

TOMM40-APOE-geenialueen vaikutus Alzheimerin tautiin

Veli-Matti Isoviita

LK

Molekyylineurologian tutkimusohjelma

Helsinki 28.2.2014

Tutkielma

veli-matti.isoviita@fimnet.fi

Ohjaaja: Pentti Tienari

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO –HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Molekyylineurologian tutkimusohjelma	
Tekijä – Författare – Author Veli-Matti Isoviita			
Työn nimi – Arbetets titel – Title TOMM40-APOE-geenialueen vaikutus Alzheimerin tautiin			
Oppiaine – Läroämne – Subject Lääketiede			
Työn laji – Arbetets art – Level Tutkielma		Aika – Datum – Month and year 28.2.2014	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 21+1
Tiivistelmä Referat – Abstract <p>Alzheimerin tauti (AT) on yleisin dementian syy ja perintötekijöiden vaikutus tautiriskiin on suuri. APOE-geenialue on vahvimmin AT:iin liittyvä geenialue. APOE:sta on kolme yleistä alleelia joiden koodamassa proteiinissa on 1-2 aminohapon eroja: E2, E3 ja E4, joista APOE4 on voimakas AT-riskitekijä. Suomalaistutkimuksissa on osoitettu, että eräs yleinen APOE3-haplotyyppi lisää ja toinen APOE3-haplotyyppi pienentää AT-riskiä. Etiologinen variantti APOE3-haplotyyppissä on tuntematon. Tässä tutkimuksessa selvitettiin kolmen pistepolymorfismin avulla APOE:n viereisen TOMM40-geenialueen vaikutusta tautiriskiin, erityisesti APOE3-haplotyyppin osana.</p> <p>Aikaisemmin kerätystä vantaalaisesta ikäkohortista monistettiin tutkittavat alueet polymeraasiketjureaktiolla (PCR), käsiteltiin PCR-tuotteet restriktioenstymmeillä ja tutkittiin restriktiotuotteet geielektroforeesilla. Saatuja tuloksia vertailtiin aikaisemmin aineistosta kerättyyn kliiniseen, neuropatologiseen ja geneettiseen tutkimustietoon.</p> <p>Tulokset osoittivat TOMM40-geenialueen olevan kytkentäepätasapainossa APOE-promoottorialueeseen, mutta ei APOE-proteiinia määrittävään eksoni-4:ään. TOMM40-polymorfismien avulla voitiin erottaa myös APOE-tyypistä riippumaton heikko AT-riskivaikutus. TOMM40- ja APOE-polymorfismien analyysi viittasi siihen, että primaari geneettinen riskitekijä APOE3-haplotyypeissä on APOE-geenin ei-koodavalla alueella, mahdollisesti promoottori/enhancer-alueella. Jatkotutkimuksissa selvitetään, vaikuttaako tämä riskitekijä APOE:n, TOMM40:n tai muiden lähigeenien ekspressioon.</p> <p>(150 sanaa)</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Alzheimer's disease, APOE, TOMM40, Genetics			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

1 Johdanto.....	1
1.1 Alzheimerin tauti.....	1
1.2 APOE.....	1
1.3 APOE3-haplotyypit.....	2
1.4 TOMM40.....	2
1.5 Energia-aineenvaihdunta ja Alzheimerin tauti.....	3
1.6 Tutkimuksen suunnittelu.....	4
2 Aineisto.....	4
2.1 Kliiniset tutkimukset.....	5
2.2 Neuropatologiset tutkimukset.....	5
2.3 Geneettiset tutkimukset.....	6
3 Menetelmät.....	6
3.1 Polymeraasiketjureaktio (PCR).....	6
3.2 Restriktioentsyymein käsittely.....	8
3.3 Geelielektroforeesi.....	8
4 Tulokset.....	10
4.1 SNP:ien vaikutus neuropatologisiin löydöksiin.....	10
4.2 SNP:ien vaikutus kliinisiin löydöksiin.....	13
4.3 Aleelifrekvenssit.....	14
4.4 Kytkeäpätasapaino TOMM40- ja APOE-geenialueella.....	15
5 Pohdinta.....	16
5.1 TOMM40:n polymorfismien haplotyypivaikutus heikompi kuin APOE:n promoottori- ja enhancer-alueen polymorfismeilla.....	16
5.2 Genetiikan tutkimuksen monet suunnat.....	18
5.3 Teknologia ja tietotekniikka genetiikassa.....	18
5.4 Milloin ja miten Alzheimerin taudin salat ratkeavat?.....	19
6 Lähteet.....	20
7 Liite 1. SNP:ien ja neuropatologisten sekä kliinisten löydösten välinen analyysi.....	22

1 Johdanto

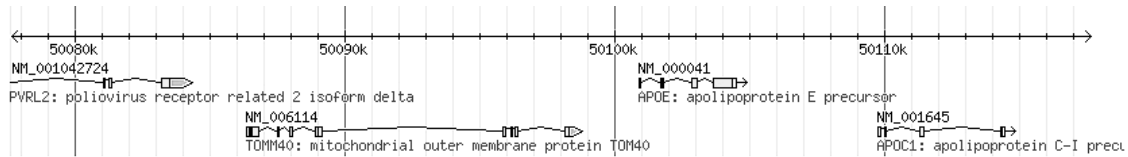
1.1 Alzheimerin tauti

Alzheimerin tauti on hermostorappeumasairaus, jonka tarkka patogeneettinen mekanismi ei ole tiedossa. Diagnostiikassa käytetään hyväksi beeta-amyloidi- ja tau-patologiaa. Hermosoluissa syntyvä beeta-amyloidipeptidi muodostaa amyloidiplakkeja ja hyperfosforyloitunut tau-proteiini neurofibrillivyyhtejä, jotka kertyvät aivokuorelle. Alzheimerin taudissa hermosolujen tuhoutuminen alkaa yleensä hippokampuksen ja entorhinaalisen korteksin alueella, mikä ilmenee kliinisesti episodisen muistin häiriönä. Alzheimerin tauti on yleisin dementiaa aiheuttava sairaus. Syytä taudin puhkeamiselle ei tiedetä eikä siihen ole parantavaa hoitoa. (1) Maailmanlaajuisesti tautia ennustetaan sairastavan vuonna 2030 66 miljoonaa ihmistä ja luku voi nousta 2050-luvulle tultaessa 115 miljoonaan (2). Suomessa dementiaa sairastaa seitsemän prosenttia yli 65-vuotiaista ja luvun oletetaan kasvavan tulevaisuudessa (1). On arvioitu, että perintötekijöiden osuus tautiriskistä on 58-76 % (3).

Alzheimerin taudin genetiikan tutkimus on jatkunut runsaat 20 vuotta. Ensimmäisiä voimakkaasti tautiin assosioituvia geenejä tunnistettiin perinnöllisistä taudin muodoista. Amyloidiprekursoriproteiinia koodaava geeni APP sekä preseniliini 1 ja 2 löydettiin 1990-luvulla ja näiden geenien avulla myös taudin patogeneesiä on pystytty hahmottamaan paremmin (4). Sporadisen Alzheimerin taudin selittäjiksi niistä ei kuitenkaan ole ollut.

1.2 APOE

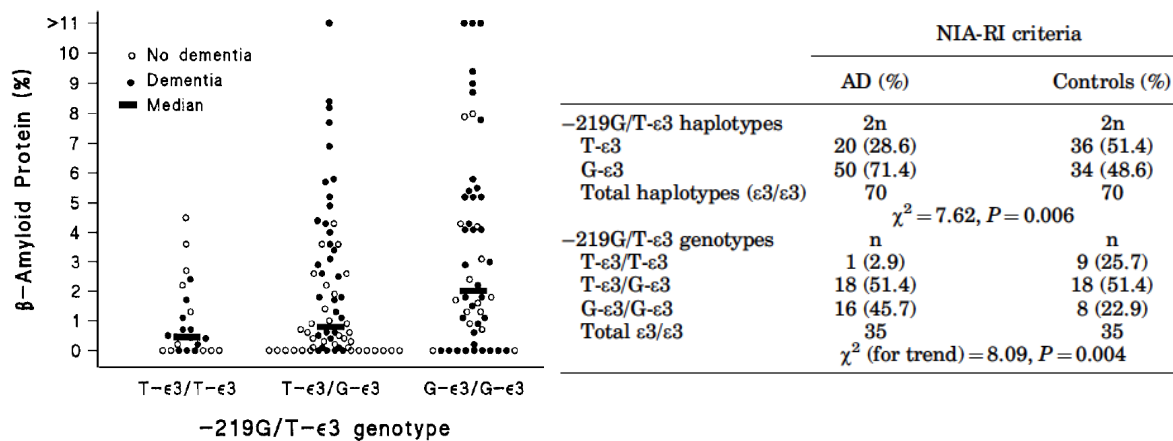
Eräs voimakkaimmin sporadiseen Alzheimerin tautiin liittyvistä geeneistä on kromosomissa 19 sijaitseva apolipoproteiinia koodaava APOE (5), joka esiintyy alleeleina $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ja $\epsilon 4$. Riskialleeli $\epsilon 4$ nostaa heterotsygoottina tautiriskin 3-kertaiseksi ja homotsygoottina jopa 15-kertaiseksi verrattuna yleisimpään genotyyppiin $\epsilon 3/\epsilon 3$ (6). APOE-geenialueen on raportoitu olevan muuta ympäristöä voimakkaammassa kytkentäepätasapainossa lähiympäristön geenien TOMM40, APOC1 ja PVRL2 kanssa (7). Kuvassa 1 on esitetty kyseinen geenialue. TOMM40:n geenialue sijaitsee APOE:tä ennen geneettisessä koodissa, jolloin se saattaa myös toimia APOE:n luentaa säätelevänä tekijänä.



Kuva 1. HapMap Genome Browserin kuva TOMM40- ja APOE-geeneistä ja niiden lähialueesta. Mitta-asteikkona paikka kromosomissa 19, geenissä aaltoviiva on introni ja laatikko eksoni.

1.3 APOE3-haplotyyppit

APOE3:n suhteen homotsygotit ovat normaalisti käsitetty riskineutraaleiksi Alzheimerin taudin suhteen. Käyttämällä kahta APOE-alueen polymorfismia myös APOE3-populaatiosta voidaan erottaa Alzheimerin riskipopulaatio. On osoitettu, että APOE-promoottorialueella kohdassa -219 sijaitseva polymorfismi rs405509 assosioituu beeta-amyloidin kertymään sekä neuropatologisesti varmistetun Alzheimerin taudin esiintymiseen (kuva 2) (8). Tämän polymorfismin G-geotyypin suhteen homotsygooteilla on myös osoitettu olevan suurempi riski kognitiiviseen heikentymään kohortissa, joka sisältää 75-90 vuotiaita, kotona asuvia ja alunperin kognitiivisesti terveitä tutkittavia (9). Polymorfismilla on osoitettu myös moduloivan yhdessä tupakoinnin kanssa aortan valtimokovettumataudin ilmenemistä (10).



Kuva 2. Beeta-amyloidin kertymä (vas.) sekä NIA-RI-kriteerein todettu Alzheimerin taudin esiintyminen APOE3-populaatiossa rs405509-polymorfismin ("219") genotyypin suhteen (8).

1.4 TOMM40

TOMM40-geenin intronista löytyneen T-emäksen toistojakson rs10524523 on raportoitu vaikuttavan Alzheimerin taudin puhkeamisikään eurooppalaista sukujuurta olevassa yhdysvalataiskohortissa (11). Tämä toistojakso esiintyy eri pituisina versioina, jotka voidaan jakaa kolmeen pääkategoriaan: lyhyisiin, pitkiin ja erittäin pitkiin jaksoihin.

Pitkistä toistojaksoista, joihin kuuluvat 19-27 emästä käsittävät jaksot, esiintyvät lähes aina APOE:n $\epsilon 4$ -alleelin kanssa (12). Tämän TOMM40-alueen toistojakson ja eräiden pistepolymorfismien perusteella pystytään jakamaan APOE3-genotyypin kantajat riski ja ei-riskihaplotyyppisiin, kuten myös aiemmissa suomalaistutkimuksissa on tehty (8, 11). Tämä yhteys nostaa esiin TOMM40:n mahdollisena Alzheimerin taudin riskigeeninä ja puoltaa tämän alueen tarkempaa tutkimusta osana taudin patogeneesin selvittelyä.

Geenialueella voi olla useita tapoja vaikuttaa solujen toimintaan. Se voi koodata proteiinia, vaikuttaa viereisten geenien ilmentymiseen toimimalla näiden luentaa säätelevänä promoottorialueena sekä myös koodata RNA:ta, joka itsessään sitoutuu joko proteiineihin tai toisiin nukleiinihappoihin. TOMM40 sekä sijaitsee lähellä APOE:tä että myös koodaa mitokondrioiden ulkokalvon siirtäjäproteiinin osaa, jonka läpi proteiinit kulkevat sytoplasmasta mitokondrioon (13). Mahdolliset toiminnalliset muutokset tässä proteiinissa voivat myös vaikuttaa mitokondrioiden toimintaan ja sitä kautta solujen aineenvaihduntaan. On myös osoitettu, että Alzheimerin taudissa syntyvä amyloidiprekursoriproteiini (APP) saattaa kertyä mitokondrioihin ja aiheuttaa näiden toiminnan häiriötä (14).

1.5 Energia-aineenvaihdunta ja Alzheimerin tauti

Aivot käsittävät noin kaksi prosenttia koko kehon massasta, mutta kuluttavat viidenneksen kehon käyttämästä hapesta ja glukoosista (15). Katsauksen mukaan useat tutkimukset ovat yhdistäneet myös APOE:n tautiriskin mitokondrioiden ja aivojen energia-aineenvaihduntaan (16). Alzheimerin tautia sairastavilla potilailla on jo 1980-luvulla mitattu aivojen PET-kuvantamisessa alentuneita glukoosiaineenvaihdunnan tasoja (17). Erityisesti posteriorisella cingulaarisella korteksilla on havaittu jo aikaisessa vaiheessa tautia melko suuria metabolisia muutoksia. (18). ApoE $\epsilon 4$:n koodaaman ApoE4-proteiinin on myös osoitettu aiheuttavan suoraan mitokondrioiden toiminnan alenemista (19). On myös pohdittu, josko TOMM40:n koodaamalla proteiinilla Tom40 on eri tavoin toimivia isoformeja, jotka vaikuttavat suoraan mitokondrioiden toimintaan ja siten keskushermoston toimintaan (16).

On olemassa siis erilaisia viitteitä sekä APOE- että TOMM40-geenialueiden assosiaatiosta energia-aineenvaihdunnan muutoksiin sekä myös viitteitä näiden geenien koodamien proteiinien vaikutuksista energiametaboliaan ja Alzheimerin taudin riskiin. Mahdollisia selitysmalleja geenien ja taudin väliselle kausaliteetille on monia eivätkä ne välttämättä ole toisiaan poissulkevia – toisaalta mikään malli ei täysin pysty taudin patogeneesiä selittämään.

1.6 Tutkimuksen suunnittelu

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää suomalaisessa ikäryhmäkohortissa, onko TOMM40-geenialueella yhteyttä APOE-alueeseen tai itsenäistä ennustearvoa Alzheimerin taudin löydösten ja riskin suhteen. Erityisen kiinnostava kysymys oli, voisiko TOMM40-variaatio selittää kahden APOE3-haplotyyppin vastakkaiset vaikutukset Alzheimerin taudin riskiin. Tutkimusryhmämme analysoi aikanaan APOE-promoottorivaariaatioiden transkriptionaalista aktiivisuutta maksa- ja astrosyyttisolulinjoissa, mutta Alzheimerin taudin riskiä selittäviä vaikutuksia ei tullut esiin promoottorialueen polymorfismeilla -491*A/T, -467*C/T, -291*G/T tai enhancer-alueen polymorfismilla +113*G/C (Huttunen, Tienari ym, julkaisematon). Tutkittavat TOMM40 SNP:t valittiin Rosesin vuoden 2010 tutkimusten perusteella (11). Tutkimusmenetelmät valittiin sekä tutkimuksen kohteelle että tutkijan taidoille soveltuviksi. Jo aiemmin kerätty tutkimusaineisto ja tehdyt kliiniset, geneettiset ja neuropatologiset kokeet mahdollistivat laajan genetiikan tutkimuksen ilman liiallista työkuormaa.

2 Aineisto

Tutkielman kohteena olevaa Vantaa-aineistoa muodostamaan otettiin kaikki Vantaalla asuvat henkilöt, joiden ikä 1.4.1991 oli 85 vuotta tai enemmän (n=601). Aineisto ei siis sisällä valintaharhaa joka voisi tulla esimerkiksi vain sairaala- tai hoitolaitospotilaita tutkittaessa. Tarkempi kuvaus sekä aineistosta että sen analysointimenetelmistä löytyy T. Polvikosken artikkelista *Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein* vuodelta 1995. (5) Tätä tutkimusta tehtäessä kaikkiaan 306 tutkittavasta (51%) oli käytettävissä neuropatologinen aineisto ja 518 tutkittavan DNA-näytteet.

2.1 Kliiniset tutkimukset

Kliininen tutkimus suoritettiin kaikkiaan 553 hengelle (92%). 48 tutkittavaa jäi ilman kliinistä tutkimusta, pääosin heidän kuoltuaan ennen kuin kliininen tutkimus ehdittiin suorittaa. Järjestelmällisen kliinisen tutkimuksen ja haastattelun tekivät neurologi sekä hoitaja. Dementian kartoittamisessa käytettiin *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* -teoksen uudistetun 3. painoksen kriteeristöä, Alzheimerin taudin diagnostiset kriteerit taas olivat *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* (NINDS) sekä *The Alzheimer's Disease and Related Disorders Associationin* määritelmien mukaisia. Vaskulaarisen dementian arvioinnissa käytettiin kriteeristöä, jonka ovat luoneet NINDS sekä *Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences*. (5)

2.2 Neuropatologiset tutkimukset

Neuropatologiset tutkimukset tehtiin The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease -protokollan (CERAD-protokoll) mukaan. Fosfaattipuskuroidussa 4-prosenttisessa formaldehydissä vähintään 2 viikkoa säilytetystä aivoista otettiin näytteitä keskimmaisesta otsalohkopoimusta, ylemmästä ohimolohkopoimusta, keskimmaisesta ohimolohkopoimusta sekä alemmasta päälakilohkon poimusta. Näytteiden otossa pyrittiin tarkkuuteen ja siihen, että leiketaso kulkisi kohtisuoraan poimun pintaan ja että koko aivojen kuorikerros tulisi mukaan näytteeseen. (5)

Formaldehydillä kiinnitetyistä parafiinin valetuista kudoksenäytteistä 8 mikrometrin leikkeitä beeta-amyloidin määrittämiseksi ja 10 mikrometrin leikkeitä hermosäievytyhtien määrittämiseksi. Beeta-amyloidin määrä neuropatologisista näytteistä määriteltiin metenamiini-hopeavärjäyksellä, hermosäiekimppujen tutkimus toteutettiin Bodian-värjäyksellä. Leikkeiden perusteella tutkittaville määriteltiin CERAD- ja Braak-luokitukset. (5)

CERAD-luokitus on neliportainen asteikko, joka lajittelee neuropatologian perusteella tutkittavat Alzheimerin tautia sairastamattomiksi (CERAD 0), epävarmoin tapauksiin (CERAD A), Alzheimerin taudille viitteellisiin (CERAD B) sekä varmoin tautitapauksiin (CERAD C) (20). Braak-luokitusta käytetään myös Parkinsonin taudissa ja se on kuusiportainen. Lievissä tapauksissa eli luokissa I ja II hermosäievytyhtien

esiintyminen on rajoittunut vain transenhornaaliselle kuorikerrokselle. Luokissa III ja IV myös limbinen järjestelmä, kuten hippokampus, on affisioitunut ja vaikeimmissa tapauksissa eli luokissa V ja VI on havaittavissa myös isoaivokuoren neokorteksilla muutoksia (21).

2.3 Geneettiset tutkimukset

DNA-analyysiä varten tutkittavista henkilöistä pakastettiin kokoverinäytteet, joista DNA eristettiin (5). Eristetystä DNA:sta on myös 2004 tehty koko genomin laajuinen Polymeraasiketjureaktio (PCR) -monistus, jolla on saatu lisättyä tutkimuksissa käytettävissä olevan DNA:n määrää. Myös alkuperäistä vahvistamatonta DNA:ta on saatavissa. Noin 120 hengestä on myös syväjäädetyt aivojen otsalohkonäytteitä, joista myös on eristetty DNA:ta ja RNA:ta. APOE-geenin alleelit määriteltiin aineistosta PCR-reaktiolla ja tuotteiden sekvensoinneilla, joista määriteltiin kaksi SNP:tä tutkittavan geenin kodoneissa 112 ja 158. (5).

3 Menetelmät

Kolmen kohteena olleen polymorfismin analyysi tehtiin monistamalla tutkimuksen kohteena olleet alueet polymeerasiketjureaktiolla (PCR), pilkkomalla saadut tuotteet restriktioentsyymein ja ajamalla pilkotut tuotteet geelielektroforeesissa, jolloin monistettujen DNA-fragmenttien pituus saatiin selvitettyä.

3.1 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

PCR on laajasti genetiikan tutkimuksessa käytetty tutkimusmenetelmä, jossa kuumien lähteiden bakteereista eristettyä DNA-polymeraasia hyväksi käyttäen tutkittavaa geenialuetta voidaan tehokkaasti monistaa. Tutkittavan alueen ja sitä ympäröivän alueen sekvenssi määritellään esimerkiksi internetissä saatavilla olevista tietokannoista kuten National Center for Biotechnology Informationin GenBankista, jonka jälkeen tutkimukseen suunnitellaan spesifit alukkeet. Nämä ovat pieniä yksijuosteisia DNA-pätkiä, jotka ovat monistettavan jakson alku- ja loppupäälle komplementaarisia ja sitoutuessaan muodostavat polymeerasientsyymille toiminnan mahdollistavan lähtökohdan. Alukkeiden suunnittelussa otetaan huomioon myös niiden denaturoitumislämpötilat ja mahdolliset muut sitoutumiskohdat. Alukkeista pyritään tekemään mahdollisimman identtisesti eri ympäristöissä toimivia ja spesifejä monistettavalle kohdalle.

PCR-liuosta lämmitetään halutun ohjelman mukaan syklisesti niin, että DNA-juosteet irtoavat toisistaan, alukkeet kiinnittyvät, polymeerasi luo uuden osan DNA:ta alukkeen perään ja jälleen syntyneet DNA-juosteet irroitetaan toisistaan. Koko PCR-ohjelman pituus ja eri vaiheiden kesto sekä käytettävät lämpötilat valitaan haluttujen tuotteiden pituuksien, käytettävien alukkeiden kiinnittymislämpötilojen sekä entsyymin ominaisuuksien perusteella. PCR-ohjelma on esitetty taulukossa 1.

PCR-alukkeet valittiin siten, että monistuva osa geenistä on tarpeeksi pitkä ja sisältää tutkittavan SNP:n tarpeeksi kaukana tuotteen reunasta. Näin sekä pilkottu että pilkkoutumaton tuote pystytään havaitsemaan samassa geelielektroforeesissa ja niiden pituus pystytään määrittelemään riittävällä tarkkuudella. Käytetyt alukkeet on kuvattu taulukossa 2.

PCR-reaktiossa käytettiin DynaZyme®-entsyymiä seuraavalla reaktioseoksella: 12,5 µl Milli-Q-vettä (vettä, joka on puhdistettu vastaamaan PCR-reaktion vaatimuksi), 6 µl 5-molaarista betaiini, 3 µl DynaZyme-entsyymisarjan omaa 10X-puskuria, 3 µl 2-mikromolaarista deoksiribonukleiiniliuosta (dNTP-liuos, sisältää saman konsentraation adeniini-, guaniini-, tymiini- ja sytosiinitrifosfaatti), 1,5 µl kumpaakin aluketta (F ja R) 10-mikromolaarisena, polymeerasientsyymiä 0,5 µl sekä 2 µl tutkittavaa DNA:ta, jonka pitoisuus on noin 20 nanogrammaa per litra. Alukeparit olivat spesifejä niin, että jokainen kolmesta parista monisti yhden tutkittavan polymorfismin sisältävää geenialuetta. Liuokset pipetoitiin 0,2 millilitran 96-kuoppalevyille, joka suljettiin liimattavalla kannella tiiviisti ja asetettiin PCR-koneeseen. Käytetty PCR-ohjelma on esitetty taulukossa 1.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika	Syklien määrä
Alkudenaturointi	96	5 min	1
Alukkeiden kiinnittyminen	96	30 s	9
Polymerisaatio	68	1 min	
Denaturaatio	94	30 s	
Alukkeiden kiinnittyminen	60	30 s	35
Polymerisaatio	68	1 min	
Loppupolymerisaatio	68	10 min	1
Jäähdytys	4	∞	1

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytetty PCR-ohjelma.

3.2 Restriktioentsyymein käsittely

Restriktioentsyymit ovat bakteereissa luontaisesti esiintyviä proteiineja, joiden tarkoitus on pilkkoa eliöön päässyttä vierasta DNA:ta ja näin suojella sitä ulkopuolisilta uhilta. Entsyymeitä on suuri määrä ja ne jokainen tunnistavat tietyn DNA-sekvenssin, jonka kohdalta entsyymi pilkkoo DNA:ta. Tunnetuista entsyymeistä on koottu tietokantoja, joiden perusteella tutkimuskäyttöön valmistettuja entsyymivalmisteita voi vertailla ja tilata omiin tutkimuksiin.

Restriktioentsyymein digestio toteutettiin seuraavalla protokollalla: 10 µl PCR-tuotetta, 8 µl vettä, 2 µl NEB 4 -restriktioentsyymipuskuria sekä 0,75 µl tarvittavaa entsyymiä. Eri polymorfismeille käytetyt entsyymit on esitelty taulukossa 2. Entsyymit valittiin siten, että tutkittava polymorfismi joko hävittää tai muodostaa entsyymille pilkkomiskohdan DNA:han riippuen polymorfismin genotyypistä. Liuosta inkuboitii 37 celsiusasteessa 3-4 tuntia, jonka aikana entsyymit pilkkoivat tai jättivät pilkkomatta PCR-tuotteet polymorfismin kohdalta, riippuen tutkittavien näytteiden genotyypistä. Myös kaikki digestioprotokollat olivat itse entsyymiä lukuunottamatta identtisiä, mikä nopeutti ja helpotti analyysin tekemistä.

SNP	rs1160985	rs8106922	rs760136
Genotyypit	C, T	A, G	A, G
F-alue	GTACCCTGCTAGGCTCGAAAG	AGCATCTTCGCACCTGCTTTG	CGACCAGATGAGGTCCTTC
R-alue	GCACAGCCTGGGTTCAATC	TGTGATTGTGCCACTGCACTC	TGGAGGTAGTGGGCTACGAG
PCR-tuotteen emästä	pituus, 280 bp	297 bp	248 bp
Restriktioentsyymi	AccI	NciI	HpyAV
Pilkotun tuotteen osien pituudet, emästä (genotyyppi)	127 bp, 153 bp (T)	104 bp, 193 bp (G)	25 bp, 223 bp() 25 bp, 61 bp, 162 bp (G)

Taulukko 2. Käytetyt PCR-alueet, restriktioentsyymit sekä tuotteiden koot.

3.3 Geelielektroforeesi

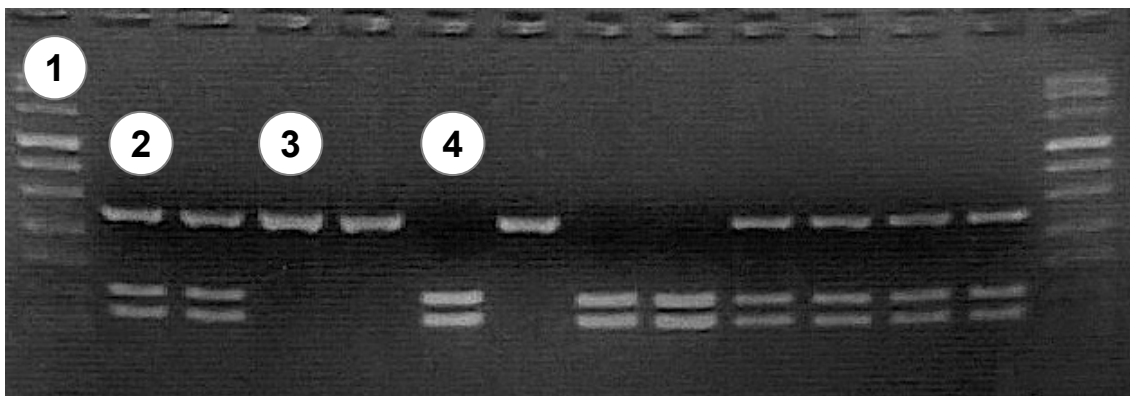
Geelielektroforeesissa tutkittavaa DNA:ta liikutetaan agarosista valmistetun geelin sisällä sähkövirran avulla. Johtuen DNA-molekyylin sokeriosien aiheuttamasta negatiivisesta nettovarauksesta molekyyli pyrkii sähkökenttään asetettuna kulkemaan kohti laitteiston positiivista napaa, anodia. Mitä pidempi DNA-fragmentti on, sen

hitaampaa se liikkuu geelissä. Lisäksi samalla geelissä ajetaan tunnetun pituisia kontrollifragmentteja, joihin vertailemalla tutkimukse kohteena olevan tuotteen pituus saadaan määritettyä tarpeeksi suurella tarkkuudella.

Elektroforeesia varten valettiin geelilaattoja, joiden agarosipitoisuus oli noin 3 massaprosenttia. Valmistukseen käytettiin 3 grammaa agarosia 100 millilitraa TAE-puskuria kohden. Mukaan laitettiin värjäysaineeksi 4 mikrolitraa etidiumbromidia. Valuvaiheessa geeleihin astettiin kammot, jotka poistettiin hyytyneestä geelistä ja näin saatiin luotua geeliin kaivot, joihin näytteet pipetointiin.

10 mikrolitraan ajettavaa näytettä sekoitettiin ensin 5 mikrolitraa latauspuskuria ja tätä seosta pipetoitiin 10 mikrolitraa geelikaivoon. Lisäksi muutamiin kaivoihin laitettiin näytteen sijasta 10 mikrolitraa tuotteiden pituuden määrittämiseen käytettävää DNA-seosta (DNA Molecular Weight Marker VIII, Roche). Se sisälsi 18 eri pituista DNA-juostetta pituudeltaan 1114-19 emäsparia. Koska tämän DNA-seoksen juosteiden pituudet tunnetaan, voitiin sen perusteella määrittää varsinaisten näytteiden pituus ja varmistaa, että sekä digestio että PCR-reaktio toimivat. Geelijaio suoritettiin 150 voltilla noin 30 minuutin ajan, minkä jälkeen geeli kuvattiin ultraviolettivalolla valaistuna. Geelin etidiumbromidi sitoutuu ajettavaan DNA-juosteisiin geelijaion aikana ja hohtaa UV-valolla valaistuna näkyvää valoa, jolloin geelin sisällä olevat DNA-juosteet voitiin kuvata ja kuvista määrittää näytteiden pilkkoutuminen ja siten genotyyppi tutkittavan SNP:n osalta.

Saaduista geelikuvista tulkittiin näytteiden genotyyppi ja se kirjattiin tietokantaan. Kuvista saadut tulokset jakautuivat 3 eri ryhmään. Mikäli tutkittava näyte oli homotsygootti niin, että restriktioentsyymin tunnistamaa kohtaa ei ole, oli näyte geelijaossa saman kokoinen kuin PCR-tuote eli mitään pilkkoutumista ei tapahtunut. Mikäli näyte oli heterotsygootti niin, että syntyi sitoutumiskohta restriktioentsyymille, näkyi geelillä 2 eri raitaa, joiden yhteispituus oli sama kuin PCR-tuotteen. Mikäli näyte taas oli heterotsygootti, näkyi geelijaossa molemmat kahdesta edellämäisestä vaihtoehdosta. Kuvassa 3 on esitetty esimerkki elektroforeesin tuloksesta.



Kuva 3. Esimerkki geielektroforeesin tuloksesta: kontrolli-DNA (1), heterotsygoottinen näyte (2), leikkautumaton homotsygootti (3) sekä leikkautunut homotsygootti (4).

4 Tulokset

Tutkimuksessa oli käytettävissä 518 potilaan DNA-näytteet. Näistä alleelien määrittäminen onnistui 98,6 – 99,8% tapauksista. Seuraavissa kappaleissa genotyypityksen tuloksia analysoidaan yhdessä muun Vantaa-aineistosta kerätyn materiaalin kanssa sekä myös vertaillaan muiden tutkimusten vastaaviin tuloksiin. Tulosten analysointi tehtiin SPSS®-ohjelmistolla (versio 21.0, IBM Corp. 2012) sekä OpenOffice Calc -taulukkolaskentaohjelmistolla (versio 3.4.1, Apache Software Foundation, 2012). Tilastollisissa analyysissä käytettiin Pearsonin χ^2 -testiä, Fisherin tarkkaa testiä, Kruskal-Wallis parametrin testiä, Kolmogorov-Smirnovin testiä, Mann-Whitneyn U-testiä sekä riskisuhdelaskentaa. Tutkittavilla polymorfismeilla havaittiin tilastollisesti merkittävä assosiaatio neuropatologisten löydösten kanssa, mutta tämä yhteys ei ollut yhtä voimakas kuin aikaisemmin tutkituilla APOE-alueen polymorfismeilla.

4.1 SNP:ien vaikutus neuropatologisiin löydöksiin

Tutkimuksessa havaittiin, että TOMM40-geenialueen polymorfismeilla on haplotyyppivakutusta APOE3-populaatiossa, mutta tämä vaikutus on heikompi kuin APOE-geenialueen jo aikaisemmin tutkituilla polymorfismeilla. Tutkituista alleeleista ainoastaan rs8106922 osoitti tilastollista merkittävyyttä neuropatologisia löydöksiä ennustettaessa. Aikaisemmin aineistosta määritellyt polymorfismit puoleesta osoittivat vahvempaa ennustearvoa, kuten myös aikaisemmin samasta aineistosta tehdyistä tutkimuksista nähdään (8). Tuloksista näkyy, että APOE-alueen rs440448 vaikuttaa

tilastollisesti merkitsevimmän aivokuoren amyloidi-pitoisuuteen ja Braak+Cerad-luokkaan, erityisesti voimakkaasti tämä tulee esiin APOE3/E3 alapopulaatiossa.

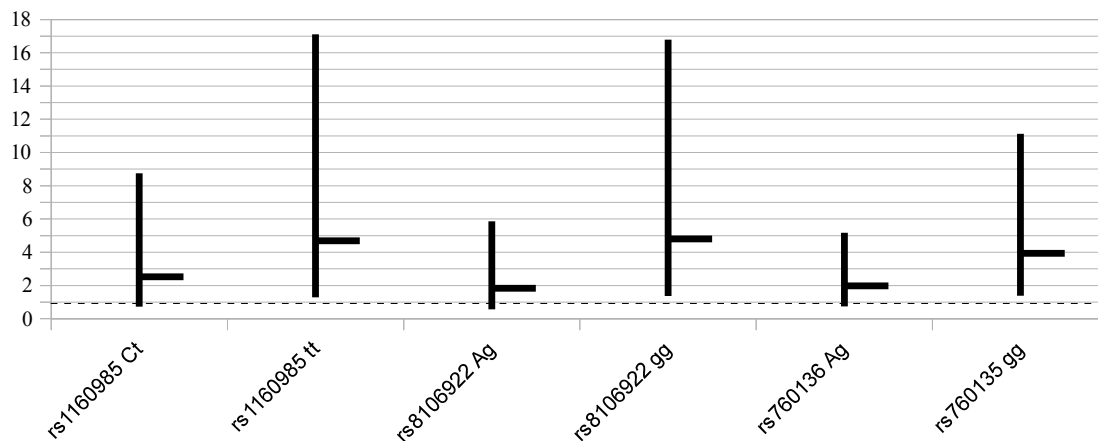
Tutkittavien SNP:ien vaikutusta neuropatologisiin löydöksiin tutkittiin jakamalla koko aineisto APOE-alleelien mukaisiin kategorioihin. Näin mahdollinen APOE-proteiinin rakennevaihtelun (E2, E3, tai E4) vaikutus saatiin vähäisemmäksi ja käytännössä nollattua ϵ_3/ϵ_3 homotsygooteilla. Kategoriat olivat suojaavan alleelin ϵ_2 kantajat, neutraalille alleelille ϵ_3 homotsygotit sekä riskialleelia ϵ_4 kantavat. Ryhmä, jonka genotyyppi APOE-alleelien suhteen oli ϵ_2/ϵ_4 jätettiin vertailuiden ulkopuolelle johtuen sen pienestä koosta ($n=4$) ja haasteista tulkita tilannetta, jossa on sekä suojaava että riskialleeli. Kategorioiden sisällä vertailtiin erikseen jokaisen polymorfismin suhteen homotsygootteja.

Polymorfismien vaikutusta beeta-amyloidin kertymään testattiin Mann-Whitney U-testiä sekä Kolmogorov-Smirnovin testiä käyttäen, koska Levenen testi osoitti varianssien heterogeenisyyden useassa eri vertailuparissa ja riippumattomien ryhmien t-testin käyttäminen ei olisi ollut järkevää. Vaikka paikoitellen vertailuryhmien välillä oli suuntaa-antavaa eroa, tutkittavilla polymorfismeilla ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta beeta-amyloidin kertymään aivoissa.

Aikaisemmin tutkimusaineistosta määritellyn CERAD-pisteystyksen suhteen tutkimuspopulaatio jaettiin kahteen osaan. Alapopulaatio A:han otettiin mukaan kaikki, joiden CERAD-pisteitys oli 0 eli tutkittavat, joilla ei ollut histologisesti osoitettavia merkkejä Alzheimerin taudista. Alapopulaatio B:hen valittiin pisteystyksen B ja C saaneet eli henkilöt, joilla oli joko merkkejä tai varma Alzheimerin tauti. CERAD A eli epävarmat tapaukset jätettiin tarkastelun ulkopuolelle. Fisherin tarkalla testillä tutkimalla vertailemalla ei löytynyt tilastollisesti merkittävää eroa eri polymorfismien genotyyppien jakautumisissa A- tai B-populaatioihin.

Kuten myös CERAD-luokituksen suhteen, myös aikaisemmin tehty Braak-luokitus analysoitiin muodostamalla siitä ensin binominaalinen muuttuja. A-alapopulaatioon otettiin tutkittavat, joiden Braak-luokitus oli 0-2 eli joko ei mitään neuropatologisia löydöksiä tai hermosäievyhtejä korkeintaan transentorhinaalisella kuorella. B-

populaation Braak-luokitus oli 4-6 eli limbisen alueen, hippokampuksen tai isoaivokuoren hermosäievyhtejä tai degeneraatiota. APOE $\epsilon 3/\epsilon 3$ -kategoriassa jokainen tutkituista polymorfismeista pystyi tilastollisesti merkitsevästi ennustamaan eri alapopulaatioihin sijoittumista. Tämän jälkeen analyysiin otettiin mukaan vielä analysoitavien polymorfismien suhteen heterotsygootit ja Braak-populaatioihin A ja B kuulumisen riskisuhde laskettiin sekä homotsygoottien että suojaavan homotsygootin ja heterotsygootin välillä. Jokaisen polymorfismin kohdalla ainostaan homotsygoottien riskisuhteen 95% luottamusväli ulottui yli yhden, kuten kuvaajasta 1 nähdään. Suojaavien tai altistavien APOE-alleelien kategorioissa ei myöskään löydetty Fisherin tarkalla testillä merkittäviä eroja. Tarkemmat lukuarvot neuropatologisten löydösten analyyseistä on esitetty liitessä 1.



Kuvaaja 1. Altistavien genotyyppien Braak 3-6 -ryhmiin kuulumisen riskisuhde suhteessa suojaavaan genotyyppiin APOE $\epsilon 3/\epsilon 3$ -populaatiossa sekä 95% luottamusväli.

Tutkittavia genotyyppijä vertailtiin vielä niiden jakautumisella kolmanteen neuropatologiseen jakoon. Ensimmäiseen ryhmään valittiin tutkittavat, jotka ovat saaneet CERAD-pisteytyksen 0 tai A ja Braak-luokan 0-2. Toisessa populaatiossa olivat näiden testien mukaan runsaammin löydöksiä sisältäneet eli CERAD C tai D ja Braak 4-6. Jaon perusteella vertailtiin jälleen vaikutusta eri APOE-genotyyppiryhmissä. Yhdessäkään genotyyppissä ei havaittu tilastollisesti merkittävää vaikutusta, mutta rs8106922 saavutti melkein tilastollisen merkittävyyden ($p=0,059$) APOE $\epsilon 3/\epsilon 3$ -populaatiossa. Apoe $\epsilon 4$ -ryhmässä ei yksikään tutkittava ollut vähäisempien löydösten kategoriassa, mikä osaltaan kuvaa $\epsilon 4$ -riskialleelin vaikutusta.

Mahdollista assosiaatiota vastemuuttujien ja tutkittujen sekä jo aikaisemmin selvitettyjen polymorfisimen suhteen tutkittiin myös Kruskal-Wallis parametrillomalla testillä. Sillä selvitettiin, onko riskialleelin kopioiden määrällä vaikutusta neuropatologisiin löydöksiin eli löytyykö tilastollisesti merkittävää trendiä. Vertailuryhminä olivat polymorfismien suhteen kaikki kolme eri genotyyppiä.

SNP genotyyppi	Amyloidi- pitoisuus		Amyl.pit., ε3/ε3		Braak+CERAD		Braak+CERAD ApoE ε3/ε3		
	med.	K.-W.	med.	K.-W.	pat.	K.-W.	pat.	K.-W.	
rs1160985 (TOMM40)	CC	3,08		1,01		0,78		0,36	
	Ct	1,99	0,23	0,95	0,22	0,67	0,45	0,51	0,13
	tt	1,73		1,75		0,68		0,69	
rs8106922 (TOMM40)	AA	3,43		0,89		0,80		0,40	
	Ag	1,76	0,10	0,91	0,08	0,64	0,19	0,48	0,04
	gg	1,96		1,84		0,73		0,76	
rs760135 (TOMM40)	AA	2,65		1,07		0,76		0,45	
	Ag	1,93	0,29	0,98	0,24	0,67	0,53	0,50	0,13
	gg	1,64		1,75		0,69		0,56	
rs405509 (APOE-prom.)	GG	1,70		1,80		0,65		0,68	
	Gt	2,53	0,59	0,90	0,01	0,71	0,80	0,53	0,02
	tt	2,65		0,44		0,70		0,18	
rs440446 (APOE +113)	GG	3,16		0,78		2,21		0,72	
	cG	1,76	0,004	0,66	0,001	0,98	0,054	0,50	0,01
	cc	0,71		0,20		0,71		0,20	

Taulukko 3. Polymorfisimen eri genotyyppien ja neuropatologisten löydösten välisten trendien tilastollinen merkittävyys koko kohortissa ja ApoE ε3/ε3 -subpopulaatiossa. K.-W. = Kruskal-Wallis testi, tilastollisen merkittävyyden raja $p < 0,05$, pat=patologisten osuus tutkittavista, med=mediaani. BRAAK-CERAD-jaottelu: ei patologiset Braak 0-2 ja CERAD 0 tai A, patologiset Braak 4-6 ja CERAD C tai D.

4.2 SNP:ien vaikutus kliinisiin löydöksiin

Kuten neuropatologisten tutkimusten kohdalla, myös tutkittavien polymorfismien vaikutusta kliinisiin löydöksiin eli todettuun dementiaan tutkittiin Fisherin tarkalla testillä ja poistamalla APOE-alleelien vaikutus tutkimalla jokainen kolmesta edellä mainitusta APOE-kategoriasta erikseen. Tilastollisesti merkittävä tulos saatiin ainostaan APOE ε4 -kategoriassa, jonka mukaan SNP:n rs1160985 tt-genotyyppi assosioitui heikosti ($p=0.015$) suojaavasti kliinisesti todettavaan dementiaan (Taulukko 4).

Genotyypin vaikutusta dementiaan tutkittiin myös koko kohortissa Fisherin tarkalla testillä, vertailupareina genotyyppien suhteen homotsygotit sekä vertailumuuttujana todettu dementia. Jälleen tilastolliselta merkittävyydeltä jäätin vaikka polymorfismi rs1160985 melkein tähän ylsikin ($p=0,054$). Myös eri alleelien pitoisuuksien ja kliinisten löydösten välisiä trendejä tutkittiin Kruskal-Wallis testillä. Kuten Fisherin tarkassa testissä, myös Kruskal-Wallis testillä ainoastaan tutkittu polymorfismi rs1160985 ApoE $\epsilon 4$ -alapopulaatioissa osoitti tilastollista merkittävyyttä.

SNP	Koko aineisto		ApoE $\epsilon 2/\epsilon 2$ ja ApoE $\epsilon 2/\epsilon 3$		ApoE $\epsilon 3/\epsilon 3$		ApoE $\epsilon 3/\epsilon 4$ ja ApoE $\epsilon 4/\epsilon 4$		
	<i>pat.</i>	<i>K.-W.</i>	<i>pat.</i>	<i>K.-W.</i>	<i>pat.</i>	<i>K.-W.</i>	<i>pat.</i>	<i>K.-W.</i>	
rs1160985	<i>CC</i>	0,62		0,50		0,53		0,75	0,015
	<i>Ct</i>	0,60	0,07	0,58	0,55	0,50	0,91	0,75	
	<i>tt</i>	0,49		0,41		0,51		0	
rs8106922	<i>AA</i>	0,61		0,60		0,51		0,68	0,35
	<i>Ag</i>	0,59	0,15	0,51	0,16	0,51	0,95	0,75	
	<i>gg</i>	0,57		0,00		0,49		1,00	
rs760135	<i>AA</i>	0,58		0,56		0,47		0,70	0,48
	<i>Ag</i>	0,61	0,16	0,56	0,55	0,52	0,80	0,78	
	<i>gg</i>	0,51		0,40		0,52		1,00	
rs405509	<i>GG</i>	0,54		0,47		0,55		0,63	0,59
	<i>Gt</i>	0,57	0,21	0,63	0,34	0,46	0,24	0,74	
	<i>tt</i>	0,66		1,00		0,58		0,75	
rs440446	<i>GG</i>	0,58		0,52		0,50		0,71	0,97
	<i>cG</i>	0,56	0,77	0,44	0,08	0,50	0,97	0,71	
	<i>cc</i>	0,52		0,67		0,52		-	

Taulukko 4. Polymorfismien eri genotyyppien ja dementian esiintymien välisten trendien tilastollinen merkittävyys koko kohortissa ja eri ApoE-subpopulaatioissa. K.-W. = Kruskal-Wallis testi, tilastollisen merkittävyyden raja $p<0,05$., pat=patologisten osuus tutkittavista.

4.3 Aleelifrekvenssit

Mitattujen alleelifrekvenssien verrattuna muissa aineistoissa esittelyihin on kuvattu taulukossa. Lisäksi taulukossa 5 on esitetty, miten Pearsonin yhden vapausasteen χ^2 -testin perusteella mitatut arvot vastaavat Hardy-Weinbergin lain esittämää genotyyppijakaumaa. Testi kuvaa, miten hyvin aineisto vastaa ideaalipopulaatiota, jossa ei esiinny ei-satunnaista pariumista, mutaatiota, luonnonvalintaa, geneettistä

ajautumista tai osapopulaatioita. Viiden prosentin merkitsevyystaso yhdelle vapausasteelle on 3,84, joten mitattujen alleelifrekvenssien voidaan katsoa noudattavan Hardy-Weinbergin lakia. Vertailtavina populaatioina ovat Rosesin vuoden 2009 yhdysvaltalainen kohortti, jonka jäsenillä on eurooppalaiset sukujuuret (11) sekä International HapMap Projectin CEU, joka sisältää länsi- ja pohjoiseurooppalaisten utahilaisia jälkeläisiä. Tuloksista huomataan, miten Vantaa-aineisto eroaa jonkin verran CEU-aineistosta ja melko paljon Rosesin aineistosta.

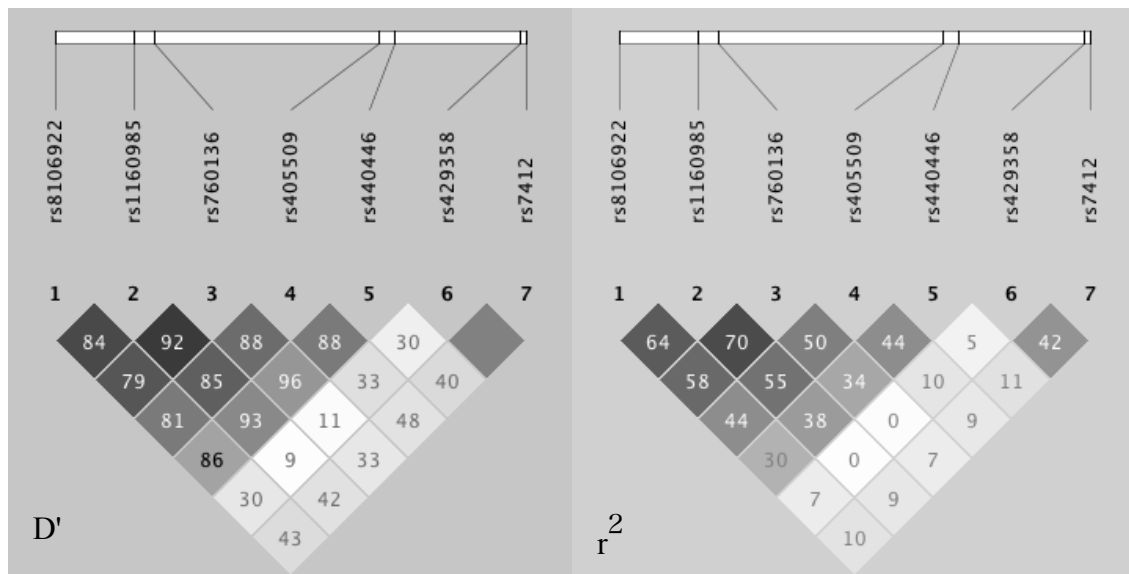
SNP	rs1160985				rs8106922				rs760136			
	<i>CC</i>	<i>tt</i>	<i>Ct</i>	χ^2	<i>AA</i>	<i>gg</i>	<i>Ag</i>	χ^2	<i>AA</i>	<i>gg</i>	<i>Ag</i>	χ^2
Vantaa	113 (21,8)	132 (25,4)	272 (52,5)	1,49	121 (23,4)	113 (21,8)	277 (53,5)	3,64	152 (29,3)	120 (23,2)	241 (46,5)	1,65
Roses 2009	51 (48,6)	10 (9,5)	44 (41,9)	0,01	55 (52,4)	6 (7,6)	42 (40,0)	0,30	51 (48,6)	10 (9,5)	44 (41,9)	0,01
HapMap CEU	38 (33,6)	23 (20,4)	52 (52,5)	0,56	44 (23,4)	18 (21,8)	51 (53,5)	0,24	-	-	-	-

2

Taulukko 5. Mitatut genotyyppien määrät ja osuudet (suluissa %) eri populaatioissa ja χ^2 -testi (df=1)

4.4 KytKentäepätasapaino TOMM40- ja APOE-geenialueella

Tutkimus vahvistaa aikasempaa tulosta kytKentäepätasapainosta, joka vallitsee TOMM40- ja APOE-geenialueella. Kuvaajassa 2 on esitetty tutkimuksen kohteena olleiden 3 SNP:n sekä jo aiemmin Vantaa-aineistosta selvitettyjen polymorfismien rs405509, rs440446 ja APOE-genotyyppjä määrittelevien polymorfismien rs429358 ja rs7412 välinen kytKentäepätasapaino. SNP:t rs405509 ja rs440446 sijaitsevat lähellä APOE-geenin promoottoriaaluetta ja niiden perusteella voidaan jakaa neutraalina pidetyn APOE ϵ_3/ϵ_3 -populaation jakaa Alzheimerin taudin suhteen riskipopulaatioihin (8). Kaksi viimeistä polymorfismia sijaitsevat APOE:n proteiinia koodavalla alueella.



Kuvaaja 2. Standardisoitu kytKentäepätasapaino (D') sekä korrelaatiokerroin (r^2) Vantaa-aineistossa. Yläreunan asteikko kuvaa SNP:ien paikkaa kromosomissa, markerit 1-3 sijaitsevat TOMM40-alueella, markerit 4-7 APOE:n alueella.

Kuvaajista nähdään, miten tutkittavalla alueella TOMM40-alueen tutkitut polymorfismit muodostavat oman melko tiiviin alueen, joka on APOE-promoottorialueeseen voimakkaammassa kytKentäepätasapainossa kuin promoottorialue on APOE:n proteiinia koodaavaan alueeseen. Huomattavaa on siis myös aineistosta näkyvä rekombinaation aktiivisuus APOE-promoottorialueen polymorfismien ja proteiinia koodavan alueen välillä. Verrattuna HapMap CEU-aineistoon Vantaa-aineiston kytKentäepätasapainot eivät olleet yhtä voimakkaita. Toisaalta myöskään vertailuaineistosta ei kaikkia vastaavia kytKentäepätasapainoja ole määritelty.

5 Pohdinta

5.1 TOMM40:n polymorfismien haplotyyppivaikutus heikompi kuin APOE:n promoottori- ja enhancer-alueen polymorfismeilla

Vaikkakin aineiston pilkkominen aiheutti haasteita, tutkimus onnistui osoittamaan TOMM40-geeniaalueen kyvyn erottaa APOE3-populaatiosta Alzheimerin taudin riskipopulaatio, kuten myös yhdysvaltalaisessa kohortissa on tehty (11). Vaikutus ei kuitenkaan ole yhtä voimakas kuin APOE-geenin alueella olevilla polymorfismeilla, joita jo aiemmin on tutkittu tästä kohortista. Vaikka tulos ei täysin definiitivinen ole, antaa se viitteitä siitä, että etiologinen muutos

sijaitsee APOE-alueella. Aikaisemmin tutkimusryhmämme tekemien tutkimusten perusteella mahdollinen muutos ei kuitenkaan välity ainakaan *in vitro* astrosyyttien tai hepatosyyttien APOE-ekspressiotasossa. Vaikutus voi olla kuitenkin erilainen *in vivo* del tai vaikuttaa muiden geenien ekspresion kautta. Voimakkaimmin neuropatologisiin löydöksiin assosioitui APOE:n enhancer-alueen muutos – enhancer-alueet puolestaan voivat vaikuttaa monien ylä- tai alavirtaan sijaitsevien geenien toimintaan.

Merkittävin haaste tutkimukselle oli aineiston koko. Vaikka lähtökohtaisesti kohorttiin kuului yli puoli tuhatta tutkittavaa, ongelmia tuli APOE-vaikutuksen poistamisen yhteydessä, jolloin tutkittavien otantojen koko pieneni jopa vain 23 henkilöön, kun myös tutkittavien polymorfismien suhteen heterosyygootit oli poistettu tutkittavasta populaatiosta.

Eräs suunta jatkotutkimukselle voisi olla Vantaa-aineistosta eristettyjen RNA-tuotteiden sekvensointi ja kvantitatiivinen PCR. Sekvensoimalla kohdegeenien, esimerkiksi TOMM40:n ja APOE:n, koodaamia mRNA-jaksoja voitaisiin selvittää polymorfismien mahdollisia vaikutuksia yhden askeleen pidemmälle geneettisen koodin ja kliinisen ilmiön välisellä matkalla. Kvantitatiivinen PCR puolestaan pystyisi osoittamaan tutkittavien mRNA-pätkien ekspressiotasoa ja siten tuomaan tietoa eri geenien ilmentämisestä ja luentatiheydestä. Yhdistämällä nämä tiedot jo olevassa olevaan aineistoon Vantaa-kohortista voitaisiin myös selvittää mahdollisten mRNA-vaihteluiden yhteyttä jo tutkittuihin neuropatologisiin ja kliinisiin merkkeihin hermostorappeumista.

Vantaa-aineisto on Suomessa ainutlaatuinen ikäkohortti ja siitä on mahdollista tehdä myös maailman mittakaavassa merkittävää tutkimusta. Vaikka nyt tehty tutkimus on ja käytetyt metodit ovat nykymittapuulla hyvinkin pienimuotoisia, voivat ne osaltaan viitoittaa myös tekemään enemmän TOMM40-alueen tutkimusta tästä aineistosta.

5.2 Genetiikan tutkimuksen monet suunnat

Vaikka Alzheimerin taudista tiedetään entistä enemmän ja tutkimusmenetelmät kehittyvät ennennäkemättömällä vauhdilla, taudin tarkkaa patogeneesiä ja siten myös tehokkaita hoitokeinoja ei edelleenkään pystytä selvittämään. Tehokasta geneettisen aineiston keräämistä on pystytty tekemään jo useita kymmeniä vuosia ja koko genomin selvittäminen on nykyään rutiinitoimintaa. GWAS-tutkimuksilla pystytään löytämään yhä enemmän tautiin liittyviä geenialueita, mutta usein jää arvailujen varaan, miten kyseiset muutokset ihmisen perimässä lopulta ilmentyvät tautiriskin kohoamisena ja aiheuttavat kliiniset manifestaatiot. Koko genomin sekvensoinnin tuottaessa yhä enemmän dataa tutkijoiden käyttöön pitää tutkimusfokusta siirtää assosioituvasta geenialueesta toisaalta sivulle, toisaalta alavirtaan: miten löydetty perimän variaatio vaikuttaa viereisten ja ehkä jopa hyvin kaukaisten geenien luentaan ja ilmenemiseen ja toisaalta mitä muutoksia löytyy koodatuista RNA-juosteista ja koodatuista proteiineista.

Usein löydettyt SNP:t ovat alueilla, jotka eivät vaikuta suoraan koodattavan proteiinin emäsjaksoon. Ne voivat kuitenkin vaikuttaa monella tapaa geenien ilmentymiseen. Vaihtoehtoinen silmikointi tuottaa proteiineista erikokoisia ja eri tavalla toimivia variantteja, kun osa eksoneista jää pois tumasta poistuvasta mRNA-molekyylistä. SNP:t voivat vaikuttaa myös läheisten ja kaukaisten geenien ilmenemistä heikentäen tai vahvistaen toimimalla geenien promoottorialueena.

5.3 Teknologia ja tietotekniikka genetiikassa

Automaattinen tietojenkäsittely on instrumentaalinen osa nykyistä genetiikan tutkimusta. Potilaan tai kudoksenäytteen sisältämän genomin, RNA-aineksen tai proteiinien sekvenssien selvittäminen tuottaa massiivisen määrän dataa, jonka analysointi manuaalisesti olisi mahdotonta. Samalla myös jokaisen perustutkijan käytössä oleva ATK-laitteiston laskentateho kasvaa huimaa vauhtia. Haasteena on tulevaisuudessa kehittää tehokkaita ja innovatiivisia työkaluja ja algoritmeja, joilla massiviinen määrä dataa analysoidaan. Evoluutiivisten mallien

selvittäminen, säännönmukaisuuksien etsiminen geneettisestä koodista sekä solujen signaalintiverkkojen ja toiminnan simulointi ovat vain muutamia esimerkkejä.

5.4 Milloin ja miten Alzheimerin taudin salat ratkeavat?

Vaikka tämä tutkimus ei juurikaan enempää valota syitä ja syy-yhteyksiä Alzheimerin taudin taustalla, selvitystyö jatkuu intensiivisenä ja tulosta tulee. APOE-TOMM40-alueella tulevia tutkimuskohteita voisivat olla esimerkiksi eri RNA-varianttien ekspressiotasot sekä geneettisten varianttien vaikutus muiden geenien ekspressioon. APOE:n promootori- ja enhancer-alueen polymorfismit saattavat säädellä TOMM40:n tai jonkin muun alueella olevan geenin ekspressiota, mikä selittäisi APOE3-haplotyyppin roolin Alzheimerin taudissa. Vaikka salaperäisen etiologian selvittelyssä on kuljettu pitkä matka epäselväksi jää, paljonko vielä on jäljellä kuljettavaa. Epigenetiikka, proteomiikka, GWAS-analysoinnin yleistymisen, normaalista poikkeavat ideat ja tietotekniset innovaatiot sekä teknologiset harppaukset tulevat tulevaisuudessa viitoittamaan uusia polkuja ja kulkemaan niitä. Perinnöllisen amyotrofisen lateraaliskleroosin (FALS) toistojakson patogeneesin selvittely on vain yksi osoitus siitä, miten kansainvälinen yhteistyö, ammattitaito ja vauhdilla etenevä teknologinen kehitys voivat tuottaa tuloksia nopeudella, jota kukaan ei osaa ennalta nähdä. Ehkä näin tulee olemaan laita myös Alzheimerin taudin kanssa.

6 Lähteet

(1) Hiltunen M, Haapasalo A, Soininen H. Alzheimerin taudin uudet riskigeenit – tautia ennakoivat biomarkerit? *Duodecim* 2013;129(7):583-588.

(2) Alzheimer's Disease International Consortium. World Alzheimer Report. 2009; Available at: <http://www.alz.co.uk/research/files/WorldAlzheimerReport.pdf>

(3) Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic Meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* 2007;39:17-12.

(4) Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 2006 Feb;63(2):168-174.

(5) Polvikoski T, Sulkava R, Haltia M, Kainulainen K, Vuorio A, Verkkoniemi A, et al. Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein. *N Engl J Med* 1995 Nov 9;333(10):1242-1247.

(6) Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 1997 Oct 22-29;278(20):1349-1356.

(7) Takei N, Miyashita A, Tsukie T, Arai H, Asada T, Imagawa M, et al. Genetic association study on in and around the APOE in late-onset Alzheimer disease in Japanese. *Genomics* 2009 May;93(6):441-448.

(8) Myllykangas L, Polvikoski T, Reunanen K, Wavrant-De Vrieze F, Ellis C, Hernandez D, et al. ApoE epsilon3-haplotype modulates Alzheimer beta-amyloid deposition in the brain. *Am J Med Genet* 2002 Apr 8;114(3):288-291.

(9) Strandberg TE, Pitkala K, Eerola J, Tilvis R, Tienari PJ. Interaction of herpesviridae, APOE gene, and education in cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2005 Jul;26(11):1001-1004.

(10) Viiri LE, Viiri KM, Ilveskoski E, Huhtala H, Maki M, Tienari PJ, et al. Interactions of functional apolipoprotein E gene promoter polymorphisms with smoking on aortic atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet* 2008 Dec;1(2):107-116.

- (11) Roses AD, Lutz MW, Amrine-Madsen H, Saunders AM, Crenshaw DG, Sundseth SS, et al. A TOMM40 variable-length polymorphism predicts the age of late-onset Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J* 2010 Oct;10(6):375-384.
- (12) Roses AD, Lutz MW, Crenshaw DG, Grossman I, Saunders AM, Gottschalk WK. TOMM40 and APOE: Requirements for replication studies of association with age of disease onset and enrichment of a clinical trial. *Alzheimers Dement* 2013 Mar;9(2):132-136.
- (13) Humphries AD, Streimann IC, Stojanovski D, Johnston AJ, Yano M, Hoogenraad NJ, et al. Dissection of the mitochondrial import and assembly pathway for human Tom40. *J Biol Chem* 2005 Mar 25;280(16):11535-11543.
- (14) Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 2006 Aug 30;26(35):9057-9068.
- (15) Jolivet R, Magistretti PJ, Weber B. Deciphering neuron-glia compartmentalization in cortical energy metabolism. *Front Neuroenergetics* 2009 Jul 9;1:4.
- (16) Wolf AB, Caselli RJ, Reiman EM, Valla J. APOE and neuroenergetics: an emerging paradigm in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2013 Apr;34(5):1007-1017.
- (17) Friedland RP, Brun A, Budinger TF. Pathological and positron emission tomographic correlations in Alzheimer's disease. *Lancet* 1985 Jan 26;1(8422):228.
- (18) Minoshima S, Foster NL, Kuhl DE. Posterior cingulate cortex in Alzheimer's disease. *Lancet* 1994 Sep 24;344(8926):895.
- (19) Chang S, ran Ma T, Miranda RD, Balestra ME, Mahley RW, Huang Y. Lipid- and receptor-binding regions of apolipoprotein E4 fragments act in concert to cause mitochondrial dysfunction and neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Dec 20;102(51):18694-18699.
- (20) Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1991 Apr;41(5):479-486.
- (21) Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82(5):239-259.

7 Liite 1. SNP:ien ja neuropatologisten sekä kliinisten löydösten välinen analyysi

APOE-genotyyppi	ε2/ε2 tai ε2/ε3						ε3/ε3						ε3/ε4 tai ε4/ε4					
SNP	rs1160985		rs8106922		rs760136		rs1160985		rs8106922		rs760136		rs1160985		rs8106922		rs760136	
SNP:n genotyyppi	CC	tt	AA	gg	AA	gg	CC	tt	AA	gg	AA	gg	CC	tt	AA	gg	AA	gg
Lukumäärä	14	17	20	3	16	15	51	111	47	106	74	102	44	3	44	4	60	1
BEETA-AMYLOIDIN ESIINTYMINEN:																		
-- Keskimääräinen amyloidipitoisuus	3,843	0,955	3,724	0,000	7,592	0,819	1,519	3,284	1,653	3,402	1,720	3,208	6,334	7,335	6,613	4,577	5,735	13,450
----Keskivirhe	3,796	0,692	1,772	0,000	3,796	1,589	0,300	0,519	1,878	3,954	1,883	3,746	4,229	3,613	4,055	2,379	3,627	-
-- Levenen testi varianssien homogeenisyydelle ¹	0,023		0,090		0,013		0,001		0,004		0,001		0,629		0,298		-	
-- Mann-Whitneyn U-testi ¹	1,000		0,218		0,927		0,134		0,088		0,118		0,783		0,486		0,146	
-- Kolmogorov-Smirnovin testi ¹	0,998		0,461		0,970		0,158		0,187		0,093		0,979		0,807		0,342	
CERAD-LUOKITUS																		
-- A: CERAD 0: lukumäärä	3	1	5	4	3	4	8	16	7	14	12	14	0	0	1	0	1	0
-- B: CERAD C tai D: lukumäärä	3	3	2	0	1	3	16	34	16	32	26	30	29	2	29	3	38	1
-- Fishterin tarkka testi: A ja B x genot. ^{1,2}	0,571		0,491		1,000		1,000		1,000		1,000		-		1,000		1,000	
BRAAK-LUOKITUS																		
-- A: Braak 0-2: lukumäärä	1	3	3	4	1	4	12	16	12	12	20	13	1	0	1	0	3	0
-- B: Braak 4-6: lukumäärä	2	2	4	0	2	2	4	25	5	24	9	23	22	1	23	3	27	1
-- Fishterin tarkka testi: A ja B x genot. ^{1,2}	1,000		0,444		0,524		0,020		0,018		0,013		1,000		1,000		1,000	
-- Riskisuhte							4,69		4,80		3,93							
--- Riskisuhteen 95 % luottamusväli							1,29	17,10	1,37	16,79	1,39	11,12						
YHDISTETTY CERAD JA BRAAK																		
-- A: CERAD 0 tai A ja Braak 0-2	1	2	2	2	1	3	7	9	6	6	11	7	0	0	0	0	0	0
-- B: CERAD C tai D ja Braak 4-6	1	2	3	0	1	2	4	20	4	19	9	18	22	1	23	3	27	1
-- Fishterin tarkka testi: A ja B x genot. ^{1,2}	1,000		0,429		1,000		0,080		0,059		0,125		-		-		-	
KLIINISET TUTKIMUKSET																		
-- A: dementia todettu, lukumäärä	7	10	8	3	7	9	24	54	23	54	39	49	11	3	14	0	18	0
-- B: ei dementiaa todettu, lukumäärä	7	7	12	0	9	6	27	57	24	52	35	53	33	0	30	4	42	1
-- Fishterin tarkka testi: A ja B x genot. ^{1,2}	0,725		0,093		0,479		0,867		0,862		0,647		0,022		0,307		1,000	
-- Riskisuhte													0,25					
--- Riskisuhteen 95 % luottamusväli													0,15	0,42				

¹ Tilastollisen merkittävyyden raja = 0,05

² Kaksisuuntainen