

Salla Majaharju

Polymorfioiden määrittämenetelmän optimointi:

5HTTLPR, rs25531 ja *MAOA-uVNTR* -polymorfiat
oikeuslääketieteellisessä tutkimusaineistossa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööryö

15.10.2015

Tekijä(t)	Salla Majaharju
Otsikko	Polymorfioiden määritysmenetelmän optimointi: <i>5HTTLPR</i> , <i>rs25531</i> ja <i>MAOA-uVNTR</i> -polymorfiat oikeuslääketieteellisessä tutkimusaineistossa
Sivumäärä	40 sivua + 5 liitettä
Aika	15.10.2015
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketeknikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede
Ohjaaja(t)	FM, tohtorikoulutettava Anna-Liina Rahikainen FT, dosentti Jukka Palo FM, Lehtori Juha Eljas A. Knuutila
<p>Aivoissa tapahtuva tiedonvälitys perustuu hermosolujen väliseen sähköiseen ja kemialliseen viestintään. Kemiallisesta viestinnästä vastaavat välittäjäaineet, joiden tehtävänä on siirtää hermosolussa sähköisesti kulkeva viesti kemiallisessa muodossa synapsiraon yli seuraavaan hermosoluun. Serotoniini on yksi aivojen tärkeimmistä hermoimpulsseja voimistavista välittäjäaineista, jonka määrän on todettu vähentyvän esimerkiksi masennustiloissa. Aivojen serotoniinivajetta pyritään korjaamaan muun muassa estämällä sen takaisinkuljetusta hermosoluun. Tällä mekanismilla toimivia masennuslääkkeitä kutsutaan selektiivisiksi serotoniinin takaisin oton estäjiksi (SSRI), joista masennuslääke sitalopraami on yksi esimerkki. Serotoniinipitoisuutta voidaan pyrkiä korjaamaan myös estämällä serotoniinin hajotusta hermosoluissa.</p> <p>Tämän insinööriyön tavoitteena oli pystyttää ja optimoida serotoniinin metaboliaan liitetyn <i>MAOA-uVNTR</i>-polymorfian ja sitalopraamin farmakodynamiikkaan liittyvien <i>5HTTLPR</i> ja <i>rs25531</i> polymorfioiden määritysmenetelmä. <i>MAOA-uVNTR</i> on serotoniinia presynaptisissa hermopäätteissä hajottavan MAOA-entsyymin säätelyalueella oleva, entsyymin tehokkuuteen vaikuttava vaihtelevaluinen toistojakso. <i>5HTTLPR</i> ja <i>rs25531</i> ovat serotoniinin kuljetusproteiinin SLC6A4:n transkriptiotehokkuuteen vaikuttavia polymorfioita, jotka sijaitsevat kuljetusproteiinia koodaavan geenin säätelyalueella.</p> <p>Menetelmän pystytyksen ja optimoinnin jälkeen tutkittujen polymorfioiden yleisyys määritettiin oikeuslääketieteellisestä tutkimusaineistosta. Aineisto oli valittu verrokkiaineistoksi sitalopraamin farmakogenetiikan ja itsemurhien välistä yhteyttä tutkivaan väitöskirjatyöhön. Saatujen tulosten oikeellisuus ja menetelmän luotettavuus varmistettiin lopuksi vielä sekvensoinnin avulla.</p> <p>Menetelmä saatiin toimimaan hyvin ja luotettavasti. Määritetyssä aineistossa yleisin <i>MAOA-uVNTR</i>-alueen alleeli oli sekä miehillä että naisilla neljän toistonjakson eli nopean entsyymitehokkuuden alleelimuoto 4 ja <i>5HTTLPR</i>-alueen yleisin alleeli sekä miehillä että naisilla oli normaalilla transkriptiotehokkuudella toimiva alleelimuoto 16A.</p>	
Avainsanat	MAOA-uVNTR, 5HTTLPR, rs25531, polymorfia, optimointi

Author(s)	Salla Majaharju
Title	Optimization of the polymorphism determination method: <i>5HTTLPR</i> , rs25531 and <i>MAOA-uVNTR</i> polymorphisms in medico-legal research material
Number of Pages Date	40 pages + 5 appendices Thursday, October 15, 2015
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedicine
Instructor(s)	Anna-Liina Rahikainen, MSc, PhD Student Jukka Palo, PhD, Docent Juha Eljas A.Knuutila, MSc, Senior lecturer
<p>Neuronal communication is based on electronic and chemical signaling between nerve cells. Chemical messengers, known as neurotransmitters, are responsible for signal transmission across the synaptic cleft when electrical signal proceeds from presynaptic to postsynaptic neuron. Neurotransmitters are divided in two categories, inhibitory and excitatory neurotransmitters. Serotonin is one of the most important excitatory neurotransmitter in the brain and decreased serotonergic activity may lead to depression. In case of depression, serotonin levels may be increased by preventing the transport of serotonin from synaptic cleft back to the presynaptic nerve cell. Drugs, acting with described mechanism, are called selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), of which citalopram is one example. Serotonin levels may also be increased by blocking the catabolism of serotonin.</p> <p>The aim of this thesis was to set up and optimize a genotyping method for the <i>MAOA-uVNTR</i>, <i>5HTTLPR</i> and rs25531 polymorphisms. These polymorphisms are related to metabolism of serotonin and pharmacodynamics of citalopram, respectively. <i>MAOA-uVNTR</i>, situated in the regulatory region of a gene <i>MAOA</i>, affects the efficiency of the forming enzyme MAOA. MAOA enzyme is responsible of serotonin metabolism in the presynaptic nerve cell. Instead, <i>5HTTLPR</i> and rs25531 are polymorphisms in the regulatory region of the <i>SLC6A4</i> gene, which codes the serotonin transporter, target of citalopram. Both <i>5HTTLPR</i> and rs25531 affect the transcription efficiency of the forming protein.</p> <p>After the set up and optimization of the method, the polymorphisms were analyzed from a medico-legal research material. These subjects were selected as controls for a PhD study, which investigates the relationship between the pharmacogenetics of citalopram and suicide. The accuracy of the results and the reliability of the method were ensured by sequencing the found alleles.</p> <p>The developed method worked well, and it was reliable. The most common allele in the <i>MAOA-uVNTR</i> area, in both men and female was allele 4, which is the rapid enzyme effectiveness allele, and the most common allele in <i>5HTTLPR</i> area, both in men and female was the normally functioning long allele 16A.</p>	
Keywords	MAOA-uVNTR, 5HTTLPR, rs25531, polymorphism, optimization

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Serotoniini	2
2.1	Serotoniinin kuljetusproteiinin rakenne ja toiminta	4
2.2	Serotoniinin metabolia	5
2.2.1	MAOA-entsyymin rakenne ja toiminta	5
2.2.2	MAOA-uVNTR -polymorfia	6
3	SSRI -lääkkeet	8
3.1	Sitalopraami	8
3.2	5HTTLPR ja rs25531 -polymorfia	9
4	Työn tausta ja tavoitteet	12
5	Materiaalit ja menetelmät	13
5.1	Tutkimusaineisto	13
5.2	Näytteiden esikäsittely	13
5.3	Degradaation vaikutus ja DNA-konsentraation optimointi	13
5.4	Dupleksi-PCR-reaktion optimointi	15
5.5	MAOA-uVNTR ja 5HTTLPR genotyyppien määrittäminen	17
5.5.1	PCR-tuotteiden erottelu kapillaarielektroforeesilla	17
5.5.2	Kapillaarielektroforeesijon tulosten analysointi	18
5.6	rs25531-polymorfian määrittäminen restriktioentsyymikäsittelyllä	18
5.7	Sekvensointi	22
5.8	Tilastollinen tarkastelu	24
6	Tulokset ja tulosten tarkastelu	25
6.1	Menetelmän pystytys	25
6.2	Polymorfioiden yleisyyden määrittäminen	32
6.2.1	5HTTLPR ja rs25531	32
6.2.2	MAOA-uVNTR	34
7	Yhteenveto	37

Liitteet

Liite 1. PCR-alukkeet

Liite 2. Kapillaarielektroforeesin ajoparametrit

Liite 3. GeneMapper ID-X v.1.4 -analyysiparametrit

Liite 4. Sekvensointi

Liite 5. Kapillaarisekvensoinnin ajoparametrit

Lyhenteet

5HTTLPR	<i>Serotonin-transporter-linked polymorphic region</i> , serotoniinin kuljetusproteiiniin liittyvä polymorfinen alue
Alleeli 3	Kolmesta toistojaksosta muodostuva alhaisen entsyymitehokkuuden <i>MAOA-uVNTR</i> -alueen alleeli
Alleeli 3.5	Kolmesta ja puolesta toistojaksosta muodostuva tehokkaan entsyymiaktiivisuuden <i>MAOA-uVNTR</i> -alueen alleeli
Alleeli 4	Neljästä toistojaksosta muodostuva tehokkaan entsyymiaktiivisuuden <i>MAOA-uVNTR</i> -alueen alleeli
Alleeli 5	<i>MAOA-uVNTR</i> -alueen viidestä toistojaksosta muodostuva alhaisen entsyymitehokkuuden alleeli
Alleeli 14	Heikentyneellä transkriptiotehokkuudella toimiva neljäntoista toistojakson <i>5HTTLPR</i> -alueen alleeli
Alleeli 16A	Normaalilla transkriptiotehokkuudella toimiva kuudentoista toistojakson <i>5HTTLPR</i> -alueen alleeli
Alleeli 16G	Heikentyneellä transkriptiotehokkuudella toimiva, rs25531 SNP:n sisältävä kuudentoista toistojakson <i>5HTTLPR</i> -alueen alleeli
BP	Base pair, emäspari
DNA	Deoxyribonucleic acid, deoksiribonukleiinihappo
FTA®-paperi	Pitkäikäinen kuivasäilytysmenetelmä paperiin imeytetyille DNA-näytteille
MAOA	<i>Monoamine oxidase A</i> , monoamiinioksidaasi A
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , polymeerasiketjureaktio
qPCR	<i>Quantitative real-time-PCR</i> , kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR

SLC6A4	<i>Solute Carrier Family 6 Member 4</i> , serotoniinin kuljetusproteiini
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , yhden nukleotidin polymorfia
SSRI	<i>Selective Serotonin Reuptake Inhibitor</i> , selektiivinen serotoniinin takaisinoton estäjä
uVNTR	<i>Upstream variable number of tandem repeat</i> , geenistä ylävirtaan oleva vaihteleva toistojakso

1 Johdanto

Aivoissa tapahtuva viestintä perustuu hermosolujen eli neuronien välisiin yhteyksiin. Hermosolun vastaanottama ärsyke etenee sähköisenä impulssina sen solukalvoa pitkin ionikanavien ylläpitämän sähköisen potentiaalin avulla. Hermoimpulssin saavuttaessa viejähaarakkeen eli aksonin pään, sähköinen impulssi muuttaa muotonsa kemialliseksi. Kemiallisesta viestinvälityksestä vastaavat aksonin pään varastorakkuloihin pakatut välittäjäaineet.

Välittäjäaineet ovat aivoissa toimivia kemiallisia yhdisteitä, jotka välittävät hermosolussa sähköisesti kulkevan viestin kemiallisesti hermosolujen välisen tilan eli synapsiraon yli seuraavaan hermosoluun. Välittäjäaineet erittyvät hermosolun aksonin pään varastorakkuloista synapsirakoon, jonka jälkeen osa välittäjäaineista sitoutuu edelleen vastaanottavan eli postsynaptisen hermosolun reseptoreihin ja viestin kuljetus jatkuu taas sähköisesti. Osa välittäjäaineista puolestaan sitoutuu presynaptisen hermosolun solukalvolla oleviin autoreseptoreihin, joiden tarkoituksena on säädellä ja hillitä välittäjäaineiden vapauttamista negatiivisen palautesäätelyn avulla. Kun viesti on kulkenut eteenpäin, ylimääräiset välittäjäaineet kuljetetaan takaisin presynaptiseen hermopäätteeseen, jossa ne joko varastoidaan uudelleen tai inaktivoidaan hajottamalla. (Ilmoniemi 2001)

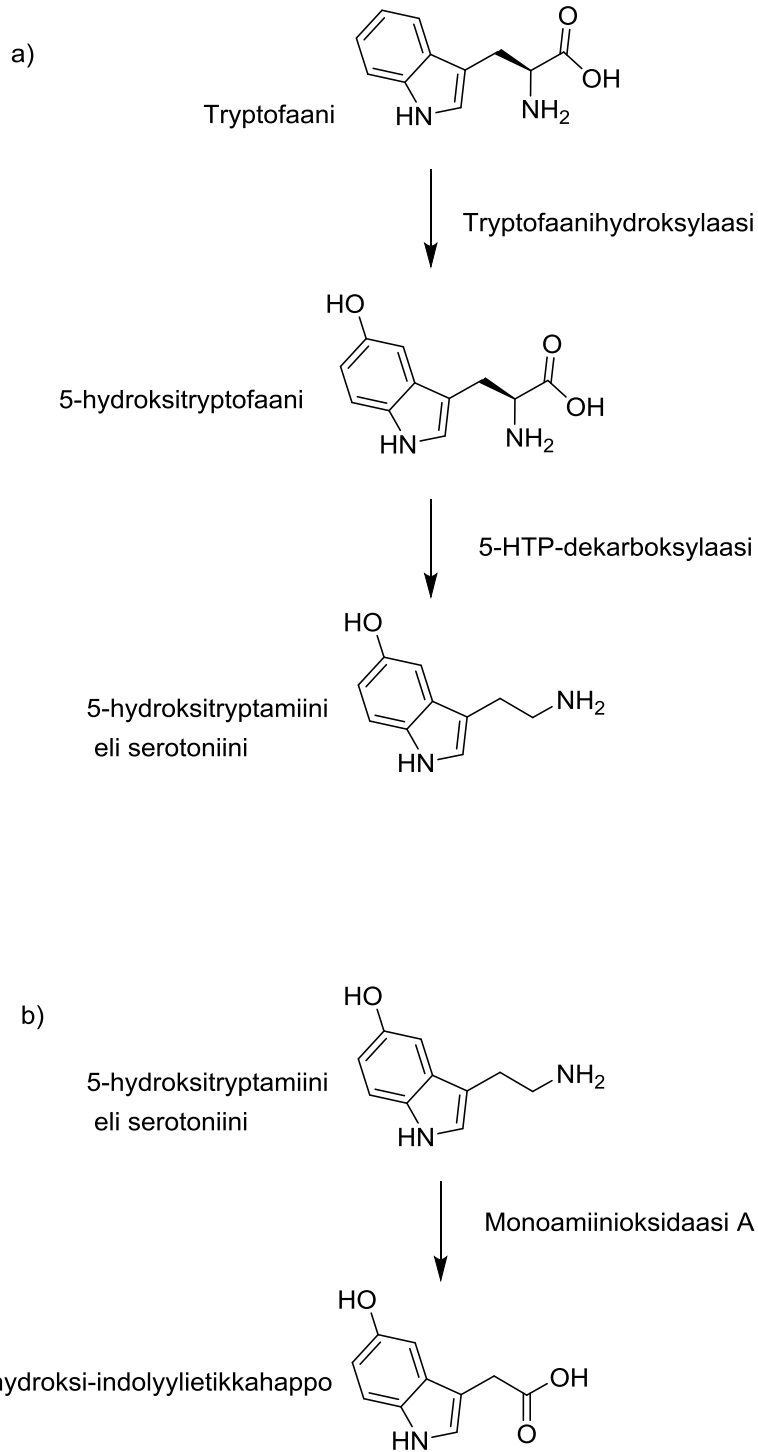
Välittäjäaineet voidaan jakaa toiminnallisesti kahteen osaan, eksitoiviin eli hermoimpulssia voimistaviin välittäjäaineisiin, joita ovat esimerkiksi adrenaliini, dopamiini ja serotoniini, sekä hermoimpulssia inhiboiviin eli estäviin välittäjäaineisiin, kuten aivojen tärkein estävä välittäjäaine gamma-aminovoihappo eli GABA. Suurin osa, noin 80 - 90 % synapsien välittäjäaineista on aminohappoja. Amiineja, esimerkiksi serotoniini ja dopamiini, on noin 5 - 10 %, minkä lisäksi pienen ryhmän (1 - 2 %) muodostavat vielä peptidit kuten oksitosiini ja endorfiini. (Ilmoniemi 2001)

Yksilölliset erot ja häiriöt välittäjäaineiden toiminnassa voivat vaikuttaa monin eri tavoin. Ongelmia voi olla niin välittäjäaineiden synteesin, kuljetuksen ja hajotuksenkin kanssa. Tyypillisimpiä välittäjäaineiden häiriöistä aiheutuvia ongelmia, joita voidaan hoitaa lääkkeellisesti vaikuttamalla juuri impulssien siirtymisen kemialliseen osaan eli välittäjäaineisiin, ovat esimerkiksi masennus ja erilaiset ahdistuneisuus- ja pelkotilat.

2 Serotoniini

Serotoniini eli 5-hydroksitryptamiini (5-HT) on aivoissa toimiva biokemiallinen välittäjäaine. Serotoniini löydettiin vuonna 1948 naudan seerumista. Erittyessään verihutaleista serotoniini toimii verisuonia supistavana tekijänä, mistä myös sen nimi juontaa juurensa. (Rapport, Green et al. 1948) Serotoniinin isänä pidetään sen löytänyttä ja nimennyttä yhdysvaltalaisutkija M.M. Rapportia.

Serotoniinia tuotetaan presynaptisessa hermosolussa L-tryptofaanista melko lyhyessä synteesisprosessissa. Ensimmäisessä vaiheessa L-tryptofaani muokataan tryptofaanihydroksylaasin (TPH) avulla 5-hydroksitryptofaaniksi, minkä jälkeen tryptofaanidekarboksylaasi muokkaa sen 5-hydroksitryptamiiniksi eli serotoniiniksi (kuva 1a). Synteesin jälkeen serotoniini varastoidaan presynaptisen hermosolupäätteen varastorakkuloihin, joista se tarvittaessa vapautetaan eksosytoosilla synapsirakoon. Synapsiraosta serotoniini sitoutuu postsynaptisen hermosolun serotoniinireseptoreihin välittäen hermoimpulssin kemiallisesti neuronista seuraavaan. Impulssin kuljettua synapsiraon yli, ylimääräinen serotoniini kuljetetaan takaisin presynaptiseen hermopäätteeseen serotoniinin kuljetusproteiiniin (SLC6A4) avulla, minkä jälkeen se varastoidaan uudelleen käyttöä varten tai hajotetaan monoamiinioksidaasi-A:n (MAOA-entsyymi) toimesta inaktiiviseksi 5-hydroksi-indolylyietikkahapoksi (5-HIAA) (kuva 1b) (Virkkunen 2005).



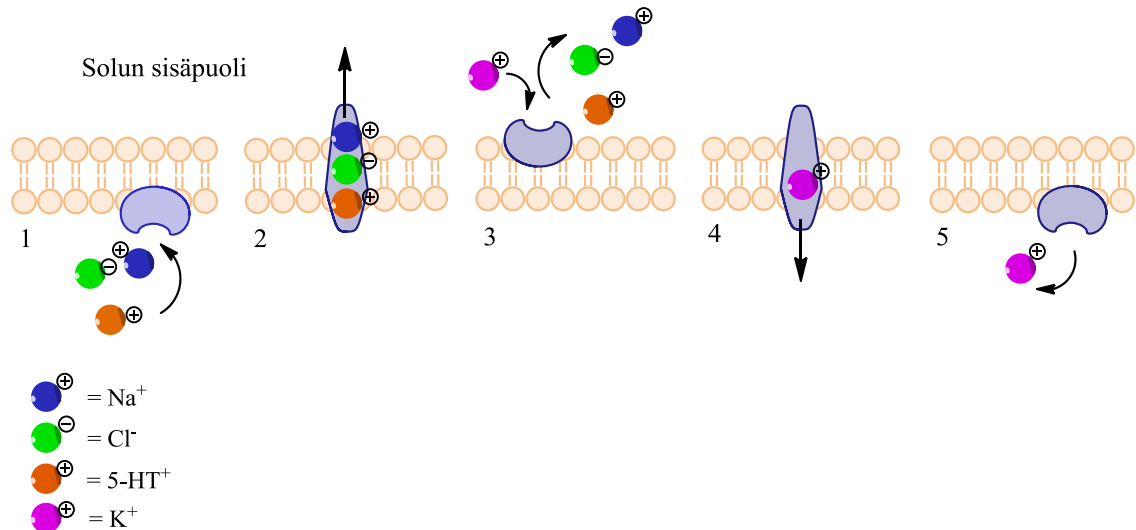
Kuva 1. Serotoniinin synteesi (a) ja hajotus (b).

Serotoniini osallistuu myös ruumiinlämmön, tunne-elämän ja ruokahalun säätelyyn. Lisäksi se toimii unta säätelevän pimeähormoni melatoniinin esiasteena vaikuttaen siten myös uneen. Suurin osa, yli 90 %, elimistön serotoniinista on suolistossa, jossa se saa aikaan suolen supistelua ja liikettä. Tästä johtuen serotoniinin määrään vaikuttavat lääkeaineet voivat aiheuttaa sivuvaikutuksenaan suolisto-oireita. (Huttunen 2008)

2.1 Serotoniinin kuljetusproteiinin rakenne ja toiminta

SLC6A4-kuljetusproteiinin (SERT, 5-HTT) tehtävänä on kuljettaa ylimääräinen serotoniini synapsiraosta takaisin presynaptiseen hermopäätteeseen viestin kuljettua synapsiraon yli. Kuljetusproteiinia koodaava geeni, *SLC6A4*, sijaitsee kromosomissa 17, kohdassa 17q11.2 ja on kooltaan noin 42 kb. SLC6A4-kuljetusproteiini on useiden masennuslääkkeiden inhibition kohteena. Lääkkeiden tavoitteena on nostaa synapsiraon serotoniinipitoisuutta ja näin tehostaa serotoniinivaikutusta, jonka heikentymistä pidetään yhtenä syynä masennukseen. Myös jotkin huumausaineet, kuten kokaiini, voivat suoraan inhiboida SLC6A4-kuljetusproteiinin toimintaa ja muuttaa näin serotoniinipitoisuuksia synapsiraossa. Myös amfetamiini lisää serotoniinin määrää synapsiraossa, mutta sen toimintamekanismi on kokaiiniin verrattuna hieman monimutkaisempi. SLC6A4-inhibition lisäksi amfetamiini sekoittaa hermosolun sisäisiä ionitasoja ja solun ylläpitämiä pH-eroja, jolloin serotoniinia vapautuu myös solun sisäisistä varastoista. (Rudnick 2006)

Serotoniinin kuljetukselle ehdotetun mekanismikuvauksen mukaan (Rudnick 2006) presynaptisen hermosolun solukalvolla olevan SLC6A4-kuljetusproteiinin aktivoituminen vaatii Na^+ -, Cl^- - ja 5-HT^+ -ionien yhtäaikaisen sitoutumisen siihen 1:1:1 stoikiometrialla. Sitoutumisen jälkeen kuljetusproteiinissa tapahtuu konformaation muutos. Konformaatiomuutoksen myötä ionit kulkeutuvat hermosolun sisäpuolelle. Ionien vapauduttua kuljetusproteiinista, niiden tilalle sitoutuu solunsisäinen K^+ -ioni, jonka jälkeen proteiinin konformaatio muuttuu jälleen ja kalium kuljetetaan solusta ulos. Kaliumin vapauduttua solun ulkoiseen tilaan, kuljetusproteiini palautuu alkuperäiseen tilaansa. Kaliumin poiston tarkoituksena on pitää serotoniinin kuljetus elektroneutraalina prosessina. Serotoniinin kuljetus solukalvon läpi on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Serotoniinin kuljetus solukalvon läpi. Serotoniinin, Na⁺ ja Cl⁻ -ionien yhtäaikainen sitoutuminen saa aikaan SLC6A4-kuljetusproteiinin aktivoitumisen (1). Aktivaation seurauksena kuljetusproteiinin konformaatio muuttuu (2) ja serotoniini kuljetetaan solun sisäpuolelle (3). Ionien vapautuessa kuljetusproteiinista niiden tilalle sitoutuu K⁺-ioni, joka seuraavaksi kuljetetaan solusta ulos (3 ja 4 ja 5). Näin kuljetustapahtuma saadaan pysymään elektro-neutraalina prosessina.

2.2 Serotoniinin metabolia

Serotoniinin metaboliasta aivoissa vastaa presynaptisessa hermopäätteessä toimiva entsyymi monoamiinioksidaasi A eli MAOA.

2.2.1 MAOA-entsyymin rakenne ja toiminta

Monoamiinioksidaasi A eli MAOA on MAOA-geenin transkriptiotuotteena syntyvä entsyymi, joka vastaa aivojen välittäjäaineina toimivien serotoniinin, dopamiinin ja noradrenaliinin aineenvaihdunnasta. Mitokondrioiden ulkokalvolla sijaitseva MAOA-entsyymi hajottaa serotoniinia ja dopamiinia katalysoimalla niiden oksidaatiota eli amiiniryhmän poistoa hapetusreaktiossa. Reaktion seurauksena presynaptisen hermopäätteen serotoniini- ja dopamiinipitoisuudet laskevat. MAOA-entsyymiä koodaava geeni sijaitsee X-kromosomissa kohdassa Xp11.3 – Xp11.4 ja se on kooltaan noin 90 kb. (Sabol, Hu et al. 1998)

X-kromosomaalisen sijainnin vuoksi miehet ovat *MAOA*:n suhteen hemitsygootteja, eli heillä on vain yksi alleeli. Naisilla sen sijaan on kaksi X-kromosomia ja näin ollen kaksi alleelia, jolloin nainen voi olla *MAOA*-alleelien suhteen joko hetero- tai homotsygoottinen. On todennäköistä, että näistä alleeleista kuitenkin vain toinen on kerrallaan aktiivinen, koska monien X-kromosomaalisten geenien kohdalla tapahtuu toisen alleelin inaktivaatiota jo varhaisessa alkionkehityksen vaiheessa. (Nordquist and Orelund 2006) Koska X-kromosomin inaktivaatio on tämän hetkisen tiedon mukaan satunnaista, on heterotsygoottisen genotyypin kohdalla on siis mahdotonta sanoa, kumpi alleeleista on aktiivinen. Lisäksi X-kromosomaalisten geenien kohdalla esiintyy mosaikismia, eli eri alleelien aktiivisuus vaihtelee solusta tai kudoksesta toiseen. (Nordquist and Orelund 2006) Näistä syistä naiset, etenkin heterotsygootteina, rajataan usein *MAOA*:ta koskevissa tutkimuksissa tulosten ulkopuolelle. (Reif, Weber et al. 2012)

2.2.2 *MAOA-uVNTR* -polymorfia

MAOA:ta koodaavasta geenistä ylävirtaan oleva vaihteleva toistojakso eli *MAOA-uVNTR* on serotoniinin metaboliaan liitetyn *MAOA*-geenin säätelyalueella oleva polymorfia. Tutkittava alue sijaitsee *MAOA*-geenin promoottorialueella 1,2 kb ylävirtaan transkription aloituskohdasta. Alue koostuu 30 emäksen toistojaksoista. Yksi toistojakso muodostuu viidesti toistuvasta kuuden emäksen ydinsekvenssistä (ACC(A/G/C)G(C/T)). (Sabol, Hu et al. 1998) Toistojaksoja on puolestaan alleelisti riippuen 2, 3, 3.5, 4 tai 5. Kolmen ja neljän toistojakson alleelit ovat näistä yleisimpiä, mutta yleisyyksissä on eroja eri väestöryhmien välillä. Latinalais-amerikkalaisilla ja valkoisella väestöryhmällä neljän toistojakson alleeli on yleisin ja mustilla ja aasialaisilla väestöryhmillä kolmen toistojakson alleeli on yleisin. (Sabol, Hu et al. 1998) Alleelit toistojaksoilla 2, 3.5, ja 5 ovat huomattavasti harvinaisempia.

On havaittu, että toistojaksojen määrä vaikuttaa geenin transkriptotehokkuuteen ja näin ollen myös välittäjäaineiden aineenvaihduntaan. Alleeleista 3.5 ja 4 muodostuvat entsyymit ovat aktiivisuudeltaan 2-10 kertaa tehokkaampia kuin alleeleista 3 ja 5 muodostuvat. (Sabol, Hu et al. 1998) Entsyymiaktiivisuudeltaan tehokkaammat muodot hajottavat serotoniinia aivoissa nopeammin, jolloin synapsirakoon vapautettavissa olevaa serotoniinia on vähemmän. Verrattaessa väkivaltarikoksista tuomittujen ryhmän alleeleja verrokkiryhmiin, alhaisemman entsyymiaktiivisuuden alleelit on liitetty äärimmäiseen väkivaltaiseen käytökseen (Tiihonen, Rautiainen et al. 2014). Nopean entsyymiaktiivisuuden alleelit on taas liitetty vakavaan masennukseen miehillä (Lung,

Tzeng et al. 2011) ja paniikkihäiriöön naisilla (Deckert, Catalano et al. 1999, Reif, Weber et al. 2012). Alleelien 3, 3.5, 4 ja 5 sekvenssit on esitetty kuvassa 3.

Alleeli 3

```
1 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
31 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
61 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
```

Alleeli 3.5

```
1 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
31 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
61 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
91 accggcaccg gcaccagt
```

Alleeli 4

```
1 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
31 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
61 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
91 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
```

Alleeli 5

```
1 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
31 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
61 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
91 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
121 accggcaccg gcaccagtac ccgcaccagt
```

Kuva 3. MAOA-uVNTR -alueen toistojaksot 3, 3.5, 4 ja 5.

MAOA-uVNTR on liitetty myös kohtuuttomaan päiväsaikaiseen uneliaisuuteen eli *excessive daytime sleepiness*, EDS:iin. (Ojeda, Niño et al. 2014) Monet välittäjäaineet kuten serotoniini, dopamiini ja noradrenaliini toimivat uniprosessissa. MAOA-uVNTR on liitetty myös alkoholi-riippuvuuteen, minkä on arveltu johtuvan alkoholin vaikutuksesta MAOA:n metaboloiman dopamiinin määrään. (Samochowicz, Chęć et al. 2015)

3 SSRI -lääkkeet

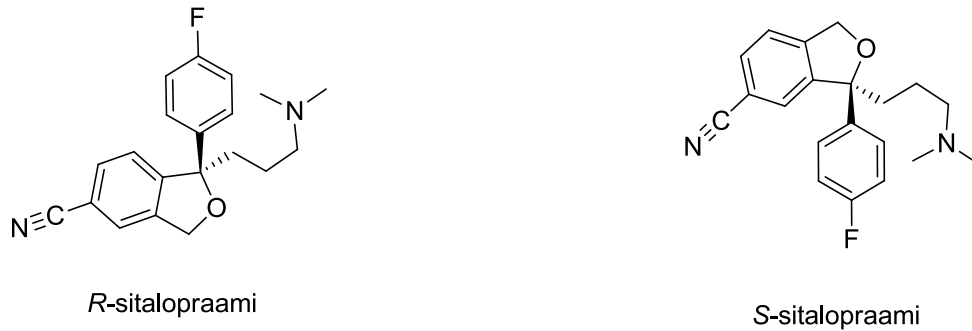
Selektiivinen serotoniinin takaisinoton estäjä eli SSRI, on nimitys ryhmälle lääkeaineita, joita käytetään masennuksen hoitoon. Suomessa ne ovat yleisimpiä masennuksen hoitoon käytettyjä lääkkeitä. SSRI-lääkkeiden teho perustuu spesifiseen serotoniinin takaisinoton estämiseen synapsiraossa, jolloin serotoniinin pitoisuus synapsiraossa pysyy korkeampana ja vaikuttaa postsynaptista hermosolua ärsyttävästi. SSRI-lääkkeiden vaikutus- eli farmakodynaamisena kohteena on presynaptisen hermosolun serotoniinin kuljetusproteiini SLC6A4. SSRI-lääkkeen sitoutuminen kohteeseensa saa aikaan serotoniinin takaisinoton estymisen synapsiraosta presynaptiseen hermopäätteeseen. Spesifisyytensä vuoksi SSRI-lääkkeet eivät juuri vaikuta muiden välittäjäaineiden, kuten dopamiinin määrään. Masennuksen lisäksi SSRI-lääkkeitä käytetään myös muiden psykiatristen sairauksien, kuten ahdistuneisuuden, paniikkihäiriön ja syömishäiriöiden hoidossa. (Kiviniemi V. 2013)

SSRI-lääkkeitä pidetään yleisesti hyvin siedettyinä lääkeaineina juuri spesifisyytensä vuoksi. Lisäksi ne ovat turvallisempia kuin aiemmin paljon käytetyt trisykliset masennuslääkkeet, joilla yliannostuksen riski on huomattava. Suurimman riskin SSRI-lääkityksen kanssa muodostaa serotoniinin hajottamista estävien MAOA-estäjien yhtäaikainen käyttö, joka voi johtaa hengenvaaralliseen serotoniinioireyhtymään. Sen vuoksi lääketyyppiä vaihdettaessa on syytä varata riittävän pitkä varoaika yhteisvaikutuksen poissulkemiseksi. Serotoniinioireyhtymä aiheuttaa levottomuutta, hikoilua, ripulia, sekavuutta ja vakavimmissa tapauksissa se voi johtaa koomaan tai jopa kuolemaan. (Laine 2000)

SSRI-lääkkeille yleisiä haittavaikutuksia ovat seksuaalitoimintojen häiriöt, pahoinvointi, hikoilu, ahdistuneisuus, unettomuus ja suolisto-ongelmat. (Huttunen 2008)

3.1 Sitalopraami

Sitalopraami on yksi SSRI-lääkeryhmään kuuluva masennuslääke. Se on raseeminen seos yhdisteen kahdesta enantiomeerista, inaktiivisesta R-sitalopraamista ja aktiivisesta S-sitalopraamista (kuva 4). Markkinoilla on myös vain yhdisteen aktiivista enantiomeeria S-sitalopraamia sisältävä masennuslääke, essitalopraami.



Kuva 4. Sitalopraamin enantiomeerit, inaktiivinen *R*-sitalopraami ja aktiivinen *S*-sitalopraami.

Sitalopraamin, kuten muidenkin SSRI-lääkkeiden, käytön alussa ahdistuneisuusoireet voivat aluksi lisääntyä ja itsetuhoiset ajatukset voimistua. Tämä lisää itsemurhariskiä hoidon alkuvaiheessa, etenkin nuorilla aikuisilla. Syiksi on esitetty esimerkiksi hoidon tehottomuutta, sivuvaikutuksia ja yksilöllisiä eroja masennuslääkkeiden vaikutuksille. (Healy, Langmaak et al. 1999) On jopa esitetty, että vakavassa masennuksessa lääke aktivoisi passiivisia masennuksen sairastajia siten että itsemurhan tekemisen kynnyks madaltuisi ennen kuin lääkkeen varsinainen hoitovaste alkaa. (Aldred 2005)

3.2 *5HTTLPR* ja rs25531 -polymorfiat

5HTTLPR on serotoniinin kuljetusproteiinia koodaavan *SLC6A4*-geenin säätelyalueella oleva polymorfia. *5HTTLPR*-polymorfia on 20-23 emäksen toistoista muodostuva DNA-jakso. Tästä polymorfista esiintyy pääasiassa kahta muotoa, 16 toistojaksosta muodostuvaa pitkää (long, l) muotoa sekä 14 toistojaksosta muodostuvaa lyhyttä (short, s) muotoa (Nakamura, Ueno et al. 2000). Lyhyessä muodossa 16 toiston jakson keskeltä, toistojaksojen 6-8 alueelta, puuttuu 43 emäksen jakso sekvenssiä ja jäljelle jää 14 toistoa. Deletion seurauksena *SLC6A4*-geenin transkriptiotehokkuus heikkenee, joka puolestaan johtaa alhaisempaan kuljetusproteiinien määrään presynaptisen hermosolun solukalvolla. Alhaisempi kuljetuskapasiteetti heikentää puolestaan serotoniinin takaisinkuljetusta synapsiraosta hermopäätteeseen. *5HTTLPR*-polymorfista on löydetty myös lyhyempiä xs-alleeleja sekä pidempiä xl-alleeleja. (Nakamura, Ueno et al. 2000)

Pituuspolymorfian lisäksi *5HTTLPR*-alueella esiintyy myös toinen geenin transkriptiotehokkuuteen vaikuttava tekijä, yhden nukleotidin polymorfia eli SNP, rs25531. SNP:t ovat yhden nukleotidin muutoksia, joita esiintyy vähintään 1 %:lla väestöstä. SNP voi osua sekvenssissä joko koodaavalle tai ei-koodaavalle alueelle. Koodaavalle alueelle osuessaan SNP voi aiheuttaa aminohapon muutoksen, jolloin proteiinin ominaisuudet voivat muuttua merkittävästi tai se voi olla niin sanottu hiljainen mutaatio, jolloin kodonin koodaama aminohappo ei muutu. SNP voi olla myös geenien säätelyalueilla, kuten rs25531 tapauksessa, jolloin muutos sekvenssissä vaikuttaa geenin transkriptiotehokkuuteen ja sitä kautta proteiinin muodostukseen.

rs25531 on serotoniinin kuljetusproteiinia koodaavan *SLC6A4*-geenin promoottorialueella olevan *5HTTLPR*-polymorfian 16 toistojakson pitkässä muodossa esiintyvä yhden nukleotidin polymorfia. Se sijaitsee sekvenssissä alueella, joka on deletoitunut 14 toistojakson lyhyessä muodossa. SNP:ssä adeniini on vaihtunut guaniiniksi, mikä taas aiheuttaa muutoksen transkriptiotekijän sitoutumiskohtassa. (Hu, Lipsky et al. 2006) Tähän alleeliin on myöhemmin viitattu tekstissä 16G-alleelina. Ilman rs25531 SNP:ä olevaan alleeliin on viitattu tekstissä puolestaan alleelina 16A ja lyhyeen 14 toiston toistojakson alleeliin alleelina 14. Alleelit 16A, 16G ja 14 on esitetty kuvassa 5. rs25531 heikentää *SLC6A4*-geenin transkriptiotehokkuuden lyhyen, 14 toistojakson alleelin tasolle. (Heils, Teufel et al. 1996) Myös 14 ja 16G -alleelien suhteen heterotsygooteilla geenin transkriptiotehokkuus on matalampi 16A-homotsygooteihin verrattuna. (Lesch, Bengel et al. 1996)

Alleeli 16A

```

1   tgcagccctc ccagcatccc ccc
24  tgcaacctcc cagcaactcc c
45  tgtacccttc ctaggatcgc tcc
68  tgcaccccc attatcccc cc
90  ttcacccttc gggcatccc ccc
113 tgcaccccca gcatccccc
133 tgcagcccc ccagcatctc ccc
156 tgcaccccca gcatccccc
176 tgcagccctt ccagcatccc cc
198 tgcacctctc ccaggatctc ccc
221 tgcaaccccc attatcccc c
242 tgcacccttc gcagtatccc ccc
265 tgcaccccc agcatcccc ca
287 tgcacccccg gcatccccc
307 tgcacccttc cagcattctc ct
329 tgcaccctac cagtattccc cc

```

Alleeli 16G

```

1   tgcagccctc ccagcatccc ccc
24  tgcaacctcc cagcaactcc c
45  tgtacccttc ctaggatcgc tcc
68  tgcaccccc attatcccc cc
90  ttcacccttc gggcatccc ccc
113 tgcacccccg gcatccccc
133 tgcagcccc ccagcatctc ccc
156 tgcaccccca gcatccccc
176 tgcagccctt ccagcatccc cc
198 tgcacctctc ccaggatctc ccc
221 tgcaaccccc attatcccc c
242 tgcacccttc gcagtatccc ccc
265 tgcaccccc agcatcccc ca
287 tgcacccccg gcatccccc
307 tgcacccttc cagcattctc ct
329 tgcaccctac cagtattccc cc

```

Alleeli 14

```

1   tgcagccctc ccagcatccc ccc
24  tgcaacctcc cagcaactcc c
45  tgtacccttc ctaggatcgc tcc
68  tgcaccccc attatcccc cc
90  ttcacccttc gggcatccc ccc
113 tgcacccccca gcatccccc
133 tgcagccctt ccagcatccc cc
154 tgcacctctc ccaggatctc ccc
178 tgcaaccccc attatcccc c
199 tgcacccttc gcagtatccc ccc
222 tgcaccccc agcatcccc ca
244 tgcacccccg gcatccccc
264 tgcacccttc cagcattctc ct
286 tgcaccctac cagtattccc cc

```

Kuva 5. Alleelien 16A, 16G ja 14 sekvenssit. Keltaisella merkitty alue on deletoitunut 14 tois-
tojakson alleelissa. rs25531 SNP kohteena oleva emäs on tummennettuna sekvenssissä.

4 Työn tausta ja tavoitteet

Tämän insinööriyön tavoitteena oli pystyttää ja optimoida serotoniinin metaboliaan liitetyn *MAOA-uVNTR*-polymorfian ja sitalopraamin farmakodynamiikkaan liittyvien *5HTTLPR* ja rs25531 -polymorfioiden määrittäminen. Menetelmän pystytyksen ja optimoinnin jälkeen tutkittujen polymorfioiden yleisyys määritettiin oikeuslääketieteellisestä tutkimusaineistosta.

Menetelmän pystytys sisälsi *MAOA-uVNTR* ja *5HTTLPR*-duplexiPCR:n optimoinnin, PCR:ssä muodostuneiden DNA-fragmenttien erottelun kapillaarielektroforeesilaitteistolla ja muodostuneiden elektroferogrammien analysoinnin. Fragmenttianalyysistä saatujen tulosten perusteella *5HTTLPR*-alueen 16 toistojakson sisältävät näytteet jatkokäsiteltiin vielä *MspI*-restriktoentsyymillä ja restriktioentsyymikäsittelyssä muodostuneet DNA-fragmentit eroteltiin vielä uudelleen kapillaarielektroforeesilaitteella rs25531 SNP:n havaitsemiseksi. Lisäksi osana PCR:n optimointia tutkittiin DNA:n degradaatiota eli hajoamista pitkään säilytetyissä vainajanäytteissä ja degradaation vaikutusta DNA:n monistumiseen. Menetelmällä aineistosta määritettyjen tulosten oikeellisuus ja menetelmän luotettavuus varmistettiin lopuksi vielä sekvensoinnin avulla.

Tässä insinööriyössä tutkittava aineisto oli valittu verrokkiaineistoksi sitalopraamin farmakogenetiikan ja itsemurhien välistä yhteyttä tutkivaan väitöskirjatyöhön, jonka tapaus-verrokkitutkimusasetelmaan perustuvan tutkimuksen tarkoituksena on tutkia onko itsemurhan tehneillä sitalopraamin käyttäjillä (tapausryhmä) ja sitalopraaminkäyttäjillä joilla kuolemanluokka on muu kuin itsemurha (verrokkiaineisto) eroa *MAOA-uVNTR* ja *5HTTLPR*-polymorfioiden suhteen.

Työssä määritettävät näytteet oli haettu tietokannasta, eristetty ja kvantitoitu etukäteen. Näytteiden hakukriteerit sekä eristys- ja kvantitointimenetelmät on kuvattu seuraavaksi lyhyesti.

5 Materiaalit ja menetelmät

5.1 Tutkimusaineisto

Tutkimusaineisto koostui Helsingin yliopiston oikeuslääketieteen osastolla vuosina 1998–2012 tutkituista vainajanäytteistä. Näytteet oli haettu toksikologian laboratorion tietokannasta. Tässä insinöörityössä määritettävän aineiston hakukriteereinä olivat positiivinen sitalopraamilöydös, kuolemanluokka muu kuin itsemurha (tapausryhmässä kuolemanluokkana itsemurha), vainajan ikä (± 10 vuotta verrattuna tapausryhmän vainajiin), sukupuoli ja veren alkoholipitoisuus (± 1 ‰ verrattuna tapausryhmän vainajiin). Tapaturmaiset kuolemat jätettiin muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta pois epävarman itsemurhamotiivin vuoksi.

5.2 Näytteiden esikäsittely

Näytemateriaalina eristyksessä oli ruumiinavauksen yhteydessä taltioidut FTA-veritahrapaperit, joista DNA eristettiin puoliautomaattisella eristysrobotilla (Automate Express™ System, Applied Biosystems) käyttäen magneettihelmiin perustuvaa Prepfilier-kemialia (Prepfilier Express™ Forensic DNA Extraction Kit, Applied Biosystems).

Eristyksen jälkeen näytteet kvantitoitiin kvantitatiiviseen reaaliaikaiseen-PCR:ään (qPCR) perustuvalla menetelmällä (Quantifiler Human Plus Quantification Kit, Applied Biosystems). Konsentraatioiden lisäksi määrittäminen antoi tietoa myös DNA:n hajoamisesta eli degradaatiosta, joka tuottaa usein ongelmia oikeuslääketieteellisessä materiaalissa. Mitä suurempia DNA-fragmenteja tutkitaan, sitä enemmän näytteen hajonneisuus vaikuttaa.

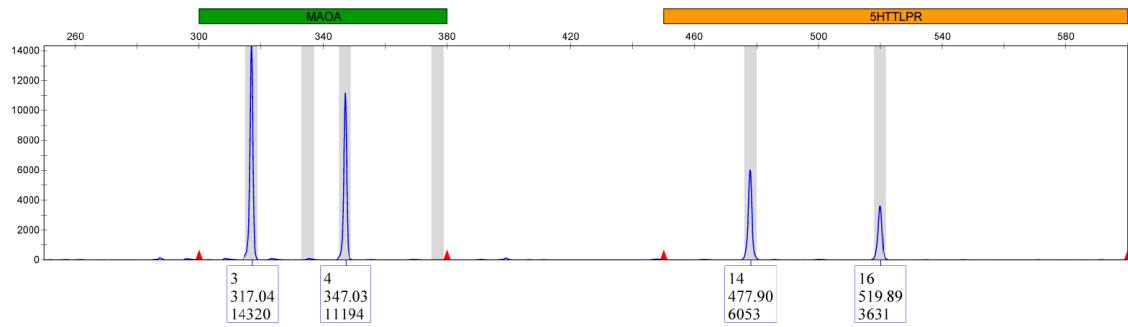
5.3 Degradaation vaikutus ja DNA-konsentraation optimointi

DNA:n hajoamista aiheuttavat UV-valo, kemikaalit, kuumuus, vesi ja hapen läsnäolo, ja se lisääntyy ajan kuluessa. Tässä työssä tutkittiin DNA:n degradaation vaikutusta näytteiden DNA:n monistumiseen eri-ikäisissä näytteissä. Näytteille oli määritetty konsentraatio ja degradaatioindeksi eli DI qPCR:ään perustuvalla menetelmällä. Menetelmässä

määritetään ensin näytteessä monistuvan lyhyen (80 bp) ja hieman pidemmän (214 bp) DNA-fragmentin pitoisuus ja tämän jälkeen lasketaan pitoisuuksien suhde (lyhyt fragmentti (ng/μl) / pitkä fragmentti (ng/μl)), jolloin saadaan niin kutsuttu degradaatioindeksi. Mitä pienempi luku (alle 1) degradaatioindeksi on, eli mitä paremmin pitkä fragmentti monistuu suhteessa lyhyeen fragmenttiin, sitä ehjempää näytteen DNA on. Degradaatioindeksi ei kuitenkaan kerro koko totuutta lopullisen halutun alueen monistumisesta, sillä voi olla, että DNA ei ole kovin hajonnutta juuri monistettavalla alueella vaikka degradaatioindeksi olisi hieman korkeampikin, jolloin PCR-reaktiossa voidaan vielä saada varsin hyvät tulokset.

Tämän degradaatiokokeilun tarkoituksena oli arvioida DNA:n hajonneisuutta pitkään säilytetyissä vainajanäytteissä ja degradaation vaikutusta DNA:n monistumiseen ja sitä myötä arvioida sopivaa DNA-konsentraatiota varsinaisen menetelmän monistusreaktioille. Degradaatiokokeilun näytteet olivat vuosilta 1998–2011 ja niiden degradaatioindeksi oli väliltä 0,76 ja 1,86, siten että vanhemmissa näytteissä DNA oli qPCR-määritysten perusteella hajonneinta. Näytteiden ikäjakauma ja degradaatioindeksin väli valittiin siten, että ne edustaisivat varsinaisten tutkittavien näytteiden ikää ja degradaatiota. Tällöin voitiin arvioida myös varsinaisten näytteiden monistumista. Näytteiden DNA-pitoisuus säädettiin välille 2 -3 ng/μl, jolloin voitiin arvioida myös sopivaa konsentraatiota varsinaisten näytteiden määrittämiselle.

Konsentraatiomääritysten ja degradaation vaikutusta selvittävän tutkimuksen perusteella varsinaiset näytteet laimennettiin DNA-konsentraatioiltaan välille 2-10 ng/μl. PCR:n optimoinnissa käytettiin oikeusbiologian laboratorion henkilökunnan hyvälaatuisia näytteitä. Henkilökunnanäytteistä valikoitui hyvin monistuva, molempien markkereiden suhteen heterotsygootti näyte (kuva 6) positiivikontrolliksi PCR:ään varsinaisten näytteiden rinnalle. Jokaisessa näytesarjassa mukana olevalla positiivikontrollilla voitiin varmistaa PCR-reaktion onnistuminen.



Kuva 6. PCR-reaktiossa käytetty positiivikontrolli, joka on heterotsygoottinen sekä *MAOA-uVNTR*-alueen alleelien 3 ja 4 suhteen että *5HTTLPR*-alueen alleelin 14 ja 16 suhteen.

5.4 Duplexi-PCR-reaktion optimointi

PCR eli polymeerasiketjureaktio on menetelmä, jota käytetään DNA:n monistamiseen. Monistettavan alueen rajaamiseksi monistettavalle DNA-sekvenssille suunnitellaan alukkeet kopioitavan alueen molempiin päihin. PCR-reaktiossa DNA-templaatin kaksoiskierre avataan kuumentamalla, minkä jälkeen lämpötilaa lasketaan hieman alukkeiden kiinnittymiseksi ja nostetaan jälleen nukleotidien liittämiseksi DNA-polymeraasientsyymien toimesta alukkeiden päihin. Tätä denaturointi-annealing-ekstensio-sykliä toistetaan halutun DNA-jakson monistuessa eksponentiaalisesti.

DuplexiPCR:n tarkoituksena on monistaa kahta erillistä DNA-aluetta yhdenaikaisesti samassa PCR-reaktiossa. Tämä asettaa tiukemmat vaatimukset sekä reaktioolosuhteille että käytettävälle lämpötilaohjelmalle, koska molempien alueiden tulisi monistua yhtä hyvin. Ennen varsinaista duplexiPCR:n pystytystä molempien monistettavien alueiden alukkeiden toimivuus testattiin erillisissä PCR-reaktioissa. Koska *MAOA-uVNTR* on kooltaan hieman pienempi, voitiin olettaa, että se monistuu myös hieman paremmin *5HTTLPR*-alueeseen verrattuna. Ensisijaisesti PCR-reaktiota lähdettiin optimoimaan testaamalla reaktiossa eri konsentraatioita, lämpötiloja ja syklien määrää. Reaktiossa käytetyt alukkeet *MAOA-uVNTR* -alueelle saatiin Sabolin ym. (1998) julkaisemasta artikkelista (Sabol, Hu et al. 1998) ja *5HTTLPR* -alueelle saatiin Nakamuran ym. (2000) julkaisemasta artikkelista. (Nakamura, Ueno et al. 2000) Alukkeiden tarkemmat sekvenssit on esitetty liitteessä 1. PCR-reaktiossa käytettiin ns. "touch-down" -

PCR-lämpötilaohjelmaa (taulukko 1), jossa reaktion annealing-lämpötilaa lasketaan portaittain alukkeiden sitoutumisen optimoimiseksi.

Taulukko 1. DuplexiPCR-ohjelma

syklimäärä	lämpötila (°C)	aika (min)
1	95	10:00
	95	0:30
5	61	0:30
	72	1:30
	95	0:30
5	60	0:30
	72	1:30
	95	0:30
5	59	0:30
	72	1:30
1	72	30:00
HOLD	4	∞

Kun monistusreaktio saatiin toimimaan kummankin alukeparin kohdalla, yhdistettiin ne samaan reaktioon. Koska *MAOA-uVNTR* monistui edelleen paremmin verrattuna *5HTTLPR*-alueeseen verrattuna, sen alukkeiden konsentraatioita laskettiin reaktiossa 0,4 µM:sta 0,1 µM:iin jolloin tuloksista saatiin tasaisemmat.

Koska reaktiossa käytetty CleanAmp™ GC Rich PCR 2X Master Mix (TriLink BioTechnologies) on valmis hot-start PCR-reaktioseos sisältäen puskurin, Taq-polymeraasientsyymin ja nukleotidit, reaktioon lisättiin vain alukkeet ja DNA-templaatti. PCR-reaktio pystytettiin jäällä reaktioseoksen lämpötilaherkkyden vuoksi. PCR-reaktion lopputilavuus oli 12,5 µl sisältäen 1x reaktioseoksen, 0,4 µM *5HTTLPR*-alueen alukkeet, 0,1 µM *MAOA-uVNTR*-alueen alukkeet ja 0,16 – 0,8 ng/µl DNA-templaattia. (taulukko 2.)

Taulukko 2. DuplexiPCR-reaktio

PCR-reaktio (12,5 µl)	konsentraatio	1x (µl)
CleanAmp™ 2x PCR Master Mix	1x	6,25
5HTTLPR_F	0,4 µM	0,5
5HTTLPR_R	0,4 µM	0,5
MAOA_F	0,1 µM	0,125
MAOA_R	0,1 µM	0,125
DNA-templaatti	0,16–0,8 ng/µl	1
ddH ₂ O	-	4

5.5 MAOA-uVNTR ja 5HTTLPR genotyyppien määrittäminen

5.5.1 PCR-tuotteiden erottelu kapillaarielektroforeesilla

Monistusreaktion jälkeen syntyneet DNA-fragmentit eroteltiin kapillaarielektroforeesilaitteistolla ja detektoitiin alukkeiden 5´päässä olevan fluoresoivan FAM-leiman avulla. Kapillaarielektroforeesi on menetelmä, jolla voidaan erotella DNA-fragmentteja niiden koon mukaan sähkövarauksen avulla. Kapillaarielektroforeesissa kapillaarien päiden välille muodostetaan sähkövirran avulla jännite-ero, ja negatiivisesti varautuneet DNA-fragmentit kulkevat kapillaarissa (36 cm) olevassa silikapolymeerissä (POP-4) siten että pienimmät fragmentit kulkeutuvat kapillaarin läpi suurempia nopeammin, samaan tapaan kuin perinteisessä agarosigeelielektroforeesissa. Kapillaarielektroforeesilaitteiston UV/Vis-detektori kapillaarin anodipäässä havaitsee kapillaarissa detektorin ohittavat DNA-fragmentit, joissa on laserin virittämä fluoresoiva FAM-leima.

Kapillaarielektroforeesilaitteena oli 24-kapillaarin Genetic Analyzer 3500 xl -laitteisto (Applied Biosystems). Ennen ajoa PCR-tuotteet pipetoitiin formamidiin, johon on lisätty kokostandardi (GeneScan™ 1200 LIZ® dye Size Standard, Life Technologies). Formamidi denaturoi monistuneen DNA:n, jotta ajautuva fragmentti havaittaisiin varmasti oikean kokonsa mukaisesti, ja denaturointi varmistettiin vielä kuumennusjäähdytyskäsittelyllä. Tarkemmat työssä käytetyt kapillaarielektroforeesilaitteiston analyysiparametrit, kuten lämpötilat ja injektioaika, on esitetty liitteessä 2.

5.5.2 Kapillaarielektroforeesiajon tulosten analysointi

Kapillaarielektroforeesissä havaittujen DNA-fragmenttien koon määrittäminen tehtiin GeneMapper® ID-X v. 1.4 -ohjelmistolla. DNA-fragmenttien koon määrittäminen perustui jokaisessa näytteessä mukana olleeseen kokostandardiin. Kokostandardi valittiin tutkittavien fragmenttien koon perusteella, ja koska pisin määritettävistä näytteistä oli noin 520bp, sopi LIZ 1200, jota voidaan käyttää 20 -1200 bp kokoisten DNA-fragmenttien koon määrittämiseen, tähän tarkoitukseen hyvin.

GeneMapper-ohjelmisto käyttää havaitun DNA-fragmentin koon määrittämiseen Local Southern Method-menetelmää, jossa DNA-fragmentin koon määrittäminen perustuu siihen, että määritettävän piikin molemmiin puoliin tulee olla vähintään kaksi tunnettua kokostandardin piikkiä. Tämän jälkeen menetelmä laskee tuntemattoman piikin koon näiden kokostandardipiikkien perusteella. Tarkemmat GeneMapper-ohjelmiston analyysiparametrit on esitetty liitteessä 3.

5.6 rs25531-polymorfian määrittäminen restriktioentsyymikäsittelyllä

Restriktioentsyymit ovat alun perin bakteereista eristettyjä entsyymejä, joita bakteeri käyttää yhtenä puolustusmekanisminaan puolustautuessaan vierasta DNA:ta vastaan. Restriktioentsyymien avulla bakteerit pystyvät pilkkomaan vierasta DNA:ta ja siten estämään sen toiminnan. Restriktioentsyymit katkaisevat kaksijuosteisen DNA:n spesifisesti tietyn emäsjärjestyksen kohdalta. Tässä työssä käytettiin *MspI*-restriktioentsyymiä (Thermo Scientific), joka on eristetty *Moraxella* -suvun bakteereista. Restriktioentsyymi katkaisee kaksijuosteisen DNA:n CCGG tunnustuskohdan ensimmäisen C:n jälkeen (kuva 7), muodostaen juosteille kohessiiviset päät.



Kuva 7. *MspI* – restriktioentsyymien tunnistuskohta

5HTTLPR-alueella olevassa rs25531 A→G SNP:ssä adeniini on vaihtunut guaniiniksi, jolloin sekvenssiin muodostuu juuri *MspI*-restriktioentsyymien tunnistuskohta. Tätä voidaan käyttää hyväksi rs25531:n havaitsemiseksi, sillä mikäli tutkittavalla alueella esiintyy rs25531 SNP, restriktioentsyymi katkaisee DNA-kaksoisjuosteen. Toisaalta, mikäli

tutkittavalla alueella ei löydy rs25531 SNP:iä, restriktioentsyymi ei tunnista kohtaa eikä pilkkoutumista tapahdu. Restriktioentsyymikäsittelyn reaktiivilavuudet sekä käytetty lämpötilaohjelma on esitetty taulukoissa 3 ja 4.

Taulukko 3. *MspI*-digestio

Restriktioentsyymikäsittely (10 µl)	konsentraatio	1x (µl)
ddH ₂ O	-	6,5
10x Buffer Tango	1x	1
MspI (10 U/µl)	5U	0,5
PCR-tuote		2

Taulukko 4. *MspI*-digestiossa käytetty lämpötilaohjelma

lämpötila (°C)	aika (min)
37 °C	180
80 °C	20
4 °C	∞

Digestion jälkeen pilkottu PCR-tuote ajettiin uudelleen kapillaarielektroforeesilla, jolloin näytteessä mahdollisesti oleva rs25531-polymorfia havaittiin digestion tuloksena syntyvien fragmenttien perusteella. Monistetulla *5HTTLPR*-sekvenssin alueella on enemmänkin *MspI*-restriktioentsyymin tunnistamia alueita, jotka kaikki entsyymi katkaisee. Alukkeen 5' -päässä olevan FAM-leiman avulla kapillaarielektroforeesilaitteisto havaitsee kuitenkin vain leikatun DNA-fragmentin, jossa leima on kiinnittyneenä, eli 5' päästä ensimmäiseen leikkauskohtaan. Mikäli monistetulla alueella alleelissa 16 on SNP rs25531, muodostaa se ensimmäisen leikkauskohdan 5' -päästä katsottuna, ja havaitun DNA-pätkän pituudeksi tulee 166 bp (kuva 8). Kapillaarielektroforeesilaitteistolla havaittujen fragmenttien koon määrittäminen tehtiin jälleen GeneMapper-ohjelmistolla, jonka tarkemmat analyysiparametrit on esitetty liitteessä 3.

FAM-
 ggcggttgccgctctgaatgcaagcacctaaccctaataatgtccctaactgcagccctcccagcatccccct
 gcaacctcccagcaactccctgtaccctcctaggatcgctcctgcatccccattatcccccccttac
 ccctcgcgccatccccctgcaccc (~166 bp)

gggcatccccctgcagccccccagcatctccccctgcaccccagcatccccctgcagcccttcagcatccccct
 gcacctctcccaggatctccccctgcaacccccattatccccctgcaccctcgcagtatccccctgcacccccag
 catccccccatgcaccccgggcatccccctgcaccctccagcattctccttgaccctaccagattcccccgcat
 cccgacctccaagcctcccgccaccttgccgtccccgcctggcgtctaggtggcaccagaatcccgcgaggactcc
 accgctgggagctgcctcgcttgcccgtggttgccagctcagtcctc tätä ei havaita

Kuva 8. Restriktioentsyymikäsittelyssä syntyvä DNA-fragmentti alleelille 16G. Kuvassa *MspI*-restriktioentsyymin tunnistuskohdat (CCGG) on merkitty punaisella, alukkeet keltaisella ja turkoosi alue kertoo pitkässä muodossa 16 olevan 43 emäsparin jakson, joka on deletoitunut lyhyessä muodossa 14.

Alleelissa 16A (kuva 9) ei ole rs25531 SNP:iä, tällöin ensimmäinen leikkauskohta sekvenssissä tulee vastaan myöhemmin, kohdassa 340 bp.

FAM-
 ggcggttgccgctctgaatgcaagcacctaaccctaataatgtccctaactgcagccctcccagcatccccct
 gcaacctcccagcaactccctgtaccctcctaggatcgctcctgcatccccattatcccccccttac
 ccctcgcgccatccccctgcaccccagcatccccctgcagccccccagcatctccccctgcacccc
 agcatccccctgcagcccttcagcatccccctgcacctctcccaggatctccccctgcaacccccatta
 tccccctgcacccctcgcagtatccccctgcacccccagcatccccccatgcacc (340 bp)

gggcatccccctgcacccctccagcattctccttgaccctaccagattcccccgcatccggacctccaagcctcc
 cgccaccttgccgtccccgcctggcgtctaggtggcaccagaatcccgcgaggactccaccgctgggagctgcc
 tcgcttgcccgtggttgccagctcagtcctc tätä ei havaita

Kuva 9. Restriktioentsyymikäsittelyssä syntyvä DNA-fragmentti alleelille 16A. Kuvassa *MspI*-restriktioentsyymin tunnistuskohdat (CCGG) on merkitty punaisella, alukkeet keltaisella ja turkoosi alue kertoo pitkässä muodossa 16 olevan 43 emäsparin jakson, joka on deletoitunut lyhyessä muodossa 14.

Lyhyt alleeli 14 (kuva 10) tuottaa restriktioentsyymikäsittelyssä 297 bp pituisen fragmentin. Alleelista puuttuu kokonaan 43 bp, kahden toiston kokoinen alue, jolla rs25531 sijaitsee 16G-alleelissa.

FAM-
ggcgttgccgctctgaatgccagcacctaaccocctaagtccctactgcagccctcccagcatccccct
gcaacctcccagcaactccctgtaccocctcctaggatcgctcctgcacccccattatccccccctcac
ccctcgcgggcatccccctgcacccccagcatccccctgcagccctccagcatccccctgcacctctc
ccaggatctccccctgcaacccccattatccccccctgcacccctcgagatccccctgcacccccagc
atccccccatgcaccc**c** (297bp)

cgccatccccctgcacccctccagcattctccttgacccctaccagatattccccgcac**ccgg**cctccaagcctcc
cgcccaccttgccgtccccgcctggcgtctaggtggcaccagaatccccgcggactccaccgctgggagctgcc
tcgcttgccc**gtgggttgccagctcagtcctc** tätä ei havaita

Kuva 10. Restriktioentsyymikäsittelyssä syntyvä DNA-fragmentti alleelille 14. Kuvassa *MspI*-restriktioentsyymin tunnistuskohdat on merkitty punaisella ja alukkeet keltaisella.

Lisäksi restriktioentsyymi katkaisee myös kaikki monistetulla *MAOA-uVNTR*-alueella olevat CCGG-sekvenssit (kuva 11), mutta kapillaarielektroforeesilla havaitaan jälleen vain 99 emäsparin kokoinen DNA-fragmentti leimallisesta 5'-päädystä ensimmäiseen katkaisukohtaan asti. *MAOA-uVNTR*:stä muodostuva fragmentti on kuitenkin niin lyhyt, ettei se häiritse rs25531-polymorfian tulkintaa.

FAM-
acagcctgaccgtggagaagggctgcgggaagcagaacaccgccccagcgcgccagcgtgctccagaaac
atgagcacaaaacgcctcagcctccttcc**c** (99bp)

cgccggcaccggcaccggcaccagtagccgcaccagtagccggcaccggcaccagtagccgcaccagtagccggcaccgg
caccagtagccgcaccagtagccggcaccggcaccgagcgaaggcggaggcccgccccgaagccgggggcacaactgc
ccaggtcccgaaccggactccagcttggacgacacctctacagcctg**cccgaatggagcgtccgttc** tätä ei
havaita

Kuva 11. Restriktioentsyymikäsittelyssä syntyvä DNA-fragmentti *MAOA-uVNTR*-alueelle. Kuvassa *MspI*-restriktioentsyymin tunnistuskohdat on merkitty punaisella ja alukkeet keltaisella.

5.7 Sekvensointi

Genotyypimäärityksissä havaitut alleelit varmistettiin vielä sekvensoimalla. Etenkin yhden emäksen muutos, SNP rs25531 *5HTTLPR*-alueella, oli hyvä tarkistaa, sillä restriktioentsyymi vaikutti pilkkovan epäspesifisesti 16G-alleelin sekvenssiä.

Sekvensoinnilla tarkoitetaan DNA:n emäsjärjestyksen selvittämistä. Tässä työssä käytetty menetelmä on niin kutsuttu Sangerin menetelmä, joka perustuu polymeerasireaktioon ja muokattuihin, leimallisiin dideoksinukleotideihin (ddNTP). Polymeerasireaktiossa on sekä tavallisia nukleotidejä että vähän dideoksinukleotidejä, joita polymeerasi käyttää syntetisoidessaan DNA:ta. Liitettään dideoksinukleotidin ei polymeerasi pysty enää liittämään juosteeseen uutta nukleotidiä ja synteesi katkeaa. Sekvensointi perustuu polymeerasireaktiossa näin muodostuneisiin eripituisiin DNA-fragmentteihin. Dideoksinukleotidit emittoivat fluoresenssia eri aallonpituuksilla, jolloin jokainen fragmentti havaitaan siihen kiinnittyneen leimallisen dideoksinukleotidin mukaisesti omana erivärisenä piikkinään kapillaarielektroforeesijossa.

Sekvensointia varten valittiin näytteet, jotka olivat PCR-tuotteen kapillaarielektroforeesitulosten perusteella tulkittu *MAOA-uVNTR*-alueen osalta homotsygooteiksi alleelien 3, 3.5, 4 ja 5 suhteen. *5HTTLPR* ja rs25531 -alueiden osalta valittiin sekvensointiin näytteet, jotka oli aiemman PCR-tuotteiden analysoinnin ja restriktioentsyymikäsittelyn jälkeisen digestiotuotteiden analyysin jälkeen tulkittu homotsygooteiksi alleeleiksi 14, 16A ja 16G. Näytteet sekvensoitiin 24-kapillaarin ABI 3500 xl -laitteistolla.

Sekvensointia varten näytteet monistettiin uudelleen. Molemmat alueet, *MAOA-uVNTR* ja *5HTTLPR* monistettiin omissa PCR-reaktioissaan (taulukko 2). Alukkeet olivat sekvenssiltään samat kuin aiemmin kappaleessa 5.4 kuvatussa PCR-reaktiossa, mutta forward-alukkeissa ei ollut FAM-leimaa, sillä fluoresoiva leima häiritsee sekvensoinnissa käytettävien leimallisten nukleotidien luettavuutta. Lämpötilaohjelma oli sama kuin aiemmin kuvatussa PCR-reaktiossa (taulukko 1).

Monistuksen jälkeen PCR-tuotteet ajettiin 1,5 % agarosigeelille PCR-reaktion onnistumisen tarkastamiseksi. Agarosigeelielektroforeesissa käytetty kokomarkkeri oli DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche Diagnostics), joka sopii välillä 19bp -1 114 bp kooltaan olevien DNA-fragmenttien tunnistamiseen.

Kun PCR-reaktion onnistuminen oli varmistettu, PCR-tuotteiden käsittelyä jatkettiin poistamalla sekvensointia häiritsevät, monistusreaktiosta ylijääneet nukleotidit ja alukkeet ExoSAP-puhdistusmenetelmällä. ExoSAP -reaktiossa toimivat exonukleaasi I (EXO I) (GE Healthcare) poistaa PCR-tuotteesta ylimääräiset alukkeet ja Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (GE Healthcare) ylimääräiset dNTP-nukleotidit entsyymaattisesti tietyssä lämpötilassa.

Puhdistuksen jälkeen polymeerasireaktiolla monistetaan haluttu alue käyttämällä tavallisten dNTP-nukleotidien lisäksi fluoresoivia dideoksiribonukleotidejä (ddNTP), sekä samoja, leimaamattomia alukkeita kuin aiemmassa PCR-reaktiossa. Reaktiossa käytettävät leimalliset ddNTP-nukleotidit pysäyttävät DNA:n monistumisen kiinnittyttyään, jolloin polymeerasireaktiossa muodostuu eripituisia DNA-fragmenttejä, jotka havaitaan kapillaarielektroforeesilla ja viimeinen, leimallinen ddNTP-emäs voidaan tunnistaa sen emittoivan fluoresenssivärin perusteella. Yhteen reaktioon käytetään vain yhteen suuntaan toimivaa aluketta. Yhdelle näytteelle tehdään siis kaksi reaktiota, joissa toisessa on forward- ja toisessa reverse -suuntainen alue. Kahteen suuntaan sekvensoitaessa voidaan varmistaa sekvensoinnin onnistuminen ja saatujen tulosten luotettavuus.

Polymeerasireaktion jälkeen ylimääräiset, sekvensointia häiritsevät, leimalliset ddNTP-nukleotidit poistettiin sekvensointireaktioseoksesta magneettisiin helmiin perustuvalla Dynabeads-sekvensointipuhdistusmenetelmällä (Life Technologies).

Sekvensoinnissa käytetyt ExoSAP-puhdistusmenetelmä, sekvensointireaktio ja Dynabeads-sekvensointipuhdistusmenetelmä on tehty käyttäen mukailien oikeusbiologian laboratorion menetelmäohjetta, joka on esitetty liitteessä 4.

Näytteet sekvensoitiin 24-kapillaarin Genetic Analyzer 3500 xl-kapillaarielektroforeesilaitteistolla (Applied Biosystems). Käytössä oli 50 cm kapillaari ja POP-7 silikapolymeeri. Tarkemmat laitteiston sekvensoinnissa käytetyt analyysiparametrit on esitetty liitteessä 5.

Sekvensoinnin jälkeen sekvenssit analysoitiin 4peaks-ohjelmistolla (Nucleobytes). Ohjelmiston avulla sekvenssejä voidaan tarkastelun lisäksi muokata ja korjata.

5.8 Tilastollinen tarkastelu

Aineistosta havaituille alleeleille laskettiin alleelifrekvenssit, eli alleelien yleisyys aineistossa. Määritetyille *5HTTLPR*-alleelifrekvensseille 14, 16G ja 16A, laskettiin GenAIEx-ohjelmiston (Peakall and Smouse) avulla Hardy-Weinbergin tasapainojakauma, mikä on yksi populaatiogenetiikan perusyhtälöistä. Oletuksena on, että väestössä genotyypifrekvenssit ovat Hardy-Weinberg -tasapainossa. Hardy-Weinbergin tasapainojakamalla siis voidaan määrittää, vastaako verrokkiaineisto väestöä ja onko se siten soveltuva vertailuaineistoksi varsinaisen tapausryhmän kanssa, eikä siinä ole tuloksia poikkeuttavia tekijöitä, esimerkiksi genotyypitysmenetelmästä johtuvaa virhettä. Genotyyppien frekvenssien on oltava johdettavissa alleelifrekvensseistä ($a^2+2ab+b^2=1$, jossa a= alleeli 1 frekvenssi ja b= alleeli 2 frekvenssi) kun oletetaan alleelien vapaa rekombinaatio. Jakauman tilastollinen testaus tehtiin χ^2 -testillä.

MAOA-uVNTR-alueen alleeleista Hardy-Weinbergiä ei voida määrittää miesten hemisyygoottisuuden vuoksi.

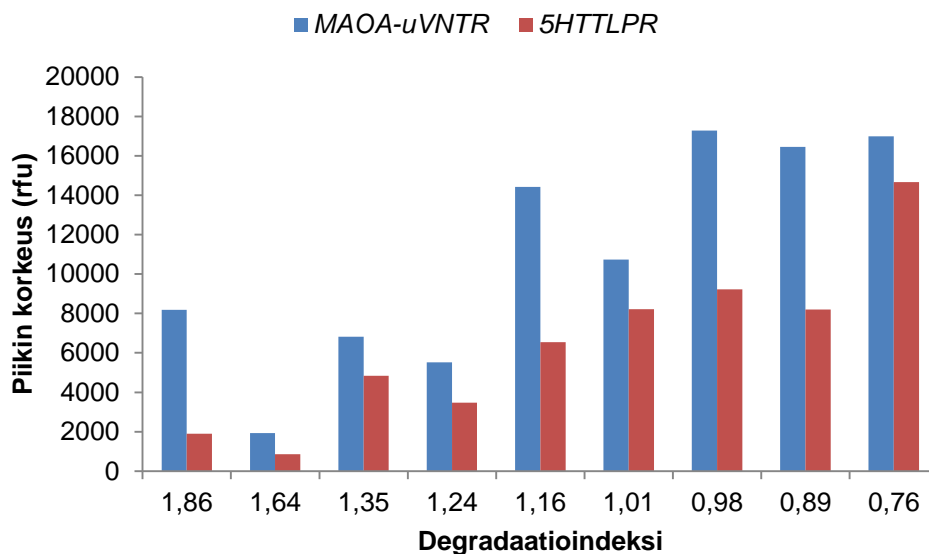
6 Tulokset ja tulosten tarkastelu

6.1 Menetelmän pystytys

Erillisinä tehtyjen PCR-reaktioiden perusteella *MAOA-uVNTR*-alue monistui hyvin testatuissa olosuhteissa mutta ongelmaksi muodostui *5HTTLPR*-alue. Pituuden lisäksi PCR-reaktion onnistumista hankaloitti *5HTTLPR*-alueen G-C-rikkaus, mikä haittaa monistumista muodostuvien sekundäärirakenteiden vuoksi.

PCR:n perinteisten parametrien, lämpötilojen ja magnesiumkloridin sekä alukkeiden konsentraatioiden optimointi ei parantanut *5HTTLPR*-alueen monistumista. Alue saatiin lopulta monistumaan valmiin, G-C-rikkaalle alueelle suunnitellun PCR-reaktioseoksen avulla. Kyseinen reaktioseos sisältää modifioituja 7-deaza-2'-dGTP-nukleotideja, jotka korvaavat osan dGTP-nukleotideista dNTP-seoksessa. 7-deaza-2'-dGTP-nukleotidien on todettu helpottavan PCR-reaktion onnistumista, koska ne stabiloivat DNA-sekvenssin G-C-rikkaita alueita, jolloin PCR-reaktiota häiritsevien sekundäärirakenteiden muodostuminen vähenee.

Kuvasta 15 voidaan nähdä, että degradaatiolla on vaikutusta määritettävien alueiden monistumiseen. Mitä vanhempi näyte ja suurempi degradaatioindeksi, sitä heikommin alue monistuu. Tämä on nähtävissä etenkin *5HTTLPR*-alueen kohdalla, joka on monistettavista alueista pidempi. Degradaatiokokeilun tulosten perusteella päätettiin, että varsinaiset näytteet laimennetaan DNA-pitoisuudeltaan välille 2 – 10 ng/μl, jolloin myös hieman enemmän hajonneet näytteet monistuisivat paremmin.



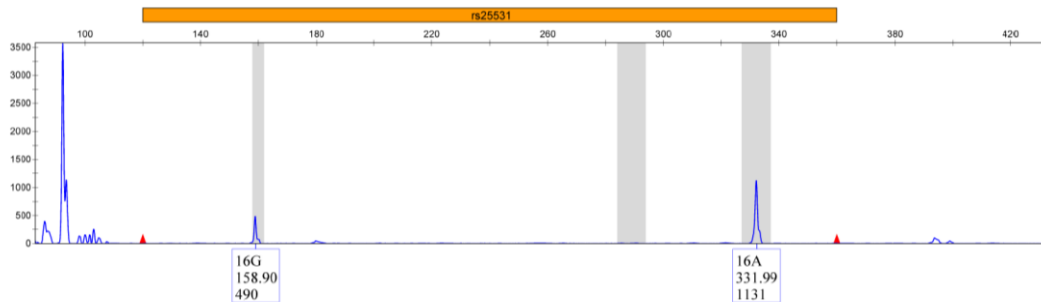
Kuva 12. Kuvaajassa pylvään korkeus kertoo alueen monistumisesta; mitä korkeampi piikki, sitä paremmin alue on monistunut. Heterotsygoottien näytteiden kohdalla alleelien piikkien korkeudet on laskettu yhteen. Näytteet olivat vuosilta 1998–2011 ja niiden degradaatioindeksi oli väliltä 0,76 ja 1,86, siten että vanhemmissa näytteissä DNA oli hajonneinta.

Kun molemmat määritettävät alueet saatiin lopulta monistumaan reaktiossa ja konsentraatiot viilattua sopiviksi sekä DNA-templaatile että alukkeille, pystytetty duplesiPCR-menetelmä toimi hyvin niin vanhempien kuin uudempienkin näytteiden kohdalla.

Restriktioentsyymikäsittelyn jälkeen ongelmia tuotti 16G-alleelin tulkinta. Restriktioentsyymi vaikutti pilkkovan hieman epäspesifisesti, siten, että se ei katkaissut jokaisesta SNP rs25531:n luomasta, alueen ensimmäisestä, CCGG-tunnistuskohdasta, vaan vasta myöhemmästä tunnistuskohdasta, jolloin elektroferogrammissa havaittiin 16G-piikin lisäksi myös pieni piikki 16A-alleelin kohdalla. Tämä saattoi johtua myös liian lyhyestä inkubointiajasta. Sekvensoimalla voitiin kuitenkin varmistua oikeasta alleelistä ja alleelin tulkinnasta. Elektroferogrammien vasemmassa reunassa nähtävistä piikeistä korkea piikki on *MAOA-uVNTR*-alueesta aiheutunut piikki, sekä muut alkupäässä havaittavat piikit ovat todennäköisesti alukkeista aiheutuvia.

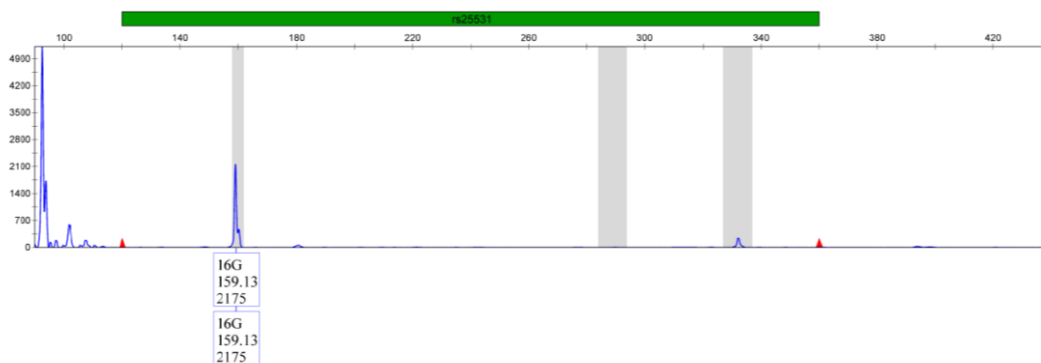
Elektroferogrammeja tulkittaessa heterotsygootissa 16G/16A-genotyypissä 16A-piikki on huomattavasti korkeampi kuin 16G-piikki, sillä alleelin 16G-alleelin kohdalla restriktioentsyymi on jättänyt katkaisematta osan SNP:n luomista tunnistuskohdista (kuva

16). Vasemmalla kuvassa on nähtävissä korkea *MAOA-uVNTR*-alueesta aiheutunut piikki.



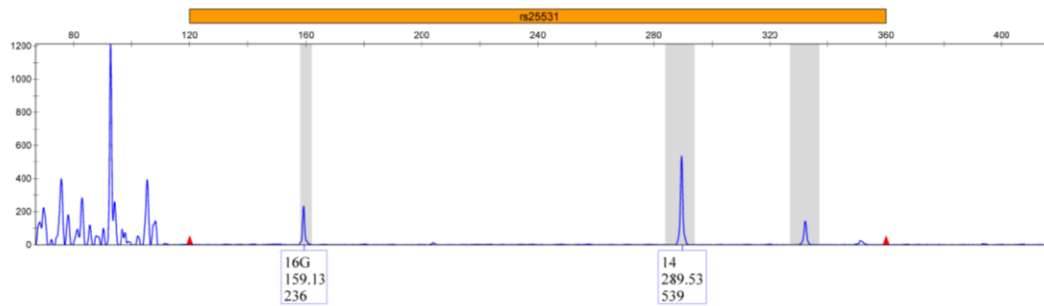
Kuva 13. Genotyypin 16G/16A elektroferogrammi.

Myös homotsygotissa 16G-genotyypissä (kuva 17) on havaittavissa pieni piikki alleelin 16A kohdalla restriktioentsyymien epäspesifisen katkaisemisen vuoksi, mutta koska 16G-alleelin aiheuttama piikki oli huomattavasti korkeampi, päätettiin, että kyseessä on homotsygoti 16G/16G-genotyyppiä oleva näyte. Tulkinta varmistettiin kuitenkin vielä sekvensoimalla.



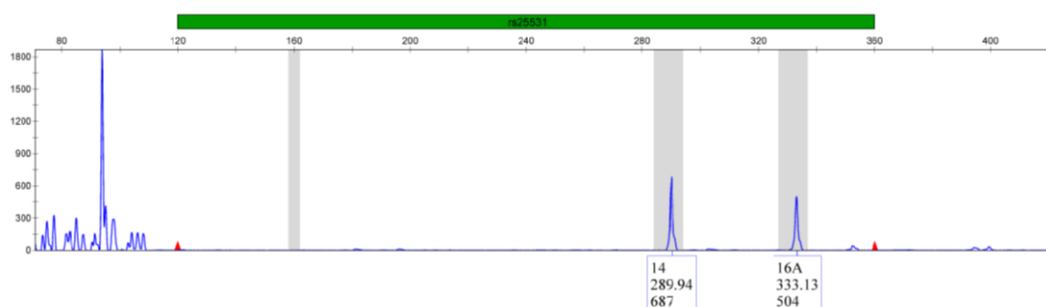
Kuva 14. Homotsygoti 16G-genotyyppi. Elektroferogrammissa on nähtävissä pieni piikki alleelin 16A kohdalla, mikä johtuu *MspI*-restriktioentsyymien epäspesifisestä katkaisemisesta ensimmäisen leikkauskohdan kohdalla.

Heterotsygoottisen 14/16G-genotyypin kohdalla elektroferogrammissa havaittiin kolme piikkiä, joista jälleen korkeampi 16G-piikki kuin 16A-piikki kertoi alleelin 16G olevan oikea alleeli. Tämä on nähtävissä kuvassa 18.

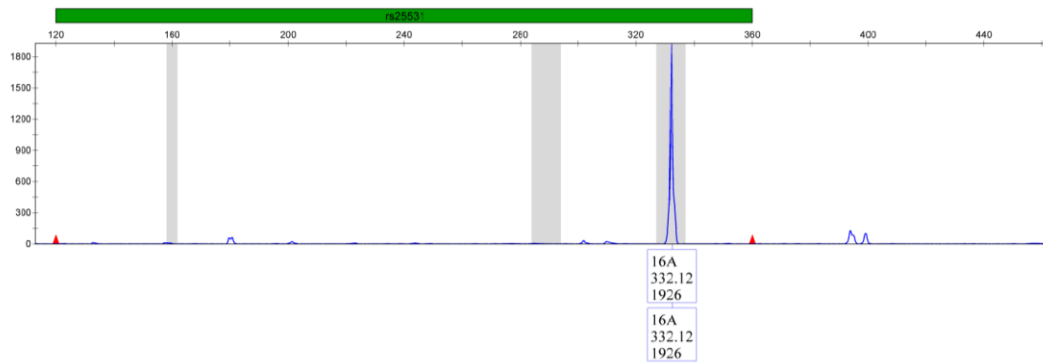


Kuva 15. Genotyyppi 14/16G.

Homotsygootin 16A ja heterotsygootin 14/16A-genotyyppien kohdalla elektroferogrammit olivat hyvin selkeät (kuvat 19 ja 20). Vasemmassa reunassa nähtävä korkea piikki on *MAOA-uVNTR*-alueesta aiheutunut piikki.

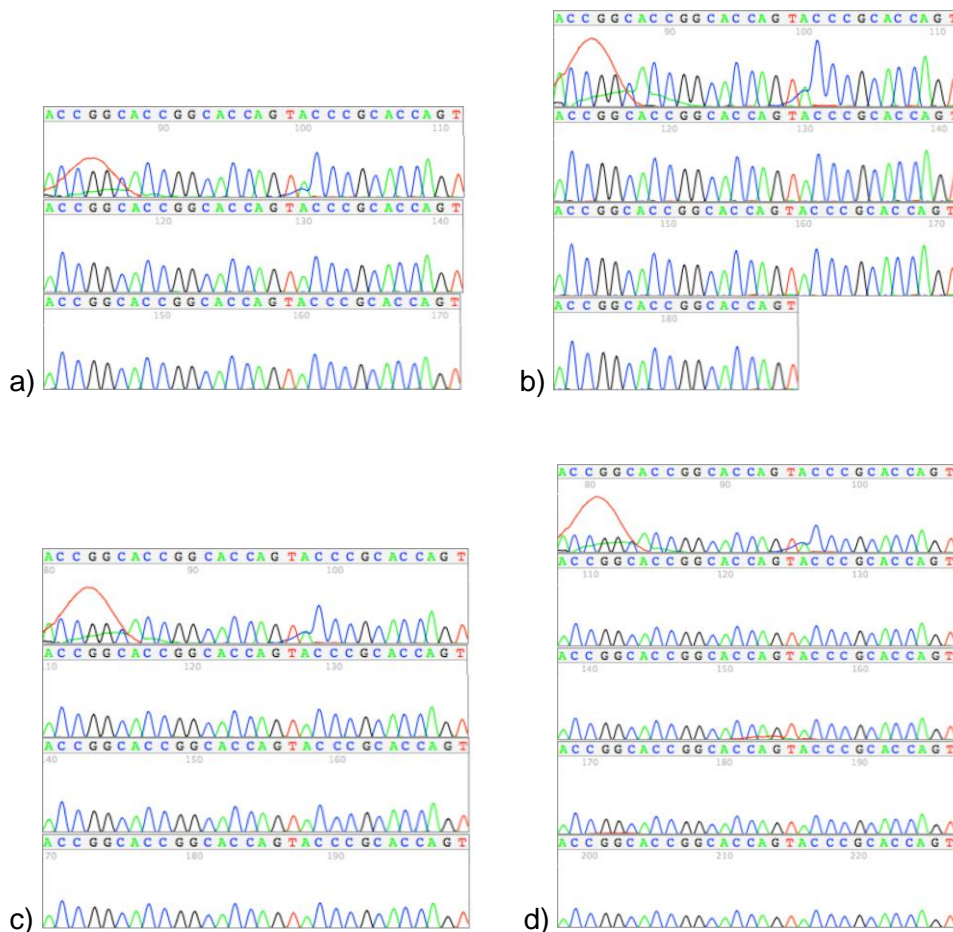


Kuva 16. Genotyyppi 14/16A.



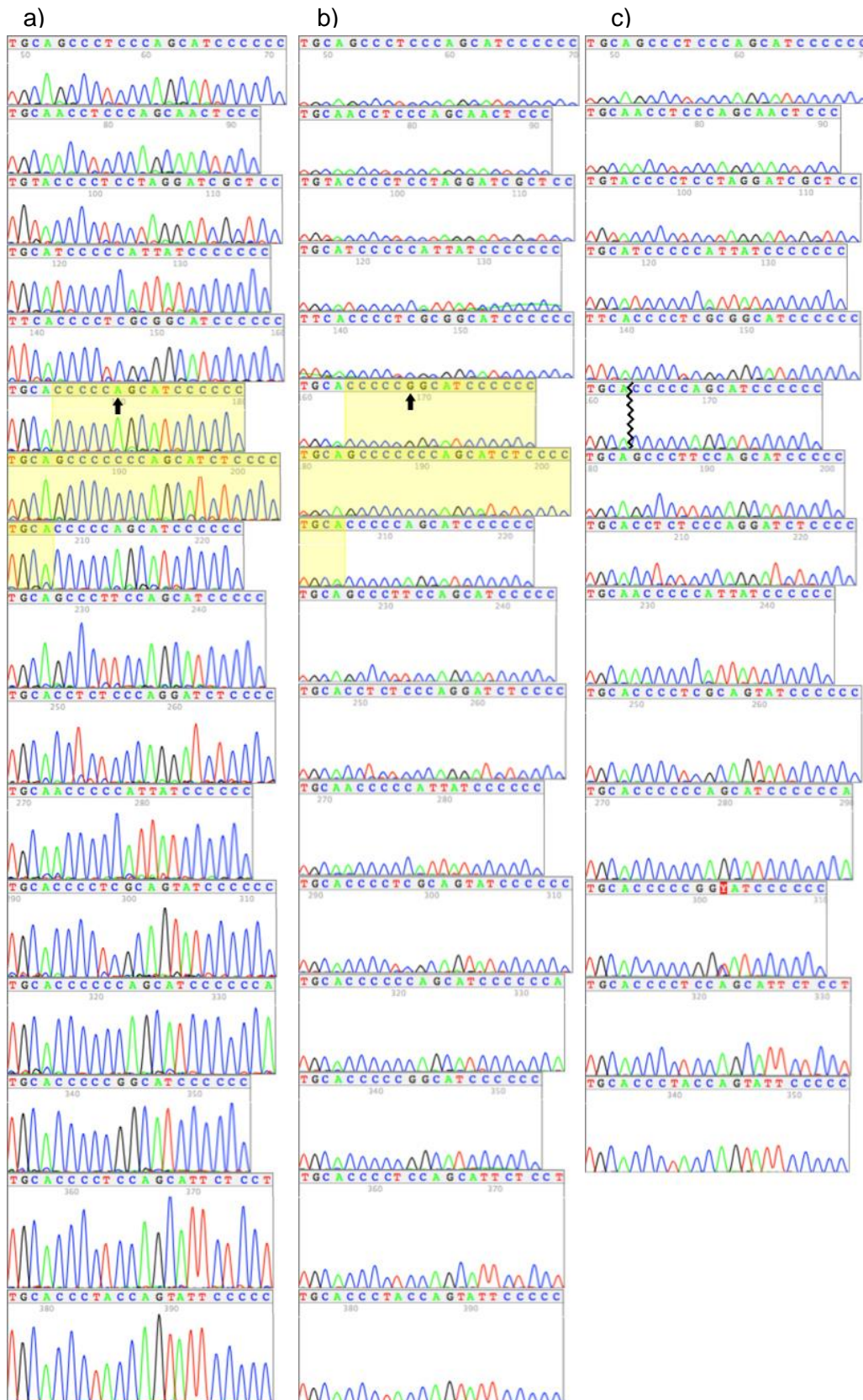
Kuva 17. Elektroferogrammi genotyypistä 16A.

Sekvensoinnilla vielä varmistettiin alleelien oikea tulkinta. Sekvensointiin valittiin ho-motsygotit näytteet jotta muodostuva sekvenssi olisi luettavaa. *MAOA-uVNTR*-alueen sekvenssit alleeleista 3, 3.5, 4 ja 5 on esitetty kuvassa 18.



Kuva 18. *MAOA-uVNTR*-alueen alleelit 3 (a), 3.5 (b), 4(c) ja 5 (d).

Etenkin *5HTTLPR*-alueen polymorfoiden sekvensointi oli tarpeellista, sillä restriktioentsyymien epäspesifisyys vaati varmistuksen alleelien tulkinnalle 16G ja 16A -alleelien kohdalla. Sekvensointiin valittiin näytteet jotka oli tulkittu homotsygooteiksi alleelien 16A (kuva 19 a), 16G (kuva 19 b) ja 14 (kuva 19 c) suhteen kapillaarielektroforeesin elektroferogrammeja tulkittaessa. Sekvensointi vahvisti tulkinnan että 16G-alleeli on homotsygootti vaikka restriktioentsyymikäsittelyn jäljiltä myös 16A:n kohdalla on nähtävissä pieni piikki.



Kuva 19. *5HTTLPR*-alueen alleelien 16A (a) , 16G (b) ja 14 (c) sekvenssit. Keltaisella merkitty alue on deletoitunut 14 toistojakson alleelissa, johon deletoitumiskohta on merkitty sahalaikuvilla. rs25531 SNP:n aiheuttama yhden nukleotidin muutos on merkitty kuviin a ja b nuolella.

6.2 Polymorfioiden yleisyyden määrittäminen

Menetelmän pystytyksen jälkeen polymorfioiden yleisyys määritettiin oikeuslääketieteellisestä tutkimusaineistosta. Yksi näyte jouduttiin jättämään aineiston ulkopuolelle kontaminaatioepäilyn vuoksi. Kontaminaatiota epäiltiin, koska näyte oli heterotsygoottinen X-kromosomissa sijaitsevan *MAOA-uVNTR*-alleelien suhteen vaikka kyseessä oli mies. Kontaminaatio varmistettiin vielä yksilöntunnistusanalytiikassa rutiinisti käytettävän GlobalFiler-menetelmän (Applied Biosystems) avulla, määrittämällä näytteestä yksilöntunnistuksessa käytettävä autosomaalinen mikrosatelliittiprofiili. Lisäksi yksi käsiteltävistä näytteistä oli niin rasvainen, ettei siitä saatu lainkaan tuloksia. On mahdollista, että näytteen sisältämä rasva inhiboi joko lämpötilojen tai reagenssien vaikutusta PCR-reaktiossa. Lopullinen aineisto koostui 282 näytteestä, joista 158 oli miehiä ja 124 naisia.

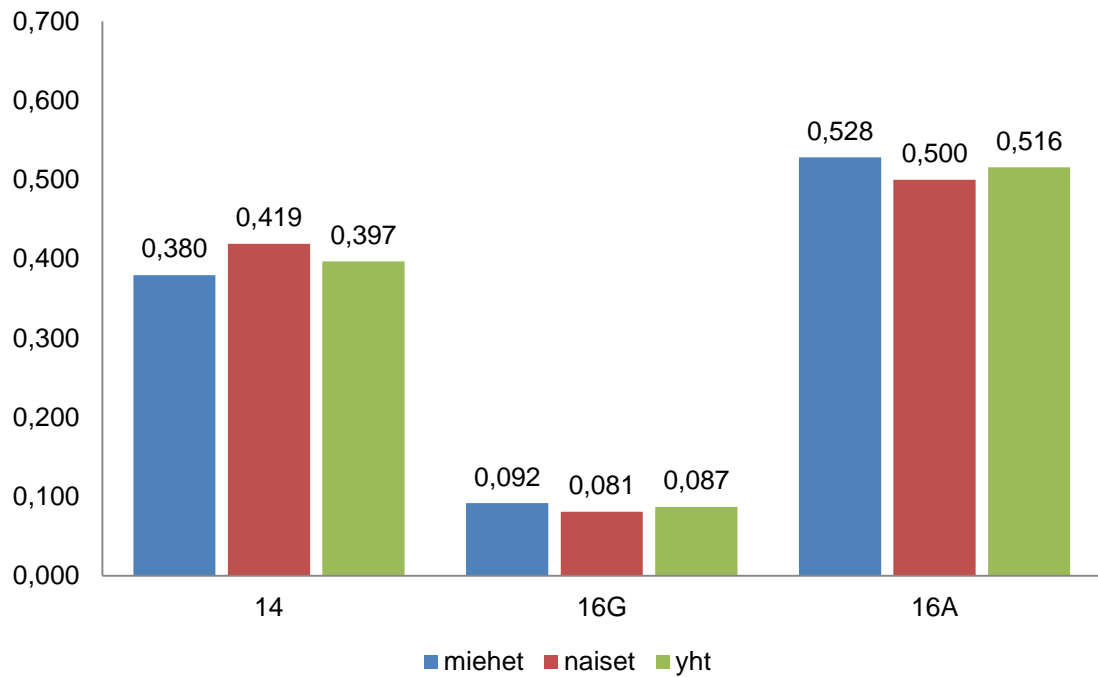
6.2.1 *5HTTLPR* ja rs25531

Taulukossa 5 on esitetty aineistossa havaitut *5HTTLPR*-alueen genotyyppien osuudet. Saaduista tuloksista laskettiin *5HTTLPR*-alleelien alleelifrekvenssit (kuva 20), sekä miehille ja naisille erikseen että yhteisesti. Alleelifrekvensseistä voidaan havaita, että aineistossa yleisin alleeli on normaalilla transkriptiotehokkuudella toimiva alleeli 16 A.

Taulukko 5. Genotyyppifrekvenssit *5HTTLPR* ja rs25531

	14,14	14, 16G	16G, 16G	14, 16A	16G, 16A	16A, 16A
Miehet	15,2 % (24*)	7,0 % (11)	1,3 % (2)	38,6 % (61)	8,9 % (14)	29,1 % (46)
Naiset	18,5 % (23)	5,6 % (7)	0,8 % (1)	41,1 % (51)	8,9 % (11)	25,0 % (31)
Yhteensä	16,7 % (47)	6,4 % (18)	1,1 % (3)	39,7 % (112)	8,9 % (25)	27,3 % (77)

*) Aineistossa havaittu lukumäärä



Kuva 20. 5HTTLPR-alueen alleelifrekvenssit.

Aineistosta määritettyä genotyypijakaumaa verrattiin Hardy-Weinbergin tasapainossa olevaan teoreettiseen genotyypijakaumaan, joka muodostettiin aineiston alleelifrekvenssien perusteella (taulukko 6). Jakauman testaukseen käytettiin χ^2 -testiä. Vapausasteita oli testissä kolme. Tulosten perusteella tutkittu aineisto oli Hardy-Weinbergin tasapainossa, ($\chi^2=0,772$, $p=0,856$) eli havaittu ja odotettu genotyypijakauma eivät poikenneet tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. Tämä osoittaa että populaatiossa ei ole havaittavissa tuloksia poikkeuttavia tekijöitä, esimerkiksi valintaa tai genotyypitysmenetelmästä johtuvaa virhettä, minkä vuoksi se soveltuu hyvin vertailuaineistoksi itsemurhan tehneitä sitalopraamin käyttäjiä tutkivaan väitöskirjatyöhön.

Taulukko 6. Hardy-Weinbergin tasapainojakauma. Aineistossa havaittujen genotyyppien sekä aineiston alleelifrekvenssien perusteella laskettujen odotettujen genotyyppien frekvenssit.

Genotyyppi	#Havaittu	#Odotettu
14, 14	47	44
14, 16G	18	19
16G, 16G	3	2
14, 16A	112	116
16G, 16A	25	25
16A, 16A	77	75
χ^2	0,772	
Vapausasteet	3	
Prob	0,856 ns	

Selitys: ns = ei tilastollisesti merkitsevä (not significant), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

6.2.2 MAOA-uVNTR

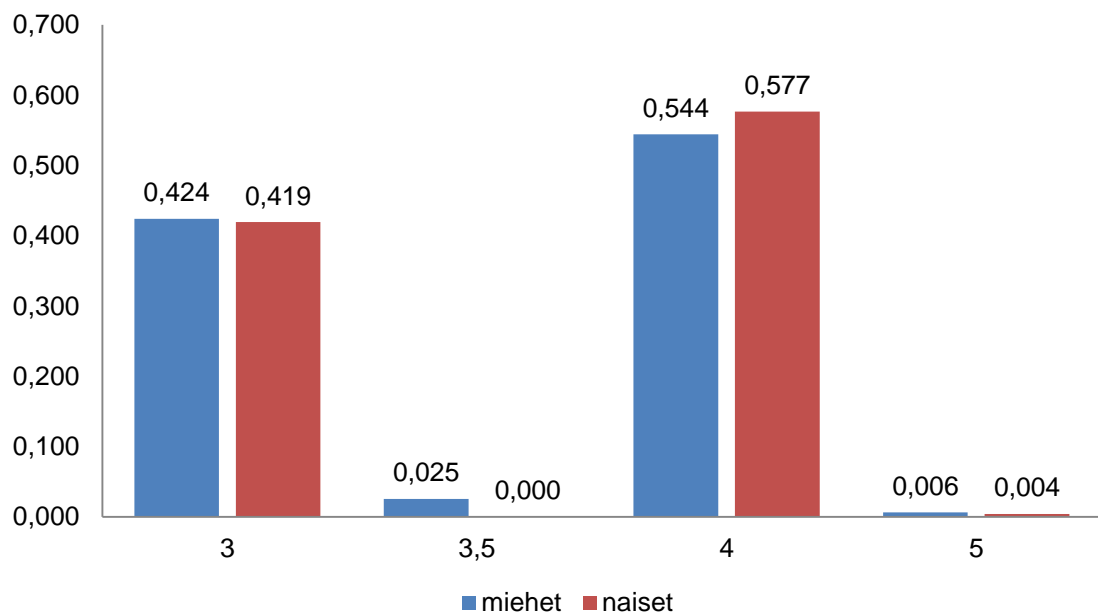
Taulukossa 7 on esitetty aineiston MAOA-uVNTR-alueen genotyyppien lukumäärät. Saaduista tuloksista laskettiin alleelien alleelifrekvenssit, sekä miehille ja naisille erikseen että yhteisesti (kuva 21). Alleelifrekvensseistä voidaan nähdä, että aineistossa yleisin alleeli on tehokkaan entsyymiaktiivisuuden alleeli 4. Tulos on sopusoinnussa aiemmin mainittujen Sabolin ym. (1998) saamien tulosten kanssa. Heterotsygoottisten naisten kohdalla tuloksia on vaikea arvioida, sillä X-kromosomissa sijaitsevan alueen aktiivista alleelia on lähes mahdotonta määrittää.

Taulukko 7. *MAOA-uVNTR*-genotyypifrekvenssit.

	3, 3	3, 3.5	3, 4	3.5, 3.5	3.5, 4	3.5, 5	4, 4	4, 5	5, 5
Miehet	23,8 % (67)*	-**	-	1,4 % (4)	-	-	30,5 % (86)	-	0,4 % (1)
Naiset	7,8 % (22)	-	21,3 % (60)	-	-	-	14,5 % (41)	0,7 % (1)	-
Yhteensä	31,6 % (89)	-	21,3 % (60)	1,4 % (4)	-	-	45,0 % (127)	0,7 % (1)	0,4 % (1)

* Aineistossa havaittu lukumäärä

** genotyyppiä ei havaittu tutkitussa aineistossa

Kuva 21. *MAOA-uVNTR*-alueen alleelifrekvenssit

Lopuksi aineistosta määritettyjä *MAOA-uVNTR* ja *5HTTLPR*-genotyyppiä tarkasteltiin vielä yhteisesti kokonaisuutena ja arvioitiin niistä muodostuvaa fenotyyppiä (taulukko 8). Miehet ja naiset on tarkasteltu erillään, sillä miesten *MAOA-uVNTR*-alueen hemisyygoottisuus vääristäisi koko aineiston fenotyyppifrekvenssejä. Miehillä yleisin

5HTTLPR-MAOA-uVNTR-fenotyyppi on yhdistelmä nopean entsyymiaktiivisuuden *MAOA-uVNTR*-alleelista (hemitsygootit genotyypit 3.5 ja 4) ja heterotsygootin genotyypin normaalisti toimivasta ja transkriptiotehokkuudeltaan heikentyneestä *5HTTLPR*-alleeleista (genotyyppi (14/16A ja 16G/16A). Naisilla yleisin *5HTTLPR-MAOA-uVNTR*-fenotyyppi heterotsygootti yhdistelmä hitaan ja nopean entsyymiaktiivisuuden *MAOA-uVNTR*-alleeleista (genotyypit (3/3.5, 3/3, 3.5/5 ja 4/5) yhdistettynä heterotsygoottiin genotyyppiin normaalisti toimivasta ja transkriptiotehokkuudeltaan heikentyneestä *5HTTLPR*-alleeleista (genotyypit 14/16A ja 16G/16A).

Taulukko 8. *MAOA-uVNTR* ja *5HTTLPR* -alueiden fenotyypit ja niiden frekvenssit tutkimusaineistossa

MIEHET	<i>5HTTLPR</i> <i>MAOA-uVNTR</i>	HEIKENTYNYT 14/14, 14/16G, 16G/16G	HEIKENTYNYT/NORMAALI 14/16A, 16G/16A	NORMAALI 16A/16A
	HIDAS (3, 5)	10,1 %	22,2 %	10,8 %
	NOPEA (3.5, 4)	13,3 %	25,3 %	18,4 %

NAISET	<i>5HTTLPR</i> <i>MAOA-uVNTR</i>	HEIKENTYNYT 14/14, 14/16G, 16G/16G	HEIKENTYNYT/NORMAALI 14/16A, 16G/16A	NORMAALI 16A/16A
	HIDAS (3/3, 3/5, 5/5)	5,6 %	7,3 %	4,8 %
	HIDAS/NOPEA (3/3.5, 3/4, 3.5/5, 4/5)	12,1 %	23,4 %	13,7 %
	NOPEA (3.5/3.5, 3.5/4, 4/4)	7,3 %	19,4 %	6,5 %

7 Yhteenveto

Tämän insinööriyön tarkoituksena oli pystyttää ja optimoida serotoniinin metaboliaan, *MAOA-uVNTR*, ja sitalopraamin farmakodynamiikkaan, *5HTTLPR* ja rs25531, liittyvien polymorfioiden määrittäminen menetelmä. Menetelmän pystytys sisälsi *MAOA-uVNTR* ja *5HTTLPR* -duplexiPCR-menetelmän optimoinnin, muodostuneiden DNA-fragmenttien erottelun kapillaarielektroforeesilaitteistolla ja siinä muodostuneiden elektroferogrammien analysoinnin GeneMapper ID-X -ohjelmistolla. Analysoiduista näytteistä valittiin vielä *5HTTLPR*-alueen pitkän alleelin 16 suhteen positiiviset näytteet restriktioentsyymikäsittelyyn, jonka avulla voitiin selvittää alleelissa 16 oleva mahdollinen SNP, rs25531.

Menetelmän pystytyksen jälkeen suoritettiin työn toinen osa, eli *MAOA-uVNTR*, *5HTTLPR* ja rs25531 -polymorfioiden määrittäminen oikeuslääketieteellisestä tutkimusaineistosta. Aineisto oli valittu kontrolliaineistoksi sitalopraamin farmakogenetiikan ja itsemurhien välistä yhteyttä tutkivaan väitöskirjatyöhön. Saaduista tuloksista laskettiin alleelifrekvenssit, joihin tapausryhmän tuloksia tullaan myöhemmin väitöskirjatyössä vertaamaan, jotta saadaan selville, onko tapausryhmän, eli itsemurhan tehneiden sitalopraamin käyttäjien ja kontrolliaineiston eli sitalopraamin käyttäjien joiden kuolemanluokka on muu kuin itsemurha, välillä tilastollisesti merkitsevää eroa. Aineiston sopivuus verrokkiaineistoksi laskettiin Hardy-Weinbergin tasapainojakaumalla, joka kertoo onko verrokkiaineisto ideaali satunnaisotos populaatiosta.

Menetelmä saatiin toimimaan hyvin ja luotettavasti, vaikka alkuun etenkin *5HTTLPR*-alueen monistumisen kanssa oli paljon ongelmia alueen CG-rikkauten vuoksi. Optimoidulla duplexiPCR:ssä käytettävien eri alueiden alukkeiden määriä päästiin tasaisiin tuloksiin molempien reaktiossa monistettavien alueiden kohdalla. Myös restriktioentsyymien epäspesifinen pilkkominen tuotti aluksi päänvaivaa, mutta sekvensoimalla havaitut alleelit voitiin varmistua niiden oikeasta tulkinnasta ja samalla menetelmän luotettavuudesta.

Kontrolliaineistossa yleisin *MAOA-uVNTR*-alueen alleeli oli sekä miehillä että naisilla 4 toistonjakson nopean entsyymitehokkuuden alleeli. *MAOA-uVNTR*-alueen genotyypeistä yleisin oli miehillä siis homotsygootti 4 toistonjakson alleeli, naisilla taas heikomman entsyymitehokkuuden toistonjakson 3 ja nopean entsyymitehokkuuden toistonjakson 4 yhdistelmä 3/4, mistä on kuitenkin mahdotonta arvioida aktiivista alleelia. *5HTTLPR*-

alueen yleisin alleeli oli sekä miehillä että naisilla normaalilla transkriptotehokkuudella toimiva 16A. Yleisin *5HTTLPR*-alueen genotyyppi sekä miehillä että naisilla oli heikentyneen transkriptotehokkuuden alleelin 14 ja normaalilla transkriptotehokkuudella toimivan alleelin 16A yhdistelmä 14/16A.

Molemmat määritetyt alueet yhdistettynä miesten yleisin *5HTTLPR-MAOA-uVNTR*-fenotyyppi oli *MAOA-uVNTR*-alueen nopean entsyymiaktiivisuuden genotyypit (3.5, 4) yhdistettynä *5HTTLPR*-alueen normaalisti toimivan ja transkriptotehokkuudeltaan heikentyneen alleelin yhdistelmään (14/16A). Naisilla yleisin *5HTTLPR-MAOA-uVNTR*-fenotyyppi oli *MAOA-uVNTR*-alueen hitaan ja nopean entsyymitehokkuuden yhdistelmien (3/3.5, 3/4, 3.5/5, 4/5) genotyypit yhdistettynä *5HTTLPR*-alueen normaalisti toimivan ja transkriptotehokkuudeltaan heikentyneen alleelin yhdistelmään (14/16A).

Aldred, D. H. G. (2005). "Antidepressant drug use & the risk of suicide." International Review of Psychiatry **17**(3): 163-172.

Deckert, J., M. Catalano, Y. V. Syagailo, M. Bosi, O. Okladnova, D. Di Bella, M. M. Nöthen, P. Maffei, P. Franke, J. Fritze, W. Maier, P. Propping, H. Beckmann, L. Bellodi and K.-P. Lesch (1999). "Excess of High Activity Monoamine Oxidase A Gene Promoter Alleles in Female Patients with Panic Disorder." Human Molecular Genetics **8**(4): 621-624.

Healy, D., C. Langmaak and M. Savage (1999). "Suicide in the course of the treatment of depression." Journal of Psychopharmacology **13**(1): 94-99.

Heils, A., A. Teufel, S. Petri, G. Stöber, P. Riederer, D. Bengel and K. P. Lesch (1996). "Allelic Variation of Human Serotonin Transporter Gene Expression." Journal of Neurochemistry **66**(6): 2621-2624.

Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, et al. (2006). "Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder." Am J Hum Genet. 2006 May; **78**(5): 815-26.

Huttunen, M. O. (2008). "Masennuksen hoidossa käytettävät lääkkeet." Duodecim Terveyskirjasto Retrieved 12.5, 2015, from http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=lam00039 Luettu 10.5.2014

Ilmoniemi, R. (2001). "Aivotoiminnan biokemiaa." Luentomoniste, from <http://www.biomag.hus.fi/braincourse/L4.html#RTFTtoC10>.

Kiviniemi V., J. J., Kastarinen H., Kuoppala J., Oravilahti T. (2013). Essitalopraami ja sitalopraami masennuksen hoidossa. Fimea kehittää, arvioi ja informoi -julkaisusarja Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea. **6**.

Laine, K. (2000). "Myrkytyksiin liittyvät toksiset oireyhtymät." Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim **15**: 1620-1627.

Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL. (1996) "Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region." Science. 1996 Nov 29; **274**(5292):1527-31.

Lung, F.-W., D.-S. Tzeng, M.-F. Huang and M.-B. Lee (2011). "Association of the MAOA promoter uVNTR polymorphism with suicide attempts in patients with major depressive disorder." BMC Medical Genetics **12**: 74-74.

Nakamura, M., S. Ueno, A. Sano and H. Tanabe (2000). "The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants." Mol Psychiatry **5**(1): 32-38.

Nordquist, N. and L. Oreland (2006). "Monoallelic expression of MAOA in skin fibroblasts." Biochemical and Biophysical Research Communications **348**(2): 763-767.

Ojeda, D. A., C. L. Niño, S. López-León, A. Camargo, A. Adan and D. A. Forero (2014). "A functional polymorphism in the promoter region of MAOA gene is associated with

daytime sleepiness in healthy subjects." Journal of the Neurological Sciences **337**: 176-179.

Rapport MM, Green AA, Page IH (1948). "Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization". The Journal of Biological Chemistry **176**(3): 1243-51.

Reif, A., H. Weber, K. Domschke, B. Klauke, C. Baumann, C. P. Jacob, A. Ströhle, A. L. Gerlach, G. W. Alpers, P. Pauli, A. Hamm, T. Kircher, V. Arolt, H.-U. Wittchen, E. B. Binder, A. Erhardt and J. Deckert (2012). "Meta-analysis argues for a female-specific role of MAOA-uVNTR in panic disorder in four European populations." American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics **159B**(7): 786-793.

Rudnick, G. (2006). "Structure/Function Relationships in Serotonin Transporter: New Insights from the Structure of a Bacterial Transporter." Handbook of experimental pharmacology **175**: 59-73.

Sabol, S. Z., S. Hu and D. Hamer (1998). "A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter." Human Genetics **103**(3): 273-279.

Samochowicz, A., M. Chęć, E. Kopaczewska, J. Samochowicz, O. Lesch, E. Grochans, A. Jasiewicz, P. Bienkowski, K. Łukasz and A. Grzywacz (2015). "Monoamine Oxidase A Promoter Variable Number of Tandem Repeats (MAOA-uVNTR) in Alcoholics According to Lesch Typology." International Journal of Environmental Research and Public Health **12**(3): 3317-3326.

Tiihonen, J., M. R. Rautiainen, H. M. Ollila, E. Repo-Tiihonen, M. Virkkunen, A. Palotie, O. Pietilainen, K. Kristiansson, M. Joukamaa, H. Lauerma, J. Saarela, S. Tyni, H. Vartiainen, J. Paananen, D. Goldman and T. Paunio (2014). "Genetic background of extreme violent behavior." Mol Psychiatry.

Virkkunen, M. (2005). "Serotoniinin muodostumiseen liittyvän TPH2-geenin yhteys itsetuhoisuuteen ja masennustiloihin." Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim **21**: 2267-2268

PCR-alukkeet

5HTTLPR:

Forward: 5' GCGTTGCCGCTCTGAATGC 3'

Reverse: 5' GAGGACTGAGCTGGACAACCCAC 3'

MAOA-uVNTR:

Forward: 5' ACAGCCTGACCGTGGAGAAG 3'

Reverse: 5' GAACGGACGCTCCATTCGGA 3'

(Oligomer)

Kapillaarielektroforeesin ajoparametrit

Genetic Analyzer 3500xl (Applied Biosystems)

Edit Instrument Protocol MAOA_SHTTLPR

Setup an Instrument Protocol

Application Type: Capillary Length: cm Polymer:

Dye Set:

Instrument Protocol Properties

* Run Module:

* Protocol Name: Locked

Description:

Oven Temperature (°C): Run Voltage (kVolts): PreRun Voltage (kVolts): Injection Voltage (kVolts):

Run Time (sec.): PreRun Time (sec.): Injection Time (sec.): Data Delay (sec.):

Advanced Options

Following values are not recommended to be changed.

Voltage Tolerance (kVolts): Voltage # of Steps (nk): Voltage Step Interval (sec.):

First Read Out Time (ms): Second Read Out Time (ms):

Normalization Target: Normalization Factor Threshold Min: Normalization Factor Threshold Max:

GeneMapper ID-X v 1.4 -analyysiparametrit

The screenshot shows the 'Analysis Method Editor' dialog box with the 'Peak Detector' tab selected. The 'Peak Detection Algorithm' is set to 'Advanced'. The 'Ranges' section includes 'Analysis' (Full Range) and 'Sizing' (All Sizes) dropdowns, with 'Start Pt' at 0 and 'Stop Pt' at 10000, and 'Start Size' at 0 and 'Stop Size' at 1000. The 'Smoothing and Baseline' section has 'Smoothing' set to 'Light' and 'Baseline Window' at 51 pts. The 'Size Calling Method' section has 'Local Southern Method' selected. The 'Peak Detection' section includes 'Peak Amplitude Thresholds' (B: 2500, R: 500, G: 500, P: 500, Y: 500, O: 100), 'Min. Peak Half Width' at 2 pts, 'Polynomial Degree' at 3, and 'Peak Window Size' at 15 pts. The 'Slope Threshold' section has 'Peak Start' and 'Peak End' both at 0.0. The 'Normalization' section has 'Use Normalization, if applicable' checked. A 'Factory Defaults' button is located at the bottom right of the dialog. At the very bottom of the window are 'Save As', 'Save', 'Cancel', and 'Help' buttons.

Hyvin *MAOA-uVNTR-5HTTLPR*-duplexiPCR-reaktiossa monistuneille, korkeat piikit muodostaville näytteille käytettiin analyysiparametreja, jotka havaitsivat tutkittavalta alueelta ne piikit, joiden korkeus oli yli 2500 rfu (Peak Detection, Peak Amplitude Threshold: B: 2500 rfu). Korkeamman kynnysarvon käyttö vähensi ylimääräisten epäpuhtauspiikkien tunnistusta ohjelmassa.

Analysis Method Editor

General | Allele | **Peak Detector** | Peak Quality | SQ & GQ Settings

Peak Detection Algorithm: Advanced

Ranges

Analysis: Full Range | Sizing: All Sizes

Start Pt: 0 | Start Size: 0

Stop Pt: 10000 | Stop Size: 1000

Smoothing and Baseline

Smoothing: None Light Heavy

Baseline Window: 51 pts

Size Calling Method

2nd Order Least Squares
 3rd Order Least Squares
 Cubic Spline Interpolation
 Local Southern Method
 Global Southern Method

Peak Detection

Peak Amplitude Thresholds:

B: 200 | R: 500

G: 500 | P: 500

Y: 500 | O: 100

Min. Peak Half Width: 2 pts

Polynomial Degree: 3

Peak Window Size: 15 pts

Slope Threshold

Peak Start: 0.0

Peak End: 0.0

Normalization

Use Normalization, if applicable

Factory Defaults

Save As | Save | Cancel | Help

Heikompien näytteiden kohdalla (piikin korkeus <2500 rfu) havaitsemiskynnys laskettiin 200 rfu:n (Peak Detection, Peak Amplitude Threshold: B: 200 rfu).

Analysis Method Editor

General | Allele | **Peak Detector** | Peak Quality | SQ & GQ Settings

Peak Detection Algorithm: Advanced

Ranges

Analysis: Full Range | Sizing: All Sizes

Start Pt: 0 | Start Size: 0

Stop Pt: 10000 | Stop Size: 1000

Smoothing and Baseline

Smoothing: None Light Heavy

Baseline Window: 51 pts

Size Calling Method

2nd Order Least Squares

3rd Order Least Squares

Cubic Spline Interpolation

Local Southern Method

Global Southern Method

Peak Detection

Peak Amplitude Thresholds:

B: 100 | R: 500

G: 500 | P: 500

Y: 500 | O: 100

Min. Peak Half Width: 2 pts

Polynomial Degree: 3

Peak Window Size: 15 pts

Slope Threshold

Peak Start: 0.0

Peak End: 0.0

Normalization

Use Normalization, if applicable

Factory Defaults

Save As | Save | Cancel | Help

Restriktioentsymikäsittelyn jälkeen muodostuneita fragmentteja analysoitaessa käytettiin analyysiparametreja, jotka tunnistivat tutkittavalta alueelta piikit joiden korkeus oli yli 100 rfu (Peak Detection, Peak Amplitude Threshold: B: 100 rfu).

Sekvensointi

ExoSAP –puhdistus (14 µl*) :	konsentraatio	1x (µl)
ddH ₂ O	-	3,6
Exonuclease (10 U/µl)	2 U	0,2
SAP (1 U/µl)	0,2 U	0,2
PCR-tuote	-	10

*osassa näytteissä reaktio puolitettu käytettävissä olevan PCR-tuotteen vähäisyyden vuoksi.

ExoSAP -lämpötilaohjelma:

lämpötila (°C)	aika (min)
37	45:00
80	15:00
10	∞

Sekvensointireaktio:	1x (µl)
2.5x sekvensointimiksi	2,3
5x Sequencing Buffer	1,15
Primer (2µM)	0,45
ddH ₂ O	7

15% pipetoitivara huomioitu äriissä.

9,5 µl miksiä + 0,5 µl ExoSAP:illa puhdistettua PCR-tuotetta.

Sekvensointireaktio:

syklimäärä	lämpötila (°C)	aika (min)
	96	0:30
26	50	0:15
	60	4:00
HOLD	10	∞

Sekvensointituotteen puhdistus

Dynabeads Sequencing Clean Up (Invitrogen, Life Technologies)

1. Vorteksoi Dynabeads-liuosta juuri ennen pipetoimista vähintään 10 sekuntia.
2. Lisää 20 µl Dynabeads-liuosta kullekin puhdistettavalle näytteelle (10 µl).
 - Sekoita huolellisesti pipetillä
 - Seisota huoneenlämmössä 15 min
3. Valmista riittävä määrä 85 % etanolia (yhdelelle näytteelle 30 µl, voi tehdä reilusti)
4. Aseta näyteputket magneettilevylle
 - Spinnaa näytteet tarvittaessa pohjaan ennen magneettilevylle asettamista
 - Seisota 1 min
 - Poista neste huolellisesti pipetillä
5. Poista näyteputket magneetilta
6. Lisää 30 µl 85 % etanolia.
 - Sekoita huolellisesti pipetillä, magneettihelmien tulee olla tasaisesti sekoittuneita nesteeseen.
7. Aseta näyteputket magneetille
 - Poista neste huolellisesti
 - Etanolin voi poistaa myös ravistelemalla käsipaperiin, kunhan magneettilevy on tiukasti kiinni näyteputkissa koko ravistelun ajan.
8. Poista näyteputket magneetilta.
9. (Kohdat 6-8 voi toistaa jos aikaisemmassa puhdistuksessa on havaittu paljon väriä.)
10. Ilmakuivaa näytteitä vähintään 5 min.
11. Lisää 30 µl ddH₂O
 - Sekoita huolellisesti pipetillä, magneettihelmien tulee olla tasaisesti sekoittuneita nesteeseen.
 - Seisota 2 min.
12. Aseta näyteputket magneetille
 - Seisota 1 min.
 - Siirrä 25 µl nestettä ajoputkiin

Kapillaarisekvensoinnin ajoparametrit

Genetic Analyzer 3500xl (Applied Biosystems)

The screenshot shows a software window titled "Edit Instrument Protocol FastSeq50_POP7xl_1" with the subtitle "Setup an Instrument Protocol". The window contains several sections for configuring sequencing parameters:

- Application Type:** Sequencing
- Capillary Length:** 50 cm
- Polymer:** POP7
- Dye Set:** E
- Instrument Protocol Properties:**
 - Run Module:** FastSeq50_POP7xl
 - Protocol Name:** FastSeq50_POP7xl_1 (with a "Locked" checkbox)
 - Description:** (empty text field)
- Operational Parameters:**
 - Oven Temperature (°C): 60
 - Run Voltage (kVolts): 13.4
 - PreRun Voltage (kVolts): 15
 - Injection Voltage (kVolts): 1.6
 - Run Time (sec.): 2520
 - PreRun Time (sec.): 180
 - Injection Time (sec.): 15
 - Data Delay (sec.): 250
- Advanced Options:** (expanded section)
 - Following values are not recommended to be changed.
 - Voltage Tolerance (kVolts): 0.6
 - Voltage # of Steps (nk): 30
 - Voltage Step Interval (sec.): 15
 - First Read Out Time (ms): 200
 - Second Read Out Time (ms): 200

At the bottom of the window, there are "Close" and "Save" buttons.