

Tanja Kallio-Koski & Elli Nyman

SOLUNULKOINEN DNA

Määrittäminen verinäytteestä

SOLUNULKOINEN DNA

Määrittäminen verinäytteestä

Tanja Kallio-Koski & Elli Nyman
Opinnäytetyö
Kevät 2020
Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Tekijät: Tanja Kallio-Koski, Elli Nyman

Opinnäytetyön nimi: Solunulkoisen DNA, Määritys verinäytteestä

Työn ohjaajat: Dosentti, koulutuspäällikkö Mika Paldanius ja FT, sairaalasolubiologi Timo Väisänen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2020

Sivumäärä: 26

Nestebiopsia on lupaava, non-invasiivinen menetelmä syövän diagnosoinnissa ja hoidossa. Nestebiopsiasta eristettävissä olevan kiertävän, solunulkoisen DNA:n avulla voidaan mm. arvioida syövän levinneisyyttä ja kasvainsolujen mutaatiotyyppisiä. Nestebiopsian sisältämistä biomarkkereista saadun tiedon avulla voidaan valita optimaalisin terapiamuoto syövänhoidossa.

Opinnäytetyömme empiirisen osuuden toimeksiantaja oli Pohjois-Pohjanmaan sairaanhoitopiiriin, Oulun Yliopistollisen sairaalan Patologian osasto. Tutkimusaineistona olivat kahden, terveen, naispuolisen kontrollihenkilön verinäytteet sekä syöpäpotilailta eristetty solunulkoisen DNA.

Terveiden kontrollihenkilöiden verinäytteistä eroteltiin plasma, johon tehtiin syöpäpotilaiden solunulkoisesta DNA:sta laimennossarja. Laimennossarjan näytteistä eristettiin solunulkoisen DNA ja määritettiin solunulkoisen DNA:n pitoisuudet.

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli perehtyä nestebiopsiaan ja solunulkoiseen DNA:han ja testata valitulla menetelmällä, kuinka hyvin kaikki solunulkoisen DNA saadaan eristettyä ja kuinka puhdasta se on solunsisäisestä DNA:sta. Saadut tulokset osoittivat, että onnistuimme eristämään solunulkoisen DNA:n ja, että käyttämämme eristysmenetelmä sopii eristykseen myös solunulkoisen DNA:n määrän ollessa näytteessä vähäinen. Saamamme tulokset voivat auttaa optimaalisen solunulkoisen DNA-pitoisuuden määrittämisessä molekyylipatologisia menetelmiä varten ja tulevia tutkimuksia silmällä pitäen.

Asiasanat: nestebiopsia, solunulkoisen DNA, cfDNA, syöpä, tuumori-DNA, ctDNA

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

Authors: Tanja Kallio-Koski, Elli Nyman

Title of thesis: Cell free DNA, Evaluation from blood samples

Supervisor(s): Docent, Head of Education Mika Paldanius &
PhD, Hospital cell biologist Timo Väisänen

Term and year when the thesis was submitted: Spring 2020 Number of pages: 26

Liquid biopsy is a promising, non-invasive method of diagnosing and monitoring cancer. With the information carried by cell free DNA, that is isolatable from liquid biopsy, it is possible to evaluate the distribution and different mutation types of tumor cells. The information gained from biomarkers in liquid biopsy can guide therapeutic decisions in oncology.

The thesis was assigned by The Northern Ostrobothnia Hospital District, Oulu University Hospital, Pathology Unit. The material of this thesis comprised of blood samples obtained from two healthy female control individuals and cell free DNA isolated from cancer patients.

Plasma was separated from the blood samples and dilution series was made from the cell free DNA collected from cancer patients. Cell free DNA was isolated and the concentration levels measured from the samples of dilution series.

The purpose of this study was to examine the topics of liquid biopsy and cell free DNA in the literature and to test how well and purely cell free DNA is isolated with the chosen method. The results indicate that we managed to isolate cell free DNA and the method used apply even when the amount of cell free DNA is very minor. These findings can help in choosing the level of cell free DNA-concentration for methods of molecular pathology and upcoming research.

Keywords: liquid biopsy, cell free DNA, cfDNA, cancer, tumor DNA, ctDNA

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
1.1	Nestebiopsia.....	7
1.2	Verenkierron solunulkoisen DNA	8
1.2.1	Solunulkoisen DNA ja syöpä.....	9
1.3	Plasman erottelu	11
1.4	cfDNA:n eristys.....	11
1.5	DNA:n pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen	12
2	MATERIAALI JA MENETELMÄT	13
2.1	Esivalmistelut ja näytteenotto	13
2.2	Plasman erottelu verinäytteistä	14
2.3	cfDNA-laimennossarjojen teko	15
2.4	cfDNA:n eristäminen plasmasta	16
2.4.1	Esivalmistelut cf-DNA:n eristämistä varten	16
2.4.2	Liuosten valmistus	16
2.4.3	QIAvac-imusysteemin kokoaminen.....	17
2.4.4	Eristys imulaitteessa	18
2.5	cfDNA:n pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen.....	19
3	TULOKSET.....	20
4	POHDINTA	23
	LÄHTEET.....	25

1 JOHDANTO

Nestebiopsia on lupaava, non-invasiivinen menetelmä syövänhoidossa perinteisen invasiivisen kudossiopsian rinnalla. Kudossiopsian ottamiseen liittyy epämukavuutta ja komplikaatoriskejä, eikä syöpäkasvaimeen aina ole mahdollista päästä käsiksi. Nestebiopsia on vaivattomampi menetelmä kuin kudossiopsia tuumorista peräisin olevien biomarkkerien määrittämiseen. Nestebiopsioista eristettävissä oleva kiertävä, solunulkoisen DNA (cell free DNA, cfDNA) sisältää informaatiota syöpään liittyvistä geneettisistä ja epigeneettisistä muutoksista. cfDNA onkin erityisen lupaava biomarkerilähde syövän hoidon seurannassa. (Kustanovich, Schwartz, Peretz & Grinshpun 2019.)

Tässä opinnäytetyössä perehdymme verenkierrossa esiintyvään solunulkoiseen DNA:han jo olemassa olevan kirjallisuuden avulla. Opinnäytetyöhömmme kuuluu empiirinen osuus, jonka toimeksiantaja oli Pohjois-Pohjanmaan sairaanhoitopiiriin, Oulun Yliopistollisen sairaalan Patologian osasto.

Empiirisen osuutemme tavoitteena oli erotella terveiden henkilöiden verinäytteistä plasma ja tehdä siihen syöpäpotilailta eristetystä cfDNA:sta laimennossarja. Tämän jälkeen oli määrä eristää laimennossarjan näytteistä cfDNA:t ja määrittää kunkin näytteen cfDNA-pitoisuus. Tarkoituksena oli testata, kuinka hyvin kaikki cfDNA saadaan eristettyä valitulla menetelmällä ja kuinka puhdasta se on solunsisäisestä DNA:sta. Saamamme tulokset auttavat optimaalisen cfDNA-pitoisuuden määrittämisessä molekyylipatologisia menetelmiä käytettäessä ja tulevia tutkimuksia tehtäessä.

1.1 Nestebiopsia

Nestebiopsia on non-invasiivinen tutkimusmenetelmä, jossa ei tarvitse leikata koepalaa kirurgisin toimenpitein. Verrattuna perinteiseen kudoksiin, nestebiopsia on huomattavasti kivuttomampi, helpompi ja nopeampi toimenpide ja sen avulla taudinkuvaa voidaan seurata reaaliaikaisesti (Isomursu, Kononen & Kuopio 2015). Nestebiopsiassa kerätään kehon nestettä ja nesteestä eristetään tutkittava biomarkkeri. Biomarkkerit ovat erilaisia molekyyliä, esimerkiksi solunulkoista DNA:ta. Nestebiopsialla tarkoitetaan yleensä laskimoverinäytettä, mutta myös muita kehon nesteitä, kuten virtsaa, sylkeä, likvoria tai seminaaliplasmaa voidaan käyttää näytemateriaalina. Biomarkkereina voivat toimia muun muassa DNA, RNA, solunulkopuoliset vesikkelit, useat eri glykoproteiinit ja antigeenit tai kasvainsolut. (Kustanovich ym. 2019.) Näytteen keräysvaiheessa täytyy kiinnittää huomiota biomarkkerin optimaaliseen säilymiseen jatkotutkimuksia varten ja esimerkiksi verinäytteet, joista tutkitaan nukleiinihappoja, täytyy ottaa näyteputkiin, jotka ovat tarkoitettu DNA ja RNA -molekyylien säilymiseen. Tässä työssä nestebiopsian näytemateriaalina oli laskimoverinäytteen plasma ja biomarkkerimolekyylinä cfDNA.

Nestebiopsianäytteet täytyy analysoida herkillä tutkimusmenetelmillä, koska biomarkkerien pitoisuudet ovat hyvin pieniä. Isomursu ym. (2015) toteavat, että cfDNA:n määrä veressä on terveen potilaan muutamasta nanogrammasta millilitrassa, pitkälle edennyttä syöpää sairastavan potilaan satoihin mikrogrammisiin litrassa, josta edelleen vain pieni osa on syöpäkasvaimista peräisin olevaa kiertävää tuumori-DNA:ta (circulating tumor DNA, ctDNA). Nestebiopsiaa voidaan hyödyntää monin tavoin syövän diagnosoinnissa ja hoidossa. Nestebiopsian avulla voidaan todeta syöpä ja arvioida sen levinneisyyttä ctDNA määrän avulla. Nestebiopsian avulla voidaan myös määrittää ctDNA:sta kasvainsolujen mutaatio-tyyppi, jonka avulla voidaan valita optimaalisin hoitomuoto. Mittaamalla cfDNA:n määrää veressä ja ctDNA osuutta siitä, voidaan arvioida hoidon tehoa. (Kustanovich ym. 2019.)

1.2 Verenkierron solunulkoisen DNA

Solujen ulkopuolella elimistössä esiintyvää DNA:ta kutsutaan solunulkoiseksi DNA:ksi (cfDNA). Solunulkoisen DNA esiintyy plasmassa yleensä lyhyinä fragmentteina (<1000 bp) sitoutuneena proteiineihin, lipideihin tai vesikkeleihin. (Qiagen 2013.) cfDNA on heterogeeninen joukko, koostuen pääosin nukleaarista ja mitokondriaalisesta DNA:sta ja sen katsotaan olevan peräisin eri lähteistä. Plasman sisältämä cfDNA on pääosin peräisin normaaleista soluista, kuten leukosyyteistä. Syöpää sairastavilla suurimman osan cfDNA:sta on todettu olevan peräisin kasvaimista. (Kustanovich ym. 2019.) Terveellä ihmisellä veren cfDNA-pitoisuus on yleensä muutama nanogramma millilitraa kohden. Syöpäpotilailla veren cfDNA:n määrä on yleensä selkeästi kasvanut, pitoisuuden ollessa jopa 100–1000-kertainen terveeseen yksilöön nähden. (Isomursu ym. 2015.)

Ensimmäisen havainnon veren solunulkoisen DNA:n olemassaolosta tekivät Mandel ja Métais vuonna 1948. Heidän pioneerityönsä ei aikanaan herättänyt suurta kiinnostusta, vaan vasta 30 vuotta myöhemmin, kun Leon kumppaneineen havaitsi kohonneita cfDNA-pitoisuuksia syöpäpotilaiden verenkierrrossa. (Heizer, Ulz & Geigl 2015.) Kohonneita cfDNA-tasoja voivat aiheuttaa myös raskaus, elinsiirrot sekä fysiologiset ja patologiset prosessit, kuten fyysinen rasitus, tulehdus, diabetes, kudolvaurio, sepsis ja sydäninfarkti (Kustanovich ym. 2019).

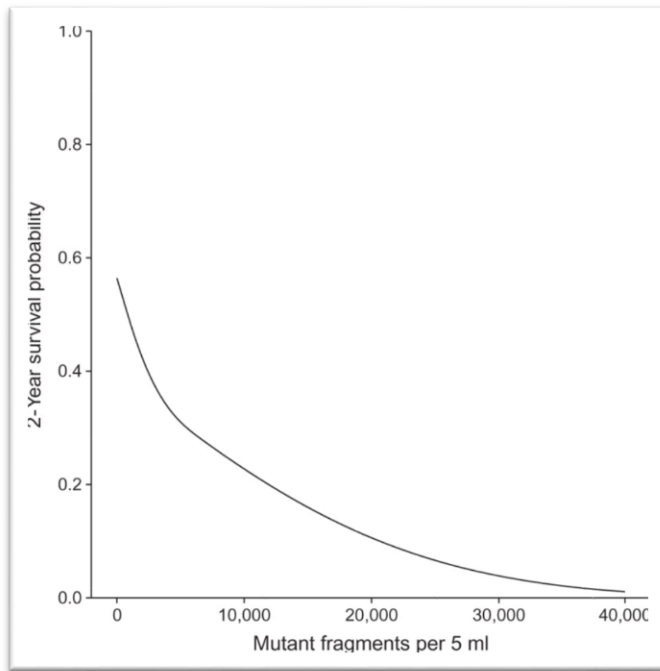
1.2.1 Solunulkoisen DNA ja syöpä

Kuolevat kasvainsolut vapauttavat lyhyitä pätkiä DNA:staan verenkiertoon. Näitä lyhyitä DNA-fragmentteja kutsutaan solunulkoiseksi kiertäväksi tuumori-DNA:ksi (ctDNA). (Burke 2014; Heizer ym. 2015.) Kiertävä tuumori-DNA genomisine muutoksineen on peräisin sekä kasvaimista että niiden etäpesäkkeistä. Nestebiopsioita voidaan ottaa potilaalta useita kertoja, mikä päihittää yksittäiseen näytteeseen rajoittuvan kudoksiopsian. Nestebiopsian sisältämää ctDNA:ta voidaan analysoida säännöllisesti, mikä edesauttaa hoidonseuranta. (Stewart, Kothari, Moulire, Mair, Somnay, Benayed, Zehir, Weigelt, Dawson, Arcila, Berger & Tsui 2018.)

Syöpään liittyvien genomisekvensointitutkimusten mukaan käytännössä kaikkiin syöpätyyppeihin liittyy geneettisiä muutoksia, kuten yhden emäksen korvautuminen (substituutio), lisäys (insertio), häviäminen (deleetio) ja siirtymä (translokaatio). Somaattisten mutaatioiden frekvenssi on vähäpätöinen normaalin solupopulaation ollessa kyseessä, mikä tekee näistä, ctDNA:sta detektoitavissa olevista mutaatioista erityisen spesifisiä biomarkkereita biologisesta näkökulmasta tarkasteltuina. (Vogelstein, Papadopoulos, Velculescu, Zhou, Diaz & Kinzler 2013.)

Tutkimustulokset viittaavat kasvaimen pahanlaatuisuuden tason korreloivan nekroositason kanssa, mikä vastaavasti vaikuttaa vapaana kiertävän tuumori-DNA:n määrään (Burke 2014; Heizer ym. 2015). Vuonna 2014 Bettegowda tutkimusryhmineen selvitti 640 syöpäpotilaan kokoisen tutkimusaineistonsa pohjalta, verenkierrossa esiintyviä mutantti-DNA-fragmentteja löytyvän suhteellisen korkeilla konsentraatioilla enemmistöllä metastaattista syöpää sairastavista potilaista. Paikallista syöpää sairastavilla konsentraatiotulokset olivat matalammat, suurimmalla osalla määrän ollessa kuitenkin havaittavissa. Tämä oli erityisen merkittävä tulos syövän hoidon kannalta, sillä syövän ollessa paikallinen, on hoidon onnistumisen ennuste korkeimmillaan. Tarkasteltaessa pitkälle edennyttä syöpää sairastavia potilaita, voitiin jokaiselta potilaalta identifioida geneettinen muutos, mikä tekee ctDNA:sta laajasti käyttökelpoisen biomarkkerin syöpäpotilaiden hoidossa. (2014.)

Tutkimusryhmän saamat tulokset puhuvat myös sen puolesta, että ctDNA-pitoisuuden määrittämisellä voidaan tarjota metastaattista (etäpesäkkeinen) syöpää sairastaville potilaille myös terapeutista ja ennustavaa informaatiota. Kuviossa 1 voidaan nähdä, että syöpäpotilaat (metastaattiset), joilla oli suhteellisen matala ctDNA-konsentraatiotaso, elivät merkittävästi pitempään kuin korkean ctDNA-pitoisuuden omaavat potilaat. Eliniän ennusteen ja ctDNA-pitoisuuden välillä voidaan todeta olevan korrelaatio. (Bettegowda ym. 2014.)



KUVIO 1. Korrelaatio eliniän ennusteen ja ctDNA-pitoisuuden välillä (Bettegowda ym. 2014).

1.3 Plasman erottelu

Veri koostuu nestemäisestä plasmasta ja siinä olevista soluista. Plasma tarkoittaa siis veren (tai imunesteen) solutonta faasia ja se muodostuu pääosin vedestä (n. 92 %). Plasma voidaan erotella verestä sentrifugoinnin avulla. Sentrifugointi erottelee veren eri partikkelit omiksi sedimenteikseen, jolloin punasolut painuvat putken pohjimmaisiksi, verihiutaleet ja valkosolut jäävät niiden pinnalle omaksi kerrokseksen ja plasma ylimmäksi faasiksi. Sentrifugoitaessa sedimentoituneen aineksen päälle jäävästä nestekerroksesta, tässä tapauksessa plasmasta, käytetään myös nimitystä supernatantti. (Tirri, Lehtonen, Lemmetyinen, Pihakaski & Portin 2001.) Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti voidaan varovasti pipetoiden ottaa talteen puhtaaseen putkeen. Sentrifugointi toistetaan saadulle plasmalle vielä muutaman kerran, erotellen supernatantti mahdollisesti vielä jäljelle jääneestä solupelletistä aina puhtaaseen putkeen.

1.4 cfDNA:n eristys

Solunulkoinen DNA voidaan eristää plasmasta kaupallisten reagenssisarjojen avulla. The QIAamp Circulating Nucleic Acid -reagenssikitin proseduurin käsittää neljä eri päävaihetta: lyysaus, sitoutuminen, pesu ja eluointi. Reagenssikitin avulla tehtävä toimintosarja tapahtuu imusysteemiin kytetyissä minikolumneissa. Ensimmäisessä vaiheessa näyte hajoitetaan eli lyysataan denaturoivissa olosuhteissa, jotta saadaan nukleiinihapot vapautettua vesikkeleistä, proteiineista ja lipideistä, joihin ne yleensä ovat sitoutuneet. Samalla inaktivoidaan RNAasit ja DNAasit, jotka voisivat hajottaa nukleiinihappoja. Seuraavassa vaiheessa vapaat nukleiinihapot kiinnittyvät valikoivasti sitoutuen minikolumnien silikamembraaneihin, kun lyaatit imetään imusysteemissä olevien minikolumnien läpi. Tämän jälkeen seuraa pesuvaiheet, jolloin kaikki mahdollisesti vielä jäljellä olevat kontaminantit saadaan tehokkaasti eliminoitua. Lopuksi eluoidaan talteen kolumneihin sitoutunut puhdas DNA. (Qiagen 2013.)

1.5 DNA:n pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen

Näytteen puhtaus cfDNA:n suhteen voidaan määrittää näytteen sisältämän DNA:n koon mukaan. DNA-molekyylin koko määritellään sen emäsparien, bp, määrän mukaan. cfDNA on hyvin pieni DNA-molekyyli, sen koko on vain <1000 bp, kun taas solunsisäinen DNA on huomattavasti suurempaa. Kun halutaan varmistaa, että näyte sisältää cfDNA:ta, voidaan suorittaa elektroforeesiajo. Siinä erikokoiset DNA-molekyylit liikkuvat geelissä sähkövirran vaikutuksesta eri nopeudella riippuen DNA-fragmentin koosta. Näytteiden kanssa samaan aikaan geelillä ajetaan kokostandardi. Näytteet leimataan DNA:han kiinnittävällä merkkiaineella. Erikokoiset DNA-fragmentit muodostavat vyöhykkeen geelille, josta niiden koko voidaan määrittää kokostandardin avulla. Jos näytteen DNA:n koko vastaa cfDNA:n kokoa, voidaan varmistua näytteen sisältävän cfDNA:ta. Jos taas geelillä havaitaan suurikokoista DNA:ta, näyte sisältää solunsisäistä DNA:ta, jolloin cfDNA:n eristyksessä ei ole onnistuttu. (Agilent Technologies 2009).

Näytteen DNA pitoisuus voidaan määrittää menetelmän avulla, jossa fluoresoiva leimaväri kiinnittyy DNA:han ja fluoresenssin voimakkuuden avulla voidaan laskea näytteen DNA-pitoisuus (Agilent Technologies 2009).

2 MATERIAALI JA MENETELMÄT

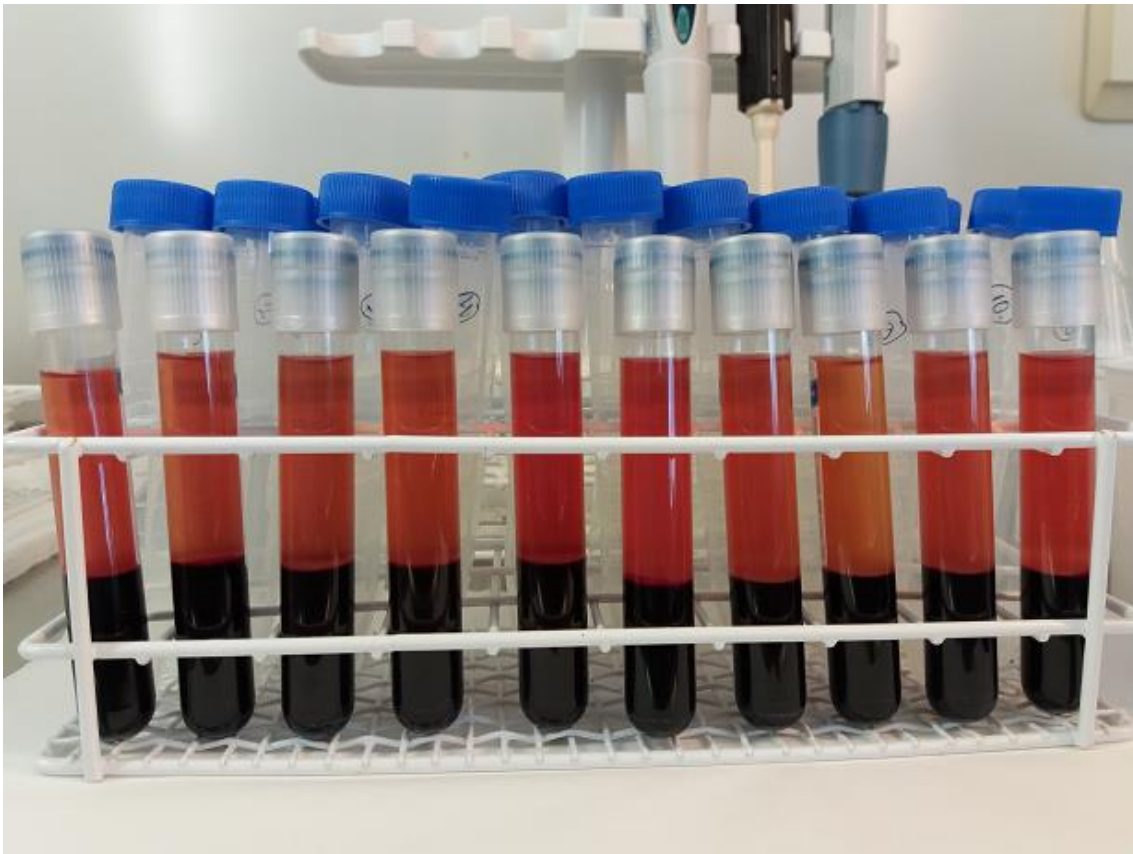
Kaikki työvaiheet tehtiin Pohjois-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin, Oulun Yliopistollisen sairaalan patologian laitoksen työohjeiden mukaan. Tutkimusaineisto koostui kahdesta terveestä naishenkilöstä sekä syöpäpotilailta aiemmin kerätystä cfDNA-näytteistä. Terveiltä naishenkilöiltä kerättiin laskimoverta ja eroteltiin verestä plasma. Saatuun plasmaan tehtiin laimennossarja syöpäpotilailta aiemmin kerätystä cfDNA:sta. Tarkoituksena oli testata, kuinka hyvin kaikki cfDNA saadaan eristettyä ja kuinka puhdasta se on solun sisäisestä DNA:sta. Työvaiheet suoritettiin laminaarivirtauskaapissa erityisellä huolella, estäen ulkoinen DNA-kontaminaatio.

2.1 Esivalmistelut ja näytteenotto

Materiaaliksi keräsimme kahdelta terveeltä naishenkilöltä yhteensä kymmenen 10 ml:n laskimoverinäytettä kyynärtaipeesta. Näytteet nimettiin näytteeksi 1 (ensimmäisen koehenkilön näytteet) ja näytteeksi 2 (toisen koehenkilön näytteet). Verinäyteputkia saatiin yhteensä 5 kpl per koehenkilö. Näytteet kerättiin huoneenlämpöisiin PAXgene-putkiin (PAXgene Blood ccfDNA Tube, A Qiagen/BD Company). Putket sekoitettiin välittömästi kääntelemällä niitä 10 kertaa, jotta putken reagenssit sekoittuvat vereen. Näytteenoton jälkeen putkien annettiin seisoa noin 30 minuuttia niin, että ne saavuttivat huoneenlämmön. Seuraavassa työvaiheessa verinäytteistä eroteltiin plasma.

2.2 Plasman erottelu verinäytteistä

Plasman erottelemiseksi putkia sentrifugoitiin huoneenlämmössä 15 minuuttia 1900 xg swing out-roottorissa. Kuviossa 2 on esitetty putkilot ensimmäisen sentrifugoinnin jälkeen. Supernatanttiplasma pipetoitiin 15 ml:n Falcon-putkeen, varoen ottamasta solupellettä mukaan. Eroteltu plasma sentrifugoitiin uudestaan huoneenlämmössä 10 minuuttia, nopeudella 1900 xg, jonka jälkeen supernatanttiplasma otettiin talteen kuten edellä. Jokaisen putken plasma jaettiin 1 ml:n eppendorf-putkiin niin, että yhden putken plasmasta saatiin 4–5 eppendorf-putkea. Eppendorf-putkia sentrifugoitiin huoneenlämmössä 10 minuuttia 13500 rpm. Lopuksi supernatantti pipetoitiin eppendorf-putkista 15 ml:n Falcon-putkiin, edelleen näytekohtaisesti. Säilytystä varten plasma pakastettiin ensin -20 °C:ssa yön yli, jonka jälkeen se siirrettiin -80 °C:een.



KUVIO 2. Veriputket ensimmäisen sentrifugoinnin jälkeen.

2.3 cfDNA-laimennossarjojen teko

Terveiltä naishenkilöiltä, laimennossarjaa varten verinäytteistä erotellut ja pakastetut plasmat sulatettiin 30 minuutin ajan 30-asteisessa vesihauhteessa. Tämän jälkeen putkia sekoitettiin Vortex-sekoittajassa 30 sekunnin ajan. Ennalta tiedettiin laimennossarjaan käytettävän, syöpäpotilailta eristetyn cfDNA-liuoksen pitoisuuden olevan 1,38 ng/μl. Valmistettiin tästä cfDNA:sta edellä eristettyyn plasmaan laimennossarja niin, että laimennosten pitoisuudet cfDNA:n suhteen olivat: 0 %, 1 %, 2,5 %, 5 % ja 10 % ja, että kunkin näytteen lopputilavuudeksi tuli 4 ml. Yhteensä näytteitä tuli kymmenen (näyte 1; 0 %, näyte 1; 1 %, näyte 1; 2,5 %, näyte 1; 5 %, näyte 1; 10 %, näyte 2; 0 %, näyte 2; 1 %, näyte 2; 2,5 %, näyte 2; 5 % ja näyte 2; 10 %). Taulukossa 1 on esitetty kuhunkin eri näyteputkioon pipetoitavat plasman ja cfDNA-liuoksen tilavuudet. Pipetointia varten cfDNA-liuosta laimennettiin 1:10 PCR-vedellä. 1:10 laimennos tehtiin pipetoimalla 20 μl cfDNA-liuosta ja lisäämällä 180 μl PCR-vettä.

TAULUKKO 1. Taulukossa on esitetty laimennossarjan (0 %, 1 %, 2,5 %, 5 % ja 10 %) pipetointitilavuudet plasman ja cfDNA-liuoksen suhteen.

haluttu pitoisuus	plasma	cfDNA-liuos (1:10 laimennos, 0,138ng/μl)	yhteensä
0 % (0 ng/μl)	4000 μl	-	4 ml
1 % (0,0001 ng/μl)	3997,1 μl	2,9 μl	4 ml
2,5 % (0,00025 ng/μl)	3992,8 μl	7,2 μl	4 ml
5 % (0,0005 ng/μl)	3985,5 μl	14,5 μl	4 ml
10 % (0,001 ng/μl)	3970,2 μl	28,9 μl	4 ml

2.4 cfDNA:n eristäminen plasmasta

cfDNA:n eristämiseen plasmasta käytettiin kaupallista QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit -määrityssarjaa (A Qiagen/ BD Company).

2.4.1 Esivalmistelut cf-DNA:n eristämistä varten

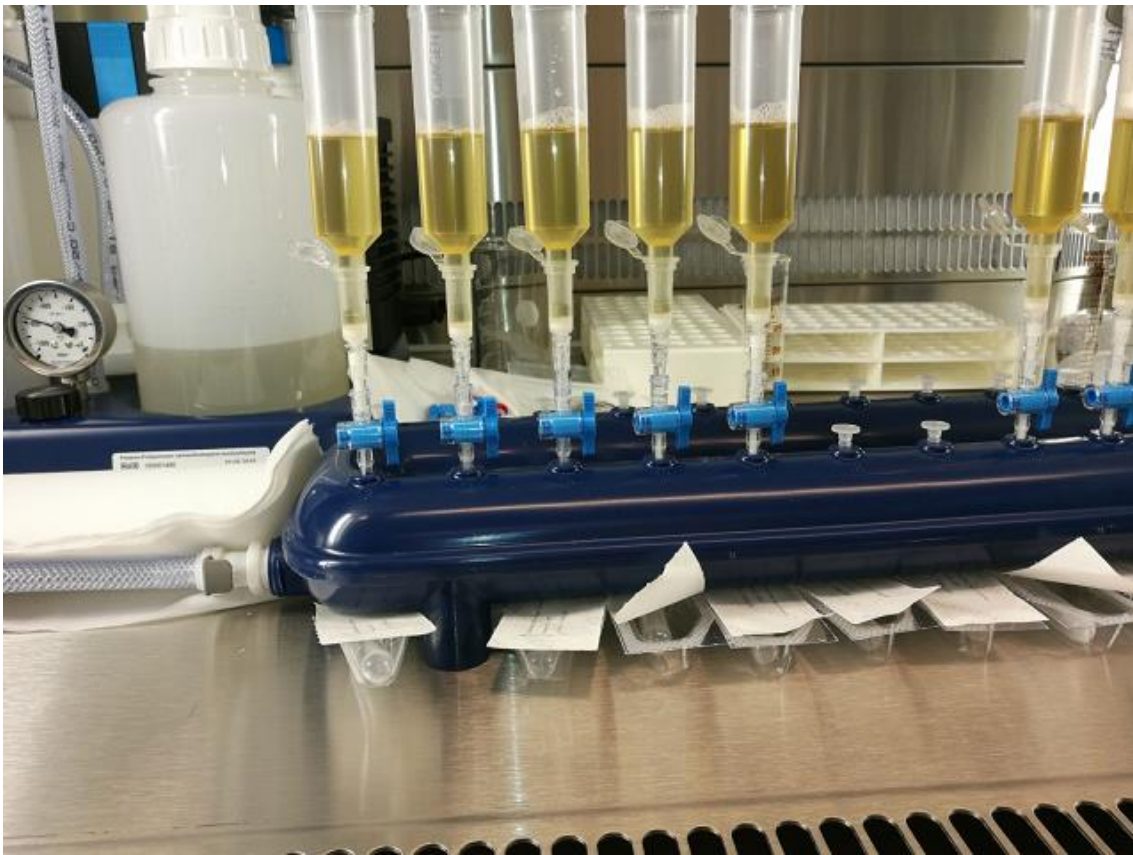
Esivalmisteluilla vähennettiin näytteiden kontaminaatoriskiä. Laminaarikaappi käynnistettiin 15 minuuttia ennen töiden aloittamista ja sen työskentelytaso puhdistettiin DNA Zap -liuoksella. Lisäksi puettiin kertakäyttöinen työtakki ja puhtaat hanskat. Hanskat vaihdettiin herkästi uusiin, mikäli ne likaantuivat. Työvaiheissa käytettiin määrityssarjan mukana tulevia putkia ja muovitavaraa. Kaikki muovipussit suljettiin klemmareilla eikä putkia saanut aukoa kaapin ulkopuolella. Pipetoitaessa pipetinkärki ei saa koskea esim. pöytätasoon tai hanskoihin, jos näin tapahtuu, täytyy kärki vaihtaa.

2.4.2 Liuosten valmistus

Valmistettiin liuokset määrityssarjan ohjeiden mukaan: ACB (200 ml isopropanoli + 300 ml ACB konsentraatti), ACW1 (25 ml absoluuttinen etanoli + 19 ml ACW1 konsentraatti), ACW2 (30 ml absoluuttinen etanoli + 13 ml ACW2 konsentraatti), RNA-AVE konsentraatti (1550 µl AVE RNA - lyofilaattiputkeen, säilytys -20 °C), proteinaasi K-liuos oli käyttövalmista. ACL-RNA-liuosta valmistettiin näytteiden tilavuuden mukaan tarvittava määrä, ohjekirjan taulukkoa noudattaen. Yhden näytteen tilavuus oli 4 ml ja näytteitä yhteensä kymmenen kappaletta, joten ACL-RNA-liuos tehtiin seuraavasti: 38,7 ml ACL puskuri + 61,9 µl RNA-AVE konsentraatti.

2.4.3 QIAvac-imusysteemin kokoaminen

cfDNA:n eristykseen käytettiin QIAvac imusysteemiä, joka näkyy kuvioissa 3 ja 4. Imusarja koottiin ohjeen mukaan. Ensin imusarjaan liitettiin VacValve (sininen venttiili), jonka jälkeen VacValveen liitettiin VacConnector. VacConnectoriin kiinnitettiin QIAamp pylväs ja pylvääseen kiinnitettiin Extender (suppilo). Kuviossa 3 näkyvät Extenderit kiinnitettyinä imupylväisiin. Imusarjan tyhjiin paikkoihin kiinnitettiin tulpat.



KUVIO 3. QIavac-imusysteemi, jossa Extenderit paikoillaan QIAamp-pylväisiin kiinnitettyinä.

2.4.4 Eristys imulaitteessa

Pipetoitiin 400 µl Proteinaasi K-liuosta 50 ml:n putkiin. Lisättiin putkiin 4 ml aiemmin tehtyä plasma-cfDNA-liuosta sekä lisäksi 3,2 ml ACL-RNA:ta. Suljettiin putket ja sekoitettiin pulssi-vorteksoimalla 30 sekunnin ajan. Sen jälkeen putkia inkuboitiin välittömästi 30 minuuttia 60 °C:ssa vesihauteessa. Inkuboinnin jälkeen lisättiin 7,2 ml ACB-puskuria ja vorteksoitiin 15–30 sekuntia, jonka jälkeen putkia inkuboitiin viisi minuuttia jäähauteessa. Inkuboinnin jälkeen liuos pipetoitiin imusarjan Extender:iin VacValve-venttiilin ollessa suljettuna (kuvio 3). Käynnistettiin pumppu, avattiin venttiilit ja annettiin neste imeytyä pylvääseen. Jonkin näytteen imeytyessä muita aikaisemmin sen venttiili suljettiin. Näytteiden imeytyttyä, suljettiin VacValve-venttiilit ja poistettiin Extenderit. Jokaiseen pylvääseen pipetoitiin 600 µl ACW1-puskuria (kuvio 4), avattiin venttiilit ja annettiin puskurin imeytyä pylväisiin. Kun puskurin oli imeytynyt, venttiilit suljettiin. Tämän jälkeen pylväisiin lisättiin 750 µl ACW2-puskuria, avattiin venttiilit ja annettiin imeytyä. Suljettiin venttiilit ja pipetoitiin pylväisiin 750 µl absoluuttista etanolia. Avattiin venttiilit ja annettiin imeytyä. Suljettiin pumppu ja pylvään tulppa. Asetettiin pylväs puhtaaseen 2 ml keräysputkeen ja sentrifugoitiin 14000 rpm kolmen minuutin ajan. Sen jälkeen siirrettiin pylväs uuteen 2 ml keräysputkeen ja kuivattiin korkki auki lämpökaapissa 56 °C, 10 minuuttia. Kuivauksen jälkeen pylväs siirrettiin 1,5 ml keräysputkeen ja lisättiin 45 µl AVE-puskuria membraanin keskelle. Suljettiin putki ja inkuboitiin kolme minuuttia huoneenlämmössä. Lopuksi putki sentrifugoitiin yhden minuutin ajan 14000 rpm ja pakastettiin (-20 °C).



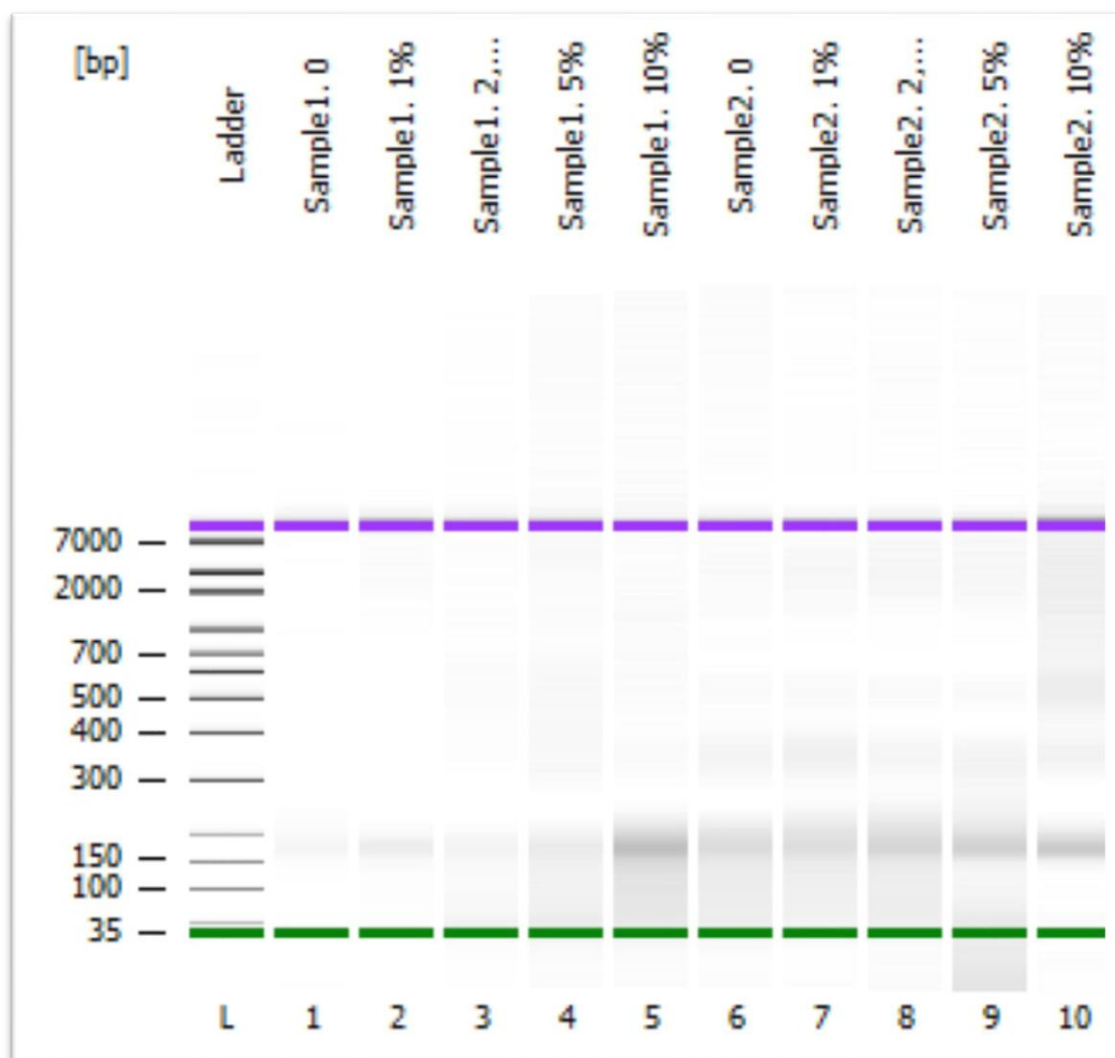
KUVIO 4. Extenderien poistamisen jälkeen pylväisiin pipetoitiin ACW1-puskuria.

2.5 cfDNA:n pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen

cfDNA:n koon määrittämisessä käytettiin Agilent High Sensitivity DNA Kit –määrittämissarjaa ja Agilent 2100 Bioanalyzer –laitetta, jossa elektroforeesiajo suoritettiin (Agilent Technologies). Menetelmän avulla pystytään tunnistamaan kooltaan 50–7000 bp olevia DNA-fragmenteja sekä määrittämään niiden pitoisuus näytteessä. Määrittäminen suoritettiin Biocenter Oulu Sequencing Centerin toimesta valmistajan ohjeen mukaan.

3 TULOKSET

Kuviossa 5 on esitetty Agilent High Sensitivity DNA Kit-määrityssarjan (Agilent Technologies) elektroforeesiajon tulokset näytteiden sisältämän DNA:n kokojakaumasta. Y-akselilla on esitetty koko emäspareina (bp) ja x-akselilla näytteet vasemmalta lukien: L = kokostandardi, 1–5 = näytteen 1 laimennossarjan näytteet: 0 %, 1 %, 2,5 %, 5 % ja 10 % ja 6–10 = näytteen 2 laimennossarjan näytteet: 0 %, 1 %, 2,5 %, 5 % ja 10 %.



KUVIO 5. Kuviossa on esitetty elektroforeesiajon tulokset, joista voi nähdä näytteiden kokojakauman. Y-akselilla koko emäspareina (bp) ja x-akselilla näytteet vasemmalta lukien: L = kokostandardi, 1–5 = näytteen 1 laimennossarjan näytteet 0 %, 1 %, 2,5 %, 5 % ja 10 % ja 6–10 = näytteen 2 laimennossarjan näytteet 0 %, 1 %, 2,5 %, 5 % ja 10 %.

Tuloksista voidaan päätellä, että elektroforeesiajo onnistui hyvin ja kokostandardi oli ajolle sopiva. Näytteiden DNA-fragmentit olivat keskimäärin 150–200 emäsparin (bp) kokoisia. Varsinkin näytteen 2 laimennossarjassa näkyy hyvin se, että vyöhyke 150–200 bp kohdalla tummenee, kun näytteen cfDNA-pitoisuus kasvaa, eli esim. kaivon 8 vyöhyke (0 %) on haaleampi verrattessa kaivon 12 (10 %) vyöhykkeeseen. cfDNA:n eristys näytteistä onnistui menetelmällä hyvin, sillä saadut DNA-fragmentit sopivat kooltaan cfDNA:ksi, eikä ajossa havaita suurempikokoista DNA:ta (joka olisi osoitus solunsisäisestä DNA:sta). Elektroforeesiajon tulokset osoittavat myös sen, että onnistuimme eristämään cfDNA:ta kaikista laimennossarjan näytteistä, sillä jokaisen näytteen kohdalla näkyy cfDNA:ta. Käyttämämme cfDNA-eristysmenetelmä sopii eristykseen näin ollen myös silloin, kun cfDNA:n määrä näytteessä on vähäinen.

Näytteen 1 ja näytteen 2 plasmat ovat kahdelta eri henkilöltä. Kuviossa 6 nähtävien tulosten perusteella näytteen 2 eri pitoisissa näytteissä voitiin havaita olevan enemmän cfDNA:ta. Näytteiden 1 ja 2 cfDNA:n määrien erot johtunevat yksilöiden välisestä normaalista vaihtelusta. cfDNA:n määrä plasmassa voi vaihdella yksilöiden välillä 1–100 ng/ml (eli 1–100 pg/μl) (Qiagen 2013).

Vaikka näyttää siltä, että jokaisessa näytteessä on vyöhyke 150–200bp alueella, analyysista saatujen, kuviossa 6 näkyvien, tulosten mukaan selviä tuloksia saatiin vain seuraaville näytteille:

Näyte 1; 1 %: DNA fragmentin koko 175 bp, pitoisuus 43,41 pg/μl

Näyte 1; 5 %: DNA fragmentit 52 bp (54,18 pg/μl), 170 bp (21,93 pg/μl) ja 178 bp (17,4 pg/μl)

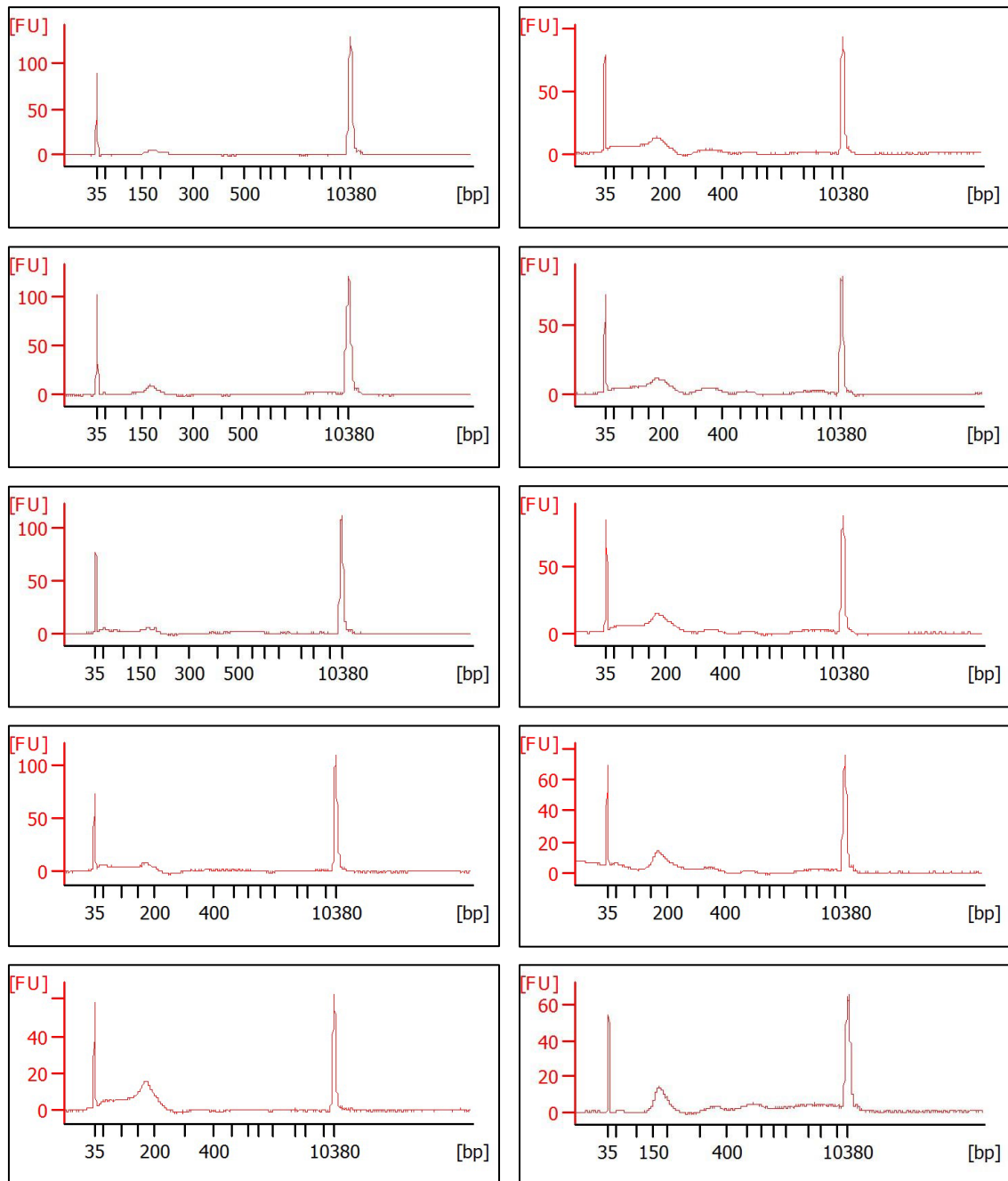
Näyte 1; 10 %: DNA fragmentit 171 bp (80,26 pg/μl) ja 177 bp (78,77 pg/μl)

Näyte 2; 0 %: DNA fragmentit 176 bp (53,82 pg/μl) ja 182 bp (70,84 pg/μl)

Näyte 2; 5 %: DNA fragmentti 172 bp (108,16 pg/μl)

Näyte 2; 10 %: DNA fragmentti 173 bp (263,98 pg/μl) ja 10192 bp (71,47 pg/μl)

Elektroforeesiajon (kuvio 5) tuloksissa erottuva näkyvä vyöhyke on siis noin 175 bp:n kokoinen DNA fragmentti.



KUVIO 6. Kuviossa on esitetty Agilent 2100 Bioanalyzer –laitteella saadut tulokset yksittäisille näytteille. Ensimmäisessä sarakkeessa vasemmalta luettuna ovat näytteen 1 laimennossarjan näytteet ylhäältä alas: 0 %, 1 %, 2,5 %, 5 % ja 10 % ja toisessa sarakkeessa näytteen 2 laimennossarjan näytteet kuten edellä. X-akselilla on esitetty DNA fragmentin koko (bp) ja Y-akselilla fluoresenssin voimakkuus (FU). 35 bp ja 10380 bp kohdalla näkyvät piikit ovat minimi- ja maksimistandardit. Noin 177 bp kohdalla olevat huiput edustavat tutkittavaa cfDNA:ta.

4 POHDINTA

Tämän tutkimusluontoisen opinnäytetyön tavoitteena oli perehtyä kirjallisuuden avulla verenkierron esiintyvään solunulkoiseen DNA:han ja pohtia sen merkitystä syövän biomarkkerina. Työn empiirisessä osuudessa teimme verinäytteistä eroteltuun plasmaan cfDNA-laimennossarjan, eristimme näytteistä cfDNA:n ja määritimme sen pitoisuudet kussakin näytteessä. Pyrkimyksenä oli selvittää, kuinka hyvin cfDNA saadaan eristettyä valitulla menetelmällä ja kuinka puhdasta se on solunsisäisestä DNA:sta.

Menetelmänä cfDNA:n eristämiseen käytettiin kaupallista QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit-määrityssarjaa (A Qiagen/ BD Company). cfDNA:n koon määrittämisessä käytettiin Agilent High Sensitivity DNA Kit –määrityssarjaa ja Agilent 2100 Bio-analyzer-laitetta, jolla elektroforeesiajo suoritettiin (Agilent Technologies). Menetelmän avulla pystytään tunnistamaan kooltaan 50–7000 bp olevia DNA-fragmentteja sekä määrittämään niiden pitoisuus näytteessä.

Tulosten perusteella voidaan päätellä, että cfDNA:n eristys näytteistä onnistui valitulla menetelmällä hyvin. Saadut DNA-fragmentit vastasivat kooltaan cfDNA:ta, eikä ajotuloksissa havaittu suurempaa DNA:ta, joka viittaisi solunsisäiseen DNA:han. Tulokset osoittavat myös sen, että onnistuimme eristämään cfDNA:ta kaikista laimennossarjan näytteistä, sillä jokaisen kaivon ajotuloksissa näkyi cfDNA:ta. Menetelmän voidaan näin ollen todeta sopivan cfDNA:n eristykseen myös silloin, kun sen määrä näytteessä on vähäinen.

Mitattaessa veren cfDNA:n pitoisuutta täytyy ottaa huomioon pitoisuuden luonnollinen variaatio. cfDNA:n määrä veressä on yksilöllistä ja pitoisuus voi vaihdella huomattavasti sekä syöpää sairastavien yksilöiden välillä että terveiden yksilöiden välillä. Havaitsimme tämän variaation myös työssämme näytteiden 1 ja 2 välillä, joiden plasmat olivat peräisin kahdelta eri henkilöltä. Artikkelissaan Kustanovich, Schwartz, Peretz & Grinshpun (2019) kertovat, että syöpäpotilaan cfDNA määrä vaihtelee 0–5 nanogrammasta millilitrassa yli 1000 nanogrammaan millilitrassa, kun taas terveillä vaihteluväli on 0–100 ng/ml. Toisaalta Gold, Cankovic, Furtado, Meier & Gocke mainitsevat vuonna 2015 tehdyssä artikkelissaan, että tutkimuksessa terveen kontrollihenkilön plasman cfDNA pitoisuus oli jopa 1000 ng/ml. Tästä voidaan päätellä, että kohonnut cfDNA pitoisuus ei ole aina merkki syövästä. cfDNA:n kohoamista voivat aiheuttaa mm. elimistön tulehdukset, diabetes, kudosaivuri, verenmyrkytys tai sydäninfarkti. Myös hyvälaatuiset elimistön stressitilat voivat nostaa

veren cfDNA-pitoisuutta, kuten esimerkiksi liikuntasuoritus, raskaus tai kudossiirrännäinen. (Kustanovich ym. 2019.) Lisäksi täytyy ottaa huomioon, että myös näytteenotto- ja näytteenkäsittelytapa voivat vaikuttaa eristetyn cfDNA:n pitoisuuteen.

Tämä opinnäytetyö ja saadut tulokset voivat auttaa optimaalisen cfDNA-pitoisuuden määrittämisessä molekyylipatologisia menetelmiä varten ja tulevia tutkimuksia silmällä pitäen.

LÄHTEET

Bettegowda, C. Sausen, M., Leary, R.J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B.R., Wang, H., Luber, B., Alani, R.M., Antonarakis, E.S., Azad, N.S., Bardelli, A., Brem, H., Cameron, J.L., Lee, C.C., Fecher, L.A., Gallia, G.L., Gibbs, P., Le, D., Giuntoli, R.L., Goggins, M., Hogarty, M.D., Holdhoff, M., Hong, S-M., Jiao, Y., Juhl, H.H., Kim, J.J., Siravegna, G., Laheru, D.A., Lauricella, C., Lim, M., Lipson, E.J., Kazue, S., Marie, S.K.N., Netto, G.J., Oliner, K.S., Olivi, A., Olsson, L., Riggins, G.J., Sartore-Bianchi, A., Schmidt, K., Shih, L-M., Oba-Shinjo, S.M., Siena, S., Theodorescu, D., Tie, J., Harkins, T.T., Veronese, S., Wang, T-L., Weingart, J.D., Wolfgang, C.L., Wood, L.D., Xing, D., Hruban, R.H., Wu, J., Allen, P.J., Schmidt, M., Choti, M.A., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Papadopoulos, N. & Diaz Jr, L.A. 2014. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med.* 2014 Feb 19; 6(224): 224ra24.

Burke, E. 2014 Circulating tumor DNA: A new generation of cancer biomarkers. *Genome Advance of the Month.* National Human Genome Research Institute.

Gold, B., Cankovic, M., Furtado, LV., Meier, F., Gocke, CD. 2015. Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility? A report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2015;17(3):209-224. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.02.001

Heizer, E., Ulz, P. & Geigl, J.B. 2015; 61:1. 112-123. Review: Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *American Association for Clinical Chemistry.*

Isomursu, A., Kononen, J. & Kuopio, T. 2015. 131 (5): 424-32. Verenkierron solunulkoinen DNA syövän merkkiaineena. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim.*

Knuutila, A. 2016. Keuhkosityöpä. *Lääkärin tietokannat / Lääkärin käsikirja.* Kustannus Oy Duodecim. Päivitetty 14.6.2018.

Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T., Grinshpun A. 2019. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(8):1057-1067. doi:10.1080/15384047.2019.1598759

Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M. & Yaros, M.J. 1977. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy.

Qiagen 2013. Circulating nucleic acid handbook. Third edition.

Salomaa, E-R. 2016. Keuhkosityöpä. Lääkärikirja Duodecim. 7.9.2016

Stewart, CM., Kothari, PD., Mouliere, F., Mair, R., Somnay, S., Benayed, R., Zehir, A., Weigelt, B., Dawson, SJ., Arcila, ME., Berger, MF. & Tsui DWY. 2018. The value of cell-free DNA for molecular pathology. *J Pathol.* 2018;244(5):616-627. doi:10.1002/path.5048

Performance Characteristics of the High Sensitivity DNA Kit for the Agilent 2100 Bioanalyzer System, Technical Note. (Viitattu 30.5.2020) <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5990-4417EN.pdf>

Tirri, R., Lehtonen, J., Lemmetyinen, R., Pihakaski, S. & Portin, P. 2001: Biologian sanakirja. Otava, Keuruu.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Jr, Kinzler, K.W. 2013. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013;339: 1546–1558