



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

**Perinnöllistä Late-Onset Spinal Motor
Neuronopathy –motoneuronitautia aiheuttavan
CHCHD10-geenin sekvensointi**

Veera Viljakainen

Opinnäytetyö
Lokakuu 2015
Bioanalytikkokoulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus

VILJAKAINEN VEERA:

Perinnöllistä Late-Onset Spinal Motor Neuronopathy –motoneuronitautia aiheuttavan *CHCHD10*-geenin sekvensointi

Opinnäytetyö 40 sivua
Lokakuu 2015

Itä-Suomesta on löytynyt vallitsevasti periytyvä spinaalinen lihasatrofia (spinal muscular atrophy), SMA-sairaus, jonka ensioireet alkavat vasta vanhemmalla iällä. Taudin löysi suomalainen tutkimusryhmä vuonna 2011 ja se sai nimeksi LOSMoN (Late-Onset Lower Motor Neuronopathy), taudista käytetään myös nimeä SMAJ (spinal muscular atrophy Jokela type). Opinnäytetyön aiheena oli Perinnöllistä Late-Onset Spinal Motor Neuronopathy –motoneuronitautia aiheuttavan *CHCHD10*-geenin sekvensointi. Aihe saatiin Tampereen yliopistolta, Lihastautien tutkimuskeskukselta. Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa analysoitavaa materiaalia geneetikolle, jotta tämä voi määrittää onko potilaalla SMAJ/LOSMoN vai jokin muu sairaus. Kun tauti ja taudin syntymekanismi on tunnettu, on mahdollisuus kehittää tauteihin uusia hoitomuotoja, kuten esimerkiksi sairastuneiden geeniterapioita. Opinnäytetyön tarkoituksena oli sekvensoida 75:n SMAJ/LOSMoN-tyyppistä tautimuotoa sairastavan potilaan DNA-näytteet ja kuvata geenin sekvensointiin käytetyt menetelmät sekä koota tietoa motoneuronitaudeista, erityisesti SMAJ/LOSMoN-taudista. Opinnäytetyön tehtävänä oli selvittää, esiintyykö aineistossa muita *CHCHD10*-geenin mutaatioita jo löydetyn G66V-mutaation lisäksi.

Aineistosta ei löytynyt uusia mutaatioita todennäköisesti siksi, että kaikki tunnetut *CHCHD10*-geenin mutaatiot sijaitsevat eksonissa 2. Tässä aineistossa oli tutkittavana geenin eksonit 1 ja 3-4. Tutkimustulos tukee oletusta, että eksoneissa 1 ja 3-4 ei ole tautia aiheuttavia mutaatioita. Toistaiseksi löydetty sairauksia aiheuttavat tunnetut mutaatiot sijaitsevat lähemmäs *CHCHD10*-geenissä, mutta aiheuttavat hyvin erilaisia tauteja. Mutaatiot G66V, G58R ja S59L sijaitsevat hyvin lähemmäs proteiinin rakenteessa ja hydrofobisen heliksin alueella. Kuitenkin tautien vakavuusasteissa on huomattava ero, G66V-mutaatio aiheuttaa oirekuvaltansa huomattavasti lievempää tautia kuin S59L-mutaatio, joka aiheuttaa vakavan ALS-taudin. G66V-mutaatio *CHCHD10*-geenissä ei aiheuta muita sairauksia kuin SMAJ/LOSMoN-taudin. Yllättävää on, että G66V-mutaatio ei aiheuta mitokondriovauriota, vaikka *CHCHD10*-geeni on ensimmäinen identifioitu SMA-tautia aiheuttava geeni, joka koodaa mitokondriaalista proteiinia.

Jatkotutkimusaiheena esitetään *CHCHD10*-proteiinin tertiäärirakenteen ja proteiinin toiminnan tutkimista, jotta saataisiin selville SMAJ/LOSMoN-taudin sekä muiden *CHCHD10*-geenin mutaatioiden aiheuttamien tautien patogeeninen mekanismi.

Asiasanat: *CHCHD10*, motoneuronitaudit, SMAJ/LOSMoN, sekvensointi

ABSTRACT

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

VILJAKAINEN VEERA:

Sequencing of the *CHCHD10* Gene Causing Late-Onset Spinal Motor Neuronopathy

Bachelor's thesis 40 pages
October 2015

A Finnish research group found an autosomal dominant lower motor neuron disorder in 2011. The disease is characterized by adult-onset of muscle cramps and fasciculations affecting the upper and lower limbs. The disorder is slowly progressive, resulting in weakness and mild muscle atrophy later in life. The disease is called SMAJ (spinal muscular atrophy, Jokela type) or LOSMoN (late-onset spinal motor neuronopathy).

This study was a part of a broader research. It was carried out at the Neuromuscular Research Unit, which is a part of Tampere Neuromuscular Research Center. The objective of this study was to produce sequence data for the geneticist. The data were collected from 75 SMAJ/LOSMoN patients which were haplotyped. The sequence data were analysed by the geneticist.

These results suggest that the pathogenic G66V mutation in *CHCHD10* gene is not located in the exons 1 or 3-4, but it is found in the exon 2. The mutation is located in the hydrophobic helix of the *CHCHD10* gene coding protein. Further research is required to find out the tertiary structure and the function of the CHCHD10 protein to examine the pathogenic mechanism of SMAJ/LOSMoN and the other *CHCHD10* linked diseases.

Key words: *CHCHD10*, motor neuron disease, SMAJ/LOSMoN, sequencing

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	MOTONEURONITAUDIT	9
2.1	Spinaalinen lihasatrofia (SMA)	11
2.1.1	Lapsuus- ja nuoruusiän spinaalinen lihasatrofia (SMA I, SMA II, SMA III)	11
2.1.2	Late-Onset Spinal Motor Neuronopathy (SMAJ/LOSMoN).....	13
2.2	SMA-mutaatiot	14
3	<i>CHCHD10</i> -GEENI.....	17
3.1	Molekyyligenetiikka	19
3.1.1	Spinal Muscular Atrophy, Jokela Type (SMAJ).....	20
3.1.2	Frontotemporaalidementia ja/tai amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALS/FTD)	21
3.1.3	Mitokondriaalinen myopatia (ADMM).....	22
4	OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA TEHTÄVÄT	23
5	TUTKIMUS- JA ANALYYSIMENETELMÄT.....	24
6	OPINNÄYTETYÖPROSESSI.....	28
7	TULOKSET	32
7.1	AGE	32
7.2	Sekvensointi.....	33
8	POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET	35
	LÄHTEET.....	38

LYHENTEET JA TERMIT

ADMM	autosomaalisesti vallitseva mitokondriaalinen myopatia
ALS	amyotrofinen lateraaliskleroosi
autosomi	kromosomi, joka ei vaikuta yksilön sukupuolen määräytymiseen
Babinskin refleksi	normaalisti aikuisella jalkapohjan ihon ärsytys aiheuttaa iso-varpaan käpristymisen alaspäin (Babinski -), mutta vauvoilla varpaat kipristyvät ylöspäin (Babinski +). Aikuisella positiivinen Babinski on merkki hermovauriosta
bulbaarinen tauti	ydinjatkeesta alkava tauti
COFA	Tampereen yliopiston Core facilities and research services
domeeni	proteiinin itsenäinen toiminnallinen ja rakenteellinen yksikkö
eksomisekvensointi	kaikkien proteiineja koodaavien alueiden emäsjärjestyksen selvittäminen
ENMG	elektroneuromyografia, jolla selvitetään tunto- ja liikehermojen sekä lihasten toimintaa
faskikulaatio	tahaton lihasnykäys
FTD	frontotemporaalidementia
gynekomastia	rintojen kasvu miehillä
haplotyyppianalyysi	molekyylogeneettinen testi, jossa spesifisillä markkereilla etsitään lähekkäin sijaitsevien ja toisiinsa kytkeytyneiden lokusten alleelit, jotka periytyvät yhtenäisinä yksikköinä
HeLa-solu	Henrietta Lacksin kohdunkaulansyövän soluista eristetty erilaistumaton ja kuolematon solulinja, jota käytetään tieteellisessä tutkimuksessa solun rakenteiden, DNA:n, RNA:n sekä proteiinisynteesin tutkimiseen
heterotsygoottinen	geenilokusten alleelit eli geenimuodot ovat erilaiset vastinkromosomeissa
homotsygoottinen	geenilokusten alleelit eli geenimuodot ovat samanlaiset vastinkromosomeissa
kytkentäanalyysi	tutkitaan assosiaatiota sen välillä, miten tietyt sukulaiset jakavat samanlaisen fenotyypin ja markkerialleelit keskenään,

	keskeistä on samojen markkerialleelien jakaminen eri sukulaisten kesken
lokus	geenin tarkka paikka kromosomissa
missense-mutaatio	pistemutaatio, jossa yksi nukleotidi vaihtuu toiseen ja aiheuttaa sen, että kodoni koodaa eri aminohappoa kuin ennen mutaatiota
motiivi	lyhyt, usein vain muutamasta aminohappotähteestä muodostunut primaarirakenteen jakso, joka ratkaisevasti vaikuttaa proteiinin ominaisuuksiin. Ohjaavat proteiineja oikeille paikoilleen solunsisäisessä liikenteessä.
neurogeeninen	hermoperäinen
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man®, kansainvälinen perinnöllisten tautien tietokanta
patogeeninen	sairautta aiheuttava
SMA	spinal muscular atrophy eli spinaalinen lihasatrofia
SMAJ/LOSMoN	spinal muscular atrophy Jokela type/late-onset lower motor neuronopathy
SNP	single nucleotide polymorphism
segregaatio	mutaation ja taudin samanaikainen esiintyminen suuressa sukulaisjoukossa
transitio	siirtymä
transfektointi	DNA:n siirtäminen soluun viruksen avulla
transversio	kääntymä
variantti	geenin mutatoitunut muoto
villityyppi	geenin alkuperäinen, ei-mutatoitunut muoto

1 JOHDANTO

Suomalainen väestö on kehittynyt pienestä alueelle muuttaneesta perusväestöstä ja muuttoliike Suomeen sekä täältä pois on ollut vähäistä. Väestöön on rikastunut tiettyjä alkuperäisväestössä esiintyneitä perimän muutoksia. Muutosten ilmenemisessä on asutushistoriasta johtuen myös alueellisia eroja, jonka vuoksi jotkut mutaatioista ovat rikastuneet vain tietyille alueille Suomessa. (Sarantaus ym. 2000, 762.)

Opinnäytetyön aiheena on Perinnöllistä Late-Onset Spinal Motor Neuronopathy –motoneuronitautia aiheuttavan *CHCHD10*-geenin sekvensointi. Aihe saatiin Tampereen yliopistolta, Lihastautien tutkimuskeskukselta ja työn ohjaajana toimi geneetikko Sini Penttilä. Tampereen yliopistollisen sairaalan Lihastautien tutkimuskeskus on valtakunnallinen lihastautien erikoispoliklinikka, jonka toimintaan kuuluvat potilaiden kliiniset arvioinnit, lihasbiopsianäytteiden tutkimukset, DNA-tutkimukset, neurofysiologian ionikanavatutkimukset, rasisuskokeet ja magneettispektroskopia. Tutkimuskeskus on tarkoitettu niille lihastautipotilaille, joiden tauti on tutkimuksista huolimatta jäänyt vaille tarkennettua syytä. (Pirkanmaan sairaanhoitopiiri 2014.)

Itä-Suomesta on löytynyt vallitsevasti periytyvä spinaalinen lihasatrofia (spinal muscular atrophy), SMA-sairaus, jonka ensioireet alkavat vasta vanhemmalla iällä. Taudin löysi suomalainen tutkimusryhmä vuonna 2011 ja se sai nimeksi LOSMoN (late-onset lower motor neuronopathy). (Jokela ym. 2011, 339.) Sittenkin kansainvälinen perinnöllisten tautien tietokanta, OMIM, nimesi taudin SMAJ:ksi (spinal muscular atrophy Jokela type), joka on taudin virallinen nimi. Suomessa LOSMoN-nimi kuitenkin tunnetaan paremmin. Vuonna 2012 tutkimuksissa saatiin selville, että SMAJ/LOSMoN-taudin aiheuttava geeni sijaitsee kromosomialueella 22q11.2-q13.2. (Penttilä ym. 2012, 2).

Huhtikuussa 2014 tutkimusryhmä sai selville taudin aiheuttavan mutaation *CHCHD10*-geenissä. Jatkotutkimuksena haluttiin analysoida 75 potilaan DNA-näytteet ja kartoittaa, löytyykö Suomessa muita tämän geenin mutaatioita jo löydetyn lisäksi ja muitakin tämän geenin aiheuttamia tautimuotoja kuin SMAJ/LOSMoN-tauti. Tutkimukseen valitut potilaat sairastivat SMAJ/LOSMoN-tyyppistä tautimuotoa ja potilaille oli tehty haplotyyppianalyysi. (Penttilä 2014b.) Haplotyyppianalyysi on molekyylogeneettinen testi, jossa

spesifisillä markkereilla etsitään lähekkäin sijaitsevien ja toisiinsa kytkeytyneiden lokusten alleelit, jotka periytyvät yhtenäisinä yksikköinä (Aula, Kääriäinen & Palotie 2006, 353).

Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa analysoitavaa materiaalia geneetikolle, jotta tämä voi määrittää onko potilaalla SMAJ/LOSMoN vai jokin muu sairaus. Tutkimustuloksilla pyritään saamaan potilaalle diagnoosi. Tietoa voidaan käyttää hyväksi tarjoamalla geneettiseen riskiprofiiliin perustuvaa perinnöllisyysneuvontaa sekä seurantaa. Kun tauti ja taudin syntymekanismi on tunnettu, on mahdollisuus kehittää tauteihin uusia hoitomuotoja, kuten esimerkiksi sairastuneiden geeniterapioita. Opinnäytetyön tarkoituksena oli sekvensoida 75:n SMAJ/LOSMoN-tyyppistä tautimuotoa sairastavan potilaan DNA-näytteet ja kuvata geenin sekvensointiin käytetyt menetelmät sekä koota tietoa motoneuronitaudeista, erityisesti SMAJ/LOSMoN-taudista. Opinnäytetyön tehtävänä oli selvittää, esiintyykö aineistossa muita *CHCHD10*-geenin mutaatioita jo löydetyn G66V-mutaation lisäksi.

2 MOTONEURONITAUDIT

Motoneuronit eli liikehermosolut ovat aivojen ja selkäytimen erikoistuneita hermosoluja, jotka johtavat elektronisia signaaleja lihasten liikkeen tuotantoon. Tähän tarvitaan kahdenlaisia soluja: ylempiä motoneuroneja ja alempia motoneuroneja. Ylemmät motoneuronit alkavat aivojen yläosasta ja jatkuvat alas selkäydintä pitkin, jossa ne yhdistyvät eri korkeuksilla alempiin motoneuronisoluihin. Nämä solut puolestaan sijaitsevat selkäytimen ulkopuolella ja yhdistyvät lihaksiin. Jos motoneuronit vioittuvat tai kuolevat, pääseuraus on tahdonalaisen liikkeen tuottamisen vaikeus. (Talbot, Turner, Marsden & Botell 2008, 1.)

Motoneuronitaudit ovat neurologisia sairauksia, joista kärsivien potilaiden motoneuronit alkavat tuhoutua. Arviolta 70 prosenttia motoneuronitautia sairastavista potilaista saa oireita raajoihin. Tällöin tarkoitetaan spinaalista motoneuronitaudin puhkeamista, jossa tauti alkaa selkäytimestä. Loput potilaista kokevat puheentuotonvaikeutta ja/tai nielemisvaikeutta, jolloin tauti alkaa ydinjatkeesta. Tällöin puhutaan bulbaarisen taudin puhkeamista. Kun alemmat motoneuronit ovat vahingoittuneet, hermoon yhdistyvä lihas surkastuu ja heikkenee. Heikkoutta esiintyy usein, muttei aina, yhdessä tahattomien lihasnykäysten (faskikulaatioiden) kanssa. Tämä tulkitaan merkiksi, että lihas on menettänyt hermoyhteyden. Kun ylemmät motoneuronit ovat vahingoittuneet, kyseiset lihasryhmät jäykistyvät. Koska aivot eivät pysty tuottamaan normaalia raajakontrollia, seuraa tästä koordinoitun kävelyn sekä yhtäkkisten suunnanmuutosten korjaamisen vaikeutta. (Talbot, Turner, Marsden & Botell 2008, 4.)

ALS-tauti (amyotrofinen lateraaliskleroosi) on motoneuronitaudin tyypeistä yleisin. Muita motoneuronitauteja ovat bulbaariparalyysi, primaarinen lateraaliskleroosi ja progressiivinen lihasatrofia. (National Institute of Neurological Disorders and Stroke 2015.) Suomen yleisimmät aikuisiän motoneuronitaudit ovat ALS, X-kromosomaalinen Kennedyn tauti sekä SMAJ/LOSMoN. Varhaisella lapsuusiällä alkavista muodoista *SMN1*-geenivirheestä johtuva spinaalinen lihasatrofia (SMA) on yleisin. (Jokela & Udd 2014, 2974.)

Amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALS) voi alkaa mistä tahansa lihasryhmästä ja oireet sekä oireiden eteneminen lihaksistossa vaihtelee yksilöllisesti. Raajoista alkavan sairauden alkuvaiheen oireita ovat tavallisesti jalassa ja/tai kädessä tuntuva lihasheikkous, lihasnykäykset ja krampit, jolloin puhutaan alemman motoneuronin vauriokuvasta. Noin neljänneksellä ALS-tautiin sairastuvista oireet alkavat nielun alueelta, jolloin oireena on puheen epäselvyys ja nielemisen vaikeus. Suomessa ALS-tautia sairastaa noin 450–500 ihmistä ja uusia tapauksia löytyy vuosittain noin 140. Sairastumisikä on keskimäärin 55–60 vuotta ja tautia esiintyy kummallakin sukupuolella. Kaikista Suomen ALS-tapauksista noin 25 prosenttia aiheutuu *c9orf72*- tai *SOD1*-geenin mutaatioista ja suvuittain esiintyvistä ALS-tapauksista näiden kahden geenin virheet selittävät suurimman osan. Parantavaa lääkehoitoa tautiin ei toistaiseksi ole. Ensimmäinen virallinen lääke rilutsoli (Rilutek®) on ollut Suomessa käytössä jo useita vuosia ja joillakin potilailla lääke hidastaa sairauden etenemistä lisäten hieman elinaikaa. Keskimääräinen elinikä diagnoosista on 3–5 vuotta, mutta sairaus etenee hyvin yksilöllisesti. (Laaksovirta 2012.)

Kennedyn taudin kliiniseen kuvaan kuuluvat etenevä lihasheikkous ja lihasten surkastuminen. Lihaksissa nähdään faskikulaatiota sekä kliinisessä tutkimuksessa että ENMG:ssä (elektroneuromyografiassa). Oireet alkavat aikuisiässä, mutta niiden paheneminen on kuitenkin huomattavasti hitaampaa kuin ALS-taudissa. Lihasoireiden lisäksi oireyhtymään kuuluvat gynekomastia (rintojen kasvu miehillä), impotenssi ja myös tuntohäiriöitä voi esiintyä. (Udd & Holmgren 1996, 218.) Kennedyn tauti johtuu X-kromosomissa sijaitsevan androgeenireseptorin (AR) toisto-jaksomutaatiosta, jonka proteiini tuote haittaa liikehermosolun toimintaa, aiheuttaen niiden ennen aikaista kuolemaa. Terveiden ihmisten AR-geenissä on 10–36 CAG-toistojaksoa, mutta Kennedyn taudissa niiden määrä on lisääntynyt noin 40–62:een. Yleensä neurologin suorittama tutkimus sekä ENMG antavat riittävän perusteet epäillä Kennedyn tautia, mutta diagnoosi perustuu verestä otettavaan geenitestiin. ENMG-tutkimuksessa selvitetään tunto- ja liikehermojen sekä lihasten toimintaa. Kennedyn tautia esiintyy vain miehillä, mutta mutaation kantajaisilla voi olla lieviä oireita, kuten lihaskramppeja ja vapinaa. Tauti ei voi periä isältä pojalle, mutta sairaan miehen tyttärille periytyy automaattisesti aina tautigeeni ja yleensä he ovat terveitä kantajia. Tautigeenin kantajanaisten tyttärillä on 50 prosentin riski olla taudin kantajia ja pojilla puolestaan on 50 prosentin riski sairastua Kennedyn tautiin. (Jokela 2012.)

Kennedyn tauti ja SMAJ/LOSMoN ovat alemman motoneuronin tauteja, eikä niihin liity ylemmän motoneuronin löydöksiä, kuten kiihtyneitä heijasteita ja positiivista Babinskin refleksiä. Normaalisti aikuisella jalkapohjan ihon ärsytys aiheuttaa isovarpaan käpristymisen alaspäin (Babinski -), mutta vauvoilla varpaat kipristyvät ylöspäin (Babinski +). Aikuisella positiivinen Babinski on merkki hermovauriosta. Molemmat taudit kuitenkin aiheuttavat faskikulaatioita, etenevää lihasheikkoutta ja lihasten surkastumista sekä ENMG:ssä todettavia hermoperäisiä (neurogeenisii) muutoksia, minkä vuoksi niitä voi olla vaikea erottaa alemman motoneuronin vauriokuvalla ilmenevästä ALS-taudista. Tautien erottelu on kuitenkin tärkeää, koska sekä SMAJ/LOSMoN- että Kennedyn taudissa potilaat pysyvät yleensä hyvin toimintakykyisinä vuosikymmeniä taudin toteamisesta, kun taas ALS johtaa kuolemaan yleensä muutaman vuoden kuluessa diagnoosista. (Jokela & Udd. 2014, 2974.)

2.1 Spinaalinen lihasatrofia (SMA)

Spinaaliset lihasatrofiat, spinal muscular atrophy (SMA), ovat harvinaisia sairauksia, joissa osa selkäytimen etusarven liikehermosoluista kuolevat. Hermotuksen puuttumisen seurauksena lihakset heikentyvät ja surkastuvat. Liikkuminen, hengittäminen, syöminen ja puhuminen vaikeutuvat. SMA-tyyppejä on olemassa neljä erilaista: SMA I, SMA II, SMA III ja SMA IV/SMAJ, jotka eroavat toisistaan puhkeamisiän ja oireiden vakavuuden perusteella. (Ellison ym. 2008, 947.) Yleensä SMA-sairauksien diagnoosi varmistetaan neurologin tutkimuksella, ENMG:llä ja geenitestillä. Tarvittaessa tehdään kuvantamistutkimuksia ja otetaan lisäksi lihasbiopsia lihassairauksien tai selkärangan sairauksien pois-sulkemiseksi. (Jokela. 2011, 18.)

2.1.1 Lapsuus- ja nuoruusiän spinaalinen lihasatrofia (SMA I, SMA II, SMA III)

Lapsuusiän SMA on autosomissa peittyvästi periytyvä lihastauti, jossa selkäytimen etusarven motoneuronien rappeutuminen johtaa raajojen ja vartalon lihasten halvaantumiseen. Kyseessä on homotsygoottinen mutaatio. Jos potilaan alleelit eli geenimuodot ovat samat, kromosomien sanotaan olevan tämän geenin suhteen homotsygoottinen. Homotsygoottinen mutaatio on peritty molemmilta vanhemmilta. Tauti jaetaan kliinisen ku-

van ja sairastumisiän perusteella kolmeen alatyyppeihin: SMA I, SMA II ja SMA III. (UTU-lab 2013.) Lapsuus- ja nuoruusiän SMA periytyy autosomaalisesti peittyvästi eli resessiivisesti. Taudin saaneen henkilön vanhemmat ovat yleensä molemmat terveitä mutaation kantajia, mutta heidän lapsillaan on 25 prosentin riski saada kummaltakin tautia aiheuttava mutaatio ja olla sairas. Tautia sairastavan henkilön jokaisella sisaruksella on 25 prosentin riski sairastaa samaa tautia. Mikäli potilas saa lapsia, potilaan lapsilla ei tautia ilmene, mutta he ovat oireettomia taudinkantajia. (Lähdetie 2012.)

SMA I (Werdnig-Hoffmanin tauti) on taudin vaikein ja vauvaiässä alkava muoto. Lunnin ja Wangin (2008, 2120–2133) mukaan SMA I -muoto kattaa noin 50–70 prosenttia lasten SMA-sairauksista. Oireet ilmenevät yleensä lapsen ensimmäisten elinkuukausien aikana. Joskus SMA puhkeaa jo sikiöaikana ja tällöin sikiö liikkuu vähemmän raskauden loppuvaiheessa. Yleensä mitä aikaisemmin oireet alkavat, sitä vaikeampi taudin muoto on. Lapsi on veltto eikä juuri liiku, eikä hän ei hallitse päätään. Itkuääni on hento, yskiminen heikkoa sekä nieleminen vaikeaa. Tauti johtaa jo varhain hengitysvajeeseen ja vaikka elinikä on vaikea ennustaa, noin 95 prosenttia potilaista kuolee alle 18 kuukauden ikäisenä. (Strömmer 2011, 12.)

SMA II (Werdnig-Hoffmanin tauti) on spinaalisen lihasatrofian keskivaikea muoto. Lunnin ja Wangin (2008, 2120–2133) mukaan sen oireet alkavat alle 18 kuukauden iässä. Lapsi oppii istumaan, mutta ei koskaan opi seisomaan tai kävelemään tuetta. Heikentyneiden kylkilivilihasten vuoksi hengittäminen sekä yskiminen ovat vaikeutuneet, painonousu hidastuu, käsissä on hentoa vapinaa ja selkärankaan kehittyä skolioosi eli se painuu mutkalle. Myös ruokatorven takaisinvirtaus (gastroesofageaalinen reflux, GER) ja ummetus ovat tavallisia ongelmia. Potilaat kuolevat yleensä hengityskeräisiin syihin varhaisaikuisuudessa. (Strömmer 2011, 12.)

SMA III (Kugelberg-Welanderin tauti) on taudin lievä muoto. Wangin ym. (2007, 1029–1030) mukaan oireet alkavat vasta kävelemään oppimisen jälkeen eli lapsi oppii seisomaan ja kävelemään tuetta. Potilaalla on lihasheikkoutta ja lihaskrampeja ja nivelet rasittuvat. Kävelykyky säilyy pitkään. Hengityselinten ongelmia on vain osalla ja silloin yleensä akuuttiin infektiin liittyy. Potilaat kuolevat usein vasta aikuisiässä. (Strömmer 2011, 12.)

Parantavaa hoitoa SMA-tautiin ei tunneta, mutta sairauteen liittyvien yleisten ongelmien hoito on tärkeää komplikaatioiden estämiseksi ja mahdollisimman hyvän elämänlaadun säilyttämiseksi. Vuonna 2007 Kansainvälinen laaja asiantuntijajoukko laati olemassa olevaan tutkimustietoon nojaavan konsensuslausunnon SMA-taudin hyvästä hoidosta. Ohjeistossa korostetaan moniammatillista erityisosaamista. SMA-potilaiden hoitovastuu jakautuu lastenlääkäreille, lastenneurologeille, hengitysvajetyöryhmälle ja anestesia- ja puheterapeuteille sekä sosiaalityöntekijöille. SMA I -lapsen kohdalla korostuvat vanhempien tukeminen ja aktiivinen palliatiivinen hoito, johon kuuluu saattohoito. (Lähdetie 2012.)

Strömmerin (2011, 25–26, 29) mukaan Suomessa oli yhteensä 15 SMA-tautia sairastavaa alle 16-vuotiasta potilasta vuoden 2010 lopussa. SMA:n esiintyvyys saman ikäisten lasten keskuudessa Suomessa oli $1,57 \times 10^{-5}$ eli 1/63 694 ja ilmaantuvuus oli $5,00 \times 10^{-5}$ eli 1/20 000 elävänä syntynyttä lasta kohden. Potilaat olivat iältään 1–12 –vuotiaita ja potilaiden iän keskiarvo oli 3 vuotta. Kaikilla potilailla oli diagnosoitu tyyppi II SMA.

2.1.2 Late-Onset Spinal Motor Neuronopathy (SMAJ/LOSMoN)

SMAJ/LOSMoN on vallitsevasti periytyvä SMA-sairaus, jonka ensioireet alkavat noin 30 ikävuoden jälkeen. Penttilän ym. (2014, 3) mukaan taudin puhkeamisen keski-ikä on 42 vuotta ja vaihteluväli 14–72 vuotta. Vallitsevalla eli dominantilla periytymisellä tarkoitetaan periytymistapaa, jossa sairaus eli ilmiäsuun muutos ilmenee silloin kun geeniparin toisessa alleelissa on mutaatio ja toinen alleeli on normaali. Vallitsevasti periytyvä tauti voi esiintyä useassa peräkkäisessä sukupolvessa. Suvun terveiden henkilöiden lapsille tauti ei periydy, mutta sairaiden lapsilla on 50 prosentin todennäköisyys periä tautigeeni ja toisaalta yhtä suuri todennäköisyys periä vastaava terve geeni. (Aula, Kääriäinen & Palotie 2006, 86.)

Sekä naiset että miehet voivat sairastua SMAJ/LOSMoN-tautiin eikä sukupuolten välillä ole eroa taudin vaikeusasteessa. Ensimmäisinä oireina ovat lihaskivut ja krampit, vuosien saatossa suorituskyky heikkenee. Vaurioitunut liikehermosolu tuottaa myös ylimääräisiä sähköärsykeitä ja lihaksistossa esiintyy faskikulaatioita, mikä on taudin huomiota kiinnittävin piirre. Potilailla on usein myös käsien vapinaa ja osalla potilaista esiintyy myös

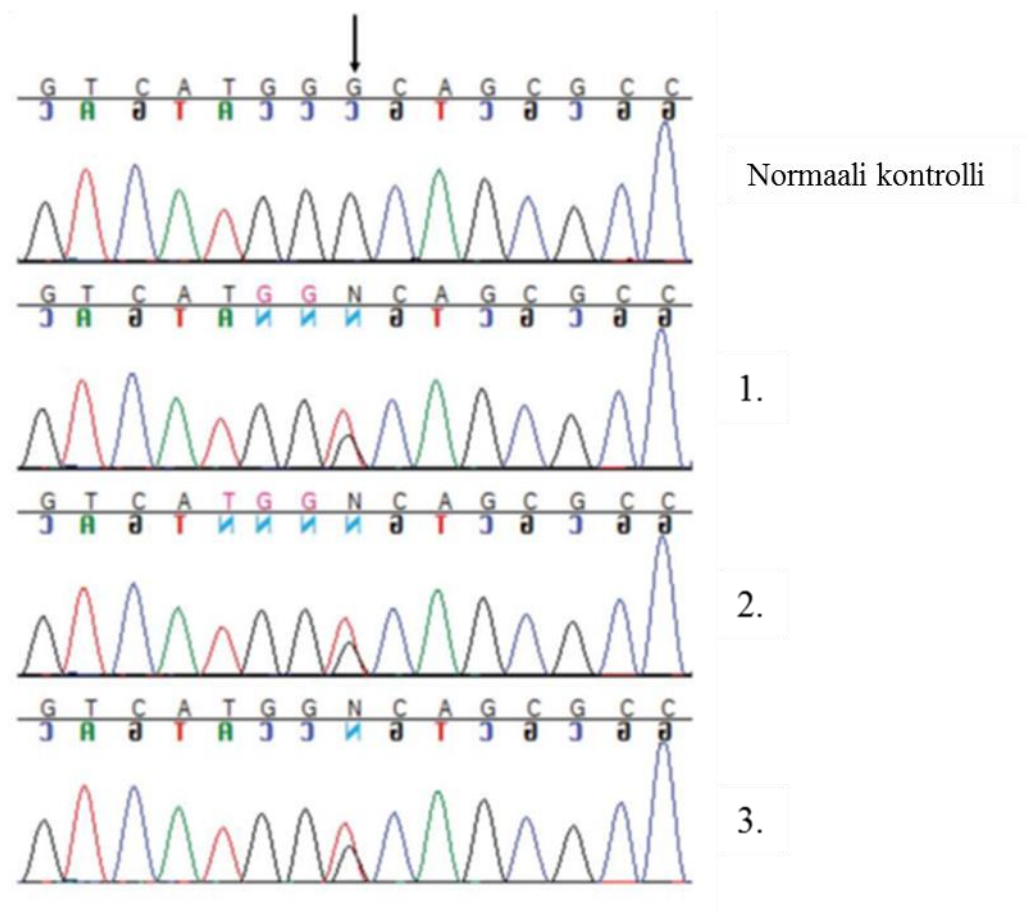
oireetonta tuntohermojen vauriota sekä lievää värinätunnon alenemaa. Sekä raajojen tyviosien että kärkeosien lihakset vaurioituvat, mutta pitkälle edenneessäkin taudissa potilaat kykenevät syömään ja hengittämään itsenäisesti. (Jokela. 2011, 18.) Penttilän ym. (2013, 5) mukaan bulbaariset oireet olivat erittäin harvinaisia ja esiintyivät taudin myöhäisvaiheessa. ENMG:ssä esiintyi neurogeenisiiä muutoksia ja seerumin CK-arvo oli kohonnut. Lihasten magneettikuvauksessa huomattiin rappeutumismuutoksia kaksoiskantaliuksessa (m. gastrocnemius) ja leveässä kantaliuksessa (m. soleus). Erotusdiagnostiikassa on huomioitava muut SMA-sairaudet, erilaiset perinnölliset ALS-muodot sekä Kennedyn tauti. (Jokela 2011, 18).

SMAJ/LOSMoN-sairauteen ei tällä hetkellä tunneta parantavaa hoitoa. Lihaskrampeja voidaan hoitaa magnesiumilla, kinidiinillä tai klonatsepamilla, ja myös neuropaattisen kivun lääkkeitä kuten gabapentiinistä tai amitriptyliinistä voi olla apua. Vapinaan voidaan käyttää beetasalpaajia, kuten propranololia. 50–60 ikävuoden tienoilla osa potilaista tarvitsee kävelyn apuvälineitä, mutta osa potilaista pystyy tässä iässä vielä juoksemaan. Toisin kuin useimmat motoneuronitaudit, SMAJ/LOSMoN ei lyhennä potilaiden elinikää ja yksittäiset potilaat ovat eläneet jopa 90-vuotiaiksi. (Jokela. 2011, 19). Penttilä ym. (2014a, 9) raportoi, että arvioitu SMAJ/LOSMoN-taudin esiintyvyys ylittää ALS-taudin esiintyvyyden Itä-Suomessa, ollen Pohjois-Karjalassa jopa 12/100 000.

2.2 SMA-mutaatiot

Lapsuus- ja nuoruusiän proksimaalinen SMA on autosomissa peittyvästi periytyvä lihastauti, joka aiheutuu *SMN1*-geenin mutaatioista, jotka osoitetaan DNA-näytteistä. Tyypillisin SMA-taudin taustalla oleva mutaatio on *SMN1*-geenin mutaatio, joka voi johtua sekä *SMN1*-geenin eksonin 7 deleetiosta että geenikon-versiosta. Deleetiossa (häviämässä) yksi tai useampi emäs häviää DNA-jaksosta ja geeni-konversiossa (geenimuuntumisessa) *SMN1*-geeni muuttuu lähes samankaltaiseksi, mutta toimimattomaksi *SMN2*-geeniksi. Tällöin liikehermosolujen tarvitsemää SMN (survival motor neuron) -valkuaisainetta ei muodostu ja liikehermosolut tuhoutuvat. Noin 95 prosentilla potilaista havaitaan *SMN1*-geenin eksonin 7 deleetio. Joillakin potilailla toisessa kromosomissa esiintyy *SMN1*-geenin eksonin 7 deleetio ja toisessa kromosomissa esimerkiksi *SMN1*-geenin pistemutaatio. (UTUlab 2013.)

SMAJ/LOSMoN-tauti aiheutuu heterotsygoottisesta mutaatiosta, c.197G>T, *CHCHD10*-geenissä, kromosomialueella 22q11. (Penttilä 2014a, 1). Tavallisessa solussa on tiettyä kromosomia kaksi kappaletta. Jos niiden alleelit eli geenimuodot ovat erilaiset, kromosomipari on heterotsygoottinen. Heterotsygoottisessa mutaatiossa mutaatio on peritty toiselta vanhemmalta. Missense-mutaatio on pistemutaatio, jossa yksi nukleotidi vaihtuu toiseen aiheuttaen sen, että kodoni koodaa eri aminohappoa kuin ennen mutaatiota. SMAJ/LOSMoN-taudin mutaatiossa on kyseessä transversio (kääntymä), jossa puriini, guaniini (G), vaihtuu pyrimidiiniin, tymiini (T). Mutaation seurauksena aminohappo, glysiini⁶⁶, vaihtuu valiiniksi. Syntyy mutaatio, joka muuttaa CHCHD10-proteiinin rakennetta ja toimintaa. Kuvassa 1 on esitetty nukleotidin 197 vaihtuminen guaniinista (piirretty mustana) tymiiniin (piirretty punaisena). N tarkoittaa mitä tahansa emästä. Ylhäällä normaali kontrolli ja potilailla 1, 2 ja 3 heterotsygoottinen mutaatio c. 197G>T. Heterotsygoottinen mutaatio näkyy kuvassa kahtena lähes samankokoisena pylväänä ja kahdella eri värillä. Toisen alleelin yksi emäs on piirtynyt mustalla, guaniini ja toisen alleelin yksi emäs punaisella, tymiini. SMAJ/LOSMoN-taudin diagnostiikassa *CHCHD10*-geenistä tutkitaan sekvensoimalla eksoni 2, jossa sijaitsevat kaikki toistaiseksi tunnetut tautia aiheuttavat mutaatiot, mutta tarvittaessa voidaan tutkia koko geeni. (Pirkanmaan sairaanhoitopiiri 2015).



KUVA 1. Heterotsygoottinen mutaatio c.197G>T (G66V) potilailla 1, 2 ja 3. (Penttilä ym. 2014a, 5). Muokattu kuva.

3 *CHCHD10*-GEENI

Bannwarth ym. (2014, 2335–2336) identifioivat ensimmäisen tautia aiheuttavan mutaation *CHCHD10*-geenissä eksomisekvensoinnilla. Eksomisekvensoinnissa selvitetään kaikkien proteiineja koodaavien alueiden emäsjärjestys. Immunohistokemiallinen värjäys ja HeLa-solujen immunokulta-elektronimikroskopia paikansivat *CHCHD10*-proteiinin mitokondrion kristaliitokseen eli mitokondrion sisäkalvon poimuihin. HeLa-solut ovat Henrietta Lacksin kohdunkaulansyövän soluista eristetty erilaistumaton ja kuolematon solulinja, jota käytetään tieteellisessä tutkimuksessa solun rakenteiden, DNA:n, RNA:n sekä proteiinisynteesin tutkimiseen. HeLa-solujen mitokondrioiden proteaasikäsittely ja jaottelu- eli differentiaalisentrifugointi osoitti, että *CHCHD10* on liukeneva proteiini mitokondrion kalvojen välissä. Proteaasikäsittelyssä käytettiin entsyyminä proteinaasi K:ta, joka pilkkoo proteiineja ja keratiinia. Koska *CHCHD10* proteiini sijaitsee mitokondrion sisällä, säilyi proteiini ehjänä entsyymikäsittelyssä. Differentiaalisentrifugointi perustuu partikkelien kokoon. Tutkittavaa materiaalia sentrifugoidaan askeleittain yhä suuremmilla kierrosnopeuksilla ja pidempiä aikoja siten, että halutut materiaalit sedimentoituvat putken pohjalle ja muut partikkelit jäävät liuokseen. Suurimmat partikkelit sedimentoituvat ensin. Solususpensiota sentrifugoidaan asteittain ja saadaan eroteltua rikkoutumattomat solut sekä tuma-, mitokondrio-, lysosomi- ja mikrosomifraktiot. (Bannwarth 2014, 2337.)

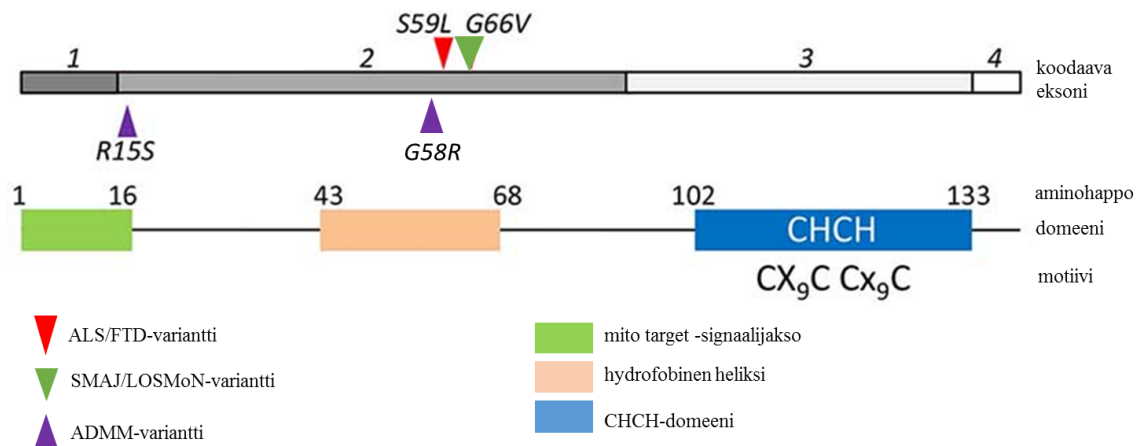
Proteiinirakenteessa on erotettavissa useita eri tasoja. Primaarirakenteeksi kutsutaan proteiinin aminohappojärjestystä, joka on DNA:n sekvenssin määräämä. Sekundaarirakenne sisältää polypeptidiketjun paikalliset laskokset ja kiertymät, kuten alfa-kierteen ja beta-laskoksen. Tertiäärirakenne sisältää primaari- ja sekundaarirakenteet, mutta lisäksi myös mahdolliset rakennetta vakauttavat kovalenttiset sidokset ja erilaiset vuorovaikutukset polypeptidiketjussa etäämpänä toisistaan olevien alueiden kanssa. Kvaternaarirakenteeksi kutsutaan proteiinirakenteen neljättä rakennetasoa. Tavallisesti kvaternaarirakenteita tavataan proteiineissa, joissa on kaksi tai useampia polypeptidiketjuja. Näiden polypeptidiketjujen yhdistelmillä on keskenään vuorovaikutuksia, joita yksittäisillä polypeptideillä ei ole. Nämä keskinäiset vuorovaikutukset ovat tärkeä osa kvaternaarirakenteen käsitettä. Kun proteiinin kokonaisrakenne on selvillä, voidaan selvittää proteiinin toimintaa. (Elliott & Elliott 2002, 38–44.)

CHCHD10-geenin rakennetta ei vielä täysin tunneta, mutta kuten muutkin CHCH-proteiinit, CHCHD10 sisältää kiertynyt kierre -heliksi-kiertynyt kierre -heliksi (coiled coil-helix-coiled coil-helix, CHCH) laskostumisen, joka on stabiloitu kahdella disulfididisidoksella eli rikkisidoksella. (Mesecke ym. 2005, 965). Kiertynyt kierre on proteiinirakenne, jossa samansuuntaiset alfa-kierteet kiertyvät toistensa ympäri, muodostaen kestävämpiä ryhmiä (Heino & Vuento 2010, 59). CHCHD10-proteiinin tertiäärirakenne on toistaiseksi selvittämättä, mutta ennustuksia rakenteesta on esitetty.

Bannwarthin ym. (2014, 2336) mukaan ennustettu CHCHD10-proteiinirakenne koostuu seuraavista osista: jäsentymätön N-terminaali, hydrofobinen heliksi ja CHCH-domeeni. N-terminaaliin aminohappoalueelle 1-16 sijoittuu oletettu mito target -signaalijakso. Mito target -signaalijakso on 10–70 aminohappoa pitkä peptidi, joka ohjaa uuden syntetisoidun proteiinin mitokondrioon. Nämä aminohapot pilkotaan, kun proteiini on ohjautunut mitokondrioon. (Makarow. 1999, 2712.) N-terminaalia seuraa erittäin hydrofobinen heliksi (vettähylykivä heliksi) aminohappoalueella 43–68. Bannwarthin ym. (2014, 2336) mukaan hydrofobinen heliksi toimii vuorovaikutuksen rajapintana eri proteiinien välillä, näin ollen S59L-mutaatio voisi mahdollisesti muuttaa proteiini-proteiini –vuorovaikutusta. Penttilän (2014a, 8) mukaan hydrofobinen heliksi on tärkeä, sillä se ylläpitää proteiinin rakennetta. Mikäli mutaatio sijoittuu heliksin alueelle rikkoen disulfidirakenteen, hajoaa myös proteiinirakenne, eikä proteiini enää toimi. Koska valiini on suurempikokoinen kuin glysiini, voi olla että G66V-mutaatio muuttaa hydrofobisen heliksin kokonaisrakennetta.

Bannwarthin ym. (2014, 2336) mukaan polypeptidin C-terminaalın puolelle, aminohappoalueelle 102–133, sijoittuu CHCH-domeeni. Proteiinin itsenäistä toiminnallista ja rakenteellista yksikköä kutsutaan domeeniksi (Elliott & Elliott 2002, 45). Mesecken ym. (2005, 965) mukaan CHCH-domeeniin sijoittuu kaksi CX9C-motiivia ja kaksi ylimääräistä kysteiiniä eli kysteiinitähdettä. On ennustettu, että neljä kysteiinitähdettä muodostavat kaksi disulfididisidosta. Kovalenttisenä sidoksena disulfididisidos on luja ja se sitoo kyseiset polypeptidiketjun osat toisiinsa, muodostaen proteiinin tertiäärirakenteen. Motiiviksi kutsutaan lyhyttä, usein vain muutamasta aminohappotähteestä muodostunutta primaarirakenteen jaksoa, joka ratkaisevasti vaikuttaa proteiinin ominaisuuksiin. Motiivit myös ohjaavat proteiineja oikeille paikoilleen solun sisäisessä liikenteessä. (Elliott & Elliott 2002, 45.)

Kuvassa 2 on esitetty toistaiseksi löydettyjen mutaatioiden sijoittuminen *CHCHD10*-geeniin ja geenin oletettu rakennekokonaisuus. Neljä eksonia ihmisen *CHCHD10*-geenistä koodaa 142 aminohapon mittaista CHCHD10-proteiinia. Aminohappoalueelle 1-16 sijoittuu oletettu mito target –signaalijakso (vihreä suorakaide), hydrofobinen heliksi sijoittuu aminohappoalueelle 43-68 (beige suorakaide) ja aminohappoalueelle 102-133 sijoittuu CHCH-domeeni (sininen suorakaide). Raportoidut mutaatiot on yhdistetty SMAJ/LOS-MoN-tautiin (vihreä kolmio), frontotemporaalidementiaan ja/tai amyotrofiseen lateraaliskleroosiin (ALS/FTD, punainen kolmio), sekä autosomaalisesti vallitsevaan mitokondriaaliseen myopatiaan (ADMM, violetti kolmio). Kaikki toistaiseksi löydettyt patogeeniset mutaatiot sijoittuvat *CHCHD10*-geenin eksoniin 2.



KUVA 2. Toistaiseksi löydettyjen mutaatioiden sijoittuminen *CHCHD10*-geeniin ja geenin oletettu rakennekokonaisuus. (Cozzolino ym. 2015) Muokattu kuva.

3.1 Molekyyligenetiikka

CHCHD10-geenin eri mutaatioiden on raportoitu aiheuttavan vakavaa ALS-sairautta sekä mitokondriaalista myopatiaa, joiden taudinkuva on erilainen kuin SMAJ/LOSMoN-taudissa. Toistaiseksi selville saadut patogeeniset *CHCHD10*-geenimutaatiot ovat seuraavat: G66V, S59L ja G58R. Nämä mutaatiot on osoitettu patogeenisiksi toiminnallisilla (funktionaalisilla) proteiinitutkimuksilla sekä segregatiolla. (Penttilä 2014b). Segregatio tarkoittaa mutaation ja taudin samanaikaista esiintymistä suuressa sukulaisjoukossa. Toistaiseksi *CHCHD10*-proteiinin tertiäärirakenne ja proteiinin toiminta ei ole tiedossa. Tämän vuoksi patogeeninen mekanismi taudeissa ei ole selvinnyt. (Penttilä. 2014a, 7).

Taulukossa 1 on esitetty keskeisimmät *CHCHD10*-geenin mutaatioita käsittelevät tutkimukset.

TAULUKKO 1. Keskeisimmät *CHCHD10*-geenin mutaatioita käsittelevät tutkimukset.

Tutkimus	1) Potilaat 2) Kontrollit	Löydetyt <i>CHCHD10</i> mutaatiot	Tulosten merkitys
Penttilä ym. 2014	1) 55 potilasta 2) 104 tervettä suomalaista	c.197G>T G66V	Aiheuttaa SMAJ-taudin
Bannwarth ym. 2014	1) 8 potilasta 2) 200 tervettä espanjalaita ja ranskalaista	c.176C>T S59L	Aiheuttaa ALS/FTD-taudin
Ajrourd-Driss ym. 2014	1) 15 potilasta 2) 1481 tervettä kaukaasialaista ja 80 tervettä latinalaisamerikkalaista	c.172G>C G58R	Aiheuttaa ADMM-taudin

3.1.1 Spinal Muscular Atrophy, Jokela Type (SMAJ)

Penttilä ym. (2014a, 2) tunnistivat 55:llä SMAJ/LOSMoN-tautia sairastavalla potilaalla saman c.197G>T heterotsygoottisen missense-mutaation *CHCHD10*-geenissä. Mutaatio sijoittuu eksoniin 2 ja hydrofobisen heliksin alueelle, kuten myös ALS/FTD-tautia aiheuttava S59L-mutaatio. Potilaat olivat 17 suomalaisesta suvusta. Mukana olivat Jokelan ym. (2011, 334) kaksi alkuperäistä sukua ja Müllerin ym. (2014) raportoima yksi suomalainen potilas, joka oli saanut aikaisemmin ALS-diagnoosin. Mutaatio löydettiin kytöntäanalyysillä ja genomisekvensoinnilla ja se segregoitui täysin taudin kanssa. Kytöntäanalyysissä tutkitaan assosiaatiota sen välillä, miten tietyt sukulaiset jakavat samanlaisen fenotyypin ja markkerialleelit keskenään, keskeistä on samojen markkerialleelien jakaminen eri sukulaisten kesken. Haplotyyppianalyysi osoitti perustaja- eli founder-mutaation. Perustajavaikutus tarkoittaa, että kaikki tautikromosomit ovat lähtöisin joko samasta perustajakromosomista tai hyvin pienestä kromosomijoukosta.

Sekvensoinnilla saatiin selville, että *CHCHD10*-geenimutaatio G66V esiintyy kaikilla suomalaisilla SMAJ/LOSMoN-potilailla, mutta puuttuu terveiltä perheenjäseniltä. Mutaatiota ei esiinny 104 terveen suomalaisen kontrollinäytteissä. (Penttilä ym. 2014a, 3.)

CHCHD10-geeni on ensimmäinen identifioitu SMA-tautia aiheuttava geeni, joka koodaa mitokondraalista proteiinia. (Penttilä ym. 2014a, 7).

3.1.2 Frontotemporaalidementia ja/tai amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALS/FTD)

Frontotemporaalidementia on aivojen rappeumasairaus, joka voi liittyä ALS-tautiin. Frontotemporaalidementiassa aivojen otsa- ja ohimolohkot rappeutuvat, aiheuttaen dementiaa sekä muutoksia potilaan persoonallisuudessa ja käytöksessä. (UTUlab 2014.) Bannwarthin ym. (2014, 2338) tutkimuksessa löydettiin heterotsygoottinen missense-mutaatio c. 176C>T. Mutaatiotyypinä ALS/FTD-taudissa on transitio (siirtymä) *CHCHD10*-geenissä, jossa pyrimidiini sytosiini (C) vaihtuu toiseen pyrimidiiniin, tymiiniin (T). Mutaation seurauksena seriini59 vaihtuu leusiiniksi. S59L-mutaatio tapahtuu hydrofobisessa heliksissä, joka sijoittuu geenin eksoniin kaksi.

Mutaatio löydettiin kahdeksalla ranskalaisella potilaalla, jotka sairastavat autosomaalisesti vallitsevaa frontotemporaalidementiaa ja/tai amyotrofista lateraaliskleroosia. Mutaatio löydettiin eksomisekvenssoinnilla ja segregatio toteutui perheessä. *CHCHD10*-geenin seulonta suoritettiin 21 uudella suvulla, jossa oli ilmentynyt samanlaisia oireita. Seulonnassa löydettiin sama S59L-mutaatio yhdellä potilaalla, joka on espanjalaista alkuperää, eikä ollut sukua ranskalaisille potilaille. (Bannwarth 2014, 2343).

Mutaatioproteiinin liikatuotanto HeLa-soluissa johti mitokondrioverkon pirstaloitumiseen (fragmentoitumiseen) sekä solun hienorakenteen epänormaalisuuteen, jotka olivat samankaltaisia myös todettujen potilaiden soluissa (Bannwarth 2014, 2343). Mitokondriot toimivat soluissa nykykäsityksen mukaan verkostomaisena rakenteena enemmän kuin yksittäisenä organelleina. Verkoston toimintaa ja rakennetta säädellään tarkasti useampien proteiinien ohjaamissa prosesseissa, jotka valvovat mitokondrioiden fuusioitumista ja jakautumista. (Karbowski & Youle 2003, 870–880.) Mitokondrioverkon apoptoosia (ohjelmoitua solukuolemaa) edeltää fragmentoituminen. Bannwarthin (2014, 2343) mukaan löydökset osoittavat, että mutaatio johtaa mitokondrion hengitysketjun vajavuuteen sekä potilaan lihaksissa että fibroblasteissa eli sidekudosta tuottavissa sidekudossoluissa. *CHCHD10*-proteiini ylläpitää mitokondrion kristojen morfologiaa (Bannwarth 2014, 2343).

3.1.3 Mitokondriaalinen myopatia (ADMM)

Mitokondriaalinen myopatia kuuluu laajempaan systemaattisten sairauksien joukkoon, jossa sairaus johtuu mitokondrion epänormaalista morfologiasta tai biokemikaalisista muutoksista. Mitokondraaliset oireyhtymät voivat johtua mutaatiosta joko mitokondriossa tai tumassa. ADMM-taudissa mutaatiogeneeni sijoittuu tumaan. Oireina potilailla on lihasten väsymistä ja surkastumista sekä rasiuksensietokyky on alentunut. (Ajroud-Driss ym. 2014, 1.)

Heiman-Pattersonin ym. (1997) tutkimuksessa löydettiin puerto ricolaisesta suvusta viiden sukupolven ajalta useita yksilöitä, jotka sairastivat autosomaalisesti vallitsevaa mitokondraalista myopatiaa (ADMM). Vain 5 prosenttia mitokondriaalisista oireyhtymistä on autosomaalisesti vallitsevia. Ajroud-Drissin ym. (2014, 5) tutkimuksessa löydettiin heterotsygoottinen missense-mutaatio *CHCHD10*-geenissä, c.172G>C. ADMM-taudissa on kyseessä transversio (kääntymä), jossa puriini guaniini (G) vaihtuu pyrimidiini sytosiiniksi (C). Mutaation seurauksena aminohappo glysiini58 (G) on vaihtunut arginiiniksi (R), syntyy mutaatio G58R, joka muuttaa CHCHD10 proteiinin rakennetta ja toimintaa.

Mutaatio löydettiin kytkentäanalyysillä ja geenisekvensoinnilla, myös segregatio toteutui perheessä. *In vitro* -tutkimukset osoittavat, että variantti eli mutatoitunut geeni sijaitsee mitokondriossa samassa paikassa kuin kontrolli. G58R-mutaatiogeenillä tai R15S/G58R-mutaatiogeenillä transfektoidut solut osoittivat mitokondrion pirstaloitumista verrattuna villityyppiin tai soluihin, joita oli transfektoitu vain R15S-mutaatiogeenillä. Löydökset ehdottavat, että R15S-variantti ei ehkä olisi patogeeninen (sairautta aiheuttava). Tutkimuksessa huomattiin, että G58R-variantti sijaitsee mutaation S59L vieressä. Tulos löydettiin yhdestä suuresta suvusta, jossa esiintyy erilaisia neurologisia sairauksia. Tutkimusryhmä päätteli, että useita fenotyyppisiä voi esiintyä viallisissa kudoksissa, jotka ovat suuresti riippuvaisia oksidatiivisesta fosforylaatiosta, mukaan lukien lihakset ja hermokudokset. (Ajroud-Driss ym. 2014, 1-8.)

4 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE, TARKOITUS JA TEHTÄVÄT

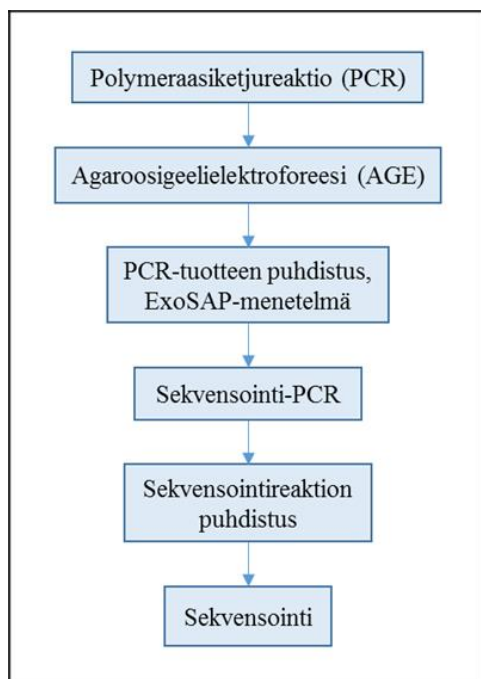
Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa analysoitavaa materiaalia geneetikolle, jotta tämä voi määrittää onko potilaalla SMAJ/LOSMoN vai jokin muu sairaus. Tutkimustuloksilla pyritään saamaan potilaalle diagnoosi. Tietoa voidaan käyttää hyväksi tarjoamalla geneettiseen riskiprofiiliin perustuvaa perinnöllisyysneuvontaa sekä seuranta. Kun tauti ja taudin syntymekanismi on tunnettu, on mahdollisuus kehittää tauteihin uusia hoitomuotoja, kuten esimerkiksi sairastuneiden geeniterapioita. Opinnäytetyön tarkoituksena oli sekvensoida 75:n SMAJ/LOSMoN-tyyppistä tautimuotoa sairastavan potilaan DNA-näytteet ja kuvata geenin sekvensointiin käytetyt menetelmät sekä koota tietoa motoneuronitaudeista, erityisesti SMAJ/LOSMoN-taudista. Opinnäytetyön tehtävänä oli selvittää, esiintyykö aineistossa muita CHCHD10-geenin mutaatioita jo löydetyn G66V-mutaation lisäksi.

5 TUTKIMUS- JA ANALYYSIMENETELMÄT

Tässä opinnäytetyössä käytettiin kvalitatiivista tutkimusmenetelmää. Opinnäytetyön toteutettiin osana laajempaa tutkimusryhmän tutkimusta. Kvalitatiivinen tutkimus on oikea ratkaisu silloin, kun tehdään esitutkimusta tai -selvitystä jotakin laajempaa hanketta varten (Hakala 2008, 171). Kvalitatiivisen tutkimuksen tarkoitus on tutkia kohdetta mahdollisimman kokonaisvaltaisesti ja sen pyrkimyksenä on ennemmin löytää tai paljastaa tosiasioita kuin todentaa jo olemassa olevia väittämiä. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara, 2008, 157.)

Kanasen (2010, 50) mukaan kvalitatiivisessa menetelmässä tutkimusta ohjaa aineisto, joten tutkimuksesta käytetäänkin nimitystä "aineistolähtöinen" tutkimus. Kvalitatiivisessa menetelmässä kohdejoukko valitaan tarkoituksenmukaisesti, eikä satunnaisotoksena (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2008, 160). Tässä opinnäytetyössä aineisto koostuu 75:stä erityyppisiä motoneuronitauteja sairastavien potilaiden DNA-näytteistä, jotka oli kerätty valmiiksi. Tulosten analyysin suoritti tutkimusryhmän geneetikko.

DNA:n ymmärtämisestä on tullut erottamaton osa lääketieteen tutkimukselle ja nopeiden sekvensointimenetelmien kehittyminen on kiihdyttänyt biologian ja lääketieteen kehitystä. DNA:n sekvensointi on prosessi, jossa määritetään nukleotidien järjestys DNA-molekyylissä. Se sisältää kaikki menetelmät tai tekniikat, joita käytetään neljän eri emäksen: adeniinin (A), guaniinin (G), sytosiinin (S) ja tymiinin (T) järjestyksen muodostaman geneettisen koodin selvittämiseen. (Timmer 2009.) Ensimmäiset DNA-järjestykset selvitettiin 1970-luvun alussa kromatografialla. Nykyisin käytössä olevat fluoresenssiin perustuvat automatisoidut analysointimenetelmiä käyttävät DNA-sekvensserit ovat tehneet DNA:n selvittämisestä nopeampaa ja helpompaa. (Timmer 2009.) Kaaviossa 1 on esitetty opinnäytetyössä käytetyt analyysimenetelmät.



KAAVIO 1. Opinnäytetyössä käytettyjen analyysimenetelmien kulku.

Polymeraasiketjureaktio (PCR). PCR-menetelmässä monistetaan kahden oligonukleotidialukkeen välinen DNA-jakso. Alukkeet (primerit) suunnitellaan siten, ettei monistettavassa DNA:ssa ole muualla samanlaisia kohtia, alukkeita käytetään rajaamaan monistusalue. PCR-reaktio voidaan jakaa kolmeen osaan: denaturaatiovaihe, alukkeiden liittymisvaihe ja pidentymisvaihe eli elongaatio- tai ekstensiovaihe. Denaturaatiovaiheessa DNA denaturoituu ja sen vastinjuosteet irtoavat toisistaan korkean lämpötilan vaikutuksesta. Kun lämpötilaa lasketaan hetkellisesti alukkeet pystyvät kiinnittymään templaattiin niille komplementaariseen kohtaan. Pidentymisvaiheessa tutkittavalle DNA-kohdalle spesifiset alukkeet kiinnittyvät yksisäikeiseen DNA:han emäsparisäännön mukaisesti. PCR-menetelmällä haluttu DNA-pätkä voidaan monistaa eksponentiaalisesti, toistamalla reaktiota 20–30 kertaa. (Glick & Pasternak. 2003, 110–115.)

Agaroosigeelielektroforeesi (AGE) on nopea ja tehokas menetelmä erikokoisten DNA/RNA-jaksojen erottamiseen, tunnistamiseen ja puhdistamiseen. Agaroosigeelielektroforeesin idea on yksinkertainen: negatiivisesti varautuneet DNA-fragmentit ajetaan sähkökentässä kohti positiivista napaa (anodi) agaroosigeelissä. Pienet fragmentit liikkuvat geelissä nopeammin kuin pitkät. (Glick & Pasternak 2003, 52.) DNA tarvitsee värin näkyäkseen geelillä. Käytössä on erilaisia väriaineita, turvallinen vaihtoehto on esimerkiksi SYBR safe DNA gel stain 10000x concentrate in DMSO –geeliväri (Invitrogen), joka ei ole yhtä mutageeninen kuin etidiumbromidi. Geeliväri lisätään geelin joukkoon,

josta se tunkeutuu nukleiinihappojen emästen väliin, DNA:n kulkeutuessa geelillä. Kun geeliä valaistaan UV-valolla, SYBR safe DNA gel stain 10000x concentrate in DMSO – geeliväri fluoresoi vihreänä. (Invitrogen. 2011, 2.) Ennen näytteiden pipetoimista näytekaivoihin, lisätään näytteisiin näytekaivoja, joka on ajopuskuria raskaampaa. Näytekaivoja auttaa näytteen pipetoimisessa näytekaivon pohjalle ja näytekaivojen väriaineita voidaan käyttää ajon seuraamiseen. AGE-menetelmää voidaan esimerkiksi käyttää PCR-reaktion toimivuuden tarkistamiseen ja varmistamaan, ettei reaktio ole kontaminoitunut. (Glick & Pasternak 2003, 52).

PCR-tuotteen puhdistus ExoSAP-menetelmällä. ExoSAP-menetelmä on yksinkertainen tapa puhdistaa PCR-tuotteet ennen sekvensointia. ExoSAP-reaktioseos sisältää kaksi hydrolyyttistä entsyymiä: eksonukleaasi I (ExoI) ja Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP). ExoSAP-menetelmä perustuu alukkeiden ja dNTP:n entsymaattiseen hajotukseen. Eksonukleaasi I ExoI pilkkoo yksiketjuisen DNA:n 3'→5' suunnassa poistaen jäljelle jääneet alukset ja SAP poistaa ylimääräiset dNTP:t. (Affymetrix 2015.)

Sekvensointi PCR. Ennen kun näytteet syötetään sekvensaattoriin, tehdään yksi sekvensointireaktio kutakin näytettä kohden. Sekvensointireaktiot tulee myös puhdistaa. Sekvensointireaktio on hyvin samankaltainen kuin tavallinen PCR-reaktio. Tärkeimpänä erona on, että sekvensoinnissa käytetään vain yhtä aluketta, jonka perään rakentuu DNA-nauhaa templaatin mallin mukaisesti. Toisena erona on, että sekvensointi PCR:ssä tavallisten deoksinukleotidien lisäksi reaktiossa on mukana dideoksinukleotideja. Kun dideoksinukleotidi liitetään syntyvään DNA-nauhaan, niin nauhan piteneminen loppuu. Kukin dideoksinukleotidi on merkattu omalla aallonpituudella fluoresoivalla leimalla. (Thermo Fisher Scientific 2013.)

Sekvensointireaktion puhdistus. Menetelmällä poistetaan sekvensointireaktiosta Big-Dye-reaktioseos, ylimääräiset dNTP:t, primerit, suolat sekä muut molekyyllipainoltaan kevyet ylimääräiset tuotteet geelin avulla, jotka voivat lisätä häiriötekijöitä sekvensoinnin tulkinnaissa (GE Health Life Sciences 2013).

DNA:n sekvensointi toteutetaan useimmiten automaattisilla sekvensaattoreilla. Automaattinen sekvensointi hyödyntää fluoresoivien leimojen käyttöä, jossa fluoresoivalla leimalla merkatus nukleotidit ajetaan geelielektroforeesilla. Sekvensointipalvelussa PCR-tuotteet luetaan kapillaarielektroforeesilla geeliltä fluoresoivaa valoa tunnistavalla CCD-

kameralla (Charge-Coupled Device). Laite tunnistaa kunkin dideoksinukleotidin sen lähettämän fluoresoivan valon perusteella ja tuottaa kromatogrammin. Kromatogrammista nähdään DNA-pätkän emäsjärjestys. Jokainen kromatogrammin huippu vastaa yhtä nukleotidia. (Timmer 2009.)

6 OPINNÄYTETYÖPROSESSI

Aihe opinnäytetyölle saatiin syksyllä 2014 ja ensimmäinen palaveri opinnäytetyön toteuttamisesta pidettiin 19.9.2014 geneetikko Sini Penttilän kanssa Lihastautien tutkimuskeskuksessa. Opinnäytetyön suunnitelma laadittiin syksyllä 2014 ja suunnitelma sekä luvat hyväksyttiin 1.12.2014. Opinnäytetyön lähdemateriaalin kerääminen aloitettiin syyskuussa 2014 ja teoriaosuuden kirjoittaminen tammikuussa 2015. Kirjoittamisprosessi jatkui syksyyn 2015 asti.

Kokeellinen osuus toteutettiin Lihastautien tutkimuskeskuksen laboratoriossa ajalla 8.-19.12.2014. Työ aloitettiin mahdollisimman pian, sillä tutkimusryhmän työ oli kesken ja tuloksia haluttiin mahdollisimman pian. Tutkimus sisälsi 75 DNA-näytettä. Valitut potilaat sairastivat SMAJ/LOS MoN-tyyppistä tautimuotoa ja potilaat oli haplotyypitetty. Genominen DNA oli eristetty valmiiksi leukosyyteistä tutkimusryhmän standardimenetelmällä.

Polymeraasiketjureaktio (PCR). Näytteet laimennettiin 20 ng/ μ l ja alukkeet 20 μ M. Näytteet, 2 x mastermix, DMSO sekä alukkeet otettiin huoneenlämpöön sulamaan. Identifioitiin stripit, mastermix-putki ja vesi. Pipetoitiin näytettä 5 μ l strippeihin. Koska PCR-reaktio on hyvin altis kontaminaatiolle, työssä käytettiin suodattimella varustettuja pipetinkärkiä.

Vaihdettiin suojakäsineet. Mastermix pipetoitiin ohjeen mukaisessa järjestyksessä ja pipetinkärki vaihdettiin jokaisen pipetoinnin välissä. 16, 5-kertaiseen mastermixiin pipetoitiin: 89,9 μ l steriiliä vettä, 206,3 μ l 2 x Thermo Scientific PCR Mastermixiä, 20,6 μ l DMSO:ta, 6,6 μ l F-alukkeita ja 6,6 μ l R-alukkeita. Valmis mastermix sekoitettiin ja sentrifugoitiin. Mastermixiä pipetoitiin näytteisiin 20 μ l, veteen viimeisenä ja pipetinkärjet vaihdettiin jokaisen pipetoinnin jälkeen. Laminaarivirtauskaapin taso puhdistettiin alkoholilla ennen sulkemista. Stripit sentrifugoitiin ja asetettiin PCR-laitteeseen. Valmiit PCR-reaktiotuotteet säilytettiin jääkaapissa.

Reagenssien ja materiaalien säilytyslämpötiloihin kiinnitettiin erityistä huomiota. Entsyymit tulee aina käsittelyn aikana pitää kylmänä jäähauteessa tai kylmäblokissa, joten

ne tuotiin työkohteeseen kylmäblokissa pakastimesta juuri ennen reaktioseokseen pipetoimista ja vietiin käytön jälkeen välittömästi takaisin pakastimeen. PCR-laitteena käytettiin Biometra® T Personal Combi-Block -laitetta. Taulukossa 2 on esitetty käytetyn PCR-ohjelman kulku.

TAULUKKO 2. PCR-ohjelman kulku.

1. 95 °C	10 min	
2. 95 °C	1 min	x 3
3. 67 °C	1 min	
4. 72 °C	1 min	
5. 95 °C	1 min	x 3
6. 64 °C	1 min	
7. 72 °C	1 min	
8. 95 °C	1 min	x 3
9. 61 °C	1 min	
10. 72 °C	1 min	
11. 95 °C	1 min	x 3
12. 58 °C	1 min	
13. 72 °C	1 min	
14. 95 °C	1 min	x 25
15. 55 °C	1 min	
16. 72 °C	1 min	
17. 72 °C	10 min	
18. 6 °C ∞	∞	

Taulukossa 3 on esitetty työssä käytetyt *CHCHD10* eksonin 1 F- ja R-alue, sekä eksonin 3-4 F- ja R-alue. Haettu PCR-tuotteen pituus eksonille 1 oli 390 bp ja eksonille 3-4 677 bp.

TAULUKKO 3. F- ja R-alukkeet *CHCHD10*-geenille, eksonille 1 ja 3-4.

F-aluke, <i>CHCHD10</i> eksoni 1	AAGGGAGATGTCCGGAGG
R-aluke, <i>CHCHD10</i> eksoni 1	GACGACCCACGTCTCCAC
F-aluke, <i>CHCHD10</i> eksoni 3-4	ACATGCTGTCTGTAGCCGC
R-aluke, <i>CHCHD10</i> eksoni 3-4	ATCCTGACCCACCTCATC

Agaroosigeelielektroforeesi (AGE). PCR-reaktion toimivuus varmennettiin agaroosigeelielektroforeesilla. Ajolaitteena käytettiin Pharmacia Biotech Hofer HE 33 agaroosielektroforeesilaitetta. Geeli valettiin 1.5 prosenttiseksi. Punnittiin 0.75 g agaroosia, joka siirrettiin erlenmeyeriin. Mitattiin 50 ml käyttämätöntä 1 x TAE-puskuria ja kaadettiin erlenmeyeriin. Sekoitettiin varovasti. Agaroosia keitettiin mikroaaltouunissa, kunnes liuos oli kirkasta ja tasaista. Liuosta sekoitettiin välillä ja seurattiin, ettei liuos kiehu yli. Annettiin liuoksen jäähtyä noin 60 °C:ksi. Lisättiin 5 µl SYBR safe DNA gel stain 10000x concentrate in DMSO, Invitrogen –geeliväriä. Geeliväri lisättiin vetokaapissa. Liuos kaadettiin ajolaitteen kelkkaan, asetettiin kammat ja annettiin jähmettyä 20 minuuttia. Geelin jähmetyttyä poistettiin kammat.

Näytteet laimennettiin kuoppalevyllä: 1 µl latauspuskuria ja 5 µl näytettä. Kaadettiin 1 X TAE-puskuria ajolaitteeseen niin, että geeli peittyi. Pipetoitiin 3 µl kokostandardia ensimmäiseen kaivoon. Kokostandardina käytettiin Thermo Scientific Gene Ruler 100 bp DNA Ladder -kokostandardia. Jokaiselle riville käytettiin omaa kokostandardia. Näytettä pipetoitiin 6 µl kuoppalevyllä geelille. Ajolaitteen suojakansi asetettiin päälle. Virraksi valittiin 125 V ja ajoaika oli 15–20 minuuttia. Geeli kuvattiin UV-kameralla ja tallennettiin laboratorion tietokoneelle. Geelikuva tulostettiin ja liitettiin laboratoriopäiväkirjaan, sekä lisäksi kuvaan identifioitiin näytetiedot.

Exosap PCR:n puhdistus. Tässä opinnäytetyössä käytettiin Illustra™:n ExoProStar™ 1-Step Enzymatic PCR and Sequence Reaction Clean-Up –kittiä (GE Healthcare). PCR-strippeihin pipetoitiin ExoProStar™ 1-Step Enzymatic PCR and Sequence Reaction Clean-Up Kit -entsyymiä 2 µl ja PCR-reaktiotuotetta 5 µl. Seos valmistettiin ja säilytettiin jäähauteessa, koska entsyymien lämpimässä pitämistä tulee välttää. Ajettiin EXOSAP-ohjelma: 15 minuuttia +37 °C, jolloin entsyymit poistavat ylimääräiset alukkeet ja nukleotidit ja 15 minuuttia +80 °C, jolloin entsyymit inaktivoituvat. PCR-laitteena käytettiin Biometra® T PersonalCombi-Block -laitetta. Koska reaktio ei säily, jatkettiin välittömästi sekvensointireaktioon.

Sekvensointi-PCR. PCR-strippeihin pipetoitiin jäällä 15 µl BIG DYE mixiä (7 µl vettä, 0.67 µl BIG DYE ja 7.33 µl BIG DYE 5x sekvensointipuskiruliuosta), 2 µl F- ja R – alukkeita (3.2 µM), sekä 3 µl PCR-templaattia. Stripit laitettiin PCR-laitteeseen ja käytettiin SEKV-ohjelmaa (taulukko 4) Valmiit sekvensointireaktiot säilytettiin +4 °C:n lämpötilassa.

1) 96 °C	5 min.	
2) 96 °C	10 sek.	x 25
3) 50 °C	5 sek.	
4) 60 °C	4 min.	
5) 4 °C	∞	

TAULUKKO 4. SEKV-ohjelma. Syklit 2-4 toistetaan peräkkäin 25 kertaa.

Sekvensointireaktion puhdistus. Geelisuodattimena käytettiin Performa® DTR Ultra 96-Well Plate –kittiä (Edge Bio). 96-suodatinlevy sentrifugoitiin 5 minuuttia 850 x G 96-kuoppalevyn kanssa. Sekvensointireaktion näytteet pipetoitiin geelisuodattimiin. Asetettiin kansi päälle ja sentrifugoitiin uuden, puhtaan 96-kuoppalevyn kanssa 5 minuuttia 850 x G. Kuoppalevyn päälle asetettiin tarrakansi. Denaturoitiin +98 °C:ssä 2 minuuttia ja siirrettiin näytteet nopeasti jäälle 2 minuutiksi. Näytteet sekoitettiin ja sentrifugoitiin.

Puhdistetut tuotteet toimitettiin Tampereen yliopiston COFA:n (Core facilities and research services) sekvensointipalveluun, jossa analysoitiin ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer. Lihastautien tutkimusryhmän geneetikko analysoi COFA:lta saadut sekvensointitulokset.

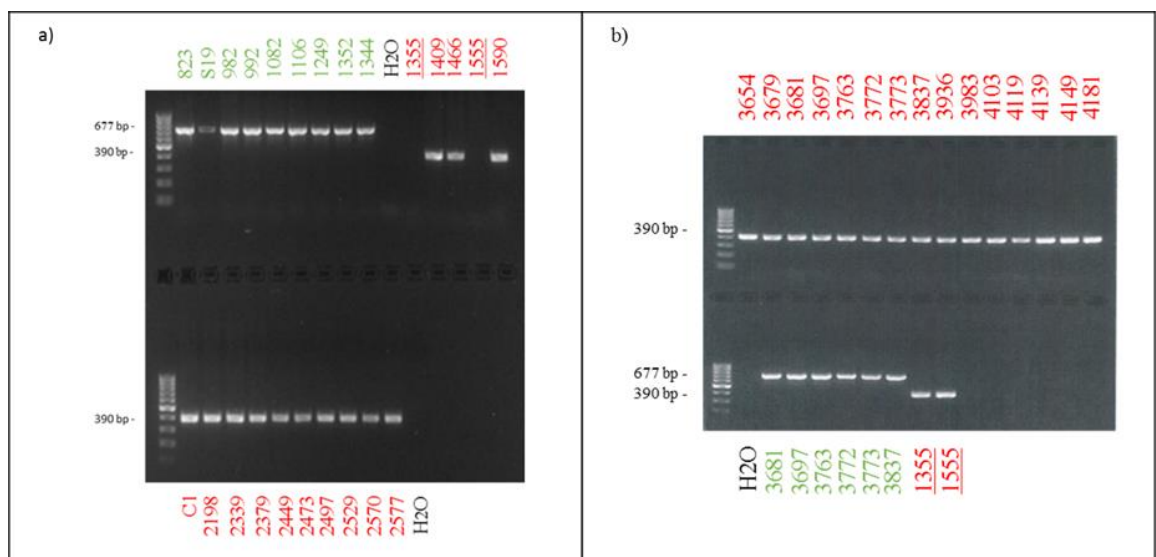
7 TULOKSET

Tulokset kirjattiin laboratoriopäiväkirjaan, johon merkattiin jokainen näyte, käytetyt materiaalit sekä työvaiheet yksityiskohtaisesti. Kaikki tulokset raportoitiin ja näytteet, jotka eivät olleet monistuneet, valmistettiin ja ajettiin uudelleen, eikä monistumattomia näytteitä käytetty analyysiin.

7.1 AGE

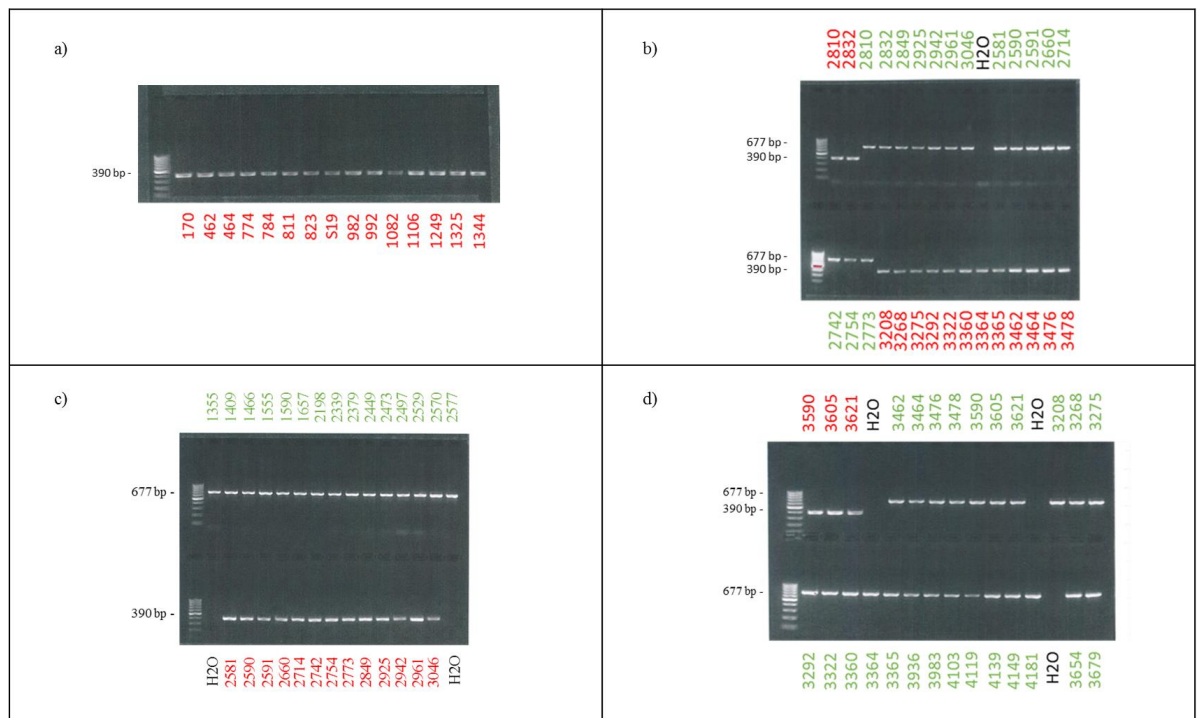
Negatiivisena kontrollina käytettiin steriiliä vettä. Jokaisessa ajossa kontrollit olivat negatiiviset, joten näytteet eivät olleet kontaminoituneet. Positiivista kontrollia ajoissa ei tarvittu, sillä menetelmä on testattu tutkimusryhmässä aiemmin ja menetelmä oli rutii-nikäytössä. PCR-tuote oli puhdasta, sillä näkyvissä ei ole ylimääräisiä fragmentteja ja PCR-tuote oli oikeankokoista: eksonille 1 390 bp ja eksonille 3-4 677 bp.

Kuvassa 3 a) nähdään, että näytteiden numero 1355 ja 1555, eksoni 1 (alleviivatut), PCR-tuotteet eivät monistuneet. Koska ajon muut näytteet toimivat, kyseessä olevien kahden näytteen näytelaimennoksissa on ollut häiriötä tai alkuperäinen näyte ei ole ollut homogeeninen, jolloin PCR-reaktioon saatiin vain vettä näytteeksi. Kyseiset näytteet valmistettiin 18.12.2014 uudestaan, kuvassa 3 b) nähdään uudelleen valmistetut näytteet, jossa kummankin näytteen PCR-tuotteet ovat monistuneet hyvin ja puhtaasti. Kuvissa eksoni 1 on merkitty punaisella ja eksoni 3-4 vihreällä.



KUVA 3 a). AGE-ajo 10.12.2014. b) AGE-ajo 18.12.2014.

Kuvassa 4 on esitetty kaikki AGE-ajot ajalta 9.-18.12.2014. PCR-tuotteet olivat kaikki oikean kokoisia. Koska H₂O-näytteissä ei ole tuotetta voidaan todeta, että käytetyissä reagensseissa ei ole kontaminaatioita. Ajoissa ei ole näkyvissä ylimääräisiä fragmentteja, joten reaktio on toiminut oikein. Kuvissa eksoni 1 on merkitty punaisella ja eksoni 3-4 vihreällä.

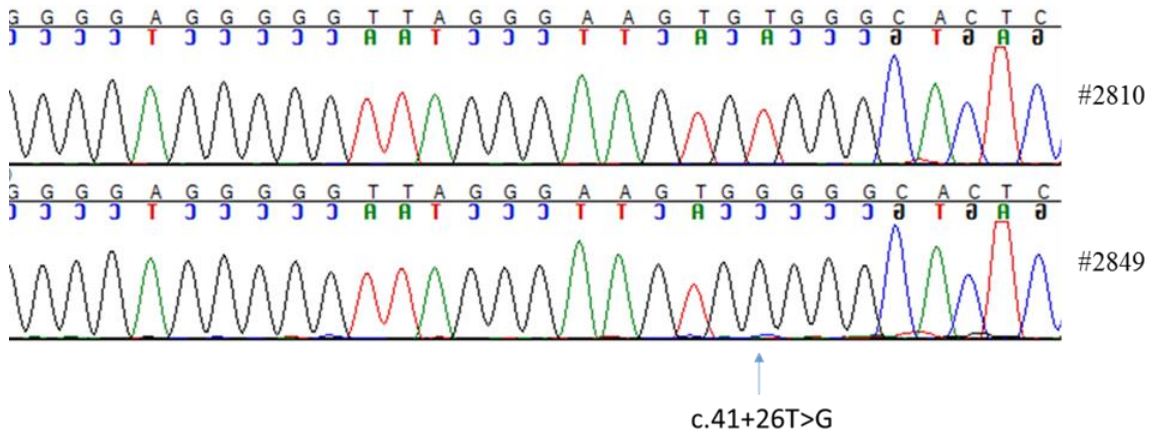


KUVA 4. AGE-ajot ajalta 9.-18.12.2014. a) 9.12.2014 b) 9.12.2014 c) 10.12.2014 d) 16.12.2014

7.2 Sekvensointi

Sekvensointidata oli puhdasta ja hyvin tulkittavissa. Kuvassa 7 näkyy, että jokainen elektroferogrammin huippu esiintyy tasaisin välein ja yksivärisenä. Muutamia peruslinjan huippuja voi olla läsnä, mutta hyvä templaatti ja alukkeet ovat minimoineet nämä häiriöt. Sekvenssissä #2849 on nähtävissä normaaliväestössä yleinen SNP (single nucleotide polymorphism) c.41+26T>G. Tässä SNP:ssä pyrimidiiniemäs tymiini (T) on vaihtunut puriiniin, guaniini (G). Kyseessä oleva SNP on homotsygoottinen, sillä guaniinin huippu on yksivärisen ja yhtä korkea kuin muut guaniinin (G) huiput.

Eri ihmisten genomit eroavat toisistaan noin 0,1 prosenttia. Yli 90 prosenttia ihmisten välisistä eroista on yhden nukleotidin muutoksia, jotka sijaitsevat keskimäärin 100–300 emäksen välein keskittyen variaatiokohtiin. Näitä yhden nukleotidin muutoksia kutsutaan snipeiksi (single nucleotide polymorphism). (Heino & Vuento 2010, 177.)



KUVA 5. Ylhäällä #2810, tulos normaali. Alhaalla #2849, tulos normaali, mutta sekvenssissä nähtävissä SNP c.41+26T>G homotsygoottisena.

8 POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Etiikka ja luotettavuus

”Terveydenhuollon päämääränä on terveyden edistäminen, sairauksien ehkäisy ja hoito sekä kärsimyksen lievittäminen.” Keskeisinä terveydenhuollon ammattiryhmien eettisissä ohjeistoissa on ihmisarvon ja itsemääräämisoikeuden kunnioittaminen, ihmiselämän suojeleminen ja terveyden edistäminen. (ETENE 2001, 1-2.) Opinnäytetyön kaikissa vaiheissa toimitettiin eettisten periaatteiden mukaisesti. Tutkimuksessa käytettiin potilasnäytteitä, joita käsiteltiin luottamuksellisesti ja siten, ettei opinnäytetyön yhteydessä potilaita voitu näyttötietojen perusteella tunnistaa. Potilaat olivat tutkimuksessa mukana vapaaehtoisesti.

Tutkimuseettisen neuvottelukunnan (2012, 6) mukaan olennainen osa tutkimusetiikkaa on hyvän tieteellisen tavan noudattaminen eli rehellisyys, tarkkuus ja huolellisuus. Myös mittaustulokset tulee raportoida tarkasti ja tiedot tulee arkistoida. ”Tieteellinen tutkimus voi olla eettisesti hyväksyttävää ja luotettavaa ja sen tulokset uskottavia vain, jos tutkimus on suoritettu hyvän tieteellisen käytännön edellyttämällä tavalla.” Eettisyyden lisäksi tutkimuksen suorittajaan kohdistuvat lainsäädännön asettamat velvoitteet, muun muassa tekijänoikeuksien kunnioittaminen, yksityisyyden suojaaminen sekä vaitiolo- ja salassapitovelvollisuus. Opinnäytetyön teoriataustaa kirjoitettaessa on pyritty käyttämään mahdollisimman alkuperäisiä ja uusia lähteitä. Viittauksilla kunnia on osoitettu alkuperäiselle tekijälle tai alkuperäisille tekijöille.

Tuloksia voidaan pitää luotettavina, koska työt on tehty työyksikön työohjeita noudattaen ja tarkoituksenmukaisilla, geneetikon valitsemilla näytteillä. Työtä tehtäessä työskenneltiin huolellisesti, tarkasti ja vastuullisesti. Työn aikana tehdyt työvaiheet, toiminnot ja tulokset kirjattiin yksityiskohtaisesti tutkimuspäiväkirjaan. Saadut tulokset on esitetty selkälaisenaan, mitään lisäämättä tai poistamatta. Käytetyt materiaalit identifioitiin siten, että niistä käy selkeästi ilmi, mistä näytteestä ja testistä on kyse. Jos näyte ei ollut monistunut, tehtiin se uudelleen eikä virheellistä tulosta huomioitu analyysissä.

PCR-reaktio on hyvin altis kontaminaatiolle, joten työskenneltäessä käytettiin suojakäsineitä ja suodattimella varustettuja pipetinkärkiä. Työskentelytapoihin kiinnitettiin huomiota ja reagenssit oli jaettu pieniin eriin ja putkien sisältö sentrifugoitiin pohjalle ennen

avaamista. Reaktiossa tarvittavat aineet yhdistettiin, sekä näytteet että reaktioseos pipetoitiin vetokaapissa. Reagenssien ja materiaalien säilytyslämpötiloihin kiinnitettiin erityistä huomiota. Koska entsyymit tulee aina käsittelyn aikana pitää kylmänä jäähauteessa tai kylmäblokissa ja entsyymien lämpimässä pitämistä tulee välttää, ne tuotiin työkohteeseen kylmäblokissa pakastimesta juuri ennen reaktioseokseen pipetoimista ja vietiin käytön jälkeen välittömästi takaisin pakastimeen. AGE-ajossa käytettiin steriiliä vettä negatiivisena kontrollina, positiivista kontrollia ei tarvittu, koska menetelmä oli aikaisemmin optimoitu ja toimii rutiinikäytössä.

Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset

Opinnäytetyössä selvitettiin, esiintyykö aineistossa muita *CHCHD10*-geenin mutaatioita jo löydetyn G66V-mutaation lisäksi. Aineistosta ei löytynyt uusia mutaatioita luultavasti siksi, että kaikki tunnetut *CHCHD10*-geenin mutaatiot sijaitsevat eksonissa 2. Tässä aineistossa oli tutkittavana geenin eksonit 1 ja 3-4. Tutkimustulos tukee oletusta, että eksonissa 1 ja 3-4 ei ole tautia aiheuttavia mutaatioita.

SMAJ/LOSMoN on toistaiseksi löydetty vain Suomesta ja keskittynyt Itä-Suomeen. Todennäköisesti mutaatio on lähtöisin itä-suomalaiselta ja G66V-mutaatio on asutushistoriasta johtuen rikastunut juuri Itä-Suomen alueelle. Geneettisellä menetelmällä on toistaiseksi SMAJ/LOSMoN-potilaita varmistettu 55 ja arvioitu että SMAJ/LOSMoN-taudin esiintyvyys ylittää ALS-taudin esiintyvyyden Itä-Suomessa, ollen Pohjois-Karjalassa jopa 12/100 000. Todennäköisesti ennen SMAJ/LOSMoN-taudin diagnosointia osa SMAJ/LOSMoN-potilaista on saanut ALS-diagnoosin. Tämä voi selittää, miksi aikaisempina vuosina Itä-Suomessa on raportoitu enemmän ALS-tautia kuin muualla Suomessa.

Mielenkiintoista on, että toistaiseksi löydetty sairauksia aiheuttavat tunnetut mutaatiot sijaitsevat lähekkäin *CHCHD10*-geenissä, mutta aiheuttavat hyvin erilaisia tauteja. Etenkin mutaatiot G66V, G58R ja S59L sijaitsevat hyvin lähekkäin ja hydrofobisen heliksin alueella. Kuitenkin tautien vakavuusasteissa on huomattava ero, G66V-mutaatio aiheuttaa oirekuvaltaan huomattavasti lievempää tautia kuin S59L-mutaatio, joka aiheuttaa vakavan ALS-taudin. G66V-mutaatio *CHCHD10*-geenissä ei aiheuta muita sairauksia kuin

SMAJ/LOSMoN-taudin. Yllättävää on, että G66V-mutaatio ei aiheuta mitokondriovauriota, vaikka *CHCHD10*-geeni on ensimmäinen identifioitu SMA-tautia aiheuttava geeni, joka koodaa mitokondraalista proteiinia.

Teoriatiedon kokoamisen myötä opinnäytetyön tekijän tietämys geenin sekvensoinnista ja siihen liittyvistä analyysimenetelmistä sekä periaatteista lisääntyi. Käytännön työ opetti paljon teoriapohjan lisäksi myös laboratoriossa tarvittavista taidoista. Opinnäytetyöprosessin aikana yhteistyö sekä opinnäytetyötekijän että ohjaajien ja työelämän edustajien kanssa oli sujuvaa. Vaativinta teoriatiedon tuottamisessa oli englanninkielestä kääntäminen sujuvasti suomenkielelle, sillä lähes kaikki teoriatieto aiheesta oli englanninkielistä. Myös oikeiden sanojen sekä termien kääntäminen suomeksi toivat omat haasteensa. Teoriatietoa oli tarjolla paljon, joten materiaalin läpikäyminen oli aikaa vievää ja rajaaminen haastavaa. Mielekästä oli, että aiheesta löytyi runsaasti ajanmukaista ja ajankohtaista tietoa.

Jatkotutkimusaiheena esitetään *CHCHD10*-proteiinin tertiäärirakenteen ja proteiinin toiminnan tutkimista, jotta saataisiin selville SMAJ/LOSMoN-taudin sekä muiden *CHCHD10*-geenin mutaatioiden aiheuttamien tautien patogeeninen mekanismi.

LÄHTEET

Aula, P., Kääriäinen, H., Palotie, A. (toim.). 2006. 3. uudistettu painos. Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Affymetrix. 2015. ExoSAP-IT PCR Product Clean-Up. Luettu 29.8.2015.
<http://www.affymetrix.com/estore/browse/promotionLandingPage.jsp?promotionId=promo440001&navModeValue=&isHtmlStatic=true&aIdValue>

Ajrourd-Driss, S., Fecto, F., Ajroud, K., Lalani, I., Calvo, S., Mootha, V., Deng, H-X., Siddique, N., Tahmoush, A., Heiman-Patterson, T. & Siddique, T. 2014. Mutation in the novel nuclear-encoded mitochondrial protein CHCHD10 in a family with autosomal dominant mitochondrial myopathy. *Neurogenetics* 1/2015, 1-9.

Bannwarth, S., Ait-El-Mkadem, S., Chausse, A., Genin, E., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., Berg-Alonso, L., Kageyama, Y., Serre, V., Moore, D., Verschueren, A., Rouzier, C., Le Ber, I., Augé, G., Cochaud, C., Lespinasse, F., N'Guyen, K., de Septenville, A., Brice, A., Yu-Wai-Man, P., Sesaki, H., Pouget, J. & Paquis-Flucklinger, V. 2014. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain a Journal of Neurology* 137, 2329-2345.

Cozzolino, M., Rossi, S., Mirra, A. & Carri, M. 2015. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, February 2015.
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2015.00031/full>

Elliott, W. & Elliott, D. 2002. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2. painos. New York: Oxford University Press Inc.

Ellison, G. 2008. *Motor Neuron Disorders*. Teoksessa Love, S., Louis, D. & David W. (ed.) *Greenfield's neuropathology*. London: Hodder Arnold, 962-965.

GE Healthcare Life Sciences. 2013. Enzymatic PCR and Sequence reaction cleanup. Luettu 22.7.2015.
https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1326706518989/litdoc29010724_20130129211715.pdf

Glick, B. & Pasternak, J. 2003. *Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA*. 3. painos. Washington DC: ASM Press.

Hakala, J. 2008. *Uusi graduopas*. Helsinki: Yliopistopaino.

Heiman-Patterson, T., Argov, Z., Chavin, J., Kalman, B., Alder, H., DiMauro, S., Bank, W. & Tahmoush, A. 1997. Biochemical and genetic studies in a family with mitochondrial myopathy. *Muscle Nerve* 20/1997, 1219-1224.

Heino, J. & Vuento, M. 2010. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. 2. uudistettu painos. Helsinki: WSOYpro Oy.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2008. *Tutki ja kirjoita*. 13.-14., osin uudistettu painos. Keuruu: Otavan kirjapaino Oy.

Invitrogen. SYBR® Safe DNA Gel Stain. Luettu 24.9.2015.

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp33100.pdf>

Jokela, M. 2011. Porras-lehti. 4/2011. LOSMoN- maailman hyvänlaatuisin motoneuro-
nitauti?

Jokela, M., Penttilä, S., Huovinen, S., Hackman, P., Saukkonen, A.M., Toivanen, J., &
Udd, B. 2011. Late-onset lower motor neuronopathy. A new autosomal dominant disorder. *Neurology* 77, 334-40.

Jokela, M. 2012. Kennedyn tauti (spinobulbaarinen lihasatrofia, SBMA). Lihastauti-
liitto. Luettu 25.9.2015.

<http://lihastautiliitto.waf-komeetta1.planeetta.com/cgi-bin/wafnet3.pl?id=376&kid=1>

Jokela, M. & Udd, B. 2014. *Suomen Lääkärilehti* 69 (45), 2974.

Kananen, J. & Heikkinen, R. (toim.) 2010. Opinnäytetyön kirjoittamisen käytännön
opas. Tampere: Tampereen Yliopistopaino Oy - Juvenes Print.

Karbowski, M & Youle, R. 2003. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy
cells and during apoptosis. *Cell death and differentiation* 108, 870-880.

Laaksovirta, H. 2012. ALS - amyotrofinen lateraaliskleroosi. Lihastautiliitto. Luettu
25.9.2015.

http://www.lihastautiliitto.fi/fi/ALS_MND

Lunn, M & Wang, C. 2008. Spinal muscular atrophy. *Lancet* 371, 2120–2133.

Lähdetie, J. 2012. Spinaalinen lihasatrofia tyyppi 1 eli SMA1 eli Werdnig-Hoffmannin
tauti. Lihastautiliitto. Luettu 22.7.2015.

http://lihastautiliitto.waf-komeetta1.planeetta.com/SMA_12

Makarow, M. 1999. Fysiologian ja lääketieteen Nobelin palkinto Günter Blobelille.
Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. Luettu 22.7.2015.

<http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo91196.pdf>

Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K. & Her-
mann, J. 2005. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria
that mediates protein import. *Cell* 121, 1059–1069.

Müller, K., Andersen, P., Hubers, A., Marroquin, N., Volk, A., Danzer, K., Meitinger,
T., Ludolph, A., Strom, T & Weishaupt, J. 2014. Two novel mutations in conserved co-
dons indicate that CHCHD10 is a gene associated with motor neuron disease. *Brain*
137, 309.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke. 2015. NINDS Motor Neuron
Diseases Information Page. Luettu 22.7.2015.

http://www.ninds.nih.gov/disorders/motor_neuron_diseases/motor_neuron_diseases.htm

Penttilä, S., Jokela, M., Hackman, P. Saukkonen, A.M., Toivanen, J. & Udd, B. 2012. Autosomal dominant late-onset spinal motor neuronopathy is linked to a new locus on chromosome 22q11.2-q13.2. *European Journal of Human Genetics* 2012, 1-4.

Penttilä, S., Jokela, M., Huovinen, S., Saukkonen, A M., Toivanen, J., Lindberg, C., Baumann, P. & Udd, B. 2013. Late-onset spinal motor neuronopathy. A common form of dominant SMA.

Penttilä, S., Jokela, M., Bouquin, H., Saukkonen A., Toivanen, J. & Udd, B. 2014a. Late Onset Spinal Motor Neuronopathy is caused by mutation in *CHCHD10*. *Annals of Neurology* 2014, 1-10.

Penttilä, S. geneetikko. 2014b. Opinnäytetyö. Sähköpostiviesti. sini.penttila@uta.fi. Luettu 30.9.2014.

Pirkanmaan sairaanhoitopiiri. 2014. Lihastautien tutkimuskeskus. Luettu 1.10.2014.
<http://www.pshp.fi/default.aspx?contentid=1388>

Pirkanmaan sairaanhoitopiiri. 2015. LOSMoN-tauti, aikuisiän motorinen neuronopatia, CHCHD10-geenin mutaatiot. Luettu 29.8.2015.
<http://www.pshp.fi/default.aspx?contentid=1472#LOSMoN-tautiperustajahaplotyyppi>

Sarantaus L, Huusko P, Eerola H, Launonen V, Vehmanen P, Rapakko K & ym. 2000. Multiple founder effects and geographical clustering of BRCA1 and BRCA2 families in Finland. *European Journal of Human Genetics* 8/2000, 757–763.

Strömmer, K. 2011. Duchennen ja Beckerin lihasdystrofian ja spinaalisen lihasatrofian prevalenssi ja insidenssi alle 16-vuotiailla lapsilla Suomessa. Turun yliopisto. Kliininen laitos. Syventävien opintojen kirjallinen työ.

Talbot, K., Turner, M., Marsden, R & Botell, R. 2008. *Motor Neuron Disease a Practical Manual*. New York: Oxford University Press.

Thermo Fisher Scientific. 2013. Sequencing Chemistries. Luettu 28.8.2015.
<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/dna-sequencing-fragment-analysis/overview-of-dna-sequencing/sequencing-chemistries.html>

Timmer, J. 2009. A brief guide to DNA sequencing. Luettu 26.8.2015.
<http://arstechnica.com/science/2009/09/a-brief-guide-to-dna-sequencing/>

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohje 2012. Julkaistu 14.11.2012. Luettu 30.9.2014.

Udd, B. & Holmgren. 1996. Kennedyn oireyhtymä–X-kromosomissa peittyvästi periytyvä ALS:n kaltainen tauti. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 112, 218.

UTUlab. 2013. Spinaalinen lihasatrofia (SMA), *SMN1*-geenin deleetion PCR-tutkimus. Luettu 25.9.2015.

<http://www.utu.fi/fi/yksikot/med/yksikot/utulab/ohjekirja/Documents/Ohjekirja%20pdf/genetiikka/SPINAALINEN%20LIHASATROFIA%20%28SMA%29,%20SMN1-GEENIN%20DELEETION%20PCR-TUTKIMUS.pdf>

UTUlab. 2014. Amyotrofinen lateraaliskleroosi ja frontotemporaalidementia (ALS/FTD), *C9ORF72*-geenin toistojaksomutaation osoitus, DNA-tutkimus Luettu 25.9.2015.

<https://www.utu.fi/fi/yksikot/med/yksikot/utulab/ohjekirja/Documents/Ohjekirja%20pdf/genetiikka/ALS-FTD,%20DNA-TUTKIMUS.pdf>

Valtakunnallinen sosiaali- ja terveysalan eettinen neuvottelukunta ETENE. 2001. ETENE-julkaisuja 1, Terveysthuollon yhteinen arvopohja, yhteiset tavoitteet ja periaatteet Julkaistu 12.12.2001. Päivitetty 02.03.2011. Luettu 30.9.2014.

Wang, C., Finkel, R., Bertini, E., Schroth, M., Simonds, Wong, B., Aloysius, A., Morrison, L., Main, M., Crawford, T., Trela, A. & Participants of the International Conference on SMA Standard of Care. 2007. Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *Journal of Child Neurology* 22, 1027-1049.