Tampereen yliopisto

Reetta-Liina Skyttä

HARVINAISET GEENIVARIANTIT AUTISMISSA JA NIIDEN VAIKUTUS MIKROGLIOIHIN

Kandidaatintutkielma
Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Tarkastaja: Tuomo Mäki-Marttunen
Huhtikuu 2025

TIIVISTELMÄ

Reetta-Liina Skyttä: Harvinaiset geenivariantit autismissa ja niiden vaikutus mikroglioihin
Kanditaatintutkielma
Tampereen yliopisto
Bioteknologian tutkinto-ohjelma
Huhtikuu 2025

Tämä kandidaatin tutkielma on kirjallisuuskatsaus, jossa tarkastellaan kolmen autismissa ilmenevän harvinaisen geenivariantin vaikutuksia mikroglian toimintaan. Työn tavoitteena on selvittää näiden geenivarianttien vaikutuksia mikroglian toimintaan sekä häiriintyneen toiminnan vaikutuksia neurovaskulaariseen yksikköön, ja tarkastellaan, miten tämä kokonaisuus ilmenee autismin oirekuvassa.

Autismi on neurobiologinen kehityshäiriö, jonka syntyyn vaikuttavat monet eri tekijät. Tässä työssä keskityttiin harvinaisiin geenivariantteihin, joilla on potilastutkimuksissa ja eläinkokeissa osoitettu olevan yhteys autismiin. Tutkielmassa käsiteltiin PTEN-, CX3CR1- ja NRXN1-geenin mutaatioita sekä niiden vaikutuksia solu- sekä käyttäytymistasolla. Tulosten perusteella tarkasteltujen mutaatioiden havaittiin vaikuttavan mikroglian solusignalointiin sekä toiminnallisten hermoverkkojen muodostumiseen. Mutaatioiden vaikutusta yksilön käyttäytymiseen tarkasteltiin hyödyntäen eläinkokeiden avulla tehtyjä tutkimuksia, ja tulokset olivat linjassa potilastutkimuksista saatujen havaintojen kanssa. Tarkasteltujen geenivarianttien todettiin vaikuttavan solusignalointiin poikkeavalla tavalla. Merkittäviä käyttäytymiseroja havaittiin jo yhden geenimutaation seurauksena verrattuna neurotyypillisiin yksilöihin.

Nämä havainnot tukevat geneettisten tekijöiden merkitystä autismissa sekä korostavat autismikirjon moninaisuutta. Tulevaisuudessa autismin geenitutkimuksessa on oleellista keskittyä harvinaisten sekä yleisten geenivarianttien yhteisvaikutukseen. Tämänhetkinen tutkimustieto perustuu suurelta osin eläinkokeisiin, joten geneettisten eroavaisuuksien vuoksi potilastutkimusten merkitys korostuu. Tulevaisuudessa tarkempi geneettinen tutkimus voi mahdollistaa kohdennetun lääkehoidon kehittämisen, autismin yhteyksien selvittämisen muihin sairauksiin ja kehityshäiriöihin sekä diagnostisten menetelmien, kuten geenitutkimuksen ja biomarkkereiden, hyödyntämisen tarkemman diagnoosin saamiseksi.

Avainsanat: Autismi, mikroglia, harvinaiset geenivariantit

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

TEKOÄLYN KÄYTTÖ OPINNÄYTTEESSÄ

Opinnäytteessäni on käytetty tekoälysovelluksia:

☐ Ei
☒ Kyllä

Ilmoitukseni mukaan olen käyttänyt opinnäytteessäni tutkielmaprosessin aikana seuraavia tekoälysovelluksia:

Tekoälysovellusten nimet ja versiot: Scopus AI, ChatGPT 4.0 (ilmaisversio)

Käyttötarkoitus:
Scopus AI: Käytetty lähdemateriaalin hankintaan.

ChatGPT 4.0: Käytetty kieliopin tarkistukseen sekä lähteiden käännöstyöhön englannista suomeksi.

Osiot, joissa tekoälyä on käytetty: Käytetty lähdemateriaalin hankinnassa ja kielentarkistustyökaluna sekä kääntäjänä läpi työn.

Olen tietoinen siitä, että olen täysin vastuussa koko opinnäytteeni sisällöstä, mukaan lukien osat, joissa on hyödynnetty tekoälyä, ja hyväksyn vastuun mahdollisista eettisten ohjeiden rikkomuksista.

ALKUSANAT

Tämä kandidaatintutkielma on tehty osana bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan opintoja. Työni pohjautuu kiinnostukseeni aihetta kohtaan sekä haluun rakentaa teoriapohjaa, joka voi tukea tulevaisuuden jatkotutkimusta mahdollisten hoitomuotojen ja diagnostiikan kehittämisessä.

Haluan kiittää lämpimästi koko Laskennallisen neurotieteen tutkimusryhmää siitä, kuinka minut on otettu osaksi ryhmää ja kuinka työtäni on arvostettu alusta lähtien. Erityiskiitokset ohjaajilleni Tuomo Mäki-Marttuselle sekä Laura Ketolle laadukkaasta ja kannustavasta ohjauksesta. Suuri kiitos myös läheisilleni tuestanne tämän prosessin aikana!

Tampereella, 09.04.2025

Reetta-Liina Skyttä

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO 1
2. MIKROGLIAT 3
2.1 Mikrogliojen toiminta ja rakenne 3
2.2 Solusignalointi 5
3. MIKROGLIOJEN AUTISMISSA ILMENEVÄT HARVINAISET GEENIVARIANTIT 10
3.1 CX3CR1-geeni 10
3.2 PTEN-geeni 11
3.3 NRXN1-geeni 12
4. GEENIVIRHEIDEN VAIKUTUS MIKROGLIOJEN JA MUIDEN SOLUJEN YHTEISTOIMINTAAN 13
4.1 Mikrogliat ja astrosyytit 14
4.2 Mikrogliat ja neuronit 15
5. GEENIVIRHEIDEN ILMENTYMINEN AUTISMIN OIREKUVASSA 18
6. YHTEENVETO 21
LÄHTEET 22

LYHENTEET

ASD	Autismikirjon häiriö
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
BDNF	Aivoperäinen neurotrofinen kasvutekijä
CNV	Kopiolukumuutokset
CX3CL1	Fraktalkiini
EAAT1	Eksitatorinen aminohappokuljettaja 1
ERK 1/2	Solunulkoinen signaaliin reagoiva kinaasi 1/2
GFAP	Gliaalinen fibrillaarinen hapan proteiini
GS	Glutamiinisyntetaasi
IL-1β	Interleukiini-1-beta
IL-6	Interleukiini-6
IL-10	Interleukiini-10
JAK	Janus-kinaasi
JNK	C-Jun N-terminaalinen kinaasi
LPS	Liposakkaridi
M1	Proinflammatorinen eli tulehdusta edistävä fenotyyppi
M2	Anti-inflammatorinen eli tulehdusta hillitsevä fenotyyppi
MCP-1	Monosyyttien kemotaktinen proteiini-1
mTOR	Nisäkkään rapamysiinin kohdeproteiini
NLR	Nukleotidien sitoutumisen oligomeeritason domeenin kaltaiset reseptorit
NRXN1	Neureksiini-1
NO	Typpioksidi
PI3K	Fosfatidyyli-inositoli-3-kinaasi
PRR	Kuviotunnistusreseptorit
RLR	Retinoiinihappo-indusoituvan geenin 1 kaltaiset reseptorit
STAT	Transkription aktivoija -proteiini
TGF-β	Transformoiva kasvutekijä beeta
TLR	Tollin kaltaiset reseptorit
TM1	Transmembraanialue 1
TNF-α	Tuumorinekroositekijä alfa
WHO	Maailman terveysjärjestö

.

1. JOHDANTO

Autismikirjon häiriö (autism spectrum disorder, ASD) on monimutkainen neurobiologinen kehityshäiriö, joka ilmenee jo varhaislapsuudessa esimerkiksi sosiaalisen vuorovaikutuksen ja kommunikaation vaikeuksina, erityisinä mielenkiinnonkohteina sekä rajoittuneina ja toistuvina käytösmalleina. Maailman terveysjärjestön (WHO) mukaan autismi koskee maailmanlaajuisesti noin kahta prosenttia lapsista. Autismiin liittyy usein käyttäytymisen ja psykiatristen häiriöiden, kuten tunteiden säätelyn vaikeuksia, sekä itsetuhoisten ajatusten ja muiden sairauksien esiintymisen lisääntynyt riski. Autismin diagnosointi perustuu yksilön käyttäytymisen havainnointiin. Hoitomuodot vaihtelevat yksilöllisesti ja voivat sisältää käyttäytymisterapiaa, puheterapiaa sekä lääkehoitoa. Diagnosoinnin helpottamiseksi ja oikeanlaisen hoitomuodon valitsemiseksi on tärkeää ymmärtää autismikirjon moninaisuus sekä geneettisen taustan vaikutus yksilön käytökseen paremmin. [1]

Autismin geneettiseen ja epigeneettiseen taustaan liittyy lukuisia tekijöitä, kuten kromosomi- ja geenimutaatiot, kopiomäärän vaihtelut (CNV) ja ympäristötekijät. Riippuen geneettisestä taustasta autismin oirekuva voi vaihdella yksilöiden välillä huomattavasti. [1] Geneettinen variantti määritellään harvinaiseksi, jos sen alleelitaajuus, eli esiintyvyys väestössä, on alle 1 % ja yleiseksi, jos sen alleelitaajuus ylittää 1 %. Harvinaiset geneettiset variantit voivat aiheuttaa merkittäviä muutoksia geenin toiminnassa ja olla suorassa yhteydessä sairauden tai kehityshäiriön syntyyn. Yksittäisten yleisten varianttien vaikutus autismialttiuteen on hyvin pieni, mutta yhteisvaikutus voi olla merkittävä. Tutkimukset osoittavat, että suurin osa autismin geneettisistä riskeistä on seurausta yleisistä varianteista, mutta harvinaisilla varianteilla on merkittävä vaikutus alttiuteen yksilötasolla. Meta-analyysien mukaan yleiset variantit selittävät noin 41 % ja harvinaiset variantit enintään 17 % autismin geneettisestä vaihtelusta. [2] Tässä työssä keskitytään erityisesti kolmen harvinaisen geenivariantin vaikutusiin mikrogliojen toimintaan ja niiden mahdolliseen yhteyteen autismin oirekuvaan.

Autismiin liittyy useita monimutkaisia neurologisia poikkeamia, jotka voivat vaikuttaa aivojen rakenteeseen ja toimintaan solutasolla. [1] Mikrogliat ovat dynaamisia keskushermoston soluja, joiden toiminta on välttämätöntä hermoston oikeanlaiselle kehitykselle, rakenteelle ja toiminnalle. Tärkeimpiä tehtäviä ovat osallistuminen synaptiseen karsintaan, keskushermoston immuunipuolustukseen, kehitykseen sekä homeostaasin ylläpitoon. Mikrogliassa ilmenevät toimintahäiriöt voivat johtaa vakaviin kehityshäiriöihin, joita

on osoitettu sekä *in vivo* - että *in vitro* -mallinnuksen kautta. Vaikka mikrogliojen tarkkaa roolia autismin synnyssä ei vielä tarkkaan ymmärretä, on yhä enemmän tutkimusnäyttöä siitä, että mikrogliojen toimintahäiriöillä saattaa olla merkittävä vaikutus autismikirjon häiriön kehittymisessä. Lisätutkimuksia tarvitaan, jotta mikrogliasolujen rooli autismin synnyssä ymmärretään paremmin. [3]

Tämän kanditaatintutkielman tarkoituksena on tarkastella harvinaisten geneettisten virheiden vaikutuksia mikrogliojen morfologiaan sekä niiden signalointikykyyn ja toiminnallisiin häiriöihin. Erityishuomio kiinnitetään siihen, miten mikrogliojen poikkeavuudet heijastuvat muiden aivosolutyyppien, kuten neuronien ja astrosyyttien, toimintaan. Lisäksi tarkastellaan, millä tavoin nämä häiriöt ovat yhteydessä autismikirjon piirteisiin ja niiden ilmenemiseen. Tutkielman tavoitteena on tarjota kattavampi geneettisen ja neurologisen perustan ymmärrys autismissa, mikä voi tulevaisuudessa johtaa nopeampaan, tehokkaampaan ja yksilöllisempään diagnosointiin sekä hoitomuotoihin.

2. MIKROGLIAT

2.1 Mikrogliojen toiminta ja rakenne

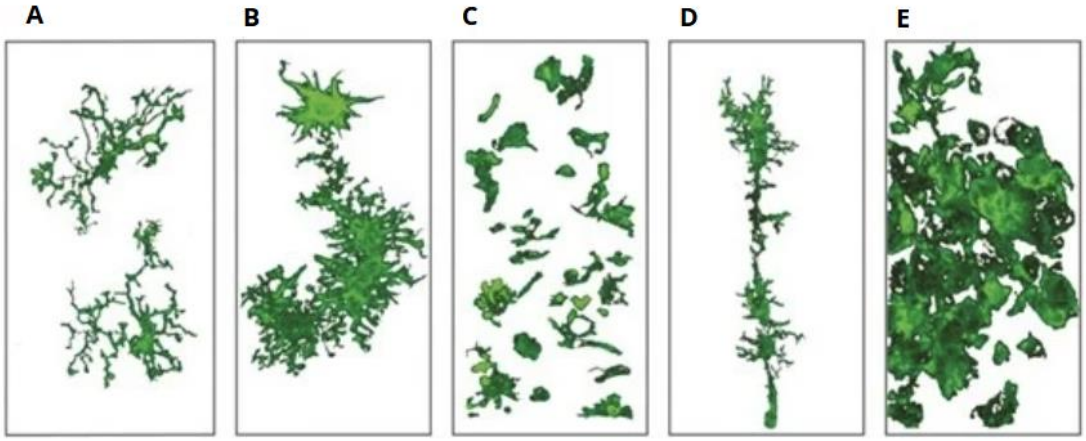
Mikrogliat ovat pysyvästi keskushermostossa sijaitsevia myeloidisia syöjäsoluja ja muodostavat 5-15 % aivojen kokonaissoluista [4], [5]. Toisin kuin neuronit, astrosyytit ja oligodendrosyytit, jotka ovat neuroektodermistä peräisin, mikroglia on hematopoieettista alkuperää ja kuuluu myeloidisiin soluihin [5]. Mikrogliat kehittyvät alkion ruskuaispussista varhaisessa alkionkehitysvaiheessa ennen muiden gliasolujen, kuten astrosyyttien ja oligodendrosyyttien, ilmaantumista. Transkriptionaalinen tekijä PU.1 ohjaa mikrogliojen kehittymistä, ja sen ilmentyminen varhaisessa alkionkehitysvaiheessa saa mikrogliat erottumaan muista kudosmakrofageista. Mikroglian esiasteet, eli erikoistuneet ruskuaispussin makrofagit, vaeltavat kehittyvään keskushermostoon, kun sydän- ja verenkiertoelimistö on kehittynyt, mutta ennen veri-aivoesteen sulkeutumista. Mikrogliojen varhainen ilmaantuminen on keskeistä aivojen oikeanlaiselle kehittymiselle ja hermoverkkojen muodostumiselle, ja niillä on monia tärkeitä tehtäviä kehittyvässä keskushermostossa. [6]

Mikrogliat osallistuvat astrosyyttien ja oligodendrosyyttien syntyyn ja kypsymiseen mukaan lukien oligodendrosyyttien esiasteiden (OPC) erilaistumiseen myeliinin tuottamiseksi. Ne myös vaikuttavat neuroepiteelin kantasolujen (NPC) erilaistumiseen hermosoluiksi tai gliasoluiksi. [7] Mikrogliat edistävät myös angiogeneesiä, aksonien kasvua, synaptogeneesiä, apoptoottisten solujen poistamista, neurogeneesiä sekä neuronien migraatiota ja erilaistumista. Näiden toimintojen keskeisinä mekanismeina toimivat solusyönti sekä solujen välinen viestintä, joka tapahtuu joko suorien solukontaktien kautta tai liukoisten välittäjäaineiden välityksellä. [6] Mikrogliapopulaatio pysyy läpi eliniän vakaana ylläpitäen solumääräänsä itseuudistumisen kautta. Ihmisen aivoissa mikroglian mediaanielinikä on noin 4,2 vuotta, ja mikroglioista noin 28 % uudistuu vuosittain. [5] Mikroglioilla on tärkeä rooli aivojen normaalissa toiminnassa ja rakenteessa. Ne eivät vain toimi ensisijaisena immuunipuolustuksena aivoissa, vaan niillä on myös monia muita elintärkeitä tehtäviä aivojen terveydelle. [3]

Mikrogliat toimivat aivojen immuunipuolustuksen soluina valvoen jatkuvasti ympäristöään etsien merkkejä vauriosta, patogeeneistä tai muista häiriöistä sekä reagoiden havaitsemiinsa muutoksiin nopeasti. [8] Mikroglia tunnistaa solupinnan reseptoreiden

avulla patogeeneihin liittyviä molekyylimalleja (PAMP) ja vaaraan liittyviä molekyylimalleja (DAMP). Nämä reseptorit käynnistävät immuunivasteen, joka auttaa suojaamaan aivoja infektioilta ja vaurioilta. Aktivoituessaan mikroglia voi vapauttaa tulehdussytokiineja ja patogeeneja solusyönnillä, mikä on osa immuunipuolustusta [9].

Mikrogliat ovat plastisia soluja, joiden rakenne ja ulkonäkö vaihtelevat aktivaatiotilan ja sijainnin mukaan vasteena ympäristön muutoksiin. Aktivoituneina mikrogliat muuttavat morfologiaansa ja toimivat esimerkiksi syöjäsolun eli fagosyyttien tavoin, tuhoten vierasaineita, mikrobeja tai väärin toimivia soluja solusyönnin avulla. [8] Pääsääntöisesti mikrogliat jaetaan kahteen pääryhmään: homeostaattisiin eli lepotilassa oleviin ja aktivoituneisiin soluihin. Aktivoituneet mikrogliat jaetaan fenotyypin mukaan yksinkertaistetusti kahteen luokkaan: proinflammatorinen eli tulehdusta edistävä fenotyyppi (M1) ja antiinflammatorinen eli tulehdusta hillitsevä fenotyyppi (M2). Fenotyyppi on dynaaminen ja muuttuu ympäristön ja aktivoivien signaalien mukaan, jolloin mikroglia voi olla missä tahansa kahden ääripään, M1 ja M2, välillä. [9] Kuvassa 1 on esitetty mikroglialle tyypilliset morfologiset muodot niiden aktiivisessa ja lepotilassa. Lepotilassa mikrogliojen solukeskus on kooltaan pieni ja niille on ominaista laaja, monimutkainen ja tiheä haaroittuminen, mikä on esitetty kuvan 1 kohdassa A. [10] Haarautuvat ulokkeet liikkuvat jatkuvasti, jonka avulla mikrogliat havainnoivat laajasti ympäristöään ja siinä tapahtuvia muutoksia. Ulokkeiden avulla mikrogliat muodostavat lyhytkestoisia yhteyksiä muihin aivosoluihin sekä verisuoniin. Nimestään huolimatta myös lepotilassa olevat mikrogliat ovat erittäin aktiivisia ja dynaamisia ja haaroittuneiden mikrogliojen on havaittu pidentävän ja vetävän takaisin ulokkeitaan 2,2 ± 0,2 µm minuutissa, mikä mahdollistaa niiden nopean reagoinnin aivojen homeostaasin häiriöihin. [5]



Kuva 1. *Havainnollistava kaavio mikrogliojen morfologiasta, mukautettu Iba1-värjättyjen solujen fotomikrografioista ja käsitelty ZEN Blue -ohjelmistolla. Solukeskus erottuu kuvissa vaaleampana alueena, kun taas ulokkeet näkyvät tummempina rakenteina. (A) Haaroittunut, (B) pensasmainen, (C) ameboidinen ja (D) sauvamainen mikroglia. (E) Mikrogliasoluarpikudos. Muokattu lähteestä Green ym., 2024. [10]*

Aktivoituneiden mikrogliojen morfologia riippuu aktivoitumiseen johtaneista syistä. Morfologiaan vaikuttavat esimerkiksi aktivaation tyyppi ja voimakkuus sekä vammat ja stressitekijät. Kuvan 1 kohdissa B-D on esitetty aktivoituneiden mikrogliojen tyypillinen rakenne: suurentunut solukeskus ja vetäytyneemmät ulokkeet verrattuna lepotilassa oleviin mikroglioihin. [5] Mikrogliasoluarpikudos (kuva 1, kohta E) muodostuu osana aivojen tulehdusvastetta kudosvaurioon ja sen tarkoituksena on estää vaurion leviäminen, kun gliasolut koaguloituvat vauriokohdan ympärille [10]. Mikroglia voi palata takaisin lepotilaan aktivaation jälkeen, mikäli ärsyke poistuu ja tulehdusreaktio laantuu. Esimerkiksi, kun vaurioitunut kudos on korjattu, mikroglia voi lopettaa tulehdussytokiinien tuotannon ja palata takaisin lepotilaan. [9]

2.2 Solusignalointi

Mikrogliasolut reagoivat ympäristön muutoksiin ja saapuviin signaaleihin muuttamalla muotoaan ja toimintaansa. Signalointireitti vaikuttaa suoraan siihen, muodostuuko mikroglioista tulehdukseen ja kudosvaurioon liitetty M1-fenotyyppi vai kudoksen korjaamiseen ja tulehduksen hillitsemiseen liitetty M2-fenotyyppi. [9] Signaloinnilla on keskeinen rooli synaptisessa karsinnassa sekä plastisuudessa, jolloin mikroglia poistaa tarpeettomia synapseja kehityksen aikana ja myös aikuisen aivoissa. Aivojen immuunivasteessa

mikroglia aktivoituu vasteena vaurioille ja infektioille sekä osallistuu aivojen puolustukseen. Mikrogliat ovat jatkuvassa vuorovaikutuksessa muiden solujen, kuten neuronien, endoteelisolujen, verisuonten sileiden lihassolujen ja astrosyyttien kanssa. Tätä monimutkaista järjestelmää kutsutaan neurovaskulaariseksi yksiköksi ja sillä on keskeinen rooli aivojen toiminnassa. Neurovaskulaarisen yksikön solujen välisen viestinnän häiriöiden on osoitettu olevan yhteydessä useisiin neurologisiin sairauksiin. Tämän vuoksi yksikön kokonaisvaltainen tarkastelu on olennaista aivotoiminnan häiriöitä tutkimuksessa. [11] Mikroglian vuorovaikutusta neurovaskulaariseen yksikköön käsitellään tarkemmin kappaleessa 4.

Mikrogliojen pinnalla oleviin reseptoreihin kuuluvat tärkeimpinä kuviotunnistusreseptorit (PRR:t), jotka voidaan jakaa kolmeen reseptoriperheeseen: Tollin kaltaiset reseptorit (TLR:t), retinoiinihappo-indusoituvan geenin 1 kaltaiset reseptorit (RLR:t) sekä nukleotidien sitoutumisen oligomeeritason domeenin kaltaiset reseptorit (NLR:t). Nämä reseptorit havaitsevat taudinaiheuttajien molekyylirakenteita, ja niiden aktivoituessa käynnistyy synnynnäinen immuunivaste, jossa mikrogliat erilaistuvat M1-fenotyypiksi ja erittävät tulehduksellisia sytokiineja, kemokiineja ja typpioksidia (NO). [9]

Muita signalointireittejä, jotka ohjaavat mikroglian erilaistumista M1-fenotyypin suuntaan, ovat esimerkiksi MAPK-, JAK/STAT– ja PI3K-Akt/mTOR-signalointireitit. MAP-kinaasivälitteisessä solusignaloinnissa on kolme päähaaraa, joista p38 MAPK ja c-Jun N-terminaalinen kinaasi (JNK) ohjaavat hallittua solukuolemaa eli apoptoosia ja solunulkoinen signaaliin reagoiva kinaasi (ERK 1/2) liittyy lisääntymiseen ja eloonjäämiseen. P38 MAPK ja JNK edistävät tulehdusta lisäämällä tulehduksellisten välittäjäaineiden tuotantoa sekä säätelemällä transkriptiotekijöiden toimintaa. Toinen merkittävä solusignalointireitti on JAK/STAT, jossa sytokiinien sitouduttua solukalvoreseptoreihin Janus-kinaasit (JAK) aktivoituvat ja fosforyloivat signaalinvälittäjä ja transkription aktivoija (STAT) -proteiineja. STAT-proteiinien muodostamat dimeerit ohjautuvat tumaan, jossa ne säätelevät geenien ilmentymistä. [9]

Solukalvoreseptoreiden, kuten Toll-tyyppinen reseptori 4:n (TLR4), TREM2:n ja CX3CR1:n, aktivoituminen esimerkiksi tulehdusta välittävien molekyylien vaikutuksesta käynnistää useita solunsisäisiä signalointireittejä kuten PI3K-AKT/mTOR-signalointireitin. PI3K-AKT-reitin aktivoituminen johtaa fosfatidyyli-inositoli-3-kinaasin (PI3K) aktivaatioon. [12] PI3K on entsyymi, joka katalysoi solukalvon fosfatidyyli-inositoli-4,5-bifosfaatin (PIP2) muuntumista fosfatidyyli-inositoli-3,4,5-trifosfaatiksi (PIP3). [13] Lipidien fosforylaatio toimii signaalina, joka aktivoi proteiinikinaasi B:tä (AKT). AKT:n aktivaatio säätelee useita solun toimintoja, kuten proteiinisynteesiä, solujen kasvua ja lisääntymistä.

[12] Yksi keskeinen AKT:n aktivoima signalointireitti on nisäkkään rapamysiinin kohdeproteiini mTOR. Se on keskeinen säätelijä solujen kasvussa, aineenvaihdunnassa, proteiinisynteesissä ja autofagiassa. mTOR:n liiallinen aktivoituminen voi johtaa mikroglian pro-inflammatoriseen aktivaatioon ja edistää neuroinflammaatiota. [14] Toisaalta sen estyminen voi heikentää mikroglian kykyä poistaa jätteitä solusyönnillä. [13] PI3K-AKT-signalointireitillä on keskeinen rooli mikroglian aktivaation, polarisaation, sytokiinien tuotannon ja migraation säätelyyn. [12]

Mikrogliojen tulehdusta lisäävä tai vaimentava signalointi sekä muiden immuunipuolustukseen osallistuvien solujen, kuten makrofagien ja astrosyyttien, aktivointi tapahtuu merkkiaineiden välityksellä. [3] Vaikka astrosyytit eivät ole varsinaisia immuunisoluja, ne voivat osallistua immuunivasteeseen aivoissa esimerkiksi vapauttamalla sytokiineja ja kemokiineja. Mikrogliat voivat olla osallisena astrosyyttien aktivoitumisessa esimerkiksi tulehdustilanteissa. [15] Proinflammatorisia eli tulehdusta lisääviä sytokiineja ovat esimerkiksi tuumorinekroositekijä alfa (TNF-α), interleukiini-1-beta (IL-1β), interleukiini-6 (IL-6) sekä kemokiini CCL2. Anti-inflammatorisia eli tulehdusta lievittäviä merkkiaineita ovat esimerkiksi interleukiini-10 (IL-10), transformoiva kasvutekijä beeta (TGF- β) sekä aivoperäinen neurotrofinen kasvutekijä (BDNF). [3] Tuotettujen kemokiinien, kuten RANTES ja monosyyttien kemotaktinen proteiini-1 (MCP-1), tehtävänä on houkutella paikalle immuunisoluja, mikä vahvistaa immuunivastetta. Mikrogliat erittävät typpioksidia, jota käytetään taudinaiheuttajien sekä vaurioituneiden solujen tuhoamiseen vasteena patogeeneille sekä sytotoksiineille. [16]

Muita mikroglian aktivaatioon vaikuttavia solukalvoreseptoreita ovat esimerkiksi TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2). TREM2 on solun pinnalla oleva immuunireseptori, joka tunnistaa solunulkoisesta ympäristöstä saapuvia ligandeja. Ligandin sitoutuminen TREM2:een käynnistää mikrogliojen polarisaation anti-inflammatoriseen fenotyyppiin. TREM2 säätelee mikrogliojen polarisaatiota erityisesti estämällä P38 MAPK -signalointireitin aktivoitumista, mikä puolestaan edistää mikrogliojen polarisaatiota anti-inflammatoriseen fenotyyppiin ja vähentää tulehdusreaktiota. On myös havaittu, että TREM2:n vaikuttaa merkittävästi apoptoottisten solujen mikroglia-välitteiseen solusyöntiin. [17]

Mikroglian pinnalla olevien reseptoreiden kautta ne ovat suorassa kontaktissa viereisten solujen, kuten neuronien, astrosyyttien ja oligodendrosyyttien kanssa [18]. Esimerkiksi puriinivälitteinen signalointi on yleinen neuronien ja mikrogliojen välillä. Adenosiinitrifosfaatti (ATP) / adenosiini signaloinnissa aktiivisten neuronien vapauttama ATP sitoutuu mikroglian pinnalla oleviin P2Y12-reseptoreihin. ATP toimii ’’vaarasignaalina’’ mikro-

glialle, jolloin mikroglia liikkuu kemotaksian mukaisesti kohti neuronia. Mikroglian erittämät entsyymit hajottavat ATP:n adenosiiniksi, joka sitoutuessaan neuronien A1-reseptoreihin vähentää välittäjäaineiden vapautumista, vaimentaen siten neuronien aktiivisuutta. [11]

Taulukossa 1 on tiivistetty mikroglian keskeiset signalointireitit, niihin vaikuttavat molekyylit sekä vaikutukset mikrogliaan.

Taulukko 1: *Mikroglian toimintaa ohjaavat signalointireitit ja niihin osallistuvat keskeiset molekyylit*

Signalointireitti	**Keskeiset molekyylit**	**Vaikutus mikroglian toimintaan**	**Lähde**
MAPK-reitti	P38 MAPK, JNK, ERK 1/2	Säätelee apoptoosia, solujen lisääntymistä ja tulehdusvastetta	[9]
JAK/STAT-reitti	Janus-kinaasit (JAK), STAT-proteiinit	Geenien ilmentymisen säätely sytokiinien välityksellä	[9]
PI3K-AKT/mTOR-reitti	PI3K, AKT, mTOR	Vaikuttaa mikroglian aktivaatioon, solujen kasvuun ja migraatioon	[12]
TREM2-signalointireitti	TREM2, P38 MAPK	Säätelee solusyöntiä ja tulehdusvastetta	[17]
Puriinivälitteinen signalointi	ATP, P2Y12-reseptori, adenosiini, A1-reseptori	Mikroglian kemotaksia ja neuronien aktiivisuuden säätely	[11]

Näiden signalointireittien laaja ja monimutkainen vuorovaikutus ohjaa mikroglian vastetta erilaisiin ärsykkeisiin, mikä vaikuttaa suoraan aivojen oikeanlaiseen toimintaan ja terveyteen. Mikrogliojen aktivaation, synapsien säätelyn ja tulehdusvasteen häiriöt voivat heikentää niiden kykyä reagoida ympäristön signaaleihin. Nämä häiriöt signalointireiteissä

ja geenien luennassa voivat korjaamattomina johtaa neurologisten sairauksien ja kehityshäiriöiden, kuten autismin, kehittymiseen. [19]

3. MIKROGLIOJEN AUTISMISSA ILMENEVÄT HARVINAISET GEENIVARIANTIT

Suurin osa autismin geneettisestä riskistä johtuu yleisistä geenivarianteista, joilla on yksittäin pieni vaikutus ja jotka ilmenevät autismissa yhteisvaikutuksena. Autismiin on kuitenkin liitetty myös lukuisia harvinaisia geenivariantteja, joilla voi olla merkittävä vaikutus yksilön alttiuteen autismille. [2] Koska autismin genetiikan tutkimus on laaja ja jatkuvasti kehittyvä, tässä kappaleessa keskitytään kolmeen mikrogliassa ilmenevään geeniin ja näihin geeneihin liittyviin harvinaisiin autismiin vaikuttaviin geneettisiin variantteihin.

3.1 CX3CR1-geeni

CX3CR1-geeni koodaa G-proteiinikytkettävää reseptoria, joka on olennainen osa mikroglian ja neuronien välistä vuorovaikutusta. CX3CR1-reseptori sijaitsee mikrogliojen solukalvolla, ja sen ligandina toimii neuroneista vapautuva fraktalkiini (CX3CL1). [9] Fraktalkiinin sitoutuminen CX3CR1-reseptoriin aiheuttaa transkriptiotekijöiden kerääntymisen ohjattuihin paikkoihin, joissa ne voivat vaikuttaa geenien ilmentymiseen. Transkriptiotekijät saavat aikaan solunsisäisten signalointireittien, kuten fosfolipaasi C:n, PI3K:n ja ERK 1/2:n aktivoitumisen. Tämän vuorovaikutuksen kautta mikroglia voi reagoida ympäristön ärsykkeisiin, kuten tulehdus- tai vaurio-olosuhteisiin, ja se voi joko edistää tai hillitä tulehdusreaktiota. Aktivoituminen säätelee mikroglian migraatiota tulehdusalueelle ja vaikuttaa sytokiinituotantoon esimerkiksi lisäämällä tai vähentämällä tulehdusta edistävien sytokiinien, TNF-a ja IL-6, tuotantoa. CX3CR1-geenissä tapahtuvat mutaatiot voivat johtaa toimintahäiriöihin, jotka altistavat neurologisten sairauksien, kuten autismin, kehittymiselle. [20]

Yksi tunnetuimmista mutaatioista CX3CR1-geenissä on Ala55Thr-pistemutaatio, joka muuttaa alaniini-aminohapon treoniiniksi aminohappoketjun 55. kohdassa. Tätä pistemutaatiota kutsutaan vaihtomutaatioksi, sillä se johtaa yhden nukleotidin vaihtumiseen toiseen, jolloin muodostunut kodoni koodaa eri aminohappoa. Tämä voi puolestaan johtaa proteiinin toimimattomuuteen. Ala55Thr-mutaatio estää fraktalkiinin indusoimaa Akt-fosforylaatiota, mikä heikentää signaalinvälityskykyä ja vaikuttaa solujen eloonjäämiseen ja toimintaan. CX3CR1-reseptorin kolmiulotteinen rakenne muuttuu, koska transmembraanialueen (TM1) ja heliksin 8 välinen hydrofobinen vuorovaikutus heikkenee. Tämä rakenteellinen muutos häiritsee reseptorin vuorovaikutusta solunsisäisten signalointimolekyylien kanssa, mikä vaikuttaa mikroglian toimintaan. [21]

CX3CR1-geenin toimintahäiriöiden vaikutuksia on tutkittu myös eläinmalleilla, kuten CX3CR1 poistogeenisellä hiirimallilla. Poistogeenisissä eläinkokeissa hiirillä on pysyvä mutaatio, joka estää CX3CR1-geenin toiminnan ja sitä kautta CX3CR1-proteiinin tuotannon. Näissä kokeissa on havaittu, että geenin toiminnan estävä mutaatio heikentää mikroglian kykyä karsia synapseja, mikä voi johtaa synapsien kertymiseen ja toimintahäiriöihin hermoverkoissa. Geenin puutos estää mikroglian kyvyn tunnistaa ja poistaa solusyönnillä heikkoja ja tarpeettomia synapseja, mikä on oleellista plastisuuden ja normaalin hermoston toiminnan ylläpitämisessä. [22]

3.2 PTEN-geeni

Mikrogliojen PI3K-AKT/mTOR-signalointireitti on keskeinen mekanismi, joka on vahvasti yhteydessä autismiin ja useisiin neurodegeneratiivisiin sairauksiin. Tämän reitin säätelyyn osallistuu useita geenejä, kuten PTEN, AKT3, PPP2R1A, mTOR, CCND, PIK3R2 ja AKT1, jotka yhdessä säätelevät mikrogliassa tapahtuvia keskeisiä prosesseja, kuten solujen kasvua, eloonjäämistä ja tulehdusvasteita. ASD-potilaiden tutkimuksissa on havaittu useita mutaatioita signalointireittiä säätelevissä geeneissä, ja yksi tunnetuimmista esiintyy mikrogliassa ilmenevässä PTEN-geenissä. PTEN-geenin mutaatiot on tunnistettu merkittäväksi riskitekijäksi autismikirjon häiriöissä, erityisesti potilailla, joilla esiintyy myös makrokefaliaa eli suurentunutta päänympärystä. Makrokefalia on yleinen piirre autismikirjon häiriössä sekä kehitysviiveestä kärsivillä potilailla. [23] Jopa 20%:lla ASD-lapsista, joilla on makrokefalia, on löydetty ituradan mutaatioita PTEN-geenissä [24].

PTEN-geenistä on tunnistettu sekä vaihto- että lukukehysmutaatioita ASD-potilailla, mikä tukee sen merkitystä autismissa. Lukukehysmutaation myötä sekvenssistä poistuu tai siihen lisätään kolmella jaoton määrä nukleotidejä, jolloin koko lukukehys muuttuu. Lukukehysmutaation seurauksena koko aminohappoketjun rakenne voi muuttua mutaation sijainnista eteenpäin. [23]

PTEn-geeni koodaa fosfataasientsyymiä, joka säätelee solunsisäisiä signalointireittejä defosforyloinnin avulla eli poistamalla fosfaattiryhmiä tietyistä molekyyleistä. PTEN toimii PI3K-AKT/mTOR-reitin pääasiallisena inhibiittorina, kumoamalla PI3K:n vaikutuksen muuntamalla PIP3:n takaisin PIP2:ksi. Tämä negatiivinen säätely on välttämätöntä, jotta PI3K-AKT/mTOR -reitti ei yliaktivoituisi. [12] Potilastutkimuksessa on löydetty PTEN-geenissä lukukehysmutaatio, joka aiheuttaa lukukehyksen siirtymän aminohappoketjun 183. kohdassa. Tämän seurauksena kaikki seuraavat aminohapot muuttuvat virheellisiksi, kunnes mutaatio johtaa ennenaikaiseen lopetuskodoniin 16 aminohapon päässä muutoksen alusta. Tällöin proteiinisynteesi päättyy ennenaikaisesti, ja syntyvä proteiini

on todennäköisesti toimimaton. [23] Toimimaton inhibiittori voi johtaa signalointireitin liialliseen aktivaatioon, jonka myötä mTOR:n proteiinikinaasin aktiivisuus on normaalia korkeampi. Hyperaktiivisuus estää autofagiaa, joka on solujen puhdistusmekanismi, jolla poistetaan vahingoittuneita solukomponentteja. Myös mikroglian proinflammatorinen M1-fenotyyppi aktivoituu, ja se erittää tulehdusvälittäjäaineita, jotka voivat pahentaa neuroinflammaatiota. [13] Nämä muutokset voivat puolestaan edistää neuroinflammatoristen reaktioiden kehittymistä, solujen hallitsematonta kasvua ja lisääntymistä, joka on liitetty neurologisiin sairauksiin. [24]

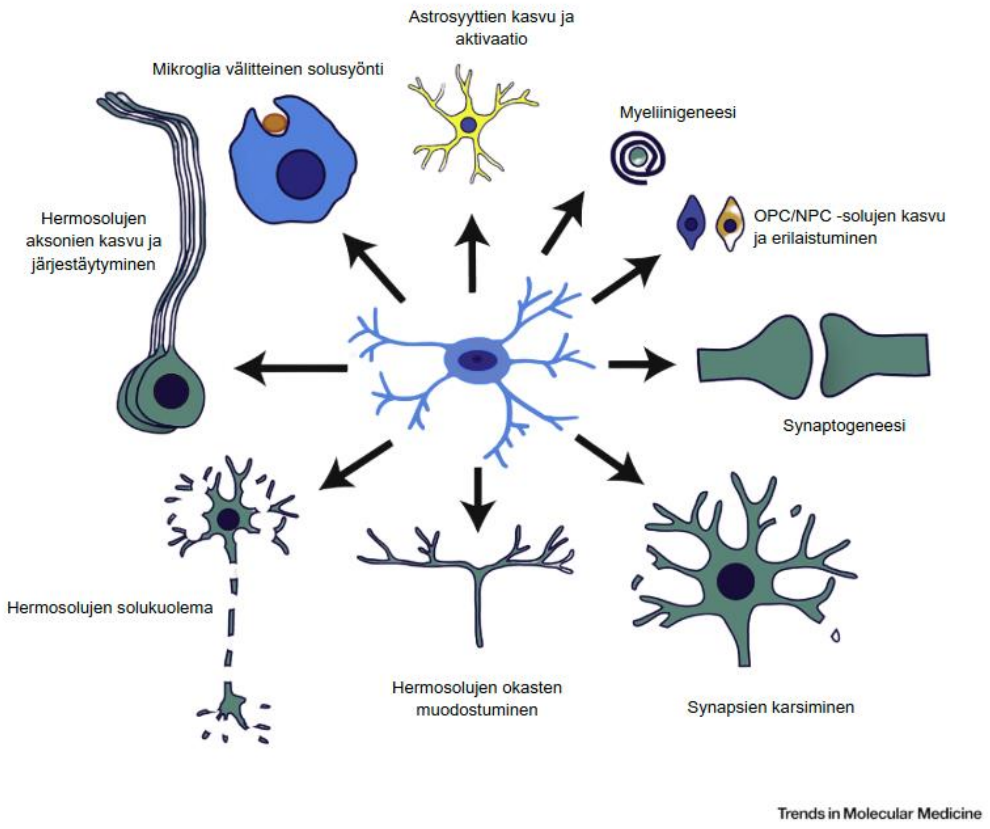
3.3 NRXN1-geeni

NRXN1-geeni koodaa neureksiini 1 -proteiinia, joka toimii presynaptisena adheesiomolekyylinä, jolla on keskeinen rooli transsynaptisessa signaloinnissa, solujen adheesiossa ja välittäjäaineiden vapautumisessa. [25] Se toimii solukalvoreseptorina postsynaptisille neurogliineille ja säätelee glutamaatti- ja GABA-reseptoreita. Neurogliinien ja neureksiinien vuorovaikutus edistää synaptisten yhteyksien muodostumista ja hermoverkkojen toiminnallisuutta. [26] Aiemmin NRXN1-geeni on yhdistetty ensisijaisesti neuronien toimintaan, mutta uusimmat tutkimukset osoittavat, että sen ilmentyminen ei rajoitu ainoistaan hermosoluihin. Sekä ihmisen mikrogliasolulinjasta että ihmisen aivokudoksesta eristetyissä mikrogliasoluissa on todettu NRXN1-geenin ekspressiota, joka on osoitus siitä, että NRXN1 ei ole pelkästään neuronien proteiini, vaan toimii myös mikrogliasoluissa [27].

NRXN1-geeni tuottaa kahta erilaista pääisoformia, pidempää isoformia NRXN1α ja lyhyempää isoformia NRXN1β, jotka syntyvät vaihtoehtoisen promoottorin käytön seurauksena [25]. Autismikirjon häiriöihin liittyvissä geneettisissä tutkimuksissa on tunnistettu NRXN1α-geenin bi-alleelisia deleetioita, jossa potilaan molemmista kromosomeista puuttuu kyseinen geenin osa. Näiden deleetioiden on havaittu lisäävän ASD:n riskiä merkittävästi [26], [27]. Bi-alleelinen deleetio johtaa NRXN1α-proteiinin tuotannon huomattavaan vähenemiseen, mikä voi häiritä synaptisten yhteyksien muodostumista ja hermoverkkojen toimintaa [27]. Lisäksi deleetio vaikuttaa suoraan mikrogliaan: mikrogliojen morfologia muuttuu, niiden haaroittuneisuus kasvaa ja solujen pinta-ala laajenee, mikä viittaa mikroglian aktivoitumiseen. Samanaikaisesti mikrogliojen määrä lisääntyy, mikä viittaa niiden proliferaation kiihtymiseen. NRXN1α-geenin deleetioon liittyy myös aivojen tulehdusvasteiden voimistuminen. Tutkimukset osoittavat, että deleetio stimuloi IL-6:n lähetti-RNA:n ekspressiota mikroglioissa, mikä puolestaan voi edistää neuroinflammatorisia prosesseja ja vaikuttaa aivojen kehitykseen. [26]

4. GEENIVIRHEIDEN VAIKUTUS MIKROGLIOJEN JA MUIDEN SOLUJEN YHTEISTOIMINTAAN

Neurovaskulaarisen yksikön oikeanlainen toiminta riippuu useista geeneistä, jotka koodaavat signalointireittien kannalta keskeisiä reseptoreita ja signalointimolekyylejä. Mikroglian geenivirheet voivat häiritä näitä vuorovaikutuksia, mikä saattaa johtaa aivojen homeostaasin häiriintymiseen ja ilmetä kehityksen viivästymisenä sekä neurologisina kehityshäiriöinä, kuten autismikirjona. [19] Tässä kappaleessa tarkastellaan edellä käsiteltyjen geenivirheiden kannalta keskeisten neurovaskulaarisen yksikön komponenttien välisiä vuorovaikutuksia, keskittyen mikroglian yhteyksiin neuronien ja astrosyyttien kanssa. Kuvassa 2 on esitetty mikroglian vaikutukset ympäristöönsä ja muiden aivosolujen toimintaan.



Kuva 2 *Mikroglian vaikutus neurovaskulaariseen yksikköön. Muokattu lähteestä Wright-Jin ym., 2019.* ***[7]***

4.1 Mikrogliat ja astrosyytit

Astrosyytit ovat keskushermoston runsain gliasolutyyppi. Ne ovat tähtimäisiä soluja, jotka ovat tiiviissä yhteydessä neuroneihin ja niiden kehitykseen. [4], [15] Astrosyytit osallistuvat neurogeneesiin ja neuronien migraatioon [28]. Astrosyyttien tärkeimpiä tehtäviä on synaptisen toiminnan ja plastisuuden säätely. Ne osallistuvat sekä uusien synapsien muodostumiseen että ylimääräisten synapsien karsintaan. Karsinnassa astrosyytit toimivat joko suoraan solusyönnillä tai epäsuorasti, aktivoimalla mikroglia välitteistä solusyöntiä. [4] Astrosyytit osallistuvat myös hermoston tärkeimpien välittäjäaineiden, kuten glutamaatin ja GABA:n, säätelyyn. Ne poistavat glutamaattia synapsin ympäristöstä eksitatorisen aminohappotransportterin 1 (EAAT1) avulla ja estävät glutamaatin liiallista kertymistä synapsiraossa ja ehkäisevät neuronien liikastimulaatiota. Glutamaatti muunnetaan glutamiiniksi glutamiinisyntetaasin (GS) avulla ja kuljetetaan takaisin neuroneihin. [28]

Astrosyytit osallistuvat mikrogliojen kanssa yhdessä aivojen tulehdusvasteen säätelyyn. Ne tuottavat sytokiineja, kemokiineja ja muita immuunivälittäjäaineita. [28] Astrosyytit voidaan jakaa A1-neurotoksiseen ja A2-neuroprotektiiviseen fenotyyppiin. Kuten mikrogliat, myös astrosyytit osallistuvat aivojen immuunivasteisiin ja tulehduksen säätelyyn. Ne voivat joko lisätä tai hillitä tulehdusta riippuen niiden aktivaatiotyypistä. A1-astrosyytit tehostavat neuroinflammaatiota, estävät synaptista haaroittumista ja aksonikasvua erittämällä neurotoksiinia. A2-neuroprotektiivisilla astrosyyteillä on korjaava vaikutus neuronien selviytymisen ja kasvun kannalta. [15]

Tutkimukset ovat osoittaneet, että astrosyyteillä on merkittävä yhteys autismiin. Autistisilla on havaittu joillakin aivoalueilla, kuten prefrontaalikorteksissa, astrosyyttien määrän vähenemistä. Astrosyyttien määrän väheneminen voi olla seurausta heikentyneestä tuotannosta tai lisääntyneestä solukuolemasta. Samalla kun astrosyyttien määrä on usein vähentynyt, niiden aktivaatiotila on usein lisääntynyt autismissa. Tämä viittaa siihen, että astrosyytit reagoivat autismille tyyppilliseen aivojen tulehdustilaan. Gliaalinen fibrillaarinen hapan proteiini (GFAP) on astrosyyttien tärkeä rakenneproteiini. Se on astrosyyttien aktivaatiotilan merkki, ja sen ilmentymisen on havaittu olevan lisääntynyt ASD:ssa. Tämä tukee havaintoa astrosyyttien lisääntyneestä aktivaatiotilasta. [28] Astrosyyttien ja mikrogliojen vuorovaikutus on tärkeää neuroinflammaation säätelyssä ja aivojen homeostaasin ylläpitämisessä. Niiden välinen vuorovaikutus on kaksisuuntaista. Aktivoituneet mikrogliat voivat indusoida reaktiivisia astrosyyttejä, ja vastaavasti aktivoituneet astrosyytit voivat aktivoida mikrogliaa. Poikkeavuudet tässä vuorovaikutuksessa voivat johtaa neuronitoiminnan häiriöihin. [4]

NRXN1α-geenin deleetio sekä PTEN-geenin lukukehys- ja vaihtomutaatiot edistävät mikroglian erilaistumista aktivoituneeseen tilaan [26]. Mikroglian aktivoituminen esimerkiksi lipopolysakkaridien (LPS) stimuloimana johtaa tulehduksellisten signalointimolekyylien kuten, TNF-α ja IL-1α, vapautumiseen. Nämä molekyylit aktivoivat astrosyyttejä reaktiiviseen A1 tilaan. [15] Autismissa on raportoitu liiallista neuroinflammaatiota, johon liittyy A1-fenotyypin reaktiiviset astrosyytit sekä kohonneet sytokiinitasot. Myös ASD:ssa ilmentyneet kohonneet GFAP-tasot ovat osoitus aktivoituneista astrosyyteistä. [28]

Mikroglian erittämät kasvutekijät ja välittäjäaineet säätelevät astrosyyttien metaboliaa ja toimintaa. Jos mikroglian PTEN-mutaatiot häiritsevät astrosyyttien toimintaa tulehduksen tai signaalinvälityksen kautta, EAAT1-transportterin ekspressio ja toiminta voi heikentyä. Transportterin heikentyneen toiminnan kautta astrosyyttien glutamaatin takaisinotto häiriintyy ja johtaa glutamaatin kertymiseen synapsiraossa. Lisäksi autismissa on havaittu alentunutta GABA-konsentraatiota motorisilla, visuaalisilla ja somatosensorisilla alueilla. [29] Glutamaatin kertyminen ja alentunut GABAn konsentraatio voi aiheuttaa neurotoksisuutta ja hermosolujen liiallista stimulaatiota, mikä voi johtaa autismikirjolle tyyppilliseen sensoriseen yliherkkyyteen, motorisiin häiriöihin ja kognitiivisiin vaikeuksiin.

4.2 Mikrogliat ja neuronit

Neuronit välittävät tietoa aivoissa sähköisten ja kemiallisten signaalien avulla. Ne ovat erikoistuneita soluja, jotka muodostavat hermoverkkoja ja välittävät viestejä hermostossa. Niiden rakenteeseen kuuluu tuojahaarakkeet, jotka vastaanottavat signaaleja muista hermosoluista, viejähaarake, joka kuljettaa signaalin eteenpäin, sekä synapsit, jotka ovat liitoskohtia, joissa hermosignaalit välitetään solusta toiseen. Synapseja muodostuu ja häviää koko yksilön elämän ajan, ja tätä prosessia kutsutaan synaptiseksi plastisuudeksi. Synaptisten yhteyksien kautta tapahtuva hermoverkostojen muodostus muokkaa aivojen toimintaa, on tärkeä tekijä oppimiselle ja muistille sekä vaikuttaa yksilön käyttäytymiseen. [3]

Mikrogliat ja neuronit vaikuttavat toisiinsa useilla eri tavoilla sekä fysiologisissa että patologissa olosuhteissa. Mikrogliat voivat edistää neuronien selviytymistä ja kasvua, osallistuvat neuronien synapsien karsimiseen aivojen kehityksen aikana, säätelevät neuronien aktiivisuutta sekä negatiivisella että positiivisella palautteella. [11] Mikrogliasolut ovat keskeisessä asemassa synapsien muodostumisessa, karsinnassa ja niiden toiminnan säätelyssä. Eräs mikrogliojen tärkeistä tehtävistä on synapsien karsiminen joko solusyönnillä tai trogosytoosin avulla, jossa solu ottaa osia toisesta solusta ilman, että koko solun hajotetaan [3]

ASD:ssä on todettu sekä liiallisia että puutteellisia synaptisia yhteyksiä riippuen aivojen alueesta, yksilöstä sekä taustalla olevista geneettisistä ja ympäristötekijöistä riippuen [14], [21]. Synapsien karsinnassa mikrogliat käyttävät CX3CR1-reseptorien ligandia, fraktalkiinia, neuronien kanssa kommunikoidessaan. Kun CX3CR1 puuttuu tai on mutatoitunut, mikroglian kyky tunnistaa tarpeettomia synapseja heikkenee. Nämä geenivirheet johtavat heikentyneeseen hermoverkkojen toimintaan ja liiallisiin synapseihin. [21]

PI3K-AKT/mTOR-signalointireitillä on keskeinen rooli synapsien muodostumisessa, karsimisessa ja synaptisen plastisuuden säätelyssä. Tämän reitin aktivoituminen säätelee neuronien tuojahaarakkeen okasiin kohdistuvaa proteiinisynteesiä. mTOR:n aktivoituminen johtaa proteiinien, kuten PSD-95:n ja synapsiini 1:n, synteesin lisääntymiseen, jotka ovat elintärkeitä synaptisten yhteyksien muodostumiselle. Nämä proteiinit edistävät synaptisen plastisuuden prosesseja, kuten tuojahaarakkeiden okasten muodostumista ja niiden kypsymistä, jotka ovat tärkeitä esimerkiksi muistiprosesseissa ja pitkäaikaiselle muistille. [13] PTEN-geenin mutaatiot voivat johtaa mTOR hyperaktivaatioon, joka voi aiheuttaa liiallista proteiinisynteesiä. Liiallinen PI3K-AKT/mTOR-signalointireitin aktivoituminen stimuloi mikroglian M1-fenotyyppiä lisäten proinflammatoristen sytokiinien eritystä ja kiihdyttäen synapsien menetystä ja neuronivaurioita. Tutkimukset ovat osoittaneet, että ASD-potilailla on havaittu synapsien plastisuuden häiriöitä, muutoksia tuojahaarakkeiden okasten morfologiassa ja synaptisen homeostaasin heikkenemistä. Nämä muutokset voivat vaikuttaa neuronien välisiin yhteyksiin ja heikentää aivojen kykyä sopeutua sekä käsitellä uutta tietoa. [14]

Tutkimukset ovat osoittaneet, että NRXN1α-poistogeeniset mikrogliat ovat menettäneet kykynsä tukea toiminnallisten neuroniverkostojen muodostumista. Kyvyttömyys johtuu monimutkaisesta yhdistelmästä tekijöitä, jotka liittyvät NRXN1α:n puutteeseen ja sen aiheuttamiin solun morfologian sekä toiminnan muutoksiin. [27] NRXN1α -geenin mutaatiot lisäävät mikrogliojen synnyttämää tulehdusreaktiota aivoissa. NRXN1α-geenin deleetio lisää tulehdusta edistävän sytokiinin, IL-6:n, eritystä mikrogliassa. [26] Sytokiinien

liiallinen ilmentyminen on osoitettu neurotoksiseksi, mikä voi johtaa neuronien vaurioitumiseen ja heikentää niiden kypsymistä [11].

5. GEENIVIRHEIDEN ILMENTYMINEN AUTISMIN OIREKUVASSA

Autismin geneettinen tausta on monitekijäinen, ja se muodostuu useiden yleisten geenivarianttien sekä harvinaisten varianttien yhteis- ja yksittäisvaikutuksista. Näiden yhteisvaikutusten vuoksi autismin geneettisen pohjan ymmärtäminen on haastavaa. Erityisesti kehityshäiriön polygeenisuuden vuoksi, jossa useat geenit vaikuttavat autismin kehittymiseen, on vaikeaa määrittää yksittäisten geenivirheiden tarkkaa roolia. Lisäksi, kuten aiemmin todettu, harvinaiset geneettiset variantit voivat ilmetä yksilökohtaisina vaikutuksina, mikä tuo lisähaasteita autismin geneettisten tekijöiden tutkimukseen. Poistogeenisten hiirimallien avulla on pyritty muodostamaan analyysia yhden geenivariantin vaikutuksista oirekuvaan.

Mutaatiot CX3CR1- ja NRXN1-geeneissä johtavat mikrogliasolujen aktivoitumiseen ja tulehdusta edistävien sytokiinien, kuten IL-6, IL-1 ja TNFa, erittymisen lisääntymiseen [20], [26]. Verinäytteistä saadut tulokset osoittavat, että ASD-lasten plasman IL-6-tasot ovat lähes kaksinkertaiset verrattuna neurotyypillisesti kehittyviin lapsiin. Kohonneet IL-6-tasot ovat erityisen korkeat ASD:n regressiivisessä muodossa, jossa lapsi menettää aiemmin opittuja taitoja, kuten kielellisiä tai sosiaalisia kykyjä tai palaa muihin kehityksellisesti aikaisempiin käytösmalleihin. Tällaisilla lapsilla IL-6:n pitoisuudet voivat olla jopa kolminkertaiset neurotyypillisesti kehittyviin lapsiin verrattuna. Mitä korkeammat IL-6:n tasot ovat, sitä voimakkaampia ovat esimerkiksi lapsen stereotyyppiset käyttäytymismallit, kuten toistuvat liikkeet ja rajoittunut kiinnostusalue, sekä sosiaalisen vuorovaikutuksen vaikeudet. Tämä viittaa siihen, että IL-6:n lisääntynyt eritys voi toimia sekä biomarkkerina ASD:n vaikeusasteelle että mahdollisesti merkittävänä tekijänä autismin patogeneesissä. [30]

Hiirillä tehdyissä *in vivo* -tutkimuksissa on havaittu, että CX3CR1 poistogeenisillä eläinmalleilla esiintyy autismille tyypillisiä käyttäytymishäiriöitä. Näillä hiirillä on todettu merkittäviä puutteita sosiaalisessa vuorovaikutuksessa, mikä ilmenee jo varhaisessa kehitysvaiheessa. Nuorilla poistogeenisillä hiirillä on havaittu heikentynyttä kiinnostusta emoaan kohtaan, kun taas aikuisilla yksilöillä sosiaalinen vuorovaikutus muiden hiirten kanssa on vähentynyt. Tämä viittaa siihen, että CX3CR1:n puuttuminen vaikuttaa haitallisesti sosiaalisen käyttäytymisen kehittymiseen. [22] Autismikirjon häiriölle ominaisia piirteitä ovat myös toistuva, lisääntynyt ja pakonomainen käyttäytyminen sekä rutiininomaiset tavat [1]. CX3CR1 poistogeenisillä hiirillä on havaittu huomattavaa lisääntynyttä

itsensä nuolemista ja turkinhoitoa, mikä voidaan tulkita stereotyyppiseksi ja pakkoluonteiseksi käyttäytymiseksi. Nämä havainnot viittaavat siihen, että CX3CR1-geenillä on tärkeä rooli aivojen normaalin kehityksen ja sosiaalisen käyttäytymisen kannalta. CX3CR1 puutos heikentää aivojen eri alueiden välistä kommunikaatiota, mikä voi johtaa sosiaalisen vuorovaikutuksen vaikeuksiin ja toistuvan käyttäytymisen lisääntymiseen. [22]

PTEN-geenin merkitys autismikirjon häiriön synnyssä on laajalti tunnistettu ja hyväksytty tieteellisessä yhteisössä [23]. Potilastutkimuksessa on havaittu, että PTEN-geenin mutaatioilla voi olla merkittäviä vaikutuksia aivojen rakenteeseen ja toimintaan. PTEN-mutaatioihin liittyy poikkeavuuksia aivojen valkeassa aineessa, mikä saattaa vaikuttaa kognitiivisiin toimintoihin. PTEN-geenin mutaation kantajilla, joilla on todettu autismikirjon häiriö (PTEN-ASD), on heikentynyttä otsalohkon toimintaa, mikä ilmenee vaikeuksina tarkkaavaisuudessa, impulsiivisuuden hallinnassa, reaktioajoissa ja motorisessa koordinaatiossa. Lisäksi PTEN-ASD-potilailla on havaittu kielellisiä vaikeuksia sekä itsensä ilmaisussa ja puheen ymmärtämisessä, mikä voi osaltaan vaikuttaa sosiaaliseen vuorovaikutukseen ja kommunikaatioon. [24] Autismikirjolle tyypillisenä piirteenä on aistiyliherkkyys, joka voi ilmetä korostuneena reaktiivisuutena ympäristön ärsykkeisiin, kuten valoihin, ääniin tai kosketukseen [1]. PTEN-ASD-potilailla on kuitenkin havaittu tutkimuksissa päinvastaista ilmiötä – heillä on ASD-potilaisiin verrattuna vähentynyt aistiherkkyys, erityisesti kosketus-, maku- ja hajuaisteissa. Tämä löydös korostaa autismikirjon ilmentymien moninaisuutta ja sitä, kuinka geneettiset tekijät voivat vaikuttaa yksilöllisiin eroihin oirekuvassa. [24] Lisäksi autististen henkilöiden aivokudoksessa on havaittu kaikkien gliasolutyyppien, kuten astrosyyttien ja mikrogliasolujen, lisääntynyttä tiheyttä hajukäämin aivokuoren toisessa kerroksessa. Tämä gliasolujen kertymä voi osaltaan selittää havaittuja aistivajeita, mikä on yksi PTEN-ASD:hen liittyvistä neurologisista erityispiirteistä. [28]

PTEN-geenin vaikutusta autismille tyypilliseen käyttäytymiseen on tutkittu eläinkokeilla käyttämällä PTEN-poistogeenistä hiirimallia. Näissä tutkimuksissa on havaittu merkittäviä muutoksia sosiaalisessa sekä toistuvissa käyttäytymismalleissa. PTEN-poistogeenisillä hiirillä on havaittu huomattavasti vähentynyttä sosiaalista vuorovaikutusta, mikä ilmenee esimerkiksi siinä, että ne viettävät vähemmän aikaa muiden hiirten läheisyydessä ja osoittavat vähäisempää kiinnostusta sosiaalisiin ärsykkeisiin.[31]

Toistuvan käyttämisen muutoksia PTEN-poistogeenisillä hiirillä on tutkittu useilla eri käyttäytymistesteillä, kuten marmorikuulahautaustestillä ja reikälevytestillä. Marmorikuulahautaustestissä arvioidaan koe-eläinten lajityypillistä esineiden hautauskäyttäytymistä, mikä voi antaa viitteitä niiden motorisista ja kognitiivisista toiminnoista. PTEN-

poistogeenisten hiirten on havaittu hautaavan marmorikuulia vähemmän kuin villityypin hiirten, mikä voi viitata heikentyneeseen lajityypilliseen käyttäytymiseen tai alentuneeseen aktiivisuuteen. [31] Reikälevytesti on käyttäytymiskoe, jossa tutkitaan hiirten tutkimiskäyttäytymistä, ahdistuneisuutta ja toistuvia käyttäytymismalleja. Testissä käytetään levyä, jossa on useita reikiä, joiden läpi eläimet voivat työntää päänsä tutkiessaan ympäristöään. PTEN-poistogeenisillä hiirillä on havaittu vähentynyttä reikien tutkimista, mikä voi viitata alentuneeseen tutkimiskäyttäytymiseen, vähentyneeseen uteliaisuuteen tai muutoksiin aivotoiminnassa, jotka vaikuttavat niiden reaktiivisuuteen. [30] Eläinkokeiden tulokset ovat yhdenmukaisia PTEN-ASD-potilailla tehtyjen kliinisten havaintojen kanssa. PTEN-ASD esiintyy usein alhaisena reaktiivisuutena sekä energiatasoina. [24]

NRXN1a-geenin deleetion eläinkokeissa on osoitettu autismille tyypillisiä käyttäytymishäiriöitä ja piirteitä. Homotsygoottisilla hiirillä havaittiin uroksilla lisääntynyttä aggressiivisuutta, kun taas naarailla sosiaalinen vuorovaikutus väheni. Heterotsygoottisilla hiirillä havaittiin heikentynyttä sosiaalista muistia, lisääntynyttä motorista koordinaatiota sekä muutoksia vuorokausirytmissä. Eläimillä tehdyt kopiolukumuutoksiin vaikuttavat kokeet osoittavat, että mitä vähemmän toimivaa NRXN1a-proteiinia on tuotettu, sitä todennäköisemmin ja vakavammin oireet ilmenevät. Heterotsygoottiset deleetiot aiheuttavat lieviä oireita, kun taas homotsygoottiset deleetiot voivat johtaa merkittävämpiin käyttäytymismuutoksiin. Merkittävää on myös se, että NRXN1a-geenin deleetion vaikutukset vaihtelivat sukupuolen mukaan. [32]

6. YHTEENVETO

Tämän kirjallisuuskatsauksena tehdyn opinnäytetyön tavoitteena oli tarkastella mikroglioissa esiintyviä harvinaisia geenivariantteja, jotka on yhdistetty autismikirjon häiriöihin. Työssä selvitettiin, miten nämä geenivirheet vaikuttavat mikroglian morfologiaan ja toimintaan, ottaen huomioon mikrogliojen vuorovaikutus aivojen muiden solujen kanssa ja niiden rooli aivojen toiminnan kokonaisuudessa. Autismikirjo on monimuotoinen neurologinen kehityshäiriö, joka ilmenee laajasti vaihtelevina poikkeavuuksina käyttäytymisessä ja kehityksessä. Autismin oireet ja niiden vakavuus vaihtelevat laajasti yksilöittäin, ja näitä eroja osaltaan selittää autististen henkilöiden välinen geneettinen vaihtelu. Tämän vuoksi geneettisten tekijöiden ymmärtäminen ja tutkimustiedon syventäminen on keskeistä niin tulevaisuuden hoitokeinojen kehittämisessä kuin tarkempien diagnosointimenetelmien luomisessa.

Tutkimuksessa tarkasteltiin mikrogliassa ilmenevien harvinaisten geenivarianttien vaikutuksia hermoverkkojen kehitykseen ja toimintaan autismikirjon häiriössä. Esimerkiksi CX3CR1-, PTEN- ja NRXN1-geenien mutaatioiden on havaittu vaikuttavan synapsien karsintaan, lisäävän neuroinflammaatiota ja muuttavan hermoverkkojen toimintaa. Geenivirheestä riippuen nämä muutokset voivat ilmetä muun muassa otsalohkon heikentyneenä toimintana, astrosyyttien liiallisena aktivoitumisena ja neuronivaurioina. Näiden hermostollisten muutosten on todettu olevan yhteydessä autismin häiriölle tyypillisiin piirteisiin, kuten sosiaalisen vuorovaikutuksen häiriöihin, poikkeavuuksiin aistitiedon käsittelyssä, rutiininomaiseen ja toistuvaan käyttäytymiseen.

Työn rajoitteena on tällä hetkellä saatavilla olevan tutkimustiedon keskittyminen pääasiassa hiirimallien avulla tehtyihin eläinkokeisiin. Koska geneettiset eroavaisuudet hiirten ja ihmisten välillä ovat merkittäviä, eläinkokeiden tuloksia ei voida suoraan yleistää ihmisiin, mikä on huomioitava tutkimustulosten tulkinnassa. Tulevaisuuden jatkotutkimuksen tulee painottua enemmän potilastutkimuksiin, joissa voitaisiin tunnistaa yksilölliset geenivirheet ja analysoiden niiden vaikutuksia autismikirjon häiriöiden ilmenemiseen. Näihin perustuva tutkimustieto voisi mahdollistaa tulevaisuudessa kohdennettuja hoitokeinoja, kuten geeniterapiaa, kantasoluhoitoja ja lääkeaineita, joiden teho kohdentuu spesifisiin signalointireitteihin.

LÄHTEET

[1] A. Genovese ja M. G. Butler, ”The Autism Spectrum: Behavioral, Psychiatric and Genetic Associations”, *Genes*, vsk. 14, nro 3, Art. nro 3, maalis 2023, doi: 10.3390/genes14030677.

[2] T. Gaugler *ym.*, ”Most genetic risk for autism resides with common variation”, *Nat Genet*, vsk. 46, nro 8, ss. 881–885, elo 2014, doi: 10.1038/ng.3039.

[3] M. Andoh ja R. Koyama, ”Microglia regulate synaptic development and plasticity”, *Developmental Neurobiology*, vsk. 81, nro 5, ss. 568–590, 2021, doi: 10.1002/dneu.22814.

[4] Y. Luo ja Z. Wang, ”The Impact of Microglia on Neurodevelopment and Brain Function in Autism”, *Biomedicines*, vsk. 12, nro 1, Art. nro 1, tammi 2024, doi: 10.3390/biomedicines12010210.

[5] A. Vidal-Itriago *ym.*, ”Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS”, *Front Immunol*, vsk. 13, s. 997786, loka 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.997786.

[6] N. Lannes, E. Eppler, S. Etemad, P. Yotovski, ja L. Filgueira, ”Microglia at center stage: a comprehensive review about the versatile and unique residential macrophages of the central nervous system”, *Oncotarget*, vsk. 8, nro 69, ss. 114393–114413, joulu 2017, doi: 10.18632/oncotarget.23106.

[7] E. C. Wright-Jin ja D. H. Gutmann, ”Microglia as Dynamic Cellular Mediators of Brain Function”, *Trends in Molecular Medicine*, vsk. 25, nro 11, ss. 967–979, marras 2019, doi: 10.1016/j.molmed.2019.08.013.

[8] J. Cornell, S. Salinas, H.-Y. Huang, ja M. Zhou, ”Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory”, *Neural Regeneration Research*, vsk. 17, nro 4, s. 705, huhti 2022, doi: 10.4103/1673-5374.322423.

[9] K. Biswas, ”Microglia mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases: A review on the cell signaling pathways involved in microglial activation”, *Journal of Neuroimmunology*, vsk. 383, s. 578180, loka 2023, doi: 10.1016/j.jneuroim.2023.578180.

[10] T. R. F. Green ja R. K. Rowe, ”Quantifying microglial morphology: an insight into function”, *Clin Exp Immunol*, vsk. 216, nro 3, ss. 221–229, maalis 2024, doi: 10.1093/cei/uxae023.

[11] Z. Ding *ym.*, ”Emerging Roles of Microglia in Neuro-vascular Unit: Implications of Microglia-Neurons Interactions”, *Front. Cell. Neurosci.*, vsk. 15, loka 2021, doi: 10.3389/fncel.2021.706025.

[12] E. Chu, R. Mychasiuk, M. L. Hibbs, ja B. D. Semple, ”Dysregulated phosphoinositide 3-kinase signaling in microglia: shaping chronic neuroinflammation”, *Journal of Neuroinflammation*, vsk. 18, nro 1, s. 276, marras 2021, doi: 10.1186/s12974-021-02325-6.

[13] S. D. Thomas, N. K. Jha, S. Ojha, ja B. Sadek, ”mTOR Signaling Disruption and Its Association with the Development of Autism Spectrum Disorder”, *Molecules*, vsk. 28, nro 4, Art. nro 4, tammi 2023, doi: 10.3390/molecules28041889.

[14] A. Sharma ja S. Mehan, ”Targeting PI3K-AKT/mTOR signaling in the prevention of autism”, *Neurochemistry International*, vsk. 147, s. 105067, heinä 2021, doi: 10.1016/j.neuint.2021.105067.

[15] Y. Xiong, J. Chen, ja Y. Li, ”Microglia and astrocytes underlie neuroinflammation and synaptic susceptibility in autism spectrum disorder”, *Front Neurosci*, vsk. 17, s. 1125428, maalis 2023, doi: 10.3389/fnins.2023.1125428.

[16] I. Yang, S. J. Han, G. Kaur, C. Crane, ja A. T. Parsa, ”The Role of Microglia in Central Nervous System Immunity and Glioma Immunology”, *J Clin Neurosci*, vsk. 17, nro 1, ss. 6–10, tammi 2010, doi: 10.1016/j.jocn.2009.05.006.

[17] Y. Tian *ym.*, ”TREM2 improves microglia function and synaptic development in autism spectrum disorders by regulating P38 MAPK signaling pathway”, *Molecular Brain*, vsk. 17, nro 1, s. 12, helmi 2024, doi: 10.1186/s13041-024-01081-x.
[18] A. D. Umpierre ja L.-J. Wu, ”How Microglia Sense and Regulate Neuronal Activity”, *Glia*, vsk. 69, nro 7, ss. 1637–1653, heinä 2021, doi: 10.1002/glia.23961.
[19] G. Fan *ym.*, ”Microglia Modulate Neurodevelopment in Autism Spectrum Disorder and Schizophrenia”, *International Journal of Molecular Sciences*, vsk. 24, nro 24, Art. nro 24, tammi 2023, doi: 10.3390/ijms242417297.
[20] M. Lee, Y. Lee, J. Song, J. Lee, ja S.-Y. Chang, ”Tissue-specific Role of CX3CR1 Expressing Immune Cells and Their Relationships with Human Disease”, *Immune Network*, vsk. 18, nro 1, tammi 2018, doi: 10.4110/in.2018.18.e5.
[21] K. Ishizuka *ym.*, ”Rare genetic variants in CX3CR1 and their contribution to the increased risk of schizophrenia and autism spectrum disorders”, *Transl Psychiatry*, vsk. 7, nro 8, ss. e1184–e1184, elo 2017, doi: 10.1038/tp.2017.173.
[22] ”(PDF) Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior”, *ResearchGate*, loka 2024, doi: 10.1038/nn.3641.
[23] K. S. Yeung *ym.*, ”Identification of mutations in the PI3K-AKT-mTOR signalling pathway in patients with macrocephaly and developmental delay and/or autism”, *Molecular Autism*, vsk. 8, nro 1, s. 66, joulu 2017, doi: 10.1186/s13229-017-0182-4.
[24] R. M. Busch *ym.*, ”Neurobehavioral phenotype of autism spectrum disorder associated with germline heterozygous mutations in PTEN”, *Transl Psychiatry*, vsk. 9, nro 1, ss. 1–9, loka 2019, doi: 10.1038/s41398-019-0588-1.
[25] R. Bose *ym.*, ”Bi-allelic *NRXN1α* deletion in microglia derived from iPSC of an autistic patient increases interleukin-6 production and impairs supporting function on neuronal networking”, *Brain, Behavior, and Immunity*, vsk. 123, ss. 28–42, tammi 2025, doi: 10.1016/j.bbi.2024.09.001.
[26] S. Montalbano *ym.*, ”Analysis of exonic deletions in a large population study provides novel insights into NRXN1 pathology”, *npj Genom. Med.*, vsk. 9, nro 1, ss. 1–10, joulu 2024, doi: 10.1038/s41525-024-00450-8.
[27] R. Bose *ym.*, ”Bi-allelic *NRXN1α* deletion in microglia derived from iPSC of an autistic patient increases interleukin-6 production and impairs supporting function on neuronal networking”, *Brain, Behavior, and Immunity*, vsk. 123, ss. 28–42, tammi 2025, doi: 10.1016/j.bbi.2024.09.001.
[28] G. Vakilzadeh ja V. Martinez-Cerdeño, ”Pathology and Astrocytes in Autism”, *Neuropsychiatr Dis Treat*, vsk. 19, ss. 841–850, huhti 2023, doi: 10.2147/NDT.S390053.
[29] L. Wang, B. Wang, C. Wu, J. Wang, ja M. Sun, ”Autism Spectrum Disorder: Neurodevelopmental Risk Factors, Biological Mechanism, and Precision Therapy”, *International Journal of Molecular Sciences*, vsk. 24, nro 3, Art. nro 3, tammi 2023, doi: 10.3390/ijms24031819.
[30] P. Ashwood, P. Krakowiak, I. Hertz-Picciotto, R. Hansen, I. Pessah, ja J. Van de Water, ”Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome”, *Brain, Behavior, and Immunity*, vsk. 25, nro 1, ss. 40–45, tammi 2011, doi: 10.1016/j.bbi.2010.08.003.
[31] J. N. Lugo *ym.*, ”Deletion of PTEN produces autism-like behavioral deficits and alterations in synaptic proteins”, *Front. Mol. Neurosci.*, vsk. 7, huhti 2014, doi: 10.3389/fnmol.2014.00027.
[32] B. Xu *ym.*, ”Allelic contribution of Nrxn1α to autism-relevant behavioral phenotypes in mice”, *PLOS Genetics*, vsk. 19, nro 2, s. e1010659, helmi 2023, doi: 10.1371/journal.pgen.1010659.