

Heini Leskinen & Johanna Maunula

miRNA:t keuhkosyövässä

miRNA:n ekspression varmistus reaaliaikaisella RT-qPCR:llä

"RNA stands between DNA and protein in the central dogma of life"
– Francis Crick

Tekijät Otsikko	Heini Leskinen & Johanna Maunula miRNA:t keuhkosyövässä miRNA:n ekspression varmistus reaaliaikaisella RT-qPCR:llä
Sivumäärä Aika	41 sivua + 4 liitettä 18.4.2012
Tutkinto	Sosiaali- ja terveystieteiden ammattikorkeakoulututkinto, Bioanalytiikka (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Lehtori Terttu-Liisa Lindell Professori Sakari Knuutila
<p>Keuhkosyöpä on maailman yleisin syöpä ja Suomessakin se on yksi yleisimmistä. Keuhkosyövät jaetaan kahteen ryhmään: pienisolaiseen ja ei-pienisolaiseen keuhkosyöpään. Noin 85 % kaikista keuhkosyövistä on ei-pienisoluista tyyppiä. Keuhkosyövän ennuste on usein huono huolimatta diagnoosin ja hoidon laajasta kehityksestä. Syöpätautien hoidossa suurena ongelmana on hoitoresistenssi ja siten uusia hoitomuotoja pyritään kehittämään jatkuvasti. Uusien tutkimusten taustalla on pyrkimys muun muassa verestä ja kudoksesta löydettävien biomarkkerien käyttöön syövän ennaltaehkäisyssä, diagnosoinnissa ja ennusteen arvioinnissa.</p> <p>Uudet tutkimukset ovat osoittaneet miRNA:n vaikutuksen karsinogeneesiin ja luoneet uusia odotuksia hoidon parantamiseen ja keuhkosyövän ennusteeseen. miRNA:t ovat pieniä RNA-molekyyliä, jotka säätelevät geeniekspressiota ja ovat siten tärkeä osa monia biologisia prosesseja. miRNA:t säätelevät ainakin 30 % kaikista ihmisen proteiinia koodaavista geeneistä. miRNA:n ekspression on todettu poikkeavan syöpäkudoksessa; miRNA:t voivat olla joko ylitai aliekspresoituneita.</p> <p>Helsingin yliopiston Haartman-instituutin sytomolekyyli- ja geenetiikan laboratorion tutkimusryhmä tutkii miRNA:n yhteyttä ei-pienisolaiseen keuhkosyöpään. He olivat tutkineet miRNA:n ekspressiota keuhkosyöpänäytteistä mikrosirumenetelmällä. Tavoitteenamme oli analysoida mikrosirumenetelmällä jo analysoituja näytteitä reaaliaikaisella RT-qPCR:llä ja vertailla saatuja tuloksia. Työmme tarkoituksena oli selvittää, miten tulokset vastasivat toisiaan.</p> <p>Tutkimme kahden miRNA:n (miR-3907 ja miR-494) ekspressiota 20 keuhkosyöpänäytteestä. Reaaliaikaisen RT-qPCR:n tulokset miR-3907:n ekspression osoittamisessa vastasivat mikrosirumenetelmällä saatuja tuloksia 85 %:sti. Toisaalta miR-494-aluke edellyttää lisäoptimointia, eivätkä saadut tulokset ole vertailukelpoisia. Siten yhteneväisyys reaaliaikaisen RT-qPCR:n ja mikrosirumenetelmän välillä oli suuri miR-3907-aluketta käytettäessä.</p>	
Avainsanat	ei-pienisoluinen keuhkosyöpä, miRNA, biomarkkeri, reaaliaikainen RT-qPCR

Authors Title	Heini Leskinen and Johanna Maunula miRNAs in Lung Cancer: Confirmation of the Expression of miRNA by Realtime RT-qPCR.
Number of Pages Date	41 pages + 4 appendices 18 April 2012
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Terttu-Liisa Lindell, Senior Lecturer Sakari Knuutila, Professor
<p>Lung cancer is the most common type of cancer in the world and, in Finland, it is one of the most common types of cancer as well. Lung cancer is divided into two groups: small-cell lung cancer and non-small-cell lung cancer (NSCLC). Approximately, 85% of all lung cancers are NSCLC. The prognosis of lung cancer is often poor despite the extensive development of diagnosis and therapy. The treatment resistance is a problem when dealing with lung cancer patients. Hence, new therapies are generated. The discovery of molecular biomarkers and their application in prevention, diagnosis and prognosis are widely researched.</p> <p>New studies have indicated the effect of miRNAs in cancer pathogenesis and opened a new prospect for improving cancer treatment and prognosis. miRNAs are small RNA molecules, which regulate gene expression and associates with many biological processes. miRNAs regulate at least 30% of all human protein-coding genes. miRNA expression has discovered to be aberrant in cancer tissue: miRNAs are either overexpressed or downregulated.</p> <p>We made our study at the Laboratory of Cytomolecular Genetics, the Haartman Institute, Helsinki University, Finland. The research group studies the connection between miRNAs and NSCLC. They have already examined the expression of miRNAs from several samples by microarray. Our aim was to analyze the samples by realtime RT-qPCR and to compare these results. The purpose of our study was to examine how the microarray results responded to the results received from realtime RT-qPCR when analyzing the expression of miRNA.</p> <p>We studied the expression of two miRNAs (miR-3907 and miR-494) from 20 NSCLC-patients.. The results from realtime RT-qPCR responded to the results received from microarray with high percentage when studying the expression of miR-3907. On the other hand, the use of miR-494 requires improvement and testing. The results lead to the conclusions that miR-3907-primer gives similar results when comparing these methods.</p>	
Keywords	NSCLC, miRNA, biomarker, RT-qPCR

Sisälllys

1	Johdanto	1
2	Keuhkosyöpä	2
2.1	Oireet ja diagnoosi	3
2.2	Hoito	3
3	Mikro-RNA	5
3.1	Geeniekspression säätelijä	6
3.2	miRNA:n synty	7
3.3	Yhteys syöpään	8
3.4	Biomarkerit syövän tutkimuksessa	10
4	MikroRNA:n tutkiminen	11
4.1	FFPE-näytteiden käyttö	13
4.1	RNA:n käsittely	14
4.2	RNA:n eristys	14
4.3	Mikrosirumenetelmä	15
5	Reaaliaikainen, kvantitatiivinen käänteistranskriptio-PCR	16
5.1	Polymeraasiketjureaktio	17
5.2	Käänteistranskriptio PCR	18
5.3	Reaaliaikainen, kvantitatiivinen PCR	19
5.3.1	SYBR® Green I:n toimintaperiaate	20
5.3.2	Reaaliaikaisen qPCR:n tulosten analysointi	21
5.3.3	Reaaliaikaisen RT-qPCR:n käytettävyys	23
5.4	PCR-työskentely	24
5.4.1	Olosuhteiden optimointi	24
5.4.2	Kontaminaatio	25
6	Aikaisemmat tutkimukset	26
7	Opinnäytetyön tavoitteet ja tarkoitus	27
8	Toteutus	28
8.1	Aineisto	28

8.2	Näytteiden analysointi	29
8.2.1	Käänteistranskriptio-PCR	29
8.2.2	Alukkeiden testaus	30
8.2.3	Reaaliaikainen qPCR	30
8.2.4	Analysointisarjat	31
9	Tulokset	31
10	Työprosessin ja tulosten luotettavuuden arviointi	34
11	Pohdinta	36
	Lähteet	39
	Liitteet	
	Liite 1. Laboratoriopäiväkirja	
	Liite 2. Taulukot	
	Liite 3. Reaaliaikaisen RT-qPCR:n kuvaajia	
	Liite 4. Reaaliaikaisen RT-qPCR:n tulokset	
	Liite 5. Reaaliaikaisen RT-qPCR:n ja mikrosirumenetelmän kvantitatiiviset ja kvalitatiiviset tulokset	

1 Johdanto

Syövän synty ja kehittyminen on monivaiheinen tapahtuma, jonka taustalla ovat perimän muutokset kromosomi- tai DNA-tasolla. Keskeistä syövän synnyssä on solujen jakaantumista, kasvua, erilaistumista ja apoptoosia säätelevien geenien mutaatiot. (Aittonmäki – Peltomäki 2006: 187; Isola 2006: 22.) Keuhkosyöpä on maailman yleisin syöpä ja Suomessakin se on yksi yleisimmistä. 85–90 % kaikista keuhkosyöpätapauksista aiheutuu tupakoinnista ja muita altistavia tekijöitä ovat muun muassa asbesti, ionisoiva säteily ja keuhkohtaumatauti. (Mali – Ojala – Salo 2006: 277–278.)

Keuhkosyövät jaetaan pienisoluisen ja ei-pienisoluisen keuhkosyöpään: suurin osa on ei-pienisoluisia keuhkosyöpätyyppejä. Keuhkosyövän ennuste on hyvin huono, koska se todetaan usein myöhään, kasvaimet ovat heterogeenisiä ja keuhkosyöpä uusiutuu herkästi. Tutkimusmenetelmien kehittyminen mahdollistaa kasvaimen molekulaarisen taustan selvittämisen ja geeniekspression (ilmentymisen) muutosten tutkimisen, minkä avulla pyritään löytämään mahdollisimman tehokasta hoitoa. Tarkan kasvaintyyppin selvittäminen auttaa lisäksi keuhkosyövän diagnosoinnissa ja ennusteen arvioinnissa. (Cherni – Weiss 2011: 1045.)

Muutokset geenien ilmentymisessä vaikuttavat kaikkien elävien organismien kasvuun ja erilaistumiseen. Geenien ilmentyminen tarkoituksenmukaisesti vaatii samanaikaista säätelyä monin tavoin. Virheet ilmentymisessä voivat johtaa useisiin sairauksiin kuten syöpään ja siten geeniekspression muutoksia onkin tutkittu laajalti. (Frilander 2006: 17–18; Finnzymes 2009: 21.)

Mikro-RNA:t (miRNA:t) ovat pieniä, ei-koodaavia RNA-molekyylejä, jotka säätelevät geeniekspressiota ja ovat siten tärkeä osa monia biologisia prosesseja. (Li – Ruan 2009: 1117.) miRNA:n ekspression muutokset ovat yhä enemmän yhdistetty syövän patofysiologisiin muutoksiin. miRNA:n ekspression on havaittu poikkeavan syöpäkudoksessa ja tietyt miRNA:t on tunnistettu mahdollisiksi syövän syntyyn ja kehitykseen vaikuttaviksi kasvunrajoite- ja onkogeneiksi. (Ortholan – Puissegur – Ilie – Barbry – Mari – Hofman 2009: 1047.) Siten miRNA:t ovat nykyisin yksi tutkituimmista molekyyleistä syöpätutkimuksessa (Leidinger – Keller – Meese 2012: 1).

Helsingin yliopiston Haartman-instituutin sytomolekyyli-genetiikan laboratorion tutkimusryhmä pyrkii kehittämään yksilöllistä hoitoa ei-pienisoluiseen keuhkosityöpään. Ryhmä tutkii miRNA:iden ekspressiota keuhkosityöpäkudoksesta muun muassa mikrosirumenetelmällä. Opinnäytetyömme on osa tätä kokonaisuutta. Tarkoituksenamme on selvittää, miten reaaliaikaisen kvantitatiivisen käänteistranskriptio-PCR:n tulokset vastaavat mikrosirumenetelmällä saatuja tuloksia. Työmme tavoitteena on analysoida mikrosirumenetelmällä jo analysoituja näytteitä reaaliaikaisella kvantitatiivisella käänteistranskriptio-PCR:llä ja vertailla saatuja tuloksia.

Opinnäytetyön alussa esitämme teorian, jota pidämme tärkeänä työn ymmärtämisessä. Keuhkosityöpä ja hoidon kehittäminen liittyvät kokonaisprojektiin ja toisaalta tutkimusmateriaalinamme on keuhkosityöpäkudosnäytteitä. Siten haluamme esittää olennaisen teorian keuhkosityöpästä. miRNA ja sen tutkiminen on työmme tärkein näkökohta ja se näkyy myös teorian laajuudessa. Olemme käyneet yksityiskohtaisesti läpi käyttämämme tutkimusmenetelmän pitäen mielessä aiheen rajauksen. Lopuksi esitämme työn toteutuksen ja tulokset sekä arvioimme työprosessin ja tulosten luotettavuutta. Lisäksi esitämme tulosten johtopäätökset ja pohdimme työn onnistumista.

2 Keuhkosityöpä

Syöpä kehittyy solussa perimän muutosten seurauksena. Muutokset voivat olla kromosomi- tai DNA-tason tapahtumia eli yksittäisiä mutaatioita DNA:ssa tai kromosomien rakenteellisia muutoksia (Aittomäki – Peltomäki 2006: 186–187; Kervinen – Gahmberg 2004: 2323.) Mutaatioita tarvitaan useita ja yhdessä ympäristö- ja elämäntapatekijöiden kanssa ne altistavat syövän synnylle. Syöpä ei yleensä periydy, vaikkakin lähes kaikissa syöpätyypeissä on kuvattu perinnöllisiä muotoja. (Aittomäki – Peltomäki 2006: 186–187.)

Keuhkosityöpä on maailman yleisin syöpä ja Suomessakin se on yksi yleisimmistä. Miehillä se on toiseksi yleisin ja naisilla neljänneksi yleisin syöpä. Sairastuminen keuhkosityöpään on suoraan verrannollinen tupakointiin; 85–90 % kaikista keuhkosityöpäpauksista aiheutuu tupakoinnista. Naisilla sairastuvuus on jatkuvasti lisääntynyt ja miehillä päinvastoin vähentynyt, mikä johtuneee muuttuneista tupakointitavoista. Keuh-

kosyövälle altistavia tekijöitä ovat tupakan lisäksi muun muassa asbesti, ionisoiva säteily ja keuhkohtaumatauti. (Mali ym. 2006: 277–278.)

Keuhkosyövät jaetaan kahteen ryhmään: pienisoluisen ja ei-pienisoluisen keuhkosyöpään. Noin 85 % kaikista keuhkosyövistä on ei-pienisoluista tyyppiä. (Cherni – Weiss 2011: 1045.) Ei-pienisoluisien keuhkosyöpien päätyypit ovat levyepiteelikarsinooma, adenokarsinooma ja suurisoluisen karsinooma. Kaikista keuhkosyövistä levyepiteelikarsinooma on yleisin (40 %). (Mali ym. 2006: 279.)

2.1 Oireet ja diagnoosi

Todettaessa keuhkosyöpä voi olla jo pitkälle edennyt, sillä se on usein varhaisvaiheessaan oireeton. Lisäksi useimmat keuhkosyövän oireet jäävät helposti huomaamatta epäspesifisyytensä vuoksi. Keuhkosyövän tärkeimpiä oireita ja löydöksiä ovat hengenahdistus, yskä, kipu, veriyskä, keuhkokuumeet ja varjostuma keuhkon natiiviröntgenkuvassa. Lisäksi yleisoireina on muun muassa heikkous, väsymys, ruokahaluttomuus ja kuumeilu. (Mali ym. 2006: 281.)

Keuhkosyöpää epäiltäessä varmistetaan histologinen diagnoosi ja selvitetään taudin levinneisyys. Potilaan tutkiminen aloitetaan anamneesin kartoituksella, laboratoriokokeilla, natiiviröntgenkuvalla sekä bronkoskopiolla (keuhkoputkien tähystys). Laboratoriotutkimuksia tehdään maksan ja munuaisten toiminnan selvittämiseksi, mutta spesifistä serologista tutkimusta ei ole. Diagnoosi perustuu leikkauksessa poistetun kudoksen mikroskooppiseen tutkimukseen tai biopsianäytteeseen. (Mali ym. 2006: 279, 283–286.)

2.2 Hoito

Keuhkosyövät jaetaan kansainvälisen levinneisyysluokitusjärjestelmän, TNM-luokituksen mukaan primaarikasvaimen, alueellisten imusolmukkeiden ja etäpesäkkeiden mukaan eri levinneisyysasteisiin (0-IV). Potilaan hoito valitaan levinneisyysasteen ja kasvaintyyppin mukaan. Vaihtoehtoina käytetään perinteisesti leikkausta sekä säde- ja solunsalpaajahoidoja joko yksittäin tai erilaisia hoitomuotoja yhdistäen (Teppo 2011; Mali ym. 2006: 288–290.)

Syöpätautien hoidossa suurena ongelmana on hoitoresistenssi. Pahanlaatuiset kasvainsolut kehittävät usein mekanismin sädetystä ja sytostaatteja vastaan esimerkiksi lisäämällä DNA:n korjausaktiiviteettia ja vähentämällä apoptoosin määrää. (Dietel – Sers 2006: 748.) Lisäksi perinteiset syöpälääkkeet (solunsalpaajat) vaikuttavat syöpäsolujen lisäksi myös normaalisoluihin, minkä vuoksi haittavaikutukset ovat usein hankalia (Kervinen – Gahmberg 2004: 2323).

Lisääntynyt tietämys solu- ja molekyylibiologisista tekijöistä on mahdollistanut uudenlaisten syöpälääkkeiden kehittämisen. Nämä niin sanotut täsmälääkkeet pyritään kohdistamaan kullekin kasvaintyyppille ominaisiin solun rakenteisiin ja toiminnan häiriöihin. Tyypillisesti täsmälääkkeet vaikuttavat muun muassa solujen signaalivälitysketjussa toimiviin proteiinikinaaseihin ja muihin säätelyproteiineihin, joiden toiminnan häiriöiden tiedetään olevan syövän syntymisen taustalla. (Kervinen – Gahmberg 2004: 2323–2325.) Ei-pienisoluisessa keuhkosyöpätyypissä eniten tutkittuja ovat tyrosiinikinaasin inhibiittorit (EGFR-TKI) gefitinibi ja erlotinibi (Mali ym. 2006: 291). Gefitinibi tarttuu ATP:n paikalle epidermaalisen kasvutekijän reseptoriin (EGFR) estäen sen autofosforylaation, joka on yksi syövän kehitykseen vaikuttavista tekijöistä. (Kervinen – Gahmberg 2004: 2325).

Tutkimus on osoittanut, että jopa saman tyypin kasvaimet ovat molekyyllitasolla kovin heterogeenisiä. Tämä takia yhden kaikille sopivan lähestymistavan kehittäminen syövän hoitoon saattaakin olla vaikeaa. Siten yksilöllisen hoidon tarve on tiedostettu; hoidon tulisi perustua kasvaimen biologisen luonteen selvittämiseen sekä potilaan soveltuvuuden tarkasteluun. (Wistuba – Gelovani – Jacoby – Davis – Herbst 2011: 135–138.)

Kasvaimen molekulaariseen tunnistukseen perustuvalla hoidolla on suuri potentiaali yksilöllisen hoidon saavuttamiseksi monen tyyppisissä syövässä. Vaikkakin täsmähoito on yleistynyt kliinisessä käytössä, useiden lupaavien lääkeaineiden tulokset ovat jääneet odotettua huonommiksi. (Wistuba ym. 2011: 135–138.) Esimerkiksi gefitinibilääkitys toimii vain noin 10 % keuhkosyöpäpotilaista. Syynä huonoon hyötyprosenttiin pidetään EGFR:n tyrosiinikinaasiosan eroja. On huomattu, että gefitinibilääkitys tehoaa erityisesti niillä, joiden EGFR on mutatoitunut ATP-sitoutumiskohdan läheisyydessä. (Kervinen – Gahmberg 2004: 2325.)

Jotta kalliita täsmälääkehoitoja annettaisiin ”oikeille potilaille” eli valittaisiin henkilöt, jotka todennäköisimmin hyötyvät lääkityksestä, tulisi keuhkosyöpäpotilaiden kasvainten mutaatiot kartoittaa tarkasti. Onkin oletettavaa, että mahdollisimman tehokkaan hoidon saavuttamiseksi potilaan syöpätyypin tarkka tunnistaminen, syövän kehitysasteen ja muiden yksilöllisten tekijöiden selvittäminen tulee tulevaisuudessa olemaan hyvin tärkeässä osassa syövän hoitotapaa suunniteltaessa. (Kervinen – Gahmberg 2004: 2325, 2329–2330.)

Keuhkosyöpä kuuluu edelleen huonon ennusteen syöpiin, vaikkakin keuhkosyöpäpotilaiden elossaoloennuste on vuosikymmenten kuluessa hitaasti parantunut (Mali ym. 2006: 281–293). Elinennuste viiden vuoden päähän on vain 15 prosenttia (Gao – Xu–Shu 2011: 699). Tästä syystä uusien hoitomuotojen ja diagnostisten välineiden löytäminen on tärkeää.

3 Mikro-RNA

Kaikkien lajien perinnöllinen informaatio on koodattuna genomiin, jonka toiminnallisia yksiköitä sanotaan geneiksi. Geeni on pätkä DNA:ta, joka pitää sisällään tiedon tuotettavasta proteiinista ja RNA:n rakenteesta. Geenin ilmentyminen (ekspressio) pitää sisällään geneettisen informaation lukemisen DNA:sta RNA:ksi ja edelleen proteiiniksi. Tumassa tapahtuvassa transkriptiossa muodostuu DNA:ta vastaava RNA-molekyylä. Tämä esiaste-RNA muokataan muun muassa silmukoinnin avulla lähetti-RNA:ksi (mRNA). Valmis mRNA kuljetetaan sytoplasmaan, jossa siitä tehdään proteiinia (translaatio). (Frilander 2006: 14–22.)

Kaikki DNA:sta tuotetut RNA-kopiot eivät toimi lähettinä (mRNA), vaan näiden geenien lopullisia tuotteita ovat erilaiset RNA:t, kuten ribosomaaliset RNA:t, siirtäjä-RNA:t ja mikro-RNA:t (miRNA) (Palotie 2006: 51–52). miRNA on ei-koodaavaa RNA:ta, joka säätelee geeniekspressiota ja on siten tärkeä osa monia biologisia prosesseja. miRNA:t osallistuvat muun muassa solujen erilaistumiseen ja uudismuodostukseen sekä apoptoosiin ja erilaisiin tautiprosesseihin. (Li – Ruan 2009: 1117.) miRNA:t ovat lyhyitä, 19–24 nukleotidin mittaisia yksijuosteisia RNA-molekyylejä (Cherni – Weiss 2011: 1045). Bioinformaatikoilta saatu tieto osoittaa, että miRNA:t ovat mukana melkein kaikissa

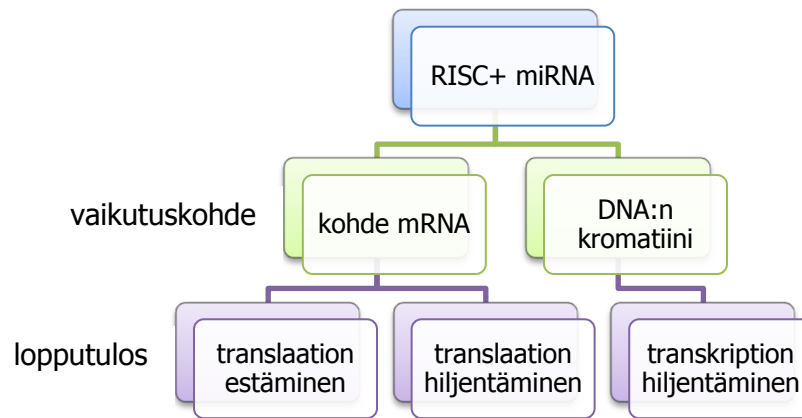
tärkeimmissä signalointireiteissä, esimerkiksi monien kasvaimeen liittyvien geenien ekspressiossa (Gao ym. 2011: 699).

Ensimmäisen miRNA:n löysi Victor Ambrosin tutkimusryhmä Harvardin yliopistosta 1990-luvun alussa. Tämän *Caenorhabditis elegans* -sukkulamadosta löydetyn miRNA:n (lin-4) huomattiin säätelevän geeniekspressiota translaatiovaiheessa. Löydöksen jälkeen käytettiin useita menetelmiä muiden miRNA:iden löytämiseen eri eläin- ja kasvilajeista. (Ahmed 2007: 569–570.)

Manchesterin yliopiston ylläpitämän miRBASE:n mukaan 168 eri lajin genomista on löydetty 18226 erilaista miRNA:ta (11/2011). miRNA:ita on löydetty muun muassa kasvi- ja nisäkässoluista sekä viruksista (Ahmed 2007: 570). Ihmisen genomissa olevien miRNA:iden määrää ei tiedetä vielä tarkasti, mutta vuonna 2012 julkaistun artikkelin mukaan niitä oli löydetty yli 1500 (Leidinger ym. 2012: 1). miRNA:iden säätelykohteena on noin 30 % kaikista ihmisen proteiinia koodaavista geeneistä (Ortholan ym. 2009: 1047). Määrä on yhä kiistanalainen; on ennustettu, että miRNA:t säätelisivät jopa 60 % ihmisen genomista (Friedman – Fahr – Burge – Bartel 2009: 92).

3.1 Geeniekspression säätelijä

miRNA:t säätelevät yksittäisten geenien translaatiota sitoutumalla komplementaarisesti lähetti-RNA-molekyylisiin. miRNA kiinnittyy mRNA:han täydellisesti aiheuttaen sen pilkkoutumisen, jolloin translaatio estyy. Toisaalta miRNA voi sitoutua kohteeseen myös osittain, mikä johtaa translaation hiljentymiseen. (Frilander 2006: 25–26; Leidinger ym. 2012: 1.) On mahdollista, että miRNA:t vaikuttavat kohdegeeniin myös transkriptiota hiljentämällä (kromatiinitasolla) (Ahmed 2007: 570–572). Kuviossa 1 on esitetty miRNA:n mahdolliset vaikutuskohteet sekä säätelyn lopputulokset. Aikaisemmin miRNA:n on oletettu säätelevän geeniekspressiota vain inhiboiden sitä, mutta lähiaikoina on saatu viitteitä, että miRNA:t voisivat myös lisätä geeniekspressiota (Leidinger ym. 2012: 1).



Kuvio 1. miRNA:n vaikutuskohteet ja säätelyn lopputulokset.

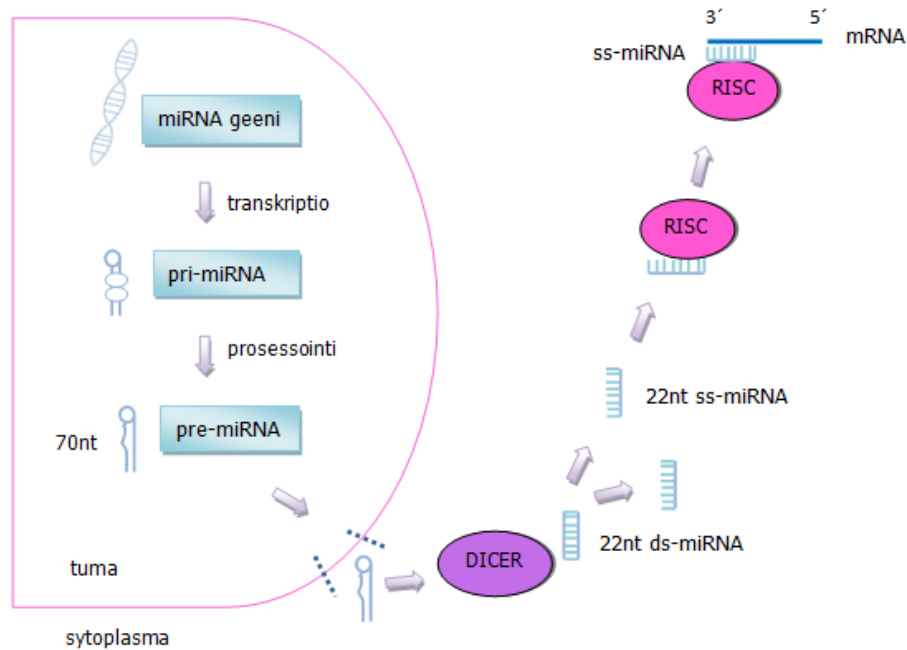
Yksi miRNA pystyy säätelemään useita satoja geenejä, ja toisaalta yhtä geeniä säätelee samanaikaisesti useampi miRNA. Yksittäiset, lähetti-RNA:han sitoutuneet miRNA:t pystyvät yhteisvaikutuksella määräämään geenin ilmentymisastetta translaatiota hiljentämällä. Säätelyn tarkoituksena on säätää geenin ilmentyminen tarkalleen oikealle tasolle kohdesolussa tasapainottaen proteiinien tuottoa. Yksittäisten miRNA:iden ilmentymisessä on eroja eri kudosten, solutyypin ja yksilönkehityksen eri vaiheiden välillä. (Frilander 2006: 26.)

3.2 miRNA:n synty

miRNA-geenit luetaan RNA polymeraasi II:lla (transkriptio) esiaste miRNA:ksi (pri-miRNA). Nämä pri-miRNA:t voivat olla joko koodaavaa tai ei-koodaavaa RNA:ta, ja niitä prosessoidaan tumassa sijaitsevalla mikroprosessorikompleksilla lyhyemmiksi, 70 nukleotidin sekvensseiksi (pre-miRNA). (Ortholan ym. 2009: 1047–1048; Ahmed 2007: 570–571.)

pre-miRNA kulkeutuu tumasta sytoplasmaan tumakalvossa sijaitsevan portin (exportin-5) kautta. pre-miRNA:sta tehdään sytoplasmassa sijaitsevan RNAasi polymeraasi III Dicerin avulla 22 nukleotidin pituinen, kaksijuosteinen miRNA (ds-miRNA). (Ortholan ym. 2009: 1047–1048; Ahmed 2007: 570–571.) Helikaasi-entsyymi avaa juosteet, joista toinen valitaan kohdegeenin säätelijäksi. Valinnan jälkeen yksijuosteinen miRNA liitetään hiljentämiskompleksiin (RNA induced silencing complex, RISC), joka tunnistaa kohdegeeniin kohdistuvan säätelyn ja välittää informaation miRNA:lle. Yksijuosteinen

miRNA (ss-miRNA) kiinnittyy joko osin tai kokonaan emäspariutumissäännön mukaisesti lähetti-RNA:n (mRNA) 3' päähän. (Ahmed 2007: 570–572.) (Kuvio 2).



Kuvio 2. miRNA:n synty ja kiinnittyminen lähetti-RNA:han (Mukaiillen Ortholan ym. 2009: 1048).

pri-miRNA transkriptio ja miRNA:n prosessointi on tarkasti säädeltyä; pienikin muutos prosessoinnissa vaikuttaa lopputuotteeseen. Siten vääränlainen miRNA:n säätely vaikuttaa karsinogeneesiin. (Ortholan ym. 2009: 1053.)

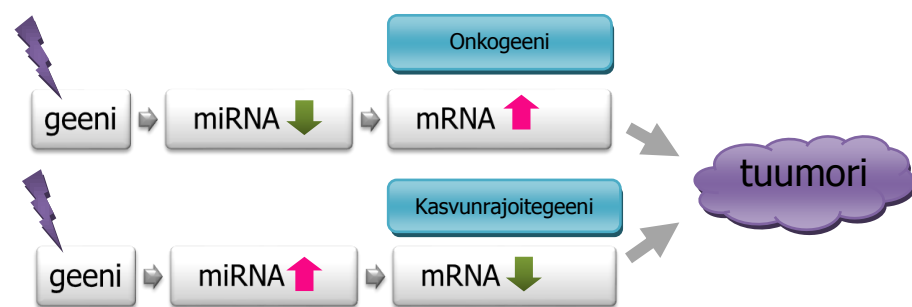
3.3 Yhteys syöpään

Syövän synnylle keskeiset DNA-vauriot kohdistuvat geeneihin, joiden epänormaali toiminta johtaa syövän kehittymiseen (karsinogeneesiin). Nämä niin sanotut syöpägeenit jaetaan kahteen päätyyppiin: onkogeeneihin ja kasvunrajoitegeeneihin. Onkogeenin aktivoituminen ja niitä vastustavien kasvunrajoitegeenien normaalin toiminnan häiriintyminen johtavat syövän syntyyn. (Isola 2006: 25–26.)

miRNA:iden ja sairauksien välillä ei ole yksiselittäistä yhdistävää tekijää, mutta useat tutkimukset osoittavat miRNA:n ekspresion poikkeavan syöpäkudoksessa; miRNA:t voivat olla yli- tai aliekspresoituneita (Frilander 2006: 27; Ortholan ym. 2009: 1049).

Esimerkiksi verrattaessa ei-pienisolusta keuhkosyöpäkudosta ja vastaavaa normaalia kudosta 104 näytteessä, havaittiin 43 poikkeavaa miRNA-ekspressiota: 15 yliekspressoitunutta (esimerkiksi mir-155, mir-21, mir-191 ja mir-17-3p) sekä 28 aliekspressoitunutta (let-7-a2 ja mir-125a) (Ortholan ym. 2009: 1050). Näistä osa on hyvin merkittäviä keuhkosyövän karsinogeneesissä. (Cherni – Weiss 2011: 1045–1047.)

miRNA:n aktiivisuuden muuttuminen saattaa olla yhtenä avaintekijänä eri syöpien synnyssä. Normaalisti miRNA säätelee onkogeeneja vähentämällä sen määrää, toimien siis tuumorisupressorina. Kun miRNA:n toiminta on heikentynyt esimerkiksi mutaation, deleetion tai miRNA:n prosessoinnin virheiden takia onkogeenin määrä lisääntyy, mikä voi myötävaikuttaa syövän muodostumiseen. Toisaalta, jos miRNA on yliekspressoitunut esimerkiksi translokaation tai geenin vahvistamisen vuoksi, se inhiboi tuumorisupressorina toimivaa geeniä liikaa, jolloin se voi edistää tuumorin kasvua. (Ahmed 2007: 576–577.) miRNA:n yhteys syöpään on kuvattu kuviossa 3.



Kuvio 3. miRNA:n yhteys syöpään. Mutaation tai muun häiriön takia (salama), miRNA:n aktiivisuus muuttuu vaikuttaen onkogeeninä tai kasvunrajoitegeeninä toimivaan mRNA:n määrään.

Myös syöpään liittyvä miRNA (onco-miR) voi toimia joko onkogeeninä tai kasvunrajoitegeeninä. Onkogeenisesti yliekspressoitu miRNA on osallisena karsinogeneesiin vaikuttaen solun kasvureittiin, apoptoosin välttämiseen ja rajattomaan jakautumiseen. Lisäksi se stimuloi verisuonten uudismuodostusta, invaasiota ja etäpesäkkeiden muodostusta. Tuumorisupressiivisten miRNA:iden vähentyneellä ekspressiolla voi olla samantapaisia vaikutuksia. (Gao ym. 2011: 700.) miRNA let-7 on esimerkki tuumorisupressorigeenistä, jonka aliekspressio johtaa onkogeenin lisääntymiseen. (Cherni – Weiss 2011: 1047).

miRNA säätelee kohdegeeniä ja tämän säätelyn häiriintyminen voi johtaa kasvaimen syntyyn ja kehittymiseen. Tällä on huomattu olevan kliinistä merkitystä useisiin syöpiin. (Gao ym. 2011: 699.) Kasvainten molekyylinen tutkimus avaa uusia näkökulmia, ei pelkästään mahdollisimman tehokkaan hoidon löytämiseen vaan kasvaintyyppin luokitteluun ja ennusteeseen syövän etenemisestä ja hoidon onnistumisesta (Cherni – Weiss 2011: 1045).

3.4 Biomarkkerit syövän tutkimuksessa

Biomarkkeri on kudoksesta, verestä tai muista kehon nesteistä löydettävä biologinen molekyyli, joka voi kuvata joko normaalia biologista prosessia tai sairauden tilaa ja kehittymistä. Biomarkkereita käytetään hyväksi muun muassa hoidon vasteen havaitsemiseen tautitiloissa. (Paasikivi 2010: 20.) Syöpien yhteydessä puhutaan kasvainmerkkiaineista, joita käytetään syövän diagnostiikassa, seurannassa ja ennusteen arvioinnissa (Stenman – Haglund – Roberts 2006: 95).

Biomarkkerien löytäminen ja niiden käyttö syövän ennaltaehkäisyssä, diagnosoinnissa ja ennusteen arvioinnissa tulisi suuressa määrin parantamaan ei-pienisoluisia keuhkosyöpää sairastavien potilaiden hoitoa (Gao ym. 2011: 699). Vaikka uusia biomarkkerikandidaatteja on löydetty (esim. EGFR-mutaatio), vain muutamia on validoitu kliiniseen käyttöön. Useat biomarkkeritutkimukset eivät ole tarpeeksi sensitiivisiä ja spesifisiä, biomarkkerien käyttö on kallista eikä välttämättä tuota toivottua tulosta. Lisäksi jokainen lupaavalta vaikuttava biomarkkeri on todennäköisesti sopimaton laajaan kliiniseen käyttöön. Biomarkkerien tutkimisessa on vaihtelua laboratorioiden välillä, joten tarvittaisiin standardisoituja menetelmiä, henkilökunnan ammattitaidon lisäämistä ja laadunvarmistusta biomarkkerien tutkimiseen. (Wistuba ym. 2011: 135–138.)

Keuhkosyövän ennuste ei ole juuri parantunut viimeisten vuosikymmenten aikana, huolimatta diagnoosin ja hoidon laajasta kehityksestä. Uudet tutkimukset ovat osoittaneet miRNA:n vaikutuksen karsinogeneesiin ja luoneet uusia odotuksia hoidon parantamiseen. (Ortholan ym. 2009: 1056.) Lisääntyneet tutkimukset miRNA:n osalta ovat avanneet keskustelun miRNA:iden käyttämisestä biomarkkereina, jotka mahdollisesti auttaisivat ratkaisemaan ongelmaa (Gao ym. 2011: 699). miRNA:t voisivat toimia joko diag-

nostisena välineenä, apuna ennusteen arvioinnissa tai jopa hoitomuotona (Leidinger ym. 2012: 3).

miRNA:ita voidaan löytää kudosten lisäksi myös monista kehon eri nesteistä kuten koverestä, plasmasta, seerumista ja virtsasta sekä jopa syljestä, ysköksestä ja BAL-näytteestä. Tästä syystä miRNA:t voisivat tulevaisuudessa olla potentiaalisia biomarkkereita keuhkosyövän varhaisessa havaitsemisessa myös ei-invasiivisena työkaluna. (Leidinger ym. 2012: 2.)

miRNA:n ekspression tutkiminen voi mahdollisesti olla apuna myös ennusteen arvioinnissa. On esitetty, että joidenkin miRNA:iden ekspressiotasoilla ja potilaan ennusteella on yhteys. Esimerkiksi miR-21 yliekspressio on yhdistetty huonoon ennusteeseen. Vaikkakin miRNA:n ekspressiotason ja huonon selviytymisen välillä on selvä yhteys, spesifiset miRNA:t vaihtelevat tutkimusten mukaan. Syynä näihin eroihin on tutkimusten erilaisuus ja spesifisten miRNA:iden löytämistä varten metodeja tulisi vakioida yhtenäisempien tulosten saamiseksi. (Leidinger ym. 2012: 5.)

Lisäksi on herännyt kiinnostus käyttää miRNA:ta hoitomuotona. Hoidon kehittämisen periaatteena on lisääntynyt tieto miRNA:n roolista toimia tuumorisupressorina ja onkogeena. (Leidinger ym. 2012: 3.) Esimerkiksi erään tutkimuksen mukaan paksusuolen-syöpäkudokseen injektoitu tuumorisupressori miRNA, mir-34a vähensi merkittävästi tuumorin kasvua. miRNA voisi toimia myös potentiaalisena terapeuttisena kohteena. (Ortholan ym. 2009: 1056.) Tulevaisuudessa geen- ja proteiiniekspressioireitteihin kohdistuvalla hoidolla tulee mahdollisesti olemaan suuri merkitys (Wistuba ym. 2011: 135–138).

4 MikroRNA:n tutkiminen

Vasta viime aikoina on ymmärretty miRNA:n tärkeys alati kehittyvässä lääketieteessä. miRNA:t ovatkin nopeasti kehittyvä tutkimuskohde, ja niiden rooli molekyyli-genetiikan alalla on kasvanut viime vuosina huimasti. Yleisesti käytettäviä menetelmiä kuten reaaliaikaista PCR:ää ja mikrosirutekniikkaa on sovellettu myös miRNA:iden tutkimiseen. (Li – Ruan 2009: 1117; Ortholan ym. 2009: 1047.)

miRNA:n profilointiin on kehitetty useita menetelmiä muun muassa miRNA:n kloonaminen, Northern-hybridisaatio (blotting), reaaliaikainen käänteistranskriptio-PCR (reaaliaikainen RT-PCR) ja in situ hybridisaatio (ISH). Kloonamista käytetään pääasiassa uusien miRNA:iden löytämiseen ja Northern-hybridisaatio on kloonamista tarkempi, rutiinikäytössä oleva metodi miRNA:iden tutkimiseen. Reaaliaikaisella RT-PCR:llä taas voidaan määrittää spesifiset miRNA:t näytteistä ja ISH:llä paikallistetaan yksittäinen miRNA soluista tai kudoksista. (Li – Ruan 2009: 1117–1118.)

Kaikilla näillä tekniikoilla on omat etunsa, mutta myös tietyt rajoitteensa. Kloonaminen ei ole tarpeeksi tarkka lähestymistapa miRNA:iden määrittämiseen; Northern-hybridisaatio on erittäin aikaa vievää, vaatii radioaktiivisia koettimia sekä suuren määrän RNA:ta; PCR:n rajoitteena on sen suuri hinta ja ISH ei ole sopiva laajaan profilointiin. Näihin ongelmiin on kehitelty erilaisia ratkaisumalleja, muun muassa LNA:n (locked nucleic acid) käyttö affiniteetin (sitoutumisen) parantamiseksi koettimen ja kohdemolekyylin välillä Northern-hybridisaatiossa ja ISH:ssä. Edellä mainittujen rajoitusten lisäksi kaikilla näillä menetelmillä on yleisiä heikkouksia, muun muassa kapea-alaisuus ja hitaus. Onneksi mikrosirumenetelmät pystyvät paikkamaan näitä heikkouksia tarjoamalla nopeaa ja laaja-alaista analyysiä. (Li – Ruan 2009: 1118–1119.)

Useat viimeaikaiset tutkimukset osoittavat, että reaaliaikainen kvantitatiivinen käänteistranskriptio-PCR (reaaliaikainen qRT-PCR) on hyvin sensitiivinen ja spesifinen menetelmä, joka tarjoaa arvokasta tietoa geenien ilmentymisestä. Kuitenkin kerralla pystytään mittaamaan vain rajoitettu määrä geenejä. Vastaavasti mikrosirumenetelmän herkkyys ja spesifisyys eivät ole samaa tasoa kuin PCR:ssä, mutta sillä pystytään mittaamaan satoja miRNA:n ekspression tasoja samaan aikaan ja se onkin yleisesti käytössä geenien ilmentymisen tutkimisessa ja transkriptioaktiivisuuden yleiskuvan muodostamisessa. (Farragher – Tanney – Kennedy – Harkin 2008: 435; Li – Ruan 2009: 1123.)

miRNA:t ovat huomattavan stabiileja ja niitä voidaan tehokkaasti eristää sekä määrittää formaliinifiksoiduista parafiinivalmistenäytteistä (FFPE-näytteet). Tämänhetkisen käsityksen mukaan miRNA:t kestävät RNAasi-käsittelyn, keittämisen, äärimmäiset pH-olosuhteet, pitkäaikaisen säilyttämisen sekä uudelleen sulattamisen ja jäädyttämisen hyvin. (Gao ym. 2011: 702, 704.)

4.1 FFPE-näytteiden käyttö

Tuorenäytteiden saannin rajallisuus vaikeuttaa tutkimustyötä, mutta formaliinifikoituja parafiininäytteitä on laajalti saatavissa säilytettynä patologian laboratorioissa ympäri maailmaa. Näytteiden suuri määrä tarjoaa mahdollisuuden tehdä laajamittaista tutkimusta molekyyli-genetiikan alalla. Kudos säilyy yhtenäisenä formaliinifikoituissa parafiinivalmisteissa, mutta toisaalta tekniikka säilyttää nukleiinihapot huonosti. RNA:n eristäminen FFPE-näytteistä on ongelmallista käsittelyn vaikuttaessa haitallisesti RNA:han: se pilkkoutuu ja lisäksi formaliini aiheuttaa ristireaktioita proteiinien ja nukleiinihappojen välillä. Ongelmaa on pyritty ratkaisemaan muuttamalla eristystekniikan vaiheita, esimerkkinä proteinaasi K:n käyttö tuorenäytteissä käytettävän guanidiini-tiosyanaatin tilalla. Lisäksi on kehitetty spesifisiä reagenssipakkauksia ja ohjekirjoja tälle näytemateriaalille. (Farragher ym. 2008: 435–436.)

miRNA:n eristäminen FFPE-näytteistä onnistuu kuitenkin suhteellisen hyvin: miRNA:n pieni koko vaikuttaa sen vakauten fiksaation aikana, eikä miRNA ole yhtä altis leikkautumiselle RISC-kompleksiin kiinnittyessään. Siten miRNA:ta pystytään tutkimaan FFPE-näytteistä. Toisaalta formaliinifikoitujen parafiinivalmisteiden käyttö vaikuttaa käänteistranskription tehokkuuteen vähentämällä sitä. (Goswami ym. 2010: 2.)

Parafiinifikoitujen valmisteiden onnistunutta käyttöä PCR:ssä ja RNA:n eristämässä on kuvattu jo 1980-luvulla. Formaliinifikoitujen parafiinivalmisteiden käyttö soveltuu geeniekspression määrittämiseen reaaliaikaisella kvantitatiivisella PCR:llä. Formaliinifikaatio vaikuttaa RNA-fragmenttien pituuteen, jolloin ne voivat olla jopa alle 200 emäsparin pituisia (Farragher ym. 2008: 437.) Fragmenttien pituuteen vaikuttaa myös näytteen tyyppi, ikä, valmisteen laatu ja säilytysolosuhteet (QIAGEN 2011: 8). Tutkimukset osoittavat, että alle 130 emäsparin pituiset RNA:t ovat optimaalisia ja määrityksen onnistuminen on erittäin todennäköistä. qRT-PCR:ssä on mahdollisuus käyttää lyhyitä RNA-fragmentteja, mikä viittaa siihen, että menetelmä sopii hyvin tällaisten näytteiden tutkimiseen. (Farragher ym. 2008: 437.)

4.1 RNA:n käsittely

RNA on epävakaampaa kuin DNA ja se hajoaa herkemmin näytteen keräyksessä, prosessoinnissa ja säilytyksessä. Puhtaan ja yhtenäisen RNA:n valmistus on suhteellisen vaikeaa, koska se kontaminoituu helposti ympäristössä olevien RNA:ta hajottavien entsyymien takia (Brown 2000: 13.) Tärkein tehtävä RNA:n valmistamisessa on nopeasti ja tehokkaasti inhiboida RNA:ta hajottavat ribonukleaasit, joita on kaikissa elävissä soluissa (Brown 2000: 13). Ribonukleaasien pääsy näytteisiin on estettävä ja näytteissä jo olevien entsyymien toiminta inaktivoitava. RNA:n eristyksessä käytettäviä inhiboivia aineita ovat muun muassa RNAasin, hepariini ja proteinaasi K. Esimerkiksi proteinaasi K hajottaa ribonukleaaseja ja orgaanisia liuottimia. (Wilkinson 2000: 69.)

Laboratorioympäristön tekeminen "ribonukleaasivapaaksi" on tärkeää menetelmän onnistumiseksi. Ribonukleaasit ovat hyvin vakaita ja aktiivisia entsyymejä, jotka eivät yleensä vaadi kofaktoreita toimiakseen. Ne inaktivoituvat huonosti ja tuhoavat RNA:ta nopeasti. Ribonukleaasit kestävät myös hyvin erilaisia fysikaalisia käsittelyitä. Käytettävät tarvikkeet (pipetit, pipetinkärjet, putket yms.) ja työtasot on käsiteltävä RNAasia tuhoavalla aineella. Autoklavointi ei yksin inaktivoi kaikkia ribonukleaaseja: esimerkiksi lasimateriaali voidaan käsitellä dietyylipyrokarbonaatilla (DEPC). (Brown 2000: 13; QIAGEN 2011: 29.)

RNA:ta käsiteltäessä aseptinen tekniikka on lähtökohtana laadukkaalle työskentelylle. Yleisin ribonukleaasikontaminaatio johtuu käsissä ja pölyhiukkasissa olevista bakteereista sekä homeista. Tämän takia on käytettävä suojäkäsineitä ja huolehdittava, että työskentelytilan ilma on mahdollisimman puhdas. Käsineet on vaihdettava tarpeeksi usein ja putket suljettava aina pipetointien välillä. Käsiteltävä RNA on pidettävä jäissä työskentelyn aikana. (QIAGEN 2011: 29.)

4.2 RNA:n eristys

Molekyylibiologinen tutkimus alkaa usein nukleinihappojen eristämällä ja puhdistamisella. Näytelaadusta ja myöhemmistä tutkimuksista riippuen käytetään erilaisia eristys-tekniikoita, esimerkiksi DNA:lle ja RNA:lle on olemassa omat ohjekirjansa. Menetelmän valintaan vaikuttavat myös toivottu nukleinihappojen määrä ja puhtaus. (Nukleinihappojen eristys ja puhdistus 2006.) RNA:n eristyksessä käytettäviä menetelmiä on satoja,

mutta monet niistä ovat aikaa vieviä ja työläitä. Tavoiteltavaa olisi, että menetelmät olisivat nopeita ja yksinkertaisia. (Wilkinson 2000: 69.)

Eristys aloitetaan solujen mekaanisella, kemiallisella ja/tai entsyymaattisella hajotuksella. Sen jälkeen inaktivoidaan solujen nukleiinihappoja hajottavat nukleasaat ja eristetään nukleiinihapot suodattamalla tai saostamalla. Eristetty materiaali puhdistetaan epäpuhtauksista, kuten proteiineista, erilaisia menetelmiä käyttäen. Näitä menetelmiä ovat muun muassa saostaminen, sentrifugointi ja kromatografia. (Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus 2006.)

RNA:n laatu voidaan tarkistaa eristämisen jälkeen eri tavoin. RNA:n konsentraatio saadaan selville mittaamalla absorbanssi spektrofotometrillä. Pieniä määriä RNA:ta on vaikea mitata fotometrillä; näiden tarkka määrittäminen voidaan tehdä esimerkiksi Agilent® 2100 Bioanalyserilla. Laite antaa tulokseksi kuvaajan, josta nähdään näytteessä olevien eri RNA:iden pituudet. Lisäksi saadaan RNA:n yhtenäisyyttä kuvaava luku, ns. integrity number. (QIAGEN 2011: 31–33.) RNA:n laatu on tärkeää jatkotutkimusten kannalta.

4.3 Mikrosirumenetelmä

Mikrosirumenetelmä perustuu kohdemolekyylien ja mikrosirulevyyn kiinnitettyjen vastinkoettimien hybridisaatioon. Hybridisaatiossa nukleiinihappojuosteet liittyvät toisiinsa komplementaarisesti. Eristetyt miRNA:t leimataan fluoresoivalla väriaineella ja hybridisoidaan mikrosirutekniikalla. Leimatun miRNA:n sitoutuminen sen vastinkoettimeen saa aikaan fluoresenssin. (Li – Ruan 2009: 1119.) Sen tuottama signaali havaitaan laserpohjaisella mikroskoopilla eli skannerilla. Myös kunkin testipisteen eli spotin aallonpituuksien intensiteetit saadaan määritettyä. (Suominen – Pärssinen – Haajanen – Pelkonen 2010: 206–207.)

Onnistuneella mikrosirutekniikalla on kaksi perusvaatimusta. Ensimmäiseksi kohteen (miRNA) on oltava yksijuosteista, jotta se voi sitoutua komplementaariseen vastinjuosteeseen. Toiseksi kohde on pystyttävä havaitsemaan sen sitoutuessa (leimaaminen). Laadukas mikrosirutekniikka vaatii täsmällistä koettimien suunnittelua ja näytteiden valmistelua sekä onnistunutta miRNA:n leimaamista. (Febbo 2005: 256.)

Koettimen mahdollisimman tehokkaaseen ja spesifiseen sitoutumiseen vaikuttavat hybridisaatio-olosuhteet. Oikeat olosuhteet luodaan ottamalla huomioon muun muassa lämpötila, hybridisaatiopuskurin ionivahvuus sekä tutkittavan alueen ja koettimen pituus. Lopputuloksen onnistumiseen vaikuttaa olosuhteiden lisäksi hybridisaation jälkeiset pesut. Hybridisaatio- ja pesuolosuhteet vaihtelevat menetelmästä riippuen. (Suominen ym. 2010: 193–194.)

Mikrosirumenetelmällä voidaan samanaikaisesti tarkastella hyvin monia geenejä ja se onkin paras vaihtoehto tutkittaessa satojen miRNA:iden ekspressiota (Knuutila 2006: 46; Li – Ruan 2009: 1123). Vaikka mikrosirumenetelmä tarjoaa laajalti informaatiota geenien ekspressiosta, muun muassa heikkoudet herkkydessä ja sisäisissä standardeissa rajoittavat tulosten analysointia (Finnzymes 2009:21).

5 Reaaliaikainen kvantitatiivinen käänteistranskriptio-PCR

Polymeraasiketjureaktio on yksi kliinisen molekyylibiologian menetelmien tukipilareista, johtuen muun muassa sen reaktiovaiheiden yksinkertaisuudesta. PCR:llä saadaan tuotettua eksponentiaalisesti DNA-sekvenssin kopioita pienestä määrästä DNA:ta. PCR on niin herkkä menetelmä, että sillä voidaan onnistuneesti monistaa DNA:ta jopa yhdestä solusta. Toisaalta valtava herkkyys aiheuttaa kontaminaatiovaaran, joka on haitta menetelmän onnistumiselle. (Theophilus 2005: 63–65.)

Kliinisessä käytössä PCR:ää käytetään lähinnä infektiodiagnostiikassa ja geenimutaatioiden tunnistamisessa (Theophilus 2005: 65). PCR tarjoaa erinomaisia välineitä virus-ten, parasiittien ja bakteerien diagnostiikkaan. Sitä käytetään laajasti myös genotyypityksessä määrittämään polymorfismia kuten yhden nukleotidin mutaatioita (Finnzymes 2009: 21–23.) Lisäksi on kehitetty erilaisia menetelmiä perinnöllisten sairauksien toteamiseen ja muun muassa sikiön sukupuolen määrittämiseen lapsivesinäytteestä sekä jo hedelmöittyneestä munasolusta. PCR:ää käytetään myös oikeuslääketieteessä yksilön tunnistamiseen. (Suominen ym. 2010: 176.)

Useita erilaisia PCR:n sovelluksia on kehitetty käyttötarpeen mukaan. Esimerkiksi reaaliaikainen kvantitatiivinen käänteistranskriptio-PCR (reaaliaikainen RT-qPCR) on hyvin

tehokas geeniekspression tutkimiseen. Se on yksi tehokkaimmista menetelmistä tutkitessa pieniä määriä RNA:ta sekä pieniä RNA-molekyyleja. (Finnzymes 2009: 21–22.) Siksi miRNA:ta ja sen esiasteita voidaan helposti analysoida käyttäen reaaliaikaista qPCR:ää (Ortholan 2009: 1047).

Käytimme työssämme reaaliaikaista RT-qPCR:ää. Siinä yhdistyvät RNA:n muuttaminen komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA), tuotteen monistaminen PCR:llä, fluoresoivan leiman käyttäminen reaaliaikaisessa mittaamisessa ja kvantitatiivisen tuloksen saaminen (Schmittgen 2006: 127). Useimmat lähteet yhdistävät kvantitatiivisen ja reaaliaikaisen PCR:n, ja niistä puhutaankin usein synonyymeinä. Siksi olemme yhdistäneet kvantitatiivisen ja reaaliaikaisen PCR:n samaan kappaleeseen, jossa tuomme kuitenkin ilmi sovellusten ominaispiirteet.

Seuraavassa käymme läpi PCR:n perusperiaatteen, työssämme käytettävät PCR-sovellukset sekä reaaliaikaisen qPCR:n tulosten tarkastelun. Lopuksi tuomme esille muun muassa PCR-työskentelyyn liittyviä yleisiä huomioita.

5.1 Polymeraasiketjureaktio

PCR:ssä monistetaan nukleiinihappojärjestykseltään tunnettua DNA-jaksoa. Lähtöaineena käytetään kaksijuosteista DNA:ta, jonka juosteet avataan korkeassa lämpökäsittelyssä. Menetelmä perustuu kahteen alukkeeseen, jotka kiinnittyvät juosteiden vastakkaisiin päihin. Monistettava DNA-jakso jää alukkeiden väliin. (Suominen ym. 2010: 153–154.)

PCR koostuu useista sykleistä, joissa jokaisessa on kolme vaihetta. Alukkeiden sitoutuminen templaattiin (DNA-jakso) vaatii juosteiden erottamisen (denaturointi) toisistaan kuumennuskäsittelyllä. Alukkeet saadaan kiinnittymään templaattiin laskemalla lämpötilaa hetkellisesti (annealing). Tämän lyhyen ajan kuluessa alukkeet ehtivät kiinnittyä, mutta templaatti säilyy yksijuosteisena. Lämpötila nostetaan DNA-polymeraasille sopivaksi, jolloin se alkaa liittää vapaita nukleotideja alukkeen perään templaatin mallin mukaisesti (ekstensio; pidennys). DNA-polymeraasi toimii 5' → 3'-suunnassa liittäen nukleotidit alukkeen 3'-päähän, jolloin muodostuu templaatin vastinjuoste. Kahdesta

juosteesta on näin saatu monistettua neljä juostetta (1. sykli). Seuraava sykli alkaa muodostuneiden juosteiden denaturoinnilla. (Suominen ym. 2010: 153–157.)

Yhden syklin vaiheet ovat siis denaturointi, alukkeiden sitoutuminen ja pidennys, joita jatketaan kunnes tarvittava määrä kohteena olevaa DNA-sekvenssiä on saatu monistettua. DNA-polymeraasi jatkaa toimintaansa, kunnes seuraava sykli alkaa. (Kuvio 4.) Sitten ensimmäisessä syklissä muodostuu monistettavaa aluetta pidempiä jaksoja. Ensimmäiset täsmälleen monistettavan alueen pituiset tuotteet saadaan vasta toisen syklin tuloksena, jolloin niiden määrä kaksinkertaistuu sykli sykliltä (eksponentiaalinen kasvu). (Suominen ym. 2010: 154–157.)



Kuvio 4. PCR-sykli.

PCR-sovelluksen valintaan vaikuttavat näytteen laatu, prosessin nopeus ja toivottu lopputulos (Suominen ym. 2010: 167, 170; Sugden 2005: 327). Eri sovelluksissa käytetään hyväksi polymeerasiketjureaktion peruseriaatetta.

5.2 Käänteistranskriptio PCR

Perinteisessä polymeerasiketjureaktiossa templaattina toimii DNA. Jos monistettava materiaali on RNA:ta, se pitää ensiksi muuttaa DNA:ksi yhdellä PCR:n sovellusmenetelmällä, käänteistranskriptio-PCR:llä. (Suominen ym. 2010: 170.)

Jos lähtömateriaalina on ei-koodaavaa RNA:ta, kuten miRNA, siltä puuttuu 3`-pästä polyA-häntä. Se täytyy syntetisoida poly(A)-polymeerasilla, jotta prosessi voidaan aloittaa. Käänteistranskriptiolla muutetaan RNA cDNA:ksi käyttäen muun muassa oligo-

dT-alukkeita. Syntyneitä cDNA-juostetta käytetään PCR-reaktiossa templaattina ja ensimmäisessä syklistä muodostuu cDNA:lle vastinjuoste. Seuraavissa sykleissä kumpikin juoste toimii templaattina. Kaikki vaiheet cDNA:n valmistuksessa ja monistuksessa voidaan tehdä yhdessä koeputkessa ilman välivaiheita. (QIAQEN 2009: 9–10; Suominen ym. 2010: 170–172.) Kun lähtömateriaalina on RNA:ta, sen käsittelyä koskevat erityisehdot on huomioitava PCR:n perusohjeiden lisäksi.

5.3 Reaaliaikainen, kvantitatiivinen PCR

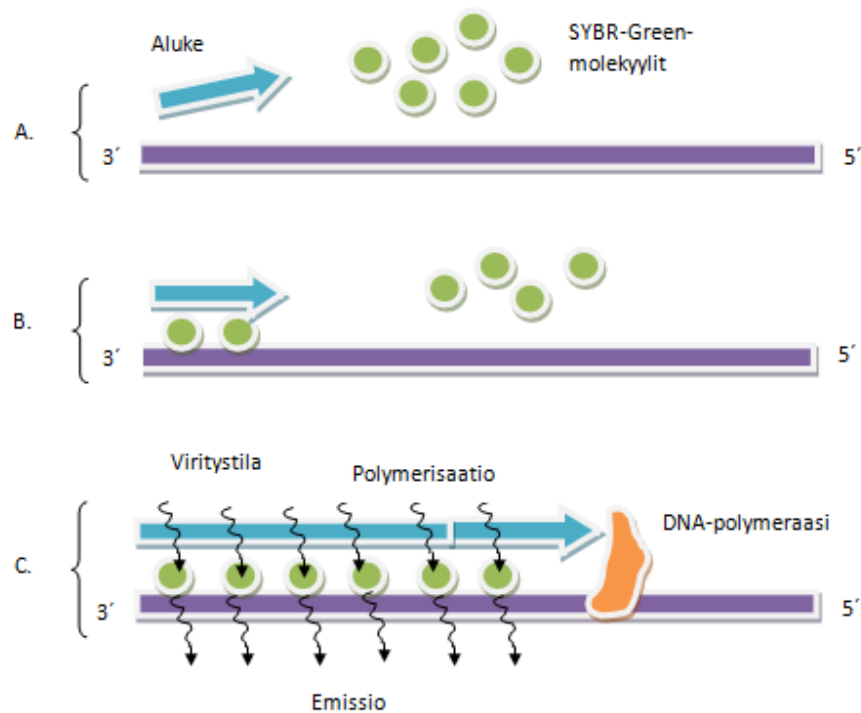
Perinteisessä PCR-menetelmässä tehdään ensin monistusreaktio, jonka jälkeen näyte analysoidaan käyttäen esimerkiksi agarosigeelielektroforeesia. Perinteinen PCR ei ole hyvä menetelmä kvantitatiiviseen määrittelyyn, sillä sen toistettavuus ei ole aina kovin luotettavaa. Kvantitatiivisen tuloksen saamiseen on kehitetty PCR:n sovellus, reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR, jossa käytetään hyväksi kaikkien tutkittavien näytteiden mukana kilpailevaa templaattia sisäisenä standardina. Tulos saadaan standardin avulla. Lisäksi reaaliaikaisessa PCR:ssä voidaan seurata syntyvän tuotteen määrää koko ajan reaktion edetessä. (Suominen ym. 2010: 166–170.) Syntyvän tuotteen määrä mitataan jokaisen PCR-syklin jälkeen (Finnzymes 2009: 4). Fluoresoivaa merkkiainetta käytetään hyväksi tuotteen määrän havaitsemisessa (kvantifiointi); signaalin voimakkuus korreloi DNA:n määrään (Suominen ym. 2010: 166–167).

On kehitetty useita tapoja käyttää fluoresenssiväriaineita tuotteen havainnoinnissa, esimerkiksi SYBR Green, TaqMan sekä energiansiirtotekniikat FRET ja Proximal. Näille yhteistä on fluoresenssisignaalin verrannollisuus tuotteen määrään. (Sugden 2005: 330–331; Suominen ym. 2010: 167.) Menetelmät vaihtelevat muun muassa sitoutumistavan mukaan (Finnzymes 2009: 4).

Yksinkertaisessa reaaliaikaisen kvantitatiivisen PCR:n sovelluksessa käytetään ei-spesifisesti kiinnittyvää leimaa (fluorokromi). Tämä lähestymistapa vaatii vähemmän optimointia kuin muut tekniikat, eikä se tarvitse tarkkaa tietoa kohdesekvenssistä. Eniten käytetty ei-spesifisesti kiinnittyvä leima on SYBR[®] Green I. (Finnzymes 2009: 4.)

5.3.1 SYBR[®] Green I:n toimintaperiaate

SYBR[®] Green I sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han, jolloin merkkiaineen fluoresenssin määrä moninkertaistuu. Sitoutumaton väriaine aiheuttaa pienemmän signaalin. (Sugden 2005: 330–331; Suominen ym. 2010: 167.) Jokaisen syklin aikana lämpötilaa lasketaan, jolloin alukkeet kiinnittyvät kohde-DNA:han ja SYBR Green-väriaine sitoutuu syntyneeseen kaksijuosteiseen tuotteeseen. (Kuvio 5.) Näin saadaan fluoresenssisignaali, joka mitataan kerran syklin aikana jokaisen pidennysvaiheen lopussa. (Sugden 2005: 330–331.)



Kuvio 5. SYBR[®] Green I:n toimintaperiaate (Mukaiillen Finnzymes 2009: 11).

A. Denaturoitu DNA, aluke ja SYBR-Green-molekyylit ovat vapaana reaktioseoksessa.

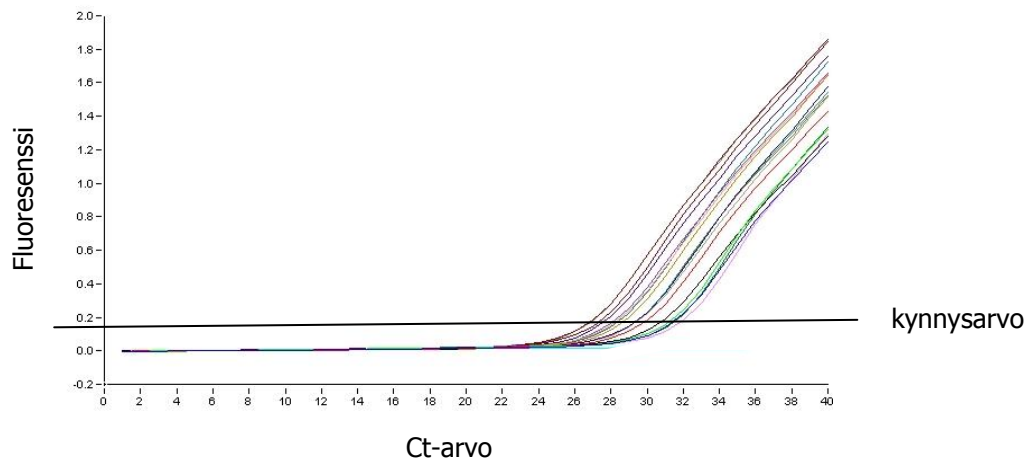
B. Aluke kiinnittyy juosteen 3'-päähen ja SYBR-Green-molekyylit sitoutuvat DNA:han.

C. DNA-polymeraasi syntetisoi vastinjuostetta DNA-templaatin mukaan ja SYBR-Green-molekyylit sitoutuvat tuotteeseen muodostaen fluoresenssisignaalin eksponentiaalisen kasvun.

Kaikista reaaliaikaisen PCR:n sovelluksista SYBR[®] Green I on edullisin, ei vaadi kohdespesifisiä koettimia ja voidaan käyttää mitä tahansa alukkeita. Tämä mahdollistaa tutkimuksen käynnistämisen nopeasti. Menetelmän haittana on SYBR-värin epäspesifisyys, sillä se sitoutuu kohde-DNA:n lisäksi kaikkeen muuhunkin kaksijuosteiseen DNA:han, kuten alukkeisiin. Jos spesifiset alukkeet suunnitellaan hyvin, tämän ei pitäisi olla ongelma. (Sugden 2005: 330–332.)

5.3.2 Reaaliaikaisen qPCR:n tulosten analysointi

Kvantitatiivisten PCR-metodien tavoitteena on selvittää tutkittavien kohdemolekyylien alkuperäinen määrä PCR:llä monistettujen tuotteiden kokonaismäärän avulla (Sugden 2005: 327). Tulosten analysoinnissa käytetään Ct-arvoa (threshold cycle), joka ilmoittaa syklien määrän, kun signaali ylittää kynnyksarvon. Kynnyksarvo määräytyy taustan aiheuttaman fluoresenssisignaalin perusteella. (Kuvio 6.) Suuri templaatin määrä aiheuttaa pienen Ct-arvon eli kynnyksarvon ylittävä signaali saavutetaan nopeammin. Kvantifikaatio suoritetaan eksponentiaalisessa vaiheessa, kun reaktio on vakaa ja tulokset ovat luotettavimpia. (Finnzymes 2009: 6–7.)



Kuvio 6. Esimerkkinä reaaliaikaisen qPCR:n kuvaaja useammasta näytteestä.

Ideaalitilanteessa menetelmän reaktiotehokkuus on 100 %, jolloin tuotteen määrä lisääntyy eksponentiaalisesti kaksinkertaistuen jokaisessa syklissä. Käytännössä signaalin vahvistamisen tehokkuus voi olla huomattavasti vähemmän ja vaihdella merkittävästi. Reaktion tehokkuus riippuu monista eri tekijöistä kuten alukkeiden sekvensseistä, juosteiden pituudesta ja näytteen puhtaudesta. Nämä tekijät vaikuttavat alukkeiden kiinnittymiseen, kohdejuosteiden denaturointiin ja DNA-polymeraasin toimintaan. (Sugden 2005: 327.)

Reaaliaikaisen PCR:n tuloksia voidaan määrittää (kvantifioida) joko absoluuttisesti tai suhteellisesti. Absoluuttinen kvantifikaatio käyttää hyväkseen vakioista saatua kalibraatiokäyrää, joilla saadaan mitattua näytteen konsentraatio. Suhteellinen kvantifikaatio

määrittää suhteellisen muutoksen ekspression tasoissa verraten näytettä ja referenssiä. Suhteellinen määrittäminen on yleisesti käytössä geeniekspressiotutkimuksissa. (Finnzymes 2009: 42–43.)

On tärkeää tehdä näytteistä rinnakkaismäärittäykset (ainakin kaksin- tai kolminkertaisesti), jotta voidaan luottaa menetelmän toimivuuteen, vaikka Ct-arvot olisivat korkeita. Jos rinnakkaisarvot eroavat yli 0,5 sykliä, näytteet pitäisi analysoida uudelleen. (Finnzymes 2009: 29.)

Käytettäessä ei-spesifisesti DNA:han sitoutuvaa leimaa, kuten SYBR[®] Green I, monistetun tuotteen spesifisyyttä tulee tarkastella sulamislämpötila-analyysin (melting curve) avulla. Spesifinen tuote saadaan erotettua ei-spesifisestä sulamislämpötilan vaihteluiden avulla. Analyysi paljastaa alukkeiden virheellisen sitoutumisen toisiinsa ja ei-spesifisten PCR-tuotteiden läsnäolon. Alukkeiden virheellinen sitoutuminen voi vähentää spesifisen kohteen monistumisen tehokkuutta. Vahvistamisen jälkeen laite tekee analyysin nostamalla lämpötilaa asteittain, jonka jälkeen se seuraa fluoresenssia lämpötilan funktiona. Väärin sitoutuneiden alukkeiden sulamislämpötila on normaalisti matalampi kuin kohde-DNA:n. Tämä sulamislämpötilojen ero paljastaa ei-tarkoituksenmukaisen sitoutumisen ja ei-spesifisten PCR-tuotteiden läsnäolon. (Finnzymes 2009:10–12; 40–41.)

Reaaliaikaisen qPCR:n tulokset geeniekspressiota tutkittaessa on normalisoitava, jotta saadaan korjattua useita vaihteluja tutkimuksessa. Aiheuttajina voivat olla muun muassa solujen ja nukleiinihappojen määrien sekä reaktion tehokkuuden muutokset, laitekohtaiset erot fluoresenssisignaalin havaitsemisessa sekä vaihtelut nukleiinihappojen yhtenäisyydessä ja näytteiden puhtaudessa. (Finnzymes 2009: 45.) Normalisoinnissa voidaan käyttää useita eri tapoja; esimerkiksi referenssigeeniä, joka on proteiinia ei-koodaava geeni (Schmittgen 2006: 133). Referenssigeeniä käytetään näytteen esikäsittelyn ja käänteistranskriptio-PCR:n vaihtelujen normalisointiin. Referenssinä käytetyn geenin tulisi pysyä muuttumattomana ja vakaana. Tämän takia suositellaan käytettäväksi useita referenssigeenejä, ja niiden ekspression tasot on mitattava ja tarkistettava. (Finnzymes 2009: 46.)

Suhteellisten tulosten normalisoinnissa voidaan käyttää $\Delta\Delta\text{Ct}$ -menetelmää, jossa näytteen ja standardin Ct-arvoja verrataan referenssigeenin Ct-arvoon (ΔCt). Näin saadaan normalisoitua tulokset näytteen laadun ja määrän vaihteluiden vuoksi. Vertaamalla näitä normalisoituja arvoja saadaan laskettua $\Delta\Delta\text{Ct}$, jota voidaan \log_2 -muotoon muuttettuna käyttää tulosten analysoinnissa. (Finnzymes 2009: 47–48.)

5.3.3 Reaaliaikaisen RT-qPCR:n käytettävyys

Reaaliaikaisella PCR:llä on monia etuja, muun muassa korkea herkkyys, suoritustaso ja tarkkuus. Kontaminaatoriski on pienempi, sillä valmiita tuotteita ei tarvitse käsitellä ja mitata monistuksen jälkeen. Lisäksi koko prosessi nopeutuu reaaliaikaisen PCR:n ansiosta. (Sugden 2005: 329; Suominen ym. 2010: 166–167.) Reaaliaikaisen PCR:n sovelluksia käytetään paljon, mutta niissä tarvittavat laitteet ovat kalliimpia kuin perinteisen PCR:n laitteet (Suominen ym. 2010: 167).

Reaaliaikaisen kvantitatiivisen PCR:n käyttö on lisääntynyt valtavasti viimeisten vuosien aikana. Sen on mahdollistanut suurentunut PCR-laitteiden, alukkeiden, koettimien ja reagenssipakkausten saatavuus, fluoresenssimenetelmien kehitys sekä kasvanut kiinnostus nopeisiin ja luotettaviin kvantitatiivisiin menetelmiin. Lisäksi on kehitetty useita keinoja menetelmän käyttämiseen eri tarkoituksissa muun muassa genotyypityksessä, patogeenien tunnistuksessa ja lisääntyvässä määrin syöpätutkimuksessa. (Sugden 2005: 338–339.)

Reaaliaikaisen qPCR:n kehittämisellä on ollut suuri vaikutus molekyyli-genetiikan tutkimukseen (Farragher ym. 2008: 437.) Se on yleisesti käytössä mikrosirumenetelmän tulosten validoinnissa muun muassa herkkyytensä vuoksi (Finnzymes 2009: 21).

5.4 PCR-työskentely

5.4.1 Olosuhteiden optimointi

PCR:n onnistumiseksi on tärkeää suunnitella hyvin tulevat työskentelytavat. Menetelmä vaatii tiettyjä optimiolosuhteita: reaktiossa tarvittavien entsyymien, alukkeiden, deoksi-nukleotidien ja magnesiumionien määrien on oltava oikeassa suhteessa sekä toisiinsa että templaattiin nähden. (Suominen ym. 2010: 156, 162.) Optimointi takaa paremman spesifisyyden, herkkyyden ja toistettavuuden. Valmistajan reagenssipakkauksessa reagenssit on optimoitu alustavasti ja tutkimus voidaan aloittaa heti. Optimaalisten tulosten saamiseksi muun muassa alukkeiden ja koettimien konsentraatiot voivat vaatia muokkausta. (Finnzymes 2009: 40.)

Eri entsyymien tehokkuuksissa on eroja ja niiden määrät riippuvat erilaisista templaateista ja alukkeista. Alukkeiden tyyppi riippuu tehtävästä työstä; alukkeiden pituus, nukleotidikoostumus ja -pitoisuus vaikuttavat annealing-vaiheen lämpötilaan. Alukkeiden kiinnittymiselle optimaalilämpötila on 55-72°C. Reaktiossa tulisi olla yhtä paljon jokaista nukleotidiä ja niitä tulisi olla mahdollisimman vähän. Näin PCR:n spesifisyys paranee, koska alukkeet eivät niin helposti kiinnity vääriin kohtiin eivätkä väärät nukleotidit kiinnity DNA-nauhaan. Myös alukkeiden kiinnittymisreaktion lämpötilan optimointi parantaa spesifisyyttä. (Suominen ym. 2010: 162–163.)

Magnesiumionit vaikuttavat PCR-reaktiossa useaan vaiheeseen; muun muassa entsyymin aktiivisuuteen ja tarkkuuteen, denaturaatioon, alukkeiden kiinnittymiseen ja tuotteen spesifisyyteen. DNA-polymeraasi tarvitsee vapaita magnesiumioneja toimiakseen. (Suominen ym. 2010: 162.)

Juosteiden epätäydellinen denaturoituminen on yksi todennäköinen syy PCR-reaktioiden epäonnistumiseen. Ongelman voisi ratkaista denaturaatioaikaa pidentämällä, mutta se vähentäisi entsyymin aktiivisuutta. Yleinen denaturaatiolämpötila on 95°C ja aika 30 sekuntia. Ennen ensimmäistä sykliä tehtävä denaturaatio (esidenaturaatio) on hyvä olla pidempiaikaisempi. (Suominen ym. 2010: 163.)

Pidennysvaiheen kesto riippuu templaattijuosteen pituudesta ja määrästä sekä käytetystä entsyymistä ja lämpötilasta. Pidempää ekstensioaikaa käytetään yleensä viime-

sessä syklissä, jotta saadaan viimeisteltyä keskeneräiset tuotteet. Sykliä määrään vaikuttaa vain templaatti-DNA:n määrä silloin, kun reaktio-olot ovat optimaaliset. Mitä pienempi templaatin määrä on, sitä enemmän syklejä tarvitaan. Toisaalta kun syklejä on liian paljon, epäspesifistä tuotetta voi syntyä enemmän. Mikäli syklejä on liian vähän, haluttua tuotetta ei saada tarpeeksi. (Suominen ym. 2010: 163–164.)

5.4.2 Kontaminaatio

Jo pienikin määrä vierasta DNA:ta, esimerkiksi pölypartikkeleista voidaan monistaa epätarkoituksenmukaisesti, jolloin tulosten tulkinnan virheet kasvavat (Theophilus 2005: 63). Siksi on kiinnitettävä huomiota tila- ja logistisiin järjestelyihin sekä noudatettava hyviä laboratoriotyöskentelytapoja. Usein PCR-menetelmiä tehdään vain siihen varatussa tilassa (puhdas tila), jolloin saadaan eliminoitua mahdolliset kontaminaatio-riskit. (Suominen ym. 2010: 165.)

PCR-työskentely suositellaan tehtäväksi laminaarivirtauskaapissa ja työskentelyalueen tulisi olla mahdollisimman puhdas. Pipetit ovat mahdollisesti yleisin kontaminaatiolähde, sillä DNA-molekyylit saattavat joutua sen sisäosiin. Siksi suositellaan käytettäväksi PCR-pipetinkärkiä, joiden suodatin estää molekyylien pääsyn pipetin sisäosiin ja vältytään kontaminoimasta seuraavia näytteitä. Lisäksi PCR-reaktioiden valmistuksessa tulisi käyttää vain siihen tarkoitettuja pipettisarjoja. (Suominen ym. 2010: 166.)

PCR-reaktioiden valmistukseen on oma tila ja tuotteiden käsittelyyn omansa. Reaktion jälkeen putket siirretään avaamattomina tuotteiden käsittelytilaan, ja ne saa avata vasta muutaman sekunnin sentrifugoinnin jälkeen. PCR-työskentelyssä käytetään omia reagensseja pieniin eriin jaettuina, jotta ylimäärä voidaan heittää pois. Kertakäyttöisten suojakäsineiden käyttö on tärkeää, ja niitä on vaihdettava mahdollisimman usein. Joissain tilanteissa tarvitaan tiukempia varotoimia, erityisesti silloin, kun lähtömateriaalia on niukasti tai on suuri mahdollisuus vääriin positiivisiin tuloksiin. (Suominen ym. 2010: 165–166.)

6 Aikaisemmat tutkimukset

Viime vuosien aikana kiinnostus miRNA:ta kohtaan on kasvanut laajasti. Aiheesta löytyy paljon tutkimustietoa eri näkökulmista katsottuna. Tästäkin huolimatta paljon on vielä tutkittavaa ja löydettävää. Tällä hetkellä voidaan vain arvailla, kuinka laajalti miRNA:t todellisuudessa vaikuttavat geenitasolla. Valitsimme tiivistelmien perusteella suuresta määrästä artikkeleita työtämme läheisesti koskettavat tutkimukset ja katsausartikkelit.

Suomalainen tutkimusryhmä (Mosakhani, Neda – Sarhadi, Virinder K. – Borze, Ioana – Karjalainen-Lindberg, Marja-Liisa – Sundström, Jari – Ristamäki, Raija – Österlund, Pia – Knuutila, Sakari) on tutkinut miRNA:n profilointia paksusuolen syövässä. Vuonna 2012 *Genes, Chromosomes & Cancer* -lehdessä julkaistu artikkeli "MicroRNA Profiling Differentiates Colorectal Cancer According to KRAS Status" käsittelee miRNA:n ekspression vaihtelua paksusuolen syövässä KRAS-statuksen mukaan. He löysivät mikrosirumenetelmällä 49 miRNA:ta, jotka olivat epänormaalisti ekspressoituneita syöpä-kudoksessa. Näistä valitut miRNA:t varmistettiin käyttämällä kvantitatiivista RT-PCR:ää.

Oman työmme lähtökohtia vastaavan tutkimuksen tehneet Dacic, Kelly, Shuai ja Nikiforova kuvaavat artikkelissaan "miRNA expression profiling of lung adenocarcinomas: correlation with mutational status" miRNA:iden ekspression muutoksia adenokarsinoo-missa. He tutkivat 319 miRNA:n ekspressiota mikrosirumenetelmällä ja muutamien yksittäisten miRNA:iden ekspressio validoitiin käyttämällä käänteistranskriptio-PCR:ää. He osoittivat tutkimuksessaan, että muutamien miRNA:iden ekspressio oli täysin ainut-laatuista ja näiden miRNA:iden käyttöä diagnostiikassa ja syövän ennusteen arvioinnis-sa tulisi tutkia lisää.

Formaliinifiksoidun parafiinivalmisteen (FFPE) käyttöä vaihtoehtoisena näytemateriaali-na miRNA:n geeniekkspression tutkimisessa on käsitelty paljon. Esimerkiksi Liu ja Xu havaitsivat vuonna 2011 *Methods in Molecular Biology* -lehdessä julkaistussa tutkimuk-sessaan "MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues", että FFPE-näytteistä eristetyn miRNA:n ekspression profiili muistuttaa läheisesti tuorenäyt-teestä saatua profiilia. Nämä osoittavat FFPE-näytteiden sopivuutta miRNA:n ekspres-sion analysointiin.

Useissa artikkeleissa on esitetty reaaliaikaisen RT-qPCR:n käyttöä miRNA:n ekspression profiloinnissa. On todettu, että reaaliaikainen RT-qPCR sopii tähän käyttöön hyvin. Esimerkiksi Schmittgen, Lee, Jiang, Sarkar, Yang, Elton ja Caifu toteavat 2008 julkaistussa *Methods*-lehden tutkimusartikkelissa "Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA", että PCR:ää voidaan käyttää mikrosirutekniikan validoinnissa tutkittaessa miRNA:n ekspressiota.

7 Opinnäytetyön tavoitteet ja tarkoitus

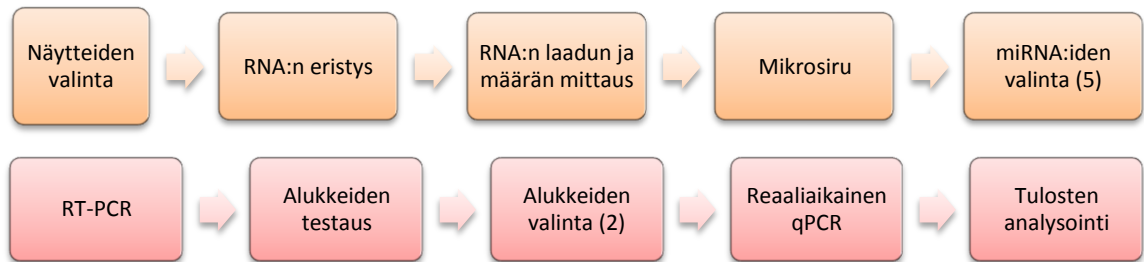
Opinnäytetyömme on osana isompaa kokonaisuutta, jossa Helsingin yliopiston Haartman-instituutin sytomolekyyli-genetiikan laboratorion tutkimusryhmä (CMG-tutkimusryhmä) pyrkii selvittämään miRNA:n yhteyttä ei-pienisoluisen keuhkosityöpään. Heidän projektinsa tavoitteena on muun muassa paikallistaa geeni- ja solutason biomarkkereita, joiden avulla saataisiin kehitettyä yksilöllistä hoitoa ei-pienisoluisen keuhkosityöpään. Jo kehitetyt ns. täsmähoidot toimivat vain osalla potilaista ja näillekin resistenttiys ilmenee vuosien kuluessa. Projektin tutkimuskysymyksenä onkin selvittää hoitoresistenssin syy.

Työmme tarkoituksena oli selvittää, miten reaaliaikaisen kvantitatiivisen käänteistranskriptio-PCR:n tulokset vastaavat mikrosirumenetelmällä saatuja tuloksia. Tavoitteena oli analysoida mikrosirumenetelmällä jo analysoituja näytteitä reaaliaikaisella RT-qPCR:llä ja vertailla saatuja tuloksia. Työtä ohjaavana tutkimuskysymyksenä oli, kuinka reaaliaikaisen RT-qPCR:n tulokset vastaavat mikrosirumenetelmällä saatuja tuloksia miRNA:n ekspression osoittamisessa ei-pienisoluisista keuhkosityöpänäyhteistä.

Henkilökohtaisiin tavoitteisiimme sisältyivät reaaliaikaisen RT-qPCR-menetelmän hallitseminen teoriassa ja käytännön tasolla, kansainvälisen ammattisanaston laajentaminen ja kielitaidon parantaminen sekä tutkimusryhmän prosessin ja toiminnan ymmärtäminen.

8 Toteutus

Opinnäytetyö toteutettiin Helsingin yliopiston Haartman-instituutin sytomolekyyligeneetiikan laboratoriossa alkuvuodesta 2012. Projektin alkuvaiheet olivat CMG-tutkimusryhmän toteuttamia, vaikkakin olimme niissä mukana työharjoittelun aikana. Varsinaiseen opinnäytetyöhömmme kuuluivat vaiheet miRNA:iden valinnan jälkeen. (Kuvio 7.)



Kuvio 7. Yhteenveto toteutuksen etenemisestä: yllä tutkimusryhmän toteuttamat vaiheet ja alla meidän osuutemme projektista.

8.1 Aineisto

Aineistomme muodostui 20 potilasnäytteestä, jotka oli valittu patologian laboratoriotietojärjestelmän tietokannasta (Qpati). Valitut näytteet olivat ei-pienisoluisia keuhkosyöpätyyppejä, joista suurin osa oli diagnosoitu adenokarsinoomiksi. Näytteiden valinnassa käytettiin yhtenä perusteena tiettyä mutaatiota (EGFR), mutta meidän työssämme sillä ei ollut merkitystä. Lisäksi käytimme kahta normaalia keuhkokudosnäytettä referenssinä (FirstChoice[®] Human Lung Total RNA: Ambion[®]).

Käytetyt näytteet olivat formaliinifiksoituja parafiinivalmisteita, jotka oli leikattu ohuiksi mikroleikkeiksi. Parafiininäytteistä oli eristetty RNA:ta juuri tälle näytetyypille suunnitellulla reagenssipakkauksella (RNeasy FFPE Kit, 2011). RNA:n laatu vaikuttaa tutkimuksessa käytettäviin menetelmiin, ja siksi RNA:n pitoisuutta sekä laatua oli testattu erilaisin tavoin. Spektrofotometrillä mitattiin näytteiden RNA:n pitoisuus ja Agilent 2100 Bioanalyzerilla tarkistettiin, onko näytteissä miRNA:ta ja kuinka yhtenäistä se on. Näytteet soveltuivat tutkimuksessa käytettäviin menetelmiin. Niissä oli tarpeeksi RNA:ta ja kaikki näytteet pitivät sisällään miRNA:ta, joskin se oli näyttemateriaalin vuoksi melko pilkkoutunutta.

8.2 Näytteiden analysointi

miRNA:iden ekspressiota oli tutkittu mikrosirumenetelmällä (Agilent miRNA Microarray) ja tulokset analysoitu GeneSpring (11.5.1) -tietokoneohjelmalla. Mikrosirumenetelmän tulosten perusteella valikoitui viisi miRNA:ta (miR-3907, miR-494, miR-3607-5p, miR-513c ja miR-892b), joiden ekspressioissa oli eroa esimerkiksi normaali- ja keuhkosyöpäkudoksen välillä. Tarkoituksena oli mitata kaikista näytteistä jokaisen miRNA:n ekspressio spesifisiä alukkeita käyttäen. Alukkeiden testauksessa huomasimme kuitenkin, että vain yksi toimi todella hyvin ja yksi jonkin verran. Muiden alukkeiden käyttöönotto olisi vaatinut suunnittelua ja optimointia, eikä tämä ollut mahdollista näin lyhyessä ajassa. Siksi valitsimme nämä kaksi toimivinta aluketta, jolloin näytemääräksi tuli 126 (21x2x3). Määrä sisälsi rinnakkaismääritykset 20 potilasnäytteestä ja yhdestä referenssistä sekä kaksi spesifistä aluketta ja yhden kalibraattori-alukkeen.

Valittujen miRNA:iden ekspressio tarkistettiin reaaliaikaisella kvantitatiivisella käänteistranskriptio-PCR:llä. Käytimme näytteiden analysoinnissa miScript PCR System -reagenssipakkausta, joka on suunniteltu havaitsemaan spesifisesti miRNA:ta. miScript PCR System on kolmivaiheinen: RNA:n muuttaminen cDNA:ksi käänteistranskriptio-PCR:llä, alukkeiden valmistus sekä miRNA:n mittaus reaaliaikaisella qPCR:llä. Työ suoritettiin Qiagen® miScript PCR System (9/2011) -ohjekirjan mukaan. Näytteet analysoitiin LightCyclerilla (Roche®). Tarkempi selvitys näytteiden analysoinnista on liitteessä 1.

8.2.1 Käänteistranskriptio-PCR

Laimensimme 19 näytettä käänteistranskriptiota varten. Tarkoituksena oli saada RNA:n konsentraatioksi 200 ng/µl:ssa. Kolmen näytteen konsentraatio oli pienempi kuin 200 ng/µl:ssa, milloin laimennosta ei tehty. Tämä otettiin huomioon reaktioseoksen veden määrässä. Valmistimme kaikille näytteille yhteisen reaktioseoksen, johon kuului transkriptaasientsyymiseos, vesi ja puskuri. Transkriptaasientsyymi käänsi RNA:n cDNA:ksi ja puskuri sisälsi reaktiossa tarvittavat nukleotidit, alukkeet ja magnesiumionit. Reaktioseos jaettiin omiin putkiinsa, joihin lisättiin RNA. Varsinainen reaktio tapahtui ensimmäisen inkuboinnin aikana (37°C/60min), jonka jälkeen reaktioseos inaktivoitiin inkuboimalla sitä 5 minuuttia 95°C:ssa. Näytteet laitettiin pakastimeen (-20°C) odottamaan seuraavaa vaihetta.

8.2.2 Alukkeiden testaus

Spesifiset alukkeet käytettäviä miRNA:ita varten tilattiin Qiagenilta. Alukkeet tulivat valmistajalta kuivamateriaalina, joka liuotettiin TE-puskuriin ja liuos jaettiin pienempiin käyttöeriin jatkuvan uudelleen sulatuksen välttämiseksi. Jokaisen alukkeen toiminta testattiin kahdella potilasnäytteellä ja yhdellä referenssinäytteellä. Lisäksi testattiin kalibraattorin toimivuus; kalibraattorina toimi U6-alue, jonka avulla normalisointi tehtiin. Testauksen perusteella valitsimme kaksi parasta aluketta käytettäväksi varsinaiseen työhön.

8.2.3 Reaaliaikainen qPCR

Käänteistranskriptiossa saatiin cDNA:n konsentraatioksi 10ng/μl:ssa, joka laimennettiin vedellä (RNase-free) 5ng/μl:ksi. Valmistimme kaikille alukkeille omat reaktioseokset, joihin sisältyi SYBR Green[®] PCR -reaktioseos, yleisalue, spesifinen alue ja vesi. SYBR Green -väriaine sitoutuu kaksijuosteiseen cDNA:han, miRNA:lle spesifinen alue kiinnittyy templaatti cDNA:han ja yleisalue muodostuneen vastinjuosteen toiseen päähän (reverse primer). Reaktioseos ja näyte pipetoitiin kuoppalevyille pipetillä sekoittaen (Liite 2; taulukko 1). Sentrifugoimalla poistettiin ilmakuplat ja seos saatiin kuoppalevyn pohjalle. Käytimme eri laitetta kuin ohjekirja ehdottaa ja seuraavat vaiheet suoritimme CMG-tutkimusryhmän ohjeen mukaan. Seos siirrettiin kapillaareihin, jotka laitettiin LightCycler -analysaattorin adapteriin. Laite mittasi näytteiden fluoresenssin kapillaarien läpi.

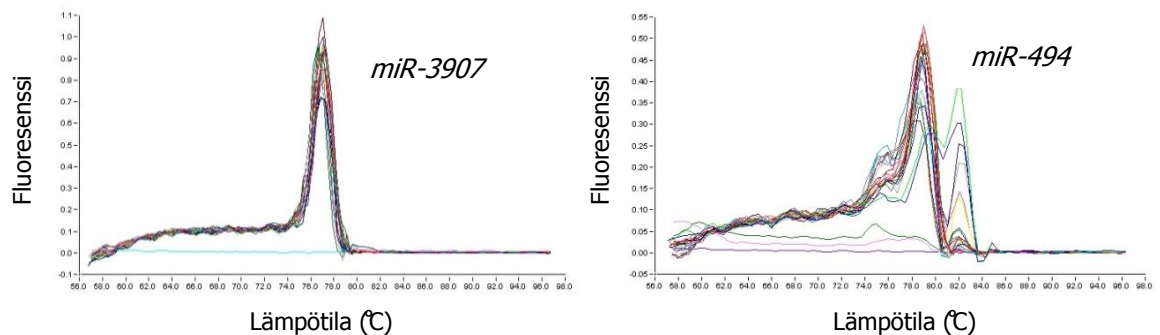
Spesifisten alukkeiden lisäksi menetelmässä käytettiin kalibraattoria (U6-alue), jota tarvittiin tulosten normalisointiin. Kalibraattorin avulla saimme laskettua näytteille vertailuarvot. Sekä kalibraattori että spesifiset alukkeet analysoitiin kerran jokaisen näytteen kanssa. Lisäksi jokaisessa sarjassa oli mukana vesikontrolli (NTC) ja referenssinäyte. Vesikontrollilla kontrolloitiin muun muassa mahdolliset kontaminaatiot, ja referenssinäyte toimi vakiona normalisoinnissa. Potilas- ja referenssinäytteet analysoitiin rinnakkaismäärityksenä toistettavuuden arvioimiseksi.

8.2.4 Analysointisarjat

Analysoimme aluksi kaksi näytettä kaikilla kolmella alukkeella tutustuaksemme menetelmään. Suurensimme analysoitavien näytteiden määrää tulevissa sarjoissa; jäljelle jääneet näytteet analysoitiin aina yhtä aluketta käyttäen useassa osassa. Siten varsinaiset analysointisarjat toteutuivat liitteen 2 taulukon 2 mukaan. Jokainen näyte analysoitiin yhdellä alukkeella kerran, joten lopulta analysointisarjoja oli yhteensä seitsemän. Näiden lisäksi kontrolloimme muutaman näytteen poikkeavien tulosten takia. Mukana jokaisessa sarjassa oli ainakin yksi vesikontrolli (NTC) ja standardinäyte.

9 Tulokset

Selvitimme kahden miRNA:n ekspressiota reaaliaikaisella kvantitatiivisella käänteistranskriptio-PCR:llä ja vertasimme tuloksia mikrosirumenetelmällä saatuihin tuloksiin. Analysoimme 20 näytettä molemmilla alukkeilla. Sulamislämpötila-analyysin perusteella miR-3907-alue toimi hyvin eikä epäspesifistä sitoutumista ollut havaittavissa. Siten pystyimme käyttämään kaikkia näytteitä tulosten analysoinnissa. miR-494:n sulamislämpötila-analyysi antoi viitteitä epäspesifisestä sitoutumisesta, joten valitsimme tulosten analysointiin vain onnistuneimmat näytteet (7 kpl). Kuvion 8 ensimmäisessä kuvassa on miR-3907:n sulamislämpötila-analyysin käyrä, jossa on havaittavissa vain yksi huippu tietyssä lämpötilassa. Jälkimmäinen kuva kertoo miR-494:n huonosta toimivuudesta, ja käyrässä onkin havaittavissa useita huippuja lämpötilojen vaihdellessa.



Kuvio 8. Sulamislämpötila-analyysit molemmilla alukkeilla.

Reaaliaikaisesta RT-qPCR:stä saatujen Ct-arvojen keskiarvoja käyttäen teimme näytteille menetelmien vertailun helpottamiseksi normalisaation seuraavan kaavan mukaisesti (Finnzymes 2009: 47–48). Kaavassa käytetään yhdellä alukkeella saatuja Ct-arvoja. Kaavaan sijoitettavat luvut kaikista näytteistä ja esimerkkilasku on esitetty liitteessä 4.

$$\begin{array}{l}
 \text{A} \quad \left\{ \begin{array}{l} \Delta Ct(\text{näyte}) = Ct(\text{näyte}[miR-1]) - Ct(\text{näyte}[U6]) \\ \Delta Ct(\text{kalibraattori}) = Ct(\text{referenssi}[miR-1]) - Ct(\text{referenssi}[U6]) \end{array} \right. \\
 \text{B} \quad \left\{ \begin{array}{l} \Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{näyte}) - \Delta Ct(\text{kalibraattori}) \end{array} \right. \\
 \text{C} \quad \left\{ \begin{array}{l} \Delta \Delta Ct \rightarrow \log 2 \end{array} \right.
 \end{array}$$

Tulokset olivat suhdeasteikollisia muuttujia, joita pystytään analysoimaan useilla kvantitatiivisilla (määrällisillä) analyysimenetelmillä (Kankkunen – Vehviläinen-Julkunen 2009:101). Laskimme Ct-arvoista keskiarvot ja log₂-arvoista Pearsonin korrelaatiokerroimen sekä tilastollisen merkitsevyyden tason (p-arvo). Korrelaation katsotaan olevan kohtalainen, kun $0,3 \leq r < 0,8$ ja toisaalta p-arvon tulisi olla $\leq 0,05$, jotta tutkimus olisi tilastollisesti merkitsevä (Kankkunen – Vehviläinen-Julkunen 2009: 106, 108).

miR-3907-alukkeella analysoitujen näytteiden korrelaatiokerroin oli -0,255 ja p-arvo 0,278; miR-494-aluketta käytettäessä korrelaatiokerroin oli -0,421 ja p-arvo 0,347. Näiden testien perusteella huomasimme, että korrelaatiota mikrosirumenetelmän ja reaaliaikaisen RT-qPCR:n tulosten välillä ei ollut ja tilastollinen merkitsevyys puuttui.

Normalisoinnin tuloksena saadut log₂-arvot ovat mikrosirumenetelmän tuloksiin verrattuna lähinnä suuntaa antavia, eivätkä tilastollisten testien tulokset olleet toivottuja. Siten yksinkertaistimme absoluuttiset arvot kvalitatiivisella osoituksella (positiivinen-negatiivinen). Normalisoinnin tuloksena saadut log₂-arvot muutettiin vastaamaan ekspression tasoa; nollaa suuremmat arvot viittaavat ekspressioon (positiivinen) ja toisaalta alle nollan jäävät arvot voidaan tulkita ei-ekspressoituneiksi (negatiivinen).

miR-3907 oli ekspressoitunut mikrosirumenetelmällä 19 näytteessä ja reaaliaikaisella RT-qPCR:llä ekspressoituneita oli 18; ei-ekspressoituneita mikrosirumenetelmällä oli yksi ja RT-qPCR:llä kaksi (Liite 2; taulukko 3). Siten reaaliaikaisella RT-qPCR:llä analysoi-

duista 20 näytteestä 17 vastasi mikrosirumenetelmän tuloksia. Menetelmien tulokset vastasivat toisiaan 85 %:sti ($17 \div 20$) miR-3907 ekspression osalta. (Taulukko 1.)

Taulukko 1. miRNA-3907:n ekspression vertailun tulokset mikrosirumenetelmällä ja RT-qPCR:llä.

➤ *miR-3907:n ekspressio*

<i>Näytenro</i>	<i>Mikrosiru-menetelmä</i>	<i>Reaaliaikainen RT-qPCR</i>
1	positiivinen	positiivinen
2	positiivinen	positiivinen
3	positiivinen	positiivinen
4	positiivinen	positiivinen
5	positiivinen	negatiivinen
6	positiivinen	positiivinen
7	positiivinen	positiivinen
8	positiivinen	negatiivinen
9	positiivinen	positiivinen
10	negatiivinen	positiivinen
11	positiivinen	positiivinen
12	positiivinen	positiivinen
13	positiivinen	positiivinen
14	positiivinen	positiivinen
15	positiivinen	positiivinen
16	positiivinen	positiivinen
17	positiivinen	positiivinen
18	positiivinen	positiivinen
19	positiivinen	positiivinen
20	positiivinen	positiivinen

Reaaliaikaisen RT-qPCR:n ja mikrosirumenetelmän kvantitatiiviset ja kvalitatiiviset tulokset ovat liitteessä 5.

Jo pelkän sulamislämpötila-analyysin perusteella oletamme, että miR-494-aluke ei ollut luotettava alun perinkään. Käsitys vahvistui analysoidessamme seitsemän näytteen tuloksia, jotka osoittautuivat päinvastaisiksi mikrosirumenetelmään nähden. Näin ollen miR-494:n käyttö luotettavasti edellyttää lisäoptimointia, jotta sitä voidaan käyttää vertailuun. Meidän osaltamme aika ei riittänyt tähän, joten jatkotutkimukset jäävät tutkijaryhmän tehtäviksi.

10 Työprosessin ja tulosten luotettavuuden arviointi

Tarkastelemme työprosessin luotettavuutta hyvän laboratoriotyöskentelyn kautta. Kontaminaatio-ongelmia ei ollut, sillä puhdistimme käytettävät välineet ja tilat ennen työn aloittamista. Lisäksi vältimme reagenssien ja näytteiden kontaminaation käyttämällä suojakäsineitä sekä sulkemalla näyteputket ja reagenssit pipetointien välillä. Kiinnitimme huomiota hyvään pipetointitekniikkaan, noudatimme ohjekirjaa tarkasti ja merkitsimme näytteet selkeästi niiden tunnistamista varten. Käytimme laadunvarmistukseen sisäisiä standardeja ja kalibraattoria sekä huolehdimme, että laitteiden ja pipettien kalibroinnit ja huollot olivat voimassa. Työskentely tapahtui pääosin jäällä ja pidempiaikaisesti alukkeet, näytteet ja reagenssit säilytettiin pakastimessa (-20°C).

Opinnäytetyömme oli yhdistettynä työharjoitteluun, jossa harjaannuimme tekemään useita pipetointisarjoja kerralla. Ennen varsinaisia analyysejä tutustuimme PCR-menetelmään harjoittelemalla sen tekemistä muutamia kertoja. Pyrimme vaikuttamaan siihen, ettei kädenjälki näkyisi tuloksissa. Siten sama henkilö pipetoi aina yhden pipetointisarjan.

Laskimme Ct-arvojen rinnakkaismäärittämisestä korrelaatiokerroimen sekä p-arvon toistettavuuden arvioimiseksi. Käytettäessä miR-3907-aluketta rinnakkaismäärittäysten korrelaatiokerroin oli 0,978 ja p-arvo 0,000; miR-494-alukkeella korrelaatiokerroin oli 0,995 ja p-arvo 0,000. Erinomaiset rinnakaistulokset kuvaavat pipetointitekniikan onnistumista ja menetelmän toistettavuutta. (Liite 3; taulukko 4.)

Reaaliaikaisen RT-qPCR:n onnistumista voidaan arvioida miR-3907:n sulamislämpötila-analyysin avulla. Yhtenevien sulamislämpötilojen (yksihiippisuus) perusteella voimme olettaa, että jokaisessa näytteessä on monistettu vain yhtä spesifistä cDNA:ta. Lisäksi jokaisessa analysointisarjassa on havaittavissa monistumista, mikä kertoo menetelmän ja reagenssien toimivuudesta. Vesikontrollien onnistuminen taas kuvaa reagenssien puhtautta. (Liite 3; taulukko 5.)

Selitys ei-toivotuille kvantitatiivisille tuloksille on oletettavasti se, että menetelmien välillä on eroa muun muassa sensitiivisyydessä ja spesifisyydessä sekä tulosten vertailu yksittäisiä, absoluuttisia arvoja käyttäen on vaikeaa kahden menetelmän normalisoinnin

erojen takia. Lisäksi tulosten luotettavuutta saattoi heikentää käytetty näytemateriaali (FFPE), joka tietävästi aiheuttaa RNA:n pilkkoutumista ja heikentää sen laatua. Myös näytteiden ja reagenssien uudelleen pakastus ja sulatus saattoi vaikuttaa näytteiden laatuun ja siten saatuihin tuloksiin. Nämä tekijät saattavat osittain selittää myös poikkeaman kolmen näytteen osalta kvalitatiivisissa tuloksissa.

Vaihdoimme tutkimustulokset miRNA:n ekspression mukaan positiivisiksi ja negatiivisiksi, jolloin mitta-asteikko vaihtui luokittelu- eli nominaaliasteikoksi. Siten myös tutkimuksemme muuttui kvalitatiiviseksi eli laadulliseksi. (Nummenmaa 2006: 38.) Tulosten muuttaminen kvantitatiivisesta kvalitatiiviseksi ei kuitenkaan poista normalisoinnin eroista johtuvia ongelmia, eikä siten lisää tutkimuksen luotettavuutta. Luokitteluasteikollisista muuttujista voidaan laskea vain harvoja tilastollisia tunnuslukuja. Vaikka muuttujille voidaan antaa numeeriset arvot (esim. positiivinen=2, negatiivinen=1), luokitteluasteikollista muuttujaa ei pidä käsitellä numeerisena muuttujana. (Nummenmaa 2006: 38.) Siten päädyimme ilmaisemaan tutkimustulokset vain ilmoittamalla, kuinka suuri määrä PCR:llä ja mikrosirumenetelmällä analysoiduista näytteistä oli ekspressoituneita (positiivisia) ja ei-ekspressoituneita (negatiivisia).

Laadullisen tutkimuksen luotettavuutta tarkastellaan eri tavoin kuin määrällisen tutkimuksen. Koska työmme tulokset ovat kvalitatiivisia, tarkkailimme sen luotettavuutta uskottavuuden ja siirrettävyyden kautta. Uskottavuudella tarkoitetaan tulosten kuvaamista selkeästi ja siirrettävyydellä tutkimuksen toistettavuutta. (Kankkunen – Vehviläinen-Julkunen 2009: 160.) Siten olemme pyrkineet kertomaan, miten analyysi on tehty ja mitkä ovat tutkimuksen vahvuudet ja rajoitukset sekä kuvanneet yksityiskohtaisesti koko tutkimusprosessin etenemisen.

Tutkimusprojektilla oli valmiina kaikki yleisen ohjeistuksen mukaiset luvat: eettisen toimikunnan lupa, tutkimuslupa ja kudosnäytteiden käyttölupa Valviralta. Otimme huomioon eettiset näkökohdat työn kaikissa vaiheissa. Lähtökohtana oli erityisesti potilaiden tunnistustietojen korvaaminen tietyillä koodinumeroilla. Vain asianomaisilla oli tiedot koodien takana olevista nimistä ja henkilötunnuksista. Noudatimme hyviä tutkimuskäytäntöjä, joihin kuului muun muassa vaitiolovelvollisuus.

11 Pohdinta

Hoitoresistenssi on yleinen ongelma syöpätautien hoidossa ja siten uusia hoitomuotoja pyritään kehittämään jatkuvasti. Huolimatta diagnoosin ja hoidon laajasta kehityksestä keuhkosyövän ennuste on edelleen huono. Biomarkkerien käyttö syövän ennaltaehkäisyssä, diagnosoinnissa ja ennusteen arvioinnissa on mielenkiintoinen lähestymistapa molekyyli-genetiikan tutkimuksiin.

Ensimmäisen miRNA:n löytämisestä 1990-luvulta on tultu pisteeseen, jossa miRNA:iden merkitys karsinogeneesiin on tunnustettu, ja on myös kehitetty käyttötarkoituksia sen hyödyntämiseen lääketieteessä. Tutkimusten taustalla on miRNA:iden ekspression erot kasvain- ja normaalikudoksen välillä. miRNA:iden käyttäminen biomarkkereina on luonut uusia odotuksia keuhkosyövän hoidon parantamiseen ja ennusteeseen.

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli selvittää, miten reaaliaikaisen kvantitatiivisen käänteistranskriptio-PCR:n tulokset vastaavat mikrosirumenetelmällä saatuja tuloksia. Tavoitteena oli analysoida mikrosirumenetelmällä jo analysoituja näytteitä reaaliaikaisella RT-qPCR:llä ja vertailla saatuja tuloksia.

Kvantitatiiviset tulokset eivät vastanneet useita aikaisempia tutkimustuloksia, joiden mukaan reaaliaikainen RT-qPCR toimii mikrosirumenetelmän validointimenetelmänä usein hyvin. Erot meidän tulosten ja aikaisempien tutkimusten välillä saattavat selittyä sillä, että niissä on verrattu yhden miRNA:n ekspressiotason eroja kahden ryhmän välillä (esimerkiksi normaali-/kasvainkudos). Työssämme vertailimme vain yksittäisten näytteiden ekspressioita näiden menetelmien kesken.

Laadullista asteikkoa käytettäessä miR-3907:n ekspressio vastasi mikrosirumenetelmällä saatuja tuloksia hyvin. Siten reaaliaikainen RT-qPCR näyttäisi toimivan mikrosirutekniikan vertailumenetelmänä miR-3907-aluketta käytettäessä ja yhteneväisyys menetelmien välillä oli suuri. Toisaalta miR-494-aluke edellyttää lisäoptimointia, eivätkä saadut tulokset ole vertailukelpoisia. Reaaliaikaisen RT-qPCR:n tulokset vastasivat mikrosirumenetelmällä saatuja tuloksia miRNA:n ekspression osoittamisessa ei-pienisoluisista keuhkosyöpänäytteistä. Reaaliaikainen RT-qPCR toimi näiden tulosten osalta mikrosirumenetelmän vertailumenetelmänä miR-3907-aluketta käytettäessä.

Henkilökohtaiset tavoitteemme toteutuivat hyvin. Hallitsimme reaaliaikaisen RT-qPCR-menetelmän sekä teoriassa että käytännön tasolla. Useiden analysointisarjojen tekeminen vahvisti kokonaiskuvan hahmottamista ja työskentelytaitomme vahvistuivat molekyyli-genetiikan laboratoriossa. Erityisesti pipetointien osalta huomasimme kehitystä tarkkuuden ja nopeuden lisääntyessä. Lisäksi pystyimme toimimaan hyvin itsenäisesti pyrkien ratkaisemaan ongelmat ensin itse.

Englanninkielen sanaston laajentamisessa ja kielitaidon parantamisessa auttoi sekä opinnäytetyön kirjoittaminen pääosin englanninkielisistä lähteistä että työskentely kansainvälisessä tutkimusryhmässä. Jokapäiväinen työskentely tutkimusryhmässä auttoi ymmärtämään toiminnan viitekehyksen ja prosessin luonteen. Parina olemme tehneet töitä jo useamman vuoden ja työnteko tuntui luontevalta ja sujuvalta. Tiesimme etukäteen toistemme vahvuudet ja käytimme niitä hyväksi työtä tehdessämme.

Opinnäytetyömme oli osana isompaa projektia, jossa pyritään selvittämään miRNA:n yhteyttä ei-pienisoluiseen keuhkosityöpään. Alun perin oli tarkoituksena, että tekisimme yhden osan projektin kokonaisuudesta. Työmme tuloksia ei kuitenkaan voi sellaisenaan hyödyntää, vaan tutkimuksia on jatkettava tutkimusasetelmaa muuttaen. Meidän osuutemme jälkeen projekti tulee todennäköisesti jatkumaan tutkimuksilla, joilla pyritään löytämään ne biomarkerit, joihin hoito voidaan kohdistaa. On vielä epäselvää, inhiboitaanko esimerkiksi miRNA:ta vai sen kohdegeeniä. Teoreettisena mahdollisuutena on etsiä tietokannoista miRNA:n säätelykohde ja valita molekulaarinen kohta, johon hoidolla vaikutetaan.

Tiesimme, että tutkimusprojektissa on riskinä tietyt epävarmuustekijät, sillä uuden asian tutkimisesta voi nousta monenlaisia kysymyksiä ja ongelmia. Tämäkään työ ei sujunut ongelmitta ja kohtasimme asioita, joihin emme olleet varautuneet. Jo opinnäytetyön suunnitelmavaiheessa olisimme voineet pohtia tutkimusasetelmaa tarkemmin ja arvioida, kuinka tuloksia voidaan käyttää näiden kahden menetelmän vertailussa.

Haastavan aiheen vuoksi syvennyimme molekyyli-genetiikkaan ja erityisesti miRNA:han perusteellisesti. Aiheen mielenkiintoisuudesta johtuen kävimme teoriaa läpi hyvinkin syvällisesti, mutta pyrimme kirjoittamaan työhön oleellisia ja tärkeäksi kokemiamme

asioita työn ymmärtämisen kannalta. Opimme käyttämään lähdetietoja kriittisesti ja yhdistämään useista lähteistä saatuja tietoja yhdeksi kokonaisuudeksi. Opinnäytetyöhön kulminoitui kaikki opiskelujen aikana opittu ja sovelsimme tietoa tämän työn kirjoittamiseen.

Lähteet

Ahmed, Farid E. 2007. Role of miRNA in carcinogenesis and biomarker selection: A methodological view. *Expert review of molecular diagnostics* 7(5): 569-603.

Aittomäki, Kristiina – Peltomäki, Päivi 2006. Syövän genetiikka. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.): *Perinnöllisyyslääketiede*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 186–205.

Brown, T.A. 2000. Getting started in molecular biology. Teoksessa Brown, T. A. (toim.) *Essential Molecular Biology*. Oxford University Press. 1–19.

Cherni, Irene – Weiss, Glen J. 2011. miRNAs in lung cancer: large roles for small players. *Future oncology* 7(9): 1045–1055.

Dacic S., Kelly L., Shuai Y., Nikiforova MN. 2010. miRNA expression profiling of lung adenocarcinomas: correlation with mutational status. *Modern Pathology* 23(12): 1577–1582.

Dietel, Manfred – Sers, Christine 2006: Personalized medicine and development of targeted therapies: the upcoming challenge for diagnostic molecular pathology. *Virchows Arch* 448: 744-755.

Farragher, Susan M. – Tanney, Austin – Kennedy, Richard D. – Harkin, Paul 2008. RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues. *Histochemistry Cell Biology* 130. 435-445.

Febbo, Phillip G. 2005. cDNA Microarrays. Teoksessa Walker, John M. – Rapley, Ralph (toim.) *Medical Biomethods Handbook*. Humana Press Inc. New Jersey. 255-271.

Finnzymes 2009: Principles of qPCR. Helsinki: Edita.

Friedman, Robin C. – Farh, Kyle Kai-How – Burge, Christopher B. – Bartel David P. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* 19 (1): 92-105.

Frilander, Mikko 2006. DNA ja geenisäätelyn periaatteet. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.): *Perinnöllisyyslääketiede*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 14–30.

Gao, Wen – Xu, Jing – Shu, Yong-qian 2011. miRNA expression and its clinical implications for the prevention and diagnosis of non-small-cell lung cancer. *Expert review of respiratory medicine* 5(5): 699-709.

Goswami, Rashmi S – Waldron, Levi – Machado, Jerry – Cervigne, Nilva K. – Xu, Wei – Reis, Patricia P. – Bailey, Denis J – Jurisica, Igor – Crump, Michael R – and Kamel-Reid, Suzanne 2010. Optimization and analysis of a quantitative real-time PCR-based technique to determine microRNA expression in formalin-fixed paraffin-embedded samples. *BMC Biotechnology* (10) 47: 1-12.

Isola, Jorma 2006: Syövän synty, kasvu ja leviäminen. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen, Mikko (toim.): Syöpätaudit. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 16–33.

Kankkunen, Päivi – Vehviläinen-Julkunen, Katri 2009. Tutkimus hoitotieteessä. Helsinki: WSOYpro Oy.

Kervinen, Jukka – Gahmberg, Carl G. 2004. Syövän täsmälääkkeet ja niiden kehitystyö. Duodecim 120. 2323–2330.

Knuutila, Sakari 2006. Geenit kromosomeissa: sytogenetiikan perusteet. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.): Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 31-47.

Leidinger, Petra – Keller, Andreas – Meese, Eckart 2012. MicroRNAs – important molecules in lung cancer research. *Frontiers in Genetics* 2 (104): 1–22.
Lewin, Benjamin 2000: *Genes VII*. Oxford University Press.

Li, Wei – Ruan, Kangcheng 2009. MicroRNA detection by microarray. *Analytical & bioanalytical chemistry* 394. 1117-1124.

Liu, A. – Xu, X 2011. MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods in Molecular Biology* 724: 259-267.

Mali, Pekka – Ojala, Antti – Salo, Jarmo A. 2006. Keuhkosyöpä. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen, Mikko (toim.): Syöpätaudit. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 277–294.

miRBASE 2011. The University of Manchester. Verkkodokumentti.
< <http://www.mirbase.org/index.shtml>>. Luettu 17.11.2011.

Mosakhani, Neda – Sarhadi, Virinder K. – Borze, Ioana – Karjalainen-Lindberg, Marja-Liisa – Sundström, Jari – Ristamäki, Raija – Österlund, Pia – Knuutila, Sakari 2012. MicroRNA Profiling Differentiates Colorectal Cancer According to KRAS Status. *Genes, Chromosomes & Cancer* 51: 1–9.

Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus 2006. Solunetti. Verkkodokumentti.
< <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/>>. Luettu 3.1.2012.

Nummenmaa, Lauri 2006. Käyttäytymistieteiden tilastolliset menetelmät. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Ortholan, Cécile – Puissegur, Marie-Pierre – Ilie, Marius – Barbry, Pascal – Mari, Bernard – Hofman, Paul 2009. MicroRNAs and lung cancer: new oncogenes and tumor suppressors, new prognostic factors and potential therapeutic targets. *Current Medicinal Chemistry* 16: 1047–1061.

Paasikivi, Riikka 2010. Biomarkkerit vievät kohti täsmähoitoja. *Kemia* 8: 20.

Palotie, Leena – Palotie, Aarno 2006. Geenikartoituksesta tautien syiden ymmärtämiseen. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno (toim.): Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 48–59.

QIAQEN 2009. miScript PCR System Handbook. Qiagen.

QIAGEN 2011. RNeasy FFPE Handbook. For purification of total RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Qiagen.

Schmittgen 2006: Quantitative gene expression by real-time PCR: a complete protocol. Teoksessa Dorak, M. Tevfik (toim.): Real-time PCR. New York: Taylor & Francis Group. 127–137.

Schmittgen, Thomas D - Lee, Eun Joo - Jiang, Jinmai - Sarkar, Anasuya - Yang, Liu-qing- Elton, Terry S – Caifu, Chen 2008. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods* 44 (1): 31–38.

Stenman, Ulf-Håkan – Haglund, Caj – Roberts, Peter J. 2006. Kasvainmerkkiaineet. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen, Mikko (toim.): Syöpätaudit. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 95–102.

Sugden, David 2005. Quantitative PCR. Teoksessa Walker, John M. – Rapley, Ralph (toim.): *Medical Biomethods Handbook*. Humana Press Inc. New Jersey. 327–345.

Suominen, Ilari – Pärssinen, Raimo – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani 2010. Geeniteknikka. Turun ammattikorkeakoulu. Turku.

Teppo, Lyly 2011. Syöpäsananasto. Syöpäjärjestöt. Verkkodokumentti. < <http://www.cancer.fi/tietoasyovasta>>. Luettu 14.11.2011.

Theophilus, Bimal D. M. 2005. Principles and medical applications of the polymerase chain reaction. Teoksessa Walker, John M. – Rapley, Ralph (toim.) *Medical Biomethods Handbook*. Humana Press Inc. New Jersey. 63-72.

Wilkinson, Miles 2000. Purification of RNA. Teoksessa Brown, T.A. (toim.): *Essential Molecular Biology*. Oxford University Press. 69–88.

Wistuba, Ignacio I. – Gelovani, Juri G. – Jacoby, Jörg J. – Davis, Suzanne E. – Herbst, Roy S. 2011. Methodological and practical challenges for personalised cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology* 8: 135–141.

Laboratoriopäiväkirja

Jaoimme laboratoriopäiväkirjan kahteen osaan: käänteistranskriptio-PCR:ään ja reaaliaikaiseen kvantitatiiviseen PCR:ään. Lisäksi esitämme lopuksi analysointisarjat ja pipetointikaavion. Käytimme näytteiden analysoinnissa miScript PCR System -reagenssipakkausta, joka sisälsi seuraavat osiot:

- *miScript Reverse Transcription Kit*: Transkriptaasientsyymiseos, puskurit ja RNAasivapaa-vesi. Puskuri sisälsi magnesiumionit, nukleotidit ja alukkeet.
- *miScript SYBR Green PCR Kit*: Alukkeet, RNAasivapaa-vesi ja SYBR Green PCR –reaktioseos. Reaktioseos sisälsi DNA-polymeraasin, puskurin, nukleotidit, väriaineen, referenssileiman ja magnesiumkloridia.
- *miScript Primer Assay*: alukkeet

Käänteistranskriptio-PCR

FFPE-näytteistä eristetyyn RNA:n muutimme cDNA:ksi käyttäen miScript Reverse Transcription -reagenssipakkausta (LOT: 139312405, exp.date: 12/2012).

Valmistelut

1. Teimme tarvittavat laimennokset, jotta RNA:ta saatiin näytteisiin 200ng/μl.
2. Suoritimme työn reagenssipakkauksen ohjeen mukaan.

Tarvittavat reaktiokomponentit:

Komponentti	määrä/1 reaktio (μl)
Puskuri	4
RNAasi vapaa vesi	14
RT Mix	1
Templaatti RNA (200ng/ml)	1
Yhteensä	20

Huomioita:

- pipetointivara oli 10 % reagenssin volyymistä
- teimme pipetoinnit jäällä sekä säilytimme näytteet ja reagenssit -20°C:ssa
- veden määrä vaihteli templaatti-RNA:n mukaan näytteissä, joiden konsentraatio oli alle 200ng/μl.

Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR

Käytimme työssä miScript SYBR[®] Green PCR reagenssipakkausta (Lot 139295627, exp. date 07/2012) ja suoritimme työn miScript PCR System- ohjeen mukaan (Qiagen 2009: Real-Time PCR for Detection of miRNA or Noncoding RNA).

- Kuoppalevyt: Biorad PCR Plates[™] 96-well Clear
- Kapillaarit: Light Cycler[®] Capillaries (20µl), Lot 354587-00, exp.date 05/2013

Valmistelut

1. Sulatimme reagenssit, alukkeet ja näytteet.
2. Valmistimme jokaiselle alukkeelle oma reaktioseoksensa, templaatti cDNA:n li-
säsimme myöhemmässä vaiheessa.

Ainesosa	Määrä/ 1 reaktio*
2x QuantiTect SYBR [®] Green PCR Master Mix	10 µl
10x miScript Universal Primer	2 µl
10x miScript Primer Assay	2 µl
RNase-free water	5 µl
Templaatti cDNA	1 µl
Yhteensä	20 µl

*pipetointivara on 10 %, eli pipetoitava määrä kerrotaan 1,1.

3. Pipetoimme reaktioseosta 19 µl ja cDNA:ta 1 µl kuoppalevyn pohjalle. Viimeiseen sarakkeeseen tuli reaktioseos ja vesi (NTC). Standardeille ja näytteille tehtiin rinnakkaismääritykset.

	Standardi		Näyte		NTC
Mastermix1	S1	S2	N1	N2	X
Mastermix2	S1	S2	N1	N2	X
Mastermix3	S1	S2	N1	N2	X

4. Kuoppalevy sentrifugoitiin (1000g; n. 30s).

Työn loppuvaiheet teimme CMG-laboratorion ohjeiden mukaan, sillä he käyttävät eri laitetta kuin Qiagenin ohjeessa.

5. Siirsimme LightCycler-kapillaarit adaptereihin (Light Cyler Centrifuge Adapters) ja pipetoimme reaktioseokset kuoppalevyttä kapillaareihin (20 µl). Korkitimme kapillaarit ja "spinnasimme" ne adapterien kanssa.
6. Teimme analysoinnin PCR-laitteella (Light Cyler, Roche®).

Taulukot

Taulukko 1. Pipetointikaavio.

<i>referenssi</i>		<i>näyte1</i>		<i>näyte2</i>		<i>näyte3</i>		<i>näyte4</i>		<i>näyte5</i>	
1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>näyte6</i>		<i>näyte7</i>		<i>näyte8</i>		<i>näyte9</i>		<i>NTC</i>			
1	2	1	2	1	2	1	2	1	X	X	X

Taulukko 2. Analysointiaikataulu ja pipetointisarjat.

<i>Päivä</i>	<i>Aluke</i>	<i>Näytteet (kpl)*</i>
8.2.2012	miR-494 miR-3907 U6	sarja1 (2)**
9.2.2012	U6	sarja2 (9)
13.2.2012	U6 miR-494	sarja3 (9) sarja3 (9)
14.2.2012	miR-494 miR-3907	sarja2 (9) sarja2 (9)
15.2.2012	miR-3907	sarja3 (9)

*Näytteiden lisäksi jokaisessa sarjassa ajettiin standardinäyte.

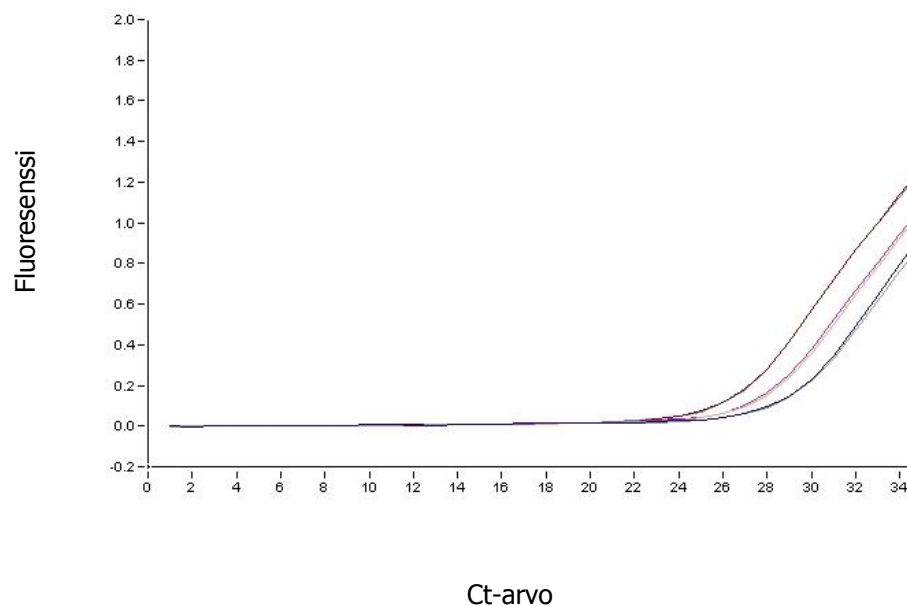
**Näytteet jaettiin kolmeen eri sarjaan analysoinnin helpottamiseksi.

Taulukko 3. miRNA-3907:n ekspression vertailun tulokset mikrosirumenetelmällä ja RT-qPCR:illä.

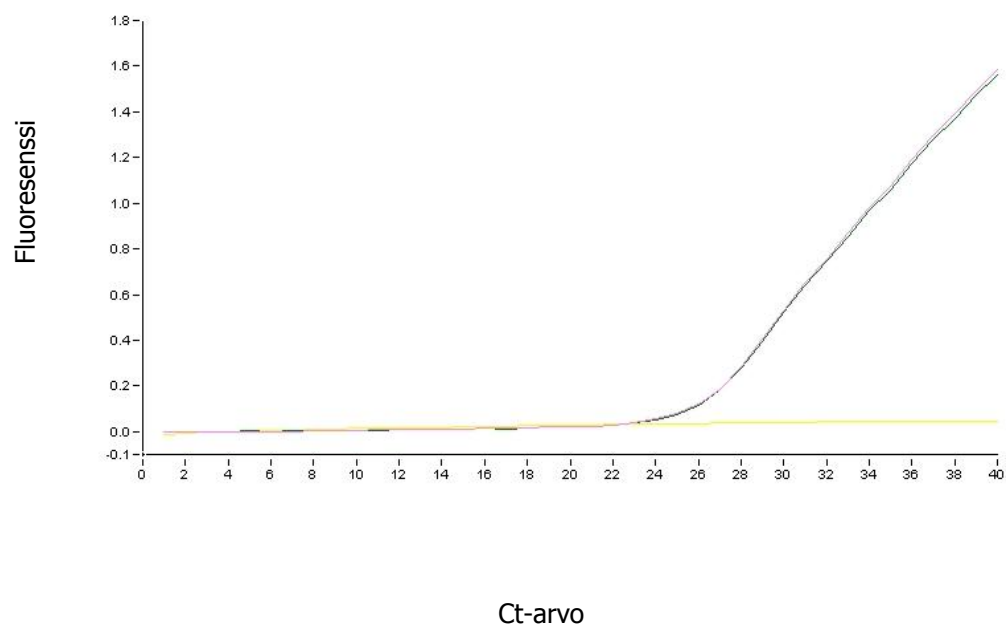
<i>miR-3907</i>	<i>Mikrosiru</i>	<i>RT-qPCR</i>
<i>positiivinen</i>	19	18
<i>negatiivinen</i>	1	2
<i>yhteensä</i>	20	20

Reaaliaikaisen RT-qPCR:n kuvaajia

Taulukko 4. Esimerkki kolmen näytteen rinnakkaismäärittämisestä.



Taulukko 5. Esimerkki yhden näytteen rinnakkaistuloksista, jossa mukana vesikontrolli (keltainen).



Reaaliaikaisen RT-qPCR:n tulokset

miR-3907

	näyte nro	Ct1	Ct2	keskiarvo	ΔCt näyte	$\Delta\Delta Ct$	log2
sarja 1	1	29,13	29,18	29,155	-4,225	-2,635	2,635
	2	26,8	27,22	27,01	-3,54	-1,95	1,95
	3	28,66	29,13	28,895	-4,125	-4,425	4,425
	4	31,39	30,97	31,18	-4,82	-5,12	5,12
	5	26,96	27,16	27,06	0,485	0,185	-0,185
sarja 2	6	27,24	26,68	26,96	-0,37	-0,67	0,67
	7	26,21	25,72	25,965	-1,605	-1,905	1,905
	8	26,28	26,65	26,465	1,015	0,715	-0,715
	9	26,18	26,18	26,18	-6,095	-6,395	6,395
	10	25,64	25,58	25,61	-0,97	-1,27	1,27
	11	27,16	27,47	27,315	-1,59	-1,89	1,89
	12	29,64	30,36	30	-0,84	-5,46	5,46
sarja 3	13	27,11	27,64	27,375	0,635	-3,985	3,985
	14	29,16	29,17	29,165	3,345	-1,275	1,275
	15	27,99	27,82	27,905	0,575	-4,045	4,045
	16	28,42	28,18	28,3	2,43	-2,19	2,19
	17	26,69	26,68	26,685	-0,36	-4,98	4,98
	18	31,69	31,22	31,455	-4,545	-9,165	9,165
	19	27,28	27,15	27,215	0,505	-4,115	4,115
	20	29,07	28,98	29,025	-0,73	-5,35	5,35

referenssinäytteet	ΔCt kalibraattori				
sarjoittain	ref1	29,25	29,52	29,385	-1,59
	ref2	27,11	27,64	27,375	0,3
	ref3	31,08	30,97	31,025	4,62

miR-494

näyte nro	Ct1	Ct2	keskiarvo	ΔCt näyte	$\Delta\Delta Ct$	log2
3	36	36	36	2,98	2,49	-2,49
5	28,22	27,95	28,085	1,51	1,02	-1,02
6	28,95	28,41	28,68	1,35	0,86	-0,86
12	24,49	24,62	24,555	-2,785	-3,275	3,275
13	27,47	27,21	27,34	0,6	0,11	-0,11
16	27,01	26,6	26,805	0,935	0,445	-0,445
19	27,84	28,1	27,97	1,26	0,77	-0,77

ΔCt kalibraattori				
referenssi	27,53	27,6	27,565	0,49

U6 Normalisointiin tarvittavat arvot

	näyte nro	Ct1	Ct2	Mean
sarja 1	1	33,53	33,23	33,38
	2	30,6	30,5	30,55
	3	33,11	32,93	33,02
	4	36	36	36
	5	26,52	26,63	26,575
sarja 2	6	27,38	27,28	27,33
	7	28,11	27,03	27,57
	8	25,52	25,38	25,45
	9	32,26	32,29	32,275
	10	26,27	26,89	26,58
	11	28,84	28,97	28,905
sarja 3	12	30,78	30,9	30,84
	13	26,6	26,88	26,74
	14	25,53	26,11	25,82
	15	27,11	27,55	27,33
	16	26,24	25,5	25,87
	17	27,08	27,01	27,045
	18	36	36	36
	19	26,71	26,71	26,71
20	29,54	29,97	29,755	
referenssinäytteet				
sarjoittain	ref1	30,71	31,24	30,975
	ref2	26,94	27,21	27,075
	ref3	26,24	26,57	26,405

Esimerkkinä näyte 1, miR-3907

$$A \left\{ \begin{array}{l} \Delta Ct(\text{näyte1}) = 29,155 (\text{näyte1}[\text{miR-3907}]) - 33,38 (\text{Näyte1}[\text{U6}]) = -4,225 \\ \Delta Ct(\text{kalibraattori}) = \\ 29,385(\text{referenssi1}[\text{miR-3907}]) - 30,975(\text{referenssi1}[\text{U6}]) = -1,59 \end{array} \right.$$

$$B \left\{ \begin{array}{l} \Delta \Delta Ct = -4,225(\text{näyte1}) - (-1,59)(\text{kalibraattori1}) = -2,635 \end{array} \right.$$

$$C \left\{ \begin{array}{l} \Delta \Delta Ct \rightarrow \log_2 \rightarrow 2,635 \end{array} \right.$$

Reaaliaikaisen RT-qPCR:n ja mikrosirumenetelmän kvantitatiiviset ja kvalitatiiviset tulokset

näyte nro	Kvantitatiiviset tulokset		Kvalitatiiviset tulokset	
	PCR	Mikrosiru	PCR	Mikrosiru
	log2	logscale		
1	2,635	9,188324	+	+
2	1,95	8,615203	+	+
3	4,425	3,2070255	+	+
4	5,12	2,2030196	+	+
5	-0,185	6,893605	-	+
6	0,67	7,346567	+	+
7	1,905	1,3978925	+	+
8	-0,715	6,63395	-	+
9	6,395	2,70854	+	+
10	1,27	-6,165653	+	-
11	1,89	0,6196213	+	+
12	5,46	2,579938	+	+
13	3,985	1,4108105	+	+
14	1,275	1,8040564	+	+
15	4,045	2,037012	+	+
16	2,19	1,3952813	+	+
17	4,98	1,4629476	+	+
18	9,165	2,1413565	+	+
19	4,115	0,62743926	+	+
20	5,35	1,1559079	+	+