

# Silmukointi geneettisissä sairauksissa

Kandidaatintutkielma

Perinnöllisyystiede

Konsta Karttunen

Helsingin yliopisto

2018

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta	Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Biologian koulutusohjelma	
Tekijä – Författare – Author Konsta Karttunen		
Työn nimi – Arbetets titel – Title Silmukointi geneettisissä sairauksissa		
Oppiaine/Optionsuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Perinnöllisyystiede		
Työn laji – Arbetets art – Level Kandidaatintutkielma	Aika – Datum – Month and year 15.1.2019	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 28
Tilivitelmä – Referat – Abstract		
<p>Silmukointi on eukaryooteilla merkittävä ja hyvin yleinen geenisäätyelyn mekanismi: noin 94 %:sta ihmisen geeneistä silmukoideaan useampi kuin yksi lähetti-RNA:n isomuoto. Silmukoinnilla on olennainen rooli myös erilaisissa geneettisissä sairauksissa, joita silmukointiin vaikuttavat mutaatiot aiheuttavat lukuisilla erilaisilla mekanismeilla. Mekanismit voidaan jakaa <i>cis</i>-vaikuttaviin ja <i>trans</i>-vaikuttaviin mutaatioihin. <i>Cis</i>-vaikuttavat mutaatiot ovat mutaatioita samassa geenisekvenssissä, johon ne vaikuttavat. <i>Trans</i>-vaikuttavat mutaatiot puolestaan ovat mutaatioita <i>trans</i>-vaikuttavissa silmukoinnin säätelijöissä, jotka kiinnittyvät <i>cis</i>-regulatorisiin säätyelelementteihin.</p>		
<p><i>Cis</i>-vaikutteiset silmukointelementit aiheuttavat silmukointimutaatioiden seurauksena yleensä perinnölliä, monogenetiset sairauksia kuten familiaalinen dysautonomia, kystinen fibroosi, Hutchinson-Gilfordin progeria ja spinaalinen lihasatrofia. Mekanismuja, joilla nämä sairaudet syntyvät, ovat joko eksonin puuttuminen 5'- tai 3'-silmukointikohdan mutaation seurauksena, mutaation muodostama silmukointikohta intronissa – joka johtaa intronin osan päätymiseen lähetti-RNA:han – mutaation aiheuttama kryptinen silmukointikohta, kryptisten silmukointikohtien aktivaatio 5'- tai 3'-silmukointikohdien mutaatioiden seurauksena, tai mutaatio silmukoinnin tehostajajaksossa.</p>		
<p>Sairauksien syynä voivat olla myös monet hyvin erilaiset silmukointimekanismit. Myotonisessa dystrofiassa RNA:n laajentuneet toistojaksot aiheuttavat silmukointitekijän kertymisen toistojaksoihin, joka aiheuttaa laaja-alaisia silmukoinnin säätylyn häiriötä useissa geeneissä. Frontotemporaalisessa dementiassa sairaus johtuu eri silmukointivarianttien lukusuhteiden muuttuneesta määrästä; Menkesin taudissa silmukointimutaatiot vaikuttavat taudin vakavuuteen, ja <i>Retinitis pigmentosa</i> aiheutuu 3'-pään silmukointikohdan tunnistavien silmukointitekijöiden mutaatioista. Silmukoinnin häiriöt ovat tyypillisiä myös syöpäsoluille. Syövissä silmukoinnin säätyy on usein laaja-alaisesti muuttunut, jolloin niissä esiintyy silmukointivariantteja eri lukusuhteissa verrattuna normaalaleihin soluihin. Syövissä esiintyy usein myös silmukointivariantteja, jotka ovat edullisia syöpäsolen kasvulle ja levittäytymiselle.</p>		
<p>Silmukoinnista johtuvien sairauksien hoitoon on kehitetty pääasiassa antisense-oligonukleotidilääkkeitä. Nämä ovat lyhyitä DNA- tai RNA-molekyylejä, jotka kiinnittyvät kohdesekvensseihinsä ja vaikuttavat silmukointiin esimerkiksi estämällä silmukointikoneiston kiinnityksen silmukointikohtaan. Antisense-oligonukleotidien lisäksi on kehitetty muita pieniä molekyylejä, joiden rooli on yleensä tehostaa antisense-oligonukleotidien toimintaa.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Ihmisgenetiikka, silmukointi, geneettiset sairaudet		
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Katarina Pelin		
Säilytyspaikka – Förvaringsställe – Where deposited		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information		

## Sisällysluettelo

1. Johdanto .....	3
2. Esiaste-mRNA ja lähettilä-RNA .....	3
3. Silmukointi ja splicesosomit .....	4
3.1 Silmukoinnin vaiheet.....	5
3.2 Vaihtoehtoinen silmukointi .....	6
4. Silmukoinnin tautimekanismit .....	7
5. Mutaatiot <i>cis</i> -regulatorisissa elementeissä .....	8
5.1 Familiaalinen dysautonomia (tyypin I mutaatio) .....	8
5.2 Kystinen fibroosi (tyypin II ja tyypin IV mutaatiot) .....	9
5.3 Hutchinson-Gilfordin syndrooma (tyypin III mutaatio).....	11
5.3.1 Muut <i>LMNA</i> -geenistä johtuvat sairaudet.....	12
5.4 Spinaalinen lihasatrofia (tyypin V mutaatio) .....	13
6. Muut silmukoinnin sairaudet.....	15
6.1 Myotoninen dystrofia .....	15
6.2 Frontotemporaalinen dementia.....	16
6.3 Menkesin tauti .....	17
6.4 <i>Retinitis pigmentosa</i> .....	18
7. Silmukoinnin mutaatiot syövässä.....	19
8. Hoitomuodot.....	21
8.1 Antisense-oligonukleotidit .....	21
8.2 Pienet molekyylit.....	22
9. Johtopäätökset .....	23
10. Lähteet.....	26

## 1. Johdanto

Ihmisellä on noin 20 000 proteiinia koodaavaa geenia, mutta lopullisia proteiinituotteita arvioidaan olevan noin 5-10 kertaa tämän verran (Scotti ja Swanson, 2015). Tämän monimuotoisuuden mahdollistaa vaihtoehtoinen silmukointi, eli ei-koodaavien intronien poistaminen ja koodaavien eksonien yhteenliittäminen, jonka avulla yhdestä geenistä muodostuu ihmisen keskimäärin kolme proteiinituotetta. Tämä tekee mahdolliseksi transkriptomin ja proteomin laajentamisen ilman genomin koon kasvua. Silmukointia voidaan myös säädellä riippuen solutyyppistä, kehitysvaiheesta ja solun vastaanottamista viesteistä (Cooper ym., 2009). Noin 94 % ihmisen geeneistä silmukoidaan (Ward ja Cooper, 2010), ja yli 90 % proteiineja koodaavista geeneistä muodostaa useamman kuin yhden mRNA-isomuodon (Scotti ja Swanson, 2015).

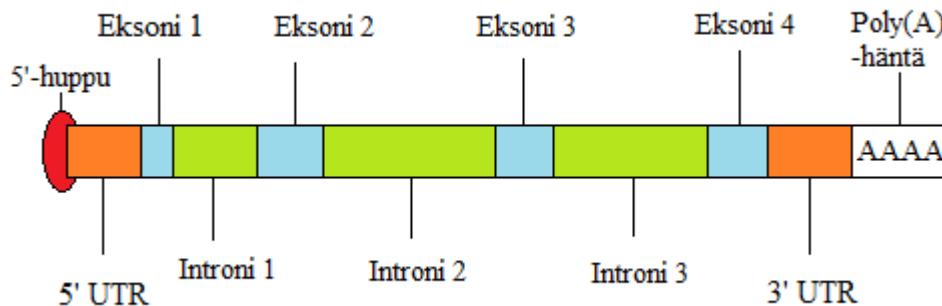
Silmukointi on keskeinen osa eukaryoottien geenisäätyä ja täten myös silmukoinnissa tapahtuvat virheet ja virheisiin johtavat mutaatiot ovat olennainen osa geneettisiä sairauksia. Yleisimpiä geneettisten sairauksien aiheuttajia ovat yhden nukleotidin polymorfismit, jotka aiheuttavat noin 84 % tunnetuista geneettisistä sairauksista. Arvolta 35-50 % ihmisen geneettisistä sairauksista johtuu virheistä silmukoinnissa (López-Bigas ym., 2005). Silmukointivirhe voi olla suoraan tautifenotyypin aiheuttaja, tai silmukointimutaatiolla voi olla vaikutusta taudin puhkeamiseen tai vakavuuteen (Ward ja Cooper, 2010).

## 2. Esiaste-mRNA ja lähettilä-RNA

Transkription aikana DNA:han koodatusta geenistä muodostetaan yksijuosteinen RNA-kopio, jota kutsutaan esiaste-mRNA:ksi. Eukaryoottien esiaste-mRNA muodostuu introneista ja eksoneista sekä muista funktioalisista osista. Intronit ovat yleensä RNA:n ei-koodaavia osia, jotka poistetaan silmukoinnin aikana; lopullinen lähettilä-RNA muodostuu eksonit yhteenliittämällä. Eksoneita on vain noin kymmenesosa tyypillisen esiaste-mRNA:n pituudesta (Ward ja Cooper, 2010).

Esiaste-mRNA sisältää 5'- ja 3'-UTR -alueet (engl. untranslated region, ei-transloitavat alueet), jotka eivät osallistu proteiinin koodamiseen, sekä niiden väliset intronit ja eksonit yhtenäisenä yksijuosteisena RNA-molekyylinä. Esiaste-mRNA:ta muokataan transkription aikana, ja sen jälkeen, mikä tapahtuu aluksi liittämällä esiaste-mRNA:n 5'-päähän huppurakenne ja 3'-päähän noin 200-250 emäksen polyadenylaatiohääntä (poly(A)-hääntä). 5'-huppu -rakenne sekä toimii proteiinisynteesin tunnistuskohtana että estää lähettilä-RNA:n hajottamisen sytoplasmassa. Yleensä myös poly(A)-hääntä vakauttaa lähettilä-RNA:ta ja

estää sen hajottamista. Kuvassa 1 on kuvattuna esiaste-mRNA:n funktionaaliset osat ennen silmukointia. Esiaste-mRNA:ssa olevat intronit silmukoidaan ja eksonit liitetään yhteen ennen kuin lähettilä-RNA on valmis (Sariola ym., 2015).



**Kuva 1:** esiaste-mRNA:n rakenne ennen silmukointia, 5'-huppu ja 3'-poly(A)-häntä lisättynä (Sariola ym., 2015).

Silmukoinnin kannalta intronien tärkeimmät funktionaaliset osat muodostuvat tyypillisesti 5'-pään silmukointikohdasta ja 3'-pään silmukointikohdasta, jotka sijaitsevat intronien päässä eksonin rajalla. 99 %:ssa introneita eksoni-introni-rajalla ovat konservoituneet GT-AG -dinukleotidit, ja näitä ympäröi vähemmän konservoitunut silmukointikohdan sekvenssi. Lisäksi intronissa on myös haarautumiskohta, joka sijaitsee 30-50 nukleotidia ylävirtaan 3'-silmukointikohdasta ja jossa on aina konservoitunut adeniiniemäs, johon silmukoinnissa irrotettu intronin 5'-pää kiinnittyy. Lisäksi 3'-pään silmukointikohdan ja haarautumiskohdan välillä on 15-20 nukleotidia pitkä, varsinkin urasiilinukleotideja sisältävä polypyrimidiinijakso 5-40 nukleotidia ylävirtaan silmukointikohdasta (Cooper ym., 2009).

### 3. Silmukointi ja spliseosomit

Silmukointia esiintyy käytännössä kaikilla eukaryooteilla ja varsinkin monisoluilla eliöillä. Silmukoinnin hyödyt ovat seurausta sen joustavuudesta geenien monimuotoisuuden lisäämisessä: eksonien duplikaatio ja translokaatio geenistä toiseen mahdollistaa uusien hybridigeenien syntymisen ja toiminnallisen monimuotoisuuden lisääntymisen (Strachan ym., 2015). Duplikaatiot johtavat redundanssiin, jonka seurauksena duplikoituneeseen geeniin kohdistuu vähemmän evolutiivista valintapainetta. Näin geeniin kertyy mutaatioita ja uudenlainen geeni pystyy mahdollisesti muodostamaan uusia toiminnallisuksia tai sen ekspressio muuttuu erilaiseksi (Kim ym., 2008). Lisäksi introni-eksoni-rakenne mahdollistaa vaihtoehtoisen silmukoinnin, jonka avulla samasta geenistä voidaan tuottaa toiminnallisesti

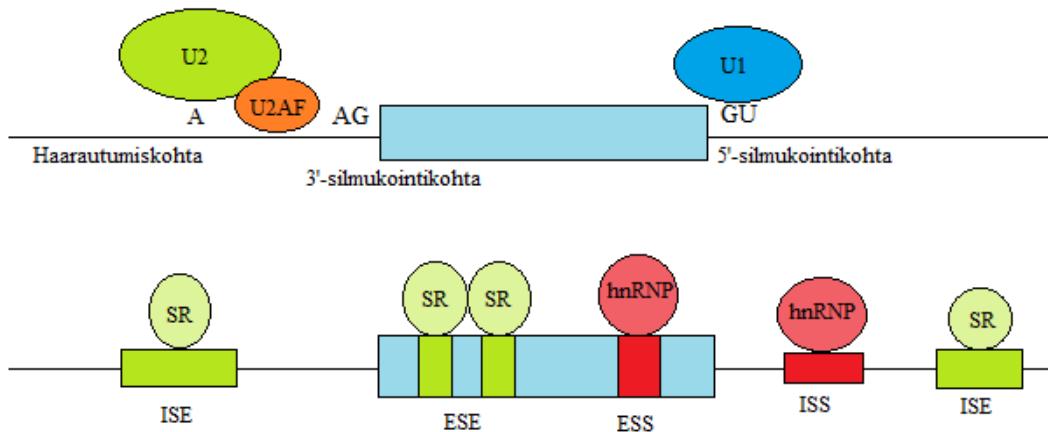
erilaisia proteiineja. Proteiinituote voi olla toiminnallisuudeltaan erilainen esimerkiksi proteiini-proteiini-interaktioissa, solunsisäisessä sijainnissa tai katalyyttisessä aktiivisuudessa (Tazi ym., 2009). Kappaleessa 7 esitän, kuinka syövät käyttävät näitä saman geenin toiminnallisesti erilaisia isomuotoja kasvunsa edistämiseen. Silmukoinnin rooli on ollut merkittävä varsinkin selkärankaisten ja selkärangattomien lajiutumisessa, kun taas esimerkiksi kasveilla koko genomin duplikaatiot ovat olleet merkittävämpiä lajiutumisen edistäjiä (Kim ym., 2008).

Eukaryooteilla silmukoinnin mahdollistaa tuman sisäinen molekyylikoneisto, spliseosomi, joka muodostuu viidestä pienestä ribonukleoproteiinista (snRNP) ja niitä avustavista proteiineista. Spliseosomit jaetaan kahteen eri tyyppiin: major-spliseosomi, eli U2-riippuvainen spliseosomi, sekä minor-spliseosomi, eli U12-riippuvainen spliseosomi (Will ja Lührmann, 2011). U2-riippuvainen spliseosomi silmukoi noin 95,5 % introneja sisältävistä geeneistä ja U12-riippuvainen spliseosomi silmukoi jäljellejäävän osan. U2-riippuvainen spliseosomi muodostuu ribonukleoproteiineista, jotka on nimetty U1, U2, U4, U5 ja U6. U2-tyypin intronit sisältävät käytännössä aina 5'-päässään GT-dinukleotidin ja 3'-päässään AG-dinukleotidin. U12-riippuvainen spliseosomi koostuu ribonukleoproteiineista U11, U12, U4atac, U5 ja U6atac (Scotti ja Swanson, 2015). U4atac ja U6atac ovat saaneet nimensä siitä, että U12-riippuvaiset intronit tunnistettiin aluksi niiden päässä olevista AT-AC -dinukleotideista, mutta sittemmin on todistettu, että intronien päässä voi olla muitakin dinukleotidipareja. Myös U12-riippuvaiset intronit voivat sisältää U2-introneille tyypillisenä pidettyjä GT-AG -dinukleotidejä. Suurin osa U12-tyypin introneista kuuluu AT-AC- tai GT-AG -alatyypeihin. U12-tyypin intronin erottavat muista introneista sen 5'-silmukointikohta ja haarautumiskohda, jotka ovat konservoituneempia muihin introneihin verrattuina. Myös U12-riippuvainen spliseosomi on yhdistetty tiettyihin silmukoinnin häiriöihin (Turunen ym., 2013).

### 3.1 Silmukoinnin vaiheet

Silmukoinnin täytyy olla hyvin tarkkaa, koska yksikin lähetti-RNA:han tarkoittamatta jäänyt, tai väärästä tunnistuskohdasta silmukoitu, introni voi aiheuttaa esimerkiksi nonsense-mutaation tai lukukehyksen muutoksen, jotka voivat estää translaation tai tuottaa toimimattoman proteiinituotteen (Ward ja Cooper, 2010). Silmukoinnin vaatiman tarkkuuden ja säätelyn arvellaan olevan syy siihen miksi silmukointikoneisto on huomattavan monimutkainen ja energiata vaativa (Matera ja Wang, 2014). Tarkkuuden käänköpuoli on, että RNA:n prosessointi on altis sairauksia aiheuttaville virheille (Scotti ja Swanson, 2015).

Silmukointi alkaa U1-snRNP:n kiinnitymisellä 5'-silmukointikohtaan ja U2:n kiinnitymisellä haarautumiskohdasta. Avustava tekijä, U2AF, kiinnittyy myös polypyrimidiinikohdasta, joka avustaa U2:n kiinnitymistä haarautumiskohdasta. Kolmen snRNP:n kompleksi, U4/U5/U6, kiinnittyy kohtien tunnistuksen jälkeen introniin muodostuvaan kompleksiin. U4 irtoaa, jonka jälkeen U6 korvaa U1:n 5'-silmukointikohdassa. U6 siirtää 5'-silmukointikohdan U2:n lähelle, jonka jälkeen tapahtuu transesterifikaatioreaktio, jossa 5'-silmukointikohdan pää irrotetaan eksonista ja kiinnitetään haarautumiskohdan adenioon. Intronista muodostuu tällöin lassomainen rakenne. Sen jälkeen U5 tuo ylävirran vapaan eksonin 3'-pään lähelle alavirran eksonin 5'-päästä, ja toinen transesterifikaatioreaktio irottaa kiinnolevan intronin 3'-pään ja liittää eksonien päät yhteen (Douglas ja Wood, 2011).



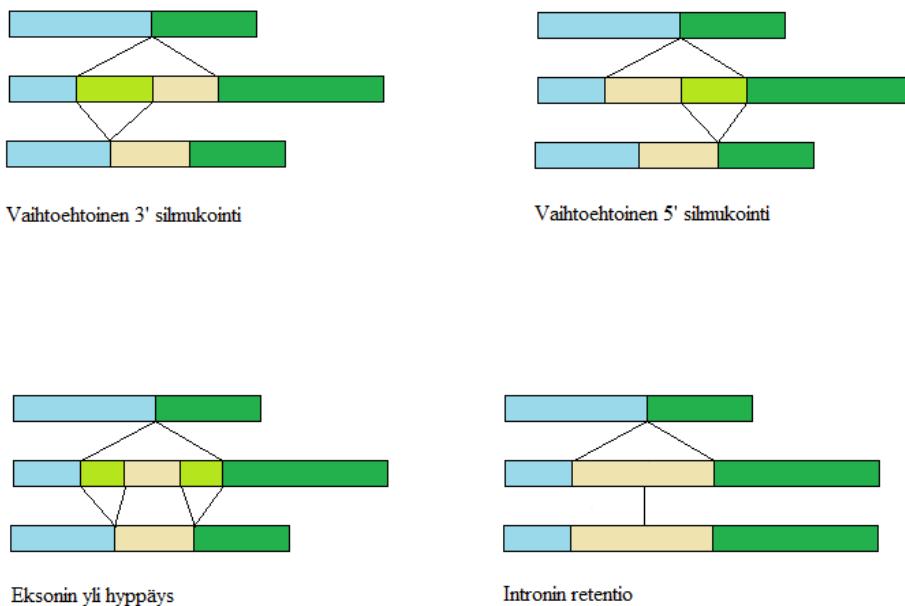
**Kuva 2:** Silmukoinnin säätylyn vaikuttavat *cis*-regulatoriset alueet ja *trans*-vaikutteiset tekijät. Vaaleansininen kohta kuvailee eksonia. ESE ja ESS ovat eksonia silmukoinnin tehostajia ja hiljentäjiä, ja ISE ja ISS intronia silmukoinnin tehostajia ja hiljentäjiä (Ward ja Cooper, 2010).

### 3.2 Vaihtoehtoinen silmukointi

Vaihtoehtoista silmukointia ohjaavat splicesosomin saamat signaalit. Splicesosomin muodostumista introniin säätelivät silmukointikohtien komplementaarisuus splicesosomin komponenteille sekä introneissa ja eksoneissa olevat *cis*-regulatoriset silmukoinnin tehostaja- ja hiljentäjäjakso, jotka ovat yleensä kuuden nukleotidin pituisia jaksoja silmukointikohtien läheisyydessä (Strachan ym., 2015). Säätylyn vaikuttavat tekijät on esitetty kuvassa 2. Silmukoinnin hiljentäjäjaksoihin kiinnittyvät hnRNP-proteiinit, eli heterogeeniset ribonukleoproteiinit, ja tehostajajaksoihin SR-proteiinit, eli seriini-arginiini -perheen proteiinit, jotka ovat nimetty niissä olevien seriini-arginiini -domeenien mukaan. Jotkut SR-

proteiinit voivat myös toimia hiljentäjinä. Silmukoinnin säätelyyn vaikuttaa myös silmukointitekijöiden ekspressiotasojen säätely solun sisäisen ja solujen välisen viestinnän avulla. Yksittäisen silmukointitekijän affineetti RNA:han on suhteellisen matala, mutta usean silmukointitekijän yhteistyö mahdollistaa tarkemman säätelyn. Myös kromatiinin ja histonien muokkaus, esiaste-RNA:n muodostamat sekundaarirakenteet ja pienet tuman RNA:t eli snoRNA:t vaikuttavat silmukoinnin säätelyyn (Douglas ja Wood, 2011).

Vaihtoehtoinen silmukointi jaetaan eri alaryhmiin, joista yleisimmät on esitetty kuussa 3: eksonin yli hyppäys kattaa noin 38,4 % vaihtoehtoisesta silmukoinnista, vaihtoehtoinen 3'-silmukointi kattaa 18,4 %, vaihtoehtoinen 5'-silmukointi 7,9 % ja intronin retentio 2,8 %. Jäljelle jäävä 32,5 % silmukoinnista kattaa muita, monimutkaisempia mekanismeja kuten vaihtoehtoiset eksonit, vaihtoehtoiset transkription aloituskohtat, eli vaihtoehtoiset promoottorikohdat, ja vaihtoehtoiset polyadenylaatiokohdat (Kim ym., 2008).



**Kuva 3.** Vaihtoehtoisen silmukoinnin yleisimpiä mekanismeja. Kaaret kuvaavat kohtia, joista vaaleanvihreänä kuvatut intronit silmukoidaan. Vaaleanruskea, sininen ja tummanvihreä kuvaavat eksoneita (Sariola ym., 2015).

#### 4. Silmukoinnin tautimekanismit

Silmukoinnissa tapahtuvat virheet voivat olla suoraan sairauden aiheuttavia tekijöitä tai vaikuttaa sairauden puhkeamiseen tai sen vakavuuteen. Silmukointimutaatioilla tarkoitetaan yleensä mutaatioita *cis*-regulatorisissa kohdissa, jotka ovat säätelykohtia samassa DNA- tai

RNA-molekyylissä, johon ne vaikuttavat. Silmukoinnin tapauksessa *cis*-vaikuttava mutaatio voi olla esimerkiksi 5'-silmukointikohdan mutaatio. *Trans*-vaikuttavat mutaatiot ovat sen sijaan mutaatioita eri molekyylien välisesti vaikuttavissa säätelijöissä, kuten silmukoinnissa *cis*-regulatorisiin kohtiin kiinnittyvät hnRNP- ja SR-proteiinit. Myös *trans*-vaikutteiset silmukointitekijöiden mutaatiot voivat aiheuttaa sairauksia (Ward ja Cooper, 2010).

*Cis*-regulatoriset silmukoinnin mutaatiot voidaan jakaa viiteen eri tyyppiin Wimmerin ym. (2007) mukaan:

- 1) Silmukointimutaatiot 5' - tai 3' -silmukointikohdissa, jotka johtavat eksonin puuttumiseen.
- 2) *De novo*-mutaation muodostama silmukointikohta intronissa, joka johtaa kryptisen eksonin, eli intronin osan, päätymisen lähettil-RNA:han.
- 3) *De novo*-mutaation aiheuttama eksoninen kryptinen silmukointikohta, joka johtaa eksonin osien puuttumiseen lähettil-RNA:sta.
- 4) Kryptisten silmukointikohtien aktivaatio 5' - tai 3' -silmukointikohdien mutaation seurauksena, joka johtaa kryptisen intronisen tai eksonisen silmukointikohdan käyttöön. Lähettil-RNA:han jäädessä intronin osa, tai eksonin osa puuttuu.
- 5) Mutaatio eksonisessa silmukoinnin tehostajajaksossa, joka johtaa eksonin tai sen osien puuttumiseen.

Yleisimmät tautimutaatiot ovat *cis*-vaikuttavia mutaatioita 5' - ja 3' -silmukointikohdien dinukleotideissa; näissä kohdissa olevat tautimutaatiot aiheuttavat käytännössä aina virheitä silmukoinnissa johtuen tunnistuskohtien spesifisyydestä (Ward ja Cooper, 2010). Arviolta noin 10 % kaikista patogeenisistä mutaatioista sijaitsee 5' - tai 3' -silmukointikohdissa ja yleisin taudin aiheuttava mekanismi on eksonien puuttuminen silmukointikohdan mutaation seurauksena. Silmukointimutaatiot 5' -silmukointikohdassa ovat yleisempää kuin 3' -silmukointikohdassa (Krawczak ym., 2007).

## 5. Mutaatiot *cis*-regulatorisisissa elementeissä

### 5.1 Familiaalinen dysautonomia (tyypin I mutaatio)

Familiaalinen dysautonomia (FD) on lähes pelkästään aškenasijuutalaisten keskuudessa esiintyvä, autosomaalinen resessiivinen sairaus. Aškenasijuutalaisilla yleisimmän taudin aiheuttavan mutaation kantajia on noin 1:30-frekvensillä ja esimerkiksi Israelissa taudin sairastajia on 1:3703 elävänä syntyneestä lapsesta. FD on perinnöllinen sensorinen ja

autonominen neuropatia, eli tauti vahingoittaa sensorisen ja autonomisen hermoston neuroneja. Oireita familiaalisessa dysautonomiassa ovat ruuansulatuskanavan, hengityksen, aistien ja sydämen toimintahäiriöt sekä skolioosi tai kyfoosi. Yleinen oire on myös dysautonominen kriisi, joka johtuu yleensä stressin seurauksena alkavista oireista, kuten hypertensiosta, takykardiasta, pahoinvioinnista, oksentelusta sekä persoonallisuuden muutoksista. Oireet johtuvat siis autonomisen ja sensorisen hermoston toimintahäiriöistä; esimerkiksi sydämen ja hengityksen autonominen säätely ei toimi normaalisti taudin aiheuttaman neuropatiän vuoksi (Rubin ja Anderson, 2008).

Familialisen dysautonomian geneettinen tausta on *IKBKAP*-geenissä, jossa on 37 eksonia ja joka koodaa 1332 aminohapon mittaista IKAP-proteiinia. Geeni sijaitsee kromosomissa 9q31. IKAP on osa elongaattorikompleksia, joka osallistuu transkription, histonien asetylaation, eksosyntoosin ja siirtäjä-RNA:n muokkaukseen (Rubin ja Anderson, 2008). Taudin aiheuttaa kaksi eri tunnettua mutaatiota. 98 %:ssa tapauksista sairauden aiheuttava mutaatio on c.2507+6T>C eli transitio 5'-silmukointikohdan kuudennessa emäksessä intronissa 20. Tämä mutaatio johtaa silmukoinnin häiriöön, koska silmukointikoneisto ei tunnista mutatoitunutta silmukointikohtaa, jolloin lähettilä-RNA:sta silmukoidaan pois eksoni 20 intronin 20 mukana (Anderson ym., 2001). Sen lisäksi mutaatio aiheuttaa lukukehyksen muutoksen ja sitä kautta nonsense-mutaation, jolloin eksoneja 20-37 ei koodata translaatiossa (Rubin ja Anderson, 2008). Toinen tunnettu mutaatio on eksonin 19 nukleotidin 2390 G>C -transversio, joka aiheuttaa p.R696P-mutaation, eli arginiini-proliini -substituution, ja seriini-treoniinikinaasin fosforylaatiokohdan puuttumisen (Anderson ym., 2001).

## 5.2 Kystinen fibroosi (tyypin II ja tyypin IV mutaatiot)

Kystinen fibroosi on autosomaalinen resessiivinen sairaus, jonka aiheuttaa mutaatio *CFTR*-genissä. Geenin koodama CFTR-proteiini on transmembraaninen kloridin konduktanssia säätelevä proteiinikanava. Sairaus on yleisin pohjoiseurooppalaistaustaisilla ihmislajeilla, joiden keskuudessa 1:2000-3000 syntyneestä sairastaa kystistä fibroosia. Sairautta on todettu 70 000 tapausta maailmanlaajuisesti, ja tapauksia ilmenee noin 1000 vuosittain. Sairaus on yleisin periytyvä geneettinen sairaus (Rafeeq ja Murad, 2017).

Kystinen fibroosi on monioireinen, etenevä ja systeeminen sairaus, joka vaikuttaa varsinkin hengitys- ja ruuansulatuselimistöön, mutta sairauden edetessä oireita ilmenee myös muissa elimissä. Keuhkojen epiteelissä solunulkoinen kloridi johtaa veden kulkeutumiseen

solukalvon yli, jolloin keuhkoputkien lima pysyy juoksevana. Kun proteiinin toiminta mutaation seurauksena häiriintyy, lima paksuuntuu keuhkoputkissa, jolloin liman kuljetus epiteelin värekarvojen avulla ei toimi. Paksu lima kertyy keuhkoputkiin ja aiheuttaa toistuvia vakavia keuhkoinfekatioita. Lisäksi infektioiden seurauksena keuhkoihin kertyy neutrofilejä, joiden vapauttama elastaasi, nukleiinihapot ja sytosolin proteiinit vaikuttavat keuhkokudoksen tuhoutumiseen ja osaltaan liman viskositeettiin. Ruuansulatuskanavassa lima tukkii haiman kanavat ja sappirakon sappitiehyen, joka aiheuttaa ruuansulatuksen häiriötä. Haiman oireet voivat aiheuttaa myös suolen tukoksia ja kivennäisaineiden puutoksia lisääntyneen hikoilun kautta poistuneen suolan vuoksi. Eliniänodote kehittyneissä maissa on noin 40-50, ja yleisin kuolinsyy sairastuneilla on keuhkoinfektiot (Rafeeq ja Murad, 2017).

*CFTR*-geeni sijaitsee kromosomissa 7q31.2. Geenistä on löydetty noin 1900 eri mutaatiota, jotka jaetaan kuuteen eri luokkaan niiden vaikutuksen mukaan. Mutaatiot on listattu taulukkoon 1. Vakavimman tautifenotyypin aiheuttavat tyypin I-III mutaatiot (Rafeeq ja Murad, 2017).

**Taulukko 1:** Kystisen fibroosin aiheuttavat mutaatiot luokiteltuna *CFTR*-proteiinin toiminnan häiriöiden mukaan (Rafeeq ja Murad, 2017).

Tyypпи	Vaikutus CFTR-kanavaan	Mutaatiot
I	Proteiinia ei tuoteta ollenkaan ennenaikeisen translaation keskeytymisen vuoksi	Nonsense Lukukehys Silmukointi
II	Proteiinin lokalisointion virheet translaation jälkeisen virheellisen muokkauksen seurauksena	Missense Deleetio
III	Kanavan säätelyn häiriöt	Missense
IV	Kloridivirtauksen ja kanavan aukiolon häiriöt	Missense
V	Vähentynyt funktioaalisen proteiinin synteesi	Silmukointi Missense
VI	Proteiinin heikentynyt vakaus solukalvolla, joka johtaa nopeampaan proteiinin uusiutumiseen mutta määrä pysyy samana	Missense

Yleisin mutaatio *CFTR*-geenissä on tyypin II sairauden aiheuttava p.F508del-mutaatio, joka aiheuttaa 70 % tapauksista (Rafeeq ja Murad, 2017). Sanz ym. (2017) tarkastelivat kolmea eri silmukointivirheen aiheuttavaa mutaatiota, jotka ovat syviä intronisia mutaatioita. Nämä mutaatiot eivät vaikuta 5'- tai 3'-silmukointikohtien toimintaan vaan muodostavat intronien keskelle uuden, vahvan silmukointikohdan, joka johtaa pseudoeksonin päätymiseen *CFTR*-transkriptiin silmukoinnissa. c.1679+1634A>G -mutaatio aiheuttaa

introniin 12 vahvan silmukointikohdan, joka johtaa 49 emäsparin pseudoeksoniin. Pseudoeksoni löytyi tutkimuksessa 99 %:ssa transkripteista. Mutaatio aiheuttaa nonsense-mutaation ja vakavan tautifenotyypin. c.3140-26A>G -mutaatio aiheuttaa silmukointikohdan 26 emäsparia ylävirtaan eksonista 20, joka johtaa eksonin pidentymiseen 25:llä emäsparilla. Mutaatio aiheuttaa lukukehyksen muutoksen ja ennenaikaisen translaation terminaation stop-kodonin muodostumisen vuoksi. Mutaation seurauksena 5 % *CFTR*-transkripteista on kuitenkin normaaleja mikä voi selittää lievemmän tautifenotyypin. c.3718-2477C>T - mutaatio aiheuttaa silmukointikohdan intronissa 22 ja johtaa 84 emäsparin pseudoeksonin muodostumiseen, jossa on myöskin stop-kodoni. Tässä mutaatiossa on variaatiota silmukoinnin virheellisyydessä mikä korrelooi vahvasti taudin vakavuuden kanssa.

Silmukointimutaatio c.1525-1G>A on mutaatio *CFTR*-geenin intronin 9 3'-silmukointikohdassa, joka johtaa silmukointikohdan toiminnan puutokseen. Mutaation seurauksena 3'-pää silmukoideaan eksonin 10 kohdissa 1610-1611 tai 1678-1679, jolloin eksoni lyhenee. Eksoni 10 voi puuttua transkripteista myös kokonaan, joka viittaa siihen, että 3'-päättä ei välttämättä silmukoidea lainkaan (Ramalho ym., 2003). On huomionarvoista, että *CFTR*-geenissä esiintyy myös monia muita silmukoinnin mutaatioita, joita tässä ei ole mainittu.

### 5.3 Hutchinson-Gilfordin syndrooma (tyypin III mutaatio)

Hutchinson-Gilfordin syndrooma on hyvin harvinainen geneettinen sairaus. Tautia pidetään autosomaalisesti dominanttina, mutta lähes kaikki tapaukset ovat olleet *de novo*-mutaatioista johtuvia ilman periytyvää taustaa, sillä tauti johtaa kuolemaan yleensä ennen lisääntymiskää. Tautia on todettu vain hieman yli 100 tapausta vuoden 1886 jälkeen, jolloin tauti on ensimmäistä kertaa kuvattu. Taudin esiintyvyys on noin 1:4 000 000 syntyneestä (Pollex ja Hegele, 2004).

Hutchinson-Gilfordin syndrooma on progeria, eli ennenaikaista ikääntymistä aiheuttava sairaus. Tautia sairastavat alkavat ilmentää ikääntymisen merkkejä ennen yhden vuoden ikää. Yleisiä oireita ovat hiustenlähtö, pieni leuko, suuret korvat ja epäsuhtaiset kasvonpiirteet. Iho näyttää ryppyiseltä ja ikääntyneeltä. Keskimääräinen kuolinikä on 13 ja kuoleman syynä ovat yleensä sydän- ja verisuonisairaudet. Tauti aiheuttaa myös muita, yleensä ikääntymiseen assosioituvia oireita, kuten niveltulehdusia ja hengityselimistön sekä sydän- ja verisuonielimistön sairauksia (Pollex ja Hegele, 2004).

Hutchinson-Gilfordin syndrooma johtuu mutaatiosta *LMNA*-geenissä. *LMNA* koodaa lamiini-proteiinia, joka osallistuu tumalevyn muodostumiseen. Tumalevy ylläpitää tuman rakenteellista eheyttä ja toimii suojaudena tuman ja sytoplasman välillä. *LMNA*-geenistä tuotetaan vaihtoehtoisen silmukoinnin kautta neljää eri proteiinituotetta: Lamiini A, C, AΔ10 ja C2 (Pollex ja Hegele, 2004). *LMNA*-geenistä on löytynyt kolme eri *de novo*-pistemutaatiota, jotka assosioituvat syndroomaan. 90 %:ssa tapauksista mutaatio c.1824C>T aiheuttaa hiljaisen p.G608G-mutaation. Mutaation yleisyys johtuu kohdassa olevasta CpG-dinukleotidista, jossa metyloitu sytosiini voi deaminoitua tymiiniksi ja kopioitua replikaatiossa edelleen. Tautifenotyyppi johtuu mutaation muodostamasta kryptisestä silmukointikohdasta, joka johtaa 150 nukleotidin deleetioon eksonin 11 lopusta. Lukukehys pysyy eheänä, joten translaatiossa proteiinituotteeseen tulee 50 aminohapon deleetio lamiini A -proteiiniin. Muut taudin aiheuttavat mutaatiot ovat p.G608, joka johtuu G>A -transitiosta samassa eksonin 11 kodonissa kuin p.G608G -potilailla, sekä p.E145K G>A -transitio kodonissa 145 eksonissa 2. Potilaalla, jolta p.E145K mutaatio löytyi, oli myös epätyypillisiä oireita verrattuna yleisempiin eksonin 11 mutaatioihin (Eriksson ym., 2003).

Immunofluoresenssitutkimuksissa on selvitetty, että 48 %:ssa tautia sairastavien soluista on tuman rakenteellisia häiriöitä, ja lamiini A:n ekspressio on vain noin neljäsosan normaaleista soluista. Hiiritutkimukset ovat osoittaneet, että *LMNA*-mutaatiot johtavat myös epänormaaliien geenien transkriptioon ja geenisäätelyn häiriöihin (Pollex ja Hegele, 2004).

### 5.3.1 Muut *LMNA*-geenistä johtuvat sairaudet

*LMNA*-geenistä johtuvia sairauksia on löydetty yhdeksän, joista Hutchinson-Gilfordin syndrooma ja muut epätyypilliset progeriat ovat yksi. Geenistä johtuvat sairaudet ovat kliiniseltä kvaltaan hyvin monimuotoisia, joka viittaa siihen, että *LMNA*-geenillä on monia erilaisia mekanismeja eri soluissa ja kudoksissa. Näitä sairauksia ovat muun muassa hartialtiolihasdystrofia, suvuttainen osittainen lipodystrofia ja laajentava kardiomyopatia (Scotti ja Swanson, 2015).

Hartia-lantiolihasdystrofiassa mutaatio on c.1608+5G>C intronin 9 5'-silmukointikohdassa viisi nukleotidia ylävirtaan eksoni-introni -rajasta. Suvuttaisessa osittaisessa lipodystrofiassa mutaatio c.1488+5G>C on myös 5'-silmukointikohdassa mutta intronissa 8. Molemmissa näistä sairauksista mutaatio aiheuttaa intronin säilymisen silmukoidussa läheti-RNA:ssa. Sen seurauksena lukukehys muuttuu, joka aiheuttaa nonsense-mutaation. Stop-kodonin vuoksi läheti-RNA hajotetaan translaation aikana

nonsense-välitteisen hajottamisen avulla, mutta molemmissa tautimutaatioissa on mahdollista, että translaatio suoritetaan loppuun asti, joka tuottaa molemmissa tapauksissa lyhentyneen lamiini A/C -proteiinin. Laajentava kardiomyopatia johtuu eksonin 4 c.640-10 A>G -transitiosta, eli transitio tapahtuu 10 nukleotidia ylävirtaan eksoni-introni -rajasta. Mutaatio johtaa vaihtoehtoisen 3'-silmukointikohdan muodostumiseen, jonka seurauksena lopulliseen lähettil-RNA:han jää 9 ylimääräisen nukleotidin jakso eksonien 3 ja 4 rajalle (Scotti ja Swanson, 2015).

#### 5.4 Spinaalinen lihasatrofia (tyypin V mutaatio)

Spinaalinen lihasatrofia on autosomaalisesti resessiivisesti periytyvä lihastauti. Se on toiseksi yleisin tappava geneettinen sairaus kystisen fibroosin jälkeen. Taudin esiintyvyys on noin 1:6000-10 000 syntyneestä. Spinaalinen lihasatrofia johtaa alempien motoneuronien degeneraatioon varsinkin proksimaalisissa lihaksissa mikä johtaa etenevään lihasrappeumaan, halvaantumiseen ja tautimuodon mukaan eliniän lyhenemiseen. Yleisiä oireita ovat myös selän lihasten heikkenemisestä johtuva skolioosi sekä hengityslihasten rappeuman aiheuttamat hengitysvaikeudet (Bowerman ym., 2017).

Spinaalinen lihasatrofia jaetaan tautimuodoltaan viiteen vakavuuden ja alkamisiän mukaan. Tyypit ovat listattuna taulukossa 2.

**Taulukko 2:** Spinaalisen lihasatrofian kliiniset muodot Bowerman ym. (2017) mukaan.

Typpi	SMN2-kopioluku	Puhkeamiskä	Kliininen kuva	Eliniän odote
0	1	Kohdussa ennen syntymää	Motoristen ja sensoristen neuronien menetyks Lihaskutistumat Sydänviat	Kuolema ennen syntymää tai heti sen jälkeen
I	2	Suurin osa 6 kuukauden ikään mennessä	Hypotonia Hengitysongelmat Syömisen ja pään liikkeen ongelmat Ei kykyä istua tai kääntyä ilman avustusta	90 % kuolleita ennen 2 vuoden ikää ilman invasiivista hengitysavustusta
II	3	6-12 kuukauden iässä	Pystyvästi istumaan ilman avustamista Ei kävelykykyä Hengityslihasten heikkous	Elinikä lyhentynyt, suurin osa 30-50 ikävuoteen asti
III	3-5	18 kuukauden jälkeen	Kävely ilman avustusta lyhytaikaisesti Yleensä ei hengitysoireita	Lähes normaali

IV	3-5	Aikuisiässä	Etevä proksimaalinen heikkous Liikekyky säilyy Etenee hitaasti	Normaali
----	-----	-------------	--	----------

Taudin geneettinen tausta on *SMN1*-geenissä kromosomissa 5q13, joka koodaa SMN-proteiinia. SMN-proteiini ekspressoituu neuronien eri osissa ja sillä on rooli motoneuronien selviytymisessä, pienien ribonukleoproteiinien metaboliassa, aktiinin sytoskeletonin muodostamisessa sekä mRNA:n kuljetuksessa. Ei ole selvää, minkä toiminnallisen roolin puute on taudin aiheuttaja (Bowerman ym., 2017). On huomionarvoista, että SMN-proteiini vaikuttaa itsessään spliceosomaalien ribonukleoproteiinien metabolismaan. Sairaudessa on todettu vakavissa muodoissa silmukoinnin häiriötä, mutta nämä häiriöt ilmentyvät kuitenkin vasta neuromuskulaaristen oireiden jälkeen (Matera ja Wang, 2014), eli SMN-proteiinin rooli silmukointitekijänä ei todennäköisesti ole taudin pääasiallinen aiheuttaja.

Sairauden puhkeaminen johtuu *SMN1*-geenin puuttuvan toiminnan mutaatiosta; solut eivät pysty tuottamaan tarpeeksi SMN-proteiinia, joka johtaa motoneuronien degeneraatioon. Taudin heterogeniseen kliiniseen kuvaan vaikuttaa *SMN1*-geenin homologi *SMN2*, joita voi olla solussa yhdestä jopa viiteen. Jokaisessa *SMN2*-geenissä on C>T-transitio eksonin 7 kuudennessa nukleotidissa, jonka vuoksi geenin tuottamasta proteiinista noin 90 % on toimimaton SMNΔ7-proteiinia. Taudin vakavuus riippuu näiden *SMN2*-duplikaattien määrästä, sillä noin 10 % geenin tuotteesta on normaalista SMN-proteiinia, joka korvaa *SMN1*-geenin toiminnan puutetta (Bowerman ym., 2017).

*SMN2*-geenin mutaatio johtaa eksonin 7 puuttumiseen virheellisen silmukoinnin seurauksena, koska mutaatio vaikuttaa eksoniseen silmukoinnin säätelyjaksoon (Bowerman ym., 2017). Virheellisen silmukoinnin syksi on esitetty kaksi eri hypoteesia: eksonisen silmukoinnin hiljentäjän muodostuminen tai eksonisen silmukoinnin tehostajan menettäminen. Silmukoinnin hiljentäjäjakson muodostumishypoteesin mukaan mutaatio muodostaa kiinnittymiskohdan hnRNPA1-proteiinille, joka on silmukoinnin hiljentäjäproteiini, kun taas silmukoinnin tehostajajakson menetyshypoteesin mukaan mutaatio estää SR-perheen SF2/ASF-silmukointitehostajan kiinnityksen eksoniin (Ward ja Cooper, 2010).

## 6. Muut silmukoinnin sairaudet

### 6.1 Myotoninen dystrofia

Myotoninen dystrofia (*Dystrophia myotonica*, DM) on autosomaalisesti dominantisti periytyvä, lähinnä eurooppalaisväestön keskuudessa esiintyvä sairaus. Myotonisesta dystrofiasta on kaksi muotoa, DM1 ja DM2. Sairauden aiheuttaa molemmissa eri geeni. Sairauden aiheuttava mutaatio löytyi frekvenssillä 1:1100 suomalaisten verenluovuttajien näytteistä tehdyn tutkimuksessa, mutta näyttekoko tutkimuksessa oli suhteellisen pieni. Sairaus on harvinainen muissa kuin eurooppalaisissa populaatioissa. Perustajanvaikutuksen vuoksi joillakin alueilla mutaatio on rikastunut. Esimerkiksi Kanadassa koillisessa Quebecissä esiintyvyys on jopa 1:550. DM2-tyyppiä on tutkittu vähemmän, mutta Saksassa tehdyn tutkimuksen mukaan molempien muotojen esiintyvyys on sama. DM2-mutaatio ilmenee vain tietyllä haplotyypillä, joka viittaa yhtiseen alkuperään (Thornton, 2014).

DM1-tyyppin myotoninen dystrofia johtuu *DMPK*-geenin mutaatiosta. Geenissä on luonnostaan CTG-trinukleotiditojakoja 5-37, sairailla ainakin 50 ja joissain tapauksissa jopa yli 3000 toistoa. Vähäinen toistojen määrä korreloii oireiden vakavuuden kanssa: ihmisiillä, joilla on 50-70 toistoa, sairaus puhkeaa vasta myöhäisessä iässä. 70-90 toiston sairaus puhkeaa yleensä noin 40 ikävuoden jälkeen ja oireet ovat lieviä. Syntymästä alkavassa, oireiltaan vakavassa muodossa toistoa on yli 1000. DM2-tyypissä mutaatio on *ZNF9*-geenissä, jossa on CCTG-tetranukleotiditojakoja. Normaalista terveillä on 10-33 toistoa ja sairailla keskimäärin 5000 toistoa. DM1-tyypissä esiintyy usein antisipaatiota, eli toistojaksot laajenevat sukupolvelta toiselle, kun taas DM2-tyypissä korrelaatio toistojakson koon ja sairauden vakavuuden välillä ei ole niin vahva, joten antisipaatiota esiintyy vähemmän. DM1-tyyppin CTG-toisto on yleisesti ottaen hyvin epävakaa, joten toistojen määrä on erilainen yksilöiden sekä yksilön kudosten solujen välillä. Toistot pitenevät myös iän myötä, joka voi vaikuttaa oireiden etenemiseen ja puhkeamiskään (Thornton, 2014).

Kliniseltä kuvaltaan myotoninen dystrofia on hyvin monimuotoinen. DM1-tyyppin yleisin muoto alkaa 75 %:ssa tapauksista aikuisiässä 20-40 ikävuoden välillä. Ensimmäisenä oireena on myotonia. Lihasheikkous leviää yleensä distaalista osista proksimaalisiin ja vaikuttaa muun muassa käsivarsien, käden, kielen ja pään alueen lihaksiin. Syntymässä alkava muoto kattaa noin 15 % tapauksista. Sairastuneilla esiintyy hypotonialla sekä vaikeuksia syömisen ja hengittämisen. Suurin osa vastasyntyneistä tarvitsee apua ruokinnan ja hengityksen kanssa. Myöhemmin lapsuudessa ilmenee oppimisvaikeuksia ja esimerkiksi

autismia. Degeneratiiviset lihasoireet alkavat aikuisiässä ja ovat samankaltaisia kuin aikuisiässä alkavassa sairaudessa. Muita muotoja taudista ovat lapsuudessa ensimmäisen ikävuoden jälkeen alkava muoto, jossa ei ole näkyviä lihasoireita, vaan kognitiivisia ja käyttäytymisoireita kuten kehitysvammaisuus, tarkkavaisuushäiriöt ja ahdistus. DM1 aiheuttaa myös muita oireita kuten sydämen toimintahäiriötä, kaihia ja keskushermoston oireita, esimerkiksi liikaunisuutta päivisin ja kognitiivisia häiriötä. DM2 alkaa aikuisiässä ja ensioireena on myöskin myotonia. Muita oireita ovat hartia-lantiolihasten, kaulan ojentajien ja kynärvarren ojentajien dystrofia. DM1-tyyppiin verrattuna distaaliset osat, kuten sormien ojentajat, ilmentävät oireita vasta myöhäisemmässä vaiheessa. DM2-tyypistä ei ole syntymässä alkavaa muotaoa ja siinä on vähemmän pään alueen lihasten ja hengityslihasten oireita (Thornton, 2014).

Myotonisen dystrofian patogeneesi johtuu RNA:n toksisuudesta, joka syntyy toistojaksojen seurauksena. Sekä DM1- että DM2-tyyppisissä toistot johtavat lähetti-RNA:n kertymiseen tuman sisään, jonka seurauksena MBNL-perheen proteiinit, joilla on korkea affinitetti RNA:n CUG-toistoihin, kertyvät toistoihin kiinni. MBNL-perheen proteiinit ovat silmukointitekijöitä ja säätellevät RNA:n hajotusta ja kuljetusta. MBNL kertyy tuman sisään, jonka seurauksena tumassa ei ole tarpeeksi MBNL-tekijöitä silmukoinnin normaaliiin toimintaan. Tästä syystä mutaatiot aiheuttavat genominlaajuisesti häiriötä silmukoinissa. Sen lisäksi mutatoitunut *DMPK*-RNA aiheuttaa CUGBP1-silmukointitekijän hyperfosforylaatiota ja stabilisaatiota, sillä mutatoitunut *DMPK* aktivoi mahdollisesti signaalireittejä, joiden seurauksena CUGBP1 fosforyloidaan. CUGBP1-tekijän kertyminen tumaan vaikuttaa osaltaan silmukoinnin säätelyn virheellisyteen. Silmukointivirheet aiheuttavat osan taudin oireista: esimerkiksi lihaksille spesifin, kloridikanavaa koodaavan *ClC-1*-geenin virheellinen silmukointi johtaa heikentyneeseen kloridin johtavuuteen lihaksiin, joka aiheuttaa myotonian (Thornton, 2014).

## 6.2 Frontotemporaalinen dementia

Frontotemporaalisen dementian eli FTDP-17 aiheuttaa *tau*-geeni, joka koodaa neuronien mikrotubuleiden rakentumiseen ja vakauteen liittyvä tau-proteiinia. Tau-proteiineja esiintyy ihmisellä kuusi erilaista, joista kaikki ovat peräisin samasta geenistä ja jotka muokataan vaihtoehtoisen silmukoinnin avulla. *Tau*-geeni on noin 100 kiloemäsparia pitkä ja se sijaitsee kromosomissa 17q21.1. Geenissä on 16 eksonia. *Tau*-geenistä johtuvia sairauksia kutsutaan yleisesti tauopatioiksi. Esimerkiksi Alzheimerin tauti on ainakin osittain tauopatia, sillä kyseisessä taudissa tau-proteiinia kertyy aivoissa kasoihin, eli ns. neurofibrillaarisii

”takkuihin” proteiinin hyperfosforylaation seurauksena. Hyperfosforyloituneen tau-proteiinin kertymistä esiintyy myös muissa perinnöllisissä ja satunnaisissa neurodegeneratiivisissa sairauksissa (Liu ja Gong, 2008).

Frontotemporaalinen dementia aiheutuu *tau*-geenin eksonin 10 vaihtoehtoisesta silmukoinnista. *Tau*-geenin kaksi eri isoformia 3R ja 4R, joissa on kolme tai neljä mikrotubuleihin kiinnittyvää toistojaksoa, esiintyvät määrällisesti samassa suhteessa terveissä aivoissa. Geenissä esiintyy ainakin 39 tunnettua mutaatiota, jotka ovat joko missense-mutaatioita, deleetioita tai silmukointiin vaikuttavia mutaatioita. On huomionarvoista, että myös missense- ja deleetiomutaatiot voivat aiheuttaa virheitä silmukoinnissa, joiden tapauksessa sairaus ei johdu virheellisestä proteiinin toiminnasta aminohapposekvenssin mutaatioista huolimatta (Liu ja Gong, 2008). Esimerkiksi yksi mutaatioista on p.N279K-mutaatio, joka tehostaa eksonisen silmukointikohdan toimintaa, jolloin eksoni 4 säilyy ja tasapaino 3R- ja 4R-proteiinien välillä muuttuu lisääntyneen 4R-taun vuoksi (Cooper ym., 2009). Ei ole selvää miksi muuttunut suhdeluku isomuotojen välillä aiheuttaa taudin. Myös Alzheimerin taudissa suhdeluvun muutoksia proteiineissa on havaittu, mutta ei selvää korrelaatiota 3R-4R-suhteeseen ja taudin välillä (Liu ja Gong, 2008).

### 6.3 Menkesin tauti

Menkesin oireyhtymä on X-kromosomaalinen kupariaineenvaihdunnan häiriön aiheuttava tauti. Menkesin oireyhtymän esiintyvyys on välillä 1:40 000-350 000. Tauti johtuu mutaatioista *ATP7A*-geenissä, joka koodaa kuparia kuljettavaa ATPaasia. Kyseinen ATPaasi kuljettaa kuparia suolen enterosyyteistä elimistöön, jossa kupari kuljetetaan soluille. Kuparia tarvitaan monissa solun prosesseissa kuten mitokondrioiden soluhengityksessä, antioksidanteissa, välittääjääaineiden ja entsyyymiä synteesissä, sidekudoksen muodostumisessa ja peptidien amidaatiossa. Kuparin homeostasia on tarkkaa, sillä liiallinen kupari soluissa on toksista (de Bie ym., 2007).

Menkesin oireyhtymä aiheuttaa neurologisia oireita kuten kehitysvammaisuutta, kohtauksia, kasvun hidastumista, hypotermiaa ja hypopigmentaatiota sekä sairaudelle tyypilliset, teräsvillaa muistuttavat hiukset. Tauti puhkeaa 2-3 kuukauden iässä ja aiheuttaa kuoleman kolmanteen ikävuoteen mennessä. Taudista on myös lievämpi muoto, jota sairastavilla on lievemmät neurologiset oireet sekä pitempi elinkä. Taudin lievin muoto, occipital horn -oireyhtymä, ilmenee yleensä hyvin lievien neurologisten oireiden kautta, tai oireita ei ole ollenkaan (de Bie ym., 2007).

Silmukointi vaikuttaa Menkesin oireyhtymässä sen vakavuuteen. Taudissa on todettu yli 200 eri mutaatiota, joista deleetiot ja insertiot, missense-mutaatiot ja silmukointimutaatiot esiintyvät samassa suhteessa. On havaittu, että mutaatiot, jotka mahdollistavat osittaisen *ATP7A*-geenin toiminnan aiheuttavat lievemmän muodon taudista. Silmukointimutaatioita esiintyy enemmän occipital horn -oireyhtymässä, jossa silmukointimutaatioista huolimatta soluissa esiintyy myös normaalista silmukoitua *ATP7A*-lähetti-RNA:ta, jonka seurauksena tautimuoto on lievämpi (de Bie ym., 2007).

#### 6.4 *Retinitis pigmentosa*

*Retinitis pigmentosa* on periytyvä etenevä verkkokalvon rappemasairaus, joka aiheuttaa näkökyvyn heikentymistä. Tauti alkaa yönäön ja ääreisnäön heikentymisellä ja lopulta myös verkkokalvon keskikohta degeneroituu. Degeneraation aiheuttaa verkkokalvon epiteelin pigmentaatio, joka johtuu mutaatioista joita taudissa on todettu 45:ssä eri geenissä (Liu ja Zack, 2013).

*Retinitis pigmentosan* autosomaalisesti dominantin muodon aiheuttajia ovat mutaatiot silmukointitekijöitä koodaavissa geeneissä *PRPF31*, *PRPF8* ja *PRPF3*. *PRPF31* osallistuu silmukinnissa U4/U6/U5 tri-snRNP:n rekrytoimiseen spliseosomiin. Tässä geenissä on todettu kuusi erilaista mutaatiota, jotka aiheuttavat autosomaalisesti dominantin *retinitis pigmentosan*. *PRPF8*-geenin mutaatiot esiintyvät usein vaikeassa, varhaisessa iässä alkavassa muodossa taudista. *PRPF8* on osa U5-ribonukleoproteiinia, joka toimii 5'- ja 3'-silmukointikohtien sekä haarautumiskohdan interaktioissa ja sijaitsee spliseosomin katalyytisessä kohdassa. Tässä tekijässä on todettu seitsemän eri missense-mutaatiota. *PRPF3*-geenin mutaatiot koodaavat U4/U6-assosioitunutta silmukointitekijää, joka vaaditaan silmukointikoneiston kokoamiseen. Tästä geenistä on löydetty kolme eri missense-mutaatiota (Liu ja Zack, 2013).

Ei ole selvää mikä näissä kolmessa silmukointitekijässä aiheuttaa juuri verkkokalvolle spesifisen sairauden. Ehdotettuja malleja ovat haploinsuffisienssi, spliseosomin kokoamisen häiriöt, fotoreseptori-spesifisen silmukointitekijän interaktion häiriö tai mutaatioista johtuva toksisuus. On todettu, että mutaatiot vaikuttavat pienien ribonukleiniproteiinien ja spliseosomien muodostumiseen millä voi olla systeemisiä vaikutuksia, jotka ilmenevät tuntemattomasta syystä vain verkkokalvolla. Verkkokalvo on myös yksi metabolisesti aktiivisimmista kudoksista mikä saattaa tarkoittaa, että se vaatii myös enemmän silmukointitekijöitä suuren tarpeen vuoksi (Liu ja Zack, 2013).

## 7. Silmukoinnin mutaatiot syövässä

Silmukoinnin virheitä ja sen säätelyn muutoksia on pidetty tyypillisenä ominaisuutena useissa syövissä. Syy-seuraus-suhdetta syövän silmukointivirheissä on tosin usein vaikea todeta, sillä ei ole selvää vaikuttavatko silmukointivirheet karsinogeneesiin, vai johtuvatko ne yleisesti solun normaalilta toiminnalta ja geenisäätelystä (Douglas ja Wood, 2011). Syövät ovat geneettisiä sairauksia, jotka syntyvät pääasiallisesti soluun kertyvien mutaatioiden seurauksena. Noin 5 %:ssa syövistä altistava mutaatio on peritty, mutta suuri osa syövistä johtuu ympäristö- ja elämäntapatekijöistä eivätkä periydy jälkeläisille. Syövät ovat monoklonaisia, eli ne aiheutuvat yhdestä solusta, joka on saavuttanut mutaatioiden seurauksena kasvuedun (Aittomäki ym., 2016).

Syöpien kehittymiseen vaikuttavat geenit jaetaan kahteen luokkaan, kasvunrajoitegeeneihin ja onkogeeneihin. Kasvunrajoitegeenit ovat normaaleissa soluissa solusyklin negatiivisia säätelijöitä. Lisäksi myös epäsuorien kasvunrajoitegeenien kuten genomin eheyden ylläpitoon osallistuvien geenien mutaatiot voivat vaikuttaa syövän kehittymiseen. Onkogeenit ovat sen sijaan solun jakautumisen positiivisia säätelijöitä, eli ne edistävät normaaleissa soluissa solun jakautumista. Kasvunrajoitegeeneissä täytyy tapahtua toiminnan menetysmutaatio, kun taas onkogeeneissä täytyy tapahtua toiminnan voimistumismutaatio. On huomioitavaa, että yksittäinen mutaatio näissä geeneissä ei vielä riitä syövän kehittymiseen, vaan tähän vaaditaan yleensä useita mutaatioita (Strachan ym., 2015).

Syöpäsoluilla on useita tunnusmerkkejä; aktiiviset onkogeenit edistävät solun kasvua ja epäaktivoituneet kasvunrajoitegeenit taas eivät jarruta jakautumista. Lisäksi proapoptoottiset geenit ovat epäaktiivisia ja antiapoptoottiset onkogeenit aktiivisia. Solut voivat jakautua loputtomasti mihin liittyy usein telomeraasigeenin aktivoituminen. Angiogeneesiä edistävät geenit ovat myös usein aktiivisia ja solun kiinnitymistä säätelevät pintaproteiinit ovat mutatoituneet mikä mahdollistaa syövän metastaasin ja kasvun ympäröivässä kudoksessa. Lisäksi syöpäsolut muuttavat metabolismansa kasvulleen edulliseksi (Aittomäki ym., 2016).

Genominlaajuisessa tutkimuksessa syöpään assosioituneita silmukointivariantteja on löydetty noin 15 000 ja näitä variantteja esiintyy lähes jokaisessa syövän kehittymisen kannalta tärkeässä solun prosessissa: jakautumisessa, erikoistumisessa, solusyklin kontrollissa, metaboliassa, apoptoosissa, liikkuvuudessa ja angiogeneesissä (Zhang ja Manley,

2013). Syövissä silmukoinnin säätely on usein virheellistä. Normaaleihin soluihin verrattuna syövissä esiintyy enemmän ”taustamelua”, eli selvästi virheellisiä silmukointivariantteja, jotka sisältävät esimerkiksi ennenaikaisia stop-kodoneja. Myös silmukointivarianttien tyyppit syöpäsolujen välillä ovat heterogeenisempiä kuin normaalien solujen välillä. Usein virheellisesti silmukoituneissa geeneissä ei ole *cis*-vaikuttavia somaattisia mutaatioita samassa lokuksessa. Nämä ominaisuudet viittaavat siihen, että silmukointivirheet johtuvat usein muuttuneesta solun sisäisestä ympäristöstä ja virheellisestä silmukoinnin säätelystä (Sveen ym., 2015).

Vaihtoehtoista silmukointia syöpäsoluissa ei tapahdu määrällisesti enemmän kuin normaaleissa soluissa, mutta syövissä ilmenee eri silmukointivariantteja kuin normaaleissa soluissa (Cooper ym., 2009). Vaikka syöpäsoluissa silmukoinnin säätely on usein viallista, niissä ilmenee silmukointivariantteja, jotka ovat hyödyllisiä syövän kehittymiselle ja selviytymiselle. Esimerkiksi *VEGF*-geenin silmukointimuoto syöpäsoluissa on usein angiogeneesiä edistävä, kun taas terveissä soluissa sen silmukointimuoto estää angiogeneesiä. Geenissä on vaihtoehtoinen 3'-silmukointikohta, jonka avulla eri isoformit tuotetaan. Toinen esimerkki on *BRAF*-onkogeeni, joka koodaa MAPK/ERK-signalointireitin *BRAF*-kinaasia. Yli puolista pahanlaatuista melanoomista on löydetty tästä geenistä p.V600E-mutaatio, joka johtaa silmukoinnissa eksonien 4–8 puuttumiseen lopullisesta transkriptista. Lyhentynyt kinaasi ei enää sitoudu *BRAF*-inhibiittoreihin, joita käytetään lääkkeenä melanooman hoitoon, joten mutaatio aiheuttaa syöpäsoluissa resistenssin kyseisille lääkkeille (Sveen ym., 2015; Zhang ja Manley, 2013). Syöpäsolut käyttävät siis samoja vaihtoehtoisen silmukoinnin mekanismeja, joita normaaleissa soluissa käytetään tuottamaan niille edullisia silmukointimuotoja.

Silmukoinnin säätelyyyn osallistuvien tehostajien ja hiljentäjien mutaatiot voivat myös vaikuttaa syövän syntyn. Esimerkiksi *SRSF1*, joka on SR-perheen proteiini, eli introniin ja eksoniin silmukoinnin tehostajajaksoihin kiinnittyvä proteiini, on useissa syövissä yliexpressioitunut, joka viittaa siihen, että kyseinen säätelijä on onkogeeni. *SRSF1*:n yliexpressio johtaa *BIN1*-geenin kasvunrajoiteaktiivisuuden estymiseen (Zhang ja Manley, 2013). Silmukointitekijän yliexpressio vaikuttaa myös useisiin muihin syöpään assosioituneihin geeneihin, jotka silmukointitekijöiden vaikutukset ovat laaja-alaisia.

Toinen esimerkki silmukoinnin säätelijöiden vaikutuksesta on hnRNP-perheen proteiini A2. Normaalisti hnRNP-perheen proteiinit kiinnittyyvät introniin ja eksoniin

silmukoinnin hiljentäjäjaksoihin. HnRNP A2:n yliexpressio johtaa *RON*-geenin eksonin 11 poistamiseen. *RON* koodaa tyrosiinikinaasireseptoria, joka normaalilassa osallistuu solun liikkuvuuden säätelyyn. ΔRON-silmukointimuoto, josta eksoni 11 puuttuu, on aktiivinen myös ilman ligandia, jolloin mutaatio vaikuttaa syövän liikkuvuuteen (Zhang ja Manley, 2013).

Myös keskeissä silmukointikoneistoja säätelvissä tekijöissä voi olla mutaatioita. Syövissä useimmin mutatoituneet silmukointitekijät SF3B1, U2AF1, SRSF2 ja ZRSR2 osallistuvat intronin 3'-päissä silmukointikohdan tunnistamiseen. Mutaatiot näissä tekijöissä johtavat usein intronin 3'-pään tunnistuksen virheisiin, jolloin introneita jää lopullisiin transkripteihin. Introneissa on usein stop-kodoneita, jotka aiheuttavat nonsense-välitteistä lähetti-RNA:n hajottamista tai lukukehyksen muutoksia (Zhang ja Manley, 2013).

## 8. Hoitomuodot

### 8.1 Antisense-oligonukleotidit

Antisense-oligonukleotidit ovat lyhyitä synteettisiä DNA- tai RNA-molekyylejä, jotka vaikuttavat niille komplementaarisiin DNA- tai RNA-jaksoihin. Antisense-oligonukleotideja käytetään silmukointivirheistä johtuvien sairauksien hoitoon, sillä ne voivat kiinnittää 5'- ja 3'-silmukointikohtiin ja estää silmukoinnin kyseissä kohdissa. Ne voivat myös kiinnittää silmukoinnin hiljentäjä- tai tehostajajaksoihin ja estää silmukoinnin säätelijöiden kiinnityksen RNA:han. Antisense-oligonukleotideja voidaan käyttää myös edistämään RNA:n ribonukleaasi H-välitteistä hajottamista tai estämään haitallisia interaktioita proteiinien ja patogeenisen RNA:n välillä (Ward ja Cooper, 2010). Oligonukleotidit suunnitellaan itsessään välttämään RNAasi H-välitteistä hajottamista, jonka takia niiden sokeri-fosfaattirankaa muokataan. Näitä muokkauksia ovat esimerkiksi 2'-0-metyylitioatti, nukleiinihappolukot, riboosin korvaus morfoliinirenkaalla ja fosfodiesterisidoksen korvaaminen fosfodiamidaattisidoksella sekä koko sokeri-fosfaattirangan korvaaminen toistuvalla aminoetyyliglyiinirangalla ja asetyyllillä, johon emäkset kiinnittyvät (Douglas ja Wood, 2011).

Spinaalisen lihasatrofian hoitoon on kehitetty antisense-oligonukleotidilääke nusinerseeni, joka on hyväksytty Euroopan unionissa myyntiin kesäkuussa 2017. Nusinerseeni on antisense-oligonukleotidi, joka kiinnittyy *SMN2*-geenin introniin 7 ja inhiboi intronista silmukoinnin hiljentäjäjaksoa. Hiljentäjäjakson inhiboiminen johtaa eksonin 7 säilymiseen *SMN2* lähetti-RNA:ssa, jonka seurausena *SMN2*-geenin avulla pystytään

tuottamaan toimivaa SMN-proteiinia, vaikka *SMN1*-geeni ei toimi (Scotti ja Swanson, 2015). Nusinerseenin avulla saadut tulokset ovat olleet hyvin lupaavia: lääke pysäyttää sairauden etenemisen ja joissain tapauksissa myös palauttaa lihasten toimintakykyä. Nusinerseenin haittamuolena on sen invasiivinen, intratekaalinen antotapa. Sen lisäksi keskushermostollinen antotapa ei ota huomioon sitä, että myös keskushermoston ulkopuolisissa kudoksissa SMN-ekspression puute voi vaikuttaa taudinkuvaan. SMN-proteiinin toiminta muualla kuin hermostossa ei ole selvää, mutta taudin on todettu vaikuttavan myös muihin kuin keskushermoston kudoksiin (Bowerman ym., 2017).

Myös Duchennen lihasdystrofiaan on kehitetty antisense-olignukleotidilääkkeitä kuten eteplirseeni. Lääkkeet toimivat vaikuttamalla dystrofiinigeniin, joka on suuri, 79 eksonin geeni. Suurin osa Duchennen lihasdystrofian aiheuttavista mutaatioista on lukukehyksen muutoksen aiheuttavia deleetioita, jotka johtavat vakavaan tautifenotyyppiin. Sairauden lievemmässä muodossa, Beckerin lihasdystrofiassa, mutaatiot säilyttävät lukukehyksen ennallaan; deleetion koolla ei ole suurta merkitystä, kunhan proteiinin N- ja C-terminaaliset domeenit pysyvät eheänä. Suurin osa kliinisissä kokeissa käytetyistä antisense-oligonukleotideista kiinnittyy eksonin 51 silmukointikohtaan, joka voi palauttaa lukukehyksen noin 13 %:lla tautia sairastavista. Hoidon tavoitteena on palauttaa lukukehys, jolloin Duchennen lihasdystrofiaa sairastavien dystrofinin osittainen toimintakyky palautuisi kuten Beckerin lihasdystrofiassa (Koo ja Wood, 2013).

Myös myotonisen dystrofian hoitoon on kehitetty antisense-oligonukleotidilääkkeitä. Sairauteen kehitetyt CAG-toistoja sisältävät oligonukleotidit hybridisoituvat CUG-toistoihin ja estävät RNA-proteiini-kompleksien muodostumisen toistojaksoihin. Oligonukleotidit estävät RNA:n toksisuuden ja vapauttavat MBNL1-proteiinin (Ward ja Cooper, 2010). Muita kohteita antisense-oligonukleotiditerapialle ovat  $\beta$ -talassemia sekä kystinen fibroosi, joissa molemmissa oligonukleotideja käytetään estämään kryptisen silmukointikohdan muodostuminen.

## 8.2 Pienet molekyylit

Duchennen lihasdystrofian hoitoon käytetty antisense-oligonukleotidi pystyy saamaan aikaiseksi vain noin 2-16 % normaalista dystrofiinin ekspressiotasosta. Sen vuoksi on kehitetty lääkkeitä, jotka tehostaisivat antisense-oligonukleotidien toimintaa. Duchennen lihasdystrofiassa dantroleeni- ja ryanodiini-lääkkeitä on käytetty kliinisissä kokeissa, joissa

niiden käyttö tehosti kymmenkertaisesti antisense-oligonukleotidin toimintaa (Scotti ja Swanson, 2015).

Spinaalisen lihasatrofian hoitoon on löydetty molekyylejä, jotka tehostavat antisense-oligonukleotidien toimintaa. Tutkimuksissa on käytetty SMNC1-, SMNC2- ja SMNC3-molekyylejä, jotka hiirillä SMN2-reportteriminigeenissä tehostivat eksonin 7 säilymistä. RNA-sekvensointi on osoittanut, että nämä pienet molekyylit eivät aiheuta transkriptomin laajuisia muutoksia (Scotti ja Swanson, 2015). Myös myotonisen dystrofian hoidossa on käytetty pieniä molekyylejä, esimerkiksi pentamidiinia, jotka estäävät MBNL1- ja CUGBP1-silmukointitekijöiden kertymisen CUG-toistoihin (Douglas ja Wood, 2011).

Pieniä molekyylejä voidaan käyttää myös suoraan vaihtoehtoisen silmukoinnin säätelyn muokkaamiseen. Yksi keinoista on SR-proteiinien fosforylaatio, joka tehostaa eksonien tunnistusta. SR-proteiineja fosforyloivien kinaasien toimintaa inhiboimalla voidaan muokata silmukointikohtien tunnistusta (Douglas ja Wood, 2011). Esimerkiksi GSK3-kinaasi fosforyloii SR-proteiineja, jotka säätelevät tau-eksoni 10 säilyttämistä *MAPT*-geenissä, joka voi estää frontotemporaaliseen dementiaan sairastumista (Ward ja Cooper, 2010). Ongelmana silmukoinnin säätelijöiden muokkaamisessa on se, että samat silmukointitekijät vaikuttavat useisiin geeneihin, joten seurauksena voi olla haitallisia kohteen ulkopuolisia vaikutuksia. Lisäksi myös kinaaseilla on useita eri rooleja solun sisäissä toiminnoissa, joten kinaasien muokkaaminen voi vaikuttaa muuhunkin kuin silmukointiin (Douglas ja Wood, 2011).

## 9. Johtopäätökset

Yli 90 % ihmisen geeneistä silmukoidaan. Mekanismin yleisyyden vuoksi silmukoinnin mutaatiot ovat hyvin edustettuina erilaisissa sekä yksi- että monigeenisissä sairauksissa, jotka voivat olla sekä perinnöllisiä että somaattisia. Yleisin silmukointimutaatio johtuu *cis*-vaikuttavista 5'- tai 3'-silmukointikohtien mutaatiosta, kuten familiaalisessa dysautonomiassa, joka vaikuttaa intronien silmukointikohtien tunnistamiseen. Silmukointiin vaikuttavia mutaatiota voi löytyä kuitenkin sairauksista lähes koko geenin mitalta, sekä introneista että eksoneista. Korrelaatio silmukointivirheen ja sairauden välillä voi olla hyvin suoraviivainen niin kuin familiaalisessa dysautonomiassa, jossa yksi silmukointiin vaikuttava pistemutaatio aiheuttaa sairauden. Silmukoinnin mutaatiot voivat olla myös hyvin laaja-alaisia, kuten esimerkiksi syövissä, joissa silmukointivariantit ja niiden lukusuhteet ovat

muuttuneet verrattuna normaalieihin soluihin. Silmukointivirhe voi siis aiheuttaa sairauden tai vaikuttaa sen puhkeamiseen tai oireiden vakavuuteen.

Silmukoinnin mutaatiot voivat johtua myös silmukoinnin säätelyn häiriöistä: säätelyyn osallistuvat *trans*-vaikuttavat silmukointitekijät säätelevät silmukointia kiinnittymällä *cis*-vaikuttaviin säätelykohtiin silmukointikohtien läheisyydessä introneissa tai eksoneissa. Nämä säätelykohdat joko tehostavat tai hiljentävät silmukointia niiden viereisissä silmukointikohdissa. Säätely lisää kompleksisuutta silmukointisairauksien tarkastelussa, sillä säätelykohdat voivat vaikuttaa sairauden tyyppiin. Esimerkiksi kystisessä fibroosissa c.1525-1G>A-mutaation eksonin 10 kryptisten silmukointikohtien läheiset eksoniset tehostajakohdat vaikuttavat kyseisten silmukointikohtien käyttöön, vaikka niiden konsensussekvenssi ei ole voimakkain (Ramalho ym., 2003). Myös silmukoinnin säätelyproteiinien mutatoituminen voi aiheuttaa silmukointisairauden esimerkiksi *Retinitis pigmentosa* tapauksessa, vaikka *cis*-vaikuttavia mutaatioita taudin aiheuttavista geeneistä ei löytyisikään.

Monimuotoisuus silmukoinnin sairausmekanismeissa on valtavaa, eikä tämän työn laajuudessa voi esitellä kuin harvoja esimerkkejä mekanismeista, joilla silmukointimutaatiot aiheuttavat sairauksia. On hyvin todennäköistä, että silmukoinnin vaikutuksista sairauksiin tiedetään vasta pieni osa, ja tästä voivat monimutkaistaa edelleen havainnot esimerkiksi silmukoinnin säätelystä sekä epigeneettisellä tasolla (Luco ym., 2011) että pitkien eikoodaavien RNA-transkriptien avulla (Scotti ja Swanson, 2015). Tärkeitä keinoja tiedon lisäämisessä voisivat olla kattavat tietokannat silmukointimutaatioista sekä silmukointikoodin kehittäminen, eli tieto silmukointiin vaikuttavasta säätelyverkostosta ja sen vaikutuksesta silmukointiin. Koodin avulla pystytäisiin ennustamaan esimerkiksi tiettyjen silmukointitekijöiden yhteisvaikutus silmukointikoneiston toimintaan. Variaatio erilaisten sairauksia aiheuttavien mekanismien välillä on kuitenkin suurta, joten silmukointikoodinkaan avulla ei välttämättä pystytäsi ennustamaan esimerkiksi frontotemporaalisen dementian kehittymistä.

Ymmärrys silmukoinnin mekanismeista ja sairauksista on kuitenkin lisääntynyt ja varsinkin antisense-oligonukleotidilääkkeet ovat viime vuosina osoittautuneet lupaavaksi terapiamuodoksi. Tulevaisuudessa yksilöllistetyn lääketieteen kehityessä ilmenee luultavasti lisää hoitovaihtoehtoja myös monimutkaisempiin silmukoinnin sairauksiin, kuten kystiseen fibroosiin, joissa tautia aiheuttavien mutaatioiden kirjo on hyvin monipuolinens yksilöiden välillä. Myös geeniterapian avulla pystytäisiin ratkomaan silmukoinnin aiheuttamia

sairauksia korjaamalla mutaatioita jo DNA-sekvenssissä. Yksittäistä kaikenkattavaa hoitoa silmukoinnin sairauksiin on kuitenkaan tuskin koskaan syntymässä, sillä monimuotoisuus eri tautien välillä on liian suurta ja niiden vaikutukset eri kudoksissa asettavat todennäköisesti isoja haasteita lääkkeen tehoamiselle luotettavasti kaikkiin kudoksiin.

## 10. Lähteet

- Aittomäki, K., Moilanen, J., ja Perola, M. (2016). Lääketieteellinen genetiikka (Helsinki: Duodecim).
- Anderson, S.L., Coli, R., Daly, I.W., Kichula, E.A., Rork, M.J., Volpi, S.A., Ekstein, J., ja Rubin, B.Y. (2001). Familial dysautonomia is caused by mutations of the IKAP gene. *Am. J. Hum. Genet.* *68*, 753–758.
- de Bie, P., Muller, P., Wijmenga, C., ja Klomp, L.W.J. (2007). Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J. Med. Genet.* *44*, 673–688.
- Bowerman, M., Becker, C.G., Yáñez-Muñoz, R.J., Ning, K., Wood, M.J.A., Gillingwater, T.H., ja Talbot, K. (2017). Therapeutic strategies for spinal muscular atrophy: SMN and beyond. *Dis Model. Mech* *10*, 943.
- Cooper, T.A., Wan, L., ja Dreyfuss, G. (2009). RNA and Disease. *Cell* *136*, 777–793.
- Douglas, A.G.L., ja Wood, M.J.A. (2011). RNA splicing: disease and therapy. *Brief. Funct. Genomics* *10*, 151–164.
- Eriksson, M., Brown, W.T., Gordon, L.B., Glynn, M.W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M.R., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Berglund, P., ym. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature* *423*, 293.
- Kim, E., Goren, A., ja Ast, G. (2008). Alternative splicing: current perspectives. *BioEssays* *30*, 38–47.
- Koo, T., ja Wood, M.J. (2013). Clinical Trials Using Antisense Oligonucleotides in Duchenne Muscular Dystrophy. *Hum. Gene Ther.* *24*, 479–488.
- Krawczak, M., Thomas, N.S.T., Hundrieser, B., Mort, M., Wittig, M., Hampe, J., ja Cooper, D.N. (2007). Single base-pair substitutions in exon–intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Hum. Mutat.* *28*, 150–158.
- Liu, F., ja Gong, C.-X. (2008). Tau exon 10 alternative splicing and tauopathies. *Mol. Neurodegener.* *3*, 8.
- Liu, M.M., ja Zack, D.J. (2013). Alternative splicing and retinal degeneration. *Clin. Genet.* *84*, 142–149.

- López-Bigas, N., Audit, B., Ouzounis, C., Parra, G., ja Guigó, R. (2005). Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Lett.* *579*, 1900–1903.
- Luco, R.F., Allo, M., Schor, I.E., Kornblihtt, A.R., ja Misteli, T. (2011). Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* *144*, 16–26.
- Matera, A.G., ja Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 108–121.
- Pollex, R.L., ja Hegele, R.A. (2004). Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Clin. Genet.* *66*, 375–381.
- Rafeeq, M.M., ja Murad, H.A.S. (2017). Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *J. Transl. Med.* *15*, 84.
- Ramalho, A.S., Beck, S., Penque, D., Gonska, T., Seydewitz, H.H., Mall, M., ja Amaral, M.D. (2003). Transcript analysis of the cystic fibrosis splicing mutation 1525-1G>A shows use of multiple alternative splicing sites and suggests a putative role of exonic splicing enhancers. *J. Med. Genet.* *40*, e88.
- Rubin, B.Y., ja Anderson, S.L. (2008). The Molecular Basis of Familial Dysautonomia: Overview, New Discoveries and Implications for Directed Therapies. *NeuroMolecular Med.* *10*, 148–156.
- Sanz, D.J., Hollywood, J.A., Scallan, M.F., ja Harrison, P.T. (2017). Cas9/gRNA targeted excision of cystic fibrosis-causing deep-intronic splicing mutations restores normal splicing of CFTR mRNA. *PLoS One* *12*, e0184009.
- Sariola, H., Frilander, M., Heino, T., Jernvall, J., Partanen, J., Sainio, K., Salminen, M., Thesleff, I., ja Wartiovaara, K. (2015). *Kehitysbiologia: solusta yksilöksi* (Helsinki: Duodecim).
- Scotti, M.M., ja Swanson, M.S. (2015). RNA mis-splicing in disease. *Nat. Rev. Genet.* *17*, 19.
- Strachan, T., Chinnery, P.F., ja Goodship, J. (2015). *Genetics and genomics in medicine* (New York, NY ; Abingdon, UK: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC).
- Sveen, A., Kilpinen, S., Ruusulehto, A., Lothe, R.A., ja Skotheim, R.I. (2015). Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene* *35*, 2413.

- Tazi, J., Bakkour, N., ja Stamm, S. (2009). Alternative splicing and disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1792*, 14–26.
- Thornton, C.A. (2014). Myotonic dystrophy. *Neurol. Clin.* *32*, 705–719.
- Turunen, J.J., Niemelä H., E., Verma, B., ja Frilander, M.J. (2013). The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley Interdiscip. Rev.* *4*, 61–76.
- Ward, A.J., ja Cooper, T.A. (2010). The Pathobiology of Splicing. *J. Pathol.* *220*, 152–163.
- Will, C.L., ja Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a003707.
- Wimmer, K., Roca, X., Beiglbock, H., Callens, T., Etzler, J., Rao, A.R., Krainer, A.R., Fonatsch, C., ja Messiaen, L. (2007). Extensive in silico analysis of NF1 splicing defects uncovers determinants for splicing outcome upon 5' splice-site disruption. *Hum. Mutat.* *28*, 599–612.
- Zhang, J., ja Manley, J.L. (2013). Misregulation of pre-mRNA alternative splicing in cancer. *Cancer Discov.* *3*, 1228–1237.