

Riikka Mertaniemi

MOLEKYYLIPATOLOGIAN MENETELMÄN KÄYTTÖ IDH-MUTAATION TODEN- TAMISESSA

MOLEKYYLIPATOLOGIAN MENETELMÄN KÄYTTÖ IDH-MUTAATION TODEN- TAMISESSA

Riikka Mertaniemi
Bio21sp
Opinnäytetyö
Kevät 2024
Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Tekijä: Riikka Mertaniemi

Opinnäytetyön nimi: Molekyylipatologian menetelmän käyttö IDH-mutaation todentamisessa

Työn ohjaajat: Paula Reponen & Jaana Hoffren

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: kevät 2024 Sivumäärä: 38 + 4 liitettä

Molekyylipatologia on patologian erikoisala, jossa tutkitaan nukleiinihappoja eli DNA:ta ja RNA:ta sekä niissä tapahtuneita muutoksia. Ala kehittyy nopeasti ja tutkittavia mutaatioita löytyy koko ajan lisää, joten molekyylipatologian merkitys osana kliinisen patologian diagnostiikkaa on kasvamassa. Isositraattidehydrogenaasi- eli IDH-geenin mutaatio on yksi tärkeimmistä molekyyli muutoksista glioomissa. Opinnäytetyössä käytettävä reaaliaikainen PCR mahdollistaa nopeamman diagnoosin, sillä monistuvan tuotteen määrää voi seurata reaaliaikaisesti.

Tämän opinnäytetyön toimeksiantajana toimi Oulun yliopistollisen sairaalan patologian yksikkö. Opinnäytetyön tarkoituksena oli suorittaa molekyylipatologian menetelmällä testausajot käyttäen formaliinifiksoituja parafiinileikkeitä (FFPE). Opinnäytetyö tehtiin Idylla-järjestelmällä, jolla etsittiin IDH-mutaatioita glioomanäytteistä. Tavoitteena oli arvioida molekyylipatologian menetelmän hyödynnettävyyttä selvittämällä menetelmän toimivuutta ja vertailemalla saatujen tulosten vastaavuutta immunohistokemian tuloksiin. Opinnäytetyön toteutustavaksi valikoitui toiminnallinen opinnäytetyö ja saatuja tuloksia tarkasteltiin laadullisin menetelmin.

Opinnäytetyössä käytettiin 15 glioomapotilaiden FFPE-näytteitä. Opinnäytetyön tuloksissa molekyylipatologian menetelmä havaitsi mutaation ja osoitti kaikille näytteille immunohistokemian kanssa yhteensopivia tuloksia. Yhdestäkään RT-PCR-ajosta ei tullut vääriä positiivisia tuloksia. Tulokset osoittavat, että molekyylipatologian menetelmä on käyttökelpoinen vaihtoehto gliomien diagnostiikassa.

Ongelmia mutaation havaitsemisessa ilmeni vasta testattaessa valmistajan suosituksia pienempiä näytemääriä. Opinnäytetyössä oli mukana suhteellisen suurikokoisia näytteitä. Tulevaisuudessa näytteet voivat olla pienempiä varsinkin paksuneulabiopsioiden yleistyessä, ja se saattaa haastaa laitteen mutaatiohavaitsemiskyvyn. Jatkotutkimuksena voisi ajaa asteittain pienempiä näytemääriä, jolloin selviäisi pienin mahdollinen näytemäärä, josta mutaatio on vielä havaittavissa.

Asiasanat: isositraattidehydrogenaasi, molekyylipatologia, reaaliaikainen polymeerasiketjureaktio, immunohistokemia, Idylla, gliooma

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

Author: Riikka Mertaniemi

Title of thesis: Application of the molecular pathology method in the verification of IDH mutation

Supervisors: Paula Reponen & Jaana Hoffren

Term and year when the thesis was submitted: Spring 2024

Number of pages: 38 + 4 appendices

Molecular pathology is a specialized field of pathology that studies nucleic acids DNA and RNA, and the changes that have occurred in them. The field is rapidly evolving, and more mutations are being discovered all the time. Molecular pathology is becoming an increasingly important part of clinical pathology diagnostics. Determination of isocitrate dehydrogenase (IDH) 1/2 mutational status is important in the diagnosis of glioma. The real-time PCR used in this thesis enables a faster diagnosis, as the amount of replicate product can be observed in real time.

This thesis was commissioned by the Department of Pathology at Oulu University Hospital. The purpose of this thesis was to perform molecular pathology tests using formalin-fixed paraffin embedded sections (FFPE). The thesis was performed with the Idylla system to detect IDH mutations in samples from glioma patients. The goal was to evaluate the usefulness and functionality of the molecular pathology method and to compare the results obtained with those of immunohistochemistry.

The thesis used 15 samples. In the results of this thesis, the molecular pathology method showed results consistent with immunohistochemistry for all samples. The results indicate that the molecular pathology method is a viable option in the diagnosis of gliomas.

The samples used in this thesis were relatively large. Problems in detecting the mutation only occurred when testing smaller sample sizes than the manufacturer's recommendations. As a further study, progressively smaller sample volumes could be run, in which case the smallest possible sample amount in which the mutation is still detectable would be found.

Keywords: isocitrate dehydrogenase, molecular pathology, real-time polymerase chain reaction, immunohistochemistry, Idylla, glioma

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	7
2	AIVOSYÖPÄ JA GLIOMAT	8
2.1	Syövän synty eli karsinogeneesi	8
2.2	Keskushermoston kasvaimet.....	9
2.3	Gliomien luokittelu	9
2.4	IDH-mutaatio	10
3	DIAGNOSTISIA TUTKIMUKSIA IDH-MUTAATIOISSA	12
3.1	Immunohistokemia	12
3.2	Molekyylipatologia	13
3.2.1	Idylla-järjestelmä	14
3.2.2	Laaduntarkkailu ja tulosten tulkinta	15
3.3	PCR:n periaate.....	16
3.3.1	RT-PCR	17
3.3.2	MP-PCR.....	18
3.4	Aiemmat tutkimukset	20
4	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET	22
5	OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS.....	23
5.1	Opinnäytetyön toteutustapa.....	23
5.2	Alkuvalmistelut	23
5.3	Työvaiheet.....	24
6	TUTKIMUSTULOKSET	26
6.1	Johtopäätökset	27
6.2	Luotettavuuden arviointi	28
6.3	Korkea Cq-arvo	29
6.4	Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat	29
7	POHDINTA	31
	LÄHTEET.....	33
	LIITTEET	39

Keskeiset lyhenteet ja käsitteet

Aluke	yksijuosteinen DNA-fragmentti, jonka DNA-polymeraasi tarvitsee toimiakseen
Blokki	yleisesti käytetty nimitys näytteelle, joka on valettu parafiiniin
Cq	kvantifiointisykli, engl. Cycle of Quantification.
DNA	deoksiribonukleiinihappo
FFPE	engl. Formalin-fixed paraffin-embedded, formaliinifikoitu ja parafiiniin valettu kudoksenäyte
HE	hematoksyliini-eosiini. Yleisin patologian laboratoriossa käytetty histologinen perusvärjäys.
IDH	isositraattidehydrogenaasientsyymi
IDH-positiivinen	IDH-mutantti, vasta-ainevärjäyksissä reagoiva
IDH-villityyppi	IDH-mutatoitumaton, IDH-negatiivinen
IHC	immunohistokemia, engl. immunohistochemistry
Kodoni	Kolmen nukleotidin pituinen "koodisana". Jokainen kodoni koodaa yhtä aminohappoa.
Krebsin sykli	sitruunahappokierto, trikarboksyylihappokierto, TCA-kierto
Mutaatio	muutos geenin koostumuksessa
MP-PCR	engl. Mediator Probe PCR, välittäjäkoetin-PCR
Nukleotidi	emäksen (adeniini A, guaniini G, sytosiini C, tymiini T, urasiili U), sokerin ja fosforihapon muodostama yksikkö
PCR	polymeraasiketjureaktio, engl. polymerase chain reaction
RT-PCR	engl. real-time-PCR, reaaliaikainen PCR
SPC	näytteenkäsittelykontrolli, engl. statistical process control
Tuumori	kasvain

1 JOHDANTO

IDH- eli isositraattidehydrogenaasi-entsyymit ovat välttämättömiä entsyymejä, joilla on keskeinen rooli solujen homeostaasissa ja Krebsin syklissä (Han ym. 2020, 1580). IDH1 sijaitsee sytoplasmassa ja peroksisomeissa ja sen kromosomilokus on 2q33. IDH2 sijaitsee mitokondriossa kromosomilokuksessa 15q26. (Han ym. 2020, 1580; Nelson ym. 2023.) IDH:ta koodaavat geenit ovat usein mutatoituneet ihmisen pahanlaatuisissa kasvaimissa (Han ym. 2020, 1580). Mutaation löytyminen IDH1- tai IDH2-geenissä ryhmittää gliooman diffuusien gliomien ryhmään. Diffuusit glioomat ovat aivojen tukikudoksen kasvaimia, jotka kasvavat epätarkkarajaisesti terveen aivokudoksen seassa. Diffuusit glioomat jaetaan IDH-mutatoituneisiin ja IDH-mutatoitumattomiin kasvaimiin. (Tynnenen ym. 2020, 1203.)

Opinnäytetyö tehdään Oulun yliopistollisen sairaalan (OYS) patologian osastolle, joka on osa Pohjois-Pohjanmaan hyvinvointialuetta (POHDE). Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on tutkia IDH-1-2-mutaatiota molekyylipatologian menetelmällä käyttäen glioomapotilaiden formaliinifikoituja parafiiniin imeytettyjä kudoksenäytteitä (FFPE). Menetelmästä saatuja tuloksia verrataan immunohistokemian tuloksiin. Tavoitteena on arvioida saatujen tulosten pohjalta menetelmän käyttöönottoa osaksi glioomapotilaiden diagnostiikkaa. Tällä hetkellä OYS:n patologian osastolla ei tutkita IDH-mutaatiota molekyylipatologisella tutkimusmenetelmällä. Opinnäytetyössä käytettävä molekyylipatologian menetelmä perustuu reaaliaikaiseen polymeraasiketjureaktioon (Real-Time PCR), josta käytän lyhennettä RT-PCR. Tätä ei tule sekoittaa reverse-transcription PCR:ään, josta usein käytetään myös samaa lyhennettä (Suominen ym. 2013, 167).

Geneettinen tieto ja ymmärrys tiedon soveltamisesta hoitoon lisääntyvät jatkuvasti, joten laboratorioden tulee mukauttaa tutkimukset lisääntyvään ja muuttuvaan tautitietoon (Kytölä, Kankainen & Ristimäki 2023). Molekyylipatologia on kehittyvä ala ja tutkittavia mutaatioita löytyy koko ajan lisää. IDH-geenin mutaatio on yksi tärkeimmistä molekyylimuutoksista glioomissa. Yleisesti IDH1-mutaatio määritetään immunohistokemiallisia menetelmiä hyödyntäen. (Nelson ym. 2023.) Tynnenen ym. (2020, 1206) mukaan immunohistokemian IDH1-värjäyksen tulos ollessa negatiivinen, tarvitaan molekyyligeneettisiä menetelmiä IDH-mutaation osoittamiseksi. Molekulaarisen määrittelyn tarkoituksena on muodostaa aiempaa yhtenäisempiä kasvainryhmiä. Molekyylimuutoksiin perustuva luokittelu luo pohjan tulokselliselle hoidolle, sillä se parantaa gliomien diagnostiikan tarkkuutta. (Tynnenen ym. 2020, 1202–1206.)

2 AIVOSYÖPÄ JA GLIOMAT

Aivot ja selkäydin muodostavat keskushermoston. Hermokudos koostuu hermosoluista ja hermotukisoluista eli gliasoluista. Aivokudoksessa toimivia gliasoluja ovat astrosyytit, oligodendrosyytit ja endependymisolut. Astrosyytit muodostavat aivojen veriaivoesteen. Oligodendrosyytit muodostavat myeliinituppea keskushermoston aksonien ympärille. Endependymisolut reunustavat aivokammioita ja osa niistä erittää aivo-selkäydinnestettä. (Leppäluoto ym. 2019, 329–331.)

Gliomat ovat aivojen tukisolukasvaimia (Tynnenen, Gardberg & Haapasalo 2023). Eri soluista lähtöisin olevat kasvaimet nimetään yleensä lähtösolukon mukaan, esimerkiksi astrosytoomat ovat lähtöisin astrosyyteistä ja oligodendrogliomat ovat lähtöisin oligodendrosyyteistä (Terveyskylä 2021a).

2.1 Syövän synty eli karsinogeneesi

Syövän synty on monivaiheinen prosessi, joka johtuu mutaatiosta eli muutoksesta solun DNA:ssa (Mäkinen ym. 2012, 308). Syövän syntyyn vaikuttaa lähes aina jokin ulkoinen tekijä (Ivaska, Ristimäki & Mustjoki 2023). Geenimuutokset syntyvät sattumanvaraisesti ja vain harvat niistä edistävät syövän syntyä. Ensimmäinen geenimuutos, kuten yksittäisen proto-onkogeenin eli esisyöpägeenin aktivoituminen, ei vielä aiheuta syöpää, mutta nopeutuneen jakautumisen vuoksi solun tytärsolut ottavat yliedustuksen, jolloin todennäköisyys sille, että myös toinen geenimuutos kohdistuu näihin soluihin, kasvaa. (Heino & Vuento 2019, 325, 329.)

Syöpäsairauksille on yhteistä solun elinkaaren häiriintyminen ja solujen hallitsematon kasvu, joka tuhoaa normaalia kudosta. Riippumattomuus kasvutekijöistä on yksi monesta tekijästä, joka vaikuttaa solun muuttumiseen pahanlaatuisiksi. Syöpäsolut voivat muokata immuunijärjestelmää itselleen suotuisaksi, jolloin immuunijärjestelmä ei enää kykene tuhoamaan syöpäsoluja. (Ivaska ym. 2023.) Kontrolliltaan kasvanut solukko voi muodostaa kasvaimen, jolla on oma verisuonitus. Tällainen kasvain pystyy tunkeutumaan ympäröivään kudokseen. (Heino & Vuento 2019, 323.) Keskushermoston kasvainten syntyyn ei tunneta ehkäisykeinoja eikä esimerkiksi elintavat vaikuta niiden syntyyn. Keskushermoston kasvaimet eivät ole perinnöllisiä. (Atula 2023.)

2.2 Keskushermoston kasvaimet

Suomessa todetaan vuosittain noin 1000 keskushermoston kasvainta, joista noin 400 on glioomia (Suomen Syöpärekisteri 2023). Keskushermoston kasvaimista 90 %, esiintyy aivoissa, loput selkäytimessä. Suomessa keskushermoston kasvaimiin kuolee nykyään yli 400 henkilöä vuosittain. Tilastojen mukaan vuonna 2021 pelkästään gliomien aiheuttamia kuolemia on ollut 314 kpl. (Suomen Syöpärekisteri 2023; Seppä ym. 2023.) Yleisin keskushermoston kasvain on gliooma, joka saa alkunsa gliasoluista. Gliomien ennuste vaihtelee suuresti niiden tyypeistä ja biologisista ominaisuuksista riippuen (Atula 2023.) Vuosina 2019–2021 seuratuista glioomaa sairastavista potilaista viiden vuoden päästä diagnoosista on ollut elossa naisista 34 % ja miehistä 25 % (Seppä ym. 2023). Mäenpään ym. (2014) mukaan aivokasvaimet ovat yksi lasten yleisimmistä syövästä. Muiden kasvainten tavoin, myös aivokasvainten yleisyys kasvaa keski-ikään jälkeen (Atula 2023). Aivokasvaimille ei ole tyypillistä levitä keskushermoston ulkopuolelle (Terveyskylä 2021b).

Perinteisesti keskushermoston kasvainten luokittelu on perustunut yksinomaan histologisiin ominaisuuksiin. Nykyään tietyt molekyylimarkkerit ovat kasvattaneet merkitystään sekä täydentävän että määrittelevän diagnostisen tiedon tarjoajana. Vuonna 2021 World Health Organization (WHO) on julkaissut Central Nervous System Tumours -kirjan uusimman painoksen (CNS5), jossa käsitellään lukuisia molekyylimuutoksia, joilla on kliinispatologista hyötyä ja jotka ovat tärkeitä keskushermoston kasvainten mahdollisimman tarkan luokittelun kannalta. Yksi näistä käsiteltävistä molekyylimuutoksista on IDH-mutaatio. Molekyyliparametri voi joskus lisätä histologisten löydösten arvoa luokan määrittämisessä. (Louis ym. 2021, 1231–1232, 1238–1239.)

2.3 Gliomien luokittelu

Gliomat voidaan luokitella mikroskooppisella tutkimuksella ja molekulaarisilla muutoksilla. Molekulaariset muutokset, kuten IDH-mutaatio, jakavat kasvaimia ennusteeltaan erilaisiin ryhmiin, vaikka histologinen tyyppi ja pahanlaatuisuusaste olisi sama. (Tynninen ym. 2020, 1202.)

Patologi nimeää ja luokittelee kasvaimen pahanlaatuisuusluokkien (Gradus 1–4) mukaan (Terveyskylä 2021b). Luokka 1 sisältää hyvänlaatuiset ja hitaasti kasvavat kasvaimet. Näiden kasvainten raja aivokudokseen on tarkka, jolloin kokonaispoisto on yleensä parantava hoito. Ne painavat tai siirtävät aivokudosta, mutta eivät kasva aivokudoksen solujen sekaan. (Terveyskylä 2021b.)

Luokan 1 kasvaimet ovat aikuisilla harvinaisia eivätkä ne muutu pahanlaatuisiksi ajan kuluessa (Terveyskylä 2021a). Luokat 2–4 sisältävät kasvaimet, jotka tunkeutuvat aivokudokseen. Tällaisen kasvaimen poisto ei yleensä ole parantava hoito, sillä kasvain on epätarkkarajainen ja leikkaus jää usein epätäydelliseksi. Glioomat muodostavat valtaosan näistä kasvaimista. (Terveyskylä 2021b.) Luokan 2 glioomat kehittyvät hitaasti useiden vuosien aikana ja joillakin niistä on taipumus muuttua pahanlaatuisiksi (Terveyskylä 2021a). Luokan 3 glioomia kutsutaan anaplastisiksi, mikä viittaa solujen muuttumista pahanlaatuiseen suuntaan. Luokan 4 glioomat ovat maligneja eli pahanlaatuisia kasvaimia, joille on tyypillistä kasvaimen suureneminen nopeasti. (Terveyskylä 2021a; Kaikki syövästä 2023.)

Oligodendroglioomassa, jossa on samanaikaisesti sekä IDH-mutaatio että 1p/19q-kodeleetio luokitellaan ryhmään 2–3 (Louis ym. 2021, 1238; Tynnenen ym. 2020, 1202). Oligodendrogliooman ennuste on suotuisampi, kuin astrozytooman (Tynnenen ym. 2020, 1205). Astrozytoomissa IDH-mutaatio erottaa suotuisan ennusteen kasvaimet omaksi ryhmäkseen (Tynnenen ym. 2020, 1202). Glioblastooma on glioomista tavallisin ja pahanlaatuisin astrozyttinen kasvain (Tynnenen ym. 2020, 1202; Pustchi ym. 2020). Noin puolet aikuisten diffuuseista glioomista on glioblastoomia (Tynnenen ym. 2020, 1205). IDH-mutatoitumaton glioblastooma kuuluu luokkaan 4 (Louis ym. 2021, 1238).

2.4 IDH-mutaatio

IDH-entsyymit ovat välttämättömiä entsyymejä, jotka osallistuvat useisiin aineenvaihduntaprosesseihin, kuten Krebsin sykliin, glutamiinin aineenvaihduntaan, lipogeneesiin ja redox-säätelyyn. Keskisessä roolissa ne ovat solujen homeostaasissa ja Krebsin syklissä, sillä ne katalysoivat isositraatin oksidatiivista dekarboksylaatiota alfaketoglutaraatiksi (α -KG). (Han ym. 2020; Cadoux-Hudson, Schofield & McCullagh 2021, 2561; Lin ym. 2015, 1–2.)

Isositraatissa on 6 hiiliatomia ja sen hapettava entsyymi on isositraattidehydrogenaasi (IDH). Oksidatiivisessa karboksylaatiassa yksi hiiliatomi irtoaa asetyyli Ko-A:sta hiilidioksidina, jolloin syntyy alfaketoglutaraatti (α -KG). α -KG:ssa on täten 5 hiiliatomia. (Heino & Vuento 2019, 114–115.) Tarkemmin selitettynä α -KG muodostuu, kun IDH1:n ja IDH2:n katalyyttiset kohdat osoittavat affiniteettia substraattiin, tässä tapauksessa isositraattiin, ja yhdessä

nikotiiniaminiadeniininidinukleotidifostaafin (NADP+) ja kaksiarvoisen metallikationin, kuten magnesiumin tai mangaanin, kanssa saavat aikaan α -KG muodostumisen (Han ym. 2020).

IDH:ta koodaavat geenit ovat usein mutatoituneet ihmisen pahanlaatuisissa kasvaimissa (Han ym. 2020, 1580). IDH-mutaatioissa IDH-mutantti pelkistää α -KG:n 2-hydroksiglutaraatiksi (2-HG). IDH-mutaatiot tuottavat suuria määriä 2-HG:ta, jonka kertymisen solun sisä- ja ulkopuolelle oletetaan saavan aikaan syöpien patogeneesin, vaikka tarkka mekanismi, jolla se tekee tämän, on edelleen epävarma. (Cadoux-Hudson ym. 2021, 2561; Lin ym. 2015, 1–2.)

Mutaation löytyminen IDH1- tai IDH2-geenissä ryhmittää gliooman diffuusien glioomien ryhmään. Diffuusit gliomat jaetaan IDH-mutatoituneisiin (IDH-mutantti) ja IDH-mutatoitumattomiin (IDH-villityyppi) kasvaimiin. (Tynnen ym. 2020, 1202–2023.) IDH-mutatoituneiden kasvainten ennuste on parempi kuin vastaavilla, saman histologisen luokan IDH-mutatoitumattomilla kasvaimilla (Gondim ym. 2019). Esimerkiksi IDH-mutatoitumatonta glioblastoomaa sairastavan potilaan mediaani elossaoloaika on vain reilu vuoden, kun taas IDH-mutatoitunutta glioblastoomaa sairastavilla vastaava aika on noin 2,5 vuotta (Tynnen ym. 2020, 1203).

Yleisin IDH-mutaatio on IDH1 R132H, jota esiintyy noin 90 %:ssa IDH-positiivisista tapauksista (Gondim ym. 2019). Mutaatio voi johtaa muutokseen syntyvän proteiinin rakenteessa (Heino & Vuento 2019, 325). Yleisimmässä IDH1-mutaatiossa adeniini on korvautunut guaniinilla nukleotidissa 395 (c.395G>A). Se muuntuu histidiiniksi (CAU) arginiinin (CGU) sijaan (p.Arg132His). Tästä käytetään nimitystä R132H-mutaatio, sillä mutaatio sijaitsee kodonissa 132. (Mehrijärvi, Hänggi & Kahlert 2020, 2.) Yhden nukleotidin korvautuminen toisella, niin kutsuttu pistemutaatio, on yleisin geenivirhe, joka johtaa usein väärän aminohapon ohjautumiseen paikalle translaatiossa eli proteiinisynteesissä. Aminohapon muuntuminen toiseksi aiheuttaa valkuaisaineen vääränlaisen laskostumisen, jolloin sen rakenne muuttuu ja sen normaali toiminta saattaa häiriintyä tai estyä kokonaan. (Jalanko, Ranki & Palotie 1996.)

3 DIAGNOSTISIA TUTKIMUKSIA IDH-MUTAATIOISSA

Kaikista aivokasvaimista pyritään saamaan edustava näyte histologisia tutkimuksia varten. Alustava lausunto voidaan antaa jo jääleiketutkimuksesta, joka tehdään jo leikkauksen aikana. (Terveyskylä 2021b.)

3.1 Immunohistokemia

Immunohistokemiallinen diagnostiikka perustuu vasta-aineiden kykyyn tunnistaa antigeenejä (Mäkinen ym. 2012, 1133). Vasta-aineet tunnistavat antigeeninsä ja sitoutuvat sen spesifiseen sitoutumiskohtaan (Mäkinen & Suikkanen 2023a). Tavoitteena on osoittaa tietyn antigeenin olemassaolo tai sen puuttuminen tutkittavassa näytteessä (Mäkinen ym. 2012, 1135).

Vasta-aineita on poly- ja monoklonaalisia. Polyklonaaliset vasta-aineet tunnistavat antigeenistä useampia erilaisia sitoutumiskohtia, monoklonaaliset tunnistavat vain yhdentyyppisen sitoutumiskohdan. Osa vasta-aineista on pan-vasta-aineita, jotka voivat tunnistaa useita saman luokan antigeenejä. (Mäkinen & Suikkanen 2023a.) Kasvaindiagnostiikassa käytettävät vasta-aineet tunnistavat antigeenejä, joiden esiintyvyys pysyy stabiilina myös pahanlaatuisissa muutoksissa, eikä kasvaimen huono erilaistuminen vaikuta ratkaisevasti värjäysreaktioon. Tulkinta on yleensä yksiselitteisesti joko positiivinen tai negatiivinen. (Mäkinen ym. 2012, 1137.)

Immunohistokemian avulla patologi pystyy antamaan diagnoosin sellaisista kasvaimista, joita ei ole ollut mahdollista luokitella pelkästään HE- ja muiden histokemiallisten värjäysten avulla (Mäkinen ym. 2012, 1133). Yksi immunohistokemian tärkeimmistä käyttöalueista on kasvainten alkuperän varmistaminen (Mäkinen & Suikkanen 2023b). Lisäksi immunohistokemian avulla tutkitaan solujen toiminnan merkkiaineita, kuten proliferaatiomarkkereita, solusyklin ja apoptoosin antigeenejä sekä solujen toimintaa sääteleviä antigeenejä (Mäkinen & Suikkanen 2023b).

Immunohistokemiallisella värjäyksellä voidaan osoittaa IDH-geenin yleisin mutaatio IDH1 R132H (Tynnenen, Gardberg & Haapasalo 2021). IDH-mutaatio tuottaa muuttuneen proteiinin, joka voidaan havaita immunohistokemialla käyttäen R132H-vasta-ainetta (Gondim ym. 2019). Jos

immunohistokemiassa IDH1-värjäyksen tulos on negatiivinen, tarvitaan molekyyligeneettisiä menetelmiä IDH-mutaation osoittamiseksi (Tynnenen ym. 2020, 1206).

3.2 Molekyylipatologia

Molekyylipatologialla tarkoitetaan laajasti määriteltynä molekyylien, kuten RNA:n, DNA:n tai proteiinien, tutkimista tautitilojen yhteydessä. Molekyylipatologisilla testeillä voi tutkia esimerkiksi DNA:n emäsjärjestystä, translokaatiota tai geenimuutoksia eli mutaatioita. (The Association of Clinical Pathologists 2023.) Molekyylipatologisia tutkimuksia voidaan hyödyntää syöpädiagnostiikassa (Orte ym. 2021, 1434). Testauksen tavoitteena on löytää kaikki mutaatiot, jotka liittyvät diagnostiikkaan, ennusteeseen tai hoitoon (Kytölä ym. 2023). PCR-pohjaiset testit antavat tuloksen yksittäisen kohdegeenin mutaatiostatuksesta, mutta nämä tutkimukset vaativat edustavan näytteen. Molekyyli-tieto, joka on kerätty DNA:sta, toimii usein yksilöllisen hoidon perustana. (Orte ym. 2021, 1433.) Molekyylipatologisen testin tulee olla tarkka, herkkä, mutta myös kustannustehokas. Tutkimus vaatii edustavien näytteiden lisäksi huolellista suunnittelua ja menetelmävertailua sekä toistettavuutta. (Ristimäki ym. 2013, 1072.)

Nukleiinihappojen kanssa on työskenneltävä tarkan aseptisesti, sillä nukleiinihappoja hajottavia nukleaaseja eli DNAaseja ja RNAaseja on kaikkialla. Nukleaaseja on esimerkiksi ihmisen iholla, josta syystä on aina käytettävä kertakäyttöisiä suojakäsineitä. (Pärssinen, Suominen & Haajanen 2012, 85.) Pienet reaktiivilavuudet ja pipetointimäärät edellyttävät laboratoriotyöskentelyssä erityistä huolellisuutta ja tarkkuutta (Pärssinen ym. 2012, 182). Työskentely vaatii tarkkaa etukäteissuunnittelua ja varsinaisten monistusreaktioiden ohella on hyvä tehdä kontrollireaktiot (Suominen ym. 2013, 156). PCR on erittäin tarkka menetelmä, jossa pienikin kontaminaatio monistuu tehokkaasti. Kontaminaatioita voi vähentää kiinnittämällä huomiota työskentelytapoihin. Työskentelytila pidetään puhtaana ja se puhdistetaan jokaisen käyttökerran välissä. Suojakäsineet vaihdetaan näytteen valmistelun jälkeen ennen PCR-laitteelle siirtymistä ja näytteiden valmistelussa käytetään PCR-laatuista vettä sekä PCR:ään soveltuvia putkia. (Pärssinen ym. 2012, 182–183; Bio-Rad 2006, 8.) Kertakäyttöreagenssien käyttö pienentää kontaminaatoriskiä. On suositeltavaa käyttää vain PCR-työskentelyyn varattuja pipetteja ja suojata itsensä asianmukaisesti. Putkien sisältö sentrifugoidaan pohjalle ennen avaamista, jotta saadaan mahdollisesti korkkiin tarttunut neste mukaan pipetointiin. (Pärssinen ym. 2012, 182–183.)

Molekyylipatologisten tutkimusten vastausaika on yleensä 5–10 työpäivää, joista noin puolet kuluu itse analyysiin ja tulosten tulkintaan. Toinen puolikas menee näytteen edustavuuden arvioinnissa ja näytteenkäsittelyyn kuluvaan ajassa ennen analyysiä. (Kytölä ym. 2023.)

3.2.1 Idylla-järjestelmä

Opinnäytetyössä käytettävä Idylla-järjestelmä on täysin automatisoitu *in vitro*-diagnostiikkamenetelmä. Se koostuu Idylla-ohjauspäätteestä, jonka voi liittää yhdestä kahdeksaan Idylla-moduuliin. Kasettien ajo tapahtuu täysin automatisoidulla Idylla™ Platform-alustalla. Kone tekee automaattisesti kasetinmukaisen testin. Se liuottaa näytteen, hajottaa solut, eristää ja monistaa DNA:n, havaitsee kohdesekvenssien fluoresoivan leiman ja tekee data-analyysin, josta saatuja tuloksia voidaan tarkastella. (Biocartis 2023.)

IDH-1-2-mutaatiomäärityssarja on tarkoitettu IDH1- ja IDH2-mutaatioiden havaitsemiseen. Se on ensimmäinen Idylla™ FLEX-teknologialla kehitetty testi, johon kuuluu automatisoitu kasetti ja alukepullo. Pipetoitavat alukkeet helpottavat uuden kasetin rakentamista, jolloin saadaan nopeammin uusia testejä markkinoille. (Biocartis NV 2023, 9; Flanders.bio 2023). Jokainen testikerta vaatii yhden kertakäyttöisen kasetin ja alukepullon. Idylla™ IDH1-2-mutaatiomäärityssarja sisältää kaikki tarvittavat reagenssit yhden Idylla™ IDH1-2-testin suorittamiseen. Alukepullo sisältää puskurin, leimaamattomat koettimet ja alleelispesifiset alukkeet, jotka on suunniteltu monistamaan spesifisesti 15 mutaatiota (ks. liite 4.). (Biocartis NV 2023, 9.) Kasetti sisältää kaikki tarvittavat reagenssit näytteen esikäsittelyä ja havaitsemista varten (Biocartis 2023).

Kasetti ajetaan Idylla-järjestelmässä, joka kykenee osoittamaan kvalitatiivisesti viisi IDH1-mutaatiota kodonissa 132, neljä IDH2-mutaatiota kodonissa 140 ja kuusi IDH2 mutaatiota kodonissa 172. Kasetissa tapahtuu koko prosessi uutetusta DNA:sta tuloksiin sisältäen reaaliaikaisen polymeraasiketjureaktion. Näytemateriaalina voi eristetyn DNA:n lisäksi käyttää FFPE-kudosta tutkittaessa gliomaa, tai verta tai luuydintä tutkittaessa akuuttia myelooista leukemiaa. (Biocartis 2023; Biocartis NV, 21.)

Kasettiin tulee asettaa leikkeitä 1–3 kpl. Suositeltava leikkeen pinta-ala on vähintään 25 mm² leikkeestä, joka sisältää 100 % tuumorisoluja (Biocartis 2023). Kun alukepullon liuos ja näyte on asetettu kasettiin, tulee kasetti asettaa välittömästi Idylla-laitteeseen, jossa materiaali sekoitetaan ja

liuoksessa oleva puskuri mahdollistaa PCR-reaktion. Kaikki tarvittavat PCR-reagenssit ovat stabiilissa muodossa. Kemiallisten reagenssien, entsyymien, lämmön ja korkeataajuisen ultraäänen yhdistelmä saa aikaan nukleiinihappojen vapautumisen PCR-monistusta varten. DNA monistetaan, ja IDH1- ja IDH2-mutaatiot havaitaan fluoresoivasti leimattujen koettimien avulla. Monistamisen ja havaitsemisen aikana syntyy fluoresoivia signaaleja, jotka Idylla™ IDH1-2-mutaatiomääritys analysoi ja muuntaa geneettiseksi tiedoksi. (Biocartis NV 2023, 6.)

3.2.2 Laaduntarkkailu ja tulosten tulkinta

Kasetin jokaisessa kammiossa monistuu ajon kanssa samaan aikaan KIF11-geenin konservoitu fragmentti, jonka PCR-reaktio toimii näytteenkäsittelyn kontrollina (SPC). Kontrollilla varmistetaan, että koko prosessi näytteestä tulokseen on toteutettu asianmukaisesti. Kontrollireaktio toimii myös mittarina näytteestä monistuvalla DNA-määrällä ja sitä käytetään näytteen mutaatiostatuksen analysoinnissa. (Biocartis NV 2023, 6, 18.)

Idylla™ IDH1-2-mutaatiomääritysohjelmisto analysoi automaattisesti kerätyt fluoresenssisignaalit ja käyttää PCR-käyrän tiedoista saatuja tunnusomaisia parametreja. Aluksi näytteenkäsittelykontrollista (SPC) saadut fluoresenssisignaalit arvioidaan PCR-käyrän validiteetin osalta, jonka jälkeen voidaan määrittää tuloksen validiteetti. (Biocartis NV 2023, 6.) Laaduntarkkailussa laite kertoo kontrollien onnistumisesta. Mikäli määrityskontrollit eivät ole monistuneet asianmukaisesti, on määrittystulos epäkelpo (invalid), eikä tällöin saatuihin tuloksiin voi luottaa. (Biocartis NV 2023, 23.) Jos kasetin yksi kontrolli ei ole onnistunut, se johtaa kyseisen PCR-kammion mutaatiokohteen mitätöintiin, mutta muiden PCR-kammioiden osalta raportoidaan edelleen kelvolliset tulokset. Jos useampi kuin yksi kontrolli ei ole onnistunut, kaikki kasetin tulokset mitätöidään. (Biocartis NV 2023, 7.)

Ajon päätteeksi konsolin näytöllä näkyy tulos, jossa ilmoitetaan IDH1- ja IDH2-geenien tietyn mutaation esiintyminen tai puuttuminen analysoidussa näytteessä. Idylla™-järjestelmä tulkitsee määrittelyn tulokset automaattisesti. Idylla™ IDH1-2 mutaatiomääritys raportoi kolmenlaisia tuloksia: mutaatiota ei havaittu (no mutation detected), mutaatio havaittu (mutation detected) ja epäkelpo (invalid). (Biocartis NV 2023, 6, 23–24.)

Kun mutaatio havaitaan, tulosraporttiin tulee lukemaan seuraavat lisätiedot mutaatiosta: proteiini-muutos, nukleotidimuutos, nukleotidimuutoksen sijainti sekä havaitun mutaation kvantifointisykli (Cycle of Quantification) eli Cq- ja Δ Cq-arvo (Biocartis NV 2023, 23–24). Cq- ja Δ Cq-arvoja käytetään sen määrittämiseksi, onko mutaatio havaittu näytteessä. Niitä käytetään myös määrittämään kasetin kelpoisuutta ja arvioitaessa prosessin asianmukaista suorittamista näytteestä tulokseen asti. Onnistuneessa testituloksessa on näkyvillä IDH-kontrollien mediaani-Cq-arvo. (Biocartis NV 2023, 7–8, 23.) Tämän Cq-arvon ollessa liian korkea, tulee raporttiin huomautus, ettei testi ole välttämättä havainnut mutaatioita näytteistä, joissa on matala mutaatio-osuus. Cq-arvo voi ylittyä, jos DNA:n laatu on heikko tai sen määrä on liian alhainen. (Biocartis 2023.)

3.3 PCR:n periaate

PCR (engl. polymerase chain reaction) eli polymeraasiketjureaktio on DNA:n monistukseen käytettävä monta kertaa peräkkäin toistettava kahdentumisreaktio, jossa monistettavat DNA-jaksot sijaitsevat kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä (Suominen ym. 2013, 153). PCR:ssä tarvitaan puskuriliuosta, kopioitavaa DNA:ta, DNA-polymeraasientsyymi, alukkeita ja nukleotideja. DNA-polymeraasit ovat entsyymejä, jotka katalysoivat DNA:n synteesiä. PCR:ssä käytetään kuumissa lähteissä elävistä bakteereista eristettyjä DNA-polymeraaseja, jotka eivät menetä toimivuuttaan kuumissa olosuhteissa. (Suominen ym. 2013, 153–154.)

Kohde-DNA:na toimii usein kaksijuosteinen DNA, joka vapautetaan solusta. DNA:n eristysvaiheessa pyritään poistamaan kopiointia häiritseviä ja inhiboivia tekijöitä. Tavoitteena on haittatekijöiden minimointi, mutta DNA:n ei siis välttämättä tarvitse olla täysin puhdasta. Lähtömateriaalina voi toimia myös RNA, mutta se pitää ensin kääntää käänteiskopioijaentsyymin avulla vastaavaksi DNA:ksi. (Suominen ym. 2013, 154, 156.)

PCR-menetelmä voidaan jakaa karkeasti kolmeen vaiheeseen: Denaturaatio, Annealing ja Extension. Nämä kolme vaihetta muodostavat yhden syklin. Jokaisen syklin jälkeen DNA:n määrä kaksinkertaistuu ja syklien määrää toistamalla saadaan DNA:n määrä nousemaan eksponentiaalisesti. (National Library of Medicine 2023.) Denaturaatiovaiheen aikana DNA kuumennetaan 95 celsiusasteeseen, jotta DNA:n emäsparien väliset vetysidokset hajoavat ja kaksijuosteinen DNA muuttuu yksijuosteiseksi. Annealing-vaiheessa denaturoitu DNA jäähdytetään 37–72 celsiusasteeseen, jolloin alukkeet kiinnittyvät monistettavan yksijuosteisen DNA:n vastaaviin komplementaarisiiin

kohtiin. (Suominen ym. 2013, 154, 156; Khehra, Padda & Swift 2023.) PCR-reaktioiden annealing-lämpötila johtuu alukkeiden pituudesta, käytettävistä nukleotideista ja niiden määrästä. Se laskeaan Wallacen säännön perusteella, jolloin kukin adeniini (A) ja tymiini (T) vastaa 2 celsiusastetta ja kukin guaniini (G) ja sytosiini (C) vastaa 4 celsiusastetta. (Suominen ym. 2013, 154, 158.)

Extension vaiheessa lämpötilaa nostetaan yleensä 72 celsiusasteeseen, jolloin DNA-polymeeraasientsyymi alkaa liittää reaktioseoksessa olevia nukleotideja 3'-5'-suunnassa tuottaen juosteita, jotka ovat identtisiä monistettavan kohteen kanssa. DNA-polymeeraasi liittää yhden nukleotidin kerrallaan ja liittäminen tapahtuu aina päädyssä olevaan vapaaseen OH-ryhmään. Kun monistettavan DNA:n kummallekin juosteelle on syntynyt vastinjuoste, nostetaan lämpötilaa 95 celsiusasteeseen ja sykli alkaa alusta. Kun näitä syklejä toistetaan useita peräkkäin, saadaan kohde-DNA:ta monistettua pienestä määrästä suuri määrä. (Suominen ym. 2013, 154, 156; Khehra ym. 2023.)

3.3.1 RT-PCR

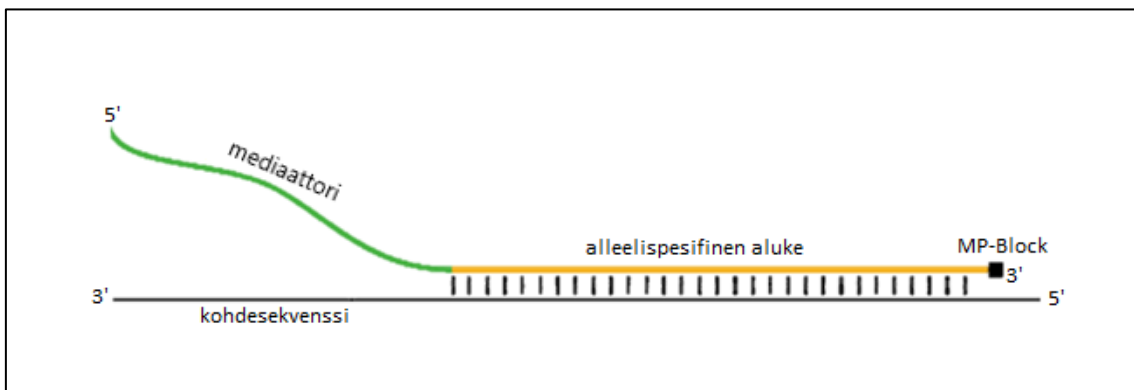
Perinteisessä PCR:ssä tuote monistetaan ja monistuksen jälkeen näyte analysoidaan esimerkiksi agarosigeelielektroforeesilla. Reaaliaikainen PCR (RT-PCR) eroaa perinteisestä PCR:stä siten, että RT-PCR:ssä voidaan seurata syntyvän tuotteen määrää reaaliaikaisesti reaktion edetessä. Reaaliaikainen seuranta perustuu fluoresoivan merkkiaineen käyttöön. Signaalit saadaan mitattaviksi käyttäen DNA:han sitoutuvaa fluoresoivaa väriä tai fluoresoivien koettimien avulla. Sitoutumisaan valmistuvaan PCR-tuotteeseen väriaineen fluoresenssisignaali moninkertaistuu ja se voidaan mitata. RT-PCR ansiosta koko PCR:n prosessi nopeutuu. Myös DNA:n kontaminaatoriski pienenee, kun lopputuotetta ei tarvitse käsitellä monistamisen jälkeen. (Suominen ym. 2013, 166–168.)

Reaaliaikaisen PCR:n alalla on viime vuosina kehitetty useita erilaisia sovelluksia. Klassisen TaqMan-menetelmän lisäksi on otettu käyttöön esimerkiksi Molecular Beacons, Scorpions, HybProbes, Hybeacons ja monia muita menetelmiä. Näille kaikille yhteistä on fluoresenssin lisääntymisen mittaaminen reaaliajassa sekä tarve käyttää fluoresenssilla leimattua koetinta. Yksi reaaliaikaisen PCR:n sovellus on Mediator Probe-PCR. (Biomers.net 2024.)

3.3.2 MP-PCR

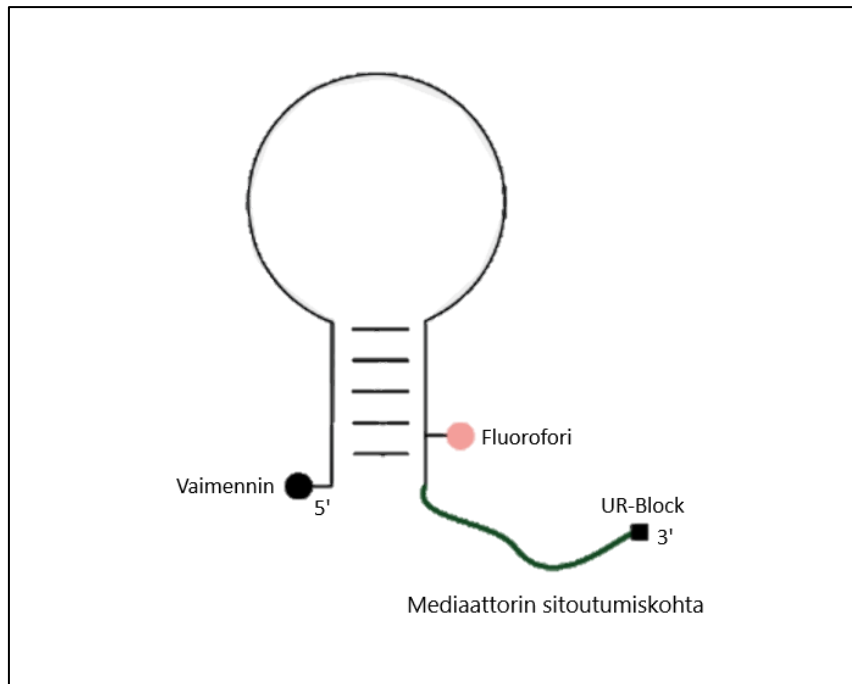
Mediator Probe PCR (MP-PCR) on reaaliaikainen PCR-tekniikka, joka mahdollistaa erittäin herkän ja selektiivisen nukleiinihappojen osoittamisen. MP-PCR käyttää DNA:n havaitsemiseen leimaamattomia välittäjäkoettimia ja fluoresenssisignaalin tuottamiseen universaaleja reporttereita. (Biomers.net 2024.)

Kuten RT-PCR:ssä, kohdesekvenssi monistuu alukkeiden avulla ja PCR:n kulkua voidaan seurata fluoresenssin lisääntymisen myötä. Tätä tarkoitusta varten välittäjäkoetin liittyy eli hybridisoituu erityisellä osalla kohdesekvenssiin. Välittäjäkoetin (engl. Mediator Probe) on leimaamaton oligonukleotidi, jonka pituus on noin 40–50 nukleotidia. Sekvenssin 3'-päässä on MP-Block, joka estää juosteen pidentymisen PCR:n aikana. 3'-pää on spesifinen monistettavalle kohteelle ja sekvenssin toinen pää, 5'-pää, jossa mediaattori sijaitsee, on yhteensopiva universaalin reportterin kanssa. Välittäjäkoettimen rakenne on piirrettynä kuvassa 1. (Biomers.net 2024.)



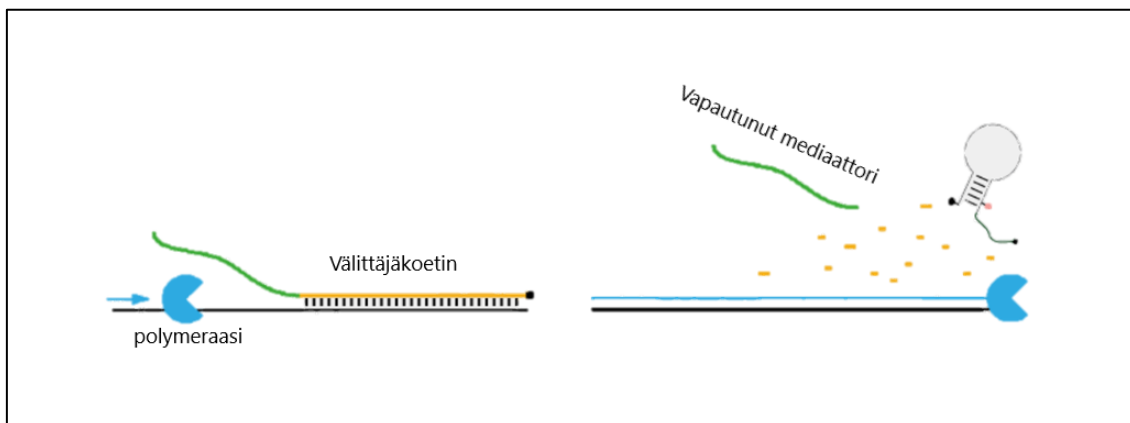
Kuva 1: Välittäjäkoetin (mukaillen Biomers.net 2024).

Universaali reportteri on koetin, joka on hiuspinnirakenteinen (molecular beacon) sisältäen pääty-silmukan ja kaksi vartta (Suominen ym. 2013, 160; Biomers.net 2024). Universaalilla reportterilla on pidennetty 3'-pää, joka mahdollistaa komplementaarisen mediaattorin liittymisen. Universaalin reportterin rungossa on fluoresoiva väriaine, joka on suunnattu vastakkain 5'-pään vaimentajamolekyylin (engl. quencher) kanssa, jolloin universaali reportteri ei fluoresoi sulkeutuneena. Universaalin reportterin 3'-päässä on estomodifikaatio, UR-Block, joka estää sen pidentymisen PCR aikana. (Biomers.net 2024.) Universaalin reportterin rakenne on hahmoteltuna kuvassa 2.



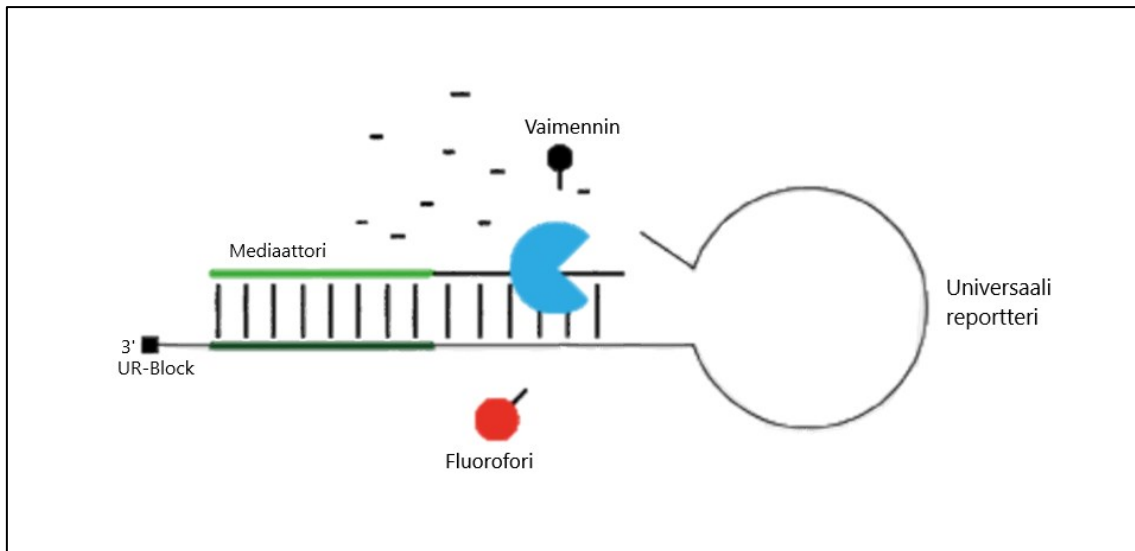
Kuva 2: Universaali reporteri (Mukaillen: *Biomers.net* 2024).

Monistusvaiheen aikana polymeraasi irrottaa roikkuvan mediaattorin kokonaisena. Tämän jälkeen hybridisoitunut välittäjäkoettimen 3'-osa pilkkoontuu samalla, kun polymeraasi syntetisoi vastakkaisen juosteen (ks. kuva 3). (*Biomers.net* 2024.)



Kuva 3: Polymeraasi monistaa kohdesekvenssin ja irrottaa roikkuvan mediaattorin (Mukaillen *Biomers.net* 2024).

Vapautunut mediaattori voi aktivoida universaalin reportterin sitoutumalla sen yksijuosteiseen 3'-päähän ja täten jatkaa polymeraasiaktiivisuutta. Tämän seurauksena fluorofori ja vaimennin erka-nevat toisistaan ja lisääntynyt fluoresenssi voidaan havaita. (*Biomers.net* 2024.) Tämä tapahtuma on kuvailtu piirroksena kuvassa 4.



Kuva 4: Fluorofori ja vaimennin erkanevat toisistaan, jolloin fluoresenssi voidaan havaita (Mukaillen Bio-mers.net 2024).

MP-PCR-menetelmässä universaalia reportteria voidaan käyttää erilaisissa määityksissä. Vain alukkeet ja leimaamaton välittäjäkoetin on suunniteltava yksilöllisesti haluttua tunnistusta varten. (Biomers.net 2024.)

3.4 Aiemmat tutkimukset

IDH-mutaatioita on tutkittu jo aiemmin käyttäen glioomapotilaiden FFPE-näytteitä. Tutkimuksessa on validoitu kvalitatiivinen RT-PCR-määitys ja tutkimuksessa oli mukana 51 FFPE-näytettä. Tutkimuksen tavoitteena oli arvioida RT-PCR-määityksen lisäämistä testausalgoritmiin. Saatuja tuloksia on verrattu immunohistokemian tuloksiin sekä sekvensointiin. Näiden tutkimusten välinen vastaavuus oli 100 %. RT-PCR:n ja sekvensoinnin välillä havaittiin 100 % yhdenmukaisuus IDH1-mutaatioiden havaitsemiseksi. Tutkimuksessa RT-PCR ja immunohistokemia osoittivat IDH1 R132H:lle yhteensopivia tuloksia yhteensä 11:lle 12:sta mutaationäytteestä. Yksi näyte oli R132H-negatiivinen immunohistokemiassa, mutta R132H-variantti havaittiin sekä PCR:llä että sekvensointipaneelilla. Lisäksi neljä mutaatioposiitivista näytettä, joita immunohistokemia ei kykene havaitsemaan, tunnistettiin muilla menetelmillä. Tutkimuksen johtopäätöksenä oli, että RT-PCR-määitys voidaan luotettavasti suorittaa FFPE-näytteille ja sitä voidaan käyttää kliinisesti glioomapotilaiden IDH-mutaatiostatuksen määrittämiseen. (Nelson ym. 2023.)

Toisessa tutkimuksessa, joka on suoritettu vuonna 2014, on validoitu reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR-määritys havaitsemalla IDH1 R132H-mutaatiota ja 11 muuta harvinaisempaa IDH1- tai IDH2-mutaatiota glioomapotilaiden FFPE-näytteistä. Menetelmän suorituskkyä on verrattu immunohistokemiaan ja Sanger-sekvensointiin. PCR:n herkkyys mutaatioiden tunnistamiselle oli verrattain korkea. Määrityksen suorituskky validoitiin 171 näytteestä, joista 146 onnistuttiin uuttamaan. IDH1/2-mutaatiostatus oli saatu 91 % tapauksista onnistuneesti PCR-testillä. Yliopistollisista tutkimuskeskuksista peräisin olevat näytteet olivat onnistuneet 100 %, ja kaupallisista näytteissä onnistumisprosentti oli 70 %. Yhtä lukuun ottamatta kaikki immunohistokemia-positiiviset IDH1 R132H-tapaukset havaittiin PCR:llä. Immunohistokemian negatiivisista tapauksista PCR havaitsi 12 muuta harvinaista mutaatiota: 10 IDH1-mutaatiota ja 2 IDH2-mutaatioita. Tutkimuksessa pääteltiin PCR-määrityksellä olevan korkea onnistumisprosentti ja sen olevan herkempi kuin Sangerin sekvensointi. Positiivinen vastaavuus oli 98 % immunohistokemian kanssa IDH1 R132H:ta havaitsemiseksi ja 100 % sekvensoinnin kanssa. Artikkelin mukaan PCR-määritys voidaan suorittaa luotettavasti FFPE-näytteillä ja se on nopeampi kuin käytössä olevat menetelmät. (Catteau ym. 2014.)

Gondim ym. (2019) kirjoittamassa artikkelissa arvioitiin immunohistokemian IDH1-R132H-vasta-ainetta IDH-mutaatiostatuksen määrittämiseksi ja tulosta verrattiin PCR:ään, joka pystyy havaitsemaan useampia IDH1- tai IDH2-mutaatioita. IDH-mutaatio löytyi immunohistokemian menetelmällä 12 tapauksesta ja PCR-menetelmällä 15 tapauksesta. R132H-vasta-aineella oli korkea spesifisyys, sillä se oli 100 % ja sen herkkyys oli 80 %. Poikkeavat tulokset olivat 3 väärää negatiivista tulosta. (Gondim ym. 2019.)

4 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on suorittaa molekyylipatologian menetelmällä testausajot formaliinifikoituista parafiinileikkeistä testaten IDH-mutaatioita glioomapotilaiden näytteistä. Opinnäytetyön tavoitteena on arvioida molekyylipatologian menetelmän hyödynnettävyyttä IDH-mutaatioissa selvittämällä menetelmän toimivuutta ja vertailemalla tulosten vastaavuutta immunohistokemian menetelmään. Tällä hetkellä OYS patologian osastolla ei tutkita IDH1-2-mutaatiota molekyylipatologian menetelmällä. Tässä opinnäytetyössä IDH-1- ja IDH-2-mutaatioita tutkitaan glioomapotilaiden FFPE-näytteistä käyttäen Idylla IDH1-2-mutaatiomäärityskasetteja.

Laatutavoitteena on onnistua kaikissa tutkimuksen vaiheissa ja siten tuottaa luotettavia tuloksia noudattaen tarkasti menetelmäohjeita, jotta opinnäytetyössä saatuja tuloksia voidaan käyttää OYS patologian osastolla arvioitaessa uuden menetelmän käyttöönottoa. Tästä opinnäytetyöstä saatujen tulosten avulla menetelmää voidaan mahdollisesti käyttää osana glioomapotilaiden syöpädiagnostiikkaa.

Opinnäytetyön tutkimuskysymykset ovat:

1. Voiko etsittävän mutaation havaita MP-PCR-tekniikkaa käyttämällä?
2. Onko molekyylipatologian menetelmän tulos yhtenevä immunohistokemian menetelmän tuloksen kanssa?
3. Onko uusi menetelmä käyttökelpoinen vaihtoehto gliomien diagnostiikassa?

Tutkimuksen tuloksia voi käyttää toimeksiantajaorganisaation tutkimusmenetelmien kehittämiseen. Opinnäytetyö lisää myös ammattitaitoni kehittymistä, sillä tutustun opinnäytetyötä tehdessä molekyylipatologian laboratorion toimintatapoihin, Idylla-laitteen käyttöön sekä syvennän osaamistani PCR:stä. Lisäksi tämän opinnäytetyön tuloksia hyödynnetään osana kansainvälistä monikeskustutkimusta yhteistyössä Biocartiksen kanssa.

5 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

Opinnäytetyön toiminnallinen osa jakaantui alkuvalmisteluihin, laboratoriotyöskentelyyn, tulosten raportointiin sekä menetelmän arviointiin. Näytteinä käytettiin glioomapotilaiden FFPE-näytteitä, jotka olivat läpikäyneet normaalin histologisen kudosprosessin. Tarkoituksena oli ajaa näytteet molekyylipatologian Idylla-järjestelmässä ja verrata tuloksia immunohistokemiasta saatuihin tuloksiin.

5.1 Opinnäytetyön toteutustapa

Opinnäytetyön tulee olla työelämälähtöinen, tutkimuksellisella asenteella toteutettu, käytännönläheinen ja alan tietojen hallintaa osoittava. Toteutustavaksi valikoitui toiminnallinen opinnäytetyö, joka on kokonaisuutena kaksiosainen ja koostuu käytännön toteutuksesta ja toteutuksen kirjallisesta raportoinnista. (Vilka & Airaksinen 2004, 10.) Toiminnallinen opinnäytetyö on yksi tutkimuksellisen kehittämisen tapa. Se on kehittämistyötä, jossa tutkimuksen ajattelutapa ja tutkimuskäytännöt palvelevat ammatillista kehittämistä. Pelkkä kehittämistyö ei riitä, vaan sen lisäksi tekijä kirjoittaa toteuttamisprosessista itsensä asiantuntijaksi. (Kostamo, Airaksinen & Vilka 2022, 8.)

Opinnäytetyössä saatuja tuloksia tarkasteltiin laadullisin keinoin. Laadullisessa eli kvalitatiivisessa lähestymistavassa pyrittiin hankkimaan kokonaisvaltaista tietoa tutkittavasta kohteesta. Tutkittava aineisto koottiin luonnollisessa, todellisessa tilanteessa. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2013, 161, 164). Työn pääkohtia olivat aineiston käsittely sekä tuloksista raportointi ymmärrettävällä ja asiaa valaisevalla kokonaisuudella. Tutkimuksen pääpaino oli saavutetuilla tuloksilla, joten raportoidessa tuotiin esille erityisesti ne vaiheet, jossa tulokset saavutettiin. (Pitkäranta 2014, 109–110, 118.)

5.2 Alkuvalmistelut

Kun opinnäytetyönsuunnitelma valmistui, alettiin kokoamaan yhteen käytettäviä näytteitä. Patologian osastolla oli arkistoituna näytteitä, jotka mahdollisesti sopivat tutkimukseen. Nämä oli listattu siten, että listaukseen oli valikoitu vuosien 2020–2023 glioomanäytteet, joista oli tiedossa immunohistokemian IDH1-värjäystulos. Listauksessa olevia näytteitä oli yhteensä 51 kappaletta.

Blokkiarkistosta haettiin FFPE-blokit ja lasiarkistosta etsittiin näytteistä jo aiemmin tehdyt näytelaseit. Kun materiaali oli koottu, tarkistettiin näytteen IDH-status. 27 kpl näytteistä oli IDH-positiivisia ja 24 kpl IDH-negatiivisia. Kerätty materiaali käytiin ensin läpi sairaalasolubiologin kanssa. Tässä vaiheessa laseihin merkattiin mahdollinen näytealue, sillä tutkittava materiaali voi olla koko kudosta tai vain osa kudoksesta. (Biocartis 2023). Samalla tarkistettiin, että blokeissa oli tarpeeksi näytemateriaalia jäljellä ja että näytteessä oli tarpeeksi soluja mutaation havaitsemiseksi. Tässä vaiheessa listauksesta putosi useampi näyte pois. Tarkemmin käsiteltäväksi valittiin 14 IDH-positiivista ja 14 IDH-negatiivista, jotka vastuupatologi kävi lävitse. Hän tarkasti mutaatioalueen sekä merkkasi laseille tuumoriprosentin. Näytevaatimuksena tutkimukseen on $\geq 10\%$ tuumorisoluja (Biocartis 2023). Mukaan menetelmän testaukseen valikoitui yhteensä 15 blokkia, joista 11 oli IDH1-positiivista, 3 IDH1-negatiivista sekä 1 blokki, josta oli tiedossa muualta saatu IDH2-positiivinen tulos.

5.3 Työvaiheet

Patologian osastolla on molekyyli tutkimuksille varattuna erillinen huone, jossa PCR-tutkimukset tehdään. Ennen aloitusta käytettävät tasot ja välineet sekä mikrotomi desinfioitiin, jotta tutkimus voitiin toteuttaa aseptisesti. Kaikki tarvittavat välineet otettiin esille ja niiden riittävyys varmistettiin. Alukepullo otettiin sulamaan pakastimesta vähintään 10 minuuttia ennen käyttöä. Näytelaseista katsottiin tuumorialue ja blokeista rajattiin tutkittava alue tuumorialueen mukaan. Laseilla luki tuumoriprosentti, jonka mukaan laskettiin tutkimuksessa käytettävien leikkeiden määrä. (Biocartis 2023). Leikkeet leikattiin erillisellä mikrotomilla käyttäen aseptisiä työskentelytapoja ja ne siirrettiin steriileillä pinseteillä PCR-tutkimuksiin tarkoitettuun Eppendorf-putkiin.

Opinnäytetyö toteutettiin Biocartiksen Idylla-molekyyli diagnostiikkajärjestelmää käyttäen. Koneelle kirjaututtiin henkilökohtaisilla tunnuksilla. Laitteelle skannattiin käytettävän kasetin ja alukepullon koodi, jolloin kone tunnisti ennalta määritellyn ajo-ohjelman. Kasetin päälle kirjoitettiin näytteen tunnistenumero jo siitäkin syystä, jos ei ole itse ottamassa kasettia pois laitteelta.

Kertakäyttöiset käsiineet vaihdettiin ennen tutkimuspöydälle siirtymistä. Filteripapereita kostutettiin hieman steriileillä pinseteillä nukleasivapaassa vedessä ja asetettiin Superfrost-plus lasille. Toisen filteripaperin päälle asetettiin tarvittava määrä parafiinileikkeitä ja niiden päälle toinen filteripaperi. Näin saatiin ”sandwich”. Alukepullo käytettiin ensin Vortex-sekoittajassa 5 sekuntia, sitten

mikrosentrifuugissa 15 sekuntia. Vortex-käsittely sekoittaa alukepullon ainesosat ja mikrosentrifuugilla saadaan mahdollisesti korkkiin tarttuneet tipat pullon pohjalle pipetoitavaksi. Käsittelyn jälkeen alukkeita pipetoitiin 50 µl kasetin hajotuskammioon ja samaan koloon vietiin sandwich koskematta pinseteillä muualle. Pinsettejä säilytettiin kontaminaation välttämiseksi 70 % alkoholiliuoksessa ja niiden annettiin kuivua ennen käyttöä. Kasetti laitettiin koneeseen heti sen valmistuttua ja ajo kesti noin 95 minuuttia (Biocartis 2023). Mikrotomi ja käytettävät tasot oli tärkeä desinfioida ennen seuraavan näytteen käsittelyä.

6 TUTKIMUSTULOKSET

Opinnäytetyö suoritettiin käyttäen valmistajan menetelmäohjeita ja kuvallisia työohjeita (ks. liite 1) (Biocartis 2023; Biocartis NV). Tutkimuksessa oli mukana OYS patologian laboratorion näytteitä, jotka olivat käyneet läpi tavanomaisen fiksaatio- ja kudokäsittelyn. Kun opinnäytetyön tulokset valmistuivat, niitä verrattiin immunohistokemian tuloksiin.

Opinnäytetyön ensimmäisenä tutkimuskysymyksenä oli selvittää, voiko etsittävän mutaation havaita käyttämällä MP-PCR-menetelmää ja toisena tutkimuskysymyksenä haluttiin saada vastaus sille, oliko molekyylipatologian menetelmän tulos yhtenevä immunohistokemian menetelmän kanssa. Saaduissa tuloksissa molekyylipatologian menetelmä havaitsi mutaation ja osoitti kaikille tutkimuksessa mukana olleille näytteille immunohistokemian kanssa yhteensopivia tuloksia: yhteensä 11 näytteelle IDH1 kodonissa 132, yhdelle näytteelle IDH2 kodonissa 172 sekä kolmelle IDH-negatiiviselle näytteelle. Opinnäytetyön tulokset on esitetty liitteenä olevassa taulukossa 1. Saadut tulokset osoittavat, että vastaavuus molekyylipatologian ja immunohistokemian menetelmässä oli 100 %. Yhdestäkään RT-PCR ajosta ei tullut väärää positiivisia tuloksia, mikä osoitti 100 %:n spesifisyyden testattavalle menetelmälle. Näistä tuloksista voitiin päätellä vastaus opinnäytetyön kolmanteen tutkimuskysymykseen toteamalla, että uusi menetelmä on käyttökelpoinen vaihtoehto gliomien diagnostiikassa. Tämä opinnäytetyö oli samalla osa kansainvälistä monikeskustutkimusta yhteistyössä Biocartiksen kanssa ja tutkimuksen tulokset tullaan julkaisemaan tieteellisessä vertaisarvioidussa julkaisusarjassa.

Opinnäytetyön lisätutkimuksissa päästiin testailemaan kasetin rajoja ajamalla laitteessa näytteitä, joissa oli joko valmistajan suosituksia pienempi tuumoriprosentti tai pienempi näytemäärä. Myös sellainen näyte uudelleenajettiin, joka oli antanut raporttiin korkean Cq-arvon käyttämällä suurempaa näytemäärää. Lisätutkimukset löytyvät liitteessä olevassa taulukossa 2.

Cq-arvon ollessa korkea, tulee tuloksiin huomautus, ettei testi ole välttämättä havainnut mutaatioita näytteistä, joissa on matala mutaatio-osuus. Tällaisen huomion saanutta näytettä kokeiltiin ajaa uudelleen käyttämällä valmistajan hyväksymää maksiminäytemäärää. (ks. liite 3, näyte 19). Kyseisestä näytteestä oli jo ensimmäisessä ajossa löytynyt tiedossa oleva IDH1-mutaatio. Leikkeen määrän lisääminen vaikutti Cq-arvoon, vaikka huomio ei täysin poistunut. Näytemäärää lisätessä Cq-arvo pieneni miltei yhden pisteen verran. Ensimmäinen ajo oli suoritettu käyttäen yhtä leikettä,

joten uudelleen ajettavan näytteen määrä kolminkertaistettiin. DNA:n määrä oli siis riittävä ja tuumorisolujakin näytteessä oli runsaasti, josta voi päätellä, että DNA:n laatu oli tässä tapauksessa todennäköisesti häiritsevä tekijänä. DNA voi olla pilkkoutunutta esimerkiksi formaliinifiksaation takia, jolloin näytteessä voi olla inhiboivana tekijänä formaliinijäämiä tai jotain muuta, joka pääsee vaikuttamaan PCR-reaktioon.

Ongelmia mutaation havaitsemisessa ilmeni vasta testattaessa valmistajan suosituksia pienempiä näytemääriä. Kasetti ajettiin käyttäen vain puolta vaaditusta näytemäärästä, jolloin tiedossa oleva mutaatio löytyi (ks. liite 3, näyte 16). Vähentäessä määrää tästä vielä puolella, ei mutaatiota enää havaittu ja myös Cq-arvo oli korkea (ks. liite 3, näyte 17). Idylla™ Explore-ohjelmasta päästiin katsomaan kyseisen ajon mutaatiokäyriä, joista oli nähtävissä mutaation kohdalla selvää nousua, mutta mutaatio ei ollut ehtinyt monistua tarvittavaa määrää rajallisten PCR-syklien aikana, jotta mutaation olisi voinut havaita. Tästä voi päätellä, että näytteen vähäinen määrä oli tässä tapauksessa vaikuttavana tekijänä. Näytteiden 16 ja 17 kohdalla ei näyttäisi olevan PCR-reaktioita inhiboivia tekijöitä, sillä suuremmilla näytemäärillä Cq-arvo oli selvästi pienempi. Mikäli mutaatio-DNA:ta ei ole tarpeeksi näytteessä, näyttäisi siltä, että ajossa käytettävää materiaalia tulee olla enemmän.

Valmistajan ohjeissa on näytevaatimuksena vähintään 10 % tuumorisoluja. Lisätestauksia tehdessä saatiin IDH-positiivinen tulos näytteestä, jossa oli vain 5 % tuumorisoluja (ks. liite 3, näyte 18). Kyseessä oli kohtalaisen suurikokoinen näyte, josta voi päätellä sen, että ainakin suurikokoisista näytteistä voi mutaation havaita, vaikka tuumorisoluprosentti olisi vaadittua pienempi.

6.1 Johtopäätökset

Yhteenvedona opinnäytetyössä saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että RT-PCR-menetelmää voi luotettavasti käyttää FFPE-näytteillä. Noudatettaessa valmistajan antamia ohjeita, tätä menetelmää voidaan hyödyntää osana glioomapotilaiden diagnostiikkaa. Mutaatio oli havaittavissa MP-PCR-tekniikkaa käyttämällä. Opinnäytetyö auttoi OYS patologian yksikköä laajentamaan molekyylipatologian tutkimusvalikoimaansa ja tarkentamaan syöpädiagnostiikkaansa.

PCR-reaktioissa oli nähtävissä selvästi näytekohtaisia eroja. Toiset näytteet monistuivat heikosti DNA:n määrästä huolimatta eikä määrän lisäys juuri vaikuttanut tuloksen Cq-arvoon. Toisissa näytteissä DNA:n laadun sijaan DNA:n määrä oli selvästi vaikuttavana tekijänä, sillä näytemäärää lisätessä myös Cq-arvo pieneni. Tässä opinnäytetyössä oli suhteellisen suurikokoisia näytteitä, joista mutaatio löytyi hyvin ja näytemäärän suhteen oli helppo noudattaa valmistajan ohjeistuksia. Mikäli kudospala olisi pieni, tulisi käyttää maksimileikemäärää, jotta DNA-mutaatioiden havaitseminen ei jäisi ainakaan vähäisestä näytemäärästä kiinni. Ongelmia saattaa ilmaantua kudospalan ollessa erittäin pieni. Esimerkiksi paksuneulanäytteissä saattaa olla tilanne, että näytteessä kaikki solut eivät välttämättä ole tuumorisoluja, joka haastaa laitteen mutaatioidenhavaitsemiskyvyn.

6.2 Luotettavuuden arviointi

Luotettavuuden arviointi tässä opinnäytetyössä kohdistui aineiston analyysiin, tutkimuksen vertailukelpoisuuteen sekä raportointiin. Luotettavuutta lisäsi käytetty lähdekirjallisuus ja käytettävät menetelmäohjeet, joiden perusteella työ tehtiin. (Hirsjärvi ym. 2013, 188–189.) Molekyylipatologian menetelmässä käytettiin laitevalmistajan luomia käyttöohjeita. Opinnäytetyön tietopohjana käytettiin mahdollisimman tuoretta kirjallisuutta ja tieteellisiä artikkeleita. Tietoa pyrittiin kokoamaan monesta lähteestä käyttäen kansainvälisiä ja kotimaisia lähdeaineistoja mahdollisimman laajan kokonaiskuvan saamiseksi. Jotta saatuihin tuloksiin voi luottaa, tuli omaa osaamista arvioida opinnäytetyön jokaisessa vaiheessa. Tutkimuksen luotettavuuteen vaikutti myös hyvä ennakointi, jolloin opinnäytetyön prosessi ja toiminnallinen osa tuli suunnitella hyvin etukäteen, jotta tulokset valmistuivat luotettavasti ja aikataulussa.

Opinnäytetyön raportoinnissa noudatettiin tieteelliselle tutkimukselle asetettuja vaatimuksia. Opinnäytetyöhön liittyvät vastuut ja velvollisuudet olivat tiedossa ennen menetelmän testausta. Tietoa hankittiin tieteellisten tutkimusten kriteerien mukaisesti ja tiedonlähteet arvioitiin kriittisesti. Tietolähteinä käytettiin koulutuksen materiaalia, OYS patologian osaston materiaalia, kirjoja sekä artikkeleita. Tuloksia julkaistaessa ja esittäessä noudatettiin tieteellisen tiedon luonteeseen kuuluvaa avoimuutta. (Hirsjärvi ym. 2013, 24.)

6.3 Korkea Cq-arvo

Raporteissa osaan tuloksista tuli korkea Cq-arvo, jonka syitä pohdittiin. Pohdinnan alla oli, että voisiko korkea Cq-arvo johtua esimerkiksi pipeteistä tai pipetoinnista. Asia tarkistettiin ja selvisi, että pipetit kalibroidaan keskimäärin kerran vuodessa. Lisäksi työssä käytetyt pipetit olivat olleet molekyylipatologian laboratoriossa vain vähällä käytöllä, joten uudelleenkalibroinnin tarvetta ei ollut. Jos pipetointimäärä olisi ollut virheellinen tai pipetoitava neste olisi pipetoitu esimerkiksi kasetin hajotuskammion reunoille, josta neste ei pääsisi osaksi reaktiota, olisi ongelmia ollut todennäköisesti jo mutaatioiden havaitsemisessa. Pipetoitaessa noudatettiin kuitenkin huolellisuutta ja tarkkuutta.

Opinnäytetyö oli OYS patologian ensimmäinen Idylla™ FLEX-teknologiaan perustuva tutkimus, jossa alukkeet pipetoidaan kasettiin ennen ajoa. Alukepulloille tuli näissä tutkimuksissa noin kaksi jäädytys-sulatus-sykliä. Pohdittiin, voisiko esille tulleet korkeat Cq-arvot johtua näistä jäädytys-sulatussykleistä. Asiaa selvittäessä tuli ilmi, että alukepullo kestää useamman jäädytys-sulatussyklin, joten tällä syklimäärällä ei pitäisi olla minkäänlaista vaikutusta. Mikäli nämä syklit olisivat vaikuttaneet alukkeisiin, olisi se vaikuttanut muihinkin ajoihin. Korkeita Cq-arvoja oli vain osassa ajoja.

Korkea Cq-arvo ei voinut olla myöskään laitteesta tai kasetista johtuva, sillä Idylla IDH1-2-kaseteissa on tulosten luotettavuutta mittaava integroitu kontrollinäyte ja itse Idylla-laitteen tulisi pysyä ajokunnossa vuosihuoltojen välillä. Laitte antaa tiedon jokaisen ajon onnistumisesta ja ilmoittaa, mikäli esimerkiksi näytemäärä on vähäinen. Mikäli Idylla-laitte ei olisi ajokunnossa tai huoltoa ei olisi tehty, se näkyisi sisäisissä kontrolleissa ja suurempina ongelmina, kuin pelkkänä Cq-arvon nousuna. Mikäli analyysikasetin tuotannossa olisi ollut laatuviika, olisi se tullut ilmi kaikissa saman erän kaseteissa. Näin ei kuitenkaan ollut ja kasettien sisäiset kontrollit menivät läpi. Cq-arvon nousu ei johtunut siis tekijästä, laitteesta tai välineistä. Aiemmin tehdyt päätelmät vahvistuivat siitä, että korkeampi Cq-arvo johtui DNA:n vähäisestä määrästä tai DNA:n laatuongelmasta.

6.4 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Opinnäytetyössä noudatettiin eettisesti hyvän tutkimuksen edellyttämiä hyviä tieteellisiä käytäntöjä. Tämän opinnäytetyön tärkeitä eettisyyden mittareita olivat rehellisyys, huolellisuus sekä tarkkuus läpi prosessin; laboratoriotyöskentelyssä, tulosten käsittelyssä ja arvioinnissa sekä raporttia

esittäessä. (Hirsjärvi ym. 2013, 23–24; Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023, 3, 11.) Opinnäytetyön eettiset kysymykset liittyivät tutkimuksen jokaiseen vaiheeseen aiheenvalinnasta tutkimustulosten julkaisuun (Vuori 2023).

Tässä opinnäytetyössä eettisiä näkökohtia tarkasteltiin lähinnä näyttemateriaalien osalta. Opinnäytetyön materiaali koostui patologian osaston glioomanäytteistä, joten opinnäytetyötä varten tehtiin lupahakemus, jonka allekirjoittaneet sitoutuivat noudattamaan salassapitovelvollisuutta ja käsittelemään tietoja asianmukaisesti tietoturvallisuustoimenpiteet huomioiden. Tutkimustuloksissa ei näkynyt henkilötietoja eikä niitä lähetetty eteenpäin raportoituessa menetelmän tuloksia. (Vuori 2023.) Tutkimukset ajettiin käyttäen näytenumeroita, joista ei voitu tunnistaa potilaiden henkilöllisyyttä. Opinnäytetyön raporttiin näytteet merkittiin järjestysnumeroa käyttäen yksilönsuojan säilyttämiseksi. Tulosten raportoinnin jälkeen kaikki opinnäytetyössä käytetyt lomakkeet on hävitetty tietosuojajätteenä.

7 POHDINTA

Opinnäytetyö eteni suunnitellussa aikataulussa ja sain toimitettua tulokset opinnäytetyön toimeksiantajalle sovitussa aikataulussa. Opinnäytetyöllä oli merkitystä sekä omalle ammatilliselle kasvuleni että toimeksiantajalle. Laatutavoite täyttyi, sillä jokainen tutkimuksen vaihe onnistui ja tuloksena saatiin luotettavia tuloksia. Opinnäytetyön tulokset olivat samassa linjassa aiempien tutkimusten kanssa (Nelson ym. 2013; Gondim ym. 2019).

Prosessin aikana sain vastaukset opinnäytetyön tutkimuskysymyksiin. Opinnäytetyössä käytettävä näytemäärä (15 kpl) oli otoskooltaan tyydyttävä. Tämän suuruudessa tutkimuksessa päästiin jo tarkastelemaan menetelmän herkkyyttä ja tarkkuutta. Opinnäytetyön tulokset osoittivat, että molekyylipatologian menetelmässä oli suuri herkkyys. Jokaisessa ajetussa näytteessä mutaatio havaittiin tiedossa olevan mukaisesti. Etsittävän mutaation pystyi havaitsemaan MP-PCR-tekniikkaa käyttämällä ja saadut tulokset olivat täysin vastaavia immunohistokemian tulosten kanssa. Koska yhdestäkään RT-PCR ajosta ei tullut vääriä positiivisia tuloksia, osoitti se suurta menetelmän tarkkuutta.

Molekyylipatologian menetelmä on käyttökelpoinen vaihtoehto gliomien diagnostiikassa, sillä immunohistokemian menetelmällä voidaan havaita IDH1-mutaatio, mutta Idylla-järjestelmä kykenee löytämään IDH1-mutaation lisäksi myös IDH2-mutaatioita. Saatujen tulosten perusteella toimeksiantaja suurella todennäköisyydellä ottaa tutkimuksessa käytetyn menetelmän kliiniseen käyttöön.

Omaa ammatillista kasvuani tarkastellessa opin kokonaan uuden PCR-tekniikan sekä molekyylipatologian laboratorion toimintatavat. Idylla-laitteen käyttö tuli erittäin tutuksi ja oman alan sanaston ymmärrys ja osaaminen koheni huomattavasti. Bioanalyytikon alaa koskevaa tietoa on usein englanniksi enemmän saatavilla, joten englannin kielen kehittyminen on ammatillisen kasvun kannalta ainoastaan positiivista.

Sain harjoitella tarkkaa työskentelyä aseptisesti ja toteuttaa itsenäisesti koko opinnäytetyön prosessin, joka kasvatti vastuunotto kykyäni. Opinnäytetyön toiminnallinen osa suoritettiin OYS patologian osastolla, joka edisti kykyä työskennellä työyhteisössä, mutta silti toimia itsenäisesti. Opinnäytetyön aikana on ollut mahdollisuus hyödyntää molekyylipatologian työntekijöiden ja opinnäytetyön ohjaajien asiantuntijuutta. Teoriatieto karttui ja käytännön osaaminen vahvistui, mikä edistää

työelämään siirtymistä tulevaisuudessa. Työskentelytaitojen lisäksi tietämys molekyylipatologian ja immunohistokemian menetelmistä kehittyi. Etenkin oma osaamiseni PCR:stä syventyi.

Opinnäytetyön ohessa tehdyt lisätestaukset muodostuivat tärkeäksi osaksi kokonaisuutta, sillä niistä saatiin lisäarvoa laitteen herkkyydestä ja laite selvästi reagoi näytemäärän vähentämiseen. Opinnäytetyössä oli käytettävissä suhteellisen suurikokoisia näytteitä, mutta välttämättä käytännössä ei näin ole ja juuri siksi muutaman lisätestauksen ajo pienemmillä määrillä oli tärkeää.

Jatkotutkimuksena asteittain näytemäärää pienentämällä saisi selville pienimmän mahdollisen näytemäärän, jolla mutaatio on havaittavissa. Testattaessa tulisi varmistaa, että näytteessä olisi mahdollisimman vähän näytettä inhiboivia tekijöitä. Mielenkiinnosta voisi myös kokeilla ajaa laitteella asteittain vanhempia näytteitä selvittääkseen vaikuttaako ajan kuluminen näytteen DNA:n laatuun. Tässä opinnäytetyössä käytetyt näytteet olivat maksimissaan kolme vuotta vanhoja.

Tässä opinnäytetyössä saadun tiedon voisi yhdistää jo käytössä olevien molekyylipatologisten menetelmäohjeiden kanssa samaan paikkaan etenkin, jos IDH1-2-mutaatiomääritystesti otetaan kliiniseen käyttöön. Lisäksi uutta, Idylla FLEX-teknologiaa varten tarvittaisi omat työohjeet, sillä aiemmin käytössä olleissa molekyylipatologian testeissä ei ole kuulunut pipetointia työvaiheisiin. Tämä helpottaisi sitä tilannetta, jos jatkossa tutkitaan Idylla FLEX-teknologialla uusia mutaatioita molekyylipatologian menetelmällä.

LÄHTEET

Atula, Sari 2023. Keskushermoston kasvaimia. Lääkärikirja Duodecim. Terveyskirjasto Duodecim. Hakupäivä 28.11.2023. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00028>.

Bio-Rad 2006. Real-Time PCR Applications Guide. Hakupäivä 17.2.2024. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf.

Biocartis 2023. Idylla IDH1-2 mutation assay kit. User Training. Koulutusmateriaali. Algol Diagnostics. Koulutuspäivä 15.8.2023. Kouluttaja Miika Palviainen.

Biocartis NV 2023. Assay Instructions Idylla™ IDH1-2 mutation assay kit. Käyttöopas. Hakupäivä 1.12.2023. <https://www.biocartis.qarad.eifu.online/BCT/FI/all>. Vaatii käyttöoikeuden.

Biomers.net 2024. Mediator Probe PCR (MP PCR). Hakupäivä 6.1.2024. https://www.biomers.net/en/Products/DNA/Mediator_Probe_PCR.html.

Cadoux-Hudson, Thomas, Schofield, Christopher J. & McCullagh, James S. O. 2021. Isocitrate dehydrogenase gene variants in cancer and their clinical significance. *Biochemical Society Transactions*, 49(6), 2561–2572. Hakupäivä 17.9.2023. <https://doi.org/10.1042/BST20210277>.

Catteau, Aurélie, Girardi, Hélène, Monville, Florence., Poggionovo, Cécile, Carpentier, Sabrina, Frayssinet, Véronique, Voss, Jesse, Jenkins, Robert, Boisselier, Blandine, Mokhtari, Karima, Sanson, Marc, Peyro-Saint-Paul, Hélène & Giannini, Caterina 2014. A new sensitive pcr assay for one-step detection of 12 idh1/2 mutations in glioma. *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1). Hakupäivä 17.9.2023. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-58>.

Flanders.bio 2023. Biocartis announces the launch of the first assay developed with the new Idylla™ Flex Technology. Hakupäivä 14.2.2024. <https://flanders.bio/en/news/biocartis-announces-the-launch-of-the-first-assay-developed-with-the-new-idylla-flex-technology>.

Gondim, Didson D., Gener, Melissa A., Curless, Kendra L., Cohen-Gadol, Aaron A., Hattab, Eyas M. & Cheng, Liang 2019. Determining IDH-Mutational Status in Gliomas Using IDH1-R132H

Antibody and Polymerase Chain Reaction. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 27(10), 722–725 Hakupäivä 3.1.2024. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000702>.

Han, Sue, Liu, Yang, Cai, Sabrina J., Qian, Mingyu, Ding, Jianyi, Larion, Mioara, Gilbert, Mark R. & Yang, Chunzhang 2020. IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *British Journal of Cancer*, 122. Hakupäivä 8.10.2023. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0814-x>.

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

Hirsjärvi, Sirkka, Remes, Pirkko & Sajavaara, Paula 2013. *Tutki ja kirjoita*. 15.–17. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Ivaska, Johanna, Ristimäki, Ari & Mustjoki, Satu 2023. *Syövän synty, kasvu, leviäminen ja syyt, ydinasiat*. Teoksessa *Syöpäsairaudet* (toim. Leppä, Sirpa, Jyrkkiö, Sirkku, Kouri, Mauri, Pasanen, Annika, Pitkäniemi, Janne, Puolakkainen, Pauli & Tenhunen, Olli). Oppiportti. Duodecim. Hakupäivä 25.9.2023. <https://www.oppiportti.fi/op/syt00001/do>. Vaatii käyttöoikeuden.

Jalanko, Anu, Ranki, Marjut & Palotie, Leena 1996. *Geenivirheet ja taudit*. Lääketieteellinen aikakauskirja *Duodecim* 1996; 112 (4). Hakupäivä 5.1.2024. <https://www.duodecimlehti.fi/duo60078>.

Kaikki syövästä 2023. *Aivokasvaimet. Syöpäjärjestöt*. Hakupäivä 21.1.2024. <https://kaikki-syovasta.fi/tietoa-syovasta/syopataudit/aivokasvaimet/>.

Khehra, Nimrat, Padda, Inderbir S. & Swift, Cathi J. 2023. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. National Library of Medicine, StatPearls. Hakupäivä 21.12.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>.

Kostamo, Pipsa, Airaksinen, Tiina & Vilkkä, Hanna 2022. *Kirjoita itsesi asiantuntijaksi: opas toiminnalliseen opinnäytetyöhön*. 2. painos. Helsinki: Art House Oy. Hakupäivä 22.1.2024. Ellibs e-kirja. Vaatii käyttöoikeuden.

Kytölä, Soili, Kankainen, Matti & Ristimäki, Ari 2023. *Molekyyli- ja geenetiikan tutkimusmenetelmät*. Teoksessa *Patologia* (toim. Mäkinen, Markus, Arola, Johanna, Kholová, Ivana, Kronqvist, Pauliina,

Leivo, Ilmo, Mäyränpää, Mikko, Paavonen, Timo, Pohjanen, Vesa-Matti, Rauramaa, Tuomas, Ristimäki, Ari & Sironen, Reijo). Oppiportti Duodecim. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. E-kirja. Hakupäivä 21.1.2024. <https://www.oppoportti.fi/op/pat00899/do>. Vaatii käyttöoikeuden.

Leppäluoto, Juhani, Rintamäki, Hannu, Vakkuri, Olli, Vierimaa, Heidi & Lauri, Timo 2019. Anatomia ja fysiologia: rakenteesta toimintaan. 9. uudistettu painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Lin, An-Ping, Abbas, Saman, Kim, Sang-Woo, Ortega, Manoela, Bouamar, Hakim, Escobedo, Yissela, Varadarajan, Prakash, Qin, Yuejuan, Sudderth, Jessica, Schulz, Eduard, Deutsch, Alexander, Mohan, Sumitra, Ulz, Peter, Neumeister, Peter, Rakheja, Dinesh, Gao, Xiaoli, Hinck, Andrew, Weintraub, Susan T., Deberardinis, Ralph J., Sill, Heinz, Dahia, Patricia L. M. & Aguiar, Ricardo C. T. 2015. D2HGDH regulates alpha-ketoglutarate levels and dioxygenase function by modulating IDH2. *Nature Communications*, 6: 7768. Hakupäivä 11.10.2023. <https://doi.org/10.1038/ncomms8768>.

Louis, David N., Perry, Arie, Wesseling, Pieter, Brat, Daniel J., Cree, Ian A., Figarella-Branger, Dominique, Hawkins, Cynthia, Ng, H. K., Pfister, Stefan M., Reifenberger, Guido, Soffietti, R., von Deimling, Andreas Riccardo & Ellison, David W. 2021. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231-1251. Hakupäivä 27.10.2023. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAB106>.

Mehrjardi, Narges Zare, Hänggi, Daniel & Kahlert, Ulf Dietrich 2020. Current biomarker-associated procedures of cancer modeling-a reference in the context of IDH1 mutant glioma. *Cell Death & Disease* 2020, 11(11). Hakupäivä 26.10.2023. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03196-0>.

Mäenpää, Hanna, Kallio, Merja, Jääskeläinen, Juha E., Kouri, Mauri & Tynnenen Olli 2014. Kesushermoston kasvaimet; Johdanto. Teoksessa *Neurologia* (toim. Soinila, Seppo & Kaste, Markku). Duodecim oppiportti. Hakupäivä 28.9.2023. <https://www.oppoportti.fi/op/neu00064/do>. Vaatii käyttöoikeuden.

Mäkinen, Markus, Carpén, Olli, Kosma, Veli-Matti, Lehto, Veli-Pekka, Paavonen, Timo & Stenbäck, Frej 2012. Patologia. 1.painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Mäkinen, Markus & Suikkanen, Sanna 2023a. Vasta-aineet. Teoksessa Patologia (toim. Mäkinen, Markus, Arola, Johanna, Kholová, Ivana, Kronqvist, Pauliina, Leivo, Ilmo, Mäyränpää, Mikko, Paavonen, Timo, Pohjanen, Vesa-Matti, Ristimäki, Ari, Rauramaa, Tuomas & Sironen, Reijo). Duodecim Oppiportti. Hakupäivä 3.1.2024. <https://www.oppoportti.fi/op/pat00858/do>. Vaatii käyttöoikeuden.

Mäkinen, Markus & Suikkanen, Sanna 2023b. Immunohistokemiallinen diagnostiikan apuvälineenä. Teoksessa Patologia (toim. Mäkinen, Markus, Arola, Johanna, Kholová, Ivana, Kronqvist, Pauliina, Leivo, Ilmo, Mäyränpää, Mikko, Paavonen, Timo, Pohjanen, Vesa-Matti, Ristimäki, Ari, Rauramaa, Tuomas & Sironen, Reijo). Duodecim Oppiportti. Hakupäivä 30.9.2023. <https://www.oppoportti.fi/op/pat00857/do>. Vaatii käyttöoikeuden.

National Library of Medicine 2023. Polymerase Chain Reaction (PCR). Hakupäivä 21.12.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>.

Nelson, Ernest J., Gubbiotti, Maria A., Carlin, Alicia M., Nasrallah, MacLean P., van Deerlin, Viviana M. & Herlihy, Sarah E. 2023. Clinical Evaluation of IDH Mutation Status in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue in Gliomas. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 27 (3). Hakupäivä 16.9.2023. <https://doi.org/10.1007/S40291-022-00638-7>.

Orte, Katri, Vainio, Paula, Mirtti, Tuomas, Taimen, Pekka, Arola, Johanna & Kallajoki, Markku 2021. Molekyylipatologia osana syöpäpotilaan hoitoa. Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim 137 (13). Hakupäivä 23.9.2023. <https://www.duodecimlehti.fi/duo16298>.

Pitkäranta, Ari 2014. Laadullinen tutkimus opinnäytetyönä: työkirja ammattikorkeakouluun. Jokioinen: e-Oppi. Ellibs e-kirja. Hakupäivä 28.9.2023. Vaatii käyttöoikeuden.

Pustchi, Sadaf E., Avci, Naze G., Akay, Yasemin M. & Akay, Metin 2020. Astrocytes Decreased the Sensitivity of Glioblastoma Cells to Temozolomide and Bay 11-7082. *International Journal of Molecular Sciences Article*. Hakupäivä 28.2.2024. <https://doi.org/10.3390/ijms21197154>.

Pärssinen, Raimo, Suominen, Ilari & Haajanen, Kari 2012. Biogeeni: ammatillista biokemiaa ja geenitekniikkaa. 1.painos. Helsinki: Opetushallitus.

Ristimäki, Ari, Kytölä, Soili, Haglund, Caj & Bono Petri 2013. Syöpäpotilaan täsmähoito on moniammatillista yhteistyötä. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 129 (10). Hakupäivä 30.9.2023. <https://www.duodecimlehti.fi/duo10981>.

Seppä, Karri, Tanskanen, Tomas, Heikkinen, Sanna, Malila Nea & Pitkäniemi, Janne 2023. Syöpä 2021: Tilastoraportti Suomen syöpätilanteesta. Suomen Syöpärekisteri. Hakupäivä 4.12.2023. https://syoparekisteri.fi/assets/themes/ssy3/factsheets/syopa_2021_tilastoraportti.html#2_Sy%C3%B6p%C3%A4tilanne_2021.

Suomen Syöpärekisteri 2023. Syöpätilastosovellus. Syöpäjärjestöjen epidemiologinen tutkimuslaitos. Hakupäivä 4.12.2023. <https://syoparekisteri.fi/tilastot/tautitilastot/>.

Suominen, Ilari, Pärssinen, Raimo, Haajanen, Kari & Pelkonen, Jani 2013. Geenitekniikka. 2. korjattu painos. Saarijärvi: Saarijärven Offset Oy.

Terveyskylä 2021a. Gliooman luokittelu. Hakupäivä 3.12.2023. <https://www.terveyskyla.fi/aivotalo/aivosairaudet/aivokasvaimet/aivokasvainten-hoito/erilaiset-aivokasvaimet-ja-niiden-hoito/gliooman-luokittelu>.

Terveyskylä 2021b. Aivokasvainten luokittelu. Hakupäivä 3.12.2023. <https://www.terveyskyla.fi/aivotalo/aivosairaudet/aivokasvaimet/aivokasvainten-luokittelu>.

The Association of Clinical Pathologists 2023. Molecular Pathology. Hakupäivä 28.9.2023. <https://pathologists.org.uk/specialities/molecular-pathology/>.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan julkaisu 2023 (2). 1. painos. Helsinki: Tutkimuseettinen neuvottelukunta. Hakupäivä 21.1.2024. https://tenk.fi/sites/default/files/2023-03/HTK-ohje_2023.pdf.

Tynninen, Olli, Gardberg, Maria & Haapasalo, Hannu 2021. Diffuusi infiltroiva astroosytooma. Teoksessa Patologia (toim. Mäkinen, Markus, Arola, Johanna, Kholová, Ivana, Kronqvist, Pauliina, Leivo, Ilmo, Mäyränpää, Mikko, Paavonen, Timo, Pohjanen, Vesa-Matti, Ristimäki, Ari, Rauramaa,

Tuomas & Sironen, Reijo). Duodecim Oppiportti. Hakupäivä 3.1.2024. <https://www.oppoportti.fi/op/pat00792/do>. Vaatii käyttöoikeuden.

Tynninen, Olli, Gardberg, Maria & Haapasalo, Hannu 2023. Glioomat. Teoksessa Patologia (toim. Mäkinen, Markus, Arola, Johanna, Kholová, Ivana, Kronqvist, Pauliina, Leivo, Ilmo, Mäyränpää, Mikko, Paavonen, Timo, Pohjanen, Vesa-Matti, Ristimäki, Ari, Rauramaa, Tuomas & Sironen, Reijo). Duodecim Oppiportti. Hakupäivä 24.2.2024. <https://www.oppoportti.fi/op/pat00791/do>. Vaatii käyttöoikeuden.

Tynninen, Olli, Haapasalo, Hannu, Kytölä, Soili & Paetau, Anders 2020. Pahanlaatuisuusaste ei yksin riitä – molekyyli tutkimukset tarkentavat gliomien diagnostiikkaa. Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim 136 (10). Hakupäivä 16.9.2023. <https://www.duodecimlehti.fi/duo15599>.

Vilkka, Hanna & Airaksinen, Tiina 2004. Toiminnallinen opinnäytetyö. 2. painos Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Vuori, Jaana 2023. Tutkimusetiikka ihmistieteissä. Tietoarkisto. Hakupäivä 16.9.2023. <https://www.fsd.tuni.fi/fi/palvelut/menetelmaopetus/kvali/tutkimusetiikka/tutkimusetiikka-ihmistieteissa/>.

LIITTEET

Liite 1 Kuvalliset työohjeet

Liite 2 Taulukko 1: Opinnäytetyössä saadut tulokset

Liite 3 Taulukko 2: Kasettien lisätestaukset

Liite 4 Taulukko 3: Havaittavat mutaatiot

Quick Reference Guide

IDH1-2 RUO

FFPE
It is recommended to use maximum 3 FFPE tissue sections
≥ 10% neoplastic cells





1



2



3



4



5



6



7



8



9



10



11



12



13



14



15



16



17



18



19



20



21



22

The physical appearance of products may deviate from their illustrations in this Quick Reference Guide.
Ref: QRG_IDH1-2RUO_FFPE_072023



TAULUKKO 1. Opinnäytetyössä saadut tulokset

Näyte	Tiedossa oleva mutaatiostatus	Vuosi	Tuumori-prosentti	Tutkimustulos	Mediaani-Cq-arvo
1	IDH1-positiivinen	2023	> 50 %	Mutation Detected IDH1 Codon 132	35,3
2	IDH1-positiivinen	2023	80 %	Mutation Detected IDH1 Codon 132	36,9
3	IDH1-positiivinen	2022	> 50 %	Mutation Detected IDH1 Codon 132	32,5
4	IDH1-positiivinen	2022	> 50 %	Mutation Detected IDH1 Codon 132	32,4
5	IDH1-negatiivinen, IDH2-positiivinen	2022	> 50 %	Mutation Detected IDH2 Codon 172	32,8
6	IDH1-negatiivinen	2023	95 %	No Mutation Detected	33,0
7	IDH1-positiivinen	2022	> 50 %	Mutation Detected IDH1 Codon 132	32,1
8	IDH1-positiivinen	2022	90 %	Mutation Detected IDH1 Codon 132	30,9
9	IDH1-negatiivinen	2023	> 50 %	No Mutation Detected	33,1
10	IDH1-positiivinen	2022	50 %	Mutation Detected IDH1 Codon 132	32,8
11	IDH1-positiivinen	2022	> 50 %	Mutation Detected IDH1 Codon 132	35,3
12	IDH1-positiivinen	2022	> 50 %	Mutation Detected IDH1 Codon 132	35,1
13	IDH1-positiivinen	2021	50 %	Mutation Detected IDH1 Codon 132	36,4
14	IDH1-negatiivinen	2022	80 %	No Mutation Detected	33,9
15	IDH1-positiivinen	2021	100 %	Mutation Detected IDH1 Codon 132	32,3

TAULUKKO 1. Kasettien lisätestaukset

Näyte	Tiedossa oleva mutaatiostatus	Vuosi	Tuumori-prosentti	Tulos	Mediaani-Cq-arvo
16	IDH1-positiivinen	2021	50 %	Mutation Detected IDH1 Codon 132	38,2
17	IDH1-positiivinen	2021	50 %	No Mutation Detected	38,3
18	IDH1-positiivinen	2021	5 %	Mutation Detected IDH1 Codon 132	34,0
19	IDH1-positiivinen	2023	80 %	Mutation Detected IDH1 Codon 132	36,2

TAULUKKO 2. Idylla™ IDH1-2-mutaatiomäärityssarjalla havaittavat IDH1- ja IDH2-mutaatiot (Mu-
kaillen Biocartis NV 2023, 7.)

GEENI	KODONI	MUTAATIO	AMINOHAPPOMUUTOS	MUUTOS DNA:SSA
IDH1	132	R132C	p.Arg132Cys	c.394C>T
		R132H	p.Arg132His	c.395G>A
		R132G	p.Arg132Gly	c.394C>G
		R132S	p.Arg132Ser	c.394C>A
		R132L	p.Arg132Leu	c.395G>T
IDH2	140	R140Q	p.Arg140Gln	c.419G>A
		R140L	p.Arg140Leu	c.419G>T
		R140G	p.Arg140Gly	c.418C>G
		R140W	p.Arg140Trp	c.418C>T
	172	R172K	p.Arg172Lys	c.515G>A
		R172M	p.Arg172Met	c.515G>T
		R172G	p.Arg172Gly	c.514A>G
		R172S	p.Arg172Ser	c.516G>T
		R172S	p.Arg172Ser	c.516G>C
		R172W	p.Arg172Trp	c.514A>T