Applied Biosystems 2012. Viitattu 3.4.2012. [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com) > Applications & Technologies > qPCR (Real-Time PCR) > Absolute vs Relative Quantification.

AML seuranta ja vastearvio. 2012. Viitattu 28.3.2012. [www.hematology.fi](http://www.hematology.fi) > Veritaudit > Akuutit leukemiat > AML > Seuranta ja vastearvio.

AML-2012. Suomen Hematologiyhdistys Ry 2012. Viitattu 12.1.2012. [www.hematology.fi](http://www.hematology.fi) > Veritaudit > Akuutit leukemiat > AML > hoito > AML-2012

Bernheim A. 2010. Cytogenomics of cancers: From chromosome to sequence. *Molecular Oncology* 4: 309-322.

Betz B. & Hess J. 2010. Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21th century. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 134: 1427-1433.

Buccisano F., Maurillo L., Del Principe M., Del Poeta G., Sconocchia G., Lo-Coco F., Arcese W., Amadori S. & Venditti A. 2012. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood* 119: 332-341.

Chi Y., Lindgren V., Quigley S. & Gaitonde S. 2008. Acute myelogenous leukemia with t(6;9)(p23;q34) and marrow basophilia. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 132: 1835-1837.

Clone Definition. MedicineNet.com. Viitattu 18.4.2012. [www.MedicineNet.com](http://www.MedicineNet.com) > C > Clone.

Elonen E. 2007 Akuutit leukemiat. Teoksessa T. Ruutu, A. Rajamäki, R. Lassila & K. Porkka. (toim.) Veritaudit. Kustannus Oy Duodecim. Helsinki: 285-309.

Ensembl 2011. About the Ensembl Project. Viitattu 17.11.2011. [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) > About Ensembl

ETENE 2001. Terveysthuollon yhteinen arvopohja, yhteiset tavoitteet ja periaatteet. Viitattu 10.11.2011. [www.etene.fi](http://www.etene.fi) > Julkaisut ja muut aineistot > Julkaisut > 2001

Garçon L., Libura M., Delabesse E., Valensi F., Asnafi V., Berger C., Schmitt C., Leblanc T., Buzyn A & Macintyre E. 2005. DEK-CAN molecular monitoring of myeloid malignancies could aid therapeutic stratification. *Leukemia* 19: 1338-1344.

Hamaguchi H., Nagata K., Yamamoto K., Fujikawa I., Kobayashi M., & Eguchi M. 1998, Establishment of a novel human myeloid leukaemia cell line (FKH-1) with t(6;9)(p23;q34) and the expression of dek-can chimaeric transcript. *British Journal of Haematology* 102: 1249-1256.

Hirsjärvi S., Remes P. & Sajavaara P. 2009. Tutki ja kirjoita. Helsinki: Tammi.

Jorgensen J. & Chen S. 2011. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: methods and best applications. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 11 (S1): S49-53. Abstract.

Kavanaugh G., Wise-Draper T., Morreale R., Morrison M., Gole B., Schwemberger S., Tichy E., Lu L., Babcock P., Wells J., Drissi R., Bissler J., Stambrook P., Andreassen P., Wiesmüller L. & Wells S. 2011. The human DEK oncogene regulates DNA damage response signaling and repair. *Nucleic Acids Research* 39 (17): 7465-7476.

Knuutila S., Kairisto V. & Porkka K. 2007. Syto- ja molekyyli-genetiikka. Teoksessa T. Ruutu, A. Rajamäki, R. Lassila & K. Porkka. (toim.) Veritaudit. Kustannus Oy Duodecim. Helsinki: 112-133.

Knuutila S. 2000. Sytogenetiikka ja molekyyli-patologia syöpätautien diagnostiikassa – esimerkkinä lymfoomat ja sarkoomat. Suomen Lääkärilehti 55 (17):1831-1841.

Koulu M., Mervaala E. & Tuomisto J. 2007. Farmakologia ja toksikologia. Medicina Oy. Kuopio.

Kraemer D., Wozniak R., Blobel G. & Radu A. 1994. The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 91 (4): 1519-1523.

Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta 9.4.1999/488.

Maeda T., Kosugi S., Ujiie H., Osumi K., Fukui T., Yoshida H., Kashiwagi H., Ishikawa J., Tomiyama Y. & Matsuzawa Y. Localized relapse in bone marrow in a posttransplantation patient with t(6;9) acute myeloid leukemia. International Journal of Hematology volume 77 (5): 522-525. Case Report.

Miyauchi Y., Sakaguchi N., Okada T., Makishima M., Ozono K. & Michigami T. 2009. Oncogenic nucleoporin CAN/NUP214 interacts with vitamin D receptor and modulates its function. Journal of Cellular Biochemistry 106 (6): 1090-1101. Abstract.

Patel S., Belmont B., Sante J. & Rexach M. 2007. Natively Unfolded Nucleoporins Gate Protein Diffusion across the Nuclear Pore Complex. Cell 129: 83-96.

Ruutu T. 2007. Kantasolujen siirrot veritautien hoidossa. Teoksessa T. Ruutu, A. Rajamäki, R. Lassila & K. Porkka. (toim.) Veritaudit. Kustannus Oy Duodecim. Helsinki: 492-503.

Schneider F., Bohlander S., Schneider S., Papadaki C., Kakadyia P., Dufour A., Vempati S., Unterhalt M., Feuring-Buske M., Buske C., Braess J., Wandt H., Hiddemann W. & Spiekermann K. 2007. AML1-ETO meets JAK2: Clinical evidence for the two hit model of leukemogenesis from a myeloproliferative syndrome progressing to acute myeloid leukemia. Leukemia 21: 2199-2201.

Sitwala K., Adamas K. & Markowitz D. 2002. YY1 and NF-Y binding sites regulate the transcriptional activity of the dek and dek-can promoter. Oncogene 21: 8862-8870.

Suomen Hematologiyhdistys Ry 2011. Kansalliset hoito-ohjeet. Viitattu 2.11.2011. [www.hematology.fi](http://www.hematology.fi) > HUS-ohjeet > AML

Suominen I., Pärssinen R., Haajanen K. & Pelkonen J. 2010. Geenitekniikka. Turun ammattikorkeakoulu. Turku.

Swerdlow S., Campo E., Harris N., Jaffe E., Pileri S., Stein H., Thiele J & Vardiman J. 2008. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. WHO Press. Lyon.

Taqman and SYBR Green Chemistries. 2012. Viitattu 3.4.2012. [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com) > Applications & Technologies > qPCR (Real-Time PCR) > Taqman and SYBR Green Chemistries.

Tobal K., Frost L. & Liu Yin J.A. 2004. Quantification of DEK-CAN fusion transcript by real-time reverse transcription polymerase reaction in patients with t(6;9) acute myeloid leukemia. Haematologica 89: 1267-1269.

Translocation – Chromosome 6. Pathologyoutlines.com. Viitattu 18.4.2012. [www.pathologyoutlines.com](http://www.pathologyoutlines.com) > Leukemia Acute > t(6;9)

Østergaard M., Stentoft J. & Hokland P. 2004. A real-time quantitative RT-PCR assay for monitoring DEK-CAN fusion transcripts arising from translocation t(6;9) in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* 28: 1213-1215.



## **Liite 1. SHY:n Geneettinen riskiluokitus 2012**

Luokitus perustuu ELN-ohjeistukseen (Blood 2010; 115: 453-474).

Siihen on lisätty monosomaalinen karyotyyppi (viitteet: Blood 2010; 116: 2224 - 2228 ja Blood 2011; 118: 679 -685).

### **Pieni riski (ryhmä I)**

**Seuraavat karyotyypipoikkeavuudet** (yksin tai muiden poikkeavuuksien yhteydessä)

t(8;21) (q22;q22) [ RUNX1-RUNX1T1]

inv16 (p13.1;q22)/t(16;16) (p13.1;q22) [CBFB-MYH11]

### **Normaali karyotyyppi seuraavien mutaatioiden yhteydessä**

NPM1-mutaatio ilman Flt3-ITD-mutaatiota

kaksoismutatoitunut CEBPA ilman Flt3-mutaatiota

### **Keskiriski (Ryhmä II)**

#### **Normaali karyotyyppi seuraavien mutaatioiden yhteydessä:**

Flt3-ITD-mutaatio ja NPM1-mutaatio

Flt3-ITD-mutaatio ilman NPM1-mutaatiota

#### **Normaali karyotyyppi ilman Flt3-ITD- ja NPM1-mutaatioita**

#### **Seuraavat ryhmään I ja III kuulumattomat karyotyypipoikkeavuudet**

t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL

muut ryhmään I ja III kuulumattomat karyotyypipoikkeavuudet

### **Suuri riski (Ryhmä III)**

#### **Seuraavat karyotyypipoikkeavuudet**

inv(3)(q21q26.2) / t(3;3)(q21;q26.2) [RPN1-EVI1]

t(6;9)(p23;q34) [DEK-NUP214]

t(v;11(v;q23) [uudelleenjärjestäytynyt MLL luk.ottamatta muutosta t(9;11)]

-5, 5q-, -7, poikkeava 17p

kompleksinen karyotyyppi

kolme tai useampi karyotyypipoikkeavuus. Lukuun ei lasketa seuraavia:  
t(15;17), t(8;21), inv(16), t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;g23), t(6;9), inv(3), t(3;3)

monosomaalinen karyotyyppi

yksi autosomin monosomia + yksi tai useampi rakenteellinen karyotyypipoikkeavuus

kaksi tai useampi autosomin monosomiapoikkeavuutta

Huom! Matalan riskin karyotyypipoikkeavuuksia ja XY monosomioita ei lasketa mukaan. (AML-2012; 2012.)

## Liite 2. Aiempien tutkimusten alukkeiden vertailu

Tutkimus	Forward-alue	Reverse-alue	TaqMan-koetin	Tuotteen pituus
Garçon ym. 2005, 1338- 1344.	AAAGTTGAAGAA- ACCCCTACAGA, 24 emästä	CATCATTACATCTTGGA- CAGCA, 23 emästä	CATACTGATGAAGGCGCC GAATTCCT, 27 emästä	161 emästä
Østergaard, Stentoft & Hokland 2004, 1213-1215.	ATTACTGGCCAGTGC- TAACTTG, 22 emästä	GATTGTTGGCTAGGGTGT- TAAA, 22 emästä	TTCCAGATGCTGATCC- CACTCCA, 23 emästä	212 emästä
Hamaguchi ym. 1998, 1249.	CCTACAGATGAAGAGT- TAA, 19 emästä	TCTTCCTCTGTTGGTTGATG, 20 emästä	Ei käytetty tutkimuksessa	290 emästä

Hamaguchi ym. 1998, 1249.	GGCCAGTGCTAACTTGG, 17 emästä	GTGTCTCTCGCTCTGG, 16 emästä	Ei käytetty tutkimuksessa	182 emästä
Maeda ym. 2003, 522- 525.	TACTGGCCAGTGC- TAACTTG, 20 emästä	TGATGAAGGCGCCGAATTC, 20 emästä	CTTTTTGCAAATCTGTTT- CAT  TGTGACTT, 29 emästä	73 emästä
Tobal, Frost & Liu Yin 2004, 1267-1269.	TTGGAAGAAGTCACAAT- GAAACAGA, 25 emästä	GGACAGCAAATTCACA- TACTGATG, 25 emästä	TTGCAAAAAGGAA- ATTCGGCGCCTT, 25 emästä	76 emästä
Itse suunnitel- lut alukkeet	TGGAAGAAGTCACAAT- GAAACAGATT, 26 emästä	ATCATTACATCTTGGACAG- CAA, 23 emästä	AGGAAATTCGGCGCCTT- CATCAGTATG, 27 emästä	89 emästä

## Liite 3. Tutkimuslupa

VARSINAIS-SUOMEN SAIRAANHOITOPIIRI Egentliga Finlands sjukvårdsdistrikt		HOITOTYÖN TUTKIMUS- JA OPINNÄYTETYÖ	
LUPAHAKEMUS (katso erilliset ohjeet: <a href="http://www.vsshp.fi/fi/tutkimus">http://www.vsshp.fi/fi/tutkimus</a> ) Hakemus lähetetään: VSSH, TYKS, Hoitotyön toimisto, suunnittelija, PL 52, 20521 TURKU		Nro _____	
		<input checked="" type="checkbox"/> Uusi tutkimus <input type="checkbox"/> Jatko/Muutos lupaan	
TUTKIMUSLUVAN HAKIJA/HAKIJAT	Nimi/nimet: Petri Juhani Rummukainen		
	Osoite: Yo-kylä 8B 3 20540 Turku		
	puhelin: 0407517054 sähköposti: petri.j.rummukainen@students.turkuamk.fi		
Opiskelu- tai työpaikka	Turun Ammattikorkeakoulu, Bioanalytiikan koulutusohjelma		
Opinnäytetyö	<input type="checkbox"/> Väitöskirja <input type="checkbox"/> Pro gradu <input checked="" type="checkbox"/> Opinnäytetyö/AMK <input type="checkbox"/> muu, mikä? _____		
	<input type="checkbox"/> Lisensiaattityö <input type="checkbox"/> Ylempi AMK		
TUTKIMUKSEN/OPINNÄYTETYÖN TIIVISTETTY KUVAUS (mm. tutkimuksen nimi, päätaivoitteet, menetelmät, aineisto, tutkimuksen suorituspaikka, tutkimuksen merkitys)	Tutkimuksen nimi on PCR-menetelmän validointi mutaation t(6;9)(p23;q34) osoittamiseksi RNA:sta TYKSlabin käyttöön. Tavoitteena on tuottaa riittävästi tutkimustietoa menetelmän validoimiseksi TYKSlabin laatuksikirjan mukaiseksi laboratoriotutkimukseksi.		
Tutkimussuunnitelma erillisenä liitteenä (max. 5 s.)	Kyseessä oleva mutaatio on harvinainen AML:ään liittyvä mutaatio, jolla on vaikutus ennusteeseen ja hoitoon. Opinnäytetyö tehdään TYKSlab os 931:n tiloissa heidän laitteillaan. Tutkimukseen käytettävät näytteet ovat osaston 931 pakastamia RNA-näytteitä, joista sairaalageneetikko Tuuja Lundán valitsee sopivat näytteet tutkimukseen.		
TUTKIMUKSEN OHJAAJA(T) YHTEYSTIEDOT	20.11.2011 <u>Tuula Lundán</u> allekirjoitus/nimen selvennys 21.11.2011 <u>Petri Rummukainen</u> allekirjoitus/nimen selvennys P.33597 644-9075499		
SITOUUMUS JA JULKAISULUPA	Sitouden noudattamaan hyvää tutkimuskäytäntöä, sairaalan yleisiä sääntöjä sekä vaitiolovelvollisuutta ( <a href="http://www.vsshp.fi/fi/tutkimus/1071/">http://www.vsshp.fi/fi/tutkimus/1071/</a> , <a href="http://www.turkucrc.fi">www.turkucrc.fi</a> ). 22.11.2011 <u>Petri Rummukainen</u> hakijan allekirjoitus/nimen selvennys 1/1/ hakijan allekirj./nimen selvennys 1/1/ hakijan allekirjoitus/nimen selvennys 1/1/ hakijan allekirj./nimen selvennys		
YLIHOITAJAN LAUSUNTO JA YHDYSHENKILÖN NIMEÄMINEN VSSH:ssä	Klinikan/yksikön kehittämishanke, johon opinnäytetyö/tutkimus liittyy: _____ Yhdyshenkilö/virkan/toimen nimike: _____ (yh nimeää) Puollan <input type="checkbox"/> En puolla <input type="checkbox"/> Ylihoitaja(t) 1/1/ allekirjoitus/nimen selvennys 1/1/ allekirj./nimen selvennys		
HOITOTYÖN ASIAINTIJIJA-RYHMÄN LAUSUNTO	<input type="checkbox"/> Lupaa puolletaan <input type="checkbox"/> Ei puolleta, Perustelu (tarv. liitteenä) <input type="checkbox"/> Pyydetään lähettämään eettiselle toimikunnalle 1/1/ allekirjoitus/nimen selvennös <input type="checkbox"/> Pyydetään lisäselvityksiä: _____		
EETTINEN TOIMIKUNTA	Eettisen toimikunnan lausunto saatu (liitteenä) 1/1/		
TUTKIMUSLUVAN MYÖNTÄMINEN	<input checked="" type="checkbox"/> Myönnetty <input type="checkbox"/> Ei myönnetty 24.11.2011 <u>Benita Pakoheimo</u> allekirjoitus/nimen selvennys allekirjoitus/nimen selvennys <u>BENITA PAKOHEIMO</u> VSSH:n/sairaalan nimen saa julkaista tutkimusraportissa/opinnäytetyössä Kyllä <input checked="" type="checkbox"/> Ei <input type="checkbox"/> Haluan nähdä tutkimusraportin/opinnäytetyön ennen julkaisuluvan antoa Kyllä <input checked="" type="checkbox"/> Ei <input type="checkbox"/>		
	Päätös annettu tiedoksi hakijalle 1/1/ Päätöksen antoi _____		

YHT 26sra TYKS/4.2009