

# **Transkriptomiikkamenetelmien käyttökelpoisuuden vertailu ohitusleikatuilla eteiskammiokatkospotilailla**

Lääketieteen koulutusohjelma

Syventävien opintojen opinnäytetyö

Anna-Reetta Toiviainen

9.3.2026

Turku

Syventävien opintojen opinnäyte

**Koulutusohjelma, oppiaine:** Lääketieteen koulutusohjelma

**Tekijä(t):** Anna-Reetta Toiviainen

**Otsikko:** Transkriptomiikkamenetelmien käyttökelpoisuuden vertailu ohitusleikatuilla eteiskammiokatkospotilailla

**Ohjaaja(t):** Professori Tuomas Kiviniemi

**Sivumäärä:** 24 sivua

**Päivämäärä:** 9.3.2026

Transkriptomiikka on jatkuvasti kehittyvä molekyylibiologian ala, jonka avulla tutkitaan RNA-molekyylien tuotantoa soluissa. Se tarjoaa mahdollisuuden tarkastella solujen toimintaa tietyllä ajanhetkellä ja erilaisissa olosuhteissa, minkä ansiosta transkriptomiikan menetelmät soveltuvat erinomaisesti solujen vasteiden tutkimiseen sekä fysiologisissa että patologisissa tilanteissa. Nämä menetelmät ovatkin vakiinnuttaneet paikkansa etenkin lääkekehityksen, lääketieteellisen tutkimuksen ja bioteknologian aloilla. Menetelmien kehitys, erityisesti siirtymä hybridisaatiopohjaisista teknologioista korkean läpimenon sekvensointimenetelmiin, on merkittävästi monipuolistanut transkriptomiikan käyttömahdollisuuksia. Tämän kehityksen myötä transkriptomiikasta onkin tullut keskeinen työkalu modernissa biotieteessä.

Tämä kirjallisuuskatsaus on osa laajempaa tutkimuskokonaisuutta, joka pyrkii tunnistamaan uuden ensimmäisen asteen eteis-kammiokatkoksen kehittymiseen liittyviä kudosis- ja solutaso- muutoksia sydämen ohitusleikkauksen jälkeen. Tarkastelussa verrataan potilaita, joille AV-katkos kehittyi sydämen ohitusleikkauksen jälkeen, potilaisiin, joilla AV-katkosta ei esiinny pre- tai postoperatiivisesti. Aineistona käytetään leikkauksen yhteydessä kerättyjä jäädytettyjä kudosisnäytteitä. Tämän kirjallisuuskatsauksen tarkoituksena on arvioida ja vertailla eri transkriptomiikan menetelmiä sekä määrittää niiden soveltuvuus edellä mainitun tutkimuksen tarpeisiin.

Tutkielmassa analysoitiin yleisimpiä transkriptomiikan menetelmiä ja selvitettiin niiden käyttökelpoisuutta ennalta määritellyn tutkimusasetelmaan. Tulokseksi saatiin, että tumasekvensointi on kyseisessä kontekstissa käyttökelpoisen sen sopiessa jääleikkeille ja ollen hyvä hypoteesia generoivan tutkimuksen kontekstissa. Tumasekvensoinnissa menetetään kuitenkin spatiaalisen sekvensoinnin mahdollistama paikkaan liittyvä informaatio. Lisäksi etenkin tumien eristäminen on kuitenkin menetelmän haasteena.

**Avainsanat:** transkriptomiikka, sekvensointi

## **Sisällys**

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Solun toiminta</b>	<b>5</b>
2.1	DNA:n rakenne ja geeniekspressio	5
2.2	RNA:n rooli solussa	5
<b>3</b>	<b>Transkriptomiikka</b>	<b>8</b>
3.1	Johdanto transkriptomiikkaan	8
3.2	Käyttökohteet	9
<b>4</b>	<b>Transkriptomiikkamenetelmiä</b>	<b>10</b>
4.1	DNA-mikrosirutekniikka	10
4.2	Bulkki-RNA-sekvensointi	11
4.3	Yksisolu- ja tumasekvensointi	12
4.4	Spatiaalinen transkriptomiikka	14
<b>5</b>	<b>Pohdinta</b>	<b>17</b>
5.1	Tutkimuksessa käytetty aineisto	17
5.2	Transkriptomiikkamenetelmän valinnasta	18
5.3	Tumasekvensointimenetelmän haasteita tutkimuksen kontekstissa	19
	<b>Lähteet</b>	<b>21</b>

## 1 Johdanto

Transkriptomiikka on mielenkiintoinen ja alati kehittyvä molekyylibiologian ala, joka tutkii RNA-molekyylien tuotantoa soluissa. Sen avulla voidaan muun muassa selvittää, miten solut reagoivat erilaisiin stressitilanteisiin, ja tämä onkin mullistanut solujen geneettisen säätelyn tutkimuksen. Transkriptomiikkaa hyödyntämällä voidaan myös muun muassa identifoida tiettyihin tautitiloihin liittyviä biomarkkereita, selvittää sairauden ennustetta ja arvioida lääkkeiden terapeuttista vastetta. Sillä onkin siis nykyään keskeinen rooli niin lääketieteellisen tutkimuksen, lääkekehityksen kuin maatalousteollisuudenkin saralla. Eri transkriptomiikan menetelmien ymmärtäminen onkin tärkeää modernille tutkijalle. Lisäksi kaupalliset sovellutukset ovat tuoneet eri menetelmät myös jokaisen tutkijan saataville. Transkriptomiikan kehityksen myötä myös menetelmien kirjo on kasvanut vuosien saatossa. (Wang ym. 2009, Abdi ym. 2024.)

Tämä kirjallisuuskatsaus on osana laajempaa tutkimuskokonaisuutta, jonka tarkoitus on selvittää soluja kudostason eroja uuden 1. asteen eteis-kammiokatkoksen (AV-katkoksen) kehittymisen yhteydessä ohitusleikatuilla potilailla. Tutkimusasetelmassa verrataan keskenään kahta potilasryhmää: niitä, joille kehittyy uusi AV-katkos postoperatiivisesti, sekä niitä, joilla AV-katkosta ei esiinny ennen toimenpidettä eikä sen jälkeen. Aineistona hyödynnetään leikkauksen yhteydessä kerättyjä jäädytettyjä kudoksenäytteitä. Tämän kirjallisuuskatsauksen tavoitteena on arvioida eri transkriptomiikan menetelmien soveltuvuutta tähän tutkimusasetelmaan.

AV-katkokset ovat joukko sydämen sähköisen impulssin etenemisen häiriöitä, jotka voivat altistaa esimerkiksi rytmihäiriöille. Näistä ensimmäisen asteen katkosta on aiemmin pidetty viattomana häiriönä, ja siksi se on jäänyt tutkimusrintamalla korkeamman asteen katkosten jalkoihin. (Airaksinen ym. 2016, Kwok ym. 2016.) AV-katkosten ja ohitusleikkauksien välinen yhteys on jo pitkään tunnistettu, mutta pidempikestoisista leikkauksenjälkeisistä AV-katkoksista ei ole juurikaan tutkimustietoa. Tämantyyppisten katkosten ilmaantumisen syystä tai ennusteesta ei niin ikään ole kattavaa käsitystä. Syitä on tarkoitus selvittää edellä mainitun potilasryhmän ohitusleikkauksen yhteydessä kerätyistä kudoksenäytteistä transkriptomiikan keinoin. Tämä kirjallisuuskatsaus on rajattu yleisimmin käytössä oleviin transkriptomiikan menetelmiin.

## 2 Solun toiminta

### 2.1 DNA:n rakenne ja geeniekspressio

Jokainen ihminen koostuu aiotumaisista soluista, eukaryooteista, ja jokaisen eukaryootin tumassa on tallentuneena koko perimäaines DNA- eli deoksiribonukleiinihappomuodossa. DNA on kaksijuosteinen molekyyli, joka koostuu kahdesta polymeeriketjusta. Polymeeriketjut puolestaan koostuvat neljästä erilaisesta nukleotidista, joista käytetään lyhenteitä A, T, C ja G, ja kaksi tällaista polymeeriketjua liittyvät toisiinsa vetysidoksin. Jokainen nukleotidi koostuu kahdesta osasta: fosfaattiosaan liittyneestä deoksiriboosi-sokerista sekä emäsosasta, joka voi olla adeniini, tymiini, sytosiini tai guaniini. Nämä nukleotidit muodostavat siis tietynlaisen, jokaiselle ominaisen emäsjärjestyksen polymeeriketjuun. DNA ei kuitenkaan toimi ainoastaan perimäaineksen varastona, vaan siihen tallentunutta informaatiota käytetään myös ohjaamaan solun toimintaa. Näin ollen informaatiota tulee myös ilmentää, *ekspressoitua*. Ekspression tuotteena syntyy sekä ribonukleiinihappo- (RNA) että proteiinimolekyyliä. Tiettyä DNA:n pätkää, joka koodaa tiettyä proteiinia tai RNA-molekyyliä, kutsutaan geeniksi ja kaikkea solun sisältämää DNA:ta genomiksi. (Alberts ym. 2015.)

RNA- ja proteiinimolekyylien valmistus solussa alkaa solun tumassa transkriptioksi kutsutussa prosessissa, jossa DNA:n emäsjärjestyksen perusteella muodostetaan esiaste-RNA-molekyyli. Esiaste-RNA:ssa on geneettistä informaatiota sisältävät osat, eksonit, kuin myös informaatiota sisältämättömät osat, intronit. RNA-molekyylistä on poistettava intronit silmukoimalla. Silmukoinnin yhteydessä voidaan poistaa myös osa eksoneista, jolloin samasta geenistä voi syntyä useita erilaisia lähetti-RNA-molekyyliä. Silmukoinnin jälkeen RNA kuljetetaan tumasta solulimaan, sytosoliin, lähetti-RNA-muodossa. Sytosolissa se voidaan kuljettaa ribosomin pinnalle, jossa siitä valmistetaan proteiini translaatioksi kutsutussa prosessissa. (Alberts ym. 2015.)

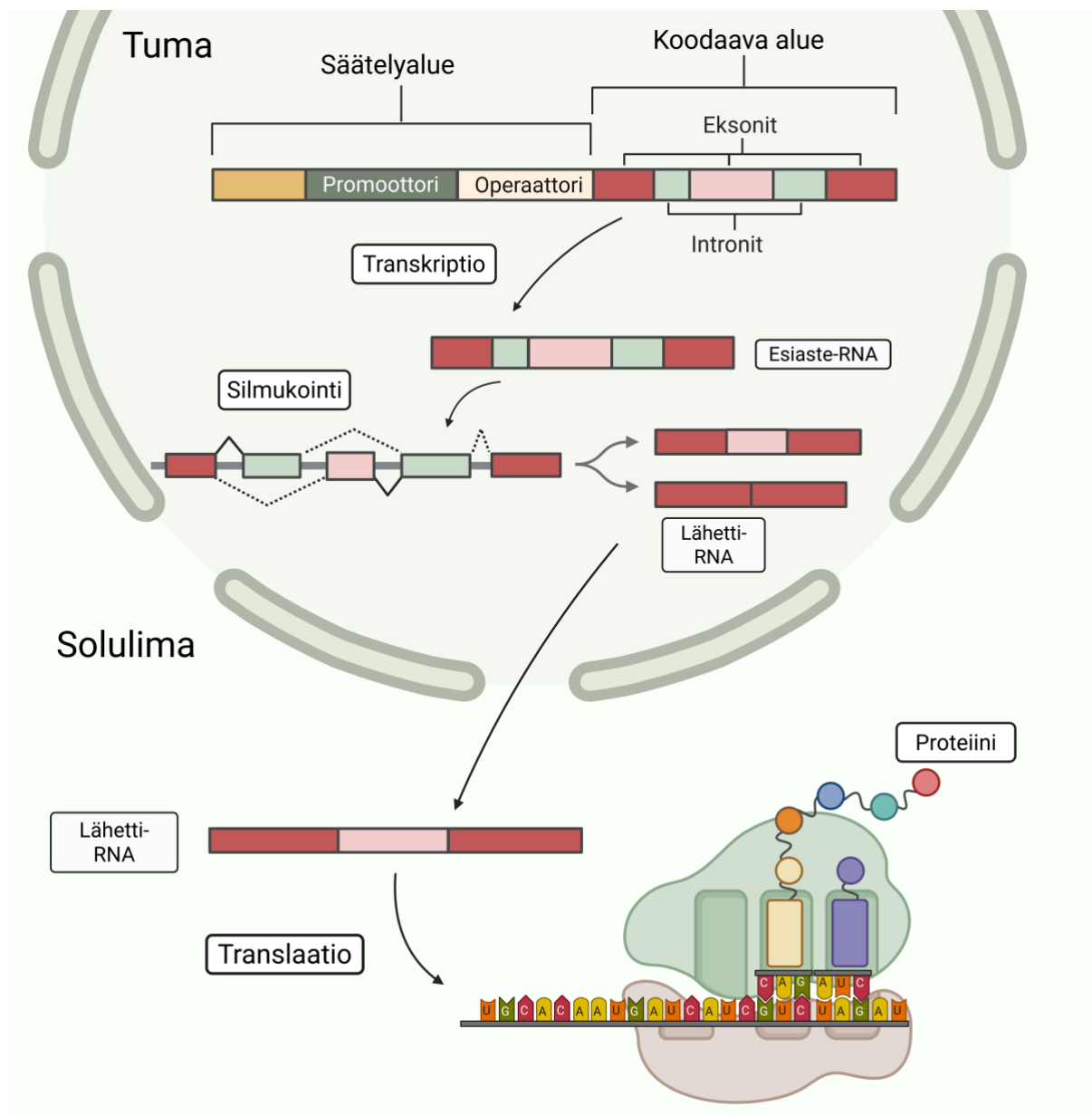
### 2.2 RNA:n rooli solussa

RNA-molekyyli eroaa DNA-molekyylistä siten, että siinä sokeriosana toimii riboosisokeri deoksiriboosin sijaan ja tymiini-emäksen tilalla on urasiili. Toisin kuin DNA:n, RNA:n ei tarvitse säilyä solussa koko sen eliniän ajan, vaan RNA-molekyyliä massatuotetaan solussa useisiin erilaisiin tarkoituksiin. RNA-transkripti, eli transkriptiossa tuotettu RNA-molekyyli, voi toimia lukuisissa tehtävissä, joista kaikkia ei vielä tunneta. Tyypillisesti RNA:t jaotellaan proteiinia koodaaviin ja proteiinia koodaamattomiin RNA-molekyyliihin. Proteiinia koodaava RNA-tyyppi on lähetti-RNA (*messenger RNA*, mRNA), joka välittää DNA:sta peräisin olevan geneettisen informaation ribosomille.

Sen sisältämän informaation pohjalta syntetisoidaan translaatiossa proteiini. (Alberts ym. 2015.)  
Suurinta osaa solun RNA:sta ei kuitenkaan käännetä proteiineiksi (Schmauch 2024).

Proteiinia koodaamattomia RNA-molekyylejä ovat esimerkiksi siirtäjä-RNA (transfer RNA, tRNA), ribosomaalinen RNA (*ribosomal RNA*, rRNA), pitkä, ei-koodaava RNA (*long noncoding RNA*, lncRNA) sekä mikro-RNA (*microRNA*, miRNA). Siirtäjä-RNA:n tehtävänä on kuljettaa aminohappo translaatiossa ribosomille. Ribosomi, jonka pinnalla proteiinisynteesi tapahtuu, vuorostaan koostuu ribosomaalisesta RNA:sta. Pitkä, ei-koodaava RNA (*long non-coding RNA*, lncRNA) taas säätelee geeniekspressiota monin tavoin ja mikro-RNA puolestaan osoittaa tiettyjä lähetti-RNA-molekyylejä hajotettavaksi tai estää niiden translaation. Kaikkia solussa tietyllä ajanhetkellä tai tietyissä olosuhteissa olevia RNA-molekyylejä kutsutaan transkriptomiksi. Transkriptomi siis kuvastaa solun toimintaa tietyllä ajanhetkellä tai tietyissä olosuhteissa. (Alberts ym. 2015, Raghavachari ym. 2018.)

Solun valmistamat proteiinit vaikuttavat siihen, millainen ilmiasu, *fenotyyppi*, tietyllä solulla on. Proteiinituotantoon vaikutetaan geeniekspression säätelyn keinoin. Geeniekspression säätelyllä on keskeinen rooli esimerkiksi solun erilaistumisessa ja sopeutumisessa ympäristöönsä. Säätelymekanismeja on useita. Tuotantoa voidaan säädellä muun muassa transkription aloituksen tasolla transkriptiotekijöiden välityksellä, RNA:n silmukoinnissa, mRNA:n kuljetuksessa tumasta sytoplasmaan sekä translaation eston tai translaation jälkeisten proteiiniin tehtävien muokkausten kautta. Lisäksi epigeneettinen säätely vaikuttaa solun fenotyyppiin. Geeniekspression säätely vaikuttaakin soluihin eri tavalla esimerkiksi sairaustiloissa, ja siksi se on erityisen houkutteleva tutkimuskohde juuri lääketieteen alalla. (Raghavachari ym. 2018.)



Kuva 1. Solun proteiinituotannon ensimmäisessä vaiheessa, transkriptiossa, tumassa tuotetaan esiaste-RNA:ta, joka tämän jälkeen silmukoidaan lähetti-RNA:ksi. Valmis lähetti-RNA kuljetetaan tumasta solulimaan, jossa siitä valmistetaan ribosomin pinnalla proteiini translaatioissa. Kuva luotu käyttämällä BioRenderiä, <https://BioRender.com>.

## 3 Transkriptomiikka

### 3.1 Johdanto transkriptomiikkaan

Transkriptomiikka on molekyylibiologian ala, joka tutkii RNA-molekyylien tuotantoa soluissa. Selvittämällä solun transkriptomi voidaan jäljittää esimerkiksi eri tavalla ilmentyneitä geenejä, vaihtoehtoisia silmukointitapahtumia, ei-koodaavaa RNA:ta ja muita erilaisia solun säätelyyn vaikuttavia tekijöitä, ja nämä taas auttavat ymmärtämään paremmin solun biologisia prosesseja. Solun transkriptomi heijastaa solun ekspressoimia geenejä tietyissä olosuhteissa ja ajanhetkessä, joten se on myös altis ulkoisille häiriöille. Tutkimuksissa voidaankin myös selvittää solun tuottamien transkriptien ilmentymistasojen muutosta sekä kehityksen aikana että myös eri olosuhteissa. (Wang ym. 2009, Abdi ym. 2024.) Transkriptomin selvittämiseksi on kehitetty useita menetelmiä aina hybridisaatiopohjaisista sekvenssiperusteisiin (Wang ym. 2009).

Transkriptejä on tutkittu jo kauan ennen kuin varsinaisia transkriptomiikan menetelmiä on ollut saatavilla. Tutkimusten tavoitteena oli tunnistaa geenit, jotka aktivoituvat tai vaimenevat eri olosuhteissa. 1980-luvulla otettiin käyttöön matalan kapasiteetin Sanger-sekvensointi, jonka avulla vastin-DNA-kirjastoista pystyttiin poimimaan ja sekvensoimaan satunnaisia transkriptipätkiä EST-kirjastoksi (expressed sequence tag). EST on siis lyhyt nukleotidisekvenssi, joka valmistetaan RNA-transkriptin pohjalta ja jonka avulla voidaan määrittää aktiivisesti ekspressoituja geenejä tietyssä kudoksessa tai solutyypissä. (Lowe ym. 2017, Sharma ym. 2025.)

Sangerin sekvensointimenetelmän jälkeen käyttöön tulivat korkeamman kapasiteetin menetelmät, kuten northern blot -menetelmä ja nailonkalvo-mikrosirumenetelmä sekä hieman myöhemmin myös kvantitatiivinen käänteiskopiointi -PCR (reverse transcriptase quantitative PCR, RT-qPCR). Myös EST-menetelmän suosio kasvoi 1990-luvulla, sillä sen avulla pystyttiin määrittämään organismin geenisisältö ilman koko genomien sekvensointia. Nämä menetelmät olivat kuitenkin työläitä ja lisäksi niiden avulla pystyttiin keräämään vain pieni osa transkriptomista. (Lowe ym. 2017.)

Vuonna 1995 kehitettiin yksi ensimmäisistä sekvensointipohjaisista transkriptomiikan menetelmistä, serial analysis of gene expression (SAGE) (Lowe ym. 2017). Se on korkean kapasiteetin sekvensointimenetelmä, jossa yhdistyvät mikrosiruteknologian ja hybridisaation periaatteet. Menetelmässä mRNA-molekyyleistä eristetään lyhyitä, muutaman nukleotidin oligonukleotidisekvenssejä, joita kutsutaan SAGE-tägeiksi, Nämä tägit toimivat tunnisteina, joiden avulla voidaan identifioida solun tuottamien geenien transkriptit. Tägit liitetään ensin peräkkäin, ja sen jälkeen ne sekvensoidaan. Näin saadaan selville, mitä geenejä solu ilmentää kyseisellä hetkellä ja kuinka paljon. (Sharma ym. 2025.)

1990-luvun puolivälin jälkeen käytetyimmäksi teknologiaksi nousi mikrosirutekniikka, joka mahdollisti näytteen analysoinnin koko genomin laajuudella. Mikrosirutekniikan jälkeen suosiota on saavuttanut RNA-sekvensointi, joka nykyään onkin käytetyin analyysimenetelmä. RNA-sekvensointi mahdollistaa koko genominlaajuisen tarkastelun mukaan lukien mRNA:t, silmukointivariantit sekä pitkät ei-koodaavat RNA:t. Tämän ansiosta RNA-sekvensointi tunnistaa eri tavoin ilmentyneet geenit useista. (Raghavachari ym. 2018.)

### 3.2 Käyttökohteet

Transkriptomiikalla on monenlaisia käyttökohteita ja sillä onkin paikkansa niin lääketieteessä, lääketeollisuudessa, bioteknologiassa kuin maatalousteollisuudessaakin. Lääketieteen alalla transkriptomiikasta on apua sairauksien patogeneesin määrittämisessä. Sen avulla voidaan esimerkiksi tunnistaa biomarkkereita, joiden perusteella voidaan pyrkiä ennustamaan sairauden kulkua tai havaita sairaus jo sen oireettomassa vaiheessa. (Abdi ym. 2024.)

Läketeollisuudessa transkriptomiikkaa käytetään mm. lääkkeiden turvallisuusprofiilin arvioinnissa, lääkkeiden terapeuttisen vasteen arvioinnissa, potentiaalisten lääkevaikutuskohteiden etsinnässä sekä lääkkeen suunnitellun vaikutuskohteen ulkopuolisten eli *off-target*-vaikutusten havaitsemisessa. (Wang ym. 2009, Abdi ym. 2024.)

Bioteknologian alalla transkriptomiikalla sen sijaan on paikkansa esimerkiksi geenien muokkauksessa, jolloin transkriptomiikan keinoin voidaan selvittää esimerkiksi tiettyjä säätelygeenejä ja -reittejä, joilla potentiaalisesti voisi olla merkitsevä rooli geenieditoinnissa. Maatalousteollisuudessa transkriptomiikkaa voidaan käyttää esimerkiksi sellaisten geenien etsinnässä, jotka tekevät kasvista tuottavamman tai kestävämmän. (Abdi ym. 2024.)

## 4 Transkriptomiikkamenetelmiä

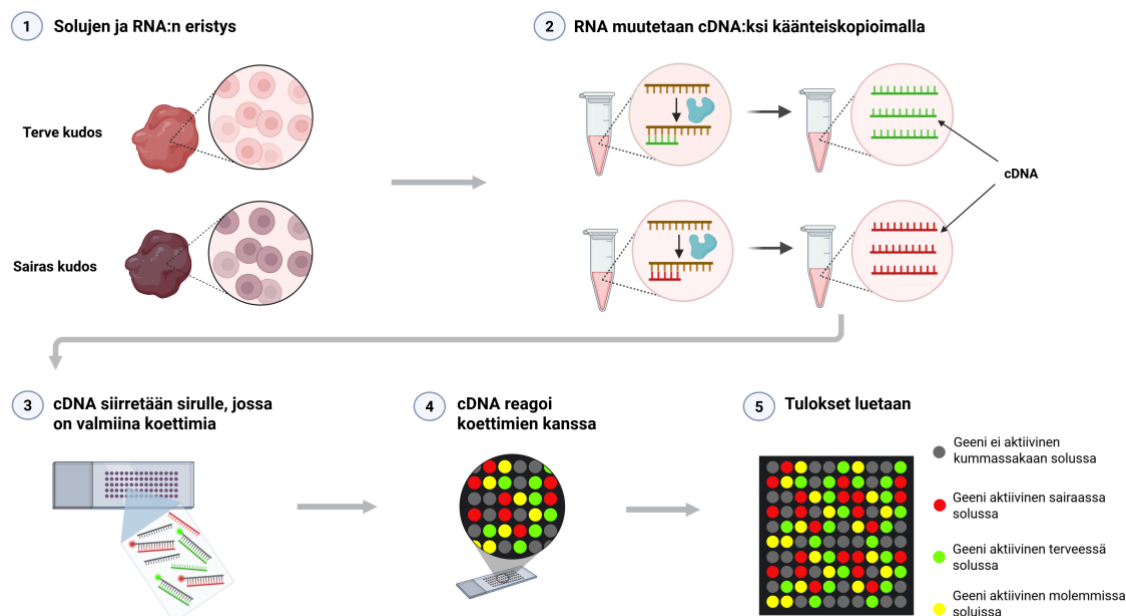
Transkriptomiikan tutkimuksien menetelmiä on useita. Tässä kappaleessa esitellään neljä erilaista nykyään käytössä olevaa menetelmää, joista osaan sisältyy hybridisaatiotekniikkaa ja osa on täysin sekvenssipohjaisia.

### 4.1 DNA-mikrosirutekniikka

DNA-mikrosirutekniikka (*microarray*) on historiallisesti runsaasti käytetty menetelmä, jonka takia sen ymmärtäminen on keskeistä modernimpien transkriptomiikan menetelmien ymmärtämisen kannalta. Menetelmä mahdollistaa koko genominlaajuisen informaation keräämisen ja sen avulla pystytäänkin tutkimaan tuhansia geenejä samanaikaisesti. Tekniikkaa hyödyntämällä voidaan esimerkiksi vertailla terveen ja sairaan kudoksen välistä geeniekspressiota tai tunnistaa myös yhden nukleotidin polymorfismit (*single nucleotide polymorphism, SNP*) sekä havaita kromosomien kopiolumuutoksia. (Sharma ym. 2025.)

DNA-mikrosirutekniikan menetelmiä on useita. Yhtenä esimerkkinä on oligonukleotideja sisältävä mikrosiru, johon on kiinnitetty lyhyitä oligonukleotidikoettimia, jotka ovat komplementaarisia tutkimuksen kohteena oleville transkripteille. Tutkittavasta solu- tai kudoksenäytteestä eristetään RNA, joka merkitään fluoresoivalla väriaineella ja tämän jälkeen siirretään mikrosirulle, jossa transkriptipätkät pariutuvat niitä vastaavan koettimen kanssa. Tämän jälkeen siru pestään ja skannataan laserilla. Vastinpariinsa sitoutuneet koettimet saadaan nähtäville ja geeniekspressio todetaan fluoresoivan valon intensiteetin perusteella. (Malone ym. 2011.)

DNA-mikrosirutekniikan heikkoutena kuitenkin on, että se vaatii ennakkotietoa geenin rakenteesta, jotta koettimet voidaan suunnitella. Tämän seurauksena erilaiset transkriptin muutokset pienistä alleelitason vaihteluista isompiin muutoksiin saattavat jäädä havaitsematta. (Malone ym. 2011.) Tyypillisesti etenkin ei-koodaavat RNA:t, joita solun ei tiedetä ilmentävän, jäävät huomaamatta. Toisaalta on myös havaittu, että koettimeen voi sitoutua myös muita kuin haluttuja geenejä, mikäli niiden sekvenssi tietyssä kohdassa on riittävän yhteneväinen tutkittavana olevan geenin kanssa. Näin voi käydä esimerkiksi sellaisten geenien kohdalla, joilla on perinteisesti useita silmukointivaihtoehtoja. (Bolón-Canedo ym. 2019.)



Kuva 2. DNA-mikrosirutekniikan avulla voidaan suorittaa vertailevaa tutkimusta terveeseen ja sairaan kudoksen välillä. Ensinnäkin kudoksesta eristetään solut ja tämän jälkeen soluista eristetään RNA. Seuraavaksi RNA muutetaan cDNA:ksi käänteiskopioimalla ja merkitään fluoresoivalla väriaineella. cDNA-materiaali siirretään mikrosirulle, jossa on valmiina oligonukleotidikoettimia. Koettimet pariutuvat cDNA-juosteiden kanssa ja tulokset luetaan fluoresoivan valon intensiteettiä hyödyntäen. Sairaassa ja terveessä kudoksen geeniekspressio näyttyy eri värein ja lisäksi pystytään selvittämään myös, mitä genejä molemmat kudokset ekspressoivat yhdessä. Kuva luotu käyttämällä BioRenderiä, <https://BioRender.com>.

## 4.2 Bulkki-RNA-sekvensointi

Bulkki-RNA-sekvensoinnin avulla voidaan tarkastella tietyn solupopulaation tai kudoksen geenien keskimääräistä ilmentymistä hyödyntämällä uuden sukupolven sekvensointitekniologiaa (*Next-Generation Sequencing* (NGS)) (Hyeongseon ym. 2023). Kuten DNA-mikrosirutekniikalla, myös bulkki-RNA-sekvensoinnilla voidaan vertailla terveeseen ja sairaan kudoksen välisiä eroja (Hegenbarth ym. 2022). Menetelmä ei kuitenkaan mahdollista yksittäisten solujen geeniekspression analysointia. (Kalantari-Dehaghi ym. 2026). Bulkki-kokeiden tavoitteena on tyypillisesti tunnistaa eri tavoin ilmentyneitä genejä eri koeolosuhteiden välillä (Hyeongseon ym. 2023). Näyttemateriaaleina voidaan käyttää niin tuorekudosta, parafiinin valettua kudosta kuin jääleikkeitäkin, ja yleisesti ottaen vähäinenkin RNA-määrä on riittävä tulosten aikaansaamiseksi (Hegenbarth ym. 2022).

Bulkki-sekvensointia varten RNA eristetään ensin tutkittavasta solu- tai kudospopulaatiosta. Vaikka koko transkriptomi onkin mahdollista sekvensoida, on yleensä tapana poistaa kokonais-RNA:sta ainakin ribosomaaliset RNA-transkriptit, sillä ribosomaalinen RNA on soluissa yliedustettuna ja näin ollen riskinä on, että se on yliedustettuna myös sekvenssidatassa harvalukuisempien RNA-tyyppien kustannuksella. Lisäksi on kehitetty erilaisia protokollia tiettyjen RNA-tyyppien rikastamiseksi

näytteistä. Esikäsitelyn jälkeen RNA käänneiskopioidaan cDNA:ksi ja siitä rakennetaan cDNA-kirjasto sekvensointia varten. Lopuksi kirjasto sekvensoidaan ja tulokset käsitellään. (Hegenbarth ym. 2022.)

Bulkki-RNA-sekvensointimenetelmien rajoitteena on, ettei niiden tuottamaa tietoa voida käytännössä yleistää yksittäisen solun tasolle, sillä analyysi perustuu useiden solujen keskimääräiseen geeniekspressioon. Menetelmä ei siis pysty havaitsemaan esimerkiksi sydänkudoksen sisäistä, solujen välistä heterogeenisyyttä. Lisäksi RNA:n eristäminen ja mahdolliset näytteenkäsitelyvaiheet- altistavat RNA:n hajoamiselle, sillä yksijuosteinen RNA on epävakaa rakenne. Usein suositellaankin arvioimaan RNA:n laatua ennen varsinaisen kokeellisen työn aloitusta. Tähän tarkoitukseen yleisimmin käytetty työkalu on RNA-integriteettinumero (*RNA integrity number, RIN*). (Hegenbarth ym. 2022, Nguyen ym. 2025.)

### 4.3 Yksisolu- ja tumasekvensointi

Yksisolusekvensointi (*Single-cell RNA sequencing, scRNA-seq*) mahdollistaa edellä mainituista menetelmistä poiketen yksittäisen solun koko transkriptomin selvittämisen pelkän kudostason tarkastelun sijaan. Yksittäisten solujen transkriptomien avulla voidaan muodostaa kuva solupopulaatiosta kyseisessä näytteessä. (Schmauch 2024.)

Käytössä on useita erilaisia menetelmiä, mutta niille kaikille on yhteistä se, että ensin solut irrotetaan ja eristetään kudoksesta. Tämän jälkeen edetään menetelmästä riippuvien välivaiheiden kautta, kunnes lopulta päädytään sekvensointiin. (Yuan ym. 2024.) Pisarapohjainen (*droplet-based*) tekniikka on yksi yleisesti käytetty menetelmä. Siinä yksittäiset solut suljetaan vesipohjaisiin, öljyfaasin ympäröimiin pisaroihin. Jokaisen pisaran sisällä on lisäksi pieni helmi, joka sisältää joukon yksilöllisiä tunnisteita; yleensä mRNA:n poly-A-häntään<sup>1</sup> sitoutuvan oligonukleotidipätkän, viivakoodeja kirjaston tunnistamiseen, solun tunnistamiseen sekä solun yksittäisten transkriptien tunnistamiseen, joista viimeistä kutsutaan myös UMI:ksi (*Unique Molecular Identifier*). Pisaran sisällä oleva solu hajotetaan, jolloin mRNA:lle komplementaariset oligonukleotidialukkeet tarttuvat mRNA:n poly-A-häntiin. Näin mRNA saadaan tunnistettua ennen käänneiskopiointia. (Potter 2018, Schmauch 2024.) Seuraavaksi mRNA käänneiskopioidaan cDNA:ksi menetelmästä riippuen joko pisaran sisällä tai sen ulkopuolella. Helmen sisältämät tunnisteet säilyvät cDNA:ssa, koska ne sisältyvät syntetisoituun juosteeseen. Seuraavaksi cDNA-fragmentit monistetaan, jotta sekvensointia varten saadaan riittävästi materiaalia. Monistamisen jälkeen materiaali kootaan kirjastoksi, jonka jälkeen se sekvensoidaan NGS-

---

<sup>1</sup> Poly(A)-häntä on mRNA:ssa ja lncRNA:ssa oleva RNA:ta stabiloiva nukleotideista koostuva rakenne, joka liitetään solussa näihin RNA- molekyyliin post-transkriptionaalisesti (Liu ym. 2019).

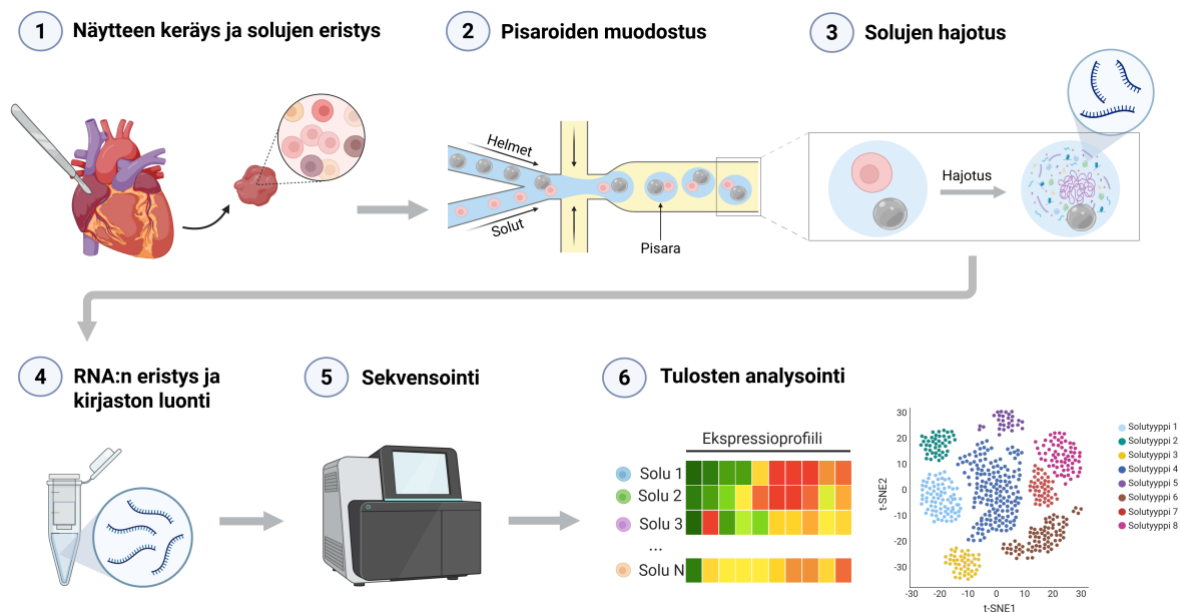
menetelmää käyttäen. Lopputuloksena kullekin yksittäiselle solulle saadaan oma transkriptomiprofiili. (Potter 2018.)

Yksisolusekvensoinnin haasteena on, että sen ensimmäiset vaiheet - näytteen valmistelusta solujen eristämisen kautta RNA:n talteenottoon - ovat herkkiä. Solutason muutokset, joihin myös transkriptionaaliset muutokset sisältyvät, alkavat heti organismin kuollessa ja syvenyvät minuuttien tai tuntien kuluessa. RNA-synteesi pysähtyy, mikä johtaa havaittavissa olevien transkriptien määrän vähenemiseen. Lisäksi syntyy erilaisia transkriptionaalisia muutoksia, kuten solun stressivasteisiin liittyvää geenien inaktivaatiota, silmukoinnin häiriöitä sekä kudosspesifistä vaihtelua mitokondriaalisen RNA:n määrässä. Lisäksi haavoittuvaisimmat solut ajautuvat apoptoosiin. Näin ollen yksisolusekvensointi on altis aikaviiveiden aiheuttamille muutoksille. Samankaltaisia ajasta riippuvaisia muutoksia on raportoitu myös eri soluneristysprotokollien välillä esimerkiksi käytettyjen hajotusentsyymien sekä inkubaatiolämpötilojen osalta. Myös solujen ja kudosten sisäisillä ominaisuuksilla on vaikutusta dissosiaatiovaiheen solukoostumukseen ja näin ollen jatkoanalyysien tuloksiin. Esimerkiksi fibroblastit ovat luonnostaan adherentteja, eli ne kiinnittyvät tiukasti kasvualustansa, mikä vaikeuttaa niiden talteenottoa analyysejä varten. Lisäksi suuret solut, kuten makrofagit ja adiposyytit, voivat puolestaan suodattaa pois eristysvaiheessa, eivätkä näin ollen päädy sekvensoitavaksi. Myös luonnostaan lyhytikäiset solut, kuten neutrofiilit, voivat jäädä havaitsematta. On myös huomioitava, että kudoksissa esiintyvät endogeeniset yhdisteet, kuten haimaentsyymit tai mahahapot, voivat hajottaa soluja ja pilkkoa RNA:ta käsittelyn aikana. (Gulati ym. 2025.)

Yksisolusekvensoinnin sijaan voidaan käyttää myös tumasekvensointia (single-nuclei RNA sequencing, snRNA-seq). Se toimii samalla periaatteella kuin yksisolusekvensointi, mutta solujen sijaan näytteestä eristetään tumat. (Schmauch 2024.) Tumasekvensoinnissa voidaan käyttää tuorekudosten lisäksi myös jääleikkeitä. On kuitenkin tärkeä huomioda, että menetelmän avulla ei saada tietoa solulimassa sijaitsevista transkripteista, koska ainoastaan tuman sisäinen RNA siirtyy jatkoanalyysiin. Myös mitoosin aikainen informaatio menetetään, sillä mitoosin aikana tumakotelo hajoaa, jolloin tuman sisältö ei enää eriydy selkeästi. (Gulati ym. 2025.) Tumasekvensoinnin etuna kuitenkin on, että tumien eristäminen on kudoksille lempeämpää (Safabakhsh ym. 2022). Esimerkiksi Wu ym. (2019) havaitsivat yksisoluu- ja tumasekvensointimenetelmiä munuaiskudoksessa vertaillaan, että tumasekvensointi vähensi edellä mainittuja dissosiaatiovääristymiä, kuten dissosiaation aiheuttaman stressivasteen aikaansaamia transkriptiotason muutoksia. Lisäksi he totesivat, että geenien havaitsemisen osalta suorituskyky vastasi yksisolusekvensointia.

On kuitenkin havaittu, että niin tumasekvensointi kuin solusekvensointikin ovat alttiita ympäröivän RNA:n kontaminaatiolle (*ambient RNA contamination*). Esimerkiksi Caglayan ym. (2022) osoittivat tutkimuksessaan, että aivojen tumasekvensointiaineistoissa RNA oli joko tumallista tai ei-tumallista

alkuperää. Esimerkiksi aiemmin esiteltyä pisarapohjaista menetelmää käytettäessä ympäröivät RNA-transkriptit voivat myös päätyä saman pisaran sisälle tutkittavan RNA:n kanssa tai toisaalta vallata kokonaan oman pisaran, jolloin tällainen pisara saatetaan virheellisesti tulkita tuman sisältäväksi ja sisällyttää analyysiin. Ympäröivän RNA:n (ambient RNA) on ajateltu olevan enimmäkseen runsaasti esiintyvistä solutyypeistä peräisin, mikä voi antaa väärän käsityksen erityisesti harvinaisempien solutyypien kohdalla väärinä niiden endogeenistä ilmentymisprofiilia.



Kuva 3. Yksisolusekvensoinnin pisaraperusteista menetelmää käytettäessä kerätystä kudoksenäytteestä eristetään ensin solut ja tämän jälkeen solut ja tunnistekoodit sisältävät helmet ohjataan pisaroihin. Tämän jälkeen solu hajotetaan, jolloin siinä olevat RNA-molekyylit hajotetaan ja käänteiskopioidaan cDNA:ksi. Helmestä peräisin olevat yksilölliset tunnistekoodit ovat osana cDNA:ta. Seuraavaksi luodaan cDNA-kirjasto, joka sekvensoidaan. Tulosten analysoinnissa käytetään tietokonepohjaisia laskentamenetelmiä ja lopputuloksena jokaiselle solulle saadaan transkriptomiprofiili. Kuva luotu käyttämällä BioRenderiä, <https://BioRender.com>.

#### 4.4 Spatiaalinen transkriptomiikka

Spatiaalinen transkriptomiikka kartoittaa kudoksessa eri puolilla esiintyvää geeniekspressiota samalla säilyttäen tiedon solujen alkuperäisestä kudospäristöstä (Zhao ym. 2021). Tämä on tärkeää, sillä yksittäisten solujen erilaistuminen, toiminta sekä säätely ovat sidoksissa niiden vuorovaikutukseen viereisten solujen ja mikroympäristön kanssa. Perinteisessä RNA:n sekvensoinnissa solut irrotetaan kudoksesta, jolloin spatiaalinen geeniekspressiotieto samalla menetetään. Spatiaalisen transkriptomiikan menetelmin tämä paikkakohtainen eli spatiaalinen viitekehys onnistutaan säilyttämään ja näin ollen saadaan selville sekä kudoksen ilmentämät geenit että geeniekspression tarkka sijainti kudoksessa. (Nguyen ym. 2025.) Spatiaalista tekniikkaa hyödynnetään erityisesti

syöpätutkimuksessa ja lääkekehityksessä sekä biomarkkereiden etsimisessä (Robles-Remacho ym. 2023).

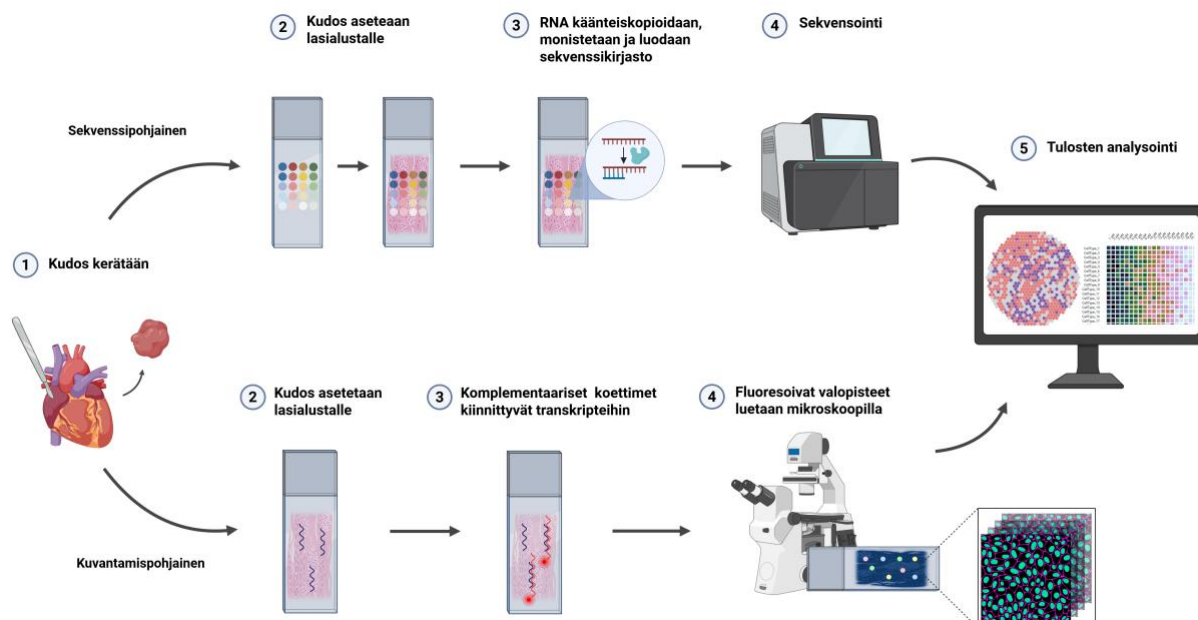
Spatiaalisen transkriptomiikan menetelmät voidaan jakaa Nguyen ym. (2025) mukaan kahteen pääluokkaan: sekvensointipohjaisiin ja kuvantamisohjaisiin menetelmiin. Molemmissa menetelmissä voidaan käyttää jääleikkeitä ja kuvantamisohjaisissa myös tuorekudosta. Kvantamisohjaisten menetelmien perustana käytetään yleisimmin joko *in situ* -hybridisaatiopohjaista (ISH) tai *in situ* -sekvensointipohjaista (ISS) menetelmää. ISH-pohjaisessa menetelmässä kudoksen asetetaan lasialustalle, jonka ennalta määrätyt, komplementaariset fluoresoivat koettimet kiinnittyvät tutkittaviin transkripteihin, jolloin ne nähdään mikroskoopissa valopisteinä ja saadaan tieto tietyn transkriptin sijainnista kudoksessa. Tällaisia hybridisaatiokierroksia voidaan toteuttaa useita peräkkäin suuremman geenimäärän profiloimiseksi. Jokainen hybridisaatiokierros kuitenkin lisää virheiden mahdollisuutta esimerkiksi koettimien epäspesifisen sitoutumisen takia. (Nguyen ym. 2025.)

ISS-pohjaisissa menetelmissä kudoksen RNA käänteiskopioidaan alustalla ensin cDNA:ksi, jonka jälkeen se monistetaan ja ankkuroidaan. Jokainen cDNA-pala jää kudokseen omalle paikalleen. Tämän jälkeen näytettä sekvensoidaan usein fluoresoivien nukleotidien avulla mikroskooppia apuna käyttäen. Lopputulokseksi saadaan tieto kudoksen RNA-molekyyleistä yhdessä niiden paikkatiedon kanssa. (Nguyen ym. 2025.)

Sekvensointipohjaisiakin menetelmiä on useita. Niiden peruseriaatteena on se, että kudoksen RNA:n sijainti näytelasilla merkitään joko esimerkiksi spatiaalikoodeilla tai käytetään suoraan spatiaalikoodeilla merkittyä lasia. RNA-molekyylit tarttuvat ”viivakodeihin” ja jäävät paikoilleen. Tämän jälkeen RNA-molekyylit käänteiskopioidaan cDNA:ksi ja sekvensoidaan. Sekvensointi mahdollistaa koko transkriptomin profiloinnin ja spatiaalikoodeilla ilmoittaa RNA:n sijainnin kudoksessa, vaikka itse sekvensointi ei tapahdukaan enää näytelasilla. Sekvenssi- ja kuvantamisohjaisia menetelmiä voidaan myös yhdistää. (Nguyen ym. 2025.)

Siihen, valitaanko kuvantamisohjainen vai sekvensointipohjainen menetelmä, vaikuttaa se, onko tutkimus hypoteesia testaava vai hypoteesia tuottava. Kvantamisohjainen menetelmä sopii hypoteesia testaavaan tutkimukseen, koska sopivien koettimien valmistus vaatii etukäteistietoa kohdegeeneistä. Hypoteesia generoivaan tutkimukseen sen sijaan sopii sekvensointipohjainen menetelmä. Kvantamisohjaisten menetelmien etuna on usein suurempi herkkyys sekä parempi resoluutio. Resoluutio kuvaa siis sitä, kuinka tiheästi transkripteja saadaan lasille pinta-alaa kohden. Tyypillisesti sekvenssipohjaisissa menetelmissä jokainen spatiaalinen koodin sisältävä kohta tai helmi voi kerätä RNA:ta useamman solun alueelta. Sekvenssipohjaisissa menetelmissä resoluutio on kuitenkin parantunut lähes yhden solun tasolle parhaissa kaupallisissa alustoissa. Lisäksi

sekvenssipohjaiset menetelmät kattavat koko transkriptomin, kun kuvantamispohjaiset tarkastelevat vain osia siitä. Kvantamispohjaisissa menetelmissä on myös huomioitava tavoitteena olevien profiloitavien geenien määrä. (Nguyen ym. 2025.)



Kuva 4. Sekä sekvenssi- että kuvantamispohjainen spatiaalisen transkriptomiikan menetelmä aloitetaan kudoksenäytteen keruusta. Kvantamispohjaisessa (tässä ISH) menetelmässä kudos asetetaan lasialustalle, jossa on valmiina etukäteen määriteltäviä fluoresoivia koettimia. Koettimet sitoutuvat kohdetranskripteihin, jolloin ne tulevat näkyviin mikroskoopissa valopisteinä. Valopisteet kertovat tietyn transkriptin sijainnista tietyssä kohdassa kudosta. Mikäli halutaan profiloida suurempi geenimäärä, voidaan hybridisaatiokierroksia toteuttaa useita peräkkäin. Sekvenssipohjaisessa menetelmässä taas kudos asetetaan spatiaalikoodeja sisältävälle lasille (tässä kuvassa). RNA-molekyylit tarttuvat spatiaalikoodeihin, jonka jälkeen ne muutetaan cDNA:ksi, luodaan sekvenssikirjasto ja sekvensoidaan näyte. Tämän jälkeen tulokset tulkitaan tietokonepohjaisia laskentamenetelmiä apuna hyödyntäen. Tulokseksi saadaan sekä transkriptomiprofiili että RNA:n sijainti kudoksessa. Kuva luotu käyttämällä BioRenderiä, <https://BioRender.com>.

## 5 Pohdinta

### 5.1 Tutkimuksessa käytetty aineisto

Transkriptomiikkatutkimukseni kohteena ovat ohitusleikatut potilaat, joille on kehittynyt sydämen ohitusleikkauksen jälkeen uusi 1. asteen AV-katkos. Näitä potilaita verrataan saman leikkauksen läpikäyneisiin potilaisiin, joilla ei havaittu pre- eikä postoperatiivisesti uutta eteis-kammiokatkosta. Potilailta on kerätty näytteeksi kudospaloja sydämen oikeasta eteiskorvakkeesta leikkaussalissa ennen varsinaisen leikkauksen toteuttamista. Kudosnäytteet on keräämisen jälkeen jäädytetty ja säilytetty -80 asteen pakkasessa.

AV-katkokset ovat sydämen sähköisen johtoratajärjestelmän häiriöitä, joissa sydäntä tahdistavan sähköimpulssin kulku estyy tai hidastuu joko eteis-kammiosolmukkeessa, Hisin kimpussa tai johtoradoissa. AV-katkos voi olla pysyvä tai tilapäinen ja ne jaetaan kolmeen päätyyppiin; ensimmäisen, toisen ja kolmannen asteen AV-katkoksiin. (Airaksinen ym. 2016.) AV-katkoksia voivat aiheuttaa esimerkiksi elektrolyyttihäiriöt, tietyt lääkeaineet sekä sydänleikkaukset. (Airaksinen ym. 2016.) Uusien AV-katkosten postoperatiivisessa kehittymisessä mukana olevia tekijöitä on ajateltu tutkimusten mukaan olevan mm. kirurgiset traumat, tulehdus, paikallinen kudoksen nestekertymä sekä iskemia. (Clay-Weinfeld ym. 2019.)

Perinteisesti niin sydämen fysiologian kuin patofysiologiankin tutkimuksiin on käytetty eläinmalleja. On kuitenkin hyvä huomioida, että eläinten ja ihmisten välillä on niin anatomisia kuin fysiologisiakin eroja sydän- ja verisuonijärjestelmässä, eikä pelkkä eläinmallien hyödyntäminen ole täysin riittävää. Nykyään käytössä on myös kantasoluista johdettuja malleja sekä sydänorganoideja (*cardiac organoids*). Näiden ongelmana on se, etteivät ne toimi kolmiulotteisessa mikroympäristössä, jossa useilla eri solutyypeillä ja kudoksilla on keskinäistä vuorovaikutusta. Näin ollen ihmiskudos säilyttää edelleen vahvasti roolinsa sydänsairauksien tutkimisessa. (Nguyen ym. 2025.)

Myös sydämen johtoratajärjestelmän solujen tutkiminen on perinteisesti ollut haastavaa, ja osittain siitä syystä johtoratajärjestelmän soluihin liittyvien molekyyli- ja proteiini-merkkereiden tunnettuus on jäänyt vähäiseksi. Haasteita aiheuttaa mm. suuri solutyypien heterogeenisyys ja toisaalta johtoratajärjestelmän hankala kolmiulotteinen anatomia sekä vaikeudet näiden solujen eristämiseen myokardiumista. Lisäksi tutkimusta on aiemmin tehty pääasiassa kudostasolla solutaso sijaan. Johtoratajärjestelmän tiettyjen ennalta määrättyjen osien geeniekspressiota on arvioitu myös esimerkiksi lasermikrodissektion ja fluoresenssiin perustuvan solulajittelun (FACS) avulla, mutta näiden ongelmana on se, ettei niiden avulla pystytä selvittämään solutyypien välistä heterogeenisyyttä. (Goodyer ym. 2019.)

Tämäkään tutkimus ei kata varsinaista johtoratajärjestelmää näytteiden ollessa oikeasta eteiskorvakkeesta. Näytteet ovat peräisin elävistä ihmisistä, jolloin kudoksenäytteen ottaminen johtoratajärjestelmästä voisi aiheuttaa potilaalle johtumishäiriön. Toisaalta eteiskorvakkeet ovat sikiökehityksen aikaisia jäänteitä, jolla ei ole fysiologista merkitystä kehittyneessä sydämessä, joten koepalan ottamisesta aiheutuneet vauriot eivät aiheuttane merkittävää toiminnallista haittaa (Airaksinen ym. 2016). On myös havaittu, että varsinaisten sydänlihassolujen, kardiomyosyyttien, lisäksi myös muut solutyypit voivat vaikuttaa sydämen rytmiin. Lisäksi muun muassa sydämen rakenteelliset muutokset ja muutokset sydämen autonomisessa hermotuksessa vaikuttavat rytmihäiriöiden syntyyn. Immuunisoluilla on tulehdusreaktioiden lisäksi roolinsa myös sydänkudoksen homeostaasin ylläpidossa rauhallisessa vaiheessa. (Xia ym. 2022.) Paljon tutkimusta onkin tehty oikean eteiskorvakkeiden näytteillä esimerkiksi eteisvärinän yhteydessä (Lamirault ym. 2006, Chiang ym. 2015).

## 5.2 Transkriptomiikkamenetelmän valinnasta

Tutkimuksen tarkoituksena on vertailla uuden AV-katkoksen saaneiden ja kontrollipotilaiden uusia solutasolla ilmentyviä mekanismeja ja havaita erityyppisiä soluja (mm. tulehdussolut, fibroblastit, sydänlihassolut). Tästä johtuen hybridisaatiopohjaisia menetelmiä käytettäessä haasteena olisi oikeiden koettimien selvittäminen. Näin ollen esimerkiksi DNA-mikrosirumenetelmä soveltuvuus tämän tutkimuksen tarpeisiin on riittämätön.

Sekvenssipohjaisia menetelmiä arvioitaessa bulkki-RNA-sekvensoinnin puutteena on, ettei menetelmä havaitse kudoksensisäistä heterogeenisyyttä eikä näin ollen erityyppisiä soluja. Yksisolusekvensointia ei voida hyödyntää, koska menetelmä edellyttää tuorenäytteitä, kun taas tutkimuksessa käytettävät kudospalat on säilötty jääleikkeinä.

Yksitumasekvensointi puolestaan on mahdollinen menetelmä myös jäänäytteille. Sen rajoitteena kuitenkin on, että se kertoo vain tumansisäisistä transkriptomeista. Toisaalta Simonson ym. (2023) havaitsivat tutkimuksessaan, että heidän toteuttamansa yksitumasekvensoinnin ja yksisolusekvensoinnin välillä oli jonkin verran korrelaatiota sekä geenien että proteiinien ilmentymisen välillä. Lisäksi tumasekvensoinnin avulla voidaan kuitenkin selvittää edelleen parhailtaan käynnissä oleva transkriptio, vaikka sytoplasmisen RNA menetetäänkin. Tumassa voi myös olla rikastuneena ei-koodaavaa RNA:ta, jolla voi olla esimerkiksi säätelytehtäviä soluissa. Näitä ei välttämättä havaittaisi bulkki- tai yksisolusekvensoinnissa. (Ackers-Johnson ym. 2018.)

Spatiaalisen transkriptomiikan sekvenssipohjaiset menetelmät voisivat myös tulla kyseeseen. Haasteena on kuitenkin käytössä olevien kudospalojen pienuus, jolloin esimerkiksi koko eteiskorvakkeen rakennetta ei saada hyödynnettyä ja näin spatiaalisen transkriptomiikan hyöty menetetään. Lisäksi heikkoutena on sekvenssipohjaisen menetelmän resoluutio, joka ei parhaimmillaankaan yllä yhden solun tasolle. Eteiskorvakkeessa on runsaasti erityyppisiä soluja, ja resoluution vuoksi jokainen datapiste keräisi sekvenssipohjaisissa menetelmissä RNA:ta useamman solun alueelta, jolloin ei saada solutason tietoa. Kvantamispohjaiset menetelmät eivät sovellu tähän tutkimukseen, sillä niissäkin hybridisaatiopohjaisten menetelmien tapaan tulisi pystyä määrittelemään halutut koettimet etukäteen. Eri menetelmien hyödyt ja rajoitteet sekä käytettävissä oleva jääleikeaineisto huomioiden tumasekvensointi vaikuttaisi olevan käyttökelpoisin menetelmä, sillä se mahdollistaa sekä solutason tarkastelun että eri solutyypin erittelyn ja havaitsemisen.

### 5.3 Tumasekvensointimenetelmän haasteita tutkimuksen kontekstissa

Tumasekvensoinnin kriittisenä osana käyttökelpoisten tulosten mahdollistamiseksi on tumien eristäminen, johon on tarjolla useita eri menettelytapoja. Safabakhsh ym. 2022 testasivat tutkimuksessaan useita eri sydänkudokselle luotuja tumien eristämiseen luotuja protokollia ja havaitsivat, että ne olivat joko liian voimakkaita tai eivät tarpeeksi voimakkaita. Lisäksi näissä protokollissa oli ongelmana tumien kertyminen ryppäiksi, jolloin yksittäisten tumien saanto jäi vähäisemmäksi. He kokeilivat FACS-menetelmää suodattamaan isompia tumarykelmiä ja kahden tuman pareja, sillä erityisesti tumaparien koot saattoivat olla lähellä yksittäisen tuman kokoa ja näin ollen sekoittaa analyysensä. He kuitenkin havaitsivat FACS-menetelmän vaurioittavan tumia, jonka he ajattelivat johtuvan siitä, että koeprosessi kestää liian pitkään tai lajittelu aiheuttaa liikaa mekaanista räsytystä. Tällä menetelmällä myös saanto jäi liian vähäiseksi.

Onnistunutkaan tumien eristys ei kuitenkaan auta, mikäli RNA:n laatu on heikkoa. Siksi RIN-arvon mittausta ennen kokeellisen työn aloittamista suositellaan RIN-arvo toisaalta määritetään ribosomaalisesta RNA:sta, eikä siten kerro suoraan tumansisäisen RNA:n laadusta (Schroeder ym. 2006). Tulosten laatua voidaan kuitenkin myös arvioida protokollaa optimoitaessa esimerkiksi vertaamalla pelletin kokoa saatujen tumien määrään. Tumien määrän eli tiheyden arviointiin voidaan käyttää esimerkiksi laskukammiota (*hemocytometer*). Tumien laadun arvio taas voidaan suorittaa mikroskooppiavusteisesti esimerkiksi DAPI-värjäyksen avulla, jolloin pystytään arvioimaan esimerkiksi tumien muotoa, eheyttä ja koon heterogeenisyyttä, sekä havaita mahdolliset ryppäät. (Safabakhsh ym. 2022.)

Tumasekvensoinnin keinoin ei myöskään ole mahdollista kerätä spatiaalista tietoa. Tämä tutkimus on kuitenkin luonteeltaan hypoteesia generoiva ja jatkossa voidaankin tehdä uusia tutkimuksia eri menetelmiä hyödyntäen spesifejä kysymyksiä silmällä pitäen.

## Lähteet

- Abdi G, Andhare P, Kumar H, Upadhyay D, Tariq M, Jain M 2024: Exploring the Genomic Symphony: A Comprehensive Analysis of Transcriptomics and Their Profound Significance in Unraveling Cellular Dynamics. Singh V (toim.) *Advances in Genomics: Methods and Applications*. S 73-90. Springer, Singapore.
- Ackers-Johnson M, Tan WLW, Foo RS-Y 2018: Following hearts, one cell at a time: recent applications of single-cell RNA sequencing to the understanding of heart disease. *Nature Communications* (9) 1.
- Airaksinen J, Aalto-Setälä K, Hartikainen J, Huikuri H, Laine M, Lommi J, Raatikainen P, Saraste A, 2016: *Kardiologia*. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P 2015: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science (Taylor & Francis Group), United States of America.
- Bolón-Canedo V, Alonso-Betanzos A, López-de-Ullibarri I, Cao R 2019: Challenges and Future Trends for Microarray Analysis. Andreas Mayr (toim.) *Microarray Bioinformatics*. S 283-293. Humana (Springer Nature), United States of America.
- Caglayan E, Liu Y, Konopka G 2022: Neuronal ambient RNA contamination causes misinterpreted and masked cell types in brain single-nuclei datasets. *Neuron* (110) 24.
- Chiang DY, Zhang M, Voigt N, Alsina KM, Jakob H, Martin JF, Dobrev D, Wehrens XHT, Li N 2015: Identification of microRNA-mRNA dysregulations in paroxysmal atrial fibrillation. *International Journal of Cardiology* 184: 190-197.
- Clay-Weinfeld K, Callans M 2019: Common Postcardiothoracic Surgery Arrhythmias. *Critical Care Nursing Clinics of North America* (31) 3: 367–388.
- Goodyer WR, Beyersdorf BM, Paik DT, Tian L, Li G, Buikema JW, Chirikian O, Choi S, Venkatraman S, Adams EL, Tessier-Lavigne M, Wu JC, Wu SM 2019: Transcriptomic Profiling of the Developing Cardiac Conduction System at Single-Cell Resolution. *Circulation Research* (125) 4: 379-397.

- Gulati GS, D'Silva JP, Liu Y, Wang L, Newman AM 2025: Profiling cell identity and tissue architecture with single-cell and spatial transcriptomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (26) 1: 11-31.
- Hegenbarth J-C, Lezzoche G, De Windt LJ, Stoll M 2022: Perspectives on Bulk-Tissue RNA Sequencing and Single-Cell RNA Sequencing for Cardiac Transcriptomics. *Frontiers in Molecular Medicine* (2).
- Jeon H, Xie J, Jeon Y, Jung KJ, Gupta A, Chang W, Chung D 2023: Statistical Power Analysis for Designing Bulk, Single-Cell, and Spatial Transcriptomics Experiments: Review, Tutorial, and Perspectives. *Biomolecules* (13) 2.
- Kalantari-Dehaghi M, Ghohabi-Esfahani N, Emadi-Baygi M 2026: From bulk RNA sequencing to spatial transcriptomics: a comparative review of differential gene expression analysis methods. *Human Genomics* (20) 1: 1-19.
- Kwok CS, Rashid M, Beynon R, Barker D, Patwala A, Morley-Davies A, Satchithananda D, Nolan J, Myint PK, Buchan I, Loke YK, Mamas MA 2016: Prolonged PR interval, first-degree heart block and adverse cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Heart* (102) 9: 672–680.
- Lamirault G, Gaborit N, Le Meur N, Chevalier C, Lande G, Demolombe S, Escande D, Nattel S, Léger JJ, Steenman M 2005: Gene expression profile associated with chronic atrial fibrillation and underlying valvular heart disease in man. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.
- Liu Y, Nie H, Liu H, Lu F 2019: Poly(A) inclusive RNA isoform sequencing (PAIso-seq) reveals wide-spread non-adenosine residues within RNA poly(A) tails. *Nature Communications* (10) 1.
- Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T 2017: Transcriptomics technologies. *PLOS Computational Biology* (13) 5.
- Malone JH, Oliver B 2011: Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biology* (9).
- Nguyen Q, Tung LW, Lin B, Sivakumar R, Sar F, Singhera G, Wang Y, Parker J, Le Bihan S, Singh A, Rossi FM, Collins C, Bashir J, Laksman Z 2025: Spatial Transcriptomics in Human Cardiac Tissue. *International Journal of Molecular Sciences* (26) 3.
- Potter S, 2018: Single- cell RNA sequencing for the study of development, physiology and disease. *Nature Reviews Nephrology* (14) 8: 479-492.

- Raghavachari N, Garcia-Reyero N 2018: Overview of gene expression analysis: Transcriptomics. Raghavachari N, Garcia-Reyero N (toim.) Gene Expression Analysis: methods and protocols. S 1-5. Springer, United States of America.
- Robles-Remacho A, Sanchez-Martin RM, Diaz-Mochon JJ 2023: Spatial Transcriptomics: Emerging Technologies in Tissue Gene Expression Profiling. Analytical Chemistry (95) 42: 15450-15460.
- Safabakhsh S, Sar F, Martelotto L, Haegert A, Singhera G, Hanson P, Parker J, Collins C, Rohani L, Laksman Z 2022: Isolating Nuclei From Frozen Human Heart Tissue for Single-Nucleus RNA Sequencing. Current Protocols (2) 7.
- Schmauch E 2024: Transcriptomics for translational medicine. Study of RNA expression in cardiac diseases and autoimmunity. University of Eastern Finland (Doctoral dissertation), Kuopio.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T 2006: The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Molecular Biology (7) 3.
- Sharma P, Slathia PS, Jamwal N, Singh R, Tripathi T, Singh VP 2025: Introduction to genome analysis and genomics. Singh DB, Tripathi T (toim.) Genome Analysis: Principles and Methods. S 1-37. Elsevier Science Publishing Co Inc, United States of America.
- Simonson B, Chaffin M, Hill MC, Atwa O, Guedira Y, Bhasin H, Hall AW, Hayat S, Baumgart S, Bedi KC Jr, Margulies KB, Klattenhoff CA, Ellinor PT 2023: Single-nucleus RNA sequencing in ischemic cardiomyopathy reveals common transcriptional profile underlying end-stage heart failure. Cell Reports (42) 2.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M 2009: RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics (10) 1: 57-63.
- Wu H, Kirita Y, Donnelly EL, Humphreys B 2019: Advantages of Single-Nucleus over Single-Cell RNA Sequencing of Adult Kidney: Rare Cell Types and Novel Cell States Revealed in Fibrosis. Journal of the American Society of Nephrology (30) 1: 23-32.
- Xia R, Tomsits P, Loy S, Zhang Z, Pauly V, Schüttler D, Clauss S 2022: Cardiac Macrophages and Their Effects on Arrhythmogenesis. Frontiers in Physiology (13).

- Yaghoobian R, Hosseini Dolama R, Soleimani H, Saeidi S, Mashayekhi M, Mirzayi P, Alavi Tabatabaei G, Hosseini K 2023: Incidence of atrioventricular block after isolated coronary artery bypass grafting: a systematic review and pooled-analysis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* (10) 1: 57-63.
- Yuan CU, Quah FX, Hemberg M 2024: Single-cell and spatial transcriptomics: Bridging current technologies with long-read sequencing. *Molecular Aspects of Medicine* (96).
- Zhao T, Chiang ZD, Morriss JW, LaFave LM, Murray EM, Del Priore I, Meli K, Lareau CA, Nadaf NM, Li J, Earl AS, Macosko EZ, Jacks T, Buenrostro JD, Chen F 2022: Spatial genomics enables multi-modal study of clonal heterogeneity in tissues. *Nature* (601) 7891: 85-91.