

Opinnäytetyö AMK

Bioanalytiikka

2019

Amanda Hynnä

MUNASARJASYÖPÄPOTILAIDEN TUOREKUDOSNÄYTTEIDEN SOPIVUUS MLPA-ANALYYSIIN

– perustuen geeneihin BRCA1 & BRCA2

Amanda Hynnä

MUNASARJASYÖPÄPOTILAIDEN TUOREKUDOSNÄYTTEIDEN SOPIVUUS MLPA- ANALYYSIIN

- perustuen geeneihin BRCA1 & BRCA2

Munasarja- ja rintasyöpä ovat kaksi yleisimpää syöpätapausta kaiken ikäisten naisten keskuudessa, minkä taustalla on mahdollisesti vaikuttavana tekijänä BRCA1 tai BRCA2-geenivirhe, eli mutaatio. Kasvunrajoittajageenit sijaitsevat 17. ja 13. kromosomissa, ja niiden tuottamat proteiinit osallistuvat DNA:n virheiden korjaukseen. On arvioitu, että 5-10 prosenttia munasarja- ja rintasyövästä johtuu perinnöllisestä alttiudesta. BRCA1-geenivirheen kantajalla on 25-50% riski sairastua munasarjasyöpään, kun taas BRCA2-geenivirheestä riski sairastua on 10-20%. Kun BRCA-geenimutaation kantajilla on 60-85%:n rintasyöpäriski.

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli selvittää, soveltuvatko tuorekudosnäytteet MLPA-analyysin, sillä tuorekudosnäytteet mahdollistavat laadukkaan kasvaingenomin analyysin. Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopistollisen keskussairaalan Lääketieteellisen genetiikan laboratoriolle. Opinnäytetyön tavoitteena oli tukea muita tutkimusmenetelmiä munasarja- ja rintasyöpägeenien havainnoimisessa ja laajentaa Lääketieteellisen genetiikan laboratorion tutkimusvalikoimaa ja parantaa potilaan hoidon tasoa.

Tutkimus toteutettiin keväällä 2019 Lääketieteellisen genetiikan laboratorion tiloissa. Yhteensä 45 valmiiksi eristettyä DNA-näytettä valittiin indikaation ja aikaisempien tutkimustulosten perusteella laboratorion näytevalikoimasta. Näytteet ovat vuodelta 2018, ja niille kaikille on aikaisemmin tehty uuden sukupolven sekvensointi. Uuden sukupolven sekvensoinnista saadut tuloksien analyysit oli jäänyt normaaleiksi, toisin sanoen pistemutaatiota ei ollut todettu. Valitut näytteet siis ovat lähtökohtaisesti sellaisia, joista voisi löytyä kopiolumuutos. Näytteille tehtiin kopiolumuutoksiin ja koettiin perustuva MLPA-tutkimus. MLPA-menetelmästä saadut tulokset analysoitiin SoftGenetics:n kehittämällä Genemarker-ohjelmalla.

Tulokset kertovat, että tuorekudosnäytteet teknisesti soveltuvat MLPA-analyysiin. Saatu positiivinen MLPA-tulos on kuitenkin aina varmistettava muulla menetelmällä. Näin ei ole mahdollista, että MLPA:lla yksinään pystyttäisiin vastaamaan syöpädiagnostiikasta.

ASIASANAT:

Munasarjasyöpä, Rintasyöpä, Geenivirhe, BRCA1, BRCA2, Tuorekudosnäyte, NGS, MLPA, PCR.

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical laboratory science

2019 | 39 pages, 3 pages in appendices

Amanda Hynnä

APPLICABILITY OF FRESH TISSUE SAMPLES FROM OVARIAN CANCER PATIENTS FOR MLPA-ANALYSIS

- based on the genes BRCA1 and BRCA2

Ovarian- and breast cancer are two of the most common cancer cases among women of all ages, due to a mutation in the BRCA1 or BRCA2 gene. The growth-limiting genes are located on chromosomes 17 and 13, and the proteins they produce are involved in repairing DNA aberrations. It is estimated that 5-10% of ovarian- and breastcancers are due to genetic propensity. The Carrier of BRCA1-gene mutation has 25-50% risk of developing ovarian cancer, whereas the carrier, who has BRCA2-gene mutation has a risk of 10-20%. While carrier of BRCA-gene mutation has 60-85% risk of developing breast cancer.

The purpose of this Thesis is to research suitability of fresh tissue samples in MLPA-analysis, because fresh tissue samples enable to quality analysis of tumorgenome`s. The Thesis is made for Finland`s Southwest Hospital Medical genetics laboratory. This Bachelor`s Thesis aims to contribute other researches of ovarian- and breast cancer genes observation and expand Medical genetics laboratory`s study selection and improve quality of patient care.

The research was carried out in the laboratory of the medical genetics department in spring 2019. Forty-five pre-extracted DNA-samples were selected by their indication and earlier research results from the laboratory`s sample archive. The samples were from year 2018 and had already been analyzed once using Next-Generation Sequencing. Analysis of results from Next-Generation Sequencing had remained normal, in the other words, no point mutation had been found. Thus, the selected samples are in principle, those that could have variations in the copy number. The samples were researched by MLPA-method, which is based on variations of copy number and probes. The results of the MLPA-method were analyzed using the Genemarker software developed by SoftGenetics.

The results show that fresh tissue samples are suitable in MLPA-analysis technically. However, the received positive MLPA-results always have to be verified by other research method. Therefore it`s not possible to use MLPA-method by itself for diagnose cancer.

KEYWORDS:

Ovarian cancer, Breast cancer, Genetic error, BRCA1, BRCA2, Fresh tissue sample, NGS, MLPA, PCR.

SISÄLTÖ

SANASTO	6
1 JOHDANTO	8
2 MUNASARJASYÖPÄ JA GEENIVIRHE, BRCA1 & BRCA2	10
2.1 Rintasyöpä	10
2.2 Tuorekudosnäyte	11
2.3 NGS	11
2.4 MLPA	12
2.5 PCR	15
2.6 Aikaisemmat tutkimukset	17
3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT	20
4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN KULKU JA TOTEUTUS	21
4.1 Tutkimusaineistot	21
4.2 Laitteet ja tilat	21
4.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat	22
5 MLPA-TUTKIMUSTEN SUORITUS	23
6 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	27
6.1 MLPA	27
6.1.1 Synteettinen kontrollinäyte	29
6.2 Lopputulos	34
7 POHDINTA	35
7.1 Tutkimuksen luotettavuus	35
7.2 Tutkimuksen eettisyys	36
7.3 Jatkotutkimusaiheet	36
LÄHTEET	37

LIITTEET

- Liite 1. MLPA-ajolista
- Liite 2. MLPA-näytelistä ja pipetointijärjestys sekvensointiin.
- Liite 3. Reagenssitaulukko

KUVAT

Kuva 1. MLPA:n kulku.	14
Kuva 2. Polymeraasiketjureaktio eli PCR	16
Kuva 3. BRCA1 AJO4 hahmotettuna PCR Platelle värikoodein.	26
Kuva 4 Kokostandarditaulukko BRCA1 AJO 4:stä	28
Kuva 5. MLPA-34, epäonnistunut näyte.	31
Kuva 6. BRCA1 AJO1 MLPA-13, normaali näyte.	32
Kuva 7. BRCA2 AJO5 MLPA-6, poikkeava näyte.	33

TAULUKOT

Taulukko 1. MLPA-tuloslista	29
-----------------------------	----

SANASTO

amplifikaatio	Kohdennetun DNA-sekvenssin monistaminen PCR:ssä
annealing	Lämpötilaa lasketaan, jotta DNA-alukkeet voisivat kiinnittyä templaatti-DNA:han. PCR-menetelmän toinen vaihe.
deleetio	Kromosomin osan häviämä, jonka seurauksena osa perintöaineksestä, eli geeneistä häviää, mikä aiheuttaa kehityshäiriötä.
denaturaatio	Kun kaksijuosteista DNA:ta kuumennetaan sen erottamiseksi kahden yksittäiseen juosteeseen; PCR:n ensimmäinen vaihe.
DNA	Deoksiribonukleiinihappo, joka sisältää kaikkien eliöiden solujen ja joidenkin virusten geneettisen (20 000-25 000 geeniä) materiaalin.
duplikaatio	Jonkin kromosomin osasen ylimäärä tai esimerkiksi kahdentuma
eksoni	Proteiinia koodaava osa geenin rakenteessa
ekstensio	PCR-menetelmän kolmas vaihe, jossa valmistetaan uutta DNA-juostetta, muun muassa lämpötilaa nostattaessa.
fragmentti	Isoja sekvenssi-jaksoja
geeni	Perinnöllistä ominaisuutta ohjaava DNA-jakso, joka sisältää tiedon valkuaisaineen tai RNA-molekyylin valmistamiseksi
geenivirhe	Mutaatio. Useimmiten kyse on peittyvästi periytyvästä sairaudesta. Jos molemmat vastingeenit ovat virheellisiä, seurauksena on sairaus.
genomi	Geeniperimä, joka on koodattu DNA:han.
hybridisaatio	MLPA-menetelmän toinen vaihe
insertio	Liittymä
koetinseos	Probemix. Sisältää jopa 60 erilaista MLPA-koetinta, jokainen kohdistuen tiettyyn DNA-sekvenssiin

ligaatio	MLPA-menetelmän kolmas vaihe, joka suoritetaan yli 16h kestäväen hybridisaation jälkeen; DNA-juosteiden yhteen sitominen päistään kovalenttisella sidoksella
loppuelongaatio	Ekstensio-vaiheen viimeistely.
nukleotidi	DNA:n ja RNA:n rakenneyksikkö, johon kuuluu kolme osaa; emäs, sokeriosa, jotka yhdessä muodostavat nukleosidin, ja fosfaatti
oligonukleotidi	koostuvat yleensä 13-25 nukleotidistä ja ne on suunniteltu hybridisoi-tumaan spesifisesti DNA- tai RNA-sekvensseihin. Sana lähtöisin Krei-kasta, oligo tarkoittaa harvaa / pientä.
pooli	kahdesta tai useammasta eri potilaasta/lähteestä peräisin olevat DNA-näytteet yhdistetään analyysiä varten
sekvenssi	Emästen järjestys DNA:ssa
sekvensointi	Menetelmä muun muassa DNA:n nukleotidijärjestyksen selvittämiseksi
syntetisoida	Yhdistää, yhdistellä
Taq DNA-polymeraasi	Entsyymi, joka on otettu lämpöä kestävästä (yli 80°C) bakteerista <i>Thermus aquaticus</i> ; hyödynnetään lämmönsietokyvynsä vuoksi PCR-menetelmän kolmannessa vaiheessa, ekstensiossa

1 JOHDANTO

Munasarjasyöpä on tappavin, usein uusiutuva gynekologinen syöpä, jonka taustalla on mahdollisesti BRCA1 tai BRCA2-geenivirhe, eli mutaatio. BRCA1 ja BRCA2 ovat kasvunrajoitegeenejä, joiden tuottamat proteiinit osallistuvat DNA:n virheiden korjaukseen. Nämä molemmat geenit ovat mahdollisia vaikuttavia tekijöitä sekä munasarja-, että rintasyövän kehityksessä. On arvioitu, että 5-10 prosenttia munasarja- ja rintasyövistä johdetaan perinnöllisestä alttiudesta (Suomen Gynekologiyhdistys, 2001). Suomen Syöpärekisterin vuoden 2017 tilastojen mukaan munasarjasyöpä oli 8. yleisin syöpä naisilla, kun taas rintasyöpä oli yleisin 20-69-vuotiaiden naisten keskuudessa. 70 vuotta täyttäneiden naisten syöpäilmaantuvuus ja -kuolleisuus tilastossa munasarjasyöpä oli listalla 10., kuitenkin syöpäkuolemia oli lähes yhtä paljon kuin uusia tapauksia on löydetty. (Syöpärekisteri, 2017.) Vaikka munasarjasyöpä ei ole tilastojen kärkipäässä, on munasarjasyövän eloonjäämisaste paljon alhaisempi kuin muiden naisiin kohdistuvien syöpien. Diagnoosivaiheesta riippuen viiden vuoden eloonjäämisaste on noin 40-50 prosenttia. (OCRA, 2019.)

BRCA1- ja BRCA2-geenien mutaatioita on raportoitu yli 2000 erilaista mutaatiota, mukaan lukien deleetit, insertiot ja monet yksittäisten nukleotidisubstituutoiden koodaavat tai ei-koodaavat sekvenssit (Karami, 2013). Pienet mutaatiot saadaan kiinni NGS-menetelmällä, mutta isoihin mutaatioihin tarvitaan MLPA:ta.

Tämän opinnäytetyön tarkoitus on selvittää, soveltuvatko tuorekudosnäytteet MLPA-analyysiin. Tämän opinnäytetyön aihe on saatu Tyksin Lääketieteellisen genetiikan laboratorion osastolta. Tällä hetkellä Lääketieteellisen genetiikan laboratorion osastolla käytetään menetelmänä NGS-sekvensointia, joka perustuu rinnakkaissekvensointiin Illuminan laitteilla, jossa moninkertaistetaan jopa miljoonia lyhyitä DNA-fragmenteja samanaikaisesti (UEF, 2018). NGS:n avulla tutkitaan muun muassa genomien virheitä, variaatioita ja geenien ilmentymisen muutoksia, esimerkiksi pistemutaatioita (Siltanen, 2018). Kyseisellä menetelmällä saatujen tuloksien analyysi on jäänyt normaaliksi, toisin sanoen pistemutaatiota ei ollut todettu. Valitut näytteet siis lähtökohtaisesti ovat sellaisia, että niistä voisi löytyä kopioluminenssi, joka pystytään havaitsemaan MLPA-menetelmällä. Näyttemuotona menetelmään on käytetty tuorekudosnäytettä, josta on tehty DNA-eristys fenoli-kloroformiuutoksella.

Opinnäytetyö on ajankohtainen, sillä geenimutaatiolöydökset ovat tärkeitä syövän varhaisdiagnostiikassa ja ehkäisyssä.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on tukea muita tutkimusmenetelmiä ovario- ja rintasyöpägeenien havainnoimisessa ja laajentaa Lääketieteellisen genetiikan laboratorion tutkimusvalikoimaa.

2 MUNASARJASYÖPÄ JA GEENIVIRHE, BRCA1 & BRCA2

Munasarjasyöpätyyppejä on useita erilaisia, jaoteltuina niiden solutyypin ja kudoksen sijainnin mukaan (Target Ovarian Cancer, 2014). Yleisin munasarjasyövän tyyppi on HGSO (High-Grade Serous Ovarian Cancer) (National Academies Press, 2016). Munasarjasyöpä voi kehittyä kaiken ikäisille naisille, yleisimmin se diagnosoidaan vaihdevuosien jälkeen. Diagnostiikka tapahtuu yleensä vasta pitkälle edenneessä vaiheessa yli 75%:lla sairastavilta naisilta, sillä varhaisen vaiheen sairaudet ovat yleensä oireettomia ja myöhäisen vaiheen oireet epäspesifisiä. (Chyke ym. 2016). Munasarjasyövä ja kasvaimet kehittyvät yleensä kolmesta kudoksesta: noin 90 prosenttia kehittyi munasarjat peittävän pintakerroksen epiteelisoluista. Epiteelisolukasvainten esiintyvyys on yleisintä yli 50-vuotiailla naisilla. Noin viisi prosenttia kehittyi munasarjojen ytimen muodostavista stromaalisoluista. Tiedetyt stromaalisolukasvaimet ovat yleisempiä murrosikäisillä naisilla, vaikkakin tuumoreita voi esiintyä kaiken ikäisillä naisilla. Loput viisi prosenttia kehittyvät itusoluista. Sukusolukasvaimet esiintyvät yleisemmin nuoremmilla naisilla. (Target Ovarian Cancer, 2014.)

BRCA1- ja BRCA2-geenien sukuanamneesi tiedetään olevan yksi munasarjasyövän suurimmista riskitekijöistä (Amos ja Struwing 1993). BRCA1-geenivirheen kantajalla on 25-50% riski sairastua munasarjasyöpään, kun taas BRCA2-geenivirheestä riski sairastua on 10-20% (Suvisaari, 2019). Kasvunrajoittajageenit sijaitsevat 17. ja 13. kromosomeissa. BRCA1 koostuu 24 eksonista ja koodittaa 1 863 aminohapon suuruista proteiinia, kun taas BRCA2 koostuu 27 eksonista ja koodittaa 3 418 aminohapon proteiinia. (Miki ym. 1994, Tavtigian ym. 1996.) BRCA1 ja BRCA2 tuottamat proteiinit osallistuvat DNA:n virheiden korjaukseen.

2.1 Rintasyöpä

Suomessa rintasyöpä naisten keskuudessa on yleisin, sillä siihen sairastuu jo yli 5000 naista vuodessa. Tapausmäärä on kasvanut tasaisesti 2,5 prosenttia vuodessa vuodesta 2000 alkaen. Suomen Syöpärekisterin ennusteiden mukaan vuonna 2030 todetaan uusia syöpätapauksia koko maassa yhteensä noin 43 000, joista arviolta 23 000 miehillä ja 20 000 naisilla. Noin puolella yli 60-vuotiailla naisilla löydetään rintasyöpä, 25-

49 vuotiailta noin neljännekseltä, ja toinen neljännes 50-59-vuotiailta. On arvioitu, että 5-10 prosenttia rintasyövistä johtuu perinnöllisestä alttiudesta. (Syöpäjärjestöt, 2016.) Noin joka kahdeksannelle kehittyy rintasyöpä ennen 85 vuoden ikää. Kuitenkin keskimäärin 20% rintasyöpätapauksista Euroopassa tapahtuu alle 50-vuotiailla naisilla; 36% esiintyy 50-64 vuotiaina, ja loput tapaukset yli mainitun iän. (Ferlay J, ym. 2018.) BRCA-geeni-mutaation kantajilla on 60-85%:n rintasyöpäriski. Geenimutaation kantajien keski-ikä diagnoosihetkellä on 20 vuotta alhaisempi kuin niillä, joilla mutaatiota ei ole. (Heikkilä, 2013.)

2.2 Tuorekudosnäyte

DNA-tutkimuksia pystytään periaatteessa tekemään mistä tahansa terveestä- tai kasvainkudoksesta, jossa esiintyy tumallisia soluja (VSSH, 2019). Tuorekudosnäytteet mahdollistavat tietyt erikoistutkimukset, jotka eivät formaliiniin fiksoidusta materiaalista enää onnistu. Erikoistutkimuksiin kuuluu muun muassa sytogeneetti-set ja molekyyli-patologiset tutkimukset. Estääkseen tuoreenäytteen mahdollisen kuivumisen, näyte kääritään keittosuolalla kostutettuun liinaan. (Ari Ristimäki ym. 2013.) MLPA-menetelmään tuorekudosnäyte on sopiva BRCA1- ja BRCA2-geenien diagnostiikassa niihin sopivien koetinseosten ansiosta (MRC Holland, 2019). Lääketieteellisen Genetiikan laboratorioon saapuneet tuorekudosnäytteet DNA-eristetään heti fenoli-kloroformiuutoksella tai pakastetaan -80°C. Kiinteä kudos pilkotaan suspensioksi tai mahdollisimman pieniksi kudospaloiksi, joista solut hajotetaan puskuriliuoksessa SDS-käsittelyllä ja proteiinit pilkotaan proteinaasi K-entsyymikäsittelyllä. Lopussa DNA puhdistetaan fenoli- ja kloroformiuutoksilla ja saostetaan etanolilla. (J. Sambrook ym. 1987.)

2.3 NGS

Next Generation Sequencing on perimän (DNA:n tai RNA:n) emäsjärjestyksen sekvensointiin (DNA:n nukleotidijärjestyksen selvittäminen) kehitetty menetelmä, joka soveltuu muun muassa yhden nukleotidin muutosten sekä lyhyiden insertioiden ja deleetioiden analysoimiseen. (UEF, 2018.) NGS:ää lisäksi voidaan käyttää sekvensoimaan kokonaisia genomeja tai vain tietyille alueille, mukaan lukien kaikki 22 000 koodaavaa geeniä (kokonainen eksomi) tai pieni määrä yksittäisiä geenejä (Behjati, 2013).

NGS-sekvensointi tarjoaa paljon herkemman lukeman, minkä vuoksi sitä voidaan käyttää tunnistamaan muutokset, jotka sijaitsevat vain muutamassa prosentissa soluista, mukaan lukien mosaiikkivariaatio. Lisäksi NGS-sekvensoinnin herkkyyttä voidaan lisätä edelleen yksinkertaisesti lisäämällä sekvensointisyvyyttä. Tämän vuoksi NGS:ää on käytetty erittäin herkissä tutkimuksissa, kuten sikiön DNA:n tutkimisessa äidin verestä (Harris, 2013), tai kasvainsolujen tason seuraamista syöpäpotilaista (Dawson, 2013).

NGS:n menetelmiä on muun muassa 5 erilaista, mutta kaikilla niillä on yhteisenä ominaisuutena DNA:n toisen juosteen muodostumisen reaaliaikainen analysointi ja massiivisten rinnakkaisten sekvensointireaktioiden suorittaminen. Lisäksi näitä menetelmiä käytettäessä ei välttämättä tarvitse entuudestaan tietää sekvensoitavan alueen sekvenssiä, mikä helpottaa uusien tuntemattomien monimuotoisuuksien etsimistä. Kuitenkin epätie-toisuus näiden tuntemattomien varianttien perinnöllisestä vaikutuksesta voi aiheuttaa ongelmia ennustaessa niiden vaikutusta tulevaisuudessa. (ten Bosch, 2008.)

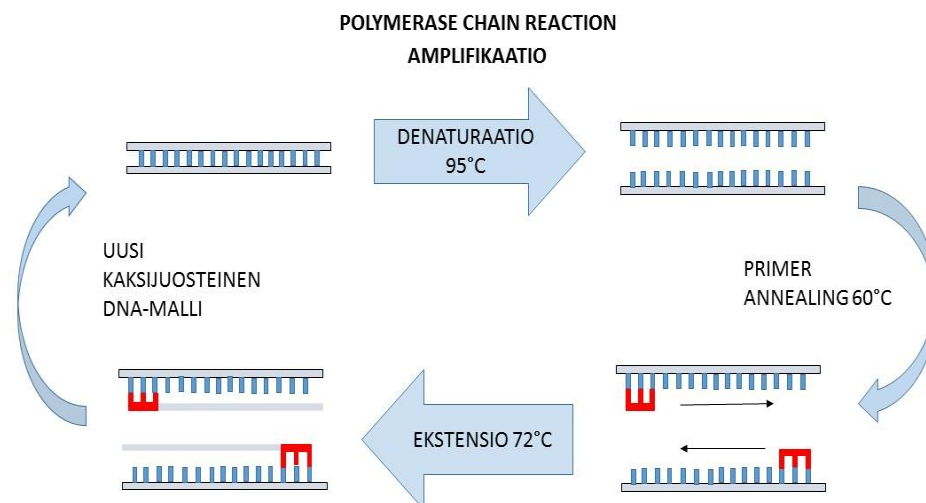
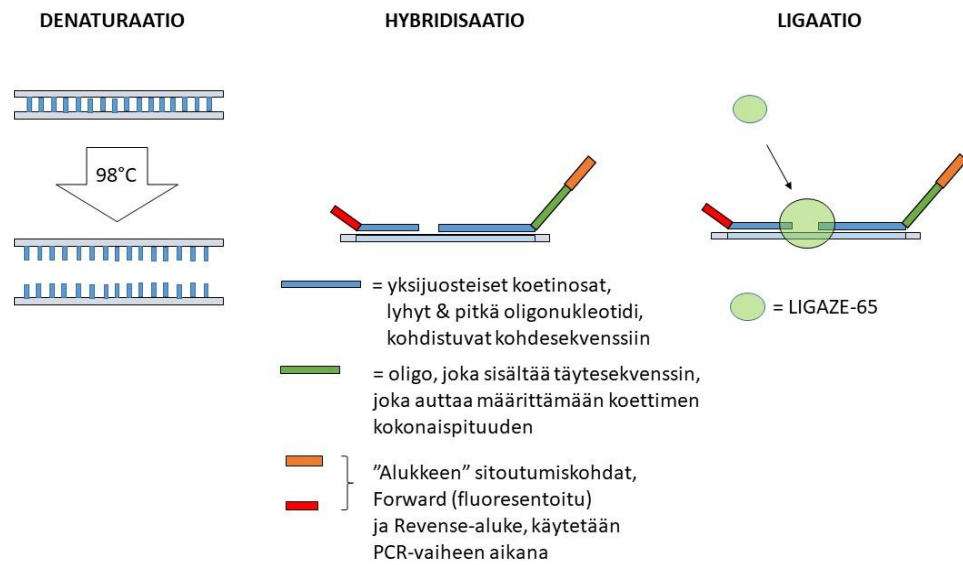
Prosessissa DNA-näytteestä valmistetaan ns. kirjasto, jonka tarkoituksena on muodostaa sekvensoitavien fragmenttien pooli erilaisten entsyymaattisten reaktioiden avulla (Siltanen, 2018). Lääketieteellisen Genetiikan osastolla NGS-menetelmässä on käytetty BRCA MASTR Plus Dx kittiä (Multiplicom). Kirjastot sekvensoitiin NextSeq-sekvenssaattorilla (Illumina) käyttäen 2x150 bp paired-end sekvensointitekniikkaa. Käsittelyihin kuuluu muun muassa kohdealueiden monistus, merkintä tunnistesekvensseillä (indexit) sekä universaalialukkeiden tunnistuskohtien kiinnitys (SOP-DNA-161, 2016).

2.4 MLPA

MLPA (Multiplex Ligaton-dependant Probe Amplification) on alankomaalaisen MRC Hollandin kehittämä, yksinkertainen, viisivaiheinen, PCR-pohjainen menetelmä, millä pystytään osoittamaan variaatiot useiden ihmisen geenien kopiolumäärässä. Molekyylidiagnostiikassa MLPA:ta voidaan tämän kyvyn vuoksi käyttää useiden geneettisten sairauksien määrittämiseen, esimerkiksi patogeneettiset variantit, joihin liittyvät tiettyjen geenien deleetit tai duplikaatiot. (Stuppia ym, 2012.) MLPA eroaa muista markkinoilla olevista menetelmistä sillä, menetelmä perustuu koettimiin, jotka hybridisoituvat tutkittaviin DNA-alueisiin. MLPA-koettimet ligoidaan kiinni toisiinsa, jonka jälkeen koetinparit monistetaan PCR-reaktiolla. PCR:ssä monistuvat vain ne koettimet, jotka ovat ligoituneet. Fragmentit erotellaan kokonsa perusteella kapillaarielektroforeesissa, ja kopiolumun

määritys tehdään vertaamalla tutkittavan näytteen fragmenttien pinta-aloja tunnettuihin kontrollinäytteisiin. (MRC Holland, 2019.)

MLPA:n viisivaiheiseen menetelmää varten tarvitaan lähtö-DNA ja koetinseos, johon on kiinnitetty fluoresoiva merkkiaine tulosten analysointia varten. Fluoresoiva merkkiaine on tässä tapauksessa kuvattu oranssina värinä. Ensimmäisen vaiheen aikana laimennettu DNA-näyte denaturoidaan n. 98°C lämpötilassa, jonka jälkeen pipetoidaan 3 µl koetinseosta denaturoidun lähtö-DNA:n päälle, jonka jälkeen koettimet hybridisoituvat yön yli tutkittavaan DNA:han. Seuraavana päivänä tapahtuvassa toisessa vaiheessa, eli ligaatiossa koettimet kiinnittyvät toisiinsa. Ligoitumattomien koettimien poistaminen on tarpeetonta MLPA:ssa, sillä niitä ei voida vahvistaa esponentiaalisesti, eivätkä ne tuota täten signaalia. Kolmannessa vaiheessa, PCR-reaktiossa kopioituvat kokonaiset, ligoituneet koettimet. Lopuksi ennen data-analyysiä PCR-reaktiossa tuotetut monistustuotteet erotetaan kapillaarielektroforeesilla. Data-analyysi tehdään perustuen kopioituneisiin koettimiin, ja sekvensaattori lukee tulokset fluoresoivan merkkiaineen avulla. (MRCHolland,2019.)



Kuva 1. MLPA:n kulku.

MLPA:n avulla pystytään saamaan yhdessä reaktiossa maksimissaan 96 näytteen tulokset 24 tunnin sisällä. Menetelmä on yksinkertainen ja yhtä reaktiota kohti halpa. MLPA pienin tarvittava näytemäärä on vain 50ng, mutta menetelmä on hyvin herkkä mahdolliselle kontaminaatiolle, jonka vuoksi DNA:n puhtauteen tulee kiinnittää erityisesti huomiota. MLPA:n esimerkki etuna on muun muassa se, että se tunnistaa usein esiintyvät,

yhden geenin poikkeamat kohdentamalla (n. 50 – 70nukleotidia) sekvenssejä, jotka ovat muun muassa FISH-menetelmälle (fluorescent in situ hybridization) liian pieniä havaittavaksi. (MRC Holland, 2019.) Vastaavasti MLPA:ta ei FISH-menetelmän tavoin pysty vielä toistaiseksi käyttämään yksittäisten solujen tutkimiseen, eikä koko genomien sekvensointiin. MLPA:lla ei myöskään pysty tunnistamaan tuntemattomia pistemutaatioita. Soluseoksista saatujen DNA-näytteiden MLPA-analyysi antaa keskimääräisen kopiokulumäärän solua kohden.

Suurimmassa osassa geeneihin vaikuttavia ituradan mutaatioita edustavat pistemutaatiot, kuitenkin tutkimukset ovat osoittaneet, että geenin deleetioita tai duplikaatioita voidaan havaita osassa tapauksista, jotka ovat negatiivisia pistemutaatioiden seulonnalle. Useat tutkimukset ovat lisäksi osoittaneet juuri geenin kopiokulumuunnoksilla olevan merkitys monimutkaisten sairauksien synnyssä, ja että tietyt kopiokulumuutokset ovat oletettuja yleisempiä, mikä tulevaisuudessa lisää mahdollisesti MLPA:n käyttöä suurien kopiokulujen määrittämisessä.

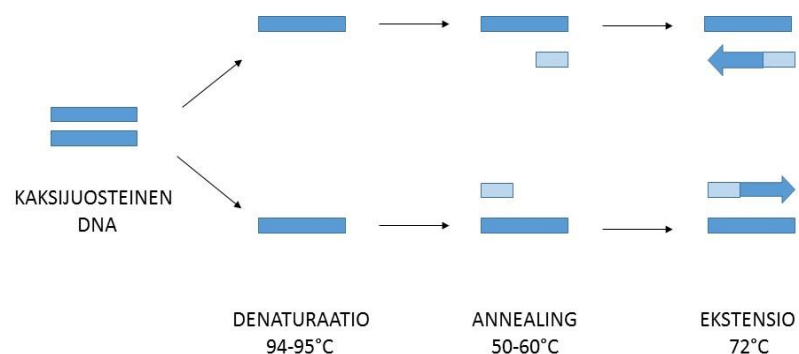
Tutkimuksen tulosten tulkintaa tulee hankaloittamaan muun muassa se, että tuumorianalyyseissä on vaikea havaita tietyn geenin deleetiota, jos näyte, josta DNA on eristetty, sisältää alle 50 % syöpäsoluja. Lisäksi mosaiikkisuuden esiintyminen saattaa jäädä huomaamatta, koska normaalien solujen läsnäolo voi peittää epänormaalien solujen läsnäolon. MLPA ei myöskään pysty havaitsemaan tasapainoisia uudelleenjärjestelyjä, koska menetelmä perustuu potilaan DNA:n määrien vertaamiseen kontrolliin ja tasapainoiset uudelleenjärjestelyt tuottavat muutoksen DNA-sekvenssien järjestyksessä, mutta eivät DNA-määrissä. (Stuppia ym. 2012.)

2.5 PCR

Polymerase Chain Reaction, eli polymeraasiketjureaktio, jonka on kehittänyt amerikkalainen biokemisti Kary Mullis vuonna 1983, mistä myöhemmin hän sai Nobelin kemianpalkinnon vuonna 1993 (TheScientist, 2019). Polymeraasientsyymien avulla voidaan monistaa tietystä Dna-osasta monta identtistä kopiota. Reaktio toistetaan monta kertaa peräkkäin kokeen aikana, ja jokaisen toiston jälkeen DNA-määrä kaksinkertaistuu. (Helena Salo, 1997.)

Toimiakseen PCR-reaktioon tarvitaan monistettavan DNA:n, alukkeet, DNA-polymeeraasientsyymi, deoksinukleotidejä eli dNTP:tä, steriloitua vettä, puskuriliuoksen ja ioneja. Reaktio tapahtuu pienessä tilavuudessa, joko steriilissä koeputkessa tai PCR-Platessa, PCR-laitteessa, joka nostaa ja laskee lämpötilaa halutun sarjan mukaisesti. (Solunetti, 2006.)

Useimmiten PCR:ssä on 20-40 kolmivaiheista sykliä, ensimmäisenä vaiheena, 15-30 sekunnin kestävässä denaturaatiossa reaktioseoksen lämpötilaa nostetaan korkealle (n. 94-95°C), jotta DNA-juosteet irtoavat toisistaan. Näin syntyy kaksi yksittäistä DNA-juostetta, jotka toimivat mallina uusien DNA-juosteiden tuottamiseksi. Toisessa vaiheessa (annealing) lämpötilaa lasketaan 50-65°C, mikä mahdollistaa alukkeiden kiinnittymisen yksijuosteisiin templaatti-DNA:hin. Vaihe kestää yleensä noin 10-30 sekuntia. Kolmannessa vaiheessa lämpötilaa taas nostetaan optimaaliseen lämpötilaan 72°C:een, jolloin Taq DNA-polymeeraasientsyymi syntetisoi yksijuosteisesta DNA:sta kaksijuosteista DNA:ta lisäämällä DNA-emäksiä yksi kerrallaan. (Yourgenome, 2016.)



Kuva 2. Polymeeraasiketjureaktio eli PCR

2.6 Aikaisemmat tutkimukset

Vehmanen ym. (1997) tutkivat Helsingin yliopistollisessa sairaalassa 100 rintasyöpäperhetapausta ja seuloivat solujen mutaatioita BRCA2-geenin koodausalueilta. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää BRCA2-geenimutaation osuutta suomalaisten rintasyöpäperhetapauksissa.

Tutkimuksen aikana löydettiin 8 perhettä sadasta (8%), jotka kantoivat 5 erilaista mutaatiota. Kaikissa viidessä mutaatiossa oli ennusteena ennenaikainen proteiinin tuotannon vähentyminen ja rintasyövän ennenaikainen puhkeaminen (keskiarvo 49-vuotiaana). Munasarjasyöpää ilmeni neljästä kahdeksaan tapauksesta, mutta miesten rintasyöpää ei ilmentynyt.

Miki Y, Swensen J ym. (1994) tutkivat kromosomi 17q ja BRCA1-geenin yhteyttä kloonauksen menetelmällä, samalla tutkien BRCA1-geenimutaation vaikutusta rinta- ja munasarjasyöpään. BRCA1-geeni ilmentyi lukuisissa kudoksissa, mukaan lukien rinta ja munasarjat. Tutkimuksessa ilmeni BRCA1:n tunnistamisen helpottavan rinta- ja munasarjasyövän herkkyyden varhaisissa diagnooseissa joillakin yksilöillä, mikä saa ymmärtämään paremmin rintasyövän biologiaa.

Vuonna 2008 Afrikassa oli 68 000 uutta rintasyöpä-tapausta, joista 37 000 dokumentoitiin kuolemantapaukseksi. Maailman terveysjärjestö (WHO) arvioi vuonna 2010, että Afrikassa olisi 97 733 uutta rintasyöpätapausta, joiden arvioitu kuolleisuus on 52 855. Noin 5% rintasyöpää sairastavista potilaista on havaittu perinnöllinen mutaatio, muun muassa BRCA1-geenin mutaatio.

Lawal AbdulRazzaq Oluwagbemiga ym. (2012) määrittivät BRCA1- ja BRCA2-geenimutaatioiden roolin afrikkalaisilla rintasyöpäpotilailla käyttäen PUBMED- ja AJOL-tietokantaa. He löysivät 16 tutkimusta, jotka täyttivät tutkimukseen vaaditut kriteerit. Tutkimukset olivat Pohjois-Afrikasta ja Saharan eteläpuolisesta Afrikasta.

Yhteensä 9 tutkimuksesta käsiteltiin 752 potilasta Saharan eteläpuolisella Afrikassa. Kolmessa tutkimuksessa, jossa käsiteltiin 144 potilasta, tutkittiin sekä BRCA1 että BRCA2 koodaavat alueet, kun taas kahdesta tutkimuksessa arvioitiin BRCA1:n ja

BRCA2:n tiettyjä osia 571 potilaasta. Pohjois-Afrikan rintasyöpäpotilain pohjautuneista tutkimuksista 4 tutkimusta käsittelivät BRCA1- ja BRCA2-geenien kokonaismäärää 219 potilaasta, kun taas pari tutkimusta käsitteli osia BRCA1- ja BRCA2-geeneistä.

Lawal AbdulRazzaq Oluwagbemiga ym. tietokantatutkimuksesta selvisi, että huolimatta rintasyövän esiintymisestä afrikkalaisilla potilailla ja rintasyövän geneettisten mutaatioiden yhdistämisestä nuorilla naisilla on tehty määrää kohden vähän tutkimuksia pienellä ajankohdalla, joista pystyisi arvioimaan kunnolla syövän geneettistä perustaa. Kyseisestä tutkimuksesta selvisi, että olisi tarve suorittaa hyvä väestön seulonta mutaatioiden selvitykseksi.

Sarantaus L, ym. (2002) tutkivat muun muassa Suomessa BRCA1- ja BRCA2-geenien perustajamutaatioiden esiintyvyyttä tutkimalla kyseisten geenien läheisyydessä olevien geenimerkkien periytymistä munasarja- ja rintasyöpäsuvuissa. Samalla he tutkivat BRCA1- ja BRCA2-geenimutaatioiden yleisyyttä suomalaisilta munasarjasyöpäpotilailta, joilla oli suvussa vähintään kaksi munasarjasyöpään sairastunutta lähisukulaista.

Tutkimuksessa muun muassa havaittiin samanlainen geenimerkkien yhdistelmä molempien geenien ympärillä kaikilla mutaation kantajilla, mikä viittaisi yhteiseen esivanhempaan, josta mutaatio on periytynyt. Samalla havaittiin maantieteellinen samankaltaisuus saman perustajamutaatiota kantavilla suvuilla. Lisäksi tutkimuksen aikana löydettiin BRCA1-geenimutaation noin 5%:sta ja BRCA2-geenimutaation 1%:sta. Mutaatio havaittiin kaikissa suvuissa, mitä useampi lähisukulainen oli sairastunut munasarjasyöpään, tai mitä nuorempana syöpätapaus oli diagnosoitu.

Zhang, Royer ym. (2011) tutkivat muun muassa MLPA-menetelmällä BRCA1- ja BRCA2-geenimutaatioiden esiintyvyyttä 1342 potilaalta, joilta oli diagnosoitu invasiivinen munasarjasyöpä vuosilta 1995-1999 ja 2002-2004. Tarkoituksena oli ollut saada tarkka arvio mutaation kantajista munasarjasyöpäpotilaiden osuudesta. 1342 potilaasta 176 naisella oli mutaatio. Osuudesta 107 naisella mutaatio oli BRCA1-geenissä, 67 BRCA2:ssa, ja kahdella naisella oli molemmissa geeneissä. MLPA-menetelmällä tunnistettiin seitsemän deleetiota. Mutaatioiden esiintyvyys oli korkea naisilla, joille oli diagnosoitu sairaus jo 40-vuotiaina. Esiintyvyys korostui myös tiettyjen kansojen välillä. Muun muassa italialaisilla naisilla mutaatioiden esiintyvyys oli 43,5%. Periytynyt mutaatio havaittiin 33,9%:lla naisista, joilla oli ensimmäisen asteen sukulainen rinta- tai munasarjasyövän kanssa. Arvo

laski 7,9%:n naisilla, joilla ei ollut ensimmäisen asteen sukulaista, joilla olisi ollut rintatai munasarjasyöpä.

Zhang, Royer ym. tutkimuksesta selvisi, että naisilla, joilla on invasiivinen munasarjasyöpä, on BRCA1- ja BRCA2-geenin mutaatiot yleisiä. Suositeltavaa olisi, että kaikilla joilla on diagnosoitu kyseinen sairaus, tulisi käydä geenitesteillä.

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoitus on selvittää, soveltuvatko tuorekudosnäytteet MLPA-analyysiin, sillä tuorekudosnäytteet mahdollistavat laadukkaan kasvaingenomin analyysin. Tutkimusaineistona käytetään Lääketieteellisen genetiikan laboratorion näytemateriaalista 45 valmiiksi DNA-eristettyä potilasnäytettä ja kontrolleina toimivat standardinmukaiset kontrollit, näytteistä valitut sisäiset kontrollit ja patologian osastolta saatu tuorekudosnäyte suolen epiteelistä, jonka kopioluku on normaali. Kaikki näytteet ja kontrollit ovat DNA-eristetty samalla menetelmällä, koska ne ovat silloin vertailukelpoisia keskenään. Ajojen tuloksia verrataan aiempiin NGS-menetelmällä saatuihin tuloksiin. Jos tulokset todetaan kelvollisiksi, menetelmä validoidaan laboratorion käyttöön.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on tukea muita tutkimusmenetelmiä munasarja- ja rintasyöpägeenien havainnoimisessa ja laajentaa Lääketieteellisen genetiikan laboratorion tutkimusvalikoimaa ja parantaa potilaan hoidon tasoa.

Tämä opinnäytetyö on luonteeltaan kvantitatiivinen, eli määrällinen tutkimus. Määrällinen tutkimus on numeerisiin arvoihin perustuvaa ilmiön selittämistä, kuvaamista ja tulkitsemistä (Jyväskylän yliopisto, 2017). Opinnäytetyössä käsitellään kahden eri menetelmän tuloksia vertailemalla tuloksista saatuihin numeerisiin arvoihin.

Tämän opinnäytetyön tutkimuskysymyksenä on *Ovatko tuorekudosnäytteet soveltuvia analysoitavaksi MLPA-menetelmällä?*

4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN KULKU JA TOTEUTUS

Opinnäytetyön aihe saatiin Tyksin Lääketieteellisen genetiikan laboratorion osastolta syksyllä 2018. Opinnäytetyön suunnitelma aloitettiin 2019 vuoden alussa. Opinnäytetyön teoreettinen osuus kerätään kriittisesti arvioiden internetistä sekä Lääketieteellisen genetiikan laboratorion osaston työohjeista ja -materiaalista. Opinnäytetyön aikataulu kohdistuu vuoteen 2019 syksyyn asti. Syventävän harjoittelujakson aikana näytteet kerätään kokoon ja laimennetaan oikeaan konsentraatiopitoisuuteen ja MLPA-analysoidaan. Tutkimustulokset saadaan viimeistään 2019 elokuun aikana. Lopullisen opinnäytetyön luovutus tapahtuisi syksyllä 2019.

Opinnäytetyö on osa Työelämäyhteistyön ja opetuksen kehittäminen bioanalytikkokoulutuksessa (TurkuCRC T163/2017) -hanketta.

Tutkimus suoritetaan työohjetta (SOP DNA-124) seuraamalla. Pipetointia harjoitellaan aluksi muun muassa Biohit:n 0,2-10µl –sähköpipettiä käyttäen, ennen virallista MLPA-analyysin aloittamista potilasnäytteiden tulosten luotettavuuden parantamiseksi.

4.1 Tutkimusaineistot

Ensin kaikki sairaalageneetikon valitsemat jo valmiiksi DNA-eristetyt potilasnäytteet kerätään ja tehdään mahdolliset konsentraatiolaimennokset, sillä reaktiossa käytetään konsentraatiopitoisuudeltaan 50ng/µl olevia näytteitä. Näytteet on kerätty vuodelta 2018, ja jotka ovat saapuneet Lääketieteellisen genetiikan laboratorioon eri puolilta Suomea. Potilaiden anonymiteetin säilyttämiseksi tässä opinnäytetyössä potilasnäytteet on nimetty eri tavalla, juoksevalla numerolla, kuin Lääketieteellisellä genetiikan laboratorion osastolla olisi tapana. Kaikki näytteet on DNA-eristetty fenoli-kloroformimuutoseristyk-sellä.

4.2 Laitteet ja tilat

Tutkimus suoritettiin Turun yliopistollisen keskussairaalan Lääketieteellisen genetiikan laboratorion tiloissa. Muun muassa PCR-kontaminaation välttämiseksi PCR-reaktiota

edeltävät vaiheet tehtiin DNA-laboratorion puhdastila PRE-PCR -huoneessa, josta siirryttiin hybridisaation ja seuraavana päivänä tapahtuvan ligaatio-ohjelman jälkeen PCR-huoneeseen. PCR-ohjelman jälkeen näytteet ajettiin sekvensaattorilla, Applied Biosystems:n 3500XLDX –laitteella POST-PCR huoneessa.

4.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Tutkimustyössä tulee noudattaa rehellisyyttä, yleistä huolellisuutta ja tarkkuutta tutkimustyössä sekä tulosten tallentamisessa ja esittämisessä (Tutkimuseettinen neuvottelukunta, 2017). Opinnäytetyönprosessin aikana noudatetaan hyvää eettistä käytäntöä ja teoriapohja luodaan plagioimatta muiden teoksia, näin kunnioittaen toisten tutkijoiden työtä ja saavutuksia. Lähteet merkitään oikein. Tiedonhaussa pyritään löytämään mahdollisimman luotettavaa tutkimustietoa muun muassa MLPA-analysistä. Potilasnäytteet ovat valmiiksi sairaalageneetikon puolesta valikoituja 45 kappaletta, valmiiksi tutkittuja ja DNA-eristettyjä näytteitä vuodelta 2018. Potilaiden näytenumerot koodataan anonymiseksi juoksevalla numerolla lomakkeista ja tutkimustuloksista, jottei potilaiden henkilöllisyyttä pysty jäljittämään

5 MLPA-TUTKIMUSTEN SUORITUS

MLPA-tutkimukset suoritettiin Lääketieteellisen Genetiikan työohjetta SOP DNA-124 käyttäen. Normaalin suolen epiteelinäytteen kontrollin ja kahden kopiolumuutos standardinäytteen lisäksi yhteensä 46kpl fenoli-kloroformilla eristettyä DNA-näytettä laimennettiin konsentraatioon 50ng/μl. Laskukaava 50ng/μl:n DNA-laimennoksille oli

$$50 / X \text{ ng/}\mu\text{l} \times 50 \text{ ng} = X \mu\text{l},$$

jossa X ng/μl on näytteen aiemmin mitattu konsentraatio, ja tuloksena saatu X μl on tarvittava määrä DNA:ta mikrolitroissa.

Esimerkki 1 pyöristettynä.

$$50/975\text{ng/}\mu\text{l} \times 50\text{ng} = 2,6\mu\text{l} , 2,6\mu\text{l} + 47,4\mu\text{l} = 50\mu\text{l}$$

Osalla näytteistä konsentraatio oli niin suuri, että jouduttiin lisäämään laboratoriovettä niin, että DNA:n määrä kuitenkin ylittyi yli 1μl.

Esimerkki 2.

$$50/4365\text{ng/}\mu\text{l} \times 100\text{ng} = 1,1\mu\text{l} , 1,1\mu\text{l} + 98,9\mu\text{l} = 100\mu\text{l}$$

Ajot koostuivat 8 osasta, joissa 4:ssä ensimmäisessä koettimet kohdistuivat BRCA 1:seen ja lopuissa ajoissa BRCA 2:seen. 6/8 ajosta koostui 24 näytemäärästä, josta kolme ensimmäistä olivat fenoli-kloroformilla eristettyjä kontrolleja, joiden jälkeen oli normaali suoli epiteeli-kontrolli ja ajon viimeisenä näytteenä toimi vesikontrolli dH2O (Liite 1). Osa näytteistä toimivat sekä ajon sisäisenä kontrolleina, että ajon ulkoisena kontrolleina muissa ajoissa, minkä tarkoituksena oli tuoda esiin mahdolliset kontaminaatiot ja pipetointivirheet ja varmistaa tulosten paikkansapitävyys. Ajoista 2/8 koostuivat BRCA1 & BRCA2 sarjalaimennoksista, joiden tarkoitus oli selvittää, jos tai kun potilaalla on ilmennyt mutaatio, kuinka pienellä prosenttiosuudella se voidaan löytää. Näytetyypit näissä ajoissa olivat Coriell:sta tilatut referenssinäytteet, jotka oli eristetty ja konsentraatio oli tiedossa, ja normaalin suolen epiteelistä eristettyä DNA:ta.

Jokaisesta ajosta tehtiin erillinen työlista Lääketieteellisen genetiikan laboratorion valmiille pohjalle (Liite 2), johon kirjattiin ajojen päivämäärät, kontrollit, potilasnäytteet, vesikontrolli ja niihin tarvittavat reagenssien määrät.

DNA-laimennokset tehtiin samalla viikolla kuin ajo ajettiin, jolloin välttyttiin mahdollinen näytteen haihtuminen Eppendorf-putkessa ja laadun heikentyminen. Kaikki DNA-laimennokset säilytettiin jääkaapissa, ja fenoli-kloroformi -kontrollit pakkasessa. Näyteputkien sijasta käytettiin 96-kanavaista/kaivoa PCR Platea, johon ympäröimällä merkittiin potilasnäytteiden ja kontrollien paikat.

Denaturaatio-ohjelma käynnistettiin Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler – laitteessa. Laitteen kuumentuessa pipetoitiin 5 µl potilasnäytteitä ja kontrollit PCR Platellet. Pipetoinnin jälkeen PCR Platen päälle laitettiin tiiviste, ja näytteet sentrifugointiin PCR Platen pohjalle, jottei näytteet laitteen kuumentuessa haihdu tai siirry toiseen näytteeseen ja kontaminoidu. Plate siirrettiin laitteeseen ja aloitettiin denaturaatio-ohjelma.

	Lämpötila °C	Kesto
Denaturaatio ohjelma	98	5 min
	25	∞

Viiden minuutin kestävän denaturaatio-ohjelman aikana valmistettiin Salsa-koettimista koostuva hybridisaatioliuos Eppendorf-putkeen. Aluksi vortexoitiin SALSA MLPA buffer ja pipetoitiin putkeen. SALSA Probe mix lisättäessä reagenssia sekoitettiin pipetoinnin yhteydessä ja lisättäessä SALSA MLPA bufferiin.

HYBR. REAGENSSI	1x
SALSA Probe mix	1,5µl
SALSA MLPA buffer	1,5µl
yhteensä	3µl

Denaturaatio-ohjelman jälkeen laitteen kansi avattiin ja näytteiden päälle lisättiin 3 µl hybridisaatioliuosta pipetoimalla käyttäen huuhtelumenetelmää. Pipetoinnin jälkeen PCR Plate laitettiin takaisin laitteeseen ja valittiin **MLPA-Hybridisaatio** -ohjelma, jossa näytteet jäivät yön yli inkuboitumaan, ja työtä jatkettiin seuraavana päivänä.

	Lämpötila °C	Kesto
Hybridisaatio ohjelma	95	1 min
	60	16-20h

Ligaatio-ohjelmaa varten valmistettiin reagensseista ligaatioseos erilliselle Eppendorf-putkeen työohjeiden mukaisesti. Ensimmäikseksi pipetoitiin dH₂O ja hyvin vorteksoidut ja sekoitetut Ligase-65 buffer A & B. ja vorteksoitiin ja spinnattiin hyvin. Lopuksi lisättiin kylmässä pidettävä Ligase-65 pipetillä huuhtelemalla. Tämän jälkeen seos sekoitettiin hyvin ja spinnattiin ennen käyttöä.

LIG. REAGENSSI	1x
Ligase-65 buffer A	3µl
Ligase-65 buffer B	3µl
dH ₂ O	25µl
Ligase-65	1µl
yhteensä	32µl

PCR Plate pidettiin laitteessa ohjelman vaihtumisen aikana. Kun laitteen lämpötila laski aikaisemman hybridisaatio-ohjelman lämpötila 60°C:sta 54°C:en, ligaatio-ohjelma pysäytettiin ja lisättiin 32µl ligaatioseosta pipetoimalla näytekuppiin, sekoittaen ja samalla välttämällä ilmakuplia. Laite antaa työn suorittamiselle 10 minuuttia ennen ohjelman jatkamista, joten pipetointi piti suorittaa nopeasti, jolloin lisäksi välttyttiin näytteiden haihtuminen.

	Lämpötila °C	Kesto
Ligaatio ohjelma	54	15 min
	98	5 min
	20	Pause

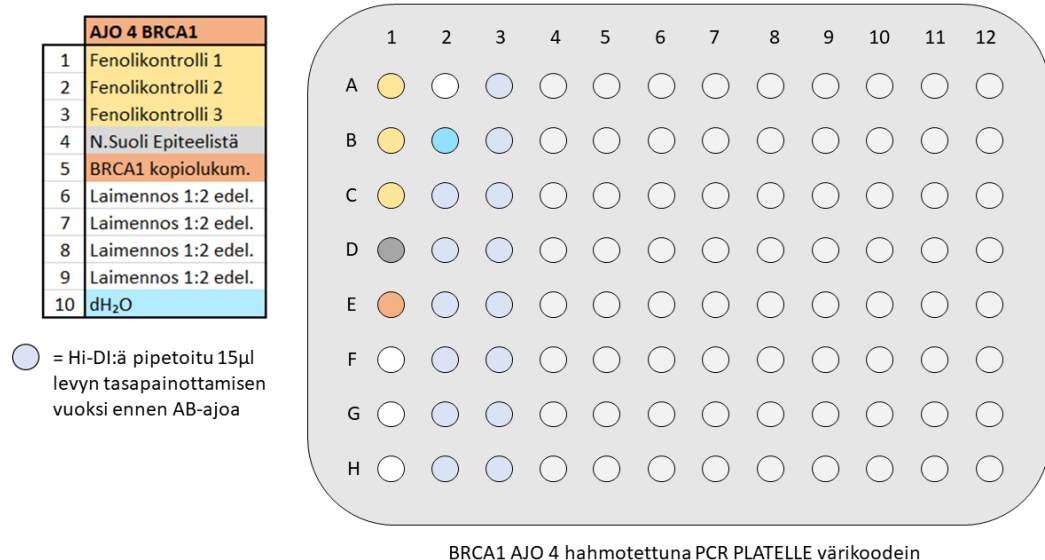
Pipetoinnin jälkeen painettiin Resume, jolloin ohjelma jatkettiin loppuun asti, jonka aikana valmistettiin PCR-reagenssiseos.

PCR REAGENSSI	1x
dH ₂ O	7,5µl
MLPA-Primemix	2µl
SALSA Polymerase	0,5µl
yhteensä	10µl

Ohjelman loputtua PCR Plate otettiin pois 2720 Thermal Cycler -laitteesta ja lisättiin 10 µl PCR-seosta näytteisiin pipetoimalla edestakaisin. Tämän jälkeen näytteet vietiin pois puhdistilahuoneesta laboratorion PCR-huoneeseen ja kytkettiin PCR laite 2720 Thermal Cycler päälle.

PCR-ohjelma	Lämpötila °C	Kesto	Toisto
1. Denaturaatio	95	30 s	1.-3.x 35
2. Annealing	60	30 s	
3. Ekstensio	72	60 s	
4. Loppuelongaatio	72	20 min	
5. Hold	15	∞	

PCR-ohjelman jälkeen siirryttiin PCR-huoneesta POST-PCR huoneeseen, jossa tehtiin ajon viimeinen vaihe AB 3500xL Dx Genetic Analyzer -laiteella. Näytteet tulisi ajaa 48 tunnin kuluessa PCR:stä, ja parhaat tulokset saadaan, kun näytteet ajetaan heti PCR:n jälkeen. Näytteitä pipetoitiin PCR Platesta uudelle puhtaalle PCR Platelle 1µl, ja lisättiin kokostandardista (LIZ 500 Genescan, Applied Biosystems) ja Hi-Di-formamidista (Applied Biosystems) koostuvaa seosta. Kutakin näytettä kohti tulee 0,1µl LIZ-500:a ja 13,9µl Hi-Di-formamidia. AB-sekvensaattori on 24-kapillaarinen, jolloin loppuihin kuoppiin täytettiin Hi-Di-formamidilla levyn tasapainottamiseksi, jos siihen on tarvetta. Plate siirrettiin GeneAmp 9700-koneeseen seitsemän minuutin kestävään denaturointi-ohjelmaan. Ohjelman aikana näytelista syötettiin AB 3500xL Dx Genetic Analyser -laitteen päätteelle ohjeiden mukaisesti. Denaturointi-ohjelman loputtua Plate syötettiin sekvensaattoriin, jolla PCR-reaktiossa tuotetut monistustuotteet erotetaan kapillaarielektroforeesilla. Ohjelman valmistuttua sekvensaattori lähettää tulokset suoraan sairaalageneetikkojen analysoitavaksi.



Kuva 3. BRCA1 AJO4 hahmotettuna PCR Platelle värikoodein.

6 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Teoriatieto viittaa tuorekudosnäytteiden olevan sopiva MLPA-menetelmälle.

Tulosten laatuun vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa näytteeseen käytetty eristysmenetelmä, näytteen DNA-laatu ja puhtaus, kontrollinäytteiden laatu, pipetointitarkkuus ja mahdolliset kontaminaatiot (MRC Holland, 2017) ja DNA:n laadun heikentyminen (Stuppia ym. 2012).

Tähän opinnäytetyön MLPA-tutkimukseen valittiin sellaiset näytteet, joissa aikaisempi NGS-menetelmällä saatujen tuloksien analyysi oli jäänyt normaaliksi, toisin sanoen piste-mutaatiota ei todettu. Tulokset oli tulkittu vastaavalla lausunnolla: *Sekvenssianalyysissä potilaan kasvainnäytteestä ei ollut osoitettavissa patogeenisia variantteja BRCA1- ja BRCA2-geenien alueella.* Valitut näytteet siis lähtökohtaisesti ovat sellaisia, että niistä voisi löytyä kopiolumuutos.

6.1 MLPA

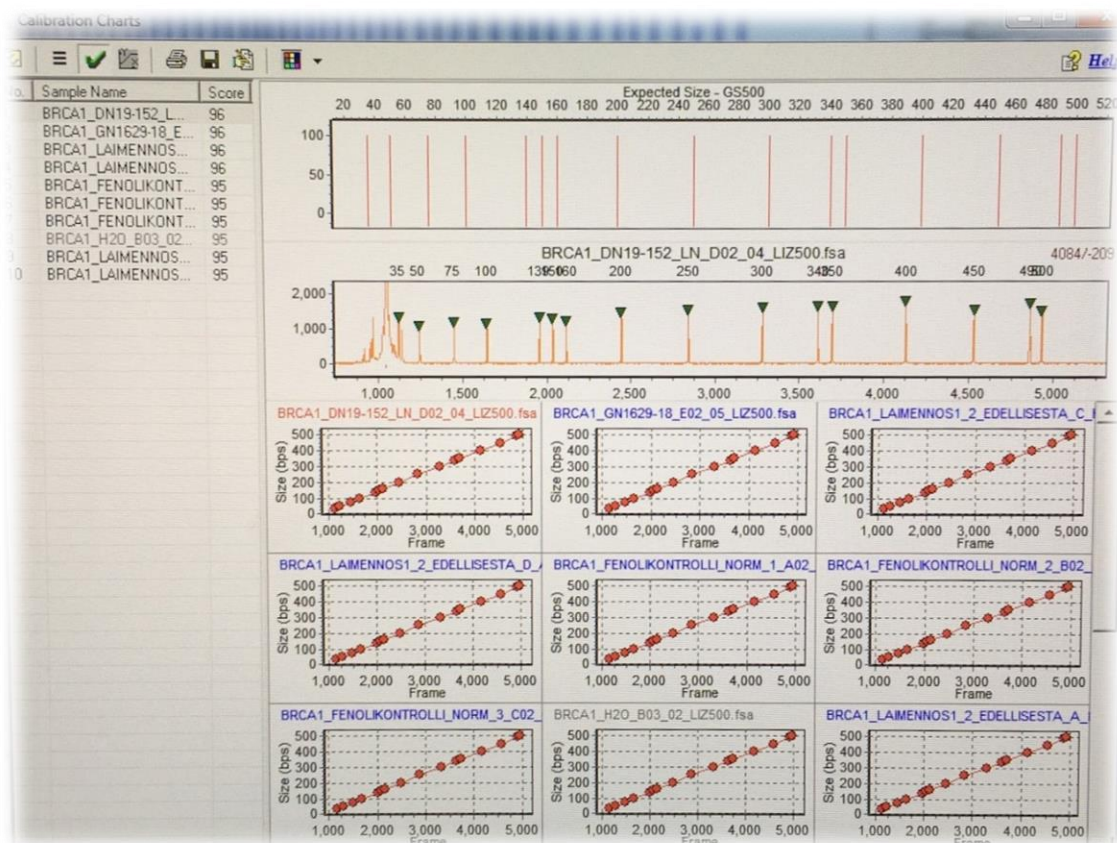
Ajojen aikana Applied Biosystems 3500xL Dx Genetic Analyser -sekvensaattori luo sekvensoiduista näytteistä raakadatan, joka haettiin verkon kautta koneella, ja tulokset tulkittiin GeneMarker-ohjelmalla käyttäen Lääketieteellisen genetiikan työohjetta.

Tulosten analysointi aloitettiin valitsemalla kokostandardi tutkitun geenin mukaan. Kun joko BRCA1 tai BRCA2 -kokostandardi määritettiin, valittiin sininen ja oranssi väri kuvastamaan piikkejä. Sininen väri kuvastaa näytteen leimattuja fragmentteja ja oranssi väri PCR-primermixissä sisältävää fluorisovaa väriainetta koettimen monistustuotteen visualisoimiseksi (Premier Biosoft, 2019). Koko analysoinnin aikana käytettiin vain näitä kahta väriä. Seuraavaksi tarkastettiin raakadatan piikkien korkeuksia. Piikkien korkeuden pitäisi olla vähintään n. 2500 intensiteettiyksikköä (Intensity Fluorescence Units). Kun piikkien korkeudet määritettiin olevan oikean kokoisia, katsottiin vesikontrolli silmämääräisesti. Jos tulostaulukosta ei ilmentynyt ylimääräisiä fragmentteja vesikontrollin kohdalla, poistettiin vesikontrolli. Poistettua vesikontrollia ei käytetty synteettisen kontrollin laskelmissa, eikä sitä näkynyt tulosraportissa. Tehtiin Auto Pull-up Removal, jonka tarkoituksena on poistaa mahdolliset leimojen spektreistä vuotaneet ylimääräiset taustat

pois, mikä muuten nostaisi vääriä piikkejä. Lisäksi vähennettiin taustan määrää Baseline Substraction:lla, sillä liian korkea tausta häiritsee piikkien pinta-alojen määrittämisessä.

Ylimääräisen taustan vähentämisen jälkeen ohjelmalla tehtiin sekä Size Calling ja normalisaatio, jossa ohjelma normalisoi ja siistii dataa. MLPA-analysissä suositellaan "Population normalization" -normalisaatiota. Tässä eri kokoisten fragmenttien signaali intensiteetin erot tasoittuvat.

Esikäsittelyn jälkeen tarkistettiin kokostandardien piikit jokaisen näytteen kohdalta; kokostandardi pitäisi vastata niitä fragmenttien kokoja, mitä siinä tiedetään olevan kokostandardia valittaessa. Näin voidaan olla varmoja, että näytteissä olevat fragmentit ovat sen kokoisia, kuin ne oikeasti ovat. Kokostandardilla verrattiin näytteistä saatuja fragmenttikokoja, muodostaen lineaarisen kuvaajan. Mikäli lukuarvo näytteen kohdalla on yli 90, kokostandardi on ok. Jos lukuarvo on pieni, eli arvo laskee alle 90, näytteen kontrollipiikit ja ohjelmalle kerrotun markkerin oletetut piikit eivät täsmää, jolloin markkeri on väärä (SOP-DNA-65).



Kuva 4 Kokostandarditaulukko BRCA1 AJO 4:stä

Seuraavaksi tehtiin paneeli, jossa määritetään geenialueiden ja kontrollialueiden pikkien sijainnit ja niiden nimet. Paneelia tehdessä valittiin joko BRCA1 tai BRCA2 koetinseosta kuvaava paneeli. Kun paneeli oli tehty, analysoitiin data uudestaan, jolloin muodostui raportti: lista näytteistä ja paneelissa määritellyistä fragmenteista.

6.1.1 Synteettinen kontrollinäyte

Genemarker antaa käyttäjälle mahdollisuuden luoda synteettinen kontrollinäyte, jota voidaan käyttää kontrollina/vertailunäytteenä. Tämä näyte lasketaan kaikkien valittujen näytetiedostojen mediaaniksi. (Genemarker, 2016) Ohjelma ehdottaa oletuksena kaikkia ajoissa olevia näytteitä synteettiseen kontrolliin, analysoinnin aikana valittiin kuitenkin kolme fenolikontrollia synteettiseksi kontrolliksi. Synteettisellä kontrollilla voidaan vähentää vääriä poikkeavia tuloksia, joita välillä tulee vain yhtä kontrollia käytettäessä (SOP DNA-65).

Kopioluvun normalisoitu arvo on 1. Tällöin geenissä ei ole havaittavissa kopiolukumuu-
tosta. Tuloksen normalisoitu arvo, joka jää alle 0,7 tarkoittaa heterotsygoottista deleeti-
tiota. Jos suhdeluku on noin yli 1,3, kyseessä on heterotsygoottinen duplikaatio. (MRC
Holland, 2017.)

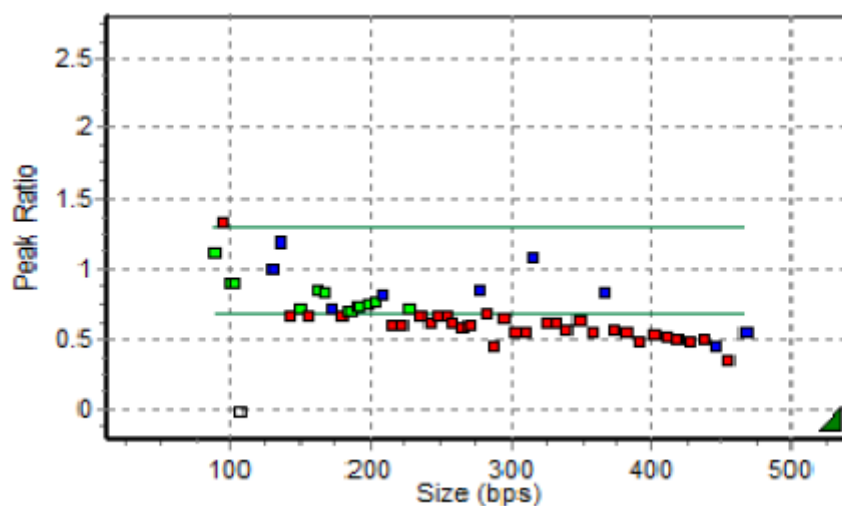
Kun analysoinnin esikäsittelyt ja synteettiset kontrollinäytteet oli valittu, tarkistettiin ja ver-
tailtiin jokaisessa ajoissa olevan normaalin suolen epiteelistä saatuja tuloksia. Kaikissa
ajoissa normaalin suolen epiteeli -tulossarja oli onnistunut hyvin, sillä jokaisessa tulok-
sissa oli normalisoitu kopiolukuarvo, mikä piti ollakin. Tulosten tulkinnan aikana tarkistet-
tiin myös ajojen sisäisten-, että ulkoisten kontrollien mahdolliset eroavaisuudet virheel-
listen pipetointitarkkuuden poissulkemiseksi. Suuria eroavaisuuksia ei näiden väliltä
myöskään löytynyt, jolloin tuloksiin pystyttiin luottamaan.

MLPA-tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa (Taulukko 1). Taulukon ensimmäi-
sessä sarakkeessa on ilmoitettu näytenumero, toisessa ja kolmannessa BRCA1 ja
BRCA2 -ajojen tulokset. Viimeisessä sarakkeessa on aiikeisemmin ilmoitettu tuumoripro-
sentti. Näytteestä saatu tutkimustulos on ilmoitettu joko normaali, poikkeama tai poik-
keama on ilmoitettu tarkemmin. Taulukossa sisäiset ja ulkoiset kontrollit ovat vääriko-
dattuna samalla värillä kuin MLPA-ajolistassa (Liite 1).

NÄYTE	BRCA1	BRCA2	TUUMORIPROSENTTI
MLPA-1	Normaali	Normaali	100 %
MLPA-1	Normaali	Normaali	100 %
MLPA-2	Normaali	Normaali	90 %
MLPA-3	Poikkeama	Normaali	70 %
MLPA-3	Poikkeama	Normaali	70 %
MLPA-4	POIK. Eksoni 20-24 duplik	POIK. Osittain duplik.	30 %
MLPA-5	Normaali	Normaali	80 %
MLPA-6	POIK. Eksoni 17 del.	Poikkeama	50 %
MLPA-6	POIK. Eksoni 17 del.	Poikkeama	50 %
MLPA-7	POIK. Eksoni 16 del.	Normaali	50 %
MLPA-8	Normaali	Normaali	60 %
MLPA-9	POIK. Eksoni 10 del.	Poikkeama ?	60 %
MLPA-9	POIK. Eksoni 10 del.	Poikkeama ?	60 %
MLPA-10	Normaali	Normaali	50 %
MLPA-11	Normaali	Normaali	60 %
MLPA-12	Normaali	Normaali	80 %
MLPA-13	Normaali	Normaali	30 %
MLPA-13	Normaali	Normaali	30 %
MLPA-14	Normaali	Normaali	30 %
MLPA-15	Normaali	Normaali	30 %
MLPA-18	Normaali	Normaali	30 %
MLPA-19	Normaali	Normaali	60 %
MLPA-19	Normaali	Normaali	60 %
MLPA-20	Epäselvä poikkeama	Normaali	40 %
MLPA-20	Epäselvä poikkeama	Normaali	40 %
MLPA-21	Normaali	Normaali	80 %
MLPA-21	Normaali	Normaali	80 %
MLPA-23	Poikkeama	Poikkeama	50 %
MLPA-23	Poikkeama	Poikkeama	50 %
MLPA-25	Normaali	Normaali	70 %
MLPA-26	Normaali	Normaali	35 %
MLPA-27	Normaali	Normaali	35 %
MLPA-28	Poikkeama	Poikkeama	60 %
MLPA-29	Normaali	Normaali	60 %
MLPA-30	Normaali	Normaali	100 %
MLPA-31	Normaali	Normaali	30 %
MLPA-31	Normaali	Normaali	30 %
MLPA-32	Normaali	Normaali	25 %
MLPA-34		Normaali	50 %
MLPA-35	Normaali	Normaali	40 %
MLPA-37	Poikkeama	Poikkeama	90 %
MLPA-39	Normaali	Normaali	30 %
MLPA-40	Normaali	Normaali	30 %
MLPA-41	Normaali	Normaali	60 %
MLPA-42	Kaottinen poik.	Normaali	60 %
MLPA-43	Normaali	Normaali	90 %
MLPA-43	Normaali	Normaali	90 %
MLPA-44	Epäselvä poikkeama	Epäselvä poikkeama	30 %
MLPA-45	Normaali	Duplikaatio	90 %
MLPA-46	Poikkeama	Poikkeama	60 %
MLPA-47	Normaali	Normaali	25 %
MLPA-48	Normaali	Normaali	45 %
MLPA-48	Normaali	Normaali	45 %
MLPA-49	Normaali	Normaali	75 %
MLPA-50	Normaali	Normaali	90 %
MLPA-51	Normaali	Normaali	40 %
MLPA-52	Normaali	Normaali	40 %

Taulukko 1. MLPA-tuloslista ja tuumoriprosentit

Lähes jokaisesta, tässä tutkimuksessa läpikäynneestä 45:stä näytteestä saatiin tutkimustulos. Näytteistä MLPA-34 oli ainoa, joka oli epäonnistunut, mikä havaittiin muun muassa alemman kuvaajan pisteiden lineaarisesti laskeutumisella.

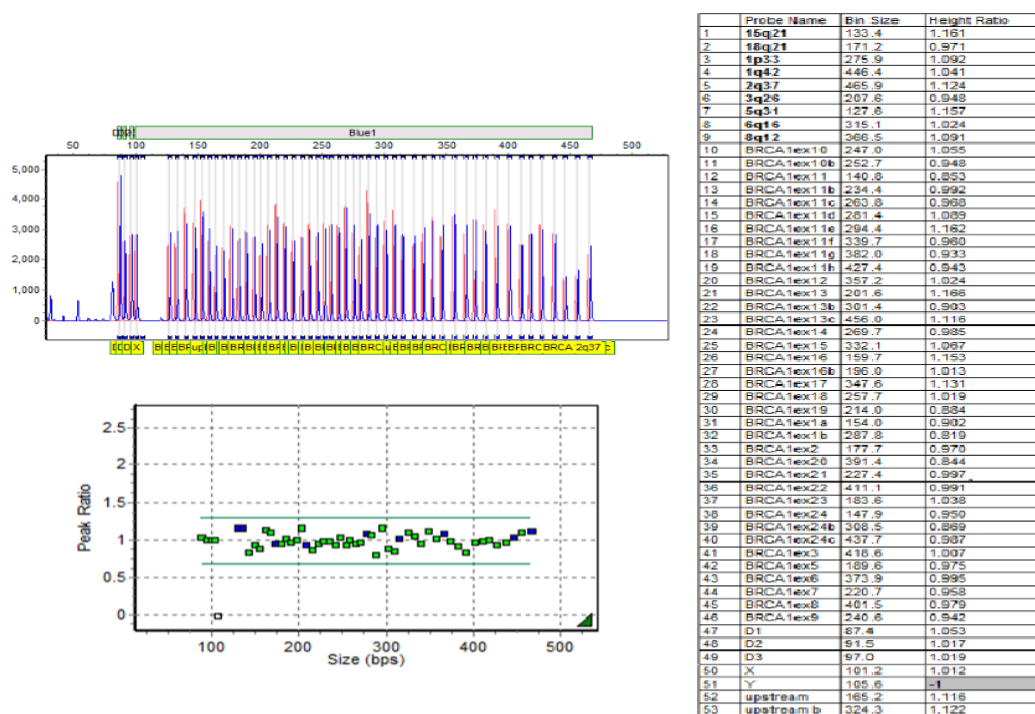


Kuva 5. MLPA-34, epäonnistunut näyte.

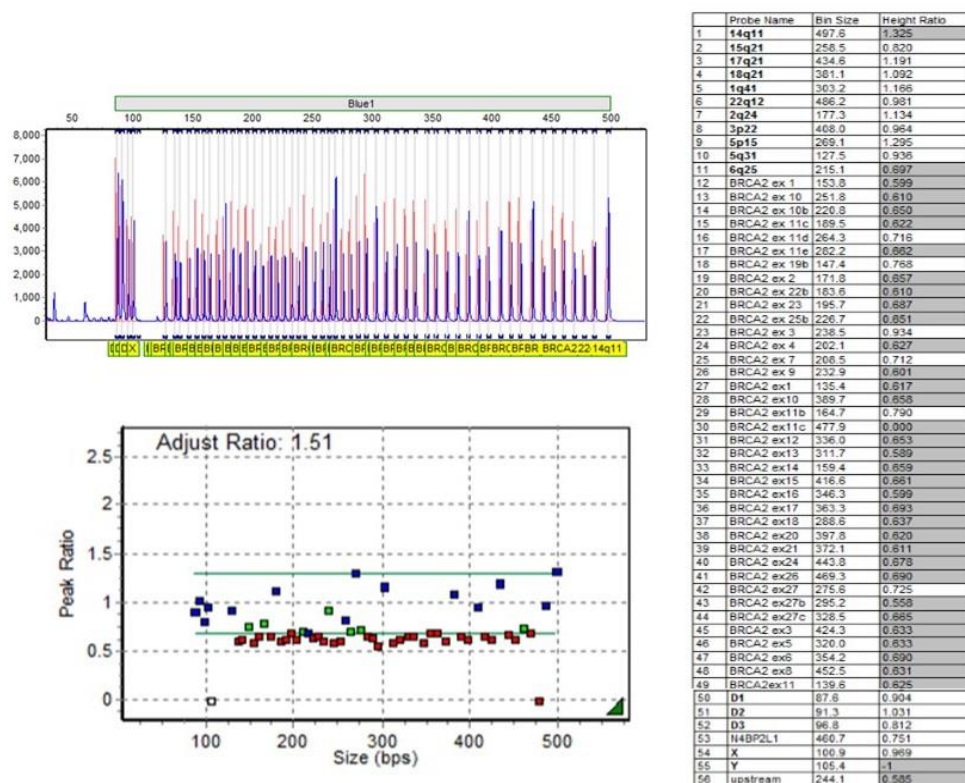
Tuloksista osalla poikkeamat ja kopiolumuutokset oli hankala määrittää, mikä hankaloitti kokonaiskuvan analysointia. Tulosten prosentuaaliset arvot on laskettu 52 näytteen tuloksista, johon sisältyi myös ajojen sisäiset, että ulkoiset kontrollit. Näytteiden kokonaismäärästä noin 73,1 prosentilla tulos oli normaali. 34,6 prosenttia 52 näytteestä ilmeni jomman kumman geenin kopiolumuutoksia. Enemmän kopiolumuutoksia esiintyi BRCA1-geenissä (32,7%), kuin BRCA2:lla (23,1%), mikä oli todennäköisempää viitaten aikaisempaan tutkimukseen. Molemmissa, sekä BRCA1-, että BRCA2-geenin kopiolumuutoksia esiintyi 21,2 prosentilla potilaista. Molempien geenipoikkeamien esiintyvyys näytteessä tarkoittaa todennäköisemmin tuumorin kaoottisesta tilanteesta, mitä ei pystytä MLPA-tutkimuksella tarkoin määrittämään.

Ajoissa 4. ja 8., joissa määriteltiin BRCA1:n ja BRCA2:n prosentuaalista kopiolumuutoksen esiintyvyyttä sarjalaimentamalla Coriell:sta tilattuja referenssinäytteitä, joissa on selkeä poikkeavuus, normaalin suolen epiteeli -näytteen kanssa. Poikkeavan näytteen kopiolumuutos esiintyi heikosti jo ensimmäisen laimennoksen kohdalla, mikä voi johtua muun muassa normaalin suolen epiteeli -näytteestä, joka mahdollisesti peittää referenssinäytteestä tulevan kopiolumuutoksen. Lisäksi somaattisten syöpätapausten kohdalla MLPA:lla on hankala havaita poikkeavuuksia, joissa muutoksia kantavista soluista osuus on pieni (<25%) (Stuppia, 2012).

Osassa näytteistä saatiin siis tulos, joka viittaisi kopiolumuutukseen kyseisessä näytteessä. Kuitenkin näytteiden tausta, muun muassa subjektiivisesti määritelty tuumoriprosentti, epätasapainottaa tulosta, eikä voida olla asiasta täysin varmoja ilman toisen tutkimusmenetelmän varmistusta. Liian alhainen tuumoriprosentti voi myös kertoa normaalkudoksen runsaudesta tuorekudosnäytteessä, mikä voi peittää tuumorista tulevan kopiolumuutoksen. Sarjalaimennosten tulokset vahvistivat tuumoriprosentin merkityksen. BRCA2 tuloksissa suurimmalla osalla BRCA2 ex 3 kohdassa löytyi poikkeavuutta. Tämä voi muun muassa viitata siihen, että jossain kontrollinäytteessä kyseisen eksonin arvo on poikkeava, jolloin se heijastuu lähes kaikkiin näytteisiin. BRCA2 ex 3 -poikkeavuus jätettiin siksi huomioimatta tulosten analysoidessa, jos se oli ainoa poikkeavuus. Tällöin näyte oli tuloksena normaali. MLPA-23 näyte on myös aikasemmin tutkittu muualla laboratoriossa, josta on myös ilmennyt kopiolumuutoksia. Tämän näytteen osalta siis tulokset ovat yhtäpitävät.



Kuva 6. BRCA1 AJO1 MLPA-13, normaali näyte.



Kuva 7. BRCA2 AJO5 MLPA-6, poikkeava näyte.

Molemmassa (kuvat 4 ja 5) on numeerinen tulostaulukon oikealla ja tulokset kuvaajaan havainnollistettuna alhaalla vasemmalla. Ylempi kuvaaja, elektroferogrammi, kuvaa AB 3500xL Dx Genetic Analyzer -sekvensaattorissa tapahtuneen fragmenttien erottelu kapillaarielektroforeesin avulla, mikä kuvaajassa ilmenee piikkeinä. Alemmassa kuvaajassa on hahmoteltu numeerisen tulostaulukon tulokset. Numeerisen tulostaulukon ensimmäisessä sarakkeessa (Probe Name) on ilmoitettu tutkittavan alueen nimi, toisessa koko ja kolmannessa tulos. BRCA1-koetinseoksessa sisältää tutkittavia alueita yhteensä 53, BRCA2:lla 56 tutkittavaa aluetta. Alemmassa kuvaajassa kontrollit on merkitty siniellä, normaalit tulokset vihreällä ja epänormaalit tulokset, jotka eivät ole 0,7-1,3 arvon välillä, punaisella. Kun vihreät merkit pysyvät rajatulla viitealueella ± 1 , tulos on silloin normaali. Optimaalisinta olisi, jos merkit olisivat kuvaajassa samalla viivalla. Taulukossa poikkeavat arvot näkyvät tummennettuna. Tämän opinnäytetyön tutkimustuloksissa Y-kromosomi on poikkeuksetta aina tummennettuna, sillä tutkittavat näytteet ovat naispuoleisia, jolloin Y-kromosomia ei pystytä syystä havaitsemaan näytteestä. Näytteessä (kuva 5), jossa poikkeama havaitaan deleetiona, arvo on laskenut alle 0,7 ja näkyy kuvaajassa punaisena ja taulukossa tummennettuna.

Kuvan 4 sekä numeerisista, että kuvaajan tuloksista pystytään päättämään, ettei näytteestä löytynyt BRCA1-geenin deletiota tai duplikaatiota, vaan kopioluku on normaali, eli noin 1 arvon paikkeilla.

6.2 Lopputulos

Tämän opinnäytetyön tutkimuskysymyksenä on *Ovatko tuorekudosnäytteet soveltuvia analysoitavaksi MLPA-menetelmällä?* Tutkimustuloksista käy ilmi, että fenolikloroformilla eristetyt tuorekudosnäytteet teknisesti soveltuvat MLPA-menetelmään. Saatu positiivinen MLPA-tulos on kuitenkin aina varmistettava muulla menetelmällä (MRC Holland, 2017). Näin ei ole mahdollista, että MLPA:lla yksinään pystyttäisiin vastaamaan syöpädiagnostiikasta. Lääketieteellisen genetiikan osastolla MLPA:ta käytetään muun muassa akuuttisen lymfaattisen leukemian syöpädiagnostiikassa, minkä tulokset varmistetaan kromosomi-tutkimuksella.

Syöpäkudosnäytteiden tulkinnassa hankaloittaa se, että ei tiedetä tarkalleen, mitä syöpäkudoksessa eksaktisti ilmentyy, varsinkin kun tuorekudosnäytteessä mahdollinen tuumoriprosentti on vaihteleva. Osalla tuloksissa löytyy mahdollisia kopiolumuutoksia, mutta muutosten tarkempi mekanismi ja laajuus ei pystytä tällä menetelmällä täysin selvittämään. Menetelmä olisi mahdollista ottaa käyttöön syöpädiagnostiikkaa sovellettaessa, jos olisi toinen menetelmä rinnalla, millä saataisiin varmistettua MLPA:lla saadut tulokset. Tällainen vaihtoehtoinen menetelmä olisi esimerkiksi ARRAY-menetelmä, jota tällä hetkellä ei ole vielä mahdollista ottaa käyttöön Lääketieteellisen genetiikan osastolla. Aiemmin tutkitulla NGS-menetelmällä ei pystytä varsinaisesti rinnakkaisvarmistamaan MLPA:n tuloksia, sillä NGS:llä ei pystytä somaattisesta kudoksesta löytämään kopiolumuutosta.

7 POHDINTA

MLPA ja Next Generation Sequencing ovat molemmat toimivia menetelmiä BRCA1- ja BRCA2-geenien määrittämisessä tuorekudosnäytteestä. Molemmissa menetelmissä on kuitenkin hyvät ja huonot puolensa. MLPA on erittäin herkkä epäpuhtauksille, mikä korostaa erityisen varovaisuuden menetelmää suorittaessa.

Opinnäytetyö kehitti bioanalytiikkakoulutuksessa opittuja tietotaitoja molekyylogeneettisten menetelmien suhteen. Opinnäytetyön teoreettisen prosessoinnin aikana oppi soveltamaan aikaisempia tutkimuksia ja ymmärtämään paremmin kahden tutkimuksen menetelmävertailua. Haasteena opinnäytetyön laboratorio-osuudessa oli aluksi tutkimuksen käytännön osuuden tuntemattomuus. Tutkimuksen laboratoriotyöskentely tapahtui kokonaisvaltaisuudessaan yksin, mikä kehitti kykyä hallita isompikin laboratorioprosessi itsenäisesti. Opinnäytetyön tekijä sai projektin aikana opetella käyttämään raakadatan analysointia varten käytettyä Genemarker-ohjelmaa geneetikon opastamana, millä varmistettiin, että opinnäytetyön tekijä saa parhaan mahdollisen kokonaisvaltaisen käsityksen MLPA-tutkimuksesta, ja näin ymmärtää menetelmää ja analysointia paremmin. Vaikka MLPA-menetelmä ei vielä otettu laboratorion käyttöön, työn tekeminen oli mielenkiintoista ja antoi arvokasta, varmempaa kokemusta DNA-laboratoriotyöskentelystä.

7.1 Tutkimuksen luotettavuus

Teoriatieto pyrittiin rajaamaan mahdollisimman tuoreeseen tutkimusaineistoon, millä pyrittiin palvelemaan tämän opinnäytetyön ajankohtaisuutta. Tutkimus- ja teoria-aineisto oli suurimmaksi osaksi englanninkielistä. Tutkimusten aikana käytettiin MLPA-lasku ja työlomaketta, jonne kirjattiin käytettyjen reagenssien määrät ja lotit ja yleisesti, mitä kyseisenä laboratoriopäivänä oli tehty. Tutkimukset suoritettiin jokaisena kertana työohjeiden mukaisesti, aseptista työjärjestelyä huomioiden. Pipetointitekniikkaa harjoitettiin ensin ennen varsinaista pipetointia mahdollisten pipetointivirheiden välttämiseksi. Pipetoinnit tehtiin suurimmaksi osaksi Lääketieteellisen Genomiikan DNA-laboratorion PRE-PCR kontaminaatioiden välttämiseksi. Puhdas laboratoriotakki ja kertakäyttökäsineet edistivät aseptista työskentelyä työvaiheiden aikana. Ajojen väliset mahdolliset eroavaisuudet muun muassa normaali suoli epiteeli-näytteen, ajojen sisäisten ja ajojen välisten kontrollien tuloksista pystyi havaitsemaan mahdolliset pipetointivirheet.

7.2 Tutkimuksen eettisyys

Tutkimustyössä tulee noudattaa rehellisyyttä, yleistä huolellisuutta ja tarkuutta tutkimustyössä, tulosten tallentamisessa ja esittämisessä sekä tutkimusten ja niiden tulosten arvioinnissa (Tutkimuseettinen neuvottelukunta, 2017). Kunnioittaen toisten tutkijoiden työtä, opinnäytetyön teoriapohja kirjoitettiin plagioimatta muiden tuotantoa ja merkittävällä lähteet oikein. Tietoa haettaessa yritettiin löytää mahdollisimman paljon luotettavaa, tarkkaa ja uutta tutkimustietoa MLPA:sta. Menetelmän heikkouksia ja vahvuuksia tarkasteltiin muidenkin kuin valmistajan näkökulmasta.

Näytteet on kerätty geneetikon ohjaamana, ja näytteet ovat vuodelta 2018 ja ne on tutkittu jo kertaalleen NGS-menetelmällä. Tutkimustuloksissa saatavat potilaan tunnistetiedot poistettiin ja koodattiin uudelleen anonymisiksi tätä opinnäytetyötä varten, näin ollen tutkittavien henkilöllisyyttä ei pystytä jäljittämään. Opinnäytetyölle haettiin tutkimuslupa Turku CRC:ltä.

7.3 Jatkotutkimusaiheet

Mahdollisesti tulevaisuudessa Lääketieteellisen genetiikan laboratorion osastolla tätä opinnäytetyötä olisi mahdollista jatkaa testaamalla samaiset potilasnäytteet ARRAY-menetelmällä, joka olisi mahdollinen vaihtoehto kopiolumuutostutkimuksille.

LÄHTEET

AbdulRazzaq Lawal Oluwagbemiga ym, 2012. Seventeen years after BRCA1: what is the BRCA mutation status of the breast cancer patients in Africa? – a systematic review Viitattu 28.02.2019

Amos CI, ym. 1993. Genetic epidemiology of epithelial ovarian cancer. Viitattu 13.11.2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8420678>

Andrew J Wallace, 2016. New challenges for BRCA testing: a view from the diagnostic laboratory: British Journal of Cancer. Viitattu 06.01.2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5141576/>

Ari Ristimäki, K. Franssila & V-M. Kosma 2013. Syöpätaudit. Helsinki: Duodecim. Viitattu 25.10.2019

Churchill Livingstone, 95-103. Tavtigian S V, Simard J, Rommens J, ym. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. Nat Genet 1996; 12: 333–7. Viitattu 4.11.2019

Committee on the State of the Science in Ovarian Cancer Research, National Academies Press, 2016. Ovarian Cancers. Viitattu 12.11.2019 Osittain luettavissa www-osoitteessa <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=NBK367618>

Chyke A, Doubeni, ym. 2016. Diagnosis and management of ovarian cancer. Viitattu 12.11.2019 Osittain luettavissa www-osoitteessa <https://www.aafp.org/afp/2016/0601/p937.html>

Dawson SJ ym. 2013. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. Viitattu 4.11.2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23484797>

Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F, 2018. Global Cancer Observatory: Syöpä tänään. Lyon, Ranska: Kansainvälinen syöpätutkimusvirasto Viitattu 25.10.2019

Genemarker. 2016. User Manual 2.7.0. Viitattu 23.11.2019 https://www.bioke.com/blobs/downloads/SG/GeneMarker_UserManual%202.7.0.pdf

Harris SR, Cartwright EJ, Török ME ym, 2013. Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of meticillin-resistant Staphylococcus aureus: a descriptive study. Viitattu 4.11.2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23158674/>

Heli Nevanlinna ja Olli-P. Kallioniemi, 1999. Perinnöllisen rintasyövän alttiuserien Suomessa. Lääketieteellinen aikakauskirja. Viitattu 10.02.2019 <https://www.duodecim-lehti.fi/lehti/1999/21/duo91098>

Internetix / Helena Salo 1997. PCR. <http://materiaalit.internetix.fi/fi/opintojaksot/5luonnontieteet/biologia/geenitekniikka/pcr> Viitattu 06.02.2019

Jan Shcouten, Paul van Vught, Robert-Jan Galjaard, Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) for Prenatal Diagnosis of Common Aneuploidies. Viitattu 28.02.2019

Jyväskylän yliopisto, 2017. Koppa: Määrällinen tutkimus. https://koppa.jyu.fi/Etusivu->Avoimet->Humanistinen_tiedekunta->Menetelmäpolkuja_humanisteille->Menetelmäpolku->Tutkimusstrategiat->Määrällinen_tutkimus Viitattu 06.02.2019

Karami F. ja Mehdipour P. 2013. A Comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. Viitattu 16.11.2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3838820/>

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, ym. A strong candidate gene for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66–71

M M Kamieniak ym. 2013. DNA copy number profiling reveals extensive genomic loss in hereditary BRCA1 and BRCA2 ovarian carcinomas. *British Journal of Cancer*. Viitattu 06.01.2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3668473/>

MRC Holland, 2019. How does MLPA work? Viitattu 12.02.2019. <http://www.mlpa.com> Home -> Technology -> MLPA technique.

MRC Holland, 2019. MLPA: An Introduction. Viitattu 12.2.2019. https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_wl2zCji-rCGANQgZPu-TixsEyIW1MscfzuKj2NDFYc-g.

MRC Holland, 2019. MLPA General Protocol. Instructions for use. Viitattu 25.10.2019. http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=_g2hKwvshD9I.

MRC Holland, 2019. What are the sample and buffer requirements for MLPA? Viitattu 17.11.2019. <https://support.mlpa.com/kb/articles/what-are-the-sample-and-buffer-requirements-for-mlpa>

National Cancer Institute. 2018. BRCA Mutations: Cancer Risk and Genetic Testing. Viitattu 28.01.2019 <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics/brca-fact-sheet#q1>

New challenges for BRCA testing: a view from the diagnostic laboratory. Viitattu 28.02.2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC51415767>

Ovarian Cancer Research Alliance, 2019. Statistics. Viitattu 13.11.2019 https://ocrahope.org/patients/about-ovarian-cancer/statistics/?gclid=EAlaIqobChMlUly-WpN7n5QIVYKyCh3qgwBGEEAAYAiAAEgL5TvD_BwE

Premier Biosoft, 2019. MLPA Probes. Viitattu 22.11.2019 http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mlpa.html

Päivi Heikkilä. 2013. Rintasyöpä. Syöpätaudit. Helsinki: Duodecim. Viitattu 25.10.2019

Raimo Pärssinen, ym. 2012. Biogeeni – Ammatillista biokemiaa ja geenitekniikkaa. Viitattu 19.10.2019

Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1987. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2. painos. N.Y. :Cold Spring Harbor Laboratory. Viitattu 25.10.2019

Sanna Siltanen, 2018. Blogikirjoitussarja: NGS-perusteet, osa 1. Immuno Diagnostic Oy. Viitattu 30.10.2019 <https://www.immunodiagnostic.fi/ngs-perusteet/>

Sarantaus, L. 2002. BRCA1- ja BRCA2-geenien periytyvät mutaatiot – perustajavaikutukset ja merkitys munasarjasyövässä Suomessa. Väitöskirja. Lääketieteellinen tiedekunta. Helsinki: Helsingin yliopisto. Viitattu 28.11.2019 https://www.terveyskirjasto.fi/terveysportti/uutis-sorvi_uusi.lue_abstrakti2?iid=3322&iprint=3&p_hakusana=

Soft Genetics, 2017. Application Note: GeneMarker® Software for Multiplex Ligationdependent Probe Amplification (MLPA™). Viitattu 1.2.2017. <http://www.softgenetics.com/papers/MLPA%20Application%20Note.pdf>

Solunetti, 2006. Nukleiinihappojen monistaminen. Viitattu 22.10.2019 http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_monistaminen/2/

Suomen Gynkologiyhdistys, 2001. Munasarjasyöpä. Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim. Viitattu 13.11.2019 <https://www.duodecimlehti.fi/lehti/2001/22/duo92618>

Suvisaari J, 2019. Periytyvä rinta- ja munasarjasyöpäaalttius, BRCA1- ja BRCA2-geenien suomalaisten mutaatioiden tutkimus, verestä. HUSLAB-liikelaitos. Viitattu 13.11.2019 <http://www.huslab.fi/ohjekirja/2+532.html>

Stuppia, L, ym. 2012. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. Viitattu 22.10.2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3317712/>

Suomen Syöpärekisteri, 2019. Syöpä 2017. Viitattu 13.11.2019 http://www.syoparekisteri.fi/assets/files/2019/10/syopa2017_raportti.pdf

Suvarna, S.K. & Layton, C. 2013. The gross room/surgical cut-up. Teoksessa: Suvarna, S.K., Layton, C. & Bancroft, J.D. 2013. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7. painos. Viitattu 25.10.2019

Syöpäjärjestöt, 18.4.2016 Tiedote: Rintasyöpään sairastuu yli 5000 naista vuodessa. Viitattu 30.10.2019 <https://www.syopajarjestot.fi/ajankohtaista/tiedotteet/rintasyopaan-sairastuu-5-000-naista-vuodessa/>

Target Ovarian Cancer, 2014. Types of ovarian cancer. Viitattu 12.11.2019 <https://www.targetovariancancer.org.uk/information-and-support/what-ovarian-cancer/types-ovarian-cancer>

ten Bosh, J. R. & Grody, W. W. 2008. Keeping up with the Next Generation: Massively Parallel Sequencing in Clinical Diagnostics. Viitattu 9.11.2019 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2570630/>

TheScientist, 2019. Kary Mullis, Inventor of the PCR Technique, Dies. Viitattu 20.10.2019 <https://www.the-scientist.com/news-opinion/kary-mullis--inventor-of-the-pcr-technique--dies-66256>

Tutkimuseettinen neuvottelukunta, 2017. Hyvä tieteellinen käytäntö. Viitattu 6.2.2019 <https://www.tenk.fi/fi/hyva-tieteellinen-kaytanta>

Tyksin Lääketieteellisen genetiikan laboratorion MLPA-analyysin työohje SOP DNA-124. Viitattu 10.02.2019

UEF Genome Center Of Eastern Finland, 2018. Menetelmät. Viitattu 30.10.2109 <http://www.uef.fi/web/genediagnosics/menetelmat>

Vehmanen P, Friedman L, Eerola H, ym. A low proportion of BRCA2 mutations in Finnish breast cancer families. Am J Hum Genet 1997. Viitattu 12.02.2019

VSSHP, 2019. Kromosomi- ja DNA-näytteiden lähetysohje. Viitattu 9.12.2019 <http://www.vsshp.fi/fi/toimipaikat/tyks/t12/kliininen-mikrobiologia/Documents/Kromosomi-%20ja%20DNA-n%C3%A4ytteiden%20%C3%A4hetysohjeet.pdf>

Whittemore A S, Gong G, Itnyre J. Prevalence and contribution of BRCA1 mutations in breast cancer and ovarian cancer: results from three U.S. population-based case-control studies of ovarian cancer. Am J Hum Genet 1997 Viitattu 12.02.2019

Yourgenome, 2016. What is PCR? Viitattu 22.10.2019 <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>

Zhang, Royer, ym. 2011. Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer. Viitattu 21.11.2019 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S009082581100062X>

	AJO 1 BRCA1	AJO 2 BRCA1	AJO 3 BRCA1	AJO 4 BRCA1	AJO 5 BRCA2	AJO 6 BRCA2	AJO 7 BRCA2	AJO 8 BRCA2
1	Fenolikontrolli 1	Fenolikontrolli 1	Fenolikontrolli 1	Fenolikontrolli 1	Fenolikontrolli 1	Fenolikontrolli 1	Fenolikontrolli 1	Fenolikontrolli 1
2	Fenolikontrolli 2	Fenolikontrolli 2	Fenolikontrolli 2	Fenolikontrolli 2	Fenolikontrolli 2	Fenolikontrolli 2	Fenolikontrolli 2	Fenolikontrolli 2
3	Fenolikontrolli 3	Fenolikontrolli 3	Fenolikontrolli 3	Fenolikontrolli 3	Fenolikontrolli 3	Fenolikontrolli 3	Fenolikontrolli 3	Fenolikontrolli 3
4	N.Suoli Epiteelistä	N.Suoli Epiteelistä	N.Suoli Epiteelistä	N.Suoli Epiteelistä	N.Suoli Epiteelistä	N.Suoli Epiteelistä	N.Suoli Epiteelistä	N.Suoli Epiteelistä
5	MLPA-1	MLPA-20	MLPA-39	BRCA1 kopiokulum.	MLPA-1	MLPA-20	MLPA-39	BRCA2 kopiokulum.
6	MLPA-2	MLPA-21	MLPA-40	Laimennos 1:2 edel.	MLPA-2	MLPA-21	MLPA-40	Laimennos 1:2 edel.
7	MLPA-3	MLPA-1	MLPA-41	Laimennos 1:2 edel.	MLPA-3	MLPA-1	MLPA-41	Laimennos 1:2 edel.
8	MLPA-4	MLPA-23	MLPA-42	Laimennos 1:2 edel.	MLPA-4	MLPA-23	MLPA-42	Laimennos 1:2 edel.
9	MLPA-5	MLPA-20	MLPA-43	Laimennos 1:2 edel.	MLPA-5	MLPA-20	MLPA-43	Laimennos 1:2 edel.
10	MLPA-6	MLPA-25	MLPA-44	dH ₂ O	MLPA-6	MLPA-25	MLPA-44	Laimennos 1:2 edel.
11	MLPA-7	MLPA-26	MLPA-45		MLPA-7	MLPA-26	MLPA-45	dH ₂ O
12	MLPA-8	MLPA-27	MLPA-46		MLPA-8	MLPA-27	MLPA-46	
13	MLPA-9	MLPA-28	MLPA-47		MLPA-9	MLPA-28	MLPA-47	
14	MLPA-10	MLPA-29	MLPA-48		MLPA-10	MLPA-29	MLPA-48	
15	MLPA-11	MLPA-30	MLPA-49		MLPA-11	MLPA-30	MLPA-49	
16	MLPA-12	MLPA-31	MLPA-50		MLPA-12	MLPA-31	MLPA-50	
17	MLPA-13	MLPA-32	MLPA-51		MLPA-13	MLPA-32	MLPA-51	
18	MLPA-14	MLPA-21	MLPA-52		MLPA-14	MLPA-21	MLPA-52	
19	MLPA-15	MLPA-34	MLPA-23		MLPA-15	MLPA-34	MLPA-23	
20	MLPA-3	MLPA-35	MLPA-43		MLPA-3	MLPA-35	MLPA-43	
21	MLPA-6	MLPA-19	MLPA-48		MLPA-6	MLPA-19	MLPA-48	
22	MLPA-18	MLPA-37	MLPA-31		MLPA-18	MLPA-37	MLPA-31	
23	MLPA-19	MLPA-9	MLPA-13		MLPA-19	MLPA-9	MLPA-13	
24	dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O		dH ₂ O	dH ₂ O	dH ₂ O	

: sisäinen kontrolli
 : sisäinen kontrolli
 : ajojen välinen kontrolli
 : sisäinen kontrolli
 : ajojen välinen kontrolli
 : ajojen välinen kontrolli
 : ajojen välinen kontrolli

MLPA-näytelistä ja pipetointijärjestys sekvensointiin

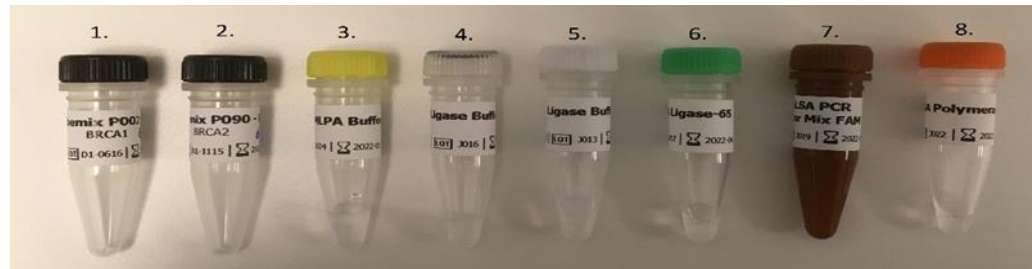
Tekijä: AMANDA
PVM: 13.03.2019 AJO 1 BRCA1

MLPA

A	1	Fenolikontrolli_norm_1
B	1	Fenolikontrolli_norm_2
C	1	Fenolikontrolli_norm_3
D	1	NORMAALI_SUOLI
E	1	BRCA1_MLPA_1
F	1	BRCA1_MLPA_2
G	1	BRCA1_MLPA_3
H	1	BRCA1_MLPA_4
A	2	BRCA1_MLPA_5
B	2	BRCA1_MLPA_6
C	2	BRCA1_MLPA_7
D	2	BRCA_MLPA_8
E	2	BRCA1_MLPA_9
F	2	BRCA1_MLPA_10
G	2	BRCA1_MLPA_11
H	2	BRCA1_MLPA_12
A	3	BRCA1_MLPA_13
B	3	BRCA1_MLPA_14
C	3	BRCA1_MLPA_15
D	3	BRCA1_MLPA_3
E	3	BRCA1_MLPA_6
F	3	BRCA1_MLPA_18
G	3	BRCA1_MLPA_19
H	3	BRCA1_dH2O
A	4	
B	4	
C	4	
D	4	
E	4	
F	4	
G	4	

Reagenssitaulukko

REAGENSIT



1. & 2. SALSA Probe mix

Sisältää jopa 60 erilaista MLPA-koetinta, jokainen kohdistuen tiettyyn DNA-sekvenssiin (Synteettistä oligonukleotidejä, bakteeritonta oligonukleotidiä, Tris.HCL, EDTA)

3. SALSA MLPA buffer

Sisältää antioksidantti ditiotreitolia (DTT), joka estää rauta-ionien aiheuttaman pidempien fragmenttien huonon monistumisen, (KCl, Tris-HCl, EDTA, PEG-6000, DTT, oligonucleotides)

4. Ligase-65 buffer A

Mukana Ligase-65 kanssa, parantaen olosuhteita.
(Koentsyymi NAD (bakteeriperäinen))

5. Ligase-65 buffer B

Mukana Ligase-65 kanssa, parantaen olosuhteita.
(Tris-HCl, MgCl₂, ioniton "pesuaine")

6. Ligase-65 enzyme

Sitoutuu hybridisoituneeseen vasemman ja oikeaan koetinoligoon, katalysoiden näiden kahden väliin kovalenttisen sidoksen. Jos koettimen ja sen kohteen välillä ligaatiokohdassa ei ole yhtä nukleotidia, entsyymi ei pysty ligatoitumaan oligoon. (Glyseroli, EDTA, DTT, KCl, Tris-HCL, ei-ioninen "pesuaine", Ligase-65 entsyymi (bakteeriperäinen))

7. PCR-primermix

Sisältää dNTP:n, sekä eteen- ja taaksepäin suuntautuvan PCR-alukkeen.
Eteenpäin suuntautuva PCR-alue on fluoresenssillä leimattu.
(Fluoresenssillä leimattu synteettiset oligonukleotidit (FAM/Cy5)
(dNTP:tä, Tris-HCL, KCl, EDTA, ioniton "pesuaine")

8. SALSA Polymerase

Voidaan käyttää erinomaisena korvikkeena taq-polymeraasille
(Glyseroli, ioniton "pesuaine" EDTA, DTT, KCL, Tris-HCL,
polymeraasi entsyymi (bakteeriperäinen))