

Heta Haikonen

# Koirien silmäsairauksiin liittyvien ehdokasgeenien kartoittaminen amerikancockerspanieleilla ja italianvinttikoirilla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööryö

26.10.2012

Tekijä Otsikko	Heta Haikonen Koirien silmäsairauksiin liittyvien ehdokasgeenien kartoittamien amerikancockerspanieleilla ja italianvinttikoirilla
Sivumäärä Aika	44 sivua + 6 liitettä 26.10.2012
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Uudet biotekniset menetelmät
Ohjaajat	filosofian maisteri Saija Ahonen professori Hannes Lohi filosofian tohtori Annika Järviluoma
<p>Insinööriyön tavoitteena oli selvittää, löytyykö ehdokasgeeneistä <i>TSPAN12</i> tai <i>PTPRZ1</i> mutaatio, joka voisi liittyä amerikancockerspanielien perinnölliseen retinan dysplasiaan ja italianvinttikoirien perinnölliseen lasiaisen rappeumaan. Tutkimus on osa laajempaa käynnissä olevaa koirien geenitutkimushanketta. Molempien sairauksien oletetaan periytyvän peittyvästi. <i>TSPAN12</i>- ja <i>PTPRZ1</i>-geenit sijaitsevat koiran kromosomissa 14, ja ne valittiin ehdokasgeeneiksi aikaisempien tutkimusten perusteella. Kumpaakaan geeniä ei ole aikaisemmin yhdistetty koirilla esiintyviin sairauksiin. Mutaation löytyminen mahdollistaisi jatkotutkimukset sairauden geenitaustasta ja geenitestin kehittämisen jalostuksen apuvälineeksi.</p> <p>Näytteiksi valittiin neljä sairasta ja neljä tervettä amerikancockerspanielia sekä italianvinttikoiraa. Yhteensä näytteitä analysoitiin 16 kappaletta, joka on riittävän suuri määrä ehdokasgeenitutkimukseen. DNA eristettiin kokoverestä. Ehdokasgeenien proteiinia koodaavan alueen monistamista varten suunniteltiin alukkeet. Eksonialueet monistettiin PCR-menetelmällä ja monistetut eksonialueet sekvensoitiin kapillaarisekvensointina. Sekvensointitulokset analysoitiin ja vertailtiin koirien välillä Sequencher-ohjelmalla.</p> <p><i>TSPAN12</i>-geenistä pystyttiin monistamaan, sekvensoimaan ja analysoimaan kaikki eksonit paitsi eksoni 1 ja <i>PTPRZ1</i>-geenistä kaikki eksonit paitsi eksonit 12, 24 ja 25. PCR-reaktion optimointia <i>TSPAN12</i>-geenin eksonille 1 ja <i>PTPRZ1</i>-geenin eksoneille 12, 24 ja 25 jatketaan tutkimusryhmässä. Analysoiduista eksoneista löytyi useita yksittäisiä pistemutaatioita. Yksikään mutaatio ei kuitenkaan esiintynyt pelkästään sairailta koirilla homotsygoottisena peittyvän periytymismallin mukaisesti, joten ne ovat todennäköisesti vain osa normaalia muuntelua. Eksoneita 1, 12, 24 ja 25 lukuun ottamatta voidaan todeta, että ainakaan <i>TSPAN12</i>- ja <i>PTPRZ1</i>-geenien koodaavat variantit eivät aiheuta retinan dysplasiaa tai lasiaisen rappeumaa. Sairauksien taustalla voi olla jokin toinen geeni tai sitten <i>TSPAN12</i>- ja <i>PTPRZ1</i>-geenien koodaavien alueiden ulkopuolella olevat esimerkiksi säätelyalueen mutaatiot.</p> <p>Tässä tutkimuksessa selvitettiin aikaisemmin vastaavista ihmisen silmäsairauksista tunnistettuja geenejä kahdella eri koirarodulla. Tutkimustulokset ehdottavat, että ainakaan näiden geenien koodaavat alueet eivät aiheuta kyseisiä sairauksia vaan taustalla on todennäköisesti muita perinnöllisiä tekijöitä, joita kannattaa kartoittaa ehdokasgeenianalyyysien sijaan kattavammalla koko perimänlaajuisella geenipaikannuksella.</p>	
Avainsanat	ehdokasgeenitutkimus, PCR-reaktio, sekvensointi, <i>TSPAN12</i> , <i>PTPRZ1</i>

Author Title	Heta Haikonen A Candidate Gene Study in Canine Eye Disorders
Number of Pages Date	44 pages + 6 appendices 26 October 2012
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biotechnology
Instructors	Saija Ahonen, Master of Science Hannes Lohi, Professor Annika Järviluoma, Doctor of Philosophy
<p>The aim of this thesis was to find out if candidate genes <i>TSPAN12</i> or <i>PTPRZ1</i> have mutations that could be linked to hereditary retinal dysplasia in American Cocker Spaniels or hereditary vitreous degeneration in Italian Greyhounds. The study is part of a broader genetics research of dog. Both diseases are considered as recessively inherited. <i>TSPAN12</i> and <i>PTPRZ1</i> -genes are located in dog chromosome 14. Genes were selected as candidate genes based on previous information. Neither of the genes were previously connected to any diseases in dogs. The discovery of mutations would make possible further studies of the genetic background of the disease and development of a gene test for the studied breeds.</p> <p>Samples were selected from four affected and four healthy American Cocker Spaniels and Italian Greyhounds. Combined 16 samples were analyzed, which is enough for candidate gene study. The DNA was purified from whole blood. Primers were designed for exon amplification. Exons were sequenced by capillary sequencing. The results of sequencing were analyzed and compared using the Sequencher-program.</p> <p>All other exons of <i>TSPAN12</i> and <i>PTPRZ1</i> -genes were amplified, sequenced and analyzed, except exon 1 of <i>TSPAN12</i> and exons 12, 24 and 25 of <i>PTPRZ1</i>. Optimization of PCR-reactions for these exons is still ongoing. Many single nucleotide polymorphisms were found. None of these mutations did appear only in affected dogs based on recessive inheritance. Variations were considered as part of a normal variation. Except exons 1, 12, 24 and 25, it could be found that coding variants of <i>TSPAN12</i> and <i>PTPRZ1</i> didn't cause retinal dysplasia or vitreous degeneration. Some other gene or mutation in regulation region outside of exons or exons that weren't amplified may be cause of the diseases.</p> <p>In this study, genes that have been identified in human eye diseases were studied in two different dog breeds. Research results suggest that coding sequences of these genes did not cause studied diseases. Probably there are other hereditary factors, which could be studied with more comprehensive genome wide scan instead of candidate gene study.</p>	
Keywords	Candidate gene study, PCR-reaction, Sequencing, <i>TSPAN12</i> , <i>PTPRZ1</i>

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Koirarotujen historiaa	2
2.1	Kesyyntyminen ja rotujen muodostuminen	2
2.2	Amerikancockerspanieli	4
2.3	Italianvinttikoiraa	5
3	Silmä	7
3.1	Silmän rakenne	7
3.2	Retinan dysplasia	8
3.3	Lasiasen rappeuma	10
4	Koira geneettisen tutkimuksen kohteena	12
4.1	Genetiikasta ja periytymismalleista	12
4.2	Koira geenitutkimuksen eläinmallina	13
5	Mahdolliset geenit retinan dysplasian ja lasiasen rappeuman taustalla	15
5.1	Ehdokasgeenitutkimus	15
5.2	<i>TSPAN12</i>	16
5.3	<i>PTPRZ1</i>	17
6	Sekvensointi geenitutkimuksen välineenä	18
6.1	Sekvensoinnin historiaa ja perusteita	18
6.2	Automaattinen sekvensointi	19
6.3	Syväsekvensointi	21
7	Tutkimusmenetelmät	22
7.1	Näytteiden valinta	22
7.2	DNA:n eristäminen ja laimentaminen	22
7.3	Polymeraasiketjureaktio (PCR)	24
7.3.1	Alukkeiden suunnittelu	24
7.3.2	Toteutus	27
7.4	Agaroosigeelielektroforeesi	29
7.5	Sekvensointi	30
7.6	Ennustusohjelmat mutaation vaikutuksen arviointiin	31

8	Tulokset	33
8.1	Alukkeiden optimointi	33
8.2	Muutokset sekvensseissä	36
8.2.1	Muutokset eksoneissa	36
8.2.2	Muutokset introneissa	37
8.3	Huomioita sukupuista	37
9	Yhteenveto	39
	Kiitokset	40
	Lähteet	41
	Linkit	44
	Liitteet	
	Liite 1. Taulukko näytteistä	
	Liite 2. DNA-näytteiden konsentraatiot	
	Liite 3. Amerikancockerspanielien sukupuu	
	Liite 4. Italianvinttikoirien sukupuu	
	Liite 5. <i>PTPRZ1</i> -geenin eksoneille suunnitellut alukkeet	
	Liite 6. PCR-ohjelma ja PCR-reaktioseos	
	Liite 7. Variantit	

## Lyhenteet

<i>TSPAN12</i>	Tetraspanin12-geeni
<i>PTPRZ1</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1 -geeni
mtDNA	Mitokondrio-DNA
FCI	Kansainvälinen koiranjalostusliitto (Fédération Cynologique Internationale)
RD	Retinal dysplacia, Retinan dysplasia
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
RNA	Ribonukleiinihappo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
UCSC	University of California, Santa Cruz

## 1 Johdanto

Koirien geenitutkimusryhmä on Helsingin yliopistossa ja Folkhälsanin tutkimuskeskuksessa toimiva tutkimusryhmä, jonka tavoitteena on tunnistaa eri koiraroduista geenivirheitä perinnöllisiin sairauksiin ja ominaisuuksiin sekä kehittää sairauksille geenitestejä jalostuksen apuvälineeksi. Koirien geenitutkimusryhmän tavoitteena on myös soveltaa saatua tietoa ihmis sairauksien selvittämiseen. Koiran perimän kartoitus vuonna 2005 on mahdollistanut eri rotujen perinnöllisten sairauksien, ruumiin rakenteen, turkin värin, koon ja käyttäytymispiirteiden geenitaustojen selvittämiseen. Geenilöydöt mahdollistavat tautimekanismien ymmärtämisen ja diagnostiikan, hoitojen sekä mahdollisten lääkkeiden kehittämisen. Koirien geenitutkimuksessa geenejä voidaan löytää merkittävästi pienemmällä näytemäärällä jopa monitekijäisiin sairauksiin kuin vastaavissa tutkimuksissa ihmisillä. Tämä johtuu koirien populaatiohistoriasta ja roturakenteesta. (Lohi 2012)

Tämän insinööriyön tarkoituksena on selvittää, onko *TSPAN12* (Tetraspanin 12) tai *PTPRZ1* (Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1) -geenissä mutaatiota, joka voisi olla amerikancockerspanielien retinan dysplasian tai italianvinttikoirien lasiaisen rappeuman taustalla. Perinnöllistä retinan dysplasiaa esiintyy amerikancockerspanieleilla yleisesti, ja se voi vakavimmillaan aiheuttaa jopa sokeutumisen (Amerikancockerspanielit ry 2012). Lasiaisen rappeuma on italianvinttikoirilla yleinen, mutta vähän tutkittu sairaus. Mikäli mutaatio löytyisi, voitaisiin tehdä jatkotutkimuksia sairauden geenitaustan selvittämiseksi.

Tutkimusmenetelmänä käytetään niin sanottua ehdokasgeeni-menetelmää, jossa tutkitaan, löytyykö sairailta yksilöiltä ja terveiltä verrokeilta muutoksia geeneistä, joiden arvioidaan olevan sairauden taustalla. Geenin proteiinia koodaavat eksonialueet monistetaan PCR-menetelmällä ja sekvensoidaan kapillaarisekvensoinnilla. Muutokset geeneissä käydään läpi bioinformatiikan menetelmin käyttäen mm. Sequencher-ohjelmaa. Löydettyjen mutaatioiden esiintymistä verrataan tapausten ja verrokkien kesken ja niiden vaikutusta arvioidaan geenin toimintaan.

## 2 Koirarotujen historiaa

### 2.1 Kesyyntyminen ja rotujen muodostuminen

Koiran (*Canis familiaris*) kesyyntymisen ajankohdasta ja paikasta on esitetty useita teorioita, eivätkä tutkijat ole löytäneet yhtenäistä näkemystä asiasta. Ensimmäiset tutkijat Charles Darwinista alkaen uskoivat kesykoiran monimuotoisuuden taustalla olevan useita koiraeläinlajeja. Nykyaikaiset mitokondrio-DNA (mtDNA) -analyysit ovat kuitenkin osoittaneen harmaasuden (*Canis lupus*) koiran ainoaksi esi-isäksi. (Boyko 2011) Taksonomialtaan koira (*Canis familiaris*) kuuluu canis-sukuun, joka kuuluu koiraeläinten heimoon (*Canidae*), joka kuuluu petoeläinten lahkoon (*Carnivora*) nisäkkäiden (*Mammalia*) luokassa. Canis-suvun lajit pystyvät lisääntymään keskenään, mikä edesauttoi uskomusta, että koira on syntynyt useasta koiraeläinlajista. (Wayne, Ostrander 1999)

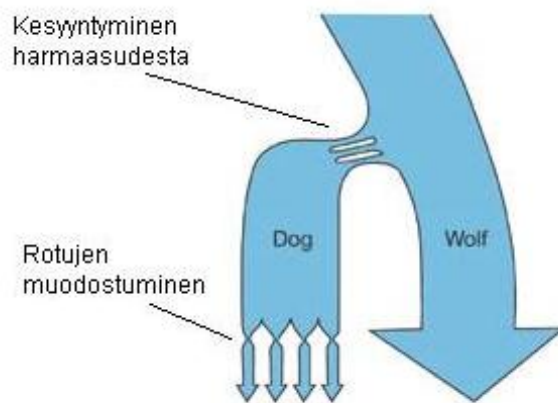
Kesyyntymiseen johtaneet tapahtumat tapahtuivat paljon ennen kuin ihminen alkoi kirjata niitä muistiin, näin ollen kesyyntymisen ajankohdasta, sijainnista ja kerroista ei ole kirjallista tietoa. Moni nykyisin olemassa olevista roduista on kehitetty muutaman viimeisen sadan vuoden aikana, eikä edes näiden rotujen luomiseen johtaneista risteytyksistä ole olemassa aineistoja. Tutkijat ovat nykyisin yhtä mieltä, että koira on kesyyntynyt yhdestä tai useammasta harmaasusipopulaatiosta. Molekyyligeneettinen tutkimus tukee tätä näkemystä. Harmaasudella ja koiralla on samoja geenialleleja ja mtDNA:ssa on yhtäläisyyksiä. Koiran ja harmaasuden mtDNA eroaa toisistaan vain 1,5 %, kun koiran seuraavaksi lähimmän sukulaisen kojootin mtDNA eroaa jo 7,5 % verrattuna koiraan. (Wayne, Ostrander 1999)

Koira erosi omaksi rodukseen harmaasudesta 15 000-100 000 vuotta sitten Itä-Aasiassa. Koira ja ihminen hyötyivät toisistaan ja jakoivat elintilan sekä ruoan. (Lindblad-Toh ym. 2005) Kesyyntymistapahtumia on kuitenkin ollut useita ympäri maailmaa. Arkeologisten tutkimusten perusteella ensimmäiset kesyt koirat elivät Lähi-idässä noin 14 000 vuotta sitten, saman ikäisiä jäänteitä ihmisen kanssa haudatuista koirista on löydetty myös Euroopasta ja noin 8000 vuotta vanhoja koirajäänteitä Pohjois-Amerikasta. (Wayne, Ostrander 1999)

Oletettavasti koiran kesyyntyminen tapahtui kuitenkin ennen maanviljelyn aloittamista. Ihmisen aloitettua viljelyn koirien liikkuminen ihmisasutuksen ympärillä muuttui entistä hyödyllisemmäksi kummankin lajin kannalta, ja koira levisi ympäri maailmaa. Ihminen



rupesi käyttämään koiria vartijoina, ruokana ja seuralaisena. Se, oliko koiran kesyyntyminen loppuun saatettu tässä vaiheessa vai jatkuiko se vielä, on edelleen väittelyn kohteena. (Boyko 2011) Ensimmäisiä koirarotuja olivat vinttikoiria- ja mastiffityyppiset rodut (Wayne, Ostrander 1999). Nykyisten koirarotujen synty on tulosta ainakin kahdesta suuresta pullonkaulasta eli populaation äkillisestä pienenemisestä ja kasvamisesta. Pullonkaulailmiöt ovat muokanneet koirarotujen perimää ja haplotyyppirakennetta ja vähentäneet geneettistä monimuotoisuutta. (Kuva 1) Ensimmäinen pullonkaula oli tuhansia vuosia sitten, kun koira kesyyntyi sudesta ja toinen nykyrotujen kehittämisen yhteydessä muutama sata vuotta sitten. Pienempiä pullonkauloja on seurannut paikallisista tapahtumista, kuten maailmasodista. (Lindblad-Toh ym. 2005)



Kuva 1. Koirarotujen kehityksen pullonkaulat (muokattu) (Lindblad-Toh ym. 2005).

Koirien laajamittaisen jalostamisen aloittamisen jälkeen perustettiin myös erilaisia rotujärjestöjä. Järjestäytyneen kenneltoiminnan maailmanlaajuinen kattojärjestö on The Fédération Cynologique Internationale (FCI, Kansainvälinen koiranjalostusliitto), jonka jäseniä on 86 kansallista kenneljärjestöä, kuten Suomen Kennelliitto. FCI on perustettu vuonna 1911, mutta ensimmäisen maailmansodan jälkeen liitto perustettiin uudelleen vuonna 1921. FCI tunnustaa tällä hetkellä 343 erilaista koirarotua, jotka se jakaa kymmeneen erilaiseen luokkaan. (Fédération Cynologique Internationale 2012)

Suomessa järjestäytynyt kenneltoiminta alkoi vuonna 1889, kun perustettiin Finska Kennelklubben – Suomen Kennelklubi. Suomessa kenneltoiminta syntyi vastaamaan metsästyksen ja aktiivisten metsästäjien tarpeisiin. Järjestön tehtävänä oli edistää parempaa koiranhoitoa yleistämällä puhtaan koirarodun harrastamista ja levittää tietoa

rotupuhtauden eduista. Vuonna 1934 Finska kennelklubben rinnalle perustettiin Suomen Kennelliitto. Vuonna 1962 Finska kennelklubben ja Suomen Kennelliitto sulautuivat yhdeksi organisaatioksi. Suomen Kennelliiton tarkoituksena on edelleen edistää puhdasrotuisten koirien kasvattamista, rotujen terveyttä ja parantaa yleistä koiranpitoa. Se toimii puhdasrotuisten koirien harrastajien ja kasvattajien yhdyssiteenä, sekä koira-harrastuksen keskus- ja etujärjestönä. (Suomen Kennelliitto 2012)

## 2.2 Amerikancockerspanieli

Amerikancockerspanieli polveutuu Yhdysvaltoihin viedyistä englannincockerspanieleista. 1800-luvun loppupuolella rotua alettiin jalostaa runsasturkkisemmaksi ja hienos-tuneemmaksi (kuva 2). Amerikancockerspanielin alkuperäinen käyttötarkoitus oli kur-pan metsästys, ja se kuuluu FCI8-luokkaan eli noutajiin, ylösajaviin koiriin ja vesikoiriin. Suomessa rekisteröidään vuosittain keskimäärin 150 yksilöä. (Amerikancockerspanielit ry 2012)



Kuva 2. Amerikancockerspanieli (Wikimedia Commons 2012).

Amerikancockerspanieleilla tavattavia perinnöllisiä silmäsairauksia ovat silmän verkkokalvonrappeuma (PRA, progressive retina atrophy), harmaakaihi ja retinan dysplasia (RD, retinal dysplasia). RD on toinen tässä työssä käsitellyistä silmäsairauksista. Jalostukseen käytettäviltä amerikancockerspanieleilta vaaditaan alle vuodenikäinen virallinen eläinlääkärin antama silmätarkastuslausunto. Amerikancockerspanieleilla tavataan

myös lonkkaniveldysplasiaa eli lonkkanivelen kasvuhäiriöitä ja patellaluksaatiota, jossa polvilumpio siirtyy normaalilta paikaltaan reisiluun alapään telaurasta polven etupuolelta sen sisäpuolelle. Muita yleisiä sairauksia ovat kilpirauhasen vajaatoiminta, iho- ja korvaongelmat, epilepsia, kirroosiin johtavaa maksasairaus, autoimmuunisairaudet ja rokotuskomplikaatiot. (Amerikancockerspanielit ry 2012)

### 2.3 Italianvinttikoiria

Italiavinttikoiria (kuva 3) on pienin vinttikoiraroduista ja kuuluu FCI10-luokkaan eli vinttikoiraluokkaan. Italiavinttikoiran uskotaan olevan lähtöisin yli 2000 vuotta sitten nykyisen Kreikan ja Turkin alueelta. Uskomus perustuu arkeologisiin löytöihin pienistä vinttikoirien luurangoista ja taiteesta. Italiavinttikoiran alkuperäisestä käyttötarkoituksesta on kaksi versiota, toisen mukaan italiavinttikoiria jalostettiin metsästämään pientä riistaa ja toisen mukaan pelkästään lemmikiksi ja seurakoiraksi. (Italian Greyhound Club of America 2012) Egyptin faaraoiden hovissa uskotaan pidetyn italiavinttikoiria, ja Kleopatraa pidetään rodun ensimmäisiin kuuluvana kasvattajana (Suomen italiaanot ja cimecot ry. 2012). Italiavinttikoirat kuuluivat 1800-luvun loppuun asti vain ylhäisön lemmikeiksi, ja niiden kasvattaminen oli vähäistä (Italian Greyhound Club of America 2012).



Kuva 3. Italiavinttikoiria (Wikimedia Commons 2012).

Maailmansotien aikana italianvinttikoirapopulaatio väheni rajusti ja Englannissa ne kuolivat lähes sukupuuttoon. Eurooppaan tuotiin italianvinttikoiria Amerikasta elvyttämään rajusti vähentyntä kantaa. Amerikan Kennelklubi rekisteröi rodun ensimmäistä kertaa vuonna 1886 (Italian Greyhound Club of America 2012). Suomeen italianvinttikoiria tuotiin 1910-luvulla, mutta kasvatustyö käynnistyi vasta 1960-luvulla. Nykyisin Suomessa on noin 400–500 italianvinttikoiraa. (Suomen italiaanot ja cirnecot ry. 2012)

Italianvinttikoirapopulaation runsas väheneminen ja uudelleen elvyttäminen 1900-luvulla on johtanut rodun perintötekijöiden vähenemiseen ja perinnöllisten sairauksien yleistymiseen. Italianvinttikoirilla esiintyviä perinnöllisiä silmäsairauksia ovat lasiaisen rappeuma ja harmaakaihi. Lasiaisen rappeuma on toinen tässä työssä käsiteltävistä silmäsairauksista. Italianvinttikoirilla esiintyy myös epilepsiaa, sydänvikaa, kaljuuntumista ja patellaluksaatiota. Nuorilla koirilla esiintyy myös luunmurtumia, johtuen ohuista raajoista ja vilkkaasta luonteesta. (Suomen italiaanot ja cirnecot ry. 2012)

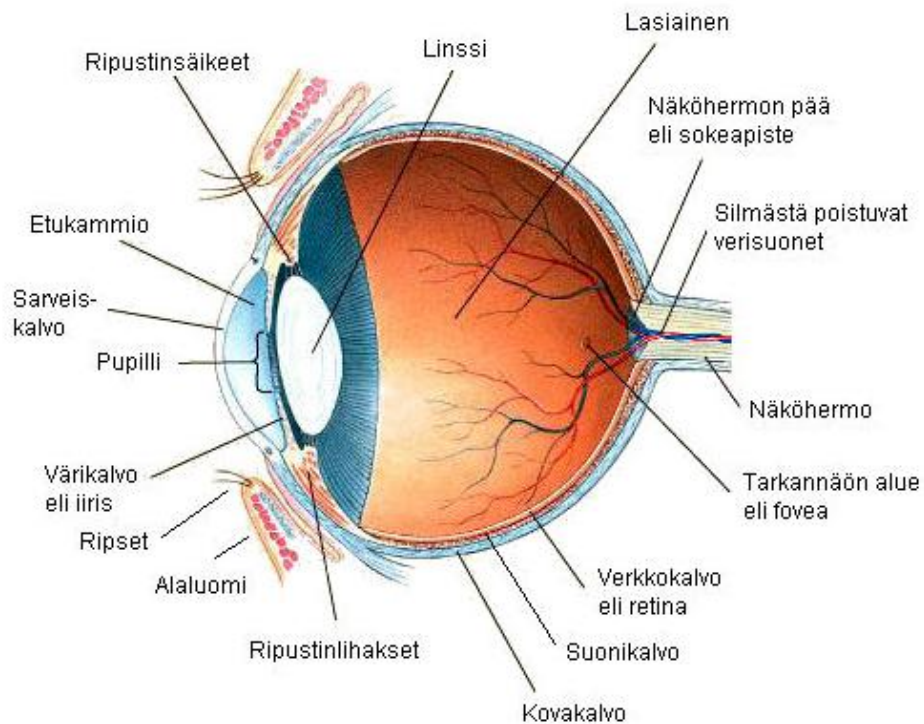
### 3 Silmä

#### 3.1 Silmän rakenne

Silmä on pyöreä aistinelin, joka toimii näköaistin välineenä. Se havainnoi ympäristöstä saapuvaa valoa, joka kulkee kameran linssiä muistuttavan rakenteen läpi verkkokalvolle, jossa aistinsolut sijaitsevat. (Haug, Sand & Sjaastad 2007) Varsinainen näköaistimus tapahtuu aivojen näkökeskuksessa, johon silmän aistinsolujen havaitsema tieto kulkee hermoimpulsseina näköhermoa pitkin. (Näkövammaisten Keskusliitto ry 2012) Koiran ja ihmisen silmät ovat rakenteeltaan ja toiminnaltaan hyvin samanlaisia.

Kovakalvo on silmämunan uloin kuori, joka silmän etuosassa muuttuu sarveiskalvoksi. Kovakalvon sisäpuolella on suonikalvo, jossa on verisuonet ja pigmenttiä. Etuosassa suonikalvon jatkeena on värikalvo (iiris), joka antaa silmälle sen värin. Värikalvon keskellä on pupilli, jonka kokoa säädellään rengasmaisilla ja säteittäisillä lihaksilla. Pupillin ja sarveiskalvon välissä on etukammio, jossa on ravinteita sisältävää nestettä. Mykiö eli linssi sijaitsee pupillin takana. Mykiö yhdessä sarveiskalvon kanssa taittaa valonsäikeitä katsottavasta kohteesta verkkokalvolle eli retinalle. Mykiö on kiinnittynyt ripustinsäikeillä ripustinlihaksiin, joiden supistuminen säätelee linssin muotoa ja näin näön tarkentumista. Mykiön mukautumiskykyä kutsutaan akkommodaatioksi. (Haug, Sand & Sjaastad 2007)

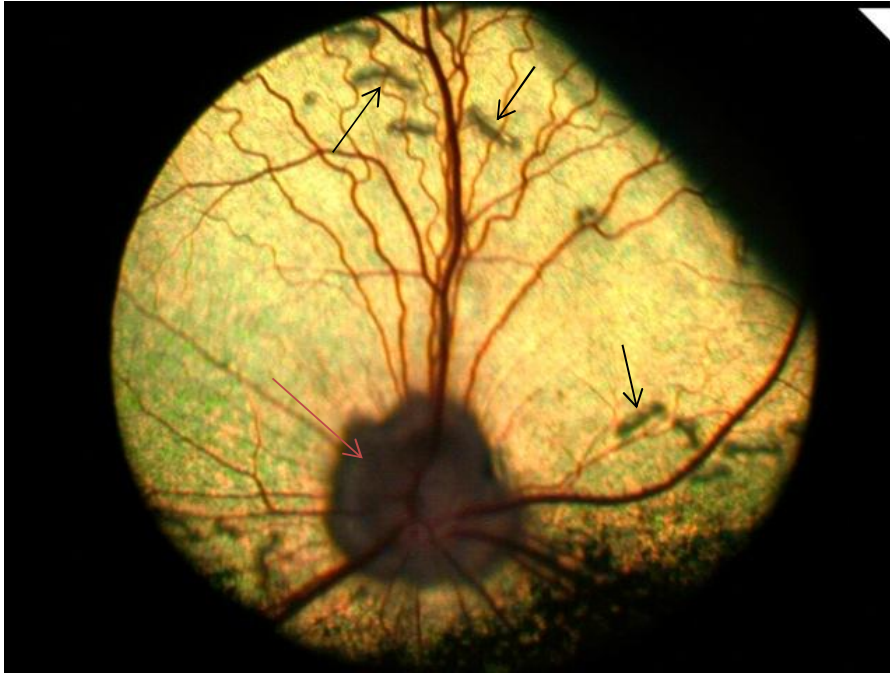
Verkkokalvo eli retina sijaitsee suonikalvon sisäpuolella. Verkkokalvo on pigmentoituunutta epiteelisolukkoa, jossa sijaitsevat aistinsolut. Aistinsoluja ovat tappi ja sauvasolut. Koiralla on vähemmän tappisoluja ja enemmän sauvasoluja kuin ihmisellä. Tämän takia koira näkee huonommin värejä, mutta pimeänäkö on parempi kuin ihmisellä. Verkkokalvolla on keskikuoppa eli fovea, joka on tarkannäkemisen alue. Sokeaksi pisteeksi kutsutaan aluetta, jossa näköhermot ja verisuonet poistuvat silmästä. Lasiainen sijaitsee silmämunan keskellä ja on suurin yksittäinen silmän osa. (Kuva 4.) (Haug, Sand & Sjaastad 2007) Silmäluomien tarkoitus on suojata silmän uloimpia osia, etenkin sarveiskalvoa. Koiralla yläluomi, jossa on värekarvoja ja ripsiä, on liikkuvaisempi kuin alaluomi. Koirat syntyvät luomet kiinni toisissaan ja ne aukeavat 10–14 päivän ikäisenä. (Gelatt 2007)



Kuva 4. Silmän rakenne (muokattu lähteestä Pirkola 2011).

### 3.2 Retinan dysplasia

Retinan dysplasia (RD) on synnynnäinen ja perinnöllinen verkkokalvon kehityshäiriö, jota esiintyy niin koiralla kuin ihmiselläkin. Retinan dysplasiassa verkkokalvolle muodostuu poimuja ja irtaumia, ja se voi olla paikallisesti liikkakasvuinen. Verkkokalvo kehittyy epänormaalisti jo sikiönkehityksen aikana. Retinan dysplasia jaetaan kolmeen luokkaan. Multifokaali RD (mRD) on sairauden lievin muoto, jossa molempiin tai toiseen silmään kehittyy yksi tai useampi poimu sekä pieniä pyöreitä ruusukemaisia muodostelmia (kuva 5). Geograafinen RD (gRD) on laajempi, ja verkkokalvolla voidaan havaita ohentumien saarekemäinen kertymä ja mahdollisesti verkkokalvon irtaumia. Näkökyky voi olla merkittävästi heikentynyt gRD:ssa. Totaali RD (tRD) on sairauden vakavin muoto, jossa koko verkkokalvo irtoaa ja aiheuttaa sokeutumisen. (Gelatt 2007) Amerikancockerspanieleilla esiintyy yleisimmin multifokaalia retinan dysplasiaa, mutta myös gRD:aa ja tRD:aa. (Amerikancockerspanielit ry 2012). Ihmisilläkin esiintyy synnynnäistä retinan dysplasiaa, joka voi johtaa sokeutumiseen.



Kuva 5. Koiran verkkokalvo, jossa voi nähdä mRD:n aiheuttamia muutoksia. Pienet mustat viirut ovat retinan dysplasiassa esiintyviä verkkokalvon poimuja (merkitty tummilla nuolilla). Iso harmaa alue, joka näkyy verkkokalvon alalaidassa, on näköhermon pää (merkitty vaalealla nuolella) ja pitkät punertavat viirut verisuonia. © Kaisa Wickström

Vuonna 1978 julkaistussa tutkimuksessa 500 amerikancockerspanielin silmät tutkittiin, joista 96 yksilöllä todettiin multifokaali retinan dysplasia. Muutokset retinassa havaittiin niin jo 3-4 viikon ikäisillä pennuilla kuin 7-vuotiailla koirillakin. Retinassa havaitut muutokset olivat poimuja ja ruusukemaisia muodostelmia, jotka johtuivat retinan solujen liikakasvusta sekä solujen määrän kasvusta. Sukutauluja analysoimalla havaittiin 71 yksilön 96 sairaasta olevan sukua toisilleen. Resessiivistä eli väistyvää periytyvyyttä pidettiin todennäköisenä, koska viidessä pentueessa, jotka olivat syntyneet 10 sairaasta vanhemmasta, kaikki eloonjääneet sairastuivat. Toisaalta dominanttia eli vallitsevaa tai useiden geenien aiheuttamaa periytymistä ei voitu sulkea pois. (MacMillan, Lipton 1978)

Liitteessä 3 on nähtävillä suomalaisten amerikancockerspanielien sukupuu. Sukupuuhun on merkitty mustalla sairast yksilöt. Urokset on merkitty neliöllä ja naaraat ympyröillä. Sukupuusta on nähtävillä, että sairaus on selvästi periytyvä, mutta periytymismallia ei pysty arvioimaan. Sukupuu osoittaa myös, että sairaus on yleinen. Sukupuuhun on punaisella nuolella on merkitty tähän työhön valitut sairast yksilöt. (Liite 3)

### 3.3 Lasiaisen rappeuma

Lasiainen on kooltaan noin 80 % silmän koosta, ja se on suurin yksittäinen silmän osa. Lasiainen sisältää 99 % vettä, loppuosa on suurimmaksi osaksi kollageenia ja hyalu-ronihappoa, jotka tekevät lasiaisesta geelimäisen ja elastisen. Lasiainen on läpikuultava ja läpäisee valoa. Lasiaisen tehtävä on ylläpitää silmän muotoa ja pitää verkkokalvo ja linssi oikeilla paikoillaan. (Gelatt 2007)

Kliinisesti lasiaisen rappeumalla tarkoitetaan lasiaisessa tapahtumia muutoksia, jotka johtavat lasiaisen luhistumiseen. Merkkejä voivat olla lasiaisen muuttuminen nestemäisemmäksi ja samentuminen (kuva 6). (Gelatt 2007) Fyysiset muutokset voivat johtaa näön menetykseen (Schoster 2012). Viime vuosina lasiaisen rappeumasta on tullut ongelma useilla roduilla kuten italianvinttikoiraa, chihuahuaa, shih tzu, whippet, havanankoira ja löwchen. Lasiaisen muuttuminen nestemäisemmäksi voi johtaa linssiluksaatioon eli linssin sijoiltaanmenoon sekä verkkokalvon irtoamiseen. (Gelatt 2007) Lasiaisen siirtyminen silmän etukammioon voi estää nesteen kierron silmässä ja johtaa glaukoomaan eli silmänpainetautiin (Schoster 2012).



Kuva 6. Italianvinttikoiraa, jolla on lasiaisen rappeuma. Silmä on selvästi samea. © Arja Koski

On normaalia, että lasiaisessa tapahtuu muutoksia koiran vanhetessa, mutta muutokset eivät aiheuta ongelmia koiralle. Joillain roduilla muutokset kuitenkin ovat vakavam-



pia. Lasiaisen rappeuman perinnöllisyydestä tai kliinisestä sairauden kulusta ei kuitenkaan ole vielä yksityiskohtaista tietoa. (Schoster 2012) Lasiaisen rappeuman tunnistamisessa on vielä haasteita. Sairauden toteaminen voi olla haastavaa perinteisellä suoralla silmänpohjantutkimusmenetelmällä. Vuonna 2008 julkaistussa tutkimuksessa 114 erirotuista koiraa tutkittiin ultraäänilaitteella, jolloin 23 koiralta tunnistettiin lasiaisen rappeuma. Silmänpohjantutkimusmenetelmällä vain 9 koiralta tunnistettiin lasiaisen rappeuma. (Labruyère ym. 2008) Liitteessä 4 on Suomen italianvinttikoirien sukupuu, josta voi nähdä, kuinka laajasti lasiaisen rappeuma on levinnyt rodussa. Sairaantyneet yksilöt on merkitty mustalla. Sukupuuhun on merkitty punaisella nuolella tähän työhön valitut sairaantyneet yksilöt. (Liite 4)

## 4 Koira geneettisen tutkimuksen kohteena

### 4.1 Genetiikasta ja periytymismalleista

Koiran koko genomi selvitettiin vuonna 2005, ja tutkimuksen kohteena oli bokseri. Koira oli viides nisäkäs, jonka genomi selvitettiin kokonaan. Sekvensointimenetelmänä käytettiin shotgun-menetelmää, jossa genomi pilkotaan satunnaisesti paloihin ja näiden emäsjärjestys määritetään. Ennen koiran genomia on selvitetty ihmisen, simpanssin, hiiren ja rotan genomit. (Lindblad-Toh ym. 2005) Koiran genomi on jakautunut 38 kromosomipariin, joita kutsutaan autosomaaliseksi kromosomeiksi, ja kahteen sukupuolikromosomiin, X ja Y -kromosomiin. (National Center for Biotechnology Information 2012).

Kromosomit muodostuvat DNA-kaksoisjuosteesta, joka on kiertynyt histoneiden ympärille nukleosomeiksi. Nukleosomit kiertyvät kromatiiniksi, joka kiertyy kromosomiksi. DNA koostuu geeneistä ja niiden välisistä alueista. Geenit ovat biologisen informaation ja perinnöllisyyden toiminnallinen yksikkö, joka on tallennettu nukleotidisekvenssinä DNA:ksi. Geenin paikkaa kromosomissa kutsutaan lokukseksi. Geenin sekvenssi antaa ohjeet proteiinin rakentamiselle ja sekvenssi luetaan kolmen nukleotidin sarjoissa eli kodoneissa. Alleelit ovat saman geenin vaihtoehtoisia muotoja. Koska koiralla on kromosomistossaan kutakin geeniä kaksi kappaletta, voi yksilöllä olla tietyistä geeneistä joko kaksi samaa alleelia (homotsygootti) tai kaksi erilaista alleelia (heterotsygootti). (Lewin 2008) Koiralla arvioidaan olevan 19 300 geeniä, joista suurin osa on ihmisen geenejä vastaavia (Lindblad-Toh ym. 2005).

Erilaisia periytymistapoja kutsutaan periytymismalleiksi. Ominaisuudet voivat periytyä yhden tai useamman geeniparin välityksellä. Usean geeniparin välityksellä periytyviin ominaisuuksiin vaikuttavat myös ympäristötekijät. Yhden geeniparin mutaation aiheuttamille mendelistisesti periytyville sairauksille tyypilliset periytymismallit ovat autosomaalinen resessiivinen eli väistynä, autosomaalinen dominantti eli vallitseva ja X-kromosomiin kytkeytynyt malli. Periytyminen voi olla myös välimuotoista, jolloin heterotsygoottinen ilmenemismuoto on kahden homotsygootin välimuoto. (Mäki 2007)

Autosomaalisessa resessiivisessä periytymisessä alleelin säätelemä ominaisuus näkyy vasta, kun alleeli on homotsygoottisena. Ne yksilöt, joilla toinen alleeleista on mutatoitunut sairautta aiheuttava, ovat heterotsygoottisia taudin kantajia. Laskennallisesti kah-

den heterostygootin kantajan jälkeläisistä 25 % sairastuu. (Norio 2000) Autosomaalissa dominantissa periytymisessä sairauden ilmenemiseen riittää, että toinen alleeleista on sairautta aiheuttava. Dominantissa periytymismallissa kahden heterostygootin sairaan jälkeläisistä laskennallisesti 50 % sairastuu. (Mäki 2007)

X-kromosomiin kytkeytyneessä mallissa geeni sijaitsee X-kromosomissa. X-kromosomissa sijaitsevat mutaatiot voivat olla dominantteja tai resessiivisiä. Nartuilla X-kromosomeja on kaksi ja uroksilla yksi. Tästä johtuen nartulla, jolla resessiivistä sairautta aiheuttava alleeli on heterostygootisena, sairaus ei ilmene. Uros, jolla resessiivistä sairautta aiheuttava alleeli on X-kromosomissa, sairastuu, koska sillä ei ole toisen X-kromosomin geeniversiota suojanaan. (Mäki 2007)

#### 4.2 Koira geenitutkimuksen eläinmallina

Koira on hyödyllinen ja mielenkiintoinen eläinmalli lääketieteellisessä tutkimuksessa sen poikkeuksellisen monimuotoisen ilmiänsun, laajan geneettisen monimuotoisuuden ja ainutlaatuisen populaatiorakenteen vuoksi. Aggressiivinen kasvatustoiminta on johtanut sisäsiittoisten populaatioiden syntyyn, jossa perinnölliset sairaudet ovat päässeet yleistymään. (National Center for Biotechnology Information 2012) Olemassa olevat rodut ovat fenotyypiltään eli ilmiänsultaan vaihtelevia niin morfologian, fysiologian ja käyttäytymisen kannalta. Ainutlaatuinen jalostushistoria takaa mahdollisuuden tutkia näiden ominaisuuksien geneettistä taustaa. (Lindblad-Toh ym. 2005) Rodun sisällä yksilöt ovat geneettisesti ja ilmiänsultaan samanlaisia, mutta rotujen väliset erot ovat suuria. Esimerkkinä rotujen välinen geneettinen eroavuus on 27 %, kun ihmispopulaatioiden välinen ero on 5-10 %. Koiran ulkoasun ja käyttäytymisen monimuotoisuuden taustalla on suljetut populaatiot, jolloin geneettiset variaatiot ovat peräisin muutamasta perustajayksilöstä. (Wayne, Ostrander 2007)

Monilla koiraroduilla on samoja perinnöllisiä sairauksia kuin ihmisillä on yleisiä. Näitä sairauksia ovat esimerkiksi syövät, sydänsairaudet, nivelreuma, autoimmuunisairaudet, kuurous ja sokeus. (National Center for Biotechnology Information 2012) Ominaisuuksien kartoittamisessa koirilla on tärkeää löytää geneettiset muutokset sairauksien takana. Yleinen menetelmä on tehdä ns. genomien laajuinen assosiaatiotutkimus (Genome wide association study, GWAS) fenotyypiltään määritetyille sairaille ja kontrollinäytteille. GWAS-menetelmää on käytetty paikantamaan tautia aiheuttavia muutoksia yli 70:een mendelistisesti periytyvään sairauteen. Koirilla ja ihmisillä on useita samanlaisia

tai samankaltaisia sairauksia, ja tällaisen sairauden taustalla olevan geenivirheen tunnistaminen koiralla voi johtaa myös ihmisellä esiintyvän sairauden taustan selviämiseen. Monet sairaudet, jotka ovat ihmisillä harvinaisia tai monimutkaisia, saattavat olla yleisiä joillain koiraroduilla. Koirat ovat erityisen hyödyllisiä tunnistettaessa uusia ehdokasgeenejä sairauksien takana. (Boyko 2011) Geneettisten sairauksien syyt ovat helpommin jäljitettävissä koirien laajoista sukutauluista kuin ihmisten perheistä. Pentuekoot ovat koirilla suuria, ja pentueita tehdään useiden urosten ja narttujen välillä. Suuressa pentueessa perinnöllisen sairauden ilmeneminen on todennäköisempää kuin pienessä. (Kirkness ym. 2003)

Koe-eläimenä koira on arvokas välimuoto ihmisen ja hiiren välillä, joka lisää niin hiiren kuin koirankin hyödyllisyyttä eläinmallina. Vaikka ihminen ja hiiri ovat kehittyneet erilleen yhteisestä kantamuodosta myöhemmin kuin ihminen ja koira, on jrsijöiden nopea evoluutio aiheuttanut ihmisen ja hiiren perintötekijöihin suuremman eron kuin ihmisen ja koiran välillä on. Koiralla on ihmisen kanssa yhtäläisyyksiä, joita hiirellä ei ole. Näitä yhtäläisyyksiä ovat koiran suurempi koko, pitkäikäisyys ja käytös, jotka johtavat samankaltaisuuksiin fysiologisten elintoimintojen ja geneettisten sairauksien monimuotoisuudessa. Koira on myös elänyt ihmisen kanssa pidempään kuin mikään muu kotieläin. Tänä aikana koira on jakanut ihmisen kanssa niin ravinnon kuin elinympäristönkin. Molempien lajien kehitykseen on vaikuttanut ihmisen muutos metsästäjä-keräilijästä viljelijäksi. (Boyko 2011) Silmänsairauksia tutkittaessa koira on parempi mallieläin kuin hiiri, koska koiran silmän anatomia vastaa paremmin ihmisen silmää. Koska hiiri on pienikokoinen yöeläin, sen silmän toiminta ja anatomia poikkeavat ihmisen silmästä. Koirilla esiintyy myös samoja silmänsairauksia kuin ihmisellä.

## 5 Mahdolliset geenit retinan dysplasian ja lasiaisen rappeuman taustalla

### 5.1 Ehdokasgeenitutkimus

Ehdokasgeenitutkimus on nopea ja suhteellisen yksinkertainen lähestymistapa tutkia geenivarianttien vaikutusta fenotyyppiin eli ilmiasuun. Ehdokasgeenitutkimusta voisi kutsua ”harkituksi arvaukseksi”, jossa aiempien tietojen ja tutkimusten perusteella valitaan geeni tarkemman tutkimuksen kohteeksi. Ehdokasgeenitutkimuksella voidaan jo pienellä näytämäärällä saada tuloksia siitä, onko sairailta yksilöillä tapahtunut geenissä merkittäviä mutaatioita, joita voitaisiin tutkia lisää.

Ehdokasgeenitutkimuksen ensimmäinen vaihe on sopivan ehdokasgeenin valinta. Ehdokasgeeni on sellainen, jolla todennäköisesti on merkittävä rooli taudin tai ominaisuuden kehityksessä, ilmenemisessä tai säätelyssä. Valittava geeni on saatettu yhdistää aiemmin jollain toisella lajilla samaan tai samankaltaiseen sairauteen tai ominaisuuteen kuin tutkimuksessa. Ehdokasgeenin valinta on tärkeä vaihe, jotta tutkimuksesta saataisiin hyödyllisiä tuloksia. (Kwon, Goate 2000)

Ehdokasgeenitutkimukseen valitaan näytteiksi aluksi pienimäärä sairaita ja terveitä yksilöitä. Geenivarianttien eli muutosten löytämiseen käytetään yleensä sekvensointimenetelmiä. Geenivarianttien löytyessä tarkastellaan niiden esiintymistä sairaita ja terveissä periytymismallin mukaisesti. Esimerkiksi autosomaalisessa resessiivisessä periytymismallissa oletetaan, että sairautta aiheuttava mutaatio on kaikilla sairailta homotsygoottinen ja vanhemmat terveistä kantajia mutaatioiden suhteen. Terveet yksilöt voivat olla kantajia tai villityyppejä. Jos mutaatio esiintyy vain sairaita, sanotaan sen segregoituvan sairauden kanssa. (Kwon, Goate 2000)

Seuraavassa vaiheessa pyritään selvittämään bioinformatiikan keinon, mitkä variantit johtavat proteiinin rakenteen ja näin ollen sen toiminnan muutokseen. Proteiinin vaikutus tutkittuun ominaisuuteen tai sairauteen on myös selvitettävä. Ehdokasgeenitutkimus on varsin nopea tapa selvittää ja tunnistaa geenivariantin yhteyttä sairauteen. (Kwon, Goate 2000) Menetelmässä on kuitenkin useita rajoitteita: usein tutkitaan vain geenin proteiinia koodaavat alueet ja esimerkiksi tärkeät säätelyalueet jäävät selvittämättä.

Ehdokasgeenitutkimus on johtanut mm. koirien koon ja ulkomuodon vaihtelevuuden geneettisen perustan parempaan ymmärrykseen eri rotujen välillä. Yhdessä ensimmäisistä ehdokasgeenitutkimuksista tutkittiin kahden eri geenin vaikutusta kallon ja naaman muotoon koiran kallonkehityksen aikana. Tutkimuksessa toisessa geeneistä tavattu yhden aminohapon muutos yhdistyi selvästi lyhyeen ja leveään kallonmuotoon. Myös negatiivisia tuloksia, joissa tutkittu geeni ei vaikuttanut tutkittuun fenotyyppiin, on saatu ehdokasgeenitutkimuksessa. Hyvä esimerkki tästä on ihmisellä kääpiökasvuisuutta aiheuttava geeni (COL10A1), joka ei kuitenkaan vaikuttanut koiran kääpiökasvuisuuteen. (Wayne, Ostrander 2007)

Tähän työhön valittiin kaksi ehdokasgeeniä *TSPAN12* ja *PTPRZ1*, joissa mahdollisesti oleva mutaatio voisi aiheuttaa retinan dysplasiaa tai lasiaisen rappeumaa. Seuraavassa kuvataan geenien ominaisuuksia ja perustellaan niiden valintaa tässä työssä.

## 5.2 *TSPAN12*

*Tetraspanin-12 (TSPAN12)* -geenin koodaama proteiini kuuluu tetraspaninperheeseen, jonka proteiinit ovat solujen pintaproteiineja. Näillä proteiineilla on tyypillisesti neljä hydrofobista eli vettä hylkivää aluetta. Tetraspanin-perheen proteiinit toimivat signaalin välittäjänä solun säätelyssä, kehityksessä, aktivaatiossa, kasvussa ja liikkuvuudessa. (National Center for Biotechnology Information 2012)

*TSPAN12*-geenin mutaation on todettu aiheuttavan ihmisellä retinan dysplasiaa ja tulehduksellista lasiaisen rappeumaa (FEVR, familial exudative vitreoretinopathy). FEVR on klassinen yhden geenin mendelistisesti periytyvä sairaus, jossa sairauden vakavuus vaihtelee suuresti. Vakavassa tapauksessa potilas usein sokeutuu jo lapsuudessa. Lievemmissä tapauksissa potilailla on vähäisiä tai ei ole ollenkaan näkökyvyn ongelmia ja heillä sairaus huomataan usein vasta, kun lähisukulainen sairastuu vakavaan muotoon sairaudesta. J. A. Poulterin ym. tutkimuksessa osoitettiin, että potilaat, joilla oli kaksi mutatoitunutta alleelia, sairastuivat vakavaan tulehdukselliseen lasiaisen rappeumaan ja retinan dysplasiaan ja heterotsygoottisen mutaation omaavat potilaat sairastuivat vain taudin lievempään versioon. Tutkimuksessa pohdittiin, että FEVR-fenotyyppi saattaa olla riippuvainen *TSPAN12*-proteiinin määrästä. (Poulter ym. 2012)

Edellä mainitun tutkimuksen perusteella voidaan ajatella, että mutaatio *TSPAN12*-geenissä voisi olla amerikancockerspanielin retinan dysplasian tai italianvinttikoiran lasiaisen rappeuman takana, joten *TSPAN12*-geeni valittiin ehdokasgeeniksi retinan dysplasiaan ja lasiaisen rappeumaan. Koiralla ei ole vielä yhdistetty *TSPAN12*-geeniä yhteenkään sairauteen.

### 5.3 *PTPRZ1*

*PTPRZ1*-geenin (Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1) vaikutusta retinan kehittymisen aikana on tutkittu hiirillä. *PTPRZ1*-proteiinin rakenteen perusteella voidaan olettaa sen toimivan solukalvon molemmin puolin signalointikanavana. Horvat-Brockerin ym. tutkimuksessa tehtiin poistogeenisiä hiiriä, joilta *PTPRZ1*-geeni oli poistettu. *PTPRZ1*-geenin puutos vaikutti hermoston tukisolujen muodostumiseen, jotka eivät retinan kehityksen aikana kehittyneet ollenkaan, kun *PTPRZ1*-geeni ei ilmentynyt. *PTPRZ1*-geenin ei kuitenkaan todettu olevan osallisena retinan kerroksien eikä retinan solujen muodostumisessa, kun tuloksia verrattiin villityyppiin eli hiireen, jolla *PTPRZ1*-geeni oli. (Horvat-Brocker ym. 2008)

Amerikancockerspanieleilla muutokset retinassa eli verkkokalvolla tapahtuvat jo sikiönkehityksen aikana, ja verkkokalvo muodostuu virheellisesti, kuten *PTPRZ1*-poistogeenisillä hiirillä. Horvat-Brocker ym. tutkimuksen perusteella *PTPRZ1*-geeni voisi olla amerikancockerspanielien retinan dysplasian takana. *PTPRZ1*-geeniä ei ole yhdistetty koiralla esiintyviin sairauksiin aiemmin.

## 6 Sekvensointi geenitutkimuksen välineenä

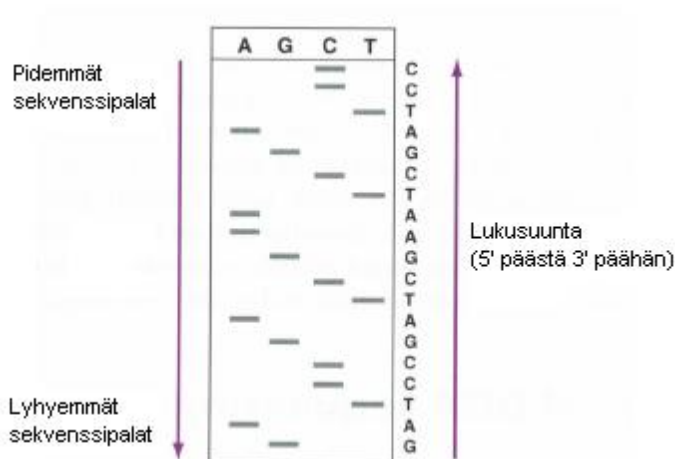
### 6.1 Sekvensoinnin historiaa ja perusteita

Vuonna 1975 sekvensointiin ensimmäinen kokonainen DNA-genomi, joka kuului pienelle bakteriofagille  $\phi$ X174 ja oli kooltaan 5 kb. Kaksi vuotta myöhemmin sekvensoitiin samankokoinen SV40-virus ja tästä kolmen vuoden kuluttua ihmisen mitokondrio, joka on pituudeltaan 16 kb. Vuonna 1995 sekvensointiin ensimmäinen kokonainen organismi *Haemophilus influenzae* -bakteeri (1800 kb). Tästä alkoi nopeasti kehittyvä koko-genomien sekvensoinnin aikakausi, jonka tärkeimpiä merkkipaaluja oli vuonna 2001 julkaistu ihmisen genomi. (Dale & von Schantz 2003) Sekvensointimenetelmät ja -tekniikat kehittyvät edelleen nopeasti.

Ensimmäisiä yleisesti käytössä olleita ja nykyisten sekvensointimenetelmien taustalla olevia ovat Sangerin ja Maxam-Gilbertin menetelmät. Maxam-Gilbertin menetelmä on kemiallinen. Menetelmä on työläs, ja siinä käytetään paljon myrkyllisiä kemikaaleja, minkä takia sitä käytettiin yleensä vain, mikäli muut menetelmät eivät toimineet. Sangerin menetelmä on entsyymaattinen, ja sen toiminta perustuu DNA-polymeraasin ja muokattujen nukleotidien (dideoksinukleotidit) käyttöön. (Törrönen 2006); (Dale & von Schantz 2003)

Sangerin menetelmä kehitettiin vuonna 1977 (Marziali & Akeson 2001). Siinä PCR-reaktioon käytetyt nukleotidit (dNTP) korvataan dideoksinukleotidilla (ddNTP). ddNTP:ien rakennetta on muokattu siten, että polymeraasi ei pysty liittämään sen perään uutta nukleotidiä, joten sekvenssi katkeaa ddNTP:n liittämisen jälkeen. Reaktioita on tehtävä neljä, joissa jokaisessa reaktiossa yksi nukleotideistä (dATP, dTTP, dGTP tai dCTP) on korvattu muokatulla ddNTP:llä. Jotta monistuminen voi tapahtua, on reaktioon lisättävä myös aluketta, kuten normaalissa PCR-reaktiossa. Reaktion aikana monistuu sattumanvaraisesti eripituisia sekvenssijaksoja. Sekvenssi voidaan päätellä reaktioiden jälkeen agarosigeelielektrofooresilla, kun eripituiset sekvenssit ovat kulkeutuneet eripituisen matkan. Jokaiselle neljälle reaktiolle on oma kaivonsa, jotta tiedetään mihin emäkseen sekvenssipätkät ovat päättyneet. Sekvenssi luetaan 5'-pästä 3'-päähän. (Kuva 7.) (Dale & von Schantz 2003)



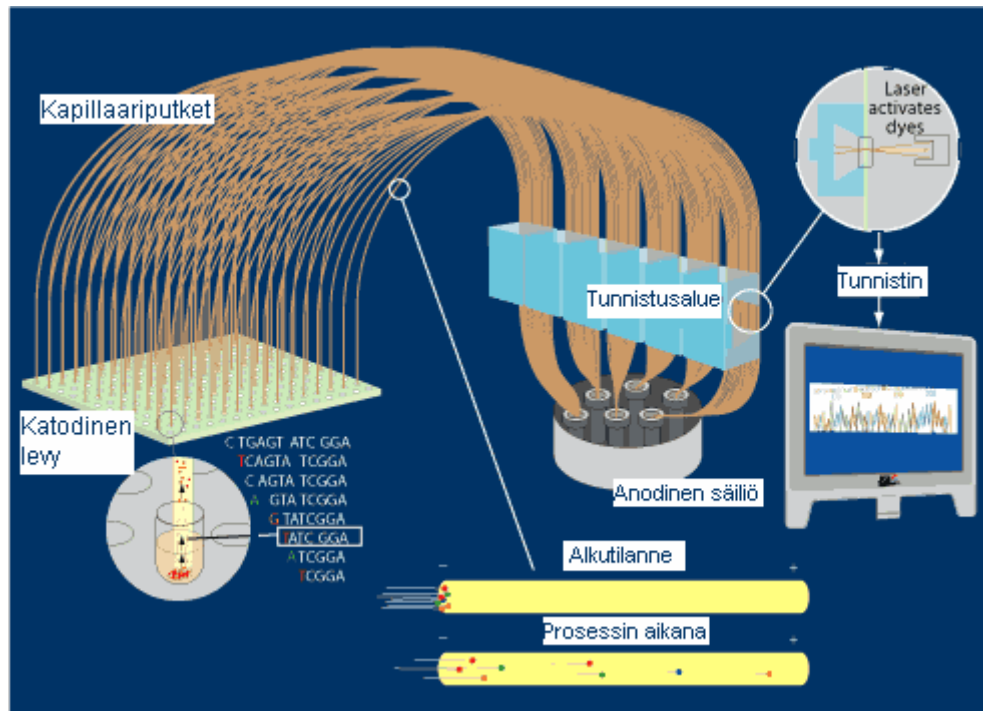


Kuva 7. Sekvenssin lukeminen agarosigeeliltä (muokattu lähteestä Dale, von Schantz 2003).

Sangerin menetelmän heikkous on se, että DNA:n pitäisi olla yksijuosteista. Sangerin menetelmää on kuitenkin kehitetty ja yhdistetty PCR:n kanssa. Näitä kahta menetelmää yhdistävää sekvensointia kutsutaan syklisteksi sekvensoinniksi, ja se on edelleen yleisesti käytössä. Siinä voidaan käyttää lähtöaineena kaksijuosteista DNA:ta, ja näyttää tarvitaan vähän, koska samaa lähtöjuostetta voidaan syntetisoida useaan kertaan. Syklisessä sekvensoinnissa käytetään vain yhtä aluketta kerrallaan, jotta vain toinen juoste polymerisoituu kerralla. (Törrönen 2006)

## 6.2 Automaattinen sekvensointi

Automaattisessa sekvensoinnissa sekvensointireaktiot ovat samankaltaisia kuin syklistä sekvensoinnissa, mutta emästen tunnistus tehdään toisin. Automaattinen sekvensointi hyödyntää sekvenssin lukemisessa fluoresoivien leimojen käyttöä, jotka korvaavat aiemmin käytettyjä radioaktiivisia leimoja. Jokaiselle nukleotidille on omalla aallonpituudella fluoresoiva leima. Sekvensointireaktioiden jälkeen reaktioseokset yhdistetään ja ajetaan automaattiseen sekvensointiin tarkoitetulla kapillaarielektroforeesilaitteella. Kapillaarielektroforeesi-laite havaitsee lasersäteiden avulla tunnistusalueen ohitse koko järjestyksessä kulkevat DNA-jaksot ja ilmoittaa sekvenssin suoraan (kuva 8). (Törrönen 2006)



Kuva 8. Kapillaarielektroforeesi (muokattu lähteestä Wikimedia Commons 2012). Sekvensointi-reaktioiden tuotteet kulkevat sähkövirran avulla katodiselta levyltä anodiselle säiliölle. Reaktiotuotteet ovat eripituisia, ja näin ollen lyhyet sekvenssin palat kulkevat nopeammin kuin pitkät prosessin aikana. Tunnistusalueella lasersäde tunnistaa fluoresoivalla värillä leimatut nukleotidit. Sekvenssi muodostuu tunnistettujen nukleotidien järjestyksestä. (Dale, von Schantz 2003)

Automaattinen sekvensointi on nopeuttanut yksittäisten emästen lukemista, tehnyt siitä luotettavampaa, ja isompia sekvenssejä pystytään käsittelemään kerralla. Automaattinen sekvensointi tuli kaupallisille markkinoille 1986, ja se oli merkittävä virstanpylväs sekvensoinnin alalla. Sekvensoinnin kehitys avasi uusia mahdollisuuksia ja johti ihmisen kokogenomin selvitykseen. Automaattista sekvensointia on käytetty myös laajalti geneettisen monimuotoisuuden selvitykseen. (Murray, Nguyen & Chen 2012) Tässä työssä sekvensointiin käytettiin 48-kapilaarista ABI3730xl-laitetta (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Sen toiminta perustuu automaattiseen sekvensointiin.

Automaattisen sekvensoinnin haasteena ovat DNA:ssa esiintyvät toistoajaksot ja pitkät yhden nukleotidin sarjat. Nukleotidien määrää jaksossa ei pystytä aina lukemaan oikein, kun monta samalla fluoresoivalla värillä leimattua nukleotidia ohittaa tunnistusalueen peräkkäin. Ongelmia saattaa tuottaa myös, kun DNA-juoste sitoutuu itseensä ja muodostaa niin sanottuja hiuspinnimutkia. Muodostelmat saattavat vaikeuttaa DNA-synteesiä tai geelijaota. Ongelmia voidaan ehkäistä vaihtelemalla reaktio-olosuhteita ja tekemällä päällekkäisiä monistuksia. (Dale, von Schantz 2003)

### 6.3 Syväsekvensointi

Syväsekvensointi (Next-generation sequencing, NGS) tarkoittaa uusimpia sekvensointimenetelmiä, joilla pystytään sekvensoimaan entistä pidempiä jaksoja sekvenssiä matalammilla kustannuksilla. Perinteisillä menetelmillä, kuten kapillaarisekvensoinnilla, voidaan selvittää muutaman tuhannen emäsparin pituisia sekvenssejä (Marziali, Akeson 2001). Syväsekvensointimenetelmillä on kerralla sekvensoitavan alueen pituutta voitu kasvattaa kattamaan koko genomi. Syväsekvensointimenetelmien selvimpiä eroja kapillaarisekvensointiin verratessa ovat ajoaika ja sekvenssin pituus. Syväsekvenssaattorit vaativat pitkiä ajoaikoja 8 tunnista jopa 10 päivään. Toisaalta yhdestä ajosta saatu sekvenssin pituus on sadoista tuhansista kymmeneen miljooniin emäspareihin. (Mardis 2008) Yleisesti käytössä olevia syväsekvenssaattoreita valmistavat mm. Roche, Illumina ja Applied Biosystems. NGS-tekniikat kehittyvät nopeasti, ja uusia menetelmiä kehitetään jatkuvasti.

## 7 Tutkimusmenetelmät

### 7.1 Näytteiden valinta

Työhön valittiin neljä eläinlääkärin tutkimaan ja diagnosoimaan retinan dysplasiaa sairastavaa amerikancockerspanieliä ja neljä lasiaisen rappeumaa sairastavaa italianvinttikoiraa. Sairaot koirat valittiin sukupuun perusteella niin, että yksilöillä on eri vanhemmat. Terveiksi kontrolleiksi valittiin neljä amerikancockerspanieliä ja neljä italianvinttikoiraa, joiden silmät oli tutkittu yli viisivuotiaana. Ehdokasgeenitutkimukseen jo neljä sairasta ja neljä tervettä näytettä on riittävä määrä. Oletuksena on, että pienessä populaatiossa kaikilla sairailta yksilöillä olisi sama mutaatio geenissä ja terveet olisivat mutaation heterotsygootteja kantajia tai villityypin edustajia. Mikäli mutaatioehdokka löydetäisiin, varmistettaisiin se seuraavaksi suuremmalla näytemäärällä.

Työssä käytettävät näytteet valittiin tutkimusryhmän 247 amerikancockerspanielinäytteestä ja 137 italianvinttikoiranäytteestä (tilanne 12.10.2012). Työssä analysoitiin DNA-näytteitä yhteensä 16 kappaletta. (Liite 1.) Näytteet on toimitettu tutkimusryhmälle kokoverenä, ja ne on pakastettu sellaisenaan tai DNA:ksi eristettynä. Tutkimusryhmän verinäytteet on kerätty yksityisten ihmisten omistamista lemmikkikoirista omistajien luvalla. Etelä-Suomen lääninhallitus on myöntänyt tutkimusryhmälle eettisen luvan (ESLH-2009-07827/Ym-23).

### 7.2 DNA:n eristäminen ja laimentaminen

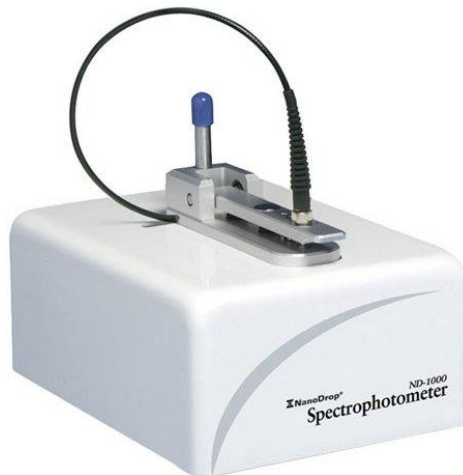
DNA:ta voidaan eristää monista eri kudoksista, verestä eristäminen on erittäin tehokas tapa saada puhdasta ja konsentraatioltaan hyvää DNA:ta. Tätä työtä varten analysoitavat DNA:t eristettiin EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo) -putkeen kerätystä kokoverestä Chemagic Magnetic Separation Module I (MSM I) -laitteella (Chemagen, Worcester, USA) (kuva 9). Eristystä varten tarvitaan 2 tai 3 ml verta. Kummallekin tilavuu-delle on laitteeseen ohjelmoitu omat ohjelmat, jotka eroavat toisistaan käytettävien reagenssien määrällä.



Kuva 9. DNA-eristyslaite, Chemagen Chemagic Magnetic Separation Module I (PerkinElmer 2012)

Chemagic MSM I on pitkälle automatisoitu DNA:n ja RNA:n eristykseen suunniteltu laite. Laitteen toiminta perustuu DNA:n magneettiseen erotukseen magnetisoituvien sauvojen ja magneettihiukkasten avulla. Ensimmäisessä vaiheessa verisolut hajotetaan proteinaasi-entsyymien avulla. Sen jälkeen magneettihiukkaset tarttuvat sauvoihin, ja ne siirretään verinäytteeseen. Magneetti kytkeytyy pois päältä, jolloin positiivisesti varautuneet magneettihiukkaset sitoutuvat negatiivisesti varautuneeseen DNA:han. Magneetti kytetään päälle ja hiukkasiin sitoutunut DNA siirretään sauvan avulla pesuvaiheeseen, jossa DNA puhdistetaan epäpuhtauksista pesupuskurin avulla. Pesuja suoritetaan useita riippuen eristysohjelmasta. Viimeisessä vaiheessa DNA eluoidaan eli liuotetaan puskuriin, jolloin magneettihiukkaset irtoavat DNA:sta. Kaikki eristyksessä tarvittavat puskurit ja liuokset ovat valmistajalta eikä niiden tarkkaa sisältöä ei kerrota. (PerkinElmer 2012)

Eluointiliuokseen konsentroituneen DNA:n pitoisuus mitattiin NanoDrop 1000 -spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (kuva 10). Sillä pystytään mittaamaan luotettavasti pitoisuuksia aina 3700 ng:aan/ $\mu$ l asti ilman, että näytettä tarvitsee laimentaa. Laite laskee konsentraation Beer-Lambertin yhtälöllä käyttäen aallonpituutta 260 nm ja ilmoittaa konsentraation yksikössä ng/ $\mu$ l. Mittauksessa käytetään aallonpituuksia 230 nm, 260 nm ja 280 nm. NanoDrop 1000 -laitteen optiselle silmälle pipetoidaan 1,5  $\mu$ l näytettä, joka pysyy silmällä pintajännityksen ansiosta. Optisen silmän vastakappale lasketaan ja silmien väliin muodostuu nestepylväs. Valolähteenä on sykkivä ksenonvalo, joka kulkee pylvään läpi. Spektrofotometri analysoi näytteen läpi kulkeneen valon. (Thermo Fisher Scientific 2008)



Kuva 10. NanoDrop 1000 -spektrofotometri. (Thermo Fisher Scientific 2008)

Eristetyt DNA-näytteet laimennettiin käyttöä varten pitoisuuteen 10 ng/μl, esimerkiksi näytteen 3 (liite 2) konsentraatio oli 307,84 ng/μl, se laimennettiin lisäämällä 6,50 μl näytettä 193,5 μl:aan BPC Grade -vettä (Sigma-Aldrich Finland Oy) (kaava 1). Liitteessä 2 on kaikkien näytteiden konsentraatiot ja laimennoslaskut.

$$c_1 V_1 = c_2 V_2 \quad (\text{Kaava 1})$$

$$V_1 = \frac{10 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} * 200 \mu\text{l}}{307,84 \text{ ng}/\mu\text{l}} = 6,50 \mu\text{l}$$

$c_1$  on alkukonsentraatio

$c_2$  on loppu konsentraatio

$V_1$  on pipetoitava tilavuus

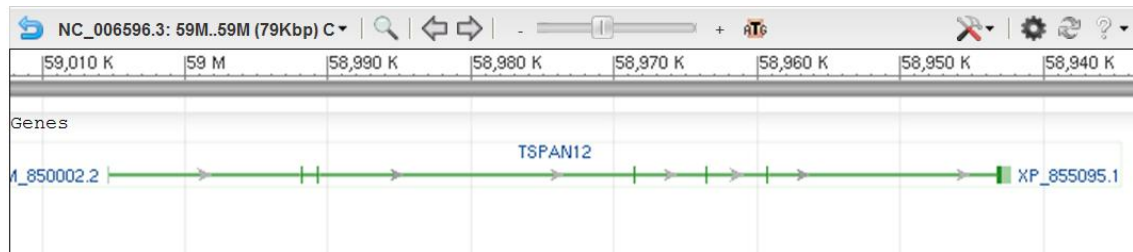
$V_2$  on loppu tilavuus

### 7.3 Polymeerasiketjureaktio (PCR)

#### 7.3.1 Alukkeiden suunnittelu

Tutkittavan *TSPAN12*-geenin sekvenssi etsittiin NCBI:n (National Center for Biotechnology Information) tietokannasta koiran genomista (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Geenit muodostuvat eksoneista eli koodaavista alueista ja introneista eli koodaamattomista alueista. Proteiinisynteesissä lähetti-RNA-synteesin jälkeen RNA-kopiosta silmukoidaan intronit pois ja jäljelle jäävät eksonit (Vaheeri 2008). Lähetti-RNA:n sekvenssi saatiin NCBI:stä ja se vietiin UCSC:n (University of California, Santa Cruz) BLAT-ohjelmaan (<http://genome.ucsc.edu/>), joka vertaa annettua sekvenssiä koiran koko genomiin. Näin voidaan varmistaa, että sekvenssi sijaitsee halutulla alueella. BLAT on

suunniteltu tunnistamaan ja vertaamaan yli 25 bp pituisia sekvenssejä genomiin nopeasti vähintään 95 % tarkkuudella. *TSPAN12*-geeni sijaitsee koiran kromosomissa 14, ja se koostuu seitsemästä eksonista (kuva 11).



Kuva 11. Kromosomissa 14 sijaitseva *TSPAN12*-geeni. Kuvassa eksonit näkyvät vihreällä viivalla pystypalkkeina. Mitä paksumpi palkki on, sitä pidempi on eksonijakso. Intronit sijaitsevat eksonien välissä. (National Center for Biotechnology Information 2012)

Jokaiselle *TSPAN12*-geenin eksonille (1-7) suunniteltiin kaksi aluketta. Toinen suunniteltiin eksonin alkupäähän (5'-pää), toinen aluke suunniteltiin eksonin loppupäähän (3'-pää) (taulukko 1). Alukkeet suunniteltiin tarttumaan DNA-juosteen intronialueelle, lähelle eksonia. PCR-menetelmällä monistetun DNA-jakson alku ja loppu ovat yleensä laadultaan huonompia, minkä takia alukkeet sijoitetaan tarttumaan eksonin ulkopuolelle, jotta koko eksoni monistuisi hyvin. Samalla sekvensoidaan ja analysoidaan mahdolliset eksonien silmukointiin vaikuttavat eksoni/intronikohdat. Tässä tapauksessa seitsemäs eksoni on kooltaan niin suuri, että se jaettiin kahteen osaan, jotta monistettavan DNA-jakson pituus ei olisi yli 800 bp. Varsinaiset alukkeet suunniteltiin Primer3-ohjelmalla (Rozen, Skaletsky 2000). Primer3-ohjelmaan syötettiin monistettava sekvenssi ja siihen merkittiin alue, jonka halutaan monistuvan. Ohjelma suunnittelee alukkeen merkityn alueen ulkopuolelle. Primer3-ohjelma antaa hakua varten valmiit parametrit mm. alukkeen koosta ja sulamislämpötilasta, joita tätä työtä varten ei muutettu. Alukepariksi valittiin ohjelman parhaaksi arvioima alukepari, joka ominaisuuksiltaan vastaa parhaiten annettuja parametreja.

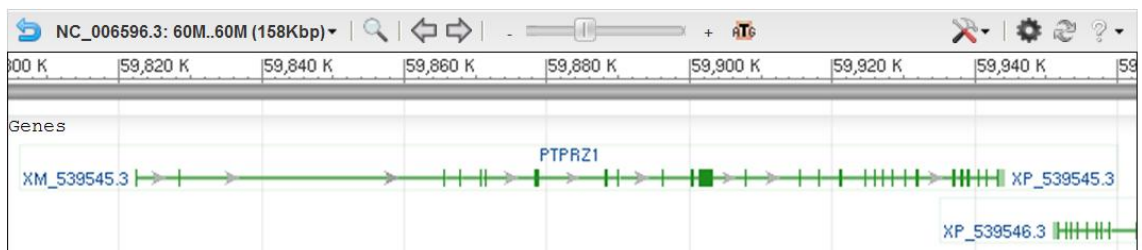
Taulukko 1. Suunnitellut alukkeet *TSPAN12*-geenin eksoneille. Alukkeet on nimetty siten, että *TSPAN12\_exon1\_F/R*-alukkeet on suunniteltu monistamaan eksonia 1, *TSPAN12\_exon2\_F/R*-alukkeet on suunniteltu monistamaan eksonia 2 jne.

<b><i>TSPAN12</i></b>	5'-	-3'	$T_m^*$ (°C)	Tuotteen koko (bp)	$T_a^*$ (°C)
<i>TSPAN12_exon1_F</i>	AAGGAGAAACGCTGTTCTGA		57,67	360	-
<i>TSPAN12_exon1_R</i>	GGAGCTAGGTCAAAGGCATGT		60,64	360	-
<i>TSPAN12_exon1_F_new</i>	TCGCCTTCTAGCCATCACTC		60,5	399	-
<i>TSPAN12_exon1_R_new</i>	ACTCCTGCGAAGAACAGAGG		59,6	399	-
<i>TSPAN12_exon2_F</i>	CACAGTTCCTGGGAAAAAGCA		60,27	353	60
<i>TSPAN12_exon2_R</i>	GTGCCGTACATGCAAGTGTC		60,19	353	60
<i>TSPAN12_exon3_F</i>	GGTTGAGGCGTGATGCTTTA		61,17	400	60
<i>TSPAN12_exon3_R</i>	CACAGGATGTTGAACAATTACCA		59,78	400	60
<i>TSPAN12_exon4_F</i>	GGTAGTGCCTCTGGCTCCT		59,42	264	60
<i>TSPAN12_exon4_R</i>	GACCCCATTCGGGTGAGT		60,75	264	60
<i>TSPAN12_exon5_F</i>	GCTTAATTAGGCCACACACAAA		59,19	382	60
<i>TSPAN12_exon5_R</i>	CCAGTGCTAACCGAATCACA		59,72	382	60
<i>TSPAN12_exon6_F</i>	AGCTCTGGGCACAAAAATGT		59,74	478	60
<i>TSPAN12_exon6_R</i>	GGGCCTTTATATTTAGACAGAAGA		57,25	478	60
<i>TSPAN12_exon7_1_F</i>	TTCGAGTTGTTTGGTTCCATT		59,46	629	60
<i>TSPAN12_exon7_1_R</i>	CATCTGCCCTCAGCATCATA		59,78	629	60
<i>TSPAN12_exon7_2_F</i>	GAGGAGACCGCAGAGTTGTT		59,45	699	56
<i>TSPAN12_exon7_2_R</i>	CAAAATTTATCCTTTTCACTCACAATG		60,16	699	56

\*  $T_a$  on alukkeen kiinnittymislämpötila, jota käytettiin PCR-reaktiossa.

\*  $T_m$  on alukkeen sulamislämpötila eli lämpötila, jossa kaksoisjuoste aukeaa.

Toinen tutkittava geeni, *PTPRZ1*, sijaitsee myös koiran kromosomissa 14. *PTPRZ1*-geeni muodostuu 30:stä eksonista (kuva 13). Alukkeet suunniteltiin samoin kuin edellä. Lista *PTPRZ1*-geenille suunnitelluista alukkeista on liitteessä 1. Alukkeet kummallekin geenille tilattiin Sigma-Aldrichiltä.



Kuva 13. Kromosomissa 14 sijaitseva *PTPRZ1*-geeni. Kuvassa eksonit näkyvät vihreällä viivalla pystypalkkeina. Mitä paksumpi palkki on, sitä pidempi on eksonijakso. Intronit sijaitsevat eksonien välissä. (National Center for Biotechnology Information 2012)



### 7.3.2 Toteutus

Alukkeet toimitettiin kuivattuna jauheena ja liuotettiin Tris-EDTA-puskuriin, valmistajan ohjeiden mukaan, pitoisuuteen 100  $\mu\text{M}$ . Aluke-liuoksesta tehtiin käyttölaimennos pitoisuuteen 5  $\mu\text{M}$ , lisäämällä 15  $\mu\text{l}$  alukelaimennosta 285  $\mu\text{l}$ :aan Sigma-Aldrichin BPC Grade –vettä (kaava 1). Alukkeiden toimivuus eli se, sitoutuuko aluke oikeaan kohtaan DNA:ssa ja monistuu oikean kokoista tuotetta, testattiin kontrollinäytteellä (taulukot 2 ja 3). Kontrollinäytteenä käytettiin yhtä tutkimusryhmän DNA-näytettä, jonka on jo aiemmin todettu monistuvan hyvin, jossa on hyvä konsentraatio ja jota on mahdollista saada lisää.

PCR-reaktiota varten pipetoitiin reaktioseos Biotoolsin polymeeraasi-entsyymillä (taulukko 2) ilman DNA-näytettä eppendorf-putkeen, josta se pipetoitiin 96-kuoppalevyille, minkä jälkeen näyte-DNA pipetoitiin kuoppalevyille. Samalle levyille pipetoitiin myös vesikontrollit, eli näyte-DNA korvattiin vedellä. Pipetoinnit suoritettiin jäällä polymeeraasientsyymien lisäämisen jälkeen. Kuoppalevy sentrifugoitiin ennen PCR-ajoa Centrifuge 5804 –sentrifugilla (Eppendorf, Hampuri, Saksa), jotta kaikki reagenssit painuvat kuoppalevyn pohjaan. Käytetyt PCR-laitteet olivat Thermal Cycler PTC-225 (MJ Research, St. Bruno, Kanada) ja T100 Thermal Cycler (BioRad, Hercules, Kalifornia, USA).

Taulukko 2. PCR-reaktioseos yhdelle reaktiolle.

PCR-reaktioseos	Pitoisuus	Tilavuus ( $\mu\text{l}$ )
Puskuri	10 x	2,4
$\text{MgCl}_2$	50 mM	0,8
dNTP	10 mM	0,48
F-aluke	5 $\mu\text{M}$	3,8
R-aluke	5 $\mu\text{M}$	3,8
DMSO	5 %	1,2
Polymeeraasi-entsyymi	5 U/ $\mu\text{l}$	0,2
Näyte-DNA	10 ng/ $\mu\text{l}$	2,4
$\text{H}_2\text{O}$		8,92
Yhteensä		24

PCR-ohjelmassa lämpötilanvaihdokset mahdollistavat polymeeraasientsyymien toiminnan ja DNA:n monistumisen. PCR-ohjelma suunniteltiin sisältämään 36 sykliä, joiden aikana DNA monistuu. Alukkeiden kiinnittymislämpötilana käytettiin 60 °C:ta. (Taulukko 3)

Taulukko 3. PCR-ohjelma. Vaiheet 2-4 toistettiin 35 kertaa ennen siirtymistä vaiheeseen 5.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika	
1	95°C	10 min	Alkudenaturaatio
2	95°C	30 s	Denaturaatio
3	60°C	30 s	Alukkeiden kiinnittyminen
4	72°C	60 s	Pidennysreaktio
5	72°C	10 min	Loppupidennysreaktio
6	8°C	∞	Loppulämpötila

Alukkeilla, joilla ei saatu monistettua PCR-tuotetta ohjelmalla (Taulukko 3), tehtiin PCR-reaktion optimointia. Optimointiin käytettiin gradientti PCR-menetelmää, jossa jokaisella 96-kuoppalevyn kahdellatoista sarakkeella on eri lämpötila, tässä 54 °C - 64 °C (taulukko 4). Gradientti PCR -menetelmässä jokaiselle vaakariville pipetoidaan samaa reaktioseosta ja näytettä, jolloin voidaan reaktiotuotteen muodostumisen määrän perusteella arvioida sopiva lämpötila reaktiolle. PCR-tuotteiden monistuminen tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla.

Taulukko 4. Gradientti PCR –menetelmässä käytetyt lämpötilat.

Kaivo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Lämpötila (°C)	54	54,3	54,9	55,7	56,8	58,3	60	61,7	62,5	63,3	63,8	64

*PTPRZ1*-geenien alukkeiden kyky monistaa haluttua PCR-tuotetta kokeiltiin Biotoolsin PCR-reaktioseoksella ja PCR-ohjelmalla (taulukot 2 ja 3). Alukkeiden *PTPRZ1\_exon12\_2* ja *PTPRZ1\_exon12\_3* monistaman alueen pituus on niin suuri (yli 800 bp) (Liite x), että alukkeiden toimivuus testattiin LongAmp Taq -polymeraasientsyymillä (New England BioLabs, Massachusetts, USA), joka on tarkoitettu pitkien PCR-tuotteiden monistamiseen. (taulukot 5 ja 3.)

Taulukko 5. PCR-reaktioseos yhdelle reaktiolle LongAmp Taq -polymeraasilla.

PCR-reaktioseos	Pitoisuus	Tilavuus ( $\mu$ l)
Puskuri	10 x	2,4
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,44
dNTP	10 mM	0,48
F-aluke	5 $\mu$ M	3,98
R-aluke	5 $\mu$ M	3,98
DMSO	5 %	1,2
Polymeraasi-entsyymi	5 U/ $\mu$ l	0,24
Näyte DNA	10 ng/ $\mu$ l	1,4
H <sub>2</sub> O		8,88
Yhteensä		24

#### 7.4 Agarosigeelielektroforeesi

Oikeiden PCR-tuotteiden monistuminen tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla. Vesinäytteiden tarkoituksena on nähdä, että tuotetta ei ole syntynyt ilman lisättyä DNA:ta eli kontaminaatiota ei ole tapahtunut. Geelinä käytettiin 1 % agarosigeeliä, joka valmistettiin Tris-boraatti-EDTA-puskurista (TBE-puskuri) ja agarosista (BioLine Reagents, Lontoo, Iso-Britannia), väriaineena käytettiin GelRed-väriainetta (Biotium, Hayward, Kalifornia, USA). Väriaine sitoutuu DNA:n emäsparien väliin konsentroituen DNA:ta sisältäviin vyöhykkeisiin, jolloin valaistaessa geeliä UV-valolla GelRed-väriaine fluoresoi punaisena ja DNA vyöhykkeet näkyvät.

Geelijon periaatteena on, että erikokoiset DNA-partikkelit kulkevat geelissä eripituisen matkan sähkövirran avulla. Negatiivisesti varautuneet DNA-partikkelit ajautuvat kohti positiivista sähkövarausta. Mitä suurempia partikkelit ovat, sitä lyhyemmän matkan ne kulkevat. (Halsas 2011) Agarosigeelielektroforeesia ajettiin 120 V virralla noin 40 minuutin ajan.

Geelille pipetoidaan aina myös kokostandardi, jonka avulla voidaan tunnistaa PCR-tuotteiden koko. Kokostandardia (GeneRuler Low Range DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ja latauspuskuriin sekoitettua PCR-tuotetta pipetoitiin 5  $\mu$ l kaivoihin, loput monistuneesta PCR-näytteestä puhdistettiin ja sekvensoitiin. Latauspuskurin on ajopuskuria (TBE-puskuri) raskaampaa, jolloin latauspuskuriin sekoitettu DNA-näyte painuu kaivon pohjaan ja antaa sille vihreän värin. (Halsas 2011)

## 7.5 Sekvensointi

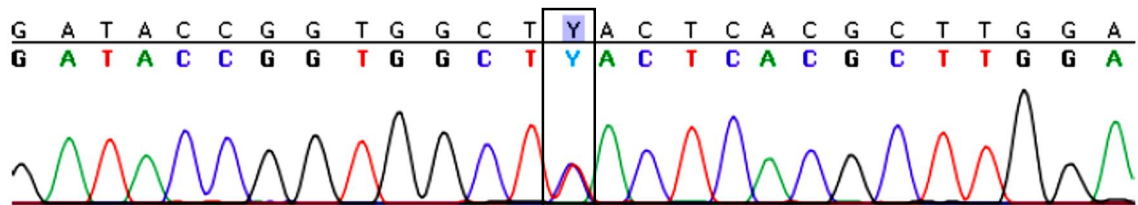
Ennen sekvensointia PCR-tuotteet puhdistettiin ExoSAP-IT-menetelmällä. ExoSAP-IT-käsittely poistaa käyttämättömät alukkeet ja nukleotidit eikä vahingoita PCR-reaktiotuotteita. Eksonukleaasi (20 U/μl) ja alkalifosfataasi (1 U/μl) (Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA) sekoitettiin käyttöä varten lisäämällä 25 μl eksonukleaasia 100 μl:aan alkalifosfataasiin. Seosta lisättiin 1,6 μl 5 μl:aan PCR-tuotetta, minkä jälkeen PCR-laitteella ajettiin ExoSAP-ohjelma (taulukko 6).

Taulukko 6. ExoSAP-PCR-ohjelma

Lämpötila	Aika	
37 °C	15 minuuttia	Entsyymireaktio
85 °C	15 minuuttia	Inaktivointi
8 °C	∞	Loppulämpötila

Puhdistettuun PCR-tuotteeseen lisättiin 1,6 μl 5'-päähän suunniteltua aluketta, jolla monistus oli suoritettu, sekvensointireaktioita varten. Sekvenssistä tulee siistimpi ja helpommin luettava, kun käytetään aluketta vain toisen pään aluketta. Sekvensointi toteutettiin kapillaarsekvensointina, jonka suoritti ostopalveluna Molekyyliiläketieteen tutkimusohjelman sekvensointilaboratorio (SeqLab, Biomedicum 2, Helsinki). Sekvensointi ostettiin Full Service -sekvensointina, jolloin sekvensointilaboratorio huolehtii kaikesta sekvensointireaktiosta ja tallentaa sekvenssin tietokantaan, josta sen voi ladata. Näytesarjojen sekvensointi suoritettiin sekvensointilaboratoriossa 48-kapillaarisella ABI3730xl instrumentilla (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). (Institute for Molecular Medicine Finland 2012)

Valmiit sekvenssit analysoitiin Sequencher-ohjelmalla. Ohjelma on suunniteltu DNA-sekvenssin kokoamiseen ja analysointiin. Ohjelmaan lisättiin sekvensoinnista saadut sekvenssit ja referenssisekvenssit, joita ohjelma vertaa ja merkitsee eroavaisuudet. (Gene Codes Corporation 2011) Referenssisekvenssi on NCBI:n tietokannasta haettu koiran *TSPAN12*-geenin ja *PTPRZ1*-geenin sekvenssi, riippuen monistetusta sekvenssistä. Ohjelma esittää sekvenssin myös kromatogrammeina (kuva 14), joissa yksittäiset nukleotidit esitetään erivärisinä piikkeinä.



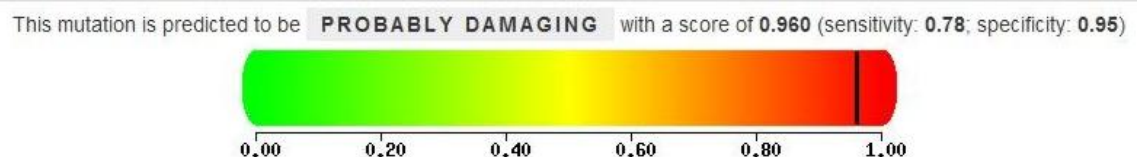
Kuva 14. Kromatogrammikuva Sequencher-ohjelmasta. Tässä esimerkissä yksi emäs on muuttunut tyimiinistä (T) sytosiiniksi (C). Muutos on heterotsygoottinen. Kuvassa neliöllä merkitty punainen ja sininen piikki kulkevat päällekkäin, jolloin kyseisessä kohdassa sekvenssissä on molemmat emäkset. Ohjelma käyttää heterotsygoottiseen T-C-muutoksen nimeämiseen kirjainta Y.

## 7.6 Ennustusohjelmat mutaation vaikutuksen arviointiin

Ennustusohjelmat toimivat apuna arvioimaan sekvenssissä olevan muutoksen vaihtaman aminohappo muutoksen vakavuutta valmistuvalle proteiinille. Tässä työssä käytettiin PolyPhen-2- ja SIFT-ohjelmia, jotka ovat avoimia internet-ohjelmia. Ohjelmat antavat ennustuksen visuaalisesti kuvana ja lukuarvona.

### *PolyPhen-2*

PolyPhen-2 on ohjelma, joka ennustaa mutaation mahdollisia vaikutuksia proteiinille, mikäli mutaation seurauksena aminohappo proteiinisekvenssissä muuttuu toiseksi. Ennustukset perustuvat useisiin ominaisuuksiin sekvenssissä ja muutoksen aiheuttamaan rakenteelliseen vaikutukseen proteiinissa. Muutokset arvioidaan asteikolla ”benign” eli suotuisa, ”possibly damaging” eli mahdollisesti haitallinen ja ”probably damaging” eli todennäköisesti haitallinen. Mikäli ohjelma ei datan puuttumisen takia pysty antamaan ennustusta, on tulos ”unknown” eli tuntematon. (Adzhubei ym. 2010)



Kuva 15. PolyPhen-2-ohjelman ennustus *TSPAN12* p.C182S-mutaatiosta. (Adzhubei ym. 2010)

Kuvassa 15 on nähtävillä, minkä näköisen ennustuksen PolyPhen-2-ohjelma antaa. Siinä on esitetty *TSPAN12*-proteiinissa tapahtunut muutos p.C182S, jonka ohjelma on ennustanut todennäköisesti haitalliseksi. Muutos on nimetty siten, että p. tarkoittaa pro-

teiniä ja C182S kysteiini (C, cysteine) -aminohapon muutosta paikalla 182 seriini (S, serine) -aminohapoksi.

### *SIFT*

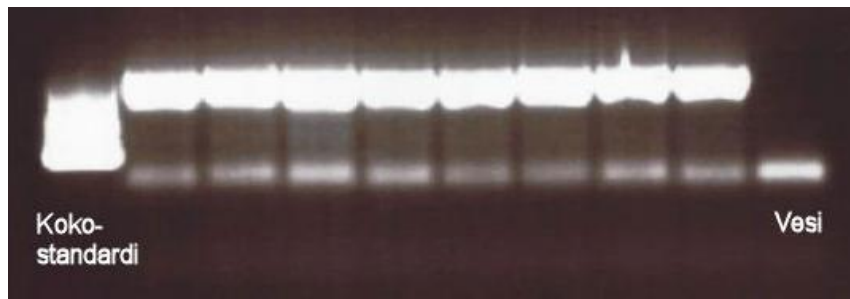
SIFT-ohjelma ennustaa, vaikuttaako aminohapon vaihdos proteiinin toimintaa. Ennustus perustuu olettamukseen, että proteiinin muodostuminen korreloi proteiinin toimintaan. SIFT-ohjelma käyttää muutoksen arviointiin lukuarvoa nolasta yhteen. Mikäli arvo on 0,05 tai pienempi, ennustaa ohjelma aminohappomuutoksen olevan "Not Tolerated" eli ei-sallittu, ja 0,05 suuremmat arvot ennustavat aminohappomuutoksen olevan "Tolerated" eli hyväksyttävä. (Ng, Henikoff 2003) SIFT antaa tuloksen listana, jossa on esillä kaikki proteiinin aminohapot, ja niiden vierellä lista hyväksyttävistä ja ei sallittavista aminohappomuutoksista.

## 8 Tulokset

### 8.1 Alukkeiden optimointi

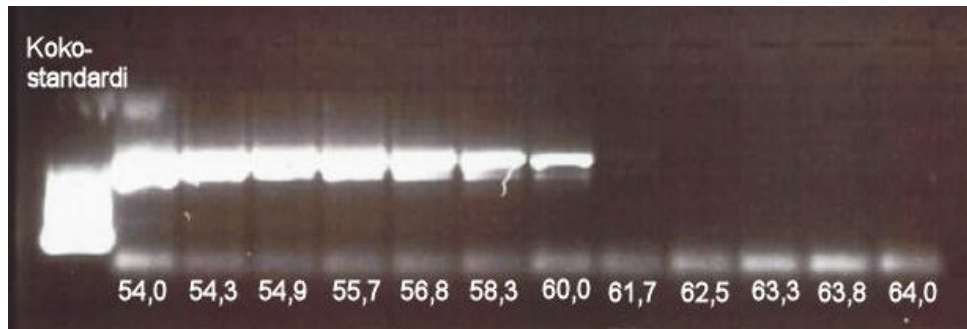
#### *TSPAN12-geenin PCR-reaktion optimointi*

PCR toimi eli monisti oikeaa PCR-tuotetta kaikilla *TSPAN12*-geenin alukkeilla, paitsi alukkeilla *TSPAN12\_exon1* ja *TSPAN12\_exon7\_2*. PCR-tuotteen monistuminen arvioitiin agarosigeelielektroforeesin avulla. Kuvassa 16 on monistettu amerikancockerspánieli näytteet alukkeilla *TSPAN12\_exon7\_2*, ja tuotteen koko on noin 700 emäsparia. Koon voi arvioida kokostandardin avulla. Valmistaja on ilmoittanut standardin koon emäspareissa.



Kuva 16. Onnistunut PCR-reaktio ja agarosigeelielektroforeesi-ajo

Alukkeille, joilla monistus ei onnistunut, testattiin uusia sopivampia alukkeiden kiinnityslämpötiloja gradientti PCR-menetelmällä. Gradientti PCR-menetelmässä jokaisella 96-kuoppalevyn kahdellatoista sarakkeella on eri lämpötila, tässä 54 °C - 64 °C (taulukko 4). Gradientti PCR:n perusteella *TSPAN12\_exon7\_2*:n sopiva alukkeiden kiinnityslämpötila oli 56 °C (kuva 17) ja tässä lämpötilassa suoritettiin PCR uudestaan (taulukot 2 ja 3). PCR-ohjelma pidettiin muuten täysin samanlaisena kuin taulukossa 3, mutta alukkeiden kiinnityslämpötila (vaihe 3) muutettiin 56 °C:seen. PCR-monistus onnistui tässä lämpötilassa, ja kaikki näytteet onnistuttiin sekvensoimaan.



Kuva 17. Gradientti PCR -reaktion jälkeen tehty agarosigeelielektroforeesi-ajo. Kuvassa on *TSPAN12\_exon7\_2* alukkeilla tehdyt gradientti PCR -reaktiot yhdellä vaakarivillä ja jokaisen kaivon lämpötila (°C).

*TSPAN12\_exon1* alukkeille kokeiltiin gradientti PCR-menetelmää myös käyttäen AmpliTaq Gold –polymeraasia (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA) (taulukot 5 ja 4). Tälläkään menetelmällä ei saatu monistetuksi eksonia 1. Eksonille 1 suunniteltiin uudet alukkeet, *TSPAN12\_exon1\_new* (taulukko 1), joilla tehtiin vastaavat PCR-reaktion optimointitestit, mutta eksonia ei pystytty monistamaan uusillakaan alukkeilla. Eksoni 1 sijaitsee GC-rikkaalla alueella, mikä vaikeuttaa monistamista. GC-rikkaat alueet sisältävät runsaasti G- ja C-nukleotidejä, jotka sitoutuvat toisiinsa voimakkaammin kuin T- ja A-nukleotidit ja niiden monistaminen PCR-menetelmällä on usein haastavampaa.

Eksonille 1 kokeiltiin myös GC-RICH PCR System -polymeraasia (Roche, Penzberg, Saksa) valmistajan ohjeen mukaan. Kyseinen polymeraasi on suunniteltu GC-rikkaiden alueiden monistamiseen, mutta sekään ei toiminut. Useiden yritysten jälkeen *TSPAN12*-geenin ensimmäistä eksonia ei onnistuttu monistamaan eikä näin ollen sekvenssoimaankaan. *TSPAN12*-geenistä pystyttiin kuitenkin monistamaan ja sekvenssoimaan kaikki muut eksonit onnistuneesti.

#### *PTPRZ1-geenin PCR-reaktion optimointi*

*PTPRZ1*-geenin monistamisessa oli ongelmia alukkeiden *PTPRZ1\_exon12\_1*, *PTPRZ1\_exon12\_2*, *PTPRZ1\_exon12\_3* ja *PTPRZ1\_exon\_24-25* kanssa. Taulukossa 7 on menetelmät, joita käytettiin PCR-reaktion optimointiin.



Taulukko 7. PTPRZ1-geenin PCR-reaktioiden optimointi. Suluissa on polymeeraasi-entsyymin valmistaja.

Alukepari	Gradientti PCR (Biotools)	LongAmp Taq, (BioLabs)	Long PCR (Fermentas)	GC-RICH PCR System (Roche)
<i>PTPRZ1_exon12_1</i>	ei toiminut	-	onnistui (60 °C)	-
<i>PTPRZ1_exon12_2</i>	ei toiminut	ei toiminut	ei toiminut	-
<i>PTPRZ1_exon12_3</i>	onnistui (55 °C)	ei toiminut	-	-
<i>PTPRZ1_exon24-25</i>	epäspesifisiä tuotteita	ei toiminut	epäspesifisiä tuotteita	ei toiminut

Gradientti PCR –menetelmää kokeiltiin kaikille alukepareille. *PTPRZ1*-geenin eksonin 12\_3 monistaminen onnistui Biotoolsin polymeeraasilla, käytettäessä alukkeiden kiinnitymisreaktiossa lämpötilaa 55 °C (taulukot 2 ja 6).

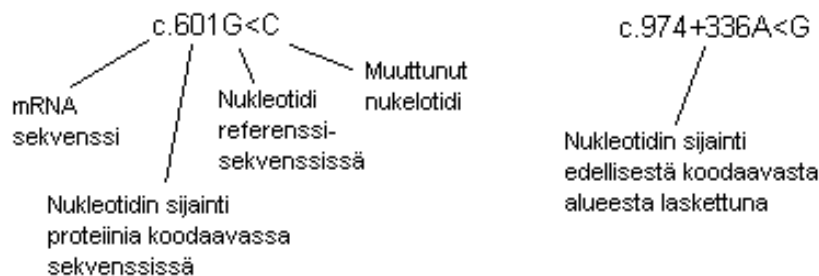
Eksonin 12\_1 monistaminen onnistui Long PCR -polymeeraasilla (Fermentas) (liite 6). Käytetty polymeeraasi on suunniteltu pitkien yli 800 bp DNA-jaksojen monistukseen. Sekvensoinnin jälkeen huomattiin kuitenkin, että sekvenssi oli monistunut väärästä kromosomista eli alukkeet olivat sitoutuneet muualle kuin oli suunniteltu.

Alukkeilla *PTPRZ1\_exon12\_2* ja *PTPRZ1\_exon\_24-25* ei onnistuttu monistamaan DNA-näytettä useista yrityksistä huolimatta. Eksoni 12 on pitkä eksoni, ja sen välissä on alue, jonka sekvenssiä eikä pituutta tiedetä. Tämä tuntematon alue hankaloittaa alukkeiden suunnittelua, toimivuutta ja PCR-monistusta. Eksonit 24 ja 25 sijaitsevat GC-rikkaalla alueella, minkä takia monistaminen on hankalampaa. *PTPRZ1*-geenistä onnistuttiin monistamaan kaikki muut eksonit onnistuneesti. Sekvenssit olivat hyvin onnistuneita ja niiden analysointi Sequencher-ohjelmalla onnistui.

## 8.2 Muutokset sekvensseissä

### 8.2.1 Muutokset eksoneissa

Sekvensoinnin tulokset analysoitiin Sequencher-ohjelmalla. DNA-sekvenssiä verrattiin referenssisekvenssiin eli koiran genomiin. Referenssisekvenssi on haettu NCBI:n tietokannasta. Variantteja löytyi useita, ja taulukko siitä, miten ne jakautuivat sairaiden ja kontrollien välille on liitteessä 7. Taulukkoon on kirjattu geenin nimi, mutaatiolle annettu nimi, proteiinissa mahdollisesti tapahtunut muutos, ennustusohjelmien antamat arviot muutoksesta ja mutaatiomuodon jakautuminen sairaiden ja terveiden välillä. Mutaatiot on nimetty yleisten nimeämiskäytänteiden mukaisesti (kuva 18).



Kuva 18. Mutaation nimeäminen. Kuvassa on esimerkit eksonisesta ja intronisesta mutaatiosta ja niiden nimeämisestä.

Eksoniin osuvia muutoksia oli vain muutama. *TSPAN12*-geenistä löytyi yksi mutaatio eksonista, joka muuttaa aminohapon toiseksi. *PTPRZ1*-geenissä aminohapon muuttavia mutaatioita löytyi kolme. (Taulukko 8.) Muutokset eivät kuitenkaan esiinny pelkästään sairailta yksilöillä, mikä oli tutkimushypoteesimme resessiivisesti periytyvässä sairaudessa. Koska mutaatioita löytyi myös terveiltä yksilöiltä, mutaatiot eivät todennäköisesti ole näin osallisena retinan dysplasiassa tai lasiaisen rappeumassa. Mutaatioiden vakavuutta proteiinin muodostumiselle arvioitiin ennustusohjelmilla SIFT ja PolyPhen-2. Molemmat ohjelmat arvioivat aminohappojen vaihdokset yhdenmukaisesti haitallisiksi tai merkityksettömiksi.

Taulukko 8. Kaikki eksoniset mutaatiot, jotka aiheuttavat proteiinisekvenssissä aminohaponmuutoksen ja ennustusohjelmien antamat ennustukset muutoksen vakavuudelle proteiinin toimintaa ajatellen.

Geeni	Mutaatio	Proteiinin muutos	Ennustus SIFT	Ennustus PolyPhen-2	Sairaat				Kontrollit			
					Homotsygootti	Heterotsygootti	Villittyoppi	Yht.	Homotsygootti	Heterotsygootti	Villittyoppi	Yht.
<i>TSPAN12</i>	c.601G<C	p.C182S	Not tolerated	Probably damaging, 0,960	0	0	4	4	1	0	3	4
<i>PTPRZ1</i>	c.287A<G	p.K96T	Not tolerated	Probably damaging, 0.996	0	2	2	4	2	1	1	4
<i>PTPRZ1</i>	c.620A<G	p.N207S	Not tolerated	Probably damaging, 1.000	0	4	0	4	0	4	0	4
<i>PTPRZ1</i>	c.4445T<C	p.V1482A	Tolerated	Unknown	0	2	2	4	0	2	2	4

### 8.2.2 Muutokset introneissa

Sekvenssissä oli useita pistemutaatioita intronialueilla, jotka monistuivat PCR-reaktiossa, koska alukkeet oli suunniteltu kattamaan eksonien ympäriltä introniakin. Muutokset eivät kuitenkaan jakautuneet selvästi sairaiden ja terveiden välille. Yhdenkään intronisen mutaation lokus eli sijainti ei ollut eksonin välittömässä läheisyydessä. Oletettavasti yksikään näistä muutoksista ei ole merkityksellinen geenin toiminnan ja siten retinan dysplasian tai lasiaisen rappeuman kannalta. Lista kaikista muutoksista amerikancockerspanieleilla ja italianvinttikoirilla on liitteessä 7.

### 8.3 Huomioita sukupuusta

Sukupuissa neliöillä on merkitty uroskoiria ja ympyröillä naaraskoiria. Mustat ympyrät ja neliöt ovat sairaita ja valkoiset terveitä. Punaisella nuolella on merkitty tässä työssä näytteinä käytetyt sairaat yksilöt. (Liitteet 3 ja 4.)

Amerikancockerspanielien sukupuussa on mukana 47 sairasta koiraa. On kuitenkin huomioitava, että kaikkien koirien silmiä ei ole tutkittu, joten sairaita koiria voi olla enemmän. MacMillanin tutkimuksessa sairaista vanhemmista syntyneet pennut sairastuivat kaikki retinan dysplasiaan. (MacMillan, Lipton 1978) Sukupuussa on yksi pentue, jonka molemmat vanhemmat sairastavat retinan dysplasiaa. Pentue on ympyröity sukupuuhun. Tästä pentueesta vain yhden koiran silmät on tutkittu, ja tämä yksilö sairast-

taa retinan dysplasiaa. On myös huomiota herättävää, että mikäli sairas koira on saanut jälkeläisiä, on retinan dysplasiaan sairastuneita jälkeläisiä viimeistään kolmannessa sukupolvessa. Nämä huomioit puoltavat tutkimuksessa esitettyä resessiivisesti periytyvää tautimallia.

Italianvinttikoirien sukupuussa on myös 47 sairasta koira, eikä kaikkien koirien silmiä ole tutkittu. Lasiaisen rappeuma ilmenee kuitenkin usein koiran vanhetessa, ja silmätutkimuksia olisi tehtävä säännöllisesti. Sukupuussa on kaksi pentuetta, joiden molemmat vanhemmat sairastavat lasiaisen rappeumaa. Pentueet on ympyröity sukupuuhun. Molemmilla pentueilla on sama isä. Toisessa pentueessa on kaksi koira, joista toinen sairastaa lasiaisen rappeumaa ja toista ei ole tutkittu. Toisessa pentueessa on yksi koira ja sen silmät on tutkittu ja todettu terveeksi. Lasiaisen rappeumaa sairastavilla italianvinttikoirilla, jotka ovat saaneet jälkeläisiä, on jälkeläisistä viimeistään toisessa sukupolvessa lasiaisen rappeumaa. Sukupuun perusteella ei pysty määrittämään sairauden periytymismallia, mutta sairauden yleisyyttä italianvinttikoirilla se kuvastaa hyvin. Jos periytymismalli on peittyvä, sairaiden vanhempien jälkeläiset ovat kaikki myös sairaita. Muut geenit tai ympäristötekijät saattavat kuitenkin vaikuttaa mutaation penetranssiin, niin että geneettisesti sairas yksilö ei sairastu.

## 9 Yhteenveto

Insinöörityössä selvitettiin kahden ehdokasgeenin mahdollista osuutta amerikkaiskockerspanielien retinan dysplasiaan ja italianvinttikoirien lasiaisen rappeumaan. Ehdokasgeeneistä ei löytynyt selkeää muutosta, joka olisi sairauksien taustalla. *TSPAN12*-geenistä jäi kuitenkin monistamatta ja sekvensoimatta eksoni 1, *PTPRZ1*-geenistä jäivät monistamatta ja sekvensoimatta eksonit 24 ja 25 sekä osittain eksoni 12, koska alukepareja ja PCR-ohjelmaa ei onnistuttu optimoimaan niin, että kyseiset alueet olisivat monistuneet. Mahdollinen mutaatio voi sijaita jossain näistä monistamatta ja sekvensoimatta jääneillä alueilla. Tämän takia kumpaakaan geeniä ei voida vielä täysin pois sulkea tutkimuksista niiden koodaavien alueiden osalta. Optimointia geenien monistamisen onnistumiseksi täytyy vielä jatkaa, jotta kaikki eksonit saataisiin sekvensoitua ja analysoitua.

On mahdollista, että mutaatio on koodaavien alueiden ulkopuolella esimerkiksi geenin säätelyalueella eikä niitä tässä työssä tutkittu. Mikäli geenilöytö tehtäisiin, jatkettaisiin tutkimusta mahdollisen geenitestin syntymiseen asti. Kun jäljelle jääneet analysoimattomat alueet on saatu käsiteltyä, tiedetään, onko kummassakaan geenissä mutaatiota, joka voisi olla yhteydessä retinan dysplasiaan tai lasiaisen rappeumaan. Mikäli mutaatio löytyy, kannattaa tutkimusta mutaation parissa jatkaa varmistamalla se isomassa aineistossa ja toiminnallisen karakterisaation avulla. Jos kummastakaan geenistä ei löydy merkittäviä muutoksia, voidaan nämä sulkea pois tutkimuksista molempien sairauksien kohdalla ainakin koodaavien alueiden osalta. Säätely- ja muiden geenin ulkopuolisten alueiden kartoittaminen on kuitenkin haastavampaa. Tutkimusta voi jatkaa uusien ehdokasgeenien kartoittamisella tai perimänlaajuisella geenipaikannuksella mikrosirujen avulla.

Käytännön ongelmia tuli vastaan vanhojen PCR-laitteiden käytössä, muutama PCR-monistus epäonnistui laitevian takia, ja ryhmälle onkin jo ostettu uudet laitteet. Uudet laitteet takaavat tasaisemman monistustuloksen sekä helpottavat ja nopeuttavat töiden tekoa.

Tietämys koirien geneettisistä sairauksista on lisääntynyt valtavasti, ja geenitestejä on kehitetty sairauksien tunnistamiseen. Koiranjalostuksen haasteita ovat kuitenkin edelleen samojen sukulinjojen yksipuolinen käyttö, joka johtaa geenien poistumiseen roduista ja koirien sukulaistumisen. Sukulaistuminen puolestaan johtaa sisäsiitokseen,

joka heikentää lisääntymiskykyä, laskee elinvoimaisuutta, ja luonnollisen variaation vähetessä perinnölliset sairaudet tulevat esiin. Koirien perinnöllisistä sairauksista puhutaan nykyään enemmän ja perinteisille jalostustavoille on etsitty vaihtoehtoja. Jalostuksessa geneettisen monimuotoisuuden säilymisen kannalta yksilöt, jotka ovat mahdollisimman vähän sukua muiden rodun koirien kanssa, ovat arvokkaimpia. Geenitestejä voidaan käyttää jalostuksen apuna.

### **Kiitokset**

Haluan kiittää tutkimusryhmänjohtajaa Hannes Lohta mahdollisuudesta tehdä insinööri-työni hänen ryhmässään ja työskennellä kiinnostavan aiheen parissa sekä oppia molekyylibiologian laboratorion menetelmiä ja käytäntöjä. Tutkija Saija Ahosta haluan kiittää työni ohjauksesta ja korvaamattomista neuvoista ja vinkeistä niin laboratoriossa kuin kirjoitusvaiheessakin. Kiitokset osoitan myös kaikille koiranomistajille näytteiden toimitamisesta tutkimusta varten ja tutkimusta osaltaan rahoittaneelle Jane ja Aatos Erkon Säätiölle. Suurkiitokset myös koulutusohjelman assistentille Liisa Heikkilälle, joka auttoi ja kannusti niin opintojen aikana, insinööriöpaikkaa etsiessä kuin valmistumisen yhteydessäkin.

## Lähteet

- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S. & Sunyaev, S.R. 2010. "A method and server for predicting damaging missense mutations". *Nature methods*. vol. 7, nro. 4, s. 248-249.
- Amerikancockerspanielit ry 2012. Verkkodokumentti. <<http://www.amerikancockerspanielit.com>>. Luettu 30.8.2012.
- Boyko, A.R. 2011. "The domestic dog: man's best friend in the genomic era". *Genome biology*. vol. 12, nro. 2, s. 216.
- Dale, J.W. & von Schantz, M. 2003. *From genes to genomes: Concepts and applications of DNA technology*. John Wiley & Sons Ltd., England.
- Fédération Cynologique Internationale 2012. Verkkodokumentti. <<http://www.fci.be>>. Luettu 28.8.2012.
- Gelatt, K.N. 2007. *Veterinary Ophthalmology, Fourth Edition edn*, Blackwell Publishing. Iowa, USA.
- Gene Codes Corporation 2011. *Sequencher® version 5.0 sequence analysis software*. <<http://www.genecodes.com>>. Luettu 31.8.2012.
- Halsas, M. 2011. *Biokemia 2. Opetusmateriaalit*. Metropolia Ammattikorkeakoulu.
- Haug, E., Sand, O. & Sjaastad, O.V. 2007. *Ihmisen fysiologia. Suomentanut Kirsi Sillman. 1-3. painos*, WSOY.
- Horvat-Brocker, A., Reinhard, J., Illes, S., Paech, T., Zoidl, G., Harroch, S., Distler, C., Knyazev, P., Ullrich, A. & Faissner, A. 2008. "Receptor protein tyrosine phosphatases are expressed by cycling retinal progenitor cells and involved in neuronal development of mouse retina". *Neuroscience*. vol. 152, nro. 3, s. 618-645.
- Institute for Molecular Medicine Finland 2012. Verkkodokumentti. <<http://www.fimm.fi/en/technologycentre>>. Luettu 22.8.2012.
- Italian Greyhound Club of America 2012. Verkkodokumentti. <<http://www.italiangreyhound.org>>. Luettu 22.8.2012.
- Kirkness, E.F., Bafna, V., Halpern, A.L., Levy, S., Remington, K., Rusch, D.B., Delcher, A.L., Pop, M., Wang, W. & Fraser, C.M. 2003. "The dog genome: survey sequencing and comparative analysis". *Science*, vol. 301, nro. 5641, s. 1898-1903.
- Kwon, J.M. & Goate, A.M. 2000. "The candidate gene approach". *Alcohol Research and Health*. vol. 24, nro. 3, s. 164-168.
- Laburyère, J.J., Hartley, C., Rogers, K., Wetherill, G., McCONNELL, J. & Dennis, R. 2008. "Ultrasonographic evaluation of vitreous degeneration in normal dogs". *Veterinary Radiology & Ultrasound*. vol. 49, nro. 2, s. 165-171.

- Lewin, B. 2008. Genes IX. Jones and Bertlett Publishers. Massachusetts, USA.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J.L., Kulbokas, E.J. & Zody, M.C. 2005. "Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog". *Nature*, vol. 438, nro. 7069, s. 803-819.
- Lohi, H. 2012. Koirien geenitutkimusryhmän kotisivut. <[www.koirangeenit.fi](http://www.koirangeenit.fi)>. Luettu 13.9.2012.
- MacMillan, A. & Lipton, D. 1978. "Heritability of multifocal retinal dysplasia in American Cocker Spaniels". *Journal of the American Veterinary Medical Association*. vol. 172, nro. 5, s. 568.
- Mäki, K. 2007. Päivitetty 5.1.2009. Geenitesteistä apua koiranjalostukseen - kaikkia ongelmia ne eivät kuitenkaan ratkaise. <<http://katariinamaki.com/artikkelit/Geenitestit.htm>>. Luettu 21.9.2012.
- Mardis, E.R. 2008. "Next-generation DNA sequencing methods". *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* vol. 9, s. 387-402.
- Marziali, A. & Akeson, M. 2001. "New DNA sequencing methods". *Annual Review of Biomedical Engineering*. vol. 3, nro. 1, s. 195-223.
- Murray, V., Nguyen, T.V. & Chen, J.K. 2012. "The Use of Automated Sequencing Techniques to Investigate the Sequence Selectivity of DNA-Damaging Agents". *Chemical Biology & Drug Design*.
- Näkövammaisten Keskusliitto ry 2012. Verkkodokumentti. <[www.nkl.fi](http://www.nkl.fi)>. 24.9.2012.
- National Center for Biotechnology Information 2012. Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Luettu 3.9.2012.
- Ng, P.C. & Henikoff, S. 2003. "SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function". *Nucleic acids research*. vol. 31, nro. 13, s. 3812-3814.
- Norio, R. 2000. Suomi-neidon geenit. Keuruu, Otava.
- PerkinElmer. 2012. Chemagic Magnetic Separation Module I. <<http://www.chemagen.com/chemagic-msm-i.html>>. Luettu 4.7.2012.
- Pirkola, T. 2011. Fysiologia ja nutrigenomiikka. Opetusmateriaalit. Metropolia Ammattikorkeakoulu.
- Poulter, J.A., Davidson, A.E., Ali, M., Gilmour, D.F., Parry, D.A., Mintz-Hittner, H.A., Carr, I.M., Bottomley, H.M., Long, V.W., Downey, L.M., Sergouniotis, P.I., Wright, G.A., MacLaren, R.E., Moore, A.T., Webster, A.R., Inglehearn, C.F. & Toomes, C. 2012. "Recessive mutations in TSPAN12 cause retinal dysplasia and severe familial exudative vitreoretinopathy (FEVR)". *Investigative ophthalmology & visual science*. vol. 53, nro. 6, s. 2873-2879.



- Rozen, S. & Skaletsky, H. 2000. "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers". *Methods Mol Biol.* vol. 132, nro. 3, s. 365-386.
- Schoster, J. 2012. Vitreous Degeneration Study. Verkkodokumentti. <[http://www.schostercerf.com/Animal\\_Eye\\_Consultants\\_of\\_Minnesota/Vitreous\\_Degeneration\\_Study.html](http://www.schostercerf.com/Animal_Eye_Consultants_of_Minnesota/Vitreous_Degeneration_Study.html)>. Luettu 26.9.2012.
- Suomen italiaanot ja cirnecot ry 2012. Verkkodokumentti. <<http://sic.fi>>. Luettu 2.8.2012.
- Suomen Kennelliitto 2012. Verkkodokumentti. <<http://www.kennelliitto.fi/fi>>. Luettu 28.8.2012.
- Thermo Fisher Scientific 2008. NanoDrop 1000 Spectrophotometer User's manual. Verkkodokumentti. <<http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>>. Luettu 20.8.2012.
- Törrönen, K. 2006. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sekvensointi/2/>>. Luettu 17.9.2012.
- Vaheri, M. 2008. Biokemia 1. Opetusmateriaalit. Metropolia Ammattikorkeakoulu.
- Wayne, R.K. & Ostrander, E.A. 2007. "Lessons learned from the dog genome". *Trends in Genetics.* vol. 23, nro. 11, s. 557-567.
- Wayne, R.K. & Ostrander, E.A. 1999. "Origin, genetic diversity, and genome structure of the domestic dog". *BioEssays,* vol. 21, nro. 3, s. 247-257.
- Wikimedia Commons 2012. Verkkodokumentti. <[commons.wikimedia.org](http://commons.wikimedia.org)>. Luettu 18.9.2012.

**Linkit**

NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
UCSC BLAT	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>
Sequencher 5.0	<a href="http://www.genecodes.com">http://www.genecodes.com</a>
PolyPhen-2	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
SIFT BLink	<a href="http://sift.jcvi.org/www/SIFT_BLink_submit.html">http://sift.jcvi.org/www/SIFT_BLink_submit.html</a>

**Taulukko näytteistä**

A = Amerikancockerspanieli

IT = Italianvinttikoiraa

RD = Retinan dysplasia

Näyte	Rotu	Syntymäaika	Sukupuoli	Status	Ikä silmätutkimuksessa*	Tutkimustulos
1	A	30.9.2004	uros	sairas	2,5 vuotta	RD, multifokaali
2	A	18.12.2000	uros	sairas	5,5 vuotta	RD, multifokaali
3	A	30.8.2005	uros	sairas	2,5 vuotta	RD, multifokaali
4	A	1.9.2007	naaras	sairas	2 vuotta	RD, multifokaali
5	A	8.6.2000	naaras	kontrolli	10 vuotta	Ei perinnöllisiä silmäsairauksia
6	A	9.5.2002	uros	kontrolli	8,5 vuotta	Ei perinnöllisiä silmäsairauksia
7	A	12.7.2003	naaras	kontrolli	7,5 vuotta	Ei perinnöllisiä silmäsairauksia
8	A	16.10.2001	uros	kontrolli	7 vuotta	Ei perinnöllisiä silmäsairauksia
9	IT	5.11.2001	uros	sairas	9,5 vuotta	Lasiaisen rappeuma
10	IT	8.2.2009	uros	sairas	2 vuotta	Lasiaisen rappeuma
11	IT	29.10.2003	naaras	sairas	7 vuotta	Lasiaisen rappeuma
12	IT	11.8.2009	uros	sairas	2 vuotta	Lasiaisen rappeuma
13	IT	10.5.2002	naaras	kontrolli	9,5 vuotta	Ei perinnöllisiä silmäsairauksia
14	IT	21.9.2004	naaras	kontrolli	5 vuotta	Ei perinnöllisiä silmäsairauksia
15	IT	30.11.2004	naaras	kontrolli	6,5 vuotta	Ei perinnöllisiä silmäsairauksia
16	IT	27.11.2004	naaras	kontrolli	7,5 vuotta	Ei perinnöllisiä silmäsairauksia

\* Sairauden toteamisikä tai ikä viimeisimmässä silmätutkimuksessa

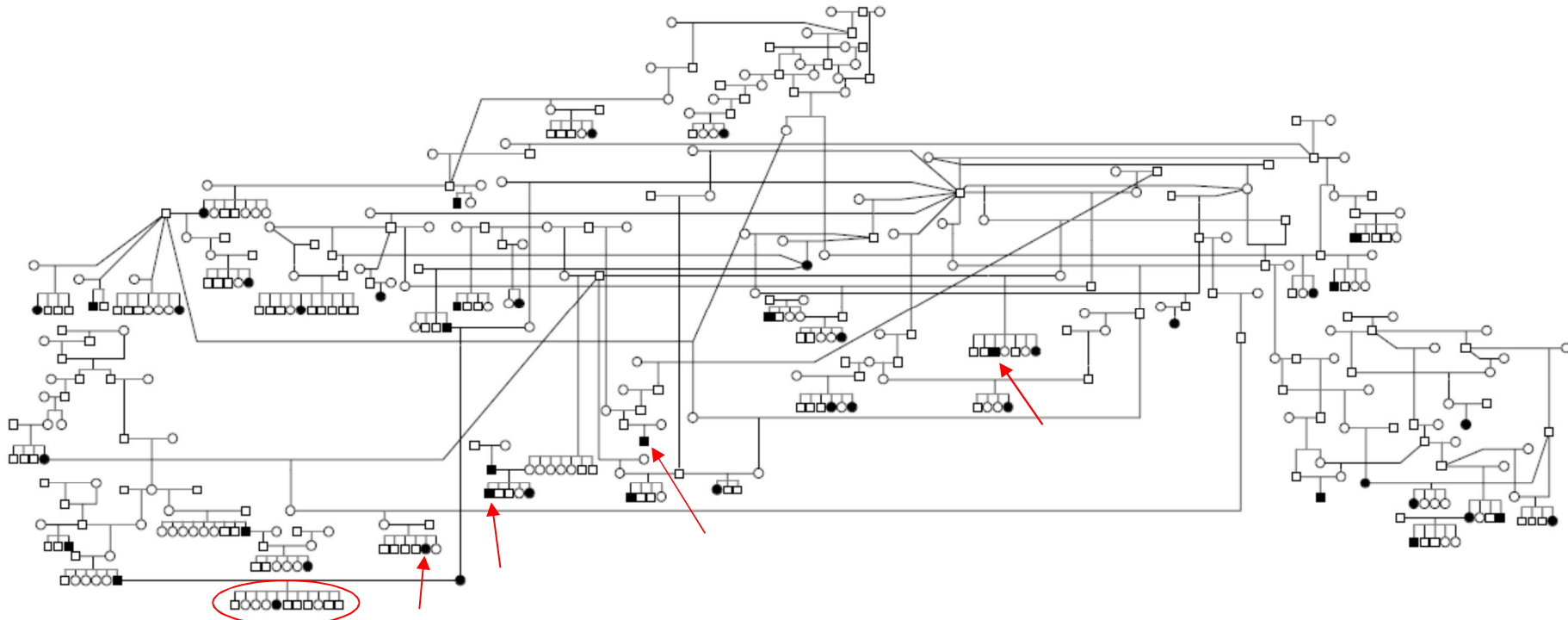
## DNA näytteiden konsentraatiot

DNA-näytteiden konsentraatiot ja 10 ng/μl laimennosta varten lasketut pipetointilavuudet.  
(Kaava 1)

Näyte	Rotu	Konsentraatio (ng/μl) $c_1$	Pipetoitava tilaavuus (μl) $V_1$	Lopputilavuus (μl) $V_2$	Loppukonsentraatio (ng/μl) $c_2$
1	A	151,0	13,3	200	10
2	A	147,7	13,5	200	10
3	A	307,8	6,5	200	10
4	A	301,0	6,6	200	10
5	A	439,0	4,6	200	10
6	A	290,0	6,9	200	10
7	A	139,0	14,4	200	10
8	A	135,4	14,8	200	10
9	IT	312,6	6,4	200	10
10	IT	141,8	14,1	200	10
11	IT	240,2	8,3	200	10
12	IT	61,5	32,5	200	10
13	IT	295,7	6,8	200	10
14	IT	198,2	10,1	200	10
15	IT	47,6	42,0	200	10
16	IT	57,3	35,0	200	10

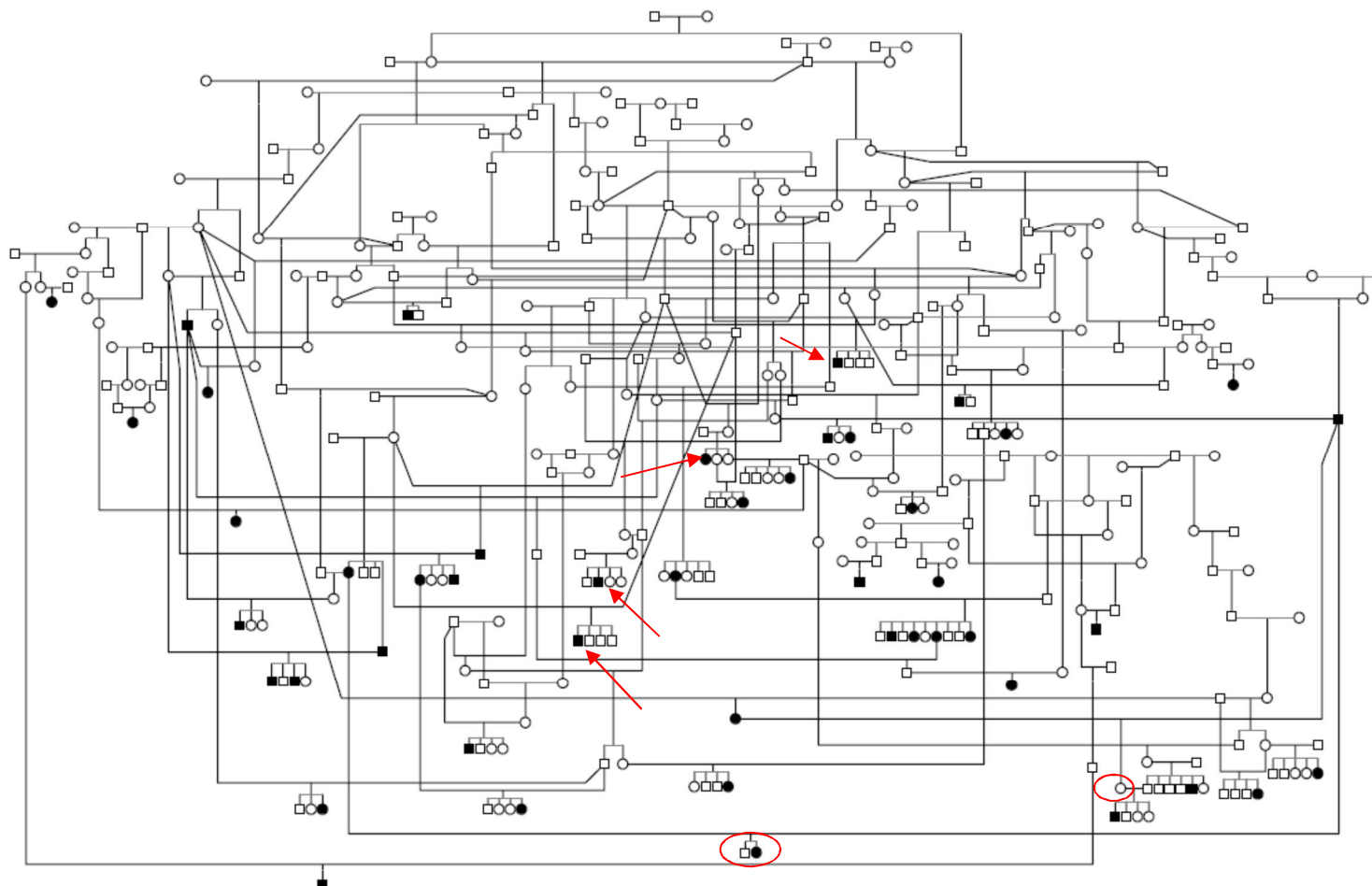
## Amerikancockerspanielien sukupuu

Mustalla merkityt ovat retinan dysplasiaa sairastavia yksilöitä. Punaisella nuolella on merkitty työhön valitut sairaat yksilöt.



## Italianvinttikoirien sukupuu

Mustalla merkityt ovat lasiaisen rappeumaa sairastavia yksilöitä. Punaisella nuolella on merkitty työhön valitut sairaat yksilöt.



Suunnitellut alukkeet *PTPRZ1*-geenin eksoneille

<i>PTPRZ1</i>	5'- -3'	Koko (bp)	T <sub>m</sub> * (°C)	T <sub>a</sub> * (°C)
<i>PTPRZ1</i> _Exon1_F	GCAAACCTTAGGAGAAAATGATACG	385	58.47	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon1_R	CCAAAGCCTTGGTAGCAAAC	385	59.75	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon2_F	ATGATTTGGGCATCCGATT	389	60.11	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon2_R	GCCAGTGTTGACTTGGGATT	389	59.97	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon3_F	GGCACACCTGCTTTAGGAAC	484	59,74	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon3_R	TTCTACTATAGTTTCAGGGCAGTTCA	484	59,77	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon4_F	CCTCTGACTGAGGAAAAGTTAGTTG	394	59,87	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon4_R	AGTCCAGTGAGGAAGGCAGA	394	59,99	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon5_F	CGTCTGCACGTGTAATGGAT	373	59,6	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon5_R	TACTCCCCTGGCAAGCTCT	373	60,01	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon6_F	GTTTGGAGGGCTTTGCTTTT	365	60,59	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon6_R	TGAGACGCGTATAAATCGTCA	365	59,34	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon7-8_F	TGGTTTTGTACCATTTTTGA	696	58,9	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon7-8_R	TTCCATTATTCCACAATTATCTG	696	59,15	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon9_F	CGCAGTGGAGAAGTGTAACG	476	59,51	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon9_R	ATAGCTTCTGCTCCCCTCCT	476	59,44	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon10_F	TTCAACTTAACAACAGCCATAAA	397	59,94	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon10_R	AAAAATCATTTTCGCCCTTTG	397	59,05	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon11_F	TTGGAGATTCTGTATTTCAAAGC	293	58,86	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon11_R	ACAATGAATAATGCCGCACA	293	59,96	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon12_1_F	GGTTTGCAGGAGTGTCTG	598	60,25	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon12_1_R	GAGCCCCCGGAAGTTTCT	598	61,51	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon12_2_F	CCCATTGAATCTCGTTTGCT	1554	60,07	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon12_2_R	CTCGCTCGTGAGTGTGCTC	1554	60,95	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon12_3_F	TAGTCGCCAAAGTTCGCAGT	2100	60,96	55
<i>PTPRZ1</i> _Exon12_3_R	TGCTACCAAAGCATGTGAG	2100	60,01	55
<i>PTPRZ1</i> _Exon13_F	AGCAACAGCAATGAAGTTG	355	58,93	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon13_R	TGGTACCTATCAAGTAACAAGAATCA	355	58,29	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon14_F	GGAGGCCGTGAAATCTTTA	377	59,16	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon14_R	ACATTTTGGGCAGCTCAAGT	377	59,74	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon15_F	CGGTTCCCTCAGGAATGTAG	348	59,54	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon15_R	CATTCTTCTAGAAAGTGAATGGT	348	59,15	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon16-17_F	TGTGCATGCAACTGTTTGAA	577	59,88	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon16-17_R	TATGCTCTGGGCCACCTAAC	577	60,1	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon18_F	GGGCCCTTGTGTATTTACC	392	58,3	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon18_R	GGATGTCCGACTGCTGATTC	392	60,63	60

<i>PTPRZ1</i> _Exon19_F	CTCCACCATCGCAGGATTAT	398	59,92	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon19_R	TTCAGGACTGCTGCTCCTTC	398	60,68	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon20_F	GCTAGACCCCTCCTGATTCC	297	60,04	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon20_R	TTGGTTGTACCACCCACTCA	297	59,85	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon21_F	GAACTCGAGTCGGTGGTAGG	388	59,72	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon21_R	CTGGAGTTCGGGCATGTAGT	388	60,13	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon22_F	ATTATTTCTCATGTGGCTCAGTC	400	57,39	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon22_R	TCAACCTGGTGAACAAAGC	400	58,75	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon23_F	GCCTCCGCCATTATGTAAAA	361	59,93	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon23_R	AGTGGAGCTCTGAACCCATC	300	59,26	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon24-25_F	GTGTGCCAGGGAGTTAGAGC	780	59,87	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon24-25_R	GTGTGCCAGGGAGTTAGAGC	780	59,99	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon26_F	ACACGGGCTCCAACAGTC	374	59,67	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon26_R	CAGTGACATGGGTTCCACGAG	374	60,15	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon27_F	TCGAGTTGAATTGTCTGTGTCA	400	59,34	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon27_R	GGTAAAATTGACTATTTGGGTAATCTG	400	59,55	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon28_F	CGTGGTGTCCCTGGTTGTA	387	60,42	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon28_R	TGTGTTAACCTTGTTTATAAGAAGCAG	387	59,31	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon29_F	CCCATGAGAAGTGTCCCTGT	363	59,96	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon29_R	AGGGGTCCACCTGATCTTTT	363	59,79	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon30_1_F	GTCCTCCAGGTCAGCAGGT	689	60,26	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon30_1_R	TCATAGGGAACGGCTTGTTT	689	59,57	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon30_2_F	TGGAATTGTGGTTTTGTTTTT	683	59,21	60
<i>PTPRZ1</i> _Exon30_2_R	TCCCATCAACCTTTCTCCAC	683	59,9	60

\*  $T_a$  on alukkeen kiinnittymislämpötila, jota käytettiin PCR-reaktiossa.

\*  $T_m$  on alukkeen sulamislämpötila eli lämpötila, jossa kaksoisjuoste aukeaa.



## **PTPRZ1-geenin eksonin 12 monistamiseen käytetty PCR-reaktioseos ja PCR-ohjelma**

Taulukko 1. PCR-reaktioseos Long PCR Enzyme Mix (Fermentas) entsyymillä. Tilavuus on yhdelle reaktiolle.

<b>PCR-reaktioseos (Fermentas)</b>	<b>Pitoisuus</b>	<b>Tilavuus (µl)</b>
Puskuri (sis. 1mM MgCl <sub>2</sub> )	10 x	2
dNTP	0,2 mM	0,4
F-aluke	0,8 mM	3,2
R-aluke	0,8 mM	3,2
DMSO	4 %	0,8
Polymeraasi-entsyymi	0,5 U	0,2
Näyte DNA	10 ng/µl	2
H <sub>2</sub> O		8,2
Yhteensä		20

Taulukko 2. PCR-ohjelma Long PCR Enzyme Mix (Fermentas) entsyymillä. Vaiheet 2-4 toistetaan 30 kertaa ennen siirtymistä vaiheeseen 5.

<b>Vaihe</b>	<b>Lämpötila (°C)</b>	<b>Aika</b>	
1	94°C	1 min 30 s	Alkudenaturaatio
2	94°C	20 s	Denaturaatio
3	60°C	30 s	Alukkeiden kiinnittyminen
4	68°C	1 min	Pidennysreaktio
5	72°C	10 min	Loppupidennysreaktio
6	8°C	∞	Loppulämpötila

Taulukko 1. Italianvinttikoirien variantit *TSPAN12* ja *PTPRZ1* -geeneissä

Italianvinttikoiria				Sairaats				Kontrollit				
Geeni	Mutaatio	Proteiinin muutos	Ennustus SIFT	Ennustus PolyPhen-2	Homotsy-gootti	Heterosty-gootti	Villi-tyyppi	Yht.	Homotsy-gootti	Heterosty-gootti	Villi-tyyppi	Yht.
<i>TSPAN12</i>	c.123-43T<C	Ei koodaavalla alueella			0	0	4	4	1	0	3	4
<i>TSPAN12</i>	c.974+336A<G	Ei koodaavalla alueella			1	2	1	4	1	1	2	4
<i>TSPAN12</i>	c.1603+35C<T	Ei koodaavalla alueella			0	3	1	4	2	1	1	4
<i>TSPAN12</i>	c.205+35C<T	Ei koodaavalla alueella			0	0	4	4	1	0	3	4
<i>TSPAN12</i>	c.205+47G<A	Ei koodaavalla alueella			0	4	0	4	0	3	1	4
<i>TSPAN12</i>	c.205+58C<T	Ei koodaavalla alueella			0	0	4	4	1	0	3	4
<i>TSPAN12</i>	c.205+84G<A	Ei koodaavalla alueella			4	0	0	4	2	0	2	4
<i>TSPAN12</i>	c.434C<T	p.S126S			1	0	3	4	0	0	4	4
<i>TSPAN12</i>	c.494T<C	p.L146L			0	1	3	4	1	1	2	4
<i>PTPRZ1</i>	c.1-15A<T	Ei koodaavalla alueella			0	2	2	4	1	1	2	4
<i>PTPRZ1</i>	c.175+205A<G	Ei koodaavalla alueella			0	1	3	4	0	0	4	4
<i>PTPRZ1</i>	c.287A<G	p.K96T	Not tolerated	Probably damaging, 0.996	0	2	2	4	2	1	1	4
<i>PTPRZ1</i>	c.508-64T<C	Ei koodaavalla alueella			1	1	2	4	1	1	2	4
<i>PTPRZ1</i>	c.604-68G<A	Ei koodaavalla alueella			1	1	2	4	2	1	1	4
<i>PTPRZ1</i>	c.604-12G<C	Ei koodaavalla alueella			2	0	2	4	1	0	3	4
<i>PTPRZ1</i>	c.671-25T<C	Ei koodaavalla alueella			0	1	3	4	0	1	3	4
<i>PTPRZ1</i>	c.1146T<C	p.T382T			2	2	0	4	2	2	0	4
<i>PTPRZ1</i>	c.1164-75T<C	Ei koodaavalla alueella			1	3	0	4	1	1	2	4
<i>PTPRZ1</i>	c.1165-27G<A	Ei koodaavalla alueella			0	3	1	4	2	1	1	4
<i>PTPRZ1</i>	c.4057-37A<G	Ei koodaavalla alueella			1	0	3	4	2	1	1	4
<i>PTPRZ1</i>	c.4154-101A<G	Ei koodaavalla alueella			3	0	1	4	3	0	1	4
<i>PTPRZ1</i>	c.4293T<C	p.A1431A			2	1	1	4	2	1	1	4

<i>PTPRZ1</i>	c.4371+21G<A	Ei koodaavalla alueella	1	0	3	4	1	0	3	4
<i>PTPRZ1</i>	c.4445T<C	Ei koodaavalla alueella	0	1	3	4	0	0	4	4
<i>PTPRZ1</i>	c.4506+11A<G	Ei koodaavalla alueella	2	1	1	4	2	1	1	4
<i>PTPRZ1</i>	c.4629C<T	p.H1543H	1	0	3	4	1	0	3	4
<i>PTPRZ1</i>	c.5277G<A	p.P1759P	0	1	3	4	1	1	2	4
<i>PTPRZ1</i>	c.5398-39A<G	Ei koodaavalla alueella	1	2	1	4	1	1	2	4
<i>PTPRZ1</i>	c.5496A<G	p.K1832K	2	1	1	4	2	2	0	4
<i>PTPRZ1</i>	c.5540+48C<T	Ei koodaavalla alueella	1	2	1	4	0	2	2	4
<i>PTPRZ1</i>	c.5676+40C<T	Ei koodaavalla alueella	1	0	3	4	0	0	4	4

Taulukko 2. Amerikancockerspanielien variantit *TSPAN12* ja *PTPRZ1* -geeneissä

Amerikancockerspanieli					Sairaat				Kontrollit			
Geeni	Mutaatio	Proteiinin muutos	Ennustus SIFT	Ennustus PolyPhen-2	Homotsy-gootti	Heterosty-gootti	Villi-tyyppi	Yht.	Homotsy-gootti	Heterosty-gootti	Villi-tyyppi	Yht.
<i>TSPAN12</i>	c.974+328A<G	Ei koodaavalla alueella			0	1	3	4	0	0	4	4
<i>TSPAN12</i>	c.974+628A<T	Ei koodaavalla alueella			0	0	4	4	1	0	3	4
<i>TSPAN12</i>	c.1603+35C<T	Ei koodaavalla alueella			2	2	0	4	3	1	0	4
<i>TSPAN12</i>	c.205+47G<A	Ei koodaavalla alueella			0	4	0	4	0	4	0	4
<i>TSPAN12</i>	c.205+84G<A	Ei koodaavalla alueella			3	0	1	4	3	0	1	4
<i>TSPAN12</i>	c.494T<C	p.L146L			1	1	2	4	1	1	2	4
<i>TSPAN12</i>	c.601G<C	p.C182S	Not tolerated	Probably damaging, 0,960	0	0	4	4	1	0	3	4
<i>TSPAN12</i>	c.617A<C	p.P187P			1	0	3	4	0	0	4	4
<i>PTPRZ1</i>	c.1-15A<T	Ei koodaavalla alueella			1	2	1	4	1	2	1	4
<i>PTPRZ1</i>	c.23T<C	p.I8I			1	2	1	4	1	3	0	4
<i>PTPRZ1</i>	c.109+99G<A	Ei koodaavalla alueella			1	0	3	4	0	0	4	4
<i>PTPRZ1</i>	c.508-69C<T	Ei koodaavalla alueella			0	1	3	4	0	1	3	4
<i>PTPRZ1</i>	c.508-64T<C	Ei koodaavalla alueella			0	2	2	4	0	2	2	4
<i>PTPRZ1</i>	c.604-68G<A	Ei koodaavalla alueella			1	1	2	4	1	2	1	4
<i>PTPRZ1</i>	c.604-12G<C	Ei koodaavalla alueella			1	3	0	4	1	3	0	4
<i>PTPRZ1</i>	c.620A<G	p.N207S	Not tolerated	Probably damaging, 1,000	0	4	0	4	0	4	0	4
<i>PTPRZ1</i>	c.671-25T<C	Ei koodaavalla alueella			2	1	1	4	2	1	1	4
<i>PTPRZ1</i>	c.829-11T<A	Ei koodaavalla alueella			0	1	3	4	0	1	3	4
<i>PTPRZ1</i>	c.1146T<C	p.T382T			4	0	0	4	4	0	0	4
<i>PTPRZ1</i>	c.1164+20T<C	Ei koodaavalla alueella			0	1	3	4	0	1	3	4
<i>PTPRZ1</i>	c.1165-75T<C	Ei koodaavalla alueella			4	0	0	4	4	0	0	4
<i>PTPRZ1</i>	c.1165-27G<A	Ei koodaavalla alueella			0	2	2	4	0	2	2	4

<i>PTPRZ1</i>	c.3949+109T<C	Ei koodaavalla alueella			0	1	3	4	0	1	3	4
<i>PTPRZ1</i>	c.4057-37A<G	Ei koodaavalla alueella			0	0	4	4	2	1	1	4
<i>PTPRZ1</i>	c.4154-101A<G	Ei koodaavalla alueella			4	0	0	4	4	0	0	4
<i>PTPRZ1</i>	c.4293T<C	p.A1431A			4	0	0	4	3	1	0	4
<i>PTPRZ1</i>	c.4445T<C	p.V1482A	Unknown	Tolerated	0	2	2	4	0	2	2	4
<i>PTPRZ1</i>	c.4506+11A<G	Ei koodaavalla alueella			2	1	1	4	2	1	1	4
<i>PTPRZ1</i>	c.4506+34G<A	Ei koodaavalla alueella			0	1	3	4	0	1	3	4
<i>PTPRZ1</i>	c.4629C<T	p.H1543H			0	1	3	4	0	1	3	4
<i>PTPRZ1</i>	c.5277G<A	p.P1759P			0	1	3	4	0	1	3	4
<i>PTPRZ1</i>	c.5398-39A<G	Ei koodaavalla alueella			1	2	1	4	1	2	1	4
<i>PTPRZ1</i>	c.5495A<G	p.K1832K			1	2	1	4	1	2	1	4
<i>PTPRZ1</i>	c.5769G<A	p.A1923A			0	1	3	4	0	1	3	4