



***PIK3CA*-MUTAATIOANALYYSI**

SYÖPÄDIAGNOSTIIKAN AVUKSI

Maarit Ahtiainen

Opinnäytetyö
Huhtikuu 2015
Bioanalytikkokoulutus

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU
Tampere University of Applied Sciences

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus, Jyväskylä 12SABIOj

MAARIT AHTIAINEN:

PIK3CA-mutaatioanalyysi syöpädiagnostiikan avuksi

Opinnäytetyö 56 sivua, joista liitteitä 4 sivua
Huhtikuu 2015

Syöpä on geneettinen sairaus, minkä vuoksi syöpäkasvaimen geneettisten muutosten tunteminen auttaa kohdennettujen täsmälääkkeiden valinnassa ja hoitovasteen arvioinnissa. Tämän työn tarkoituksena oli kehittää *PIK3CA*-geenin mutaatioanalyysi syöpädiagnostiikkaan soveltuvaksi. *PIK3CA* on PI3K/Akt/mTOR-reaktitiellä keskeisenä tekijänä olevan PI3K-proteiinin katalyyttinen osa. *PIK3CA*-geenin mutaatiot moninkertaistavat PI3K:n aktiivisuuden, jolloin reitin signaalointi ei ole enää riippuvainen reseptoriin sitoutuvasta kasvutekijästä. Reitti säätelee keskeisiä solun toimintoja, kuten jakautumista ja erilaistumista, ja on yksi useimmin mutatoituneista reaktioreiteistä syövässä.

Kehitettävänä olleessa menetelmässä näytteenä on potilaan parafiiniin valetusta kudoksenäytteestä eristetty DNA. DNA:sta monistetaan PCR:llä yleisimmin mutaatioita sisältävät kohdat. *PIK3CA*-geenin somaattisista pistemutaatioista yli 80% sijaitsee eksonin 9 kodoneissa 542 ja 545 ja eksonin 20 kodonissa 1047. Jaksojen monistamisen jälkeen PCR-tuote sekvensoidaan pyrosekvenssointimenetelmällä.

Menetelmän suurimpina haasteina olivat pseudogeenin monistuminen ja kontaminaatioherkkyys. Näihin haasteisiin pyrittiin vastaamaan PCR-alukkeita, olosuhteita ja työtapoja muokkaamalla. Työssä löydettiin PCR-alukkeet, joilla PCR-olosuhteita tiukentamalla päästiin eroon pseudogeenin monistumisesta. Kontaminaatio-ongelmasta PCR:ssä ei päästy kokonaan eroon, mutta huolellisilla työtavoilla kontaminaatio pysyi vähäisenä eikä häirinnyt varsinaisten näytteiden tulosten tulkintaa. Menetelmän herkkyys ja toistettavuus määritettiin mutaatioita sisältävistä standardi-DNA-näytteistä tehdyillä laimennossarjoilla. Menetelmä osoittautui hyvin herkäksi ja toistettavuus oli hyvä. Menetelmä löysi luotettavasti myös tiedossa olleet mutaatiot tutkituista rintasyöpänäytteistä.

Menetelmästä tuli tämän opinnäytetyön myötä käyttökelpoinen ja sitä voidaan jatkossa käyttää Keski-Suomen keskussairaalan patologian osastolla tutkimusnäytteiden analysointiin.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree programme in Biomedical Laboratory Science

MAARIT AHTIAINEN:

The Mutation Analysis of *PIK3CA* for Cancer Diagnostics

Bachelor's thesis 56 pages, appendices 4 pages

April 2015

Cancer is a genetic disease. Therefore, the knowledge of genetic changes in a tumor helps clinicians to tailor the treatment of a patient and predict the clinical response. The purpose of this Bachelor's thesis was to improve the mutation analysis of the *PIK3CA*-gene for a reliable detection of the most common mutations in the gene.

The PI3K/Akt/mTOR-pathway is among the most frequently mutated pathways in human cancer. This pathway regulates several cellular processes, such as cell growth, proliferation and differentiation. *PIK3CA* is the catalytic subunit of PI3K protein, and the mutations in *PIK3CA*-gene multiply the activity of PI3K. This leads to a constitutive activation of the pathway regardless of the growth factor binding into the cell-surface receptor.

In the current method, the sample DNA is first extracted from a tissue sample embedded in paraffin. DNA samples are amplified by using PCR for regions including the most common mutations. These are codons 542 and 545 in exon 9 and codon 1047 in exon 20. These mutations cover ~80% of the somatic point mutations found in the *PIK3CA*-gene. After amplification, a mutation analysis is performed by using pyrosequencing.

The two main challenges in this study were to avoid the pseudogene amplification and to prevent contamination in the PCR reactions. For this purpose, the PCR primers, PCR conditions and the related work operations were modified. Suitable PCR primers were found which together with adjusted PCR conditions excluded the pseudogene amplification. However, the problems with PCR contamination were not totally solved. Fortunately, the level of contamination was sufficiently low to allow the mutation analysis of patient samples. The sensitivity and reproducibility of the method were determined by using dilutions of the reference mutation standards. The method proved to be very sensitive and reproducible. Known mutations were reliably found in previously studied breast cancer samples.

The Bachelor's thesis produced a usable method for mutation analysis of *PIK3CA*. The method can be further used in the Pathology Laboratory of the Central Finland Central Hospital for testing the most common mutations in *PIK3CA*-gene from patients with cancer.

Key words: cancer, genetic testing, *PIK3CA*

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	SYÖVÄN SYNTY	7
3	SYÖVÄN GENETIIKKA	9
	3.1 Onkogeenit.....	10
	3.2 Kasvunrajoitegeenit	10
	3.3 DNA-vaurioita korjaavat geenit.....	11
4	SYÖVÄN GEENIDIAGNOSTIIKKA.....	12
5	TÄSMÄHOIDOT	14
6	PIK3CA	16
	6.1 PI3K-AKT-mTOR-reaktiotie.....	16
	6.2 <i>PIK3CA</i> :n mutaatiot.....	17
	6.3 <i>PIK3CA</i> :n merkitys syövässä	17
7	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE.....	19
8	MENETELMÄT JA MATERIAALIT	20
	8.1 Tutkimusstrategia.....	20
	8.2 Näyttemateriaali	20
	8.3 DNA:n eristys	21
	8.4 Polymeerasiketjureaktio (PCR)	21
	8.5 Pyrosekvensointi	25
9	TYÖN SUORITUS	29
	9.1 Pseudogeenin monistumisen estäminen.....	29
	9.1.1 Uusien PCR-alukkeiden suunnittelu ja testaus	29
	9.1.2 PCR:n olosuhteiden optimointi	30
	9.2 Pyrosekvensoinnin optimointi	31
	9.3 Menetelmän herkkyuden ja toistettavuuden määrittäminen	32
	9.4 Kontaminaatioiden välttäminen	33
	9.5 Menetelmän toimivuus rintasyöpänäytteillä.....	34
10	TULOKSET	35
	10.1 Pseudogeenin monistumisen estäminen.....	35
	10.2 Esimerkkejä mutaatioanalyysin tuloksista.....	36
	10.3 Kontaminaatiot.....	41
	10.4 Menetelmän herkkyys ja toistettavuus.....	42
	10.5 Rintasyöpänäytteiden analysointi	45
11	JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA	46
	11.1 Etiikka ja luotettavuus	46
	11.2 Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset.....	47

LÄHTEET	49
LIITTEET	53
Liite 1. DNA:n eristys	53
Liite 2. Näytteiden valmistelu pyrosekvensointia varten	55

1 JOHDANTO

Syövän varhainen toteaminen on edellytys hyvälle taudin hoidolle ja ennusteelle. Syöpädiagnoosi perustuu useimmiten mikroskooppiseen tutkimukseen, jossa pyritään selvittämään muutoksen pahan- tai hyvänlaatuisuus. Tätä varten kasvain pyritään tyypittämään ja selvittämään sen lähtökudos, levinneisyys ja erilaistumisaste. Morfologinen tutkimus perustuu histokemiallisiin värjäyksiin ja mm. solujen kasvutapaan, kokoon, muotoon ja jakautumistiheyteen. Diagnoosia voidaan tarkentaa immunohistokemiallisilla, sytogeneettisillä ja molekyylipatologisilla tutkimuksilla. (Ristimäki, Franssila ja Kosma, 2013, 88-100.)

Geneettisten muutosten merkitys syövän synnyssä on tunnettu jo pitkään, mutta vasta perimän lukemiseen ja geenimuutosten selvittämiseen tarvittavan teknologian kehittyminen on mahdollistanut geneettisen tiedon yhdistämisen diagnostiikkaan ja hoitoihin. Ihmisen koko genomitiedon hyödyntäminen diagnostiikassa on aikaisemmin osoittautunut liian kalliiksi ja työlääksi, mutta uuden sukupolven sekvensointitekniikat, joissa sekvensointi keskitetään sairauden kannalta keskeisiin ja tunnettuihin genomien kohtiin, mahdollistavat kustannustehokkaan geenidiagnostiikan. Syöpäkasvaimen yksilöllisten geneettisten ominaisuuksien tunteminen auttaa kohdennettujen täsmälääkkeiden valinnassa ja hoitovasteen arvioinnissa. (Myllykangas, Koskenvuo ja Alastalo, 2013, 141-143.)

Tämän työn tarkoituksena oli kehittää PIK3CA:n mutaatioanalyysi syöpädiagnostiikkaan soveltuvaksi. Menetelmän olosuhteita ja työskentelytapoja optimoimalla pyrittiin saavuttamaan diagnostiseen käyttöön riittävä menetelmän luotettavuus ja herkkyys. Tavoitteena oli, että menetelmää voitaisiin jatkossa käyttää Keski-Suomen keskussairaalan patologian osastolla tutkimusnäytteiden analysointiin, mikä laajentaisi molekyylipatologian syövän DNA-muutosten tutkimusvalikoimaa.

2 SYÖVÄN SYNTY

Syövän synty eli karsinogeneesi on tapahtumasarja, jossa solun DNA:ssa tapahtuvat vauriot eli mutaatiot johtavat solun hallitsemattomaan jakautumiseen. Karsinogeneesissä voidaan erottaa kolme vaihetta: initiaatio, promootio ja progressio. Initiaatiovaiheessa solun DNA:ssa tapahtuu mutaatio, jota solun DNA:n korjausmekanismit eivät jostain syystä saa korjattua ja joka altistaa solun myöhemmille muutoksille. Promootiovaiheessa solukko jakautuu aktiivisesti, geneettinen instabiliteetti lisääntyy ja solukko muuttuu pahanlaatuisiksi. Progressiovaiheessa pahanlaatuiset muutokset jatkuvat, solukko muuttuu riippumattomaksi ulkoisista kasvutekijöistä ja ssavuttaa kyvyn lähettää etäpesäkkeitä. (Isola 2013, 13.)

Syöpäsoluksi solun muuttavat muutokset osuvat solun kasvunsäätelyjärjestelmiin eli jakautumista, kasvua, erilaistumista ja ohjattua solukuolemaa sääteleviin geeneihin. Syöpä on useimmiten somaattinen, eli mutaatiot tapahtuvat ihmisen elinaikana, eivätkä näin ollen periydy. Pienessä osassa syöpiä (5-10%) syövälle altistava geenivirhe on ollut jo sukusoluissa ja johtaa periytyvään syöpäalittiuteen. (Aittomäki ja Peltomäki 2006, 186-187.) Syöpä on lähes aina monoklonaalinen, eli kasvain on saanut alkunsa yhden solun kontrolloimattomasta jakautumisesta. Kasvainsolukko voi silti olla hyvinkin heterogeeninen sekä mutaatioiden että solujen ilmiäsuhteiden suhteen. Tämä johtuu sekä vilkkaan jakautumisen takia suuresta mutaatioiden ilmaantumisajuudesta verrattuna normaaliin solukloon että syöpäsolukon heikentyneestä kyvystä korjata syntyviä DNA-vaurioita. (Isola 2013, 15.)

Hanahan ja Weinberg ovat esittäneet teorian keskeisistä ominaisuuksista, jotka solun on saavutettava, jotta solu muuttuu pahanlaatuisiksi (taulukko 1). Nämä ominaisuudet ovat tunnusomaisia, toisiaan täydentäviä ja yhteisiä kaikille syöpäsoluille, riippumatta niihin johtavien geenien ja mutaatioiden valtavasta moninaisuudesta. (Hanahan & Weinberg, 2000, 58; 2011, 646)

TAULUKKO 1. Syöpäsolun ominaisuudet.

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Omavaraisuus kasvusignaalien suhteen 2. Riippumattomuus kasvua rajoittavista signaaleista 3. Apoptoosin torjuminen 4. Rajaton jakautumiskyky 5. Angiogeneesi eli verisuonien muodostus 6. Kyky tunkeutua ympäröivään kudokseen ja lähettää etäpesäkkeitä |
|--|

Geneettisten muutosten lisäksi syöpäsoluilla voi olla hankittuja, ulkopuolelta tulleita uusia DNA-jaksoja. Useimmiten syynä ovat virusinfektiot, joita pidetään osallisena 10-15%:ssa ihmisen syövästä. Syöpään kytkeytyviä viruksia ovat ihmisen papilloomavirus (HPV), hepatiittivirukset B ja C (HBV ja HCV), herpesvirus (KSHV), Epstein-Barr-virus (EBV) ja ihmisen T-lymfotrooppinen virus (HTLV-1). (Martin & Gutkind, 2008, S31.) Virukset lisäävät isäntäsolun jakautumista, kiihdyttävät aineenvaihduntaa, estävät ohjelmoitua solukuolemaa eli apoptoosia ja häiritsevät immuunitoimintaa, mikä edesauttaa syövän syntyä. (Pekkonen & Ojala, 2013, 1545-1546.)

Syöpäsolun genomissa voi olla myös hankittuja epigeneettisiä muutoksia, jotka muuttavat DNA:ta ympäröivän kromatiinin rakennetta ja geenien ilmentymistä ilman, että DNA:n emäsjärjestys muuttuu (Stratton ym. 2009, 719). Ensimmäisen kerran syövän epigeneettisiä muutoksia osoitettiin 30 vuotta sitten, jolloin havaittiin, että kasvainkudoksessa DNA:n metylaatio on vähentynyt terveeseen kudokseen verrattuna (Feinberg & Vogelstein 1983, 89). Hypometylaatio on sittemmin osoittautunut yhdeksi syöpäsolujen tyypilliseksi piirteeksi. Hypometylaation lisäksi muita epigeneettisiä mekanismeja ovat DNA:n hypermetylaatio, DNA:han sitoutuvien proteiinien modifikaatiot ja mikro-RNA-välitteinen säätely. Soluilla on siis DNA:n lisäksi epigeneettinen taso, joka määrittää solun kohtalosta, ja jossa tapahtuvat virheet voivat altistaa esim. syöväälle yhtäläillä geenimuutosten kanssa (Tieva & Peltomäki 2012, 62.)

3 SYÖVÄN GENETIIKKA

Sata vuotta sitten saksalainen sytologi Theodor Boveri esitti, että syöpä on geneettinen sairaus, jossa solun perimässä eli DNA:ssa tapahtuneiden muutosten seurauksena solu aloittaa epänormaalin jakautumisen (Boveri 2008, 1-84). Tämä pystyttiin osoittamaan vasta yli seitsemänkymmentä vuotta myöhemmin, jolloin mullistavat havainnot syöpää aiheuttavista, solun normaalien geenien muutoksista tehtiin (Stehelin ym. 1976, 170-173; Parada ym. 1982, 474-478; Tabin ym. 1982, 143-149). 1980-luvun puolivälissä jako kahden tyyppiin syöpää aiheuttaviin geeneihin; onkogeneihin ja kasvunrajoitegeeneihin, alkoi vakiintua, samoin kuin käsitys syövän geneettisten muutosten moninaisuudesta (esim. pistemutaatiot, kopiolumun muutokset, translokaatiot) (MacConaill ja Garraway 2010, 5220).

DNA-sekvenssin muutokset voivat olla pistemutaatioita eli yhden emäksen vaihtumisia toiseen, mikä voi johtaa vastaavan proteiinin aktivoitumiseen tai vaimenemiseen. Translokaatiot eli DNA-jaksojen siirtymiset kromosomien sisällä tai välillä voivat myötävaikuttaa syövän syntyyn häiritsemällä normaalien geenien toimintaa tai muodostamalla syöväälle altistavia fuusiogenejä. Kromosomaaliset häiriöt, joissa geenin kopioluku kasvaa monistumisen seurauksena tai vähenee deleetioiden takia, voivat myös aiheuttaa syöpää. (MacConaill ja Garraway 2010, 5219-5220.)

DNA:n vaurioita syntyy elimistössä koko ajan, mutta soluissa olevat korjausentsyymit useimmiten eliminoivat muutokset. Näiden korjausmekanismien pettämistä pidetään keskeisenä tapahtumana syövän synnyssä (Isola 2013, 16-17). Syövän kehittymiseen tarvittavien mutaatioiden määrästä ei ole varmuutta, mutta yleisesti ajatellaan, että normaalin solun kehittyminen syöpäsoluksi vaatii 6-12 kasvuedun tarjoavaa mutaatiota (Aittomäki ja Peltomäki 2006, 190). Uusia syöväälle altistavia mutaatioita etsitään ja löydetään koko ajan lisää. Ihmisen noin 22 000 proteiinia koodaavasta geenistä noin 400 on osoittautunut mahdollisiksi syöpägeneiksi. Näistä noin 10% löytyy myös sukusoluista aiheuttaen perinnöllisen alttiuden syöväälle. (Stratton, Campbell & Futreal 2009, 721; Futreal, Coin, Marshall ym. 2004, 177).

Syöpägeneissä on paljon vaihtelua kudosspesifisyyden ja mutaatioiden yleisyyden suhteen. Joitain geneistä löytyy mutatoituneena monentyyppisistä syöivistä, mutta on myös genejä, jotka rajoittuvat vain yhteen syöpätyyppiin. Geneettinen vaihtelu on runsasta

saman syöpätyypin sisällä ja jopa histologialtaan täysin samanlaisten kasvainten välillä. Tietyn geenin saman mutaation vaikutus voi myös olla erilainen eri kasvaimissa. Edelleen mutaatioiden ilmaantuminen eri kasvaimissa eri aikaan vaikuttaa syövän kehittymiseen. Reittien moninaisuudesta huolimatta kaikki syöpäsolut lopulta saavuttavat kaikille syöpäsoluille yhteiset ominaisuutensa (Taulukko 1) (Hanahan & Weinberg 2000, 67.)

3.1 Onkogeinit

Onkogeinit muodostuvat mutaation seurauksena proto-onkogeneistä, joiden normaali tehtävä on edistää solun kasvua. Geeniin kohdistuva mutaatio on aktivoiva ja usein vain yhden aminohapon muutokseen johtava ns. missense-mutaatio (johtuu yleisimmin yhden nukleotidin vaihtumisesta toiseen). Onkogeinit toimivat solutasolla dominantisti, eli vain geenin toisen alleelin mutatoituminen riittää onkogeenin aktivoitumiseen ja syöpää aiheuttavan muutoksen aikaansaamiseen (Aittomäki ja Peltomäki, 2006, 188). Onkogeenin tuotteet voidaan luokitella kuuteen ryhmään: solun ulkoiset kasvutekijät, solun pinnalla olevat kasvutekijäreseptorit, solun sisäiset signaalin välittäjät, apoptoosin säätelijät, tuman transkriptiotekijät ja kromatiinin muokkaajat (Croce 2008, 503; Isola ja Kallioniemi, 2013, 19). Tässä työssä tutkimuksen kohteena oleva PIK3CA kuuluu solun sisäisiin viestinvälitysmolekyyleihin.

Onkogeenin aktivoituminen antaa soluille kasvuedun ja lisää elossa pysymistä. Aktivoitumisen takana on monen tyyppisiä geneettisiä muutoksia; mutaatioita, geenien monistumista tai kromosomaalista uudelleenjärjestäytymistä. Itse geeni voi aktivoitua pistemutaatioiden, deleetioiden tai insertioiden vaikutuksesta, mutta samoin muutokset geenin promootterialueella voivat johtaa transkription lisääntymiseen ja edelleen geenin aktivaatioon. Geenien monistuminen voi johtaa ylimääräisiin onkogeenin kopioihin ja lisääntyneeseen aktiivisuuteen. Kromosomaaliset translokaatiot voivat siirtää onkogeenin paikkaan, jossa aktiivisuus lisääntyy. Translokaatioiden seurauksena voi syntyä myös geenien yhdistelmiä, joiden tuottama fuusioproteiini on onkogeeninen (Chial H, 2008, 33).

3.2 Kasvunrajoitegeenit

Kasvunrajoitegeenien tehtävänä solussa on rajoittaa solun kasvua ja jakautumista ja stimuloida solukuolemaa, jotta solujen tasapaino säilyy. Osa näistä geeneistä osallistuu myös DNA:n vaurioiden korjaukseen eli estää mutaatioiden kertymistä. Tällaisen geenin toiminnan heikkeneminen tai loppuminen mutaation seurauksena voi käynnistää syövän kehittymisen. Kasvunrajoitegeenit toimivat solutasolla usein resessiivisesti, eli geenin molempien alleelien täytyy inaktivoitua, jotta syöväälle altistava vaikutus syntyy. (Aittomäki & Peltomäki 2006, 190.) Tätä ilmiötä kutsutaan Knudsonin kahden osuman hypoteesiksi (two-hit hypotheses) (Knudson 1971, 820). Ensimmäinen osuma geenin toiseen alleelliin voi olla joko jo perimässä saatu altistava mutaatio tai elämän aikana syntynyt mutaatio, ja toinen osuma kohdistuu myöhemmin geenin vastinalleeliin. Toinen osuma voi olla paitsi mutaation aikaan saama, myös esimerkiksi virusinfektion aiheuttama tai epigeneettinen metylaatiomuutos. (Isola & Kallioniemi 2013, 20.)

Parhaiten tunnettu kasvunrajoitegeeni on *p53*, joka koordinoi solun jakautumista ja apoptoosia. *p53* aktivoituu DNA:han tulleen vaurion seurauksena. Aktivoituessaan se indusoi geenejä, joiden tuottamat proteiinit pysäyttävät solun jakautumisen vaurion korjausta varten. Jos DNA-vaurion korjaus ei ole mahdollista, aktivoitunut *p53* indusoi geenejä, joiden proteiinituotteet johtavat ohjelmoituun solukuolemaan eli apoptoosiin. *p53*:n toimintahäiriö on yleisin yksittäinen geenivirhe, ja esiintyy lähes kaikissa syöpätyypeissä. (Isola 2013, 17-20.)

3.3 DNA-vaurioita korjaavat geenit

Genomissa muodostuu DNA-vaurioita koko ajan sekä solun sisäisten reaktiivisten tekijöiden että ympäristötekijöiden aiheuttamana. Osa vaurioista johtaa solun kuolemaan, jolloin pitkäaikaisia seurauksia ei ole. Vaurio voi myös tapahtua solun toiminnan kannalta merkityksettömässä kohdassa. Vaurioiden korjaamiseksi elimistössä toimii joukko DNA:ta korjaavia entsyymejä, jotka suorittavat jatkuvaa kromosomien valvontaa ja virheiden korjausta. Korjausmekanismit voidaan jakaa DNA:n replikaation jälkeistä tarkistusta suorittaviin (mismatch repair, MMR), emäsmuutoksia korjaaviin (base excision repair, BER) ja nukleotidivirheitä korjaaviin (nucleotide excision repair, NER) proteiineihin. Näiden korjausmekanismien häiriöitä pidetään keskeisenä tapahtumana syövän synnyssä. (Isola 2013, 17.)

4 SYÖVÄN GEENIDIAGNOSTIIKKA

Ihmisen koko genomin sekvensointi valmistui kymmenisen vuotta sitten (Human Genome Project, 1990-2003). Koko genomin hyödyntäminen diagnostiikassa on käytännössä mahdotonta ja rajoittuu kalleutensa ja resursointivaatimustensa takia suurien kansainvälisten tutkimuskonsortioiden hankkeisiin. Eksomisekvensoinnilla, jossa selvitetään vain proteiineja koodaavien alueiden emäsjärjestys (2% koko genomista), kustannukset laskevat kymmenesosaan. Kliiniseen käyttöön tämäkin on liian kallista, mutta palvelee tutkimusmaailman intressejä. (Myllykangas, Koskenvuo & Alastalo, 2013, 141-145.)

Syöpäkasvainten genomien kartoitusprojekteista merkittävimmät käynnissä olevat ovat Yhdysvaltain terveystieteiden rahoittama syöpägenomiatlas (The Cancer Genome Atlas, TCGA, <http://cancergenome.nih.gov/>) ja Sanger Instituutin syöpägenomin kartoitusprojekti (<https://www.sanger.ac.uk/>). Näiden hankkeiden tavoitteena on analysoida systemaattisesti kymmenien syöpätyyppien ja tuhansien kasvainten genomit ja verrata niitä terveiden kudosten genomiin. Hankkeet tuottavat uutta tietoa eri syöpätyyppien geneettisistä muutoksista, mikä tulee parantamaan syöpäpotilaiden diagnostiikkaa ja hoitoa. Näin kerätyn tiedon pohjalta kliiniseen käyttöön soveltuvassa syövän geenidiagnostiikassa keskitytään selvittämään kyseisen syövän kannalta merkittävät perimän muutokset. Tämä on tullut mahdolliseksi kohdennettujen sekvensointitekniikoiden kehityksen myötä. (Myllykangas, Koskenvuo & Alastalo, 2013, 141-145.)

Kohdennetussa geenisekvensoinnissa keskitytään sairauden kannalta merkittäviin genomin kohtiin, jolloin saadun tiedon analysointi on yksinkertaisempaa ja edullisempaa. Samalla vältetään eettiset ongelmat, joita koko genomin avaamisen myötä syntyy, koska genomista voi paljastua ihmisen terveyden ja tulevaisuuden kannalta merkittävä tietoa. Yksinkertaisimmillaan geenidiagnostiikka on potilaan yhden tai useamman tautiin liittyvän geenin tiettyjen eksonien sekvensointia ja mutaatioiden määrittämistä. Nykyinen täsmähoito perustuu tähän ja toimii hyvin, jos taudinkuva on selkeä ja klinikko tuntee kyseiseen kasvaimen liittyvät muutokset, joita etsiä ja joiden perusteella valita sopiva hoito. Syöpäkasvain on usein kuitenkin useamman geneettisen muutoksen summa, jolloin yksittäisten geenimuutosten sijaan kokonaiskuvan saamiseksi tarvitaan laajempia kyseiseen syöpätyyppiin liittyvien muutosten analyysipaneeleja. Tällöin puhutaan uuden sukupolven sekvensointimenetelmistä, joilla voidaan kustannustehokkaasti määrit-

tää syöpäkudoksen laajempi geneettinen profiili etenkin hoidollisesti merkittävien ja mahdollista lääkeresistenssiä aiheuttavien muutosten suhteen. Näiden menetelmien uskotaan olevan syövän rutiinidiagnostiikkaa jo lähitulevaisuudessa. (Myllykangas, Koskenvuo & Alastalo, 2013, 141-145.)

5 TÄSMÄHOIDOT

Vaikka syöpä on geneettisesti ja epigeneettisesti hyvin monimutkainen sairaus, kasvaimen kasvua ja selviytymistä voidaan usein häiritä vain yhden onkogeenin inaktivaatiolla. Tätä ilmiötä kutsutaan onkogeeniriippuvuudeksi. Ilmiön ajatellaan perustuvan siihen, että onkogeenien koodaamat proteiinit osallistuvat moniin reaktioteihin syöpäsolun uudelleen ohjelmoitussa solun signaaliverkostossa, jolloin yksittäisen onkogeenin merkitys on suurempi kuin normaalisolussa. Syövän kohdistetut täsmähoidot perustuvat tämän heikon kohdan tunnistamiseen ja geenin toiminnan pysäyttämiseen. (Weinstein & Joe 2006, 448).

Syöpäpotilaan täsmähoidon toteutuminen edellyttää perinteisen morfologisen diagnoosin lisäksi molekulaarisia analyysimenetelmiä; syöpäsoluissa tapahtuneiden mutaatioiden määrittämistä ja lääkeresistenssimekanismien tuntemista. Immunohistokemiallisilla värjäyksillä tai syto- ja molekyylogeneettisillä testeillä voidaan selvittää, ilmentyykö hoidon kohde kasvainsoluissa. Immunohistokemiallinen värjäys on nopea, tarkka ja edullinen tapa osoittaa jonkin proteiinin ilmentyminen kudoksessa, edellyttäen että riittävän herkkä ja spesifinen vasta-aine kohdeproteiinille on olemassa. (Ristimäki, Kytölä, Haglund & Bono 2013, 1071-1074.) Sytogeneettisillä testeillä, kuten *in situ*-hybridisaatiolla, voidaan havaita perimän uudelleenjärjestymiä ja molekyylogeneettisillä testeillä, kuten PCR:llä ja sekvensoinnilla, kasvaimen somaattisia mutaatioita (Tyybäkinoja & Knuutila 2006, 2018).

Täsmälääkkeet häiritsevät tietyn molekyylin toimintaa syöpäkasvaimessa ja tällä hetkellä käytössä olevien lääkkeiden joukossa on tekijöitä, jotka estävät solukasvun signalointia, häiritsevät kasvaimen verisuonien kehitystä, edistävät syöpäsolujen kuolemaa, stimuloivat immuunijärjestelmää tuhoamaan syöpäsoluja tai luovuttavat toksisia yhdisteitä syöpäsoluihin. Proteiinit, joita esiintyy syöpäsolussa enemmän kuin terveessä solussa, voivat olla hyviä kohteita täsmähoidolle etenkin, jos ne osallistuvat solun kasvuun tai elossa säilymiseen (American Cancer Society 2013).

Täsmälääkkeistä hyvänä esimerkkinä on HER2-positiivisen rintasyövän hoito trastusumabilla. HER2-tyrosiinikinaasi kuuluu solun jakautumista sääteleviin kasvutekijöihin, ja geenin monistuma johtaa solujen hallitsemattomaan kasvuun. Lisääntyneen kinaasin vaikutus voidaan estää HER2-reseptoriin sitoutuvalla monoklonaalisella vasta-aineella,

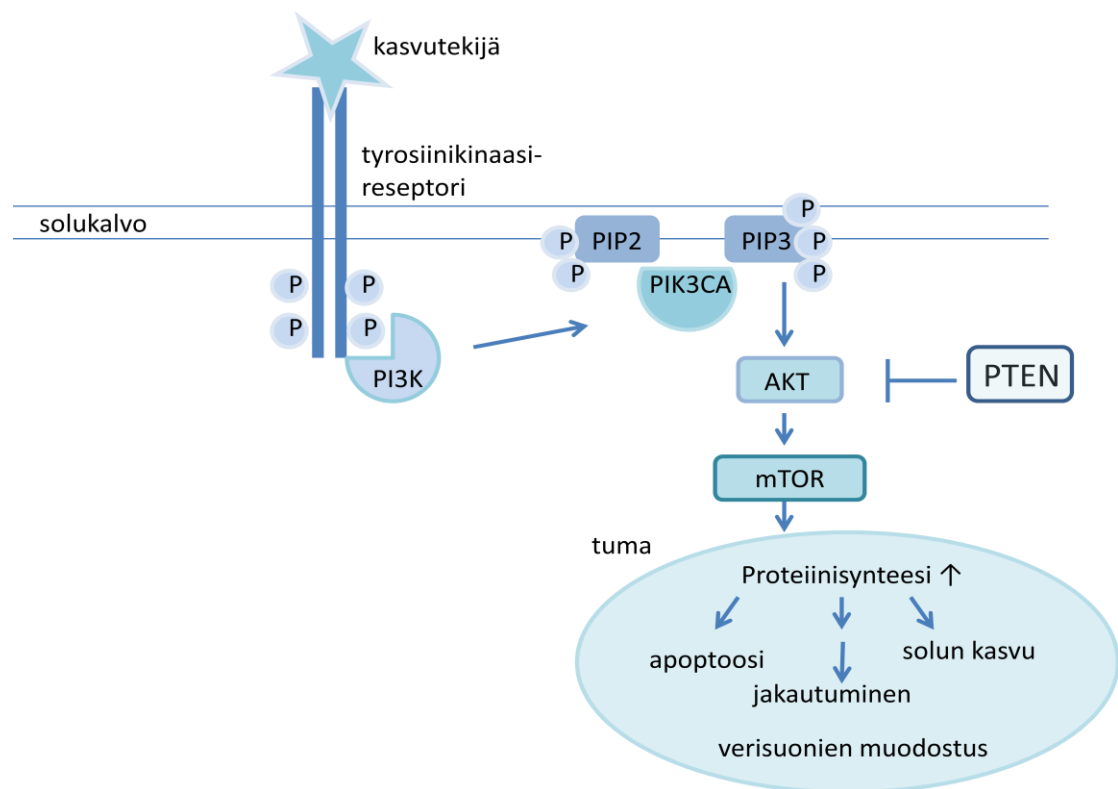
trastutsumabilla. Trastutsumabin tapaan monet täsmälääkkeet ovat monoklonaalisia vasta-aineita jotakin solun ulkoista rakennetta kohtaan. Täsmälääkkeinä käytetään myös pienikokoisia molekyyliä, jotka voivat tunkeutua syöpäsolujen sisään ja häiritä solun toimintaa. Rintasyövän hoidossa käytettävä lapatinibi toimii HER1- ja HER2-tyrosiinikinaasien inhibiittorina sitoutumalla solunsisäiseen kinaasin osaan. (Bono & Joensuu 2010, 1205-1206). Muita käytössä olevia täsmälääkkeitä ovat mm. *BRAF*-geenin V600E-mutaatiota ilmentävän melanooman hoito vemurafenibillä (O'Brien, Guilhot, Larson ym. 2003, 994) ja Philadelphia-kromosomimuutoksen sisältävän kroonisen myeloidisen leukemian (CML) hoito imatinibillä (Chapman, Hauschild, Robert ym. 2011, 2507).

Vaikka täsmälääkkeen toiminta-ajatus on yksinkertainen, haastetta lääkkeen toimivuudelle tuo syöpäkasvaimen geneettinen moninaisuus ja kyky kehittää resistenssi annettavalle hoidolle. Yhden signaalireitistön tietyn molekyylin inhibointi täsmälääkkeellä voidaan syöpäsolukossa korvata ja kumota muiden, osittain päällekkäisten reaktioteiden toiminnoilla. Näin ollen syövän hoidon tulevaisuudessa tietyn geenin mutaatioiden tuntemisen lisäksi tulee panostaa kasvaimen koko geneettisen ympäristön tuntemiseen. (Martini ym. 2012, 87)

6 PIK3CA

6.1 PI3K-AKT-mTOR-reaktiotie

Fosfatidyli-inositoli-3-kinaasit (PI3K) ovat ryhmä lipidikinaaseja, jotka toimivat viestinvälitysmolekyyleinä tyrosiinikinaasireseptoreiden kautta tapahtuvassa PI3K-AKT-mTOR-reaktiotien (fosfoinositidi-3-kinaasi-AKT-mammalian target of rapamycin) solusignaloinnissa (kuva 1). Tyrosiinikinaasireseptoreihin kuuluvat mm. EGFR (epidermal growth factor receptor), humaan EGFR2 (HER2) ja IGF-R1 (insulin-like growth factor 1). Solukalvon läpäisevän tyrosiinikinaasireseptorin kautta tapahtuva tiedonvälitys perustuu reitillä toimivien proteiinien fosforylaatioon, ja lopullisena vaikutuskohteena ovat keskeiset solutoiminnot (kuten kasvu, jakautuminen, erilaistuminen) kohdegeenien transkription ja proteiinisynteesin säätelemänä.



KUVA 1. PI3K/Akt/mTOR-reaktiotie. Reitit aktivaatio käynnistyy, kun kasvutekijä sitoutuu solukalvon tyrosiinikinaasireseptoriin. PI3K sitoutuu autofosforyloituneeseen reseptoriin. Aktivoituneen PI3K:n katalyyttinen yksikkö PIK3CA siirtyy solukalvolle ja fosforyloi fosfolipidi PIP2:n PIP3:ksi. Fosforyloitunut PIP3 puolestaan aktivoi AKT:n ja edelleen mTOR:in. Näin edennyt toisilähettiläen aktivaatioketju säätelee monia keskeisiä solutoimintoja kohdegeenien transkription ja proteiinisynteesin kautta. PTEN on fosfataasi, joka toimii tuumorisupressorina inhiboiden PI3K-AKT:n signalointia (Mukaellen Zhang 2013).

6.2 *PIK3CA*:n mutaatiot

PI3K on heterodimeerinen entsyymi, joka koostuu säätely-yksiköstä (p85) ja katalyyttisestä yksiköstä (p110 α), jota *PIK3CA*-geeni koodaa. *PIK3CA*:n mutaatiot moninkertaistavat PI3K:n aktiivisuuden, jolloin reitin signalointi ei ole enää riippuvainen tyrosiinikinaasireseptoriin sitoutuvasta kasvutekijästä. Yli 80% *PIK3CA*:n somaattisista pistemutaatioista (yhden emäksen muutos, ks. taulukko 2) sijaitsee kolmessa ns. hot spot-kohdassa; eksonissa 9 helikaalisella alueella kodoneissa 542 ja 545 ja eksonissa 20 kiinaasialueella kodonissa 1047. Mutaatiot aiheuttavat yhden aminohapon muutoksen; eksonin 9 kodoneissa 542 ja 545 glutamaatti muuttuu glysiiniksi (E542K ja E545K) ja eksonissa 20 kodonissa 1047 histidiini vaihtuu arginiiniksi (H1047R). *PIK3CA*-geeni lukeutuu onkogeeneihin ja sen mutaatiot ovat yleisiä (~20-40%) monissa syöpätyypeissä, kuten rinta- ja kolorektaalisyövissä ja glioblastoomissa (Campbell, Russell, Choong ym. 2004; Samuels, Wang, Bardelli ym. 2004).

TAULUKKO 2. *PIK3CA*:n yleisimmät mutaatiot eksoneissa 9 ja 20 (<http://www.mycancergenome.org>).

	Aminohappomuutos	Nukleotidimuutos
PIK3CA exon 9	p.E542K	c.1624G>A
PIK3CA exon 9	p.E545K	c.1633G>A
PIK3CA exon 20	p.H1047R	c.3140A>G

6.3 *PIK3CA*:n merkitys syövässä

PI3K-AKT-mTOR-reaktiotie on yksi useimmin mutatoituista reaktioteistä syövässä. Reitti voi aktivoitua useiden erilaisten mekanismien kautta. Kahtena päämekanismina ovat reaktioteiehen osallistuvien tekijöiden somaattiset, reittiä aktivoivat mutaatiot ja itse tyrosiinikinaasireseptorien aktivaatio. Useimmiten lisääntynyt aktiivisuus johtuu aktivoivista mutaatioista ja geenien monistumisesta reitin keskeisissä tekijöissä (esim. PI3K ja AKT1) tai PTEN-tuumorisupressorin inaktivaatiosta. Useille reitin tekijöille on kehitetty inhiboivia täsmälääkkeitä, ja lupaavat tulokset prekliinisistä tutkimuksista ovat johtaneet lääkkeiden kliinisiin kokeisiin. (Courtney, Corcoran & Engelman 2010; 1075-1081.)

Rintasyövässä PIK3CA-mutaatioiden on osoitettu liittyvän imusolmukemetastaaseihin, estrogeeni- ja progesteronireseptorien ilmentymiseen samoin kuin HER2:n yli-ilmentymiseen (Saal ym. 2005, 2554; Stemke-Hale ym. 2008, 6084). Cizkova ym. osoittivat ~450 potilaan aineistolla, että mutaatioiden esiintyminen rintasyövässä vaihtelee kolmoisnegatiivisten (ER-/PR-/HER2-) 12,5%:sta reseptoriposiitivisten ja HER2-negatiivisten (ER+/PR+/HER2-) 41,1%:iin. Samassa tutkimuksessa mutaatioiden esiintyminen yhdistettiin myös pidempään metastaasivapaaseen elossaoloaikaan (Cizkova ym. 2012, 1). PI3K/Akt/mTOR-reaktiotien inhibiittoreiden teho rintasyövän hoidossa yhdistettynä anti-HER2-hoitoon, hormonihoitoon tai kemoterapiaan on osoittautunut paremmaksi syövässä, joissa on PIK3CA-mutaatioita (Oliveira ym. 2012).

Kolorektaalisyöväät ovat joukko hyvin heterogeenisiä syöpiä, joissa paikallinen kasvain voidaan helposti poistaa, mutta pidemmälle edenneenä ja metastasoituneena sairauden ennuste on hyvin huono. Pitkälle edenneiden kolorektaalisyöpien hoidossa käytetään täsmälääkkeenä EGFR-inhibiittoreita, kuten setuksimabia ja panitumumabia, jotka inhiboivat PIK3/Akt/mTOR-reaktiotien. Anti-EGFR-hoidosta hyötyvät kuitenkin vain potilaat, joilla ei ole KRAS-geenin (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) mutaatioita. KRAS-villityypin syövässä PIK3CA-mutaatiot on yhdistetty huonompaan kliiniseen lopputulokseen ja mutaatioilla voi olla ennustearvoa anti-EGFR-hoidon teholle. (Van Cutsem ym. 2009, 1408; Amado ym. 2008, 1626) Uusin merkitys PIK3CA-mutaatioille löytyi Liaon ym. tutkimuksesta, jonka perusteella mutaatiot voisivat toimia ennustavana tekijänä aspiriinihoidon teholle. Aspiriinihoidon tiedetään suojaavan kolorektaalisyövältä (Rothwell ym. 2010, 1741) ja Liaon ym. tutkimus osoitti, että diagnoosin jälkeinen aspiriinihoito on yhteydessä pidempään elossaoloon potilailla, joiden kasvaimesta on todettu PIK3CA-mutaatio (Liao ym. 2012, 1596).

7 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Tutkimuksen tarkoituksena on kehittää PIK3CA:n mutaatioanalyysi syöpädiagnostiikkaan soveltuvaksi. Tarkoituksena on menetelmän olosuhteita ja työskentelytapoja optimoimalla saavuttaa diagnostiseen käyttöön vaadittava menetelmän luotettavuus ja herkkyys.

Tutkimuksen tavoitteena on, että menetelmää voidaan jatkossa käyttää Keski-Suomen keskussairaalan patologian osastolla potilasnäytteiden analysointiin. Tutkimus tulee laajentamaan molekyylipatologian syövän geneettisten muutosten tutkimusvalikoimaa.

8 MENETELMÄT JA MATERIAALIT

8.1 Tutkimusstrategia

Sain opinnäytetyön aiheen patologian osastolta kesäkuussa 2013, jonka jälkeen aloin perehtyä aiheeseen ja kirjoitin tutkimussuunnitelman. Tutkimuslupa työlle myönnettiin 11.10.2013. Opinnäytetyön käytännön laboratorio-osuuden tein Keski-Suomen keskussairaalan patologian osastolla loppuvuoden 2013 aikana.

Tämä opinnäytetyö on tutkimusotteeltaan kehittämistutkimus. Kehittämistutkimuksen kohteena voi olla prosessi, toiminto, asiantila tai tuote, eli lähes mikä tahansa, johon voidaan valituilla toimenpiteillä vaikuttaa ja jonka halutaan kehittämisen jälkeen olevan paremmin (Kananen 2012, 21). Kehittämistutkimus ja luonnontieteissä paljon tutkimusasetelmana käytetty kokeellinen tutkimus muistuttavat toisiaan, koska molemmissa selvitetään tutkittavan asian ennen ja jälkeen-tilaa (Kananen 2012, 24). Dokumentaatio, eli mitä, miten, miksi, millä perusteella ja milloin tehtiin, on tämän tyyppisessä tutkimuksessa erittäin tärkeää. Näin syntyvä tutkimuspäiväkirja toimii aineistona, johon opinnäytetyö perustuu (Kananen, 2012, 48). Kehittämistyössä ei tyydytä vain kuvailemaan esim. toimintoa kuten laadullisessa tutkimuksessa, vaan etsitään vaihtoehtoja asiantilan parantamiseen, testataan ne ja osoitetaan niiden toimivuus (Kananen 2012, 44).

Kehittämistutkimus on hyvin lähellä toimintatutkimusta. Molemmissa strategioissa pyritään muuttamaan olemassaolevaa asiantilaa. Toimintatutkimus kuitenkin yleensä kohdistuu ihmisiin ja tutkittavat osallistuvat tutkimusprosessiin (Kuula 1999, 10). Kehittämistutkimuksessa voidaan erottaa kaksi prosessia: kehittämistyö, jonka kohteena tässä opinnäytetyössä on PIK3CA-mutaatioiden määritysmenetelmä, ja tutkimus, jonka tuotoksena opinnäytetyö on syntynyt.

8.2 Näyttemateriaali

Mutaatioanalyysissä näyttemateriaalina käytettiin formaliinilla kiinnitettyjä ja parafiiniin valettuja rintakudosnäytteitä (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE). Näytteistä oli leikattu ja värjätty näytelaseja, joihin patologi oli valomikroskooppitarkastelun jälkeen merkinnyt havaitun syöpäkudoksen tai syöpäsolujen sijainnin. Tämän perusteella parafiiniblokissa olevasta näytteestä pyrittiin keräämään näytteet siltä kohtaa, jossa

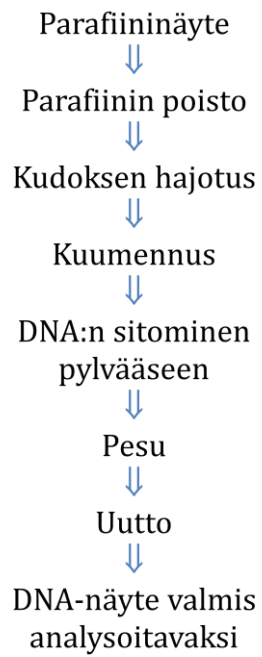
syöpäsoluja on mahdollisimman paljon. Näyteblokeista leikattiin mikrotomilla 5-10 µm:n paksuisia leikkeitä 3-8 kpl/näyte riippuen leikkeiden pinta-alasta ja solutiheydestä. Jos näyte oli hankalasti leikattavissa tai syöpäsolujen osuus oli hyvin pieni muuhun kudokseen verrattuna, näytteet voitiin ottaa myös ontolla biopsianeulalla.

8.3 DNA:n eristys

DNA:n eristys (kuvio 1) parafiini-näytteistä suoritettiin kaupallisella DNA:n eristyskitillä (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, Qiagen) valmistajan ohjeen mukaan (Qiagen, 2012). Ohje on suomennettuna liitteessä 1. Leikatuista leikkeistä poistettiin parafiini ksyleenikäsittelyllä, jonka jälkeen ksyleeni poistettiin etanolilla. Pienimmissä ja vaativimmissä näytteissä käytettiin saman valmistajan deparafinisointiliuosta (Deparaffinization Solution, Qiagen) ksyleeni-etanoli-käsittelyn sijaan, jolloin supernatantteja ei tarvinnut poistaa, ja pienet näytteet säilyivät putkessa varmemmin. Kudokset hajotettiin entsyymaattisesti proteinaasi K:lla 56°C:ssa ja kudoksen kiinnitykseen käytetyn formaliiinin muodostamat ristisidokset hajotettiin kuumennuksella 90°C:ssa. DNA saostettiin ja erotettiin puhdistuspylväillä (QIAamp MinElute column, Qiagen), joiden kalvo sitoi DNA:n. Pylväässä oleva DNA pestiin pesupuskurilla ja uutettiin eluointipuskurilla. DNA:n konsentraatio mitattiin pienoisspektrofotometrillä (NanoDrop 2000c/2000 UV-Vis, Thermo Scientific). Jos näytteen DNA-pitoisuus oli hyvin matala, tulos tarkistettiin Qubit® 2.0 fluorometrillä (Invitrogen, Life Technologies Corporation), jonka herkkyys on NanoDrop:ia parempi.

8.4 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

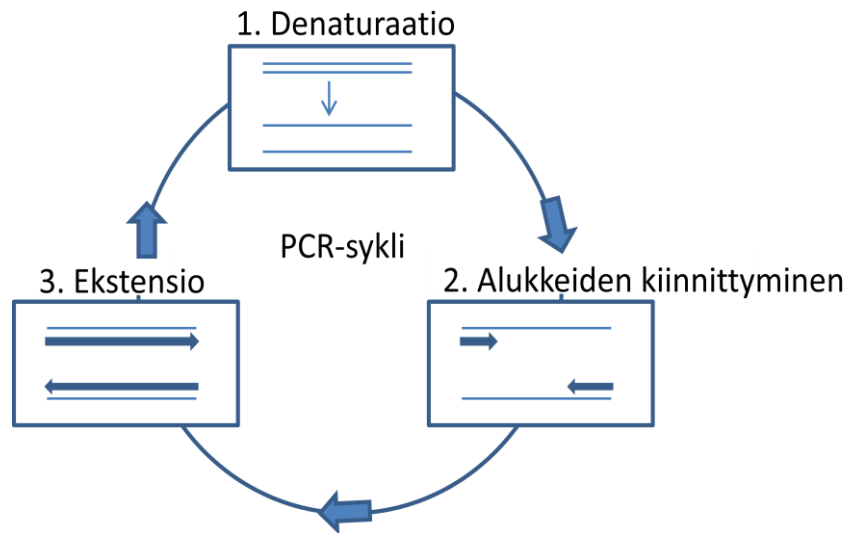
Polymeraasiketjureaktiolla tarkoitetaan menetelmää, jossa haluttu DNA-jakso voidaan monistaa eksponentiaalisesti (kuvio 2). PCR-sykli muodostuu kolmesta vaiheesta; kohde-DNA:n denaturaatiosta, PCR-alukkeiden kiinnittymisestä komplementaariseen kohteeseen (annealing) ja pidennysvaiheesta (extension), jossa polymeraasiensyymi pidentää aluketta kohde-DNA:n kopioksi (kuvio 3). Syklejä toistamalla alukkeiden väliin jäävä DNA-jakso monistuu eksponentiaalisesti. PCR-reaktiot tehdään pienessä tilavuudessa mikroputkissa (<0,5 ml). PCR-laitteeseen ohjelmoidaan em. vaiheisiin tarvittavat lämpötilat ja haluttu määrä syklejä. Reaktion alussa seos kuumennetaan 15 minuutiksi 95 °C:een, jotta reaktiossa käytetty termostabiili DNA-polymeraasi aktivoituu. (Suominen & Ollikka 1999.)



KUVIO 1. DNA:n eristys parafiininäytteestä



KUVIO 2. Eksponentiaalinen monistus PCR-reaktion aikana



KUVIO 3. PCR-syklin vaiheet.

Reaktioseosta (taulukko 3) tehdään tarvittava määrä, jaetaan mikroputkiin ja lopuksi lisätään näyte-DNA. Jokaisessa reaktiosarjassa on aina mukana negatiivinen kontrolli (reaktio ilman näyte-DNA:ta) kontaminaatioiden paljastamiseksi ja positiivinen kontrolli (tunnettu DNA-näyte) osoittamaan reaktion toimivuus.

TAULUKKO 3. PCR-seoksen pipetointiohje.

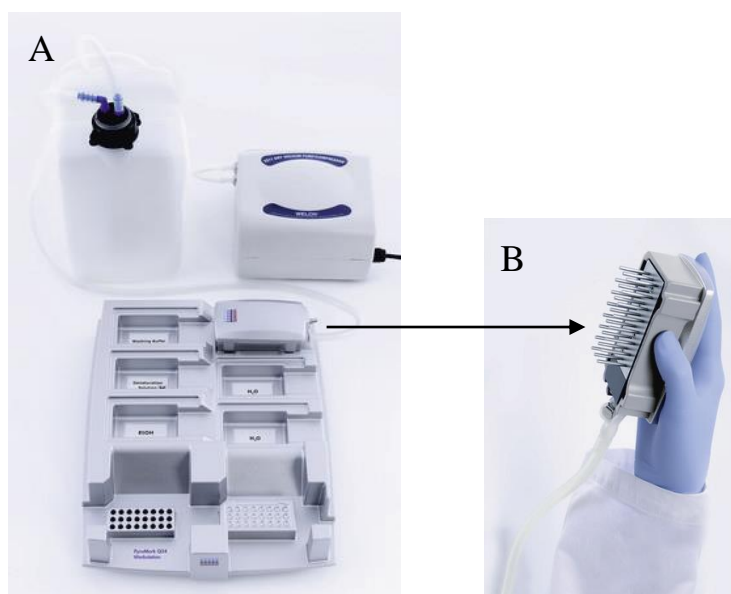
PCR-reaktioseos		
	pitoisuus reaktiossa	tilavuus reaktiossa
10xPCR-puskuri	1x	3,5 µl
MgCl₂ 25 mM	3 mM	2,1 µl
dNTP:t 10 mM kutakin	0.2 mM	0,70 µl
aluke F 10 µM	7 pmol	1,75 µl
aluke R 10 µM	7 pmol	1,75 µl
HotStarTaq 5 U/µl	1,1U	0,22 µl
H₂O		19,98 µl
Kokonaistilavuus		30 µl
+ näyte	0,3 ng/µl	5 µl

Taulukon mukaisesti yhden putken reaktioseos sisältää 30 µl reaktioseosta ja 5 µl näyte-DNA:ta (pitoisuudeltaan 2ng/ml). PCR-reaktiot tehtiin T100 Thermal cycler-laitteella (Bio-Rad). Tutkittavista DNA-näytteistä monistettiin kahden erillisen PCR-reaktion avulla PIK3CA:n eksonien 9 ja 20 alueet, joissa sijaitsevat yleisimmät tämän geenin pistemutaatiot (Samuels ja Velculescu, 2004). Menetelmän pystytysvaiheesta lähtien

PIK3CA-mutaatioanalyysissä oli käytetty seuraavanlaista PCR-sykliä: 94 °C 20 s (denaturaatio), 50 °C 20 s (alukkeiden kiinnittyminen) ja 74 °C 40 s (pidennys) toistettuna 50 kertaa (Välilehto 2013). Tämän työn kuluessa reaktio-olosuhteita muokattiin jatkossa esitetyllä tavalla. Negatiivinen kontrolli sisälsi näytteenä 5 µl nukleaasivapaata vettä (Qiagen) ja positiivinen näyte 5 µl metyloimatonta kontrolli-DNA:ta (DNA-konsentraatio 1 ng/µl). Valmiit PCR-tuotteet säilytettiin +4 °C:ssa, ellei sekvensointia tehty välittömästi.

8.5 Pyrosekvensointi

Tässä työssä PCR-tuotteen sekvensointiin käytettiin pyrosekvensointimenetelmää, joka oli muokattu kaupallisen *BRAF*-geenin pyrosekvensointiin käytetyn reagenssikitin ohjeesta *PIK3CA*-geenin mutaatioiden osoittamiseen soveltuvaksi (Välilehto, 2013). Ennen sekvensointia PCR-tuotteet valmisteltiin PyroMark Q24-työasemassa (kuva 2A) valmistajan ohjeiden mukaisesti (Qiagen, 2013). Näytteiden valmistelun ohje on suomennettuna liitteessä 2.



KUVA 2. Pyromark Q24-työasema (A) ja PCR-tuotteiden puhdistamiseen käytettävä imusuodatuslaite (B) (Qiagen 2011).

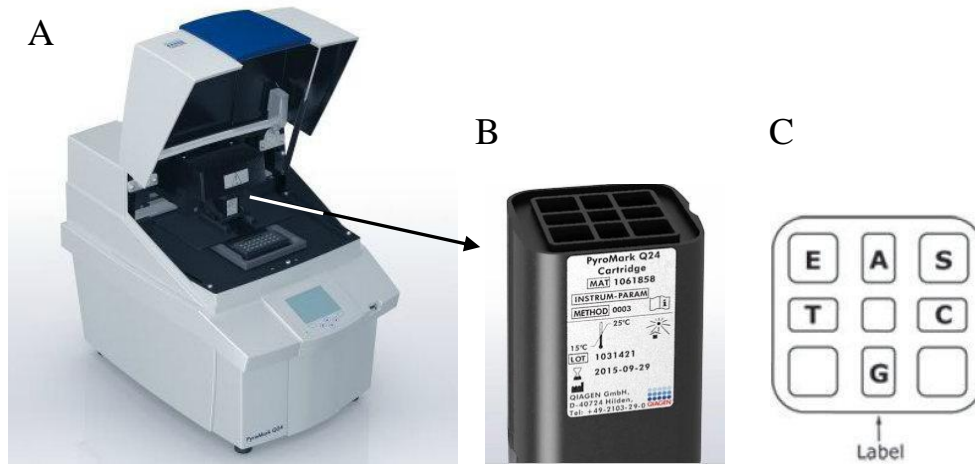
Näytteen valmistelu sekvensointia varten aloitetaan sitomalla biotinyloidut PCR-tuotteet streptavidiinilla päällystettyihin sefaroosipalloihin (\varnothing 34 µm, Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare). Sitoutuminen tapahtuu sitoutumispuskurissa (Py-

romark Binding Buffer, Qiagen) ja putkia pidetään ravistelussa 1400 rpm 10 minuutin ajan. Streptavidinipalloon kiinnittyminen mahdollistaa näytteiden seuraavat käsittelyvaiheet Pyromark Q24-työasemassa. Tässä laitteessa näytteen käsittely ja kuljetus liuksesta toiseen tapahtuu vakuumi-imulaitteen (kuva 2B) avulla, jonka suodatinkärkien läpi neste kulkeutuu, mutta suurikokoiset sefaroosipallot ja niissä kiinni oleva näyte-DNA jäävät kiinni kärkiin.

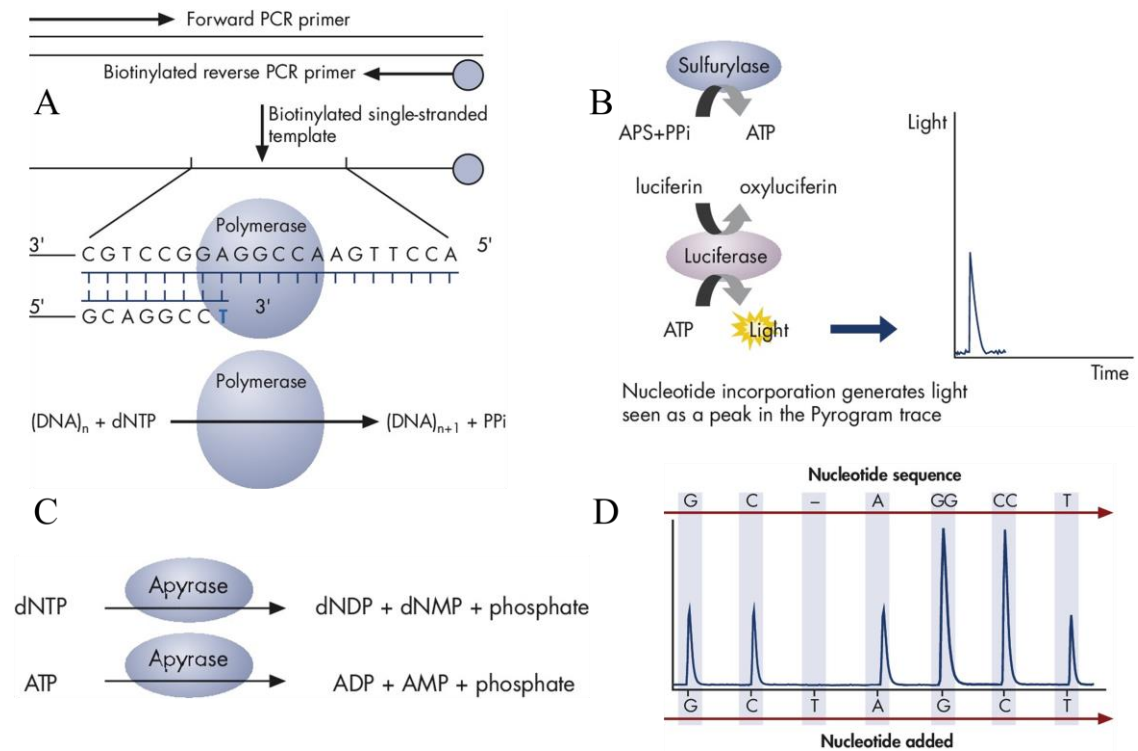
Liuokset työaseman altaissa ovat käyttöjärjestyksessä 70% etanoli, denaturaatioliuos (Pyromark Denaturation Solution, Qiagen), pesupuskuri (Pyromark Was Buffer, Qiagen) ja käytön lopuksi suodattimien huuhtelua varten kaksi vesiallasta. Etanolihuuhtelu poistaa palloon sitoutumattoman PCR-tuotteen, denaturaatioliuos erottaa PCR-tuotteen vastinnauhat toisistaan ja pesupuskurissa biotyinyloimattomat juosteet huuhtelaan pois. Imulaitteen suodatinkärkiä kuivataan hetki pystyasennossa, jonka jälkeen vakuumi-imu sammutetaan ja suodatinkärjet asetetaan sekvensointilevylle, jonka kuoppiin on valmiiksi pipetoitu sekvensointialukkeet. Kevyellä ravistelulla yksijuosteinen näyte-DNA irtoaa kuoppiin, jonka jälkeen levyä inkuboidaan 80°C:ssa kahden minuutin ajan. Levyn annetaan jäähtyä vähintään 10 minuuttia huoneenlämmössä. Tänä aikana sekvensointialukkeet sitoutuvat kohdesekvenssiinsä.

Pyrosekvensointi suoritetaan Pyromark Q24-laitteella (Qiagen) (kuva 3) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Reaktiossa tarvittavat entsyymi, substraatti ja nukleotidit pipetoidaan laitteen patruunaan (Kuva 3B ja C), ja näytelevy ja patruuna asetetaan laitteeseen. Sekvensointiohjelma siirretään laitteeseen USB-muistitikulla ja ohjelma käynnistetään. Jokaisessa sekvensoinnissa ovat mukana negatiivinen ja positiivinen kontrolli PCR-reaktiosta. Pyrosekvensoinnin reaktioiden periaate on selitetty kuvassa 4.

Sekvensoinnin valmistuttua ajon raakadata tallentuu laitteelta USB-muistitikulle, jolta se siirretään tietokoneelle ja analysoidaan Pyromark Q24 2.0.6 –ohjelmalla (Qiagen).



KUVA 3. Pyromark Q24-sekvensointilaite (A) ja patruuna (B), johon sekvensointiin tarvittavat reagenssit pipetoidaan merkittyihin kaivoihin (C): entsyymi (E), substraatti (S) ja nukleotidit (A, C, G ja T) (Qiagen 2011).



KUVA 4. Pyrosekvensoinnin periaate (Qiagen 2013)

(A) PCR-reaktiossa tuotettu biotinyloitu yksinauhainen tuote hybridisoidaan sekvensointialukkeen kanssa reaktioseoksessa, joka sisältää 4 entsyymiä; DNA-polymeraasin, ATP-sulfurylaasin, lusiferaasin ja apyraasin, sekä substraatteina adenosiini-5'-fosfosulfaattia (APS) ja lusiferiiniä. DNA-polymeraasi liittää dNTP:n sekvensointialukkeeseen. Jokaisella sitoutumisella vapautuu vastaava määrä pyrofosfaattia (PPi).

(B) ATP-sulfurylaasi muuttaa PPi:n ATP:ksi, jonka voimalla lusiferaasi hapettaa lusiferiinin oksilusiferiiniksi. Tämä havaitaan ATP:n määrää vastaavana näkyvän valon määränä. Kamera detektoi valon määrän, ja signaalin eli piikin korkeus vastaa liitettyjen nukleotidien määrää.

(C) Apyraasi-entsyymi hajottaa vapaaksi jääneet nukleotidit ja ATP:n, jonka jälkeen seuraava nukleotidi liitetään. dATP-nukleotidin tilalla sekvensoinnissa käytetään dATP α S:ää (deoksi-adenosiini- α -tio-trifosfaatti), jota lusiferaasi ei tunnista substraatikseen.

(D) Sekvensointialukkeen pidentäminen jatkuu halutun pituiseksi, ja nukleotidijärjestys voidaan määrittää pyrogrammin signaalihiikkien perusteella.

9 TYÖN SUORITUS

9.1 Pseudogeenin monistumisen estäminen

Pseudogeenit ovat alkuperäisen, proteiinia koodaavan geenin kopioita, joilla ei ole enää kykyä tuottaa toimivaa proteiinia (Mighell, Smith, Robinson ym. 2000). Pseudogeenit voivat olla tarpeettomia jäänteitä genomissa, mutta ne voivat myös osallistua muiden geenien ilmentymisen säätelyyn (Roberts & Morris 2013). PIK3CA-geenillä on pseudogeeni, jolla on yli 95% homologia PIK3CA:n eksonien 9-13 kanssa, mikä häiritsee eksoni 9:n helikaalisen alueen mutaatioiden määrittystä. Kodonissa 545 geenisekvenssi on GAG ja pseudogeenin vastaava sekvenssi GCG, kun taas kodonissa 542 sekvenssi on sama sekä geenissä että pseudogeenissä. (Muller, Miller, Hofmann ym. 2007.) Tämä edellyttää menetelmän PCR-reaktiolta erittäin suurta spesifisyyttä, jotta vain oikea kohdegeeni monistetaan ja sekvensoidaan.

9.1.1 Uusien PCR-alueiden suunnittelu ja testaus

PIK3CA-mutaatioanalyysin pystytysvaiheessa suurimmaksi ratkaistavaksi ongelmaksi oli jäänyt pseudogeenin monistumisesta johtuva taustasignaali, joka häiritsi tulosten analysointia (Välilehto 2013). Tässä vaiheessa PCR-reaktion alukkeina käytettiin kirjallisuuden perusteella alukkeita PIK3CAex9F ja PIK3CAex9R (Nosho ym. 2008; Liao ym. 2012) (taulukko 4). Näiden alukkeiden monistamalla alueella kodonissa 553 PIK3CA-geenissä on AGT ja pseudogeenissä A-C. Tämä kohta sijoittuu reverse-alukkeen keskelle, jolloin reaktio-olosuhteita tiukentamalla tuskin vältytään pseudogeenin monistumiselta. Tästä syystä ohjaajani oli menetelmän kehittämistä varten tilannut Bakerin ym. (2012) julkaisuun pohjautuen uusia alukkeita, joita aloin testata. Sekä alukepareissa PIK3CAex9F15813-ex9R15813 että PIK3CAex9F16813-ex9R16813 reverse-alue oli suunniteltu niin, että alukkeen 3'päähän sijoittuvan kodonin 533 kahden emäksen ero geenin ja pseudogeenin välillä mahdollistaisi spesifisen PIK3CA:n monistumisen. Tilasimme lisäksi myös kaksi muuta reverse-aluketta (PIK3CA-ex9R041013 ja PIK3CA-ex9031013), joista 3'-päähän viimeinen T jätettiin pois, koska se sitoutuu sekä PIK3CA-geenissä että pseudogeenissä vastinkohdassa olevaan A-emäkseen. Uusilla alukkeilla oli tavoitteena annealing-lämpötilaa tiukentamalla saada aikaan olosuhteet, joissa 3'-pästä vain PIK3CA-geeniin täysin sitoutuva alue pysyisi kiinni kohdesekvenssissä, jolloin monistuva tuote olisi spesifinen.

TAULUKKO 4. PCR-reaktiossa työn kuluessa testattujen alukkeiden ja monistettavien DNA-jaksojen sekvenssit. Lopulliseen käyttöön päätyneet on esitetty sinisellä. Monistettavassa sekvenssissä punaisella näkyvät yleisimmin mutatoituneet kodonit (eksonissa 9 kodonit 542 ja 545 ja eksonissa 20 kodoni 1047). Vihreällä merkitty on kodoni, jossa on kahden emäksen ero PIK3CA:n ja pseudogeenin välillä.

Eksoni 9		
Aluke	Alukkeen sekvenssi	Monistettava sekvenssi
PIK3CA-ex9F	5'-biotiiini- AACAGCTCAAAG CAATTTCTACACG-3'	AACAGCTCAA AGCAATTTCT ACACGAGATC CTCTCTCTGA AATCACT- GAG CAGGAGAAAAG ATTTTCTATG GAGTCACAGG T
PIK3CA-ex9R	5'-ACCTGTGACTC CATAGAAAATCTTT-3'	
PIK3CA-ex9F15813	5'-AAGGGAAAATGAC AAAGAACAGC-3'	AAGGGAAAAT GACAAAGAAC AGCTCAAAGC AATTTCTACA CGAGATCCTC TCTCTGAAAT CACTGAGCAG GAGAAAGATT TTCTAT- GGAG TCACAGGTAA GTGCTAAAAT GG
PIK3CA-ex9R15813	5'-biotiiini- CCATTTTAGCACTT ACCTGTGACT-3'	
PIK3CA-ex9F16813	5'-biotiiini-AACAGCTCA AAGCAATTTCTACA-3'	AACAGCTCAA AGCAATTTCT ACACGAGATC CTCTCTCTGA AATCACT- GAG CAGGAGAAAAG ATTTTCTATG GAGTCACAGG TAAGTGCTAA AATG
PIK3CA-ex9R16813	5'CATTTTAGCACTT ACCTGTGACT-3'	
PIK3CA-ex9R041013	5'CATTTTAGCACTT ACCTGTGAC-3'	AACAGCTCAA.....TGCTAA AATG
PIK3CA-ex9R031013	5'CCATTTTAGCACTT ACCTGTGAC-3'	AACAGCTCAA.....TGCTAA AATGG
Eksoni 20		
Aluke	Alukkeen sekvenssi	Monistettava sekvenssi
PIK3CA-ex20F	5'-biotiiini- CAAGAGGCTTTGGAG- TATTTCA-3'	CAAGAGGCTT TGGAGTATTT CATGAAACAA ATGAATGATG CA- CATCATGG TGGCTGGACA ACAAAAATGG ATTG
PIK3CA-ex20R	5'-CAATCCATTTTT GTTGTCCA-3'	

Taulukossa 4 on esitetty työn alussa käytössä olleet (PIK3CAex9F ja -ex9R) ja optimoinnin tuloksena nykyiseen käyttöön päätyneet alukkeet (PIK3CAex9F16813 ja -ex9R16813) sekä PCR-reaktioissa monistuvien DNA-jaksojen sekvenssit. Eksonin 20 PCR-alukkeet toimivat hyvin eikä niihin tehty muutoksia.

9.1.2 PCR:n olosuhteiden optimointi

Menetelmän pystytysvaiheessa PIK3CA-mutaatioanalyysissä oli käytetty seuraavanlaisia PCR-sykliä: 94 °C 20 s (denaturaatio), 50 °C 20 s (alukkeiden kiinnittyminen) ja 74 °C 40 s (pidennys) toistettuna 50 kertaa (Välilehto 2013). Sopivan alukkeiden kiinnitysmislämpötilan arvioinnissa voidaan hyödyntää alukkeiden sitoutumisen voimakkuutta kuvaavaa sulamislämpötilaa (T_m) eli lämpötilaa, jossa puolet alukkeesta on sitoutunut kaksinauhaiseksi kohdesekvenssinsä kanssa. Karkea arvio sulamislämpötilasta voidaan laskea ns. Wallacen säännön avulla, jossa $T_m = 2^{\circ}\text{C}(\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C}(\text{G}+\text{C})$, eli alukkeen A- ja T-emäkset nostavat lämpötilaa 2°C ja G- ja C-emäkset 4°C (Suominen ym. 2010; 158-160). Usein annealing-lämpötilana käytetään muutamaa astetta sulamislämpötilaa alempaa lämpötilaa, ja alukkeiden valmistajatkin antavat alukkeille erilaisilla laskentaohjelmilla suosituslämpötiloja, mutta käytännössä parhaan mahdollisen annealing-lämpötilan löytäminen edellyttää aina useamman lämpötilan testausta.

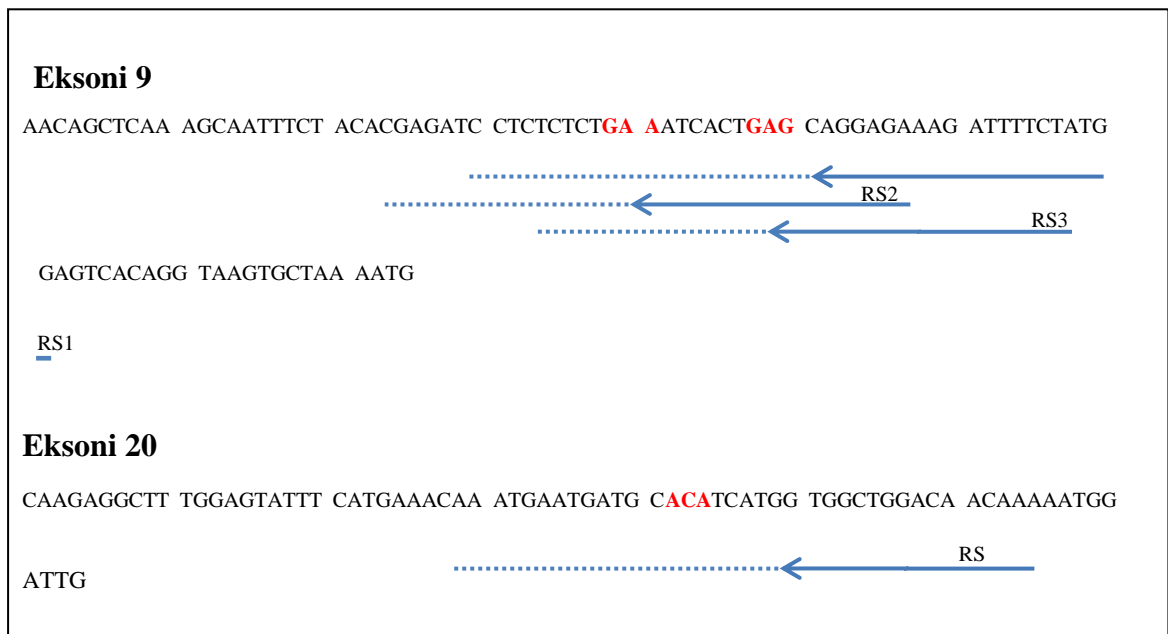
Menetelmän pystytysvaiheessa käytettyjen alukkeiden PIK3CAex9F ja PIK3CAex9R sulamislämpötilat Wallacen säännöllä laskettuna ovat 70°C ja 68°C, mihin nähden käytetty annealing-lämpötila 50°C oli hyvin alhainen, ja saattoi osaltaan selittää epäspesifisen tuotteen monistumisen. Tämän takia uusien alukkeiden testauksen yhteydessä oikea annealing-lämpötila varmistettiin tekemällä PCR-ajoja annealing-lämpötiloilla 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68 ja 70°C. PCR-laitteena käytetty T100 Thermal cycler (BioRad) mahdollistaa lämpötilagradientin käytön ajon aikana, mikä nopeuttaa oikean lämpötilan haarukointia. Tein parhaan annealing-lämpötilan määrittämiseksi tarvittavat PCR-ajot käyttämällä näytteenä kaupallista kontrolli-DNA:ta. Parhaan lämpötilan selvittyä varmistin reaktion toimivuuden myös parafiinileikkeistä eristetyillä potilas-DNA-näytteillä. Testasin myös exonin 20 alukkeiden toimivuuden samassa lämpötilassa.

9.2 Pyrosekvensoinnin optimointi

Sekvensoinnissa käytetyt alukkeet perustuvat aiempaan julkaisuun (Liao ym, 2012), mutta deoksinukleotidien dispensaatio- eli syöttöjärjestystä muokattiin työn edetessä niin, että mahdolliset nukleotidimuutokset tutkittavilla alueilla saatiin luotettavasti näkyviin (Taulukko 5). Dispensaatiota myös lyhennettiin rajaamaan sekvensointi tunnettujen mutaatioiden alueelle, mikä samalla lyhensi sekvensointi-aikaa (kuvio 4).

TAULUKKO 5. Pyrosekvensoinnissa käytettyjen alukkeiden sekvenssit, analysoitavat sekvenssit ja nukleotidien dispensaatiojärjestys. * IUPAC-nukleotidikoodit: K=G/T, Y=C/T, B=C/G/T (www.bioinformatics.org).

Aluke	Alukkeen sekvenssi	Anaysoitava sekvenssi	Dispensaatiojärjestys
PIK3CAex9-RS1	5'-CCATAGAAAATCTTTCTCCT-3'	G/TCTC/TAGTGATTTBAGA GAGAG	CGTACTGCAGTGCATT- CGAGA
PIK3CAex9-RS2	5'-TTCTCCTKCTYAGTGATTT-3' *	BAGAGAGAG	ACGTAGAGA
PIK3CAex9-RS3	5'-TAGAAAATCTTTCTCCTGCT-3'	C/TAGTGATTTCBAGAGAG AG	ACTAGTGAGTCGTAGA
PIK3CAex20-RS	5'-GTTGTCCAGCCACCA-3'	TGAT/CGTGC/TATC/TATTC /TATTTG	ATGCATACGTAGCT- GATCGATCAT



KUVIO 4. Sekvensoinnissa käytettyjen alukkeiden RS1, RS2 ja RS3 (eksoni 9) sijoittuminen ja RS (eksoni 20) PCR:llä monistetuille DNA-jaksoille. Nuolet esittävät alukkeita ja pisteviiva sekvensoitavaa jaksoa. Punaisella näkyvät yleisimmin mutatoituneet kodonit 542 ja 545 eksonissa 9 ja kodoni 1047 eksonissa 20.

9.3 Menetelmän herkkyden ja toistettavuuden määrittäminen

Jotta PIK3CA-mutaatioiden määrittäminen soveltuisi kliiniseen käyttöön, menetelmän herkkyys oli määritettävä. Tätä varten tilattiin kaupallisia E542K-, E545K- ja H1047R-mutaatiot sisältäviä FFPE-standardeja (50% PI3K α E542K FFPE Reference Standard, 50% PI3K α E545K FFPE Reference Standard ja 50% PI3K α H1047R (MCF10a) FFPE Reference Standard, Horizon Diagnostics, Cambridge, United Kingdom). Standardeissa käytetyissä solulinjoissa mutaatiot ovat heterotsygoottisena, eli ko.

mutatoidun alleelin tiheys näytteessä on 50%. Näytteistä eristettiin DNA ja määritettiin konsentraatio kuten edellä. Näytteistä tehtiin käyttölaimennos 1ng/μl, jota sekoitettiin pronsentuaalisissa suhteissa *PIK3CA*-villityyppiä edustavan kontrolli- DNA:n samanhavuisen laimennoksen kanssa (taulukko 6). Näin saatiin 2,5–50 % mutaatiota sisältävä sarja, jota näytteenä käyttäen PCR-reaktiossa (5μl/reaktio) voitiin selvittää menetelmän herkkyyttä.

TAULUKKO 6. Mutaatiofrekvenssarjan pipetointi.

Ref Std 50% 1ng/μl μl	Co DNA 1ng/μl μl	Mutaation osuus %
50	-	50
25	25	25
20	30	20
15	35	15
10	40	10
5	45	5
2,5	47,5	2,5

Selvitin menetelmän toistettavuutta tekemällä edellä mainittujen mutaatiofrekvenssarjojen PCR-reaktiot kahdella rinnakkaisella, jolloin pystyin arvioimaan menetelmän toistettavuutta erilaisilla näytteen mutaatiomäärillä. Herkkyysmäärittämissä exonista 9 monistettu jakso sekvensoitiin alukkeilla *PIK3CA*ex9-RS1(E545K) ja –RS2 (E542K), ja exonista 20 monistettu jakso sekvensointialukkeella *PIK3CA*ex20-RS (H1047R).

9.4 Kontaminaatioiden välttäminen

Työn pystytysvaiheessa havaittu menetelmän kontaminaatioherkkyys (Välilehto, 2013) säilyi haasteena myös menetelmän kehittämisessä. PCR-reaktion kontaminaatio-ongelmalla tarkoitetaan sellaisen DNA:n monistumista, joka ei ole peräisin monistettavasta näytteestä. Tämä tulee esiin monistumisena negatiivisessa kontrolliputkessa. Menetelmän herkkyys kontaminaatioille korostuu etenkin tilanteissa, joissa templaattia on hyvin vähän, kuten diagnostiikassa. Kontaminaatio-ongelma esiintyy helposti silloin,

kun samoja PCR-reaktioita tehdään paljon ja toistuvasti, jolloin riski monistettujen jaksojen kulkeutumiselle esim. työpinoille ja reagensseihin lisääntyy, ja niiden siirtyminen uusiin PCR-reaktioihin mahdollistuu. Tällöin PCR-työskentelyn tilojen ja työtapojen merkitys korostuu. PCR-reaktioiden valmistukseen tulisi olla oma, muusta laboratoriosta eristetty puhdistila, jossa reaktiot voidaan valmistaa laminaarivirtauskaapissa. Laminaarikaappi tulisi puhdistaa UV-valolla pipetointien välissä. PCR-työskentelyssä tulisi käyttää vain tähän tarkoitukseen olevaa pipettisarjaa ja suodattimen sisältäviä pipetinkärkiä, joilla estetään pipettien kontaminoituminen DNA:lla. Reaktioiden jälkeen PCR-putkia ei koskaan saisi käsitellä tilassa, jossa PCR-reaktioita pipetoidaan, vaan tuotteiden käsittelyyn varatussa erillisessä tilassa (Suominen & Ollikka, 1999, 111-112).

Työskentelyolosuhteet patologian osastolla tätä työtä tehdessä eivät olleet optimaaliset diagnostiselle PCR-tutkimukselle asetettuja edellytyksiä ajatellen, mikä osaltaan lisäsi työn haasteellisuutta kontaminaatioiden suhteen. PCR-reaktiot ja tuotteiden käsittely eli sekvensointi tehtiin muusta laboratoriosta erillään sijaitsevassa huoneessa, mutta näytteiden DNA-eristys ja PCR-reaktiot pipetoitiin vetokaapissa, jossa UV-puhdistuksen mahdollisuutta ei ollut. Osastolle suunniteltu remontti molekyyli-patologian tilojen nykyaikaistamiseksi viivästyi vuoden 2013 lopulla, minkä takia työskentelyssä piti noudattaa erityistä huolellisuutta ja ottaa tilojen haastellisuus koko ajan huomioon. Opinäytetyöni loppuvaiheessa hankittiin PCR-reaktioiden pipetointiin tarkoitettu pöytämallinen UV-lampulla varustettu laminaarikaappi. Tämä sijoitettiin DNA:n eristyspisteestä erilleen ja pääsin sitä käyttämään viimeisissä PCR-reaktioissa.

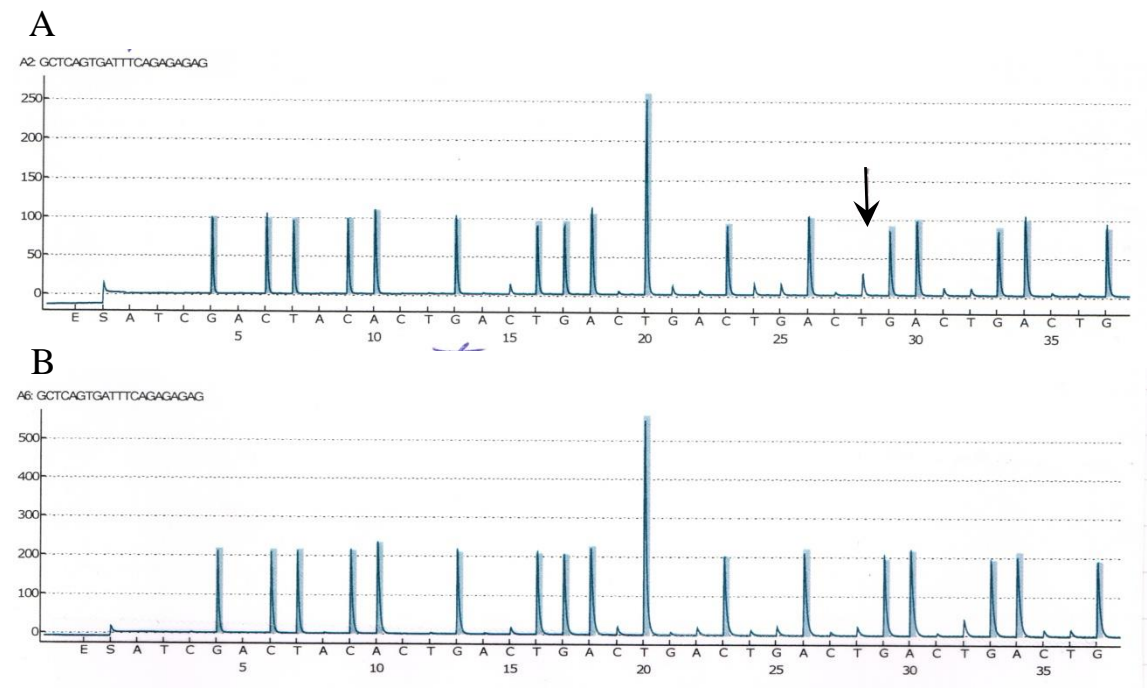
9.5 Menetelmän toimivuus rintasyöpänäytteillä

Työn päätteeksi testasin menetelmän toimivuutta rintasyöpänäytteillä, joiden PIK3CA-mutaatioiden olemassaolo tunnettiin. Keräsin aiempien tulosten perusteella 18 näytteen parafiiniblokkit, joista joko leikkasin leikkeitä tai otin ontolla biopsianeulalla näytteitä ja eristin DNA:n. Näytteet analysoitiin em. tavalla.

10 TULOKSET

10.1 Pseudogeenin monistumisen estäminen

Uudet alukeparit PIK3CAex9F15813-ex9R15813 ja PIK3CAex9F16813-ex9R16813 oli suunniteltu sillä ajatuksella, että eksonissa 9 kodonin 533 kahden emäksen ero geenin ja pseudogeenin välillä mahdollistaisi spesifisen PIK3CA:n monistumisen, kun tämä kohta sijoitettiin reverse-alukkeen 3'pään (taulukko 4). Tämä ei kuitenkaan riittänyt poistamaan pseudogeenin monistumista, mikä näkyi sekvensointituloksessa ”mutaatiopiikkinä” villityyppiä edustavassa kontrolli-DNA:ssa samalla tavalla kuin vanhoilla alukkeillakin (kuva 5A). Syy tähän löytyi PCR-alukkeiden sulamislämpötiloihin nähden hyvin matalasta PCR-reaktion annealing-lämpötilasta, joka alkuperäisessä PCR-ohjelmassa oli 50°C. Toimivaksi annealing-lämpötilaksi valikoitui gradienttijaon jälkeen 62°C, jossa 3'-päästä vain oikeaan kohdegeeniin täysin sitoutuva aluke pysyi kiinni kohdesekvenssissä ja pseudogeenin monistuminen estyi (kuva 5B).



KUVA 5. Sekvensointitulokset PCR-ajoista alukkeilla PIK3CAex9F ja PIK3CAex9R ja annealing-lämpötilana oli 50°C (A) ja alukkeilla PIK3CAex9F16813 ja -ex9R16813 ja annealing-lämpötilana 62°C (B). Pseudogeenin monistuminen näkyy ylimääräisenä piikkinä (merkitty nuolella).

Alukepareista PIK3CAex9F15813-ex9R15813 ja PIK3CAex9F16813-ex9R16813 jälkimmäiset toimivat paremmin johtuen mahdollisesti lyhyemmästä monistettavasta alueesta. Reverse-alueet PIK3CA-ex9R041013 ja PIK3CA-ex9031013, joista 3'-pään viimeinen T oli jätetty pois, eivät osoittautuneet paremmiksi kuin alukepari PIK3CAex9F16813-ex9R16813, mistä syystä tämä alukepari päättyi lopulliseen käyttöön.

Pyrosekvensointiin tehdyt em. muokkaukset osoittautuivat toimiviksi, ja tutkittavat mutaatiot saatiin luotettavasti esiin. Sekvensointialuke PIK3CAex9-RS3 oli ollut menetelmän pystytysvaiheessa varmistamassa RS1:llä ja RS2:lla saatua tulosta, mutta menetelmän luotettavan toimivuuden takia sen käytöstä jatkossa luovuttiin.

10.2 Esimerkkejä mutaatioanalyysin tuloksista

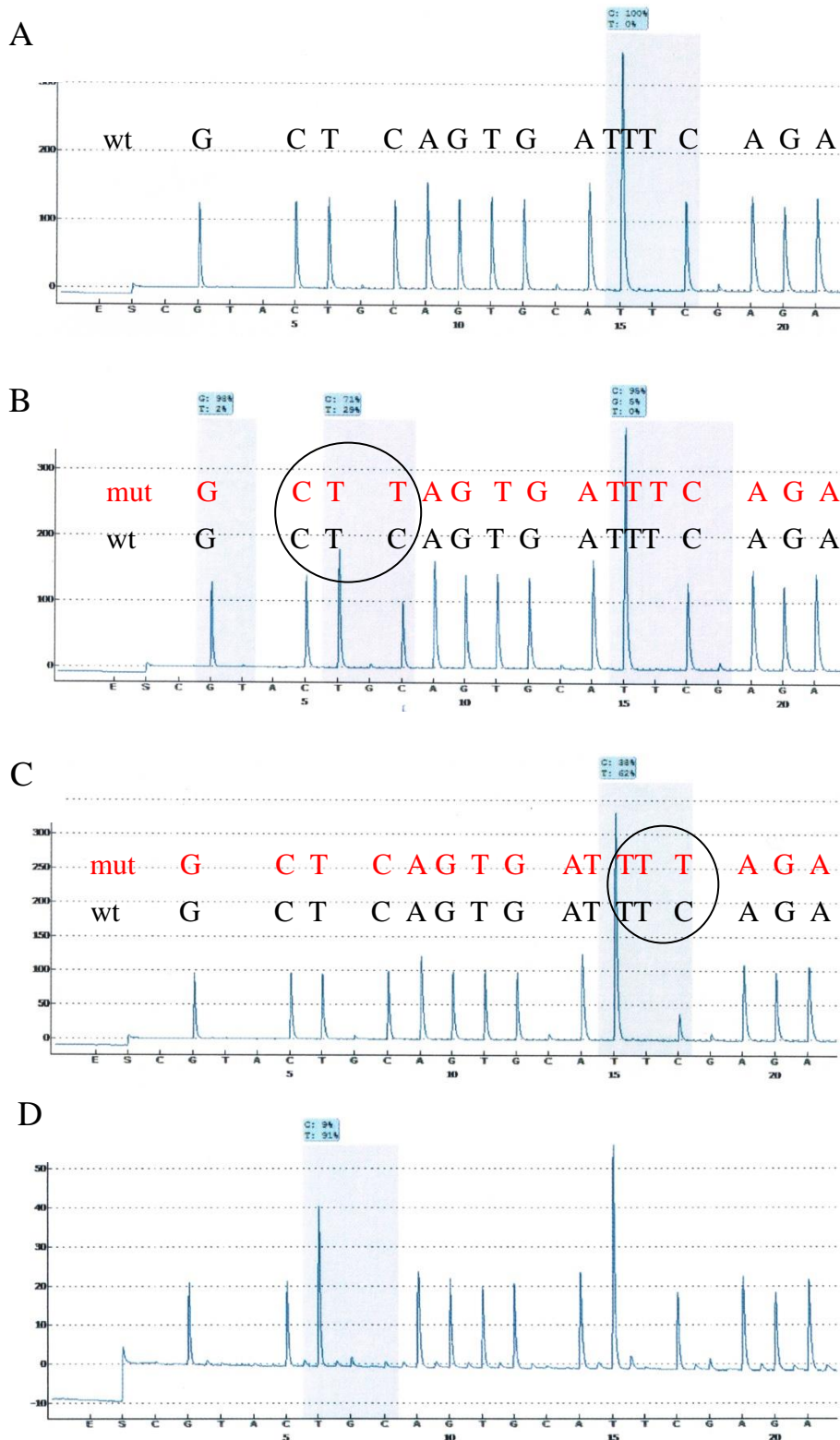
Kuviin 6 ja 7 on koottu esimerkkejä eksonista 9 sekvensointialukkeilla RS1 ja RS2 tehdyistä mutaatioanalyyseistä ja kuvassa 8 on esimerkkejä eksonista 20 sekvensointialukkeella RS tehdyistä analyyseistä. Kuvia tulkittaessa on hyvä pitää mielessä, että potilasnäyte sisältää aina sekä terveistä soluista lähtöisin olevaa villityypin DNA:ta että syöpäsolujen mutatoitunutta DNA:ta. Näin ollen sekvensointitulokset on aina sekoitus näistä. Kuviin on merkitty sekä villityypin että mutatoitun näytteen sekvenssi. Analysointorin antamat prosenttiluvut tutkittavien kohtien (ympyröity) emäsmäärille kertovat mutaatio-osuuden.

Kuvassa 6 on esimerkkejä sekvensointialukkeella RS1 eksonista 9 tehdyistä analyyseistä. Kuvassa 6A on villityypin DNA:sta tehty positiivinen kontrolli, josta sekvenssiksi saadaan G CTC AGT GAT TTC AGA. Sekvensointituloksessa useimmat samat peräkkäiset nukleotidit näkyvät korkeampana piikkinä. Kuvassa 6B on näyte K9073-05, jossa on mutaatio c.1633G>A eli kodonin 545 sekvenssi CTC on muuttunut sekvenssiksi CTT. Tämä näkyy analysoitavan kohdan sekvensointituloksessa niin, että villityypin DNA:n nukleotidi-C:n 100%:n osuus on muuttunut suhteeksi C:71%-T:29%. Kuvassa 6C on näyte K9980-09, jossa on mutaatio c.1624G>A eli kodonin 542 sekvenssi TTC on muuttunut sekvenssiksi TTT. Tämä näkyy analysoitavassa kohdassa nukleotidi-C:n 100% osuuden muuttumisena suhteeksi C:38%-T:62%. Kuvassa 6D on sekvensointitulokset negatiivisesta kontrollista, jossa optimitalanteessa ei pitäisi näkyä mitään. Menetel-

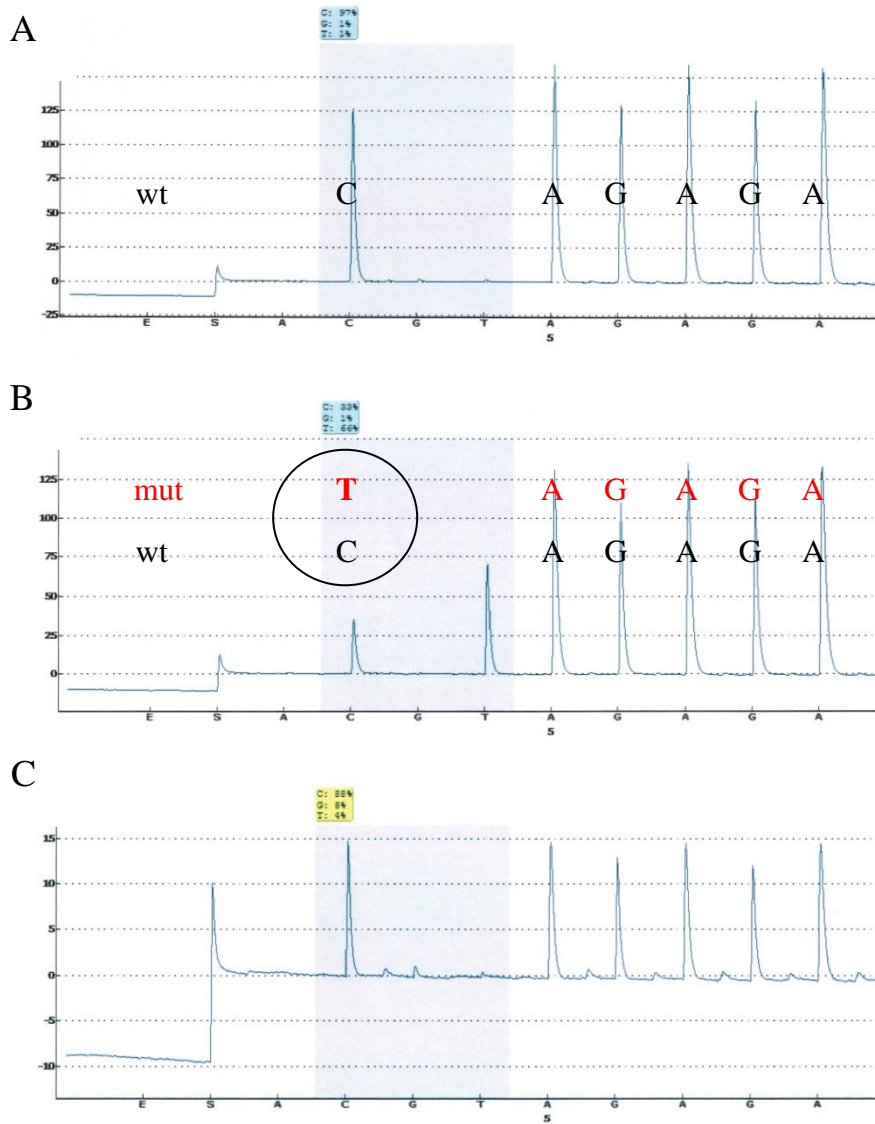
mässä esiintyneiden kontaminaatio-ongelmien takia, joista lisää seuraavassa kappaleessa, tässäkin sekvensointituloksessa näkyy kodonin 545 mutaatiota vastaava kontaminaatio. Signaalin taso on huomattavasti matalampi kuin potilasnäytteissä eikä näin ollen häiritse analyysiä. Kontaminaatio jää vähäisyytensä vuoksi myös positiivisen kontrollin signaalin alle.

Kuvassa 7 on esimerkkejä sekvensointialukkeella RS2 eksonista 9 tehdyistä analyyseistä. Kuvassa 7A on villityypin DNA:sta tehty positiivinen kontrolli, josta sekvenssiksi saadaan C AGA GA. Kuvassa 7B on analyysi näytteestä K9980-09, jossa on mutaatio c.1624G>A eli kodonin 542 sekvenssi TTC on muuttunut sekvenssiksi TTT. Tulokseksi saatu nukleotidisuhde C:33%-T:66% vastaa melko hyvin kuvassa 6C esitettyä tulosta samasta näytteestä, mutta RS1-alukkeella sekvensoituna. Kuvan 7C negatiivisessa kontrollissa näkyy myös hieman kontaminaatiota, mutta signaalin taso on näytteiden analyysitulokseen nähden merkityksetön.

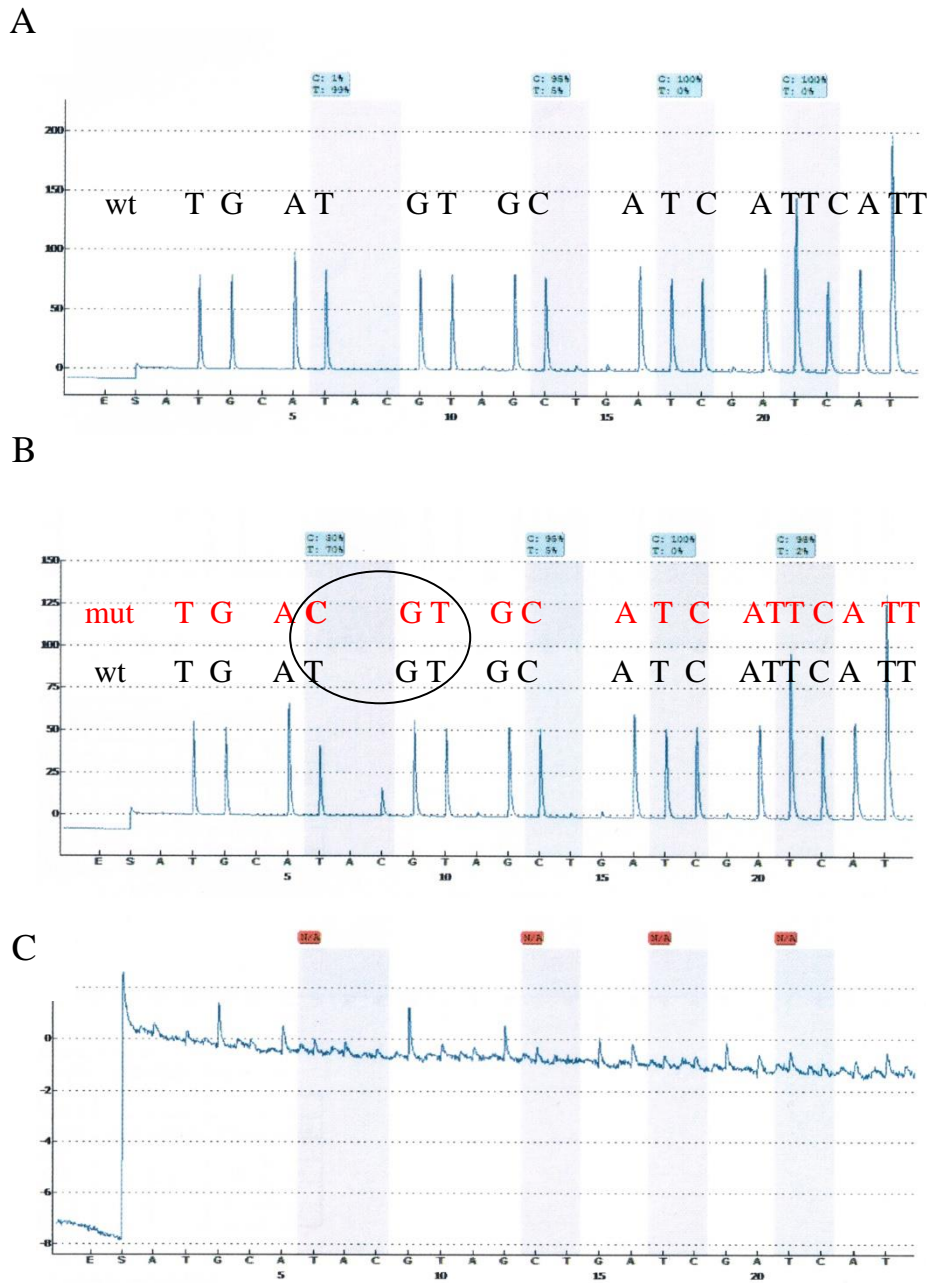
Kuvassa 8 on esimerkkejä sekvensointialukkeella RS eksonista 20 tehdyistä analyyseistä. Kuvassa 8A on villityypin DNA:sta tehty positiivinen kontrolli, josta sekvenssiksi saadaan TGA TGT GCA TCA TTC ATT. Kuvassa 8B on analyysi näytteestä K4873-12, jossa on mutaatio c.3140A>G eli kodonin 1047 sekvenssi TGT on muuttunut sekvenssiksi CGT ja nukleotidin-T:n 100%:n osuus on muuttunut suhteeksi C:30%-T:70%. Kuvan 8C negatiivinen kontrolli on täysin puhdas.



KUVA 6. Esimerkkejä alukeparilla PIK3CAex9F16813-ex9R16813 eksonista 9 tehdyn PCR-tuotteen sekvensoinnista sekvensointialukkeella RS1. Näytteinä villityyppiä edustava positiivinen kontrolli (A), K9073-05, jossa 1633G>A mutaatio kodonissa 545 (B), K9980-09, jossa 1624G>A mutaatio kodonissa 542 (C) ja negatiivinen kontrolli (D).



KUVA 7. Esimerkkejä alukeparilla PIK3CAex9F16813-ex9R16813 eksonista 9 tehdyn PCR-tuotteen sekvensoinnista sekvensointialukkeella RS2. Näytteinä positiivinen kontrolli (A), K9980-09, jossa 1624G>A mutaatio kodonissa 542 (B) ja negatiivinen kontrolli (C).



KUVA 8. Esimerkkejä alukeparilla PIK3CAex20F-ex20R eksonista 20 tehdyn PCR-tuotteen sekvensoinnista sekvensointialukkeella RS. Näytteinä positiivinen kontrolli (A), K4873-12, jossa 3140A>G mutaatio kodonissa 1047 (B) ja negatiivinen kontrolli (C).

10.3 Kontaminaatiot

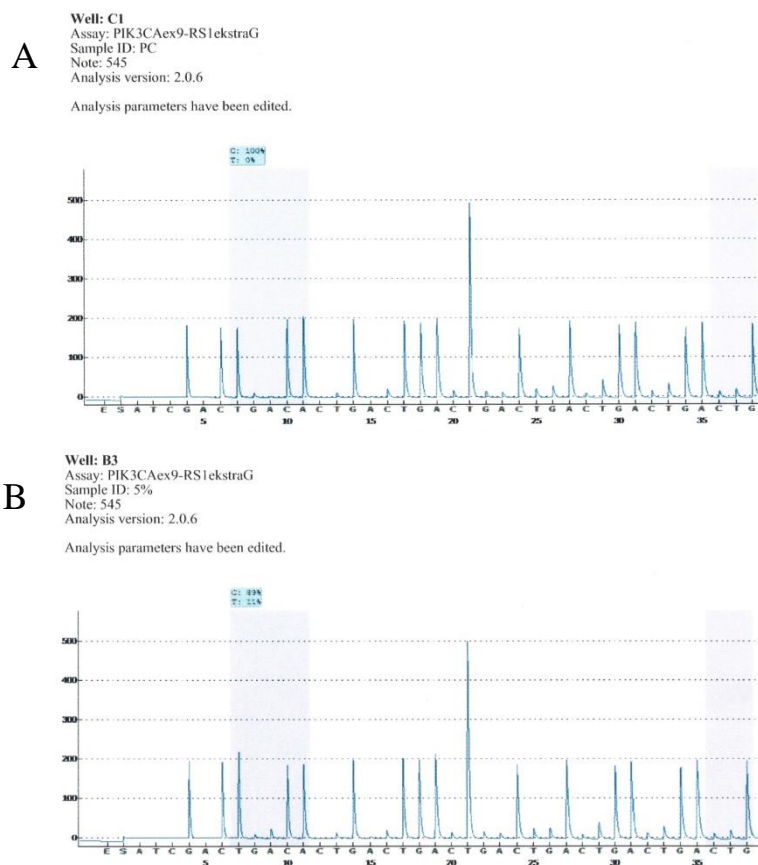
Työn alkuvaiheessa kontaminaatio-ongelma ilmeni samoin kuin aiemminkin, eli PCR-reaktioiden negatiivisessa kontrolliputkessa tapahtui monistumista. Sekvensoinnin perusteella monistuminen oli alkuperältään villityypin DNA:ta eli se saattoi olla lähtöisistä tahansa DNA:ta sisältävästä materiaalista. Koska muissa laboratorioissa tehdyissä testeissä ei vastaavaa ongelmaa esiintynyt, todennäköisin kontaminaation aiheuttaja oli monistettu PCR-tuote. Tällainen kontaminaatio ei lievänä häiritse kuitenkaan mutaatioiden määrittämistä, koska näyte-DNA:ta on yleensä paljon enemmän ja sen runsas monistuminen peittää kontaminaation alleen.

Samalla kun menetelmän herkkyyttä alettiin määrittää kaupallisilla mutaatiostandardeilla, kontaminaatio-ongelma paheni. Tapahtui pahin, eli negatiivisessa kontrollinäytteessä alkoi monistua mutatoitunut DNA (kuva 6D). Tämä siitä huolimatta, että työskentelin mutaatiostandardeilla erityisen huolellisesti ja tiedostaen kontaminaatoriskin vakavuuden, joka mutatoituneen DNA:n käsittelyyn liittyy. Mutaatiodiagnostiikassa tämän kaltainen kontaminaatio voi johtaa väärin positiivisiin tuloksiin.

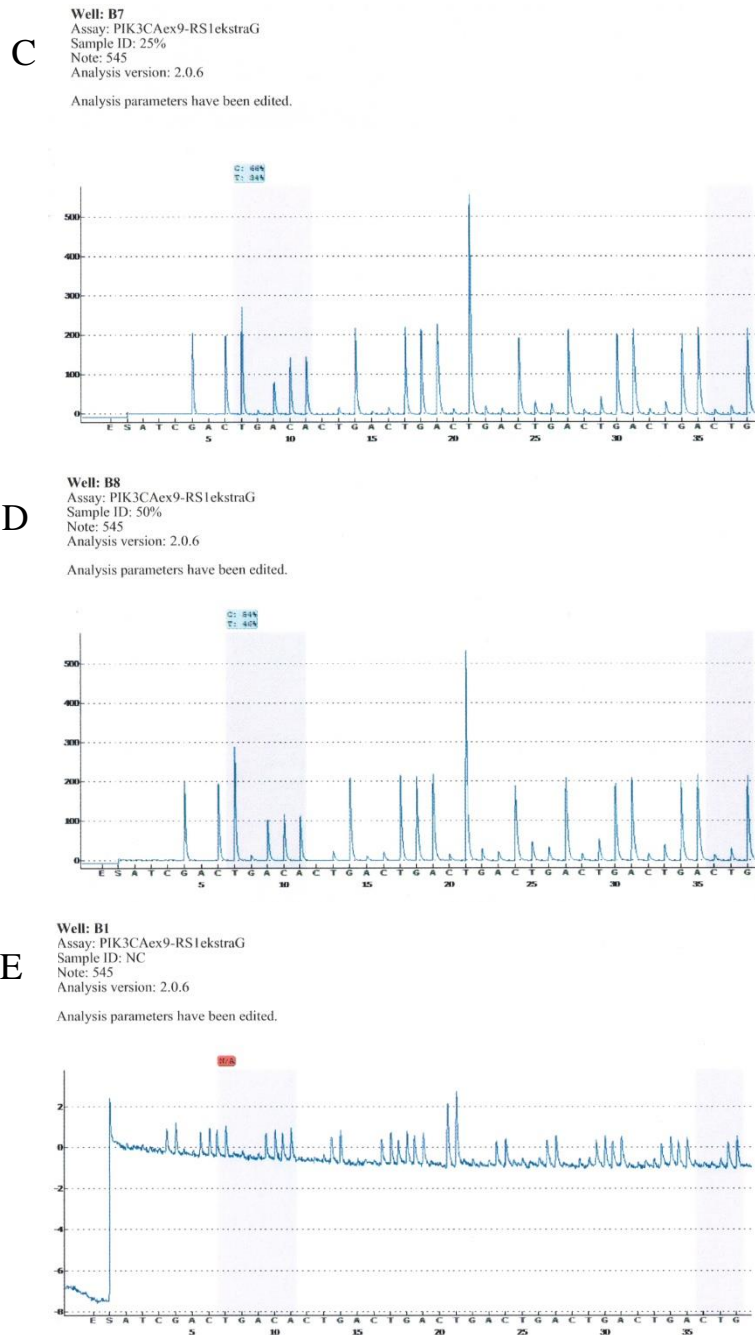
Todennäköisenä syynä kontaminaatioon olivat em. mainitut tämän kaltaiseen työhön soveltumattomat työtilat. Eristin mutaatiostandardien DNA:t samassa tilassa ja samaa pipettisarjaa käyttäen, joita käytin myös PCR-reaktioita pipetoitaessa. Tällaiset työvaiheet tulisi ehdottomasti tehdä erillisessä tilassa, jossa olisi mahdollisuus puhdistaa työtila ja pipetit UV-valolla aina työskentelyn jälkeen. Koska tällaista mahdollisuutta ei ollut, siivosimme työpisteitä perusteellisesti, kaikki PCR-reaktioihin käytetyt reagenssit uusittiin ja pidin taukoa PCR-reaktioiden tekemisessä. Näillä toimenpiteillä sain menetelmän toimimaan niin, että kontaminaatio ei enää häirinnyt diagnostiikkaa; mutatoituneen DNA:n monistuminen näkyi edelleen vähän negatiivisessa kontrollissa, mutta ei häirinnyt varsinaisten näytteiden tulosten tulkintaa, eli määrältään hyvin pienenä kontaminaatio jäi varsinaisesta näytteestä monistuvan jakson alle.

10.4 Menetelmän herkkyys ja toistettavuus

Menetelmän herkkyyden määrittämisessä käytettiin PCR-reaktioihin alukeparia PIK3CAex9F16813-ex9R16813 exonin 9 ja alukeparia PIK3CAex20R-PIK3CAex20F exonin 20 monistamiseen. Näytteinä olivat kaupallisista E542K-, E545K- ja H1047R-mutaatiot sisältävistä DNA-standardeista tehdyt 2,5–50% laimennokset. Sekvensoinnit tehtiin alukkeilla PIK3CAex9-RS1 (E545K), PIK3CAex9-RS2 (E542K) ja PIK3CAex20-RS (H1047R). Kuvassa 9 on esimerkkinä osa E545K-mutaation sisältävästä standardista tehdystä herkkyysmäärittäyssarjasta RS1:llä sekvensoituna. Positiivisessa kontrollissa eli villityypin DNA:ssa mutaatiota ei ole, jolloin kodonissa 545 nukleotidien suhde on C:100%-T:0% (kuva 9A). Kuvissa 9B, C ja D mutatoitun DNA:n osuus on 5, 25 ja 50%, jolloin nukleotidien C ja T osuudet vastaavasti muuttuvat ollen näissä analyseissä C:89%-T:11%, C:66%-T:34% ja C:54%-T:46%. Etenkin pienillä mutatoitun DNA:n osuuksilla analyysin tulos oli todellista mutaation määrää suurempi.



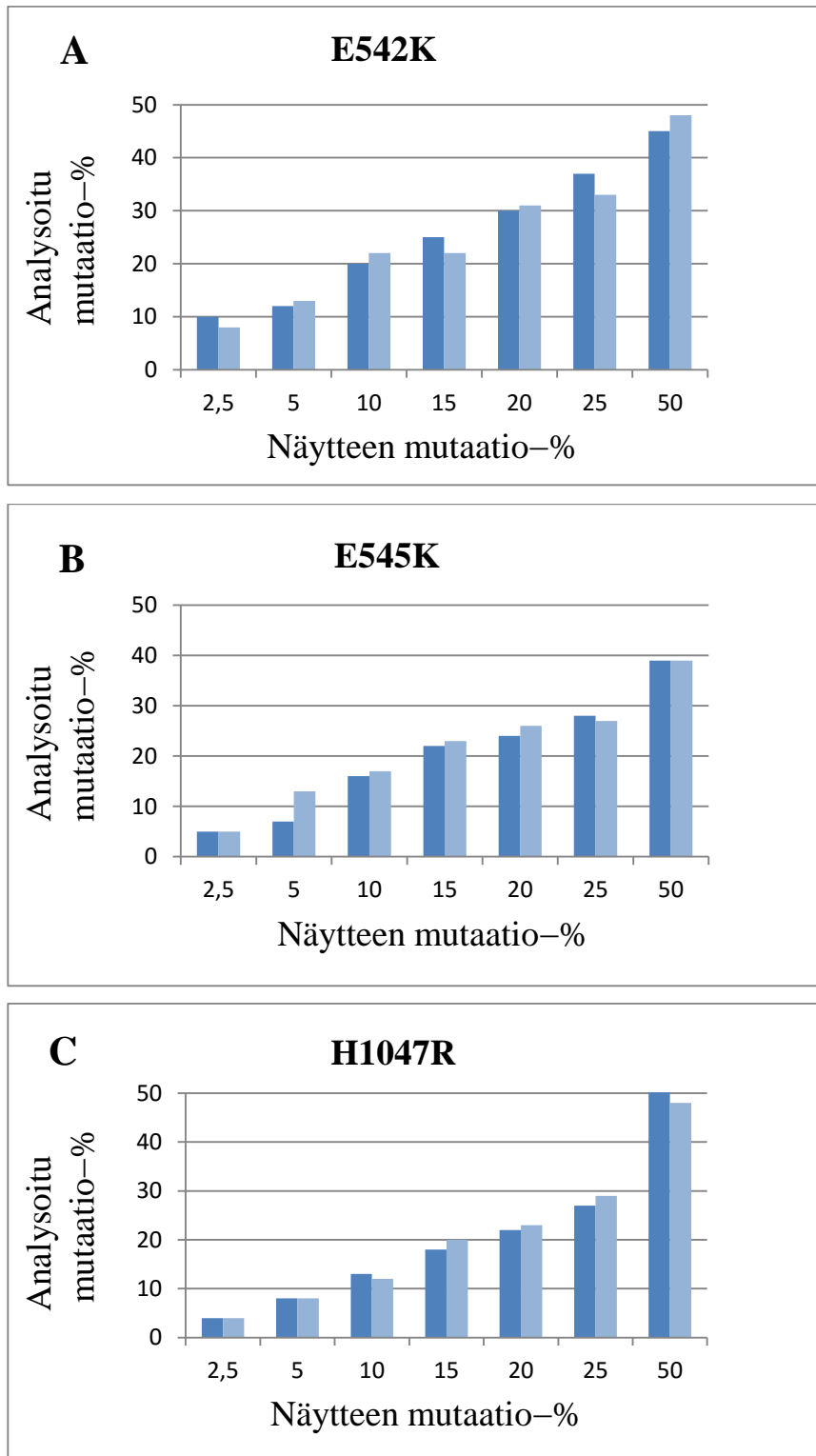
KUVA 9. (jatkuu seuraavalla sivulla)



KUVA 9. Esimerkkejä PIK3CAex9-RS1-alukkeella E545K-mutaation sisältävästä standardista tehdystä herkkyysmäärittämisestä. Kuvassa ovat positiivinen kontrolli (A), 5% (B), 25% (C) ja 50% (D) mutaatiota sisältävä laimennos sekä negatiivinen kontrolli (E).

Kahdella rinnakkaisella tehtynä herkkyysanalyysistä saatiin käsitys myös menetelmän toistettavuudesta. Kuvassa 10 esitetään laimennetuista mutaatiostandardeista (2,5–50%) saadut rinnakkaiset mutaatioanalyysin tulokset. Kaikkien mutaatioiden analyyseissä rinnakkaiset ovat melko hyvät, mikä osoittaa menetelmän toistettavuuden olevan hyvä. Useimmiten eniten poikkeamia rinnakkaisiin tuli hyvin pienillä mutaatiofrekvensseillä,

jolloin pienetkin pipetointierot rinnakkaisissa voivat vaikuttaa tulokseen suhteessa enemmän kuin suurissa pitoisuuksissa.



Kuva 10. Mutaatiofrekvensisarjasta (2,5–50%) määritetyt mutaatiopitoisuudet mutaatioille E542K (A), E545K (B) ja H1047R (C). Vierekkäiset pylväät kuvaavat samassa PCR-ajossa tehtyjä rinnakkaisia.

10.5 Rintasyöpänäytteiden analysointi

Testasin työni lopuksi menetelmän luotettavuutta aiemmin patologian osastolla analysoiduilla rintasyöpänäytteillä, joiden mutaatiostatus tunnettiin. Näytteistä löytyneet mutaatiot ja niiden määrä on esitetty taulukossa 7. Tulokset vastasivat hyvin aiemmin saatuja tuloksia, mikä tukee menetelmän toimivuutta ja käyttökelpoisuutta potilasnäytteiden analysoinnissa.

TAULUKKO 7. PIK3CA-mutaatiot rintasyöpänäytteissä.

näyte	Löytynyt mutaatio ja sen määrä		
K9767-13	c.1633G>A	p.E545K	34 %
K9234-13	c.1633G>A	p.E545K	32 %
K11255-12	c.1633G>A	p.E545K	16 %
K7437-12	c.1633G>A	p.E545K	30 %
K5050-12	c.1633G>A	p.E545K	37 %
K11372-12	c.1633G>C	p.E545K	14 %
K12380-13	c.3140A>G	p.H1047R	49 %
K16569-12	c.3140A>T	p.H1047L	20 %
K11531-12	c.3140A>G	p.H1047R	23 %
K11307-12	c.3140A>G	p.H1047R	8 %
K4873-12	c.3140A>G	p.H1047R	30 %
K1831-12	c.3140A>G	p.H1047R	26 %
K2868-12	ei mutaatioita		
K1151-12	ei mutaatioita		
K17508-12	ei mutaatioita		
K12150-13	ei mutaatioita		
K3956-13	ei mutaatioita		
K11640-12	ei mutaatioita		
K12236-12	ei mutaatioita		

11 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

11.1 Etiikka ja luotettavuus

Opinnäytetyö aloitettiin tutkimussuunnitelman teolla, jonka jälkeen työlle haettiin tutkimuslupa Keski-Suomen sairaanhoitopiiriltä. Työssä käytettiin näytteinä numeroituja, olemassa olevia parafiiniblokkeja, joiden käsittelyssä potilastiedot eivät tulleet missään vaiheessa esiin. Työn eettisyys ja luotettavuus perustuvat hyvän tieteellisen käytännön noudattamiseen kuten rehellisyyteen, huolellisuuteen ja tarkkuuteen, tieteellisen tutkimuksen kriteerien mukaisiin tiedonhankintatapoihin ja tutkimusmenetelmiin ja toisten tutkijoiden työn kunnioittamiseen ja asianmukaisiin viittauksiin. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta, 2013.)

Opinnäytetyön kuten kaiken muunkin tutkimustyön laatu määritellään työn luotettavuuden perusteella. Luotettavuus koostuu reliabiliteetistä eli tutkimustulosten pysyvyydestä ja validiteetista eli oikeiden asioiden tutkimisesta (Kananen 2012, 161). Tutkimustulosten pysyvyys tässä opinnäytetyössä tarkoittaa sitä, että kehitetty analysointimenetelmä löytää toistettavasti tutkittavana olevat mutaatiot. Edellytys menetelmän käytölle ja toistettavuudelle on luotettava dokumentointi työn kulusta (Kananen 2012, 165). Tämän opinnäytetyön kehitysvaiheen dokumentointi tapahtui yksityiskohtaista työpäiväkirjaa pitämällä. Työpäiväkirjani sisältää lähtökohtatilanteen, kaikki menetelmän kehitysprosessin vaiheet ja näiden tulokset sekä kehitysprosessiin liittyvän pohdinnan, eli miksi jotakin tehtiin ja mitä siitä seurasi. Työpäiväkirjani kuvaaman kehitysprosessin olen pyrkinyt kirjoittamaan opinnäytetyöni työn suoritus-kappaleeseen loogiseksi kokonaisuudeksi.

Validiteettia eli pätevyyttä tälle työlle antaa tiivis yhteistyö molekyylipatologian henkilökunnan kanssa. Aiheen valinta perustui heidän laajaan tietämykseensä syöpädiagnostiikasta ja kehitettäväksi valitun menetelmän tarpeellisuudesta. Tiivis yhteistyö ohjaajan kanssa kehitystyön kuluessa lisäsi tehtyjen ratkaisujen validiteettia. Perehdyin aiheeseen liittyvään kirjallisuuteen hyvin tutkimussuunnitelmaa tehdessäni ja edelleen opinnäytetyötä kirjoittaessani, ja olen pyrkinyt kokoamaan lukijalle olennaisimman ja ajan tasalla olevan tietoperustan, johon opinnäytetyöni pohjautuu.

11.2 Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset

Opinnäytetyöni tarkoituksena oli kehittää *PIK3CA*-mutaatioanalyysimenetelmä potilasnäytteiden diagnostiseen testaukseen soveltuvaksi. Tämä edellytti menetelmän olosuhteiden ja työskentelytapojen muokkausta.

Pseudogeenin monistumisen estäminen oli työn ensimmäinen haaste ja ehdoton edellytys menetelmän kliiniselle käytölle. Analysoitavissa mutaatiokohdissa eksonin 9 kodoneissa 545 ja 542 ero geenin ja pseudogeenin välillä on hyvin pieni. Kodonissa 545 pseudogeenin sekvenssi on GCG ja *PIK3CA*-geenin GAG, kun taas kodonissa 542 sekvenssi on molemmissa sama. Etenkin potilasnäytteissä, joissa tuumorisoluja on vähän, pseudogeenin monistuminen voi johtaa väärin tulkintoihin. Pseudogeenin tahaton monistuminen voi piilottaa kodonissa 542 olevan mutaation tai pseudogeenistä kodonissa 545 monistuva muutos voidaan virheellisesti tulkita mutaatioksi. PCR-reaktiossa monistumisen onnistuminen on täysin riippuvainen alukkeiden sitoutumisesta kohdesekvenssiin. Erityisesti alukkeen 3'-pään, johon polymeerasi sitoutuu ja aloittaa monistamisen 5'→3'-suuntaan, kiinni pysyminen kohde-DNA:ssa on välttämätöntä. Näin ollen tämän kohdan sitoutumisen heikentämisellä monistuminen voidaan myös estää. Tähän pyrittiin suunnittelemalla eksonin 9 reverse-alue niin, että alue sitoutuu täydellisesti 3'-päästään vain *PIK3CA*-geeniin. Tällöin pseudogeeniin heikommin sitoutunut alue ei riittävän korkeassa alukkeen kiinnittymislämpötilassa pysy kunnolla kiinni, eikä pseudogeenin monistumista tapahdu. Tämä teoria toimi käytännössä hyvin, ja spesifinen *PIK3CA*-geenin monistuminen toteutui.

Kontaminaatio-ongelma oli työn toinen haaste. PCR-reaktioon perustuvassa diagnostikassa tulee olla ehdottoman varma, että monistunut tuote on vain ja ainoastaan potilasnäytteestä monistunutta. Tämä varmistetaan aina PCR-ajossa mukana olevalla negatiivisella kontrollireaktiolla, jonka ainoana erona muihin reaktioihin on näytteen sijasta lisätty vesi. Mutaatiodiagnostikassa pahin mahdollinen kontaminaatio on lähtöisin mutaation sisältävästä DNA:sta, jolloin monistuminen voi johtaa väärin positiivisiin tuloksiin. Kontaminaatio voi olla lähtöisin mutaation sisältävästä potilasnäytteestä, tai kuten tässä työssä, menetelmän herkkyyden analysointiin käytetystä mutaatiostandardista. Vaikka mutaatiostandardien käsittelyyn liittyvät riskit tiedostettiin, ja niitä käsiteltiin suurella huolellisuudella, pahin silti tapahtui. PCR-reaktioihin käytetyt reagenssit vaihdettiin,

työtilat puhdistettiin ja PCR-reaktioiden teossa pidettiin tauko. Näillä toimenpiteillä kontaminaatio saatiin riittävän vähäiseksi ja pystyin saattamaan työni loppuun.

Herkkyys- ja toistettavuusmäärittämissä menetelmä osoittautui hyvin herkäksi ja toistettavaksi. Mutaatiostandardeista tehtyjen laimennossarjojen analyysituloksissa menetelmä antoi etenkin pienillä mutatoituneen DNA:n osuuksilla todellista mutaation määrää suuremman tuloksen. Yksi selitys tälle voi olla jokin tekijä mutaatiostandardien laadussa, joka voimisti monistumistehokkuutta. Menetelmän suuri herkkyys selitti osaltaan myös menetelmän suurta kontaminaatioalttiutta. Työn lopuksi menetelmällä analysoitiin joukko rintasyöpänäytteitä, joiden mutaatiostatus tiedettiin aiempien määritysten pohjalta. Menetelmä löysi mutaatiot luotettavasti.

Työn käytännön laboratorio-osuudessa korostuivat molekyylibiologisten menetelmien vaatima tarkkuus ja huolellisuus ja hyvien työskentelyolosuhteiden merkitys. Patologian osaston molekyylibiologian tilojen puutteellisuus oli osastolla tiedostettu, ja uusien tilojen remontoinnin valmistumista odoteltiin. Opinnäytetyöni loppuvaiheessa käyttöön saatiin pöydällä pidettävä PCR-käyttöön tarkoitettu UV-kaappi, joka mahdollisti PCR-reaktioiden pipetoinnin laminaari-virtauksen suojissa. Kaapin UV-lamppu mahdollisti myös työskentelyalueen dekontaminoinnin käytön jälkeen. Vuoden 2014 alkupuolella patologian osastolle valmistuivat uudet molekyylibiologian käyttöön tarkoitetut tilat, joissa edellä mainitut puutteet on hyvin saatu korjattua. Näin ollen olosuhteet syöpän diagnostiikassa käytettävien mutaatioanalyysien suhteen ovat nyt kunnossa.

Tekijän aiempi kokemus molekyylibiologian töistä oli suurena apuna paitsi käytännön laboriotöissä myös kehitystyön eri vaiheiden pohdinnassa ja työn eteenpäin viemisessä. Työn merkityksen hahmottaminen ja teoretien omaksuminen vaati laajaa kirjallisuuteen perehtymistä, ja syvensi tekijän tietämystä syöpäsairauksista huomattavasti. Opinnäytetyö tuotti käyttökelpoisen analyysimenetelmän PIK3CA:n yleisimpien mutaatioiden määrittämiseen. Opinnäytetyö antoi tekijälleen hyvän perehdytyksen nykyaikaiseen syöpädiagnostiikkaan, jossa geenitestauksilla on yhä enenevässä määrin merkittävä rooli.

LÄHTEET

- Aittomäki, K. ja Peltomäki, P. 2006. Syövän genetiikka. Teoksessa Aula, P., Kääriäinen, H. ja Palotie, A. (toim.): Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 186–205.
- Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D.J., Juan, D., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., Patterson, S.D. & Chang, D.D. 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26, 1626-1634.
- American Cancer Society. 2013. Targeted cancer therapy. <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/targetedtherapy/targeted-therapy-types>. Luettu 10.1.2015.
- Baker, C.L., Vaughn, C.P. & Samowitz, W.S. 2012. A PIK3CA pyrosequencing-based assay that excludes pseudogene interference. *Journal of Molecular Diagnostics*, 14(1), 56-60.
- Bono, P. & Joensuu H. 2010. Rintasyövän uudet täsmälääkehoidot. *Duodecim* 126, 1205-1215.
- Boveri, T. 2008. Concerning the Origin of Malignant Tumors by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *Journal of Cellular Sciences*. 121(Suppl 1), 1-84.
- Campbell, I.G., Russell, S.E., Choong, D.Y ym. 2004. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Research* 64, 7678-7681.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P ym. 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *New England Journal of Medicine* 364, 2507-2516.
- Chial, H. 2008. Proto-oncogenes to Oncogenes in Cancer. *Nature Education* 1(1):33.
- Courtney, K.D., Corcoran, R.B. & Engelman, J.A. 2010. The PIK3K pathway as drug target in human cancer. *Journal of clinical oncology* 28, 1075-1083.
- Croce, C.M. 2008. Oncogenes and cancer. *The New England Journal of Medicine* 358(5), 502-511.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein B. 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301, 89-92.
- Futreal, P.A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N. & Stratton, M.R. 2004. A census of human cancer genes. *Nature review of cancer* 4(3), 177-183.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1), 57-70.

Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5), 646-674.

Isola, J. 2013. Kasvunrajoitegeenit syövän kehittämisessä. Teoksessa H. Joensuu , Peter J. Roberts , Pirkko-Liisa Kellokumpu-Lehtinen , Sirku Jyrkkö , Mauri Kouri & Lyly Teppo (toim.) *Syöpätaudit*. Helsinki: Duodecim.

Isola, J., & Kallioniemi, A. 2013. Onkogeenit syövän synnyssä. Teoksessa H. Joensuu , Peter J. Roberts , Pirkko-Liisa Kellokumpu-Lehtinen , Sirku Jyrkkö , Mauri Kouri & Lyly Teppo (toim.) *Syöpätaudit*. Helsinki: Duodecim.

IUPAC Codes. Luettu 13.10.2013. <http://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html>.

Kananen, J. 2012. Kehittämistyö opinnäytetyönä. Kehittämistutkimuksen kirjoittamisen käytännön opas.

Kuula, A. 1999. Toimintatutkimus: Kenttätyötä ja muutospyrkimyksiä. Tampere: Vastapaino.

Knudson, A. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68(4), 820-823.

Liao, X., Morikawa, T., Lochhead, P ym. 2012. Prognostic role of PIK3CA mutation in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Clinical Cancer Research* 18(8), 2257-2268.

MacConaill, L.E. & Garraway, L.A. 2010. Clinical Implications of the Cancer Genome. *Journal of Clinical Oncology* 28 (35), 5219-5228.

Martin, D. & Gutkind, J.S. 2008. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene* 27, S31-42.

Martini, M., Vecchione, L., Siena, S ym. 2012. Targeted therapies: how personal should we go? *Nature Reviews Clinical Oncology* 9, 87-97.

Mighell, A.J., Smith, N.R., Robinson, P.A ym. 2000. Vertebrate pseudogenes. *FEBS Letter* 468, 109-114.

Muller, C.I., Miller, C.W., Hofmann, W.K ym. 2007. Rare mutations of the PIK3CA gene in malignancies of the hematopoietic system as well as endometrium, ovary, prostate and osteosarcomas, and discovery of a PIK3CA pseudogene. *Leukemia Research* 31, 27-32.

Myllykangas, S., Koskenvuo, J.W. & Alastalo, T-P. 2013. Uuden polven sekvensointimenetelmät geenidiagnostiikassa. *Duodecim* 129, 141-148.

Nosho, K., Kawasaki, T., Ohnishi M ym. 2008. PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia* 10(6), 534-541.

O'Brien, S.G., Guilhot, F., Larson, R.A ym. 2003. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 348, 994-1004.

Oliveira, M., Navarro, A., De Mattos-Arruda, L., Sánchez-Ollé, G., Bellet, M., Balmaña, J., Gómez-Pardo, P., Perez-Garcia, J.M., Muñoz-Couselo, E., Vidal, M., Ortega, V., Dienstmann, R., Aura, C., Prudkin, L., Vivancos, A., Ahnert, J.R., Baselga, J., Jabernerero, J., Cortes, J. and Saura, C. 2012. PI3K pathway (PI3Kp) dysregulation and response to pan-PI3K/AKT/mTOR/dual PI3K-mTOR inhibitors (PI3Kpi) in metastatic breast cancer (MBC) patients (pts). *Journal of Clinical Oncology* 30(Suppl.): abstract 509.

Parada, L.F., Tabin, C.J., Shih, C ym. 1982. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras oncogene. *Nature* 297, 474-478.

Pekkonen, P. & Ojala, P.M. 2013. Virusinfektio – monimuotoinen syövän aiheuttaja. *Duodecim* 129 (15), 1545-1551.

Qiagen. 2012. QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook — June 2012. Luettu 8.10.2013. <http://www.qiagen.com>

Qiagen. 2013. Pyromark Q24 Advanced User Manual. 06/2013. Luettu 10.10.2013. <http://www.qiagen.com>

Ristimäki, A., Franssila, K. & Kosma, VM. 2013. Syövän patologia. Teoksessa Joensuu, H., Roberts, P.J., Kellokumpu-Lehtinen, PL., Jyrkkiö, S., Kouri, M. & Teppo L. (toim.) *Syöpätaudit*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Ristimäki, A., Kytölä, S., Haglund, C. & Bono, P. 2013. Syöpäpotilaan täsmähoito on moniammatillista yhteistyötä. *Duodecim* (129), 1071-1079.

Roberts, T.C. & Morris, K.V. 2013. Not so pseudo anymore: pseudogenes as therapeutic targets. *Pharmacogenomics* 14(16), 2023-2034.

Rothwell, P.M., Wilson, M., Elwin, C.E., Norrving, B., Algra, A., Warlow, C.P. & Meade, T.W. 2010. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomized trials. *Lancet* 376, 1741-1750.

Saal, L.H., Holm, K., Maurer, M., Memoe, L., Su, T., Wang, X., Yu, J.S., Malmström, P.O., Mansukhani, M., Enoksson, J., Hibshoosh, H., Borg, A. & Parsons, R. 2005. Pik3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Research* 65(7), 2554-2559.

Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., ym. 2004. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304, 554.

Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. & Vogt, P.K. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260, 170-173.

Stemke-Hale, K., Gonzalez-Angulo, A.M., Lluch, A., Neve, R.M., Kuo, W.L., Davies, M., Carey, M., Hu, Z., Guan, Y., Sahin, A., Symmans, W.F., Pusztai, L., Nolden, L.K., Horlings, H., Berns, K., Hung, M.C., van de Vijver, M.J., Valero, V., Gray, J.W., Bernards, R., Mills, G.B. & Hennessy, B.T. 2008. An integrative genomic and proteomic

analysis of PIK3CA, PTEN and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Research* 68(15), 6084-6091.

Stratton, M.R., Campbell, P.J. & Futreal, P.A. 2009. The cancer genome. *Nature Reviews* 458 (9), 719-724.

Suominen, I. & Ollikka, P. 1999. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Opetushallitus. Helsinki. Hakapaino Oy.

Tabin, C.J., Bradley, S.M., Bargmann, C.I., Weinberg, R.A., Papageorge, A.G., Scolnick, E.M., Dhar, R., Lowy, D.R. & Chang, E.H. 1982. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300, 143-149.

Tieva, A. & Peltomäki, P. 2012. Epigeneettiset muutokset syövässä. *Duodecim* 128(1), 62-71.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta, opetus- ja kulttuuriministeriö. 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö. <http://www.tenk.fi/fi/htk-ohje>, luettu 5.1.2014.

Tyybäkinaja, A. & Knuutila, S. 2006. Molekyyliryötyypitys – raja sytogenetiikan ja molekyylibiologian väliltä häviämässä. *Duodecim* (122), 2018-2022.

Van Cutsem, E., Köhne, C.H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C.R., Makhson, A., D'Haens, G., Pintér, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J.K., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, S., Schlichting, M., Nippgen, J. & Rougier, P. 2009. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine* 360, 1408-1417.

Välilehto, O. 2013. Pyrosekvensointi *PIK3CA*-mutaatioanalyysin työkaluna. Vaihtoehtoiset ammattiopinnot. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Tampereen ammattikorkeakoulu.

Weinstein, I.B. & Joe, A.K. 2006. Mechanisms of disease: Oncogene addiction – a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology* 3(8), 448-457.

Zhang, X., Li, X. & Zhan, J. 2013. Current status and future perspectives of PI3K and mTOR inhibitor as anticancer drugs in breast cancer. *Current Cancer Drug Targets* 13, 175-187.

LIITTEET

1(2)

Liite 1. DNA:n eristys

DNA:N ERISTÄMINEN FORMALIINIFIKSOIDUISTA JA PARAFIINIIN VALETUISTA KUDOSNÄYTTEISTÄ
(QIAmp DNA FFPE Tissue Kit, Qiagen) (suomentanut Vällilehto 2013)

1. Kuumenna lämpöhaude 56 °C:een.
2. Poista ylimääräinen parafiini näyteblokeista.
3. Leikkaa mikrotomilla 3–8 leikettä (paksuus 5–10 µm, max. 250 mm²). Hylkää ensimmäiset 2–3 leikettä, mikäli näyteblokki on ollut kosketuksessa ilman kanssa.
4. Kerää leikkeet 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkiin ja lisää näytteisiin 1 ml ksyleeniä.
5. Vorteksoi voimakkaasti 10 s.
6. Sentrifugoi täydellä nopeudella (20 000 x g/14 000 rpm) 2min huoneenlämmössä.
7. Poista supernatantti pipetoimalla.
8. Lisää näytteisiin 1 ml etanolia (96–100 %) ja sekoita vorteksoimalla.
9. Sentrifugoi täydellä nopeudella 2 min. huoneenlämmössä.
10. Poista supernatantti pipetoimalla.
11. Avaa putket ja anna näytteiden kuivua huoneenlämmössä (tai 37 °C) 10 min tai kunnes kaikki etanoli on haihtunut.
12. Suspensoi pelletti 180 µl:aan ATL-puskuria.
13. Lisää 20 µl proteinaasi K:ta ja sekoita vorteksoimalla.
14. Inkuboi 56 °C:ssa 1 h tai kunnes näyte on täysin hajonnut.
15. Inkuboi 90 °C:ssa 1 h.
16. Sentrifugoi lyhyesti.
17. Lisää 2 µl RNAaasi A:ta (100 mg/ml) ja inkuboi 2 min huoneenlämmössä.
18. Lisää 200 µl AL-puskuria ja sekoita vorteksoimalla.
19. Lisää 200 µl etanolia (96–100 %) ja sekoita vorteksoimalla.
20. Sentrifugoi 15 s.
21. Aseta QIAmp MInElute -puhdistuspylväs keräysputkeen, ja siirrä näyteliuos pylvääseen.
22. Sentrifugoi 8 000 rpm 1 min.
23. Poista keräysputken liuos, ja siirrä pylväs puhtaaseen keräysputkeen.
24. Lisää pylvääseen 500 µl AW1-puskuria.
25. Sentrifugoi 8 000 rpm 1 min.

jatkuu

2(2)

26. Poista keräysputken liuos, ja siirrä pylväs puhtaaseen keräysputkeen.
27. Lisää pylvääseen 500 µl AW2-puskuria.
28. Sentrifugoi 8 000 rpm 1 min.
29. Poista keräysputken liuos, ja siirrä pylväs puhtaaseen keräysputkeen.
30. Sentrifugoi täydellä nopeudella (20 000 x g/14 000 rpm) 3 min.
31. Aseta pylväs puhtaaseen keräysputkeen.
32. Lisää 20–200 µl ATE-puskuria pylvään kalvon keskelle.
33. Inkuboi 5 min huoneenlämmössä.
34. Sentrifugoi täydellä nopeudella (20 000 x g/14 000 rpm) 1 min.
35. Säilytä DNA lyhytaikaisesti 4 °C:ssa tai pidempiaikaisesti -20 °C tai -80 °C:ssa mielellään eriin jaettuna.

Liite 2. Näytteiden valmistelu pyrosekvensointia varten

1(2)

NÄYTTEIDEN VALMISTELU PYROSEKVENSOINTIA VARTEN
(PyroMark Q24 Advanced User Manual, Qiagen) (suomentanut Vällilehto 2013)

1. Laimenna sekvensointialukkeet 10 μM :n pitoisuuteen annealing-puskurilla.
2. Valmista DNA:n sitomiseen tarvittava liuos:

Streptavidin sepharose high performance	2 μl
Pyromark binding-puskuri	40 μl
H ₂ O	28 μl

Yhteensä	70 μl

3. Pipetoi liuosta kuoppalevyille 70 μl /näyte.
4. Lisää 10 μl PCR-tuotetta.
5. Sekoita ravistelijalla 10 min 1 400 rpm.
6. Laimenna sekvensointialukkeet:

10 μM alukeliuos	0,8 μl
Pyromark annealing-puskuri	24,2 μl

Yhteensä	25 μl

7. Lisää laimennettua sekvensointialuketta Pyromark Q24 –levylle 25 μl /näyte.
8. Valmista näytteet Pyromark-vakuumityöasemassa:

Aseta PCR-levy ja Pyromark Q24-levy työasemaan.

Käynnistä vakuumpumppu ja imulaite.

Aseta imulaitteen suodatinkärjet PCR-levyn kuoppiin 15 s ajaksi.

Siirrä imulaite 70 % etanoliin 5 s ajaksi.

Siirrä imulaite denaturaatioliuokseen 5 s ajaksi.

Siirrä imulaite pesupuskuriin 10 s ajaksi.

Nosta imulaite ylös ja pystyasentoon (yli 90°) 5 s ajaksi, jotta suodatinkärjet kuivahtavat.

Sulje imulaite (off).

Aseta imulaitteen suodatinkärjet Pyromark Q24 –levyn kuoppiin, ja liikuta työkalua edestakaisin sivuttain vapauttaaksesi templaatti-DNA:n.

jatkuu

2(2)

Puhdista imulaite liikuttamalla sitä edestakaisin puhdistetun veden astiassa (H₂O I) 10 s.

Siirrä imulaite seuraavaan puhdistetun veden (H₂O II) astiaan, ja käynnistä imu.

Nosta imulaite ylös ja pystyasentoon (yli 90°) 5 s ajaksi, jotta suodatinkärjet kii-
väävät.

Sammuta imulaite ja vakuumpumppu sekä aseta imulaite P-asemaan (parking).

9. Inkuboi Pyromark Q24 –levyä 2 min 80 °C:ssa.
10. Anna näytteiden jäähtyä vähintään 10 min huoneenlämmössä.
11. Valmistele sekvensoinnin ajo-ohjelma PyroMark Q24 –ohjelmalla.
12. Liuota kylmäkuivatut entsyymi ja substraatti 620 µl:aan puhdistettua vettä.
13. Lisää entsyymi (E), substraatti (S) ja deoksinukleotidiliuokset (A, C, G ja T) Pyro-
mark-patruunaan omiin paikkoihinsa.
14. Aseta patruuna ja Pyromark Q24-näytelevy sekvensointilaitteeseen.
15. Valitse ajo-ohjelma USB-muistitikulta.
16. Aloita pyrosekvensointi.

