



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

ALKIOBIOPSIAN DNA-ERISTYSMENETELMÄN VAIKUTUS ALLELE DROPOUT-ILMIÖÖN

Hanna-Kaarina Juppi

Opinnäytetyö
Marraskuu 2016
Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus

JUPPI HANNA-KAARINA

Alkiobiopsian DNA-eristysmenetelmän vaikutus allele dropout-ilmioon

Opinnäytetyö 52 sivua

Marraskuu 2016

Lapsettomuus ja lasten saantiin liittyvät vaikeudet ovat yleistynyt ongelma ympäri maailman. Tehokkain hoitomuoto on koeputkihedelmöitys (IVF). Koeputkihedelmöityshoito mahdollistaa myös alkiodiagnostiikan, jossa perinnöllistä tautia kantavien potilaiden alkiot tutkitaan tarkoituksena vähentää riskiä saada sairas lapsi.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia alkiodiagnostiikan merkittävää ongelmaa, allele dropout-ilmiota (ADO). Allele dropout on ilmiö, jossa vain toinen tutkittavan geenin alleeleista monistuu polymeerasiketjureaktiossa (PCR). Monistumisvirhe voi aiheuttaa pahimmillaan virheellisen diagnoosin. Allele dropoutia esiintyy analyyseissa, joissa lähdemateriaalia on hyvin vähän. Sen syiksi on esitetty esimerkiksi epäonnistunutta solujen hajotusta, DNA:n eheyteen vaikuttavia tekijöitä ja polymeerasiketjureaktion epäoptimaalisia olosuhteita. Menetelmien kehittämisen tavoitteena on vähentää ilmiön esiintyvyyttä ja täten parantaa alkiodiagnostiikan luotettavuutta.

Tässä opinnäytetyössä verrattiin vakiintunutta solujen hajottamis- ja DNA:n eristystyötappaa Ovumian tutkimaan muokattuun menetelmään. Tutkittujen menetelmien vaikutusta allele dropoutiin ja PCR:n onnistumiseen arvioitiin. Työssä käytettiin menettelytapoja, jotka ovat osittain salassa pidettäviä. Täten niiden yksityiskohdat on poistettu julkaistavasta versiosta. Tulokseksi saatiin tilastollisesti merkitsevästi alempi allele dropout käytettäessä Ovumian metodia standardimenetelmään verrattuna. Työssä tutkittu muokattu menetelmä voi toimia jatkokehityksen kohteena esimerkiksi tuotekehitykselle.

Asiasanat: alkiodiagnostiikka, allele dropout, hedelmöityshoidot, lapsettomuus

ABSTRACT

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

HANNA-KAARINA JUPPI

The Effect of DNA Extraction Method on Allele Dropout in Embryo biopsy

Bachelor's thesis 52 pages
November 2016

Infertility and other problems concerning having children are a common problem around the world. The most efficient treatment method is *in vitro* fertilization (IVF). IVF treatments also make preimplantation genetic diagnosis (PGD) possible, where embryos of patients carrying a hereditary disease are analysed with the aim of decreasing the risk of having an affected child.

The purpose of this study was to examine a major PGD related problem, a phenomenon called allele dropout (ADO). Allele dropout is manifested when only one of the two alleles in the locus being investigated amplifies during polymerase chain reaction. A mistake or misinterpretation in the amplification process can result in faulty diagnosis. Allele dropout occurs in analyses, where a limited number of source material is present. The factors causing allele dropout are suggested to be for example failed cell lysis, factors concerning DNA integrity and suboptimal conditions in PCR. The purpose of developing current methods is to decrease the incidence of allele dropout and thereby increasing the reliability of preimplantation diagnostics.

In this study, a new protocol for cell lysis and DNA extraction was compared with an established method. Incidence of allele dropout and the success rate of PCR were measured. Some of the methods used are regarded as confidential and therefore some details are excluded from the published version. During laboratory work, a statistically significant decrease in allele dropout rate was observed with the new protocol. The method used can act as a starting point for protocol development.

Key words: preimplantation genetic diagnosis, allele dropout, infertility treatment, infertility

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	HEDELMÖITYSHOIDOT JA LAPSETTOMUUS	8
3	ALKIONKEHITYS JA ALKIODIAGNOSTIIKKA.....	11
	3.1 Alkion syntyä edeltävät vaiheet	11
	3.2 Alkionkehitys.....	11
	3.3 Yleistä alkiodiagnostiikasta	12
	3.4 Alkion geneettisen seulontatutkimuksen suoritus.....	14
	3.4.1 Alkioiden biopsointi.....	14
	3.4.2 Näytesolujen analysointi	18
	3.5 Yhden solun analyysien erityispiirteet.....	21
	3.5.1 Yhden solun PCR:n ongelmia.....	22
	3.5.2 Allele dropout.....	24
4	LYYSISMENETELMÄT DNA:N ERISTÄMISEKSI.....	25
	4.1 Alkion geneettiseen seulontaan käytetyt tekniikat.....	25
	4.2 Suolojen vaikutus DNA:n säilyvyyteen ja polymeerasiketjureaktion tehokkuuteen.....	26
5	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE.....	29
6	MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT	30
7	TYÖN SUORITUS	31
	7.1 Tutkimusstrategia.....	31
	7.2 DNA:n fragmentaatiokokeet	31
	7.3 Allele dropout-kokeen näyttemateriaali.....	32
	7.4 Yksittäisten solujen käsittely PCR-kokeita varten.....	32
	7.5 Solujen hajotus allele dropout-kokeessa.....	33
	7.6 Polymeerasiketjureaktio.....	33
	7.6.1 Polymeerasiketjureaktion optimointi	34
	7.7 Dimetyylisulfoksidi-testaus	36
	7.8 Allele dropout-PCR	37
	7.9 Tuotteiden detektointi	37
	7.10 Tilastollinen analyysi	37
8	TULOKSET	39
	8.1 DNA:n fragmentaatiokokeet.....	39
	8.2 Polymeerasiketjureaktion optimointi	42
	8.3 Dimetyylisulfoksiditestaus ja polymeerasiketjureaktion optimointi yksittäisillä soluilla	43
	8.4 Yksittäisten solujen allele dropout ja polymeerasiketjureaktio	44

9 POHDINTA JA YHTEENVETO	46
LÄHTEET	49

1 JOHDANTO

Raskauden alkaminen ei aina ole yksinkertaista. Lapsia haluavia pareja voi koskettaa joko kokonaan lapsettomuus tai huoli syntyvän lapsen terveydestä. Syitä lapsettomuuteen on monia ja aina syytä ei välttämättä edes saada selville. Erityisesti synnyttäjien kasvava keski-ikä ja esimerkiksi endometrioosi, stressi, paino-ongelmat ja ympäristömyrkyt vaikuttavat hedelmällisyyteen.(MSD 2014, Sariola ym. 2015.) Lapsettomuustutkimuksia ja -hoitoja voidaan tehdä sekä julkisessa että yksityisessä terveydenhuollossa ja tutkimus- ja hoitokäytännöt vaihtelevat klinikoiden välillä (MSD 2014). Tekniikoiden kehittyessä hedelmällisyshoitojen kysyntä on kasvanut ja hoitojen teho parantuu jatkuvasti. Onkin arvioitu, että noin 3 % Pohjoismaissa syntyvistä lapsista on saanut alkunsa hedelmöityshoitojen seurauksena. (Sariola ym. 2015.)

Lapsettomuustutkimusten tai hedelmällisyshoitojen syynä voi olla varsinaisen hedelmättömyyden lisäksi myös tieto vanhempien kantamasta perinnöllisestä sairaudesta. Mikäli toinen tai molemmat vanhemmista tietävät kantavansa tiettyä vakavan sairauden aiheuttavaa geeniä, voi heillä olla halu estää sairauden siirtyminen toiveissa olevalle lapselle. Alkiodiagnostiikan keinoin voidaan alkion DNA:sta tutkia sen kantamia perinnöllisiä sairauksia jo ennen varsinaisen raskauden alkua. Alkiodiagnostiikkaa suoritetaan ottamalla eli biopsoimalla yleensä koeputkihedelmöityksellä alkunsa saaneesta alkioista yhden tai useamman solun näyte. (Thornhill & Snow 2002.) Vähäistä näytemäärää on tarpeen monistaa polymeerasiketjureaktiolla (PCR), jotta analyysija varten olisi riittävästi DNA:ta. Varsinkin yhden solun PCR:ään liittyy kuitenkin monia ongelmia, joista ehkä merkittävin on allele dropout (ADO). Allele dropout-ilmiö tarkoittaa tilannetta, jossa vain toinen solun tutkittavana olevista alleeleista monistuu ja alkio voidaan diagnosoida tämän vuoksi virheellisesti.(Rechitsky ym. 1998, Piyamongkol ym. 2003.)

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia alkiobiopsian DNA-eristysmenetelmän vaikutusta allele dropout-ilmiöön vertaamalla kahta menetelmää toisiinsa. Solujen hajoituksessa ja DNA:n eristämisessä käytettiin yleisesti käytössä olevaa natriumdodekyylisulfaatti/proteinaasi K-käsittelyä (SDS/PK), jota verrattiin Ovumian tutkimaan modifioituun versioon. Työn tavoitteena oli tuottaa Ovumialle tietoa allele dropout-ilmiöön vaikuttavista tekijöistä ja heidän menetelmänsä soveltuvuudesta käytännön työhön. Osa

työssä käytetyistä menetelmistä on sovittu salassapidettäviksi, joten kaikkia yksityiskoh-
tia ei julkaista.

2 HEDELMÖITYSHOIDOT JA LAPSETTOMUUS

Suomessa ensisynnyttäjien keski-ikä on noussut jo vuosikymmeniä ja Tilastokeskuksen mukaan vuonna 2012 kaikkien synnyttäjien keski-ikä oli yli 30 vuotta. Naisten hedelmättömyys on lisääntynyt samanaikaisesti myös siittiöiden laadun heiketessä. (Sariola ym. 2015.) Tämän vuoksi lapsettomuus koskettaa kymmeniä tuhansia pareja Suomessa. Lapsettomuuteen on monia syitä ja osaan niistä voidaan vaikuttaa hedelmöityshoidoilla. (MSD 2014.)

Noin neljäsosa parien lapsettomuudesta on naisesta johtuvaa, noin neljännes miehestä johtuvaa ja noin neljännes sekä miehestä että naisesta johtuvaa. Joka neljännelle lapsettomuustapaukselle ei löydetä syytä ollenkaan ja kyse on selittämättömästä lapsettomuudesta. Lapsettomuuden taustalla voi olla esimerkiksi munarakkulan kypsymishäiriö, endometriosisi, kivesten toiminnan hormonaalisen säätelyn poikkeavuus tai sukusolujen piilevät kromosomipoikkeavuudet. Monesti on kuitenkin niin, ettei voida osoittaa yhtä tiettyä syytä lapsettomuudelle. Fyysisten ja anatomisten tekijöiden lisäksi lapsettomuuteen voivat vaikuttaa myös elämäntavat, kuten erilaiset paino-ongelmat, ravinto, ympäristömyrkyt ja esimerkiksi stressi. (MSD 2014, THL 2016b.) Yleinen ohje lapsitoiveisille parille on hakeutua tutkimukseen vuoden aktiivisen yrittämisen jälkeen tai jo aikaisemminkin naisen ollessa yli 35-vuotias tai jos parilla on tiedossa muita hedelmällisyyteen vaikuttavia esitietoja. Tutkimuksissa selvitetään mm. parin yleistä terveydentilaa, nykyisiä elintapoja ja mahdollisia suvussa esiintyviä sairauksia. Miesten siittiöiden liikkuvuus selvitetään ja naisen kohtu ja munasarjat tutkitaan mahdollisten tukosten tai poikkeamien varalta. Molemmilta osapuolilta tutkitaan laajasti myös erilaisia hedelmällisyyteen liittyviä hormonipitoisuuksia, kuten LH, FSH, testosteroni ja prolaktiini. (MSD 2014.)

Lapsettomuustutkimuksia ja -hoitoja tehdään sekä julkisessa että yksityisessä terveydenhuollossa. Eri tutkimus- ja hoitokäytännöt vaihtelevat klinikoiden välillä ja kullekin parille suunnitellaan oma yksilöllinen hoitonsa. (MSD 2014.) Hedelmällisyyshoitojen kysyntä on kasvanut ja hoitojen teho parantuu jatkuvasti. Hedelmöityshoitoihin liittyvät riskitekijöinä esimerkiksi keskenmenot ja keskosuus. (Sariola ym. 2015.)

Varsinaisia hedelmöityshoitoja ovat ovulaation induktio (OI), inseminaatio (IUI), koeputkihedelmöitys (IVF) ja siittiön mikroinjektio munasoluun (ICSI). Hoidoissa voidaan

käyttää mahdollisuuksien mukaan parin omia tai luovuttajien sukusoluja. Ovulaation induktiota eli munarakkulan kypsytyshoitoa tehdään tilanteissa, joissa munasolu ei kypsy ja irtoa eli ovuloi luonnostaan. Kypsytyks voidaan tehdä tablettihoidolla tai tietyissä tapauksissa pistöksin. Munasarjojen stimulaatio FSH:llä ja LH:lla mahdollistaa useamman munasolun keräyksen sykliä kohden, mikä taas kasvattaa raskautumisprosenttia. (Findlay 2000, MSD 2014.) Inseminaatiota käytetään, kun lapsettomuus johtuu siittiöistä tai syystä, jota ei tiedetä. Siemenneste käsitellään mahdollisten siittiövasta-aineiden poistamiseksi ja parhaiden siittiöiden erottelun vuoksi. Sen jälkeen siittiöt ruiskutetaan naisen kohtuun, jossa hedelmöityminen tapahtuu luonnollisesti. Inseminaatio voidaan tehdä joko naisen luonnollisen kierron mukaan tai yhdistettynä munarakkulan kypsytyshoitoon. (MSD 2014.)

Nykyään käytetyin hedelmöityshoitomenetelmä on koeputkihedelmöitys. Ensimmäinen koeputkilapsi syntyi vuonna 1978 ja tämän jälkeen maailmaan on syntynyt arviolta yli viisi miljoonaa lasta IVF- tai ICSI-hoitojen avulla. Koeputkihedelmöityksessä naiselta ja mieheltä kerätään sukusoluja ja varsinainen hedelmöitys tehdään laboratorioissa. Koeputkihedelmöitystä varten samalle maljalle munasolujen kanssa lisätään parhaiten liikkuvat siittiöt. ICSI-hoidossa yksi valikoitu siittiö viedään ohuen neulan avulla suoraan munasolun sisälle. Hedelmöitymisen jälkeen alkioita viljellään 1–6 vuorokautta, jonka jälkeen se siirretään kohtuun, jossa se voi kiinnittyä ja aloittaa raskauden. Tavallisesti alkioita saadaan käyttöön useampi, mutta yleensä vain yksi tai kaksi alkioista siirretään kohtuun. Ylimääräiset alkioita voidaan pakastaa myöhempää käyttöä varten. Valtaosa alkioista selviää pakastus- ja sulatusprosessista. (MSD 2014.)

Yleensä hedelmöitynyt munasolu siirretään kohtuun nelisoluvaiheessa (2 vrk munasolun keräyksestä) tai kahdeksansoluvaiheessa (3 vrk munasolun keräyksestä). Blastokystiviljelyä varten alkioita kasvatetaan maljalla viisi päivää, jolloin saadaan paremmin tietoa alkion mahdollisesta kiinnittymiskyvystä ja laadusta. Kiinnittymistä voidaan edesauttaa avaamalla blastokystaa ympäröivä alkiokuori esimerkiksi laserilla tai mekaanisesti pipetillä. Mikäli tehdään alkiodiagnostiikkaa, otetaan solunäyte joko kolmen päivän ikäisestä alkioista tai viidentenä kuudentena päivänä blastokystasta. Blastokystavaiheen alkioista voidaan ottaa useampi solu näytteeksi, mikä parantaa diagnoosin luotettavuutta. Tutkitut alkioita voidaan siirtää joko heti diagnoosin saamisen jälkeen tai ne voidaan pakastaa ja siirtää analyysin valmistuttua. Alkiodiagnostiikkaa tehdään pareille, joiden tiedetään kantavan perinnöllistä sikiön kuoleman, vakavan sairauden tai kehityshäiriön aiheuttavaa

tautia. Potilaille, joilla on useita keskenmenoja tai tuloksettomia hedelmöityshoitoja sekä yli 38-vuotiaille naisille, suositellaan kromosomilukumäärää selvittävää alkiodiagnostiikkaa (PGS) ikään liittyvien riskien vuoksi. On tosin havaittu myös, että nuorilla naisilla jopa puolet normaalin näköisistä alkioista on kromosomaalisesti poikkeavia ja yli 42-vuotiailla osuus on jopa 80 %. Täten PGS:ää voidaan tarjota kaikille ikä- ja olosuhderyhmille keskenmenojen ja turhien hoitojen välttämiseksi. (MSD 2014.)

3 ALKIONKEHITYS JA ALKIODIAGNOSTIIKKA

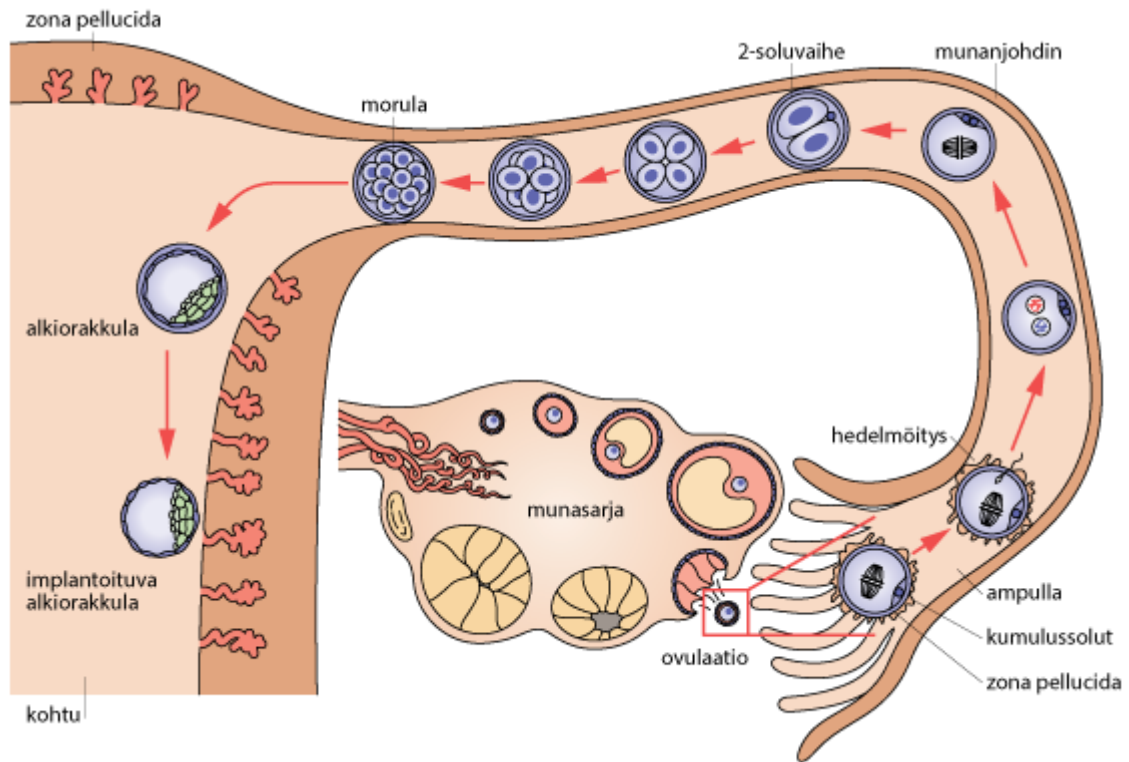
3.1 Alkion syntyä edeltävät vaiheet

Munasolun hedelmöittyminen on ensimmäinen vaihe uuden yksilön synnyssä (kuva 1). Ovulaation eli munasolun kypsymisen ja irtoamisen jäljiltä munasolun ympärille jää glykoproteiineista muodostuva kalvo, jota kutsutaan zona pellucidaksi. Zona pellucidaa ympäröi kerroksittainen somaattisista kumulussoluista muodostuva kuori ja nämä yhdessä suojaavat munasolua. Munasolun ovuloiduttua, se jatkaa kehittymistään ja jakaantuu sekundaariseksi oosyytiksi ja poistosoluksi. Sekundaarinen oosyytti siirtyy munanjohtimen päähän eli ampullaan ja on valmis hedelmöittymään. Miehen sukusolut eli siittiöt siirtyvät spermiogeneesin kautta lisäkivekseen, jossa ne kypsyvät kykeneväiseksi hedelmöittämään munasolun. Zona pellucidan rakenne mahdollistaa yleensä vain yhden siittiön fuusioitumisen munasolun kalvon kanssa. Haploidien sukusolujen yhtyminen sopivissa olosuhteissa mahdollistaa diploidin solun ja uuden yksilön kehittymisen. (Ylikorkala ym. 2011, Sariola ym. 2015.)

3.2 Alkionkehitys

Varsinainen alkionkehitys alkaa preimplantaatiokehityksellä eli vaiheella, jossa hedelmöittynyt munasolu ei vielä ole kiinnittynyt kohtuun. Tämä vaihe kestää noin kuusi seitsemän päivää ja tapahtuu pääasiassa munanjohtimessa. Hedelmöittymisen jälkeen alkio alkaa jakaantua useammaksi soluksi. Ensimmäisten solunjakautumisten aikana alkio ei kasva kokoa ja tsygootti jakaantuu tytärsoluiksi, joita kutsutaan blastomeereiksi. Alkiota, joka koostuu yli kahdeksasta blastomeerista, kutsutaan morulaksi. Kukin solunjakautuminen kestää noin 12–24 h, joten neljän päivän ikäisenä alkiossa on 16–32 blastomeeriä. (Ylikorkala ym. 2011, Sariola ym. 2015.) Blastomeerit ovat totipotentteja eli täysikykyisiä soluja, joten niillä on kyky muodostaa kaikkia alkionkehityksessä tarvittavia solutyyppejä. Varhainen alkio on hyvin mukautuva, mikä mahdollistaa solujen poiston tai lisäyksen ilman, että sillä on suurta vaikutusta alkion kehitykseen. Tässä vaiheessa blastomeereillä saattaa kuitenkin olla jo omia erityispiirteitä, sillä alkion solut alkavat erilaistua noin 8–16-soluvaiheessa (polarisaatio). Alkion kehittyessä edelleen se muodostaa alkiorakulan eli blastokystin. Blastokystivaiheen saavuttaminen kestää tavallisesti noin viisi päivää

hedelmöitymisestä ja sen aikana alkio on liikkunut munanjohtimesta kohtuun, johon se voi implantoitua. Implantoitumisen jälkeen raskaus voi alkaa. (Sariola ym. 2015.)



KUVA 1. Ihmisalkion luonnollinen kehitys munasolun ovulaatiosta implantaatioon. Munasolu hedelmöityy munajohtimessa, minkä jälkeen muodostunut alkio alkaa jakaantua ja liikkua kohti kohtua. Kohdussa alkiorakkula kuoriutuu ja kiinnittyy kohdun seinämään. (Sariola ym. 2015).

3.3 Yleistä alkiodiagnostiikasta

Mikäli raskautta ei kuulu tai vanhemmilla tiedetään jo etukäteen olevan lasten saantiin vaikuttavia perinnöllisiä sairauksia, voidaan lapsettomuushoidoissa hyödyntää myös alkiodiagnostiikkaa. Alkiodiagnostiikan tekemisen tavoitteena on selvittää jo ennen raskauden alkamista kantaako tuotettu alkio tiettyjä perinnöllisiä sairauksia tai tiloja. Alkiodiagnostiikka voidaan jakaa kahteen pääluokkaan, jotka ovat PGS eli alkion geneettinen seulonta (prenatal genetic screening) ja PGD eli alkion geneettinen diagnosointi (preimplantation genetic diagnosis). PGS:n avulla voidaan tutkia alkion kromosomistoa, kun taas PGD:n avulla analyysi ulottuu jopa yksittäisten geenien tasolle. (Harper 2012.) PGD:n ensiaskeleet otettiin 1989 X-kromosomiin kytkeytyneiden sairauksien ja 1990 autosomaalisten resessiivisten tautien osalta. Ensimmäisissä kliinisissä sovelluksissa al-

kiodiagnostiikkaa tehtiin sukupuolimäärityksen avulla Y-kromosomia vastaan kohdenne-
tuilla alukkeilla. Alkiot, joissa monistusta ei tapahtunut, tulkittiin XX-alkioiksi, jolloin ne
olivat terveitä, joskin mahdollisesti taudin kantajia. (Handyside ym. 1990.)

Erityisesti parit, joilla tiedetään olevan perinnöllisiä tauteja tai joilla on jo sairas lapsi,
sairauden aiheuttamia keskenmenneitä raskauksia tai este raskauden keskeyttämiselle,
hyötyvät alkiodiagnostiikasta. Korkeaikäiset äidit kuuluvat PGS-kohderyhmään, sillä ikä
lisää kromosomimuutosten riskiä. PGD:n ajatellaan olevan eettisesti hyväksyttävämpää
kuin pelkkä lapsivesitutkimus, sillä se tehdään ennen raskauden varsinaista alkamista.
Täten raskauden keskeyttämisen tarve voidaan minimoida. (Thornhill & Snow 2002, Har-
per 2012.) Päätös aloittaa hedelmällisyystutkimukset ei kuitenkaan ole helppo, sillä pro-
sessi vaatii aikaa ja kärsivällisyyttä ja siltikään aina ei saada odotettua lopputulosta. Suo-
ritustavasta riippumatta alkiodiagnostiikan haittapuoliin kuuluvat madaltunut raskautu-
misprosentti, keskenmenot ja hoidon korkea hinta. Lisäksi PGD:hen liittyvät myös monet
eettiset kysymykset. Useissa maissa alkiodiagnostiikan käsittely on kokonaan kielletty, kun taas
joissakin maissa luvat käsitellä ihmisalkioita ovat lähes valvomattomia. Alkiodiagnos-
tiikkaan liittyviä eettisiä kysymyksiä ovat esimerkiksi alkiolle tehtävä kudostyyppitestaus
kantasolujen luovuttajaehdokkuutta varten ja erilaiset alttiusgeenitutkimukset mm. tie-
tyille syöville ja Huntingtonin taudille. (Thornhill & Snow 2002, Harper 2012.) Nykyään
alkiodiagnostiikan avulla on kuitenkin syntynyt tuhansia terveitä lapsia (Preimplantation
Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) 2008).

PGD:n avulla tehtäviä analyyseja on kehitelty ainakin 170:lle perinnölliselle yhden gee-
nin sairaudelle, joihin kuuluvat esimerkiksi akondroplasia, perinnöllinen rintasyöpä, kys-
tinen fibroosi, Fanconin anemia, hemofiliat, fragiili-X, Huntingtonin tauti ja fenyylilike-
tonuria (Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) 2008). Näistä
eräs tutkituimmista on kystinen fibroosi, jota käytetään tautimallina useissa alkiodiagnos-
tiikan tutkimuksissa. Kystinen fibroosi on vakava autosomaalinen resessiivinen sairaus,
jonka yleisyys kaukaasialaisessa väestössä on noin 1:2000 syntynyttä lasta kohden ja noin
joka 20:n ihmisen arvellaan olevan taudin kantaja. Sairaudessa tiedetään olevan yksi
kolmen emäsparin deleetio valtamutaationa ja se vastaa noin 70–75% kaikista tautita-
pauksista. (Ray ym. 1996.) Mutaatioiden homogeenisyyden vuoksi kystinen fibroosi on
oivallinen tutkimuskohde perustutkimukselle.

3.4 Alkion geneettisen seulontatutkimuksen suoritus

PGD koostuu pääasiassa kahdesta työvaiheesta. Ensimmäinen niistä on diagnostisen materiaalin kerääminen. Näytteeksi otetaan eli biopsoidaan yksi tai useampi solu. Toisessa vaiheessa näytteestä tutkitaan niiden sisältämät geenit, joko samassa tai ulkopuolisessa laboratoriossa. Analyysivaiheen suorittamiseksi minimivaatimukset ovat PCR:n valmistelualue, erityiset PGD-reagenssit, PCR-laite ja detektiolaite PCR-tuotteiden havainnointiin. Diagnostisen vaiheen tärkein osa on luotettavien tulosten saamisen lisäksi kontaminaatioiden estäminen.(Thornhill & Snow 2002.)

3.4.1 Alkioiden biopsointi

Solujen irrotuksen eli biopsian ensimmäisessä vaiheessa on päästävä zona pellucidan läpi. Lämpäisy voidaan tehdä joko mekaanisesti (esim. mikroneula), kemiallisesti (pH 2.2) tai lämmön avulla (laser). Varsinainen solumassan keruu tapahtuu imuun liitetyn mikromanipulaattorin, mikroskoopin ja optiikan avulla. (Thornhill & Snow 2002.) Välineistöä esitetään kuvassa 2. Tapoja suorittaa biopsointia on monia. Periaatteessa tutkittava materiaali voidaan kerätä missä vain vaiheessa kypsän munasolun ja blastokystin välillä, riippuen siitä minkälaista sairautta tai tilaa alkioista etsitään. Tällä hetkellä diagnostiikassa käytetään ennen kaikkea meiosisissa syntyneitä munasolun poistosoluja, jakaantumisvaiheen alkion soluja ja blastokystin soluja, joista jokaisella on omat erityisvaatimuksensa ja rajoitteensa. (Findlay 2000, Thornhill & Snow 2002.) Menetelmien edut ja haitat on esitetty taulukossa 1. Poistosolujen tutkimuksella voidaan selvittää äidin kantamat sairaudet jo ennen kuin hedelmöitys tapahtuu. Tämä sopii erityisesti maternaalisten eli äidiltä peräisin olevien kromosomimuutosten selvittelyyn ja on useimmissa maissa sallittu alkiodiagnostiikan muoto sen vähäisen eettisen taakan vuoksi.(Findlay 2000, Harper 2012.) Menetelmän avulla ei kuitenkaan voida selvittää esimerkiksi tulevan alkion sukupuolta, paternaalisia eli isältä periytyviä tauteja tai hedelmöityksessä tapahtuvia virheitä (Findlay 2000, Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) 2008, Harper 2012).

Jakaantumisvaiheen biopsiassa (cleavage stage biopsy) alkio on yleensä kolmen päivän ikäinen ja jakaantunut in vitro kuudeksi–kahdeksaksi soluksi. Tämän ikäisesti alkioista voidaan turvallisesti poistaa yksi tai kaksi blastomeeriä. Jakaantumisvaiheen alkion tut-

kiminen mahdollistaa sekä maternaalisten että paternaalisten tautien analyysin ja mahdollisten ensimmäisten jakaantumisten aikana tapahtuneiden virheiden havaitsemisen. Biopsoitavan materiaalin määrä on kuitenkin hyvin pieni (yksi tai kaksi solua), joten usein on mahdollista tehdä näytteestä vain yksi ainoa tutkimus. Blastomeeritutkimuksessa käytetään myös soluja, joista voisi tulla osa sikiötä, jolloin analyysiin voi liittyä eettisiä ongelmia. Kolmas ongelma on se, että suuri osa jakaantumisvaiheen alkioista pysäyttää kehityksensä in vitro (usein kahdeksan-soluvaiheessa), joten biopsoitujen alkioiden implantaation onnistuminen saattaa tuottaa ongelmia. Tutkimuksissa on myös havaittu, että jo blastomeerivaiheen alkiossa voidaan havaita mosaikismia eli osassa alkion soluja voi olla poikkeava määrä kromosomeja tai niiden osia. (Findlay 2000, Thornhill & Snow 2002, Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) 2008, Harper 2012.)



KUVA 2. Alkiobiopsia (Ylikorkala ym. 2011).

Kolmas tapa ottaa näyte on blastokystibiopsia, jossa näyte otetaan alkion ollessa 5–7 vuorokauden ikäinen ja noin sadan solun kokoinen. Menetelmän etuihin kuuluvat erityisesti näytteeksi otettavien solujen suurempi määrä, sillä jopa 15 solua voidaan ottaa tarvittaessa näytteeksi. Tämä mahdollistaa useampien testien tekemisen tai tulosten varmistamisen. Mikäli näyte otetaan vasta blastokystivaiheessa, alkio on jo ohittanut kahdeksan-soluvaiheen pysähdysten, jolloin biopsoidut alkioit voivat olla vitaalimpia ja aikaansaada suuremman raskausprosentin sopivan alkion löytämiseen kuluvan ajan ja työmäärän vähentymisen lisäksi. Nykymenetelmillä noin 50–60 % jakautuneista alkioista kehittyvät blastokystiksi. (Harper 2012.) Blastokystibiopsia voidaan suorittaa kahdella eri tavalla.

Ensimmäisessä menetelmässä jakautumisvaiheen alkion kuoreen tehdään reikä niin, että sen laajentuessa blastokystiksi tietyt solut tyräytyvät, jonka jälkeen ne voidaan biopsoida. Toisessa menetelmässä reikä porataan blastokystivaiheessa viidennen päivän aamuna ja solut biopsoidaan analyysia varten myöhemmin samana päivänä. Aikaisemmin blastokystibiopsian kanssa ongelmana oli sen ajoittaminen diagnoosin ja implantaation kanssa, mutta nykyään ongelma on ratkaistu pakastamisella. Blastokystit siirretään usein yksinään mahdollisten moniraskauksien vähentämiseksi. (Harper 2012.) Yhtä hoitokiertoa kohden raskautumisprosentti on noin 20–40%, mikä ei juurikaan eroa nk. luonnollisesti alkunsa saaneiden raskauksien todennäköisyyksistä (MSD 2014).

TAULUKKO 1. Alkiodiagnostiikan käytössä olevat menetelmät etuineen ja haittoineen. Muokattu lähteestä Thornhill & Snow (2002).

Vaihe	Edut	Haitat
Oosyytti (I poistosolu)	Näytteenotolla ei vaikutusta alkionkehitykseen ja kokeen ajoituksella ei kiirettä	Tuo esiin vain maternaaliset sairaudet ja vain yksi solu käytettävissä
Tsygootti (I ja II poistosolu)	2 solua analyysiä varten Näytteenotolla ei vaikutusta alkion kehitykseen	Vain maternaaliset sairaudet havaittavissa Lyhyt aika biopsian tekemiseen
Jakaantumisvaihe	Voidaan diagnosoida sekä maternaaliset että pater-naaliset sairaudet Käytettävissä 1–2 solua	Kromosomaalisen mosaikismin mahdollisuus Tumattomien blastomeerien esiintyminen
Blastokysti	Mahdollisuus ottaa näytteeksi useampi solu Alkion laatu esivalittu Korkeampi implantaatioaste	Käytettävä aika PCR:ään rajallinen tuorealkioita käytettäessä Solujen poikkeavuus toisistaan Vähemmän alkioita käytössä

Tällä hetkellä maailmalla käytetään alkiodiagnostiikassa pääasiassa blastomeereihin ja blastokysteihin perustuvia tekniikoita niiden poistokappaleiden käyttöä laajempien diagnosointimahdollisuuksien vuoksi. Jonkin verran on tutkimusta myös alkion erittämien aineenvaihduntatuotteiden, kuten entsyymien tai proteiinien käytöstä analyysien lähtömaterialina. Non-invasiivisten menetelmien eduksi luetaan, ettei alkioita tarvitse biopsioida ja täten alkioden kehittymishäiriöiden riski voidaan minimoida. Eritettyihin tuotteisiin perustuvat tutkimukset ovat kuitenkin alkutekijöissään, joten tuloksia ei voida vielä soveltaa ihmisiin. Nykyisten soluviljelymenetelmien kehittäminen voisi mahdollistaa useampien näytesolujen käytön esimerkiksi blastomeeriviljelmien ja useampien blastokystivaiheeseen edenneiden alkioden kautta. Vaihtoehtona on parantaa nykyisiä diagnostisia menetelmiä niin, että yhdestä solusta saataisiin tehtyä useampia testejä. (Findlay 2000.)

3.4.2 Näytesolujen analysointi

Mikäli alkiodiagnostiikkahoidossa alkio pyritään siirtämään ilman pakastusta, käytettävien analyysitekniikoiden tulee olla nopeita raskauden alkamismahdollisuuksien parantamiseksi (Piyamongkol ym. 2003). Diagnostisten menetelmien käyttöä rajoittaa pääasiassa kolme tekijää: alkioden pieni koko, käytettävissä olevien solujen määrä ja vaikeudet riittävän suurten tarkkuuksien saavuttaminen äärimmäisen vähäisen lähtömateriaalin tutkimisessa. PGD:ssä käytettävät analyysimetodit ovat tähän mennessä perustuneet pääasiallisesti PCR:n eli polymeerasiketjureaktion ja FISH:in eli fluoresenssi in situ-hybridisaation käyttöön. (Findlay 2000.) Viime vuosina myös uudet DNA-sirupohjaiset tekniikat (array-CGH, SNP-Array, NGS) ovat vallanneet alaa (Thornhill & Snow 2002, Harper 2012).

PCR-reaktiota käytetään DNA-näytteen monistamiseksi. **Alkuperäinen PCR** perustuu kaksijuosteisen DNA:n monistamiseen lämpötilan vaihtelun, entsyymien, alukkeiden ja vapaiden nukleotidien reagoitessa koeputkessa. PCR-reaktiossa on kolme vaihetta: denaturaatiovaihe, jossa kaksijuosteinen DNA hajoaa lämmön avulla yksijuosteiseksi, annealing- eli pariutumisvaihe, jossa käytetyt alukkeet kiinnittyvät kohdesekvenssiinsä ja elongaatio- eli pidentymisvaihe, jossa DNA-polymeeraasi rakentaa uutta juostetta templaatin mukaisesti. Näitä vaiheita toistetaan kunnes tuotetta on monistettu riittävästi. Yleensä monistamisen kohteena on tietyn geenin osa, joka halutaan saada monistamisen myötä näkyväksi ja täten geneettisen analyysin informaatioksi. PCR:n monipuolisuus on tehnyt siitä erään tärkeimmistä geneettisen analyysin työkaluista. Kahdesta sen suurimmasta edusta ensimmäinen on sensitiivisyys, sillä optimoidulla PCR:llä jo yhdestä tai muutamasta solusta saadaan monistettua tutkimukseen riittävä määrä materiaalia. Toinen etu on menetelmän nopeus. DNA:n monistamisessa menee vain muutama tunti, jolloin analyysi voidaan tehdä siirtopäivän aikana. Ensimmäiset PGD-tapaukset hyödynsivätkin perinteistä PCR:ää sukupuolen ja autosomaalisen resessiivisen taudin tutkimiseen. Alussa tehtiin vääriä diagnooseja sukupuolen suhteen, mikä on saanut tutkijat kehittämään PCR-menetelmiä entistä tarkemmiksi. Nykyään monet diagnooseista perustuvatkin ennemmin jonkin tietyn analyysin havainnointiin kuin sen puuttumiseen. (Wells 1998, Findlay 2000.) **Nested-PCR:ssä** reaktio suoritetaan käyttäen kahta erillistä alukeparia ja PCR-reaktiota. Ensimmäisessä PCR:ssä nk.ulkoalukeparilla monistetaan tutkittava amplikoni eli monistettava alue suuripiirteisesti muutaman syklin aikana. Tämän jälkeen ensimmäisen PCR-

reaktion tuotteita siirretään templaatiksi eli malliksi toisen vaiheen polymeraasiketjureaktioon, jossa nk. sisäalukeparilla suoritetaan toinen PCR-reaktio suuremmalla syklimäärällä, kunnes tuote on nähtävissä. Perättäisillä reaktioilla voidaan monistaa haluttu osuus entistä spesifisemmin ja testin sensitiivisyys paranee. (Holding ym. 1993, Thornhill & Snow 2002.)

Fluoresenssi-PCR:ssä käytettyihin alukkeisiin on kiinnitetty fluoresoiva leima. PCR:n jälkeen tuote kulkee analyysimatriisissa ja siihen kohdistetaan laservalo, joka saa tuotteen fluoresoimaan ja se voidaan havainnoida. Käyttämällä valonmonistusta ja sopivaa automatisaatiota on mahdollista havaita entistä pienempiä määriä tuotetta kuin perinteisiä agarooosi- tai akryyliamidigeelejä detektoitaessa. Fluoresenssihavainnointi on noin tuhat kertaa sensitiivisempää kuin perinteinen geielektroforeesi ja mahdollistaa myös suurten monistumiserojen havaitsemisen, kun esimerkiksi toisen alleelin määrä on vain alle 1 % toisen pitoisuudesta. Tuotteiden yksilöllisiin emissioaallonpituuksiin perustuva detektointi mahdollistaa jopa yksittäisen emäsparin eron havainnoinnin ja yhdessä tutkimuksessa voidaan käyttää jopa 15 erilaista alukeparia. (Wells 1998, Findlay 2000, Thornhill & Snow 2002.) Nykyään laajassa käytössä oleva **multiplex-PCR** mahdollistaa monien lokuksien eli tiettyjen DNA-paikkojen monistamisen yhtäaikaaisesti tutkittavana olevasta genomista useamman toisistaan riippumattoman alukeparin avulla. Tällä voidaan joko etsiä useampaa eri sairautta tai varmistaa yhden sairauden tila. Multiplex-PCR on hyvin vaativa menetelmä, joka edellyttää tarkkaa suunnittelua reaktio-olosuhteiden suhteen, jotta kaikki fragmentit monistuisivat yhtäläisesti ja toisaalta, että alukkeet tuottaisivat vain yhtä tiettyä tuotetta. PGD:n yhteydessä on tutkittu erityisesti kvantitatiivista fluoresenssi-multiplex-PCR:ää (QF-multiplex-PCR). Tämä mahdollistaisi useampien sekvenssin osien tutkimisen samanaikaisesti, jolloin myös mahdollinen allele dropout voitaisiin havaita helpommin. Fluoresenssi-multiplex-PCR:n etuja ovat sen nopeus, edullisuus, laaja käyttöalue, DNA:n sormenjälkitunnistusmahdollisuus, luotettavuus ja helppous. (Wells 1998, Findlay 2000, Thornhill & Snow 2002.)

FISH eli fluoresenssi *in situ* -hybridisaatio on menetelmä, jolla tutkitaan pääasiassa alkioiden sukupuolta ja aneuploidioita. Se perustuu fluoresoivien koettimien tarttumiseen kohdesekvensseihinsä, jotka voidaan analyysiä tehdessä havaita. PGD:ssä menetelmää voidaan hyödyntää autosomaalisten sairauksien seulonnassa. Menetelmä on kuitenkin kallis ja FISH:in toiminta-alue on enemmän kromosomien kuin yksittäisten geenien ta-

solla. Muita rajoitteita ovat menetelmän epätarkkuus, fluorokromien spesifisyys ja tuloksien tulkitsemisen vaikeus, sillä signaalit voivat sekoittua keskenään ja tarkemman tuloksen saaminen vaatisi useamman solun tutkimisen. Ongelmiin kuuluvat myös maternaalisen kontaminaation tunnistamattomuus sekä menetelmän hitaus ja työläys. (Findlay 2000.)

Lisäksi DNA:n monistamiseen ja diagnosointiin on olemassa muitakin menetelmiä, joiden käytännöllisyyttä alkiodiagnostiikan ja nk. yhden solun analyyseissa arvioidaan. Eräs kiinnostavimmista kohteista on koko genomin monistamiseen perustuvat menetelmät, kuten WGA (Whole Genome Amplification), PEP (Primer Extension Preamplification) ja DOP (Degenerate Oligonucleotide Primer). Niissä monistetaan teoreettisesti koko genomi, jolloin saadaan kasvatettua alkuperäisen DNA:n määrää yhdestä noin 50–100:n tai jopa 1000:n kopioon. Menetelmät ovat kuitenkin erittäin aikaa vieviä ja todellisuudessa koko genomista monistuu vain noin 80 %. Tämä voi aiheuttaa virheitä alkiodiagnostiikan tarpeisiin. Menetelmiä kuitenkin kehitellään jatkuvasti PGD:n yhteydessä esimerkiksi Tay-Sachs'n, kystisen fibroosin, hemofilia A:n ja Duchennen lihasdystrofiaan liittyvässä tutkimuksessa. Näistä tutkimuksista saadut alustavat tulokset ovat rohkaisevia yhden solun analyyseihin liittyvien rajoitteiden kumoamisessa. Koko genomin monistusta käytetään myös uusien DNA-siruihin perustuvien teknikoiden yhteydessä. (Wells 1998, Findlay 2000, Thornhill & Snow 2002, Harper 2012.)

Mikäli sairautta aiheuttava tarkka mutaatio on tuntematon, voidaan alkiodien sairausstatusta tutkia käyttämällä **kytkentäanalyysiä**. Mitä tahansa informatiivista polymorfismia (tunnettua DNA-kohtaa, jossa esiintyy laajalti emäksen muutoksia), joka sijaitsee lähellä tautilokusta, voidaan käyttää signaalina mutaation läsnä- tai poissaololle vaikka tarkkaa mutaatiota ei tunnetaisikaan. KytKentäanalyysiä varten tarvitaan potilaan sukupuu ja lähisukulaisten DNA-näytteet, jotta voidaan havaita mikä polymorfinen variantti periytyy yhdessä taudin kanssa. KytKentäanalyysi on käyttökelpoinen PGD:ssä, koska tautia aiheuttava mutaatio saattaa olla tuntematon, mutaatio ei monistu PCR:ssä tai mutaatio on hyvin heterogeeninen. Myös ADO:n aiheuttaman virhediagnoosin riskin vähentyminen ja kontaminaatioiden tunnistuskyky tekevät kytKentäanalyysistä hyvän työkalun kliiniseen PGD:hen. KytKentäanalyysiä on hyödynnetty esimerkiksi Marfanin syndrooman ja Huntingtonin taudin tutkimuksissa. (Wells 1998, Thornhill & Snow 2002.)

Näytteen riittävän monistamisen jälkeen tuotteet detektoidaan eli tuotetaan näkyviksi, esimerkiksi elektroforeesilla. Analyysit voivat perustua erityisesti joko yksittäisen emäksen muutosten, tietyn geenivirheen tai suuremman sairausryhmän havaitsemiseen eri menetelmin. Analyyseissä hyödynnetään esimerkiksi perinteisen sekvensoinnin lisäksi esimerkiksi restriktioentsyymien spesifisyyttä ja alleelispesifisten oligonukleotidien käyttöä (Wells 1998, Thornhill & Snow 2002.)

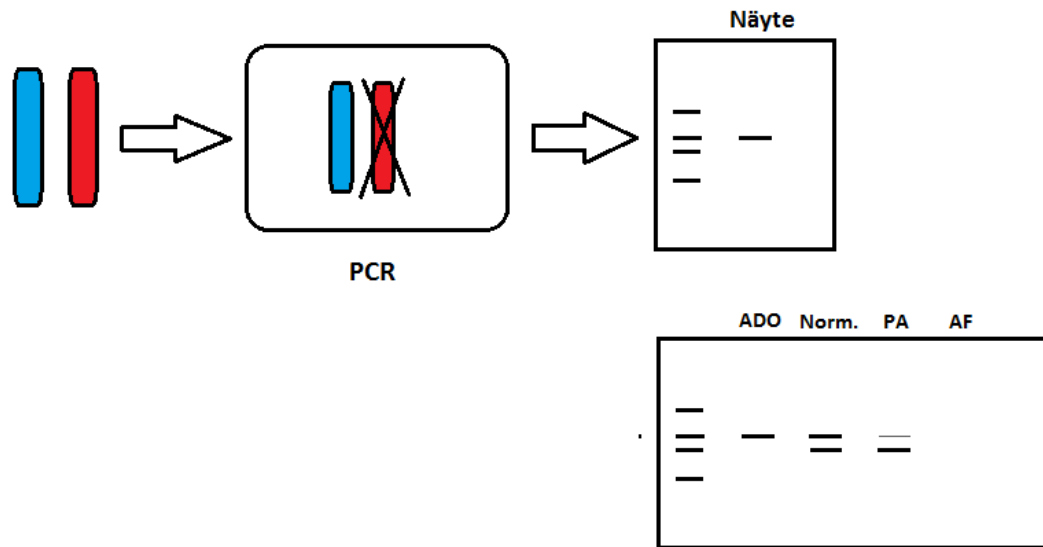
3.5 Yhden solun analyysien erityispiirteet

Kun analyysin ja diagnoosin lähtömateriaalina on vain yksi solu, tulee menetelmissä ottaa huomioon monia erityispiirteitä. Ensinnäkin lähtömateriaalin eli alkion huolellinen ja osaava käsittely on tärkeää. Alkiobiopsioita laboratoriossa tekevän henkilökunnan on oltava kokenutta ja tehtäväänsä perehtyneitä. Alkioiden biopsia vaatii suurta tarkkuutta ja runsaasti ammattitaitoa, sillä blastomeerien poiston lisäksi jäljelle jäävien alkioden tulee olla elinkykyisiä. Alkiot ovat kallisarvoista materiaalia, sillä vain noin 30–40 % siirretyistä alkiosta aloittaa raskauden (THL 2016a).

Diagnostiseen PGD:hen liittyviä haasteita ovat esimerkiksi käytettävissä olevan DNA:n vähäinen määrä, sillä yhdessä solussa on vain noin 7 pikogrammaa DNA:ta. Yhden solun PCR:ää on kuitenkin käytetty jo yli pari vuosikymmentä PGD:ssä monogeenisten tautien seulontaan. Aiemmin menetelmänä oli perinteinen PCR, mutta nykyään käytössä on useimmiten nested-PCR ja fluoresenssi-PCR. Koska solun lyysis eli hajotus tapahtuu samassa putkessa kuin PCR-reaktio, on kaikkien käytettyjen reagenssien oltava myös yhteensopivia. (Thornhill ym. 2001.) Tekniikoiden on oltava erittäin luotettavia (yli 95 %) ja tarkkoja (yli 99 %) kliinisiä käyttökohteita varten ja diagnoosi on pystyttävä tekemään mielellään alle kahdeksassa tunnissa, jos alkio halutaan siirtää vielä saman päivän aikana. Vain muutama tekniikka pystyy diagnoosiin alle vuorokaudessa. Tämän lisäksi tekniikoiden tulee pystyä havaitsemaan laaja joukko erilaisia mutaatioita, sairauksia ja niiden variaatioita. (Findlay 2000, Kim ym. 2009.) Kehitettäessä PGD:hen uusia menetelmiä, eräs suurimmista ongelmista on tutkimusmateriaalin eli ihmisalkioiden saatavuus ja niihin liittyvä etiikka. Hiirialkioita on saatavilla helposti mutta ne eivät ole täysin verrattavissa ihmistutkimukseen. Toinen vaikeus on tutkimuksen lähtömateriaalin standardointi, sillä samasta lähtöäidistä on usein saatavilla vain muutama alkio. Tämä tekee tulosten vertailusta ja kontrolloinnista vaikeaa ja rajoittaa tilastollisesti merkittävien tuloksien saamista. (Findlay 2000.)

3.5.1 Yhden solun PCR:n ongelmia

Yhden solun PCR:ssä havaitaan yleensä pienemmät tehokkuudet monistumisessa kuin useamman solun vastaavissa lähtömateriaalin vähäisen määrän vuoksi. Suurimmat ongelmat yhden solun PCR:ssä ovat kontaminaatio, monistumisen epäonnistuminen ja ADO. Näistä kontaminaatio on kenties helpoin vaikuttamiskohde, sillä huolellisella työskentelellä, rutinoitumisella ja tarkoituksenmukaisilla tiloilla ulkopuolisen DNA:n kontaminaation riskiä voidaan vähentää lähes olemattomiin. Kontaminaatioiden lähteitä on kaikkialla, mutta käyttämällä vain PGD-käyttöön tarkoitettuja välineitä, äärimmäistä huolellisuutta ja kuhunkin vaiheeseen erikseen suunniteltua tilaa, on kontaminaatioiden riskiä mahdollista alentaa. Kontaminaation pääsy analyysiin voi pahimmillaan johtaa virheelliseen diagnoosiin, sillä yhdenkin testiin kuulumattoman kopion monistuminen PCR:ssä alkuperäisen näytteen lisäksi voi aiheuttaa vääriä tuloksia. Kontaminaatioiden havaitsemiseksi analyyseja tekevissä tutkimuskeskuksissa tulee tehdä kontrollitarkistuksia riittävän usein ja hyödyntää testeissä negatiivisten kontrollien osoituskykyä. (Wells 1998, Thornhill & Snow 2002.) Sopivien työtapojen noudattamisen lisäksi kontaminaatioiden riskiä voidaan vähentää tuotteiden post-PCR-sterilisaatiolla. Siinä syntyneet PCR-tuotteet käsitellään analyysin jälkeen esimerkiksi urasiili-DNA-glykosylaasilla. Entsyymi pilkkoo tuotetut juosteet, kun PCR:n aikana on käytetty dUTP:tä dTTP:n sijaan ja täten käsittely vähentää ristikontaminaatioiden riskiä. (Thornhill & Snow 2002.) Lisäksi tutkitavan näytteen alkuperä voidaan varmentaa käyttämällä DNA:n ”sormenjälkitunnistusta”, jolla saadaan tarkennettua diagnoosin luotettavuutta yhä edelleen. Sormenjälkitunnistuksessa DNA:sta etsitään tiettyjä muutaman nukleotidin pituisia toistojaksoja, joiden määrä eroaa eri yksilöiden välillä. Täten kontaminaatio-DNA voidaan erottaa näyte-DNA:sta. (El-Hashemite & Delhanty 1997, Thornhill & Snow 2002, Piyamongkol ym. 2003.)



KUVA 3. Yhden solun PCR:n ongelmia. ADO syntyy, kun toinen vastinalleeleista ei monistu. Tällöin yksilö tulkitaan homotsygootiksi. Muita yhden solun PCR:ssä ilmeneviä ongelmia ovat PA eli suosiva monistuminen ja AF eli monistuksen epäonnistuminen. Kuva muokattu lähteestä Wang ym. (2012).

Sen sijaan vaikeammin lähestyttäviä ongelmia ovat monistuksen epäonnistuminen (AF, amplification failure), suosiva monistus (PA, preferential amplification) ja ADO (allele-drop-out). Ilmiöiden detektio havainnollistetaan kuvassa 3. Monistuksen epäonnistuminen koskettaa tavallisesti noin 5–10 % tutkittavista soluista, mutta joissain tapauksissa osuus voi olla yli 20 %. Syytä monistumisen epäonnistumiselle on monia ja tarkkaa syytä saadaan harvoin selville. Syiksi on esitetty esimerkiksi solun katoamista siirtoprosessissa, näytesolun tuman puuttumista tai sitä, että solun DNA ei pääse kosketuksiin PCR:n reagenssien kanssa epäonnistuneen solulyysiksen vuoksi. (Thornhill & Snow 2002, Piyamongkol ym. 2003.) Tiedetään, että yleisesti PCR:n onnistumiseen vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa solujen laatu, solujen lyysiksen ajankohta, magnesiumionipitoisuus käsittelyliuoksessa ja siirtopuskurin määrä. Näiden samojen tekijöiden tiedetään vaikuttavan myös yhden solun PCR:ään. (Thornhill ym. 2001.) Silloin tällöin näytteissä havaitaan nk.suosivaa monistumista, joka tarkoittaa tilannetta, jossa toinen solun alleeleista monistuu selvästi tehokkaammin kuin toinen alleeli. Tämä havaitaan elektroforeesissa heikompana intensiteettinä vähemmän monistuneessa alleelissa. Enemmän monistuva alleeli valikoituu sattumanvaraisesti, tosin lyhyempi alleeli monistuu yleensä paremmin puhtaasti PCR:n kineetiikan vuoksi. (Piyamongkol ym. 2003.) Kontaminaatiota, monistumisen epäonnistumista ja suosivaa monistumista tavataan myös suurempien solumäärien PCR:n yhteydessä (Ray & Handyside 1996).

3.5.2 Allele dropout

Erityisesti pienien DNA-määrien PCR:n ongelma on allele dropout eli **ADO**. ADO tarkoittaa tilannetta, jossa toisen alleelin monistuminen epäonnistuu kokonaan PCR:n aikana. Tämä aiheuttaa vain toisen alleelin detektion ja alkiodiagnostiikassa vakavan virhediaгноosin riskin. ADO:n esiintyvyys vaihtelee suuresti. Joissain tutkimuksissa ADO:ta on havaittu jopa yli kolmasosassa näytteistä, joskin keskimääräinen esiintyvyys on yleensä hieman pienempää. ADO:n esiintyvyyden tiedetään riippuvan muuan muassa käytetystä solutyypistä, testattavista geeneistä, lyysisolosuhteista ja PCR-olosuhteista. Esimerkiksi blastomeereissä ADO:n esiintyvyys on havaittu olevan korkeampi kuin lymfosyyteissä. (Wells 1998, Kim ym. 2009.) Amplikonin pituuden on myös havaittu vaikuttavan ADO:n esiintyvyyteen (Piyamongkol ym. 2003).

ADO:n uskotaan saavan alkunsa PCR:n primaarisyklariden aikana, jossa kriittisenä tekijänä on PCR-olosuhteiden sopivuus esimerkiksi denaturaatiolämpötilan suhteen. Ray ja Handyside (1996) tutkimuksessa selvitettiin PCR:n ensimmäisten syklien erilaisten denaturaatiolämpötilojen (90–96 °C) merkitystä ADO:hon. Tutkimuksessa havaittiin selvä yhteys denaturaatiolämpötilan ja ADO:n suhteen niin, että korkeampaa (96 °C) lämpötilaa käytettäessä ADO vähenee selvästi. (Ray & Handyside 1996.) Muita PCR:n aikana vaikuttavia tekijöitä voivat olla esimerkiksi DNA:n tietyt geenien säätelyyn liittyvät rakenteet (Stevens ym. 2014). ADO voidaan havaita vain heterotsygoottien alleelien ollessa kyseessä, mutta ilmiö voi vaikuttaa sattumanvaraisesti kumpaankin alleeliin tietyssä lokuksessa. Täten heterotsygoottia yksilöä voidaan luulla virheellisesti homotsygootiksi. Autosomaalista resessiivistä tautia kantaville vanhemmille, joilla on sama mutaatio, ADO:n ei pitäisi johtaa sairaan alkion siirtämiseen, mikäli näyte ei ole kontaminoitunut. Näissä tapauksissa ADO voi kuitenkin johtaa virheellisiin positiivisiin tuloksiin vähentäen potentiaalisten siirrettävien alkioden määrää ja raskauden mahdollisuutta. Yhdistelmä-heterotsygooteissa tai autosomaaleissa dominanteissa tiloissa ADO:n seuraukset voivat kuitenkin olla merkittävät, sillä se saattaa saada aikaan sairaan alkion siirtämisen. (El-Hashemite & Delhanty 1997, Thornhill & Snow 2002, Piyamongkol ym. 2003.) Tämän vuoksi ADO:sta johtuvien virheiden välttämiseksi ilmiön frekvenssi on tunnettava ja minimoitava jokaiselle lokukselle ja koejärjestelylle erikseen, erityisesti kun kyseessä voi olla heterotsygootti alkio (Rechitsky ym. 1998).

4 LYYSISMENETELMÄT DNA:N ERISTÄMISEKSI

4.1 Solun hajottaminen

Jotta DNA:ta voidaan monistaa polymeerasiketjureaktiossa ja analysoida siitä saatuja tuotteita, on solun perimäaines saatava ensin eristettyä. Yhden solun hajotusta eli lyysistä voidaan tehdä usealla eri tavalla ja eri solutyypeillä on omat erityisvaatimuksensa. Yleisesti ajateltuna käytetty lyysismenetelmä ei saa häiritä solusta tutkittavan analyysia. Menetelminä voidaan käyttää esimerkiksi laseriin perustuvaa lyysausta, mekaanista lyysausta, ääniaaltolyyysausta, sähköhajottamista, entsyymaattista tai kemiallista lyysausta. Entsyymaattisissa lyysausmenetelmissä hyödynnetään esimerkiksi proteinaasi K:ta, joka hajottaa laaja-alaisesti erilaisia proteiineja, kuten DNA:han sitoutuneita proteiineja ja nukleaaseja. Proteinaasi K:n toimintalämpötila-alue ulottuu jopa +65 °C:seen, minkä vuoksi sen inaktivoimiseksi vaaditaan korkeaa lämpötilaa. (Sigma-Aldrich 2016.) Kemialliset lyysausmenetelmät perustuvat usein detergenttien tai emästen käyttöön. Detergentit ovat molekyyliä, jotka tunkeutuvat solun kalvoihin ja rikkovat lipidien välisiä vuorovaikutuksia (El-Hashemite & Delhanty 1997, Brown & Audet 2008). Yleisesti käytetty detergentti on esimerkiksi SDS eli natriumdodekyylisulfaatti, joka hajottaa solun sekunneissa. Usein käytetty on myös Triton-X, joka on hitaampi, mutta huomattavasti hellävaraisempi solun proteiineille kuin SDS. Emäspohjaisten lyysisliuosten käyttö perustuu niiden kykyyn muodostaa ionikonsentraatioero muodostamalla OH⁻ ioneita ja täten lyysaamalla solun. (Brown & Audet 2008.)

4.2 Alkion geneettiseen seulontaan käytetyt tekniikat

Alkiodiagnostiikan yhteydessä on tutkittu useiden eri lyysismenetelmien soveltuvutta yhden solun PCR:ään ja allele dropout-ilmioon. Tutkimuksia on tehty mm. veden, kiehuvan veden ja nestemäisen tyyppien käytöstä (Gitlin ym. 1996, Kim ym. 2009). Yleisimmin käytetyt solujen hajotusmenetelmät ovat kuitenkin SDS:n ja proteinaasi K:n (PK/SDS) sekä alkaalisen lyysisreagenssin, kuten kaliumhydroksidin (KOH) käyttö. Vertailua näiden kahden menetelmän välillä on tehty useissa eri tutkimuksissa, mutta saadut tulokset vaihtelevat ryhmien välillä. (Ray & Handyside 1996, El-Hashemite & Delhanty 1997, Thornhill ym. 2001, Piyamongkol ym. 2003, Kim ym. 2009.) SDS:n käyttö perustuu sen vahvaan detergenttiominaisuuteen, jolla se häiritsee kalvolipidien välisiä sitoutumisia.

Emäksinen lyysispuskuri taas hajottaa solun tehokkaasti ja tuottaa yksijuosteista kohde-templaattia denaturoimalla DNA:n. Proteinaasi K:n käyttö SDS:n kanssa perustuu sen kykyyn pilkkoa DNA:han sitoutuneita proteiineja, ilman että se vaikuttaa templaattiin. KOH-menetelmässä muut liuoksen apuaineet liuottavat proteiinit DNA:sta, niin että se vapautuu monistettavaksi. (Gitlin ym. 1996, El-Hashemite & Delhanty 1997.) Menetelmien välinen vertailu on vaikeaa, sillä PK/SDS-lyysauksessa on julkaistuissa tutkimuksissa käytetty erilaisia olosuhteita (pitoisuus 125–400 ng/μl, lyysaus 37–65°C ja proteiinaasin inaktivaatioaika 15–30 min). Proteinaasi K:n yhteydessä sen alkuperä, säilytyksen pituus ja työliuosten välinen eräeroavaisuus voi myös vaikuttaa lyysisen tehokkuuteen. Yhteinen tekijä PK/SDS-tutkimuksissa on, että liuos ei sisällä puskuria. PK/SDS-hajotus ei kuitenkaan ole kovin standardoitu menetelmä, kun taas emäksen käyttöön perustuva lyysis raaka-aineineen ja inkubaatioaikoineen vaikuttaa olevan huomattavasti yhdenmukaisempi. Emäsllyysauksen etu PK/SDS-menetelmään nähden on sen nopeus (15 min versus 75 min). Haittana on esimerkiksi emäksen neutraloivan trisiini-puskurin lisäysvaihe, joka vaatii ylimääräisen putken avaamisen ja täten lisää kontaminaation riskiä. Lyysisliuosten välistä eroa on kuitenkin vaikea saada selville, sillä ADO:hon vaikuttavat myös epäsovivat PCR-olosuhteet ja sopimattomat alukkeet. (Thornhill ym. 2001.) ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) suosittelee PGD-keskuksissa käytettävän joko PK/SDS-lyysistä tai alkaalista lyysausta (Harton ym. 2011).

4.3 Suolojen vaikutus DNA:n säilyvyyteen ja polymeraasiketjureaktion tehokkuuteen.

Solun lyysisauksen ja polymeraasiketjureaktion aikana DNA-molekyylit altistuvat korkeille lämpötiloille. Nämä lämpötilat voivat saada aikaan DNA:n vaurioitumista ja DNA-ketjun hajoamista. Vaurioitumisen taustalla voivat olla esimerkiksi fosfodiesterisidosten hydrolyysi, depurinaatio tai sytosiinin deaminaatio (Greer & Zamenhof 1962, Lindahl & Nyberg 1972, Marguet & Forterre 1994, Marguet & Forterre 1998). DNA:n hajoamista esimerkiksi depurinaation vuoksi tapahtuu jo runsaasti PCR-lämpötiloja alhaisemmissakin lämpötiloissa ja fysiologisissa olosuhteissa. Nämä muutokset ovat usein hitaampia mutta voivat inaktivoida DNA:n kokonaan. Erityisesti laboratorion in vitro-olosuhteissa syntyneitä vahinkoja ei voida korjata solun omin korjausmekanismein ja vauriot saattavat aiheuttaa virheellisiä tuloksia analyysiin. (Greer & Zamenhof 1962, Lindahl & Nyberg 1972, Marguet & Forterre 1994.)

Solujen sisällä ja tumassa DNA:ta ympäröi vesiliuos, johon on liuenneena ioneja, kuten natriumia, kaliumia, magnesiumia ja kloridia. DNA on negatiivisesti varautunut molekyyli fosfaattitukirankansa vuoksi ja kaksijuosteisen DNA:n eri puolet liittyvät toisiinsa vetysidoksin. Vetysitoutuminen tuo samanmerkkiset varaukset lähelle toisiaan ja aiheuttaa repulsiivoimia. Solun liuenneet kationit stabiloivat rakennetta ja mahdollistavat rakenteen koossa pysymisen. Solun suolapitoisuus vaikuttaa DNA:n stabiliteetin lisäksi myös esimerkiksi DNA:n pakkautumiseen. (Marguet & Forterre 1994, Maity ym. 2016.) Tietyn raja-arvon alapuolella kationikonsentraatio stabiloii DNA:n rakennetta, mutta raja-arvoa suuremmilla konsentraatioilla se häiritsee rakenteen yhdenmukaisuutta. Kohtuullisilla suolapitoisuuksilla myös DNA-polymeraasin toiminta helpottuu ja monistumistehokkuus paranee. (Maity ym. 2016.) Mikäli ionipitoisuus on liian vahva käytetylle polymeraasille, sen konformaatio voi muuttua ja toiminta inhiboitua (Butcher ym. 1994, Herbert ym. 2002). Suunnitellessa reaktioita PCR-monistusta varten tuleekin ottaa huomioon jokaisen reaktioon osallistuvan komponentin ominaisuudet ja optimaaliset olosuhteet.

Useissa tutkimuksissa on todettu suolojen suojaava vaikutus myös korkeissa lämpötiloissa, kuten PCR:n aikana. Marguet ja Forterren (1998) tutkimuksessa havaittiin, että DNA:n lämpöhajoaminen vähenee 90–110°C:ssä kun läsnä on monovalenttia (50–500mM KCl, NaCl) tai divalenttia (1–25mM MgCl₂) suolaa. Syyksi suojaamiseen on esitetty depurinaation vähenemistä ionivahvuuden kasvaessa ja että suolat suojaavat fosfaattitukirangan negatiivisia varauksia. (Greer & Zamenhof 1962, Marguet & Forterre 1994, Marguet & Forterre 1998.) DNA:n ehjänä pysymisellä on tietysti vaikutuksia myös polymeraasiketjureaktion onnistumiseen.

PBS:ää eli fosfaattipuskuroitua suolaliuosta käytetään yleisesti alkiobiopsian siirtämisessä reaktioputkeen. Se muistuttaa ionipitoisuuksiltaan ja muilta ominaisuuksiltaan elimistön fysiologisia olosuhteita, minkä vuoksi se on hyvä työväline esimerkiksi laimennoksia tehdessä. Monet työvaiheet sisältävät PBS:ää, minkä vuoksi sen pitoisuuden merkitystä on tutkittu myös PCR:n onnistumisen yhteydessä. Zhu ym. (2015) tutkimuksessa tutkittiin PCR:n tehokkuutta erilaisissa PBS-pitoisuuksissa. Tutkimusryhmä havaitsi, että käytetyn PBS-pitoisuuden pienentyessä PCR:n tehokkuus parani lähes puolella, kun pitoisuuksina käytettiin 50mM–0mM. Reaktiotehokkuuden kasvun lisäksi myös käytetyn templaatin määrää voitiin vähentää. Matalampi PBS-pitoisuus siis vähensi PCR:n inhibi-

tiota. Matalan PBS-pitoisuuden käyttöön liittyy kuitenkin riskinsä, sillä matalilla pitoisuuksilla solut voivat lyysautua spontaanisti osmoottisen epätasapainon vuoksi. (Zhu ym. 2015.)

5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää alkiodiagnostiikan analyyseissä ilmenevään allele dropout-ilmiöön vaikuttavia tekijöitä ja verrata kahta eri solujen hajotusprotokollaa toisiinsa. Verrattavina ovat laajalti käytössä oleva standardimenetelmä ja Ovumian tutkima muokattu protokolla. Tarkoituksena on menetelmän olosuhteita ja työskentelytapoja optimoimalla saavuttaa hyvä lähtökohta jatkotutkimukselle ja myöhemmin diagnostiseen käyttöön soveltuva tarkkuus ja luotettavuus menetelmälle.

Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa Ovumialle tietoa heidän kehittämänsä menetelmän soveltuvuudesta käytännön työhön ja lisätutkimuksiin. Tavoitteena on tuottaa hyvä pohja menetelmien jatkokehitykselle ja lisätä tietoa allele dropout-ilmiöön vaikuttavista tekijöistä.

Tutkimuksen työhypoteeseiksi asetettiin:

- (1) PK/SDS-lyysismenetelmää käytettäessä inaktivaatiovaiheen kuumennus aiheuttaa merkittävää DNA:n katkeamista ja tämä voi olla suuri syy ADO:n ilmenemiselle.
- (2) ADO:a voidaan vähentää käyttämällä DNA:ta suojaavaa puskuria kuumennusvaiheessa.

6 MENETELMÄLLISET LÄHTÖKOHDAT

Tämä opinnäytetyö on luonteeltaan kvantitatiivista eli määrällistä tutkimusta. Tärkeä osa opinnäytetyötä on myös kokeellinen osuus. Määrällinen tutkimuksen määritelmän mukaan määrällinen tutkimus antaa kuvan mitattavien ominaisuuksien välisistä riippuvuussuhteista ja eroista. Tutkimus kuvaa tutkimuskohteiden ominaisuuksia, kuten pituutta, painoa tai intensiteettiä numeerisesti. Yleisesti määritellen määrällisen tutkimuksen avulla voidaan selvittää, kartoittaa tai vertailla esimerkiksi maiden väestöjä, yksilöitä ja niiden ominaisuuksia tai luonnonilmiöitä. (Vilka 2007.) Tässä työssä tutkimuskysymyksenä oli selvittää, onko kahden DNA-eristysmenetelmän välillä eroa ja mikäli on, kuinka paljon.

Määrällinen tutkimus käsitellään yleensä tilastollisen analyysin avulla. Lukuarvot ja lukumäärät esitetään usein frekvenssien ja prosentiosuuksien avulla. Tulosten esittämisessä hyödynnetään taulukoita ja usein taulukon tulokset nk. ristiintaulukoidaan. Ristiintaulukoinnin avulla voidaan arvioida vaikutussuhteita tutkimuksen sisällä. Usein on tarpeen myös tehdä eri ryhmien välistä vertailua ja varmistaa ovatko saadut erot todellisia vai näennäisiä. (Virtuaaliammattikoulu 2007.) Tilastollisten merkitsevyyksien laskennassa voidaan käyttää esimerkiksi Studentin t-testiä, khiin neliö-testiä tai Fischerin tarkkaa testiä.

Määrällisen tutkimuksen luotettavuutta voidaan tutkia mittaamalla tutkimuksen reliabilisuutta ja validiutta. Tutkimuksen reliabilisuus kuvaa tutkimuksen kykyä antaa toistettavia, ei-sattumanvaraisia tuloksia eli sitä kuinka pysyviä saadut tulokset ovat. Tutkimuksen voidaan sanoa olevan luotettava ja tarkka, kun toistomittauksissa saadaan samat tulokset tutkimuksen tekijästä riippumatta. Tutkimuksen validius kuvaa tutkimuksen kykyä mitata tutkittavaa asiaa sitä todellisuudessa kuvaavalla mittarilla. Validiutta voidaan mitata arvioimalla, miten tutkimuksen tekijä on onnistunut esimerkiksi muodostamaan haastattelun kysymyksiä tai esiintyykö tutkimuksessa systemaattisia virheitä, kuten esimerkiksi verrokkiryhmien erilaiset olosuhteet. Yhdessä reliabilisuus ja validius muodostavat tutkimuksen kokonaisluotettavuuden, jota voidaan taas arvioida mm. toistamalla koejärjestely. Määrälliseen tutkimukseen kohdistuvat tieteellisen tutkimuksen laatuvaatimukset, joihin kuuluvat mm. tutkimuksen informatiivinen sisältö, puolueettomuus ja esimerkiksi toistettavuus. (Vilka 2007.)

7 TYÖN SUORITUS

7.1 Tutkimusstrategia

Valitsin opinnäytetyöni tekopaikaksi Hedelmätyösklinikka Ovumian, sillä heidän tekemänsä tutkimus on ajankohtaista ja aikaisempaa koulutustaustaani hyödyntävää. Sain aiheen maaliskuussa 2016, jonka jälkeen valmistelin tutkimussuunnitelman ja tarvittavat salassapitosopimukset yhdessä työnantajani kanssa. Opinnäytetyön kokeellisen osuuden tein Ovumia Oy:ssä huhti-kesäkuussa 2016.

Opinnäytetyön tutkimusosa koostui useasta alatutkimuksesta, joiden avulla selvitettiin yksittäisten tekijöiden vaikutusta polymeerasiketjureaktion onnistumiseen ja allele dropoutin esiintyvyyteen. Eri puskureiden vaikutusta inaktivaatiovaiheen kuumennuksen aiheuttamiin DNA-katkoksiin tutkittiin DNA:n fragmentaatiokokeilla. Lisäksi tutkittiin DMSO:n vaikutusta PCR:n onnistumiseen. Myös polymeerasiketjureaktion optimointi oli osa kokeellista osaa. Pääpaino tutkimuksessa oli ADO-koesarjassa, jossa tutkittiin DNA:n eristysmenetelmän vaikutusta yhden solun PCR-monistuksen yhteydessä. PCR:ssä käytettiin pitkää templaattia (allelepituuudet 892 bp ja 1081 bp), koska allele dropoutin esiintyvyys on korkeampi pitkällä monistettavilla DNA-jaksoilla (Piyamongkol ym. 2003). Tällöin mahdolliset käsittelyjen erot tulevat paremmin näkyviin.

DNA-eristyksen inkubaatiolämpötiloina käytettiin kirjallisuudessa yleisimmin esiintyviä olosuhteita: lyysauslämpötilana 37 °C, 60 min (Holding ym. 1993, Daniels ym. 2001, Thornhill ym. 2001, Piyamongkol ym. 2003, Kim ym. 2009, Martinhago ym. 2010, Michalska ym. 2013) ja inaktivaatiolämpötilana 99 °C, 15 min (Holding ym. 1993, Sherlock ym. 1998, Daniels ym. 2001, Eftedal ym. 2001, Piyamongkol ym. 2003, Martinhago ym. 2010, Michalska ym. 2013).

7.2 DNA:n fragmentaatiokokeet

Kokeiden tarkoituksena oli tutkia puskureiden suojaavaa vaikutusta DNA:han lyysauksen (37 °C, 60 min) ja inaktivaation (99 °C, 15 min) olosuhteissa. Standardiliuoksella tarkoitetaan yleisesti käytettyä PK/SDS-liuosta, jossa on 2 µl 125 µg/ml proteinaasi K:ta (125 µg/ml) ja 1 µl SDS:ää (17 µM) ilman puskuria. DNA:na käytettiin 135 ng NoLimits DNA 10000bp (Thermo Scientific).

Eri määriä ja/tai pitoisuuksia testattavia puskureita olivat PBS, jota käytetään biopsian siirtämisessä lyysausliuokseen sekä Ovumiassa DNA:ta suojaavaan tarkoitukseen suunnitellut OvT- ja OvG -puskurit. Käsittelyn vaikutukset detektoitiin elektroforeesilla samalla tavalla kuin PCR-kokeiden tuotteet (kts. kohta 7.9)

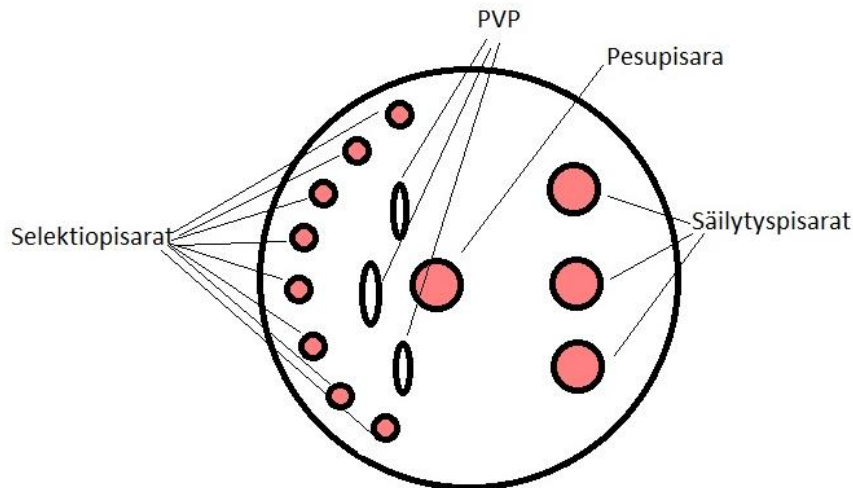
7.3 Allele dropout-kokeen näytemateriaali

Työssä käytettiin miespuolisen koehenkilön valkosoluja, jotka oli pakastettu ja säilötty nestetyypeen. Solut sulatettiin nopeasti siirtämällä pakastusolki +37 °C veteen 30 sekunniksi. Sulanut liuos siirrettiin eppendorf-putkeen ja soluille lisättiin varovasti 900 µl RPMI (RPMI-medium, Lonza) +SSS (Serum Substitute Supplement, IrvineScientific)-liuosta (9:1) jäädytysnesteen poispesemiseksi. Pesuliuoksen lisäämisen jälkeen suspensiota käännettiin varovasti ja soluja sentrifugoitiin 2000 x g kahden minuutin ajan. Pesu toistettiin kaksi kertaa ja viimeisellä kerralla solut sentrifugoitiin vain lyhyesti laskeutumaan putken pohjalle. Soluja siirrettiin solumaljan säilytyspisaroihin odottamaan erotte-
lua.

7.4 Yksittäisten solujen käsittely PCR-kokeita varten

Yksittäisten solujen käyttöä varten käytettiin erityisesti näitä kokeita varten suunniteltua koeasetelmaa, joka esitellään kuvassa 4. Solualustana käytettiin soluviljelymaljan kantta (Nunc/Falcon), johon pipetoitiin kolme 20 µl RPMI+SSS-pisaraa (säilytyspisarat) solujen säilytystä varten ja yksi 20 µl pisara injektio pipetin pesua varten. Maljalle lisättiin kolme 5 µl pisaraa PVP:tä (polyvinyylipyrrolidoni) (Origio), jonka viskositeetin avulla solujen siirto on hallitumpaa. Maljalle lisättiin myös 5 µl RPMI+SSS-pisaroita (selektiopisarat) yksittäisten solujen erottamiseksi. Pisaroiden pipetointien jälkeen malja peitettiin parafiiniöljyllä (Origio) ja siirrettiin +4 °C:seen odottamaan soluja. Sulatettua solu-
liuosta siirrettiin mikroskoopin alla pieni määrä säilytyspisaroihin, joissa solujen morfologiaa analysoitiin. Tämän jälkeen 5–7 yksittäistä solua siirrettiin kuhunkin selektiopisaraan tarkempaa tarkastelua varten ja malja siirrettiin käänteismikroskoopin ristisiirto-
pöydälle. Kustakin selektiopisarasta valittiin yhdet yhdenmukaisen kokoiset, pyöreähköt solut siirrettäväksi edelleen lyysisliuokseen hajotusta ja analyysia varten. Solut siirrettiin mikromanipulaattorin (Integra, Research Instruments) ja PVP:llä täytetyn biopsiapipetin

(Origio) avulla noin 50 nanolitrnan tilavuudessa UTW-low profile mikrosentrifuugistrippeihin, joihin oli pipetoitu valmiiksi lyysisliuosta. Kutakin selektiopisaraa käytettiin vain kerran olosuhteiden vakioimiseksi.



KUVA 4. Koejärjestely yksittäisten solujen erottelua ja valikointia varten.

Kuva itse piirretty.

7.5 Solujen hajotus allele dropout-kokeessa

Solujen lyysauksessa käytettiin 3,0 µl proteinaasi K/SDS-liuosta, johon oli lisätty 0,1 µl PBS-liuosta mimikoimaan blastomeerinäytteen mukana siirtyvää liuosta. Lyysisliuoksen kokonaistilavuus oli 3,1 µl per mikrosentrifuugiputki. Lyysisliuos valmistettiin etukäteen ja säilytettiin +4 °C:ssa. Solut siirrettiin putkiin ja niiden annettiin hajota 60 min 37 °C:ssa, jonka jälkeen proteinaasi K inaktivoitiin siirtämällä solut lämpöhauteelle 99 °C 15 minuutin ajaksi. Inaktivaation jälkeen näytteet siirrettiin +4 °C:seen, kunnes niille aloitettiin PCR-reaktio.

7.6 Polymeraasiketjureaktio

PCR:ssä monistettiin osaa amelogeniini-geenistä, jota käytetään yleisesti sukupuolen määrittämiseen mm. rikostutkimuksessa ja alkiodiagnostiikassa. Geeni sijaitsee lokuksissa Xp22.1–Xp22.3 ja Yp11.2. PCR voidaan suunnitella niin, että Y ja X-kromosomien alleelien tuotteet ovat eripituisia. Kahden eri tuotteen havaitseminen tarkoittaa miestä ja yhden naista. (D'Aquino ym. 2013.) Koska käytetyt solut olivat miehen soluja, kustakin

solusta oli odotettavissa kaksi eri tuotetta. Täten mahdollinen allele dropout voitiin havaita.

PCR-reaktiot tehtiin 25 µl tilavuudessa. Käytetty polymeraasi oli Phusion U Hot Start Polymerase (Thermo Scientific), jolla on ns. oikolukuaktiviteetti, eli se poistaa väärin templaattijuosteeseen liittyneet nukleotidit, jonka seurauksena virheet DNA:n synteesissä ovat 25–50 kertaa pienemmät kuin perinteisesti käytetyllä *Taq*-polymeraasilla. Lisäksi se voi liittää syntetisoitavaan juosteeseen UTP:tä, mikä mahdollistaa urasiili-DNA-glykosylaasin (Arctic Zymes) käytön PCR:n esi-inkubaatiossa tuhoten mahdolliset aikaisemmat reaktioputkea kontaminoivat PCR-tuotteet. Kaikissa reaktioissa käytettiin GC-puskuria (Thermo Scientific) 1x konsentraatiossa ja magnesiumkonsentraatio oli 1,5 mM. Nukleotideista (Thermo Scientific) TTP korvattiin kokonaisuudessaan UTP:llä.

7.6.1 Polymeraasiketjureaktion optimointi

PCR:n optimointi on tärkeä vaihe alkiodiagnostiikkaprotokollan kehittämisessä. Sen tarkoituksena on saada reaktiosta mahdollisimman spesifinen tuote ja suuri saanto. Optimoinnin kohteena ovat alukkeet ja niiden ominaisuudet, alukkeiden ja esimerkiksi polymeraasientsyymien pitoisuudet, käytetyt reaktiolämpötilat, reagenssien optimaaliset pituudet ja vaiheiden siirtymien nopeudet. Hyvin tehty optimointi lisää tulosten toistettavuutta ja täten tuottaa laadukkaampaa dataa. Optimoimaton PCR tuottaa artefaktoja analyysiin mm. primer-dimereiden, epäspesifisen sitoutumisen ja pahimmillaan kokonaan sitoutumatta jättämisen myötä. Kontaminaatioiden estäminen pienen lähtömäärän PCR:ssä on erittäin tärkeää. (Robertson 1998.) On havaittu, että useimmille PCR:lle sopivat pusku-riolosuhteet ovat 1.5 mM Mg²⁺, matala suolapitoisuus (50 mM KCl), 0.2 mM jokaista aluketta ja 0.2 mM kutakin dNTP:tä. Liian korkeat magnesiumpitoisuudet lisäävät alukkeiden epäspesifistä sitoutumista. Liian matalat pitoisuudet taas vähentävät tiettyjen polymeraasien aktiivisuutta ja saattavat johtaa heikkoon saantoon. Myös liuoksen pH:llä ja suolapitoisuudella on merkitystä tehokkuudelle. (Robertson 1998.) Optimaaliset olosuhteet voivat kuitenkin vaihdella suurestikin riippuen esimerkiksi monistettavasta DNA-alueesta ja käytetystä polymeraasista.

Tämän työn PCR-optimoinnissa amelogeniinin havaitsemiseksi selvitettiin kahden ennalta suunnitellun alukeparin toimivuutta ja optimaalista konsentraatiota. Pareina käytet-

tiin AM18B+AM1098 (alukepari #3) ja AM18B+AM1083 (alukepari #4) Ovumiassa aikaisemmin tehtyjen tutkimusten perusteella. Alukkeiden sekvenssit on esitetty taulukossa 2. Tuotteiden pituudet alukeparille #3 ovat 892bp (AMELY) ja 1081bp (AMELX). Alukeparin #4 tuotteet ovat pituudeltaan 877bp (AMELY) ja 1066bp (AMELX).

TAULUKKO 2. Työssä käytetyt PCR-alukkeet

Aluke	Sekvenssi
AM18B	CTCTGATGGTTGGCCTCAA
AM1098	CAGGCACTGTGTTTACATCCA
AM1083	CATCCATCACACACATTCTTCA

Tutkittavana DNA:na oli 0,5 ng miehen DNA:ta, mikä vastaa noin 75 solun DNA-määrää. Alukeparien konsentraatioina käytettiin 5 pmol ja 15 pmol. Käytetty PCR-ohjelma oli taulukon 3 mukainen. Toisessa koeryhmässä PCR-syklejä oli 30 ja toisessa 35.

TAULUKKO 3. PCR:n optimoinnissa käytetty ohjelma

Syklit	Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika (s)
1	Alkudenaturaatio	98	30
1-15	Denaturaatio	98	45
	Annealing	64	60
	Ekstensio	72	60
16-30/35	Denaturaatio	98	15
	Annealing	64	60
	Ekstensio	72	60
	Säilytys	4	∞

Lopullista PCR:ää varten haluttiin myös varmistaa optimaalisin annealing-lämpötila ja sitä varten luotiin koesarja, jossa verrattiin 64 °C ja 65 °C-annealing-lämpötiloja ja 10 pmol ja 15 pmol alukepitoisuuksia. Alukkeina käytettiin aiempien tulosten perusteella optimaalisinta alukeparia. DNA:na käytettiin 10 ng miehen DNA:ta. PCR-ohjelmana käytettiin taulukon 4 mukaisia ohjelmia.

TAULUKKO 4. PCR:n optimoinnissa käytetty ohjelma optimaalisen annealing-lämpötilan selvittämiseksi

Syklit	Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika (s)
1	Alkudenaturaatio	98	30
1-10	Denaturaatio	98	45
	Annealing	64/65	60
	Ekstensio	72	60
16-35	Denaturaatio	98	15
	Annealing	64/65	60
	Ekstensio	72	75
	Säilytys	4	∞

7.7 Dimetyylisulfoksidi-testaus

DMSO (dimetyylisulfoksidi) on varsin yleinen PCR-lisäaine, joka heikentää erityisesti G-C-emäspariutumista. Sitä käytetään varsinkin pitkiä ja/tai korkean GC-pitoisuuden omaavia amplikoneja monistettaessa. Tässä työssä tutkittavana oleva amplikoni ei ole GC-rikas, mutta se on kohtuullisen pitkä, josta syystä kokeiltiin DMSO:n vaikutusta monistustehokkuuteen. Samalla DMSO saattaa mahdollistaa alemman denaturaatiolämpötilan käytön, mikä saattaa antaa näytteen DNA:lle paremman suojan. Yksittäisiä valkosoluja siirrettiin putkiin ja niihin lisättiin käsittelyn mukaiset PCR-seokset, joissa oli joko 0 %, 2 % tai 4 % lisättyä DMSO:ta. Reaktioille suoritettiin 1 h lyysaus 37 °C:ssa ja 15 minuutin proteinaasi K:n inaktivointi 77 °C:ssa. Käytetty PCR-ohjelma on kuvattu taulukossa 5.

TAULUKKO 5. DMSO:n vaikutusten tarkastelemiseksi laadittu PCR-ohjelma

Syklit	Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika (s)
1	Alkudenaturaatio	96	30
1-15	Denaturaatio	96	15
	Annealing	64	90
	Ekstensio	72	45
16-42	Denaturaatio	98	30
	Annealing	64	60
	Ekstensio	72	75
	Säilytys	4	∞

7.8 Allele dropout-PCR

80 solua käsiteltiin ja siirrettiin yksitellen putkiin, kuten aiemmin mainittu. Puolet soluista käsiteltiin standardimenetelmällä (1 h 37 °C, 15 min 99 °C) ja puolet muuten samoin, mutta reaktioseokseen lisättiin DNA:n suojauksen kannalta optimaalisimmaksi arvioitua puskuria ennen inaktivaatiovaihetta.

7.9 Tuotteiden detektointi

PCR-tuotteet detektoitiin elektroforeesilla käyttäen 1,2 % geelejä (FlashGel™ System, Lonza). PCR-tuotteisiin lisättiin 6x Loading Dyetä (Thermo Scientific) pitoisuuteen 1x ja molekyyli-markkerina käytettiin GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific). Geelit ajettiin 160 V noin 10 min tai kunnes tuotteet erottuivat riittävästi toisistaan. Kuvantaminen tehtiin Lonzan kameralla.

7.10 Tilastollinen analyysi

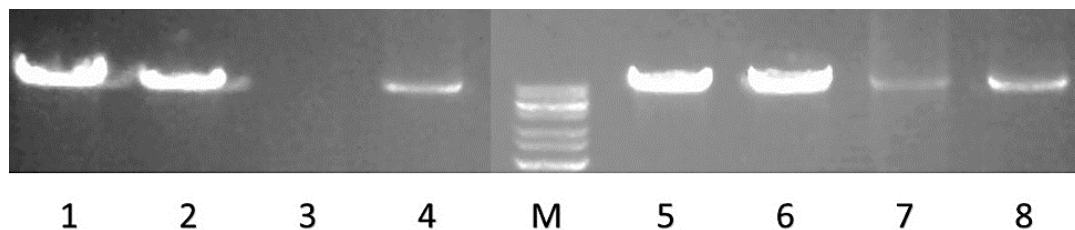
PCR-reaktioiden monistustehokkuutta ja ADO-esiintyvyyttä eri DNA:n käsittelymenetelmien välillä verrattiin käyttäen tilastollista analyysiä. Tässä työssä näytteiden määrä oli pieni, tulokset olivat numeraalisia ja tuloksia haluttiin verrata keskenään, joten tilastollisen analyysin välineeksi valittiin Fischerin tarkka testi. Fischerin testiä varten muodostettiin nk.nollahypoteesi, jonka mukaan eri käsittelyjen välillä ei ole eroa. Nollahypoteesi voidaan kumota, mikäli testin havaittu merkitsevyysarvo on alle määritellyn P-ar-

von. P-arvo kuvaa riskiä, jolla saatu yksittäinen piste noudattaa nollahypoteesia.(McDonald 2009.) Tilastollista merkitsevyyttä analysoitiin Internetistä löytyvän laskurin avulla (<http://www.socscistatistics.com/tests/fisher/Default2.aspx>, vierailtu 12.9.2016). P-arvo $<0,05$ tulkittiin tilastollisesti merkittäväksi.

8 TULOKSET

8.1 DNA:n fragmentaatiokokeet

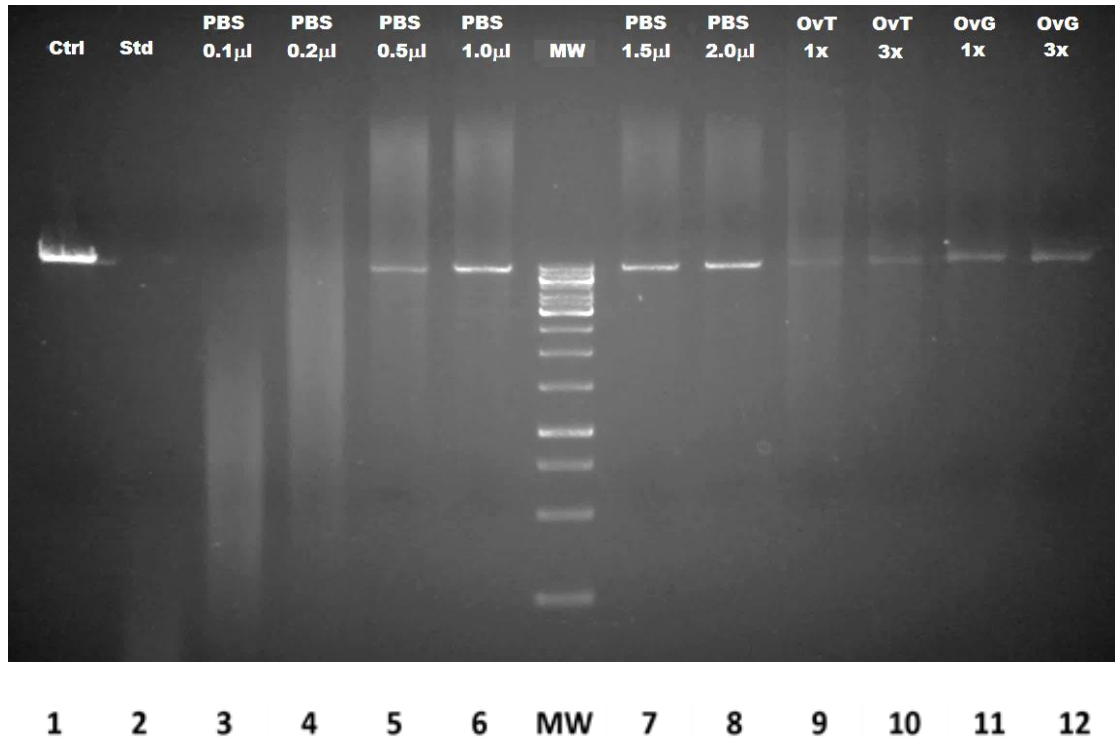
DNA:n fragmentaatiokokeiden tarkoituksena oli selvittää olosuhteita, joissa DNA vaurioituu tai säilyy hyvin. Kuvassa 5 esitetään edustava kuva DNA:n fragmentaatiokokeesta. Kokeessa verrattiin erilaisten lyysisolosuhteiden vaikutusta DNA:n hajoamiseen. +37 °C lämmitys standardiliuoksessa (=ilman puskuria) ei fragmentoi DNA:ta, mutta lyhyt 15 minuutin altistus 99 °C:ssa proteinaasi K:n inaktivoimiseksi aiheuttaa DNA:n pilkkoutumisen. Kun reaktioseokseen lisätään OvG-puskuria, DNA:n fragmentaatio vähenee 99 °C:ssa. PBS-käsittelyssä tulokset ovat samankaltaisia ja lisäksi PBS:n käyttö vähentää DNA:n fragmentaatiota myös ilman OvG-puskurin lisäystä. Näyte 3 on hajonnut kokonaan, näytteet 4, 7 ja 8 osittain.



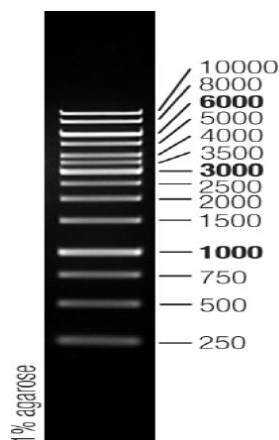
KUVA 5. Elektroforeesigeeli, jossa DNA:n fragmentaatiokokeen tulokset. Näyte **1**: Käsittelemätön näyte, **2**: Standardiliuos, 37 °C 1 h, **3**: Standardiliuos, 1 h lyysis 37 °C ja 15 min inaktivaatio 99 °C **4**: sama kuin 3, mutta lisätty OvG-puskuria ennen inaktivaatiota. Näytteet **5-8**: kuten 1–4 mutta lisätty 0,5 µl PBS-liuosta biopsianäytteen siirtopuskurin mimikoimiseksi. M= molekyyli­markkeri (GeneRuler 1 kb, Thermo Scientific).

Eri määrissä lisätyn PBS:n sekä OvT- ja OvG-puskureiden vertailun tulokset DNA:n hajoamiseen lämpökäsittelyiden aikana on esitetty kuvassa 6. Kaikki näytteet, paitsi näyte 1, käsiteltiin 1 h 37 °C ja 15 min 99 °C ennen PCR:ää. PBS-lisäykset tehtiin ennen lyy­stistä ja OvT- ja OvG-puskurit lisättiin ennen inaktivaatiovaihetta. Ennen PCR:ää kaikkien reaktioiden tilavuus tasattiin puskureilla siten, että suolakoostumukset olivat identtisiä. Kuvasta 6 voidaan nähdä, että standardikäsittely hajottaa DNA:n pieniksi, pääosin alle 250 emäsparin fragmenteiksi ja että samanlaisilla olosuhteilla kasvava PBS:n konsent­raatio suojaa DNA:ta. Erityisesti näytteet 2–4 ovat fragmentoituneet runsaasti ja vain

”smear” on näkyvissä. Suurin suojaus saatiin kolmella suurimmalla konsentraatiolla. Kuvasta voidaan myös havaita, että OvG-puskuri suojaa DNA:ta OvT-puskuria paremmin. Käytetty molekyyli­markkeri mitta-asteikkoineen on esitetty kuvassa 7.



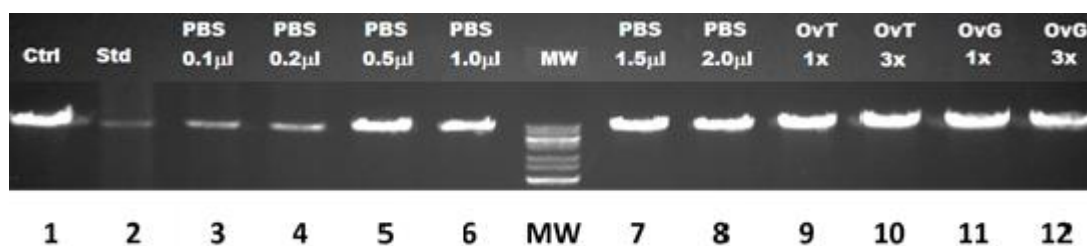
KUVA 6. Elektroforeesigeeli, jossa 10 kb:n DNA:n käsittely 37 °C:ssä ja 15 min 99 °C eri puskureilla. **1.** Käsittelemätön kontrolli **2.** Standardiliuos **3–8.** Eri pitoisuudet PBS:ää lisätty standardiliuokseen. **9–10** OvT-puskuri, eri pitoisuudet, **11–12** OvG-puskuri, eri pitoisuudet. MW= molekyyli­markkeri (GeneRuler 1 kb, Thermo Scientific). Molekyyli­markkerin lyhin fragmentti on 250 bp.



KUVA 7. Thermo Scientific GeneRuler 1 kb-mitta-asteikko (Thermo Scientific 2012)

Yksijuosteinen tai osittain yksijuosteiseksi avautunut DNA kulkeutuu elektrofooresissa kaksijuosteista DNA:ta hitaammin. Kuvassa 6 10 kb:n fragmenttien yläpuolella näkyvä harsomainen DNA ("smear") viittaa siis käsittelyjen avanneen DNA-juosteita ainakin osittain. Edellyttäen, että samalla ei ole tapahtunut DNA:n katkeamista, hitaasti kulkeutuvalla DNA:lla ei ole ADO:n kannalta merkitystä. Juosteiden avautuminen inaktivaatiovaiheessa saattaa päinvastoin helpottaa juosteiden erottumista PCR:n alkudenaturaati-ossa. Sen sijaan käsittelyt, joissa syntyy 10 kb:n fragmenttien alapuolella näkyvää "smearia" on tapahtunut DNA:n katkeamista, mikä lisää ADO-riskiä.

Kuvassa 8 on esitetty puskureiden vaikutuksia DNA:n hajoamiseen lämpökäsittelyiden aikana standardikäsittelyä matalammassa lämpötilassa. Kaikki näytteet, paitsi näyte 1, käsiteltiin 1 h 37 °C ja 15 min 77 °C. Inaktivaatiokäsittelyn jälkeen lämpötilan lasku +4 °C:seen tehtiin hitaasti (-0.3 °C/s). PBS-lisäys tehtiin ennen 37 °C:een inkubaatiota ja OvT-(1x ja 3x) ja OvG-puskurit (1x ja 3x) lisättiin ennen inaktivaatiovaihetta. Kaikkien reaktioiden tilavuus tasattiin lopuksi siten, että suolapitoisuudet olisivat elektrofooresissa samanlaiset. Kuvasta 8 voidaan nähdä, että inaktivaatio 77 °C:ssa on hellävaraisempi DNA:lle kuin 99 °C:ssa (vrt.kuva 6) ja että PBS:n konsentraation lisäys suojaa DNA:ta. Suurin suojaus saatiin kolmella korkeimmalla konsentraatiolla. Suojaava vaikutus on samansuuruinen suuremmilla PBS-pitoisuuksilla kuin OvT- ja OvG -puskureilla, kun tuloksia tarkastellaan silmämääräisesti.

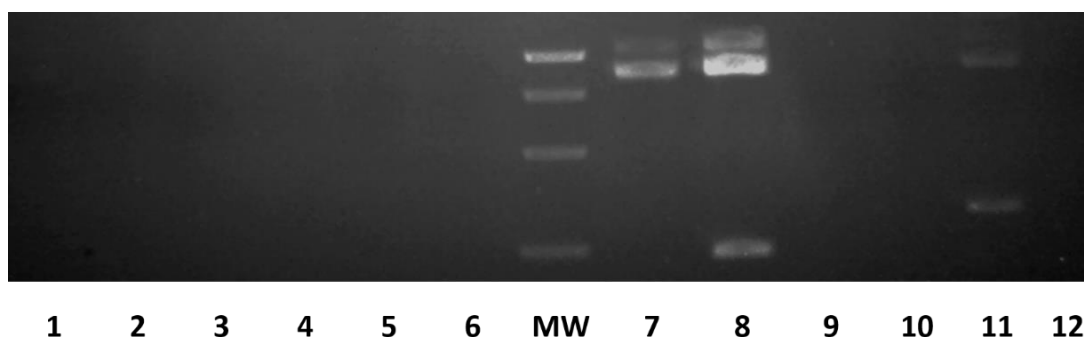


KUVA 8. Elektrofooresigeeli, jossa DNA:n fragmentaatiokokeen tulokset eri PBS-pitoisuuksilla ja puskureilla. Inaktivaatiolämpötilana käytetty 77 °C.

1. Käsittelemätön **2.** Standardikäsittely **3–8.** Eri pitoisuudet PBS:ää. **9–10.** OvT-puskuri, eri pitoisuudet, **11–12.** OvG-puskuri, eri pitoisuudet. MW= molekyyli­markkeri (GeneRuler 1 kb, Thermo Scientific).

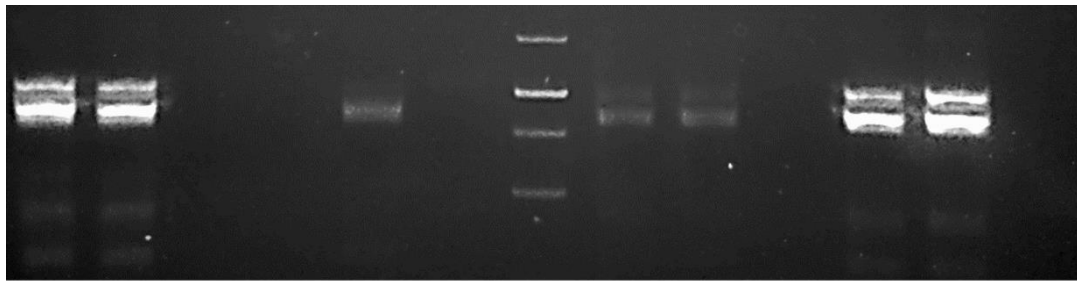
8.2 Polymeraasiketjureaktion optimointi

Kuvassa 9 on esitetty elektroforeesigeelikuva, jossa on vertailtu PCR-sykliden määrän (30 tai 35), alukeparien (#3 ja #4) ja alukepitoisuuden (5 pmol ja 15 pmol) vaikutusta kohdeamplikonin monistumiseen. Templaattina käytettiin 0,5 ng genomista DNA:ta. Näytteet, joissa käytettiin vain 30 PCR-sykliä, eivät ole monistuneet havaittavissa määrin. Kun syklimäärää lisätään viidellä 35:teen, tuotteita voidaan havaita. Alukeparilla 3 monistumista on selvästi molemmilla alukepitoisuuksilla (5 pmol ja 15 pmol), kun taas paria 4 käytettäessä vain suuremmalla pitoisuudella voidaan havaita PCR-tuotetta. Näytteissä 8 ja 11 näkyy lyhyitä epäspesifisiä tuotteita.



KUVA 9. Elektroforeesigeeli, jossa vertailu eri alukepitoisuuksien (5 pmol ja 15 pmol) ja syklien minimimäärien välillä PCR:n optimointia varten. Näytteissä 1–6 syklien lukumäärä on 30 ja näytteissä 7–12 syklien lukumäärä on 35. Näytteissä 1–2 ja 7–8 käytetty alukeparia #3 ja näytteissä 4–5 ja 10–11 alukeparia #4. 3, 6, 9 ja 12 ovat negatiivisia kontrolleja. MW= molekyyli­markkeri (GeneRuler 1 kb, Thermo Scientific)

Kuvassa 10 esitetään tulokset kahden eri annealing- eli pariutumislämpötilan ja alukepitoisuuden vaikutuksesta PCR:n monistustehokkuuteen. Templaattina käytettiin 0,5 ng genomista DNA:ta ja syklimäärä oli 35. Aikaisempien kokeiden perusteella optimoinnissa käytettiin alukeparia 3. Matalampaa annealing-lämpötilaa (64 °C) käytettäessä monistuminen on tehokkaampaa pienemmällä alukepitoisuudella (5 pmol), kun taas suuremmassa annealing-lämpötilassa (65 °C) suurempi alukepitoisuus (15 pmol) tuottaa enemmän tuotetta. Lähes kaikissa reaktioseoksissa syntyi jonkin verran epäspesifisiä tuotteita, mutta ne eivät haitanneet tutkittavien fragmenttien tulkittamista. Kaikki negatiiviset kontrollit ovat negatiivisia.



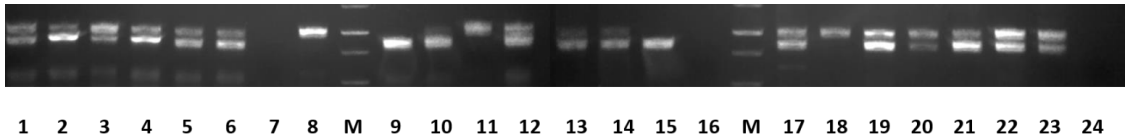
1 2 3 4 5 6 MW 7 8 9 10 11 12

KUVA 10. Elektroforeesigeelikuva, jossa vertailtu eri annealing-lämpötiloja ja alukepitoisuuksia PCR:n optimointia varten. Näytteissä 1–6 käytetty annealing-lämpötilana 64°C ja näytteissä 7–12 65°C. Näytteissä 1–3 ja 7–9 alukepitoisuutena käytetty 10 pmol ja näytteissä 4–6 ja 10–12 käytetty alukepitoisuus on 15 pmol. Näytteet 3, 6, 9 ja 12 ovat negatiivisia kontrolleja. MW= molekyyli­markkeri (GeneRuler 1 kb, Thermo Scientific).

Tässä vaiheessa oli saatu yleiskuva tarvittavista PCR-olosuhteista 0,5 ng DNA:ta monistettaessa ja tietoja hyödyntämällä siirryttiin optimoimaan PCR:ää yhdestä solusta.

8.3 Dimetyylisulfoksiditestaus ja polymeerasiketjureaktion optimointi yksittäisillä soluilla

Solut sulatettiin ja pestiin ohjeen mukaan ja kuhunkin putkeen lisättiin yksi solu. Solut hajotettiin lyysausliuoksessa 1 h 37 °C proteinaasi K-käsittelyllä ja proteinaasi K inaktivoitiin 15 min 77 °C:ssa. Solujen PCR-reaktioihin lisättiin niiden ryhmän mukaisesti 0, 2 tai 4 tilavuusprosenttia DMSO-liuosta muiden reagenssien yhteydessä. PCR:n tulokset nähdään kuvassa 11. Kokonaismonistumistehokkuus on suuri (20/21) eli 95,2 %. ADO:a esiintyy kokonaisuudessaan 4/21 eli 19,0 %. Näytteissä on havaittavissa suosivaa monistumista, jolloin molemmat alleelit monistuvat, mutta toinen alleeleista (usein pienempi) näkyy elektroforeesigeelissä voimakkaampana. Näytteiden joukossa on myös negatiivisia kontrolleja (8, 16 ja 24) joista yksi on positiivinen. Ryhmässä, jossa ei käytetty DMSO:ta, ei esiinny ADO:a, mutta monistuminen on epäonnistunut kokonaan yhdessä näytteessä. 2 % DMSO-ryhmässä esiintyy ADO:a 3/7, mutta ei yhtään monistumisen kokonaisepäonnistumista. 4 % DMSO-ryhmässä ADO:a on 1/7 ja ei yhtään monistumisen kokonaisepäonnistumista. Tulosten perusteella selkeää etua DMSO:n käytöstä ei ole.



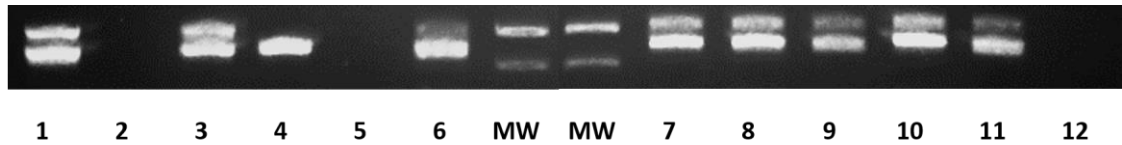
KUVA 11. Elektroforeesigeeli, jossa tulokset DMSO-pitoisuuksien vaikutuksista yhden solun PCR:n onnistumiseen ja allele dropout-ilmiöön. Näytteissä **1–8** 0 % DMSO, näytteissä **9–16** 2 % DMSO ja näytteissä **17–24** 4 % DMSO. M= molekyyli-markkeri (GeneRuler 1 kb, Thermo Scientific). Näytteet 8, 16 ja 24 ovat negatiivisia kontrolleja.

8.4 Yksittäisten solujen allele dropout ja polymeraasiketjureaktio

PCR-optimointien tulosten perusteella päädyttiin vertaamaan inaktivaatiota 15 min 99 °C:ssä ilman puskuria (standardikäsitely) ja 3xOvG puskurin kanssa. Inaktivaatiosta 77 °C:n lämpötilasta luovuttiin, koska tuloksissa oli liikaa vaihtelua optimointien aikana. PCR:ssä ei käytetty DMSO:ta.

Yhteensä 80 yksittäistä solua käsiteltiin. 40 solua käsiteltiin standardimenetelmän mukaan, jossa soluja lyysataan ensin 1 h 37 °C ja tämän jälkeen käsitellään 15 minuuttia 99 °C proteinaasi K:n inaktivoimiseksi. Toinen 40 solun ryhmä käsiteltiin muuten samoin, mutta ennen 15 minuutin inaktivaatiota reaktioon lisättiin 3xOvG-puskuria. PCR aloitettiin 60 sekunnin alkudenaturaatiolla 98 °C:ssä, jonka jälkeen tehtiin 15 sykliä 98 °C 15 s denaturaatio, 64 °C 90 s annealing ja 72 °C 45 s ekstensio. Tämän jälkeen inkuboitiin 27 sykliä 98 °C 30 s denaturaatiolla, 64 °C 90 s annealingilla ja 72 °C 45 s ekstensiolla. Lopuksi putkia pidettiin viisi minuuttia 72 °C:ssä.

Kuvassa 12 esitellään yhden koesarjan tulokset. Standardikäsitelyssä monistumisen onnistuminen oli 25/40 (62,5 %) ja ADO:ta esiintyi 68 %. Ryhmässä, johon oli lisätty 3xOvG puskuria, monistumisteho oli 24/40 (60 %) ja ADO:ta esiintyi 37,5 %.



KUVA 12. Esimerkki elektroforeesigeelikuvasta standardilyysausmenetelmästä verrattuna menetelmään, jossa käytetään puskuria lisänä. Näytteet **1–5** käsitelty standardilyysausmenetelmällä (1 h 37°C ja 15 min 99°C) ja näytteet **7–12** samoin, mutta ennen inaktivaatiovaihetta reaktioon lisättiin 3xOvG-puskuria. Näyte **6** on positiivinen kontrolli ja näyte **12** negatiivinen kontrolli. MW= molekyylimarkkeri (GeneRuler 1 kb, Thermo Scientific)

ADO:n osalta ero oli tilastollisesti merkittävä ($p=0.045$) ja siihen liittyvät laskukaavat on esitetty taulukossa 6. Täten nollahypoteesi hylättiin ja menetelmien välisen eron voitiin todeta olevan todellinen.

TAULUKKO 6. Yksittäisten solujen ADO-PCR-testin tulokset. AS (amplification success) = ainakin yksi alleeli monistunut, ADO = allele drop-out. ADO% = havaittujen ADO:jen määrä/AS x 100%

	AS	ADO
Standardi	25/40 (62.5%)	17/25 (68%)
3x OvG -puskuri	24/40 (60%)	9/24 (37.5%)
<i>P-arvo (Fisherin testi)</i>	<i>N.S.</i>	<i>0.045 *</i>

9 POHDINTA JA YHTEENVETO

Tutkimuksessa käsiteltiin alkion solujen sijaan verestä eristettyjä valkosoluja, sillä blastomeerien saatavuus on äärimmäisen vaikeaa. Työssä käytetyt menetelmät soveltuvat tietyn varauksin myös alkiosta saatavien näytteiden tutkimiseen. Käytännön osuus vei noin 6 viikkoa keväällä 2016 ja työstä saatuja tuloksia pohdittiin työn teon ohessa työelämäohjaajani Peter Bredbackan kanssa. Osa tuloksista on jätetty pois yleisesti julkaistavasta versiosta salassapitosopimuksen vuoksi.

Allele dropout on merkittävä ongelma alkiodiagnostiikassa. ADO-riskin pienentäminen parantaisi alkiodiagnostiikan luotettavuutta ja tehokkuutta. Lisäksi se helpottaisi suunnittelua ja uusien testien käyttöönottoa. Tyypillisesti tautigeenin mutaatiokohdan lisäksi analysoidaan multiplex-PCR:n avulla useita sen lähellä olevia polymorfisia DNA-markkereita, joiden tulosten avulla mutaatiokohdan tulos voidaan varmistaa. Keskimääräinen 25 % ADO-esiintyvyys vaatii neljä informatiivista markkeria, jotta mahdollinen ADO voidaan havaita molemmista alleeleista 95 % tarkkuudella. Viiden prosentin ADO-esiintyvyydellä markkereita vaaditaan kaksi, jotta luotettavuus olisi 99 %. (Harton ym. 2011) Vähentämällä ADO:a selvittäänsi pienemmällä määrällä lisämarkkereita, mikä helpottaa diagnostiikkamenetelmien kehittämistä. DNA-siruteknologiaa hyödyntävän SNP-arrayn (karyomappauksen) käyttö alkiodiagnostiikassa on viime vuosina yleistynyt. Siinä tutkittavan geenin mutaatiota ei analysoida suoraan, vaan geenin lähellä olevia yhden emäsmuutoksen (Single Nucleotide Polymorphism) alueita. Karyomappauksessa ADO on 30 % luokkaa (Altarescu ym. 2013). Hyödynnettävissä olevien SNP-alueiden määrä vaihtelee mm. tutkittavan geenin sijainnista riippuen ja joissakin tilanteissa niitä on niin rajallisesti, että ADO:n vähentäminen voisi ratkaista diagnostiikan onnistumisen.

ADO:iin liittyvää tutkimustyötä alkiodiagnostiikan osalla on tehty jonkin verran, mutta lähes vuosikymmenen ei ole juurikaan tullut uutta tietoa. Tässä työssä oli tarkoituksena tutkia solujen hajoamiseen ja käsittelyyn liittyviä olosuhteita ja sitä, kuinka ne vaikuttavat DNA:n monistumiseen. Tulokseksi saatiin, että Ovumian kehittelemä menetelmä vähentää allele dropout-ilmiötä standardimentelmään verrattuna. Vähäisestä näytemäärästä huolimatta Ovumiassa kehitelty protokolla solujen eristykseen ja hajottamiseen vaikuttaa tulosten perusteella erittäin lupaavalta. Menetelmällä, jossa hyödynnetään lysisliuoksen

suolapitoisuutta ja suolan suojaavaa vaikutusta on teoreettinen pohja, jota tämän työn DNA-fragmentaatiokokeet vahvistavat. Alustavat PCR-tulokset yksittäisistä soluista tukevat myös teoriaa.

Tyypillisesti yhden geenivirheen alkiodiagnostiikassa monistetaan noin 100–400 bp:n eli emäsparin pituisia PCR-tuotteita. Tässä työssä käytettiin selvästi pidempiä amplikoneja (X-kromosomin amelogeniinituote on 1081 bp ja Y-kromosomin 892 bp), jotta käsittelyjen mahdolliset erot saataisiin selkeämmin esiin. Noin 150 bp:n amplikoneilla ADO on 10 %:n luokkaa sen noustessa 35–45 %:iin 350–400 bp:n amplikoneilla (Piyamongkol ym. 2003). Tässä työssä standardimenetelmällä todettu korkea ADO (68 %) on tämän perusteella odotetun suuruinen. OvG-puskurin lisäys ennen proteinaasi K:n inaktivaatiota laski ADO:ta noin puoleen (37.5 %), eli samalle tasolle mitä on odotettavissa selvästi lyhyemmillä 350–400 bp:n tuotteilla. Puskurin lisäyksen vaikutus lyhyemmillä amplikoneilla on vielä selvittämättä. On mahdollista, että puskurin antamalla suojalla on vähemmän merkitystä lyhyempien DNA-alueiden analysoinnissa. Ovumiassa tehdyissä jatkokokeissa on kuitenkin kehitetty protokollaa edelleen, jonka seurauksena ADO on vähentynyt tämänkin työn tulosta alemmalle tasolle (Bredbacka 2016).

Tekemämme tutkimus antoi perustason tietoa DNA:n hajoamisen mekanismeista ja rajasi vaihtoehtoja jatkotutkimuksen suunnille Ovumiassa. Kokeiluluontoiset testit ja olosuhteet on kirjattu ylös Ovumian tutkimuskäyttöä varten ja niitä voidaan hyödyntää jatkossa. Varsinaiset koetulokset toimivat hyvänä pohjana jatkotutkimukselle ja toistomäärien kasvattamiselle. Suuremman näytemäärän kerääminen mahdollistaa laajemman tilastollisen vertailun ja lisää tulosten luotettavuutta.

Käytännön osuuden tekemiseen varattu aika oli hyvin lyhyt kattavan aineiston keräämiseen. Menetelmien optimoiminen ja opettelu vaati runsaasti aikaa ja lisäksi monet työvaiheet olivat sellaisenaan jo hyvin aikaa vieviä. Monet olosuhde- ja käsittelykokeilut epäonnistuiivat tai jäivät jatkokehittämisen asteelle ja ne on jätetty lopullisen työn ulkopuolelle työn selkeyden ja toistomäärien puuttumisen vuoksi. Osa kokeista epäonnistui toimimattomien reagenssien vuoksi ja yksityiskohtien selvittäminen vei työaikaa. Monien kokeiden epäonnistumisen syy selvisi vasta jälkikäteen. Tämä on kuitenkin tavallista tutkimustyössä.

Tieteellinen tutkimus on eettisesti hyväksyttävä ja luotettava, kun se on tehty hyvän tieteellisen käytännön mukaisesti. Hyvä tieteellinen käytäntö tarkoittaa, että tutkimuksen tavoitteet, aineiston kerääminen ja käsittely ja esimerkiksi tulosten esittely eivät loukkaa tutkimuksen kohderyhmää tai muuta tiedeyhteisöä. Tutkijan tehtävänä on tuottaa tarkkoja, huolellisia ja rehellisiä tuloksia sekä kunnioittaa muiden työryhmien työtä. Mahdolliset taloudelliset sidonnaisuudet ja ryhmän jäsenten osuudet on myös tapana ilmoittaa tutkimuksessa. Hyvien tapojen lisäksi tutkijan tulee ottaa huomioon lainsäädäntö mm. yksityisyyden ja tekijänoikeuksien osalta. Tämä tutkimus suoritettiin tutkijan eettisiä toimintatapoja käyttäen. Ennen tutkimuksen aloittamista laadittiin tutkimussuunnitelma ja tutkimussopimus, jossa kuvattiin mm. salassapidon osuus ja tekijänoikeudet työhön. Työn aikana tutkimuksesta pidettiin työpäiväkirjaa, johon kirjattiin tutkimuksen työvaiheet ja olosuhteet.

Työtä tehdessäni kiinnitin huomiota olemassa olevaan teorian tietoon ja sen ymmärtämiseen. Moni käytetyistä työvaiheista oli minulle tuttu aikaisemman koulutustaustani vuoksi, mutta mielestäni onnistuin kehittämään osaamistani myös niissä. Alkiodiagnostiikka ja siihen liittyvät terveydenhuollon osa-alueet vaikuttivat ennen työhön ryhtymistä mielenkiintoisilta, mutta onnistuivat osoittautumaan vielä moninkertaista mielenkiintoisemmiksi itse työskentelyn aikana. Pääsin tutustumaan Ovumiassa tehtävään monipuoliseen hoitotyöhön melko laajasti myös opinnäytetyöni aiheen ulkopuolelta. Keskustelut Ovumian työntekijöiden ja erityisesti ohjaajani Peterin kanssa olivat antoisia ja lisäsivät kiinnostusta aiheeseen entisestään. Mielestäni toimin työssäni kykyjeni mukaan tarkasti ja luotettavasti niin, että saamiini tuloksiin voidaan luottaa ja niitä voidaan käyttää pohjana jatkotutkimukselle. Omasta kiinnostuksestani johtuen tein tavanomaista pidemmän käytännön jakson ja se kannatti, vaikkakin aika jäi edelleen hyvin lyhyeksi tieteellisen tutkimuksen aikajanalla. Työlle saatiin kuitenkin lopputulos annetuissa aikarajoissa ja raportointi suoritettiin kohtuullisessa ajassa, joten työhön voidaan olla tyytyväisiä.

LÄHTEET

Altarescu G, Zeevi DA, Zeligson S, Perlberg S, Eldar-Geva T, Margalioth EJ, Levy-Lahad E & Renbaum P. 2013. Familial haplotyping and embryo analysis for Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) using DNA microarrays: a proof of principle study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 30 (12), 1595-1603.

Bredbacka P. 2016. Suullinen tiedonanto.

Brown RB & Audet J. 2008. Current techniques for single-cell lysis. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 5 Suppl 2, S131-8.

Butcher S, Hainaut P & Milner J. 1994. Increased salt concentration reversibly destabilizes p53 quaternary structure and sequence-specific DNA binding. *Biochemical Journal* 298 (3), 513.

Daniels G, Pettigrew R, Thornhill A, Abbs S, Lashwood A, O'Mahony F, Mathew C, Handyside A & Braude P. 2001. Six unaffected livebirths following preimplantation diagnosis for spinal muscular atrophy. *Molecular Human Reproduction* 7 (10), 995-1000.

D'Aquino M, D'Aquino M & Stallone V. 2013. *Sex chromosomes : new research*. Nova Science Publishers. New York.

Eftedal I, Schwartz M, Bendtsen H, Andersen AN & Ziebe S. 2001. Single intragenic microsatellite preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis provides positive allele identification of all CFTR genotypes for informative couples. *Molecular Human Reproduction* 7 (3), 307-312.

El-Hashemite N & Delhanty JD. 1997. A technique for eliminating allele specific amplification failure during DNA amplification of heterozygous cells for preimplantation diagnosis. *Molecular Human Reproduction* 3 (11), 975-978.

Findlay I. 2000. Pre-implantation genetic diagnosis. *British Medical Bulletin* 56 (3), 672-690.

Gitlin SA, Lanzendorf SE & Gibbons WE. 1996. Polymerase chain reaction amplification specificity: incidence of allele dropout using different DNA preparation methods for heterozygous single cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 13 (2), 107-111.

Greer S & Zamenhof S. 1962. Studies on depurination of DNA by heat. *Journal of Molecular Biology* 4 (3), 123-141.

Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K & Winston RM. 1990. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344 (6268), 768-770.

Harper JC. 2012. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011. *Human Genetics* 131 (2), 175.

- Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, Moutou C, SenGupta S, Traeger-Synodinos J, Harper JC & European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium. 2011. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Human Reproduction (Oxford, England)* 26 (1), 33-40.
- Hebert PD, Remigio EA, Colbourne JK, Taylor DJ & Wilson CC. 2002. Accelerated molecular evolution in halophilic crustaceans. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 56 (5), 909-926.
- Holding C, Bentley D, Roberts R, Bobrow M & Mathew C. 1993. Development and validation of laboratory procedures for preimplantation diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics* 30 (11), 903-909.
- Kim SA, Yoon JA, Kang MJ, Choi YM, Chae SJ & Moon SY. 2009. An efficient and reliable DNA extraction method for preimplantation genetic diagnosis: a comparison of allele drop out and amplification rates using different single cell lysis methods. *Fertility and Sterility* 92 (2), 814-818.
- Lindahl T & Nyberg B. 1972. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11 (19), 3610-3618.
- Maity A, Singh A & Singh N. 2016. Differential stability of DNA based on salt concentration. *European Biophysics Journal* .
- Marguet E & Forterre P. 1998. Protection of DNA by salts against thermodegradation at temperatures typical for hyperthermophiles. *Extremophiles : Life Under Extreme Conditions* 2 (2), 115-122.
- Marguet E & Forterre P. 1994. DNA stability at temperatures typical for hyperthermophiles. *Nucleic Acids Research* 22 (9), 1681-1686.
- Martinhago C, Vagnini L, Petersen C, Mauri A, Baruffi R, de Oliveira R & Franco J, Jr. 2010. Development of a real-time PCR method for rapid sexing of human preimplantation embryos. *Reproductive Biomedicine Online* 20 (1), 75-82.
- McDonald JH. 2009. *Handbook of biological statistics*. Sparky House Publishing Baltimore, MD.
- Michalska D, Jaguszewska K, Liss J, Kitowska K, Mirecka A & Å• ukaszuk K. 2013. Comparison of whole genome amplification and nested-PCR methods for preimplantation genetic diagnosis for BRCA1 gene mutation on unfertilized oocytes-a pilot study. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 11 (1), 1-9.
- MSD. 2014. *Hedelmöityshoidot*. Parempaa elämää.
- Piyamongkol W, Bermudez MG, Harper JC & Wells D. 2003. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Molecular Human Reproduction* 9 (7), 411-420.

Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS). 2008. Guidelines for good practice in PGD: programme requirements and laboratory quality assurance. *Reproductive Biomedicine Online* 16 (1), 134-147.

Ray PF & Handyside AH. 1996. Increasing the denaturation temperature during the first cycles of amplification reduces allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Molecular Human Reproduction* 2 (3), 213-218.

Ray PF, Winston RM & Handyside AH. 1996. Reduced allele dropout in single-cell analysis for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 13 (2), 104-106.

Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, Amet T, Ivakhnenko V, Kukharensko V, Kuliev A & Verlinsky Y. 1998. Allele dropout in polar bodies and blastomeres. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 15 (5), 253-257.

Robertson JM. 1998. An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 98, 121.

Sariola H, Frilander M, Heino T, Jernvall J, Partanen J, Sainio K, Salminen M, Thesleff I & Wartivaara K. 2015. *Kehitysbioologia [Online]. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 2015. (Luettu 24.11.2016) Saatavilla Internetissä (vaatii käyttäjätunnuksen) : www.op-piportti.fi/op/kbi00056. 2 Edition. Kuvan käyttöön myönnetty lupa.*

Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, Tutschek B & Adinolfi M. 1998. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Annals of Human Genetics* 62 (Pt 1), 9-23.

Sigma-Aldrich. 2016. *Analytical Enzymes: Proteinase K*.

Stevens AJ, Stuffrein-Roberts S, Cree SL, Gibb A, Miller AL, Doudney K, Aitchison A, Eccles MR, Joyce PR, Filichev VV & Kennedy MA. 2014. G-Quadruplex Structures and CpG Methylation Cause Drop-Out of the Maternal Allele in Polymerase Chain Reaction Amplification of the Imprinted *MEST* Gene Promoter. *PLoS ONE* 9 (12), e113955.

Thermo Scientific. 2012. *Product Information: GeneRuler 1 kb DNA Ladder #SM0311. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013004_GeneRuler_1kb_DNALadder_250ug_UG.pdf. 24.11.2016. Kuvan käyttöön myönnetty lupa.*

THL. 2016a. Hedelmöityshoidot 2014-2015, Tilastoraportti. 9.

THL. 2016b. *Seksuaali- ja lisääntymisterveys: Tahaton lapsettomuus. . <https://www.thl.fi/fi/web/seksuaali-ja-lisaantymisterveys/lapsettomuus/tahaton-lapsettomuus>. 30.10.2016.*

Thornhill AR, McGrath JA, Eady RAJ, Braude PR & Handyside AH. 2001. A comparison of different lysis buffers to assess allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Prenatal Diagnosis* 21 (6), 490-497.

Thornhill AR & Snow K. 2002. Molecular Diagnostics in Preimplantation Genetic Diagnosis. *The Journal of Molecular Diagnostics* 4 (1), 11-29. Kuvan käyttöön myönnetty lupa.

Vilkka H. 2007. *Tutki ja mittaa : määrällisen tutkimuksen perusteet*. Tammi. Helsinki.

Virtuaaliammattikoulu. 2007. *Tilastollisen analyysin periaatteet*. Virtuaaliammattikoulu. <http://www2.amk.fi/digma.fi/www.amk.fi/opintojak-sot/0709019/1193463890749/1193464131489/1194289328583/1194289853960.html>. 8.11.2016.

Wang C, Schroeder KB & Rosenberg NA. 2012. A maximum-likelihood method to correct for allelic dropout in microsatellite data with no replicate genotypes. *Genetics* 192 (2), 651-669. Kuvan käyttöön myönnetty lupa.

Wells D. 1998. Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. *Prenatal Diagnosis* 18 (13), 1389.

Ylikorkala O, Ylikorkala O & Tapanainen J. 2011. *Naistentaudit [online]*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 2011 (luettu 20.10.2016). Saatavilla Internetissä (vaatii käyttäjätunnuksen): www.oppiportti.fi/op/nsk001188. Kuvan käyttöön myönnetty lupa.

Zhu Y, Zhang YX, Liu WW, Ma Y, Fang Q & Yao B. 2015. Printing 2-dimensional droplet array for single-cell reverse transcription quantitative PCR assay with a microfluidic robot. *Scientific Reports* 5, 9551.