

Fluoresenssi in situ hybridisaatio -menetelmien vertailu NAV3-geenin  
kopioluvun määrittämisessä

Mikko Rautalahti  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Syöpäbiologian laitos / Jorma Isola  
Toukokuu 2012

TAMPEREEN YLIOPISTO

*Tiedekunta*

Lääketieteen yksikkö

Syöpäbiologia/ Institute of Medical Technology, IMT

*Tekijä*

Rautalahti Mikko

*Työn nimi*

Fluoresenssi in situ hybridisaatio -menetelmien vertailu NAV3-geenin kopioluvun määrittämisessä

*Oppiaine*

Syöpäbiologia

*Työn laji*

Syventävien opintojen kirjallinen työ

*Sivumäärä*

16+1

*Avainsanat*

virtuaalimikroskopia, epifluoresenssimikroskopia, patologia, syöpä, molekyyliytogenetiikka

*Tiivistelmä*

Virtuaalimikroskopian (eli mikroskooppinäytteiden käsittelyn digitaalisessa muodossa) hyödyntäminen kliinisessä lääketieteessä sekä mikroskopian opetuksessa on viime vuosien aikana kasvanut nopeasti. NAV3-geenin kopiolukumuutosten määrittäminen *fluoresenssi in situ hybridisaatio* (FISH) -menetelmällä on lupaava uusi menetelmä syövän molekyyli diagnostiikkaan. Digitaalisen kuvantamistekniikan käyttösopivuutta FISH-välitteiseen syöpädiagnostiikkaan ei ole vielä tutkittu. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla FISH:n eri menetelmävariaatioita keskenään (digitaalinen kuvaus vs. manuaalinen mikroskopointi.) Tutkimuksessa ei selvinnyt, tulisiko FISH-analyysi tehdä digitaalisesti vai manuaalisesti kudosleikkeistä (n = 20) tai kasvaimesta eristetyistä tumapreparaateista (n = 28 ). Molemmilla menetelmävariaatioilla on omat teoreettiset etunsa, mutta kunnollista tutkimusmenetelmien välistä korrelaatiota ei havaittu uuden digitaalisen kuvantamismenetelmän validointiin.

# SISÄLLYS

1. JOHDANTO .....	2
1.1 Syöpä ja sen diagnostiikan tulevaisuus .....	2
1.2 Syövän molekyyli diagnostiikka in situ hybridisaatiolla.....	3
1.3 Syöpä ja NAV3-geeni.....	4
1.4 NAV3-geeni uuden skannausmenetelmän validoinnissa .....	4
2. AINEISTO.....	5
3. MENETELMÄT .....	6
3.1 Perustietoa hybridisaatiosta .....	6
3.2 Perustietoa fluoresoivista merkkiaineista .....	7
3.3 Perustietoa koettimesta .....	8
3.4 Fluoresoivan koettimen hybridisaatio .....	8
3.2 Näytteiden kuvaaminen .....	9
3.2.1 Mikroskooppi .....	10
3.2.2 Näytteiden skannaus .....	11
3.3 Näytteiden analysointi .....	11
4. TULOKSET.....	12
5. POHDINTA.....	13
LÄHTEET .....	15

# 1. JOHDANTO

## *1.1 Syöpä ja sen diagnostiikan tulevaisuus*

Syöpä on sairaus, joka johtuu kehon muuntuneiden solujen hallitsemattomasta jakaantumisesta ja leviämisestä muihin kudoksiin. Sairauden kriteerit täyttyvät, jos patologiseen prosessiin kuuluvat nämä kuusi syöväälle ominaista tunnusmerkkiä (Galigiuri 2007):

- 1) Kasvusignaalin autonomia (solut kasvavat ilman säädeltyjä kasvutekijöitä)
- 2) Estosignaalien vastaanottamattomuus (solut kasvavat kieltosignaaleista huolimatta)
- 3) Apoptoosin välttely (solut väistävät ”kuolinkäskyä”)
- 4) Angiogeneesi (kasvain säätelee oman verenkierron muodostumista)
- 5) Rajaton lisääntymispotentiaali (solut voivat jakaantua huomattavan usein)
- 6) Invaasio ja leviäminen (solut leviävät sinne, minne ne eivät kuulu)

Maaailman terveysjärjestön (WHO) mukaan uusien syöpälajien lukumäärä kasvaa 50 %:lla vuoteen 2020 mennessä. Tämä luo paineita uusien diagnostisten menetelmien löytämiselle, sillä nykyiset tutkimusmenetelmät ovat riittämättömiä havaitsemaan useiden uusien syöpätautien varhaisvaiheiden tunnusmerkkejä. Tavoitteena on löytää vastauksia mahdollisuuksiin, joita lisääntynyt lääketieteellinen tieto, teknologian nopea kehitys ja hoitovaihtoehtojen monipuolistuminen luovat. Perinteisten patologis-anatomisten diagnoosimenetelmien, genetiikan menetelmien sekä kuvantamistutkimusten väliset rajat ovat vähitellen katoamassa.

Tulevaisuudessa syövän diagnostiikka perustuu entistä enemmän erilaisten menetelmien yhdistelmiin. Tämä mahdollistaa sen, että syöpä todetaan entistä varhaisemmin ja hoidetaan yksilöllisesti, mikä jo itsessään takaa paremman ennusteen paranemisen kannalta (Pukkala ym. 2006). Ennusteen arviointiin käytetään kudospaloista tehtyjä erityistutkimuksia, joihin lukeutuvat mm. diagnostisiin vasta-aineisiin perustuvat värjäykset sekä syöpägeenien monistumista osoittavat molekyylibiologiset tutkimukset.

Mikä on uusien menetelmien ja löydösten hyöty? Kun ymmärretään tautien muodostumismekanismien perusteet ja tämän tiedon pohjalta kehitetään rajatun vaikutuksen tuova

uusi lääke, voidaan hoitovaihtoehtojen kirjoa laajentaa. Tavoitteena on, että diagnostiikka tarjoaa kattavat mahdollisuudet hoitovalintoihin: potilasta hoidetaan yksilöllisemmin ja kasvaimen monipuoliset piirteet otetaan huomioon hoidon linjauksissa. Tarkka diagnostiikka parantaa potilaan ennustetta ja säästää terveydenhuollon varoja, kun kalliit hoidot pystytään kohdentamaan niistä hyötyville potilaille.

## ***1.2 Syövän molekylidiagnostiikka in situ hybridisaatiolla***

Molekyyli- ja sytogeneettiset menetelmät tarjoavat mahdollisuuden tunnistaa muutoksia, jotka vähitellen johtavat solun kasvun säätelyn häiriintymiseen ja malignin solukloonin syntyyn. Yksi näistä menetelmistä on in situ -hybridisaatio, jossa leimattu geenikoetin hybridisoidaan histologiseen preparaattiin, jota voidaan tarkastella mikroskoopilla. (Tönnies 2002.) Kyseinen tekniikka on ihanteellinen kromosomien tutkimiseen: nukleiinihapot (DNA tai RNA) sijaitsevat täsmällisissä paikoissa soluissa ja kudoksissa, joten suuri määrä potentiaalista tietoa häviää, jos nämä molekyylit erotetaan solusta. Tästä syystä on kehitetty tekniikoita, joissa nukleiinihappokoettimia käytetään kohdistamaan spesifisiin nukleiinihapposekvensseihin, kun ne ovat vielä paikallaan solussa. In situ -hybridisaatiomenetelmässä DNA:ta tai RNA:ta ei siis eristetä näytteestä ja siirretä esimerkiksi kalvolle elektroforeesin avulla, kuten Southern- ja Northern-hybridisaatioissa, vaan koetin hybridisoidaan suoraan kohdepreparaattiin. Hybridisoimalla kromosomipreparaattiin fluoresoiva merkkiaine voidaan selvittää geenien paikallistumista eri kromosomeihin sekä geenien kopiolukumäärä fluoresenssimikroskoopilla. Tämä menetelmä tunnetaan fluoresenssi in situ -hybridisaationa, *FISH*. (Kearney 1998.)

FISH-menetelmien selkein käyttöindikaatio tällä hetkellä on rakenteeltaan poikkeavien kromosomien tunnistaminen metafaasinäytteistä. Kromosomaalisiksi muutoksiksi luetellaan aneuploidia (tila, jossa solussa on epänormaali määrä kromosomeja), translokaatiot (kromosomin muuttuminen siten, että sen osa siirtyy toiseen kromosomiin tai eri kohtaan samassa kromosomissa), deleetiot (osa kromosomista on tuhoutunut) sekä amplifikaatiot (geenin ekspressiivoimakkuus on lisääntynyt). Nämä FISH-menetelmällä havaitut muutokset antavat tietoa esimerkiksi syöpägeenien monistumisesta ja kasvaimen estäjägeenien inaktivoitumisesta. (Ross & Hortobagyi 2004.)

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on vertailla FISH:n eri menetelmävariaatioita keskenään käyttäen vertailukohteena NAV3-geenin kopiokokumääriä. Tällä hetkellä ei ole varmaa tietoa siitä, tulisiko FISH-analyysi tehdä kudostenleikkeestä vai kasvaimesta eristetystä tumapreparaatista. Molemmilla menetelmävariaatioilla on omat teoreettiset etunsa, mutta kunnollisia tulosten vertailuja ei ole tehty.

### ***1.3 Syöpä ja NAV3-geeni***

NAV3-geenin kopiokokumuutosten määrittäminen FISH-menetelmällä on lupaava uusi menetelmä syövän molekyyli diagnostiikkaan. NAV3-geeniä on vastikään kuvailtu geeninä, jonka hankituilla mutaatioilla kromosomissa 12 olisi tekemistä varsinkin ihon T-solulymfomien karsinogeenisissä prosesseissa. Kyseessä on NAV3-geenin deleetio tai translokaatio, ja tämän muutoksen on havaittu liittyvän myös eräisiin muihin yleisiin imusolukasvaimiin sekä epitelialista alkuperää oleviin syöpiin, kuten esim. paksusuolisyöpään ja sen esisasteisiin. (Hahtola 2008.)

NAV3-geeni kuuluu ns. neuron navigator -perheeseen, ja sen toiminta keskittyy nykytietämyksen valossa hermostoon. Tämä koodattu proteiini sisältää sekä kiertyneitä että suojeltuja aminohappojen aktivoivia alueita (AAA) muistuttavia kiinnityskohtia, joihin soluaktiivisuutta säätelevät adenosinitrifosfaattit (ATPase) voivat ankkuroitua. Geeni sijaitsee kromosomissa 12, paikalla 12q14.3 (HUGO Gene Nomenclature Committee 2008.)

NAV3-geenin deleetiot ovat nähtävissä T-solulymfoman alkuvaiheissa, ja deleetioiden ilmaantuvuus näyttäisi kasvavan taudin edetessä (Karenko ym. 2005.) Hypoteesina onkin esitetty, että NAV3-geenin deleetio vaikuttaa syövän syntyyn. Hypoteesin pohjalta on identifioitu genejä ja geenituotteita, jotka perustuvat tRNA-teknologiaan ja mikrosiruanalyysiin. Nämä geenituotteet yli-ilmentyvät NAV3-deleetion vaikutuksesta, ja tämän prosessin on oletettu liittyvän syövän patologiisiin muutoksiin. Uusimmissa julkaisuissa on kuitenkin todettu, ettei NAV3-deleetio välttämättä ole ensisijainen syy syövän syntyyn. (Kawai ym. 2009.)

### ***1.4 NAV3-geeni uuden skannausmenetelmän validoinnissa***

Perinteisesti FISH-näytteet mikroskopoidaan okulaarien kautta pimeässä huoneessa ilman, että näytteistä otetaan digitaalisia kuvia (tai kuvataan esimerkiksi vain yksi näkökenttä, jolloin valikoitumisharha on ilmeinen). Yhden näytteen mikroskopointiin kuluu tyypillisesti 10 - 15 minuuttia. Koska fluoresenssi sammuu ajan myötä (noin kahden tai kolmen kuukauden kuluessa), ei

näytelaseja voidaan arkistoida myöhempää tarkastelua varten. Tämän ongelman ratkaisemiseksi on kehitetty automatisoitu skannerimikroskoopi, jolla FISH-näytteet voidaan digitoida myöhemmin tietokoneen kuvaruudulla tehtävää geenikopioluvun määrittämistä varten. Skannausmenetelmä on saatu kehitettyä teknisesti luotettavalle asteelle, mutta kunnollisia tulosten vertailuja perinteisen okulaarien kautta ja tietokoneen kuvaruudulta tehtävän kopiolumuanalyysin välillä ei ole.

Tässä tutkimuksessa verrataan

- 1) NAV3-geenin kopiolumuja paksusuolisyöpänäytteissä tutkittuina tuma- ja leike-FISH:n avulla. Geenikopiolukusuhteen (NAV3/referenssi) analyysi tehdään perinteisesti mikroskoimalla okulaarien kautta. Näytteistä määritetään keskimääräinen geenikopiolukusuhte (NAV3/referenssikoetin).
- 2) NAV3-geenin kopiolumuja tutkittuina tuma-FISH-preparaateista vertaillen okulaarien kautta määritettyjä ja skannauksen jälkeen kuvaruudulta saatuja tuloksia.
- 3) NAV3-geenin kopiolumuja tutkittuina leike-FISH-preparaateista vertaillen okulaarien kautta määritettyjä ja skannauksen jälkeen kuvaruudulta saatuja tuloksia.
- 4) Tutkimuksessa selvitetään myös kopiolumuanalyysin toistettavuus kahden mikroskopistin välillä. Toistettavuus selvitetään sekä okulaarien kautta mikroskopoinnin että skannattujen kuvien analysoinnin suhteen.

## 2. AINEISTO

Näytteet tutkimusta varten toimitti Tampereen yliopiston tutkijoiden perustama bioteknologiayritys, Dermagene Oy, joka kehittää syövän diagnostisia testejä. Yksityisen yrityksen yhteistyökumppaneina ovat Tampereen yliopistollisen sairaalan iho- ja sukupuolitautilin klinikka, anatomian laitos ja lääketieteellisen genetiikan osasto. Näytteitä oli yhteensä 48 kappaletta. Ne koostuivat 28 tumapreparaatista ja 20 kudosleikepreparaatista, jotka oli kerätty laajasta syöpäjoukosta, joihin lukeutuvat mm. koolonkarsinoomat, malignit vatsaseudun lymfoomat, suurisoluiset anaplastiset lymfoomat, hodgkinin sekä non-hodgkinin taudit ja follikulaariset lymfoomat.

Kudosleikepreparaatit (n = 20) hybridisoitiin Dermagene Oy:n kehittämällä, fluoresoivalla koettimella syöpäbiologian laitoksen laboratoriossa. Tumapreparaatit (n = 28) tulivat valmiiksi hybridisoituina Dermagene Oy:n laboratoriosta.

### **3. MENETELMÄT**

Tutkimus tehtiin seuraavasti:

- 1) Fluoresoiva koetin hybridisoitiin tutkittaviin parafiinileikepreparaatteihin. (Dermagene Oy toimitti hybridisoituneet tumanäytepreparaatit.)
- 2) Näytteet mikroskoipoitiin manuaalisesti okulaarien kautta Carl Zeissin epifluoresenssimikroskoopilla suurennoksella öljy x 63.
- 3) Näytteet mikroskoipoitiin LCD-näyttöpääteltä edellä mainitulla epifluoresenssimikroskoopilla, johon oli kytketty moottorisoitu, automaatiotekniikkaa hyödyntävä näytteensiirtopöytä. Kuvaus suoritettiin mikroskooppiin kytketyllä teräväpiirtokameralla ja kuvat skannattiin Surveyor-tietokoneohjelmalla, jolla myös kuvat tallennettiin digitaalisiksi tiedostoiksi.
- 4) Kuvat siirrettiin myöhempää käyttöönottoa varten yliopiston internetpalvelimelle.
- 5) Data-analyysia varten käytettiin ImageJ-kuvankäsittelyohjelmaa, jolla NAV3-geenin kopiolut määritettiin manuaalisesti merkitsemällä ne edellä mainitun ohjelman ”Click-Counter” -lisäosalla.
- 6) Kopiolumäärät siirrettiin taulukkoon Excel-tietokoneohjelmalla, ja saatuja arvoja vertaatiin keskenään (sekä okulaarien kautta mikroskopoinnin että skannattujen kuvien arvoja).

#### ***3.1 Perustietoa hybridisaatiosta***

Hybridisaatiolla tarkoitetaan komplementaaristen nukleiinihapposekvenssejen liittämistä toisiinsa emäspariutumissääntöä noudattaen. Hybridi voi syntyä DNA-DNA, DNA-RNA tai RNA-RNA-molekyylien välille. Kun toinen hybridisaatioon osallistuvista nukleiinihapoista on leimattu esimerkiksi fluoresoivaa valoa emittoivalla leimalla, voidaan hybridi havaita fluoresenssimikroskopiolla. Leimattua nukleiinihaponauhaa kutsutaan koettimeksi. (Suominen & Ollikka 2004.)

Hybridisaatioon vaikuttavat olennaisesti vallitsevat olosuhteet, kuten lämpötila, hybridisaatiopuskurin suolapitoisuus sekä koettimen ja tutkittavan aminohapposekvenssialueen pituus. Myös koettimen ja kohteen sytosiini- ja guaniinipitoisuudet vaikuttavat hybridisaation



muodostumiseen, koska C- ja G- emästen välille syntyy kestävämpi sidos kuin A- ja T-emästen välille. Hybridisaatio-olot pyritään valitsemaan niin, että koetin sitoutuisi mahdollisimman spesifisesti ja tehokkaasti kohdenukleinihappoon. Olosuhteita täytyy soveltaa menetelmäkohtaisesti, ja yleensä oikeat olosuhteet menetelmälle löytyvät *vain* kokeilemalla. (Suominen & Ollikka 2004.)

Koettimen spesifisyys kohdenukleinihapolle on tärkeää hybridisaation onnistumisen kannalta. Koettimen valinnassa on huomioitava, että muodostuva hybridi on kestävä ja koetin pääsee kulkeutumaan helposti solun sisään. Lyhyet koettimet tunkeutuvat soluun paremmin kuin pitkät, mutta niiden spesifisyys ei ole yhtä hyvä. (Kononen & Pelto-Huikko, 1998.)

### **3.2 Perustietoa fluoresoivista merkkiaineista**

Fluoresenssimikroskopian avulla voidaan muodostuneet hybridit havaita FISH-menetelmässä. Fluoresenssi syntyy kun molekyylit absorboivat valokvantteja ja niiden elektronit siirtyvät virittyneeseen tilaan ylemmälle kuorelle. Kun elektronit palaavat omalle elektronikuorelleen viritystila purkautuu ja aine emittoi näkyvää valoa. Tätä ilmiötä kutsutaan fluoresenssiksi. (Eskelinen & Vääräniemi 1998.)

Tutkimuksessa käytetty geenispesifinen koetin oli leimattu fluoresoivilla merkkiaineilla, jotka mahdollistivat tutkittavien preparaattien kopiolumäärien selkeän visualisoinnin. Solubiologiassa käytetyt fluoresoivat merkkiaineet eli fluoroforit voidaan jakaa ryhmiin joko niiden käyttötarkoituksen mukaan tai niiden emittoiman aallonpituuden mukaan. Käyttötarkoituksensa mukaan ne voidaan jaotella proteiineihin liitettäviin fluoroforeihin (esimerkiksi fluoreskeiini isotiosyanaatti FITC, tetrametyylirodamiini-isotiosyanaatti TRITC sekä Texas Red) ja fiksoitujen tai elävien solujen rakenteisiin sitoutuviin merkkiaineisiin (DNA-merkkiaineet 4', 6-diamidino-2-fenyyli-indoli, DAPI). Toinen, ehkä havainnollisempi tapa on jaotella fluoroforit niiden emittoiman aallonpituuden mukaan. Käytännössä voidaan erottaa kolme väriä: *sininen, vihreä ja punainen*. Esimerkiksi tumaväriaine DAPI lähettää sinistä valoa, FITC vihreää valoa sekä rodamiinijohdannaiset (organellien merkkiaineet) ja Texas Red (proteiineihin sitoutuvat merkkiaineet) punaista valoa. Käytännössä solujen lukumäärä voidaan laskea yksitumaisuuden vuoksi sinisistä signaaleista ja kopiolumäärät laskea vihreiden ja punaisten signaalien ilmenemissuhteista. (Wilkinson 1998.)

NAV3-geenin kopiolukumäärää voidaan analysoida vertaamalla NAV3-geenin signaaleja (punaisia) sentromeeri 12-spesifisiin signaaleihin (vihreät) Syöpäsoluissa NAV3-geenissä saattaa esiintyä deleetiota (sentromeerien signaaleja enemmän kuin NAV3-geenin signaaleja eli vihreitä signaaleita enemmän kuin punaisia) tai amplifikaatiota (NAV3-geenin signaaleja enemmän kuin sentromeerien signaaleja eli punaisia signaaleja enemmän kuin vihreitä). Tämä riippuu siitä, mistä syövästä on kyse.

### ***3.3 Perustietoa koettimesta***

Tutkimukseen tarvittiin fluoroforeilla leimattua koetinta, joka hybridisoitiin preparaatteihin. Geenispesifinen koetin valmistettiin ns. Nicktranslaatio-menetelmällä. Siinä DNA:n leimaus tapahtuu kahden entsyymin avulla. DNAasi-I-entsyymi tekee kohde-DNA:han ”nikkejä” (eli katkoksia DNA:n sokeri-fosfaattiselkärankaan), joita DNA polymeraasi-I ensin ”laajentaa” poistamalla nukleotideja (ns. 5' → 3 eksonukleaasiaktiiviteetti) ja sitten korvaa poistamansa nukleotidit reaktioon lisätyillä leimatuilla nukleotideilla (ns. 5' → 3 polymeraasiaktiiviteetti)

Leimatun koettimen koko on hyvin tärkeä osa in situ -hybridisaatiossa. Jos koetin koostuu liian monesta fragmentista, näytelasilta saatava signaali saattaa olla liian voimakas ja aiheuttaa ns. taustamelua liian paljon. Jos koetin on fragmenttikooltaan liian pieni, fluoresoiva signaali saattaa olla liian heikko myöhempää tarkastelua varten.

### ***3.4 Fluoresoivan koettimen hybridisaatio***

Parafiinileikepreparaatit leimattiin Dermagene Oy:n valmistamalla fluoresoivalla koettimella, joka on NAV3-geenispesifinen. Kyseinen koetin on käyttökelpoinen sekä tuma- että kudosleikepreparaatteihin. Leimaamisessa referenssinä käytettiin sentromeeri 12 -spesifistä koetinta, joka oli leimattu erivärisellä fluorokromilla. Referenssikoetin tunnistaa kunkin kromosomin sentromeerialueella toistojaksot (ns. sateliitti-alueet).

Koettimen hybridisaatio kudosteikepreparaatteihin suoritettiin seuraavasti:

Näytteet deparaffinoitiin ja ilmakeivattiin, minkä jälkeen ne asetettiin 2 M suolahappoon (HCL) 20 minuutiksi. Tämän jälkeen näytteet pestiin vedellä, jonka jälkeen niitä keitettiin 98 °C:ssa 0,01 M sitruunahappopuskurissa 15 minuuttia. Keittämisen päätteeksi näytteet huuhdeltiin vedellä, jonka jälkeen näytteet entsymaattisesti digestoitettiin pepsiinissä 10 - 30 minuuttia. Tämän jälkeen näytteet pestiin vedellä ja upotettiin formaaliiniin fiksoitumaan 10 minuutiksi. Formaaliinijäänteet pestiin vedellä pois. Pesun jälkeen koetin pipetoitiin näytelaseihin ja laitettiin denaturoitumaan 95 °C -asteiseen kammioon 5 minuutiksi. Seuraavaksi näytteet inkuboitettiin yön yli 42°C asteessa, jolloin koetin hybridisoitui näytteeseen.

Hybridisaation jälkeen on tärkeää suorittaa pesuvaiheet, joilla poistetaan kiinnittymättömät koettimet näytelasilta. Jos pesuvaihe jää liian lyhyeksi tai se suoritetaan liian matalassa lämpötilassa, on vaarana, että myös näytelasien tausta fluoresoi kopioluminoituja eikä signaaleja voida näin ollen erottaa. Tämä hankaloittaa kopioluminointimäärien laskemista huomattavasti. Jos pesulämpötila on liian korkea ja pesuvaihe liian pitkä, saattaa fluoresenssi heikentyä tai hävitä kokonaan. Pesun jälkeen näytelasit ilmakeivataan. Kuivaamisen tulee tapahtua täydellisesti ja nopeasti, jottei fluoresenssi sammuu. Kuivauksen jälkeen laselle lisätään päällystysainetta, joka ehkäisee näytteiden ylivaloittumista ja mahdollistaa peitinlasin kunnollisen kiinnittymisen.

### ***3.2 Näytteiden kuvaaminen***

Jokainen näytelasi kuvattiin seuraavan protokollan mukaisesti:

- 1) Näytelasi asetettiin mikroskoopin näytteesiirtopöydälle. Näytelasille applikoitiin immersioöljyä, ja näyte mikroskopoitettiin okulaarien kautta suurennoksella oil x 63.
- 2) Kuva siirrettiin tietokoneen näyttöpäätteelle kamerasiirtolaitteella.
- 3) Kuvaa tarkennettiin manuaalisesti, jotta FISH-signaalit saataisiin tarkasti näkyville.
- 4) Kamerasiirtolaitteiden asetuksia säädettiin Surveyor-tietokoneohjelmalla, kunnes fluoresoivien signaalien laatu oli tyydyttävä.
- 5) Näytelasit skannattiin edellä mainitulla tietokoneohjelmalla, ja saadut kuvat tallennettiin kuvamontaasina yliopiston internetpalvelimelle.

### 3.2.1 Mikroskooppi

Tutkimuksessa käytetty epifluoresenssimikroskooppi on pohjimmiltaan kirkaskenttämikroskooppi, joka on valjastettu FISH-analyysia varten tarvittavilla lisäosilla. Kirkaskenttämikroskopiassa näyte altistetaan valkoiselle valolle, joka läpäistessään näytteen muodostaa tarkasteltavan näkymän. Valolähteenä käytetään yleisimmin halogeenilamppua, jonka ylöspäin hohtavan valon määrää säädellään kenttähimmentimellä. Saapuva valo kootaan kondensorilla pienelle pinta-alalle, joka kohdennetaan näytteesiirtopöydän päällä sijaitsevaan näytelasiin.

Näytteesiirtopöytää voidaan liikuttaa X- ja Y-suunnassa joko manuaalisesti tai moottoreiden avulla, joita ohjataan erillisellä ohjaussauvalla. Tarkennus, joka vastaa näytteesiirtopöydän Z-suuntaista liikettä, voidaan suorittaa automaattisesti tietokoneen kuvantamisohjelmistolla tai manuaalisesti mikroskoopissa olevalla säätöruuvilla.

Mikroskoopin käytettävissä olevat objektiivit sijaitsevat renkaassa, jota pyörittämällä voidaan nopeasti vaihtaa käytettyä suurennusta. Näytelasin näkymä suurennetaan käytetyillä objektiiveilla, josta se johdetaan joko silmillä katseltaviin okulaareihin tai digitaalikameran valokennoihin. (Tuominen 2008)



Koska fluoresoiviin näytteisiin tuleva sekä näytteistä emittoiva valo kulkevat objektiivien kautta, mikroskoopissa on säteenjakajajärjestelmä, jolla lyhytaaltoinen viritinvalo ja pitempiaaltoinen emissiovalo voidaan ohjata eri suuntiin. Tämä suoritetaan kahtaistaittavalla peilillä, joka taittaa tiettyä kynnyksarvoa lyhyemmät aallonpituudet 90 astetta ja päästää pitemmät aallonpituudet suoraan. Viritinvalo ohjataan peilin kautta objektiiviin ja näytteeseen, jossa fluoresoivat molekyylit virittyvät ja emittoivat valokvanteja joka suuntaan. (Eskelinen & Vääräniemi 1998.) Osa emittoituneista valokvanteista ohjautuu objektiiviin, ja viritinvaloa pitempiaallonpitoisina ne pääsevät säteenjakajan läpi suoraan emissiosuodattamien ja okulaareja kohti. Tätä varten mikroskoopissa on emissiosuodatin, joka mahdollistaa, että vain näytteen lähettämä valo pääsee okulaareihin.

Mikroskoopin erotuskyky on kuitenkin rajallinen. Fluoroforien viritysaallonpituuden ja emittoivan valon aallonpituuden tulisi olla niin kaukana toisistaan, että niiden kulkureitit voidaan erottaa toisistaan suodattimen ja peilien avulla. Näytteet, joissa valo lähtee vain muutamista pisteistä ja koostuu vain yhdestä aallonpituudesta, ovat haaste valon automaattisille mittausjärjestelmille. Fluoresenssimikroskopian erityisvaatimukset johtuvatkin havainnoitavan valon vähäisyydestä.

Esimerkiksi FITC-merkkiainemolekyylien sijantipaikat erottuvat toisistaan, kun objektiivin numeerinen aperttuuri on 1,3 mikrometriä. Fluoresenssimikroskoopin syvyysterävyys on vielä huonompi, noin 0,4 - 0,5 mikrometriä. Käytetyssä skannaustekniikassa kuitenkin pystyttiin syvyysuunnassa saamaan enemmän leikekerroksia (z-stacks), mikä mahdollisti tarkemman kopiolumäärityksen.

### **3.2.2 Näytteiden skannaus**

Virtuaalinäytelasien tutkiminen muistuttaa riittävän tarkasti oikeaa mikroskopointia, kun näytteet kuvannetaan tarpeeksi korkealla optisella tarkkuudella (Rojo ym. 2006). Kun käytetään korkeita tarkkuuksia, tutkittava näkökenttä ei kuitenkaan kata yhtäaikaisesti kuin murto-osan kuvannettavan näytteen pinta-alasta, joten kuvantamisprosessi on suoritettava pala palalta.

Näytelasi kuvannetaan järjestelmällisesti hyödyntäen mikroskoopin moottoroitua näytteensiirtopöytää, jonka liikkeitä ohjataan automaattisesti Surveyor-kuvantamisohjelmiston avulla. Kuvantamisen tuotoksena syntyy tuhansia yksittäisiä kuva-alkioita, jotka jälkikäsitellään ja yhdistetään tietokoneella suureksi montaasikuvaksi. Virtuaalinäytelasit olivat sytologisia, joten niiden kuvantaminen oli suoritettava tavanomaista korkeammalla optisella tarkkuudella (suurennoksella öljy x 63) Tämä moninkertaisti tuotetun kuvainformaation määrän suhteessa tavanomaiseen kuvantamiseen. Suurimmat kuvat olivat useita gigatavuja. Tiedostojen suuri koko esti niiden katselun tavanomaisilla kuvankäsittelyohjelmistoilla. Tutkimuksessa käytettiin ImageJ-ohjelmaa, joka latsi yliopiston serveriltä vain sen osan kuvatiedostosta, jota haluttiin tutkia.

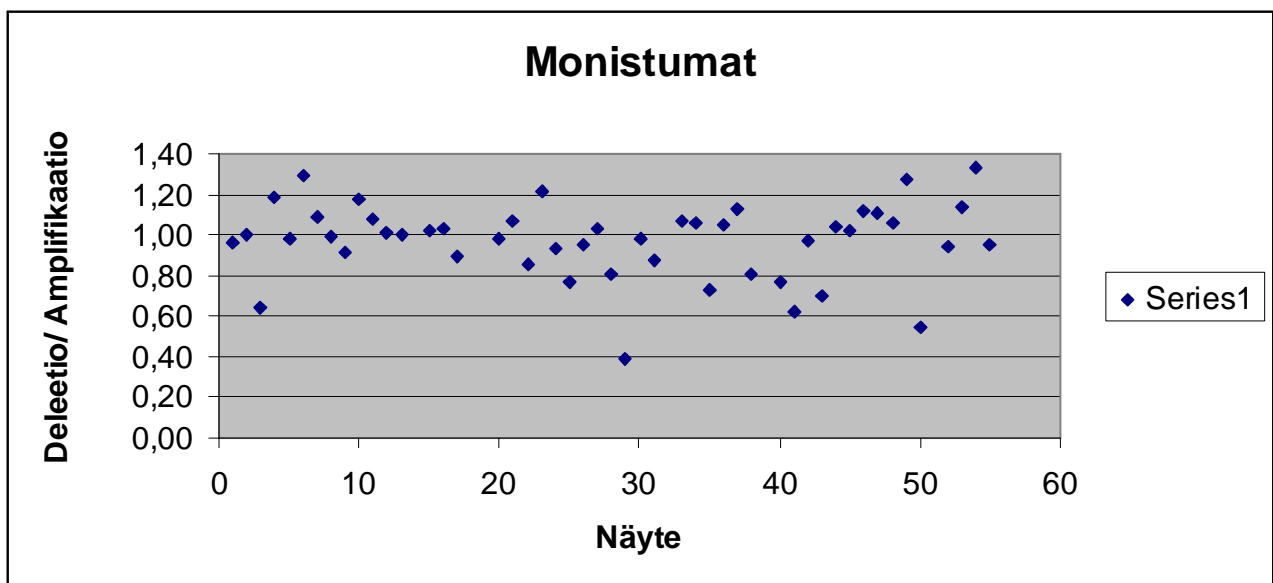
### **3.3 Näytteiden analysointi**

Saadut kuvamontaasit siirrettiin ImageJ-ohjelmaan jatkokäsittelyä varten. Jokaisesta kuvasta etsittiin sattumanvaraisesti sopivan kokoinen näkökenttä, jonka kaikki signaalit laskettiin.

Siniset (DAPI-värjätyt) signaalit ilmaisivat tumien (ja samalla solujen) lukumäärät ja niitä tuli olla noin 20 per näkökenttä. Jokaisen tuman sisäiset vihreät (sentromeerit) ja punaiset (NAV3-geeni) signaalit laskettiin ImageJ-ohjelman ”click-counter” -lisäosalla, jonka avulla signaalien sijainti piirtyi kuvatiedostoon. Kuvat tallennettiin uudeksi tiff-kuvatiedostoksi arkistointia varten, ja laskettujen signaalien lukumäärät siirrettiin Excel-taulukkolaskentaohjelmaan.

## 4. TULOKSET

Näytteiden analysointia varten kuvasin kopiolumääräsuhteet taulukkoon (kuva 2). Taulukosta käy ilmi monistumien epäjohdonmukaisuus: osassa näytissä ilmeni voimakasta signaalien lisääntymistä, osassa taas deleetiota. Näytteistäni saamiani kopiolumääräsuhteita (amplifikaatioiden suhde deleetioihin) ei voitu verrata Dermegenen laskemiin kopiolumääräsuhteisiin, sillä yritys lopetti toimintansa ennen kuin tutkimus saatettiin loppuun. Tämä teki tutkimuksen tulosten analysoinnin merkityksettömäksi.



**Kuva 2: Näytteistä todettujen monistumien suhdeluvut. Suhdeluvut kertovat todettiin kudosleike-preparaateissa signaalien vähentymistä (deleetiota) vai lisääntymistä (amplifikaatiota) Tuloksia verrataan toisella menetelmällä saatuihin vastaaviin tuloksiin.**

## 5. POHDINTA

Kopiolukumäärien samankaltaisuutta eri menetelmävariaatioilla ei pystytty tutkimuksessa osoittamaan. Digitaalisesti saadut kopiolukumääräsuhteet olivat miltei järjestelmällisesti vastakkaiset verrattuina manuaalisesti mikroskoipoituihin arvoihin.

Näytesyöpäsolujen morfologia saattaa aiheuttaa virheitä kopiolukumäärien laskemisessa. Syövän tunnusmerkin konsentraatio saattaa olla riittämätön havaitsemiseen (sensitiivisyys huono), tai syövän tunnusmerkki saattaa antaa väärän positiivisen tuloksen (spesifiteetti huono).

Morfologisen analyysin tai proteiinin konsentraation määrittäminen ei välttämättä mahdollista uusien tutkimusmenetelmien löytämistä, jos syövän geneettinen tausta on epäselvä. Riittämätön taustatieto synnyttää tällöin väärän tutkimushypoteesin.

Tutkimuksen teknisessä suoriutumisessa voi esiintyä ongelmia. Signaalin tunnistaminen vaikeutuu jos signaali sijaitsee molemmissa kromosomihomologeissa tai metafaasi-vaiheessa oleva signaali näkyy kummassakin kromatidissa. Myös mahdollinen signaalin halkeama eli "split"-signaali häiritsee kopiolukujen laskemista. Jos tumat olivat interfaasi-vaiheessa, S- ja G2-vaiheen soluissa on normaalisti 3 - 4 signaalia. Joskus näytteiden epäonnistunut värjääminen aiheuttaa sen, että signaalien ja taustan erottaminen vaikeutuu.

Näyte voi olla viallinen, jolloin metafaasinäytteessä on liikaa sytoplasmaista taustaa, joka häiritsevästi valaisee näkökenttää. Myös hybridisaatioissa käytössä olleet reagenssit saattavat olla vanhentuneita tai suoritettavat pesut ovat liian heikkoja. Hybridisaation tehokkuutta on silmämääräisesti hyvin vaikea määrittellä. Näytteessä saattaa olla liian paljon digestiota, koettimen konsentraatio saattaa olla liian suuri tai koko koetin saattaa olla viallinen. Tämä aiheuttaa mikroskopoinnissa virheitä, varsinkin jos mikroskooppi ei ole tarpeeksi hyvä löytämään signaaleita tai käytössä on väärät suodattimet ja objektiivit.

Kuva-analyysissä ja kopiolukujen laskemisessa voi myös esiintyä ongelmia. Digitaalisessa kuva-analyysissä himmeiden signaalien tunnistaminen voi olla mahdotonta, vaikka kuvauksen resoluutio olisikin tarpeeksi korkea. Myös tulkintaa häiritsevät artefaktat saattavat erehdyttävästi muistuttaa signaaleja jälkikäsitteilyn seurauksena. Tutkimuksessa käytettävä automaatiokannaustekniikka ei aina toiminut asetustensa mukaisesti, joten kuvaan saattoi harmillisesti tulla lisää virheellistä, jopa manipuloitua informaatiota. Manuaalisen kuva-analyysin ongelmat syntyvät yleensä

huolimattomuusvirheistä. Signaaleja laskettaessa tulisi pysyä jatkuvasti samalla alueella, jottei samoja signaaleja lasketa uudestaan. Okulaareista katsottuja himmeitä, todellisia signaaleja ei pystytä vahvistamaan, mikä lisää laskuvirheiden esiintyvyyden todennäköisyyttä.



## LÄHTEET

Caligiuri MA. Basic Biology and Cancer: What causes good cells to go bad?

(verkkodokumentti) 23.7.2007 American Association for Cancer Research: Basic Biology and Cancer. Saatavissa [www.aacr.org](http://www.aacr.org).

Eskelinen, S & Vääräniemi, J. Fluoresenssimikroskopia. Teoksessa: Rantala, I. & Lounatmaa, K. (toim.) *Biologinen valomikroskopia*. Helsinki: Yliopistopaino 1998, s. 166 - 175

Hahtola S. Identification of novel target genes in different subtypes of cutaneous T-cell lymphoma. Väitöskirja (artikkeli). 2008 Helsinki: Helsingin yliopisto.

HUGO Gene Nomenclature Committee. Symbol Report: NAV3 (verkkodokumentti).

Saatavissa [http://www.genenames.org/data/hgnc\\_data.php?hgnc\\_id=15998](http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=15998) (päivitetty 11.1.2011)

Karenko, L, Hahtola, S, Päivinen, S, Karhu, R, Syrjä, S, Kähkönen, M, Nedoszytko, B, Kytölä, S, Zhou, Y, Blazevic, V, Pesonen, M, Nevala, H, Nupponen, N, Sihto, H, Krebs, I, Poustka, A, Roszkiewicz, J, Saksela, K, Peterson, P, Visakorpi, T & Ranki, A. Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas Show a Deletion or Translocation Affecting NAV3, the Human UNC-53 Homologue, *Cancer Research*. 65, 18, s. 8101 - 8110, 9/2005

Kawai K, Uchida Y, Yonekura K, Virtanen S, Tähtinen M, Krohn K, Ranki A, Kanekura T. Cutaneous-Type Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma Does Not Primarily Show Deletion of NAV3 Gene. *Invest Dermatol*. 2009 Jul 23.

Kearney L. Detection of genomic sequences by fluorescence in situ hybridization to chromosomes. Teoksessa: Wilkinson, D.G. (toim.) *In Situ Hybridization: A Practical Approach*, Oxford University Press 1998 s. 161-188

Kononen, J & Peltö-Huikko, M. In situ -hybridisaatio. Teoksessa: Rantala, I & Lounatmaa, K (toim.) *Biologinen valomikroskopia*. Helsinki: Yliopistopaino 1998, s. 176 - 183.

Pukkala E, Dyba T, Hakulinen T, Sankila R. Syöpä 2015: Syövän ilmaantuvuus, syöpäpotilaiden ennuste ja syöpäkuolleisuus (verkkodokumentti) Syöpäjärjestöt 2006. Saatavissa <http://www.cancer.fi/syopajarjestot/julkaisut/raportit/>

Rojo MG, García GB, Mateos CP, García JG, Vicente MC. Critical Comparison of 31 Commercially Available Digital Slide Systems in Pathology. *Int. J. Surg. Pathol* 14, 4 (2006), 285–305

Ross, S & Hortobagyi, N. Introduction and background. Kirjassa: Ross, S & Hortobagyi, N. (toim.) *Molecular Oncology of Breast Cancer*, Jones & Bartlett Publishers 2004. s. 16

Suominen, I. & Ollikka, P. 2004. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Nukleinihappojen hybridisaatiotekniikat. 3. painos. Opetushallitus. Helsinki: Hakapaino.

Tuominen. JPEG2000-standardin hyödyntäminen virtuaalimikroskopiassa  
Pro gradu-tutkielma. 2008 Tampere: Tampereen yliopisto

Tönnies Holger. Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics *TRENDS in Molecular Medicine* 2002 Vol. 8 No 6:246 - 250

Wilkinson D.G. The theory and practice of in situ hybridization. Teoksessa: Wilkinson D.G. (toim.) *In Situ Hybridization: A Practical Approach*, Oxford University Press 1998 s. 1 - 20