

Aino Wirtanen

Keuhkosyöpään liittyvän EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittaminen parafiinileikkeestä syväsekvensointimenetelmällä

Tulosten vertaaminen FISH-menetemän avulla saatuihin tuloksiin.

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Aino Wirtanen Keuhkosyöpään liittyvän EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittaminen parafiinileikkeestä syväsekvensointimenetelmällä 51 sivua + 3 liitettä 4.6.2012
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Laadunvalvonta ja tuotekehitys
Ohjaajat	Päätoiminen tuntiopettaja Titta Pirkola Professori Sakari Knuutila
<p>Keuhkosyöpä on maailman yleisin syöpä ilmaantuvuuden ja kuolleisuuden suhteen. Sen myöhäisestä diagnosoinnista johtuen hoitoennuste on usein huono, sillä syöpä on levinnyt hoidon ulottumattomiin. Tehokkaampia diagnosointimenetelmiä tutkitaan jatkuvasti. EML4-ALK-fuusiogeeni on yksi ei-pienisoluisista adenokarsinoma keuhkosyöpää aiheuttava geeni-mutaatio, jota vastaan on kehitetty fuusioproteiinin toiminnan estävä lääke, crizotinibi.</p> <p>Tämä insinöörityö suoritettiin yhteistyössä Helsingin yliopiston Haartman-instituutin sytomolekyyli-genetiikan tutkimusryhmän (CMG) ja Suomen molekyyli-lääketieteen instituutin (FIMM) kanssa keväällä 2012. Työn tarkoituksena oli verrata fluoresenssi in situ hybridisaatiomenetelmällä (FISH) ja syväsekvensoinnilla (NGS) saatujen tuloksien vastaavuutta toisiinsa. Lisäksi tutkittiin, saadaanko syväsekvensoinnilla lisätietoa inversiosta ja fuusiosta syntyneiden geneettisten poikkeavuuksien tunnistamiseen. Lopuksi verrattiin kirjallisuuslähteiden perusteella menetelmien luotettavuutta, nopeutta ja taloudellisuutta kliinisessä tutkimuspalvelussa.</p> <p>Tutkimusaineistona käytettiin adenokarsinoma keuhkosyöpää sairastavien potilaiden formaalinifikoituja parafiiniin valettuja syöpäkudosleikkeitä. Potilaan syöpäkudosnäytteestä tehtiin syväsekvensointi ja FISH-tutkimus. FISH-tutkimuksessa lasille kiinnitetulle kudოსleikkeelle hybridisoitiin leimattu FISH-koetinseos ja lasit analysoitiin fluoresenssimikroskoopilla. Potilaan EML4-ALK-status selvitettiin solujen fuusiopositiivisuuden perusteella. Syväsekvensointimenetelmä tapahtui FIMM:n toimesta, ja tuloksia tarkasteltiin analysointiohjelmalla osana opinnäytetyötä.</p> <p>Työn yhteydessä suoritettua FISH-tutkimuksessa analysoitiin 26 FISH-lasia, joista viisi tulokittiin EML4-ALK-positiivisiksi. Sekvensointiin käytettiin 43 potilaan tutkimusaineistoa. Syväsekvensointimenetelmä osoitti inversion kautta syntyneen EML4-ALK-fuusiogeenin neljällä potilaalla. FISH- ja syväsekvensointimenetelmän tulokset vastasivat toisiaan. Lisäksi syväsekvensointimenetelmällä pystyttiin tunnistamaan geneettisen poikkeavuuden tyyppi toisin kuin FISH-menetelmällä. Syväsekvensointimenetelmä on kuitenkin toistaiseksi FISH-menetelmää hitaampi ja kalliimpi, eikä sovellu vielä kliiniseen tutkimuspalveluun.</p>	
Avainsanat	ei-pienisoluisen keuhkosyöpä, EML4-ALK-fuusio-onkogeneeni, fluoresenssi in situ hybridisaatio, syväsekvensointi

Author Title Number of Pages Date	Aino Wirtanen Lung cancer related EML4-ALK-fusion oncogene detection from paraffin embedded tumor tissue by deep sequencing 51 pages + 3 appendices 6 June 2012
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Product development and quality control
Instructors	Titta Pirkola, Principal Lecturer Sakari Knuutila, Professor
<p>Lung cancer is the most common and fatal cancer in the world. The poor prospect of cure results from the late diagnosis of cancer after it has spread out of the reach of treatment. More effective diagnostics and therapies are researched. EML4-ALK fusion gene is one of the gene mutations causing non-small cell adenocarcinoma lung cancer. It has been developed a targeted medicine, crizotinib, which prevents the function of the fusion protein.</p> <p>This final year project was carried out in collaboration with the Helsinki Universitys Haartman institute's Cytomolecular Genetics (CMG) research group and the Institute of Molecular Medicine Finland (FIMM) during spring 2012. The purpose of the research was to compare the results from fluorescent <i>in situ</i> hybridization (FISH) and deep sequencing. In addition it was investigated whether deep sequencing gives further information on whether the gene fusion was formed by inversion or deletion. Finally the reliability, speed and feasibility aspects of workflow in clinical diagnostics were compared on the basis of literature reviews.</p> <p>Formalin-fixed paraffin embedded tumor tissue samples from adenocarcinoma lung cancer patients were used as research material. Both FISH and deep sequencing were performed from the same sample. In FISH-method, the sample was fixed to the slide and hybridized with labeled FISH-probe mixture. Slides were analyzed with fluorescence microscope, and the EML4-ALK status was determined according to fusion positive cells. Deep sequencing was done by FIMM, and the results were examined as a part of this thesis.</p> <p>Five of the 26 slides prepared for the thesis project were detected as EML4-ALK-positive. More extensive research material was used in deep sequencing, and the EML4-ALK status of 43 patients was determined. Sequencing revealed four fusion positive cases, and all of them were formed by inversion. The results from FISH method and deep sequencing correlated each other. Moreover, deep sequencing, unlike FISH, was able to identify genetic anomalies. However, deep sequencing is still a more time-consuming and expensive method than FISH; therefore, it is not suitable for clinical research service at the moment.</p>	
Keywords	non-small cell lung cancer, EML4-ALK fusion gene, fluorescent in situ hybridization, deep sequencing

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Tutkimuksen tarkoitus	2
3	Teoriataustaa kirjallisuudesta	3
3.1	Solun perinnöllinen toiminta ja geenitekniikan perusteet	5
3.1.1	DNA elimistön toiminnan ohjaajana ja perimän tallentajana	5
3.1.2	DNA:n emäsjärjestyksen selvittäminen ja Sangerin menetelmä	8
3.1.3	Geenimutaatiot	9
3.2	Syövän synty	11
3.3	Syöpägeenit	12
3.3.1	Onkogeenit	12
3.3.2	Tuumorisupressori- eli kasvunrajoitegeenit	12
3.4	Pahalaatuisen kasvaimen kehittyminen	13
3.5	EML4-ALK-fuusio-onkogeeni	14
3.6	Keuhkosityövän esiintyvyys meillä ja maailmalla	15
3.7	Keuhkosityöpätyypit	16
3.8	Keuhkosityövän oireet, diagnostiikka ja hoidon suunnittelu	17
3.9	Ei-pienisoluisen keuhkosityövän hoito	19
3.10	Crizotinibi-täsmälääke	21
3.11	ALK-geenin uudelleenjärjestäytymisen diagnosointimenetelmät	26
3.11.1	Fluoresenssi in situ hybridisaatio	26
3.11.2	Käänteiskopointi polymeerasikerjureaktio	28
3.11.3	Immunohistokemia	28
3.11.4	Syväsekvensointi	29
4	Menetelmät ja työn toteutus	29
4.1	Fluoresenssi in situ menetelmä	32
4.1.1	FISH-valmisteen tekeminen parafiinileikkeestä	35
4.2	Syväsekvensointi	39
4.3	Syväsekvensointimenetelmä	40
4.3.1	Syväsekvensointidatan analysointi	45

5	Tulokset	47
6	Luotettavuuden arviointi	49
7	Pohdinta	50
8	Tulevaisuuden näkymät	53
	Lähteet	54

#### Liitteet

Liite 1. ALK uudelleenjärjestymisen detektointi Vysis ALK Break Apart formaliini fiksoidusta parafiinileikkeestä FISH Probe Kitillä

Liite 2. FISH-analysointilomake

Liite 3. Menetelmien vertailun tulokset

## Sanasto

A	adeniiniemäs (adenine)
ADP	adenosiinidifosfaatti (adenosine diphosphate)
ALK	anoplastinen lymfooma kinaasi (anaplastic lymphoma kinase)
ATP	adenosiinitrifosfaati (adenosine triphosphate)
bp	emäspari (base pair)
C	syosiiniemäs (cytosine)
CMG	sytomolekyyli­genetiikan tutkimusryhmä (cytomolecular genetics)
DNA	deoksiribonukleiinihappo (deoxyribonucleic acid)
<i>E. coli</i>	kolibakteeri ( <i>Escherichia coli</i> )
EML4	echinoderm microtubule-associated protein-like 4
EGFR	epidermal growth factor receptor
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (U.S. Food and Drug Administration)
FFPE	formaliinifikoitu parafiiniin valettu kudospnäyte (formalin-fixed paraffin-embedded tissue)
FIMM	Suomen molekyyli­lääketieteen instituutti (Institute for Molecular Medicine Finland)
FISH	fluoresenssi in situ hybridisaatio (fluorescence in situ hybridization)
G	guaniiniemäs (guanine)
GLOBOCAN 2008 tietopankki	syövän il­mantuvuudesta ja kuolleisuudesta maailmassa
kb	10 <sup>3</sup> emästä(kilobase)
KIF5B	Kinesin family member 5B
KRAS	kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
IHC	immunohistokemia (immunohistochemistry)
IVG	Integrative Genomics Viewer
<i>in vitro</i>	koeolosuhteissa
<i>in vivo</i>	elävässä organismissa
mb	10 <sup>6</sup> emästä (megabase)
NSCLC	ei-pienisoluinen keuhkosityöpä (non-small cell lung cancer)
NGS	uuden sukupolven sekvensointimenetelmä (next generation sequencing)
U	urasiiliemäs (uracil)
T	tyymiiniemäs (thymine)
TRK	TRK-fused gene
SCLC	pienisoluinen karsinoma eli mikrosellulaarikarsinomaan (small cell lung cancer)
RNA	ribonukleiinihappo (ribonucleic acid)
mRNA	lähetti-RNA (messenger ribonucleic acid)
RT-PCR	käänteiskopointi polyme­raasiketjureaktio (reverse transcriptase - polymerase chain reaction)
pH	vetyionivahvuus
PCR	polyme­raasiketjureaktio (polymerase chain reaction)
SBS	synteettinen sekvensointi (sequencing by synthesis)
Valvira	Sosiaali- ja terveystal­an lupa- ja valvontavirasto

## 1 Johdanto

Syöpä on sairaus, joka johtuu perimässä tapahtuneista muutoksista, jonka seurauksena solut alkavat jakautua hallitsemattomasti muodostaen kasvaimia. Perimäaineksen mutaatioita tapahtuu jatkuvasti, mutta elimistöllä on tehokkaat korjausmekanismit vaurioiden korjaamiseksi. Syövän kehittyminen on monivaiheinen tapahtuma ja sen syntyminen edellyttää useita eri geenivaurioita solun kasvua ja erilaistumista säätelevissä geeneissä. [1]

GLOBOCAN 2008 -syöpärekisterin mukaan joka vuosi maailmalla todetaan 1,6 miljoonaa uutta keuhkosityöpätapausta. Keuhkosityöpä on maailmassa yleisin syöpätyyppi uusien syöpätapausten ja syöpäkuolemien määrässä mitattuna [2]. Yksi keuhkosityövän alatyypeistä, ei-pienisoluista adenokarsinoomaa aiheuttava mutaatio EML4-ALK-geenifuusio, on löydetty vuonna 2007. EML4-ALK-geenimutaatiossa kromosomissa 2p tapahtuu fuusio EML4:n ja ALK:n välillä. Tämä mutaation on huomattu olevan yksi adenokarsinooma aiheuttavista tekijöistä, koska sillä on todettu onkogeenisestä aktiivisuutta *in vitro* ja *in vivo*, jolloin kasvainsolukkoa alkaa muodostua solunjakautumisen hallitsemattoman aktivoitumisen myötä. [3]

EML4-ALK-mutaatiosta johtuvaa adenokarsinoomaa on havaittu eniten tupakoimattomilla naispotilailla, jotka ovat yleisesti ottaen nuorempia kuin potilaat, joilla on muista geenivirheistä syntynyt adenokarsinooma [4]. Geenimutaatiosta johtuva geenin aktivoituminen aiheuttaa syöpäsolukon syntymisen, mikä voidaan pysäyttää pienimolekyylisellä inhibiittorilla, crizotinibilla [5].

EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamiseen on käytössä useita eri menetelmiä, joista parhaana eli niin sanottuna kultaisena standardina pidetään Abbott Molecularin Break Apart -kaksiväritestiä. EML4-ALK-geenifuusion osoittamisella on suuri ennustava merkitys potilaan hoitoennusteen arviointiin ja hoitomuodon valintaan. [6] Tässä opinnäytetyössä testataan syväsekvensoinnin käytettävyyttä EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamiseen ja tuloksia verrataan jo käytössä olevaan fluoresenssi *in situ* hybridisaatiomenetelmään.

## 2 Tutkimuksen tarkoitus

Tämän opinnäytetyön tarkoitus on verrata FISH-menetelmän tuloksia syväsekvensoinnilla saatuihin tuloksiin ja selvittää, ovatko eri menetelmien avulla saadut tulokset toisiinsa vastaavia. Jotta tuloksia voidaan pitää mahdollisimman luotettavina, vertailuun tuliaan käyttämään opinnäytetyön yhteydessä tuotetun aineiston lisänä jo olemassa olevaa aineistoa. Tulosten perusteella pyritään esittämään menetelmien heikkoudet ja vahvuudet sekä arvioimaan, onko syväsekvensointi parempi ja järkevämpi diagnosointimenetelmä EML4-ALK-geenifuusion osoittamiseen. Lisäksi EML4-ALK-geenifuusiopositiivisista näytteistä tutkitaan syväsekvensointitulosten avulla, onko poikkeavuus muodostunut fuusion inversion vai deleetion johdosta. Syväsekvensoinnin antamalla lisäinformaatiolla pyritään löytämään uutta tietoa EML4-ALK-geenifuusiosta. Lopuksi pohditaan menetelmän soveltuvuutta kliinisessä palvelutoiminnassa luotettavuuden, nopeuden ja taloudellisuuden näkökulmasta.

Tähän opinnäytetyöhön liittyvän tutkimuksen tavoitteet ovat seuraavat:

1. Selvittää, kuinka syväsekvensoinnilla saadut tulokset vastaavat FISH-menetelmän avulla saatuja tuloksia EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamisessa keuhkojen adenokarsinomaan johtavan hoitolinjan tukemiseksi.
2. Arvioida spesifisesti, kuinka hyvin tutkittavilla menetelmillä saadut tulokset vastaavat erityyppisiä poikkeavuuksia. Tutkittavat geneettiset poikkeavuudet ovat fuusiosta johtuva inversio ja deleetio.
3. Verrata, kuinka luotettavia, nopeita ja taloudellisia tutkittavat menetelmät ovat kliinisessä tutkimuspalvelussa.

Opinnäytetyön hypoteesina on, että FISH- ja syväsekvensointimenetelmällä tulokset korreloivat. Haluttaessa tarkempaa ja perusteellisempaa tietoa geenivirheestä saadaan syväsekvensoinnilla suoritettulla analyysillä huomattavaa lisäarvoa. [6]

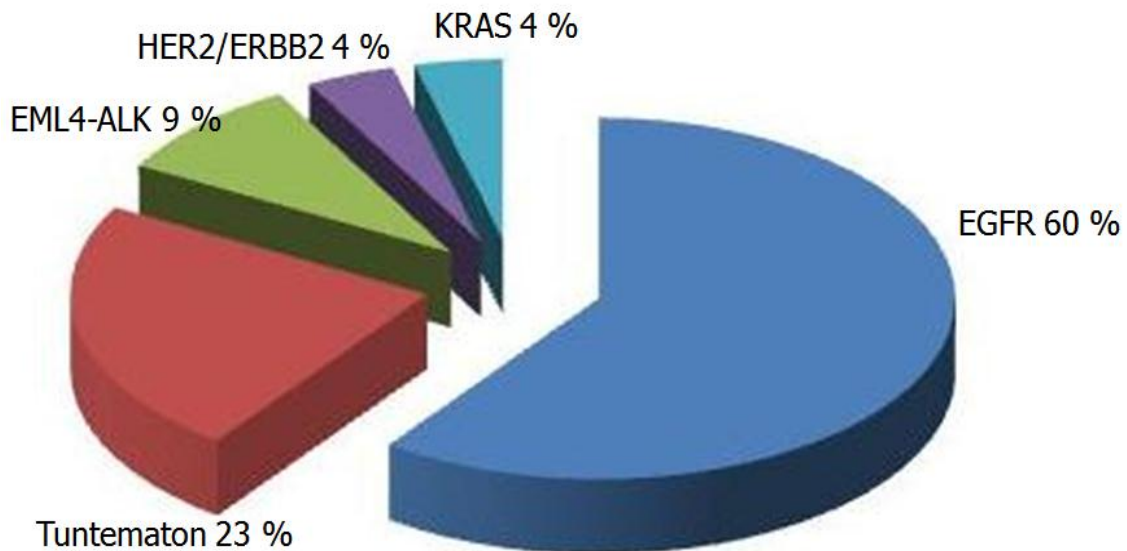


### 3 Teoriataustaa kirjallisuudesta

Keuhkosityöpä on yksi yleisimmistä syöpäkuoleman aiheuttajista [7]. Korkea keuhkosityöpäkuolleisuus johtuu siitä, että syöpä diagnosoidaan usein vasta sitten, kun tauti on ehtinyt edetä jo hyvin pitkälle sekä mahdollisesti levinnyt eli metastoitunut keuhkoista muihin elimiin. Tässä vaiheessa syöpä on vaikeasti parannettavissa, joten syöpähoidoilla lähinnä lievitetään syövän aiheuttamia oireita ja parannetaan potilaan jäljellä olevaa elämänlaatua. [4]

Kliinisesti keuhkosityöpä jaetaan kahteen päätyyppiin: pienisoluisen ja ei-pienisoluisen keuhkosityöpään. Näiden alatyypin hoitomenetelmät eroavat toisistaan. Ei-pienisoluisen keuhkosityöpä on selkeästi yleisin keuhkosityöpätyyppi kattaen noin 80 % kaikista keuhkosityövistä. Ei-pienisoluisen keuhkosityöpä jaetaan edelleen kolmeen pääalaluokkaan, jotka ovat levyepiteelikarsinooma, adenokarsinooma ja suurisoluisen karsinooma. 40 % kaikista ei-pienisoluisista keuhkosityövistä on tyypiltään adenokarsinomia, joita hoidetaan pääosin solunsalpaahoidoilla, mutta hoidon tulokset ovat olleet heikkoja pitkälle levinneissä ja metastoituneissa adenokarsinoomissa. [7] Arviolta noin 5 %:lla ei-pienisoluisista keuhkosityöpää sairastavilla potilailla on EML4-ALK-fuusio-onkogeeni, joka vastaa käytännössä yli 70 000:ta uutta syöpäpotilasta maailmalla joka vuosi. [4]

Viime vuosien syöpätiedon karttuminen ja sen ymmärtäminen molekyylitasolla on mahdollistanut uusien syöpähoitojen kehittämisen. Ei-pienisoluisen keuhkosityövän adenokarsinoomaa aiheuttavia geenimutaatioita tunnetaan jo monia. Niistä yleisin on EGFR-mutaatio, joka kattaa noin 60 % kaikista ei-tupakoivien potilaiden adenokarsinoomista. Tälle mutaatiolle on kehitetty jo EGFR-inhibiittorit, joiden avulla syöpäpotilaiden elämänlaatu ja elinajanpituus on tilastollisesti parempi verrattuna kemoterapialla hoidettuihin potilaisiin. [4] Kuviossa 1 sivulla 4 esitetään ei-tupakoivien NSCLC-adenokarsinoomaa sairastavien somaattisten geenimutaatioiden määrät. Tupakoivien ja aasialaistaustaisten potilasryhmässä sekä EGFR- että ALK-mutaatioiden suhde kasvaa kuin potilasryhmässä, joka on valittu pelkän keuhkosityöpätyypin perusteella. [4]



Kuvio 1. Tupakoimattomien aasialaistaustaisten potilaiden eri geenimutaatioiden osuudet NSCLC-adenokarsinoomissa [Mukaillen lähdettä 8].

Toiseksi yleisin ei-pienisoluisen keuhkosyövän adenokarsinooman tiedossa olevista mutaatioista on EML4-ALK-geenifuusio. Poikkeavuuden yhteys syöpään havaittiin vuonna 2007. EML4-ALK-geenimutaatiossa kromosomissa 2p tapahtuu fuusio EML4:n ja ALK:n välillä. EML4-ALK-geenimutaation seurauksena solu tuottaa virheellistä kinaasiproteiinia, joka aiheuttaa solujen kontrolloimattoman kasvun. Fuusioproteiinia vastaan on kehitetty inhibiittori, jonka avulla syöpäsolun toimintaa voidaan hillitä tai jopa pysäyttää sen kasvu kokonaan. Lääkkeenä toimii pieni inhibiittorimolekyylä crizotinibi, joka on kohdennettu ALK-geeniin estäen sen tyrosiini-kinaasi aktiivisuuden ja täten syöpä-geeniksi muuntumisen. Inhibiittorin toimintaperiaate on estää ATP-molekyylin tarttuminen tyrosiini-kinaasin aktivoivaan reseptoriin, jolloin mutaation aiheuttamaa virheellistä, erittäin tuumorigeenistä proteiinia ei muodostu. EML4-ALK-onkogeenin osoittamiseen on käytössä useita eri menetelmiä kuten IHC, RT-PCR ja FISH, joista FISH-menetelmää pidetään tällä hetkellä parhaana menetelmänä. Menetelmiä kehitetään jatkuvasti, jotta EML4-ALK-positiiviset potilaat voidaan diagnosoida oikein ja potilaille voidaan antaa täsmälääkehoitoa. EML4-ALK-fuusio-onkogeenin omaaville potilaille ei ole hyötyä perinteisistä syöpähoidoista kuten kemoterapiasta. [3;4;5;6;7;9]

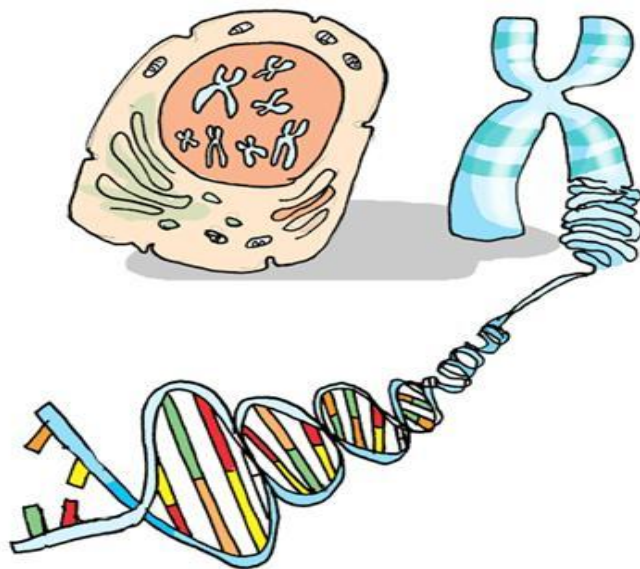
### 3.1 Solun perinnöllinen toiminta ja geenitekniikan perusteet

Tässä luvussa esitellään yksinkertaistetusti ja lyhyesti solun perinnöllistä toimintaa ja geenitekniikan perusteita, jotka auttavat ymmärtämään tähän opinnäytetyöhön liittyviä ilmiöitä ja menetelmiä.

#### 3.1.1 DNA elimistön toiminnan ohjaajana ja perimän tallentajana

Deoksiribonukeliinihappo eli DNA sisältää ihmisen perimän geneettisen informaation, joka on tallentunut DNA:n emästen järjestykseen. DNA sisältää tiedon eri proteiinien rakentamiseksi. DNA-jaksoja, joiden mukaan tietyt proteiinit rakentuvat, kutsutaan geeneiksi. [10] Niiden toiminta säätelee solutoimintoja, jotka vaikuttavat paljon eliöiden ulkoasuun ja ominaisuuksiin. Geenien lisäksi ympäristökijät muokkaavat yksilön ominaisuuksia. Geneissä ominaisuudet siirtyvät sukupolvelta toiselle. Mutaatioiden kautta geneissä voi tapahtua pysyviä muutoksia. [11]

Ihmisten perimä, kuten kaikkien eukaryoottisolujen DNA, on järjestynyt solun tumassa oleviksi kromosomeiksi (kuvio 2). Ihmisellä on yhteensä 22 autosomaalista kromosomi-paria, jotka esiintyvät identtisinä pareina eli diploidena. Autosomaaliset kromosomit eivät vaikuta yksilön sukupuolen määräytymiseen. Ihmisen sukupuolen määräävät kaksi sukupuolikromosomia. Naisen sukupuolikromosomit ovat XX ja miehen XY. Normaalisti ihmisellä on siis 46 kromosomia. [10]

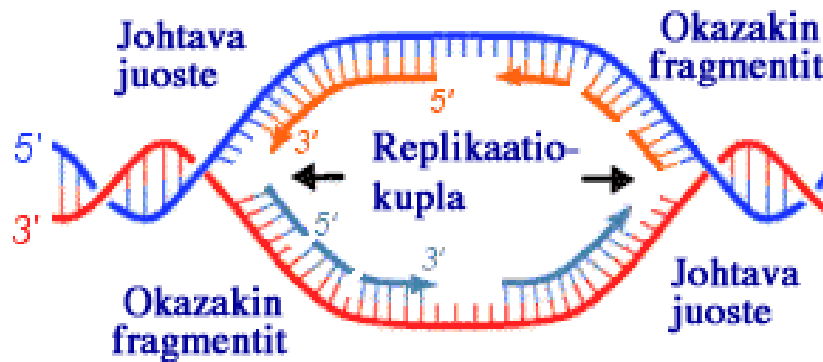


Kuvio 2. Geneettinen koodi pakkautuneena kromosomeiksi solun tumassa [12].

DNA-ketjussa on geenejä, joissa proteiinien rakennusohjeet ovat jakautuneet eksoni- ja intronialueisiin. Eksonit ohjaavat geenin toimintaa ja proteiinien koodausta. Niiden osuus koko perimästä on vain noin 1,5 %. Intronit käsittävät suurimman osan DNA:sta ja ovat proteiinien ei-koodaavia alueita. [10]

DNA esiintyy pääosin kaksijuosteisena kierteisenä molekyylinä. Sen runko koostuu deoksiriboosi-sokerista ja fosforista. DNA:n sisältämä informaatio on tallentunut neljän eri emäksen järjestykseen. Nämä neljä emästä ovat adeniini, guaniini, sytosiini ja tymiini. Lisäksi ribonukleasihapossa esiintyy urasiiliemästä tymiinillä. Emäksistä adeniini- ja guaniiniemäksiä kutsutaan puriineiksi ja sytosiini- ja tymiiniemästä ja RNA:n urasiiliemästä kutsutaan pyrimidiineiksi. Emäkset esiintyvät aina puriini-pyrimidiinipareina, jolloin ne pystyvät muodostamaan kaksi vetysidosta, sillä niiden kolmiuotteiset muodot kohtaavat toisensa. Vetysidosten ansiosta DNA-juosteet pysyvät toisissaan kiinni ja pystyvät kiertymään superkierteiseksi rakenteeksi. Vastinemäsparit ovat A-T, G-C ja RNA:ssa A-U. Nukleotidiksi kutsutaan DNA:n tai RNA:n rakenneyksikköä, joka on sokerin, emäksen ja fosforin muodostama kokonaisuus. [10]

Jotta elimistö pysyy toimintakykyisenä, on solujen jakaannuttava aika ajoin. Solun jakautumisen yhteydessä myös perintöaineksen on siirryttävä uuteen soluun, jolloin DNA:n on kahdennuttava. DNA:n kahdentuminen eli replikaatio alkaa, kun helikaasi-entsyymi katkaisee vastinemästen väliset vetysidokset ja DNA:n juosteen erkanevat toisistaan. Kromosomissa on useita replikaatiokuplia, jossa DNA kahdentuu samanaikaisesti. Seuraavaksi primaasi-entsyymi rakentaa RNA-alukkeet erkaantuviin DNA-juosteisiin, joista kopioiminen aloitetaan. DNA-polymeraasi rakentaa vastinjuostetta emäspariperiaatteen mukaisesti vain 5'–3' suuntaisesti, jolloin niin sanottu johtava juoste muodostuu yhtenäisenä ketjuna ja toinen juoste rakentuu lyhyinä Okazakin fragmentteina. Syntyneessä vastinjuosteessa on vielä paikoillaan RNA-alukkeet, ja sokeri- ja fosfaattimolekyylien väliin on jäänyt tyhjiä aukkoja. Toinen DNA-polymeraasi korvaa RNA-alukkeet DNA-nukleotideilla. Ligaasi-entsyymi puolestaan korjaa aukot sokeri- ja fosfaattimolekyylien välillä. Näin perimäaine on kahdentunut identtisiksi DNA-kaksoisjuosteiksi alkuperäisen DNA:n rakenteen mukaisesti. [10;13] DNA:n kahdentuminen esitetään kuviossa 3 sivulla 7.



Kuvio 3. DNA:n kahdentuminen. [13]

Perimäaineksen geenitekniset menetelmät perustuvat DNA:n rakentumiseen emäspäri-aatteen mukaisesti. Erona muun muassa FISH- ja NGS-menetelmässä tehtävän DNA:n vastinjuosteen muodostuminen luonnolliseen DNA-replikaatioon verrattuna on, että leimatut koettimet, joiden emäsekvenssi tunnetaan, liittyvät DNA:n mallijuosteeseen. Näin voidaan tunnistaa haluttuja DNA-jaksoja ja havaita DNA-jaksossa tapahtuneita mutaatioita, jolloin koetimella ei ole komplementaarista vastinjuostetta. Hybridisaation avulla voidaan kvantitoida DNA:n tai RNA:n määrä, tutkia geenien ilmentymistä ja tunnistaa eksoni-introni-raja-alueita. [6]

Transkriptiossa geneettinen informaatio välittyy DNA:lta RNA:lle. Siinä DNA toimii mallijuosteena, jonka mukaan lähetti-RNA eli mRNA valmistetaan. Translaatiossa mRNA:n rakenne ohjaa proteiinien valmistusta, jolloin geneettinen informaatio määrä proteiinien rakennesein eli aminohappojen järjestyksen. Sen sisältämä informaatio on jakautunut kolme peräkkäistä emäksen muodostamiin yksiköihin, kodoneihin. Jokaista koodonia vastaa yksi tai useampi aminohappo. Proteiinisynteesissä kodonit tulkitaan tietyksi aminohapoksi, ja niistä valmistetaan aminohappoketjua geenin sisältämien rakennusohjeiden perusteella. Valmiit aminohappoketjut laskostuvat koostumuksensa mukaan proteiineiksi, jotka toimivat spesifisesti omassa tehtävässään. Proteiinit ovat solujen päärakennusaine, ja lisäksi ne säätelevät solun toimintaa ja ovat siten välttämättömiä elintoiminnoille. Proteiinit toimivat mm. katalyyttisinä entsyymeinä elimistön kemiallisissa reaktioissa sekä solukalvojen pintareseptoreina, hormoneina ja kasvutekijöinä. [15]

### 3.1.2 DNA:n emäsjärjestyksen selvittäminen ja Sangerin menetelmä

Sekvensoinnin avulla voidaan määrittää DNA:n emäsjärjestys. Sekvensoinnin periaatteena on, että tutkittava DNA pilkotaan pienemmiksi jaksoiksi ja jokaisen jakson emäsjärjestys määritetään erikseen. Lyhyiden DNA-jaksojen emäsjärjestystiedot yhdistetään, jolloin molekyylin koko genomin emäsjärjestys saadaan selville. [15]

DNA:n rakenne keksittiin vuonna 1953, mutta ensimmäiset sekvensointimenetelmät kehittivät Frederick Sanger ja Alan Maxam ja Valter Gilbert 1970-luvun lopulla. Sangerin ja Maxam-Gilbertin menetelmät ovat vieläkin käytössä, ja tutkijat saivat jaetun Nobelin palkinnon vuonna 1980 saavutustensa johdosta. [16]

Sangerin sekvensointi eli dideoksimenetelmä on entsyymaattinen menetelmä DNA:n emäsjärjestyksen sekvensoimiseen. Se perustuu DNA-polymeraasin toimintaan ja nukleotideihin, jotka esiintyvät muokattuina dideoksinukleotideina, joista puuttuu 3' OH-ryhmä. Menetelmä aloitetaan leimatun sekvensointialukkeen liittämällä sekvensoitavalle alueelle. Tämän jälkeen alukkeesta lähtien rakennetaan templaatile eli mallijuosteelle komplementaarista vastinnauhaa. Dideoksimenetelmässä DNA:n synteesi pysähtyy, kun DNA-polymeraasi ei pysty liittämään uutta nukleotidia replikaation pysättävän dideoksinukleotidin jälkeen. Sangerin menetelmässä käytetään neljää eri koeputkea, jossa jokaisessa on sekä kaikkia nukleotideja että yhtä dideoksinukleotidia. Näin ollen DNA-polymeraasi syntetisoi DNA:ta koeputkessa ja synteesi loppuu aina tietyn emäksen kohdalta, riippuen mitä dideoksinukleotidia koeputki sisältää. Koska dideoksinukleotidia on koeputkessa vain vähän, loppuu synteesi satunnaisesti eri kohdassa sekvenssiä olevan emäksen kohdalta. Näin syntyy erimittaisia DNA-jaksoja. Polymeerasireaktion jälkeen polymeerasireaktiossa syntyneet DNA-jaksot erotellaan geelielektroforeesilla. Erottelu perustuu DNA-fragmenttien pituuteen, sillä pienemmät fragmentit kulkevat geelin läpi virtaavassa sähkökentässä nopeammin kuin suuret fragmentit. Alukkeen leimaus mahdollistaa juosteiden erottumisen geelissä. Jo yhden nukleotidin ero voidaan havaita DNA:n kulkeutumismatkasta. DNA-jaksojen erottelun avulla voidaan päätellä DNA-sekvenssin emäsjärjestys. [15;17]

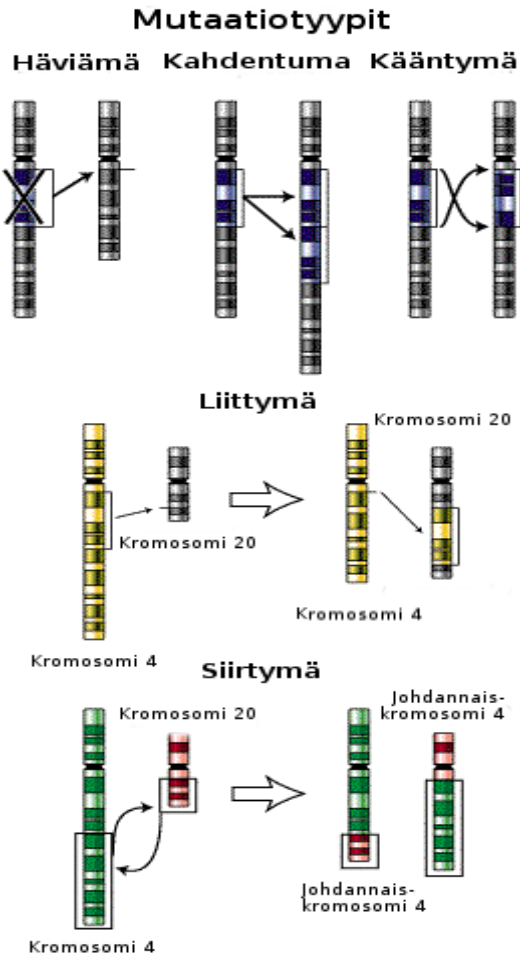
Sangerin menetelmä on ensimmäisen sukupolven sekvensointimenetelmä, jonka pohjalta uuden sukupolven menetelmät ovat kehittyneet. Sangerin menetelmä on ollut yli 30 vuotta suosituin käytössä oleva sekvensointimenetelmä, mutta kehittyvä teknologia

on mahdollistanut nopeamman, edullisemmän ja tarkemman menetelmän DNA:n emäsjärjestyksen selvittämiseksi. Syväsekvensoinnin suuri etu perinteiseen Sangerin menetelmään verrattuna on sen edullisuus ja mahdollisuus tuottaa suuria määriä sekvensointidataa. [8]

### 3.1.3 Geenimutaatiot

Mutaatiot ovat muutoksia geeneissä, kromosomeissa tai kromosomistoissa, jotka aiheutuvat perimäaineen eli DNA/RNA:n sekvenssien kasvusta, vähentymisestä tai muuttumisesta. Spontaaneja mutaatioita syntyy solun normaalin toiminnan yhteydessä, sillä DNA-polymeraasi ei ole erehtymätön, vaan tekee joskus kopiointivirheitä. DNA-polymeraasin kopiointivirheet saattavat johtaa perinnöllisiin sairauksiin, mikäli mutaatio tapahtuu ituradalla. Samalla se on myös edellytys evoluutiolle, sillä muutoin jälkeläisten geenit olisivat vanhempiensa geenien kaltaisia. Mutageenit altistavat solut kemiallisille ja fysikaalisille häiriötekijöille, jolloin mutaation todennäköisyys kasvaa. Tunnettuja mutageeneja ovat esimerkiksi syöpää aiheuttavat karsinogeeniset kemikaalit, ionisoiva säteily ja tietyt virukset. [18]

DNA:ssa tapahtuu mutaatioita jatkuvasti, mutta vain pieni osa jää pysyviksi. Evoluution aikana ihmiselle on kehittynyt erittäin tehokkaat korjausmekanismit erityyppisten mutaatioiden korjaamiseksi. Lisäksi yksittäiset mutaatiot ovat neutraaleja, eikä niillä ole merkitystä elimistön toiminnalle. Monien mutaatioiden kertymien samaan soluun saattaa johtaa sairauksiin kuten syöpään. Mutaatioiden vaikutuksen lisäksi niiden käsittämä laajuus vaihtelee suuresti. Ne voivat olla yhden nukleotidin muutoksia eli pistemutaatioita tai pidempien, jopa miljoonien emäsparien muutoksia. Laajemmissa mutaatioissa kromosomin rakenteessa tai lukumäärässä voi tapahtua muutoksia. [18;6]



Kuvio 4. Kromosomimutaatioiden päätyypit. [19]

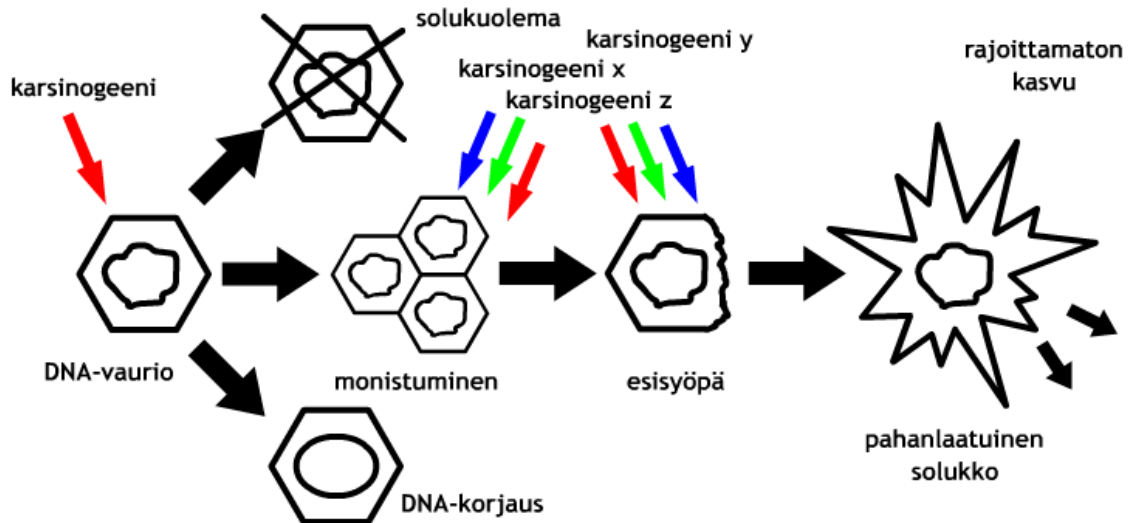
Kromosomimutaatiot jaetaan viiteen päätyyppiin, jotka ovat deleetio, duplikaatio, inser-tio, inversio ja translokaatio (kuvio 4). Deleetiossa eli häviämässä osa perimäaineksesta häviää, jolloin kromosomin pituus lyhenee ja kromosomialue esiintyy solussa vain yksinkertaisena. Kahdentumassa eli duplikaatiossa kromosomialueen DNA on puolestaan monistunut niin, että alueen geenit esiintyvät solussa kolmikertaisena eli trisomisina. Liittymässä eli insertiossa toisesta kromosomista liittyy osa tai osia toiseen kro-mosomiin. Kääntymässä eli inversiossa kromosomi on katkennut kahdesta kohdasta ja katkennut pala on kääntynyt kromosomissa 180°. Tällöin geenijärjestys on muuttunut osassa kromosomia käänteiseksi. Siirtymässä eli translokaatiossa taas kromosomeissa on tapahtunut katkoksia ja irronneet kromosomiosat ovat vaihtaneet paikkaa eri kro-mosomien kesken. Nämä kromosomimutaatiot voivat aiheuttaa uusien yhdistelmä- eli fuusiogeenien synnyn, jolloin fuusion osapuolten geenien toiminta saattaa muuttua. [20]



### 3.2 Syövän synty

Solutasolla syöpään sairastuminen johtuu aina perintötekijöiden virheistä. Yleisesti syöpä ei kuitenkaan ole perinnöllinen sairaus, mutta tietyt perityt geenivirheet saattavat suurentaa syöpään sairastumisen riskiä, kun kaikissa soluissa on jo valmiina yksi merkittävä geenivirhe. Kuitenkin vain muutama prosentti syöivistä aiheutuu synnynnäisestä geenivirheestä. [6;21]

Syövän synty on monivaiheinen tapahtumasarja, jonka seurauksena kasvunsäätelyjärjestelmiin kasautuneet vauriot eli mutaatiot saavat solun irtautumaan elimistön omasta säätelyjärjestelmästä ja jakautumaan kontrolloimattomasti. (Kuvio 5.)



Kuvio 5. Syövän synty. [22]

DNA:n kopiointissa tapahtuu jatkuvasti virheitä, mutta elimistössä on DNA-vaurioita eliminoivia korjaus- ja puolustusmekanismeja, jotka korjaavat suurimman osan DNA:ssa tapahtuneista virheistä. Korjausmekanismi saattaa kuitenkin pettää, ja geenivirhe voi periytyä tytärsoluille, mikäli solu on vielä jakautumiskykyinen. Vasta useat samaan soluun kasautuneet DNA-mutaatiot voivat saada aikaan malignin eli pahanlaatuisen syöpäsolun kehittymisen. Syövälle tunnusomaista on solun itsenäinen jakautuminen, oma verisuonitus ja kyky tunkeutua ympäröivään kudokseen. [23a]

### 3.3 Syöpägeenit

Syöpägeenejä ovat geenit, joiden DNA-muutosten aiheuttama virheellinen toiminta johdtaa eri vaiheiden kautta solujen malingoitumisprosessiin. Normaalisti syöpägeenit ovat solun kasvun ja kehityksen säätelijöitä. Syöpägeenit jaetaan kahteen päätyyppiin: onkogeeneihin ja kasvunrajoitegeeneihin. [23a]

#### 3.3.1 Onkogeenit

Syöpägeenit eli onkogeenit ovat solun normaalitoimintaa säätelevien niin sanottujen proto-onkogeenien muuttuneita muotoja. Onkogeenien vaikutus syövän syntyyn perustuu niiden toiminnan aktivoitumiseen ja sitä kautta solukasvun säätelyyn. Onkogeenit toimivat eräänlaisena solun kaasupolkimena. Jos kaasupoljin jumittuu pohjaan ja aktivoituu pysyvästi, solu alkaa toimia poikkeavasti. Syöpäsolun itsenäisyys ja nopeutunut solunjakautuminen ovat seurausta juuri onkogeenien kasvusignaali välityksen aktivoimisesta. Aktivoitumiseen riittää jo yhden alleelin vaurioituminen, jolloin onkogeenin toiminta lisääntyy monikertaiseksi tai muuttuu väärenlaiseksi. [23a;21]

Onkogeenit voivat olla sekä solukalvon pinnalla olevia reseptoreita tai niihin sitoutuvia molekyyliä, jotka aktivoivat solunjakautumisen. Osa onkogeeneistä on proteiinikasvutekijöitä, jotka stimuloivat kasvusignaalin välittymisen solun tumaan. Esimerkiksi tässä opinnäytetyössä tutkittava ALK-geenin muuntuneen aktivaation aiheuttama tyrosiinkinaasin aktivoituminen lisää onkogeenien aktiivisuutta. Hiirimalleissa tämä on aiheuttanut lukuisia adeokarsinomia. Onkogeenit voivat myös vaikuttaa suoraan DNA:n toimintaan säädellen geenien luentaa tai DNA:n jakautumista. [23a;24]

#### 3.3.2 Tuumorisupressori- eli kasvunrajoitegeenit

Tuumorisupressori- eli kasvunrajoitegeenit toimivat solun jarrupolkimina, sillä ne hillitsevät solun kasvua. Kasvunrajoitegeenit kontrolloivat solun jakautumista tarttumalla proteiinien pintaan, jotka vapaana ollessaan nopeuttavat solun jakautumista. Kasvunrajoitegeenit voivat olla myös solun pinnalla sijaitsevia reseptoreita. Kun kasvunrajoitegeenien toiminta on häiriintynyt tai estynyt kokonaan, solun jakautuminen kiihtyy ja jatkuu periaatteessa loputtomasti. Kasvunrajoitegeenien inaktivoitumiseen vaaditaan useimmiten molempien geenialleelien toiminnan häiriintyminen. [23a;21]

Kasvunrajoitegeenit luokitellaan kolmeen pääryhmään: gatekeepers, caretakers ja landscapers. Portinvartijageenit eli gatekeeper-geenit estävät soluja jakautumasta tai kiihdyttävät solukuolemaa. Tällä hetkellä tärkein syöpälääkkeiden ja sädehoidon vaikutusmekanismi liittyy apoptoosin käynnistämiseen, jolloin syöpäsolu kuolee ohjelmoitusti. Caretaker-geenit pitävät yllä DNA:n eheyttä ja niiden inaktivoituessa soluun kerääntyy enemmän mutaatioita, joiden kasaantuminen soluun edesauttaa syövän syntyä. Landscaper-geenit puolestaan estävät solun kasvuympäristön muuttumista syövän kasvua edistäväksi. [23a]

#### 3.4 Pahalaatuisen kasvaimen kehittyminen

Normaalissa tilanteessa solun jakautuminen on elimistön tarkasti säätelemä prosessi. Syövän kehittyessä säätelyjärjestelmä pyörittää solusykliä, joka ei ole elimistön kontrolloitavissa. Usein merkittävät muutokset kontrollijärjestelmässä aiheutuvat onkogeenien aktivoitumisesta ja DNA:n korjausjärjestelmän pettämisestä, jolloin soluun alkaa kasaantua DNA-muutoksia. Kiihtyneen solun jakautumisen johdosta muuntuneiden solujen tytärsolut ovat yliedustettuna terveessä solukossa. Muuntuneisiin soluihin muodostuu erilaisia mutaatioita ja kilpailuetua antavat geenimuutokset rikastuvat kasvaimessa, kun solun kasvuun negatiivisesti vaikuttavat mutaatiot karsiutuvat pois. Syöpäsolujen välillä tapahtuu siis evoluutiota, ja lopulta mutaatioyhdistelmistä kaikista aggressiivisimmasta solukloonista kehittyy kasvain. [18]

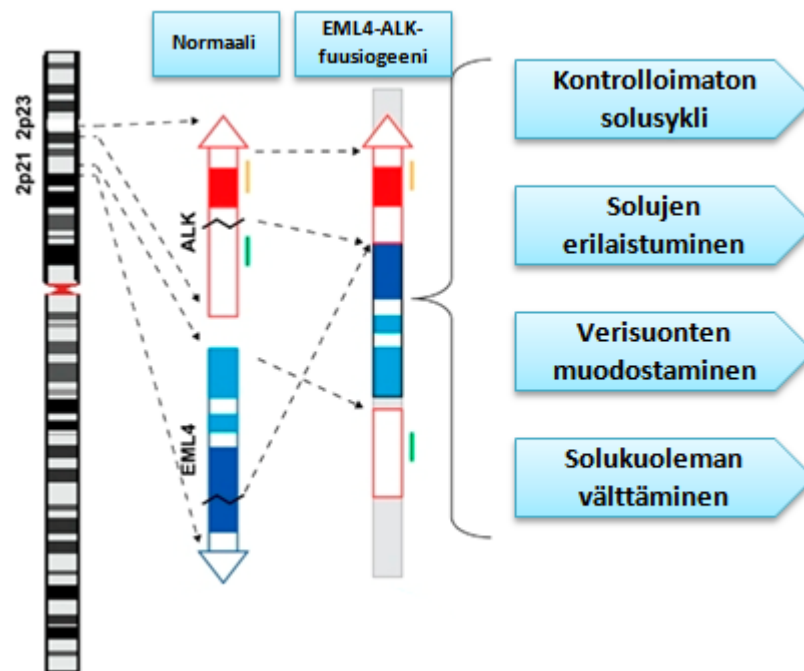
Kasvaimen kehitys on hidasta ja vaatii useita satoja solunjakautumissyklejä. Normaalisolun jakautuminen loppuu noin 80 jakautumissyklin jälkeen, sillä jokaisen solun jakautumisen yhteydessä kromosomien telomeeriset rakenteen lyhentyvät, kunnes jakautuminen ei ole enää mahdollista. Syöpäkasvaimet pystyvät kuitenkin useimmiten tuottamaan telomeerien lyhentymisen estävää telomeraasientsyymiä, jolloin loputon solunjakautuminen on mahdollista. [21]

Kasvaimen kasvu riippuu jakautumissyklissä olevien solujen määrästä, syklin pituudesta ja solujen kuolemasta. Yleistä useimmille syöville on syöpäsolujen kiihtynyt jakautumisnopeus verrattuna terveeseen solukloon. Syöpäsolujen jakautumissykli on koko ajan aktiivinen, eivätkä solut siirry syklin jälkeen lepotilaan, toisin kuin elimistön terveet solut, sillä ne ovat normaalien säätelytekijöiden ulottumattomissa. Kasvaimen kasvunopeuteen vaikuttaa myös solukuoleman välttäminen, joka vaatii muutoksia solukuole-

maa ohjaavissa geeneissä. Jotta syöpäkasvain voi kasvaa kiinteässä kudoksessa yli kuutiomillimetrin kokoiseksi, tarvitsee se oman verisuonituksen hapen ja ravinnon turvaamiseksi. Syöpäsoluista erittyy hapen puutteen vuoksi verisuonten syntyä edistäviä kasvutekijöitä, ja näin se voi kasvattaa kokoaan kudoksessa. Toisaalta syöpäsolut kestävät huomattavaakin hapenpuutetta. [18;6;23a]

### 3.5 EML4-ALK-fuusio-onkogeeni

EML4-ALK-fuusio-onkogeenin yhteys keuhkosyövän ei-pienisoluisen adenokarsinomaan löydettiin vuonna 2007 Manabu Soda ja hänen tutkijaryhmänsä toimesta. EML4-ALK-fuusio on kromosomin 2p sisällä inversion kautta muodostunut pieni fuusiogeeni, ja sillä on todettu olevan kasvaimia aiheuttava vaikutus (Kuvio 6). [9;3]



Kuvio 6. EML4-ALK-fuusiogeeni aiheuttaa syöpää [Mukaiillen lähde 25].

Sekä ALK että EML4 sijaitsevat kromosomin 2 lyhyessä käsivarressa, ja niiden etäisyys toisistaan on 12 Mb. Geenit ovat suuntautuneet vastakkaisiin 3' ja 5' suuntiin. ALK-geenillä voi olla myös muissa kromosomeissa eri fuusio-osapuolia, kuten TFG ja KIF5B, mutta fuusio EML4:n kanssa on kaikista yleisin fuusio-tyyppi NSCLC:ssä. Lisäksi Koivunen et al. ovat huomanneet tutkimuksissaan, että yhtä tapaus lukuun ottamatta EGFR-, KRAS- ja ALK-mutaatiot ovat toinen toisensa poissulkevia mutaatioita. EML4-ALK-fuusio-onkogeeneja on löydetty 11 erilaista variaatiota (Sasaki 2010), sillä geenien

katkoskohtien välillä on vaihtelua. Variaatioissa ALK-geenin sijainti on aina sama, mutta EML4-geenin koko ja sijainti vaihtelee katkoskohdasta riippuen. Variaatioiden merkitys ja vaste täsmähoitoon on vielä epäselvä. Lisäksi monet variaatiot aiheuttavat haasteita fuusion diagnosoinnissa. [7;26]

Kaikista ei-pienisoluisista keuhkosityövistä noin 5 % on EML4-ALK-fuusiosta johtuvia,, mikä vastaa vuositasolla noin 70 000 potilaan määrää maailmanlaajuisesti. Shaw'n et al. kliinisten tutkimusten mukaan EML4-ALK-fuusio-onkogeeni esiintyy potilasjoukolla, jotka ovat keski-ikänsä noin 10 vuotta nuorempia kuin esimerkiksi EGFR-mutaation aiheuttamassa ei-pienisoluisessa keuhkosityövissä. EML4-ALK-tapauksissa keski-ikä on noin 52 vuotta, kun taas EGFR-mutaatiossa se on 64 vuotta. Lisäksi on todettu, että EML4-ALK-mutaatiota tavataan selvästi eniten vähän tupakoivilla tai tupakoimattomilla potilailla, jotka sairastavat adenokarsinoomaa. Koivunen et al. ovat todistaneet myös, että potilaan syntyperällä on yhteys fuusion esiintyvyyteen: aasialaistaustaisten potilaiden keskuudessa EML4-ALK-fuusio oli yleisempi kuin eurooppalaista alkuperää olevilla potilailla. Lisäksi EML4-ALK-geenifuusiota on tavattu myös rinta- ja peräsuolensyövässä. [4;3]

### 3.6 Keuhkosityövän esiintyvyys meillä ja maailmalla

Keuhkosityöpä on maailman yleisin syöpämuoto sen ilmaantuvuudessa ja kuolleisuudessa mitattuna. Vuonna 2008 maailmassa keuhkosityöpään arvioitiin sairastuneen 1,6 miljoonaa ja siihen kuolleen 1,3 miljoonaa ihmistä. [2]

Suomen syöpärekisterin tietojen mukaan vuonna 2010 suomalaisilla miehillä todettiin 1615 uutta keuhkosityöpätapausta, joiden osuus kaikista syöpädiagnooseista on 10,8 %. Keuhkosityöpä on tällä hetkellä miesten toiseksi yleisin syöpä eturauhassyövän jälkeen (31,6 %). Kuitenkin keuhkosityöpään sairastumistodennäköisyys on jatkuvasti pienentynyt 1970-luvun alkupuolelta alkaen. [23b;27a]

Suomalaisilla naisilla puolestaan todettiin samana vuonna 2010 704 uutta keuhkosityöpätapausta. Tämä vastaa 5,1 %:a kaikista syöpälöydöksistä, ja keuhkosityöpä on naisilla neljänneksi yleisin syöpä. Keuhkosityövän määrä naisten keskuudessa on kasvussa, mikä on seurausta naisten tupakoinnin yleistymisestä. [23b;27b]

Keuhkosityöpään sairastumisen suurin vaaratekijä on tupakan poltto. Se aiheuttaa 85–90 % kaikista keuhkosityöpätapauksista. Keuhkosityövän ilmaantuvuus onkin suoraan verrannollinen tupakan kulutukseen, ja tupakoijan todennäköisyys sairastua keuhkosityöpään on 15–20 kertaa suurempi kuin tupakoimattoman. Myös passiivinen tupakointi nostaa riskiä sairastua keuhkosityöpään 2–3-kertaiseksi. Tupakoinnin aiheuttaman riskin suuruuteen vaikuttavat tupakoinnin aloittamisikä, tupakointivuodet ja poltettujen savukkeiden määrä. Myös muut elinympäristön tekijät suurentavat keuhkosityöpään sairastumisen riskiä. Esimerkiksi asbesti, ionisoiva säteily ja muut teollisuuden ja liikenteen aiheuttamat hengitysilman karsinogeenit alistavat keuhkosityöväälle. Useiden eri tekijöiden yhteisvaikutus moninkertaistaa sairastumisen riskiä. [23b]

### 3.7 Keuhkosityöpätyypit

Keuhkoalueen syövät jaetaan histologisen luokituksen perusteella kahteen pääryhmään: pienisoluisen karsinomaan eli mikrosellulaarikarsinomaan ja ei-pienisoluisen karsinomaan, NSCLC:hen. Adenokarsinoma on yksi ei-pienisoluisen keuhkosityövän kolmesta alatyypistä ja ne voidaan jakaa vielä muun muassa asinaarisiin, papillaarisiin, bronkioloalveolaarisiin ja solideihin limaa muodostaviin alatyyppeihin. Niiden erilaistumisastetta voidaan kuvailla hyvin, kohtalaisesti tai huonosti erilaistuneiksi. [28]

Adenokarsinoman osuus kaikista keuhkosityöivistä on noin 25 %, ja sen esiintyvyys vaihtelee eri maissa. Tauti on yleistymässä kaikkialla maailmassa ja USA:ssa se on yleisin ei-pienisoluisen karsinoma, sen osuus on noin 50 % kaikista tapauksista. Euroopan vastaava luku on noin 30 %, kun vielä 20 vuotta sitten keuhkosityövän adenokarsinomat käsittivät vain 5 % ei-pienisoluisista karsinoomista. [29]

Useimmiten adenokarsinoma on keuhkoparenkyymissa perifeerinen pyörötuumori tai kasvainmassa. Liman muodostus on ominaista suurimmalle osalle adenokarsinomatyypeistä. Lisäksi adenokarsinoomille on tyypillistä, että se tunkeutuu verisuoniin ja muodostaa etäpesäkkeitä taudin varhaisessa vaiheessa, vaikka primaarikasvain on usein pieni. [29] Etäpesäkkeitä muodostuu yleisimmin maksaan, lisämunuaisiin, luustoon, aivoihin ja ihonalaiseen kudokseen [30].

Adenokarsinooma on naisten yleisin keuhkosyöpätyyppi, ja se liittyy tupakointiin. Kuitenkin huomattavaa on, että tupakoimattoman potilaan syöpätyyppi on lähes poikkeuksetta adenokarsinooma. [7;23b]

### 3.8 Keuhkosyövän oireet, diagnostiikka ja hoidon suunnittelu

Keuhkosyöpä on usein alkuvaiheessa oireeton ja saattaa muodostaa suurenkin kasvaimen ilman huomattavia oireita. Lisäksi oireiden ilmaannuttua ne jäävät helposti tutkimatta, sillä oireet ovat epäsepesifisiä. Ne riippuvat primaarituumorin koosta, sijainnista ja leviämisestä imusolmukkeisiin ja rintaontelon eli thoraxin ulkopuolelle. Tärkeimmät oireet keuhkosyövässä ovat yskä, veriyskä, toistuvat keuhkokuumeet, hengenahdistus ja rintakipu. Yleisoireina, jotka saattavat olla pitkään ainoita oireita, esiintyy ruokahaluttomuutta, laihtumista, väsymystä, kuumeilua ja heikkoutta. Keuhkosyövän varhaisvaiheen oireettomuus johtaa helposti liian myöhäiseen taudin toteamiseen, jolloin syöpä on levinnyt jo parantavan hoidon ulottumattomiin. [23b;28]

Keuhkosyöpää epäiltäessä potilaalta otetaan röntgenkuva keuhkoista. Kuvan avulla voidaan havaita näkyvät kasvaimet, joiden läpi mitta on yli 1 senttimetri. Jatkotutkimuksena potilaille suoritetaan tähystys eli bronkoskopia. Bronkoskopiassa tähystin vietään suun ja henkitorven kautta keuhkoihin, ja sen avulla voidaan tarkastella keuhkosolukkoa ja mahdollisen syövän levinneisyyttä. Epäilyttäviltä alueilta voidaan ottaa kudoksenäytteitä eli biopsioita. Mikroskoopilla tutkituista kudoksenäytteistä patologi tutkii keuhkokudoksen histologian perusteella, onko kyseessä syöpä. Biopsian lisäksi potilaasta voidaan ottaa ohutneulanäyte, mikäli tautia ei ole voitu osoittaa varmuudella edellä mainituilla tutkimuksilla. Ohutneulanäyte otetaan ihon lävitse ohuella neulalla, mutta toimenpide voidaan suorittaa vain, jos kasvaimen sijainti mahdollistaa sen. Tutkimuksessa neula kohdistetaan kasvaimeen ultraääni- tai kerroskuvauksen avulla, ja saatu näyte tutkitaan syöpäsolujen löytämiseksi. [31] Muussa tapauksessa kudoksenäyte otetaan leikkauksen yhteydessä [30].

Laboratoriodiagnostisina testeinä syöpänäytteestä tutkitaan selekoidusti vasta-aine alatyypityksiä oikean keuhkosyöpädiagnoosin varmistamiseksi. Lisäksi adenokarsinoomissa, erityisesti ei-tupakoivien potilaiden joukosta, selvitetään EGFR- ja ALK-positiivisuus, jolloin näiden kahden yleisimmän keuhkosyöpää aiheuttavan mutaation läsnäolo voi-

daan todeta. Samalla voidaan myös pois sulkea täsmähoidon mahdollisuus EGFR- ja ALK-negatiivisilla potilailla. [6]

Keuhkosityövän levinneisyysluokituksen eli TNM-luokituksen avulla valitaan käytettävä hoitomuoto. Luokitus toimii myös klinikon tukena hoitotuloksen arvioinnissa, raportoinnissa ja potilaan elossaoloennusteena. TNM-luokituksen T tarkoittaa tuumoria (primääripesäke), N nodusta (alueelliset imusolmukkeet) ja M metastaaseja (etäpesäkkeet). Hoitopäätökseen eniten vaikuttavat tekijät ovat kasvaimen histologinen alatyypipi, kliininen levinneisyysaste sekä potilaan yleiskunto. TNM-luokituksen tekemiseksi on tehtävä tutkimuksia, joilla selvitetään kasvaimen päätyyppi, kasvaimen leviäminen sekä leikkauksen tai sädehoidon käytön mahdollisuus hoidossa. [30]

Todetun keuhkosityövän levinneisyyden selvittäminen ohjaa oikeiden hoitomuotojen valitsemiseen. Levinneisyyttä tutkitaan useimmiten keuhkojen kerroskuvauksella eli tietokonetomografialla, jossa potilaan ylävartalosta piiryy röntgenlaitteella tarkkoja poikkeileikkauksuvia. Joskus magneettitutkimus on tarkempi ja käyttökelpoisempi tutkimusmenetelmä kuin keuhkojen kerroskuvaus. Magneettitutkimuksella voidaan nähdä tarkemmin rintakehän seinämän ja keuhkopussin alueen kasvaimen levinneisyys. Keuhkosityövässä muodostuu etäpesäkkeitä yleisimmin maksaan, lisämunuaisiin, luustoon, aivoihin ja ihonalaiseen kudokseen. Jos potilaalla epäillään olevan etäpesäkkeitä, suoritetaan erilaisia kuvantamistutkimuksia, kuten aivojen tietokonetomografia, luuston isotooppikuvaus ja luuröntgenkuvaus. [30;31]

Ennen syöpähoitojen aloittamista on selvitettävä kasvaimen solutyyppi ja levinneisyys. Taudin histologinen luokittelu on ensiarvoisen tärkeää, sillä eri karsinoomien hoito ja ennusteet poikkeavat toisistaan. Lisäksi hoidon suunnitteluun vaikuttavat potilaan yleiskunto, keuhkojen toimintakapasiteetti sekä potilaan oma halu osallistua hoitoihin. Syöpähoidot ovat aina rankkoja, eikä niitä voida siksi antaa heikkokuntoisille potilaille. Esimerkiksi hyvin iäkkään, heikkokuntoisen ja pitkälle levinneen keuhkosityövän hoidon tavoitteena on oireiden lievittäminen syövän hoidon sijaan. Taas varhain todetuissa keuhkosityövissä ja hyväkuntoisten potilaiden kohdalla hoitojen tavoitteena on paraneminen tai ainakin elinajan pidentäminen ja hyvän elämänlaadun ylläpitäminen. [29;31;32]



Spirometrialla tutkitaan keuhkojen toimintakykyä, ja sitä käytetään potilaan leikkaus- ja sädehoitokelpoisuuden arvioimiseen. Spirometrilla voidaan arvioida, jääkö leikkauksen tai sädehoidon jälkeen keuhkoihin riittävästi pinta-alaa kaasujen vaihtoon, niin että keuhkojen toimintakyky säilyy riittävällä tasolla. [31] Esimerkiksi leikkaus tai radikaali sädehoito saattaa alentaa keuhkojen toimintaa pysyvästi 50 prosentilla. [28].

Potilaan toimintakyky keuhkosyövän diagnosointihetkellä vaikuttaa primaarihoitomuotoon. Toimintakyvyn arviointiin käytetään sekä WHO:n suorituskykyluokitusta (0–4) että Karnofskyn asteikkoa (10–100 %). (Taulukko 1.)

Taulukko 1. Karnofskyn ja WHO:n toimintakykyluokitus [33].

Karnofskyn luokitus		WHO:n luokitus (Zubrod, ECOG)	
Kriteerit	Luokka (%)	Luokka	Kriteerit
Kykenee normaaliin toimintaan, ei oireita taudista	100	0	Kykenee normaaliin toimintaan, suoriutuu kaikista ennen sairautta tekemistään toimista ilman rajoituksia
Kykenee normaaliin toimintaan, vähäisiä löydöksiä tai oireita taudista	90		
Normaalitoiminta ponnistuksin, joitakin löydöksiä tai oireita taudista	80	1	Ei suoriudu raskaasta fyysisestä rasituksesta mutta omatoiminen ja kykenee kevyeen työhön
Ei kykene normaalin toimintaan eikä työhön, pystyy huolehtimaan itsestään	70	2	Omatoiminen mutta ei pysty kevyeen työhön. Tarvitsee vuodelepoa vähemmän kuin 50 % päiväajasta
Tarvitsee ajoittain apua, mutta kykenee huolehtimaan useimmista tarpeistaan	60		
Tarvitsee huomattavaa apua ja usein lääkinnällistä hoitoa	50	3	Vain osittain omatoiminen, tarvitsee vuodelepoa enemmän kuin 50 % päiväajasta
Kykenemätön huolehtimaan itsestään, tarvitsee erityistä apua ja lääkinnällistä hoitoa	40		
Vakavasti toimintakyvytön, sairaalahoito aiheellista	30	4	Täysin toimintakyvytön, ei pysty huolehtimaan itsestään, vuodepotilas
Hyvin sairas, laitoshoido ja aktiivinen tukihoido välttämätöntä	20		
Terminaalivaihe, elintoiminnot heikkenevät nopeasti	10		

Syövän aktiivista hoitoa voidaan antaa potilaille, joiden suorituskyky on yli 70 % Karnofskyn asteikolla tai luokassa 0–2 WHO:n asteikolla.

### 3.9 Ei-pienisoluisen keuhkosyövän hoito

Kun keuhkosyöpätyyppi ja sen levinneisyys ovat selvillä, tehdään hoitosuunnitelma yhteistyössä keuhkolääkärien, kirurgian ja syöpätautien erikoislääkärien kanssa [30]. Ei-pienisoluisen keuhkosyövän ensisijainen hoitomuoto on karsinoman leikkaus. Varhain

todetuissa ja paikallisissa keuhkosyövissä leikkaus voi parantaa potilaan kokonaan. Leikkaus on kuitenkin mahdollinen vaihtoehto vain noin 20 %:lle, sillä suurimmassa osassa tapauksista kasvain on ehtinyt jo levitä liian laajalle alueelle tai potilaan yleiskunto on heikentynyt sille tasolle, ettei leikkausta voida enää suorittaa. Keuhkosyövän leikkauksessa voidaan poistaa keuhklohko tai toinen keuhko ja sen imusolmukkeet riippuen kasvaimen sijainnista ja koosta. [23b;34]

Toissijaisena hoitomuotona ei-pienisoluisen keuhkosyövän adenokarsinoomassa käytetään sädehoitoa. Sädehoitoa voidaan antaa leikkauksen jälkeisenä hoitona tai hoitona niille potilaille, joille leikkaus ei ole mahdollinen. Sädehoidon antaminen vaatii kuitenkin potilaalta riittävää yleiskuntoa. Sädehoidon avulla on mahdollista parantaa potilas tai ainakin pidentää elämää ja vähentää potilaan oireita ja kipuja. Sädehoidon antaminen vaatii tarkkaa tietokonetomografiaan perustuvaa annossuunnittelua ja kasvaimeen kohdistuvaa säteilytystä. Säteily kohdistetaan niin, että mahdollisimman suuri osa terveestä keuhkokudoksesta ja ympäröivistä elimistä saadaan suojattua suurilta säteilyannoksilta [23b;34]

Levinneessä ei-pienisoluisessa keuhkosyövässä käytetään myös solunsalpaajahoitoa. Solunsalpaajat eli sytostaatit ovat lääkkeitä, jotka kulkevat veren mukana kaikkialle elimistöön tuhoten syöpäsolukkoa. Sytostaattihoidot annetaan potilaille 3–4 viikon välein joko suonensisäisenä tiputuksena tai tablettimuodossa. Pääasiassa solunsalpaajien avulla voidaan parantaa potilaan elinaikaa ja elämänlaatua. Hoitoa voidaan suositella myös leikkauksen jälkeisenä hoitona, jotta voidaan tuhota primaarikasvaimesta muualle elimistöön levinneitä syöpäsoluja. Sitä käytetään myös pienentämään kasvainta ennen leikkausta sekä hidastamaan uusiutuneen taudin etenemistä. Lisäksi solunsalpaajahoidojen yhdistäminen sädehoitoon on todettu parantavan sädehoidon kokonaistehoa. [34]

Uusia täsmälääkkeitä, jotka vaikuttavat suoraan solun signaalinvälitykseen, tutkitaan ja kehitellään jatkuvasti ei-pienisoluisen keuhkosyövän hoitona. Keuhkosyövän patologian ymmärtäminen molekyyllitasolla on mahdollistanut täsmälääkkeiden kehittämisen ja uuden hoitomuodon ei-pienisoluisen keuhkosyöpään. [19] Niitä voidaankin pitää syöpätutkimuksen läpimurtoina, sillä ne vaikuttavat tehokkaasti suoraan syövän syntymekanismiin ja ovat hyvin siedettyjä. Keuhkosyöpään tarkoitettujen täsmälääkkeiden kehittämisen ongelmana on, että syöpä johtuu useamman solun kasvun säätelyjärjestel-

män vaurioitumisesta, jolloin yksi lääke vaikuttaa vain osassa syöpäsoluja. [24;30] Täsmälääkkeitä voidaan käyttää potilaille, joiden keuhkosityöpä johtuu tietyistä geneettisestä poikkeavuudesta, jolloin vain osa potilaista voi hyötyä siitä [24].

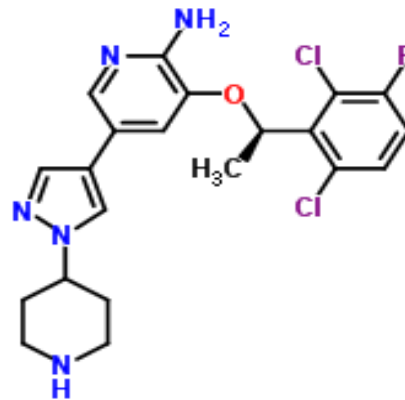
Paikallisesti levinneeseen tai etäpesäkkeitä lähettäneen ei-pienisoluisen keuhkosityövän hoitoon on käytössä syöpäsolujen pinnalla olevan EGFR:n toimintaan vaikuttavia täsmälääkkeitä. Tällä hetkellä on käytössä suun kautta annosteltavia inhibiittorilääkkeitä erlotinibi ja gefitinibi. Molempien lääkkeiden toiminta perustuu EGFR-proteiinin toiminnan estämiseen eli inhiboimiseen, jolla estetään syöpäsolujen sisäinen viestinvälitys, solukasvu ja taudin leviäminen. Erlotinibia käytetään paikallisesti edenneen tai etäpesäkkeitä lähettäneen ei-pienisoluisen keuhkosityövän hoitoon, jos solusalpaajahoido on osoittautunut tehottomaksi. Sitä voidaan käyttää myös ylläpitohoitona, mikäli kasvaimen kasvu on saatu tasaantumaan solusalpaajahoidon aikana. Gefitinibi soveltuu erlotinibin kanssa samalle potilasryhmälle, mutta hoidosta hyötyvät vain ne potilaat, joilla on todettu EGFR-proteiinin toiminnan aktivoiva geenivirhe. Erlotinibin ja gefitinibin haittavaikutuksina ovat mm. erilaiset ihottumat, ripuli, ruokahaluttomuus ja pahoinvointi. Näistä täsmälääkkeistä ei ole kuitenkaan apua EML4-ALK-positiivisille potilaille, sillä heidän on todettu olevan vastustuskykyisiä eli resistenttejä EGFR-tyrosiinikinaasi inhibiittoreille. Näiden potilaiden hoidossa tulee käyttää ALK-geenin toimintaa sääteleviä inhibiittoreita. [3;35]

Ei-pienisoluisessa adenokarsinooma keuhkosityövässä täsmähoitosta hyötyvien potilaiden osuus on noin 10 %. Täsmälääkkeillä on todettu olevan sekä potilaan elinikää että elämänlaatua parantava vaikutus. Lääkkeiden teho perustuu tyrosiinikinaasin toiminnan estämiseen, joka toimii keskeisenä solun signaalireittien, kasvun ja erilaistumisen säätelijänä. Geenimutaation vaikutuksesta häiriintynyttä tyrosiinikinaasin toimintaa voidaan säädellä ALK-kohdennetuilla inhibiittoreilla. [24]

### 3.10 Crizotinibi-täsmälääke

Crizotinibi-inhibiittori, kauppanimeltään Xalkorin, on ensimmäinen klinisiin tutkimuksiin edennyt ALK-inhibiittori, joka on Pfizerin kehittämä pienimolekyylinen suun kautta otettava lääkevalmiste. Crizotinibin rakennekaava esitetään kuviossa 7 sivulla 22. Crizotinibi estää ALK- ja MET-reseptorityrosiinikinaasien sekä niiden varianttien, kuten EML4-ALK-fuusioproteiinien, toimintaa. ALK-geeni koodaa tyrosiinikinaasiaproteiinia, jonka toiminta-

nan estäminen rajoittaa tai saattaa jopa pysäyttää EML4-ALK-fuusiota ilmentävien syöpäsolujen kasvun. Fuusioproteiinien toiminta estyy inhibiittorin kiinnittymisellä adensiinitrifosfaatin sitoutumispaikkaan. ATP:n kiinnittymisen estäminen ehkäisee solukasvua niissä soluissa, jotka ilmentävät EML4-ALK-fuusioproteiineja. [5] Lääkkeen koemolekyylit välittävät solun sisällä viestejä, jotka säätelevät syöpäsolujen kontrolloimattomaa kasvua ja eloonjäämistä eli apoptoosia [36].



Kuvio 7. Crizotinibin rakennekaava [37].

Crizotinibiini FDA-hyväksyttiin lääkeaineeksi Yhdysvalloissa elokuussa 2011, mutta Suomessa sillä ei ole vielä myyntilupaa. Potilaiden ALK-statuksen selvittämiseksi Abbott Molecular on kehittänyt Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit-testipaketin, joka on FDA:n hyväksymä. Vysis ALK Break Apart FISH Probe-testipakettia tulisi käyttää EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamiseen, jotta täsmähoidosta hyötyvät potilaat voidaan diagnosoida. [36;38]

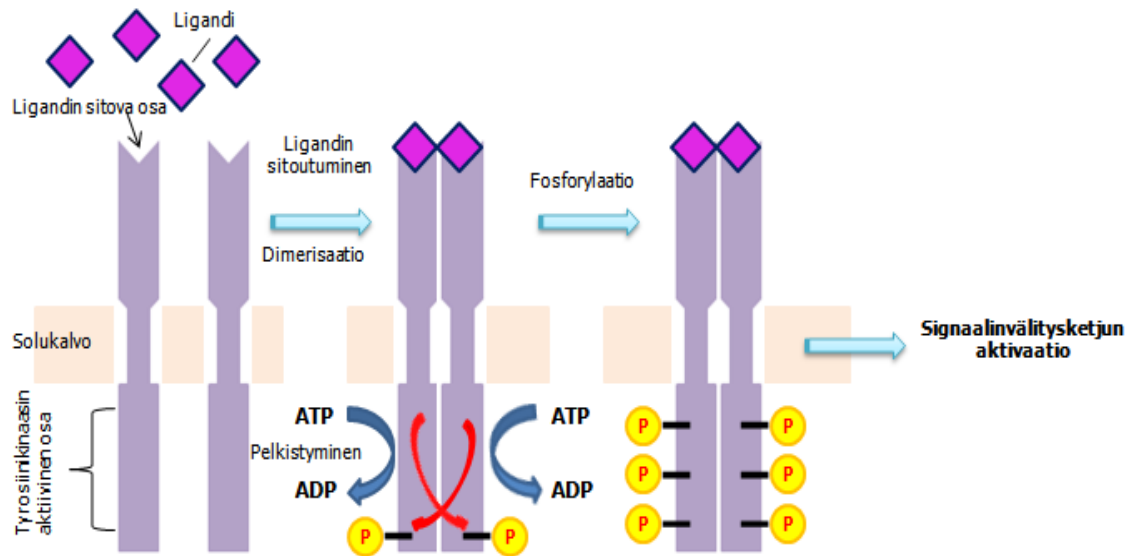
Syöpää hoidettaessa crizotinibia otetaan suun kautta 250 mg kahdesti päivässä ja hoitoa jatketaan niin kauan, kuin siitä on potilaalle merkittävää hyötyä [39]. Lääkeaine on yleisesti hyvin siedetty. Hoidon sivuvaikutuksina mainitaan mm. pahoinvointi, oksentelu, ummetus, ripuli, näköhäiriöt ja turvotus [40].

Koivunen ja Kwak ovat tutkimuksissaan todenneet crizotinibin kiihdyttävän syöpäsolujen solukuolemaa *in vitro* ja kasvaimen pienenemistä keuhkokudoksessa [4]. Pitkään jatkuneen hoidon aikana potilaille kehittyi useimmiten resistenssi crizotinibi-inhibittoria vastaan, kun esimerkiksi portinvariantijageenissä tapahtuu syöpäsolulle edullinen mutaatio, joka estää inhibiittoria tarttumasta solun jakautumista säätelevään reseptoriin [7].

Uuden mutaation takia tauti uusiutuu [5]. Hoidon aikana potilaalle kehittyneen resistenssin mekanismit tunnetaan huonosti. Resistenssin toimintamekanismeja tutkitaan jatkuvasti, jotta sekundaärimutaatiota vastaan voidaan kehittää uusia terapeuttisia hoitomuotoja. [24]

Solut valmistavat ALK-geenin ohjeiden mukaan solukalvolle reseptorityrosiinikinaaseja, jotka välittävät signaaleita solukalvon pinnalta solun sisään [41]. Monet tyrosiinikinaasireseptorit ovat kasvutekijöiden reseptoreita, jolloin kasvutekijöiden sitoutuminen saa kaksi monomeerista reseptoria liittymään yhteen muodostaen reseptoridimeerin (dimerisaatio). Tämä johtaa solun sisäisten osien fosforylaatioon, joka tuottaa sitoutumispaikkoja muille viestinvälitysketjussa toimiville proteiineille. [42]

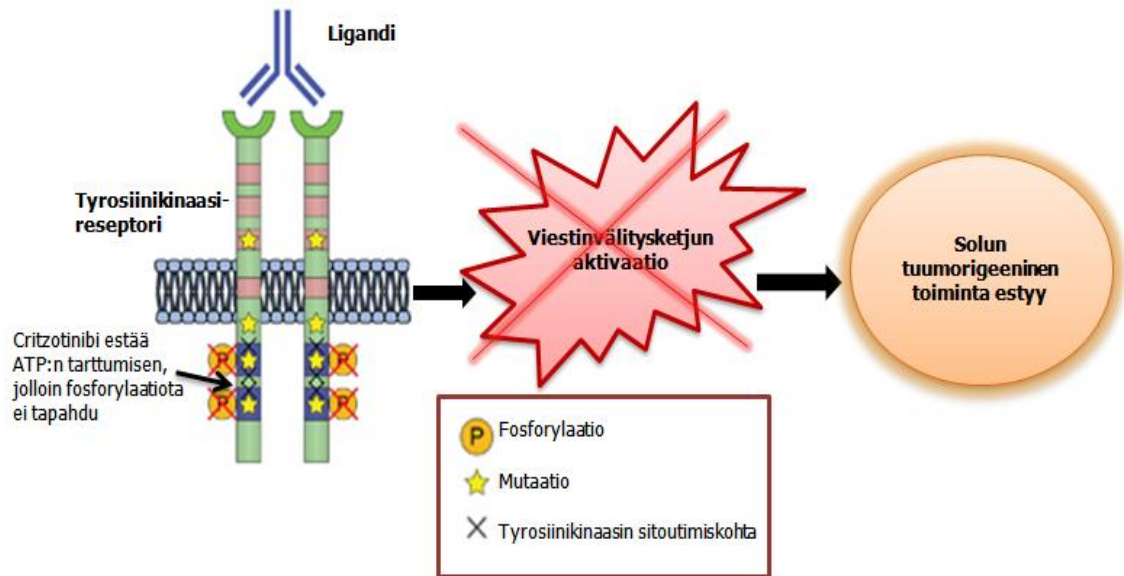
Tyrosiinikinaasireseptoreissa on kolme osaa: solun ulkopuoleinen ligandin sitova osa, solukalvon läpäisevä osa ja solunsisäinen tyrosiinikinaasin aktiivinen osa. Tyrosiinikinaaseilla on kyky aktivoida proteiineja fosforyloimalla niiden tyrosiineja. Signaalinvälitysketju alkaa, kun solukalvon reseptoriin tarttuu ligandi ja kaksi monomeerista reseptoria dimerisoituu eli kiinnittyy toisiinsa. Ligandi on orgaaninen molekyyli, joka sitoutuu toiseen molekyyliin eli tässä tapauksessa reseptoriin. Toisen reseptorin kinaasiosa fosforyloi eli aktivoi toisen reseptorin tyrosiineja ja päinvastoin. Fosfaattiryhmänä tyrosiinikinaasilla toimii ATP, joka pelkistyy fosforylaatioreaktion seurauksena ADP:ksi. Aktivoinut kinaasi voi luovuttaa fosfaattiryhmänsä toiselle solunsisäiselle proteiinille, jonka seurauksena seuraava proteiini aktivoituu. Uusien proteiinien aktivointi jatkuu, ja tätä aktivaatiotapahtumaa kutsutaan signaalinvälitysketjuksi. [41;42] Tyrosiinikinaasin aktiivatio on esitetty kuviossa 8 sivulla 24.



Kuvio 8. Tyrosiinkinaasin aktivaatio [Mukaillen lähdettä 43].

Ei-pienisoluisissa syöpäsoluissa EML4-ALK-fuusiogeneeni tuottaa poikkeavaa proteiinia, jonka tyrosiinkinaasi ei reagoi kasvutekijöiden säätelyyn, koska ligandin eli kasvutekijän sitoutumista reseptoriin ei tarvita, sillä dimerisaatio mahdollistaa ligandista riippumattoman kinaasiaktivaation. Fuusioproteiinia tuotetaan jatkuvasti, mikä seurauksena signaalinvälitysketju on jatkuvasti aktivoitunut. [24] Suurentunut ALK-aktiivisuus, yhdessä muiden tyrosiinkinaasien kanssa, lisää pahanlaatuisen solukon kasvua, solun elinikää, metastasoitumista, stimuloi verisuonten muodostusta ja lisää solunsalpaaja-resistenssiä [23c].

Crizotinibin toiminta perustuu juuri ATP:n kiinnittymisen estämiseen, jolloin fosforylaatiota ei tapahdu ja signaalinvälitysketju katkeaa. Crizotinib-inhibiittori kilpailee ATP-molekyylin kanssa tyrosiinkinaasireseptorin sitoutumispaikasta syrjäyttäen ATP:n ja estämällä kinaasin aktivaation. Näin solujen yliaktiivinen toiminta saadaan pysäytettyä ja syöpäsolun toiminta estyy. [23d] (Kuvio 9 sivulla 25.)



Kuvio 9. Tyrosiinikinaasi-inhibiittori estää syöpään johtavan viestinvälitysketjun aktivaation [Mukaillen lähdettä 25].

Crizotinibi-hoidon hyötyä ei-pienisoluista adenokarsinoma keuhkosityöpää sairastavilla potilailla on tutkittu kahdessa Shaw'n et al. kliinisessä tutkimuksessa (A ja B), jonka perusteella lääkeaine sai FDA-hyväksynnän. Tutkimuksessa oli 255 potilasta, jotka olivat ALK-positiivisia ja joiden keuhkosityöpä oli paikallisesti levinnyt tai metastoitunut ei-pienisoluinen keuhkosityöpä. Näistä potilaista 96 %:lla syöpä oli tyypiltään adenokarsinoma. Kliiniseltä taustaltaan potilaista 48 % oli miehiä, ja koko potilasjoukosta alle kolme prosenttia tupakoi. Potilaiden keski-ikä oli 52 vuotta, ja 60 % oli eurooppalais-syntyisiä ja 30 % aasialaistaustaisia. Potilaat saivat hoidon aikana kahdesti päivässä 250 mg lääkeannoksen crizotinibia. [44]

Crizotinibi-lääkeaineen hoitovaikutuksen tutkimiseksi tutkijat määrittivät mitattavat kokonaishoitovasteenkriteerit, joiden perusteella hoidon tehoa seurattiin. Tutkimuksissa seurattiin myös hoitovasteen kestoa. Tutkimuksessa A (136 potilasta) kokonaishoitovasteen saavutti 1 potilas ja osittaisen vasteen 67 potilasta 22 viikkoa kestäneen hoidon aikana. Prosentuaalisesti osittaisen hoitovasteen saavuttivat puolet potilaista. Lääkehoidolla saadun vasteen keskimääräisen kesto oli 42 viikkoa. Tutkimuksessa B (119 potilasta) kokonaishoitovasteen saavutti 2 potilasta ja osittaisen hoitovasteen 69 potilasta. Osittaisen hoitovasteen saavutti 61 % potilaista. Tutkimuksessa B hoidon kesto oli 32 viikkoa ja hoitovaste 48 viikkoa. [5]

Täydellisen hoitovasteen eli syöpäsignaalien häviämisen saavutti 1 % koko tutkimuksen potilaista. Täydellinen hoitovaste ei kuitenkaan välttämättä tarkoita syövän parantumista. Crizotinibi-hoidon avulla kasvain pienentyi 57 % potilaista ja 33 %:lla taudin eteneminen pysähtyi. Tutkimuksen perusteella crizotinibi saattaa pidentää ALK-positiivisten potilaiden elinaikaa. Lisätutkimuksia crizotinibin tehosta verrattuna perinteisiin keuhkosyövän hoitomuotoihin tehdään parhaillaan. [5;44]

### 3.11 ALK-geenin uudelleenjärjestäytymisen diagnosointimenetelmät

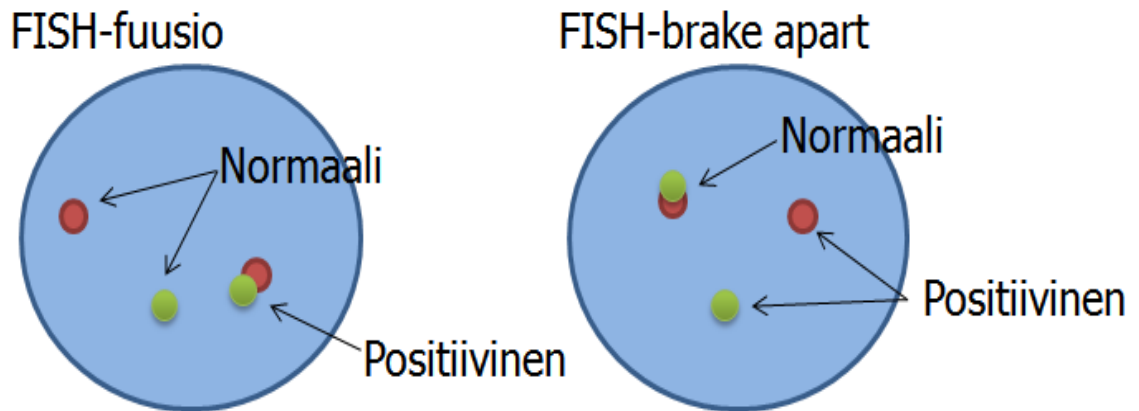
ALK-geenin uudelleenjärjestäytymisiä on tunnistettu anaplastisessa suurisoluisessa keuhkosyövässä yli 15 vuoden ajan, ja eri diagnostisia menetelmiä on kehitetty ja validoitu syöpätyypin tunnistamiseen. Parhaana diagnosointimenetelmänä EML4-ALK-fuusiogeenin osoittamiselle pidetään FISH-menetelmää. Tällä hetkellä arvioidaan eri menetelmien, kuten polymeraasiketjureaktion, immunohistokemian ja fluoresenssi *in situ* hybridisaation soveltuvuutta EML4-ALK-fuuso-onkogeenin luotettavaan detektointiin. [4]

#### 3.11.1 Fluoresenssi in situ hybridisaatio

Fluoresenssi in situ hybridisaatio menetelmää varten on kehitetty useita testejä EML4-ALK-fuusiogeenin osoittamiseen. Käytössä on esimerkiksi fuusio- ja break apart -systeemejä, joiden ero perustuu koettimien suunnitteluun. Suunnittelu määrää myös FISH-lasien fuusiotatoksen tulkitsemisen (kuvio 10 sivulla 27). Fuusiosysteemeissä tutkitaan tunnettuja translokaatioita, jotka aiheuttavat leukemiaa ja syöpää geenien järjestäytyessä uudelleen. Fuusiosysteemeissä koettimet on suunniteltu siten, että normaalissa solussa signaalit ovat erillään ja fuusiosolussa geenimutaation johdosta signaalit ovat puolestaan päällekkäin. Break apart -systeemeissä tutkitaan, onko tutkittava geenialue fuusioitunut toiselle geenialueelle. Koettimet on suunniteltu niin että geenialueen alku- ja loppupäähän on suunniteltu eri fluoresoivalla leimalla leimatut koettimet. Normaalisolussa signaalit havaitaan yhtenäisenä fuusiosignaalinä ja eronneet break apart -signaalit ovat osoitus geenifuusiosta. Lisäksi FISH-menetelmissä on eri leimattujen koettimien eli mikroskoopissa havaittavien värien määrä vaihtelee sen mukaan, kuinka monta geenialuetta tai kromosomia halutaan tutkia samanaikaisesti. Suunniteltu koetin kohdennetaan tutkittavalle alueelle, jolloin FISH-testillä voidaan



osoittaa esimerkiksi translokaatioita, deleetioita, inversioita ja geenikopiomäärän muutoksia. [45;46]



Kuvio 10. Fuusio- ja break apart -systemien analysointi [Mukailen lähdettä 46].

Tässä tutkimuksessa käytetään Abbott Molecularin kaupallista break apart -testiä, jota suositellaan yleisesti EML4-ALK-fuusiostatuksen diagnosointiin. 2-väritestissä on kaksi koetinta, joista toinen on ALK-lokuksen 5' päässä ja toinen EML4-geenin alueella. Terveessä solussa oranssi ja vihreä signaali nähdään fluoresenssimikroskoopilla yhteen sulautuneena fuusiosignaalina. EML4-ALK-fuusiossa signaalit havaitaan eronneena oranssina ja vihreänä split-signaalina. Testillä voidaan todeta sekä kromosomin sisäiset että väliset ALK-muutokset. [4;6]

FISH-menetelmän heikkoutena on, ettei sen avulla voida erottaa EML4-ALK-fusion eri variaatioita, toisin kun PCR-metelällä. Myöskään geenipoikkeaman muotoa ei saada selville FISH:illä. Lisäksi menetelmän heikkoutena ovat tapaukset, joissa inversiosta johtuen geenimateriaalista on hävinnyt vain pieni osa, jolloin split-signaalin havaitseminen on ongelmallista. [4]

### 3.11.2 Käänteiskopointi polymeraasikerjureaktio

RT-PCR on nopea ja herkkä menetelmä ALK-geenin uudelleenjärjestäytymisen havaitsemiseksi. Rutiinikäytössä RT-PCR:n käyttö on haastavaa, sillä analyysi on tehtävä multiplexina, jolloin voidaan tutkia samanaikaisesti kaikki EML4-ALK-variaatiot. EML4-ALK-fuusion variaatioita on tunnistettu 11 erilaista, jolloin myös jokaiselle variaatiolle on oltava omat alukkeensa. Lisäksi formaliinifiksoitujen parafiinikunosnäytteiden käyttö PCR:ssä on vaikeaa, sillä näytteen DNA:n riittävyys asettaa vaatimuksia menetelmän käytölle. Tutkimukset ovat myös osoittaneet, että PCR:llä on saatu positiivisia tuloksia, vaikkei ALK-geenin uudelleenjärjestäytymistä ole tapahtunut syöpä- tai terveessä kudoksessa. [4]

### 3.11.3 Immunohistokemia

Immunohistokemian avulla suoritettavat analyysit ovat käytössä rutiinimenetelmänä patologian tutkimuksissa. IHC:ssa käytetään tutkittavalle antigeenille entsyymi- tai fluoresoivalla merkkiaineella leimattua kasvaimelle spesifistä vasta-ainetta. Mikäli kudoksella on antigeeni, muodostuu antigeeni-vasta-ainekompleksi, joka voidaan havaita värireaktiona fluoresenssi- tai valomikroskooppilla. [23e] Tällä hetkellä muutamia vasta-aineita on kehitetty ALK-uudelleenjärjestäytymisen diagnosointiin ja uusia testataan jatkuvasti [4].

Immunohistokemiallisen tutkimuksen käyttäminen ei-pienisoluisen adenokarsinoma keuhkosityövän diagnosoinnissa on toistaiseksi yksistään riittämätön. Varmaa syytä tähän ei tiedetä, mutta on mahdollista, että adenokarsinoman tyyppisessä keuhkosityövässä uudelleenjärjestäytynyt ALK-geeni ei ekspressoitu tai sen pitoisuus on liian alhainen IHC-määritykseen. Kuitenkin IHC-testillä voidaan helposti ja nopeasti testata ALK-proteiinin ilmentyminen, jolloin on mahdollista suuntaa-antavasti diagnosoida potilaan sairastavan ALK-geenin uudelleenjärjestäytymisestä johtuvaa keuhkosityöpää. [4]

ALK-statuksen selvittämisen jälkeen voidaan tehdä jatkotutkimuksia tarkemman diagnoosin ja hoitomenetelmän varmistamiseksi. IHC-määrityksiä voidaan tehdä jokaisessa patologian laboratoriossa toisin kuin FISH-määrityksiä. [4]

### 3.11.4 Syväsekvensointi

Syväsekvensointi ei ole vielä diagnostisessa käytössä oleva menetelmä EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamiseen, mutta sen potentiaalia syöpätutkimuksessa selvitetään. Syväsekvensointi mahdollistaa kokonaisen genomien emäsjärjestyksen tarkastelun samanaikaisesti. Syväsekvensoinnin käyttö syöpätutkimuksessa perustuu syöpään sairastuneen henkilön genomissa tapahtuneiden mutaatioiden vertaamiseen terveen ihmisen genomiin. [47]

Menetelmän avulla syöpäsairauksien luonteesta saadaan uutta tietoa, ja sen ansiosta syövän diagnosointia, hoitomuotoja ja täsmäläkkeitä pystytään kehittämään [48]. Seuraavassa luvussa perehdytään tarkemmin fluoresenssi in situ hybridisaatio- ja syväsekvensointimenetelmään.

## 4 Menetelmät ja työn toteutus

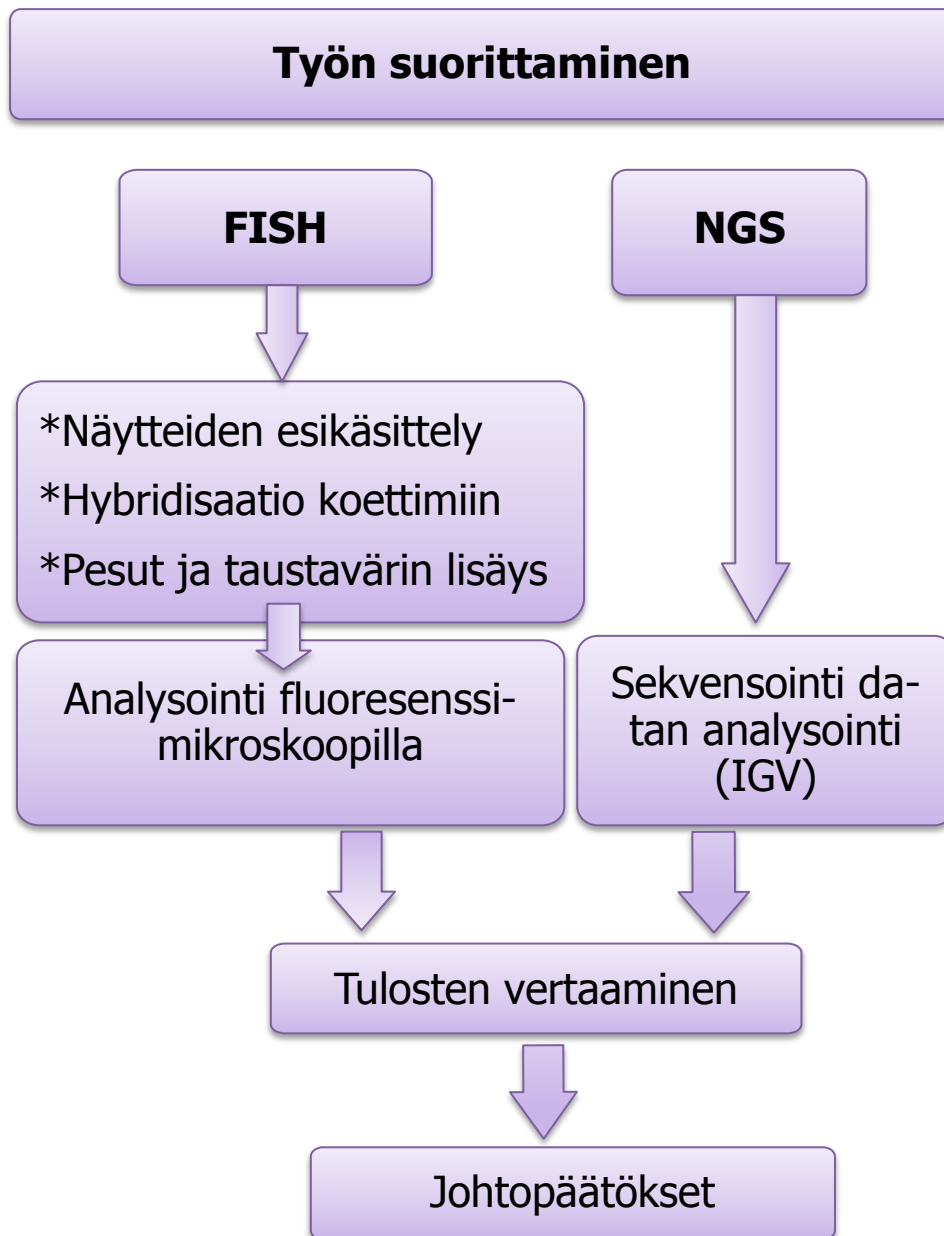
Tutkimusmenetelminä käytetään fluoresenssi in situ hybridisaatiota ja uuden sukupolven syväsekvensointia. FISH-tutkimus on jo käytössä oleva diagnostinen menetelmä, jota pidetään suositeltavana menetelmänä EML4-ALK-fuusio-onkogeenin diagnosointiin. The Vysis ALK Break Apart FISH Probe-reagenssipakkaus on Abbotin valmistama kaupallinen testi, jolla fuusiosstatus voidaan tutkia. Menetelmällä ei saada kuitenkaan tietoa, mistä EML4-ALK-fuusio-onkogeenin variaatioista on kyse ja mistä geneettisestä poikkeavuudesta, inversio/deleetio, fuusio on muodostunut. Tutkimukseni tarkoituksena onkin selvittää, onko syväsekvensointi täysin luotettava ja olisiko se parempi menetelmä EML4-ALK-mutaation osoittamiseen ei-pienisoluisista adenokarsinoomaa sairastaville keuhkosyöpäpotilaille?

Tutkimuksessa syväsekvensointi suoritetaan pääosin eksonien ja eksoni-introniraja-alueiden osalta. Sekvensoitava alue oli noin 729000 pb ja sekvensointia varten suunniteltiin Aquilentin eArray-ohjelman avulla 35 syöttiä (bait) ALK- ja 25 syöttiä EML4-geenin alueelle. Lisäksi ALK-geenin 19–20 eksonien väliselle intronialueelle suunniteltiin oma syötti. Tutkimuksen eksoni-kohdentamisen avulla voitiin minimoida analysoitavan datan määrä. [49]

Opinnäytetyössäni tutkitaan ei-pienisoluista adenokarsinoma keuhkosityöpää sairastavia potilaita, joilla ei ole tupakointihistoriaa. Potilasjoukko on valittu sen perusteella, että EML4-ALK-fuusio-onkogeneeni tavataan kaikkein eniten juuri nämä kriteerit täyttävillä keuhkosityöpöpotilailla. [4] Tutkittavat potilasnäytteet tulevat HUSLABin keskuspatologian laboratoriosta. Näytteet ovat parafiiniin valettuja formaliniinifiksoituja kudoksenäytteitä, joista patologi on varmistanut syöpäkudoslöydöksen. Blokeista tehdyt 7–10 µm näyteleikkeet on kiinnitetty näytelaseille. Saman parafiiniblokin kudospainetta käytetään sekä FISH- että syväsekvensointimenetelmässä.

Käytännön osuudessa suoritetaan FISH-menetelmän osalta näytelasien esikäsittely, hybridisaatio ja näytelasien jälkipesu. Esikäsittelyssä poistetaan parafiini kudostenleikkeistä lämpö- ja liuoskäsittelyiden avulla. Tämän jälkeen näytelasit käsitellään proteinaasi K-entsyymillä, joka hajottaa fiksaatioissa denaturoituneet proteiinit parantaen koettimen kiinnittymistä kohteeseen. Näytteiden esikäsittelyn jälkeen DNA denaturoidaan yksijuosteiseen muotoon, ja koettimet hybridisoidaan spesifisesti aika-lämpötilaohjelmoidulla Abbotin ThermoBrite-lämpölevyllä. Lopuksi hybridisaatiossa kiinnittymättömät koettimet pestään pois pesuliuksella ja näytelasille laitetaan sinistä väriä fluoresoivaa taustaväriä. Valmiista FISH-laseista analysoidaan 50:n solun EML4-ALK-fuusiosstatus. Syväsekvensoinnin osalta ei ole laboratoriotöitä, sillä ne tehdään FIMM:n omissa tiloissa. Valmiista sekvensointidatasta on tarkistettu näytteiden EML4-ALK-positiivisuus. Lopuksi eri menetelmien avulla saatuja tuloksia verrattiin keskenään ja tehtiin johtopäätökset (taulukko 2 sivulla 31).

Taulukko 2. Yhteenveto opinnäytetyön toteutuksesta.



Työ toteutetaan yhteistyössä Haartman-instituutin ja Suomen molekyyli lääketieteen instituutin kanssa. Haartman instituutin tiloissa suoritetaan kaikki fluoresenssi in situ hybridisaatioon liittyvät työvaiheet, analysointi fluoresenssimikroskoopilla ja EML4-ALK-geenifuusiosituksen määrittäminen. Parafiiniblokista eristetystä DNA:sta syväsekvensointi tapahtuu Biomedicum FIMM-yksikössä, josta saadaan tutkittujen potilasnäytteiden sekvensointitulokset analysoitavaksi. Analysoinnissa käytetään bioinformatiikan ohjelmaa Integrative Genomics Viewer 1.5. Mikäli FISH- ja syväsekvensointimenetelmällä analysoitujen näytteiden tulokset ovat ristiriitaisia, voidaan diagnoosi varmistaa

vielä isobritannialaiselta tutkimusryhmältä, joka kehittää PCR-menetelmää EML4-ALK-fuusiogeenin osoittamiseen.

Opinnäytetyö on osa sytomolekyyli-genetiikan tutkijaryhmässä vuonna 2011 aloitettua tutkimusta, jonka tarkoituksena on vertailla EML4-ALK-fuusiogeenistä aiheutuvan ei-pienisoluisen keuhkosyövän diagnosointimenetelmiä ja selvittää hoitoresistenssin vaihteluun vaikuttavia syitä. Tarvittavat tutkimusluvut potilasmateriaalin käyttöön on anottu Sosiaali- ja terveysalan lupa- ja valvontavirastolta Valviralta sekä eettiseltä toimikunnalta.

EML4-ALK-geenifuusion osoittamisesta on tehty jo yksi opinnäytetyö CMG-ryhmässä vuonna 2011. Opinnäytetyön aiheena oli EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittaminen parafiinileikkeestä FISH-menetelmän avulla adenokarsinoman diagnostiikassa. Opinnäytetyön tutkimuskohteensa oli sama geenifuusio, mutta siinä vertailtavina menetelminä olivat FISH ja IHC. Tämän opinnäytetyön rinnalla tehdään samanaikaisesti vielä kolmas opinnäytetyö ei-pienisoluisen keuhkosyövän adenokarsinoman diagnosointimenetelmästä. Työssä vertailtavina menetelminä ovat puolestaan reaaliaikainen RT-qPCR ja mikrolevytekniikka. [6;50]

EML4-ALK-fuusio-onkogeneeniä tutkitaan ympäri maailmaa, joten siitä julkaistaan jatkuvasti uutta geenimutaation diagnosointiin ja hoitoon liittyvää tutkimustietoa. Uusien syöpämutaatioiden löytäminen auttaa lääketiedettä kehittämään näihin poikkeavuuksiin kohdennettuja lääkevasteita. [51;52]

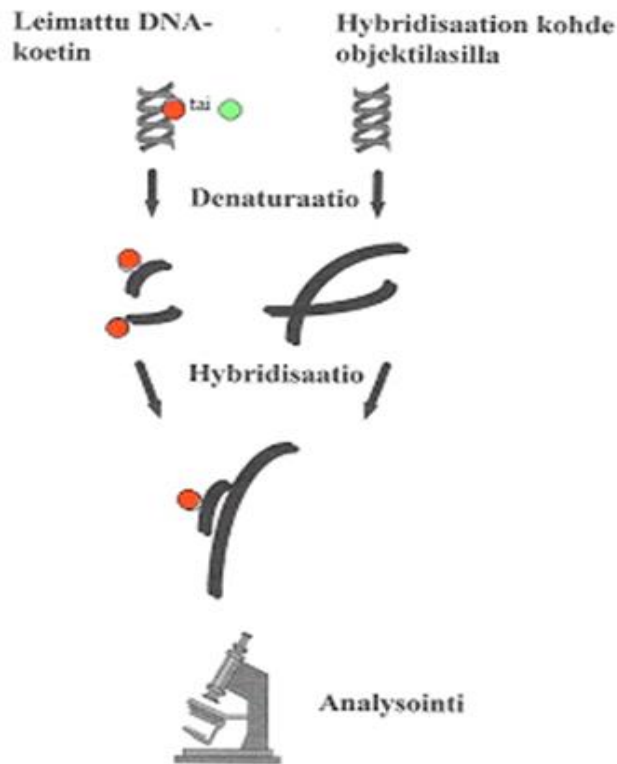
#### 4.1 Fluoresenssi in situ menetelmä

Fluoresenssi in situ hybridisaatiossa käytetään hyväksi fluoresenssi-ilmiötä. Ilmiön synnyttämiseksi kemiallisen aineen energiatasoa nostetaan valaisemalla ainetta fluoresoivalla valolla, jolloin energiatason muutoksen purkautuessa voidaan havaita eriväristä hohtavaa valoa. Syvemmin tarkasteltuna fluoresoivan aineen eli fluorokromin elektroni valjastaa valon fotonin virittyen korkeampaan energiatasoon. Energiatason muutos on vain hetkellinen, ja viritystila purkautuu elektronin palatessa perustilaansa. Koska alkuperäisen fotonin energiaa on kulunut viritystilan aikana, on purkautumisessa luovutetun fotonin energia alkuperäistä pienempi, jolloin aallonpituus on suhteessa suurempi. Virit-

tävän valon ja fluoresenssi-ilmiössä syntyvän valon eri aallonpituuksia ansiosta valojen erottavuutta toisistaan voidaan hyödyntää fluoresenssimikroskopiassa. [18]

In situ hybridisaatio on tehokas menetelmä nukleiinihapposekvenssien tunnistamiseen ja paikantamiseen sytoplasmassa, soluelimissä ja kromosomeissa. FISH-menetelmässä molekyylitarkan tunnistuksen avulla tutkittava geeni voidaan paikantaa mikroskoopissa näkyvään kromosomiin. Lyhykäisydessään FISH-menetelmässä geenikoetin, joka vastaa emäsekvenssiltään tutkittavaa geeniä, leimataan fluoresoivalla merkkiaineella, ja se hybridisoidaan vastaanottavaan geeniin. Merkkiaineen avulla kromosomiin hybridisoitu koetin voidaan havaita fluoresenssimikroskoopilla ja tarkastella geenin sijaintia kromosomissa. [53]

Hybridisaatiolla tarkoitetaan vetysidosten avulla tapahtuvaa pariumista nukleiinihappojuosteiden välillä [55]. Ennen hybridisaatiota kaksijuosteinen DNA "avataan" eli denaturoidaan korkean lämpötilan, voimakkaan emäskäsittelyn tai niiden kombinaation avulla. Ympäröivien olosuhteiden ansiosta juosteiden väliset heikot vetysidokset murtuvat ja vastinjuosteet saadaan erkanemaan toisistaan. Denaturaatio on palautuva reaktio, jossa olosuhteiden palauttaminen, kuten lämpötilan lasku, saa vastinjuosteet pariutumaan emäspariperiaatteen mukaisesti. Fluoresenssi in situ hybridisaatiossa fluorokromilla leimattu koetin, eli luonnollisesti tai keinotekoisesti valmistettu DNA/RNA-jakso ja tutkittavan biologisen näytemateriaalin DNA denaturoidaan yksijuosteiseksi. Kontrolliduissa olosuhteissa koettimet hybridisoituvat komplementaariseen nukleiinihappojuosteeseen, jolloin muodostuu kaksijuosteisen DNA-jakso. Hybridisoituneet jaksot voidaan detektoida niihin kiinnitetyn leiman avulla, joka lähettää visuaalisesti havaittavaa valoa. [6;53] (Kuvio 11 sivulla 34.)



Kuvio 11. FISH-menetelmän vaiheet. [56]

Hybridisaation onnistumiseen vaikuttavat reaktiossa vallitsevat tekijät, kuten lämpötila ja puskurin ionivahvuus eli pH. Reaktiossa tarvittava lämpötila riippuu tutkittavan DNA/RNA:n guaniini-sytosiinipitoisuudesta, sillä niitä yhdistää kolme vetysidosta, kun taas adeniinia ja tymiiniä yhdistää kaksi vetysidosta. GC-rikkaiden alueiden välillä on enemmän vetysidoksia, jolloin juosteiden erottaminen vaatii korkeampaa energiaa eli tässä tapauksessa lämpötilaa. Sama pätee myös koettimen ja DNA-jakson pituudessa. Mitä pidempiä nukleiinihappujuosteet ovat, sitä voimakkaammin vetysidokset yhdistävät juosteita. Formamiidia voidaan käyttää reaktiolämpötilan laskemiseen, jotta solun morfologia ei vaurioidu. Lisäksi koettimen konsentraation on oltava riittävän korkea, jotta koetin sitoutuu mahdollisimman tehokkaasti ja spesifisesti vastinjuosteisiin. Myös hybridisaation lopussa tehtävissä pesuissa liuoksen lämpötila ja ionivahvuus on säädettävä kyseiselle reaktiolle sopivaksi, jotta epäspesifisesti sitoutuneet koettimet saadaan pestyä näytteestä pois, kuitenkin niin etteivät vastinemäsperialteen mukaisesti oikein pariutuneet koettimet huuhtoudu samalla. [53]

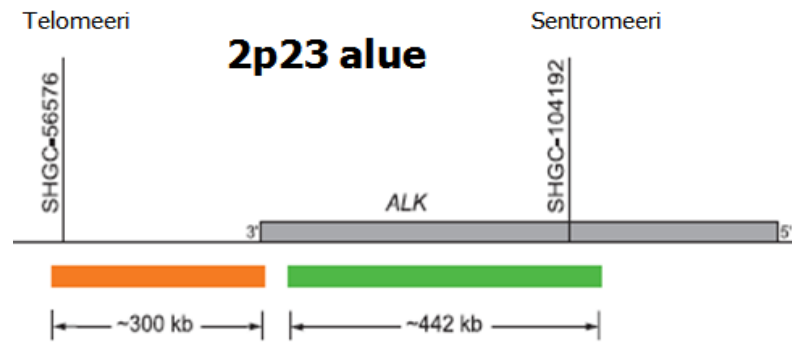
FISH-menetelmän avulla voidaan tutkia esimerkiksi geeniekspressiota, kromosomien lukumäärää ja poikkeavuuksia, muuttuneiden sekvenssien ja onkogeenien sijaintia kromosomissa sekä perimän evolutiivista kehittymistä [53]. FISH:in käyttäminen diagnos-



tiikassa perustuu menetelmän nopeuteen ja hyvään erotuskykyyn. Lisäksi käytettävien koettimien valikoima laajenee jatkuvasti, ja FISH:llä on mahdollista tutkia useaa kohdetta samanaikaisesti. Perinteiseen kromosomitutkimukseen verrattuna FISH:n etuna on se, että tutkittavaa näytettä ei tarvitse viljellä ja sillä voidaan tutkia kudospäätteitä, joiden solut ovat jakautumisen välivaiheessa eli interfaasivaiheessa tai jakautumattomia soluja. Syöpätutkimuksessa FISH-menetelmää käytetään pääosin kromosomi- ja geenimuutosten sekä onkogeneenien monistumien ja deleetioiden tunnistuksessa. [56]

#### 4.1.1 FISH-valmisteen tekeminen parafiinileikkeestä

Parafiinin upotetuissa solunäytteissä kudusrakenteet säilyvät hyvin ja niistä saadaan monta erillistä näytettä. Parafiinileikkeitä käytetään yleisesti patologisissa tutkimuksissa ja näytteet soveltuvat hyvin in situ hybridisaatio-kokeisiin. Solunäyte kiinnitetään aluslasille ja kuivataan ennen parafiiniin upottamista. Parafiiniblokista leikataan 7–10 µm paksu leike, ja parafiini poistetaan lämpö- ja liuoskäsittelyiden avulla. Tämän jälkeen näytelasit käsitellään proteinaasi K -entsyymillä, joka hajottaa fiksaatiossa denaturoituneet proteiinit parantaen koettimen kiinnittymistä kohteeseen. Näytteiden esikäsittelyn jälkeen DNA denaturoidaan yksijuosteiseen muotoon. Leimattujen koettimien spesifinen hybridisaatio suoritetaan aika-lämpötilaohjelmalla Abbotin ThermoBrite-lämpölevyllä. The Vysis ALK Break Apart FISH Probe -testipaketti sisältää kahden eri koettimen seoksen. Koettimet ovat leimattu ALK-geenin katkoskohdan vastakkaisilta puolilta. (Kuvio 12 sivulla 36.) SpectrumOrange-väri on noin 300 kb pituinen koetin ALK-geenin telomeerin puoleisella alueella. Sentromeeripuolella koettimena käytetään noin 440 kb pituista SpectrumGreen-koetinta.

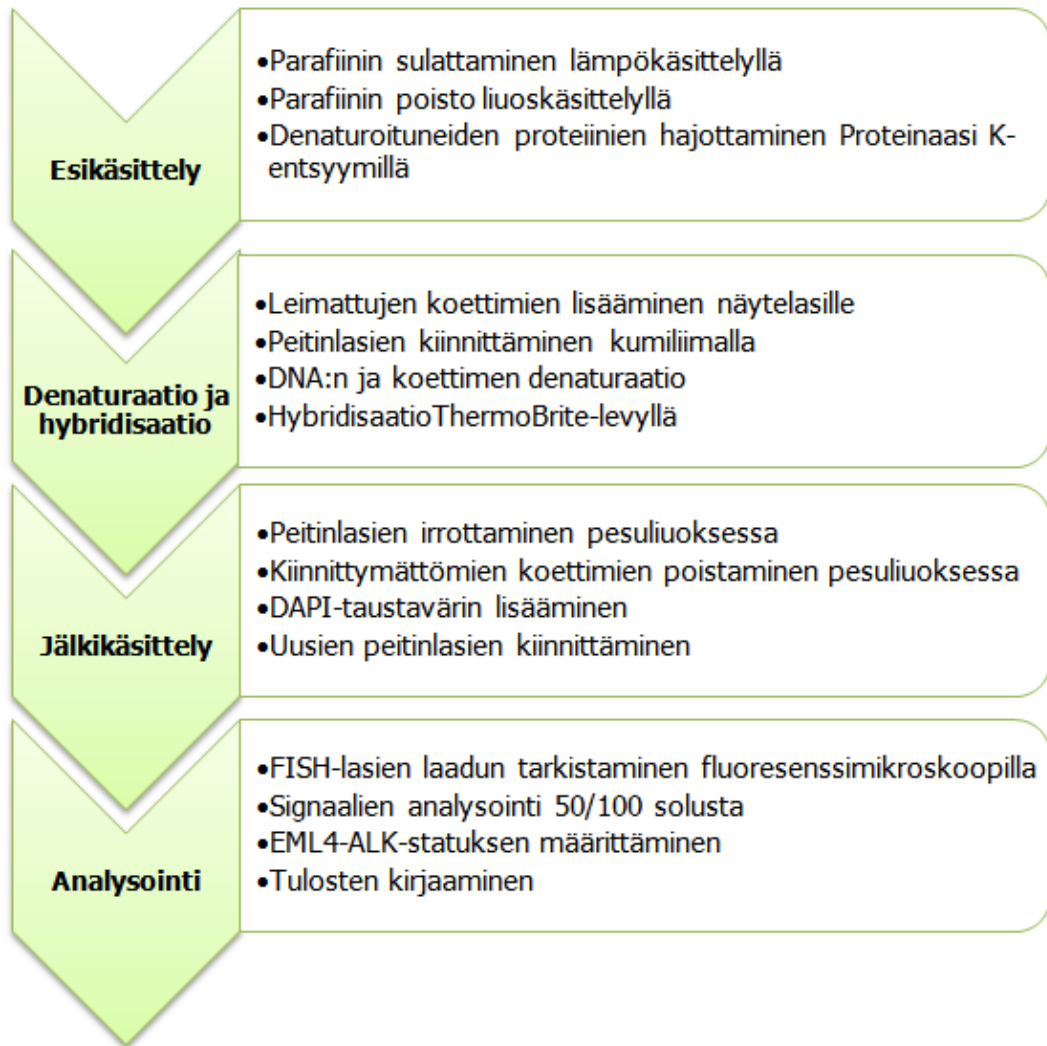


Kuvio 12. FISH-menetelmän leimattujen koettimien suunnitelu [Mukaiillen lähde 57].

Hybridisaation jälkeen kiinnittymättömät koettimet pestään pois pesuliuoksella. Lopuksi näytelasille laitetaan sinistä väriä fluoresoivaa taustaväriä DAPIa. Taustavärin avulla voidaan tarkastella kohteen morfologiaa ja tunnistaa solut, joissa fluoresoivat signaalit sijaitsevat. [53;57]

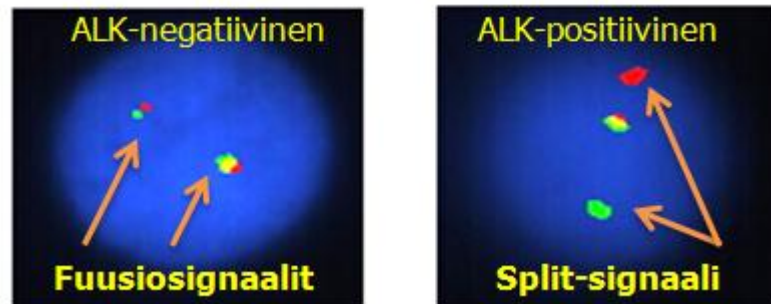
Ennen näytteiden analysointia on tarkastettava hybridisaation onnistuminen ja näytteiden laatu. Analysointikelpoisessa näytteessä solujen pitäisi olla toisistaan erillään ja solureunojen eheitä ja selkeärajaisia. Näytteissä ei saisi olla liian voimakasta taustaa tai muita signaalin havaitsemista häiritseviä tekijöitä. Lisäksi signaaleiden pitäisi olla riittävän voimakkaita, selkeärajaisia ja helposti arvioitavissa. [57] FISH-menetelmän päätyövaiheet on kuivailtu taulukossa 3 sivulla 37. Yksityiskohtaiset ohjeet FISH-menetelmän suorittamiseksi ovat työohjeessa. (liite 1.)

Taulukko 3. FISH-menetelmän työvaiheet.



Jotta näytteiden visualisointi voidaan suorittaa luotettavasti, tulee visualisointimenetelmää valitessa pyrkiä herkkään ja erotuskykyiseen lopputulokseen. The Vysis ALK Break Apart FISH Probe testipaketin kanssa käytetään epi-fluoresenssimikroskooppia, jonka valon lähteenä on 100 W elohopealamppu. Elohopealamppu lähettää ultraviolettisäteilyä, joka virittää fluorokromin atomin uudelle energiatasolle ja virityksen purkautuessa saa aikaan fluoresenssi-ilmiön. Visualisoinnin helpottamiseksi fluoresenssimikroskoopissa on valon aallonpituutta säätelevä suodin eli filteri ja eri signaaleja suodattavat filteerit. Signaaleita suodattavat filteerit ovat välttämättömiä, sillä signaalit ovat kromosomissa niin lähekkäin, että kahden erillisen signaalin havaitseminen yhtäaikaaisesti on haastavaa. [53]

Analyysikelpoisilta näytelaseilta valitaan viisi aluetta, joissa solut eivät ole liian tiheästi ja signaalit ovat riittävän voimakkaita signaalin havaitsemiseen. Yhdestä näytteestä valitaan 50 solua, jotka analysoidaan EML4-ALK-geenifuusion suhteen. Vysis ALK Break Apart FISH Probe –testipaketin koettimilla tehdyllä hybridisaatiolla normaalisolun punainen ja vihreä signaali ovat joko vierekkäin tai päällekkäin fuusiosignaalinä. Tämä havaitaan oranssina tai hyvin lähekkäin olevina punaisena ja vihreänä signaalina, joka osoittaa, että solussa on fuusiosignaali. [57]



Kuvio 13. Vasemmalla ALK-negatiivinen solu, jossa on kaksi normaalia fuusiosignaalia ja oikealla ALK-positiivinen solu, jossa on vain yksi fuusiosignaali ja yksi split-signaali [Mukai-  
len lähde 58].

Mikäli solussa on tapahtunut EML4-ALK-geenifuusio, punainen ja vihreä signaali näkyvät toisistaan eronneina eli split-signaalina. Kuviossa 13 nähdään vasemmalla ALK-fuusionegatiivinen solu (kaksi fuusiosignaalia) ja oikealla ALK-positiivinen solu (split-signaali ja normaali fuusiosignaali). Signaalien välinen etäisyys tulisi olla vähintään kaksi signaalileveyttä. Lisäksi vihreän signaalin puuttuminen on merkki ALK-geenin deleetiosta, sillä vain vihreän signaalin puuttuminen eli deleetio voi johtua geenimutaatiosta, koska oranssi koetin on ALK-geenin telomeeripuolella. (Kuvio 12 sivulla 36). Solut, joissa on ALK-deleetio, analysoidaan positiivisiksi. Signaalien ollessa hyvin kaukana toisistaan voidaan olettaa, että kyseessä on ALK-geenin translokaatio jonkin tuntemattoman geenin kanssa. [57]

Lopuksi viidenkymmenen solun analysoinnista katsotaan positiivisten ja negatiivisten solujen määrä. Tulos on negatiivinen, mikäli EML4-ALK-geenifuusion suhteen on positiivisia soluja alle 5 kappaletta eli 10 %. Jos positiivisia soluja on vähintään puolet eli 25 tai enemmän, voidaan tulosta pitää positiivisena. Rajatapauksissa toinen arvioija suorittaa analysoinnin uudelleen ja molempien analyysien tulokset lasketaan yhteen.

Tällöin positiiviseksi tulokseksi tulkitaan näytteet, joissa positiivisia soluja on vähintään 15 %. [57] (Liite 2.)

#### 4.2 Syväsekvensointi

Uuden sukupolven sekvensointimenetelmä on vuonna 2005 julkaistu sekvensointimenetelmä, jossa yhdistyvät tutkittavan DNA:n emäsjaksojen monistaminen kiinteällä alustalla ja sekvensointiprosessi. Syväsekvensointi on mahdollistanut ekspressoituvien geenien, geenien koodavien alueiden eli eksoneiden sekä kokonaisten genomien sekvensoinnin. Uuden menetelmän avulla esimerkiksi syöpäsairauksien biologiasta saadaan jatkuvasti uutta tietoa, ja sen ansiosta syövän diagnosointia ja hoitomuotoja pystytään kehittämään eteenpäin, sillä syöpä on yleisimmin perimän muutoksista johtuva sairaus. [48] Syväsekvensointi perustuu sairastuneen henkilön genomissa tapahtuneiden mutaatioiden vertaamiseen terveeseen ihmisen genomiin. Terveen ja sairaan ihmisen genomia voidaan vertailla keskenään, sillä yleisesti tiedetään, että syöpäsairauteen johtavia geenimutaatioita esiintyy vain pienellä osalla väestöä. [47]

Syväsekvensointimenetelmällä on monia etuja perinteiseen Sangerin menetelmään verrattuna. Uuden sukupolven sekvensointimenetelmillä säästetään aikaa, sillä esimerkiksi aikaa kuluttavaa DNA:n kloonausta *E. coli*-faagivektoriin ja geenikirjastojen luomista ei tarvitse suorittaa, koska esikäsittelyt tehdään *in vitro*. Kloonauksia suoritetaan mikrosirun pinnalle synteettisesti mittatilaustyönä valmistettujen oligonukleotidien avulla. Toiseksi sekvensointiainoa lyhentävät uuden sukupolven menetelmässä käytettävät mikrosirut, sillä niiden käyttö on nopeampaa ja tehokkaampaa kuin perinteisen Sangerin menetelmän kapillaarien käyttö. [47]

Yhdellä ajokerralla voidaan sekvensoida satoja tuhansia templaatteja, kun taas Sangerin sekvensoinnilla saavutetaan vain murto-osa uuden sukupolven sekvensoinnin kapasiteetista. Yhdellä NSG-sekvenssaattorilla voidaan tuottaa vuorokaudessa yhtä paljon tietoa kuin muutamalla sadalla Sanger-menetelmään pohjautuvalla sekvenssaattorilla. Tällöin myös henkilöstöressurssien tarve pienenee. Myös reagensseista syntyvät materiaalikustannukset pienenevät, koska tutkittavat näytteet ovat sitoutuneet samalle alustalle, jolloin niitä voidaan käsitellä samassa reaktiossa yhdellä reagenssivolyyymillä. Tällöin jokainen yksittäinen näyte ei vaadi käsittelyä omalla reagenssivolyyymillä. Lisäksi uuden sukupolven sekvensoinnissa näytteen laadulla ja määrällä ei ole yhtä suuria vaa-

timuksia kuin Sangerin-menetelmän kloonikirjastoja valmistettaessa. Esimerkiksi Neandertalin ihmisen DNA:ta selvitettäessä saatavilla olevan näytemateriaalin DNA:ta on erotettavissa vain enää noin 5 %. Heikkolaatuinen näyte ei kuitenkaan estä genomien määrittämistä NGS-menetelmällä. Sekvensointia on vain tehtävä 20-kertainen määrä nykypäivän ihmisen genomien sekvensointiin verrattuna. [47;59]

Syväsekvensoinnin etuna ensimmäisen sukupolven sekvensointimenetelmiin on, että tulokset ovat digitaalisia, jolloin sekvenssejä voidaan tarkastella nukleotidin tarkkuudella missä tahansa kohdassa genomia. Tämän mahdollistaa sekvensoinnissa käytetty alkuperäistä näytemateriaalia korkeampi DNA-pitoisuus (over-sampling), jolloin sekvenssin lähettämä signaali on tavallista voimakkaampi. Over-sampling vähentää sekvensointiin vaikuttavia häiriötekijöitä, jotka edesauttavat tarkan sekvensointituloksen saavuttamista. [48]

Syväsekvensoinnin heikkoutena ovat menetelmällä tuotetun laajan sekvensointidatan asettamat tietotekniset haasteet esimerkiksi datan säilyttämisen, seurannan ja laadun varmistuksen suhteen. Lisäksi analysointiohjelmat vaativat jatkuvaa kehittelyä sekvensoinnista syntyvän laajan informaatiotulvat hallinnan ja sen aikaavievän käsittelemisen helpottamiseksi. [8]

Eksoni-alueiden sekvensointi voidaan suorittaa sekä Sangerin -menetelmällä että syväsekvensoinnilla. Eksoni-sekvensointi on kohdennettu sekvensointimenetelmä, jonka avulla voidaan tutkia pientä osaa ihmisen genomista samanaikaisesti, sillä ihmisellä proteiineja koodaavien alueiden osuus koko genomista on vain 1–2 %. Vaikka proteiineja koodaamattomilta intronialueilta löytyy syövän kehittymiseen liittyviä mutaatioita, CMG-ryhmän tutkijat keskittyvät pääosin eksoneihin ja ei-koodaaviin eksoni-introniraja-alueisiin. [49]

### 4.3 Syväsekvensointimenetelmä

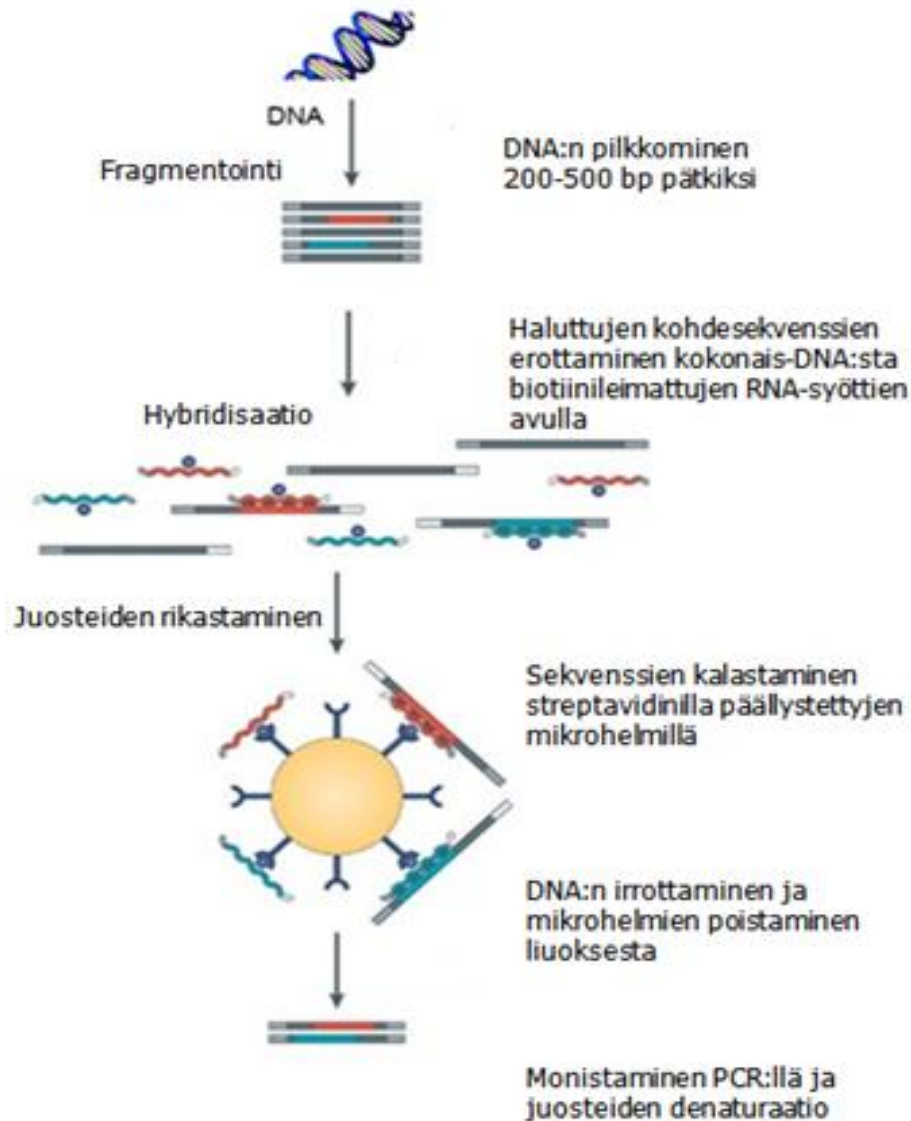
NGS-menetelmän työvaiheet ovat mallijuosteen eli templaatin valmistaminen, sekvensointi, kuvantaminen sekä datan analysointi. Markkinoilla on tarjolla monia erilaista kaupallisia alustoja ja jatkuvasti kehitellään tehokkaampia ja monikäyttöisempiä alustoja erilaisiin sekvensointitarkoituksiin. Eri valmistajien alustat eroavat toisistaan eri sekvensointimetodien lisäksi käyttötarkoituksen, emäspituuden, sekvensointiajan, saata-

van datan laajuuden ja hinnan perusteella. Markkinoiden ensimmäiset kaupalliset alustat ovat Roche'n 454-, Illuminan Solexa- ja Lifen APG-alustat. [8] Seuraavassa osiossa keskitytään Illuminan Genome Analyzer IIX:llä suoritettavaan syväsekvensointiin, sillä Illuminan sovellusta käytettiin tässä opinnäytetyössä.

Illuminan sekvensointi perustuu synteettiseen sekvensointiin. Menetelmässä fragmentoidut eli katkaistut DNA-jaksot sekvensoidaan Genome Analyzer IIX -laitteella, minkä jälkeen tunnistetuista DNA-jaksoista kootaan yhtenäinen genomi FIMM-yksikön käytössä olevien sovellusten avulla. [60]

Työ aloitetaan DNA:n eristämällä parafiinileikkeistä, minkä jälkeen näytteet siirtyvät FIMM-yksikköön jatkokäsittelyyn. Eristetty DNA fragmentoidaan ääniaaltojen avulla noin 200-500 bp pituisiksi palasiksi. Kohdennettujen sekvenssien erottaminen kokonais-DNA:sta suoritetaan Agilentin Technologies SureSelect Target Enrichment System -kitillä. Epätasaisesti pilkottujen fragmenttien päät korjataan ja tasataan (end repair) niin, että DNA:n katkoskohdat ovat tylppäpäisiä (blunt-ends). Tylppiin päihin liitetään A-emäksestä koostuva "häntä" (poly-A tail), johon adaptorin T-häntä (poly-T tail) liitetään ligaasi-entsyymien avulla. Tarttumattomat adaptorit poistetaan ja DNA-juosteet hybridisoituvat Agilentin eArray-sovelluksella valmistettujen biotiinileimattujen RNA-syöttien kanssa. RNA-syöttien avulla sekvensointiin valitaan vain halutut eksonit ja mikro-RNA-alueet. [61]

Seuraavaksi hybridisoituneet kohdesekvenssit ”kalastetaan” kokonais-DNA:n joukosta streptavidinilla päällystettyjen mikrohelmien avulla, sillä biotiinin ja streptavidinin välillä on voimakas sitoutumisvuorovaikutus. Erottelussa käytetään apuna magneettialustaa. Seuraavaksi mikrohelmet käsitellään liuoksella, joka irrottaa kohde-DNA:n mikrohelmistä. Mikrohelmet poistetaan liuoksesta ja erotetun DNA:n laatu ja sekvenssien kokoja-kauma tarkistetaan geelielektroforeesin avulla. Lopuksi DNA monistetaan PCR:llä ja denaturoidaan eli saatetaan lämpökäsittelyllä yksijuosteiseksi (Kuvio 14). [61]

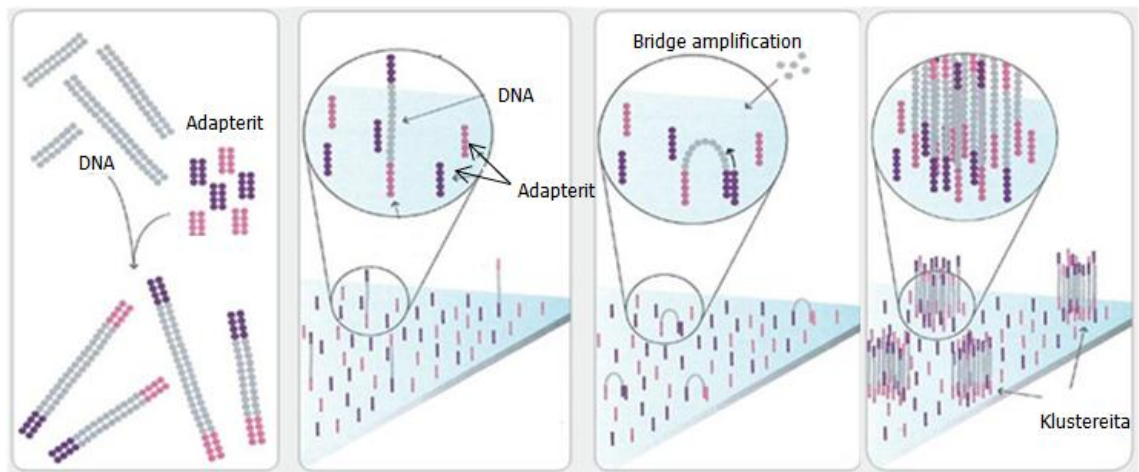


Kuvio 14. Tutkittavien DNA-jaksojen erottaminen ja monistaminen ennen syväsekvensointia [Mukaiillen lähde 35].

Illuminan alustalle levitetään kohdennetut yksijuosteiset DNA-fragmentit, joiden päihin on liitetty adaptorit. Alustalle on kiinnitetty tiheästi adaptorille komplementaarista



DNA-juosteita eli primereita, joihin yksijuosteiset DNA-fragmentit tarttuvat kiinni adaptoreillaan. Alustalla fragmentit muodostavat samaa yksijuosteista DNA:ta sisältäviä ryhmiä eli klustereita, koska samalla primerilla on peitetty tietty alue lasista. Fragmentit tarttuvat alustan primereihin ja mallijuosteelle rakentuu vastinjuoste DNA-polymeraasin ja nukleotidien avulla. Tämän jälkeen DNA:n pää tarttuu uuteen primeriin muodostaen sillan, minkä jälkeen juosteet eroavat toisistaan, kun alkuperäinen DNA-fragmentti jää paikoilleen ja sille rakentunut vastinjuoste tarttuu uuteen primeriin. Seuraavaksi yksijuosteisille DNA-pätkille rakentuvat jälleen uudet vastinjuosteet, ja tätä monistamista jatketaan kunnes alustalla ei ole enää vapaita primereita (Kuvio 15). Tätä PCR:ään pohjautuvaa monistustapaa kutsutaan siltamonistamiseksi (bridge amplification). [60]

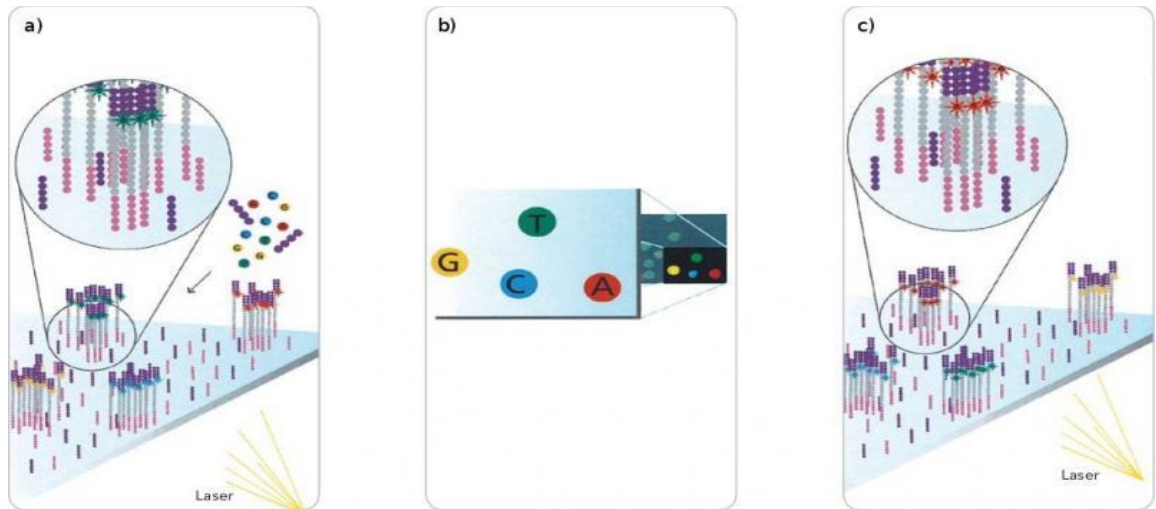


Kuvio 15. DNA-fragmenttien tarttuminen alustaan ja niiden monistaminen [Mukaihen lähde 60].

Kun tutkittavat juosteet ovat kiinnittyneet alustalle, aloitetaan synteettinen sekvensointi. Alustalle lisätään jälleen kaikkia neljää emästä sisältävää seosta ja DNA-polymeraasia, jolloin fragmenteille monistuu vastinjuostetta emäspariperiaatteen mukaisesti. Nukleotidit ovat muokattuja, ja ne on leimattu fluoresoivalla värillä. Nukleotidien muokkaamisen takia replikaatio pysähtyy nukleotidin kiinnittyessä vastinjuosteseen. (Kuvio 16a sivulla 44.) Nukleotidien liittämisen jälkeen ylimääräiset tarttumattomat nukleotidit pestään pois alustasta.

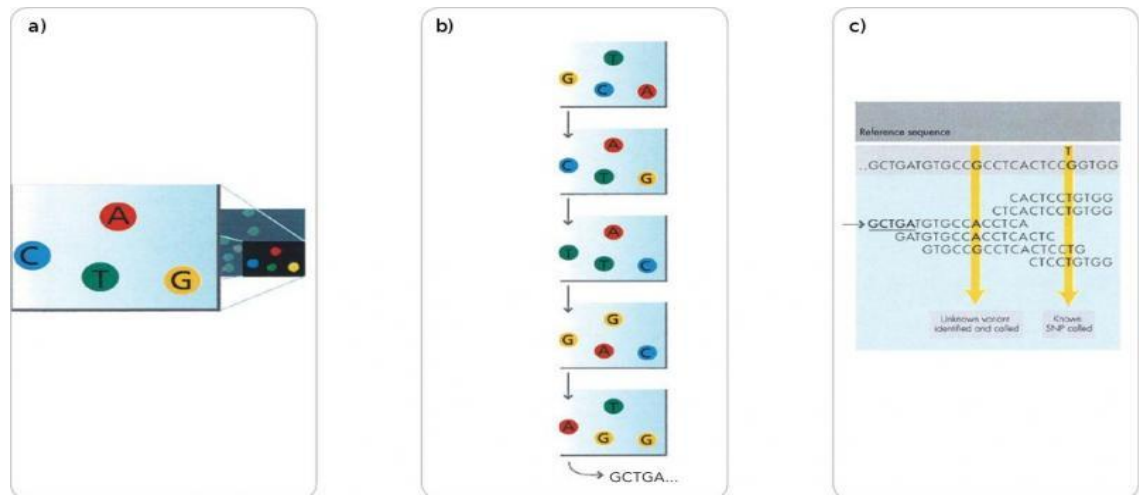
Tämän jälkeen laseri skannaa alustan, jolloin fluoresoivat värit voidaan detektoida kameran avulla. Jokaisella nukleotidilla on oma värinsä, jonka kamera tunnistaa. Kamera detektoi jokaisen klusterin, jossa on samaa juostetta monistuneena. (Kuvio 16b-c)

Ryhmiä lähettämistä väreistä muodostuu kuva (Kuvio 17a sivulla 45). Emäsdetektion jälkeen nukleotidin sekvensoinnin pysäyttävä osa ja fluoresoiva leima poistetaan ja sykliä toistetaan. Jokaisen syklin tuloksena kaikista alustalle kiinnitetyistä fragmenteista saadaan määritettyä yksi nukleotidi. Sykliä toistomäärä Illuminan GenomeAnalyzerilla on noin 100 sykliä, sillä suuremmilla syklien toistomäärillä sekvensoinnin laatu heikenee. [60]



Kuvio 16. Emässekvenssin selvittäminen leimattujen nukleotidien avulla. [60]

Lukuisien replikaatiosykliden tuloksena jokaisesta syklistä muodostuu koko alustan kattava "emäskartta". Seuraavaksi ohjelma analysoi kartat kaksivaiheisesti: ensimmäisenä ohjelma tunnistaa fragmenttiklusterit ja niiden intensiteetit. Seuraavaksi määritellään fragmenttien emäsjärjestys mitattujen intensiteettien perusteella. (Kuvio 17b sivulla 45) Lopuksi yksittäiset fragmentit kootaan yhtenäiseksi genomiksi referenssigenomin avulla (Kuvio 17c sivulla 45). Tämän jälkeen terve- ja näyte-DNA ovat vertailtavissa. [60] Koska tässä työssä käytettiin eksonitarkennettua sekvensointia, puuttuivat introni-alueet sekvensointidatasta.



Kuvio 17. Genomin kokoaminen yksittäisten fragmenttien emäsjärjestyksen perusteella. [60]

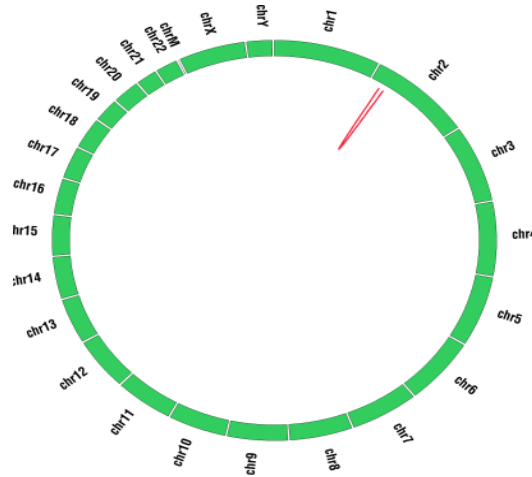
#### 4.3.1 Syväsekvensointidatan analysointi

Sekvensointidatan analysointiin käytettiin Broad Institutun kehittämää sekvensointiohjelmaa Intergrative Genomics Viewer 1.5 (IGV).

Analysointi aloitettiin tiedostojen lataamisella FIMM-yksikön sekvensointitiedostoista. Koska analysointidataa oli paljon ja tiedostot olivat hyvin suurikokoisia, tarvittiin erillinen kovalevy tiedostojen tallennuspaikaksi. Analysointiin vaadittavia tiedostoja olivat sekvensoidun näytteen genomi, ihmisgenomin referenssisekvenssi, kromosomin 2 sekvenssi sekä kohdennettujen eksonialueiden ja mikro-RNA:iden sekvenssit. Referenssisekvenssi on luotu 1000 Genomes -projektin tuloksena, jossa ihmisen geeniperimää ja sen variaatioita eri väestöissä on selvitetty. 2 kromosomin sekvenssi valittiin analysoitavaksi sen takia, että EML4-ALK-geenifuusio tapahtuu juuri tässä kromosomissa.

Ennen sekvensointianalyysin aloittamista katsottiin IGV-ohjelman ns. alustava analysointi ohjelman piirtämästä kuvasta, josta voidaan nähdä ohjelman tulkitsemat kromosomien väliset ja sisäiset fuusiot. EML4-ALK-fusion suhteen tarkasteltiin kuvaa kromosomista 2, jotta voitiin havaita tutkittava fuusio. Kuvassa ympyrän kehälle on sijoitettu ihmisen 22 kromosomia sekä sukupuolikromosomit. Kromosomien koot on suhteutettu kromosomien osuuteen ympyrän kehällä. Punainen käyrä kromosomien välillä osoittaa geenifuusion osapuolet. Lisäksi käyrän paksuus ilmaisee fuusion voimakkuutta.

Fuusiokäyrän EML4-ALK-geenin välillä tulee olla jyrkkä, sillä fuusion katkoskohdat ovat kromosomissa hyvin lähekkäin toisiaan. Kuviossa 18 nähdään kromosomissa 2 sijaitseva EML4-ALK-fuusio.



Kuvio 18. IGV-ohjelman alustava arviointi, josta nähdään EML4-ALK-geenifusio.

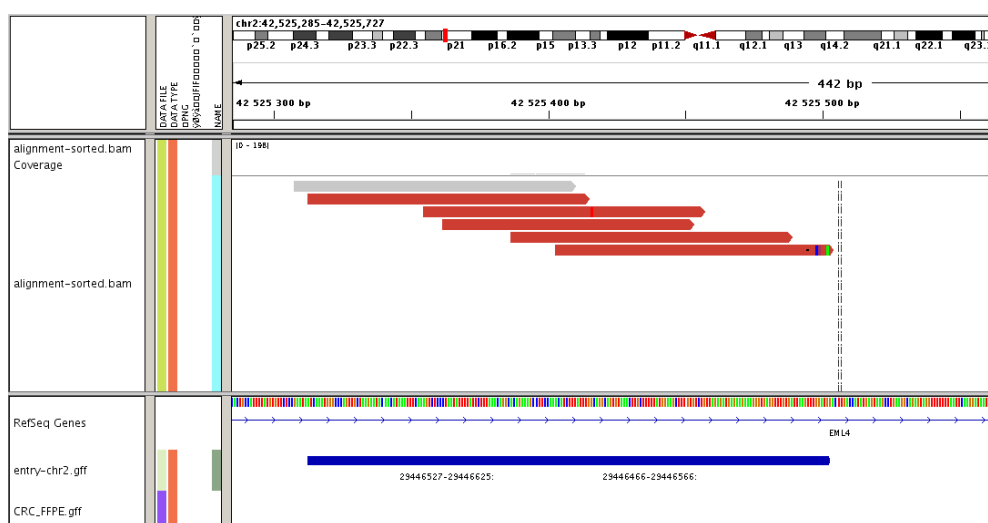
Pelkkä kuvan tarkastelu ei ole tarpeeksi luotettavaa näytteen lopullisen fuusiostatuksen varmistamiseksi, sillä ohjelma ei osoita kaikkia fuusioita ohjelmistoon asetettujen algoritmien vuoksi. Esimerkiksi näytteen laadulla eli eristetyn DNA:n määrällä ja laadulla on vaikutusta ohjelman kykyyn tunnistaa geenifusio.

Potilaan EML4-ALK-fuusiostatuksen selvittämiseksi verrattiin näytteen sekvenssiä terveeseen ihmisen referenssisekvenssiin. Analysointi aloitettiin tutkimalla ALK-geenissä tapahtuneita muutoksia, sillä tiedetään, että EML4-ALK-fuusiossa ALK-geenissä katkoskohta on aina samassa paikassa, mutta EML4-geenin katkoskohdista on eri variaatioita.

Kromosomin sisäisten muutosten tutkimisesta auttoi IGV-ohjelman värikoodaus. Jokaisella kromosomilla on oma värinsä, ja fuusioituneet sekvenssit ovat koodattu kromosomeille asetettujen värien perusteella. 2 kromosomin väritunniste on tumman punainen. Fuusiosekvenssistä saadaan lisätietoa viemällä hiiren kursori tutkittavan sekvenssin päälle. Tietoikkunasta selviää mm., onko fuusiosekvenssi pariutunut (mate-pared), fuusiosekvenssien sijainnit kromosomissa sekä sekvenssien etäisyys toisistaan. Lisäksi tiedoista voidaan tulkita, onko fuusiossa emäsjärjestys pysynyt samana vai muuttunut käänteiseksi tapahtunut. Jos sekvenssit ovat samaa merkkiä (++) tai (--) on

emäsjärjestys käänteinen; jos taas eri merkkiä, on fuusioituneen alueen emässekvenssi alkuperäisessä järjestyksessä.

Jokainen ALK-geenin alueella oleva tumman punainen sekvenssi tutkittiin yksitellen ja selvitettiin, onko fuusion toinen osapuoli EML4-geenin alueella. Mikäli fuusioita esiintyi ALK-geenissa, kirjattiin fuusiosekvenssin sijainti ja varmistettiin, että toinen fuusio-osapuoli EML4-geenin alueelta. (Kuvio 19.) Useiden tosiaan vastaavien fuusioiden esiintyminen EML4- ja ALK-geenin välillä on osoitus potilaan EML4-ALK-fuusiopositiivisuudesta. Näytteen fuusiostatus, fuusioiden määrä ja laatu taulukoitiin. (Liite 3.)



Kuvio 19. Viisi EML4-ALK-fuusiopositiivista sekvenssiä EML4-geenin alueella (punaiset sekvenssit). Fuusiogeenin toinen osapuoli selviää sinisen sekvenssin koordinaateista, joka tässä tapauksessa on ALK.

Lisäksi opinnäytetyön ulkopuoleisena tutkimuksena samasta aineistosta tutkittiin kaikki esiintyvät kromosomien väliset ja kromosomien sisäiset geenifuusiot. Tällä tutkimuksella haluttiin etsiä mahdollisia uusia geenifuusioita keuhkosyövän adenokarsinoomassa.

## 5 Tulokset

Opinnäytetyöhön yhteydessä suoritetussa tutkimuksessa analysoitiin yhteensä 26 FISH-lasia, joista viisi tulkittiin EML4-ALK-positiivisiksi. Kaikki viisi positiivista tulosta olivat melko yksiselitteisiä tapauksia, sillä positiivisten solujen määrä näytteessä vaihteli 46 ja 74 % välillä. EML4-ALK-testissä positiivisen tuloksen rajana on, että vähintään 50 % tutkituista 50 solusta on positiivisia. Tutkimuksen aikana esiintyi myös muutamia raja-

tapauksia, joissa positiivisten solujen määrä 50 solusta oli yli kymmenen prosenttia. Näistä näytteistä suoritettiin uudelleen arviointi, jolloin kaikki rajatapaukset osoittautuivat negatiiviseksi, kun arviointi tehtiin yhteensä 100 solusta. Uudelleen analysoinnissa positiivisuuden rajana on solujen fuusiopositiivisuus 15 solussa. FISH-tulokset vastasivat täysin PCR-menetelmällä saatuja tuloksia.

Syväsekvensointimenetelmällä saaduista tuloksista analysoitiin 43 potilaan EML4-ALK-status. Syväsekvensointiin käytettiin laajempaa tutkimusaineistoa, joka oli peräisin CMG-ryhmän aikaisemmista tutkimuksista. Neljältä potilaalta löydettiin EML4-ALK-mutaatio NGS-menetelmällä, joista kaikki osoittautuivat inversiosta johtuviksi geeni-fuusioiksi. Neljästä positiivisesta tuloksesta kaksi oli opinnäytetyössä tutkittuja näytteitä. IGV-ohjelma havaitsi kaksi positiivista tapausta jo alustavan analyysin perusteella. Näissä tapauksissa EML4-ALK-positiivisten sekvenssien määrä oli 5 ja 15 sekvenssiä. Kaksi muuta positiivista näytettä havaittiin tutkimalla ALK-geenissä tapahtuneita muutoksia manuaalisesti. Näistä näytteistä löytyi kolme ja seitsemän fuusiopositiivista sekvenssiä. Lisäksi tutkittavasta materiaalissa oli yksi tapaus, jossa fuusio oli tapahtunut kromosomissa 2, ja se muistutti alustavassa arviossa hyvin paljon EML4-ALK-välistä fuusiota. Sekvenssitasolla tarkasteltuna ilmeni, ettei fuusio ollut EML4- ja ALK-geenin välillä. Taulukossa 4 on otos menetelmien vertailun tutkimustuloksista. Sinisellä alueella on FISH-tulos sekä EML4-ALK-positiivisten solujen määrä tutkituista soluista. Vihreällä alueella on PCR-tulos ja oranssilla alueella syväsekvensoinnin alustava analyysi, manuaalinen tulkinta ja fuusiopositiivisten sekvenssien määrä ja laatu. Koko tutkimusaineiston tulokset laajemmassa mittakaavassa ovat nähtävissä liitessä 3.

Taulukko 4. Otos FISH-, PCR- ja NGS-menetelmällä saaduista tuloksista.

FISH	Pos. solut	PCR-tulos	NGS tulokset	NGS manuaalinen tulkinta	pos. sekvenssit
<b>positiivinen</b>	70 %	<b>positiivinen</b>	<b>negatiivinen</b>	<b>positiivinen</b>	3 inv.
negatiivinen	0 %	negatiivinen	negatiivinen	negatiivinen	-
<b>positiivinen</b>	46 %	<b>positiivinen</b>	<b>negatiivinen</b>	<b>positiivinen</b>	7 inv.
negatiivinen	2 %	negatiivinen	negatiivinen	negatiivinen	-
<b>positiivinen</b>	64 %	<b>positiivinen</b>	<b>positiivinen</b>	<b>positiivinen</b>	15 inv.
negatiivinen	8 %	negatiivinen	negatiivinen	negatiivinen	-
negatiivinen	11 %	negatiivinen	negatiivinen	negatiivinen	-
negatiivinen	0 %	negatiivinen	negatiivinen	negatiivinen	-
negatiivinen	0 %	negatiivinen	negatiivinen	negatiivinen	-
negatiivinen	2 %	negatiivinen	negatiivinen	negatiivinen	-
negatiivinen	4 %	negatiivinen	negatiivinen	negatiivinen	-
<b>positiivinen</b>	66 %	<b>positiivinen</b>	<b>positiivinen</b>	<b>positiivinen</b>	5 inv.

## 6 Luotettavuuden arviointi

Tutkimustuloksia voidaan pitää luotettavina, sillä kaikki EML4-ALK-positiiviset tapaukset pystyttiin osoittamaan positiivisiksi FISH-, NGS- ja PCR-menetelmillä muiden näytteiden ollessa negatiivisia.

FISH-lasien teko ja koettimien hybridisaatio tehtiin Abbot-testivalmistajan virallisten ohjeiden mukaisesti. Lasien analysointikelpoisuus varmistettiin esitarkastuksella, jossa arvioitiin signaalien voimakkuus, solujen riittävyys ja solun reunojen selkeys. Kaikki lasit, yhtä tapausta lukuun ottamatta, olivat analyysikelpoisia. Epäonnistunut lasi oli värjäytynyt kauttaaltaan oranssiksi, eikä siinä ollut havaittavissa selkeitä signaaleja eikä solu-reunoja. Tämä lasi hylättiin ja siitä valmistettiin uusi lasi, jolle tehtiin FISH-hybridisaatio. Lisäksi jokaisessa FISH-sarjassa oli mukana valmistajan antamaa ALK-positiivinen ja -negatiivinen kontrollilasi, jolla voitiin tarkistaa koettimien toimivuus.

FISH-lasien analysointi vaati silmän harjaantumista. Välillä lähemmäs olevien vihreän ja oranssin signaalien etäisyyttä oli vaikea arvioida ja tehdä sen pohjalta päätös solun fuusiopositivisuudesta. Abbotin The Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kitin ohjeiden mukaan solu on positiivinen EML4-ALK-mutaation suhteen, kun signaalit ovat vähintään kahden signaalileveyden päässä toisistaan. Kuitenkin uudelleen arviointien myötä sadan solun tutkiminen antoi riittävän suuren otoksen analyysin lopputuloksen varmistamiseksi. Lopuksi kaikki FISH-lasit tarkastutettiin professori Sakari Knuutilalla, joka antoi lopullisen lausunnon näytteen EML4-ALK-statuksesta. FISH-analyyseja aloitettaessa solujen positiivisuuden arviointikyky ei ollut vielä kehittynyt riittävän hyväksi, jolloin positiiviseksi tulkittujen solujen lukumäärä kasvoi todellisuutta suuremmaksi. Näistä lasista oli suoritettava uudelleen arviointi, jonka perusteella väärät positiiviset tulokset saatiin karsittua pois.

Syväsekvensointituloksia voidaan pitää myös luotettavina, sillä Illumina GenomeAnalyzer IIx sekvensoi jokaisen kohdesekvenssin yli 100 kertaa. Tämän jälkeen heikkolaatuiset sekvenssit poistetaan sekvensointiaineistosta filttointi- ja laadunvalvontaohjelmis-

tojen avulla. Lopulta Illuminan GenomeAnalyzer IIx:llä päästään 99 %:n emäslukutarkkuuteen. [47;62]

NGS-tuloksien alustavan analysoinnin avulla IVG osoitti kaksi EML4-ALK-positiivista löydöstä, ja kaksi muuta positiivista tapausta voitiin osoittaa tarkastelemalla tuloksia sekvenssitasolla.

Tutkimus oli tarkoitus suorittaa vielä suuremmasta tutkimusaineistosta, mutta aikarajoitteiden takia viimeisiä NGS-tuloksia ei saatu analysoidavaksi tätä opinnäytetyötä tehtäessä. Suurempi tutkimusaineisto olisi parantanut tulosten luotettavuutta entisestään.

## **7 Pohdinta**

Tässä opinnäytetyössä saatiin vastaukset syväsekvensointi- ja FISH-menetelmän avulla saatujen tulosten vastaavuuteen sekä siihen, kuinka näillä menetelmillä saadaan tietoa geenipoikkeavuudessa. Menetelmien käytettävyyttä kliinisessä tutkimuspalvelussa käsitellään yleisellä tasolla kirjallisuuslähteiden perusteella.

Syväsekvensoinnilla saadut tulokset vastasivat FISH-menetelmällä saatuja tuloksia 100 %:n tarkkuudella. 43 potilaan tutkimusryhmässä diagnosoitiin 4 EML4-ALK-positiivista geenifuusiota, ja positiivisuus oli osoitettavissa sekä FISH- että syväsekvensointimenetelmällä.

FISH-menetelmällä voidaan osoittaa split-signaalin avulla inversiosta syntyneet EML4-ALK-fuusiot. EML4-ALK-geenin välistä deleetioita ei voida osoittaa FISH:llä, sillä FISH detektoi vain näytteestä olevia sekvenssejä. Lisäksi The Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kitin molemmat koettimet on suunniteltu ALK-geenin alueelle, joten häviämän kokoa ja aloituskohtaa ei sen vuoksi voida selvittää, eikä voida tietää, rajoittuuko häviämä ALK- ja EML4-geenin välille. Syväsekvensoinnilla voidaan puolestaan osoittaa sekä inversiot että deleetiot. Analysointiohjelma havaitsee deleetiot sen perusteella, että häviämän johdosta on havaittavissa normaalia vähemmän sekvenssejä. Syväsekvensointimenetelmän tuloksista voidaan nähdä kaikki geenien uudelleenjärjestäytymiset, fuusion osapuolet sekä fuusioalueen pituus, joita ei voida osoittaa tällä FISH-menetelmällä.



Menetelmien luotettavuutta arvioitaessa opinnäytetyössä suoritettun tutkimuksen perusteella molemmat menetelmät ovat luotettavia EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamiseen, sillä tulokset vastasivat täysin toisiaan, eikä vääriä positiivisia tai negatiivisia tuloksia tullut.

NGS-menetelmää voidaan pitää spesifisenä, sillä jokainen kohdesekvenssi sekvensoidaan yli 100 kertaa, jolloin emästen lukuvirheiden todennäköisyys on noin 1 %. [62] The Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit on spesifinen inversiosta johtuneen EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittamiseen. FISH osoitti positiiviset EML4-ALK-fuusiot 100 % tarkkuudella, ja samoja tuloksia on saatu myös muissa tutkimuksissa. Justin et al. ALK-uudelleenjärjestäytymisen diagnosointimenetelmiä vertailevassa tutkimuksessa FISH-menetelmällä voitiin osoittaa viisi positiivista tulosta kuudesta (n=20). Yhtä näytettä ei voitu osoittaa positiiviseksi FISH:llä, sillä lasi ei ollut analyysikelpoinen, koska DNA oli osittain hajonnut 4–7 vuotta vanhoissa parafiinileikkeissä. [63] Deleetiota ei kyseisellä tutkimuksella voida varmasti osoittaa alukkeiden suunnittelun johdosta. EML4-ALK-fuusioista yli 2/3 johtuu inversioista ja 1/3 deleetioista. [4].

FISH-menetelmä ylivoimaisesti nopeampi kuin syväsekvensointi, kun analysoidaan yhtä näytettä. Näytteen EML4-ALK-status voidaan selvittää tarvittaessa jopa kahdessa työpäivässä, kun taas syväsekvensointitulosten saaminen kestää useita viikkoja. Normaalissa olosuhteissa FISH-analyysi voidaan suorittaa noin neljässä työpäivässä. Yhdessä FISH-sarjassa voidaan valmistaa 10 näytelasia ja kaksi kontrollilasia. Yhdellä NGS-sekvensoinnilla voidaan puolestaan sekvensoida 96 näytettä ja noin 100 miljoonaa emäsjaksoa. [62] Syväsekvensointimenetelmän nopeutta on vaikea verrata FISH-menetelmään, sillä syväsekvensointiin kuluva aika riippuu useasta tekijästä, kuten palveluntarjoajasta, sekvensoitavan perimän ja analysoitavien geenialueiden määrästä. FISH on toistaiseksi nopeampi menetelmä pienten näytemäärien analysointiin, mutta NGS-menetelmien voimakkaan kehityksen ansiosta syväsekvensointi tulee olemaan nykyistäkin nopeampi menetelmä.

Taloudellisuudessa FISH osoittautui syväsekvensointia edullisemmaksi vaihtoehdoksi. Abbotin johtajan Kathryn B. Beckerin mukaan yksittäinen FISH-testi maksaa noin 250 \$ eli 190 €, kun taas yhden kokonaisen genomin syväsekvensoinnin kustannukset ovat

1000 dollarin eli 800 euron luokkaa. [64;65]. Lisäksi on otettava huomioon, että syväsekvensointi vaatii kehittyneet ja tehokkaat tietotekniset laitteet sekä IT- ja bioinformatiikan asiantuntijoita, mikä nostaa edelleen menetelmän kustannuksia [66]. Kuitenkin oikean diagnoosin saaminen on ensiarvoisen tärkeää, sillä Crizotinibi-hoidon hinta on 9600 \$ [65] eli noin 7400 €/kk, jolloin virheellisistä diagnooseista aiheutuu potilaan väärän hoitovalinnan lisäksi myös suuria taloudellisia kustannuksia. Lisäksi syväsekvensointi asettaa rajoitteita näytemateriaalin suhteen. Sekvensointiin vaadittava 5 µg:n DNA-näytettä voi osoittautua haastavaksi eristää varsinkin parafiiniin valetuista kudosnäytteistä. FISH-menetelmä puolestaan vaatii ainoastaan kudosleikkeen, jossa on vähintään 50 analyysikelpoista solua. FISH-menetelmän etuna on myös se, että vaadittava kudosleikkeen määrä on niin pieni, että se soveltuu ohutneulanäytteille ja näyteblokiista jää tutkimusmateriaalia myös muihin jatkotutkimuksiin [63].

FISH-menetelmän etuna on menetelmän helppous ja laitteiston yksinkertaisuus. FISH-menetelmään tarvittavalla lämpölevyllä ja fluoresenssimikroskoopilla voi tehdä myös muita FISH-analyysejä. FISH-menetelmä on standardoitu menetelmä ja se on ollut jo pitkään diagnostiikan käytössä sen edullisuuden ja testien monipuolisuuden ansiosta. Luotettavan tuloksen saamiseksi FISH-lasien analysointi vaatii kuitenkin kokemutta tutkijaa, sillä se perustuu jossain määrin tutkijan subjektiiviseen tulkintaan.

Syväsekvensointi puolestaan on kallis ja hidas menetelmä geenimutaatioiden tutkimiseen. NGS:ään tarvittavien laitteistojen hinnat ovat kalliita, ja siksi niiden käyttö Suomessa on keskitettyä, jolloin sekvensoinnin suorittaminen on riippuvainen palveluntarjoajasta. Lisäksi NGS:n haasteena on sekvensoinnin tuottama suuri informaatiomäärä ja sen käsittely, joka vaatii henkilöstö ja tietoteknisiä resursseja. Syväsekvensoinnin etuna on suurten näytesarjojen sekvensointi yhdellä kertaa ja tulosten 99-prosenttinen luotettavuus sekä mahdollisuus tutkia useita mutaatioita samanaikaisesti.

Syväsekvensointi ei ole tällä hetkellä soveltuva menetelmä kliiniseen tutkimuspalveluun menetelmän vaativuuden johdosta. Kliinisessä tutkimuspalvelussa sekvensointitulokset ovat luotettavia, mutta niiden pitäisi olla nopeasti saatavilla ja hoitohenkilökunnan helposti tulkittavissa. NGS:llä ei saada lisähyötyä EML4-ALK-geenifuusion diagnosoinnissa niin kauan, kuin eri fuusiovariaatioiden merkitykset ovat epäselviä ja hoitolinja on kaikille variaatioille sama. Monipuolisuudellaan ja menetelmän antamalla laajalla informaatiolla

tiolla syväsekvensointi on kuitenkin ylivoimainen verrattuna FISH-menetelmään. Esimerkiksi variaatioiden tutkimiseen ja täsmälääkkeiden kehittämiseen NGS-menetelmä antaa paljon uutta arvokasta tietoa.

## **8 Tulevaisuuden näkymät**

Syväsekvensointi ja muut uuden sukupolven sekvensointimenetelmät mahdollistavat syöpää aiheuttavien geenimutaatioiden tutkimisen aikaisempia menetelmiä huomattavasti laajemmassa mittakaavassa. Näin saadaan tarkempaa tutkimustietoa eri geenimutaatioista ja niiden merkityksestä syövän kehityksessä. Genomin läpisekvensoinnin mahdollistavat menetelmät perustuvat sattumanvaraiseen sekvensointiin, jolloin sekä tunnettuja että tuntemattomia geenimuutoksia voidaan tarkastella samanaikaisesti. Geneettisellä luokituksella voidaan arvioida useimmiten paremmin yksittäisen potilaan ennustetta ja vastetta syöpähoitoihin. Syövän biologian parempi tietämys mahdollistaa tehokkaampien diagnosointimenetelmien ja syöpähoitojen kehittämisen, jolloin oikeilla syöpähoitovalinnoilla voidaan vaikuttaa positiivisesti potilaiden elinaikaan ja elämänlaatuun. Geenimutaatioiden syvä tuntemus auttaa kehittämään myös uusia kohdennettuja täsmälääkkeitä. Syöpägenomin analysointi on tärkeää, sillä täsmälääkkeet tehoavat vain tiettyyn syöpämutaatioon, minkä takia oikeiden potilaiden valinta ja väärin poissulkeminen on ensiarvoisen tärkeää. Tehokkaampia ja luotettavampia diagnostisia menetelmiä testataan jatkuvasti. Vaikka uuden sukupolven sekvensointimenetelmissä on vielä paljon heikkouksia ja kehitystyötä vaativia kohteita, on menetelmä erittäin lupaava antaen tutkijoille ensiarvoisen tärkeää informaatiota syöpäsairauksista ja parantaen ihmisten asemia taistelussa syöpää vastaan. [47;64]

## Lähteet

- [1] Syöpäjärjestöt 2010. Mikä on syöpä.  
<<http://www.cancer.fi/tietoasayovasta/syopa/>>. (Luettu 4.5.2012).
- [2] GLOBOGAN 2008. Summary statistics (2008). International Agency for Research on Cancer (IARC). <<http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp#KEY>>. (Luettu 4.5.2012).
- [3] Shaw, Alice T. – Yeap, Beow Y. – Mino-Kenudson, Mari – Digumarthy, Subba R. – Costa, Daniel B. – Heist, Rebecca S. – Solomon, Benjamin – Stubbs, Hannah – Ad41 mane, Sonal – McDermott, Ultan – Settleman, Jeffrey – Kobayashi, Susumu – Mark, Eugene J. – Rodig, Scott J. – Chirieac, Lucian R. – Kwak, Eunice L. – Lynch, Thomas J. – Iafrate, John A. 2009. Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK. *Journal of Clinical Oncology*. Vol 27. 4247–4253.  
<<http://jco.ascopubs.org/content/27/26/4247.long#Home>>. (Luettu 9.1.2012).
- [4] Sasaki, Takaaki – Rodig Scott J. – Chirieac, Lucian R. – Jänne, Pasi A. 2010. The biology and treatment of EML4-Alk non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*. 46. 1773-1778
- [5] Shaw, Alice T. – Yasothan, Uma – Kirkpatrick, Peter 2011. Crizotinib. *Nature* 2011. Vol 10. 897-898. <<http://www.nature.com/nrd/journal/v10/n12/full/nrd3600.html>>. (Luettu 12.1.2012).
- [6] Knuutila, Sakari 2012. Professori. Helsinki. Suullinen tiedonanto 12.1.2012.
- [7] Halberg, Bengt – Palmer Ruth H. 2011. ALK and NSCLC: Targeted therapy with ALK inhibitors. *F1000 Medicine reports* 2011. Vol 3:21. 1-9.  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3206708/?tool=pubmed>>. (Luettu 9.1.2012).
- [8] Metzker, Michael L 2009. Sequencing technologies- the next generation. *Nature reviews Genetics* 2010. Vol. 11, s.31–46.  
<<http://www.nature.com/nrg/journal/v11/n1/full/nrg2626.html>>. (Luettu 24.4.2012).
- [9] Soda, Manabu – Choi, Young Lim – Enomoto, Munehiro et al. 2007. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. Vol 448 s. 561-566.  
<<http://www.nature.com/nature/journal/v448/n7153/full/nature05945.html>>. (Luettu 9.1.2012).
- [10] Vuorio, Eero. DNA ja geeni. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Leisti, Jaakko 2002. 2. painos. Perinnöllisyyslääketiede. Kustannus Oy Duodecim. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä 2002.

- [11] Päijät-Hämeen virtuaalinen oppimisympäristö. II Perinnöllisyys, bio- ja geeniteknikka sekä evoluutio.  
<[http://www.edu.lahti.fi/~verkko/bi/II\\_perinnoll.htm](http://www.edu.lahti.fi/~verkko/bi/II_perinnoll.htm)>. (Luettu 14.5.2012).
- [12] Avela, Kristiina. Genomin rakenne. 2009.  
<[http://www.google.fi/imgres?q=Replikaatio&start=220&hl=fi&biw=1280&bih=681&gbv=2&tbm=isch&tbnid=INvrqi0853a0OM:&imgrefurl=http://personal.inet.fi/tiede/tapiovaara/syyskokous2009.htm&docid=AgHgMvZPjHKZDM&imgurl=http://personal.inet.fi/tiede/tapiovaara/syyskokous2009\\_tiedostot/image017.jpg&w=399&h=437&ei=Al2VT9qXHenf4QTgtunQDw](http://www.google.fi/imgres?q=Replikaatio&start=220&hl=fi&biw=1280&bih=681&gbv=2&tbm=isch&tbnid=INvrqi0853a0OM:&imgrefurl=http://personal.inet.fi/tiede/tapiovaara/syyskokous2009.htm&docid=AgHgMvZPjHKZDM&imgurl=http://personal.inet.fi/tiede/tapiovaara/syyskokous2009_tiedostot/image017.jpg&w=399&h=437&ei=Al2VT9qXHenf4QTgtunQDw)>. (Luettu 14.5.2012)
- [13] Solunetti 2006. Replikaatio.  
<<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/replikaatio/2/>>. (Luettu 14.5.2012).
- [15] Suominen, Ilari – Ollikka, Pauli 1999. DNA:n sekvensointi. Yhdistelmä DNA-tekniikan perusteet. 3.painos. Opetushallitus. Hakapaino Oy 1999.
- [16] Venäläinen, Rosa. Ei päiväystä. Sekvenointimenetelmillä saadaan tietoa emäsjärjestyksestä. Otavan Opisto.  
<[http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/bi/bi5/4\\_geeni\\_ ja\\_biotekniikkaa\\_kaytannossa/4.3\\_geenitekniikan\\_perusmenetelmia/4.3.5\\_sekvenointi\\_menetelmat?C:D=hNcI.gWxL&m:selres=hNcI.gWxL](http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/bi/bi5/4_geeni_ ja_biotekniikkaa_kaytannossa/4.3_geenitekniikan_perusmenetelmia/4.3.5_sekvenointi_menetelmat?C:D=hNcI.gWxL&m:selres=hNcI.gWxL)>. (Luettu 27.4.2012).
- [17] Solunetti 2006. Sangerin menetelmä.  
<[http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sangerin\\_menetelma/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sangerin_menetelma/2/)>. (Luettu 27.4.2012).
- [18] Heino, Jyrki – Vuento, Matti 2010. 2. painos. Biokemian ja solubiologian perusteet. Helsinki. WSOYpro Oy.
- [19] National Human Genome Research Institute. Mutaatiotyypit 2005.  
<<http://fi.wikipedia.org/wiki/Tiedosto:Mutaatiotyypit.png>>. (Luettu 27.4.2012).
- [20] Simola, Kalle O. J. Kromosomisairaudet. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Leisti, Jaakko 2002. 2. painos. Perinnöllisyyslääketiede. Kustannus Oy Duodecim. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä 2002.
- [21] Aaltonen, Lauri A. Syövän genetiikka. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Leisti, Jaakko 2002. 2. painos. Perinnöllisyyslääketiede. Kustannus Oy Duodecim. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä 2002.
- [22] Opetushallitus 2011. Syövän synty-karsinogeneesi.  
<<http://www2.edu.fi/etalukionterveystieto/karsinogeneesi.html>>. (Luettu 14.5.2012).
- [23c] Elonen, Erkki – Elomaa, Inkeri. Solunsalpaajahoito. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen Mikko. 2007, 3. painos. Syöpätaudit. Kustannus Oy Duodecim. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä 2006.

[23d] Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. Gastrointestinaalinen stroomatumori eli GIST. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen Mikko. 2007, 3. painos. Syöpätaudit. Kustannus Oy Duodecim. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä 2006.

[23a] Isola, Jorma. Syövän synty, kasvu ja leviäminen. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen Mikko. 2007, 3. painos. Syöpätaudit. Kustannus Oy Duodecim. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä 2006.

[23b] Mali, Pekka – Ojala, Antti – Salo, Jarmo A. Keuhkosyöpä. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen Mikko. 2007, 3. painos. Syöpätaudit. Kustannus Oy Duodecim. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä 2006.

[23e] Stenman, Ulf-Håkan – Haglund, Caj – Roberts, Peter J. Syövän patologia. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen Mikko. 2007, 3. painos. Syöpätaudit. Kustannus Oy Duodecim. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä 2006.

[24] Shaw, Alice. T – Solomon, Benjamin, 2011. Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase in Lung Cancer. American Association for Cancer Research. 2011;17;2081-2086. <<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/17/8/2081.full.pdf+html>>. (Luettu 7.1.2012).

[25] Cheng, Liang – Alexander, Riley E – MacLennan, Gregory T – Cummings, Oscar W – Montironi, Rodolf – Lopez-Beltran, Antonio – Cramer, Harvey M – Davidson, Darell D – Zhang, Shaobo 2012. Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. Modern Pathology 2012. Vol 25, s.347–369. <<http://www.nature.com/modpathol/journal/v25/n3/full/modpathol2011215a.html>>. (Luettu 14.5.2012).

[26] Koivunen, Jussi P. – Mermel, Craig – Zejunullahu, Kershnik – Murphy, Carly et al 2008. National Institute of Health. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. Clinical Cancer Clin Cancer Res. 2008 Jul 1;14(13):4275-83. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3025451/pdf/nihms263091.pdf>>. (Luettu 26.3.2012).

[27] Suomen Syöpärekisteri 2012. Päivitetty 01.03.2012. Yleisimmät syövät vuonna 2010. <[www.syoparekisteri.fi](http://www.syoparekisteri.fi)>.

a) miehet: <<http://stats.cancerregistry.fi/stats/fin/vfin0020i0.html>>. (Luettu 11.3.201).

b) naiset: <<http://stats.cancerregistry.fi/stats/fin/vfin0021i0.html>>. (Luettu 11.3.2012).

[28] Mattson, Karin – Kyösola, Kimmo – Ojala, Antti. Keuhkosyöpä. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly 1999. Syöpätaudit. 2. painos. Duodecim. Vammalan Kirjapaino Oy. 1999

[29] Knuutila, Aija. Thoraxalueen kasvaimet ja keuhkopussin sairaudet. Teoksessa Kinnulla, Vuokko – Brander, Pirkko E. – Tukiainen Pentti 2005. Keuhkosairaudet. 3. painos. Duodecim. Karisto Oy 2005.

[30] Bellaoui, Pirkko – Nieminen, Eeva-Maija – Mali, Pekka – Räsänen, Merja – Rosenberg-Ryhänen, Leena. Keuhkosyöpäpotilaan opas. 2.painos. Suomen Syöpäpotilaat ry. Redfina 2011. Saatavilla myös verkossa.  
<<http://www.syopapotilaat.fi/pdf/keuhkosyopaapas2011.pdf>>.

[31] Syöpäjärjestöt. Ei päiväystä.  
<<http://www.cancer.fi/tietoasyovasta/syopataudit/keuhkosyopa/>>. (Luettu 23.3.2012).

[32] Mattson, Karin – Kunnamo, Ilkka – Aho, Tellervo 2001. Suomen Lääkäriseuran Duodecimin. Käyvän hoidon potilasversiot. Keuhkosyöpä.  
<<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/naytaartikkeli/tunnus/khp00014>>. (Luettu 23.3.2012)

[33] Suomen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Keuhkolääkäriyhdistys ry:n ja Suomen onkologiayhdistys ry:n asettama työryhmä 2008. Keuhkosyöpä. Karnofskyn ja WHO:n toimintakykyluokitus.  
<<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/naytaartikkeli/tunnus/hoi06050>>. (Luettu 23.3.2012).

[34] Syöpäjärjestöt, 2005. Päivitetty 2.3.2005. Ei-pienisoluisen keuhkosyöpä.  
<<http://www.cancer.fi/tietoasyovasta/syopataudit/keuhkosyopa/ei-pienisoluisen/>>. (Luettu 12.3.2012.)

[35] Pfizer 2010. Keuhkosyöpä. <<http://www.syopainfo.fi/eri-syopamuodot/keuhkosyopa.html>>. (Luettu 26.3.2012).

[36] Wiklund, Tom 2010. Uudentyyppisellä täsmähoidolla lupaavia tuloksia ei-pienisoluisen keuhkosyövän hoidossa. Pfizer Oy.  
<<http://www.pfizer.fi/sites/fi/ajankohtaista/tiedotteet/Pages/ei-pienisoluisenkeuhkosyovanhoito.aspx>>. (Luettu 26.3.2012)

[37] Royal Society of Chemistry. Ei päiväystä. Crizotinib. <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.9801307.html> >. (Luettu 4.5.2012).

[38] U.S. Food and Drug Administration 2011. Verkkojulkaisu: FDA approves Xalkori with companion diagnostic for a type of late-stage lung cancer.  
<<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm269856.htm>>. (Luettu 28.2.2012).

[39] Pfizer 2011. Verkkotiedosto.  
<<http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=676>>. (Luettu 28.2.2012).

[40] Pfizer Oncology. 2011. Crizotinib Fact Sheet. Verkkomateriaali  
<[http://www.pfizer.com/files/news/esmo/crizotinib\\_fact\\_sheet.pdf](http://www.pfizer.com/files/news/esmo/crizotinib_fact_sheet.pdf)>. (Luettu 28.2.2012).

- [41] Genetic Home References 2011. ALK. <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ALK>>. (Luettu 28.3.2012).
- [42] Solunetti 2006. Tyrosiinikinaasireseptori. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/tyrosiinikinaasireseptori/3/>>. (Luettu 28.3.2012).
- [43] Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, et al. 1999. Controlling the Cell Proliferation and Death Machinery. Teoksessa Modern Genetic Analysis. W. H. Freeman and Company. New York 1999. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21350/#A2268>>. (Luettu 14.5.2012).
- [44] Pazdur, Richard 2011. FDA Approval for Crizotinib. National Cancer Institute. <<http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-crizotinib>>. (Luettu 29.3.2012).
- [45] Abbot molecular 2012. Hematology Probes. <<http://www.abbottmolecular.com/products/oncology/fish/hematology-probes.html>>. (Luettu 29.5.2012).
- [46] Wisconsin state laboratory of hygiene 2008. FISH: (Fluorescent *In Situ* Hybridization). <<http://www.slh.wisc.edu/cytogenetics/procedures/fish/index.dot>>. (Luettu 29.5.2012).
- [47] Haimovich, Adrian. D 2011. Methods, Challenges, and Promise of Next-Generation Sequencing in Cancer Biology. Yale Journal of Biology and medicine. 2011 Vol 84, s.439–336.<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3238319/?tool=pubmed>>. (Luettu 19.4.2012).
- [48] Meyerson, Matthew – Gabriel, Stacey – Gets, Gad 2010. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. Nature Review Genetics. 2010 Vol 11, s.685–694. <<http://www.nature.com/nrg/journal/v11/n10/full/nrg2841.html>>. (Luettu 19.4.2012).
- [49] Sarhadi, Virinder 2012. Targeted Next Generation Sequencing: clinical application in NSCLC management. Suullinen tiedonanto. 3.2.2012.
- [50] Hokkanen, Emmi – Tikkanen, Milja. EML4-ALK-fuusio-onkogeenin osoittaminen parafiinileikkeestä FISH-menetelmän avulla adenokarsinooman diagnostiikassa. Opinnäytetyö Metropolia AMK 2011.
- [51] Govindan, Ramaswamy 2011. Hope without hype: EML4-ALK inhibition of treatment of lung cancer. The Lancet 2011. Vol 12. 983-984. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204511702534>>. (Luettu 8.1.2012).
- [52] Mok, Tony S. 2011. Personalized medicine in lung cancer. Clinical oncology 2011. Vol 8. 661-668. <<http://www.nature.com/nrclinonc/journal/v8/n11/full/nrclinonc.2011.126.html>>. (Luettu 9.1)



- [53] Leitch, A.R – Schwarzacher, T. – Jakson, D. – Leitch, I.J. 1994. Microscopy handbooks 27 - *In situ* hybridization. United Kingdom. Bios Scientific Publishers Limited.
- [55] Salo, Helena. 1997. Opit-ympäristön Internetix-materiaali  
<<http://materiaalit.internetix.fi/fi/opintojaksot/5luonnontieteet/biologia/geenitekniikka/hybridisaatio>>. (Luettu 22.2.2012).
- [56] Yhtyneet Medix Laboratoriot Oy. Verkkomateriaali. FISH-menetelmän käyttöalueet kliinisessä diagnostiikassa.  
<[http://www.yml.fi/do.xsp?objectType=complextype&directoryType=simple&parentOID=1127043436\\_595\\_669&complextypeOID=1127109967\\_251\\_1029a&viewType=viewinfo-view&redirect1=%2Fdo.xsp%3FviewType%3Dviewinfoview%26objectType%3Dcomplextype%26directoryType%3Dsimple%26complextypeOID%3D1127043436\\_595\\_669%26SID%3D2BE49E847F4B941A9903](http://www.yml.fi/do.xsp?objectType=complextype&directoryType=simple&parentOID=1127043436_595_669&complextypeOID=1127109967_251_1029a&viewType=viewinfo-view&redirect1=%2Fdo.xsp%3FviewType%3Dviewinfoview%26objectType%3Dcomplextype%26directoryType%3Dsimple%26complextypeOID%3D1127043436_595_669%26SID%3D2BE49E847F4B941A9903)>. (Luettu 22.2.2012).
- [57] Abbot Molecular Inc. 2011. Study Brochure version 1.0. Detection of ALK rearrangements, using use the Vysis ALK Break Apart FFPE FISH Probe Kit, in Finnish lung carcinoma patients.  
<[http://www.abbottmolecular.com/static/cms\\_workspace/pdfs/US/Vysis\\_ALK\\_FISH\\_Probe\\_Kit\\_PI.pdf](http://www.abbottmolecular.com/static/cms_workspace/pdfs/US/Vysis_ALK_FISH_Probe_Kit_PI.pdf)>. (Luettu 22.2.2012).
- [58] Neogenomics 2011. A Rapid, Comprehensive ALK FISH Test for NSCLC Therapy Selection.  
<<http://www.neogenomics.com/alk-rearrangement-in-nsclc.htm>>. (Luettu 14.5.2012)
- [59] Scuster, Stephan C. 2008. Next-generation sequencing transforms today's biology. Nature Methods Vol. 5, s.16–18.  
<<http://www.nature.com/nmeth/journal/v5/n1/pdf/nmeth1156.pdf>>. (Luettu 25.4.2012).
- [60] Dahlö, Martin 2010. Illumina sequencing. Sequencing Technologies teoksessa The UPPNEX book. <<https://www.uppnex.uu.se/uppnex-book/technologies/solexa-sequencing>>. (Luettu 24.4.2012).
- [61] Agilent Tehnologies 2010. SureSelect Target Enrichment for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing Protocol 2010 Version 1.0.  
<[http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/G3360-90020\\_SureSelect\\_Indexing\\_1.0.pdf](http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/G3360-90020_SureSelect_Indexing_1.0.pdf)>. (Luettu 25.4.2012).
- [62] Illumina 2009. Genome Analyzer*IIx* Upgrade Kit.  
<[http://www.illumina.com/documents/products/specifications/specification\\_genome\\_analyzer\\_iix\\_upgrade\\_kit.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/specifications/specification_genome_analyzer_iix_upgrade_kit.pdf)>. (Luettu 14.5.2012).
- [63] Just, Pierre-Alexander –Cases, Aurélie – Audenbourg, Anne – Cessot, Anatole – Pallier, Karine – Danel, Claire – Veache-Lavenu, Marie-Cécilie – Laurent-Puig, Pierre – Terris, Benoît – Blons, Hélène 2012. Histologic subtypes, immunohistochemistry, FISH

or molecular screening for the accurate diagnosis of ALK-rearrangement in lung cancer: A comprehensive study of Caucasian non-smokers. *Lung Cancer* 2012. Vol 76, s. 309-315. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169500211005782>>. (Luettu 11.5.2012).

[64] Koivunen, Jussi – Karppinen, Peppi. 2008. Syöpägenomiprojektit muuttamassa syövän diagnostiikkaa ja hoitoa. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 2008. Vol. 20, s.2291–2993. <<http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo97557.pdf>>. (Luettu 25.4.2012)

[65] Street, James 2011. Crizotinib Is 'Major Breakthrough for Genomic Medicine'. *Medscape Medical News* 2011. <<http://defeatosteosarcoma.org/category/generalcancerresearch/genetic-research-generalcancerresearch/alk/>>. (Luettu 11.5.2012).

[66] Desai, AN – Jere, A 2012. Next-generation sequencing: ready for the clinics? *Clinical Genetics* 2012. Vol 81, s.503-501. <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-0004.2012.01865.x/full>>. (Luettu 7.5.2012).

## **ALK uudelleenjärjestymisen detektointi Vysis ALK Break Apart formaliini fiksoidusta parafiinileikkeestä FISH Probe Kitillä**

### **Parafiinin sulattaminen (Baking)**

1. Sulata näytelasien parafiini Thermo Brite-levyllä 60 °C 2–24 tuntia.
  - Mikäli parafiini ei ole täysin sulanut, nosta lämpötilaa 68 °C:een ja jatka sulatusta, kunnes parafiini on sulanut.

### **Parafiinin poisto ja denaturoituneiden proteiinien hajottaminen**

#### Esivalmistelut

#### Proteasiliuos

- Lisää yksi proteaasi K-putki puskuria sisältävään pulloon. Huuhtele putkea pienellä määrällä puskuria ja lisää liuos pulloon. Sulje pullon korkki ja sekoita liuosta kääntelemällä pulloa hellästi. Kaada proteaasi K-liuos lasikyvettiin ja liuota entsyymi vesihauteessa  $37 \pm 1$  °C:ssa vähintään tunnin ajan. Sulje kyvetin kansi huolellisesti parafiinilla, jotta vältetään puskurin haihtumiselta. Tarkista että entsyymi on liennut puskuriin täysin ennen työn jatkamista.
  - Säilyy päivän

#### Esikäsitteilyliuos

- Kaada Pretreatment Solution pullo (50 ml) kyvettiin ja lämmitä vesihauteessa  $81 \pm 2$  °C:een. Liuoksen on oltava vähintään  $80 \pm 2$  °C kyvetin sisäpuolella.
  - Liuos säilyy päivän

#### Hemo-De

- Kaada kolmeen kyvettiin 50 ml Hemo-De-liuosta. Käytä huoneenlämpöisenä.
  - Liuos säilyy viikon

#### Tislattuvesi

- Kaada kahteen kyvettiin noin 50 ml tislattua vettä.
  - Vaihda jokaisen käyttökerran jälkeen

#### Etanoliliuokset

- Valmista 70 %, 85 % ja 100 % etanolilaimennokset tislattuun veteen. Käytä huoneenlämpöisenä.

- Laimennokset on käytettävä viikon kuluessa. Säilytä tiiviisti suljettuina. Jos etanoliliuokset haihtuvat, laimentuvat tai muuttuvat sameaksi liiallisen käytön vuoksi, valmista uudet laimennokset.

### **Parafiinin poisto Hemo-De-etanolikäsitteilyllä**

2. Upota näytelasit Hemo-De-liuokseen 5 minuuttia
3. Toista käsittely kaksi kertaa
4. Upota lasit 100 % etanolia sisältävään kyvetiin 1 minuuttia
5. Toista käsittely uudessa kyvetissä
6. Kuivaa laseja 2–5 minuuttia (ei välttämätön)

### **Lasien esikäsitteily**

7. Tarkista, että Pretreatment Solutionin lämpötila on  $80 \pm 2$  °C. Upota kahdeksan lasia liuokseen  $12 \pm 3$  minuutiksi. Lasit voidaan asettaa kyvetiin näytteiden takapuolelta vastakkain. Kyvetin päädyissä olevat lasit on asetettava leikepuoli kyvetiin keskustaan päin suunnattuna, jotta liuos huuhtelee näytealuetta paremmin.
8. Huuhtelee laseja tislatussa vedessä 3 minuuttia. Kuivaa ylimääräinen vesi lasien reunoilta käsipyyhkeellä.

### **Denaturoituneiden proteiinien hajottaminen**

9. Upota lasit  $37 \pm 1$  °C Proteaasi K-liuokseen  $20 \pm 2$  minuutiksi.
10. Huuhtelee laseja tislatussa vedessä 3 minuuttia.

### **Hybridisaatio**

11. Upota lasit 70 % etanoliliuokseen 1 minuutiksi.
12. Upota lasit 85 % etanoliliuokseen 1 minuutiksi.
13. Upota lasit 100 % etanoliliuokseen 1 minuutiksi.
14. Kuivaa laseja 2–5 minuuttia valolta suojattuna.
15. Kostuta ThermoBriteen-lämpölevyn sienet tislatussa vedellä. Aseta sienet paikalleen lämpölevyn kannen sisäpuolelle ja tarkista, että levy on puhdas.
16. Aseta ThermoBriteen hybridisaatio-ohjelma: denaturaatiolämpötila (Melt Temp) 73 °C denaturaatioaika (Melt Time) 3 minuuttia, hybridisaation lämpötila (Hyb

Temp) 37 °C ja hybridisaatioaika (Hyb Time) vähintään 14 tuntia ja enintään 24 tuntia.

17. Tästä eteenpäin työvaiheet suoritetaan mahdollisimman vähän valoa sisältävässä ympäristössä, jotta koettimien leimat saadaan pysymään voimakkaina.
18. Lisää 10 µl koetin seosta (Vysis ALK Break Apart FFPE FISH probes) lasille näyteleikkeen päälle ja sulje alue peitinlasilla. Poista ilmakuplat ja levitä seosta koko peitinlasin alueelle.
19. Sulje peitinlasin reunat kumisementillä
20. Aseta lasit Thermobrite-lämpölevylle ja aloita hybridisaatio-ohjelma. Hybridisoi näytelaseja 14–24 tuntia. Huom! Näytelasien pesuprosessi on suoritettava samana päivänä, kun hybridisaatio on valmistunut.

## **Pesuprosessi**

### Esivalmistelut

- Kaada 50 ml Wash Buffer II lasikyvettiin ja lämmitä vesihauteessa  $74 \pm 1$  °C vähintään puoli tuntia.
    - o Säilyy 1 päivän
  - Kaada 50 ml Wash Buffer I kyvettiin. Käytä huoneenlämpöisenä.
    - o Säilyy 1 päivän
21. Irrota näytelaseista kumisementti pinseteillä. Säilytä laseja ThermoBritessä, kunnes lasit menevät pesuprosessiin.
  22. Laita kuusi lasia Wash Buffer I-kyvettiin 2–5 minuutiksi. Voit heiluttaa kyvettä ja raottaa peitinlasia varovasti esimerkiksi skalppelilla, jos peitinlasit eivät irtoa laseista. Vältä liikuttamasta peitinlaseja kudostuhon minimoimiseksi.
  23. Upota lasit välittömästi  $74 \pm 1$  °C Wash Buffer II-liuokseen 2 minuutiksi. Ravista aluksi varovasti 1–3 sekuntia.

## **Hybridisoitujen lasien visualisointi**

24. Kuivaa laseja pimeässä huoneenlämmössä.
25. Lisää 10 µl DAPI-taustaväriä hybridisaatioalueelle

26. Laita peitinlasi.

27. Suorita näytelaseille laaduntarkistus fluoresenssimikroskoopilla neljän tunnin kuluessa tai laita pakastimeen -20 °C. Anna lasien lämpötilan nousta huoneenlämpöiseksi ennen analysoinnin aloittamista.

# FISH-lasien analysointilomake

Programme biomarqueurs émergents - translocation EML4-ALK  
Version 1; November 2010

## APPENDIX B

### SPECIMEN ENUMERATION WORKSHEET

#### Patient Identification

INITIALS PATIENT # SITE # SPECIMEN #

ALK FISH Start Date: \_\_\_/\_\_\_/20\_\_\_(dd/mm/yyyy)

Enumeration Date: \_\_\_/\_\_\_/20\_\_\_(dd/mm/yyyy)

Is this a second enumeration for an equivocal slide? 1. No 2. Yes

Record the signal patterns of 50 Nuclei below.

Specimen Type: \_\_\_\_\_

Nuclei #	# paired signals	# single orange signals	# single green signals	Cell classification	Nuclei #	# paired signals	# single orange signals	# single green signals	cell classification
1	3	-	-		26	3	-	-	
2	1	-	-		27	4	-	-	
3	2	-	-		28	3	-	-	
4	3	1	1	F	29	4	-	-	
5	2	-	-		30	6	-	-	
6	2	-	-		31	2	-	-	
7	2	-	-		32	1	-	-	
8	4	-	-		33	2	-	-	
9	3	-	-		34	4	-	-	
10	1	-	-		35	3	-	-	
11	3	-	-		36	1	-	-	
12	3	-	-		37	5	-	-	
13	1	1	1	F	38	4	-	-	
14	2	-	-		39	2	-	-	
15	2	-	-		40	2	-	-	
16	4	-	-		41	2	-	-	
17	3	-	-		42	4	-	-	
18	4	-	-		43	4	-	-	
19	3	-	-		44	4	-	-	
20	3	-	-		45	2	-	-	
21	4	-	-		46	2	-	-	
22	2	-	-		47	4	1	1	F
23	3	-	-		48	4	-	-	
24	3	-	-		49	3	-	-	
25	2	-	-		50	1	1	1	F

Total number of negative cells	46	Total number of paired signals	171
Total number of positive cells F=4	4	Total number of single orange signals	4
		Total number of single green signals	4

#### INSTRUCTIONS TO INVESTIGATOR:

PLEASE SIGN THE BOTTOM OF THIS FORM AND RETURN THE WHITE AND YELLOW COPY TO ABBOTT MOLECULAR INC.

COMPLETED BY: Aino Wirtanen AND AINO WIRTANEN DATE 9/2/2012 (MM/DD/YYYY)

CONFIDENTIAL MATERIAL - 10

This material is the property of Abbott Molecular and must not be disclosed or used except as authorized in writing by Abbott Molecular

16.2.2012 Neg. Saari

## Menetelmien vertailun tulokset

Sukupuoli	Ikä	ALK FISH tulos	Posit. soluja	Posit. solut (%)	PCR-tulos	Tuumori %	NGS tulokset	NGS sekvenssi analyysi	NGS sekvenssit
Nainen	46	positiivinen	35/50	70	positiivinen	>50	negatiivinen	positiivinen	3 inv.
Mies	71	negatiivinen	2/50	4	-	60	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	72	negatiivinen	2/50	4	-	30	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	57	negatiivinen	0/50	0	negatiivinen	70	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	48	positiivinen	23/50	46	positiivinen	>50	negatiivinen	positiivinen	7 inv.
Nainen	68	negatiivinen	1/50	2	negatiivinen	90	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	44	positiivinen	32/50	64	positiivinen	60	positiivinen	positiivinen	15 inv.
Mies	80	negatiivinen	1/50	2	negatiivinen	~50	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	50	negatiivinen	2/50	4	negatiivinen	~20	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	63	negatiivinen	2/50	4	negatiivinen	~50	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	64	negatiivinen	0/50	0	negatiivinen	~60	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	68	negatiivinen	3/50	6	negatiivinen	~60	negatiivinen	negatiivinen	fuusio ei EML4-ALK
Nainen	65	negatiivinen	5/10	8	negatiivinen	~40	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	64	negatiivinen	6/50	12	negatiivinen	~70	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	61	negatiivinen	3/50	6	negatiivinen	~60	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	63	negatiivinen	3/50	6	negatiivinen	~40	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	56	negatiivinen	0/50	0	negatiivinen	80	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	58	negatiivinen	2/50	4	negatiivinen	~70	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	77	negatiivinen	4/50	8	negatiivinen	50	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	67	negatiivinen	11/100	11	negatiivinen	30	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	66	negatiivinen	0/50	0	negatiivinen	~60	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	65	negatiivinen	0/50	0	negatiivinen	~40	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	67	negatiivinen	1/50	2	negatiivinen	20	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	58	negatiivinen	1/50	2	negatiivinen	~20	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	45	negatiivinen	2/50	4	negatiivinen	~30	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	61	positiivinen	33/50	66	positiivinen	~80	positiivinen	positiivinen	5 inv.
Nainen	75	negatiivinen	8/50	16	negatiivinen	>80	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	82	negatiivinen	4/50	8	negatiivinen	~40	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	50	negatiivinen	4/50	8	negatiivinen	~80	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	63	negatiivinen	4/50	8	negatiivinen	-	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	80	negatiivinen	4/50	8	negatiivinen	-	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	68	negatiivinen	2/50	4	negatiivinen	-	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	53	negatiivinen	4/50	8	negatiivinen	-	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	59	negatiivinen	1/50	2	negatiivinen	-	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	75	negatiivinen	2/50	4	negatiivinen	-	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	61	negatiivinen	2/50	4	negatiivinen	-	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	54	negatiivinen	5/50	10	negatiivinen	-	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	65	negatiivinen	3/50	6	negatiivinen	-	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	62	negatiivinen	1/50	2	negatiivinen	-	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	71	negatiivinen	1/50	2	negatiivinen	-	negatiivinen	negatiivinen	-
Nainen	66	negatiivinen	0/50	0	negatiivinen	-	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	76	negatiivinen	2/50	4	negatiivinen	-	negatiivinen	negatiivinen	-
Mies	59	negatiivinen	4/50	8	negatiivinen	-	negatiivinen	negatiivinen	-