



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Ekaterina Pylsy

*Tautia aiheuttavien geenivarianttien identifiointi suomalaisilta periytyviä silmäsairauksia sairastavilta potilailta*

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

15.11.2020

Tekijä Otsikko	Ekaterina Pyly Tautia aiheuttavien geenivarianttien identifiointi suomalaisilta periytyviä silmänsairauksia sairastavilta potilailta
Sivumäärä Aika	44 sivua + 3 liitettä 15.11.2020
Tutkinto	Bioanalytikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	ryhmänjohtaja ja silmätautien erikoislääkäri Joni Turunen, Folkhälsanin tutkimuskeskus väitöskirjatyöntekijä Pauliina Repo, Folkhälsanin tutkimuskeskus lehtori Merja Ojala, Metropolia AMK lehtori Heidi Malava, Metropolia AMK
<p>Opinnäytetyö toteutettiin Folkhälsanin tutkimuskeskuksessa Silmägenetiikan tutkimusryhmässä. Työn tavoitteena oli tunnistaa periytyviä silmänsairauksia aiheuttavia geenivirheitä; suomalaisille suonikalvoston melanoomaa sairastaville potilaille suoritettiin <i>BAP1</i>-kasvunrajoitegeenin mutaatioanalyysi ja <i>NLRP3</i>-geenivirhe analysoitiin periytyvästä sarveiskalvotulehduksesta kärsiviltä potilailta. Monet perinnölliset taudit aiheutuvat yhden geenin mutaatiosta. Uudet sekvensointitekniikat ovat osoittaneet, että yhdellä yksilöllä voi olla jopa 3,5 miljoonaa muutosta koko genomissa, joista useimmilla ei ole haitallisia terveysvaikutuksia. Yksittäisen taudin geneettistä taustaa selvitettyä variaatio tuo hankaluuksia, kun joukosta tulisi löytää sairauden aiheuttava muutos. <i>BAP1</i>-geenin ituratamutaatiot altistavat harvinaiselle silmänsyövälle, suonikalvoston melanoomalle (uveamelanooma, UM). <i>NLRP3</i>-geenin mutaatio c.61G&gt;C aiheuttaa vallitsevasti periytyvän autoinflammatorisen sarveiskalvotulehduksen nimeltään <i>keratitis fugax hereditaria</i>.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli jatkaa tutkimusryhmän aiempaa tutkimusta <i>BAP1</i>- ja <i>NLRP3</i>-geenivarianttien identifiointiksi sekä niiden kantajien tunnistamiseksi. Mutaatioanalyysissä käytettävä genominen DNA eristettiin potilaan kokoverinäytteestä, jonka jälkeen DNA-näytteiden pitoisuus mitattiin ja DNA laimennettiin. Mutaatioanalyysit suoritettiin Sanger- tai seuraavan sukupolven eksomisekvensointi menetelmillä. <i>NLRP3</i>-analyysissä analysoitiin eksoni 1, jossa aiemmin löydetty mutaatio c.61G&gt;C istuu. UM-potilaiden näytteet analysoitiin eksomisekvensoinnilla, jonka tuloksista poimitaan <i>BAP1</i>-geenin kaikki eksoniset variantit. Eksomisekvensointilöydökset varmistetaan Sanger-sekvensoinnilla.</p> <p>Suomessa periytyviä <i>BAP1</i>-mutaatioita on löytynyt ~2,0 %:lta suonikalvoston melanoomaa sairastavilta potilailta ja varianttia c.61G&gt;C <i>NLRP3</i>-geenissä kantaa 0,02 % suomalaisista sekä 0,01 % muista eurooppalaisista väestöistä. Molemmista tapauksissa tautien harvinaisuus tuo haasteita sairauksien diagnosointiin ja perinnöllisten syiden selvittäminen parantaa sairauksien tunnistamista ja hoitoa. Tässä työssä prosessoitiin 63 suonikalvoston melanoomapotilaan tutkimusnäytteet analysoitavaksi <i>BAP1</i>-kasvunrajoitegeenin mutaatioanalyysiin. Aikaisempien tutkimusten perusteella vain noin yhden heistä arvioidaan kantavan patogeenista <i>BAP1</i>-varianttia. Viideltä <i>keratitis fugax hereditariaa</i> sairastavalta potilaalta todettiin <i>NLRP3</i>-geenin c.61G&gt;C variantti.</p>	
Avainsanat	<i>BAP1</i> , <i>NLRP3</i> , UM, DNA, PCR, Sanger-sekvensointi, eksomisekvensointi

Author Title	Ekaterina Pylysy Identification of disease-causing gene variants from Finnish patients with inherited ophthalmic diseases
Number of Pages Date	44 pages + 3 appendices 15 October 2020
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Joni Turunen, Principal investigator Pauliina Repo, PhD student Merja Ojala, Lecturer Heidi Malava, Lecturer
<p>The thesis was carried out at the Folkhälsan Research Centre in the Eye Genetics Research Group. The aim of the thesis was to identify inherited genetic defects that cause eye diseases. Tumor suppressor <i>BAP1</i> mutation analysis was carried out in Finnish patients with uveal melanoma (UM), and <i>NLRP3</i> mutation analysis in the patients with inherited corneal inflammation called <i>keratitis fugax hereditaria</i>. Many genetic diseases are caused by a mutation in a single gene. New sequencing techniques have shown that a single individual can have up to 3.5 million changes in the entire genome, most of which do not have adverse health effects. In determining the genetic background of individual disease, variation presents difficulties when a disease-causing change should be found in the population.</p> <p>The aim of the thesis was to continue the research group's previous efforts to identify pathogenic <i>BAP1</i> and <i>NLRP3</i> gene variants and identify their carriers. Germline mutations in the <i>BAP1</i> gene predispose to rare eye cancer, uveal melanoma. The mutation c.61G&gt;C in the <i>NLRP3</i> gene causes inherited corneal autoinflammatory disease. The genomic DNA used in the mutation assays was isolated from the patient's whole blood sample, after which the DNA concentration was measured and the DNA was diluted. Mutation analyzes were performed using Sanger or next-generation exome sequencing methods. The <i>NLRP3</i> assay analyzed exon 1, where the mutation c.61G&gt;C is located. Samples from UM patients were analyzed by exome sequencing, from which all exonic variants of the <i>BAP1</i> gene are extracted. Exome sequencing findings are confirmed by Sanger sequencing.</p> <p>In Finland, <i>BAP1</i> mutations have been found in ~2.0% of patients with uveal melanoma and variant c.61G&gt;C in the <i>NLRP3</i> gene is carried by 0.02% of Finns and 0.01% of other European populations. In both cases, the rarity of diseases presents challenges in diagnosing diseases, and identifying hereditary causes improves the identification and treatment of diseases. In this study, 63 samples of patients with uveal melanoma were processed for further analysis of <i>BAP1</i>. Based on previous studies only one of them will carry a pathogenic <i>BAP1</i>. The c.61G&gt;C variant was detected in five patients tested for the <i>NLRP3</i> gene defect.</p>	
Keywords	<i>BAP1</i> , <i>NLRP3</i> , UM, DNA, PCR, Sanger sequencing, exome sequencing

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Periytyvät sairaudet	2
2.1	Mutaatiotyypit	3
2.2	Geenitestaus	4
3	Geenivirheiden tutkiminen	5
3.1	DNA:n eristys	5
3.2	DNA puhtauden ja pitoisuuden mitta	6
3.3	Polymeraasiketjureaktio (PCR)	6
3.4	Agaroselektroforeesi (AGE)	7
3.5	Eksomisekvensointi	8
3.6	Sanger-sekvensointi	8
4	<i>BAP1</i> -geenivirheet ja periytyvä alttius suonikalvoston melanoomalle	9
4.1	<i>BAP1</i>	9
4.2	Periytyvä alttius suonikalvoston melanoomalle	10
5	<i>NLRP3</i> -geenivirhe ja periytyvä sarveiskalvotulehdus Suomessa	13
5.1	<i>NLRP3</i>	13
5.2	Periytyvä sarveiskalvotulehdus	14
6	Tarkoitus ja tavoitteet	15
7	Opinnäytetyön menetelmät	16
7.1	Tutkimusnäytteet	16
7.2	Laitteet ja reagenssit	17
7.3	DNA eristys	19
7.4	DNA puhtauden ja pitoisuuden mitta	22
7.4.1	Nanodrop-spektrofotometri	22
7.4.2	Qubit-fluorometri	22
7.5	DNA-näytteiden laimennus	23
7.6	<i>BAP1</i> -mutaatioanalyysi eksomisekvensoinnilla	24
7.7	<i>NLRP3</i> -mutaatioanalyysi Sanger-sekvensoinnilla	24
7.7.1	Polymeraasiketjureaktio (PCR)	24
7.7.2	Agaroselektroforeesi (AGE)	26
7.7.3	PCR-tuotteen puhdistus ExoSAP-IT-reagenssilla	27

7.7.4	BigDye-käsittely	28
7.7.5	Kapillaarisekvensointi	29
8	Tulokset	29
8.1	DNA näytteet	29
8.2	<i>BAP1</i> -mutaatioanalyysi	29
8.3	<i>NLRP3</i> -geenin mutaatioanalyysi	30
9	Pohdinta	33
9.1	Tulosten tarkastelu	33
9.2	Tutkimuksen luotettavuus	34
9.3	Eettisyys	36
9.4	Johtopäätökset	37
9.5	Tulosten hyödyntäminen	38
9.6	Kehittämisehdotukset ja haasteet	39
9.7	Ammatillinen kasvu	39
	Lähteet	41
	Liitteet	
	Liite 1. Työn mutaatioanalyysiin kuuluneet näytteet	
	Liite 2. AGE-ajojen tulokset ( <i>NLRP3</i> -geeni)	
	Liite 3. Sekvenssikromatogrammit ( <i>NLRP3</i> -geeni)	

## **Alkulause**

Lämpimät kiitokset Pauliina Repolle ja Joni Turuselle heidän panoksestaan tämän opinnäytetyön suunnittelu- ja toteutumisvaiheessa. Lisäksi haluan esittää kiitokset opinnäytetyötäni ohjanneille Metropolia Ammattikorkeakoulun Bioanalytiikan tutkinto-ohjelman lehtori Merja Ojalalle ja Heidi Malavalle, heidän tuesta ja avusta kirjoittaa tämä opinnäytetyö sekä arvokkaista korjausehdotuksista.

Opinnäytetyö oli antanut hyvät edellytykset hankkia oman alan erikoistietoja ja -osaamista. Olen erittäin kiinnostunut geeniteknisestä laboratoriotyöskentelystä ja opinnäytetyö tutkimusryhmässä antoi mahdollisuuden tutustua geenitekniikan tieteellisiin ja käytännön sovelluksiin. Olen hyvin innostunut aiheesta ja siihen liittyvästä tutkimustyöstä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli esittää asiat mahdollisimman havainnollistavasti ja selkeästi, jotta myös alaa vähän huonosti tuntevat voisivat kiinnostua aiheesta.

Helsingissä 15.11.2020

Ekaterina Pylysy

## Lyhenteet

Agaroosi	Agarista puhdistettu galaktoosipitoinen neutraali polysakkariidifraktio, jota käytetään mm. elektroforeesigeleissä.
Alleeli	Samanpaikkaisen vastingeenin vaihtoehtoinen muoto.
Aluke	PCR-reaktiossa (kts. PCR) tarvittava oligonukleotidi, johon DNA-polymeraasi lisää nukleotideja muodostaen polymeerin.
bp	Emäspari. Kaksijuosteisen DNA:n tai RNA:n pienin rakenneyksikkö, base pair.
DNA	Deoksiribonukleiinihappo, periytyvän tiedon kantaja-aine.
FIMM	Institute for Molecular Medicine Finland, Suomen molekyyli lääketieteen instituutti.
PCR	Polymeraasiketjureaktio. Kaksisäikeisen DNA-juosteen monistustekniikka <i>in vitro</i> .
RT	Huoneenlämpöinen, room temperature.
SNP	Yhden nukleotidin muutos, single nucleotide polymorphism.
UM	Uveamelanooma.

## 1 Johdanto

Silmän kehityksestä vastaavat geenit tunnetaan erityisen hyvin ja mutaatiot näissä geeneissä voivat aiheuttaa silmän rakennepoikkeavuuksia (Kivelä – Majander – Sankila 2016: 232). Osa silmäsairauksista on myös muiden kuin silmän kehityksestä vastaavien geenien aiheuttamia. Mutaatiot näissä geeneissä voivat altistaa kasvaimille tai ne voivat aiheuttaa sarveiskalvon sameutumia. (Valle 1966; Walpole ym. 2018.) Suomalaiseen tautiperintöön kuuluu useita erilaisia silmätauteja ja yleisimpien silmäkasvainten kehityksessä geenivirheillä on merkittävä osuus. Harvinaisten silmäsairauksien selvittäminen ja niiden taustalla olevien geenien toiminnan tunteminen on diagnostiikassa tärkeää, koska tämä edesauttaa geenihoidon kehitystä. (Kivelä ym. 2016: 232-233.)

DNA eli deoksiribonukleinihappo sisältää perintötekijät eli geenit. Geenien ansiosta ihminen kykenee kehittymään, toimimaan ja siirtämään informaatiota jälkeläisilleen. Solun jakautumisen yhteydessä geenit siirtyvät tytärsolulle. DNA replikoituu eli kahdentuu ennen solun jakautumista ja molemmat tytärsolut saavat kopion perintötekijöistä. Geenit rakentuvat proteiineja koodaavista eksoneista ja niiden välissä olevista introneista eli geenit ovat epäjatkuvia. Eksoneita vastaava emäsjärjestys on valmiissa lähetti-RNA:ssa. Ihmisen genomissa on keskimäärin 23 000 proteiineja koodaavaa geeniä, josta ainoastaan vähäinen osa ihmisen DNA:n emäsparista tarvitaan varastoimaan informaation proteiinien aminohappojärjestyksestä. (Suominen – Ollikka 2004: 15.)

Eri ihmisyksilöiden genomit eli kaikki geenit eroavat toisistaan arvioltaan 0,1 %. Enemmän kuin 90 % ihmisten välisistä eroista johtuvat yhden nukleotidin muutoksista (SNP). Nämä muutokset keskittyvät variaatiokohtiin, jotka sijaitsevat keskimäärin 100-300 emäksen välein. Yksilöiden välisiä eroja kutsutaan yhden nukleotidin polymorfismiksi. (Heino – Vuento 2009: 187–188.) Useimmilla muutoksilla ei ole haitallisia terveysvaikutuksia, mutta monet geenitaudit voivat johtua yhden nukleotidin muutoksesta (Aittomäki – Moilanen – Perola 2016: 14).

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tunnistaa harvinaisia geenivirheitä, jotka aiheuttavat kahta periytyvää silmäsairautta. Suomalaisille suonikalvoston melanoomaa sairastaville potilaille suoritettiin *BAP1*-kasvunrajoitegeenin mutaatioanalyysi ja *NLRP3*-geenivirhe analysoitiin periytyvää sarveiskalvotulehdusta (*keratitis fugax hereditaria*) sairastavilta potilailta. Työn aikana tutkimukseen osallistuvien potilaiden DNA eristettiin kokoverestä,



jonka jälkeen *BAP1*-kasvunrajoitegeenin mutaatioanalyysi suoritettiin seuraavan sukupolven eksomisekvensoinnilla ja *NLRP3*-analyysi Sanger-sekvensoinnilla. Opinnäytetyö toteutettiin Folkhälsanin tutkimuskeskuksessa silmägenetiikan tutkimusryhmässä.

## 2 Periytyvät sairaudet

DNA on suurikokoinen molekyyli ja sen monistaminen on monivaiheinen tapahtuma. Arvioiden mukaan virheitä muodostuu solun perimään vähintään kerran jokaisen solunjakautumisen yhteydessä. Toiset emäsparit ovat alttiimpia virheille kuin toiset ja pienimmät muutokset voivatkin olla vain yhden emäksen suuruisia. Solut pyrkivät säilyttämään genominsa mahdollisimman muuttumattomana korjaamalla DNA:han tulevia virheitä. Tästä huolimatta variaatioita syntyy. (Vuorio 2002: 33-34.) Kerran tapahtunut DNA:n muutos periytyy solusukupolvesta toiseen (Kääriäinen – Sipponen 2002: 22). Ituradan eli sukusolujen DNA:n muutokset mahdollistavat lajin evoluution, mutta voivat aiheuttaa myös periytyviä sairauksia (Kettunen – Palotie 2016: 99). Jokaisella ihmisellä onkin perimässään satoja geenivirheitä, jotka voivat aiheuttaa sairauden tai altistaa taudin puhkeamiselle olosuhteissa, jotka lisäävät tautiriskiä. Kun perimän kaikki geenit tunnetaan, voidaan analysoida vaihteluja geenien luennassa erilaisissa tautitiloissa. (Palotie 2002: 71.)

Periytyvää sairautta sairastavat potilaat ohjataan perinnöllisyysneuvontaan, jossa lääkäri selvittää taudin mahdollista periytymistä suvussa. Jos suvussa on useita sairaita, sukupuu voi paljastaa Mendelin sääntöjen mukaisen periytymistavan, vaikka diagnoosi ei ole vielä selvillä. Kun usealla sukulaisella on samanlainen sairaus, taudin perinnöllisyyttä on helppo epäillä. Heidän tietonsa voivat kertoa taudin ominaispiirteistä ja voivat auttaa diagnoosin tekemisessä. (Pöyhönen – Aittomäki 2016: 37.) Perinnöllisyysklinikkoita Suomessa on kaikissa yliopistosairaaloissa sekä Helsingissä Väestöliiton perinnöllisyysklinikka ja Folkhälsanin ruotsinkieliselle väestölle tarkoitettu vastaava klinikka (Kääriäinen – Sipponen 2002: 7).

Perinnöllisyyslääketiede eroaa muista lääketieteenaloista, koska asiakkaana on potilaan lisäksi mahdollisesti myös muita sukulaisia. Sukupuiden antaman tiedon ja geenitutkimusten avulla voidaan sukulaisten parista löytää yksilöt, joilla itsellään tai heidän jälkeläisillään on suurentunut riski sairastua. Perinnöllisyysneuvonta auttaa perhettä löytämään parhaan mahdollisen tavan sairauden välttämiseksi ja ohjaamaan riskiyksilöt seurantaan tutkimuksiin. Perinnöllisten tautien tunnistamista vaikeuttaa tapausten harvalukuisuus. (Aula – Kääriäinen – Leisti 2002: 13.)

Harvinaisia perinnöllisiä sairauksia sairastaa noin 6 % suomalaisesta väestöstä eli noin 200 000 suomalaista. Harvinaiset perinnölliset sairaudet koskevat monia perheitä ja niillä on huomattavasti suurempi kansanterveydellinen merkitys kuin on ajateltu. Sairaudet ovat yleensä koko elämän kestäviä ja monioireisia, ja tämä vaikuttaa terveydenhuollon kustannuksiin ja palveluihin. Kansainvälistymisen myötä sairauksien maantieteellinen esiintyvyys murtuu ja ennestään meille tuntemattomia perinnöllisiä sairauksia on tullut osaksi jokapäiväistä kliinisen genetiikan diagnostiikkaa. (Aittomäki ym. 2016: 15-16.)

## 2.1 Mutaatiotyypit

Perimästä löytyy suuri määrä erilaisia ja erimuotoisia mutaatioiden aiheuttamia variaatioita. Variaatiolla tarkoitetaan perimän tarkoin määritettyä kohtaa, jossa esiintyy ihmisten välillä vaihtelevia muotoja eli alleeleja. Mutaatio voi tapahtua joko ituradan soluissa tai somaattisissa soluissa. Ituradan mutaatiot syntyvät sukusoluissa ja periytyvät vanhemmilta jälkeläisille. Somaattisissa soluissa tapahtuvat mutaatiot syntyvät hedelmöityksen jälkeen ja eivät luonnollisesti periydy. (Kettunen – Palotie 2016: 99-101.)

Mutaatioita on hyvin erityyppisiä. Yksi emäs voi muuttua toiseksi (emäksen vaihdos eli substituutio). Muutama nukleotidi voi poistua DNA-jaksosta (häviämä eli deleetio). DNA-jaksoon voi liittyä muutamasta ylimääräisestä emäksestä koostuva DNA-pätkä (liittymä eli insertio). Osa DNA-jaksosta voi kopioitua kahteen kertaan (kahdentuma eli duplikaatio, insertion erikoismuoto). Osa DNA:sta voi muuttua käänteiseksi (kääntymä eli inversio). Kaksi DNA-jaksoa eri puolilta perimää voivat vaihtaa paikkaa keskenään (siirtymä eli translokaatio). (Kettunen – Palotie 2016: 100.) Muutoksia on erilaisia ja suurin osa tutkittavista geenivirheistä on tunnettuja pistemutaatioita, joissa yksi nukleotidi on vaihtunut toiseksi (Horelli-Kuitunen – Orpana 2016: 118).

Emäksen vaihdokset proteiinia koodaavilla alueilla eivät ole sattumanvaraisia. Vaan johduvat siitä, että proteiinien sekvenssit ja biologiset toiminnat ovat konservoituneita ja patogeeninen variantti vaikuttaa proteiinin rakenteeseen tai syntyvään proteiinin määrään. Koodaaville alueille syntyviä mutaatioita on erilaisia. Hiljaiset mutaatiot eivät vaihda aminohappoa polypeptidisekvenssissä, missense-mutaatiot vaihtavat aminohapon ja nonsense-mutaatiot lopettavat proteiinisynteesin ennen aikaa. Mutaatiot, jotka sijaitsevat perimässä tai säätelyalueella ovat haitallisimpia, koska ovat vahingollisia elimistön toiminnalle. Emäksen vaihdokset, deleetiot ja insertiot proteiinia koodaamattomilla aluilla (lukuun ottamatta säätelyalueita ja RNA:n silmukoitumiseen vaikuttavia alueita) ovat

yleensä harmittomia, koska nämä alueet eivät vaikuta merkittävästi geenin ilmentymiseen. (Kettunen – Palotie 2016: 101.)

## 2.2 Geenitestaus

Geenitestaus perustuu tekniikkoihin, joilla luetaan yhden tietyn geenin sekvenssiä ja etsitään siitä mutaatioita, joiden päätellään olevan kyseisen sairauden tai oireiden syynä (Kääriäinen 2016: 368). Monogeeniset eli geenien aiheuttamat periytyvät sairaudet, jotka ilmenevät aikuisiällä ovat geenitestauksen yleisin kohde. Kun esimerkiksi sairautta aiheuttava geenivirhe perheessä tunnetaan, voidaan geenitutkimuksella selvittää suvun jäsenten sairastumisriskiä. Tässä tilanteessa oireettomilla suvun jäsenillä on mahdollisuus taudin ennaltaehkäisevään hoitoon tai tieto sairaudesta voi auttaa varautumaan tulevaan. (Kääriäinen 2016: 364.)

Uuden sekvensointitekniikan ansiosta on mahdollisuus tutkia suuria geenijoukkoja sekä edetä koko perimän tutkimuksen saakka. Geneettisten muutosten tunnistamiseen käytettävän menetelmän valintaan vaikuttaa, millainen on haettavan muutoksen oletettu luonne: yksittäinen yhden nukleotidin käsittävä pistemutaatio tai suurikokoinen, tuhansia emäspareja sisältävä rakennemuutos. Menetelmän valintaan vaikuttaa myös tutkimukseen käytettävä näytemäärä. Monissa harvinaisissa sairauksissa potilaita voi olla hyvin vähän ja geenitesti suoritetaan yhdestä tai muutamasta näytteestä kerrallaan. Molekyylogeneettiset tutkimukset tehdään tavallisemmin veren valkosoluista ja tutkimuksia varten DNA eristetään näytteestä. (Horelli-Kuitunen – Orpana 2016: 109-112.)

Suorassa geenidiagnostiikassa käytetään monia eri menetelmiä ja useimmat pohjautuvat polymeerasiketjureaktioon (PCR), jossa tutkittava geenialue monistetaan miljooniksi kopioiksi. Monistustuotteesta voidaan tutkia geenialueen rakennetta tai virheitä. PCR-menetelmässä on kuitenkin rajoituksensa, koska voidaan monistaa vain muutamien tuhansien nukleotidien pituisia alueita. Tämä soveltuu vain kooltaan suhteellisiin pieniin mutaatioihin, kuten pistemutaatioihin tai pieniin rakennemuutoksiin. (Horelli-Kuitunen – Orpana. 2016: 116.)

Sekvensointitekniikassa mutaatiot tutkitaan selvittämällä emäsjärjestys sekvensointireaktiolla. Sekvensointitekniikoita ovat mm. perinteinen Sanger-sekvensointi ja uuden sukupolven sekvensointi. Uuden sukupolven sekvensoinnissa selvitetään emäsjärjestys

hyvin suuresta kohdemäärästä. Molemmat sekvensointireaktiot perustuvat DNA-polymeraasiin ja nukleotidin lisäämiseen. (Horelli-Kuitunen – Orpana 2016: 119-121.)

Uudet sekvensointimenetelmät ovat osoittaneet, että yksilöllä voi olla noin 3,5 miljoonaa muutosta koko genomissa, joista useimmilla ei ole haitallisia terveysvaikutuksia. Yhden geenin geenivirheiden aiheuttamia tauteja (ns. monogeenisiä) tunnetaan jo useita tuhansia. Yksittäisen taudin geneettistä taustaa selvitetessä variaatio tuo hankaluuksia, kun joukosta tulisi löytää sairauden aiheuttava muutos. Geneettisten tutkimusten tulosten tulkinta ei ole aina yksiselitteistä. (Aittomäki ym. 2016: 14.) Arvioitaessa geenivarianttien patogeenisuutta, on otettava huomioon sen vaikutus tuotettavan proteiinin toimintaan ja geeniin liitetyn taudin ilmiäsuun ja periytymistapaan. Jos samanlaista muutosta ei havaita normaaliväestössä tai sen on aiemmin todettu liittyvän tautiin, tämä puoltaa mutaation patogeenisuutta. (Horelli-Kuitunen – Orpana 2016: 121.)

Siitä huolimatta, että perimän geenivariantit tavallisesti toistuvat väestöstä toiseen, on tapauksia, joissa eri väestöissä tietyntyyppiset geenivariantit liittyvät eri tavalla tutkittuihin tauteihin ja ominaisuuksiin. Geenivariantit vaihtelevat eri väestöissä, joten tulosten tulkinta sekä yleistettävyyks voi olla hankalaa populaatioiden välillä. Toisaalta tulosten toistuessa samankaltaisina populaatiosta toiseen, se on luotettava todiste niiden merkittävyydestä. Väestöjen erilaisuuksia voidaan analyysissä jonkin verran korjata tilastollisilla menetelmillä, mutta geneettisten tutkimusten tulokset on varmistettava aina siinä väestössä, mihin sen tuloksia aiotaan soveltaa. (Aittomäki ym. 2016: 14.)

### **3 Geenivirheiden tutkiminen**

#### **3.1 DNA:n eristys**

Genominen DNA eristetään kokoverestä mutaatioanalyysijä varten. Eristyksessä näyte puhdistetaan epäpuhtauksista kuten proteiineista ja solukalvojen osista. DNA eristetään mahdollisimman ehjänä. DNA on pitkää ja ohutta rihmaa, joka pilkkoutuu liian voimakkaassa käsittelyssä esimerkiksi pipetoinnin aikana. Myös sekoitukset on tehtävä erityisen hellävaraisesti. (Suominen ym. 2013: 105-106.)

Kromosomaalisen, suurikokoisen DNA:n eristäminen aloitetaan keräämällä soluja verestä, valkosoluista. Sen jälkeen solut käsitellään hajotuspuskurilla, jolloin solut hajoavat. Nukleiinihapot puhdistetaan proteiineista ja saostetaan isopropanolilla. Nukleiinihapot

saostuvat yhdenarvoisten kationien läsnä ollessa suolana, kun liuokseen lisätään isopropanolia. DNA kerätään talteen sentrifugoimalla putken pohjalle. DNA-sakka pestään etanolilla ja liuotetaan lopuksi puskuriin. (Suominen – Ollikka 2004: 64.)

### 3.2 DNA puhtauden ja pitoisuuden mittaaminen

Nukleiinihappoliuosten pitoisuuden mittaamiseen käytetään pienoisspektrofotometreja ja -fluorometreja, joissa voidaan mitata DNA-pitoisuus hyvin pienestä määrästä näytettä. Yleisemmin käytetty DNA-mittausmenetelmä perustuu DNA:n nukleotidien absorptioon aallonpituusalueella 260 (nm). (Suominen – Ollikka 2004: 67.)

Puhtaan DNA-liuoksen absorptio 260 nm:ssä on 1,0 ja se vastaa DNA-konsentraatiota 50 µg/ml. Proteiinien absorptiomaksimi on noin 280 nm:ssä. Puhtaan DNA:n absorptiosuhde näissä aallonpituuksissa on:  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,8$ . Absorbanssisuhde pienenee proteiini- ja RNA-kontaminaatioissa ja suurenee RNA:n, oligonukleotidien tai vapaiden nukleotidien läsnäollessa. (Suominen – Ollikka 2004: 67-68.)

### 3.3 Polymeerasiketjureaktio (PCR)

Polymeerasiketjureaktion (PCR) avulla monistetaan lyhyitä DNA-jaksoja. Monistettavat alueet sijaitsevat kahden DNA-jakson välissä, joiden nukleotidijärjestys tunnetaan hyvin. DNA:n monistusta varten tarvitaan templaatti-DNA, alukkeet, lämpöä kestävä polymeerasientsyymi, dNTP:t eli deoksinukleotidit ja puskuriliuos. DNA-polymeerasi ei inaktivoitu korkeissa lämpötiloissa. Polymeerasientsyymi on muunneltu rekombinantti DNA-polymeerasi, joka on eristetty termofiilisestä *Thermus sp.* bakteerista, joka ilmenee *E. coli*-sella. (Suominen ym. 2013: 153–155.) Korkeat lämpötilat parantavat reaktion spesifisyyttä, koska riittävän korkeassa lämpötilassa alukkeet kiinnittyvät ainoastaan oikeisiin kohtiin ja virheellinen kiinnittyminen vähenee (Suominen – Ollikka 2004: 108).

Templaattina toimii kaksijuosteinen DNA. Alukkeet kiinnittyvät kaksinauhaisen DNA:n eri juosteisiin monistettavan DNA-alueen vastakkaisiin päihin ja alukkeiden väliin jäävä alue monistetaan. Ensin DNA pitää denaturoida yksijuosteiseksi kuumennuskäsittelyllä, jotta alukkeet voivat sitoutua templaattiin. Lämpötilaa lasketaan hetkellisesti, jotta alukkeet kiinnittyvät templaattiin niille komplementaariseen kohtaan. Lämpötilaa nostetaan ja DNA-polymeerasi alkaa liittämään reaktioseoksessa olevia vapaita nukleotidejä alukkeeseen 3'-päähän templaatin mallin mukaan, jolloin tapahtuu pidennysreaktio. Templaatin

kummallekin nauhalle muodostuu vastinnauha alukkeista alkaen. Lämpötila jälleen nostetaan ja nauhat irtoavat toisistaan. Yksi sykli muodostuu denaturaatiosta, alukkeiden kiinnityksestä ja pidennysreaktiosta. Syklejä toistetaan useita peräkkäin, jolloin saadaan monistettua suuria määriä DNA-jaksoja. (Suominen ym. 2013: 153–155.)

PCR on kontaminaatiolle herkkä menetelmä. Kontaminoivat DNA:t, jotka eivät ole peräisin monistettavasta näytteestä, saattavat saada aikaan virheellisiä tuloksia. Kontaminoiva DNA:kin voi monistua ja alkuperäisen näytteen DNA saattaa tulla kokonaan syrjäytetyksi reaktiossa. (Suominen – Ollikka 2004: 111.)

### 3.4 Agarosielektroforeesi (AGE)

Noin 0,1–50 kb kokoisia DNA fragmentteja voidaan erotella ja analysoida agarosigeelielektroforeesilla (AGE). Agarosi on merilevästä eristettävä polysakkaridi, joka liukenee veteen kiehumisen aikana ja jäähtyy muodostaen hyytelömäisen geelin. DNA:n kulkeutumiseen AGE:ssa vaikuttaa agarosipitoisuus ja DNA:n muoto. (Suominen – Ollikka 2004: 72-75.)

Nukleiinihappojen kulkeutuminen AGE:ssa perustuu DNA:n negatiiviseen sähkövaraukseen. Nukleiinihappoissa oleva fosfaattiryhmä antaa nukleiinihappoille happaman ominaisuuden ja voimakkaan negatiivisen sähkövarauksen. (Suominen – Ollikka 2004: 17.) Sähkökentässä DNA kulkeutuu negatiivisesti varautuneena positiivista napaa eli anodia kohti. DNA kulkee agarosigeelissä, jonka verkkorakenne hidastaa kulkeutumista sitä enemmän, mitä suurempikokoista DNA on. Pidemmät DNA-molekyylit kulkeutuvat hitaammin kuin lyhyemmät DNA-molekyylit. Ja mitä tiheämpää geeli on, sitä hitaammin DNA kulkeutuu. (Suominen – Ollikka 2004: 72.)

DNA ei näy agarosigeelissä ilman väriainetta. Väri tunkeutuu nukleiinihappojen emästen väliin. Kun DNA-värikompleksia säteilytetään ultraviolettivalolla, emäkset absorboivat UV-säteitä ja luovuttavat saamaansa energian fluoresoivalle väriaineelle. Agarosielektroforeesilaitte koostuu ajoaltaasta, altaan pohjalla kummassakin päässä olevista elektrodeista ja turvakannesta. (Suominen – Ollikka 2004: 72-73.)

### 3.5 Eksomisekvensointi

Eksomisekvensointi on perimän laaja tutkimus, joka käsittää perimän proteiineiksi ilmenyvän osan eli eksomin nukleinihappojen emäsjärjestyksen sekvensoinnin. Kaikki perimän eksonit muodostavat yhdessä eksomin. Eksoni on geenin koodittava osa, DNA-jakso, jota vastaava emäsjärjestys on lähetti-RNA:ssa. Eksomisekvensoinnissa sekvensoidaan ainoastaan noin 1,5 % koko genomista, jolloin voidaan sulkea ulkopuolelle koko perimän suuren variaatiomäärän analysointi ja yhtä aikaa menetetään mahdollisuus identifioida eksomin ulkopuoliset muutokset. (Horelli-Kuitunen – Orpana 2016: 119-121.)

Uuden sukupolven sekvensoinnissa jokaisesta nukleotidin onnistuneesta lisäämisestä saadaan mitattava signaali ja sekvenssi muodostuu lyhyistä fragmenteista, jotka tietoteknisin keinoin järjestetään pitkäksi sekvenssiksi. Saatua sekvenssiä verrataan tunnettuun normaaliin referenssiksekvenssiin ja analyysiohjelmalla tunnistetaan yhdenkin nukleotidin erot luotettavasti. On hankalaa tulkita, milloin löydetty variaatio vaikuttaa niin merkityksellisesti proteiinin rakenteeseen, että kysymyksessä on tautia aiheuttava muutos. Translaation lopetuskodoniin liittyvät tai proteiinin toiminnan kannalta kriittiselle alueelle ulottuvat aminohappomuutokset voivat aiheuttaa proteiinin puuttumisen tai proteiinin toiminnan häiriintymisen. (Horelli-Kuitunen – Orpana 2016: 119-121.)

### 3.6 Sanger-sekvensointi

Sangerin menetelmässä monistetaan sekvensoitavat alueet ensin PCR-reaktioissa, jonka jälkeen saadut PCR-tuotteet sekvensoidaan emäsjärjestyksen selvittämiseksi (Horelli-Kuitunen – Orpana 2016: 119). Sangerin menetelmä perustuu polymeerasientsyymiin ja muokattuihin nukleotideihin eli dideoksinukleotideihin (ddNTP), joiden avulla luodaan sattumanvaraisesti eripituisia DNA-fragmentteja. Kapillaarsekvensointi on korvanut geelissä ajettavan elektroforeesin, mutta menetelmän toimintaperiaate on samankaltainen. Reaktiotuotteet ajetaan samassa kapillaarissa yhtenä näytteenä ja jokaisen ketjun viimeinen nukleotidi (A, C, G, T) tunnistetaan emäskohtaisen fluoresoivan signaalin perusteella. Tulos saadaan digitaalisessa muodossa, graafisena tulosteena ja nukleotidisekvenssinä. (Suominen ym. 2013: 108.)

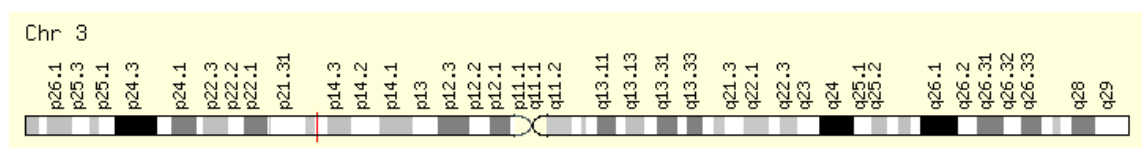
Sekvensointireaktioiden fragmentit erotellaan niiden koon perusteella, jolloin saadaan selville nukleotidien järjestys DNA-juosteessa. Dideoksinukleotidit eroavat deoksi-

nukleotideistä, dideoksinukleotidin molekyylin 3`päässä oleva OH-ryhmä on korvattu ve-  
tyatomilla. Kasvava juoste katkeaa, kun ketjuun liitetään deoksinukleotidien (dNTP) si-  
jasta dideoksinukleotidejä. Polymeraasientsyymi ottaa reaktioseoksesta sattumanvarai-  
sesti normaaleja deoksinukleotidien (dNTP) lisäksi dideoksinukleotidejä. Dideoksi-  
nukleotideihin polymeraasientsyymi ei pysty enää liittämään seuraavaa nukleotidiä vaan  
ketjun työstäminen loppuu dideoksinukleotidiin. Dioksinukleotidit ovat värjättyjä eri fluo-  
resenssileimoilla, omalla värillä ja emäsjärjestyksen selvittäminen perustuu fluoresens-  
sin mittaamiseen. Eri fluoresoivat leimat ovat eri fluoresenssia ja ne mitataan eri aallon-  
pituuksilta. (Suominen ym. 2013: 177–179.)

## 4 *BAP1*-geenivirheet ja periytyvä alttius suonikalvoston melanoomalle

### 4.1 *BAP1*

*BRCA1-associated protein-1 (BAP1)* -geeni sijaitsee kromosomissa 3 alueella 3p21.1, kromosomin lyhyessä varressa (p); alueella 2, raita 1 ja aliraita 1 (kuvio 1). Geeni sisältää 17 eksonia. (Harbour ym. 2010.) *BAP1* on deubikitinoiva entsyymi, se poistaa ubikitiiniä kohdeproteiineistaan. Ubikitiinimolekyylien läsnäolo proteiinissa voi vaikuttaa proteiinin aktiivisuuteen ja sen vuorovaikutukseen muiden proteiinien kanssa. (MedlinePlus 2020.) *BAP1* on myös kasvurajoitegeeni (tuumorisupressori), joka säätelee soluissa mm. transkriptiota sekä DNA:n virheiden korjausta, solusykliä sekä erilaistumista. (Jeansen ym. 1988: 1109.)



Kuvio 1. *BAP1* sijaitsee kromosomissa 3 alueella 3p21.1. (Weizmann Institute of Science 2015.)

Kasvurajoitegeenin tehtävänä on jarruttaa solun kasvua. Kasvunrajoiteproteiinit säätelevät solujen normaalia kasvua ja toimivat mm. solun jakautumisen hillitsevinä kasvutekijöinä, kasvutekijöiden reseptoreina ja edistävät solukuolemaa. (Aaltonen 2002: 198–199.) Kun kasvunrajoitegeenissä tapahtuu sen toiminnan sammuttava mutaatio, tämä vaikuttaa proteiinituotteeseen niin, että se ei enää kykene toimimaan kasvun jarruna.



Kasvunrajoitegeenit toimivat solutasolla tyypillisesti väistyvän geenin tavoin eli molempien alleelien pitää muuttua toimintakyvyttömiksi ennen kuin solu alkaa jakautumaan hallitsemattomasti ilman geenien rajoittavaa vaikutusta. (Aittomäki – Peltomäki 2016: 281.)

Solun normaali toiminta edellyttää tasapainoa onkogeenien ja tuumorisupressorigeenien välillä. Toimiakseen solun kasvua rajoittavana tekijänä, tuumorisupressorina, BAP1-proteiinin täytyy päästä solun tumaan sekä säilyttää deubikitinoiva entsyymiaktiivisuutensa. (Ventii ym. 2008.) Alun alkaen *BAP1* löydettiin sen yhteisvaikutuksesta BRCA1-proteiinin kanssa, mutta sen tuumorigeneesiä ehkäisevät ominaisuudet eivät tämänhetkisen tiedon mukaan ole suoraan yhteydessä tähän vuorovaikutukseen. (Jeansen ym. 1988: 1097.)

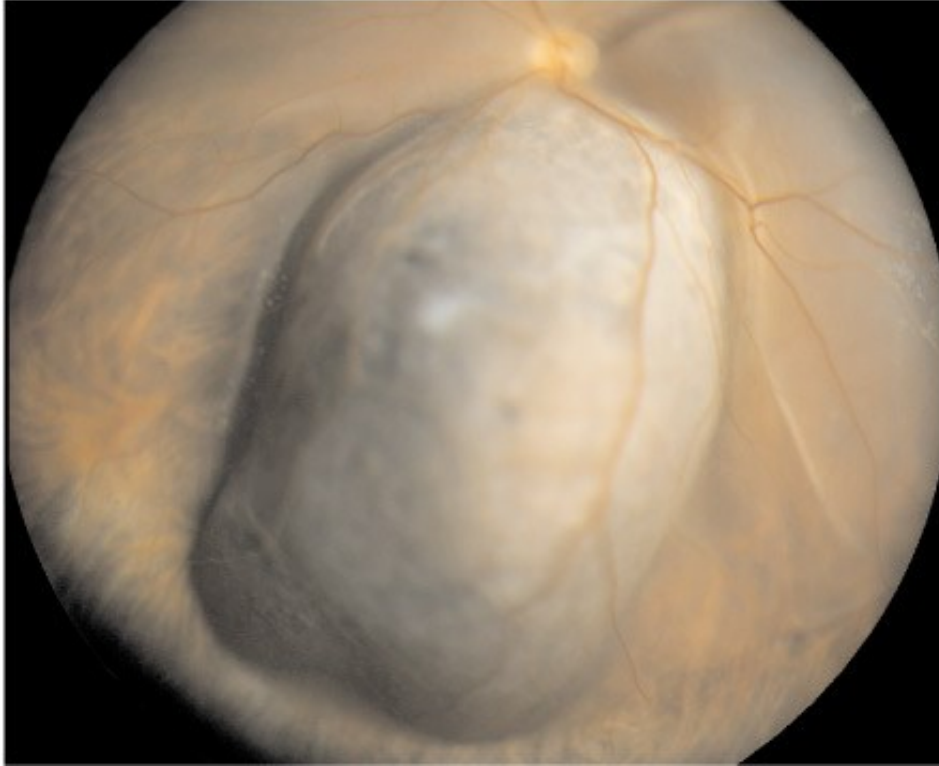
#### 4.2 Periytyvä alttius suonikalvoston melanoomalle

Suonikalvoston melanooma (uveamelanooma, UM) on yleisin aikuisten silmän sisäinen syöpä, mutta harvoin periytyvä. Suomessa uveamelanoomaan sairastuu vuosittain noin 45 ja koko maailmassa noin 6 900 potilasta. Suonikalvoston melanooma (kuvio 2) kuuluu värikkäiden ja sädekehän melanooman kanssa samaan ryhmään. Ne poikkeavat monessa suhteessa ihon ja limakalvojen, kuten silmän sidekalvon, melanoomista. Tämän ryhmän kasvaimilla aiheuttaja on vielä tuntematon, eikä auringonvaloaaltistus näytä olevan merkittävä tekijä kasvaimen synnyssä. (Kivelä 2013.)

Suonikalvoston melanoomaan sairastuu tavallisesti yli 45-vuotiaat, mutta myös nuoremmilla tautia on tavattu. Tummilla roduilla kasvain on hyvin harvinainen. Kasvaimet voivat syntyä pigmenttiluomista. Joka viidennellätoista ihmisellä arvioidaan olevan silmänpohjassaan luomi, josta enintään yksi viidestäsadasta luomesta voi muuttua pahanlaatuisiksi elämän aikana. Viimeaikana on todettu, että osa suonikalvoston melanoomista johtuu peritystä *BAP1*-geenivirheestä ja geenivirheen kantajista noin kymmenesosa sairastuu suonikalvoston melanoomaan. (Kivelä 2013.)

Suurin osa suonikalvoston melanoomista on pitkään oireettomia, jolloin kasvain havaitaan sattumalta esimerkiksi silmälasitarkastuksessa. Suurin osa kasvaimista johtaa näön heikkenemiseen, jonka syynä on tavallisesti kasvainverisuonista tihkuvan nesteen aiheuttama verkkokalvon irtauma. Suuret kasvaimet ja silmänpainetta kohottavat melanoomat voivat aiheuttaa kipua ja punoitusta silmässä. Suonikalvon melanoomat ovat aluksi puolipallon muotoisia ja kasvaimen suurentuessa ja työntyessä suonikalvoston

verkkokalvon alle, sen muoto muuttuu, jolloin kasvain muistuttaa enemmän herkkusieni-  
mäistä muotoa. Suurin osa kasvaimista ovat väriltään tummia, mutta voivat olla myös  
lähes värittömiä. (Kivelä 2013.)



Kuvio 2. Suonikalvon melanooma. (Kuva: Duodecim oppiportti 2013.)

Suonikalvoston melanooma rajoittuu yleensä silmän sisälle, mutta noin joka sadannella  
potilaalla havaitaan levinneisyystutkimuksissa etäpesäkkeitä. Vaikka kasvainsilmä voi-  
daan poistaa, potilaat voivat menehtyä etäpesäkkeisiin. Tämä johtuu todennäköisesti  
siitä, että etäpesäkkeitä aiheuttavat kasvaimet kasvavat hitaasti mutta leviävät hyvin var-  
haisessa vaiheessa, ennen silmäoireiden ilmaantumista, kasvaimen ollessa vielä pieni.  
Suonikalvoston melanooma leviää pelkästään veriteitse, sillä silmässä ei ole imusuonia.  
Suurin osa etäpesäkkeistä leviää maksaan (95%) ja muut yleisimmät leviämispaikat ovat  
keuhkot, iho ja luusto. Silmäkasvain voidaan poistaa leikkauksella, mutta valtaosa mela-  
noomista hoidetaan paikallisella sädetyksellä. Suonikalvon melanoomaa sairastavien  
kymmenvuotiskoolevuus on keskimäärin 40 %. (Kivelä 2013.)

Uveamelanooma kasvaimet ovat geneettisesti suhteellisen yksinkertaisia. Tyypillinen  
uveamelanooma kasvain sisältää joko *GNAQ* tai *GNA11* proto-onkogeenin mutaation,  
jonka lisäksi kasvaimista löytyy tavallisimmin myös tuumorisupressori *BAP1*, *EIF1AX*- tai

*SF3B1*-geenivirhe. Kasvaimet voidaan jakaa kahteen luokkaan, sellaisiin, joissa on *BAP1*-geenivirhe ja sellaisiin, joissa on joko *EIF1AX*- tai *SF3B1*-geenivirhe. Tuumoriluokkien ennusteet eroavat toisistaan merkittävästi, sillä *BAP1*-mutatoituneilla kasvaimilla on taipumuksena lähettää etäpesäkkeitä. (Kivelä ym. 2016: 246.) Lisäksi uveamelanooma kasvaimista löydetään usein isoja kromosomin tason muutoksia, kuten toisen kromosomi 3:n puuttuminen, 8q- tai 6p-käsivarren lisääntyminen (Smit ym. 2019). *BAP1*-geenin virheitä on löydetty myös potilaiden ituradasta, jolloin mutaatio periytyy (Kivelä ym. 2016: 246).

*BAP1*-mutaation kantajilla on muuta väestöä suurempi riski sairastua suonikalvoston melanooman lisäksi myös muille pahanlaatuisille kasvaimille. *BAP1*-mutaatio altistaa kantajansa suonikalvoston melanoomalle (uveamelanooma, UM), keuhkopussin mesotelioomalle, ihomelanoomalle sekä munuaissyövälle. (Walpole ym. 2018: 1328.) Toisin sanoen syöpien taustalta voi löytyä *BAP1*-syöpäoireyhtymä (Pilarski ym. 2016). *BAP1*-syöpäoireyhtymä on korkean riskin syöpäsyndrooma, koska nykytietämyksen mukaan *BAP1*-mutaation kantajan elinaikainen riski sairastua syöpään on ainakin 85% (Walpole ym. 2018: 1335). Suomessa periytyviä *BAP1*-mutaatioita on löytynyt ~2,0 %:lta suonikalvoston melanoomaa sairastavilta potilailta. Nykypäiväisen suosituksen mukaan *BAP1*-geenivirhettä kantaville suositellaan vuosittaista seulontaa silmälääkärin ja ihotautilääkärin toimesta sekä munuaisten kuvantamista. (Kivelä ym. 2016: 246.)

Tyypillisimpiä geenivirheitä ovat *BAP1*-geenin toiminnan rikkovat loss-of-function (LOF) mutaatiot (Walpole ym. 2018). LOF-mutaatiot ovat patogeenisiä tautia aiheuttavia mutaatioita, jotka eivät aiheuta tulkintavaikeuksia kliinisessä työssä. *BAP1*-geenistä on lisäksi löydetty aminohapon muuttavia variantteja, joiden kliininen merkitys on vielä epäselvä (variant of unknown significance, VUS). Potilaiden seuranta on kuormittavaa sekä potilaiden että terveydenhuollon kannalta, joten olisi äärimmäisen tärkeää pystyä kunnolla määrittelemään varianttien vaikutus tuotettavan *BAP1*-proteiinin toimintaan. Tämän vuoksi suomalaisilta uveamelanooma potilailta löytyneitä aminohapon muuttavia *BAP1*-geenivariantteja on tutkittu myös toiminnallisissa kokeissa. (Repo ym. 2019: 9.)

Periytyvälle syövälle altistavat geenivirheet ovat tavallisimmin kasvunrajoitegeeneissä. Peritystä alttiudesta huolimatta syöpäkasvain syntyy useampien tavallisesti elämän aikana kertyneiden mutaatioiden seurauksena. Kasvaimen synty edellyttää proto-onkogeenin eli esisyöpägeenin muutoksen lisäksi myös toisen kasvunrajoitegeeni alleelin

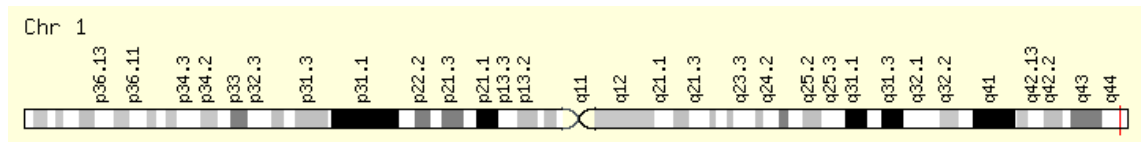
inaktivoitumisen. Periytyvän syövän ominaisuuksiin kuuluu varhainen sairastumisikä, alttius useimpiin primaarituumoreihin sekä tietyn syövän esiintymistä muualla suvussa. Nykyään kohdistetaan huomattavia resursseja periytyvän syöpäalttiuden molekyyligeneettisten taustan tutkimiseen. Tärkeämmät perusteet ovat periytyvän syövän harvinaisuus, joka tuo haasteita syövän diagnosointiin. Tutkimusten avulla voidaan saada apua taudin diagnostiikkaan, hoitoon ja ennaltaehkäisyyn. (Aaltonen 2002: 204-205.)

Tähän mennessä Turusen ja Kivelän tutkimusryhmä on analysoinut *BAP1*-geenin noin 500:lta vuosina 2010-2018 sairastuneelta uveamelanooma potilaalta. Potilaiden rekrytointi on jatkuvaa, ei-selektiivistä ja vuosittain uusia potilaita diagnosoidaan noin 65. Ainoastaan alle 5 % potilaista ovat jättäytyneet tutkimusten ulkopuolelle ja on hyvin todennäköistä, että vuosien 2019-2020 aineisto paljastaa uusia *BAP1*-syöpäsyndroomaperheitä. (Repo ym. 2019.)

## 5 *NLRP3* -geenivirhe ja periytyvä sarveiskalvotulehdus Suomessa

### 5.1 *NLRP3*

*NLR Family Pyrin Domain Containing 3 (NLRP3)* -geeni sijaitsee kromosomissa 1 alueella 1q44, pitkässä varressa (kuvio 3). Geeni sisältää 11 eksonia. *NLRP3*-geeni koodaa pyriinin kaltaista proteiinia, joka osallistuu tulehdusreaktioita säätelevien inflammosomien toimintaan. Inflammosomi käynnistää tulehdusreaktiota ja puolustaa elimistöä ulkopuolisilta uhilta. Proteiini sisältää pyriinidomeenin, nukleotidia sitovan kohdan (NBS) ja leusiinipitoisen toistomotiivin (LRR). Proteiini on vuorovaikutuksessa apoptoosiin liittyvän proteiinin PYCARD / ASC kanssa. Tällä kompleksilla on rooli tulehduksen, immuunivasteen ja apoptoosin säätelyssä. (Masumato ym. 2001.) *NLRP3*-mutaatiot liittyvät muun muassa perinnölliseen kylmäurtikaria oireyhtymään (FCAS), Muckle-Wellsin oireyhtymään (MWS) ja krooniseen infantiiliseen neurologiseen iho- ja nivelten (CINCA) oireyhtymään. Tälle geenille on tunnistettu useita vaihtoehtoisesti silmukoituja transkriptiomuunnelmia, jotka koodaavat erillisiä isoformeja. (Almeida de Jesus – Goldbach-Mansky 2013.)



Kuvio 3. *NLRP3* sijaitsee kromosomissa 1 alueella 1q44. (Weizmann Institute of Science 2015.)

## 5.2 Periytyvä sarveiskalvotulehdus

Periytyvän sarveiskalvon tulehduksen (kuvio 4), *keratitis fugax hereditaria* kuvasi ensimmäisen kerran suomalainen silmälääkäri Olavi Valle vuonna 1964. Muualta maailmasta tautia ei ole vielä raportoitu. Vallen tutkimuksessa oli kymmenen perheenjäsentä neljässä sukupolvessa. (Valle 1966.) Kaksi vuosikymmentä myöhemmin raportoitiin myös toinen perhe (Ruusuvaara – Setälä 1987).

Silmägenetiikan tutkimusryhmä identifioi tautia-aiheuttavan geneettisen muutoksen vuonna 2018 julkaistussa työssä. Tutkimukseen osallistui 30 sairastunutta ja seitsemän tervettä henkilöä seitsemästä eri perheestä. *Keratitis fugax hereditaria* aiheuttaa silmätulehduskohtauksia, jossa silmä särkee ja punoitaa. Silmän tulehduskelliset kohtaukset alkavat lapsuudessa ja toistuvat muutaman kerran vuoden aikana. Oireet tavallisesti häviävät muutamassa päivässä, mutta näköön jää sameutta muutamaksi viikoksi. Kohtaukset uusiutuvat yhdestä kuuteen kertaan vuodessa ja niiden esiintyvyys vähenee aikuisiällä. Osalla potilaista tauti aiheuttaa pysyvän näöntarkkuuden heikentymisen sarveiskalvosamentumien vuoksi. (Turunen ym. 2018.)

Kaikilta Turusen ym. (2018) tutkimuksessa testatuilta potilailta löydettiin *NLRP3*-geenin eksonin 1 missense variantti c.61G>C. Variantti johtaa histidiinin 21 korvaamiseen aspargiinihapolla tuotetussa proteiinissa p.(Asp21His). Tauti ei ole vielä kovin tunnettu maailmalla, mutta eksomitietokannoista päätellen, sitä pitäisi löytyä muistakin eurooppalaisista väestöistä. GnomAD tietokannan mukaan varianttia kantaa 0,02 % suomalaisista sekä 0,01 % muista eurooppalaisista väestöistä. Mutaatio *NLRP3*-geenissä aiheuttaa ilmeisesti tulehdusreaktion silmässä tarpeettoman herkästi. Tauti periytyy autosomaalisesti vallitsevasti, jolloin sairastuneen henkilön on perittävä vain yksi mutatoitunut alleeli yhdeltä vanhemmalta. Tutkimuslöydös helpottaa taudin diagnostiikkaa ja saattaa lähitulevaisuudessa tarjota näille potilaille parempia hoitokeinoja.



Kuvio 4. Sarveiskalvotulehdus (Kuva: Joni Turunen 2018.)

*NLRP3*:n mutaatioanalyysi auttaa *keratitis fugax hereditaria*n diagnosoimisessa myös muissa maissa. Tämä auttaa kartoittamaan taudinkuvan vaihtelua ja voi johtaa uusien *NLRP3*-varianttien tunnistamiseen. Yksi syy siihen, miksi *keratitis fugax hereditaria* ei ole toistaiseksi laajemmin tunnistettu, voi olla joidenkin potilaiden taudin lievä muoto, jolloin se ole tarpeeksi vakava, jotta sitä lähdetään jatkoselvittämään. (Turunen ym. 2018.)

## 6 Tarkoitus ja tavoitteet

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tunnistaa periytyviä silmäsairauksia aiheuttavia geenivirheitä: suomalaisille suonikalvoston melanoomaa sairastaville potilaille suoritettiin *BAP1*-kasvunrajoitegeenin mutaatioanalyysi ja *NLRP3*-geenivirhe analysoitiin periytyvästä sarveiskalvotulehduksesta kärsiviltä potilailta. Mutaatioanalyyseissä käytettävä genomisen DNA eristettiin potilaan kokoverinäytteestä, jonka jälkeen DNA-näytteiden pitoisuus mitattiin ja DNA laimennettiin. *BAP1*-kasvunrajoitegeenin mutaatioanalyysi suoritettiin seuraavan sukupolven eksomisekvensoinnilla ja *NLRP3*-analyysi Sanger-sekvensoinnilla. *NLRP3*-analyysissä analysoitiin eksoni 1, jossa aiemmin löydetty mutaatio c.61G>C istuu (Turunen ym. 2018). UM potilaiden näytteet prosessoitiin valmiiksi

eksomisekvensointiin, jonka tuloksista myöhemmin analysoidaan *BAP1*-geenin eksomiset variantit.

Opinnäytetyöni tarkoituksena oli jatkaa tutkimusryhmän aiempaa tutkimusta haitallisen *BAP1*- ja *NLRP3*-geenivarianttien identifioimiseksi sekä niiden kantajien tunnistamiseksi. Tässä opinnäytetyössä *BAP1*-mutaatioanalyysit kohdistettiin v.2019-2020 diagnosoituihin suomalaisiin suonikalvoston melanoomapotilaisiin. Opinnäytetyön tuloksista voidaan mahdollisesti löytää uusia geenivirhettä kantavia potilaita. Sarveiskalvotulehduksen (*keratitis fugax hereditaria*) taustan selvittäminen on hyvin arvokasta, koska tauti on harvinainen. Tauti on herkästi jäänyt aiemmin tunnistamatta tai sitä on mahdollisesti hoidettu muina sairauksina. Tauti on vielä hyvin tuntematon maailmalla, mutta sitä pitäisi löytyä myös muista eurooppalaisista väestöistä. (Turunen ym. 2018.)

Opinnäytetyön tavoitteena oli osoittaa näytteistä sairautta aiheuttava perimän muutos tai sulkea se pois. Normaalilla tuloksella voitiin sulkea pois kliinisin perustein epäilty perinnöllinen tauti, sekä oli mahdollisuus selvittää geenivirheen periytymistä suvussa ja tunnistaa suvun oireettomat mutaation kantajat. (Horelli-Kuitunen – Orpana 2016: 111.) Potilaat, joilta löytyi patogeeninen variantti, saivat lähetteen perinnöllisyysneuvontaan.

## 7 Opinnäytetyön menetelmät

### 7.1 Tutkimusnäytteet

Sovelaita tässä tutkimuksessa käytettäväksi potilaiksi ovat suomalaissyntyiset henkilöt, joilla diagnosoitiin uveamelanoma (UM) tai joilla on epäily periytyvästä sarveiskalvontulehduksesta. UM-potilaat hoidetaan keskitetysti Helsingin yliopistollisen sairaalan silmätautien klinikassa. UM-potilaiden rekrytointi ja näytteenotto on toteutettu ennen tämän työn aloitusta, *NLRP3*-analyysiin tulevien potilaiden sen aikana.

Suurin osa UM-näytteistä on potilaista, joilla diagnosoitiin uveamelanoma vuosina 2019-2020. UM potilaiden rekrytointi on jatkuvaa ja ei-selektiivistä, jolloin kaikille soveliaille potilaille tarjotaan mahdollisuutta osallistua tutkimukseen. Sarveiskalvotulehduspotilaat (KFG) on rekrytoitu valikoidusti jälkikäteen.

Potilasnäytteet säilytettiin EDTA-putkissa kokoverenä (-20 °C) Folkhälsanin tutkimuskeskuksen laboratoriossa ennen DNA-eristystä. DNA-eristyksen yhteydessä näytteet anonymisoitiin potilastunnistein, joilla näytteet identifioitiin tästä eteenpäin.

## 7.2 Laitteet ja reagenssit

Opinnäytetyö suorituksessa hyödynnettiin Folkhälsanin silmägenetiikan tutkimuslaboratorion laitteita ja välineitä. Laboratoriotyö suoritettiin käyttäen steriilejä reagensseja ja välineitä, jolloin ympäristön mikrobien tai vieraiden DNA-kontaminaatioiden pääsy näytteeseen estyi. Kaikissa laboratoriotöissä käytettiin suojatakia, käsineitä ja sopivia työkenkiä. Taulukossa 1 on esitetty opinnäytetyössä käytetyt laitteet ja niiden toimittajat.

Taulukko 1. Laitteet

Laite ja malli	Toimittaja
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc
Eppendorf® Centrifuge 5810R	Sigma-Aldrich
Spectrafuge 24D	Labnet International, Inc
ProBlot™ 12 Hybridization Oven	Labnet International, Inc
DS-11 Fx + Spectropfotometer / Fluorometer (Nanodrop)	DeNovix
Qubit ® 2.0 Fluorometer	Invitrogen by life technologies
C1000™ Thermal Cycler	BIO-RAD
Elektroforeesilaitte, PowerPac Basic	BIO-RAD
Elektroforeesiallas Owl Separation Systems B1	Thomas Scientific

Taulukossa 2 on esitetty menetelmäkohtaiset reagenssit.



Taulukko 2. Reagenssit

Menetelmä	Reagenssi	Kataloginumero	Valmistaja	Säilytys	
<b>DNA:n eristys kokoverestä</b>	Geneaid™ DNA Isolation Kit	FE20001	Geneaid™	RT	
	Etanoli 70%			RT	
	Isopropanoli 99,8 5			RT	
<b>Konsentraation mitta</b>	Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Q32850 / Q32856	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	RT, Standardit +4	
	Buffer EB Elution Buffer 250 ml	19086	Qiagen	RT	
<b>PCR</b>	ddH <sub>2</sub> O			RT	
	Biotools 10X standard reaction buffer with MgCl <sub>2</sub>		Biotools	-20°C	
	<i>NLRP3</i> varR (aluke), 5'-AAAA-GACTCATCCGTGTGCCG		Sigma	+4°C	
	<i>NLRP3</i> varF (aluke), 5'-GTCTTCCTTCCAC-TCACCCCA		Sigma	+4°C	
	10 mM dNTP Mix	R0191	Thermo Scientific	-25°C - 15 °C	
	Biotools DNA Polymerase (1U/μl)		Biotools	-20°C	
	<b>Agaroosigeelija</b>	Agarose, Molecular Grade	BIO-41025	Bioline	RT
		0,5 x TBE			RT
6 x DNA Loading Dye		R0611	Thermo Scientific	-20°C	
GeneRuler 100 bp DNA Ladder, ready-to-use		SM0243	Thermo Scientific	-20°C	
Midori Green Advance			NIPPON Genetics	+4°C	
<b>Eksosappaus</b>	ExoSAP-IT™ reagent	78201	Thermo Fisher Scientific	15°C-25°C	
<b>BigDye-käsittely</b>	BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	4336697	Thermo Fisher Scientific	15°C-25°C, BigDye® sequencing buffer 4°C.	

### 7.3 DNA eristys

Ituradan DNA eristettiin kokoverestä kaupallisella Blood DNA Isolation Kit (Geneaid Biotech, GEB01K) –tuotteella. DNA eristyksen aikana veren valkosolusolut kerättiin ja hajotettiin hajotuspuskurilla, jotta DNA (kromatidit) saatiin esille. Tämän jälkeen nukleiinihapot puhdistettiin proteiineista. DNA saostettiin isopropanolilla. Sakka sentrifugoitiin Falcon-putken pohjalle, pestiin etanolilla ja liuotettiin lopuksi puskuriin.

#### *Esisivalmistelut*

Näytteet eristettiin noin 4-8 näytteen erissä. Kaikki näytteet käsiteltiin samalla tavalla. Pakastetut EDTA-putket sulatettiin huoneenlämmössä. Näyteputket pidettiin erillään toisistaan ristikontaminaation välttämiseksi. Putket merkittiin huolellisesti ja potilastunnisteet jäljennettiin sekä putken korkkiin että kylkeen. Kaikki reagenssit olivat huoneenlämpöisiä ennen käyttöä. Pipetin kärkeä vaihdettiin aina pipetointien välissä.

#### *Punasolujen hajotus ja valkosolujen pelletointi*

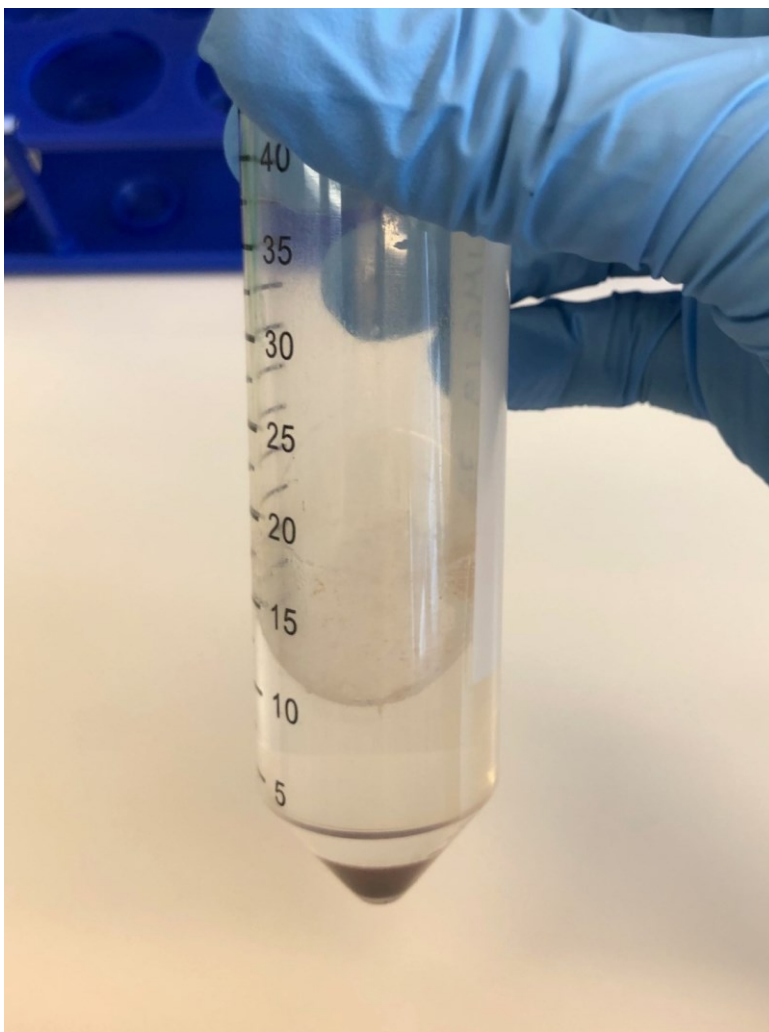
6-10 ml EDTA-verta kaadettiin 50 ml:n Falcon-putkiin, johon lisättiin 30 ml punasolujen hajotuspuskuria (RBC Lysis Buffer). Putket käännettiin ja 5 minuutin seisotuksen jälkeen putkia sentrifugoitiin 3 000 x g:ssa 5-7 minuutin ajan. Sentrifugoinnin jälkeen putken pohjalle muodostui valkosolupelletti (tiivistetty sakka). Supernatantti (hajotetut punasolut) kaadettiin varovasti jäteastiaan kallistamalla putkea vaakatasoon. Putken pohjalle jäi alle 5 ml jäännöspuskuria ja valkosolupelletti. Putkea sekoitettiin Vortex-koeputkiravistelijalla ja resuspensoitiin pipetillä vuoroin, kunnes valkosolupelletti oli täydellisesti resuspensoitunut jäännöspuskuriin. Solumöykät jäännöspuskurissa huonontavat solujen hajoamista ja pienentävät lopullista DNA-saantoa.

#### *Valkosolujen hajotus*

Kun jäännöspuskuri oli tasainen, lisättiin 10 ml valkosolujen hajotuspuskuria (Cell Lysis Buffer) ja putket sekoitettiin Vortex-koeputkiravistelijalla. Putkia seisoitettiin 60°C:ssa uunissa 10 minuutin ajan välillä käänellen/sekoittaen. Uunin jälkeen näytteitä seisoitettiin huoneenlämmössä yön yli.

### *Proteiinin poisto*

4,5 ml proteiinin poistopuskuria lisättiin homogeeniseen näytteeseen ja näytettä sekoitettiin Vortex-koeputkiravistelijalla välittömästi 10 sekunnin ajan. Liuos muuttui ruskeaksi. Näytettä sentrifugoitiin 3 000 x g:ssä 5 minuuttia tiiviin tummanruskean proteiinipelletin muodostamiseksi (kuvio 5). DNA:ta sisältävä liukoinen faasi, supernatantti, jäi putken yläosaan. Liuoksen pinnalla oli aina vaahtoa ja hajoamatonta kudosta, jotka eivät sentrifugoinnin aikana painautuneet putken pohjalle. Näitä poistettiin pipetin kärjellä, jolloin vaahtoa ja proteiinijäämiä tarttuu kärkeen. Supernatantti kaadettiin varovaisesti puhtaan Falcon-putkeen. Kaatamisen aikana putkea pyöräytettiin, jolloin vaahto jäi putken seinälle. Putkia inkuboitiin jäällä 5 minuutin ajan proteiinien saostumisen tehostamiseksi, jonka jälkeen näytettä sentrifugoitiin 3 000 x g:ssä vielä 5 minuuttia. Tämä menettelytapa lisäsi DNA:n puhtautta.



Kuvio 5. Proteiinipelletti (tiivistetty sakka) Falcon-putken pohjalla.

### *DNA-saostaminen*

Kirkas supernatantti siirrettiin uudelleen puhtaaseen 50 ml:n sentrifugiputkeen, johon lisättiin 13,5 ml isopropanolia. Putkea käännettiin varovasti 20 kertaa. Isopropanoli saosti DNA:n näkyväksi rihmaksi (kuvio 6). Näytettä sentrifugoitiin 3 000 x g:ssa 5 minuutin ajan ja supernatantti kaadettiin pois. Näytteeseen lisättiin 10 ml 70 % etanolia pelletin pesemiseksi. Näytettä sentrifugoitiin 3 000 x g:ssä 3 minuutin ajan ja supernatantti kaadettiin varovasti pois, jottei pelletti huuhtoudu pois. Pellettiä ilmakeivattiin 10 minuuttia.



Kuvio 6. DNA-rihma.

### *DNA pelletin liuotus*

Falcon-putkeen lisättiin 80-350 µl DNA-nesteytyspuskuriä pelletin koosta riippuen. Jos pellettiä ei näkynyt, puskuria lisättiin hyvin vähän, ettei DNA:sta tule liian laimea. Jos pelletti tai DNA-rihma jäi putken seinälle, odotettiin pelletin painumista putken pohjalle. Liuotuksen aikana pelletti kirkastui ja liukeni putken pohjalle. Näytteet voitiin siirtää DNA-säilytysputkiin, kun ne olivat lienneet. Falcon-putken pohjaa napautettiin ja katsottiin, ettei pohjalle jää liukenematonta DNA:ta. Näytteet resuspensoitiin pipetillä ja siirrettiin stokkeihin.

## 7.4 DNA puhtauden ja pitoisuuden mittaaminen

DNA-pitoisuutta mitattiin kahdella eri menetelmällä. Ensimmäisessä DNA:n laimennoksessa riitti Nanodrop-spektrofotometrin saama tulos, mutta seuraavissa laimennoksissa DNA-pitoisuus mitattiin Qubit-fluorometrillä, jolloin saatiin tarkempi DNA-pitoisuus DNA-laimennoksille, jotka menivät eksomisekvensointiin.

### 7.4.1 Nanodrop-spektrofotometri

Näytteiden DNA konsentraatio ja puhtaus mitattiin Nanodrop-spektrofotometrillä. Ohjelmaksi valittiin dsDNA kaksijuosteisen DNA:n mittaamiseen. Spektrofotometri nollattiin liuoksella, johon DNA oli liotettu. Stokkiputkien pohjaa naputeltiin DNA-näytteen sekoittamiseksi, jonka jälkeen näyte pyöräytettiin putken pohjalle. DNA-näytettä pipetoitiin detektoriin 1 mikrolitra (µl). Mittauksia tehtiin kaksi ja mittausten tuloksista laskettiin keskiarvo.

### 7.4.2 Qubit-fluorometri

Tarkan DNA-pitoisuuden kvantitatiiviseen määrittämiseen käytettiin kaupallista Qubit® dsDNA BR Assay –kittiä valmistajan ohjeen mukaan. Kitti sisälsi määritysreagenssin, laimennuspuskurin ja kaksi DNA-standardia. Fluoresoiva reagenssi laimennettiin reaktiopuskurilla, joka lisättiin näytteisiin. DNA-pitoisuus luettiin Qubit® -fluorometrillä. Määritys on erittäin selektiivinen kaksijuosteiselle DNA:lle (dsDNA). Yleiset epäpuhtaudet, kuten suolat tai proteiinit eivät häiritse määrittämistä. Qubit-mittaus suoritettiin huoneenläm-

mössä, koska lämpötilan vaihtelut vaikuttavat määrittelyn tarkkuuteen. Lämpötilan vaihteluiden minimoimiseksi reagenssit säilytettiin huoneenlämmössä ja määrittelyputket asetettiin fluorometriin vain ennen mittausta.

Näytteet mitattiin erissä ja jokaisen määrittelyn kohdalla suoritettiin uusi kalibrointi käyttäen kitin standardeja. Putkina käytettiin Qubit-mittaukseen tarkoitettuja putkia. Ainoastaan putken kannet merkittiin, koska putkien kyljen merkitseminen voi häiritä määrittelyä. Näytteet tasapainotettiin huoneenlämmössä noin kahden tunnin ajan ennen mittausta.

10 µl kutakin Qubit-standardia ja 2 µl jokaista näytettä pipetoitiin omiin mittausputkiinsa. Tarvittava DNA määrä oli pieni ja pipetointi oli suoritettava huolellisesti. Qubit-käyttöliuos valmistettiin vasta ennen mittausta. Reagenssi on valoherkkä ja se säilytettiin valolta suojattuna. Käyttöliuos valmistettiin laimentamalla dsDNA BR-reagenssi dsDNA BR-puskuriin laimennussuhteessa 1:200. Putkien lopullinen tilavuus oli 200 µL. Näytteet mitattiin pienimmissä erissä. Valmistettiin käyttöliuos 7 näytteelle, kahdelle standardille ja yhdelle hukkaputkelle (10 kpl). Sekoitettiin 10 µl dsDNA BR-reagenssia 1990 µl:aan dsDNA BR-puskuria. Standardeihin lisättiin 190 µl käyttöliuosta ja näytteisiin 199 µl käyttöliuosta ja sekoitettiin putket Vortex-koeputkiravistelijalla. Putkien annettiin inkuboitua huoneenlämmössä 2 minuuttia. Qubit-fluorometrissa valittiin dsDNA-ohjelma. Standardit luettiin laitteen ohjeen mukaan ja putket asetettiin vuorotellen näytekammioon. Putkien välillä kansi suljettiin.

## 7.5 DNA-näytteiden laimennus

Eksomisekvensointiin lähetettävät UM-potilaiden DNA-näytteet mitattiin portaittain. Eksomisekvensointiin tarvittiin 15 µl DNA:ta 10-12 ng/µl pitoisuudessa. Eristetty DNA-stokki mitattiin Nanodropilla ja näytteistä tehtiin 60 ng/µl välilaimennos EB-puskuriin. EB-puskuri ei sisällä EDTA:ta, joka voi häiritä eksomisekvensoinnin entsyymaattisia reaktioita. Laimennettujen näytteiden konsentraatio mitattiin Qubitilla ja näytteistä valmistettiin edelleen 11 ng/µl laimennos. Jokaisen laimennoksen jälkeen, näytteiden annettiin tasapainottua yön yli jääkaappilämpötilassa tai vähintään 2 tuntia huoneenlämmössä.

Osa näytteistä jouduttiin laimentamaan uudelleen alusta, koska DNA ei asettunut haluttuun konsentraatioon. Jos näytteitä laimennetaan moneen kertaan, kontaminaation riski kasvaa. Näytteitä laimennetaan siten enintään kolme kertaa, jonka jälkeen laimennus aloitetaan stokeista uudelleen.

16 µl laimennettua näytettä siirrettiin lopuksi kuoppalevyille. Avonaisen kuoppalevyn päällä ei työskennelty kontaminaation välttämiseksi. Kuoppalevy peitettiin tarrakannella. Kansi tiivistettiin kuoppalevyn ympäriltä ja jokaisen kuopan kohdalta käyttäen ohutta spaattelia.

*NLRP3*-mutaatioanalyysin näytteistä tehtiin PCR-reaktioita varten 50 ng/µl pitoiset käytölaimennokset. Näytteet mitattiin Nanodrop-spektrofotometrilla ja laimennettiin steriiliin veteen.

#### 7.6 *BAP1*-mutaatioanalyysi eksomisekvensoinnilla

UM-potilaiden eksomisekvensointi suoritettiin laboratoriossa valmistetuille DNA-laimennoksille ulkoistetusti Suomen molekyyli lääketieteen instituutissa (FIMM). Sekvenssikirjastojen valmistukseen käytettiin kaupallista Human Core Exome –kittiä (Twist Bioscience) ja sekvensointi suoritettiin Novaseq S4-sekvensointijolla (PE101, Illumina).

Eksomisekvensoinnin toteutus sekä varianttien identifointi jäävät tämän opinnäytetyön vaatimustason ulkopuolelle eikä sitä eritellä tarkemmin. Eksomisekvensointitulokset analysoidaan *BAP1*-geenin varianttien osalta. Variantit tarkastellaan IVG:stä, joka on genomiikan visualisointityökalu ja varmistetaan variantit sekvensoimalla.

#### 7.7 *NLRP3*-mutaatioanalyysi Sanger-sekvensoinnilla

Sanger-sekvensointia varten *NLRP3*-geenin eksoni 1 monistettiin polymeraasiketjureaktiolla (PCR). PCR-reaktioiden onnistuminen analysoitiin agarosigeelielektroforeesilla, reaktiot puhdistettiin entsymaattisesti (Exosapit) ja leimattiin varsinaista kapillaarsekvensointia varten fluoresoivasti (BigDye). Kapillaarsekvensointi tehtiin ulkoistetusti FIMMillä (FIMM: Suomen molekyyli lääketieteen instituutti). Lopuksi sekvenssit tarkasteltiin Sequencher 5.4.6 -ohjelmalla.

##### 7.7.1 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

Työskentelyalue oli pidettävä mahdollisimman puhtaana ja pipetointiin käytettiin filterikärkiä, jotka estävät aerosoleja siirtymästä pipetin sisäosiin ja sieltä mahdollisesti muihin reaktioputkiin. PCR-reaktiot tehtiin jäällä soveltuviissa mikrosentrifuugiputkissa. Mukaan

tehtiin aina negatiivinen kontrollireaktio ulkopuolelta tulevan DNA-kontaminaation pois-sulkemiseksi. PCR-mix valmistettiin taulukossa 3 olevan ohjeen mukaan. Polyme-raasientsyymi lisättiin aina viimeisenä. Reagenssien määrät laskettiin tarvittavalle näy-temäärälle.

Taulukko 3. PCR-mix yhdelle näytteelle

Reagenssi	Määrä (1x)
ddH <sub>2</sub> O Biotools DNA Polymeraasi	14,9 µl
Biotools 10x standardi reaktiopuskuri	2,0 µl
F-aluke 5 µM	0,65 µl
R-aluke 5 µM	0,65 µl
10 mM dNTP Mix	0,2 µl
Biotools DNA Polymeraasi (1U/µL)	0,6 µl
DNA (50 ng/µl)	1,0 µl
Yhteensä:	20µl

Työssä käytetyt alukkeet on esitetty taulukossa 4. Alukkeet laimennettiin (F-aluke ja R-aluke) 100 µM:sta 5 µM:siksi. Negatiiviseen kontrolliin pipetoitiin vain PCR-mixin rea-genssit.

Taulukko 4. *NLRP3*-alukkeet

Aluke	Alukkeen emäsjärjestys
<i>NLRP3</i> varF (aluke)	5'-AAAAGACTCATCCGTGTGCCG
<i>NLRP3</i> varR (aluke)	5'-GTCTTCCTTCCACTCACCCCA

PCR-reaktiot ajettiin automatisoiduilla koneilla, joihin oli ohjelmoitu reaktioketjun vuorot-taisten vaiheiden lämpötila ja kesto (taulukko 5). PCR koneessa DNA-fragmenttien määrä kasvoi joka kierroksella eksponentiaalisesti, jolloin saatiin riittävä määrä DNA:ta sekvensointia varten (Vuorio 2002: 42).



Taulukko 5. PCR-ohjelma

Vaihe	1	2	3	4	5	6
Lämpötila (°C)	94	94	60	72	72	8
Aika	10 min	45 s	45 s	1 min	10 min	∞
34 sykliä						

### 7.7.2 Agaroosielektroforeesi (AGE)

PCR-reaktioiden puhtauden sekä onnistumisen tarkastelemiseksi valettiin 1,5 % agarosigeeli 0,5 x TBE-puskuriin (Tris-boraatti-EDTA-puskuri). Tarvittava määrä agarosia punnittiin, sekoitettiin puskuuriin ja kiehautettiin useaan kertaan mikroaaltouunissa, kunnes kaikki agarosio oli sulanut. Seokseen lisättiin Midori Green-väriainetta ja sekoitettiin varoen. AGE:ssa DNA-jaksot saadaan UV-valossa näkyviksi värjäämällä geeli valettaessa Midori Green-väriaineella. Sula agarosiseos kaadettiin ajokelkkaan, jonka päät oli teipattu kiinni vuotamisen estämiseksi ja näytekampa asetettiin paikalleen. Geelin annettiin jäähtyä ja jähmettyä noin 20 min. Geelin jäähtyttyä teipit ja näytekampa poistettiin ja geeli asetettiin ajolaitteeseen. Ajolaite oli täytetty 0,5 x TBE-puskurilla niin, että agarosigeeli juuri ja juuri peittyi sen alle.

Näytteet valmistettiin AGE-ajoon sekoittamalla kuoppalevyllä 5 µl PCR-tuotetta, 2 µl 6x LoadingDye:ta ja 3 µl steriiliä vettä (taulukko 6). PCR-reaktion on oltava ajopuskuria raskaimpia, jotta ne asettuvat tasaiseksi kerrokseksi agarosigeelin näytekaivojen pohjalle (Suominen – Ollikka 2004: 73). Näytteisiin lisättiin LoadingDye:ta tiheyden lisäämiseksi ja väriainetta seuraamaan ajon edistymistä. Näytteet pipetoitiin geelin yläreunassa oleviin näytekoloihin. Näytteiden molemmiin puolin lisättiin 7,5 µl kokostandardia. Kokostandardina toimii DNA, joka on pilkottu entsyymillä tunnetun kokoisiksi fragmenteiksi (Suominen – Ollikka 2004: 74).

Lopuksi turvakansi asetettiin ajolaitteen päälle ja yhdistettiin virtalähteeseen. Geeliä ajettiin 80-100 V jännitteellä, kunnes ajorintama oli edistynyt noin 2 cm. Geeli nostettiin varovaisesti pois ajolaitteesta ja kuvattiin UV-valossa. DNA-fragmentit fluoresoivat UV-valossa ja niistä otettiin kuva. Vyöhykkeet (bändit) näkyivät sitä paremmin, mitä enemmän

niissä oli DNA:ta. Kun verrataan DNA-vyöhykkeen kulkemaa matkaa kokostandardin kulkemaan matkaan, voidaan päätellä DNA-vyöhykkeen koko (Suominen – Ollikka 2004: 75-76).

Taulukko 6. AGE-näytteen valmistus

Reagenssit	Määrä (1x)
PCR-tuote	5 µl
6x LoadingDye	2,0 µl
ddH <sub>2</sub> O	3 µl
Yhteensä:	10 µl

### 7.7.3 PCR-tuotteen puhdistus ExoSAP-IT-reagenssilla

Onnistuneesti monistunut PCR-reaktio puhdistettiin ExoSAP-IT-puhdistusreagenssilla ennen sekvensointia. ExoSAP-IT-reaktio poistaa PCR-reaktiosta ylimääräiset alukkeet ja sitoutumattomat nukleotidit. Puhdistusreagenssi koostuu kahdesta hydrolyyttisestä entsyymistä puskurissa, muunnetusta eksonukleaasi I:stä ja katkarapujen alkalisesta fosfataasista (SAP). Exonukleaasi I poistaa ylimääräiset alukkeet ja mikä tahansa PCR:n aikana tuotettu yksijuosteinen DNA. SAP poistaa jäljellä olevat nukleotidit PCR-seoksesta, jotka voivat häiritä myöhempiä reaktioita. (Thermo Fisher Scientific 2020.)

10 µl:aan PCR-näytettä pipetoitiin 2 µl ExoSAP-IT -entsyymiseosta. Näytteet pipetoitiin PCR-mikroputkiin. Reaktiota inkuboitiin 37 °C:ssa 30 minuutin ajan PCR-koneessa. Tämän jälkeen inkuboitiin 80 °C:ssa 15 minuutin ajan, jotta Exosap- It™ -reagenssi inaktivoituu. Exosappaus-ohjelma on esitetty taulukossa 7. Käsitelty PCR-tuote säilytettiin -20 °C:ssa, kunnes sitä tarvittiin.

Taulukko 7. Exosappaus-ohjelma

Vaihe	1	2	3
Lämpötila (°C)	37	80	8
Aika	30 min	15 min	∞

#### 7.7.4 BigDye-käsittely

BigDye-käsittely tehdään ennen sekvensointia ja sen tarkoituksena on lisätä muokattuja nukleotidejä PCR-tuotteeseen. BigDye Terminator sisältää muokattuja terminaattorimolekyylejä, jotka lisätään tavallisten nukleotidien joukkoon. Terminaattorimolekyylä pysäyttää DNA-synteesin muokatun nukleotidin kohdalle. Tällä tavoin muodostuu leimattuja DNA-fragmentteja, jotka eroavat pituudeltaan aina yhden nukleotidin verran. (Horelli-Kuitunen – Orpana 2016: 119.)

BigDye-mixit (forward ja reverse) valmistettiin taulukon ohjeen mukaan (taulukko 8), reaktiot tehtiin jäällä ja valoherkkä BigDye Terminator v3.1 RRmix-reagenssi suojattiin valolta käärimällä reagenssi folioon. Forward- ja reverse reaktiot tehtiin erikseen omiin reaktioputkiin. BigDye-mixit valmistettiin viidelle KFG-potilasnäytteelle ja yhdelle varaputkelle. Pipetoinnin aikana menetetään aina jonkin verran liuosta, joten pipetointivaraa kannattaa aina olla.

Taulukko 8. BigDye-mix

Reagenssi	Määrä (1x)
MilliQ H <sub>2</sub> O	5,10 µl
BigDye 5x sekvenssipuskuri	1,75 µl
Aluke (F tai R, 5 µM)	0,65 µl
BigDye Terminator v3.1 RRmix	0,5 µl
Puhdistettu PCR-tuote	2,0 µl
Yhteensä:	10 µl

Näytteet pipetoitiin kuoppalevyille, kuoppalevy suljettiin tarrakannella ja ajettiin BigDye-sekvensointireaktio-ohjelmalla (taulukko 9). Sekvensointireaktio ajettiin ohjelmalla, joka sisälsi 5 eri vaihetta. Kuten polymeraasiketjureaktiossa eri vaiheet suoritettiin eri lämpötiloissa aina tietyn ajan.

Taulukko 9. BigDye-sekvensointireaktio-ohjelma:

Vaihe	1	2	3	4	5
Lämpötila (°C)	96	96	59	60	10
Aika	1 min	10 s	10 s	4 min	∞
29 sykliä					

### 7.7.5 Kapillaarisekvensointi

BigDye-käsiteltyjen PCR-tuotteiden kapillaarisekvensointi ostettiin palveluna FIMM:ltä. FIMM käyttää kapillaarisekvensointiin 3730xl DNA Analyzer- laitetta.

## 8 Tulokset

### 8.1 DNA näytteet

Työssä eristettiin 49 DNA-näytettä. Näytteiden DNA-pitoisuudet Nanodropilla mitattuna sekä niiden puhtaudet on eritelty liitteessä 1. Jokaisen näytteen DNA-eristys onnistui sekä saannoltaan että puhtaudeltaan. Eristettyjä UM-potilasnäytteitä oli 42 kpl ja periytyviä sarveiskalvotulehduspotilaiden näytteitä 5 kpl. UM-potilaat oli merkitty UMG-tunnuksin, sarveiskalvotulehduspotilaat KFG-alkuisin tunnuksin.

*Keratitits fugax hereditariaa* sairastavasta perheestä KEF27, eristettiin neljä erillistä näytettä (KFG2701, KFG2703, KFG2704 ja KFG2705) ja perheestä KEF29 eristettiin yksi näyte (KFG2901). UM-potilaat eivät olleet toisilleen sukua lukuun ottamatta potilaita UMG89-27 ja UMG19-40. Samasta perheestä potilaiden näytteiden lisäksi eristettiin näytteet kolmelta sukulaiselta, joilla ei ole syöpää (UMG19-40-S1, UMG19-40-S2, UMG19-40-S3).

### 8.2 BAP1-mutaatioanalyysi

63 suonikalvoston melanoomapotilaan tutkimusnäytteet prosessoitiin analysoitavaksi BAP1-kasvunrajoitegeenin mutaatioanalyysiin. Eristetyt näytteet laimennettiin ekso-

misekvensointiin. Positiiviset löydökset varmennetaan Sanger-sekvensoimalla, kun tulokset valmistuvat. Aikaisemmin tehtyjen tutkimusten perusteella vain noin yhden suoni-kalvoston melanoomapotilaista arvioidaan kantavan patogeenista *BAP1*-variaatiota.

### 8.3 *NLRP3*-geenin mutaatioanalyysi

*NLRP3*-geenin PCR-reaktion monistuminen varmistettiin AGE:lla. Esimerkki PCR-reaktion AGE:sta on esitetty kuviossa 7. Loput työssä suoritetuista AGE:sta on lisätty työn liitteisiin (liite 2). Indikoitu negatiivinen kontrolli (ei DNA-templaattia) oli puhdas (kuvio 7), jolloin kustakin PCR-reaktiosta nähtävä monistumistuote oli peräisin näytteeseen pipetoidusta potilas DNA-näytteestä. Onnistunut PCR-tuote jatko käsiteltiin ja lähetettiin kapillaarsekvensointiin. Jos negatiivinen kontrolli osoitti vierasperäisen DNA-kontaminaation (kts. liite 2), PCR-reaktio uusittiin alusta, kunnes negatiivinen kontrolli osoitti reaktion olevan puhdas. Uusinnassa reagensseja kuten steriili vesi vaihdettiin ja alukkeet laimennettiin uudelleen puhtauden varmistamiseksi.



Kuvio 7. *NLRP3*-PCR. Negatiivinen kontrolli osoitti reaktioiden olevan vapaita ulkopuolisesta DNA-kontaminaatiosta. Kokostandardi näytti PCR-tuotteen olevan odotetun kokoinen 377 bp.

PCR-tuotteet sekvensoitiin emäsjärjestyksen selvittämiseksi. Sekvenssit analysoitiin Sequencher 5.4.6-ohjelmalla. Analyysiohjelmalla potilaiden *NLRP3* eksonin 1 sekvenssiä verrattiin ihmisen referenssisekvenssiin, joka on saatavilla Ensembl-geenitietokannasta.

Tarkastelemalla sekvenssikromatogrammeja havaittiin potilailta yhden emäksen G>C-muutos (yksi guaniini emäs oli muuttunut sytosiiniksi) verrattaessa referenssisekvenssiin. Mutaation paikkatieto selvitettiin syöttämällä muutos verkkopohjaiseen MutationTaster-sovellukseen. MutationTaster ilmoittaa variaation paikkatiedon ja laskennallisen ennusteen variaation patogeenisuudesta sekä sen mahdollisen esiintymisen tunnetuissa variaatitietokannoissa. Referenssitietokantoihin, kuten MutationTasterin käyttämät 1000G ja ExAC, on kerätty ihmispopulaatioissa esiintyviä tunnettuja variaatioita. Ohjelma toimii sekä proteiini- että DNA-tasolla.

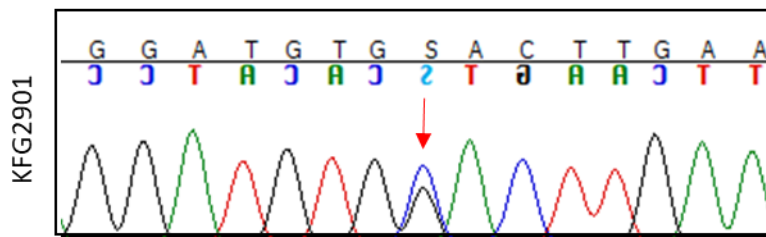
Muutos ilmoitettiin *NLRP3*:n transkriptille ENST00000336119. Muutos määriteltiin ohjeiden mukaisesti. Ohjelma ilmoitti variantin olevan *NLRP3* c.61G>C (kromosomaalinen paikka chr1:247582157G>C) ja sen geneettisen variaatitunnisteen rs200154873 (taulukko 10). Variaatio oli samanlainen kuin laboratorion aiemmin tunnistama *NLRP3*-mutaatio (Turunen ym. 2018: 47). Ensimmäisen eksonin ensimmäinen emäs on numeroltaan yksi ja siitä promootoria kohti eteenpäin mentäessä puhutaan etenemisestä geeniä ”ylävirtaan” (Heino – Vuento 2019: 188). Täten muutos oli koodaavan sekvenssin 61 emäs. Muutos aiheuttaa aminohapon 21 aspargiini muutoksen histidiiniksi (p.Asp21His) eli muutos on yhden aminohapon vaihdos toiseksi (missense-mutaatio).

Taulukko 10. *NLRP3*-geenin aikaisemmin tunnistama mutaatio

Geeni	eksoni	kromosomaalinen paikka	cDNA paikka	Aminohappomuutos	rs tunniste
<i>NLRP3</i>	1	kromosomi 1:247582157	c.61G>C	Asp21His	rs200154873

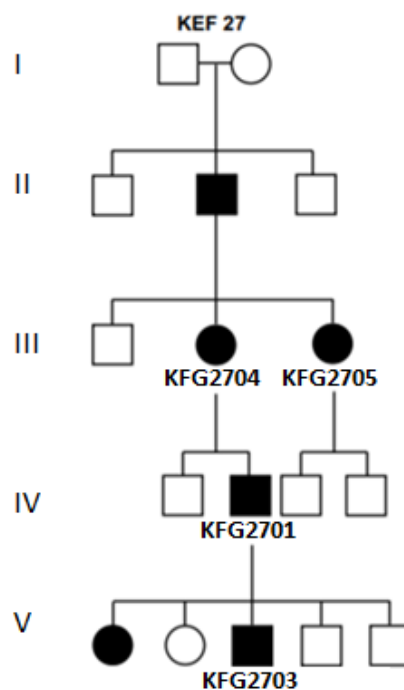
Kuviossa 8 on esimerkki Sequencher 5.4.6 -ohjelmalla visualisoidusta DNA-kromatogrammista, josta voi tulkita emässekvenssin. Kaikki neljä nukleotidejä tunnistettiin fluoresoivan merkkiaineen antaman spesifisen värin perusteella: A eli adeniini = vihreä, T eli tyymiini = punainen, C eli sytosiini = sininen ja G eli guaniini = musta. Kaikista tutkituista näytteistä löydettiin sama pistemutaatio c.61G>C muutos heterotsygoottisena, jolloin toinen alleeli on muuttunut ja toinen alleeli normaali. Positiiviset löydökset varmistettiin uudella Sanger-sekvensointi uudesta DNA-laimennoksesta.

*NLRP3* c.61G>C



Kuvio 8. Esimerkki havaitusta *NLRP3*-muutoksesta. Potilaan KFG2901 sekvenssikromatogrammi, johon heterotsygoottinen muutos on merkitty punaisella nuolella.

*NLRP3*-mutaatioanalyysi suoritettiin perheille KEF29 (KFG2901) ja KEF27 (KFG2701, KFG2703, KFG2704 ja KFG2705). Perheessä KEF29 *NLRP3*-geenivirhe c.61G>C todettiin tutkimukseen perheestä ainoalla osallistuneella potilaalla KFG2901. Perheessä KEF27 geenivirhe löydettiin kaikista tutkimusnäytteistä: III-sukupolven sisaruksilta KFG2704 ja KFG27-05, potilaan KFG27-04 pojalta KFG2701 sekä tämän lapselta KFG2703 (kuvio 9).



Kuvio 9. Sukupuu tutkimukseen osallistuneesta perheestä KEF27. Sukupuu sisältää sisarukset, sisaruksen pojan ja tämän lapsen. Sukupuun neliö tarkoittaa miestä ja ympyrä naista. Sairaats henkilöt on merkitty tummennetuin symbolein.

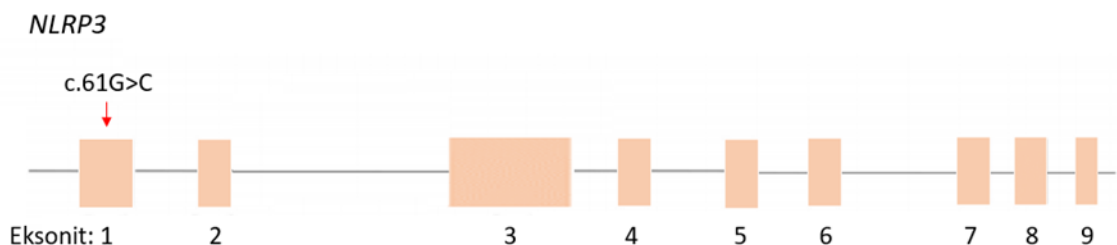
## 9 Pohdinta

### 9.1 Tulosten tarkastelu

DNA eristykset onnistuivat hyvin sekä puhtaudeltaan että saannoltaan. Näytteet olivat riittävän eheitä ja puhtaita eksomisekvensointiin sekä Sanger-sekvensointiin.

*BAP1*: Tässä työssä prosessoitiin 63 suonikalvoston melanoomaa sairastavan potilaan tutkimusnäytteet analysoitavaksi *BAP1*-kasvunrajoitegeenin mutaatioanalyysiin. Eksomisekvensoinnin tulokset eivät ehtineet valmiiksi opinnäytetyön aikana. Voidaan kuitenkin olettaa, pohjautuen aikaisempiin tuloksiin, että vuosina 2019-2020 kerätyistä UM-näytteistä ehkä yhdellä voi esiintyä yksi patogeenisista varianteista. Johtopäätöksissä tarkastellaan näitä aikaisemmin löydettyjä patogeenisia variantteja.

*NLRP3*: KFG näytteille tehty PCR ja Sanger-sekvensointi onnistuivat erittäin hyvin. PCR:t olivat kontaminaatiovapaita, joka voitiin todeta negatiivisella kontrollilla. Alukkeet eivät tuottaneet useita epäspesifisiä vyöhykkeitä (bändejä). Monistuminen oli spesifistä suunnitellulle alueelle AGE:n mukaan, joka pääteltiin oikean kokoisesta PCR-tuotteesta (377 bp). Automaattinen DNA-sekvenssaattori oli tuottanut hyvän DNA-sekvenssin. Sekvenssikäyrä oli selkeä. PCR-reaktiossa ei ollut ylimääräisiä alukkeita, jotka olisivat voineet sotkea sekvenssikäyrän. Mutaatioanalyysin tuloksena kaikista KFG-näytteistä löydettiin *NLRP3* c.61G>C mutaatio (kuvio 10). Tämä oli yhtenevää testattujen näytteiden kliinisen kuvan sekä sukuamneesin (kts. sukupuoli, kuvio 9) kanssa. Mutaatiovarmennukset tehtiin uusista DNA-laimennoksista, ja tulokset olivat yhdenmukaisia aikaisempien tulosten kanssa.



Kuvio 10. *NLRP3*-geenistä löydetty c.G>C mutaatio eksonissa 1.



## 9.2 Tutkimuksen luotettavuus

Inhimilliset virheet syntyvät luonnollisena seurauksena toimintaan vaikuttavista olosuhteista. Tehdyn tutkimuksen luotettavuuden kannalta tärkeintä on vaikuttaa toimintaolosuhteisiin siten, että inhimillinen virheen riski olisi mahdollisimman pieni. (Helevuo ym. 2012: 54). Inhimilliseen toimintaan liittyy aina erehtymisen mahdollisuus, joten on äärimmäisen tärkeää, että virheet tuodaan esiin hyvin avoimesti. Keskitytään kehittämään toimintaa niin, ettei samanlaista virhettä pääsisi tapahtumaan uudelleen. (Helevuo ym. 2012: 56.)

Yhdistelmä-DNA-tekniikka on erittäin monimutkaista ja haastavaa, ja sen soveltaminen käytännön laboratoriotyöskentelyyn on hyvin hankalaa, jos asioiden teoreettinen tausta ei ole selvillä. Pelkkien kirjallisten ohjeiden varassa laboratoriossa työskentely saattaa tuottaa ongelmia, koska oikeisiin asioihin ei ole osattu kiinnittää huomiota. Pitää ymmärtää, mitä ollaan tekemässä ja mihin kokonaisuuteen työ liittyy, jotta työ voi onnistua. (Suominen – Ollikka 2004: 7.) Kokonaiskuvan hahmottaminen on äärimmäisen tärkeää myös tulosten kannalta, jolloin niiden luotettavuutta on mahdollista arvioida.

DNA-näytteet voivat kontaminoitua ulkopuolisella DNA:lla tai mikrobeilla eristyksen aikana tai sen jälkeen. Lisäksi DNA-näytteiden käsittelyssä voi tapahtua sekaannus. Näiden virheiden jälkeen tulos ei ole näytteeseen merkityn potilaan todellinen löydös. Lisäksi PCR-reaktioon liittyy kontaminaatiovaara, koska pienikin määrä vierasta DNA:ta jossain liuoksessa, koeputkessa tai pipetissä johtaa tämän kontaminoivan sekvenssin monistumiseen. (Horelli-Kuitunen – Orpana 2016: 117.)

Virhelähteet pyrittiin minimoimaan mutaatioanalyysien kulun aikana erilaisin menetelmin. Näytteenotossa potilaista otettiin kaksi verinäytettä, joista toinen säilytettiin pakastettuna. Jos käsiteltäville potilasputkille sattuu jotakin odottamatonta, kuten menetetään DNA:ta tai eristetyn näytteen luotettavuutta epäillään (esim. ristikontaminaatio tai väärä koodaus), työ voidaan suorittaa uudelle eristykselle. DNA näytteiden koodaus tarkistettiin ennen näytteiden eristystä, jotta potilaan sosiaaliturvatunnus vastaa annettua potilaskoodia ja mahdollisuus virheelliseen numerointiin minimoitiin. Lisäksi eristettiin vain pieni määrä näytteitä kerrallaan eristäjän työtarkkuuden maksimoimiseksi. Putket pidettiin eristyksen ajan erillään, jotta ne eivät päässeet kosketuksiin keskenään. Sekä korkit, että putket merkittiin korkkien vaihtumisen estämiseksi.

Laboratoriotöissä käytettiin vain steriilejä reagensseja sekä välineitä ulkopuolisen DNA tai bakteerikontaminaation välttämiseksi. Puhtautta edistettiin käyttämällä filtterillisiä pipetinkärkiä. Käytettävien reagenssien voimassaolo sekä pakkausten eheys tarkistettiin ennen niiden käyttöä. Joitakin reaktiotuotteita tai reagensseja säilytettiin kylmässä ja valolta suojattuna. Reaktiotuotteiden hajoamista estettiin käyttämällä kylmähaudetta ja valoherkät reagenssit käärittiin folioon työn ajaksi. Huolellinen ja systemaattinen työskentely lisäsi tulosten toistettavuutta. Huolellisuus näytteiden käsittelyssä ja pipetoinnissa on oleellista.

Näytteiden ja reagenssien loiskumista pyrittiin välttämään, koska loiskuminen työskentelyn aikana voi vähentää DNA:ta. Näytteiden virheellisen pipetoimisen estämiseksi työn suoritusta helpotettiin pipetointikartoin ja ohjein, jotka tulostettiin erilliselle työohjeelle (näytteiden paikat stripeissä ja pipetoitavien reagenssien määrä sekä järjestys). Kontaminaatioiden välttämiseksi sekä reagenssien että näytteiden korkit pidettiin suljettuina muutoin kuin pipetoitaessa niistä tai niihin. PCR-reaktioita kontrolloitiin käyttämällä negatiivisia kontroleja, jotka eivät sisältäneet DNA-templaattia. Tällöin nähtiin, että PCR-reaktiosta nähtävä monistumistuote oli peräisin näytteeseen pipetoidusta potilas DNA-näytteestä eikä kontaminantista.

Positiiviset löydökset varmennettiin aina uudesta DNA-käyttölaimennoksesta. Tällöin geneettinen löydös piti todentaa myös uudesta reaktiosta. Tällä tavoin voitiin kontrolloida DNA-eristyksen jälkeen tapahtuneita pipetointivirheitä. Lisäksi positiivisen löydöksen saaneet potilaat ohjataan perinnöllisyysneuvontaan, jossa löydös todennetaan uudesta näytteenotosta kliiniseen tutkimukseen hyväksytyssä akkreditoidussa laboratoriossa (esim. HUSLAB). Jos koodaamisessa tai eristyksessä tapahtuu virhe, se jää tässä vaiheessa kiinni.

Koko laboratoriossa tapahtunut työ dokumentoitiin laboratoriopäiväkirjaan. Tällä tavoin voidaan selvittää, kuka työn on tehnyt, millä menetelmillä ja onko työohjeesta poikettu. Laboratoriotyön täytyy olla jäljitettävissä, siltä varalta, että työ halutaan toistaa tai tuloksissa on epäselvyyttä. Myös laboratoriotöiden laadun varmistus edellyttää, että koko laboratoriotöiden dokumentointi.

### 9.3 Eettisyys

Opinnäytetyö tehtiin hyvää tieteellistä tutkimuskäytäntöä noudattaen ja eettisyys huomioitiin opinnäytetyön jokaisessa vaiheessa. Opinnäytetyössä noudatettiin tiedeyhteisön tunnustamia toimintatapoja, kuten rehellisyyttä, yleistä huolellisuutta ja tarkkuutta tutkimustyössä. Tässä opinnäytetyössä kunnioitettiin muiden tutkijoiden tekemää työtä ja annettiin heidän saavutuksillensa niille kuuluvan arvon heidän tuloksiansa julkaistessaan. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.)

Sekä uveamelanooman että sarveiskalvotulehduksen periytyvien tekijöiden tutkimukset ovat saaneet eettisen toimikunnan puoltavan lausunnon sekä Helsingin yliopistollisen sairaalan Pää- ja kaulakeskuksen tutkimusluvan. Tutkimukset noudattavat Helsingin julistuksen oppikkappaleita. Tutkimukseen osallistuvilta potilailta pyydettiin kirjallinen informoitu suostumus tutkimukseen osallistumisesta.

Potilailla on oikeus tietosuojaan. Potilaiden anonymiteetin suojaamiseksi näytteitä käsiteltiin vain näytetunnisteilla ja koodiavainta (tiedostoa) säilytettiin EU:n GDPR:n säädösten mukaisesti tietosuojatussa ympäristössä. Vapaaehtoisuutta perinnöllisyysneuvontaan sekä geenitesteihin korostettiin. Potilaat saivat riittävästi tietoa ja aikaa päättää mahdollisten riskialleelien testaamisesta. Tietosuojan merkitys korostuu geneettisten sairauksien perinnöllisyyden selvittelyssä. Geenit eivät ole yksinomaan vain potilaan sillä yhden ihmisen geenit kertovat mahdollisesti myös omaisten sairastumisriskeistä. Tietosuojalainsäädäntö rajoittaa potilastietojen käyttöä, jotka ovat käytettävissä vain asianomaisen luvalla. (Pöyhönen – Aittomäki ym. 2016: 40.)

Tutkimukseen osallistuvat potilaat saivat itse päättää, haluavatko he kuulla tutkimustuloksista. Potilaalla on oikeus olla tietämättä kantamistaan periytyvistä sairausriskitekijöistä. Epätietoisuus on monen mielestä huonompi asia kuin huonot uutiset, mutta tietyissä tilanteissa ihmiset eivät halua tietää ovatko he haitallisten geenimuutosten kantajia. Sairauksia aiheuttavia ja niille altistavia geenejä voidaan testata, jolloin ihmiset voivat pelästyä tätä tietoisuutta miettimällä kantavatko he suvussa periytyvää tautia vai eivät. (Norio 2002: 324.)

Genomiprojekti itsessään ei ole enempää eettinen kuin epäeettinenkään. Se tuli tarpeelliseksi, kun kehitettiin menetelmiä geenien paikantamiseen ja rakenteen tutkimiseen.

Genomin anatominen selvittäminen tapahtuu samalla tavalla kuten aikaisemmin anatomiasa annettiin nimet luille, lihaksille ja hermoille. Saatua tietoa voidaan hyödyntää sekä oikealla että eettisesti kyseenalaisella tavalla. Tämä on perinnöllisyyslääkäreiden ja kohdeperheiden välinen asia, jossa tietenkin yhteiskunnallakin on sananvaltaa. (Norio 2002: 327.)

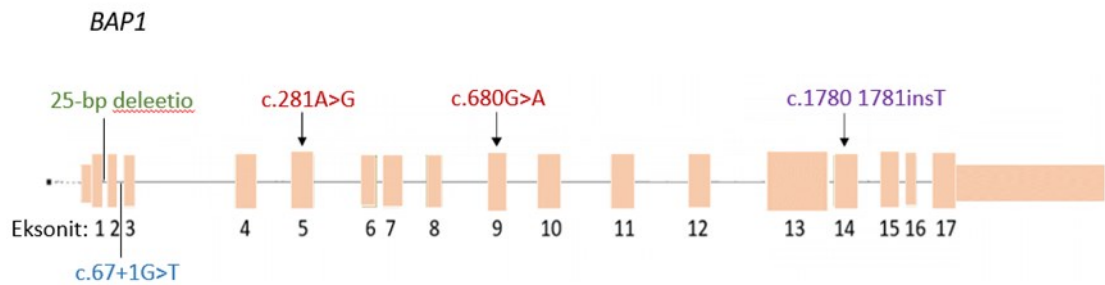
#### 9.4 Johtopäätökset

Opinnäytetyön tavoitteena oli tunnistaa periytyviä silmäsairauksia aiheuttavia geenivirheitä, perehtyä mahdollisimman tarkasti kahteen periytyvään harvinaiseen silmäsairauteen: suonikalvoston melanoomaan ja sarveiskalvotulehdukseen nimeltään *keratitis fugax hereditaria*. Perehtyä tautien syntyperään, esiintyvyyteen ja niiden tapaan periytyä. Työ aloitettiin eristämällä genomisen DNA potilasnäytteistä ja lopetettiin sekvensointitulosten analysointiin. Teoriataustaa on pyritty pitämään mahdollisimman selkeänä ja tiiviinä, jotta opinnäytetyön aiheen sisäistäminen olisi lukijalle helpompaa.

Opinnäytetyölle asetetut tavoitteet täyttyivät, UM-potilaiden näytteet prosessoitiin *BAP1*-kasvunrajoitegeenin mutaatioanalyysiin ja *NLRP3*-geenivirheen mutaatioanalyysille saatiin tulokset. Tässä tutkimuksessa sarveiskalvotulehduksesta kärsivillä potilailla esiintyy *NLRP3*-geenissä oleva c.61G>C pistemutaatio, mikä oli yhdenmukaista aikaisempien tutkimusten kanssa. *NLRP3*-geenissä oleva c.61G>C pistemutaatio aiheuttaa *keratitis fugax hereditarian*, mutta taudin vaikeusaste voi vaihdella (Turunen ym. 2018). Sairauksien aiheuttavien muutosten tunnistaminen on tärkeää, koska tämä voi muuttaa sairauksien hoitoa ja ennustaa sairauksien periytyvyyttä perheessä.

Vaikka UM-näytteet prosessoitiin *BAP1*-kasvunrajoitegeenin mutaatioanalyysiin ja tulokset ovat viivästyneet, eivätkä ehdi tämän opinnäytetyön tarkasteluun, voidaan kuitenkin pohtia aikaisempia tuloksia ja miettiä patogeenisen variantin todennäköisyyttä. Viimeisimmässä tutkimusryhmän tutkimuksessa analysoitiin *BAP1*-geeni 432 potilaalta, joilla diagnosoitiin UM vuosina 2010-2017. Tutkimuksen aikana harvinaisia variantteja löytyi 21, joista viisi luokiteltiin patogeenisiksi (kuvio 11). *BAP1*-geenin koodaavan proteiinin rikkovat loss-of-function (LOF) mutaatiot intronissa 2 (c.67+1G>T) ja eksonissa 14 (c.1780 1781insT). Yhden aminohapon vaihdos toiseksi (missense-mutaatio) löytyi eksonissa 5 (c.281A>G) ja eksonissa 9 (c.680G>A). Intronissa 1 oli 25 emäksen deleetio. Patogeeniset variantit vaikuttivat mm. silmukointiin ja deubikitinoivaan entsyymiaktiivisuuteen. (Repo ym. 2019.)

Tämän opinnäytetyön *BAP1*-kasvurajoitegeenin mutaatioanalyysin tulokset todennäköisesti puoltavat edellisiä tutkimuksia ja yhdeltä tässä opinnäytetyössä analysoidulta potilaalta löytyy *BAP1*-geenin patogeeminen variantti. Eksomisekvensoinnin tuloksia odotetaan noin kuukauden sisällä, tällä hetkellä ne ovat työn alla Suomen molekyyli lääketieteen instituutin sekvensointilaboratoriossa (Molecular Medicine Institute of Finland, FIMM).



Kuvio 11. Aikaisemmissa tutkimuksissa löydetyt patogeeniset variantit, joilla on erilaiset toiminnalliset ominaisuudet. Eksoniset mutaatiot on osoitettu nuolella ja introniset mutaatiot viivalla. Erilaiset variantit on esitetty erivärisinä. LOF-mutaatiot intronissa 2 (c.67+1G>T) ja eksonissa 14 (c.1780 1781insT). Yhden aminohapon vaihdos toiseksi (missense-mutaatio) eksonissa 5 (c.281A>G) ja eksonissa 9 (c.680G>A). 25 emäksen deleetio intronissa 1. (Repo ym. 2019.)

## 9.5 Tulosten hyödyntäminen

Opinnäytetyössä saatuja tuloksia hyödynnetään sekä kliinisessä että tutkimuksellisessa mielessä. Tulosten avulla selvitetään normaalin alleelin tai mutaatioalleelin oireettomat kantajat tai sairaat (Hortelli-Kuitunen Orpana 2016: 125). Tutkimustulosten avulla selvitetään geenivirheen periytymistä suvussa ja suvun jäsenten sairastumisriskiä, jolloin oireettomilla suvun jäsenillä on mahdollisuus taudin oireita estävään hoitoon, tai tieto tulevasta taudista voi vaikuttaa myönteisesti heidän elämän suunnitteluun (Kääriäinen 2016: 364).

63 suonikalvoston melanoomapotilaan tutkimusnäytteiden avulla, jotka prosessoitiin analysoitavaksi *BAP1*-kasvunrajoitegeenin mutaatioanalyysiin, voidaan tunnistaa uusia geenivirhettä kantavia potilaita. Vuosien 2019-2020 aineisto voi paljastaa uusia *BAP1*-syöpäsyndroomaperheitä, jolloin siihen kuuluvat syöpätyypit sekä *BAP1*-mutaatioiden penetranssi tarkentuvat. (Repo ym. 2019.) Geenivirheen kantajia seurataan, jotta voidaan hyvissä ajoin jo taudin varhaisessa vaiheessa tunnistaa alttiusoireyhtymään

kuuluvia syöpiä. Joidenkin syöpäoireyhtymien kohdalla tutkimukset ovat selvästi parantaneet ennustetta ja tiedon lisääntymisen myötä saadaan toivoa paremmasta tulevaisuudesta. On hyvin tavallista, että geenivirhettä kantavat ovat alttiita useammalle kuin yhdelle syöpätyypille. (Aaltonen 2002: 204–205.)

Sarveiskalvotulehduksesta kärsivien potilaiden tulokset patogeenisestä variantista osoittivat, että tautia kannattaa testata myös muista eurooppalaisista väestöistä. Tauti on harvinainen ja geenitestauksen avulla tauti saa lisää näkyvyyttä. Harvinaisten silmäsairauksien taustalla olevien geenien toiminnan tunteminen on diagnostiikassa tärkeää, koska tämä edesauttaa geenihoidojen kehitystä. (Kivelä ym. 2016: 232.)

## 9.6 Kehittämiskohteet ja haasteet

Vaikka tieto sairauksien periytymisestä ja geenien toiminnan säätelystä on muuttunut monipuolisemmaksi, ei ihmisen genejä tai perimän toimintaa edelleenkään kokonaan tunneta. Tieteellisen tutkimuksen vaativa tehtävä on edelleenkin tuottaa vielä tuntematonta tietoa ihmisen perimästä, jota voidaan käyttää sairauksien hoidossa ja terveyden ylläpitämisessä. (Aittomäki ym. 2016: 13.)

Geneettisten tutkimusten merkittävämmät haasteet liittyvät löydösten tulkinnan vaikeuteen. Tulevaisuuden suurin haaste ei ole enää itse geenitiedon tuottaminen, vaan uusilla tutkimusmenetelmillä saatavan suuren informaation ymmärtäminen ja tiedon hyödyntäminen klinikoita ja potilasta hyödyntävään muotoon. (Hortelli-Kuitunen Orpana 2016: 124-125.)

On usein mahdotonta hallita useiden kymmenien ehdokasgeenien tai suorastaan koko genomien sekvensoinnissa esiin tulleita geenimuutosten kliinistä merkitystä. Tulosten prosessointi päätöksenteon tueksi onkin tärkein kehityskohde uuden geneettisen informaation hyötykäytön edistämiseksi. (Hortelli-Kuitunen Orpana 2016: 125.)

## 9.7 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyön aikana käytettiin erilaisia molekyyli-genetiikan tutkimusmenetelmiä, tutustuin sekä menetelmien että tutkittavien sairauksien taustatietoon ja työskentelin osana Folkhälsanin henkilökuntaa. Nopeus ja kyky työskennellä itsenäisesti kehittyi opinnäyte-

työn aikana, ja saavutin luottamusta työskennellä itsenäisesti kirjallisten ohjeiden varassa. Kommunikaatio ja yhteistyö on ollut luontevaa muiden tutkimusryhmän jäsenten kanssa. Uskalsin selvittää epäselviksi jääneitä ohjeita ja pystyin jälkikäteen käymään työn kulun läpi. Osasin kysyä apua myös työyhteisön muilta jäseniltä enkä jäänyt siten neuvottomaksi. Virheiden sattuessa en lannistunut tai antanut aiemman virheen vaikuttaa työsuoritukseeni negatiivisesti. Sen sijaan opin virheistäni ja pystyin jatkamaan työskentelyä.

Olen ollut hyvin kiinnostunut työskentelystä tutkimuslaboratoriossa. Laboratorio-ohjeiden toteutuksen lisäksi olen motivoitunut oppimaan mihin käytetty menetelmä perustuu. Tämä on oleellista tulevaisuudessa kohdattavien ongelmien ratkaisemiseksi. Olen ollut jopa kiinnostuneempi tutkimuksen taustasta enemmän kuin tämän työn puitteissa edellyttäisiin. Tämä on ollut tutkimusryhmässä tärkeää, koska tutkimusryhmä koki, että arvostan heidän tekemää työtä ja ymmärrän tehtävän työn tärkeyden.

Työssä suoritettiin mutaatioanalyyskejä kahdelle eri geenille kahteen eri projektiin. Tämän kokonaisuuden hallitseminen on haastavaa, mutta suoriuduin siitä minulta vaaditulla tasolla. Opin käsittelemään monta näytettä kerrallaan ja varmistamaan, ettei ristikontaminaatiota tapahdu. Harjoittelin eristämään näytteitä pienemmissä erissä, pitämään putkia erillään ja aina varmistamaan pipetoinnin alussa ja lopussa, että pipetoitava näyte siirtyy sille tarkoitettuun putkeen. Hyvät muistiinpanot helpottivat töiden toistoa ja lisäsivät varmuutta työntekoon. Opin opinnäytetyön aikana tunnistamaan kehitystä vaatia työtapoja, ja toistamalla näitä työvaiheita uudelleen, opin niissä suoriutumaan huolellisemmin ja varmemmin.

Kokonaisuudessaan opinnäytetyöprosessi oli hyvin mielenkiintoinen ja opettavainen. Ammattitaitoni ja vuorovaikutustaitoni ovat kehittyneet ja vahvistuneet. Teoriaosaamiseni on laajentunut. Olen saanut uusia näkökulmia työskentelyyn, jotka jatkossa auttavat minua suoriutumaan työtehtävistä varmemmin. Laboratoriotyöt vaativat runsaasti kärsivällisyyttä ja töiden toistamista, mikä minulta onnistuu hyvin luontevasti.

## Lähteet

Aaltonen, Lauri A. 2002. Syövän genetiikka. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Leisti, Jaakko. Perinnöllisyyslääketiede. 2., uudistettu painos. Helsinki: Duodecim. 198–205.

Aittomäki, Kristiina – Moilanen, Jukka – Perola, Markus 2016. Genetiikka osana lääketiedettä globalisoituvassa yhteiskunnassa. Teoksessa Aittomäki, Kristiina – Moilanen, Jukka – Perola, Markus (toim.). Lääketieteellinen genetiikka. 1., painos. Helsinki: Duodecim. 13-16.

Aittomäki, Kristiina – Peltomäki, Päivi 2016. Syövän genetiikka. Teoksessa Aittomäki, Kristiina – Moilanen, Jukka – Perola, Markus (toim.). Lääketieteellinen genetiikka. 1., painos. Helsinki: Duodecim. 281.

Almeida de Jesus, Adriana – Goldbach-Mansky, Raphaela 2013. Monogenic autoimmune-inflammatory diseases: concept and clinical manifestations. *Clinical Immunology* 147 (3). 155-174.

Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Leisti, Jaakko 2002. Perinnöllisyyslääketiede Mendelistä geenikarttaan. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Leisti, Jaakko. Perinnöllisyyslääketiede. 2., uudistettu painos. Helsinki: Duodecim. 12-13.

BAP1 gene: BRCA1 associated protein 1. MedlinePlus 2020. Verkkosivusto. Päivitetty 18.8.2020. <<https://medlineplus.gov/genetics/gene/bap1/>>. Luettu 13.10.2020.

Harbour, J. William – Onken, Michael D. – Roberson, Elisha D. O. – Duan, Shenghui – Cao, Li – Worley, Lori A. – Council, M. Laurin – Matatall, Katie A. – Helms, Cynthia – Bowcock, Anne M 2010. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* 330 (6009). 1410-1413.

Heino, Jyrki – Vuento, Matti 2019. Biokemia ja solubiologia. 1., painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Helovuori, Arto – Kinnunen, Marina – Peltomaa, Karolina – Pennanen, Pirjo 2012. Potilas-turvallisuus: potilasturvallisuuden keskeisiä kysymyksiä havainnollisesti ja käytännönläheisesti. 2., painos. Kliinikko käsikirjat. Helsinki: Edita Prima Oy.

Horelli-Kuitunen, Nina – Orpana, Arto 2016. Kromosomi- ja geenimuutosten laboratoriodiagnostiikka. Teoksessa Aittomäki, Kristiina – Moilanen, Jukka – Perola, Markus (toim.). Lääketieteellinen genetiikka. 1., painos. Helsinki: Duodecim. 109-125.

Human (GRCh37.p13). Gene: NLRP3 ENSG00000162711. Reference sequence: NM\_001243133.2. Ensembl Genome Browser. <[https://grch37.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000162711;r=1:247579458-247612410](https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000162711;r=1:247579458-247612410)>. Luettu 3.11.2020.



Jeansen, David E. – Proctor, Monja – Marquis, Sandra T. – Gardner, Heather Perry – Ha, Seung I. – Chodosh, Lewis A. – Ishov, Alexander M. – Tommerup, Niels – Vissing, Henrik – Sekido, Yoshitaka – Minna, John – Borodovsky, Anna – Schultz, David C. – Wilkinson, Keith D. – Maul, Gerd G. – Barlev, Nickolai – Berger, Shelley L. – Prendergast, George C. – Rauscher III, Frank J. 1998. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene* 16 (9). 1097–1112.

Kettunen, Johannes – Palotie, Aarno 2016. Genominen variaatio ja sen tulkinta. Geneetiikka osana lääketiedettä globalisoituvassa yhteiskunnassa. Teoksessa Aittomäki, Kristiina – Moilanen, Jukka – Perola, Markus (toim.). *Lääketieteellinen geneetiikka*. 1., painos. Helsinki: Duodecim. 99-101.

Kivelä, Tero – Majander, Anna – Sankila, Eeva-Marja 2016. Silmätautien geneetiikka. Teoksessa Aittomäki, Kristiina – Moilanen, Jukka – Perola, Markus (toim.). *Lääketieteellinen geneetiikka*. 1., painos. Helsinki: Duodecim. 232-234. 246.

Kivelä, Tero 2013. Suonikalvoston melanooma. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Kellokumpu-Lehtinen, Pirkko-Liisa – Jyrkkiö, Sirkku – Kouri, Mauri – Teppo, Lyly (toim.). *Syöpätaudit. Verkkoaineisto: Duodecim oppikirjat*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Saatavilla Internetissä.

Kääriäinen, Helena – Sipponen, Marjatta 2002. Geenit: Terveys ja sairaus. 1., painos. Porvoo: WSOY.

Kääriäinen, Helena 2016. Ennustava geenitestausta, geenitestausta terveyskeskuksissa ja omaehtoiset testit. Teoksessa Aittomäki, Kristiina – Moilanen, Jukka – Perola, Markus (toim.). *Lääketieteellinen geneetiikka*. 1., painos. Helsinki: Duodecim. 364-368.

Masumoto, Junya – Taniguchi, Shun'ichiro – Nakayama, Jun – Shiohara, Masaaki – Hidak, Eiko – Katsuyama, Tsutomu – Murase, Sumio – Sagara, Junji 2001. Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin N-terminal homology domain containing protein, in normal human tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry: SAGE Journals* 49 (10). 1269–1275.

MutationTaster- verkkopohjainen sovellus. Saatavilla Internetissä: <http://www.mutation-taster.org/>.

Norio, Reijo 2002. Geneetiikka ja etiikka. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Leisti, Jaakko. *Perinnöllisyyslääketiede*. 2., uudistettu painos. Helsinki: Duodecim. 324–327.

Palotie, Leena 2002. Perimän rakenne ja toiminta. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Leisti, Jaakko 2002. *Perinnöllisyyslääketiede*. 2., uudistettu painos. Helsinki: Duodecim. 71.

Pilarski, Robert – Carlo, Maria – Cebulla, Colleen – Abdel-Rahman, Mohamed – Adam, Margaret P. – Ardinger, Holly H. – Pagon, Roberta A. – Wallace, Stephanie E. – Bean,

Lora JH. – Stephens, Karen – Amemiya, Anne 2016. BAP1 Tumor Predisposition Syndrome. GeneReviews. Seattle: University of Washington.

Pöyhönen, Minna – Aittomäki, Kristiina 2016. Mitä sukupuu kertoo? Teoksessa Aittomäki, Kristiina – Moilanen, Jukka – Perola, Markus (toim.). Lääketieteellinen genetiikka. 1., painos. Helsinki: Duodecim. 37-40.

Repo, Pauliina – Järvinen, Reetta-Stiina – Jäntti, Johannes E. – Markkinen, Salla – Täll, Martin – Raivio, Virpi – Turunen, Joni A. – Kivelä, Tero T. 2019. Population-based analysis of BAP1 germline variations in patients with uveal melanoma. *Human Molecular Genetics* 28 (14). 2415-2426.

Ruusuvaara, Pekka – Setälä, Kirsi 1987. "Keratoendotheliitis fugax hereditaria. A clinical and specular microscopic study of a family with dominant inflammatory corneal disease". *Acta Ophthalmologica (Copenhagen)* 65 (2). 159–169.

Smit, Kyra N. – Jager, Martine J. – de Klein, Annelies – Kiliç, Emine 2019. Uveal melanoma: Towards a molecular understanding. *Progress in Retinal and Eye Research* 75. 100800.

Suominen, Ilari – Ollikka, Pauli. 2004. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3–2., painos. Helsinki: Opetushallitus.

Suominen, Ilari – Pärssinen, Raimo – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani 2013. Geeniteknikka. Turun ammattikorkeakoulun oppimateriaaleja. 2., korjattu painos. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Thermo Fisher Scientific 2020. ExoSAP-IT PCR cleanup reagents. Esite. <[https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fbrochures%2FExoSAP-IT\\_Brochure.pdf&title=QnJvY2h1cmU6IEV4b1NBUCBJVCBCcm9jaHVyZQ==](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fbrochures%2FExoSAP-IT_Brochure.pdf&title=QnJvY2h1cmU6IEV4b1NBUCBJVCBCcm9jaHVyZQ==)>. Luettu 15.10.2020.

Turunen, Joni A. – Markkinen, Salla – Wilska, Rosi – Saarinen, Silva – Raivio, Virpi – Täll, Martin – Lehesjoki, Anna-Elina – Kivelä, Tero T. 2016. BAP1 Germline Mutations in Finnish Patients with Uveal Melanoma. *Ophthalmology* 123. 1112-1117.

Turunen, Joni A. – Immonen, Annamari T. – Järvinen, Reetta-Stiina – Kawan, Sabita – Repo, Pauliina – Korsbäck, Anna – Ala-Fossi, Olli – Jaakkola, Aino M. – Majander, Anna – Vesaluoma, Minna – Kivelä, Tero T. 2020. In Vivo Corneal Confocal Microscopy and Histopathology of Keratitis Fugax Hereditaria From a Pathogenic Variant in NLRP3. *American Journal of Ophthalmology* 213. 217-225.

Turunen, Joni A. – Wedenoja, Juho – Repo, Pauliina – Järvinen, Reetta-Stiina – Jäntti, Johannes E. – Mörtenhumer, Sanna – Riikonen, Antti S. – Lehesjoki, Anna-Elina – Majander, Anna – Kivelä, Tero T. 2018. Keratoendotheliitis Fugax Hereditaria: A Novel

Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome Caused by a Mutation in the Nucleotide-Binding Domain, Leucine-Rich Repeat Family, Pyrin Domain-Containing 3 (NLRP3) Gene. *American Journal of Ophthalmology* 188. 1–50.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta (TENK) 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Verkkodokumentti. <[https://tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK\\_ohje\\_2012.pdf](https://tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf)>. Luettu 13.11.2020.

Valle, Olavi 1966. Keratitis Fugax Hereditaria – a New Eye Syndrome. *Ophthalmologica* 151 (5). 537-547.

Ventii, Karen H. – Devi, Narra S. – Friedrich, Kenneth L. – Chernova, Tatiana A. – Tighiouart, Mourad – Van Meir, Erwin G. – Wilkinson, Keith D. 2008. BRCA1-Associated Protein-1 Is a Tumor Suppressor that Requires Deubiquitinating Activity and Nuclear Localization. *Cancer Research* 68: (17). 6953-6962.

Vuorio, Eero 2002. DNA ja geeni. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Leisti, Jaakko 2002. *Perinnöllisyyslääketiede. 2., uudistettu painos.* Helsinki: Duodecim. 33-34. 42.

Walpole, Sebastian – Pritchard, Antonia L. – Cebulla, Colleen M. – Pilarski, Robert – Stautberg, Meredith – Davidorf, Frederick H. – de la Fouchardière, Arnaud – Cabaret, Odile – Golmard, Lisa – Stoppa-Lyonnet, Dominique – Garfield, Erin – Njauw, Ching-Ni – Cheung, Mitchell – Turunen, Joni A. – Repo, Pauliina – Järvinen, Reetta-Stiina – van Doorn, Remco – Jager, Martine J. – Luyten, Gregorius P. M. – Marinkovic, Marina – Chau, Cindy – Potrony, Miriam – Höiom, Veronika – Helgadottir, Hildur – Pastorino, Lorenza – Bruno, William – Andreotti, Virginia – Dalmasso, Bruna – Ciccarese, Giulia – Queirolo, Paola – Mastracci, Luca – Wadt, Karin – Kiilgaard, Jens F. – Speicher, Michael R. – van Poppelen, Natasha – Kilic, Emine – Al-Jamal, Rana’a T. – Dianzani, Irma – Betti, Marta – Bergmann, Carsten – Santagata, Sandro – Dahiya, Sonika – Taibjee, Saleem – Burke, Jo – Poplawski, Nicola – O’Shea, Sally J. – Newton-Bishop, Julia – Adlard, Julian – Adams, David J. – Lane, Anne-Marie – Kim, Ivana – Klebe, Sonja – Racher, Hilary – Harbour, William J. – Nickerson, Michael L. – Murali, Rajmohan – Palmer, Jane M. – Howlie, Madeleine – Symmons, Judith – Hamilton, Hayley – Warriar, Sunil – Glasson, William – Johansson, Peter – Robles-Espinoza, – Carla D. – Ossio, Paul – de Klein, Annelies – Puig, Susana – Ghiorzo, Paola – Nielsen, Maartje – Kivelä, Tero T. – Tsao, Hensin – Testa, Joseph R. – Gerami, Pedram – Stern, Marc-Henri – Paillerets, Brigitte B. – Abdel-Rahman, Mohamed H – Hayward, Nicholas K. 2018. Comprehensive Study of the Clinical Phenotype of Germline BAP1 Variant-Carrying Families Worldwide. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute: Oxford Academic* 110: (12). 1328-1341.

Weizmann Institute of Science 2015. BRCA1 Associated Protein-1 (Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase). GeneCards. The Human Gene Datedase. Verkkodokumentti. <<https://genecards.weizmann.ac.il/v3/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BAP1>>. Luettu 23.10.2020.

Weizmann Institute of Science 2015. NLR Family, Pyrin Domain Containing 3. GeneCards The Human Gene Datedase. Verkkodokumentti. <<https://genecards.weizmann.ac.il/v3/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NLRP3>>. Luettu 23.10.2020.

## Työn mutaatioanalyysiin kuuluneet näytteet

Työssä analysoidut näytteet. Taulukossa on eritelty kaikki työn mutaatioanalyysiin kuuluneet näytteet, sekä niiden konsentraatio ja puhtaus. UMG numeroinnin ensimmäinen numeropari viittaa diagnoosivuoteen ja jälkimmäinen on järjestysnumero. Esimerkiksi UMG15-72 on järjestyksessään 72 vuonna 2015 diagnosoitu UM-potilas.

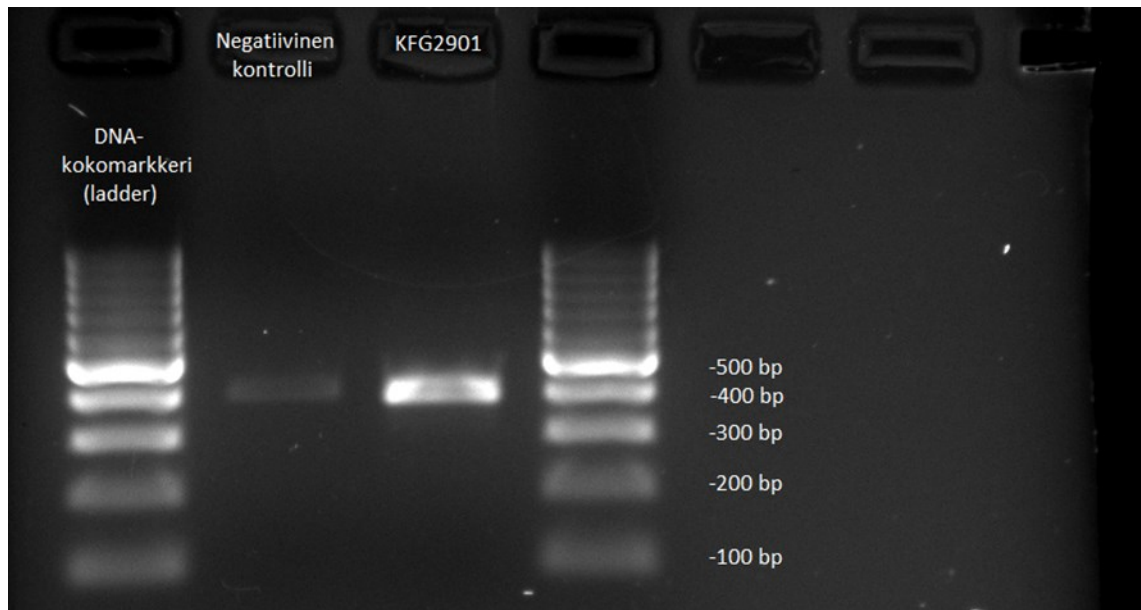
Potilas (68 näytettä)	DNA eristetty	DNA pitoisuus (ng/μl)	DNA-puhtaus (A260/280)
UMG89-27	x	33	1,83
UMG15-72	aiemmin	331	-
UMG18-08	x	245	1,84
UMG18-26	x	355	1,89
UMG18-56	x	404	1,91
UMG18-62	x	562	1,89
UMG19-13	aiemmin	379	1,90
UMG19-17	aiemmin	770	1,94
UMG19-19	aiemmin	568	1,92
UMG19-22	aiemmin	376	1,92
UMG19-24	aiemmin	962	1,95
UMG19-27	x	502	1,90
UMG19-29	x	713	1,89
UMG19-31	x	530	1,91
UMG19-32	aiemmin	206	1,89
UMG19-33	x	583	1,87
UMG19-34	aiemmin	413	1,90
UMG19-35	aiemmin	572	1,94
UMG19-36	x	887	1,93
UMG19-37	aiemmin	273	1,90
UMG19-40	aiemmin	162	-
UMG19-40-S1	x	367	1,87
UMG19-40-S2	x	312	1,88
UMG19-40-S3	x	321	1,87
UMG19-41	x	485	1,89
UMG19-43	aiemmin	609	1,93
UMG19-44	aiemmin	328	1,93
UMG19-45	x	13	1,84
UMG19-46	aiemmin	395	1,93
UMG19-47	x	864	1,92
UMG19-48	aiemmin	652	1,94
UMG19-50	x	362	1,89
UMG19-51	aiemmin	437	1,92
UMG19-53	x	298	1,89
UMG19-55	x	346	1,86
UMG19-58	x	494	1,88
UMG19-59	x	180	1,88
UMG19-60	x	272	1,88
UMG19-61	aiemmin	842	1,94

UMG19-62	x	494	1,87
UMG19-65	x	746	1,91
UMG19-66	x	294	1,89
UMG19-67	x	874	1,93
UMG19-68	x	552	1,88
UMG19-69	x	343	1,87
UMG19-71	x	522	1,90
UMG19-72	x	416	1,88
UMG19-73	x	170	1,88
UMG19-74	x	359	1,87
UMG19-75	x	454	1,90
UMG19-78	x	392	1,89
UMG19-79	x	350	1,87
UMG19-80	x	860	1,91
UMG19-81	x	487	1,89
UMG19-82	x	818	1,91
UMG19-83	x	434	1,89
UMG20-03	x	346	1,87
UMG20-04	x	549	1,87
UMG20-12	x	1106	1,88
UMG20-17	x	978	1,94
UMG20-19	x	461	1,91
UMG20-26	x	647	1,91
UMG20-28	aiemmin	254	-
KFG2901	aiemmin	138	-
KFG27-01	x	720	1,93
KFG27-03	x	1060	1,94
KFG27-04	x	702	1,93
KFG27-05	x	1163	1,89

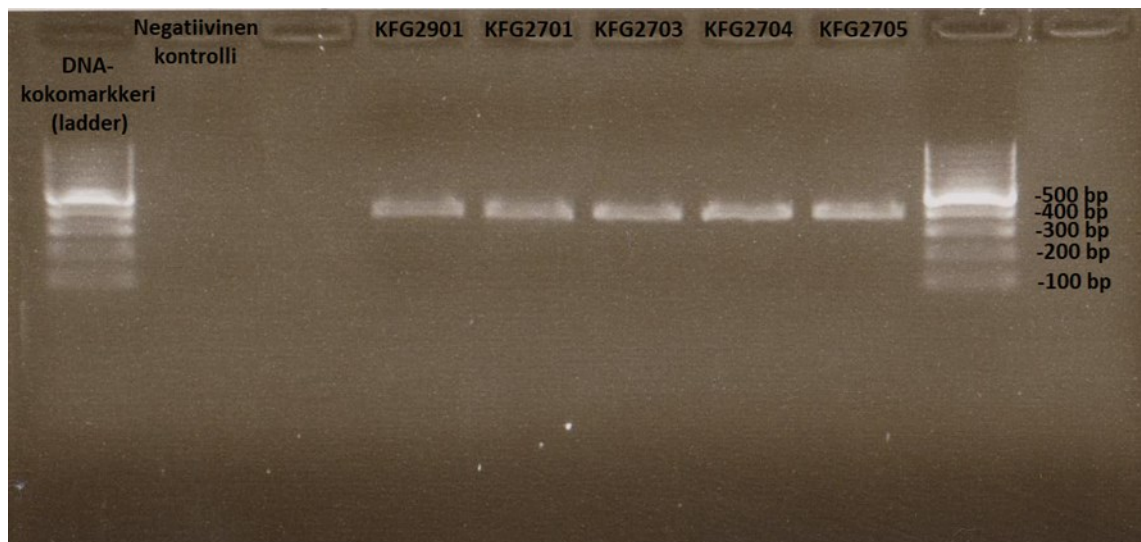
x = DNA eristetty osana tätä työtä

## AGE-ajojen tulokset (*NLRP3*-geeni)

Geelikuvat



PCR-reaktion kontaminaatio.



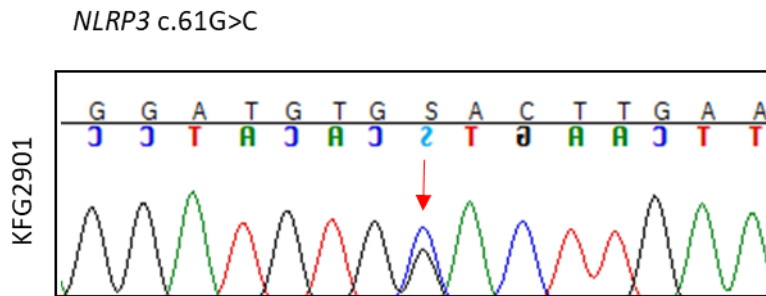
PCR-reaktio. Negatiivinen kontrolli osoitti reaktioiden olevan vapaita ulkopuolisesta DNA-kontaminaatiosta. Kokostandardi näytti PCR-tuotteen olevan odotetun kokoinen 377 bp.



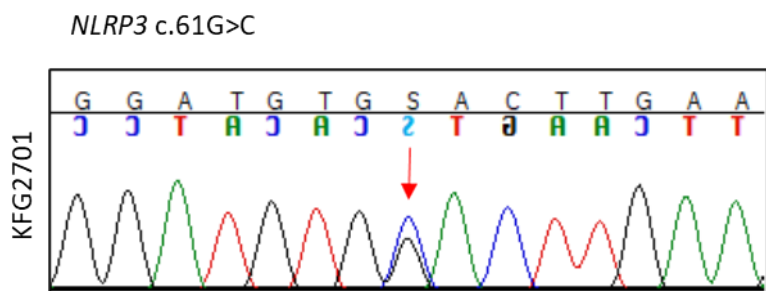
Mutaatiovarmennus.

### Sekvenssikromatogrammit (*NLRP3*-geeni)

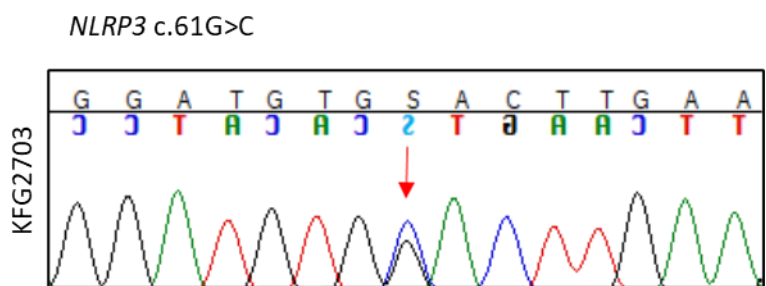
Potilaiden sekvenssikromatogrammit, johon heterotsygoottinen muutos c.61G>C on merkitty punaisella nuolella.



Potilaan KFG2901 sekvenssikromatogrammi.



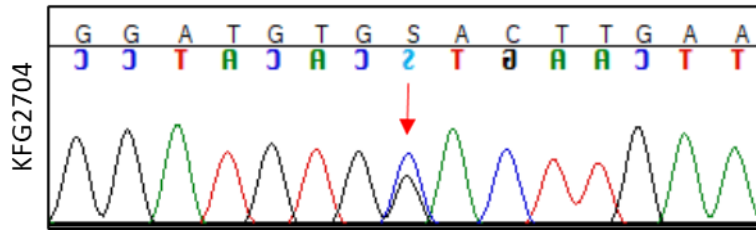
Potilaan KFG2701 sekvenssikromatogrammi.



Potilaan KFG2703 sekvenssikromatogrammi.

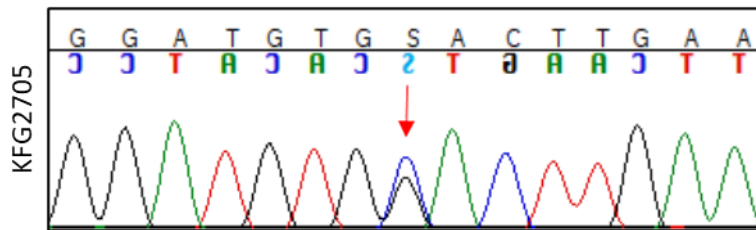


*NLRP3* c.61G>C



Potilaan KFG2704 sekvenssikromatogrammi.

*NLRP3* c.61G>C



Potilaan KFG2705 sekvenssikromatogrammi.