

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

**Tarja-Tuulikki Järvinen**

**SLC1A1- ja JMJD2C-geenien assosiaatio  
autismin kirjoon suomalaisessa väestössä**

Insinööritö 27.2.2009

Ohjaaja: dosentti Irma Järvelä

Ohjaava opettaja: yliopettaja Marja Vaheri

Tekijä	Tarja-Tuulikki Järvinen
Otsikko	SLC1A1 ja JMJD2C geenien assosiaatio autismin kirjoon suomalaisessa väestössä
Sivumäärä	50
Aika	27.2.2009
Koulutusohjelma	bio- ja elintarviketekniikka
Tutkinto	insinööri (AMK)
Ohjaaja	dosentti Irma Järvelä
Ohjaava opettaja	yliopettaja Marja Vaheri
<p>Aikaisemmissa tutkimuksissa oli havaittu, että kromosomissa 9p24 sijaitseva geeni SLC1A1 assosioitui pakko-oireiseen häiriöön. Kansainvälisessä autismin alttiusgeenin kartoituksessa kromosomissa 9p24.1 sijaitsevan geenin JMJD2C oli havaittu assosioituvan autismin kirjoon. Haluttiin tutkia, assosioituvatko nämä geenit autismin kirjoon suomalaisessa väestössä.</p> <p>Työtä varten oli kerätty näytteitä suomalaisilta autismin kirjon henkilöiltä ja heidän lähisukulaisiltaan, ja näiden DNA eristettiin kokoverestä. Tutkimukseen valittiin 176 näytettä henkilöiltä, joilla oli joko varhaislapsuuden autismi tai Aspergerin oireyhtymä, ja kontrollina käytettiin näytteitä 200 tuntemattomalta luovuttajalta.</p> <p>SLC1A1-geeni jakautuu 12 eksoniin, ja se koodaa EAAT3-proteiinia, joka kuljettaa L-glutamaattia solujen sisälle neuroneissa. SLC1A1-geenin tutkimuksessa käytettiin perinteistä sekvensointia, ja mukana oli kuusi markkeria eksonien 4, 8 ja 10 alueelta ja läheisyydestä. JMJD2C-geeni jakautuu 21 eksoniin, ja se koodaa GASC1-proteiinia, joka säätelee geenien transkriptiota poistamalla kromatiineja pakkaavien histoniproteiinien metyyliiryhmiä. JMJD2C-geenin tutkimuksessa käytettiin reaaliaikaista PCR:ää markkerille rs1340513, jonka oli aiemmissa tutkimuksissa havaittu assosioituvan autismin kirjoon. SLC1A1-geenissä 175 näytteelle ja 194 kontrollille ja JMJD2C-geenille 175 näytteelle ja 197 kontrollille laskettiin todennäköisyydet alleeli- ja genotyyppijakaumille yksilötason <math>\chi^2</math>-testillä, joka on assosiaatioanalyysimenetelmä, jossa tunnetaan yleisempien ja harvinaisempien alleelien määrät sairailta ja verrokeilla. Lisäksi käytettiin Fisherin tarkkaa testiä, joka soveltuu hyvin erityisesti silloin, kun laskennassa on mukana pieniä alleelimääriä. Testit suoritettiin R-ohjelmalla (The R Foundation for Statistical Computing), joka on maksuton tietokonekieli ja -ympäristö tilastollisille menetelmille.</p> <p>Nollahypoteesina yksilötason <math>\chi^2</math>-testissä pidetään sitä, että assosiaatio alleelien, genotyyppien ja sairausstatuksen välillä on puhtaasti satunnaista, ja tilastollista merkitsevyydestä 0,01 pidetään tilastollisesti merkitseväenä, jolloin voidaan katsoa, että nollahypoteesi kumoutuu. SLC1A1-geenin yksikään markkeri ei saavuttanut tilastollista merkitsevyydestä 0,01, jolloin nollahypoteesi jäi voimaan eikä geeni assosioitunut autismin kirjoon. JMJD2C-geenin markkeri alitti tilastollisen merkitsevyydestä 0,01 alleelijakauman kohdalla. Todennäköisyydet markkerin alleelijakaumalle yksilötason <math>\chi^2</math>-testissä oli noin 0,0085 ja Fisherin tarkassa testissä noin 0,0065, jolloin nollahypoteesi kumoutui eli assosiaatio alleelien ja sairausstatuksen välillä ei ollut puhtaasti satunnaista. JMJD2C-geeni assosioitui autismin kirjoon myös suomalaisessa väestössä.</p>	
Hakusanat	pakko-oireinen häiriö, kromosomit, autismi, geenit

## Helsinki Metropolia University of Applied Sciences Abstract

Author	Tarja-Tuulikki Järvinen
Title	Association of SLC1A1 and JMJD2C genes to Finnish people with autism spectrum disorders
Number of Pages	50
Date	27 February 2009
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Degree	Bachelor of Engineering
Instructor	Irma Järvelä, Docent
Supervisor	Marja Vaheri, Principal Lecturer
<p>Previous studies have discovered an association between obsessive compulsive disorders (OCD) and SLC1A1-gene located in chromosome 9p24. The international autism genome studies have discovered that gene JMJD2C located in chromosome 9p24.1 was associated with autism spectrum disorders (ASD). The aim of this final year project was to study if there was an association between these genes and the Finnish people with autism spectrum disorder.</p> <p>For this study, samples of Finnish people with ASD and their families were collected. DNA was extracted from whole blood. There were 176 samples of people with either autism or Asperger's syndrome and 200 unknown controls in this study.</p> <p>The SLC1A1 gene contains 12 exons and codes excitatory amino acid transporter-3 (EAAT3) protein. Six markers of the SLC1A1 gene located in exons 4, 8 and 10 or nearby were sequenced. The JMJD2C gene contains 21 exons and codes gene amplified in squamous cell carcinoma 1 (GASC1) protein. Real time PCR was used to rs1340513 marker in the study of JMJD2C gene. There were 175 ASD samples and 194 controls to the SLC1A1 gene and 175 ASD samples and 197 controls to the JMJD2C gene. The probabilities were calculated to allele squares and genotype squares with the chi square test, in which the amounts of alleles in people with ASD and controls were known. In addition, Fisher's exact test was used. The tests were performed with the R program (The R Foundation for Statistical Computing) which is a free statistical computer language and environment.</p> <p>When the association between alleles, genotypes, and state of health is purely random and the significant level 0.01 or minor we talk about null hypothesis of the chi square test is not valid. None of the six markers of the SLC1A1 gene reached the significant level of 0.01 and this gene had no association with ASD. Marker rs1340513 of the JMJD2C gene reached the probability 0.0065 with the chi square test and 0.0085 with Fisher's exact test to allele square, which means that the null hypothesis was not valid and this gene had an association with ASD in Finnish people, too.</p>	
Keywords	obsessive-compulsive disorder, chromosomes, autism, genes

# Sisällys

## Tiivistelmä

## Abstract

1	Johdanto	6
2	Pakko-oireiset häiriöt	7
2.1	Kuvaus	7
2.2	Pakko-oireiden kirjoa	7
2.3	Pakko-oireisten häiriöiden esiintyvyys	8
2.4	Pakko-oireiden etiologiaa	8
2.5	Pakko-oireiden periytyvyys	9
3	Autismin kirjo	10
3.1	Taustaa	10
3.2	Autismin kirjoon kuuluvat oireyhtymät ja häiriöt	11
3.3	Varhaislapsuuden autismi	11
3.4	Autismin esiintyvyys	12
3.5	Aspergerin oireyhtymä	12
3.6	Aspergerin oireyhtymän esiintyvyys	12
3.7	Autismin kirjon etiologiaa	13
4	Genomin kartoituksessa käytettäviä menetelmiä	14
4.1	Perimästä	14
4.2	Geenikartoituksesta	15
4.3	Kytkentäanalyysi	16
4.3.1	Parametrinen kytkentäanalyysi	16
4.3.2	Ei-parametrinen kytkentäanalyysi	17
4.4	Assosiaatioanalyysi	17
4.5	Haplotyyppi	18
4.6	Assosiaatioanalyysi menetelmiä	18
4.7	Yksilötason $\chi^2$ -testi, Fisherin tarkka testi ja R	19
5	Ehdokaskromosomeja ja -geenejä autismin kirjossa	21
5.1	Kromosomi 17	21
5.2	Kromosomi 15 ja GABA-geenit	21
5.3	Kromosomi 7	22
5.4	Kromosomi X ja neurologiinigeenit	23
5.5	Kromosomi 3	24
5.6	Kromosomi 1	24
5.7	Kromosomi 9	24
6	Pakko-oireisiin assosioituva geeni SLC1A1	25
6.1	EAAT-perhe	25
6.2	SLC1A1-geenin ja sen proteiinin rakenne	25

6.3	EAAT3-proteiinin toiminnasta	26
6.4	SLC1A1-geenin mutaatioiden vaikutuksia	27
7	Työn tarkoitus	28
8	Materiaalit ja menetelmät	28
8.1	DNA:n eristys ihmisen kokoverestä	28
8.2	PCR-ketjureaktio	30
8.3	PCR-tuotteen geelielektroforeesiajo	31
8.4	PCR-tuotteen puhdistus	32
8.5	Esisekvensointireaktio puhdistetulle PCR-tuotteelle	32
8.6	Reaaliaikainen PCR (RT-PCR)	33
9	Tulokset ja tulosten tarkastelu	35
9.1	DNA:n eristäminen ja DNA-pitoisuuden mittaaminen	35
9.2	SLC1A1- ja JMJD2C-geenien alleelien tulosten käsittely	36
10	Yhteenveto	45
	Lähteet	46

## 1 Johdanto

Usein havaitaan, että monet sairaudet, häiriöt ja oireyhtymät kulkevat suvussa ja ovat siten ainakin osittain perinnöllisiä. Kuitenkaan ei usein löydy vain yhtä geeniä, joka aiheuttaisi häiriön, vaan taustalla epäillään useiden geenien ja ympäristön yhteisvaikutusta. Yhden geenin aiheuttamia sairauksia on tunnettu jo pitkään, mutta geeninkartotusmenetelmien kehityksen myötä on voitu ryhtyä tutkimaan myös monitekijäisten sairauksien genetiikkaa. Kansainvälisten geenin tutkimusprojektien ja kehittyneiden tilastollisten menetelmien ansiosta voidaan tutkia yhden tai useampien yhden emäksen variaatioiden kytkeä ja assosiaatioita johonkin sairauteen. Tässä työssä tarkasteltiin kahden geenin yhden emäksen variaatioiden assosiaatiota autismin kirjoon käyttäen perinteistä sekvensointia, reaaliaikaista PCR:ää ja tilastollisia menetelmiä.

## **2 Pakko-oireiset häiriöt**

### **2.1 Kuvaus**

Pakko-oireinen häiriö (obsessive-compulsive disorder OCD) on ahdistuneisuushäiriöihin kuuluva tila, jossa keskeisimpinä oireina ovat pakkoajatukset ja pakkotoiminnot. Pakkoajatukset ovat toistuvia yllykkeitä tai mielikuvia, jotka koetaan epämiellyttäväksi ja jotka aiheuttavat merkittävää ahdistusta ja kärsimystä. Pakkoajatuksista kärsivä henkilö tajuaa, että kyseiset ajatukset ovat hänen oman elämänsä tuotteita, ja hän yrittää torjua niitä ajatuksia joillain muilla ajatuksilla tai toiminnoilla. Pakkotoiminnot ovat toistuvia toimintaketjuja tai mielen toimintoja, joita henkilö tuntee joutuvansa suorittamaan pakkoajatustensa vuoksi voidakseen vähentää niihin liittyvää ahdistuneisuutta. Pakkoajatukset tai -toiminnot vievät paljon aikaa päivässä ja haittaavat henkilön normaaliarutiineja, arkielämää ja ihmissuhteita. /1, s. 230–231./

### **2.2 Pakko-oireiden kirjoja**

Pakko-oireisen kirjojen häiriöt (obsessive-compulsive spectrum disorders) sisältävät tiloja, joiden oireet ja muut ominaisuudet kuten esimerkiksi kertyminen joihinkin sukuihin, monihäiriöisyys, sukupuolijakauma, alkamisikä ja sairastumista edeltävät persoonallisuuden piirteet muistuttavat pakko-oireista häiriötä. Pakko-oireisen kirjojen häiriöitä ovat mm. dysmorfinen ruumiinkuvahäiriö eli omaan ulkomuotoonsa kohdistuvia pakkoajatuksia ja rituaaleja, hypokondria eli sairastumisen pelkoja, joihin voi liittyä somaattisia oireita, Touretten oireyhtymä eli nuorena alkavat nykimishäiriöt tai tahattomat äännähdykset, näpistelyhimo, karvojennyppimishäiriö, elimellisin oirein ilmenevä harhaluuloisuushäiriö ja syömishäiriöistä etenkin ahmimishäiriö. /1, s. 233–236./

### **2.3 Pakko-oireisten häiriöiden esiintyvyys**

Pakko-oireiset häiriöt ovat harvinaisia pienillä lapsilla ja alkavat yleensä murrosiässä tai aikuisena. Oireet alkavat keskimäärin 19-vuotiaana ja noin 21 % oireista puhkeaa 10-vuotiaana. Miehet sairastuvat aikaisemmin kuin naiset mutta aikuisiällä pakko-oireista kärsiviä naisia on miehiä enemmän. /2./ Pakko-oireisia henkilöitä arvioidaan olevan maailmassa noin 1-3 % väestöstä riippuen käytettyjen diagnostisten kriteerien tiukkuudesta. /2; 3, s. 29/. Pakko-oireiset häiriöt diagnosoidaan yleensä mielenterveyshäiriöiden diagnostisen ja tilastollisen käsikirjan (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV) luokituksen mukaisin kriteerein. /1; 2; 4/. DSM on Yhdysvaltain psykiatriyhdistyksen (American Psychology Association) APA:n kehittämä diagnoosijärjestelmä. /5/.

### **2.4 Pakko-oireiden etiologiaa**

Pakko-oireisen häiriön syiksi epäillään neurobiologisia tekijöitä kuten neuroanatomisia ja neurokemiallisia sekä immunologisia ja geneettisiä tekijöitä. Neuroanomiassa on kuvantamistutkimustulosten perusteella esitetty, että pakko-oireissa on keskeistä aivojen eri osien välisten yhteyksien häiriintyminen. Neurokemiassa on esitetty syiksi serotonini- ja dopamiiniaineenvaihdunnan poikkeavuutta. Immunologiassa epäillään lapsuusiän streptokokki-infektiossa muodostuneita vasta-aineita, jotka reagoivat ristiin tyvitumakkeiden kanssa. Infektion laukaisema immunologinen mekanismi voi aiheuttaa pakko-oireisen häiriön. /1, s. 238./



## 2.5 Pakko-oireiden periytyvyys

Pakko-oireiden ajatellaan olevan monitekijäinen geneettinen häiriö perustuen kaksos-tutkimuksiin, joissa 80–87-prosenttisesti molemmilla samanmunaisista kaksosista ilmeni pakko-oireita verrattuna erimunaisiin kaksosiin, joilla pakko-oireiden esiintyvyys oli 47–50 %. Lisäksi on osoitettu, että varhaisessa iässä pakko-oireisiin sairastuvien lasten aikuisilla lähiomaisilla esiintyy pakko-oireita kontrolleja useammin. /6./ Vahvoiksi ehdokasgeenipaikoiksi on esitetty kromosomeja 2q, 9p ja 16q, joista erityisesti kromosomia 9p. /2; 4; 6/. Kromosomin 9p24 alueella sijaitseva geeni SLC1A1 koodaa proteiinia EAAC1, joka toimii glutamaatin kuljettajana neuroneissa, suolistossa, munuaisissa, maksassa ja sydämessä. Pakko-oireisilla on todettu eroja glutamaattipitoisuuksissa aivojen eri osissa kontrolleihin verrattuna. /2./

Useat mielenterveyden häiriöt ovat oireiltaan pakko-oireiden kaltaisia, ja niitä voi olla vaikea erottaa toisistaan. /1, s. 233/. Myös mahdollinen suhde pakko-oireiden ja autististen oireiden välillä on huomioitu. Suvuissa, joissa on autismin kirjon oireita, esiintyy merkittävästi enemmän pakko-oireita kuin esimerkiksi suvuissa, joissa esiintyy Downin syndroomaa. /6./ On huomattu, että useilla lapsilla ja aikuisilla, jotka kärsivät pakko-oireista, on sellaisia käyttäytymispiirteitä, jotka mielletään autismin kirjioon kuuluviksi. /7./

## 3 Autismin kirjo

### 3.1 Taustaa

Vuonna 1943 amerikkalainen psykiatri Leo Kanner kuvaili lapsia, joilla oli merkittäviä vaikeuksia vastavuoroisessa sosiaalisessa kanssakäymisessä ja kommunikaatiossa. Heillä oli viivästynyt varhainen kielellinen kehitys ja toistavaa sekä ritualistista käyttäytymistä. Tilaa kutsutaan nykyään varhaislapsuuden autismiksi. /8./ Ensimmäisen kerran sanaa autismi käytettiin kuvailemaan skitsofreenisia potilaita. Autistiset häiriöt luokiteltiin lapsuusiän skitsofreniaksi amerikkalaisessa diagnoosijärjestelmässä (DSM-II) 1968, mutta englantilainen lasten psykologian professori Michael Rutter määritteli varhaislapsuuden autismin erilliseksi oireyhtymäksi 1978. /9, s. 11; 10./

Vuonna 1944 itävaltalainen lastenlääkäri Hans Asperger kuvaili poikia, joilla oli merkittäviä vaikeuksia sosiaalisessa vastavuoroisuudessa ja joilla oli rajoittuneet kiinnostuksen kohteet sekä motorisia vaikeuksia. Pojilla oli kuitenkin normaalit kognitiiviset eli tiedonkäsittelyyn liittyvät sekä kielelliset taidot. /11./ Hans Asperger ei ollut tietoinen Leo Kannerin kuvailemista lapsista, joilla oli samanlaisia häiriöitä sosiaalisissa taidoissa kuin hänen omilla potilaillaan. Pääasiallisina eroina Kannerin ja Aspergerin kuvailemissa potilaissa oli se, että Aspergerin potilailla oli korkeampi älykkyys ja oireiden ilmeminen oli myöhäisempää kuin Kannerin potilailla. /8; 11./ Aspergerin työ tuli tunnetuksi vasta vuonna 1981, kun englantilainen psykiatri Lorna Wing julkaisi sen englanniksi ja alkoi kutsua tilaa Aspergerin oireyhtymäksi (Asperger Syndrome AS). /12./

### 3.2 Autismin kirjoon kuuluvat oireyhtymät ja häiriöt

Amerikassa autismin kirjo (Autism Spectrum Disorders ASD) luokitellaan kuuluvaksi laaja-alaisiin kehityshäiriöihin (Pervasive Developmental Disorders PDD), johon kuuluvat autistiset häiriöt, Aspergerin oireyhtymä, lapsuusiän disintegraatiiviset häiriöt, Rettin oireyhtymä ja sellaiset laaja-alaiset kehityshäiriöt, joita ei ole määritelty toisin (Pervasive Developmental Disorder-Not Otherwise Specified PDD-NOS). /13, s. 17; 14./ Suomessa ja Euroopassa puhutaan autismin kirjosta, johon kuuluvat varhaislapsuuden autismi, Aspergerin oireyhtymä, Rettin oireyhtymä, epätyypillinen autismi ja disintegraatiivinen oireyhtymä. /15/. Autismin kriteerit ovat olleet vakiintuneita pitkään mutta Aspergerin oireyhtymän diagnosoinnissa on käytetty seitsemää eri kriteerimallia, mikä on vaikeuttanut tulkintaa. /13, s. 18; 9, s. 15/. Nykyään autismin kirjon diagnosointiin käytetään DSM-IV (APA, 1994) ja kansainvälisen tautiluokitusjärjestelmän kriteerejä (International Classification of Diseases ICD-10, World Health Organization, 1993). /13, s. 18/.

### 3.3 Varhaislapsuuden autismi

Autismi on neurobiologinen keskushermoston kehityshäiriö, joka ilmenee varhaislapsuudessa viimeistään silloin, kun lapsi alkaa liikkua enemmän ja hänen pitäisi kiinnostua muista ihmisistä. Autistinen lapsi ei hakeudu toisten seuraan jakaakseen iloaan tai kiinnostuksen kohteitaan heille, ja hänellä on vaikeuksia ymmärtää eleitä, erilaisia viivahteita puheessa ja kasvojen ilmeissä, eikä hän kykene itse tuottamaan sellaisia hallitusti. Autistisella lapsella on usein viivästynyt puheen kehitys ja toistavaa käyttäytymistä, joka vie paljon aikaa päivässä. Autismi on koko elämän kestävä tila, joka ilmenee eri henkilöillä eri tavoin, mutta yhteisinä piirteinä autistisilla henkilöillä ovat vaikeudet sosiaalisessa vastavuoroisuudessa ja kommunikaatiossa sekä toistava käyttäytyminen. /14./ Noin 75 % autistisista henkilöistä on kehitysvammaisia ja 20–30 %:lla on epilepsiaa. /13, s. 18; 9, s. 12; 16/.

### 3.4 Autismin esiintyvyys

Autismi on miehillä noin kolme kertaa yleisempää kuin naisilla ja esiintyvyys väestössä on 3-6 / 10 000. /13, s. 21–22; 17/. Autismi voi olla syvää, jolloin autistiselle henkilölle ei kehity puhetta lainkaan, tai se voi olla hyvätasoinen (High-Functioning Autism HFA), jolloin henkilö voi elää suhteellisen itsenäisesti. /14; 18/. Noin 10 % autistisista henkilöistä pystyy elämään itsenäisesti, ja parhaan ennusteen autistisen henkilön mahdollisuudelle itsenäiseen elämään antavat henkilön riittävä älykkyys ja kielellinen kehityksen taso viiteen ikävuoteen mennessä. /9, s. 12/.

### 3.5 Aspergerin oireyhtymä

Henkilöllä, jolla on Aspergerin oireyhtymä, on samankaltaisia vaikeuksia sosiaalisessa vastavuoroisuudessa ja kommunikaatiossa kuin autismissa sekä rajoittuneet, omaleimaiset kiinnostuksen kohteet. Oireet ilmenevät yleensä esikouluikäisellä lapsella, jolla on aikaisemmin ollut ikätasoinen kehitys. /19./ Aspergerin oireyhtymää voi olla vaikea erottaa hyvätasoisesta autismista, vaikka on voitu osoittaa, että AS-henkilöillä on korkeampi älykkyys kuin HFA-henkilöillä. /18/. Aspergerin oireyhtymä saattaa jäädä joillakin henkilöillä diagnosoimatta, sillä AS-henkilöt ovat usein toiminnallisesti hyvätasoisia, ja he voivat edetä elämässään hyvin. /18/. Aspergerin oireyhtymä on elämänikäinen, ja sen taso voi vaihdella eri henkilöillä selkeistä oireista piirteisiin. /19/.

### 3.6 Aspergerin oireyhtymän esiintyvyys

Riippuen kriteerien tiukkuudesta, Aspergerin oireyhtymän arvioidaan olevan miehillä 2,3–15 kertaa yleisempi kuin naisilla ja esiintyvyyden väestössä 1 / 10 000 – 7,1 / 1000. /18; 19/. Näyttää siltä, että Aspergerin oireyhtymä ilmenee naisilla eri tavalla kuin miehillä, mikä on vaikeuttanut naisten diagnostiikkaa. /18; 15/. Arvellaan myös, että noin 50 % lapsista, joilla on Aspergerin oireyhtymä, saavuttaa aikuisuuden ilman diagnoosia tai heidät on voitu diagnosoida muulla tavoin, mahdollisesti väärin. / 19; 18/.

### 3.7 Autismin kirjon etiologiaa

Autismin kirjon ajatellaan olevan monitekijäinen, geenien ja ympäristön yhdessä aiheuttama tila, jossa esiintyy usein muita päällekkäisiä oireita. Autistisilla henkilöillä voi ilmetä aggressiivisuutta, hyperaktiivisuutta, itsensä satuttamista, aistihäiriöitä ja univaikeuksia. /16/. Autismin kirjossa ja erityisesti Aspergerin oireyhtymän kanssa voi olla lisäksi Touretten oireyhtymä, mielialahäiriöitä, tarkkaavaisuus- ja oppimisvaikeuksia, pakko-oireita ja skitsofreniaa. /13, s. 19; 19/. Syitä autismin kirjoon on etsitty geneeistä, aineenvaihduntahäiriöistä, infektiosta, raskauden aikaisista ongelmista, ympäristötekijöistä ja aivojen rakenteen poikkeavuuksista. /16; 18; 19/. Autismin kirjolla arvellaan olevan ainakin osin geneettistä alkuperää, sillä molemmilla samanmunaisista kaksosista 36 – 98 %:lla esiintyy autismin kirjoa, kun taas molemmilla erimunaisista kaksosista vain 0 – 30 %:lla. Perheen muilla sisaruksilla riski on noin 2 – 6 %. /9, s. 16; 16; 20/. Joissain perheissä, joissa lapsilla on autismin kirjoa, myös vanhemmilla voi esiintyä autismin kirjon piirteitä. /13, s. 47; 18/.

## 4 Genomin kartoituksessa käytettäviä menetelmiä

### 4.1 Perimästä

Ihmisen DNA:ssa on noin kolme miljardia emäsparia, jotka ovat järjestäytyneet 22 autosomaaliseksi kromosomipariksi ja kahdeksi sukupuolikromosomiksi. Kromosomien pituudet vaihtelevat muutamasta kymmenestä muutamaa sataan senttimorganiin. Yksi senttimorgan vastaa noin miljoonaa emäsparia DNA:ta. Ihmisen perimässä on alueita, joissa eri yksilöiden välillä on geneettistä vaihtelua, joko yhden emäksen muutoksia tai mikrosatelliittialueita eli erikokoisia lyhyitä emästen toistojaksoja. Näitä geneettisiä variantteja kutsutaan alleeleiksi. Ihmisen perimässä on noin 9 miljoonaa yhden emäksen muutosta (Single Nucleotide Polymorphism) SNP, joita esiintyy noin 300 emäsparin välein. Usein toisiaan lähellä sijaitsevat kaksi tai useampi alleeli periytyvät yhdessä, jolloin puhutaan haplotyypistä. Haplotyyppien periytyvyyteen vaikuttaa sukusolujen vähennysjaon meioosin yhteydessä tapahtuva tekijänvaihto, jolloin homologiset vastinkromosomit voivat vaihtaa segmenttejä keskenään eli tapahtuu geneettinen rekombinaatio. Jos haplotyyppi jää rekombinaatiopisteiden väliin, se periytyy sellaisenaan. /13; 21./

Noin 1,1 % ihmisen perimästä on proteiinia koodaavaa aluetta eli eksoneita ja noin 24 % perimästä eksonien välissä olevia koodaamattomia alueita eli introneita. Loput DNA:sta on geenien välistä aluetta. /9, s. 35./ Perimä voi muuttua monella tapaa, ja se on edellytys evoluutiolle mutta aiheuttaa usein ongelmia. Kromosomin tasolla olevissa muutoksissa jokin kromosomin segmentti voi olla kääntynyt, poistunut, siirtynyt toiseen paikkaan kromosomissa tai kopioitunut useampaan kertaan. Geenin tasolla tapahtuu yleensä yhden emäksen muutoksia. Jos yhden emäksen muutos osuu geenin proteiinia koodaavalle alueelle, voi se johtaa aminohapon vaihdokseen, jolloin proteiinin rakenne voi muuttua. Muutoksen osuessa geenin intronin alueelle lähelle eksonia tai säätelyalueelle voi proteiinin koodaaminen estyä kokonaan. Muutokset proteiinin rakenteessa tai määrässä voivat aiheuttaa sairauksia. Yksinkertaisimmillaan sairaus voi johtua yhden emäksen muutoksesta ja voi periytyä vallitsevasti tai peittyvästi, jolloin puhutaan monogeenisestä sairaudesta. Monitekijäisissä sairauksissa mikään geeni yksinään ei riitä

selittämään sairautta, vaan sairaus on useamman geenin ja ympäristön vaikutuksen summa. /13; 21/.

## 4.2 Geenikartoituksesta

Sairauksien geenikartoituksen on mahdollistanut vuonna 1990 aloitettu julkinen kansainvälinen ihmisen genomien kartoitusprojekti (Human Genome Project) HGP, jonka päämääränä oli identifioida ihmisen kaikki geenit, sekvensoida emäsjärjestykset, siirtää saatu tieto julkisiin tietokantoihin ja tarjota erilaisia tilastollisia menetelmiä. /22/. Genomin kartoitusta voidaan toteuttaa kahdella menetelmällä, joko kytkentä- tai assosiaatioanalyysillä, joita yleensä käytetään yhdessä. Kartoitus aloitetaan usein kytkentäanalyysillä, ja kun tarkkuutta halutaan lisää, siirrytään assosiaatioanalyysiin. Kartoituksessa etsitään kromosomista ne alueet, joissa esiintyy yksilöiden välistä vaihtelua. Näitä alueita käytetään markkerilokuksina. /21/. Markkereina tutkimuksissa käytetään yleisesti mikrosatelliitteja, mutta alhaisemman mutaatioasteen ja yleisyyden vuoksi yhden emäksen muutokset markkereina ovat kasvavan kiinnostuksen ja käytön kohteena. /13; 9/. Kuvassa 1 on yhden emäksen muutosmarkkeri, joka on merkitty yksilöllisellä tunnuk-sella rs12682807. Varsinainen emäsmuutos on esitetty punaisella, hakasulkeissa. Näitä markkereita on kerätty genomitietokantoihin (UCSC / NCBI / HapMap).

rs12682807 [*Homo sapiens*]

TGGCCACAGTCCTGACTGGGTATGTC[A/C]GACTCAAGAGAAGAGACAGAAACCT

Kuva 1. Yhden emäksen muutosmarkkeri ja sen tunnus rs12682807. Keskellä punaisella hakasulkeissa on ilmoitettu emäsmuutos, joka tässä tarkoittaa, että emäs A vaihtuu emäkseksi C.

### 4.3 KytKentäanalyysi

KytKentäanalyysissä tutkitaan, onko tutkittava markkerilokus tai kytKentäryhmä kytkeytynyt sairauslokukseen eli sellaiseen alueeseen kromosomissa, jossa sairauteen altistava alleeli sijaitsee. Kytkeytymisellä tarkoitetaan geneettisessä rekombinaatiossa tapahtuvan tekijänvaihdon mukana kulkeutuvien lokusten periytymistä yhdessä. Todennäköisyyttä sille, että kahden lokuksen välillä tapahtuu rekombinaatio, kutsutaan rekombinaatiofraktioksi, jonka arvo vaihtelee välillä 0 ja 0,5. Jos lokukset sijaitsevat vastinkromosomeissa päällekkäin, arvo on 0 eikä rekombinaatiota näiden välillä voi tapahtua. Samassa kromosomissa sijaitsevien lokusten kasvava etäisyys toisistaan kasvattaa arvoa 0:sta 0,5:een. Jos arvo on likimain 0, ovat lokukset kytkeytyneet. Odotusarvoisesti tapahtuu yksi rekombinaatio 100 senttimorganin välein, mutta todellisuudessa määrä ja etäisyydet vaihtelevat eri kromosomeissa. /13; 9; 21./

#### 4.3.1 Parametrinen kytKentäanalyysi

KytKentäanalyysi jaetaan kahteen osaan, parametriseen ja ei-parametriseen kytKentäanalyysiin. Parametrisellä eli mallipohjaisella analyysillä tutkitaan yleensä monogeenisten sairauksien periytymistä sukupuussa, ja siinä edellytetään, että periytymismalli eli sairauden ilmiasu ja sen aiheuttama geneettinen tausta tunnetaan. Vaadittuja tietoja geneettisistä taustoista ovat taudin ilmiasu, sen periytymistapa, rekombinaatiofraktio ja markkerialleelien yleisyys väestössä, kun sairausalleleja on 2, 1 tai 0. Tilastollisesti estimoimalla pyritään selvittämään sairausgeenin todennäköisin sijainti käyttämällä suurimman uskottavuuden menetelmää, joka koostuu hypoteesien määrittämisestä, uskottavuusfunktion muodostamisesta, parametrien estimoinnista, hypoteesien testauksesta ja tilastollisten johtopäätösten muodostamisesta. /13; 9; 21./



### 4.3.2 Ei-parametrinen kytkentäanalyysi

Ei-parametrinen kytkentäanalyysi ei vaadi tietoa periytymismallista ja soveltuu siksi myös monitekijäisten sairauksien geenikartoitukseen. Menetelmällä tutkitaan, kuinka usein samaa sairautta ilmentävät sisarukset jakavat yhteiseltä esivanhemmalta saadun samassa markkerilokuksessa olevat samat 2, 1 tai 0 alleelia. Yksinkertaisin ei-parametrinen kytkentäanalyysi on sairaiden sisarusparien menetelmä, joka soveltuu parhaiten peittyvästi periytyvien alleelien paikallistamiseen. Menetelmässä kerätään suuri joukko perheitä, joissa on kaksi sairasta sisarusta ja heidän yhteiset vanhempansa. Sairaiden sisarusten odotetaan jakavan 0, 1 tai 2 alleelia todennäköisyyksillä 0,25, 0,5 ja 0,25. Jos markkerilokus on kytketty sairauslokukseen, jakavat sisarukset alleeleja useammin kuin odotusarvoisesti. /13; 21./

### 4.4 Assosiaatioanalyysi

Assosiaatioanalyysillä tutkitaan, periytyvätkö lähekkäisten lokusten alleelit ja esiintyykö jonkin sairauden ilmiäsi tietyn alleelin tai haplotyyppin kanssa odotettua useammin. Jos jonkin sairautta aiheuttavan variantin periytyminen yhdessä tietyn markkerin kanssa ei ole satunnaista, ovat kyseinen variantti ja markkeri keskenään kytkentäepätasapainossa. Kytkentäepätasapaino johtuu yleensä siitä, että pieni eristäytynyt alkuperäisväestö on lisääntynyt voimakkaasti eikä siihen ole tullut muualta uusia geenejä, jolloin mahdollinen sairausmutaatio on päässyt rikastumaan ja ilmenee vielä nykyisessäkin väestössä. Mitä nuorempi mutaatio, sitä laajempi on havaittava kytkentäepätasapainoalue kromosomissa. Kytkentäepätasapaino kuitenkin heikkenee populaation iän kasvaessa rekombinaatioiden seurauksena. /13; 9; 21./

## 4.5 Haplotyyppi

Vaikka haplotyypeillä on taipumus hajota rekombinaatioiden yhteydessä, on ihmisen genomissa havaittu haplotyyppialueita, jotka ovat säilyneet, sillä näitä alueita ympäröivät rekombinaatiopisteet. Haplotyyppialueiden eli haplotyyppiblokkien sisällä olevat alleelit eivät periydy eri yksilöille toisistaan riippumatta johtuen ihmisten yhteisestä väestöhistoriasta. Näin ollen voidaan yhdessä tai useammassa lokuksessa sijaitsevien alleelien niin kutsuttujen tunnistemerkereiden (tag-SNP) perusteella päätellä, mitä muita alleleja yksilö kantaa muissa lokuksissa saman haplotyyppialueen sisällä. /13; 9; 21./ Vuonna 2002 perustettu kansainvälinen haplotyyppien kartoitusprojekti HapMap on erikoistunut julkaisemaan ihmisen genomien sekvenssien variaatioita. HapMap on käyttänyt yhden emäksen muutosten kartoitukseen 269 ihmisen DNA:ta Afrikasta, Euroopasta ja Aasiasta. Näytteet on kerätty ydinperheistä eli yhdeltä lapselta ja hänen molemmilta vanhemmiltaan. Tavoitteena on löytää populaatioille yhteisiä haplotyyppiblokkeja sekä tunnistemerkereita haplotyyppialueiden sisällä, mikä vähentäisi tilastollisten testien ja väärin positiivisten tulosten määrää geenitutkimuksissa. /23; 21./

## 4.6 Assosiaatioanalyysi menetelmiä

Yksinkertaisin assosiaatioanalyysi on yksilötason  $\chi^2$ -testi, jossa tunnetaan sairaiden ja verrokkien yleisempien ja harvinaisempien alleelin määrät. Periytymisen epätasapainotestissä käytetään ydinperheitä, jossa mukana on sairas lapsi ja hänen molemmat biologiset vanhempansa. Testissä tarkastellaan heterotsygoottisten vanhempien alleelien siirtymistä sairaalle jälkeläiselle. Haplotyyppianalyysijä tehdään yleensä ydinperheille, mutta jos väestössä on rajallinen määrä eri alkuperää olevia kromosomeja ja yksilöt ovat samasta väestöstä, voidaan haplotyyppianalyysijä tehdä myös yksilöille väestön haplotyyppijakaumaan perustuen. /21./

#### 4.7 Yksilötason $\chi^2$ -testi, Fisherin tarkka testi ja R

Sekä yksilötason  $\chi^2$ -testiä että Fisherin tarkkaa testiä varten täytyy luoda nelikenttätaulukko (taulukko 1), jossa näkyvät yleisempien (i) ja harvinaisempien (j) alleelien lukumäärät (a, b, c ja d) sairailta ja verrokeilla.

*Taulukko 1. Nelikenttätaulukko yksilötason  $\chi^2$ -testiä ja Fisherin tarkkaa testiä varten.*

	Sairaat	Verrokkit	Yhteensä
Alleeli i	a	b	(a + b)
Alleeli j	c	d	(c + d)
Yhteensä	(a + c)	(b + d)	n

Yksilötason  $\chi^2$ -testissä testimuuttujan arvo  $\chi^2$  kahdelle muuttujalle lasketaan kaavalla 1:

$$\chi^2 = \sum_{i,j} \frac{(o_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}}, \quad (1)$$

jossa  $o_{ij}$  on havaittujen eli sairaiden ja verrokkien alleelien määrä ja  $e_{ij}$  on odotettujen alleelien frekvenssit. Odotettu frekvenssi saadaan laskettua taulukosta 1 esimerkiksi sairaille, joilla on alleeli (i) siten, että kerrotaan sairaiden ja verrokkien alleelien (i) summa (a + b) sairaiden alleelien yhteislukumäärällä (a + c) ja jaetaan saatu tulos otoskoolla (n). Kahden muuttujan tapauksessa vapausasteluku on (s - 1) (r - 1), jossa s on rivien ja r on sarakkeiden lukumäärä. /21; 24, s. 61./

Fisherin tarkassa testissä todennäköisyys lasketaan kaavalla 2:

$$p = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{a!b!c!d!n!}, \quad (2)$$

jossa (!) tarkoittaa kertomaa, (a, b, c ja d) nelikentän (taulukko 1) alleelimääriä sairailta ja verrokeilla ja (n) on otoskoko. /25./

R (The R Foundation for Statistical Computing) on tietokonekieli ja -ympäristö tilastollisille menetelmille. R-ohjelma on ilmainen ja soveltuu tavallisimpiin tietokoneympäristöihin. R-ohjelmassa yksilötason  $\chi^2$ -testiä ja Fisherin tarkkaa testiä varten täytyy nelikentän tiedot syöttää riviin siten, että peräkkäin tulevat saman alleelin määrät sairaille ja verrokeille eli taulukosta 1 syötettynä (a, b, c, d) ja tämä rivi muutetaan sitten matriisimuotoon, jonka jälkeen testit voidaan suorittaa. Jos mukana on pienempiä alleelimääriä kuin 5, suosittelee R käyttämään Fisherin tarkkaa testiä  $\chi^2$ -testin sijaan. /26./

## 5 Ehdokaskromosomeja ja -geenejä autismin kirjossa

### 5.1 Kromosomi 17

Serotoniini (5-hydroksitryptamiini, 5-HT) vaikuttaa käyttäytymiseen ja moniin psykologisiin tiloihin kuten mielialan vaihteluihin, ahdistukseen, pakko-oireisiin, aggressiivisuuteen, uneen ja sosiaaliseen vastavuoroisuuteen. Keskushermostossa serotoniini vaikuttaa yleensä synapseihin inhihoivasti. Kromosomin 17 lokuksessa q11.1-q12 serotoniinin kuljettajageenin SLC6A4 (5-HTT) säätelyalueen (5-HTTLPR) ja toisen intronin alueen (VNTR) joillakin varianteilla on vaikutusta serotoniinin kuljetukseen verisoluihin lisäävästi. Lisääntynyt serotoniinin takaisinkuljetus neuroneihin aivojen serotonergisessä järjestelmässä saa aikaan serotoniinin vajetta neuronin post-synaptisessa osassa. /27; 28./

### 5.2 Kromosomi 15 ja GABA-geenit

Kromosomin 15 lokuksessa q11-q14 sijaitsevat geenit UBE3A, ATP10C ja HERC2 sekä GABA<sub>A</sub>-reseptorin alayksikkögeenit GABRB3, GABRA5 ja GABRG3. /29/. Gamma-aminovoihappo GABA on aikuisella keskushermoston inhihoiva välittäjäaine. Sen esiasteena on glutamaatti, joka aktivoi keskushermoston toimintaa. Kehityksen aikana GABA voi toimia kiihdyttävänä välittäjäaineena johtuen kypsyvien neuronien korkeasta solunsisäisestä kloridipitoisuudesta. Autistisilla henkilöillä on havaittu vähemmän GABA-reseptoreja kuin verrokeilla, ja lisäksi heidän plasmastaan on mitattu enemmän GABAa ja glutamaattia. /29./

Nykyään tiedetään ainakin kahdeksan GABA-luokkaa ja 18 GABA-reseptorin alayksikkögeeniä. GABA-reseptorien alayksikkögeenejä sijaitsee ainakin seuraavissa kromosomeissa: 4p12 (GABRG1, GABRA2, GABRA4 ja GABRB1), 5q34-q35.1 (GABRB2, GABRA6, GABRA1, GABRG2 ja GABRP), 6q15 (GABRR1 ja GABRR2) ja 15q12 (GABRB3, GABRA5 ja GABRG3). /29; 30./

Kromosomissa 15 lokuksen q11.2-q13 monistuminen saattaa lisätä autistisia piirteitä erityisesti, jos kromosomi periytyy äidin puolelta. UBE3A-geeni koodaa ubikitiiniproteiiniligaasia E3A, joka liittyy solujen ubikitiinivälitteisen proteolyysin ja apoptoosin säätelyyn. Monistuneen segmentin vuoksi tuota proteiiniligaasia esiintyy solussa enemmän, mikä aiheuttaa genotoksista stressiä. /31./

### 5.3 Kromosomi 7

Kromosomin 7 lokuksessa q31 on geeni, joka koodaa pleiotrooppista MET-reseptorityrosiinikinaasia. MET-geenin toimintaa ymmärretään parhaiten syövän yhteydessä ja HGF-kasvutekijävälitteisessä elinten kehityksessä ja korjauksessa. MET vaikuttaa myös immuunitoimintaan ja aivojen kehitykseen. Yhden emäksen muutos MET-geenin säätelyalueella häiritsee geenin transkriptiota. /32; 33/. Kromosomin 7 lokuksessa q31 on kaksi katkaisukohtaa, joiden väliin jäävät geenit IMMP2L, NRCAM ja runsaasti leusiinia sisältäviä toistoalueita. IMMP2L-geeni vaikuttaa mitokondrion toimintaan. /34./

Saman kromosomin lokuksessa q22 sijaitsee reelin-nimistä glykoproteiinia koodaava geeni RELN, joka osallistuu aivojen kehitykseen. Kolmen emäksen pitkä toistojakso RELN-geenin säätelyalueella heikentää geenin ilmentymistä. /34; 17./ Lokuksessa q22 sijaitsee myös geeni NPTX2, jonka arvellaan vaikuttavan synapseja kiihdyttävässä toiminnassa. /17./ Kromosomin 7 lokuksessa q22-q31 tapahtunut monistuminen tai segmentin korvautuminen toisella häiritsevät alueelle jäävien geenien toimintaa. /34./ AUTS1-lokukseksi kutsutulla alueella 7q31-q33 sijaitsevat geenit IMMP2L, FOXP2, RAY1/ST7, glutamaattireseptorigeeni GRM8, CADPS2 ja WNT2. Muutosten kyseisellä alueella on todettu kytkeytyvän autismiin. /17./

#### 5.4 Kromosomi X ja neuroliigiinigeenit

Kromosomin X lokuksissa q13.1 ja q22.3 sijaitsevat neuroliigiinigeenit NLGN3 ja NLGN4. Neuroliigiinigeenit koodaavat solukalvoproteiineja, jotka koostuvat viidestä erillisestä osasta, domeenista. Proteiinit sitoutuvat solukalvolle siten, että osa proteiinita jää solukalvon sisään, osa solun puolelle ja osa solun ulkopuolelle. Ihmisellä on viisi erilaista neuroliigiinigeeniä, jotka sijaitsevat seuraavissa kromosomeissa: 3q26 (NLGN1), 17p13 (NLGN2), Xq13 (NLGN3), Xp22 (NLGN4) ja Yq11 (NLGN4Y). Neuroliigiinit 1, 2 ja 3 ilmenevät pääosin aivoissa, kun taas NLGN4:n on havaittu myös ilmenevän sydämessä, maksassa lihaksissa ja haimassa. Neuroliigiinit ovat sijoittuneet synapsien solukalvoille ja vaikuttavat suoraan synapsien toimintaan mm.  $\beta$ -neureksiinin kanssa. Neuroliigiinien ja  $\beta$ -neureksiinin välisen yhteistyön arvellaan vaikuttavan suuresti synapsien GABA-reseptorien ja glutamaatin toimintaan. /13, s. 50–52./ Yhden emäksen muutos neuroliigiinigeenissä NLGN3 vaihtaa arginiinin kysteiiniksi ja geenissä NLGN4 emäsmuutos lopettaa transkription kesken, jolloin proteiinisynteesi keskeytyy. /35/.

Muita autismin kirjoon kytkeytyviä X-kromosomin lokuksia ovat q28 (MeCP2), p21.13 (CDKL5/STK9), q27.3 (FMR1) ja q22-q23 (ATGR2). /13; 17/. MeCP2-geeni koodaa proteiinia, joka sitoutuessaan DNA:n CpG-alueeseen säätelee geenin transkriptiota. Muutaation MeCP2-geenissä arvellaan heikentävän ainakin kromosomin 15 alueella q11-q14 olevien geenien UBE3A, GABRB3, ATP10A, GABRA5 ja GABRG3 ilmenemistä. /36./ FMR1-geenin säätelyalueen kolmen emäksen laajentunut toistojakso estää geenin transkription ja aiheuttaa kehitysvammaisuutta, johon liittyy usein autismia. /13, s. 48/. X-kromosomin virheet vaikuttavat miehiin pahemmin kuin naisiin, sillä miehet perivät vain yhden X-kromosomin. Tämä voi olla yksi syy siihen, miksi autismia esiintyy miehillä enemmän. /13, s. 59/.

### 5.5 Kromosomi 3

Kromosomin 3 lokuksessa p24-p26 sijaitsee oksitosiinireseptorigeeni OXTR, jonka arvellaan kytkeytyvän jotenkin autismin kirjoon. /13, s. 93–94/. Lisäksi autismin kirjon henkilöillä on todettu erilainen oksitosiinin esiasteen ja oksitosiinin välinen suhde plasmassa kuin verrokeilla, mikä saattaa liittyä entsyymeihin, jotka vastaavat oksitosiinin esiasteen muokkaamisesta toimivaksi oksitosiiniksi. /17/. Kromosomin 3 lokus q25-q27 (AUTS2) on todettu uudeksi ehdokasalueeksi autismin kirjossa suomalaisessa väestössä. /9; 16/.

### 5.6 Kromosomi 1

Kromosomin 1 lokuksessa q42 sijaitsevat geenit DISC1, DISC2 ja TRAX. DISC1-geenin arvellaan vaikuttavan laajasti neurologiseen kehitykseen, ja tämän geenin on havaittu assosioituvan skitsofrenian kanssa. Sen epäillään olevan osallisena myös kaksisuuntaisen mielialahäiriön ja autismin kirjon synnyssä. /37./

### 5.7 Kromosomi 9

Kromosomissa 9 lokuksessa p24.1 sijaitsee geeni JMJD2C jumonji domain containing 2C, joka tunnetaan myös nimillä GASC1, KDM4C tai JHDM3C. Ihmisellä on ainakin neljä JMJD2-perheeseen kuuluvaa geeniä JMJD2A, JMJD2B, JMJD2C ja JMJD2D, jotka sijaitsevat kromosomeissa 1p34.1, 19p13.3, 9p24.1 ja 11q21. JMJD2C-geeni koodaa tumaproteiinia (JmjC domain-containing histone demethylation protein 3C), joka tunnetaan myös nimellä GASC1-proteiini (Gene amplified in squamous cell carcinoma 1 protein). JMJD2C-geeni on jakautunut 21 eksoniin, ja proteiini sisältää 1056 aminohappoa. Tällä proteiinilla on kuusi erillistä konservoitunutta domeenia: JmjN, JmjC sekä kaksi PHD- ja kaksi TUDOR-domeenia. /38; 39./ Kromosomin 9p23-p24 alueella tapahtuneiden laajojen emästen toistojaksojen arvellaan aiheuttavan JMJD2C-geenin liiallisen ilmenemisen, minkä arvellaan olevan osallisena monien syöpien syntyyn.



GASC1-proteiini säätelee geenien transkriptiota osallistumalla kromatiineja pakkaavien histoni-proteiinien toimintaan poistamalla metyyliiryhmiä niistä, jolloin kromatiini ei pääse pakkautumaan. /40; 41./ JMJD2C-geenissä yhden emäksen muutosmarkkerien rs1340513 ja rs722628 on havaittu kytkeytyvän autismin kirjoon. /42/.

## 6 Pakko-oireisiin assosioituva geeni SLC1A1

### 6.1 EAAT-perhe

Kromosomissa 9 lokuksessa p24 sijaitsee geeni SLC1A1 solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter) member 1, joka koodaa glutamaatin kuljettajaproteiinia EAAC1 (excitatory amino acid carrier 1) eli EAAT3 (excitatory amino acid transporter-3). Ihmisellä on viisi EAAT-perheeseen kuuluvaa proteiinia EAAT1-EAAT5, joita koodaavat geenit SLC1A3, SLC1A2, SLC1A1, SLC1A6 ja SLC1A7. Nämä geenit sijaitsevat kromosomeissa 5p13, 11p13-p12, 9p24, 19p13.12 ja 1p32.3. EAAT-proteiinit ovat sijoittuneet solukalvolle siten, että osa proteiinista jää solun sisäpuolelle, osa on kalvolla ja osa solun ulkopuolella. Kaikki nämä proteiinit kuljettavat solun sisälle yhtä tai useampaa aminohappoa. /43/.

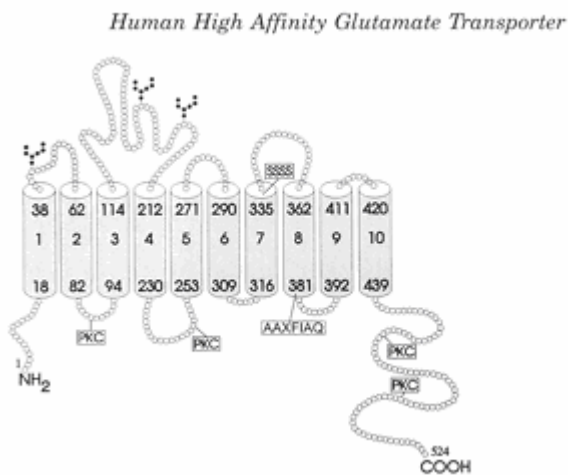
### 6.2 SLC1A1-geenin ja sen proteiinin rakenne

SLC1A1-geenissä (kuva 2) on noin 97 000 emäsparia, ja se on jakautunut 12 eksoniin. /43/.



Kuva 2. Mukailtu kuva SLC1A1-geenistä, jossa näkyvät 12 eksonia. /43/.

EAAC1-proteiinissa (kuva 3) on 524 aminohappoa, ja proteiini on asettunut solukalvolle siten, että ainakin 10 domeenia jää solukalvon sisään ja ne näkyvät kuvassa sylinterin muotoisina. Osa näistä domeeneista on konservoituneita. Proteiinissa on lisäksi kolme N-glykosylaatiokohtaa, jotka ovat sijoittuneet solun ulkopuolisiin domeeneihin. Yksi N-glykosylaatiokohta on sijoittunut solukalvon sisälle jäävien domeenien 1 ja 2 väliin, ja kaksi kohtaa sijaitsee domeenien 3 ja 4 välissä (kuva 3). Solun sisään jäävissä domeeneissa on neljä proteiinikinaasi C:n (PKC) fosforyloitokohtaa. Fosforyloinnin hermo-päätteen presynaptisessa osassa arvellaan vaikuttavan pidempikestoiseen synapsiseen kulkeutumiseen. /44./



Kuva 3. Ihmisen glutamaatin kuljettajaproteiinin EAAC1:n rakenne. /44/.

EAAT3-proteiinia on aivoissa erityisesti hippokampuksen ja aivojen kuorikerroksen neuroneissa sekä maksan, munuaisten, ohutsuolen ja sydämen epiteelissä. /43; 44/.

### 6.3 EAAT3-proteiinin toiminnasta

Proteiinin tehtävänä on pitää solun ulkoinen glutamaattipitoisuus sopivana keräämällä glutamaattia takaisin solun sisälle. Proteiinin toiminta on riippuvainen solukalvon sähköisestä potentiaalista. L-glutamaatin sisäänkuljetus tapahtuu yhdessä kahden natriumionin  $\text{Na}^+$  kanssa. Samalla kulkeutuvat yksi kaliumioni  $\text{K}^+$  ja yksi hydroksi-ioni  $\text{HO}^-$  solun ulkopuolelle. Jokaisen glutamaatin mukana solun sisälle kulkeutuu yksi positiivinen varaus, mikä mahdollistaa korkean glutamaattipitoisuuden keräämisen sekä neuro-

neihin että epiteelisoluihin. /44./ EAAT3-proteiinin arvellaan kuljettavan L-glutamaatin lisäksi myös D- ja L-aspartaattia. Neuroneihin lähinnä kuljetetaan glutamaattia ja epiteelisoluihin myös aspartaattia. /45./ EAAT3-proteiinin toimintaa säätelee ainakin GTRAP3-18-proteiini, joka toimii yhdessä EAAT3-proteiinin solunsisäisen karboksyyli-päänteisen domeenin kanssa. GTRAP3-18-proteiinin ilmentymistä säätelee A-vitamiini, ja tämän proteiinin liiallinen ilmentyminen heikentää EAAT3-proteiinin toimintaa. /45./

#### **6.4 SLC1A1-geenin mutaatioiden vaikutuksia**

Mutaatioiden SLC1A1-geenissä arvellaan vaikuttavan amyotrooppisen lateraalisklerosin ja dikarboksyylisen aminoasidurian syntyyn. /46/. SLC1A1-geenin mutaatioiden arvellaan myös aiheuttavan skitsofreniaa ja pakko-oireista häiriötä (OCD). Ihmisen SLC1A1-geenissä tiedetään ainakin kaksi yhden emäksen muutosta, jotka osuvat geenin eksoniselle alueelle, ja näitä on tutkittu sekä skitsofrenian että OCD:n yhteydessä. Lisäksi on tutkittu lukuisia yhden emäksen muutoksia, jotka ovat eksonien välittömässä läheisyydessä tai geenin säätelyalueella. /2; 43; 46./ Pakko-oireisessa häiriössä kiinnostavia yhden emäksen polymorfioita ovat olleet ainakin rs301434, rs301435, rs3087879, rs3780412, rs301430, rs301979, rs2228622, rs12682807 ja rs2072657. Osan näistä markkereista on havaittu muodostavan tilastollisesti merkitseviä haplotyyppejä keskenään kuten rs301434/rs3087879 (C/G), rs301430/rs301979 (T/C) ja rs12682807/rs2072657/rs301430 (A/T/T) tai (A/T/C). Markkerit rs301430 ja rs2228622 eksoneissa 10 ja 4 ovat synonyymisiä, eli emäksen muutos ei aiheuta aminohapon vaihdosta. /47./

## 7 Työn tarkoitus

Aiemmin oli kansainvälisessä autismin alttiusgeenien kartoituksessa havaittu, että kromosomissa 9 sijaitseva geeni JMJD2C assosioitui autismin kirjoon. /42/. Tämä geeni sijaitsee lähellä SLC1A1-geeniä, jonka tiedetään assosioituvan pakko-oireisiin häiriöihin. Sekä pakko-oireisissa häiriöissä että autismin kirjossa henkilöillä esiintyy pakko-toimintoja, ja haluttiin selvittää, assosioituuko SLC1A1-geeni myös autismin kirjoon. Samalla haluttiin selvittää JMJD2C-geenin assosioitumista suomalaisen autismin kirjion väestöön.

## 8 Materiaalit ja menetelmät

### 8.1 DNA:n eristys ihmisen kokoverestä

Kemikaalit ja materiaalit DNA:n eristyksessä:

A-puskuri eli punaisten verisolujen hajotuspuskuri pH 7,6:

- 0.32 M sakkaroosi
- 10 mM (Tris-puskuri  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$  5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) Trizma Base
- 1 % (polyetyleeniglykoli p-(1,1,3,3-tetrametyyllibutyli)-fenyylieetteri) Triton-X-100
- 2 M HCl pH:n säätöön

B-puskuri eli proteinaasi-K puskuri pH 8,0:

- 75 mM NaCl
- 25 mM EDTA
- 10 mM Trizma Base
- 1 M NaOH pH:n säätöön

*Tritirachium album* Proteinaasi-K 20 mg/ml (Finnzymes)

20 % Natriumdodekyylisulfaatti (SDS)-liuos

Fenoli-kloroformi-isoamyylialkoholi tilavuussuhteessa 25:24:1:

- Tris-emäspuskuroitu fenoli pH 7,9 (Tris-emäspuskuria (tulee fenolin mukana erillisessä pullossa) lisätään fenoliin (pH 6,6) suhteessa 65  $\mu\text{l}$  / 1ml fenolia, jolloin pH saavuttaa arvon 7,9) (Applied Biosystems)
- kloroformi-isoamyylialkoholi 24:1

2M KCl-liuos

96 % etanoli

Tris-EDTA (TE) -puskuri:

- 10 mM Tris-HCl pH 7,5
- 1 mM EDTA pH 8,0

Geeliputket 15 ml Phase Lock Gel (PLG) light (Eppendorf)

Tyhjennettiin EDTA-veriputkien sisältämä ihmisen kokoveri noin 10 ml 50 ml:n muoviputkiin ja lisättiin noin 40 ml noin 4-celciusasteista A-puskuria pH 7,6. Sekoitettiin putkia ja pidettiin jäissä 10 minuuttia. Sentrifugoitiin ohjelmalla 1200 g, 4 °C, 15 min. Kaadettiin supernatantti pois ja käsiteltiin putkien pohjalle jääneet pelletit uudelleen edellä mainitulla tavalla. Supernatantti kaadettiin pois mahdollisimman tarkasti ja putkiin lisättiin 2 ml B-puskuria pH 8,0, 50 µl proteinaasi-K:ta ja 100 µl 20 % SDS-liuosta. Putkien annettiin inkuboitua yön yli 56 °C:ssa ravistelijassa.

Seuraavana päivänä muoviputkien sisältö tyhjennettiin 15 ml:n geeliputkiin, joiden pohjalla oli noin 2,5 ml geeliä, lisättiin putkiin 3 ml tris-puskuroitua fenolia ja 3 ml kloroformi-isoamyylialkoholia. Putkia pidettiin sekoittajassa 15 min ja sentrifugoitiin ohjelmalla 1500 g, huoneen lämmössä, 10 min. Sentrifugoinnin jälkeen putkissa oleva geeli oli siirtynyt keskelle erottamaan kevyen ja raskaan faasin toisistaan. Tämä perustui tiheyseroihin eri faasien välillä. Orgaaninen faasi oli raskainta, ja se jäi pohjalle, geeli oli kevyempää kuin orgaaninen faasi mutta raskaampaa kuin vesifaasi, jossa oli DNA. Vesifaasi tyhjennettiin 15 ml:n muoviputkiin, joihin lisättiin 200 µl 2 M KCl-liuosta ja 5 ml noin 4-celciusasteista 96 % etanolia. Putkia käännettiin varovasti, kunnes liuokseen ilmestyi valkoista rihmaa. Putket sentrifugoitiin ohjelmalla 2000 rpm, huoneen lämmössä 5 min. Supernatantti kaadettiin pois ja putkien pohjalle jääneiden DNA-pellettien annettiin kuivua noin tunti putket ylösalaisin. Lopuksi putkiin lisättiin 500 µl TE-puskuria pH 8,0 ja DNA:n annettiin rauhassa liueta TE-puskuriin. DNA-liuos pipetoitiin 1,5 ml:n eppendorffputkiin ja putkia säilytettiin jääkaapissa. DNA:n pitoisuus (ng/µl) ja puhtausaste (260/280) mitattiin spektrofotometrisesti.

## 8.2 PCR-ketjureaktio

Kemikaalit polymeerasiketjureaktiossa:

- *Thermus brockianus* DNA polymeerasientsyymi DyNAzyme II Hot Start 5u/μl (Finnzymes)
- 10X reaktiopuskuri DyNAzyme II Hot Start (Finnzymes)
- nukleotidiseos dNTP Mix (Finnzymes)
- alukkeet F- ja R-suunta 20 ng/μl (Oligomer Oy)

Taulukoissa 2 ja 3 on esitetty työssä käytettävät alukeparien sekvenssit ja niiden kiinnityslämpötilat PCR-reaktiossa. Alukkeissa F-suunta (Forward) tarkoittaa aluketta, joka kiinnittyy DNA-juosteeseen ennen kopioitavaa aluetta, kun polymeerasireaktio kulkee päästä 5' päähän 3'. R-suunta (Reverse) tarkoittaa aluketta, joka kiinnittyy saman DNA:n vastinjuosteeseen ennen kopioitavaa aluetta, kun polymeerasireaktio kulkee päästä 3' päähän 5'.

*Taulukko 2. SLC1A1-geenin alukeparien sekvenssit ja kiinnityslämpötilat PCR:ssä*

Eksoni	F-suunta 5'→3'	R-suunta 5'→3'	Kiinnityslämpötila °C
4	gctcagcattttggctggacctca	gcaaaatgaaagtcacaataattcaaaag	55
8	cgcaccatctaaccacat	taaccaactgaaaccaacacctct	59
10	acagcaccttctgattcctggacctg	gtcgtatttaactcttgggaaggactttatagatc	57

*Taulukko 3. JMJD2C-geenin alukeparin sekvenssit ja kiinnityslämpötila PCR:ssä*

PCR	F-suunta 5'→3'	R-suunta 5'→3'	Kiinnityslämpötila °C
	ctcaactccatggcttcaca	aaccctgcctccatcttat	58

PCR-reaktioseos ja entsyymilaimennos (taulukko 4) tehtiin omiin eppendorffputkiin.

*Taulukko 4. PCR-reaktioseos ja entsyymilaimennos. Reagenssien tilavuus on yhdelle kuoppalevyn kaivolle.*

PCR	1x (μl)
reaktiopuskuri	1
nukleotidiseos	0,25
aluke F 20 ng/μl	0,32
aluke R 20 ng/μl	0,32
dH2O	6,11
Entsyymilaimennos	
entsyymi	0,15
dH2O	4,85

PCR-reaktioseosta pipetoitiin 8 µl kuhunkin kaivoon, kaivoihin lisättiin 2 µl DNA:ta ja käynnistettiin taulukon 5 mukainen PCR-ajo-ohjelma.

*Taulukko 5. PCR-ajo-ohjelma. X °C tarkoittaa sitä, että jokaiselle alukkeelle on oma erityinen kiinnittymislämpötila.*

	1. vaihe	2. vaihe, 35 kierrosta	3. vaihe
alkukuumennus	94 °C 5 min		
entsyymilaimennoksen lisäys			
denaturaatio		94 °C 30 s	
alukkeiden kiinnittyminen		X °C 30 s	
kopioituminen		72 °C 30 s	72 °C 10 min
loppulämpötila			4 °C

Entsyymilaimennosta pipetoitiin kuhunkin kaivoon 5 µl. Entsyymi on inaktiivinen huoneenlämmössä, ja aktivoituakseen se vaatii 94 °C lämpötilan, jolloin entsyymin inhibiittori denaturoituu.

### 8.3 PCR-tuotteen geelielektroforeesiajo

Kemikaalit geelin valmistuksessa:

10X Tris-Boraatti-EDTA (TBE) -puskuri pH 8,3:

- 1.1M Tris
- 900mM Boorihappo
- 25mM EDTA
- agar GellyPhor (Euroclone)

1 % etidiumbromidiliuos

Kemikaalit geelijaossa:

- Väriaine Gel Loading Dye, Blue (6X) (New England BioLabs)
- DNA-kokomarkkeri 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs)

Valmistettiin 1,5 % agar TBE-puskurissa, jossa oli 1-prosenttista etidiumbromidia.

Pipetoitiin kuoppalevyn kaivoihin 3 µl väriainetta ja 4 µl PCR tuotetta. Pipetoitiin geelin kaivorivin ensimmäiseen kaivoon 3 µl DNA kokomarkkeria ja viereisiin kaivoihin 7 µl PCR-tuotetta, jossa oli väriaine. Geelijaon olosuhteet olivat 160 V 20 min. Ajon jälkeen geeli valokuvattiin UV-valossa.

## 8.4 PCR-tuotteen puhdistus

Kemikaalit PCR-tuotteen puhdistusreaktiossa:

entsyymiseos (eksonukleaasi, alkalifosfataasi) ExoSAP-IT (USB Corporation)

Pipetoitiin jäissä kuoppalevyllä kaivoihin 2 µl entsyymiseosta ja 5 µl puhdistettavaa PCR-tuotetta. Levy sentrifugoitiin ohjelmalla 900 g 1 minuutti, jotta seos varmasti painui kaivon pohjalle ja ilmakuplat poistuivat. Suoritettiin lämpökäsittely taulukon 6 mukaisesti. Reaktion aikana entsyymiseoksen sisältämät hydrolyyttiset entsyymit pilkkosivat yksijuosteisen DNA:n nukleotideiksi ja nukleotidit nukleosideiksi.

*Taulukko 6. Puhdistusreaktio.*

entsyymireaktio	37 °C 15 min
denaturaatio	80 °C 15 min
loppulämpötila	10 °C

## 8.5 Esisekvensointireaktio puhdistetulle PCR-tuotteelle

Kemikaalit esisekvensointireaktiossa:

- nukleotidiseos (dNTP, ddNTP+leima) BigDye 3.1 Terminator (Applied Biosystems)
- 5X sekvensointipuskuri BigDye (Applied Biosystems)
- alukkeet F- tai R-suunta 5 ng/µl (Oligomer Oy)

Alukeparien sekvenssit ovat samat kuin taulukoissa 2 ja 3. Tehtiin jäissä taulukon 7 mukaiset reaktioseokset eppendorffputkiin ja pipetoitiin niistä jäissä kuoppalevyn kaivoihin 8 µl seosta ja 2 µl puhdistettua PCR-tuotetta.

*Taulukko 7. Reaktioseos esisekvensointireaktiolle. Reaktioseokset tehdään erikseen R- ja F-suuntaan.*

esisekvensointi	1 x (µl)
dH <sub>2</sub> O	5,2
puskuri	1,8
aluke R/F (5 ng/µl)	0,65
nukleotidiseos	0,35



Pipetoinnin jälkeen levy sentrifugoitiin ohjelmalla 900 g, 1 minuutti. Varsinainen esisekvensointireaktio suoritettiin PCR-laitteella taulukon 8 mukaisesti.

*Taulukko 8. PCR-ajo-ohjelma esisekvensointireaktiolle. X °C tarkoittaa sitä, että jokaiselle alukkeelle on oma erityinen kiinnittymislämpötila.*

	1. vaihe	2. vaihe, 25 kierrosta	3. vaihe
alkukuumennus	96 °C 1 min		
denaturaatio		96 °C 10 s	
alukkeen kiinnittyminen		X °C 5 s	
kopioituminen		60 °C 4 min	
loppulämpötila			10 °C

Yleensä riitti, että esisekvensointireaktio tehtiin vain yhteen suuntaan ja suunta oli usein valmiiksi optimoitu kullekin alukkeelle.

Varsinainen sekvensointi tilattiin ostopalveluna, ja sen suoritti sekvensointipalveluja tarjoava yritys Seqlab Oy.

## 8.6 Reaaliaikainen PCR (RT-PCR)

Kemikaalit ja laitteet reaaliaikaisessa PCR:ssä:

- PCR-seos (koettimet+leima, alukkeet, dNTP, entsyymi) TaqMan 40 x SNP Genotyping Assay mix (Applied Biosystems)
- reaktiopuskuri TaqMan 2 x Universal Master mix (Applied Biosystems)
- 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)

Kaikki vaiheet RT-PCR-ajossa suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Valmistettiin reaktioseos jäissä taulukon 9 mukaisesti.

*Taulukko 9. Reaktioseos RT-PCR:lle.*

RT-PCR seos	1 x (µl)
2 x reaktiopuskuri	12,50
20 x PCR-seos	1,25

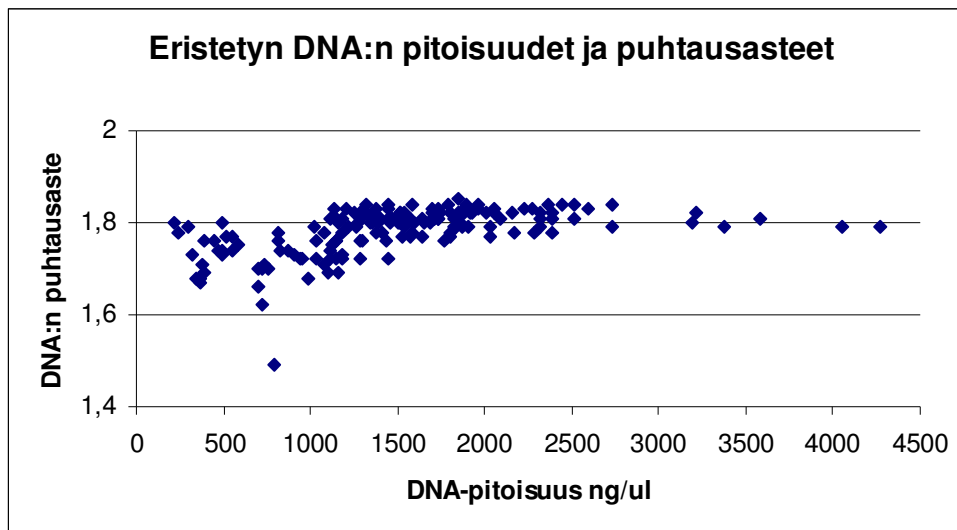
Pipetoitiin jäissä RT-PCR-laitteelle suunnitellun kuoppalevyn kaivoihin 13,5 µl reaktioseosta (taulukko 9) ja DNA:ta niin, että sen pitoisuus kaivossa oli noin 20 ng/µl.

Varsinainen ajo kesti 1 tunti 42 minuuttia, ja onnistuneessa ajossa fluoresenssin kynnyisarvo ylittyi jo 20–30 kierroksen jälkeen. Koetin sisälsi tunnetun alleelin. Lisäksi koettimen yhdessä päässä oli fluoresenssileima ja toisessa päässä oli sammuttaja, joka esti fluoresenssileimaa fluoresoimasta. Reaktion aikana, kun koetin ja aluke olivat asettuneet kopioitavaan DNA-juosteeseen, eteni PCR-reaktio alukkeelta koettimelle. Polymeraasientsyymi pilkkoi koettimen, jolloin fluoresenssileima etäännytti sammuttajasta ja pystyi fluoresoimaan. Laite luki tämän fluoresenssin.

## 9 Tulokset ja tulosten tarkastelu

### 9.1 DNA:n eristäminen ja DNA-pitoisuuden mittaaminen

Työssä eristettävät verinäytteet oli kerätty suomalaisilta autismin kirjon henkilöiltä ja heidän perheenjäseniltään sekä sukulaisiltaan. Eristettyjä näytteitä oli 163, ja niiden DNA-pitoisuus vaihteli suuresti luultavasti sekä eristyksessä ilmenneiden että mittaus- teknisten ongelmien vuoksi. Suurin pitoisuus oli 4274 ng/μl ja pienin 217 ng/μl. Pitoi- suuksien keskiarvo oli 1494 ng/μl ja keskihajonta 709 ng/μl. Eristetyn DNA:n korkein puhtausaste oli 1,85 ja matalin 1,49. Puhtausasteiden keskiarvo oli 1,78 ja keskihajonta 0,05.



Kuva 4. 163 eristetyn DNA-näytteen pitoisuudet ja puhtausasteet.

Kuvassa 4 on esitetty 163 eristetyn DNA:n pitoisuudet ja puhtausasteet. Kuvasta voi nähdä, että suurin osa DNA-pitoisuuksista osuu välille 1000 – 2000 ng/μl ja puhtausasteet ovat suurimmalla osalla lähellä optimiarvoa 1,8. On myös havaittavissa heikoimpia puhtausasteita DNA-pitoisuuksilla, jotka ovat alle 1500 ng/μl.

## 9.2 SLC1A1- ja JMJD2C-geenien alleelien tulosten käsittely

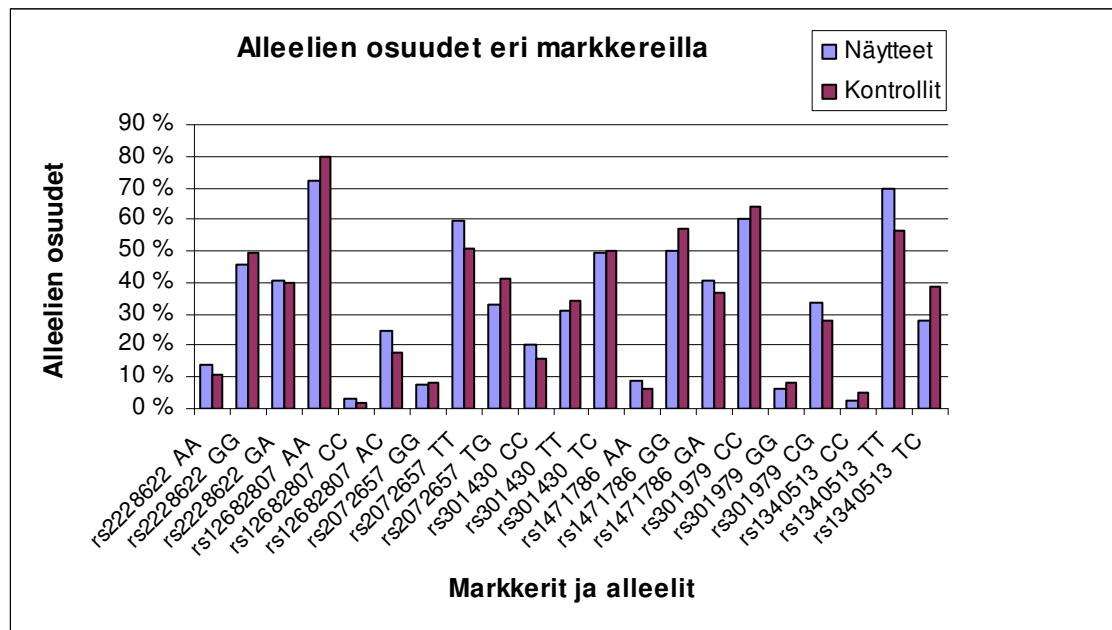
Tutkimukseen valittiin perheistä yksi sellainen henkilö, jolla oli diagnosoitu joko varhaislapsuuden autismi tai Aspergerin oireyhtymä. DNA-näytteitä kertyi 176. Kontrollina käytettiin 200:aa DNA-näytettä, joiden luovuttajat olivat tuntemattomia. Esikokeiden yhteydessä löydettiin yksi uusi yhden emäksen muutos rs1471786, joka sijaitsi eksonin 10 läheisyydessä, ja tämä markkeri otettiin mukaan varsinaiseen tutkimukseen. Pakko-oireisiin assosioituvan geenin SLC1A1 eksoneille 4, 8 ja 10 suoritettiin monistus, geielektroforeesiajo ja puhdistusreaktio. Puhdistetuille PCR-tuotteille tehtiin esisekvensointimonistus eksoneille 4 ja 10 F- ja eksonille 8 R-suuntaan. Autismiin kirjoittuvan geenin JMJD2C markkerille rs1340513 suoritettiin RT-PCR samoille 176 näytteelle ja 200 kontrollille.

Näytteiden ja kontrollien sekvenssit luettiin. SLC1A1-geenin eksoni 10:ssä markkerin rs301979 kohdalla molemmat alleelit näkyivät sekvenssissä näytteillä noin 94 %:lla ja kontrolleilla 92 %:lla. Jäi täysin tulkinnanvaraiseksi, mitkä niistä oli oikeasti heterotsygotteja ja mitkä eivät. Todennäköisesti kyseisen markkerin tulokset eivät ole luotettavia, mutta markkeri otettiin kuitenkin mukaan laskentaan. Taulukossa 10 on esitetty sekvenssin luennassa käytetyt markkerit SLC1A1- ja JMJD2C-geeneille ja markkereissa olevat emäsmuutokset sekä muutoksen sijainti eksoniin nähden.

*Taulukko 10. SLC1A1- ja JMJD2C-geenien sekvenssin luennassa käytetyt markkerit ja niiden emäsmuutokset. Muutoksen sijainti kertoo, kuinka monen emäksen päässä muutos on intronissa joko ennen (-) eksonin alkua tai jälkeen (+) eksonin lopun.*

<b>SLC1A1</b>	<b>Markkeri</b>	<b>Muutoksen sijainti</b>	<b>Emäsmuutos</b>
Eksoni 4	rs2228622	Eksoni	G→A
Eksoni 8	rs12682807	Introni + 8	A→C
Eksoni 10	rs2072657	Introni - 118	T→G
Eksoni 10	rs301430	Eksoni	T→C
Eksoni 10	rs1471786	Introni + 11	G→A
Eksoni 10	rs301979	Introni + 88	C→G
<b>JMJD2C</b>	<b>Markkeri</b>	<b>Muutoksen sijainti</b>	<b>Emäsmuutos</b>
Eksoni 9	rs1340513	Introni - 3292	T→C

Sekvenssin luennan jälkeen saatiin SLC1A1-geenille alleelitulokset 175 näytteelle ja 194 kontrollille ja JMJD2C-geenille 175 näytteelle ja 197 kontrollille. Kuvassa 5 on esitetty SLC1A1- ja JMJD2C-geenin markkerien alleelien prosentuaaliset osuudet näytteille ja kontrolleille. Siniset pylväät esittävät näytteiden ja lilat kontrollien alleelien osuuksia. Markkerit näkyvät kuvassa alhaalla viistosti ja niiden alleelit isoilla kirjaimilla perässä. Kuvassa näkyy alleelien osuuksien vaihtelua näytteiden ja kontrollien välillä, mutta suurin osa vaihtelusta on alle 10 %. JMJD2C-geenin markkerin rs1340513 alleelien TT ja TC kohdalla näkyy yli 10 %:n ero näytteiden ja kontrollien välillä. Selkein ero on alleelilla TT, jota näyttäisi olevan näytteillä selkeästi enemmän kuin kontrolleilla.



Kuva 5. SLC1A1- ja JMJD2C-geenin markkerien alleelien prosentiosuudet näytteille ja kontrolleille. Alhaalla viistosti on esitetty markkerit ja niiden perässä isoilla kirjaimilla homotsygootit sekä heterotsygootit alleelit, esimerkiksi AA, GG ja GA. Siniset pylväät esittävät näytteiden ja lilat kontrollien alleelien osuuksia.

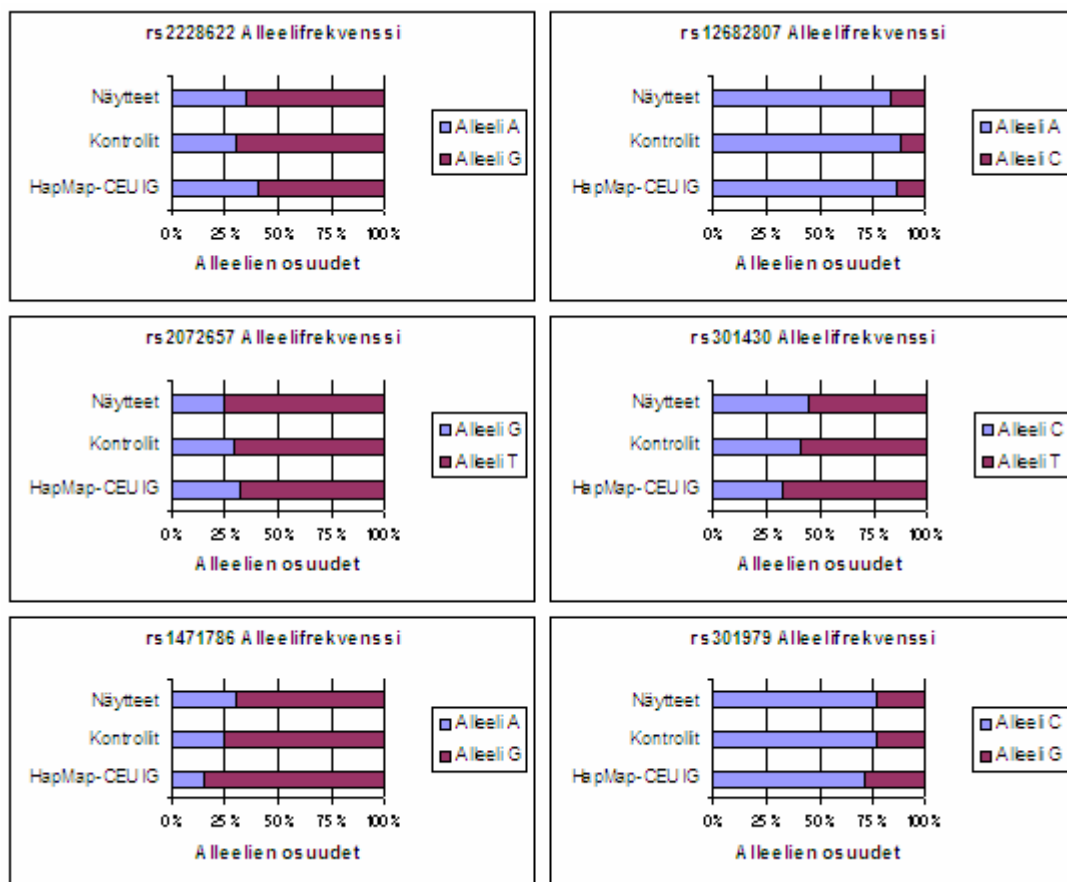
Alleelituloksista laskettiin näytteille ja kontrolleille alleelifrekvenssit ( $f$ ) kaavalla 3, jossa on esimerkkinä yleisempi alleeli ( $i$ ):

$$f(i) = \frac{2 * i + ij}{(2 * i + ij) + (2 * j + ij)} \quad (3)$$

Kaavassa 3 (i) on yleisempi alleeli ja (j) harvinaisempi. Heterotsygoottia alleelia edustaa (ij). Alleelifrekvenssi harvinaisemmalle alleelille (j) laskettiin samalla tavalla.

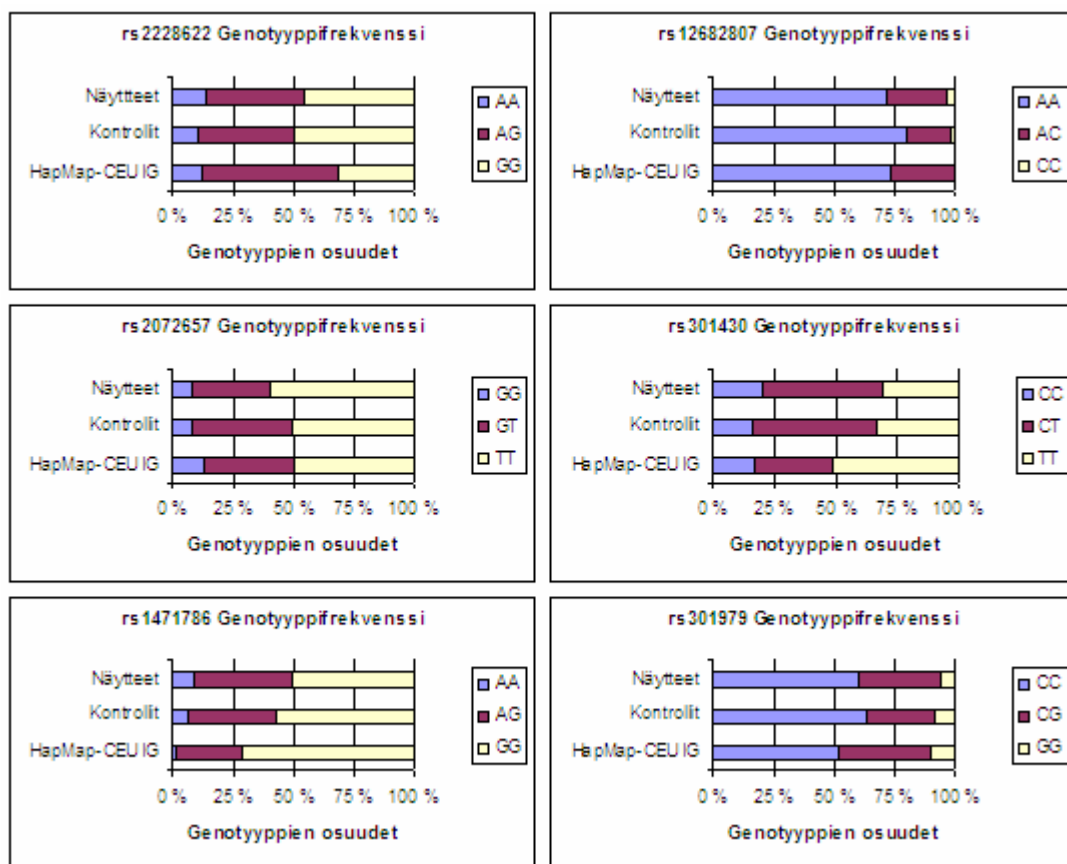
Genotyypifrekvenssit näytteille ja kontrolleille laskettiin jakamalla esimerkiksi harvinaisemman, homotsygootin alleelin (j) määrä laskennassa mukana olevilla näytteiden tai kontrollien kokonaismäärällä eli otoskoolla. Samalla tavalla laskettiin genotyypifrekvenssit yleisemmälle homotsygootille alleelille (i) ja heterotsygootille alleelille (ij).

Kuvissa 6 ja 7 on esitetty SLC1A1-geenin markkerien alleeli- ja genotyypifrekvenssit. Vertailun vuoksi kuviin lisättiin myös HapMap-tietokannasta eurooppalaisten (CEU IG) alleeli- ja genotyypifrekvenssit. Kuvassa 8 on esitetty JMJD2C-geenin markkerin alleeli- ja genotyypifrekvenssit rinnakkain.



Kuva 6. SLC1A1-geenin markkerien näytteiden ja kontrollien sekä HapMap-tietokannassa olevien eurooppalaisten (CEU IG) alleelifrekvenssit. Kuvissa on kerrottu, kumpaa alleelia sininen tai lila palkki edustaa kussakin markerissa.

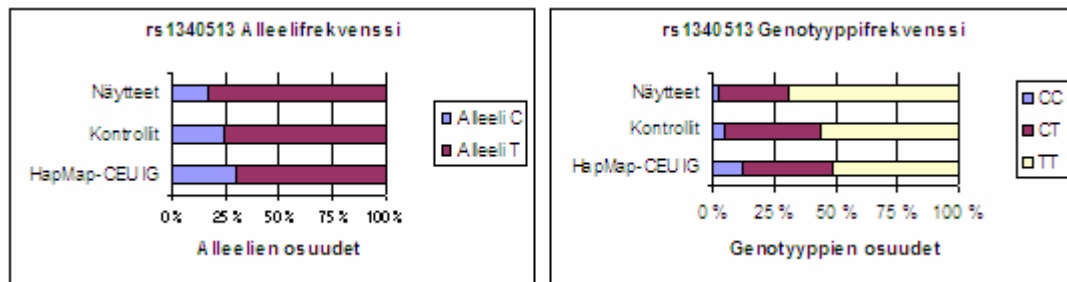
Kuvassa 6 vaihteoiset alleelit on merkitty erivärisin palkein. SLC1A1-geenin markkerien alleelifrekvensseissä huomaa jonkinlaista eroa näytteiden, kontrollien ja eurooppalaisten välillä. Varsinkin näytteiden ja eurooppalaisten välillä on suurehkoja eroja alleelifrekvensseissä ainakin markkereissa rs2072657, rs301430 ja rs1471786. Kontrollien ja eurooppalaisten välillä suurimmat alleelifrekvenssierot ovat markkereissa rs2228622, rs301430 ja rs1471786. Sen sijaan näytteiden ja kontrollien välillä ei ole mainittavia eroja.



Kuva 7. SLC1A1-geenin markkerien näytteiden ja kontrollien sekä HapMap-tietokannassa olevien eurooppalaisten (CEU IG) genotyypifrekvenssit. Kuvissa on kerrottu minkä väriset palkit edustavat mitään genotyyppiä kussakin markerissa.

Kuvassa 7 on kolmella eri väripalkilla esitetty homo- ja heterotsygootit alleelivaihtoehdot. SLC1A1-geenin markkerien genotyypifrekvensseissä on huomattavia eroja näytteiden ja eurooppalaisten, jonkin verran kontrollien ja eurooppalaisten mutta aika vähän näytteiden ja kontrollien välillä. Suurimmat erot ovat yleisemmissä homotsygooteissa

alleeleissa. Markkereissa rs301430 ja rs1471786 on eurooppalaisilla selkeästi enemmän yleisempää homotsygoottia alleelia kuin näytteillä ja kontrolleilla. Harvinaisempaa homotsygoottia alleelia on näytteillä enemmän kuin eurooppalaisilla markkereissa rs12682807 ja rs1471786. Heterotsygoottia alleelia on eurooppalaisilla eniten markkerissa rs2228622 ja vähiten markkerissa rs301430.



Kuva 8. JMJD2C-geenin markkerin alleeli- ja genotyypifrekvenssit näytteille, kontrolleille ja HapMap-tietokannassa oleville eurooppalaisille (CEU IG). Kuvissa on kerrottu erivärisillä palkeilla alleelivaihtoehdot ja genotyypit.

Kuvassa 8 on esitetty rinnakkain JMJD2C-geenin markkerin alleeli- ja genotyypifrekvenssit erivärisin palkein. Alleelifrekvenssikuvassa näkyy, että näytteillä on yleisempää alleelia T enemmän kuin kontrolleilla ja eurooppalaisilla. Genotyypifrekvenssikuvassa genotyypin TT esiintyvyys näytteillä on selkeästi suurempaa kuin kontrolleilla ja eurooppalaisilla. Sen sijaan harvinaisempaa alleelia ja genotyyppiä näyttäisi olevan eniten eurooppalaisilla.

Tilastollisilla testeillä haluttiin selvittää, assosioituvatko SLC1A1- ja JMJD2C-geenin markkerit autismin kirjoon. Nollahypoteesina yksilötason  $\chi^2$ -testissä on se, että assosiaatio alleelien, genotyyppien ja sairausstatuksen välillä on puhtaasti satunnaista. Fisherin tarkassa testissä nollahypoteesina on, että vapausasteiden ollessa 1 kertoimien suhteen pitäisi olla 1 alleelien sekä terveiden ja sairaiden välillä väestössä, josta otos on tehty. Jotta tulokset olisivat tilastollisesti merkitseviä, pitäisi todennäköisyyden olla 0,01 tai sitä pienempi, jolloin nollahypoteesi kumoutuu.



Todennäköisyyksiä alleelijakaumille yksilötason  $\chi^2$ -testillä ja Fisherin tarkalla testillä laskemista varten piti ensin laskea alleelien (i) ja (j) määrät (m), ja ne laskettiin kaavalla 4 esimerkiksi alleelille (j):

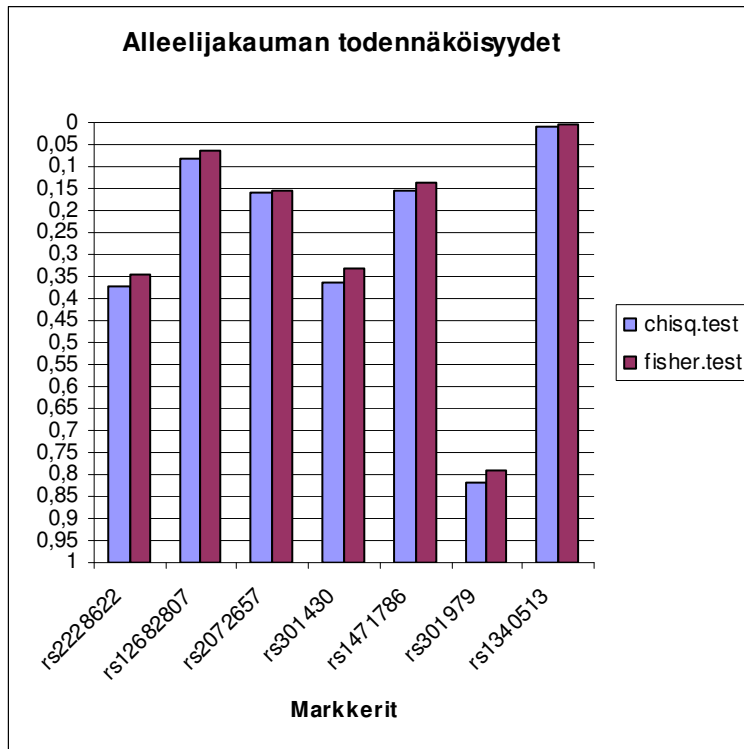
$$m(j) = 2 * j + ij \quad (4)$$

Lasketut alleelimäärät näytteiltä ja kontrolleilta syötettiin R-ohjelmaan, muutettiin matriisimuotoon ja annettiin käskyt yksilötason  $\chi^2$ -testille `chisq.test()` ja Fisherin tarkalle testille `fisher.test()` taulukon 11 mukaisesti.

*Taulukko 11. R-ohjelmalle syötetyt käskyt alleelijakaumien todennäköisyyksien laskemista varten. Käskyssä X on kuvitteellinen nimi, m() on kaavalla 4 lasketut alleelimäärät yleisemmälle alleelille (i) ja harvinaisemmalle alleelille (j) sekä näytteille (n) ja kontrolleille (k). Y on kuvitteellinen nimi matriisimuotoon muutetulle datalle X.*

```
> X<-c(m(in),m(ik),m(jn),m(jk))
> matrix(data=X,ncol=2,nrow=2)
> Y<-matrix(data=X,ncol=2,nrow=2)
> chisq.test(Y)
> fisher.test(Y).
```

Kuvassa 9 on esitetty alleelijakauman todennäköisyydet SLC1A1- ja JMJD2C-geenien markkereille. Sinisellä palkilla on esitetty yksilötason  $\chi^2$ -testin ja lilalla palkilla Fisherin tarkan testin todennäköisyydet. Kaikkien markkerien kohdalla Fisherin tarkka testi on antanut hieman pienemmän todennäköisyyden kuin yksilötason  $\chi^2$ -testi. JMJD2C-geenin markkeri rs1340513 alitti tilastollisesti merkitsevän tason todennäköisyydellä 0,0085 yksilötason  $\chi^2$ -testillä ja 0,0065 Fisherin tarkalla testillä.



Kuva 9. Alleelijakauman todennäköisyydet SLC1A1- ja JMJD2C-geenien markkereille. Sininen palkki kertoo yksilötason  $\chi^2$ -testin ja lila palkki Fisherin tarkkan testin todennäköisyydet. Todennäköisyysväli 1 – 0 on pystyakselilla.

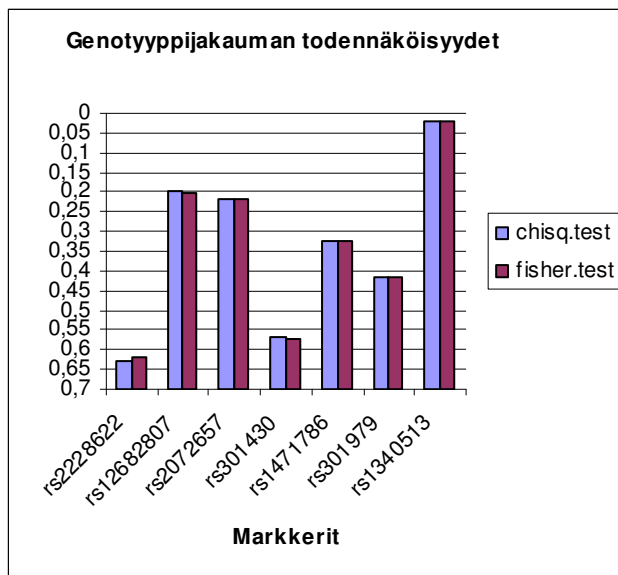
Kuvassa 9 näkyy myös SLC1A1-geenin markkerin rs301979 muista markkereista selkeästi poikkeava, heikko todennäköisyysarvo, joka saattaa viitata siihen, että sekvenssin tulokset eivät olleet luotettavia tuon markkerin kohdalla. SLC1A1-geenin kohdalla markkeri rs12682807 pääsi lähimmäksi tilastollista merkitsevyytensä todennäköisyydellä 0,081 yksilötason  $\chi^2$ -testillä ja 0,065 Fisherin tarkalla testillä.

Genotyypijakaumien todennäköisyyksiä laskettaessa samoilla tilastollisilla menetelmillä syötettiin sekvensoinnista saadut alleelitulokset suoraan R-ohjelmaan ja annettiin taulukon 12 mukaiset käskyt.

*Taulukko 12. R-ohjelmaan syötetyt käskyt genotyypijakaumien todennäköisyyksien laskemista varten. Käskyssä X on kuvitteellinen nimi, alleelitulokset yleisemmälle alleelille (i), harvinaisemmalle alleelille (j) ja heterotsygootille alleelille (ij) sekä näytteille (n) ja kontrolleille (k). Y on kuvitteellinen nimi matriisimuotoon muutetulle datalle X.*

```
> X<-c(in, ik, jn, jk, ijn, ijk)
> matrix(data=X,ncol=3,nrow=2)
> Y<-matrix(data=X,ncol=3,nrow=2)
> chisq.test(Y)
> fisher.test(Y).
```

Kuvassa 10 on esitetty genotyypijakauman todennäköisyydet SLC1A1- ja JMJD2C-geenien markkereille. Sinisellä palkilla on esitetty yksilötason  $\chi^2$ -testin ja lilalla palkilla Fisherin tarkkan testin todennäköisyydet. JMJD2C-geenin markkeri rs1340513 pääsi lähelle tilastollista merkitsevyyttä todennäköisyysarvolla 0,02 molemmilla testeillä.



Kuva 10. Genotyypijakauman todennäköisyydet SLC1A1- ja JMJD2C-geenien markkereille. Sininen palkki kertoo todennäköisyydet yksilötason  $\chi^2$ -testillä ja lila palkki Fisherin tarkalla testillä. Todennäköisyysväli 0,7 – 0 on pystyakselilla.

Kuvassa 9 alleelijakauman todennäköisyyksissä muista markkereista selkeästi poikkeavan heikon arvon saanut SLC1A1-geenin markkeri rs301979 ei saanut poikkeavan heikkoa todennäköisyysarvoa genotyypijakaumalle (kuva 10). Sen sijaan heikoin arvo on SLC1A1-geenin markkerilla rs2228622 ja parhaimman todennäköisyysarvon sai hienoisesti markkeri rs12682807 niin kuin alleelijakaumallekin.

SLC1A1-geenin yksikään markkeri ei saavuttanut tilastollista merkitsevyytensä alleeli- eikä genotyypijakaumille, joten nollahypoteesi jää voimaan eikä geeni assosioitu autismin kirjoon ainakaan tutkimuksessa mukana olevien markkerien osalta. JMJD2C-geenin markkeri rs1340513 alitti tilastollisen merkitsevyytensä alleelijakauman osalta ja pääsi lähelle tilastollista merkitsevyytensä genotyypijakaumalle. Kun tilastollinen merkitsevyytensä saavutettiin edes alleelijakaumalle, voidaan sanoa, että assosiaatio alleelien ja sairausstatuksen välillä ei ole puhtaasti satunnaista ja JMJD2C-geeni assosioituu autismin kirjoon myös suomalaisessa väestössä.

## 10 Yhteenveto

Työssä haluttiin selvittää pakko-oireisiin assosioituvan geenin SLC1A1 ja autismin kirjoon assosioituvan geenin JMJD2C assosioitumista autismin kirjoon suomalaisessa väestössä. JMJD2C-geeni assosioitui autismin kirjoon myös suomalaisessa väestössä, sen sijaan SLC1A1-geeni ei assosioitunut.

Työssä eristettiin kokoverestä 163 DNA-näytettä suomalaisilta autismin kirjon henkilöiltä, heidän perheenjäseniltään ja sukulaisiltaan. Eristetyn DNA:n pitoisuuden keskiarvoksi saatiin 1494 ng/μl ja puhtausasteen keskiarvoksi 1,78, joka oli lähellä optimia 1,8. Työssä tutkittiin SLC1A1-geenin eksonien 4, 8 ja 10 alueella tai läheisyydessä olevien markkerien alleeleja PCR-monistuksella ja sekvensoinnilla. Lisäksi tutkittiin JMJD2C-geenin markkerin rs1340513 alleelit reaaliaikaisella PCR:llä.

Tutkimuksessa oli mukana 176 DNA-näytettä suomalaisilta autismin kirjon henkilöiltä ja 200 kontrollia tuntemattomilta luovuttajilta. Alleelitulokset saatiin SLC1A1-geenin kohdalla 175 näytteeltä ja 194 kontrollilta sekä JMJD2C-geenin kohdalla 175 näytteeltä ja 197 kontrollilta. SLC1A1-geenin markkerien kohdalla ei esiintynyt alleeli- ja genotyyppifrekvenssien kohdalla mainittavia eroja näytteiden ja kontrollien välillä. JMJD2C-geenin markkerin alleelifrekvenssissä näkyi selvästi, että näytteillä oli enemmän alleelia T kuin kontrolleilla. Genotyyppifrekvenssissä näkyi selkeästi, että genotyyppi TT oli näytteillä yleisempää kuin kontrolleilla.

Todennäköisyydet molempien geenien markkerien alleeli- ja genotyyppijakaumille laskettiin yksilötason  $\chi^2$ -testillä ja Fisherin tarkalla testillä. SLC1A1-geenin markkeri rs12682807 ylsi lähimmäksi tilastollista merkitsevyytensä 0,01 alleelijakaumalle todennäköisyydellä 0,081 yksilötason  $\chi^2$ -testillä ja 0,065 Fisherin tarkalla testillä. JMJD2C-geenin markkeri rs1340513 alitti tilastollisen merkittävyyden alleelijakaumalle todennäköisyydellä 0,0085 yksilötason  $\chi^2$ -testillä ja 0,0065 Fisherin tarkalla testillä. Myös genotyyppijakauma markkerilla rs1340513 ylsi lähelle todennäköisyydellä 0,02 molemmilla testeillä.

## Lähteet

- 1 Lönqvist, Jouko, Heikkinen, Martti, Henriksson, Markus, Marttunen, Mauri, Partonen, Timo. *Psykiatria. 2. uudistettu painos*. Kustannus Oy Duodecim, Karisto Oy, 2001.
- 2 Dickel, Diane E., Veenstra-VanderWeele, Jeremy, Cox, Nancy J., Wu, Xiaolin, Fischer, Daniel J., Van Etten-Lee, Michelle, Himle, Joseph A., Leventhal, Bennet L., Cook, Edwin H. jr, Hanna Gregory L. Association Testing of the Positional and Functional Candidate Gene SLC1A1/EAAC1 in Early-Onset Obsessive-compulsive Disorder. *Archives of General Psychiatry*, 2006. Vol. 63, s. 778–785
- 3 *Psykiatrian käsikirja*. Recallmed Oy, Jyväskylä: Gummerus kirjapaino Oy, 1998.
- 4 Veenstra-VanderWeele, J., Kim, S-J., Gonen, D, Hanna, G.L., Leventhal, B.L., Cook, E. H. jr.: Genomic organisation of the SLC1A1/EAAC1 gene and mutation screening in early-onset obsessive-compulsive disorder. *Molecular Psychiatry*, 2001. Vol. 6, s. 160-167.
- 5 Lieb R. Anxiety Disorders: clinical presentation and epidemiology. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2005. Vol. 169, s. 405-432.
- 6 Hanna, Gregory L., Veenstra-vanderWeele, Jeremy, Cox Nancy J., Boehnke, Michael, Himle, Joseph A., Curtis, George C., Leventhal Bennet L., Cook, Edwin H. jr. Genome-Wide Linkage Analysis of Families With Obsessive-Compulsive Disorder Ascertained Through Pediatric Proband. *American Journal of Medical Genetics*, 2002. Vol. 114, s. 541-552.
- 7 Ivarsson, Tord, Melin, Karin. Autism spectrum traits in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder (OCD). *Journal of Anxiety Disorders*, 2007.
- 8 Kanner, L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, 1943. Vol. 2, s. 217-250.
- 9 Auranen, Mari. Molecular genetics of autism spectrum disorders in the Finnish population. *Väitöskirja*. Helsingin Yliopisto, 2002.
- 10 Rutter, M. Diagnosis and definition of childhood autism. *Journal of Autism and childhood schizophrenia*, 1978. Vol. 8, s. 139-161.
- 11 Asperger, H. Die autistischen Psychopathen im Kindersalter. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 1944. Vol. 1, s. 76-136.
- 12 Wing, L. Asperger's syndrome: a clinical account. *Psychological Medicine*, 1981. Vol. 11, s. 115-129.

- 13 Ylisaukko-oja, Tero. Search for Susceptibility Genes in Autism Spectrum Disorders. Väitöskirja. Helsingin Yliopisto, 2005.
- 14 Lord, Catherine, Cook, Edwin H., Leventhal, Bennet L., Amaral, David G. Autism Spectrum Disorders. *Neuron*, 2000. Vol. 28, s. 355-363.
- 15 Järvelä, Irma. Lääketieteellisen molekyyli-genetiikan dosentti, Helsingin Yliopisto. Sähköpostikeskustelu 6.3.2008.
- 16 Newschaffer, Craig J., Croen, Lisa A., Daniels, Julie, Giarelli, Ellen, Grether, Judith K., Levy, Susan E., Mandell David S., Miller, Lisa A., Pinto-Martin, Jennifer, Reaven, Judy, Reynolds, Ann M., Rice, Catherine E., Schendel, Diana, Windham, Gayle C. The Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annual Review of Public Health*, 2007. Vol. 28, s. 235–258.
- 17 Muhle, Rebecca, Trentacoste, Stephanie V., Rapin, Isabelle. The Genetics of Autism. *Pediatrics*, 2004. Vol. 113, s. e472-e486.
- 18 Gillberg, Christopher. Asperger syndrome and high-functioning autism. *The British Journal of Psychiatry*, 1998. Vol. 172(3), s. 200-209.
- 19 Khouzam, Hani Raoul, El-Gabalawi, Fayez, Pirwani, Nabeel, Priest, Fiona. Asperger's Disorder: A Review of Its Diagnosis and Treatment. *Comprehensive Psychiatry*, 2004. Vol. 45(3), s. 184-191.
- 20 Auranen, Mari, Vanhala, Raija, Varilo, Teppo, Ayers, Kristin, Kempas, Elli, Ylisaukko-oja, Tero, Sinsheimer, Janet S., Peltonen, Leena, Järvelä, Irma. A Genomewide Screen for Autism-Spectrum Disorders: Evidence for a Major Susceptibility Locus on Chromosome 3q25-27. *American Journal of Human Genetics*, 2002. Vol. 71, s. 777-790.
- 21 Ollikainen, Vesa, Uimari, Pekka. Geeninkartoitusopas. CSC-Tieteellinen laskenta OY, 2001–2004.
- 22 Human Genome Project Information. (WWW-dokumentti.) <[www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/project/about.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/about.shtml)> Luettu 20.4.2008.
- 23 A haplotype map of the human genome. *Nature*, 2005. Vol. 437(7063), s. 1299–1320.
- 24 MAOL-taulukot. Keuruu: Otava, 2000.
- 25 Biostatistiikka: Riippumattomuustestestä. (WWW-dokumentti.) Kuopion yliopisto. <[www.uku.fi/~mauranen/bis/bis1toc\\_.html](http://www.uku.fi/~mauranen/bis/bis1toc_.html)> 1995. Luettu 15.10.2008.

- 26 Chi-Square Tests in R. (WWW-dokumentti.) <nit-ro.biosci.arizona.edu/r/IntroR/chiqs-R.pdf>. Luettu 16.10.2008
- 27 Klauck, Sabine M., Poutska, Fritz, Benner, Axel, Lesch, Klaus-Peter, Poutska, Annemarie. Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? Oxford University Press Human Molecular Genetics, 1997. Vol. 6, No. 13, s. 2233-2238.
- 28 Kim, S-J, Cox, N, Courchesne, R, Lord, C, Corsello, C, Akshoomoff, N, Guter, S, Leventhal, BL, Courchesne, E, Cook, EH jr. Transmission disequilibrium mapping at the serotonin transporter gene (SLC6A4) region in autistic disorder. Molecular Psychiatry, 2002. Vol. 7, s. 278-288.
- 29 McCauley, Jacob L., Olson, Lana M., Delahanty, Ryan, Amin, Taneem, Nurmi, Erika L., Organ, Edward L., Jacobs Michelle M., Folstein, Susan E., Haines, Jonathan L., Stucliffe, James S. A Linkage Disequilibrium Map of the 1-Mb 15q12 GABAA Receptor Subunit Cluster and Association to Autism. American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics), 2004. Vol. 131B, s. 51-59.
- 30 Ma, D. Q., Whitehead, P. L., Menold, M. M., Martin, E. R., Ashley-Koch, A. E., Mei, H., Ritchie, M. D., DeLong, G. R., Abramson, R. K., Wright, H. H., Cuccaro, M. L., Hussman, J. P., Gilbert, J. R., Pericak-Vance, M. A. Identification of Significant Association and Gene-Gene Interaction of GABA Receptor Subunit Genes in Autism. American Journal of Human Genetics, 2005. Vol. 77, s. 377-388.
- 31 Baron, Colin A., Tepper, Clifford G., Liu, Stephenie Y., Davis, Ryan R., Wang, Nicholas J., Schanen, N. Carolyn, Gregg, Jeffrey P. Genomic and functional profiling of duplicated chromosome 15 cell lines reveal regulatory alterations in UBE3A-associated ubiquitin-proteasome pathway processes. Human Molecular Genetics, 2006. Vol. 15, No. 6, s. 853-869.
- 32 Campbell, Daniel B., Stucliffe, James S., Ebert, Philip J., Militeri, Roberto, Bravaccio, Carmela, Trillo, Simona, Elia, Maurizio, Schneider Cindy, Melmed, Raun, Sacco, Roberto, Persico, Antonio M., Levitt, Pat. A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. PNAS, 2006. Vol. 103 no. 45, s. 16839.
- 33 Campbell, Daniel B., D'Oronzio, Rosanna, Garbett, Krassi, Ebert, Philip J., Mirnics, Karoly, Levitt, Pat, Perisco, Antonio M. Disruption of Cerebral Cortex MET Signaling in Autism Spectrum Disorder. Annals of Neurology, 2007. Vol. 62, s. 243-250.
- 34 Petek, Erwin, Windpassinger, Christian, Vincent, John B., Cheung, Joshep, Boright, Andrew P., Scherer, Stephen W., Kroisel, Peter M., Wagner, Klaus. Disruption of a Novel Gene (IMMP2L) by a Breakpoint in 7q31 Associated with



- Tourette Syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 2001. Vol 68, s. 848–858.
- 35 Jamain, Stephane, Quach, Helene, Betancur, Catalina, Råstam, Maria, Colineaux, Catherine, Gillberg, Carina I., Söderström, Henrik, Giros, Bruno, Leboyer, Marion, Gillberg, Christopher, Bourgeron, Thomas. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature genetics*, 2003. Vol. 34, s. 27-29.
- 36 Samaco, Rodney C., Hogart, Amber, LaSalle, Janine M. Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Human Molecular Genetics*, 2005. Vol. 14(4), s. 483–492.
- 37 Kilpinen, H, Ylisaukko-oja, T, Hennah, W, Palo OM, Varilo, T, Vanhala, R, Nieminen-von Wendt, T, von Wendt, L, Paunio, T, Peltonen, L. Association of DISC1 with autism and Asperger syndrome. *Molecular Psychiatry*, 2008. Vol. 13, s. 187–196.
- 38 Katoh, M., Katoh, M. Identification and characterization of JMJD2 family genes in silico. *International Journal of Oncology*, 2004. Vol. 24, s. 1623-1628.
- 39 Katoh, Y., Katoh, M. Comparative integromics on JMJD2A, JMJD2B and JMJD2C: preferential expression of JMJD2C in undifferentiated ES cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 2007. Vol. 20(2), s. 269-73.
- 40 Yang, Z.-Q., Imoto, I., Fukuda, Y., Pimkhaokham, A., Shimada, Y., Imamura, M., Sugano, S., Nakamura, Y., Inazawa, J. Identification of a novel gene, GASC1, within an amplicon at 9p23-24 frequently detected in esophageal cancer cell lines. *Cancer Research*, 2000. Vol. 60, s. 4735-4739.
- 41 Cloos, P. A. C., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K. H., Helin, K. The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature*, 2006. Vol. 442, s. 307-311.
- 42 The Autism Genome Project Consortium. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature Genetics*, 2007. Vol. 39, No. 3.
- 43 Deng, Xiangdong, Shibata, Hiroki, Takeuchi, Naoko, Rachi, Shinako, Sakai, Mayumi, Ninomiya, Hideaki, Iwata, Nakao, Ozaki, Norio, Fukumaki, Yasuyuki. Association Study of Polymorphisms in the Glutamate Transporter Genes SLC1A1, SLC1A3, and SLC1A6 with Schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*, 2007. Vol. 144B, s. 271–278.
- 44 Kanai, Yoshikatsu, Stelzner, Matthias, Nußberger, Stephan, Khawaja, Sadiqa, Herbert, Steven C., Smith, Craig P., Hedigerli, Matthias A. The Neuronal and

Epithelial Human High Affinity Glutamate Transporter, Insights into Structure and Mechanism of Transport. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., 1994. Vol. 269, No. 32, s. 20599-20606.

- 45 Lin, C. I., Orlov, I., Ruggiero, A. M., Dykes-Hoberg, M., Lee, A., Jackson M., Rothstein, J. D. Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18. *Nature*, 2001. Vol. 410, s. 84-88.
- 46 Smith, C. P., Weremowicz, S., Kanai, Y., Stelzner, M., Morton, C. C., Hediger, M. A. Assignment of the gene coding for the human high-affinity glutamate transporter EAAC1 to 9p24: potential role in dicarboxylic aminoaciduria and neurodegenerative disorders. *Genomics*, 1994. Vol. 20, s. 335-336.
- 47 Stewart, Evelyn S., Fagerness, Jesen A., Platko, Jill, Smoller, Jordan W., Scharf, Jeremiah M., Illmann, Cornelia, Jenike, Eric, Chabane, Nadia, Leboyer, Marion, Delorme, Richard, Jenike, Michael A., Pauls, David L. Association of the SLC1A1 Glutamate Transporter Gene and Obsessive-Compulsive Disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*, 2007. Vol. 144B, s. 1027-1033.