

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

**Katja Salo**

**Musikaalisuuden liittyminen dysleksian ehdokasgeenien  
alleeleihin – tutkimus musikaalisuuden ja  
kielenkehityksen yhteisestä geneettisestä taustasta**

Insinööriö 23.11.2009

Ohjaaja: dosentti Irma Järvelä

Ohjaava opettaja: yliopettaja Marja Vaheri

Tekijä	Katja Salo
Otsikko	Musikaalisuuden liittyminen dysleksian ehdokasgeenien alleeleihin – tutkimus musikaalisuuden ja kielenkehityksen yhteisestä geneettisestä taustasta
Sivumäärä	55
Päivämäärä	23.11.2009
Koulutusohjelma	bio- ja elintarviketekniikka
Tutkinto	insinööri (AMK)
Ohjaaja	dosentti Irma Järvelä
Ohjaava opettaja	yliopettaja Marja Vaheeri
<p>Tässä Helsingin yliopiston lääketieteellisen genetiikan laitoksella tehdyssä tutkimuksessa yhdistyi täysin uudella tavalla dysleksia ja musikaalisuus, joita on aikaisemmin tutkittu erillisinä ominaisuuksina. Dysleksia eli lukihäiriö on tiedetty periytyväksi sairaudeksi jo pitkään (Hallgren 1950) ja siihen assosioituvia yhden emäksen polymorfioita (SNP) tunnetaan useita. Pullin ym. 2008 julkaisemassa tutkimuksessa löydettiin viitettä tiettyjen perimän alueiden liittymisestä sekä musikaalisuuteen että lukihäiriöön. Tutkimustulos sopii yhteen aivotutkimuksissa saatujen tulosten kanssa, joissa on todettu, että kielen ja musiikin käsittely aivoissa tapahtuu osin samoilla alueilla (mm. Jentschekken 2008).</p> <p>Tutkimuksen hypoteesina oli, että musikaalisuudella ja dysleksiolla saattaisi olla yhteisiä geenejä ihmisen perimässä. Työssä analysoitiin tunnettujen dysleksian ehdokasgeenien polymorfioita suomalaisissa suvuissa, joissa tutkittavat oli testattu kolmella musikaalisuustestillä. Pääasiallinen tutkimusmenetelmä oli yli 12-vuotiaiden koehenkilöiden verestä eristetyn DNA:n tutkiminen polymeraasiketjureaktion (PCR) avulla. Koehenkilöiden genomista monistettiin kiinnostavien SNP:iden alueet ja analysoitiin alleelit suorasekvensoinnin avulla. Musikaalisuuspisteitä ja koehenkilöiden genotyyppinä sekä näiden periytymistä suvussa analysoitiin QTDT- ja FBAT-ohjelmilla (Abecasis ym. 2000). Tulokset antavat viitteitä KIAA0319- ja/tai DCDC2-geenin assosioitumisesta musikaalisuuteen. Paras <i>p</i>-arvo em. geenin/geenien kytköksestä saatiin Seashoren musikaalisuustestin tuloksiin (<math>p=0.019493</math>), kun merkitseväenä pidetään alle 0,05 <i>p</i>-arvoja.</p> <p>Tutkimusmateriaali oli pienehkö (<math>n=395</math>), joten parempien ja luotettavampien tulosten saamiseen tarvitaan suurempi tutkimusmateriaali. Tulokset antavat tietoa musiikin ja kielenkehityksen evoluutiosta ja ihmisen aivojen toiminnasta. Myös musiikin merkitys biologisena ominaisuutena kasvaa saatujen tulosten myötä.</p>	
Hakusanat	musikaalisuus, dysleksia, geeni, SNP

Author	Katja Salo
Title	Linkage between musical aptitude and dyslexia susceptibility genes – a study about common genetic background between musicality and linguistic development
Number of Pages	55
Date	23.11.2009
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Degree	Bachelor of Engineering
Instructor	Irma Järvelä, Docent
Supervisor	Marja Vaheri, Principal Lecturer
<p>This research was executed at the Helsinki University Department of Medical Genetics. It combined in a totally new way dyslexia and musical aptitude, which have previously been studied a lot as separate traits. Dyslexia (also known as reading disability) has been known as a heritable trait for decades (Hallgren 1950) and several single nucleotide polymorphisms (SNP) have been found to have an association to dyslexia. Pulli et al. found in 2008 that there are several regions in our genome that have a strong association to musical aptitude. One of those regions has earlier been discovered to be susceptibility gene for dyslexia. It has been also discovered that the processing of music and language takes place partly in the same regions of the brain (e.g. Jentschekken 2008). These observations suggest that there could be a common genetic background for musical and linguistic development.</p> <p>The hypothesis was that there could be genes that control both musical aptitude and dyslexia. In this study we analyzed the occurrence of known dyslexia-SNPs in Finnish families. The members of these families were tested with three tests that indicate musical capability. All study subjects over 12 years of age gave a blood sample from where DNA was extracted and then the alleles of the SNPs were analyzed by PCR and direct sequencing. After that, the subjects' musicality points, genotypes and inheritance of the genotypes were analyzed with QTDT and FBAT programs (Abecasis et al. 2000). The results show that KIAA0319 and/or DCDC2 gene could be associated with musical aptitude. The best <math>p</math>-value for this association was found in the Seashore pitch test (<math>p=0.019493</math>). We considered <math>p</math>-values lower than 0.05 as significant.</p> <p>The size of the study material was relatively small (<math>n=395</math>), and for more reliable results, a larger material is needed. Results give information on the evolution of music and language development and also more accurate information on how the human brain is working. Also the significance of the music as a biological trait increases.</p>	
Keywords	musicality, musical aptitude, dyslexia, gene, SNP

## Sisältö

1	JOHDANTO .....	6
2	KIRJALLINEN OSA .....	7
2.1	Ihmisen perimän muuntelu.....	7
2.2	Sairauksien periytyminen.....	8
2.2.1	Yhden geenin aiheuttamat sairaudet .....	8
2.2.2	Monitekijäiset sairaudet .....	8
2.3	Perimän tutkiminen .....	10
2.4	Kielen käsittely aivoissa.....	12
2.5	Musiikin käsittely aivoissa.....	14
2.6	Musiikki .....	15
2.6.1	Musikaalisuustestit .....	17
2.7	Dysleksia.....	18
2.7.1	Fonologinen häiriö .....	19
2.7.2	Magnosellulaarinen häiriö .....	20
2.7.3	Fonologisen ja magnosellulaarisen häiriön yhdistelmä.....	20
2.7.4	Dysleksiageenit.....	22
2.8	Musiikki ja dysleksia .....	25
3	KOKEELLINEN OSA .....	27
3.1	Materiaalit ja menetelmät .....	28
3.1.1	Perhemateriaali.....	28
3.1.2	DNA:n eristys.....	29
3.1.3	PCR .....	32
3.1.4	Geelielektroforeesi.....	33
3.1.5	Sekvensointi .....	34
3.1.6	Tilasto-ohjelmat .....	36
4	TULOKSET.....	38

4.1	DNA:n eristys.....	38
4.2	PCR:n optimointi ja tuotteen laatu .....	39
4.3	Geelielektroforeesi.....	42
4.4	Sekvensointi .....	43
4.5	Tietokannan luominen .....	44
4.6	Tulosten tilastollinen käsittely .....	47
4.7	FBAT- ja QTDT- tulokset .....	48
5	TULOSTEN TARKASTELU .....	50
6	KIRJALLISUUSLUETTELO .....	52

## **LYHENTEET JA TERMIT**

FBAT = Family Based Association Tests, assosiaatiotestit perhemateriaaleille

KMT= Karma Music Test, Karman musikaalisuustesti

PCR = Polymerase Chain Reaction, polymeerasiketjureaktio

QTDT= Linkage Disequilibrium Analyses for Quantitative and Discrete Traits, kytkentäepätasapainoanalyysi kvantitatiivisille ja diskreeteille ominaisuuksille

QTL = Quantitative-Trait Loci, kvantitatiiviseen ominaisuuteen vaikuttava genomin alue

SNP = Single Nucleotide Polymorphism, yhden emäksen polymorfia

SP= Seashore Pitch Test, Seashoren sävelkorkeuden tunnistamistesti

ST= Seashore Time Test, Seashoren sävelen keston tunnistamistesti

# 1 JOHDANTO

Nyky-yhteiskunnassa kommunikointi kaikissa eri muodoissaan on normaalin elämän edellytys. Yksilöltä odotetaan sujuvaa kielellistä osaamista ja ihmisen oletetaan tietävän paljon häntä itseään koskevista sekä globaaleista asioista. Tietoyhteiskunta vaatii kaikkeen toimintaansa kielen monipuolista ymmärtämistä kirjoitetussa ja kuullussa muodossa. Kuitenkin n. 10 % väestöstä kärsii kehityksellisestä lukihäiriöstä, dysleksiasta (Kaminen-Ahola 2007). Nämä ihmiset joutuvat päivittäin tilanteisiin, joissa heidän kykynsä eivät kohtaa vaatimuksia. Lievänä dysleksia saattaa hidastaa kirjoittamista ja vaikeuttaa hieman esimerkiksi tentteihin vastaamista, mutta pahimmillaan se voi tehdä työelämän lähes mahdottomaksi ja syrjäyttää myös sosiaalisista kontakteista.

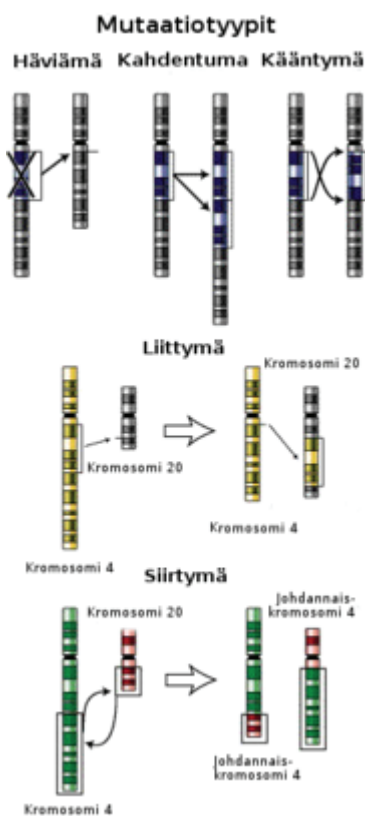
Eräät dysleksian ilmenemismuodot liittyvät puutteisiin äänteiden prosessoinnissa (Kaminen-Ahola 2007, Lyytinen ym. 2002). Tästä on syntynyt ajatus, että musiikin ja kielen prosessointi aivoissa voisi olla osittain yhteisillä alueilla ja tapahtua osin samoilla mekanismeilla. Tutkimuksissa on saatu tästä todisteita (Jentschekken 2008, Karma 2007) ja lisäksi on löytynyt viitteitä, että genomissa olisi alueita, jotka koodaisivat sekä musiikin että kielen prosessoinnin kannalta tärkeitä molekyylejä (Pulli ym. 2008).

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää, onko löydetyillä dysleksiageeneillä yhteyttä musikaalisuuteen tai oikeammin sen puutteeseen. Hypoteesina on, että musikaalisuus periytyy yhdessä tunnettujen dysleksian ehdokasgeenipaikkojen kanssa. Tulokset saattavat avata ovia jatkotutkimusten ohella nopeampaan diagnosointiin ja paremmin kohdistettuun terapiaan. Lisäksi tutkimus valottaa ihmisen varhaista kehitystä uudesta näkökulmasta: onko mahdollista, että musiikki on ollut kielen ohella tärkeä ominaisuus, joka on antanut yksilölle valintaedun evoluutiossa? Aiheeseen liittyen on tehty viime aikoina jonkin verran tutkimusta, mutta nyt ensimmäistä kertaa tutkitaan musiikin ja kielen yhteistä geneettistä taustaa.

## 2 KIRJALLINEN OSA

### 2.1 Ihmisen perimän muuntelu

Ihmisten keskinäinen eroavaisuus genomien suhteen johtuu pääasiassa kolmesta erisyydestä: mutaatiosta, joka voi olla joko yhden emäksen vaihtumista/häviämistä tai isompien alueiden muuttumista kromosomeissa, (kuva 1) kromosomien trisomioista, (esimerkiksi 21-trisomia) tai geneettisestä rekombinaatiosta, joka tapahtuu lisääntymisen yhteydessä (Sammalisto 2008.)



Kuva 1. Mutaatiotyypit



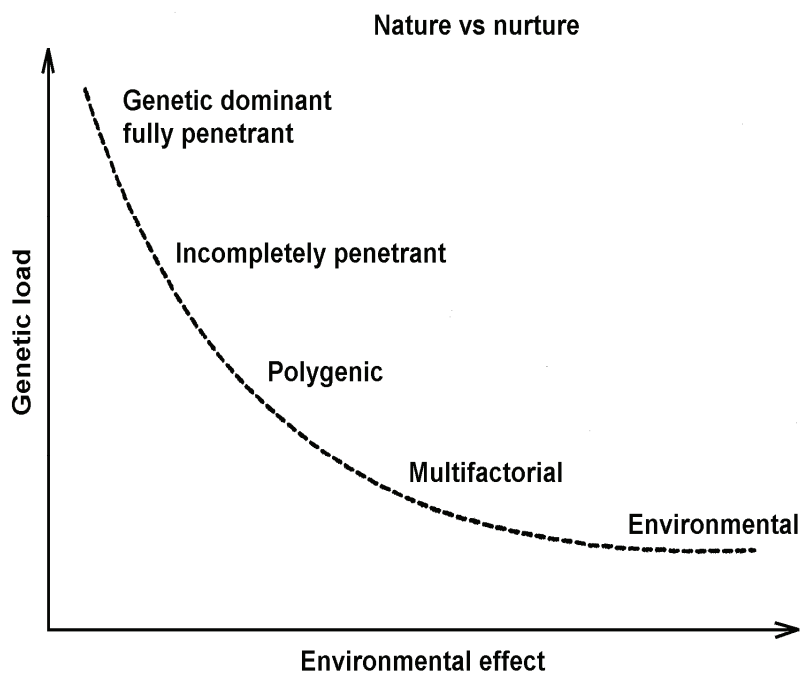
## **2.2 Sairauksien periytyminen**

### **2.2.1 Yhden geenin aiheuttamat sairaudet**

Suurin osa tunnetuista perinnöllisistä sairauksista on monogeenisiä eli yhden geenin aiheuttamia. Tällöin virhe joko geenin säätelyalueella tai proteiinia koodaavalla alueella vioittaa geenituotetta niin pahasti, että se vaikuttaa johonkin tärkeään aineenvaihduntareittiin ja voi aiheuttaa ihmisen sairastumisen. Monogeeniset sairaudet jaetaan peittyvästi periytyviin ja vallitsevasti periytyviin. Peittyvästi periytyvät sairaudet vaativat kaksi viallista geenialleelia (yksi isältä ja yksi äidiltä) ilmentyäksensä, sillä yksi normaali alleeli riittää tuottamaan tarpeeksi oikeaa proteiinia. Vallitsevasti periytyvässä sairaudessa jo yksi viallinen alleeli sairautta aiheuttavassa geenissä aiheuttaa taudin (Aula ym. 1998.) Albinismi on peittyvästi periytyvä sairaus, jossa geenivirhe aiheuttaa melaniinin puuttumisen kehosta. Huntingtonin tauti on vallitsevasti periytyvä sairaus, jossa geenivirhe ilmenee keskushermoston rappeutumisena. (Hartl ym. 2002.)

### **2.2.2 Monitekijäiset sairaudet**

Suuri osa ihmisen ominaisuuksista, kuten pituus, ihonväri ja useat sairaudet, periytyvät monitekijäisesti. Yksilöllisiin ominaisuuksiin vaikuttavat genomien alueet (quantitative-trait loci, QTL) ovat osatekijöinä näiden ominaisuuksien synnyssä. Tietty QTL ei kuitenkaan yksin riitä muodostamaan ominaisuutta, eikä sen puuttuminen estä ominaisuuden ilmenemistä. (McGrath ym. 2006.)



Kuva 2. Perimän ja ympäristön vaikutus ihmisen ominaisuuksiin

Monitekijäisten sairauksien taustalla on selvä geneettinen vaikutus, mutta ympäristötekijöillä on usein voimakas vaikutus sairauden puhkeamiseen. Ympäristötekijöitä ovat mm. ravinto, lääkkeet, sosiaalinen ympäristö, odottavan äidin terveydentilan vaikutus sikiöön, liikunta, harrastukset jne. Suomessa hyvä esimerkki monitekijäisestä sairaudesta on sepelvaltimotauti, jonka puhkeaminen on pitkälti elintavoista riippuvainen. Myös dysleksia on monitekijäinen sairaus.

Monitekijäisten sairauksien synty ja ilmeneminen on monimutkainen prosessi, mutta karkeasti voidaan sanoa, että sairaus puhkeaa, kun on tarpeeksi alttiusgeenejä huonoihin ympäristövaikutuksiin yhdistettynä.

## 2.3 Perimän tutkiminen

Tutkimustuloksista luettaessa on hyvä ymmärtää myös menetelmät tulosten takana. Seuraavassa käydään läpi yleisimmät genomien tutkimuksessa käytetyt työkalut.

- **Periytyvyystutkimuksella** selvitetään, onko kyseisellä ominaisuudella ylipäättään geneettistä pohjaa. Yleensä pelkästään lähisukulaisten tutkiminen ei anna tarpeeksi luotettavaa vastausta, sillä perheenjäsenillä on yleensä hyvin samankaltainen ympäristö, joka voi vaikuttaa joihinkin ominaisuuksiin geneejiä enemmän. Luotettavampi tapa tehdä periytyvyystutkimus on kaksostutkimus. Kaksostutkimuksessa kartoitetaan identtisten kaksosten ja erimunaisten kaksosten fenotyypit. Jos identtisillä kaksosilla ominaisuuden esiintyvyys on selvästi erimunaisia kaksosia korkeampi, voidaan sen katsoa olevan periytyvä. Tämä selittyy sillä, että kaikilla kaksosilla on ollut keskenään sama ympäristö, mutta identtisillä kaksosilla on enemmän yhteisiä geneejiä; geneettinen ominaisuus on todennäköisesti molemmilla kaksosilla, kun taas erimunaisilla kaksosilla ominaisuus saattaa olla vain toisella. (Gibson ym. 2008)
- **Karyotyypianalyysi** on kehittyneen geenitekniikan takia jo pikkuhiljaa vanhanaikaiseksi jäävä menetelmä. Karyotyypauksella voidaan selvittää suuret kromosomimuutokset, kuten siirtymät, häviämät ja kahdentumat. Mikroskoopilla voidaan nähdä 10 M:n ja *in situ*-hybridisaatiolla 100 ep:n kokoiset alueet. Näillä menetelmillä ei kuitenkaan saada mitään tietoa DNA-alueen sekvenssistä. Karyotyypaus on edelleen käytössä kliinisessä genetiikassa, mutta tutkimustyössä sitä ei yleisesti käytetä. Tässä tutkimuksessa mainitut dysleksian ehdokasgeenit DYS11 ja ROBO1 ovat löytyneet alun perin karyotyypauksen avulla. (Gibson ym. 2008.)

- **Kytkentäanalyysin** tavoitteena on löytää perinnölliseksi todettuun ominaisuuteen kytkeytyvät perimän alueet. Menetelmässä käytetään hyväksi geenimerkkejä, jotka ovat kahden, kolmen tai neljän nukleotidin toistojaksoja. Geenimerkkien periytyminen on yleensä analysoitu perhemateriaaleilla, jossa tutkittavan ominaisuuden periytymistapa tunnetaan. Tutkittavaan tautiin kytkeytynyt perimän alue, lokus, paikannetaan siten, että analysoidaan terveiden ja sairaiden koehenkilöiden tietyt geenimerkit, yleensä noin 1000 SNP:tä. Geenimerkit monistetaan PCR:llä ja erotetaan geelielektroforeesilla. Näin saadaan kerättyä tietoa terveen ja sairaan ihmisen geenimerkeistä. Tutkimuksessa lasketaan kytkentä-arvo, ns. LOD score-luku (logaritminen todennäköisyysuhde), joka ilmoittaa, kuinka usein tietty alleeli periytyy sairauden kanssa verrattuna saman alleelin sattumanvaraiseen periytymiseen tutkimusmateriaalissa. (Aula ym. 2006.) LOD-score lasketaan kaavalla 1.

$$LOD = \log_{10} \frac{p(\text{periytyy yhdessä sairauden kanssa})}{p(\text{ei periydy sairauden kanssa})} \quad \text{Kaava 1.}$$

Kyt kennän katsotaan olevan tilastollisesti merkittävä LOD-score-arvon ollessa yli 3. Tämä vastaa suunnilleen  $p$ -arvoa 0,0002. (Ollikainen ja Uimari 2001-2004.)

- Geenimerkki itsessään ei aiheuta sairautta, vaan sen läheisyyteen kytkeytynyt tautigeeni, jota etsitään **assosiaatioanalyysillä**. Kyt kentä perustuu olettamukseen, että tarpeeksi lähekkäin olevilla perimän alueilla ei tapahdu tekijäinvaihdosta eli rekombinaatiota meiosisissa, vaan alueet ja niiden sisältämät geenimerkkien alleelit periytyvät yhdessä. Juuri tämän takia voidaan olettaa tautigeenin sijaitsevan kyt kentäanalyysissä löytyneen geenimerkin läheisyydessä ja lähialueiden sekvensointi ja tautiin kytkeytyneen alleellin etsiminen voidaan aloittaa. (Aula ym. 2006.)

Geenitekniikka kehittyy jatkuvasti, ja nykyään käytettävät DNA-sirut ovat avanneet uusia mahdollisuuksia. DNA-sirujen avulla voidaan jo osittain jättää kytkentäanalyysikin väliin. DNA-siruilla on mahdollista tehdä jopa miljoonan SNP:n haravointi näytteistä (Genome-Wide Association Studies, GWASs), jolloin tautigeeni voidaan löytää ilman monimuotoisia geenimerkkejä. (Gibson ym. 2008.) Tällainen tutkimus tehdään yleensä suurissa, tuhansien tapausten ja verrokkien materiaaleissa (ns. case-control-tutkimus).

## 2.4 Kielen käsittely aivoissa

Ei voida nimetä yhtä tiettyä aivoaluetta, jossa kieli prosessoitaisiin. Kieli käsittää kuuloaistimisen, näköärsyksen (kirjaimet) aistimisen, muistin, sanojen muodostamisen, puhekyvyn jne. Karkeasti voidaan kuitenkin jaotella kielen käsittely aivoissa siten, että vasen aivopuolisko ohjaa puhetta, foneemista analyysia ja oikeakätisillä myös kirjoittamista. Lisäksi vasen aivopuolisko tallentaa sanat muistiin. Oikeassa aivopuoliskossa tapahtuu visuaalinen aistiminen, ja siten se on tärkeä lukemisessa ja kirjoittamisessa. (Ahvenainen & Holopainen 1999.)

Lukemisen kannalta tärkeitä aivotoiminnan komponentteja ovat fonologinen tietoisuus, fonologinen koodaus, ortografinen koodaus ja nopea nimeäminen. Nämä muodostavat lukijalle kokonaiskuvan sanasta kirjaimina, äänteinä ja merkityksellisenä kokonaisuutena.

*Fonologinen tietoisuus* on kyky jakaa sana äännteiksi eli foneemeiksi. Jokaista kirjainta vastaa tietty äänne, foneemi.

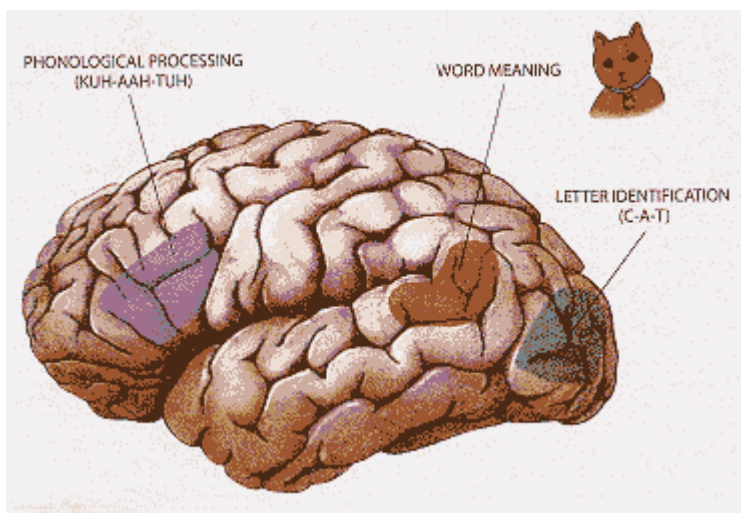
- *Fonologinen koodaus* on kyky lausua sanoja (= kirjainsarjoja), joita ei ole ennen kuullut. Kyky perustuu opittuun kirjain-foneemiyhteyteen, joka on mahdollista oppia myös paljon poikkeuksia sisältävissä kielissä, kuten englannissa. Tätä kykyä mitataan usein pseudosanoilla, jotka ovat testattavan äidinkielen rakennetta vastaavia kirjainsarjoja, jotka eivät tarkoita mitään.
- *Ortografinen koodaus* on kyky tavata sanoja. Esim. englannin kielessä yhteys kirjoitusasun ja lausumisen välillä on monimutkainen, ja lisäksi kieli sisältää

sanoja, jotka lausutaan samalla tavalla, mutta kirjoitusasu on eri. Normaalilla lukutaidolla pystyy kuitenkin tavaamaan myös tällaisia sanoja.

- *Nopea nimeäminen* on kyky nimetä nähty asia välittömästi. Kykyä testataan näyttämällä koehenkilölle sarja numeroita, kirjaimia, esineitä tai värejä. Tämä kyky korreloi usein lukemisen sujuvuuden kanssa. Tämä onkin loogista, sillä lukijan pitää sanan varsinaisen lukemisen lisäksi hahmottaa mielessään, mitä sana oikeastaan tarkoittaa. (McGrath ym. 2006.)

Kielen ymmärtäminen sekä puhutussa, että kirjoitetussa muodossa on korvan, silmien ja aivojen monimutkaista yhteistyötä. Aivot ovat prosessointikeskus, jonka rakenteen täytyy olla oikein järjestäytynyt, jotta kirjaimet ja foneemit saavat oikean muodon. Aivojen kyky varastoida tietoa ja toistaa opittuja asioita perustuu oikein muodostuneeseen hermosoluverkoston.

Kuvassa 3 on havainnollistettu lukemiseen tarvittavat tapahtumat ja niiden sijoittuminen aivokuorella.



Kuva 3. Lukemisessa esiintyvät tapahtumat aivokuorella

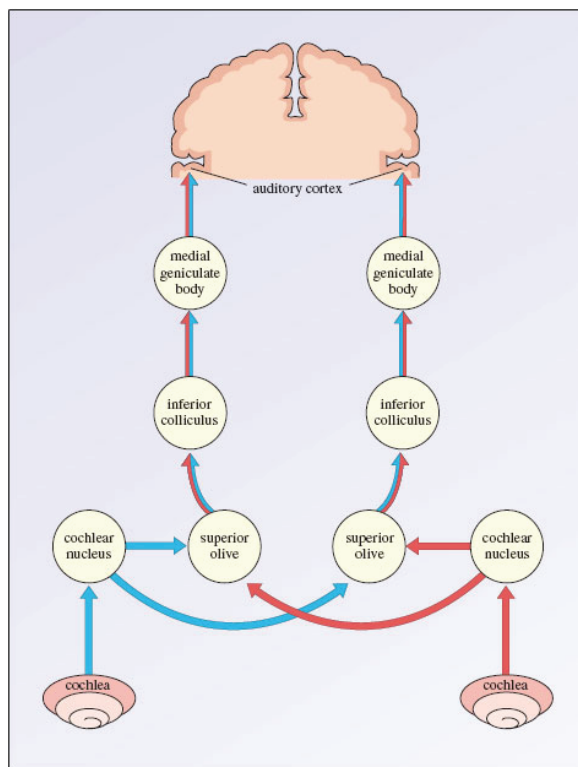
## 2.5 Musiikin käsittely aivoissa

Vaikka musiikin tunnistus ja käsittely ovat aivojen monimutkaista toimintaa, kuuloaisti on tärkeä äänen ja musiikin tunnistamisessa ja siitä nauttimisessa. Ääni on ilmanpaineen vaihtelua, joka välittyy korvan tärykalvon kautta eteenpäin aivosillalla sijaitseviin ylempiin oliivutumakkeisiin. Oliivutumakkeissa otetaan vastaan tieto äänen tulosuunnasta ja saapumisajasta kumpaankin korvaan. Aistiärsyke kulkee oliivutumakkeisiin molemmista korvista, ja saatu informaatio käsitellään sopivaan muotoon keskiaivojen molemmilla puolilla sijaitsevissa alakukkuloissa (inferior colliculi). Alakukkuloista informaatio siirtyy sisempien polvekenystysten kautta kuuloaivokuorelle, jossa lopullinen aistiminen tapahtuu. (Psykonet.)

Vasen aivopuolisko aistii musiikin rytmin sekä sävelten keston ja ajallisen järjestyksen. Oikealla puolella taas painottuu musiikin melodian, sävelkorkeuden ja sävyjen aistiminen. (Psykonet.)

Zatorren tutkimus (2003) valottaa, kuinka kuuro Beethoven kykeni säveltämään huipputeoksia. Jo aikaisemmin Zatorre oli selvittänyt (Zatorre 2002), mitkä aivoalueet aktivoituvat musiikkia kuunnellessa. Menetelmänä oli tutkia potilaita, joilla oli aivovamma tietyllä alueella. Potilaat, joilla vaurio oli ohimolohkon kuuloalueella, kärsivät hahmottamisongelmista musikaalisissa tehtävissä. Merkillepantavaa oli, että ongelmat olivat vaikeampia, kun vaurio oli oikealla aivopuoliskolla. Tutkimuksessa selvitettiin, ovatko nämä alueet oleellisia myös silloin, kun koehenkilö kuvittelee kuulevansa musiikkia. Tulokset olivat hyvin samanlaisia kuin oikean musiikin aistimisen yhteydessä. Lisäksi testattiin terveitä koehenkilöitä toiminnallisen magneettikuvauksen, fMRI:n (functional Magnetic Resonance Imaging) avulla. Koehenkilöille annettiin sekä kuultuun että kuviteltuun musiikkiin liittyviä tehtäviä ja fMRI:llä kuvattiin aivojen aktiiviset alueet. Sekä kuultu että kuviteltu musiikki näkyivät

aktiivisuutena kuulokuorella, ja lisäksi todettiin, että oikean puolen kuulokuori oli vasenta aktiivisempi kummassakin tapauksessa.



Kuva 4. Äänen aistiminen kuuluelimissä ja aivoissa

## 2.6 Musiikki

Musiikki on yleismaailmallinen ilmiö, eikä sen harrastaminen jossain muodossa (kuuntelu, soittaminen, laulaminen, säveltäminen) ole sidottu kulttuuriin, ikään tai sukupuoleen. Musiikki on historioitsijoille vaikea kohde, sillä konkreettiset todisteet musiikin harjoittamisesta alkavat vasta vanhimmista säilyneistä nuottikirjoituksista ja tätä vanhempaa todistemateriaalia on vaikea löytää. Kuitenkin esim. Ranskasta on löytynyt huilunkappaleita, jotka ovat iältään n. 50 000 vuotta (McDermott ja Hauser



2005), ja aina tähän päivään asti on olemassa löydöksiä, jotka tukevat olettamusta, että musiikkia on harjoitettu ihmiskunnan alusta asti. Löydökset tukevat myös ajatusta siitä, että musiikin harjoittaminen ei ole peräisin yhdeltä maantieteelliseltä alueelta, vaan musiikkia on alettu harjoittaa itsenäisesti eri kulttuurialueilla. Eri kulttuureilla on erilainen tapa toteuttaa musiikkia, mutta tutkijat ovat löytäneet erilaiselta kuulostavien musiikkikulttuureiden takaa yhteneviä alueita. Näiden tietojen pohjalta voidaan esittää kysymys: onko kyky harjoittaa musiikkia meissä sisäsyntyistä, eli onko musiikilla biologinen tausta ja siten merkitys ihmisen evoluutiossa?

Musiikin tutkimisessa on yleensä painotettu musiikin kulttuurista merkitystä yksilölle ja yhteisöille. Viime aikoina musiikkia on ruvettu ajattelemaan myös biologisena ominaisuutena, jolla on voinut olla merkitystä myös ihmisen evoluutiossa. Pullin ym. (2008) tutkimus oli ensimmäinen, jossa kartoitettiin musikaalisuuteen kytkeytyviä geenejä ja tutkimustulokset osoittivat, että ihmisen musikaalisuuteen vaikuttavat vahvasti useat perimän alueet. Tulokset viittaavat siihen, että mieltymys musiikkiin ja sen harrastamiseen on osittain synnynnäistä, ja tämän vuoksi voidaan olettaa sillä olevan myös jokin tehtävä evoluutiossa. Darwin esitti jo vuonna 1817, että musiikin tarkoitus olisi houkuttaa kumppania paritteluun ja tämän teorian vahvasti Miller (2000) esittämällä, että musiikki on tapa tuoda esille yksilön aivotoimintaa ja siten perimän laadukkuutta. Eihän Odysseuskaan voinut vastustaa seireenien laulua. Yleisemmin musiikki nähdään kuitenkin kommunikointivälineenä yhteisötasolla.

Musiikki on kautta aikojen ollut yhteisöä yhdistävä tekijä, sen avulla voi ilmaista tunteita ja kommunikoida sekä tunnistaa tiettyyn ryhmään kuuluva yksilö. On siis aiheellista ajatella, että ihmisen kehityksen alkuvaiheessa musiikki on antanut sitä toteuttamaan kykeneville yksilöille etulyöntiaseman ja siten musikaalisuus olisi ominaisuutena yleistynyt. (Peretz 2006). Pinker (1997) esitti, että musiikki on ”kuulojärjestelmän juustokakku”. Vertaus tarkoittaa sitä, että ihminen on mieltynyt juustokakkuun sen sisältämän, ihmiselle tärkeiden rasvan ja sokerin takia, mutta itse juustokakku ja sen hyvä maku eivät ole ihmiselle elintärkeitä. Samoin kuulo ja

kommunikointi ovat ihmisen selviytymisen kannalta tärkeitä, mutta musiikki ja sen ymmärtäminen olisivat vain sivutuotteita, eivät elintärkeitä ihmiselle. Pinkerin teoria ei ole kovin suosittu, ja tuntuukin suoranaiselta vähättelyltä olettaa, että aistikyky, joka on jo vastasyntyneellä ja jota ihmiset ikään, kansalaisuuteen ja sosiaaliseen taustaan katsomatta ovat toteuttaneet kymmeniä tuhansia vuosia, olisi vain sattumaa tai merkityksetöntä ihmisen kehityksessä.

Musiikin aistimista on tutkittu vastasyntyneillä ja vauvoilla. (Trehub 1984, 2001, 2003, 2006). Tutkimukset osoittavat, että ihmisellä on syntymästään asti kyky oppia tunnistamaan melodioita ja prosessoida musiikkia ja sen osia. Vauvoilla ja aikuisilla on osittain eriävät mekanismit musiikin prosessointiin, mutta hyvin suurelta osin ne ovat yhteneväisiä. Imeväisikäiset kykenevät esimerkiksi erottamaan tutun kappaleen miltä tahansa sävelkorkeudelta soitettuna samoin kuin aikuiset (Trehub 2006). Vastasyntyneiden on todettu kuuntelevan musiikkia mieluummin kuin puhetta (Trehub 2001), ja äidit ovat laulaneet hyvin samantyyppisiä tuutulauluja lapsilleen kautta aikojen, ympäri maailmaa. Nämä tutkimukset vahvistavat ajatusta siitä, että mieltymys musiikkiin on meissä biologisesti ohjelmoitu eikä se ole turha ominaisuus.

### **2.6.1 Musikaalisuustestit**

Musikaalisuutta voidaan mitata useilla eri tavoilla. Tähän tutkimukseen valittiin testit, jotka mittaavat enemmän henkilön synnynnäistä musiikin ymmärtämistä kuin harjoittelun tuloksena syntynyttä osaamista.

#### **Seashoren musikaalisuustestit**

Seashoren sävelkorkeuden (Seashore pitch, SP) ja Seashoren sävelen keston (Seashore time, ST) ovat testejä, jotka mittaavat henkilön kykyä erottaa yksittäisten sävelten korkeuden ja keston eroja. Testit koostuvat sävelpareista ja henkilön tehtävä on

havaita sävelparin sävelien mahdolliset erot sävelkorkeudessa tai pituudessa. Molempien testien maksimipistemäärä on 50 (Pulli ja muut 2008.)

### **Kai Karman musikaalisuustesti, Karma Music Test**

Henkilön mahdollisuus hahmottaa musiikin rakenteita riippuu pitkälti kuulojärjestelmän kyvystä tunnistaa eroja sävelien korkeudessa ja kestossa (Karma 2007).

Kai Karman musikaalisuustesti (Karma Music Test, KMT) mittaa henkilön kykyä hahmottaa musiikin rakenteita. Harjoittelun vaikutus testin tulokseen on todennäköisesti vähäinen. Siten myös henkilö, joka ei harjoita musiikkia säännöllisesti, voi saada hyvät pisteet KMT:stä. Testi soveltuu yli 7-vuotiaille, ja sitä käytetään yleisesti musiikkioppilaitosten pääsykokeissa, esimerkiksi Sibelius-Akatemiassa.

Testi koostuu 40:stä kahdeksan sävelen sarjasta. Jokainen sarja soitetaan ensin kolmesti. Lyhyen tauon jälkeen sarja soitetaan vielä kertaalleen. Viimeisellä kerralla sarja on joko samanlainen kuin kolmella ensimmäisellä kerralla tai hieman muutettu. Testattavan henkilön on erotettava sarja joko samaksi tai muutetuksi. Pisteytys tapahtuu oikeiden vastausten perusteella, ja maksimipistemäärä on 40. (Pulli ym. 2008.)

## **2.7 Dysleksia**

Dysleksia eli lukihäiriö on yleinen lukemiseen ja kirjoittamiseen liittyvä häiriö, josta kärsii 5-10 % (jopa 17,5 %) väestöstä. Lukihäiriö ilmenee, vaikka potilaalla on riittävä älykyys, koulutus ja sosiaalinen ympäristö eli hyvät edellytykset sujuvaan lukemiseen. Suuri esiintyvyyden vaihtelu johtuu osittain epätarkasta diagnosoinnista ja

perinnöllisen dysleksian monista ilmenemismuodoista. Dysleksian esiintyvyys vaihtelee myös kielialueittain, esimerkiksi suomalaisista aikuisista 6 % kärsii dysleksiasta. Oletetaan, että dysleksian biologinen tausta on kaikilla alueilla sama, mutta dysleksian ilmeneminen riippuu kielen kirjoitusjärjestelmästä. Suomi on helppolukuinen kieli, sillä kirjoitettua kirjainta vastaa yleensä tietty äänne. Esimerkiksi englannin kielen lukeminen on vaikeampaa, sillä kirjaimen ja äänteen yhteys on monimutkaisempi. Aikaisemmin on ajateltu, että dysleksia olisi miehillä naisia yleisempää, mutta uusimpien tutkimusten mukaan sukupuolitekijä on luultua heikompi. (Kaminen-Ahola 2007.)

Dysleksia todistettiin periytyväksi sairaudeksi 1950 (Hallgren 1950). Sen jälkeen on todettu, että molemmat identtiset kaksoiset kärsivät dysleksiasta useammin kuin molemmat ei-identtiset, josta myös voidaan päätellä dysleksian olevan voimakkaasti perinnöllinen sairaus (Defries 1996). Dysleksian on todettu olevan monitekijäinen, perinnöllinen ominaisuus, joka ei periydy Mendelin periaatteen mukaan, joitakin poikkeuksia lukuun ottamatta. (Kaminen-Ahola 2007). Sen syntyyn vaikuttavat myös ympäristötekijät. Lisäksi sairauden vaikeusaste riippuu altistavien alleelien määrästä.

Dysleksian selittäminen fysiologisesti tai kognitiivisesti jonkin tarkan mallin mukaan on vaikeaa juuri monimuotoisen ilmentymisen takia, ja lisäksi tietämys dysleksian molekyyli-tason muutoksista on vielä puutteellista. On kuitenkin esitetty teorioita, joiden avulla dysleksiaan liittyviä ilmiöitä voidaan selittää. Dysleksian selittämiseksi on kehitetty teorioita, joista tärkeimmät ovat fonologinen häiriö, magnosellulaarinen häiriö ja näiden yhdistelmä.

### **2.7.1 Fonologinen häiriö**

Erityisesti kielissä, joissa kirjain-äännevastaavuus ei ole tarkka, on havaittu fonologisessa tietoisuudessa olevien puutteiden johtavan usein lukihäiriöön.

Lukihäiriöstä kärsivät lapset ovat menestyneet huonosti testeissä, joissa on pitänyt osittaa sanoja ja yhdistää osia uudelleen, muistaa lyhyitä äännesarjoja ja riimitellä sanoja. Fonologiseen häiriöön liittyy myös vaikeudet erottaa toisistaan lausutut, toisiaan muistuttavat kirjainyhdistelmät. Nämä ongelmat voivat johtua puutteista primaarisessa kuulohavainnoinnissa. (Kaminen-Ahola 2007, Lyytinen ym. 2002.)

### **2.7.2 Magnosellulaarinen häiriö**

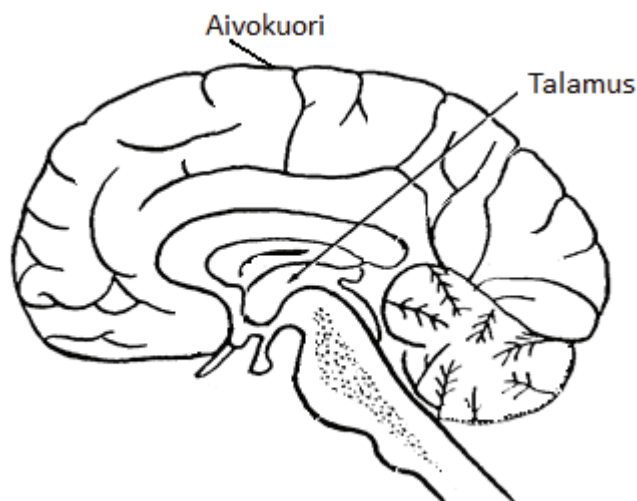
Magnosellulaarinen hermosolu on näköjärjestelmän suuri hermosolu, joka on herkkä muuttuville ja liikkuville ärsykeille laajassa näkökentässä. Dysleksiaan liittyy puutteita näköhavaintojen tekemisessä, ja tämä tukee magnosellulaarista teoriaa. Myös kuulojärjestelmässä on magnosoluja ja tämän järjestelmän puutteellinen toiminta voi liittyä dysleksiaan ja etenkin foneemisen tietoisuuden puutteellisuuteen. (Kaminen-Ahola 2007, Lyytinen ym. 2002.)

### **2.7.3 Fonologisen ja magnosellulaarisen häiriön yhdistelmä**

Edellä mainitut teoriat dysleksian selittämiseksi on yhdistetty usealla tavalla perusteltuina. Yksi selitys on, että aivojen kyky käsitellä nopeaa informaatiovirtaa (äänen muutokset, lukemiseen liittyvä informaatio) on puutteellinen. Tämä selittäisi sekä visuaaliseen että kuuloaistimiseen liittyvän dysleksian ja lisäksi foneemisen tiedostamisen puutteeseen liittyvät dysleksian muodot. (Stein ja Walsh 1997, Lyytinen ym. 2002.)

Ns. bottom-up (alhaalta ylös) -teoria (Rasmus 2004) ehdottaa, että muutokset talamuksessa johtavat tiettyjen aivokuorialueiden (ks. kuva 5) epänormaaliin rakenteeseen. Tämä selittäisi kuuloaistimisen puutteellisuuden vaikutuksen fonologiseen tiedostamiseen ja myös näköaistimisen poikkeuksellisen toiminnan aiheuttamat muut ongelmat. (Rasmus 2004.)

Ns. top-down (ylhäältä alas) -teorian vaikutusreitti on päinvastainen bottom-up-teorialle. Tässä teoriassa hypoteesina on se, että aivokuoren epänormaali rakenne johtaa muutoksiin myös talamuksessa ja siten vaikeuksiin kuulo- ja näköaistimisessa. Tätä tukevat eläimillä tehdyt tutkimukset. (Kaminen-Ahola 2007.)



Kuva 5. Aivokuoren ja talamuksen sijainnit aivoissa

Dysleksian mekanismien tarkempi tuntemus olisi tarpeen, jotta voitaisiin kehittää entistä yksilöllisempiä ja paremmin kohdennettuja terapiamuotoja. On mahdollista, että molekyyligeneettiset tutkimukset antavat uutta tietoa lukihäiriön synnystä molekyylitasolla, sillä alttiusgeenien tunnistamisen avulla voidaan selvittää niiden koodaamien molekyylien rakenne ja vaikutuspaikka.

## 2.7.4 Dysleksiageenit

Dysleksiaan liittyviä ehdokasgeenipaikkoja on tunnistettu tähän mennessä 11 ja ehdokasgeenejä kuusi (taulukko 1).

*Taulukko 1. Tunnetut dysleksia- ehdokasgeenit ja –paikat.*

Ehdokasgeeni	SNP	Lähde
DYX1C1	rs11629841	Taipale ym. 2003
	rs3743205	
ROBO1	6483	Hannula-Jouppi ym. 2005
	6651	
DCDC2	rs793862	Meng ym. 2005
	rs807701	
KIAA0319	rs2038137	Cope ym. 2005
	rs2143340	
	rs4504469	
MRPL19		Anthoni 2007
C2ORF3	rs714939	Anthoni 2007

### ROBO1

ROBO1 sijaitsee kromosomissa 3 lokuksessa DYX5. Se löydettiin alun perin tutkimuksessa, jossa kartoitettiin aivopuoliskoja yhdistäviin aksoneihin vaikuttavia geenejä. ROBO1:n geenituotteella on tehtävä prosessissa, jossa neuronit suuntaavat aksonit tietyille reitille. ROBO1-geenillä on siis suora vaikutus hermosoluverkoston rakentumiseen aivoissa. Suomalaisessa dysleksiaperheessä on todettu kromosomien välinen siirtymä tässä geenissä. Siirtymän seurauksena syntyneen haplotyyppin genomissa ROBO1-tuotteen ilmeneminen on vähentynyt tai puuttuu kokonaan. Tämän oletetaan aiheuttavan muutoksia aivopuoliskojen välisten aksonien muodostumisessa ja sen seurauksena potilaalle vaikeuksia lukemisessa. (Hannula-Jouppi ym. 2005.)

## **DCDC2**

DCDC2 sijaitsee lokuksessa 6p22, joka on eniten tutkittu dysleksiaan liitetty perimän alue. DCDC2 (Schumacher ym. 2006) koodaa proteiinia, jonka uskotaan vaikuttavan hermosolujen migraatioon. Hermosolujen migraatio tarkoittaa hermosolun siirtymistä syntykohdastaan lopulliselle paikalleen. Migraatio on oleellinen osa aivojen kehitystä. DCDC2:n geenituote ilmenee sekä sikiöillä että aikuisilla. Tutkimuksen mukaan voidaankin pitää loogisena, että hermoston migraatioon vaikuttavan geenin toiminta on häiriintynyt dyslektikoilla, joiden hermoston migraatio ja kypsyminen on epänormaalia. Tutkimuksessa havaittiin tämän geenin vahva assosiaatio dysleksiaan, erityisesti vaikea-asteiseen. Myös Haying ym. (2005) totesivat tutkimuksessaan, että geenin ilmenemisen heikkeneminen johti hermosolujen migraation muutokseen.

## **KIAA0319**

KIAA0319 sijaitsee lokuksessa 6p21, aivan DCDC2:n läheisyydessä. Kytkeä dysleksiaan on todettu geenin edessä olevalla säätelyalueella, joka säätelee geenin ilmenemisen ajoitusta ja voimakkuutta. Copen ym. tutkimuksessa (2005) todettiin, että dysleksiaan kytkeytyneet yhden emäksen polymorfiat (single nucleotide polymorphism, SNP) vähensivät KIAA0319:n transkriptiota. Samaan tulokseen päätyivät Harold ym. (2006) ja Luciano ym. (2007). (Gibson ym. 2008.)

KIAA0319:n lähetti-RNA ilmenee suurissa määrin lähinnä visuaalisen aistimisen ja päälaen alueella aivoissa. Tutkimuksissa, joissa geenituotteen normaali muodostuminen on estetty, on todettu epänormaalia migraatioita käsitellyissä hermosoluissa. Geenituotteen tarkkaa molekyyli-tason toimintatapaa aivoissa ei vielä tunneta, mutta viimeaikaiset tutkimukset viittaavat siihen, että se toimii hermosolujen solukalvolla ja saattaa olla yhteydessä hermosoluja tukeviin glia-soluihin. (Parrachini ym. 2006, Gibson ym. 2008.)



## **DYX1C1**

DYX1C1 sijaitsee lokuksessa 15q21. Suomalaisesta perheestä on löydetty tällä alueella tapahtunut kromosomisiirtymä, jonka on todettu vioittavan DYX1C1-geeniä ja periytyvän yhdessä dysleksian kanssa (Nopola-Hemmi ym. 2000). Geeni ilmenee useissa kudoksissa, mm. aivokuoren hermosoluissa ja valkoisen aineen glia-soluissa. Tarkempaa tietoa proteiinin tehtävästä ei ole. Taipale ym. (2003) tutkivat, onko tällä geenillä yhteyttä dysleksiaan myös niillä potilailla, joilla siirtymää ei ole tapahtunut. Tutkimuksessa löytyi kaksi SNP:tä, jotka kytkeytyivät dysleksiaan. Tulokset eivät olleet täysin selviä ja kiistattomia, mutta kuitenkin suuntaa antavia. Toinen SNP on geenin translaation aloitusalueella ja toinen muodostaa ennenaikaisen lopetuskoodin, tosin tämän takia jää vain neljä aminohappoa muodostumatta. Useissa tutkimuksissa on kuitenkin epäonnistuttu toistamaan Taipaleen ja kumppaneiden tutkimustuloksia ja joissakin tutkimuksissa on saatu ristiriitaisia tuloksia. Toistaiseksi ei ole pystytty osoittamaan, että näiden riskialleelien vaikutus olisi yleistä dysleksiassa. Yksi selitys ristiriitaisille tuloksille voisi olla läheisen geenin tai joidenkin DNA-muutosten kytkeytymien löydettyihin riskialleeleihin, jolloin tutkimus pitäisi kohdentaa ko. geenialueisiin. DYX1C1 ei siis ole kiistaton dysleksiageeni, mutta ilman muuta lisätutkimuksen arvoinen kohde. (McGrath ym.)

## **C2ORF3**

C2ORF3 on uusi löydös, ja sen toiminnasta tiedetään vasta vähän. Yksi hypoteesi (Anthoni ym. 2007) on, että kauempana itse geenistä olevalla geenien välisellä, alueella sijaitsevat muutokset saattaisivat vaikuttaa geenin toimintaan. Geenituote ilmenee sekä sikiön että aikuisen aivoissa useilla alueilla, mutta tarkempaa toimintamekanismia ja kohdemolekyylejä ei tunneta. Riskihaplotyyppin heterotsygoottisilla kantajilla geenituotteen ilmeneminen on selvästi alentunut. Anthonin ja kumppaneiden tutkimuksessa löydetty riskihaplotyyppi assosioitui myös

MRPL19-geenin alentuneeseen ilmenemiseen, ja todennäköistä on, että riskihaplotyyppi sijaitsee näitä molempia geenejä säätelevällä säätelyalueella.

## 2.8 Musiikki ja dysleksia

On suhteellisen uusi ajatus, että musiikin ja kielen käsittely olisivat osin päällekkäisiä prosesseja, ja tutkimuksia aiheesta on vähän. Toisaalta, kuten lukihäiriötä tutkittaessa on todettu, kielen käsittelyn ongelmiin liittyy usein puutteet fonologisessa prosessoinnissa, joka puolestaan liittyy tiiviisti äänteiden ymmärtämiseen ja kokonaisuuden muodostamiseen äänteistä. Lisäksi heikentynyt kuulo ja vaikeudet käsitellä nopeaa ääni-informaatiota ovat mahdollisia syitä lukihäiriöön. Voidaan olettaa, että edellä mainitut ongelmat vaikuttavat myös musiikkiänten prosessointiin.

Musikaalisuuden geneettistä taustaa selvittävässä tutkimuksessa (Pulli ym. 2008) havaittiin, että eräs voimakkaasti kytkeytyvä ehdokasgeeni yhdistyy myös lukihäiriöön: netriinireseptori UNC5C:n esiaste on vuorovaikutuksessa netriinien kanssa. Netriinit ohjaavat hermosolujen migraatiota sekä aksonien leviämistä ja toimivat yhteistyössä ROBO-geeniperheen kanssa. Tämä aineenvaihduntareitti antaa aihetta musikaalisuuden ja kielenkehityksen geneettisen ja neurologisen yhteyden tutkimiselle.

Jentschekken (2008) tutkimuksessa tutkittiin lukihäiriöisten lasten musikaalista prosessointia, ja verrokkiryhmänä oli kielellisesti normaalisti kehittynyt, muuten koeryhmää vastaava joukko lapsia. Hypoteesina oli, että lukihäiriöisillä lapsilla olisi puutteita myös musiikin käsittelyssä. Tutkimuksessa koehenkilöille soitettiin sointusarjoja ja mitattiin niiden aikaansaamat vasteet aivoissa. Mitattavat vasteet, EARN ja N5, ovat nopeita, automaattisia heijasteita, jotka liittyvät kokonaisuuden rakentamiseen äänteistä. Tulokset olivat yksiselitteisiä: verrokkiryhmässä vasteet muodostuivat odotetusti, mutta lukihäiriöisillä lapsilla vasteita ei muodostunut.

Tutkimuksessa saatiin useita todisteita musiikin ja kielen käsittelyn yhteisistä aivoalueista.

Karman tutkimuksessa (2007) todettiin, että KMT:n avulla voidaan merkittäväällä todennäköisyydellä havaita dysleksia. Matalat pisteet KMT:ssä ennustavat mahdollista taipumusta dysleksiaan. Tämä tukee ajatusta, että lukihäiriö liittyy kuuloaistinvaraiseen kielen oppimiseen, joka on helpompaa synnynnäisesti musikaalisille. Se puolestaan viittaa musikaalisuuden ja kielenkehityksen yhteiseen biologiseen taustaan. Musikaalisuuden perinnöllisyyden tutkimuksessa (Pulli ym. 2008) löytyi positiivinen alue kromosomissa 18q, josta on aikaisemmin löydetty dysleksiaan kytkeytynyt alue (Fisher ym. 2002). Tutkimustulos viittaa siihen, että alueella saattaa sijaita geeni, jolla on vaikutus sekä musikaaliseen kykyyn että lukihäiriölle altistumiseen.

### 3 KOKEELLINEN OSA

Tutkimuksen tavoitteena oli etsiä mahdollinen yhteys tunnettujen dysleksiaan altistavien geenimuotojen ja musikaalisuuden välillä.

Tähän tutkimukseen otettiin mukaan taulukossa 2 esitetyt ehdokasgeenipaikat. Taulukossa on myös tässä työssä käytetyt lyhenteet geenipaikkojen nimistä.

*Taulukko 2. Ehdokasgeenipaikkojen mutaatiot ja nimien lyhenteet*

SNP	Nimen lyhenne	Kromosomi	Emäs	Mutaatio
KIAA0319_rs2038137	K_20	6	24645943	C→A
KIAA0319_rs2143340	K_21	6	24659071	A→G
KIAA0319_rs4504469	K_45	6	24588884	C→T
DCDC2_rs793862	DC_79	6	24207200	A→G
DYX1C1_rs11629841	DX_11	15	55777638	T→G
DYX1C1_rs3743205	DX_37	15	55790530	C→T
C2ORF3_rs714939	C2_71	2	75835107	G→A

Lisäksi kromosomisiirtymän aiheuttama mutaatio geenissä ROBO1 oli mukana tutkimuksessa.

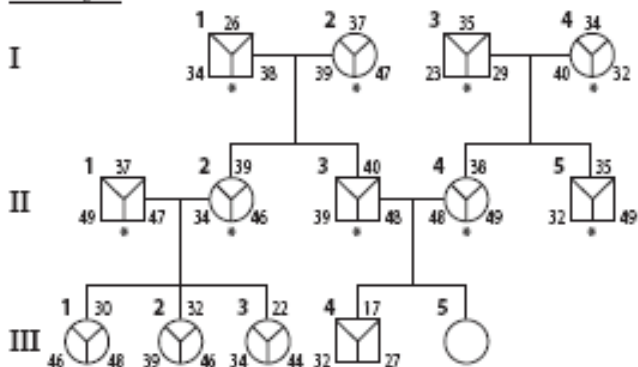
Tutkimus aloitettiin määrittämällä koehenkilöiden (ks. kohta 3.1.1 Perhemateriaali) musikaalisuus kolmella musikaalisuustestillä (ks. kohta 2.6.1 Musikaalisuustestit). Henkilöiden verinäytteistä eristettiin DNA, josta sekvensoitiin suoralla PCR-sekvensoinnilla tunnetut dysleksiaan liitetyt geenimuutokset tutkittavien ehdokasgeenien alueilta. Kun koehenkilöiden alleelit näissä geneissä oli selvitetty, tutkittiin erilaisten haplotyyppien ja musikaalisuustason periytymistä yhdessä. Analysointivälineenä käytettiin seuraavia ohjelmia: assosiaatiotestit perhemateriaaleille (Family Based Association Tests, FBAT), haplotyyppitestit

(Haplotype Based Association Tests, HBAT) ja kytkentäepätasapainoanalyysi kvantitatiivisille ja diskreeteille ominaisuuksille (Linkage Disequilibrium Analyses for Quantitative and Discrete Traits, QTDT)(Abecasis ym. 2000).

## **3.1 Materiaalit ja menetelmät**

### **3.1.1 Perhemateriaali**

Tämän tutkimuksen otos oli tutkimuksen alkaessa yhteensä 405 henkilöä. Näytteet koostuvat kahdesta eri ryhmästä. Ensimmäinen ryhmä on Pullin musikaalisuus-tutkimuksen materiaali, joka käsittää 234 henkilöä. Nämä henkilöt valittiin koko maan alueelta musiikkia harrastavista perheistä. Tavoitteena oli saada mukaan sukuja, joissa esiintyy paljon musikaalisuutta, ja tarkoitus oli koota yhdestä suvusta koehenkilöitä kolmessa eri sukupolvessa siten, että lasten molemmat vanhemmat, serkukset ja muut lähisukulaiset saataisiin mukaan. Kuvassa 6 on yhden suvun sukupuu. Kuvassa henkilön kohdalla olevat numerot tarkoittavat seuraavaa: vasemmalla Seashoren sävelen keston testin (ST) pisteet, ylhäällä Karman musikaalisuustestin (KMT) pisteet ja oikealla Seashoren sävelkorkeuden testin (SP) pisteet. \*-merkki tarkoittaa, että henkilöstä on DNA-näyte.

**Family 1**

Kuva 6. Esimerkki tutkimukseen osallistuvasta suvusta. Suvun 1 sukupuu.

Toinen koehenkilöryhmä on koottu myöhemmin, alkaen vuodesta 2007. Otos on kerätty ympäri Suomea ja mukana on runsaasti myös ei-musikaalisia koehenkilöitä.

### 3.1.2 DNA:n eristys

Suurin osa koehenkilöiden näytteistä oli jo eristetty DNA:ksi. Osa tutkimukseen osallistuneiden verinäytteistä eristettiin tutkimuksen aikana. Kun kaikki näytteet oli eristetty, niistä tehtiin 4 ja 40 ng/μl laimennokset 96-kuoppaisille levyille.

Materiaalit ja laitteet:

- A-puskuri (pH 7,6)
 

Sukroosi, MP 194018	0.32 M
Trizma Base, Sigma T-1503	0.01 M
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O, Merck 105833	0.005 M
Triton-X, BDH 30632	1 %
Deionisoitu vesi	

- B-puskuri (pH 8,0)
 

NaCl, Riedel 31434	0.075 M
EDTA=Idranal III, Riedel 34549	0.025 M
Trizma Base, Sigma T-1503	0.01 M
Deionisoitu vesi	
  
- Absoluuttinen EtOH, Altia
- Fenoli, Finnzymes/Amresco
- Proteinaasi K (20 mg/ml), Finnzymes
- Natriumdodekyylisulfaatti (SDS)( 20 %)
- Fenoli (pH 7,9)
- Kloroformi/isoamyylialkoholi (24:1)
- KCl (2 M)
- TE-puskuri (pH 8,0)
  - o 5 ml 2M Tris-puskuri
  - o 2 ml 500 mM EDTA
  - o Lisätään MQ-vettä litran tilavuuteen asti, autoklavoidaan
- Faasilukkogeeliputkia, Eppendorf
  
- Sentrifugi
- Spektrofotometri

Verinäytteet tulivat laboratorioon EDTA:ta sisältävissä putkissa. EDTA hajottaa verisolujen seinämiä ja estää veren hyytymistä. 10 ml verta kaadettiin 50 ml:n Falcon-putkiin, joihin lisättiin 40 ml A-puskuria. Putkia pidettiin 10 minuuttia jäissä, jotta A-puskurin hajottamista soluista vapautuvat, DNA:ta tuhoavat entsyymit lakkaisivat toimimasta. Tämä jälkeen sentrifugoitiin putkia 1200 x g, 4 °C: ssa 15 minuutin ajan. Sentrifugoimalla saatiin putken pohjalle solumateriaalista muodostunut pelletti, jossa DNA oli mukana. Supernatantti kaadettiin pois ja toistettiin A-puskurikäsitely ja sentrifugointi mahdollisimman tarkan talteenoton saavuttamiseksi. Supernatantti kaadettiin jälleen pois ja putkiin lisättiin 2 ml B-puskuria. Tässä vaiheessa pelletti

sisältää runsaasti proteiineja, jotka ovat peräisin soluista. Näitä hajottamaan lisättiin 50 µl proteinaasi K:ta ja 100 µl SDS: ää. Putkia inkuboitii yon yli 56 °C:ssa.

Seuraavana päivänä putkien sisältö kaadettiin faasilukkoputkeen, lisättiin 3 ml fenolia ja 3 ml kloroformi/isoamyylialkoholia ja sekoitettiin 15 minuuttia sekoittajassa. Fenoli-kloroformikäsittely saostaa hajonneet proteiinit ja isoamyylialkoholi estää fenolin vaahtoamisen. Orgaanisen ja vesifaasin erottamiseksi sentrifugoitiin putkia 1500 × g 10 minuuttia. Faasilukkoputkessa DNA:n sisältävä vesifaasi jää ylimmäksi, ja se voitiin kaataa suoraan 15 ml:n Falcon-putkeen. DNA saostettiin liuksesta lisäämällä 200 µl kaliumkloridia (2 M) ja 5 ml absoluuttista etanolia. Saostettu DNA sentrifugoitiin putken pohjalle (2000 rpm, 5 minuutin ajan), minkä jälkeen supernatantti kaadettiin pois. Pelletin annettiin kuivua 30–60 minuuttia, minkä jälkeen se liuotettiin 500 µl:aan TE-puskuria.

DNA-näytteiden laatu varmistettiin Nanodrop-laitteella, joka mittaa DNA:n puhtauden ja pitoisuuden spektrofotometrisesti. Nukleiinihappojen maksimiabsorbanssi on aallonpituudella 260 nm. Proteiineilla taas maksimiabsorbanssi on aallonpituudella 280 nm. Näiden kahden absorbanssin suhde puhtaalla DNA:lla on 1,8. Tästä paljon poikkeava arvo on merkki huonosti puhdistuneesta DNA:sta. Proteiini jäämät voivat inhiboida PCR-reaktiota. PCR voi onnistua jopa silloin, kun puhtaudesta kertova suhdeluku on noin yksi, mutta tällöin väärin negatiivisten tulosten riski on suuri. Näytteen tiedot tallennettiin tietokantaan (taulukko 9, s. 38).

Näytteet pipetoitiin säilytystä varten 1,5 ml:n Eppendorf- putkiin ja lopullinen säilytys on pakastimessa -80 °C:ssa.



### 3.1.3 PCR

Materiaalit ja laitteet:

- Alukkeet. Sekvenssit on esitetty taulukossa 3.

*Taulukko 3. Käytettyjen alukkeiden sekvenssit*

SNP	fwd-alukkeen sekvenssi	rev-alukkeen sekvenssi
KIAA0319_rs2038137	5'-CTT TCC TGA ATGCC AGA AG-3'	5'-ACG ACG AGG AGG AAC AAG TG-3'
KIAA0319_rs2143340	5'-TCA GAA TAA AAC ATG GCT TTG C-3'	5'-ATG GGG ATG CAA GTC ATC AG-3'
KIAA0319_rs4504469	5'-GTG CCT GGA GGG AAT GAG TA-3'	5'-AAA AGC CCA GTG CTC ACA GT-3'
DCDC2_rs793862	5'-CAA ATC AGC AAA GCT CAA CG-3'	5'-AAA TTC TAG TAG GCC TAT CAC AAA GG-3'
DYX1C1_rs11629841	5'-TGG CAA AGC AGT TCA TTG TG-3'	5'-AGT GCA TTT TTC TGC TGT GG-3'
DYX1C1_rs3743205	5'-GAA CAC GTC CGT GTC TCT GA-3'	5'-CAG CTT CCC TAG CAA CCA AG-3'
C2ORF3_rs714939	5'-AAC AAG AAA CCC ACC CAC TG-3'	5'-TCC ATG TTG GAA GAG GAA GG-3'

- Dynazyme II DNA-polymeraasientsyymi, Finnzymes
- Puskuriliuos (tulee entsyymien mukana, koostumusta ei kerrota), Finnzymes
- Steriili MQ-vesi
- dNTP-seos (pitoisuus jokaisen nukleotidin suhteen 10 mmol/l), Finnzymes
- DNA-näyte (4 tai 40 ng/μl, ks. taulukko 10)
- UV-kaappi
- PCR-laite

Alukkeet tilattiin Oligomerilta, joka valmistaa synteettistä DNA:ta ja RNA:ta tutkimustarpeisiin. Taulukon 4. mukaista ohjelmaa käytettiin läpi koko tutkimuksen,  $T_A$

ja reagenssisekoituksen koostumus määritettiin optimoinnissa (ks. kohta 4.2 PCR:n optimointi).

*Taulukko 4. PCR-ohjelma*

94 °C	4 min	alkudenaturaatio	} x 35
Entsyimin lisäys manuaalisesti			
94 °C	30 s	denaturaatio	
Ta	30 s	sitoutuminen	
72 °C	30 s	pidennys	
72 °C	10 min	loppupidennys	
10 °C	∞	säilytys	

### 3.1.4 Geelielektroforeesi

Materiaalit ja laitteet

- PCR-tuotetta
- 100 emäsparin kokostandardi, New England Laboratories
- 6 x ajoväri, New England Laboratories
- Agarosigeelijauhe, Euroclone
- TBE puskuri (Tris-boorihappo-EDTA)
  - 5 x TBE-puskuri
    - 54 g Tris
    - 27,5 g boorihappo
    - 4,75 g EDTA
    - Täytetään MQ-vedellä litran tilavuuteen
- Geelielektroforeesilaitte (ajo 400 mA. 160 V, 20 min.)
- UV-lampulla varustettu kamera geelin kuvaamiseen

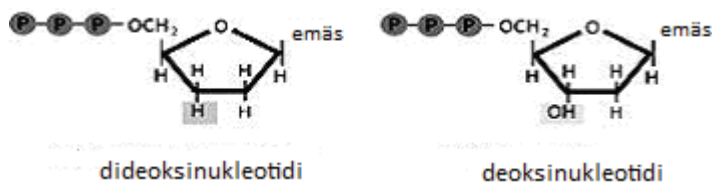
Valittiin geelille ajettavat näytteet siten, että 96-kuoppalevyn lähes jokaiselta riviltä ja sarakkeelta oli mukana vähintään yksi näyte. Pipetoitiin uudelle kuoppalevylle näytettä ja ajoväriä suhteessa 6:1. Pipetoitiin geeliin rivin ensimmäisiin kaivoihin kokostandardi, loppuriville värjätty näytteet ja käynnistettiin elektroforeesilaitte.

### 3.1.5 Sekvensointi

Materiaalit ja laitteet

- alukkeet (taulukko 3)
- eksonukleaasina ExoSAP-IT, Affymetrix
- leimana Big dye<sup>®</sup> Terminator v3.1, Applied Biosystems
- laimennospuskurina BigDye Dilution buffer v3.1, Applied biosystems
- Steriili MQ-vesi
- PCR-tuotetta
  
- PCR-laite

ExoSAP-it on eksonukleaasientsyymi, joka hajottaa ylijääneet alukkeet ja nukleotidit PCR-tuotteesta, jotta ne eivät häiritsisi sekvensointia, ja tekee templaattista yksijuosteista. BigDye<sup>®</sup> Terminator on DNA-polymeraasi, ja valmiissa reagenssisekoituksessa on mukana tavallisia nukelotideja sekä leimattuja dideoksinukleotideja. Dideoksinukelotidilla ei ole hydroksyyliiryhmää nukleotidin sokerikomponentissa, jolloin seuraava nukleotidi ei pääse kiinnittymään siihen (kuva 7).



Kuva 7. Dideoksinukleotidin ja deoksinukleotidin ero

DNA-polymeraasi rakentaa uutta juostetta templaatin rinnalle, ja leimatun nukleotidin liittyessä juosteeseen monistus lopetetaan. Jokainen emäs (A, T, C, G) on leimattu eri aallonpituudella fluoresoivalla leimalla. Näin saadaan eripituisia DNA-pätkiä, jotka päättyvät leimattuun A-, B-, C- tai D-emäkseen. Sekvenssi luetaan kapillaarielektroforeesilaitteella. Menetelmä on siis periaatteeltaan sama, kuin Sangerin menetelmä. Varsinainen sekvensointi tehtiin SeqLab:issa, SeqLab on Helsingin Yliopiston, HUS:n ja Kansanterveyslaitoksen yhteispalveluyksikkö, joka tuottaa DNA:n sekvensointipalveluja. Tulokset analysoitiin omassa laboratoriossa.

Taulukko 5. PCR-tuotteen puhdistusreaktio

Eksonukleaasi (ExoSAP-IT, Affymetrix)	2 µl
PCR-tuote	5 µl

Taulukko 6. Puhdistusreaktio-ohjelma

37 °C	15 min
80 °C	15 min

Taulukko 7. Leimausreaktio

H <sub>2</sub> O	5,2 ml
Puskuri (BigDye®)	1,8 ml
Aluke (vain toisen suunnan)	0,65 ml
Polymeraasi/leimaaja (BigDye Terminator, AB)	0,35 ml
Puhdistettu DNA	2 ml

Taulukko 8. Leimausreaktio-ohjelma

96 °C	1 min	} x 25
96 °C	10 s	
55 °C	5 s	
60 °C	4 min	
10 °C	säilytys	

### 3.1.6 Tilasto-ohjelmat

#### **Ped-check**

Ped-check-ohjelmaan (O'Connell 1998) syötetään tiedot koehenkilöiden välisistä sukulaisuussuhteista ja genotyypit. Ohjelma hälyttää, jos annetut tiedot eivät ole mahdollista. Esimerkiksi tietyn alleelin suhteen homotsygoottiset vanhemmat eivät voi saada tämän alleelin suhteen heterotsygoottista lasta. Tällaisen virheen kohdalla syy voi olla työskentelyvirhe tai biologisen isyyden epäselvyys. Tietoa PedCheck- ja muista geenikartoitukseen liittyvistä ohjelmista löytyy myös teoksesta Geenikartoitusopas (Ollikainen ja Uimari 2004).

#### **QTDT**

KytKentäepätasapainoanalyysi kvantitatiivisille ja diskreeteille ominaisuuksille (Analyses for Quantitative and Discrete Traits, QTDT) (Abecasis, [www-sivut](#)), on ohjelma, jonka avulla lasketaan, onko ominaisuuden periytyminen yhdessä tietyn geenimerkin kanssa sattumaa vai onko kytKentä olemassa. Tässä tutkimuksessa huomioitiin lisämuuttujina henkilön sukupuoli ja ikä. QTDT ei pysty laskemaan monimutkaisten haplotyyppien kytkeytymistä ominaisuuteen. Tällä ohjelmalla laskettiin jokaisen SNP:n assosioituminen kuhunkin ominaisuuteen erikseen.

## **FBAT/HBAT**

Assosiaatiotestit perhemateriaaleille -ohjelmat (Family/Haplotype Based Association Tests, FBAT/HBAT) (Harvardin [www-sivut](http://www.biostat.harvard.edu/~fbat/) bioinformatikalle) on rakennettu perheaineistojen assosiaatioanalyysien tekemiseen. Nämä ohjelmat hyväksyvät binääriset, kategoriset ja jatkuvat muuttujat, ja geenimerkkiaineisto voi olla mikä tyypinen tahansa. Siten ne sopivat mm. perheaineiston analysoimiseen ja pystyttiin laskemaan tulokset myös usean eri geenimerkin muodostamille haplotyypeille.

## 4 TULOKSET

### 4.1 DNA:n eristys

Koehenkilöiden verestä eristettiin DNA ja sen puhtaus mitattiin. Näytteiden tiedot koottiin tietokantaan, josta ote on esitetty taulukossa 8. Tutkimuksia varten näytteet pipetoitiin kuoppalevyille ja laimennettiin pitoisuuksiin 4 ng/μl ja 40 ng/μl. Puhtaan DNA:n 260/280-absorbanssien suhde on 1,8. Mittausten perusteella proteiinit oli poistettu suhteellisen tarkasti ja kaikki näytteet olivat eristuksen jälkeen tarpeeksi puhtaita PCR:n tekemiseen.

*Taulukko 9. DNA-eristysten tietokantaa*

Proj_ID	sample_ID	huom	Näyte otettu	DNA-eristys pvm	liuotettu 1 x TE	DNA kons. ng/ul	puhtaus: 260/280
MUSGEN	433a		4.4.2008	14.touko	600μl	433	1,78
MUSGEN	434a		5.4.2008	14.touko	600μl	800	1,78
MUSGEN	435a		5.4.2008	14.touko	600μl	714	1,77
MUSGEN	436a		5.4.2008	14.touko	600μl	216	1,65
MUSGEN	437a		5.4.2008	14.touko	600μl	342	1,75
MUSGEN	438a		5.4.2008	14.touko	600μl	267	1,70
MUSGEN	439a		5.4.2008	14.touko	600μl	233	1,69
MUSGEN	440a		11.4.2008	14.touko	600μl	672	1,81
MUSGEN	441a		13.4.2008	14.touko	600μl	638	1,79
MUSGEN	442a	a-putki hajosi	29.4.2008				
MUSGEN	443a		4.4.2008	22.5.2008	500μl	1478	1,81
MUSGEN	444a		5.4.2008	22.5.2008	500μl	265	1,67
MUSGEN	445a		11.4.2008	22.5.2008	500μl	672	1,73
MUSGEN	446a		11.4.2008	22.5.2008	500μl	1789	1,83

## 4.2 PCR:n optimointi ja tuotteen laatu

Alukkeille piti määrittää sopivat PCR-olosuhteet kontrollihenkilön DNA:ta käyttäen, ennen kuin arvokkaita potilasnäytteitä otettiin käyttöön. Tämä tehtiin niin sanotulla gradienttimenetelmällä; ajettiin PCR-ohjelma neljällä erilaisella reagenssisekoituksella (taulukko 10) siten, että jokaisella rivillä oli hieman eri  $T_A$ .  $T_A$  on lämpötila, jossa puolet kaksijuosteisen DNA:n vetysidoksista ovat katkenneet ja DNA-polymeraasi alkaa liittää nukleotideja juosteen 3'-päähän.  $T_A$  on noin viisi astetta alukkeen sulamislämpötilaa,  $T_m$ , alhaisempi. PCR-reaktion jälkeen näytteet ajettiin geielektroforeesissa (kuva 7), jolloin nähtiin, mikä  $T_A$  ja mikä reagenssisekoitus antaa parhaat tulokset.

Taulukko 10. Reagenssisekoitusten koostumus.

Reagenssi	A-sekoitus	B-sekoitus	C-sekoitus	D-sekoitus
10 x buffer (Dynazyme, Finnzymes)	1x	1x	1x	1x
dNTP (Finnzymes)	0,3 $\mu$ M	0,3 $\mu$ M	0,3 $\mu$ M	0,3 $\mu$ M
Fwd primer	0,3 $\mu$ M	0,6 $\mu$ M	0,3 $\mu$ M	0,6 $\mu$ M
Rev primer	0,3 $\mu$ M	0,6 $\mu$ M	0,3 $\mu$ M	0,6 $\mu$ M
DNA	5 ng/ $\mu$ l	5 ng/ $\mu$ l	2 ng/ $\mu$ l	2 ng/ $\mu$ l

Dynazyme II DNA-polymeraasia lisättiin alkudenaturaation jälkeen siten, että loppukonsentraatio oli 0,02246 U/ $\mu$ l.

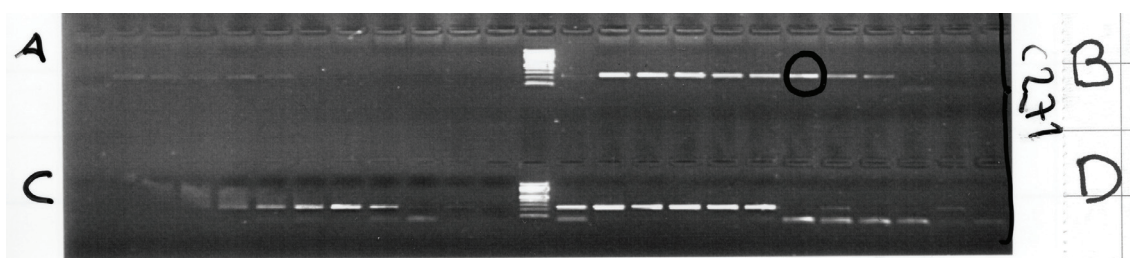
Kuvassa 7 on esitetty optimointiolosuhteet 96-kuoppalevyille tehtynä. Jokaisella rivillä on 12 kuoppaa, ja joka riville tuli eri sekoituksella tehtyt PCR-reaktiot. DNA-näyte oli joka kuopassa sama, jotta erot näytteiden välillä eivät vaikuttaisi tulokseen. PCR-kone ohjelmoitiin siten, että ensimmäisen sarakkeen  $T_A$  oli 50 °C, ja lämpötila nousi tasaisesti joka sarakkeessa. Viimeisessä sarakkeessa lämpötila oli korkein, 65 °C. Näin saatiin kattava otos PCR-reaktioista, jotka oli tehty eri sekoituksilla ja lämpötiloilla.



	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <span>50 °C</span> <span style="margin: 0 10px;">→</span> <span>65 °C</span> </div>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A-sekoitus												
B-sekoitus												
C-sekoitus												
D-sekoitus												

Kuva 7. Kaavakuva alukkeiden optimointiolosuhteista 96-kuoppalevyllä

Kuvassa 8 on geelille ajetut näytteet C2ORF3\_rs714939:n alukeparin optimoinnista. Ylhäällä vasemmalla olevalla rivillä (A) on A-sekoituksella tehdyt näytteet, kuvan 7 osoittamassa lämpötilagradientin järjestyksessä. Vastaavasti rivit B, C ja D on tehty omalla sekoituksellaan ja samassa gradientissa. Kuvasta nähdään, että A-sekoituksella ei saatu yhtään onnistunutta PCR-reaktiota. B-, C- ja D-sekoituksilla tuli sekä onnistuneita että epäonnistuneita reaktioita. Tasaisin tulos tuli B-sekoituksella, joten valittiin se jatkossa tällä alukeparilla tehtäviin PCR-reaktioihin. Ympyröity DNA-juova on näyte, jonka  $T_A$  oli 58,6 °C. Onnistuneen reaktion ja aiemman kokemuksen perusteella valittiin jatkoreaktioihin  $T_A$  60 °C. Kaikki alukkeet optimoitiin samoja menetelmiä käyttäen.



Kuva 8. Geelille ajettu gradientti-PCR C2ORF3\_rs714939:n alukkeille

Taulukossa 11 on esitetty optimoinnin tuloksena saadut parhaat olosuhteet kullekin alukeparille.

Taulukko 11. Optimoidut PCR-olosuhteet

SNP	Mix	Ta (°C)
KIAA_rs2038137	C	58,5
KIAA_rs2143340	C	62
KIAA_rs4504469	C	62
DCDC2_rs793862	D	55
DCDC2_rs807701	C	56,5
DYX1C1_rs11629841	C	60
DYX1C1_rs3743205	B	60
C2ORF3_rs714939	B	60

Tämän tutkimuksen aikana törmättiin sekä toimimattoman PCR:n ongelmaan, että kontaminaatioihin. Jostain syystä aiemmin hyvin toimineet PCR-reaktiot eivät yhtäkkiä toimineetkaan eikä tuotetta syntynyt lainkaan. Tämän vuoksi vaihdeltiin hieman reagenssi-sekoituksen koostumusta, ilman tuloksia. Lopulta reaktiot alkoivat jälleen tuottaa tulosta vanhalla reseptillä.

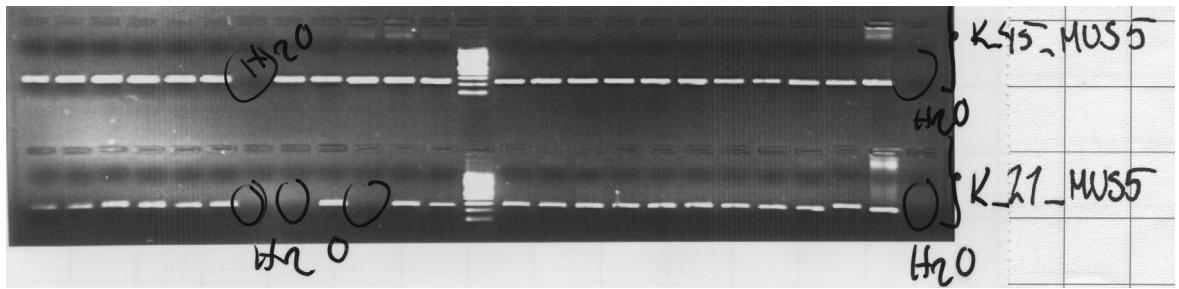
DCDC2:n kohdalla oli välillä hankaluuksia saada PCR tuottamaan oikeaa tuotetta tarvittava määrä. Alukkeet optimoitiin kuten muutkin, ja tietyt olosuhteet näyttivät toimivan hyvin. Kuitenkin potilasnäytteillä tehdyt PCR -reaktiot tuottivat tulosta epävarmasti. Päädyttiin vaihtamaan Dynazyme II DNA-polymeraasin Phusion DNA-polymeraasiin. (Finnzymes). Phusion on tehokkaampi entsyymi ja lisäksi se ei vaadi manuaalista hot-starttia, kuten Dynazyme II. ”Hot-start” on termi, joka tarkoittaa DNA:n denaturoimista korkeassa lämpötilassa usean minuutin ajan. Dynazyme II:sta käytettäessä suositellaan hot-startin tekemistä ilman entsyymiä, jotta entsyymi ei denaturoidu. Phusion on huomattavasti kalliimpi, ja siksi käytettiin ensisijaisesti Dynazymeaa. Phusion osoittautui kuitenkin jopa liian tehokkaaksi ainakin käytetyillä DNA-määrillä; epäspesifistä sitoutumista esiintyi paljon, joten tuotetta ei voitu sekvensoida. Lopulta PCR-reaktio saatiin toimimaan alkuperäisillä resepteillä Dynazyme II:lla, tosin syytä aikaisempiin ongelmiin ei tässäkään tapauksessa löydetty.

Kontaminaatio-ongelma oli työläämpi ratkaista. Jo tutkimuksen alussa todettiin, että noin kaksi vuotta vanhoilla kuoppalevyillä olevissa vesikontrolleissa oli DNA:ta. Näillä levyillä vesikontrollit olivat näytteiden seassa omassa kuopassaan. Tämä on kuitenkin huono tapa tehdä vesikontrolli, sillä on yleisesti tiedossa, että ajan myötä korkeja avatessa hyvin pieniä määriä DNA:ta voi roiskua väärään kaivoon. Määrä on kuitenkin niin pieni, että se ei vaikuta kaivossa olevan DNA:n koostumukseen käytännössä lainkaan. Vesikontrollit tulisi tehdä siten, että PCR-reaktioita pipetoitaessa tehdään koneeseen menevälle levyille muutama vesinäyte, jossa on reagenssisekoitus ja DNA-näytettä vastaava määrä sekoitukseen käytettyä vettä. Näin varmistetaan, että reaktion valmistamiseen käytetyt reagenssit ovat puhtaita.

Mahdollisesti kontaminoituneet näytteet uusittiin, jotta tutkimuksen tulosten oikeellisuutta ei voitaisi epäillä lainkaan. Vanhat näytelevyt heitettiin pois ja tehtiin uudet. Vesikontrollit tehtiin siitä eteenpäin yllä kerrotulla, paremmalla menetelmällä.

### **4.3 Geelielektroforeesi**

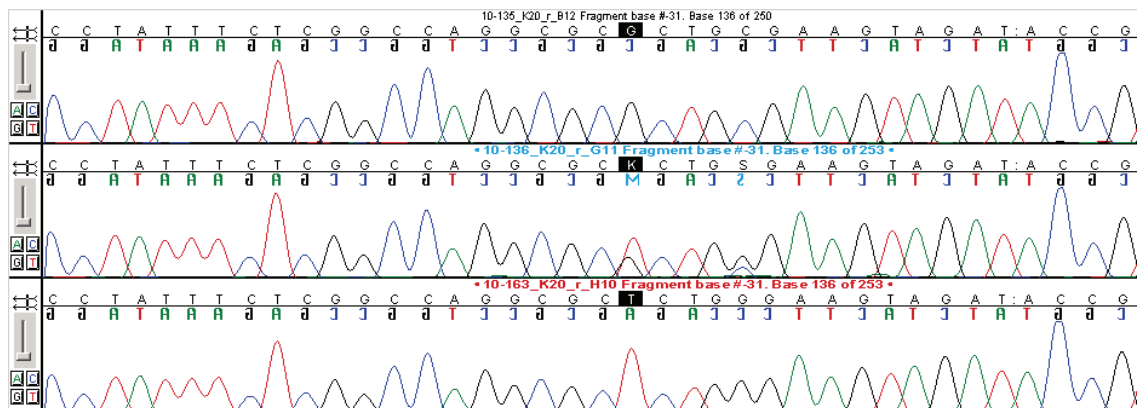
PCR-ajon jälkeen kaikki vesikontrollit ja osa muista näytteistä ajettiin geelielektroforeesissa. Menetelmä erottelee DNA-molekyylit niiden koon perusteella ja kun näytteiden vieressä ajetaan tunnettu kokostandardi, nähdään, onko saatu PCR-tuote oikean kokoista. Vesikontrollien tulee luonnollisesti olla tyhjiä. Jos vesikontrollin todetaan sisältävän DNA:ta, tulokset ovat arvottomia mahdollisen kontaminaation vuoksi. Lopuksi geeli kuvattiin UV-valolla valaisevalla kameralla, jotta saatiin kuva DNA-paikoista. Kuvassa 9 geelille on ajettu näytteitä KIAA\_rs4504469- ja KIAA\_rs2143340-PCR:stä. Kuvasta nähdään, että saatu tuote on oikean kokoista ja vesikontrollit ovat puhtaita.



Kuva 9. Geelille ajetut näytteet kahdesta eri PCR:stä

#### 4.4 Sekvensointi

Näytteet vietiin SeqLabiin sekvensoitaviksi. Tulokset analysoitiin itse. Sekvenssissä oleellinen kohta oli geenissä tunnettu mutaatiokohta. Kuvassa 10 on kolmen eri näytteen sekvenssiä SNP:stä KIAA\_rs2038137 ja itse mutaatiokohta näkyy kuvassa mustalla maalattuna. Ylimmästä sekvenssistä nähdään, että kyseinen henkilö (näyttenumero tekstirivillä ensimmäisenä) on tämän SNP:n suhteen G-homotsygootti. Keskimmäinen näyte on heterotsygootin henkilön ja alin on T-homotsygootti.



Kuva 10. Kolmen koehenkilön DNA-sekvenssi KIAA\_rs2038137:n mutaatioalueella

## 4.5 Tietokannan luominen

SeqLab:sta saatu sekvenssi analysoitiin. Koska tässä tutkimuksessa oli tarkoitus tutkia tunnetussa kohdassa tapahtuvaa yhden nukleotidin muutosta, ei koko alueen sekvenssiä tarvinnut lukea. Sekvenssin laatu tarkistettiin ja luettiin haluttu kohta. Näyte voi olla nukleotidin suhteen heterotsygootti tai homotsygootti joko harvinaisempaa tai yleisempää muotoa. Esimerkiksi DC\_80:n yleisempi muoto on A ja harvinaisempi G, jolloin koehenkilön sekvenssi tässä kohtaa on muotoa AG, AA tai GG.

Koehenkilöiden kantama alleeli merkittiin Excel-taulukkoon, jossa jokaiselle henkilölle oli oma rivi. Riville tuli omaan sarakkeeseensa jokaisen tutkittavan SNP:n muoto (taulukko 12).

ROBO1:n kaksi SNP: tä jätettiin pois tutkimuksesta jo ennen varsinaista tilastollista käsittelyä. Yli puolet näytteistä sekvensoitiin näiden SNP:den alueelta, eikä yhtään mutaatiota (edes heterotsygoottia) löydetty. Mutaatiota onkin aikaisemmin löydetty ainoastaan yhdestä suomalaisesta dysleksiaperheestä (Hannula-Jouppi ja muut 2005), joten on hyvin mahdollista, että sitä ei muualta väestöstä löydy.

Taulukko 12. Genotyypitietokantaa

SNP		K_20	K_21	K_45	DC_79	DX_11	DX_37	C2_71
Koodinumerot		G=1, T=2	A=1, G=2	C=1, T=2	G=1, A=2	T=1, G=2	C=1, T=2	A=1, G=2
Perhe	HIö							
1	174	GG	AA	CT	GG	TT	CC	GG
1	175	GG	AA	CC	GA	GG	CC	GG
1	176		AA	CC	GA	TG	CC	GG
1	177	GG	AA	CC	GG	TG	CC	
1	178	GT	AA	CT	AA	TT	CC	AA
1	179	GT	AA	TT	GG	GG	CC	AA
1	180	GT	AA	CT	GA	TG	CC	AA
1	181	GG	AA	CT	GA	TG		AA
1	189	GG	AA	CC	GG	TG		GG
2	100	TT	AA	TT	GG	GG	CC	AA
2	118	TT	AA	TT		GG	CC	AA
3	153	GT	AA	CT	GG	TG	CC	AA
3	154	GT	AA	CT	GG	TG	CC	AA
3	155	GT	AA	CT	GG	TG	CC	AG
3	158	GG	AA	CC	GA	TG	CT	AA
3	198	GG	AG	CC	GG	TT	CC	AG
3	200	GG	AA	CC	GA	TT	CT	AA
4	102	GT	AG	CT	GG	TG	CC	AG
4	103	GT	AA	CT	GA	TG	CC	AA
4	104	GT	AA	CT	GG	TT	CT	AG
4	105	GT	AA	CT	GA	TG	CT	AA
4	106	GT	AA	CT	GG	TT	CT	AA
4	107	GT	AA	CT	GG	TT	CT	AG
5	183	GT	AA	CT	GG	GG	CC	GG
5	184	TT	AA		GG	TG	CC	GG
5	185	GT	AA	TT	GG	TG	CC	GG
5	186	GT	AA	CT	GG		CC	GG
5	187	GT	AA	TT	GG	TT	CC	AG

Tilastollista käsittelyä varten tehtiin vielä jokaiselle SNP:lle erikseen Excel-taulukko, jossa alleelit koodattiin numeroilla 1 ja 2. Tämä tehtiin, koska tilastolliseen käsittelyyn käytettävät ohjelmat ymmärtävät ainoastaan numerot. Taulukossa 12 on rivillä ”koodinumerot” esitetty kunkin SNP:n eri alleelien numerointi.

Lopulliseen tilastolliseen käsittelyyn ei saatu jokaisen koehenkilön genotyyppiä jokaisesta SNP:stä. Osa sekvensseistä oli epäselvää ja esimerkiksi etenkin KIAA\_rs2143340:n kohdalla sekvenssi oli usein niin tulkinnanvaraista, että suuri osa näytteistä joudutaan uusimaan. Tähän työhön uusittujen näytteiden tulokset eivät ehtineet.

Taulukko 13. Kunkin SNP:n puuttuvien genotyyppien osuus alkuperäisestä määrästä

SNP	Puuttuvat genotyypit
KIAA_rs2038137	3,00 %
KIAA_rs2143340	38,40 %
KIAA_rs4504469	8,70 %
DCDC2_rs793862	16,60 %
DYX1C1_rs11629841	10,90 %
DYX1C1_rs3743205	18,10 %
C2ORF3_rs714939	8,90 %

Toiseen tietokantaan kerättiin koehenkilöiden saamat pisteet musikaalisuustesteistä (taulukko 14). Lopuksi laskettiin mahdollinen yhteys musiikkipisteiden ja genotyyppien välillä.

Taulukossa 14 on esitetty osa musikaalisuuspisteet sisältävästä tietokannasta. Karman musikaalisuustestissä (KMT) maksimipistemäärä on 40 ja Seashoren testeistä (SP ja ST) 50. Tilasto-ohjelmat tarvitsevat keskenään vertailukelpoiset tiedot, ja siksi KMT-pisteet korjattiin siten, että niidenkin maksimipistemäärä on 50. ”KMT\_korj”-sarakeessa ovat nämä korjatut pisteet. Viimeisessä sarakeessa on kaikkien testien yhteenlasketut pisteet.

Taulukko 14. Osa musikaalisuuspisteet sisältävästä tietokannasta

FamID	dnaID	sex	age	KMT_korj	SP	ST	COMB
1	174	1	48	46,25	47	49	142,25
1	175	2	68	46,25	47	39	132,25
1	176	1	40	50	48	39	137
1	177	1	67	32,5	38	34	104,5
1	178	1	71	43,75	29	25	97,75
1	179	2	62	42,5	32	40	114,5
1	180	2	35	47,5	49	48	144,5
1	181	1	38	43,75	49	32	124,75
1	189	2	42	48,75	46	34	128,75
1	1000	2	16	37,5	48	46	131,5
1	1001	2	15	40	46	39	125
1	1002	2	12	27,5	44	34	105,5
1	1003	1	12	25	27	32	84

## 4.6 Tulosten tilastollinen käsittely

Tulosten laskeminen ilman tietokoneohjelmaa olisi erittäin työlästä, ellei mahdotonta. Muuttujina on emäsmuutosten periytyminen perheissä ja niiden muodostamat eri haplotyyppit, musikaalisuustestien pisteet yhdessä ja erikseen jne. Näiden kaikkien väliset yhteydet laskettiin seuraavilla tietokoneohjelmilla: KytKentäepätasapainoanalyysi kvantitatiivisille ja diskreeteille ominaisuuksille (Linkage Disequilibrium Analyses for Quantitative and Discrete Traits, QTDT) ja Assosiaatiotestit perhetutkimuksiin (Family/Haplotype Based Association Tests, FBAT/HBAT) (Abecasis ym. 2000.)

Ensimmäiseksi tietokannat muunnettiin tilasto-ohjelmille ymmärrettäviksi. Alleelit merkittiin numeroilla 1 ja 2 (normaali muoto 1 ja mutaatio 2). KMT:ssä eri osioissa maksimipistemäärät vaihtelevat, joten eri osioiden pisteytykset muutettiin toisiaan vastaavaksi.

Genotyyppien oikeellisuus tarkistettiin PedCheck-ohjelmalla (O'Connell 1998) ennen tietojen syöttämistä QTDT-ohjelmaan. QTDT:n avulla laskettiin yksittäisten SNP:den mahdollinen assosioituminen musikaalisuustasoon ja sen periytymiseen.

FBAT/HBAT:lla laskettiin mahdollinen assosioituminen SNP:den muodostamien erilaisten haplotyyppien ja musikaalisuuspisteiden periytymisen välillä.

Sekä QTDT:n että FBAT/HBAT:n tuloksista merkittäviksi katsottiin ne, joiden  $p$ -arvo oli korkeintaan 0,05.



#### 4.7 FBAT- ja QTDT-tulokset

FBAT:lla löydettiin merkitsevyyttä osoittavia  $p$ -arvoja tiettyjen ominaisuuksien ja haplotyyppien välille. QTDT:llä sen sijaan ei saatu merkitsevyyttä. Taulukossa 15 on esitetty kaikki ominaisuudet ja niihin alle 0,05:n  $p$ -arvolla assosioituvat haplotyyppit. Tulostaulukossa ”Frekvenssi/Perh. #” tarkoittaa haplotyyppin suhteellista osuutta näytemateriaalista/kuinka monessa perheessä sitä esiintyy.

Taulukko 15. FBAT:ssa merkitsevyyttä osoittavat haplotyyppit

Ominaisuus	Haplotyyppi				Frekvenssi/Perh. #	p
	K_20	K_21	K_45	DC_79		
KMT	1	2	1	1	0.059/10	0.028948
	2	1	1	1	0.054/9	0.03
SP	1	2	1	1	0.059/10	0.038207
	2	1	1	1	0,054/9	<b>0.019493</b>
ST	1	2	1	1	0.059/10	0.021626
	2	1	1	1	0.054/9	0.038279
<b>Yhdistetyt pisteet</b>	2	1	1	1	0.054/9	0.025246
	<b>K_20</b>	<b>K_21</b>	<b>K_45</b>			
KMT	1	2	1		0.079/13	0.022384
SP	1	2	1		0.079/13	0.035398
ST	1	2	1		0.079/13	0.020695
<b>Yhdistetyt pisteet</b>	1	2	1		0.079/13	0.034716

FBAT:n mukaan haplotyyppin K\_20 K\_21 K\_45 DC\_79 muoto 1211(h1=GGCG) assosioituu musikaalisuuteen, jota mitataan KMT:llä, SP:llä ja ST:llä. Suurin merkitsevyys ( $p= 0.021626$ ) on ST:n kohdalla. Myös muoto 2111(h2=TACG) näyttää merkitsevyyttä jokaisen testin kohdalla ja lisäksi testien yhteenlasketut pisteet antavat merkitsevyyden  $p= 0.038279$ . Paras merkitsevyys ( $p=0.019493$ ) on h1:n assosioitumisella Seashoren sävelkorkeuden tunnistamistestiin (SP).

Haplotyyppi K\_20 K\_21 K\_45 genotyypillä 121 (h3=GGC) osoittaa merkitsevyyttä kaikkien testien ja yhdistettyjen pisteiden kohdalla. Paras merkitsevyys ( $p=0.020695$ ) on h3:n assosioitumisella Seashoren sävelen keston tunnistamistestiin (ST).

## 5 TULOSTEN TARKASTELU

Tässä tutkimuksessa etsittiin ensimmäistä kertaa yhteistä geneettistä komponenttia musikaalisuudelle ja kielelliselle kyvykkyydelle, kahdelle ominaisuudelle, joita on pidetty erillisinä ja toista jopa turhana. Kieli on ihmiskunnan kehityksen ja säilymisen kannalta elintärkeä, ja jos voidaan yhdistää musikaalinen kyvykkyys samoihin geeneihin, musiikin arvo saa uuden merkityksen.

Saadut tulokset antavat viitteitä KIAA0319:n ja/tai DCDC2:n assosioitumisesta musikaaliseen kyvykkyyteen. Geenit sijaitsevat lähekkäin ja siten periytyvät usein yhdessä. Tämän vuoksi on vaikea sanoa ilman tarkempia tutkimuksia, kummalla on suurempi vaikutus. Kuitenkin KIAA0319:n genotyyppi h3 näyttää assosiaatiota myös itsenäisenä, joten voidaan olettaa ainakin sillä olevan merkitystä.

Sekä KIAA0319:n että DCDC2:n vaikutus näkyy aivoissa. KIAA0319:n lähetti-RNA:ta esiintyy runsaasti aivojen visuaalisen aistimisen ja päälaen aivokuoren alueilla. Kokeet ovat osoittaneet epänormaalia hermosolujen migraatiota aivoissa, jos normaali transkriptio on estetty. Myös DCDC2:n geenituote on yhdistetty aivojen hermosolujen migraatioon. (Parrachini ym. 2006, Gibson ym. 2008.) Tämän tutkimuksen tulos tukee olettamusta, että kielenkehityksen kannalta tärkeät molekyylit ja aineenvaihduntareitit ovat osallisena myös musiikin hahmottamisessa.

Musikaalisuuden mahdollinen kytkeytyminen kielelliseen kyvykkyyteen avaa uusia mahdollisuuksia mm. dysleksian hoitoon ja diagnosointiin, jos jatkotutkimukset tukevat saatuja tuloksia. Musiikkiterapia voisi kehittää potilaan kykyä hahmottaa puhetta (ja siten myös kirjoitusta) kokonaisuutena. Tämän tutkimuksen hypoteesi tukee toteutuessaan erityisesti fonologisen häiriön merkitystä dysleksian kehittämisessä.

Saadut tulokset ovat vasta viitteellisiä, sillä näytemateriaali oli liian pieni (n=395) täysin vakuuttaviin tuloksiin. Tutkimusta kuitenkin kannattaa jatkaa, sillä aihe on uusi ja alustavat tulokset lupaavia. Tutkimusta tullaankin jatkamaan siten, että näytteenantajia olisi vähintään tuhat, näin tulokset painottuvat selkeämmin oikeaan suuntaan.

Dysleksia esiintyy eriasteisena ja potilaiden vaikeudet ovat eri alueilla. Tarkempi diagnosointi on askel parempaan hoitoon, ja sitä varten tarvitaan lisää tietoa dysleksian syistä. Tarkemmat molekyyli-tason tutkimukset voisivat valottaa assosioituvien geenien tehtävää aivoissa ja antaa mahdollisuudet jopa dysleksian lääkehoitoon.

## KIRJALLISUUSLUETTELO

Ahvenainen O. ja E. Holopainen. 1999. Lukemis- ja kirjoittamisvaikeudet: Teoreettista taustaa ja opetuksen perusteita. Jyväskylä: Kirjapaino Oma Ky.

Anthoni Heidi, Marco Zucchelli, Hans Matsson, Bertram Müller-Myhsok, Ingegerd Fransson, Johannes Schumacher, Satu Massinen, Päivi Onkamo, Andreas Warnke, Heide Griesemann, Per Hoffmann, Jaana Nopola-Hemmi, Heikki Lyytinen, Gerd Schulte-Körne, Juha Kere, Markus M. Nöthen, Myriam Peyrard-Janvid. 2007. A locus on 2p12 containing the co-regulated MRPL19 and C2ORF3 genes is associated to dyslexia. *Human Molecular Genetics* Vol.16, 6: 667-677.

Aula, P. , Kääriäinen, H. & Leisti, J. 1998. Perinnöllisyyslääketiede. Jyväskylä: Duodecim.

Cope Natalie, Denise Harold, Gary Hill, Valentina Moskvina, Jim Stevenson, Peter Holmans, Michael J. Owen, Michael C. O'Donovan, Julie Williams. 2005. Strong evidence that KIAA0319 on chromosome 6p is a susceptibility gene for developmental dyslexia. *American Society of Human Genetics* 76:581–591

DeFries, J.C. and M. Alacron. 1996. Genetics of specific reading disability. *Mental Retardation and Developmental Disabilities* 2: 39-47.

Gibson Christopher J., Jeffrey R. Gruen. 2008. Genes of language and reading. *Journal of communication Disorders*.

Hannula-Jouppi Katariina, Nina Kaminen-Ahola, Mikko TAipale, RANja Eklund, Jaana Nopola-Hemmi, Helena Kääriäinen, Juha Kere. 2005. The axon guidance receptor gene ROBO1 is a candidate gene for developmental dyslexia. *PLOS Genetics* 1: 467-474.

Hallgren B. 1950. Specific dyslexia (congenital word-blindness): a clinical and genetic study. *Acta Psychiatrica et Neurologica*, supplement 65, 1-287.

Harold, D., Parcchini, S., Scerri, T., Dennis, M., Cope, N., Hill, G.,. 2006. Further evidence that the KIAA0319 gene confers susceptibility to developmental dyslexia. *Molecular Psychiatry* 11: 1085-1091.

Hartl Daniel L., Elizabeth W. Jones. 2002. *Essential Genetics: a genomics perspective*

Jentschke Sebastian, Stefan Koelsch, Stephan Sallat, Angela D. Friederici. 2008. Children with specific language impairment also show impairment of music-syntactic processing. *Journal of Cognitive Neuroscience* 20: 1-12.

Kaminen-Ahola Nina. 2007. Susceptibility genes and neurodevelopmental mechanisms in dyslexia. Helsinki: Yliopistopaino

Karma Kai. 2007. Musical aptitude definition and measure validation: Ecological validity can endanger the construct validity of musical aptitude tests. *Psychomusicology* 2007 19:(2) 79-90.

Luciano Michelle, Penelope A. Lind, David L. Duffy, Anne Castles, Margaret J. Wright, Grant W. Montgomery, Nicholas G. Martin, Timothy C. Bates. 2007. A haplotype spanning KIAA0319 and TTRAP is associated with normal variation in reading and spelling ability. *Biol. Psychiatry* 62: 811-817.

Karma K. 2007. Musical Aptitude Definition and Measure Validation: Ecological Validity Can Endanger the Construct Validity of Musical Aptitude Tests. *Psychomusicology*. 19:79–90.

McDermott J, Hauser M. 2005. The origin of music: innateness, uniqueness and evolution. *Music Perception* 23: 29-59.

McGrath Lauren M., Shelley D. Smith, Bruce F. Pennington. 2006. Breakthroughs in the search for dyslexia candidate genes. *TRENDS in Molecular Medicine*.

Meng Haying, Shelley D. Smith, Karl Hager, Matthew Held, Jonathan Liu, Richard K. Olson, Bruce F. Pennington, John C. DeFries, Joel Gelernter, Thomas O'Reilly-Pol, Stefan Somlo, Pawel Skudlarski, Sally E. Shaywitz, Bennet A. Shaywitz, Karen Marchione, Yu Wang, Murugan Paramasivam, Joseph J. LoTurco, Grer P. Page, Jeffery R. Gruen. 2005. DCDC2 is associated with reading disability and modulates neuronal development in the brain. *PNAS* vol. 102 47: 17053-17058.

Miller, G. 2000. Evolution of human music through sexual selection. The origins of music 329-360.

Nopola-Hemmi J, Taipale M, Haltia T, Lehesjoki AE, Voutilainen A, Kere J. 2000. Two translocations of chromosome 15q associated with dyslexia. *Journal of Medical Genetics* 37: 771-775.

O'Connell JR, Weeks DE. 1998. A program for identifying genotype incompatibilities in linkage analysis: *Am J Hum Genet* Jul;63(1):259-66

Ollikainen Vesa, Pekka Uimari. 2001-2004. CSC – Tieteellinen laskenta Oy.

Parrachini Silvia, Ankur Thomas, Sandra Castro, Cecilia Lai, Murugan Paramasivam, Yu Wang, Brendan J. Keating, Jennifer M. Taylor, Douglas F. Hacking, Thomas Scerri, Clyde Francks, Alex J. Richardson, Richard Wade-Martins, John F. Stein, Julian C. Knight, Andrew J. Copp, Joseph LoTurco, Anthony Monaco. 2006. *Human Molecular Genetics* Vol. 15 10: 1659-1666.

Peretz Isabelle. 2006. The nature of music from a biological perspective. *Science Direct* 100: 1-32.

Pinker S. 1997. *How the mind works*. New York: Norton.

Pulli K., K Karma, R Norio, P Sistonen, HHH Göring, I Järvelä. 2008. Genome wide linkage scan for loci of musical aptitude in Finnish families: Evidence for a major locus at 4q22. *JMG Online First*.

Rasmus F. 2004. Neurobiology of dyslexia: Areinterpretation of the data. *Trends Neurosci.* 27: 720-726.

Sammalisto Sampo. 2008. Search for genetic variants influencing human height. Helsinki: Kansanterveyslaitos.

Schumacher Johannes, Heidi Anthoni, Faten Dahdouh, Inke R. König, Axel M. Hillmer, Nadine Kluck, Malou Manthey, Ellen Plume, Andreas Warnke, Helmut Remschmidt, Jutta Hulsmann, Sven Cichon, Cecilia M. Lindgren, Peter Propping, Marco Zucchelli, Andreas Ziegler, Myriam Peyrard-Janvid, GerdSchulte-Körne, Markus M. Nöthen, Juha Kere. 2006. Strong genetic evidence of DCDC2 as a susceptibility gene for dyslexia. *The American Journal of Human Genetics* 78: 52-62.

Stein J., V. Walsh. 1997. To see but not to read: the magnocellular theory of dyslexia. *Trends In Neurosciences* 20:147-152.

Taipale Mikko, Nina Kaminen, Jaana Nopola-Hemmi, Tuomas Haltia, Birgitta Myllyluoma, Heikki Lyytinen, Kurt Muller, Minna Kaaranen, Perttu J. Lindsberg, Katariina Hannula-Jouppi, Juha Kere. 2003. A candidate gene for developmental dyslexia encodes a nuclear tetratricopeptide repeat domain protein dynamically regulated in brain. *PNAS Vol. 100* 20: 15553-15558.

Trehub, S. E., Bull, D., Thrope, L. A.. 1984. Infants' perception of melodies: The role of melodic contour. *Child Development* 55: 821-830.

Trehub, S. E. 2001. Musical predispositions in infancy. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 930: 1-16.

Trehub, S. E.. 2003. The developmental origins of musicality. *Nature Neuroscience* 6: 669-673.

Trehub S.E., E. E. Hannon. 2006. *Cognition* 100: 73-99.

Zatorre, R.J. 2003. Music and the brain. *New York Academy of Sciences* 999: 4-14.

Zatorre, R. J., P. Belin, V.B. Penhune. 2002. Structure and function of auditory cortex: music and speech. *Trends Cognit. Sci.* 6: 37-46.

<http://www.psykonet.fi/perustutkinto/kogneu08/041208%20.pdf>, yliopistojen toteuttama psykologian opintokokonaisuus.

[http://www.psykonet.helsinki.fi/psykonet/Tampere/Opetus/TaYPsyko.nsf/0/e6a3b3a3fc51792fc22571170032021e/\\$FILE/Aivotoimintojen%20lateralisaatio%20ja%20tietoisuus.ppt](http://www.psykonet.helsinki.fi/psykonet/Tampere/Opetus/TaYPsyko.nsf/0/e6a3b3a3fc51792fc22571170032021e/$FILE/Aivotoimintojen%20lateralisaatio%20ja%20tietoisuus.ppt), yliopistojen toteuttama psykologian opintokokonaisuus.

<http://www.hytti.uku.fi/~hronkko/Tiedekirjoittelu/Aivot%20karttapallona.htm>, Kuopion Yliopiston opintomateriaalia.

<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/QTDT/>

<http://www.biostat.harvard.edu/~fbat/default.html>

## KUVAT

1. <http://fi.wikipedia.org/wiki/Mutaatio>
2. Irma Järvelä
3. <http://www.healthyplace.com/Communities/ADD/addfocus/Images/dyslexia4.gif>
4. [http://openlearn.open.ac.uk/file.php/3373/SD329\\_1\\_027i.jpg](http://openlearn.open.ac.uk/file.php/3373/SD329_1_027i.jpg)
5. <http://www.niaaa.nih.gov/NR/rdonlyres/01DAE108-9B80-4672-A497-1E53A7ED5EF4/0/211p67.gif>
7. [http://www.google.fi/url?sa=t&source=web&ct=res&cd=1&ved=0CAsQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.avoin.helsinki.fi%2Fasp%2Fdatastore%2Fdownload.asp%3Fds\\_id%3D21262%26Luento4.pdf&rct=j&q=leimaus+dideoksi&ei=uETnSprpCJmFsAbYvz5BQ&usg=AFQjCNFGML8AFcHUj-ftYQehd8NKCBRhww](http://www.google.fi/url?sa=t&source=web&ct=res&cd=1&ved=0CAsQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.avoin.helsinki.fi%2Fasp%2Fdatastore%2Fdownload.asp%3Fds_id%3D21262%26Luento4.pdf&rct=j&q=leimaus+dideoksi&ei=uETnSprpCJmFsAbYvz5BQ&usg=AFQjCNFGML8AFcHUj-ftYQehd8NKCBRhww)