

*HNF1B*-geenin karakterisointi suomalaisissa  
eturauhassyöpäperheissä

Pro gradu -tutkielma  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteellisen teknologian instituutti  
Toukokuu 2010  
Mimmi Patrikainen

## **ALKUSANAT**

Tämä pro gradu -tutkielma tehtiin Tampereen yliopiston Lääketieteellisen teknologian instituutissa (IMT). Tutkimuksen kokeellinen osuus suoritettiin Johanna Schleutkerin perinnöllistä eturauhassyöpää tutkivassa ryhmässä Lääketieteellisen teknologian instituutissa.

Haluan kiittää Johanna Schleutkeria siitä, että sain mahdollisuuden tehdä tutkielman kokeellisen osuuden ryhmässä. Lisäksi kiitän Johannaa työn tarkistamisesta sekä neuvoista työn aikana. Suuret kiitokset kuuluvat myös ohjaajalleni Tiina Wahlforsille korvaamattomasta avusta työn eri vaiheissa sekä Linda Enrothille asiantuntevista neuvoista laboratoriotyössä. Haluan kiittää myös koko ryhmää käytännön vinkeistä sekä mukavan työilmapiirin luomisesta.

Lopuksi kiitokset perheelleni ja ystäväilleni, jotka ovat kannustaneet minua opiskelujeni aikana sekä erityiskiitokset Henrille tuesta ja kannustuksesta kaikkien opiskeluvuosieni ajan.

Tampere, Toukokuu 2010

Mimmi Patrikainen

## PRO GRADU -TUTKIELMA

**Paikka:** TAMPEREEN YLIOPISTO  
Lääketieteellinen tiedekunta  
Lääketieteellisen teknologian instituutti

**Tekijä:** PATRIKAINEN, MIMMI TIINA TUULIA

**Otsikko:** *HNF1B*-geenin karakterisointi suomalaisissa eturauhassyöpäperheissä

**Sivumäärä:** 79

**Ohjaajat:** FT Tiina Wahlfors, professori Johanna Schleutker

**Tarkastajat:** professorit Johanna Schleutker ja Markku Kulomaa

**Päiväys:** 27.5.2010

---

### TIIVISTELMÄ

**Tutkimuksen tausta ja tavoitteet:** Eturauhassyöpä on miesten yleisin syöpä Suomessa ja muissa länsimaissa ja sen syntyyn vaikuttavat monet tekijät, niin perinnölliset tekijät kuin myös ulkoiset riskitekijät. Perinnöllisen eturauhassyövän osuus on noin 5-10 % kaikista syöpätapauksista, mutta noin 20 % syövistä on todennäköisesti joitakin perinnöllisiä tekijöitä taustalla. Tämä tutkimus perustuu suomalaisella perheaineistolla tehtyyn kytkentätutkimukseen, jossa saatiin vahva kytkentä kromosomaaliseen alueeseen 17q21-22. Tavoitteena oli löytää eturauhassyövälle altistavia muutoksia kandidaattigeenistä *HNF1B*, joka sijaitsee kyseisellä alueella.

**Tutkimusmenetelmät:** Kandidaattigeenin sekvenssi selvitettiin sekvensointimenetelmällä käyttäen ABI PRISM -analysaattoria. Eturauhassyöpään assosioituneita geenimuutoksia tutkittiin suuremmassa aineistossa käyttäen TaqMan<sup>®</sup>-genotyypausmenetelmää. Yhden geenimuutoksen tutkimiseen käytettiin High resolution melting (HMR) -menetelmää, jonka optimointi ja testaus olivat osa tutkimuksen tavoitteita. Tutkimuksen aineistona käytettiin suomalaisia eturauhassyöpäperheitä ja Suomen Punaisen Ristin verenluovuttajat toimivat kontrollinäytteinä. TaqMan<sup>®</sup>-genotyypauksissa aineistona käytettiin Tampereen yliopistollisen sairaalan urologian poliklinikan eturauhassyöpäpotilaiden näytteitä.

**Tutkimustulokset:** Kandidaattigeenistä löytyi kymmenen muutosta, joista kaksi (IVS8-22T>C ja IVS9+444C>A) oli assosioitunut eturauhassyöpään. Lisäksi geenin promoottorialueelta löytyi mielenkiintoinen 16 emäksen toistojakso, jonka toistojen määrät vaihtelivat eri näytteiden välillä.

**Johtopäätökset:** *HNF1B*-geenistä löytyneet, eturauhassyöpään assosioituvat muutokset sijaitsivat intronisella alueella ja 3'UTR-alueella, joten näiden muutosten vaikutus geeniin välittyy todennäköisesti geenin ilmentymiseen säätelyn kautta. Yksityiskohtaisempaa biologista vaikutusta on vaikea ennustaa tämän tutkimuksen perusteella. Promoottorialueelta löytynyt toistojakso sijaitsee alueella, jossa on useiden transkriptiofaktoreiden kiinnittymiskohtia. Sekvenssimuutokset vaikuttavat todennäköisesti transkriptiotekijöiden kiinnittymiseen ja edelleen *HNF1B*:n säätelemien geenien ilmentymiseen. Tarkempia tutkimuksia kuitenkin tarvitaan, jotta voidaan arvioida variaatioiden yhteyttä syöpään.

## MASTER'S THESIS

**Place:** UNIVERSITY OF TAMPERE  
Faculty of Medicine  
Institute of Medical Technology IMT

**Author:** PATRIKAINEN, MIMMI TIINA TUULIA

**Title:** Characterization of *HNFB* gene in Finnish prostate cancer families

**Pages:** 79

**Supervisor:** Doctor Tiina Wahlfors, Professor Johanna Schleutker

**Reviewers:** Professors Johanna Schleutker and Markku Kulomaa

**Date:** 27.5.2010

---

## ABSTRACT

**Background and aims:** Prostate cancer is the most common cancer of males in Finland and in other Western countries and it is a very heterogeneous disease. The most important risk factors are age, race and family history. Proportion of hereditary prostate cancer from all prostate cancer cases is about 5-10 %, but in about 20 % of cancer cases there are some genetic factors behind. This study is based on earlier linkage study, which was performed using Finnish prostate cancer families. Strong linkage to locus 17q21-22 was found in this earlier study. The aim of the study was to find predisposing changes from the sequence of the candidate gene *HNFB*, which maps to concerned chromosomal area.

**Methods:** Candidate gene was sequenced using ABI PRISM -analyzer. Gene variants associated with prostate cancer were investigated in larger sample size using TaqMan<sup>®</sup>-genotyping method. One of the gene variants was studied by High resolution melting (HMR) -method. Optimization and testing of HMR was also one of the aims of the study. Finnish prostate cancer families were used as sample material and control samples were blood donors from the Finnish Red Cross. Samples of urology polyclinic patients from Tampere University Hospital were also used in TaqMan<sup>®</sup>-genotyping.

**Results:** Ten gene variants were found from the candidate gene, of which two (IVS8-22T>C and IVS9+444C>A) were associated with prostate cancer. Moreover there was interesting repeat sequence of 16 base pairs in gene promoter, where the number of repeats varied between different samples.

**Conclusions:** Mutations found from *HNFB* gene that were associated with prostate cancer, were located in intronic and 3'UTR areas of the gene. That suggests the regulative role of these mutations in the gene expression. Based on this study, more detailed biological effect is difficult to predict. Repeat sequence of promoter region is located in the area, where there are binding sites for many transcription factors. Sequence variations probably affect the binding of transcription factors and further the expression of genes regulated by *HNFB*. Nevertheless, more studies are needed to estimate the connection between these variations and prostate cancer.

# SISÄLLYS

LYHENTEET .....	7
1 JOHDANTO .....	8
2 KIRJALLISUUSKATSAUS .....	10
2.1 ETURAUHANEN .....	10
2.1.1 <i>Eturauhasen rakenne ja tehtävät</i> .....	10
2.1.2 <i>Eturauhasen hyvänlaatuinen liikakasvu</i> .....	11
2.1.3 <i>PIN-muutos eturauhassyövän esiasteena</i> .....	12
2.2 ETURAUHASSYÖPÄ .....	13
2.2.1 <i>Prevalenssi</i> .....	13
2.2.2 <i>Riskitekijät</i> .....	14
2.2.3 <i>Perinnöllinen eturauhassyöpä</i> .....	15
2.3 SAIRAUDELLE ALTISTAVIEN RISKIGEEENIEN ETSIMINEN .....	16
2.3.1 <i>Kytentätutkimukset</i> .....	17
2.3.2 <i>Assosiaatiotutkimukset</i> .....	18
2.3.3 <i>Perinnölliselle eturauhassyövälle altistavat geenit</i> .....	19
2.4 KANDIDAATTIGEEENI <i>HNF1B</i> .....	23
2.4.1 <i>HNF1B-geenissä raportoidut mutaatiot</i> .....	24
2.4.2 <i>HNF1B-geenin rakenne ja kromosomialue 17q</i> .....	25
2.4.3 <i>HNF1B:n kohdegeenit</i> .....	25
2.4.4 <i>HNF1B-proteiinin rakenne</i> .....	27
2.4.5 <i>HNF1A ja HNF1B muodostavat dimeerisen rakenteen</i> .....	29
2.4.6 <i>HNF1B-geenin yhteys eturauhassyöpään</i> .....	29
2.4.7 <i>HNF1B yhdistävä tekijä eturauhassyövän ja diabeteksen välillä</i> .....	30
3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET .....	34
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	35
4.1 NÄYTTEET .....	35
4.2 SEKVENSOINTI .....	36
4.2.1 <i>Alukkeiden suunnittelu</i> .....	36
4.2.2 <i>PCR-reaktio</i> .....	38
4.2.3 <i>PCR-tuotteiden geielektroforeesiajo</i> .....	39
4.2.4 <i>PCR-tuotteiden puhdistus</i> .....	39
4.2.5 <i>Sekvensointi-PCR</i> .....	40
4.2.6 <i>Sekvensointi-PCR-tuotteiden puhdistus etanolisaostuksella</i> .....	41
4.2.7 <i>Sekvensointi ABI PRISM -analysointorilla</i> .....	41
4.2.8 <i>Sekvenssin analysointi Sequencer 4.9 -ohjelmalla</i> .....	41
4.3 GENOTYYPPIAUS TAQMAN <sup>®</sup> -MENETELMÄLLÄ .....	42
4.4 GENOTYYPPIAUS HIGH RESOLUTION MELTING (HMR) -MENETELMÄLLÄ .....	43
4.5 TILASTOLLISET ANALYYSIT .....	45

5	TULOKSET .....	47
5.1	SEKVENSOINNIN JA TAQMAN-GENOTYYPPAUKSEN PERUSTEELLA SAADUT TULOKSET .....	47
5.1.1	<i>HNF1B</i> -geenissä havaitut muutokset.....	47
5.1.2	<i>HNF1B</i> -geenin promoottorialueen sekvenssivariaatiot .....	49
5.1.3	Kahden <i>HNF1B</i> -geenin eturauhassyöpään assosioituvan SNP:n genotyypit suomalaisessa väestössä .....	50
5.2	TILASTOLLISET ANALYYSIT .....	51
5.2.1	<i>Hardy-Weinbergin tasapaino</i> .....	51
5.2.2	<i>OR:t ja vaastaavat 95 %:n luottamusvälit</i> .....	51
5.3	ALLEELIFREKVENSSIT .....	53
5.4	HMR-MENETELMÄN OPTIMOINTI.....	54
6	POHDINTA .....	57
6.1	MENETELMIEN TARKASTELU .....	57
6.1.1	<i>Sekvensointi</i> .....	57
6.1.2	<i>Genotyypaus TaqMan-menetelmällä</i> .....	58
6.1.3	<i>Genotyypaus High resolution melting (HMR) -menetelmällä</i> .....	58
6.2	<i>HNF1B</i> :N SEKVENSSISTÄ LÖYTYNEIDEN MUUTOSTEN TARKASTELU .....	60
6.3	<i>HNF1B</i> :N PROMOOTTORIALUEEN SEKVENSSIN TARKASTELU .....	65
6.4	KAHDEN ETURAUHASSYÖPÄÄN YHDISTETYN SNP:N TARKASTELU SUOMALAISSA VÄESTÖSSÄ .....	66
6.5	TUTKIMUKSEN TULEVAISUUS.....	68
7	JOHTOPÄÄTÖKSET.....	70
	LÄHDELUETTELO.....	72

## LYHENTEET

EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, etyleenidiamiinitetraetikkahappo
GWAS	genome-wide association study, genominlaajuinen assosiaatiotutkimus
HMR	high resolution melting, korkean erotuskyvyn sulamisreaktio
HNF1B	hepatocyte nuclear factor-1-beta, maksasoluissa esiintyvä tumatekijä-1-beta
HPLC	high performance liquid chromatography, korkean suorituskyvyn nestekromatografia
HW-tasapaino	Hardy-Weinberg tasapaino
ICPCG	international consortium for prostate cancer genetics, kansainvälinen eturauhassyöpägenetiikan liitto
IGF-1	Insulin-like growth factor1, insuliinin kaltainen kasvutekijä1
LOD	logarithm of odds, logaritminen todennäköisyys
MODY	maturity onset diabetes of the young, perinnöllinen ja nuorilla aikuisilla puhkeava aikuisiän diabetes
miRNA	microRNA, mikro-RNA
mRNA	messenger RNA, lähetti-RNA
OR	odds ratio, ristitulosuhte
PCR	polymerase chain reaction, polymeerasiketjureaktio
PDB	protein data bank, proteiinitietopankki
PIN	prostatic intraepithelial neoplasia, eturauhasen epiteelin patologinen muutos
POU-transkriptiotekijä	Pit-1-, Oct1- ja UNC-86-rakenneyksiköt omaava transkriptiotekijä
pre-mRNA	precursor mRNA, mRNA:n esimuoto
PSA	prostata spesifinen antigeeni
SNP	single-nucleotide polymorphism, yhden nukleotidin polymorfia
TDT-test	transmission disequilibrium test, tilastollisen epätasapainon välittymisen testi

## 1 JOHDANTO

Eturauhassyöpä on tällä hetkellä selkeästi miesten yleisin syöpä ja toiseksi yleisin syöpäkuolemien aiheuttaja Suomessa (Suomen syöpärekisteri, 2009). Myös useimmissa länsimaissa eturauhassyöpä on yleisimmin diagnosoitu syöpä ja sen esiintyvyys on ollut nousussa maailmalajuisesti. Eturauhassyöpä on monitekijäinen tauti, jonka syntyyn vaikuttavat niin perinnölliset tekijät kuin myös ulkoiset riskitekijät. Selkeimpinä riskitekijöinä voidaan pitää korkeaa ikää, etnistä taustaa ja perhehistoriaa taudin suhteen (Schaid, 2004). Eturauhassyöpä kehittyy rauhaskudoksen epiteelisolujen muuttuessa pahalaatuisiksi syöpäsoluiksi, mitä edeltää yleensä PIN-muutos (eng. prostatic intraepithelial neoplasia) eli eturauhasen patologinen muutos (Bostwick ym., 2004).

Perinnöllinen syöpä kattaa noin 5-10 % kaikista eturauhassyövistä, mutta nuorella iällä eturauhassyöpään sairastuneista jopa puolet sairastaa perinnöllistä eturauhassyöpää tai familiaalista syöpää (Carter ym., 1992). Familiaalisessa syövässä tautialttius kulkee suvussa, mutta sairastumistiheys sukulaisten keskuudessa ei täytä perinnöllisen syövän kriteerejä. Perinnölliselle eturauhassyöväälle altistavia geenejä on pyritty tunnistamaan useissa kytkentä- ja assosiaatiotutkimuksissa, mutta kokonaisvaltaisesti tautialttiudesta vastaavia selkeitä riskigenejä ei ole löydetty. Perinnöllinen eturauhassyöpä on todennäköisesti hyvin heterogeeninen tauti, joka on seurausta useista alttiusgeeneistä, jotka mahdollisesti vaikuttavat yhdessä elämäntapaan liittyvien riskitekijöiden kanssa (Macinnis ym., 2009). Kun oikeat geenimuutokset yhdistyvät, niiden kerrannaisvaikutus voi olla suuri ja aiheuttaa suuren riskin sairastua eturauhassyöpään.

Tässä työssä tutkittiin kromosomialueella 17q12 sijaitsevaa geeniä *HNF1B* (hepatocyte nuclear factor-1-beta) suomalaisessa perheaineistossa. Suomalaisella perheaineistolla tehty genomilaajuinen kytkentätutkimus (George ym., käsikirjoitus) osoitti vahvan kytkennän (LOD-arvo 3,6) kromosomialueeseen 17q21-22 kuudessatoista eturauhassyöpäperheessä. *HNF1B*-geeni oli jo aikaisemmin yhdistetty suurentuneeseen eturauhassyöpäriskiin neljän SNP-muutoksen rs4239217, rs757210 (Gudmundsson ym., 2007), rs4430796- ja rs11649743 (Sun ym., 2008) osalta, joten geeniä haluttiin tutkia myös suomalaisessa aineistossa. *HNF1B* on transkriptiotekijä, joka vaikuttaa ainakin maksan, munuaisten ja sukupuolirauhasten muodostumiseen alkionkehityksen



aikana sekä myöhemmin edellä mainittujen elinten toimintojen ylläpitoon (Lu ym., 2007).

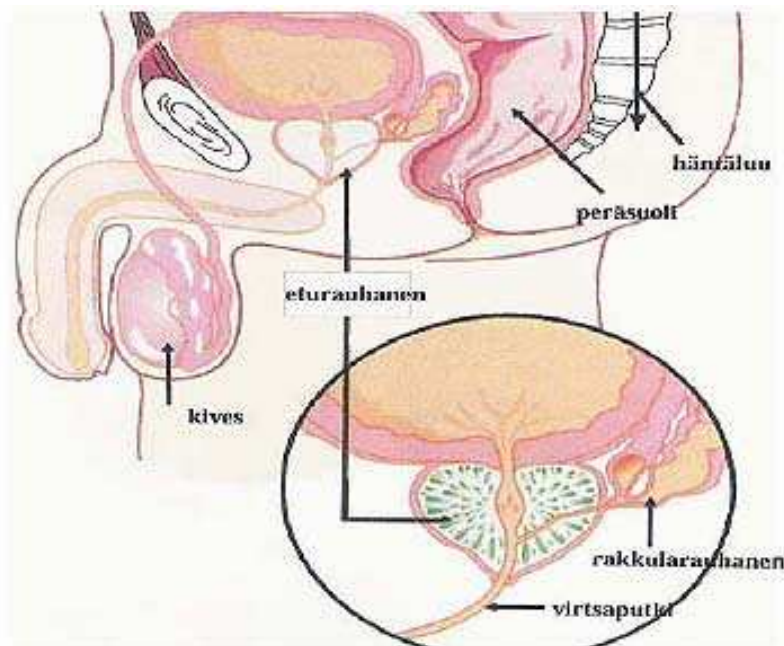
Lisäksi työssä testattiin High resolution melting (HMR) -menetelmää ja sen soveltuvuutta sekvensointia korvaavaksi menetelmäksi. HMR-menetelmä perustuu eri genotyyppien erilaiseen DNA:n sulamislämpöön. DNA:n kaksoiskierteinen rakenne sitoo fluoresoivaa väriainetta, joka DNA-juosteiden erotessa voidaan havaita. Eri näytteiden genotyypit voidaan erottaa erilaisen sulamiskäyrän perusteella. Menetelmä on nopea tapa erottaa suuresta näyttemäärästä erilaiset genotyypit ja se vähentää sekvensointireaktioiden määrää.

## 2 KIRJALLISUUSKATSAUS

### 2.1 Eturauhanen

#### 2.1.1 Eturauhasen rakenne ja tehtävät

Eturauhanen (Kuva 1) on miesten lisäsuokupolirauhanen. Se on kooltaan noin luunun kokoinen ja sijaitsee virtsarakon alapuolella virtsaputken ympärillä. Eturauhanen muodostuu noin viidestäkymmenestä pikkurauhasesta, jotka laskevat parinkymmenen tiehyen kautta virtsaputkeen. Rauhasen välissä on sileitä lihassyitä sekä runsaasti sidekudosta, jonka määrä kasvaa miehen vanhetessa. Virtsaaminen voikin olla vanhemmilla miehillä vaikeutunut eturauhasen suurenemisen takia. (Nienstedt ym., 1999, 438.)



*Kuva 1.* Eturauhasen poikkileikkaukkuva. Eturauhassyöpöpotilaiden tuki ry:n (ERSY:n) verkkosivu, <http://www.psa.fi/images/poikkileikkaus.jpg>

Eturauhasesta voidaan anatomisesti erottaa erilaisia vyöhykkeitä: etuvyöhyke, keskusvyöhyke, välivyöhyke sekä perifeerinen vyöhyke. Etuvyöhykkeessä ei ole lainkaan rauhas kudosta, vaan se koostuu side- ja lihaskudoksesta. Pääosan eturauhasesta muodostavat keskusvyöhyke ja perifeerinen vyöhyke. Virtsaputkea ympäröivät alueet muodostavat välivyöhykkeen. Eturauhasen hyvänlaatuinen

liikakasvu saa alkunsa välivyöhykkeen alueelta, kun taas valtaosa eturauhassyövistä saa alkunsa perifeerisen vyöhykkeen alueella. (Nurmi ym., 2002.)

Syntymän aikaan eturauhanen painaa noin 1 g, josta se alkaa vähitellen kasvaa saavuttaen noin 4 g painon 12 vuoden iässä. Puberteetti-iässä miessukupuolihormonien erityksen lisääntyessä eturauhanen kasvaa voimakkaasti ja painaa lopulta noin 15 - 20 g. Neljäkymmenen ikävuoden jälkeen eturauhasen hyvänlaatuinen liikakasvu saa aikaan eturauhasen voimakkaan painon kasvun, joka kuitenkin määrältään ja nopeudeltaan on hyvin yksilöllistä. Suurimmillaan eturauhanen voi tällöin painaa jopa satoja grammoja. (Nurmi ym., 2002.)

Eturauhanen on lisäsukupuolirauhanen, jonka tehtävä on muodostaa ja varastoida siemennestettä. Valtaosa siemennesteestä muodostuu parillisissa rakkularauhasissa, joista se purkautuu rauhastiehyitä pitkin virtsaputken alkuosaan. Eturauhasen tuottama rauhaserite muodostaa noin yhden neljäsosan siemennesteen tilavuudesta. Rauhaserite sisältää siittiöiden tarvitsemia ravinteita sekä niiden liikkumiskyvyn kannalta tärkeitä yhdisteitä. Eturauhanen erittää myös prostataspesifistä antigeeniä (PSA), jonka proteaasientsyymi liuottaa geelimäisen siemennesteen juoksevaan muotoon. Prostataspesifisen antigeenin määrä veressä voidaan mitata ja siitä on tullut merkittävä eturauhassyövän merkkiaine, koska veren PSA-taso on eturauhassyöpää sairastavilla usein koholla. (Nurmi ym., 2002.)

### 2.1.2 Eturauhasen hyvänlaatuinen liikakasvu

Eturauhasen hyvänlaatuinen liikakasvu on normaali ikääntymiseen liittyvä ilmiö, joka on todettavissa 80 %:lla yli 60-vuotiaista miehistä (Saarelma, 2010). Näistä noin 40 % kärsii liikakasvun aiheuttamista oireista. Hyvänlaatuinen liikakasvu on seurausta eturauhasen välivyöhykkeen epiteelin sekä välivyöhykettä tukevan side- ja lihaskudoksen liikakasvusta (Bostwick ym., 2004). Ainoa tunnettu eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvun riskitekijä on ikä. Mikäli miessukupuolihormonien tuotanto on vähentynyt, liikakasvun riski on normaalia pienempi (Saarelma, 2010).

Suurentuneen eturauhasen oireet johtuvat siitä, että virtsarakon alapuolella oleva eturauhanen kasvaessaan sekä painaa virtsarakon pohjaa että ahtauttaa rauhasen läpi

kulkevaa virtsaputkea. Lisäksi eturauhasen kasvu vaikuttaa virtsarakon kaulan ja rauhasen lihaksiston toimintaan. Yhdessä nämä tekijät haittaavat rakon toimintaa ja vaikeuttavat virtsan eritystä. Virtsan kerääntymisongelmat ilmenevät tihentyneenä virtsaamistarpeena. Eturauhasen hyvänlaatuinen liikakasvu ei ole terveydelle vaarallista, mutta oireet voivat olla kiusallisia ja niitä voidaan hoitaa. (Saarelma, 2010.)

### 2.1.3 PIN-muutos eturauhassyövän esiasteena

PIN-muutos (eng. prostatic intraepithelial neoplasia) eli eturauhasen patologinen muutos on mitä todennäköisin eturauhasen adenokarsinooman esiaste. PIN-termiä käytetään nykyään kuvaamaan korkean arvon PIN-muutosta (HGPN, eng. high grade PIN) erotuksena matalan arvon PIN-muutoksesta, jota ei voida suoraan yhdistää kasvaimen muodostukseen. Eturauhasen hyvänlaatuinen liikakasvu saa alkunsa välivyöhykkeen alueelta, kun taas valtaosa eturauhassyövästä saa alkunsa perifeerisen vyöhykkeen alueella. Adenokarsinooma-kasvaimet kehittyvät perifeerisen vyöhykkeen rauhaskudoksen epiteelisoluista niiden muuttuessa pahanlaatuisiksi. PIN-muutos kuvaa solun jakautumista, joka edeltää pahanlaatuista ja invasiivista syövässä tavattua kasvua. PIN-muutos kertoo häiriöistä solun erilaistumisessa ja solusyklin säätelyssä ja muutoksella kuvataan tilannetta normaalin eturauhasepiteelin ja syövän välillä. Eturauhasen tiehyissä tapahtuu sytologisia muutoksia, kuten tuman kasvua, jotka muistuttavat syövässä tapahtuvia ilmiöitä. PIN-muutoksessa epiteelisolujen kasvu suuntautuu tyvisoluista solun lumenin puolelle, mikä on päinvastainen ilmiö solujen normaalille kasvulle. (Bostwick ym., 2004.)

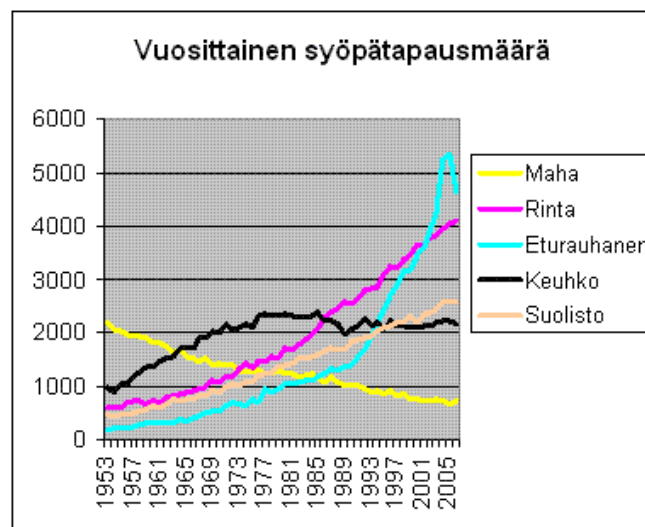
PIN-muutos ei nosta merkittävästi seerumin PSA-konsentraatiota, joten muutos voidaan havaita vain eturauhasesta otetusta koepalasta. PIN-muutoksia löydetään noin 9 %:ssa otetuista eturauhasen koepaloista ja PIN-löydöksen jälkeen syöpä kehittyy yleensä noin kymmenen vuoden kuluessa. Mitä korkeammalla iällä PIN-muutos löydetään, sitä nopeammin potilaalle yleensä kehittyy eturauhassyöpä. Vanhemmilla miehillä karsinooma kehittyy usein jopa viiden vuoden sisällä PIN-muutoksen löytymisestä. (Bostwick ym., 2004.)

## 2.2 Eturauhassyöpä

Eturauhassyöpä on tällä hetkellä selvästi miesten yleisin syöpä Suomessa ja toiseksi yleisin miesten syöpäkuolemien aiheuttaja keuhkosityövän jälkeen (Suomen syöpärekisteri, 2009). Arviolta joka kymmenes mies tulee elinaikanaan sairastumaan eturauhassyöpään. Todennäköisesti eturauhassyövän syntyyn vaikuttavat yhdessä geneettiset tekijät, endogeeniset hormonit sekä ympäristötekijät. Perimä on kuitenkin yksi selkeimmistä riskitekijöistä ja tutkimuksissa on voitu osoittaa, että suvussa useat eturauhassyöpään sairastuneet nostavat selkeästi vielä terveiden miesten riskiä sairastua.

### 2.2.1 Prevalenssi

Eturauhassyöpä on yleisimmin diagnosoitu syöpä useimmissa länsimaissa ja sen esiintyvyys on ollut nousussa. Eturauhassyövän yleisyydessä on kuitenkin suuria eroja eri maiden välillä. Eniten eturauhassyöpää sairastetaan USA:ssa Kanadassa, Ruotsissa, Australiassa ja Ranskassa, kun taas Aasian maissa sitä on tavattu vain vähän (Schaid 2004). Suomessa eturauhassyöpä on tällä hetkellä selvästi miesten yleisin syöpä ja toiseksi yleisin miesten syöpäkuolemien aiheuttaja keuhkosityövän jälkeen (Suomen syöpärekisteri, 2009). Kuvassa 2 on esitetty vuosittainen syöpätapausten kasvu Suomessa vuosina 1953 - 2005 yleisimpien syöpien osalta. Kuvasta voi nähdä, miten eturauhassyöpä on yleistynyt huomattavasti verrattaessa muihin yleisiin syöpätauteihin.



Kuva 2. Yleisimpien syöpätautien määrät ja niiden muutokset Suomessa vuosina 1953 - 2006. (Suomen syöpärekisteri, 2009. <http://www.cancerregistry.fi/tilastot/AID91.html>)

Myös Yhdysvalloissa eturauhassyöpä on yleisimmin diagnosoitu syöpä miehillä ja esiintymistiheys on noussut huomattavasti viimeisen 20 vuoden aikana. Yleistymisen voidaan selittää osittain PSA-seulonnan aloittamisella, jolloin suurempi osa syöivistä pystytään diagnosoimaan. Vuoden 2001 jälkeen eturauhassyöpä on kuitenkin yleistynyt Yhdysvalloissa noin 4,4 % vuosittain, mitä ei voida selittää pelkästään seulonnan lisäyksellä. Myös Yhdysvalloissa eturauhassyöpä aiheuttaa toiseksi eniten syöpäkuolemia miehillä. (American Cancer Society, 2009.)

### 2.2.2 Riskitekijät

Eturauhassyöpä on monitekijäinen sairaus, jossa selviä riskitekijöitä ovat ikä, etninen tausta ja perhehistoria taudin suhteen (Schaid 2004). Tämän lisäksi myös muita eturauhassyövän syntyyn vaikuttavia tekijöitä on esitetty, kuten hormonit, ruokavalio ja fyysinen aktiivisuus. On myös viitteitä siitä, että eturauhasen tulehdukset voisivat edistää eturauhassyövän kehittymistä (Nelson ym., 2004). Eturauhassyöpä on vanhojen miesten sairaus ja noin 80 % syöivistä diagnosoidaan yli 65-vuotiailla miehillä (Carter & Coffey 1990). Myös esiintyvyys lisääntyy huomattavasti miesten iän mukana. Nuorena diagnosoitu eturauhassyöpä on taas todennäköisesti perinnöllistä eturauhassyöpää (Carter ym., 1992). Suomessa uusia syöpätapauksia on diagnosoitu eniten 70 - 74 -vuotiaiden ikäryhmässä vuosina 2003 - 2007 (Suomen syöpärekisteri, 2009).

Eri etnisten ryhmien välillä on suuria eroja riskissä sairastua eturauhassyöpään. Etenkin afrikkalaista alkuperää olevalla väestöllä näyttäisi olevan suurempi riski sairastua syöpään verrattuna valkoihoiseen väestöön (Monroe ym., 1995). Tutkimuksissa on osoitettu, että myös afrikkalaista alkuperää olevien keskuudessa perhehistorialla on suuri vaikutus sairastumisriskiin, mikä viittaa siihen, että positiivisella perhetaustalla on etnisyyttä suurempi vaikutus sairastumisalttiuteen (Monroe ym., 1995). Suurin osa eturauhassyöivistä on sporadisia, mutta noin 5 - 10 % syöivistä positiivisella perhetaustalla on vaikutusta taudin syntyyn. Mitä läheisempi sukulaissuhde henkilöllä on eturauhassyöpään sairastuneisiin ja mitä useampi perheenjäsen on sairastunut, sitä suurempi riski henkilöllä on sairastua. Eturauhassyöpäriski siis kasvaa sairastuneiden sukulaisten määrän mukaan. Esimerkiksi miehellä, jonka ensimmäisen asteen sukulaisista (isä tai veli) kolme tai useampia on sairastunut eturauhassyöpään, on 11-

kertainen riski sairastua verrattuna mieheen, jolla ei ole positiivista perhetaustaa taudin suhteen (Steinberg ym., 1990).

Eturauhassyöpään sairastuneen henkilön perhetaustaan perustuen voidaan tauti luokitella joko perinnölliseksi, familiaaliseksi tai sporadisiksi syöväksi. Carter ym. (1992) kuvasivat ensimmäisenä perinnöllisen eturauhassyövän, jossa vähintään yksi seuraavista kriteereistä tuli täyttyä: 1) kolme tai useampi ensimmäisen asteen sukulainen on sairastunut, 2) eturauhassyöpää on tavattu kolmessa sukupolvessa isän tai äidin puolella tai 3) kaksi ensimmäisen asteen sukulaisista on sairastunut 55-vuotiaana tai aikaisemmin. Familiaalisessa syövässä ei ole näin tarkasti määriteltyjä kriteerejä, mutta perheet, joissa kaksi ensimmäisen asteen sukulaista on sairastunut tai yksi ensimmäisen asteen ja kaksi tai useampia toisen asteen sukulaista on sairastunut, luokitellaan familiaalista syöpää kantaviksi perheiksi (Carter ym., 1992). Nuorella iällä eturauhassyöpään sairastuneista noin 40 - 50 % tapauksista on kyse familiaalisesta syövästä ja arviolta noin 10 - 20 % kaikista eturauhassyövistä on familiaalista eturauhassyöpää.

### 2.2.3 Perinnöllinen eturauhassyöpä

Morganti ym. (1956) raportoivat eturauhassyövän esiintymisestä perheittäin jo 1956, mutta varsinaisesti perinnöllisestä eturauhassyövästä puhuttiin vasta ensimmäisten segregaatioanalyysien julkaisun jälkeen 1992 (Carter ym., 1992). Tämän jälkeen useita eturauhassyövän periytymistä käsittelevää tutkimusta on julkaistu. Useat tutkimukset käyttävät segregaatioanalyysiä selittämään eturauhassyövän suvuttaista periytymistä erilaisin geneettisin mallein. Monissa tutkimuksissa esitettiin mallia, jossa tautialttius selitettiin harvinaisilla dominantisesti perityvillä riskialleleilla yhdessä tai useammassa geenissä aiheuttaen korkean elinikäisen sairastumisriskin eturauhassyöpään (Carter ym., 1992, Gronberg ym., 1997a, Schaid ym., 1998).

Myöhemmin on kuitenkin osoitettu, että erilaiset mallit tarjoavat paremman selityksen taudin suvuttaiseen esiintymiseen. Sairastumisriskiä parhaiten kuvaaviin malleihin kuuluu resessiivisen periytyvyyden malli (Pakkanen ym., 2007) sekä dominantin ja resessiivisen tai dominantin ja X-kromosomaalisen periytyvyyden malli (Cui ym., 2001). Cui kollegoineen on esittänyt, että dominantisti periytyvät geenit lisäävät

sairastumisriskiä nuorella iällä, kun taas resessiivisesti periytyvät tai X-kromosomaaliset geenit nostavat sairastumisriskiä vanhemmalla iällä. Kahden tai useamman geenin synergistinen vaikutus on myös kuvattu heterogeenisen periytyvyyden mallissa, jossa vaikuttaa kaksi tai kolme dominanttigeeniä (Conlon ym., 2003).

Monilla kytkentätutkimuksilla on pyritty tunnistamaan korkean riskialttiuden geenejä perheistä, joissa on useita eturauhassyöpään sairastuneita. Useita tautiin kytkeytyneitä kromosomialueita on löydetty näissä tutkimuksissa, mutta varsinaisesti uusia eturauhassyöville altistavia geenejä ei ole löydetty kytkentätutkimusten perusteella (Schaid, 2004). Myös assosiaatiotutkimuksilla on pyritty tunnistamaan yleisiä eturauhassyövän riskiin liittyviä geenivariaatioita ja monia kandidaattigeenejä on tutkittu liittyen näihin assosiaatiotutkimuksiin. Tutkimustulokset kuitenkin viittaavat siihen, että suvuittain esiintyvä eturauhassyöpä on todennäköisesti seurausta useista alttiusgeeneistä, jotka mahdollisesti vaikuttavat yhdessä elämäntapaan liittyvien riskitekijöiden kanssa. Todennäköisesti yksi tai useampi geeni vastaa vahvasta resessiivisesti periytyvästä riskistä sairastua eturauhassyöpään, jonka lisäksi monilla geenivarianteilla voi olla heikko vaikutus taudin riskialttiuteen (Macinnis ym., 2009). Kun oikeat geenivariantit yhdistyvät, niiden kerrannaisvaikutus voi olla suuri ja aiheuttaa suuren riskin sairastua eturauhassyöpään.

### 2.3 Sairaudelle altistavien riskigeenien etsiminen

Mielenkiinnon kohteena oleva kromosomikohta paikannetaan yleensä ensin koko genomilaajuisella tutkimuksella. Ensimmäisessä vaiheessa analysoidaan yleensä noin 400 mikrosatelliittimarkkeria, jotka sijoittuvat tasaisin välein kromosomeihin. Aineistoksi otetaan mahdollisimman suuri määrä perheitä, joissa on monia sairauden kantajia yhtä perhettä kohti. Jos jokin markkeri eli geenimerkki osoittaa kytkennän tiettyyn kromosomipaikkaan, kyse voi olla tautigeenin läheisyydestä. Tulokset tulee kuitenkin analysoida huolellisesti ja kytkentä tulee osoittaa tilastollisesti todennäköiseksi.

Yleensä kytkentälöydöstä seuraa mikrosatelliittimarkkerikartan tihentäminen kyseisellä kromosomialueella kytkentätuloksen varmistamiseksi ja alueen tarkempien rajojen



löytämiseksi. Tämän jälkeen voidaan valita kandidaattigeeni löydetyltä alueelta kromosomista ja tutkia geeniä sairastuneiden ja kontrollihenkilöiden (tapaus-verrokki - aineisto) avulla alleeli-assosiaation löytämiseksi. Kandidaattigeenianalyysissä geenejä tutkitaan yleensä yksi tai muutama kerrallaan. Geenit valitaan sen perusteella, mitä tiedetään aikaisempien tutkimusten perusteella geenituotteen toiminnasta. Kandidaattigeenitutkimuksen heikkouksia ovat mahdollisten kandidaattigeenien suuri määrä, jolloin tutkittavan geenin valinta useiden mahdollisten joukosta voi olla hankalaa.

### 2.3.1 KytKentätutkimukset

Perinteinen lähestymistapa periytyvien riskigeenien etsimiseksi on kytKentäanalyysi, jossa perhemateriaalien avulla pyritään paikantamaan taudille altistavia geenejä. Geneettiset kytKentäanalyysit perustuvat rekombinaatiotapahtumien hyödyntämiseen. On todennäköistä, että DNA-juosteiden vaihtoa tapahtuu toisistaan kaukana sijaitsevien geenien välillä, kun taas rekombinaatio lähekkäin toisiaan sijaitsevan geenin välillä on harvinaisempaa. Lokusten välisten rekombinaatioiden määrää voidaan käyttää lokusten välisten geneettisten etäisyyksien laskemiseen.

Meioosin eli sukusolujen jakautumisen jälkeen solut sisältävät vain yhden kappaleen jokaista kromosomia. Perintöaineksen jakamiseksi homologiset kromosomit yhdistyvät keskenään. Jakautumisessa tapahtuu rekombinaatioita eli DNA-juosteen vaihtoa kahden kromosomin välillä. Jokaisen meioosin aikana tapahtuu noin 30–40 uudelleenjärjestymistä, mikä vastaa muutamaa rekombinaatiota jokaisen kromosomin osalta. Lokukset ovat kytkettyneet jos ne periytyvät yhdessä, johtuen fyysikaalisesta tai geneettisestä läheisyydestä. Geneettisessä kytKentäanalyysissä yleisimmin käytettyjä geenivariantteja ovat mikrosatelliitit. Niiden avulla voidaan seurata markkerin periytymistä perheissä. Geenimarkkeri, joka on geneettisessä kytKennässä sairautta aiheuttavan mutaation kanssa, periytyy suurella todennäköisyydellä yhdessä mutaation kanssa sairauden kantajalle. Kun sairauden ja geenimarkkerin välinen kytKentä on löydetty, sairautta aiheuttava geeni ja mutaatiot pyritään seuraavaksi paikantamaan.

Monogeenisiä sairauksia aiheuttavat mutaatiot periytyvät klassisten Mendelin sääntöjen mukaan, mutta tällaiset mutaatiot ovat yleensä harvinaisia populaatiossa. Yhden geenin

aiheuttamille sairauksille on tyypillistä korkea penetranssi, eli vain hyvin harvoin seuraavan sukupolven mutaationkantaja ei sairastu. Lisäksi on erittäin harvinaista, etteivät kaikki perheen sisällä sairastuneet kantaisi sairaudelle altistavaa mutaatiota. Monogeenisten sairauksien geneettisistä erikoispiirteistä johtuen klassinen parametrinen kytkentäanalyysi sopii näiden tautien geenien paikantamiseen yleensä erinomaisesti.

Eturauhassyövälle altistavien geenien etsimisessä ei voida käyttää klassista kytkentäanalyysiä, koska periytymismalli ei noudata tunnettuja periytymissääntöjä ja useimpien geenien kohdalla penetranssi on alhainen. Monitekijäisten tautien kytkentäanalyysiä varten on käytössä ei-parametrisia analyysimuotoja, jotka yleensä testaavat geenimarkkereiden alleelien periytymistä taudinkantajille perheen sisällä (Lander & Schork, 1994). Jos taudinkantajat jakavat identtisiä geenimarkkerialleleja perheissä useammin kuin tilastollisesti on odotettavissa, kyseessä voi olla kytkentä taudin ja kyseisen geenimarkkerin välillä. Monitekijäisen sairauden kytkentäanalyysiin tarvitaan suuri määrä perheitä tai sairaita sisaruspareja, koska taudin heterogeenisyys ja todennäköinen tautigeenien yleisyys väestössä heikentävät analyysin tehokkuutta. Kytkentäanalyysin heikkona puolena on myös suhteellisen vähäinen tutkittavien rekombinaatioiden määrä, koska useimmissa tapauksissa monien sukupolvien näytteitä ei ole saatavilla samanaikaisesti. (Collins, 2009.)

### 2.3.2 Assosiaatiotutkimukset

Yleisimmin käytetty assosiaatiotutkimus on niin kutsuttu tapaus-verrokkitutkimus, jossa geenimarkkerin alleelifrekvenssejä seurataan kahden ryhmän välillä. Polymorfia assosioituu sairauteen, jos sen alleelifrekvenssit poikkeavat merkitsevästi ryhmien välillä. Äärimmäisen tärkeää geneettisessä tapaus-verrokkitutkimuksessa on ryhmien valinta siten, että ne edustavat samaa geneettistä taustaa ja että osallistuvat koehenkilöt eivät ole lähisukulaisia keskenään (Cardon & Bell, 2001, Lander & Schork, 1994). Jos kyseisiä asioita ei huomioida ryhmiä valittaessa, merkitsevän eron löytyminen saattaa johtua väestöjen alleelifrekvenssien eroista, eikä suinkaan markkerialleelin assosiaatiosta taudinaiheuttajamutaatioon tai altistavaan geenimarkkeriin.

Assosiaatiotutkimus on tehokas menetelmä monitekijäisen sairauden taustalla olevien geenien tunnistamiseksi, jos tutkittava geenimarkkeri on riittävän lähellä taudille altistavaa geenivariaatiota ja kytkentäepätasapainossa tämän kanssa. Suurin osa eturauhassyöpään assosioituvista geenivarianteista ei varsinaisesti aiheuta syöpää, vaan pikemminkin lisää alttiutta sairastua. Tämän takia analysoitavien ryhmien on oltava tarpeeksi suuria, jotta analyysi olisi riittävän tehokas heikkojen assosiaatioiden havaitsemisessa (Cardon & Bell, 2001). Tutkittavien ryhmien valintaan liittyvät ongelmat voi myös ratkaista käyttämällä perheen sisäisiä verrokkeja, kuten esimerkiksi TDT-analyysiä (transmission disequilibrium test) tai genotyypiltään eroavien sisarusten analyysiä (Cardon & Bell, 2001). TDT-analyysissä tutkitaan kolmen henkilön perimää eli sairaan perheenjäsenen lisäksi tarvitaan vanhempien DNA-analyysi. TDT perustuu siihen, että lapsen todennäköisyys periä jokin tietty alleeli toiselta vanhemmalta on 50 prosenttia, kun taas taudinaiheuttaja-alleeli (tai altistava alleeli) tai taudinaiheuttaja-alleelin kanssa kytkentäepätasapainossa oleva alleeli periytyy useammin.

### 2.3.3 Perinnölliselle eturauhassyövälle altistavat geenit

Useat tutkimusryhmät ovat keränneet perheaineistoja eri populaatioista, joiden avulla on yritetty paikantaa eturauhassyövälle altistavia genejä. Ensimmäinen eturauhassyövälle altistava lokus (HPC1, 1q24-25) löydettiin genomilaajuisissa kytkentätutkimuksissa Yhdysvalloissa vuonna 1996 (Smith ym., 1996). HPC1-lokus oli kytkeytynyt eturauhassyöpään yhdessä kolmasosassa tutkituista 79 pohjoisamerikkalaisesta ja 12 ruotsalaisesta perheestä. HPC1:n yhteys eturauhassyöpään oli vallitseva perheissä, joissa syöpä oli puhjennut nuorella iällä ja se voitiin parhaiten tunnistaa suurista perheistä, joissa oli monia sairastuneita henkilöitä (Gronberg ym., 1997b). Monet analyysit tämän jälkeen ovat varmistaneet alttiusgeenin paikantumisen kromosomialueelle 1q24-25 (Cooney ym., 1997), mutta toisaalta toisissa tutkimuksissa tätä yhteyttä ei ole nähty (McIndoe ym., 1997, Schleutker ym., 2000). Jo ensimmäisestä eturauhassyöpään yhdistetystä alttiusgeenistä voitiin päätellä eturauhassyövän geneettinen heterogeenisyys.

Vuonna 2002, kuusi vuotta alkuperäisen kytkentätutkimuksen jälkeen, *RNASEL*-alttiusgeeni löydettiin kromosomialueelta 1q24-25 (Carpten ym., 2002). Kahden mutaation, Glu265X ja Met1Ile, raportoitiin periytyvän HPC1-kytkeytyneissä

eturauhassyöpäperheissä. Suomalaisissa eturauhassyöpäperheissä Glu265X-muutos on yhdistetty kohonneeseen syöpäriskiin perheissä, joissa on vähintään neljä sairastunutta (Rökman ym., 2002). Mutaation ei kuitenkaan voitu osoittaa periytyvän eturauhassyöpäperheissä, koska mutaationkantajia oli yhtä paljon sairastuneissa ja terveissä kontrolleissa ja vain viisi henkilöä 350 tutkitusta henkilöstä oli kantajia (Wiklund ym., 2004). *RNASEL*-geenistä on löydetty useita polymorfisia kohtia harvinaisten mutaatioiden lisäksi. Arg462Gln on yleinen missense muutos, joka on yhdistetty sekä kohonneeseen (Rökman ym., 2002) että alentuneeseen eturauhassyöpäriskiin (Nakazato ym., 2003). Tuloksista voitiin päätellä, että *RNASEL* voi selittää vain pienen osan kaikista familiaalisista eturauhassyöpätapauksista. Glu265X on ainoa merkittävä geenin alueelta löytynyt mutaatio ja sekin segregoituu taudin kanssa vain muutamissa tutkituissa perheissä.

Toinen eturauhassyövälle altistava lokus PCAP löydettiin ranskalaisilla ja saksalaisilla perheillä tehdyissä genomilaajuisissa kytKentätutkimuksissa. PCAP paikannettiin kromosomialueeseen 1q42.2-43 (Berthon ym., 1998). Tätä lokusta tutkittiin myös muissa populaatioissa, mutta vahvistusta kytkennälle ei löytynyt muissa aineistoissa, tai yhteys oli hyvin heikko. Kyseinen lokus on mahdollisesti eturauhassyövälle altistava näissä kahdessa ranskalaisessa ja saksalaisessa populaatiossa, mutta tulosta ei voida yleistää maailmanlaajuisesti.

Kolmas eturauhassyöpään yhdistetty lokus HPCX löydettiin tutkimalla pohjoisamerikkalaisia, ruotsalaisia ja suomalaisia perheaineistoja. Näissä kytKentätutkimuksissa tunnistettiin X-kromosomin lokus q27-28, joka oli kytkeytynyt noin 16 %:iin perheistä (Xu ym., 1998). Suomalaisessa väestössä kytkeytyneisyys oli jopa 40 % ja vahvin tulos saatiin perheistä, joissa tauti periytyi äidin puolelta ja diagnoosi-ikä oli myöhäinen (>65 vuotta) (Schleutker ym., 2000). Myös saksalaisessa väestössä noin 40 % tutkituista eturauhassyöpäperheistä oli kytkeytyneitä *HPCX*-alueeseen (Paiss ym., 2001), mutta tutkimukset muissa populaatioissa eivät ole antaneet vahvistusta *HPCX*-alueen kytkeytyneisyydelle (Bergthorsson ym., 2000). On viitteitä siitä, että *HPCX*-alueen mutaatioilla voisi olla osuutta myös sporadisissa eturauhassyöpätapauksissa. Segregaatio-analyyseihin perustuen eturauhassyövälle oli jo aikaisemmin ehdotettu X-kromosomaalista periytymistapaa (Monroe ym., 1995).

*HPCX*-lokukseen kytkeytyneisyys eturauhassyöpään vahvistaisi tätä olettamusta, jolloin syöpäalttius periytyisi maternaalisesti.

Tutkimalla sukuja, joissa on eturauhassyövän lisäksi esiintynyt aivokasvaimia, löydettiin neljäs eturauhassyövälle altistava lokus, *CAPB*, kromosomialueelta 1p36 (Gibbs ym., 1999). Aivojen ja keskushermon syöpien oli jo aikaisemmin huomattu esiintyvän perheissä, joissa on alttius myös eturauhassyöpään (Goldgar ym., 1994). *CAPB*-lokus voisi ainakin osittain selittää yhteyden näiden syöpien välillä. Myös negatiivisia tuloksia *CAPB*-geenin kytkeytyvyydestä on raportoitu, eikä lokus ole merkittävässä roolissa myöskään suomalaisen väestön syöpäriskin lisääjänä.

Vuonna 2001 Utahissa tehtiin genomilaajuinen kytkentäanalyysi kahdeksalle suurelle eturauhassyöpäperheelle, jolloin paljastui kromosomilokuksen 17p11 (*HPC2*) yhteys eturauhassyöpään. Utahin perheaineiston perusteella löydettiin kaksi periytyvää mutaatiokohtaa 1641insG ja Arg781His *ELAC2*-geenistä, joka oli ensimmäinen kandidaattigeeni kromosomikohdassa 17p11.2. Insertio 1641insG katkaisee yhden kolmasosan proteiinista, joka on rakenteeltaan hyvin konservoitunut ja jota voidaan löytää lähes jokaisesta ihmisen kudoksesta (Tavtigian ym., 2001). *ELAC2*:n yli-ilmentyminen syöpäsoluissa voi aiheuttaa solusyklin häiriöitä ja G2-vaiheen solujen lisääntymistä aiheuttaen epäsäännöllistä solunjakautumista ja kasvainten muodostumista (Korver ym., 2003). Suomalaisesta perheaineistosta ei kuitenkaan löytynyt *ELAC2*:n 1641insG- ja Arg781His-mutaatioita (Rökman ym., 2001).

Jo ensimmäisessä genomilaajuisessa kytkentätutkimuksessa vuonna 1996 nousi esiin muitakin kromosomikohtia kuin eniten tutkittu 1q24-25. Yksi näistä alueista oli 8p22-p23. Xu ym. (2001c) tutkivat kyseistä aluetta kytkentäanalyysillä, jossa oli mukana 159 eturauhassyöpäperhettä. Erityisesti perheet, joissa syöpädiagnoosi oli tehty vanhemmalla iällä (>65 vuotta), olivat kytkeytyneitä tähän lokukseen. Eturauhassyövän yhteys lokukseen on myöhemmin todistettu monissa tutkimuksissa (Wiklund ym., 2003). Kytkentäanalyysin jälkeen löydettiin eturauhassyöpäperheissä periytyviä mutaatioita geenistä *MSR1*, joka paikantui kromosomikohtaan 8p22 (Xu ym., 2002). *MSR1* on solukalvon läpäisevä proteiini, joka toimii reseptorina monille polyanionisille ligandeille, kuten bakteereille. *MSR1*-geeni ei ilmene eturauhaskudoksessa, vaan normaalisti se löydetään vain makrofageista (Rökman, väitöskirja 2004). Kyseinen

geeni on jo toinen eturauhassyöpään yhdistetty geeni, joka toimii myös immuunipuolustuksessa. Tämä viittaisi siihen, että eturauhasen tulehduksilla olisi yhteys syövän muodostumiseen, mistä oli jo aikaisemmin löydetty viitteitä. Suomalaisella perheaineistolla tehdyssä tutkimuksessa *MSR1*-geenin varianteilla ei kuitenkaan ollut yhteyttä eturauhassyöpään (Seppälä ym., 2003). Taulukkoon 1 on koottu kytkentätutkimuksilla löydetyt perinnölliselle eturauhassyövälle altistavat lokukset ja geenit sekä niiden ensimmäinen raportointivuosi ja julkaisija.

*Taulukko 1.* Taulukossa on esitetty oletetut perinnölliselle eturauhassyövälle altistavat lokukset.

<b>Lokus/ Geeni</b>	<b>Paikka kromosomissa</b>	<b>Ensimmäinen raportointi</b>
HPC1/ <i>RNASEL</i>	1q24-25	Smith ym. 1996
PCAP	1q42.2-43	Berthon ym. 1998
HPCX	xq27-28	Xu ym. 1998
CAPB	1p36	Gibbs ym. 1999b
HPC2/ <i>ELAC2</i>	17p11	Tavtigian ym. 2001
MSR1	8p22	Xu ym. 2001c

Perheaineistojen perusteella tunnistetut riskigeenit ovat suhteellisen harvinaisia, korkean penetranssin geenejä, jotka ovat vastuussa vain pienestä osasta eturauhassyöpätapauksia. Harvinaisten korkean riskin geenien lisäksi eturauhassyövän kehittymisen taustalla on kuitenkin mitä todennäköisimmin paljon yleisiä geneettisiä polymorfioita, joilla on yksistään suhteellisen pieni vaikutus eturauhassyövän sairastumisriskiin (Guy ym., 2009). Populaatiotasolla riski voi kasvaa huomattavaksi polymorfioiden yleisyyden takia tai usean geenivariaation yhdistyessä samalla henkilöllä voi tuloksena olla korkeampi eturauhassyöpäalttius. Pienen syöpärisikin muutoksien tunnistaminen kytkentä-analyysillä on vaikeaa, mutta assosiaatiotutkimuksilla myös näitä muutoksia voidaan tunnistaa.

Assosiaatiotutkimusten avulla on tunnistettu monia eturauhassyövälle altistavia geenejä. Assosiaatiotutkimuksilla voidaan tunnistaa geenejä ja niiden polymorfioita, joiden vaikutukset eivät ole tarpeeksi voimakkaita tullakseen esiin kytkentätutkimuksissa. Assosiaatiotutkimusten avulla tunnistettuja, eturauhassyövälle altistavia geenejä ovat esimerkiksi *MSMB*, *LMTK2* ja *KLK3* (Eeles ym., 2008). Vuonna 2008 tehdyssä genominlaajuisissa assosiaatiotutkimuksessa tunnistettiin seitsemän

kromosomialuetta, jotka olivat assosioituneet eturauhassyöpään. Lisäksi eturauhassyövälle altistavia kandidaattigeenejä löydettiin kolmelta kromosomialueelta, joista *MSMB* sijaitsi kromosomissa 10, *LMTK2* kromosomissa 7 ja *KLK3* kromosomissa 19. *MSMB* ja *KLK3* geenit voisivat olla hyödyllisiä eturauhassyövän seulonnassa, kun taas *LMTK2* koodaa signaaliproteiinia ja voi näin ollen olla potentiaalinen kohdemolekyyli eturauhassyövän lääkehoitoihin (Guy ym., 2009). Kaikkiaan assosiaatiotutkimuksissa on löydetty hiljattain (vuosina 2007–2008) noin 15 kromosomialuetta, jotka on yhdistetty suurentuneeseen eturauhassyöpäalttiuteen ja näiltä alueilta on tunnistettu noin kymmenen geeniä, jotka ovat assosioituneet eturauhassyöpään (Witte, 2009).

Yleiset polymorfiat eivät suoraan vaikuta syöpäalttiuteen, mutta voivat yhdessä muiden riskitekijöiden kanssa johtaa syövän syntyyn. Todennäköisimmät eturauhassyövän kandidaattigeenit osallistuvat androgeenien kuten testosteronin metaboliaan, koska eturauhasen solujen kasvu on riippuvainen testosteronista. Androgeenejä stimuloivia geenejä on tutkittu paljon ja on todennäköistä, että ne vaikuttavat jollain tasolla eturauhassyövän syntyyn. Kiistatonta yhteyttä eturauhassyöpäriskiä ei näistä androgeenejä stimuloivista kandidaattigeeneistä kuitenkaan ole vielä löydetty (Schaid, 2004). Androgeenejä stimuloivien geenien lisäksi matalan penetranssin muutoksia voi löytyä DNA:n korjausreitin geeneistä tai immuunipuolustukseen liittyvistä geeneistä. Osa kytKentätutkimusten perusteella löydettyistä eturauhassyövälle altistavista geeneistä, kuten *ELAC2* tai *MRS1*, voivatkin itse asiassa olla matalan penetranssin geenejä, toisin kuin ensin luultiin (Rökman, väitöskirja 2004).

#### 2.4 Kandidaattigeeni *HNF1B*

Tämän tutkielman kokeellisessa osassa karakterisoitiin kandidaattigeeni *HNF1B* (hepatocyte nuclear factor-1-beta) suomalaisessa eturauhassyöpäperheissä. Geeni valikoitui tutkimuksen kohteeksi aikaisempien kytKentätutkimusten perusteella. *HNF1B* koodaa proteiinia, joka kuuluu homeodomeinin sisältävien transkriptiotekijöiden suurperheeseen ja tunnetaan myös nimellä TCF2 tai vHNF1 (Bach ym., 1991). Geenin koodaama proteiini sitoutuu DNA:han joko homodimeerisenä tai heterodimeerisessä muodossa yhdessä sille sukua olevan proteiinin HNF1A:n kanssa. Geeni on elintärkeä alkionkehityksen aikana ja se osallistuu monien elinten varhaiseen kehitykseen, joista

esimerkkinä munuaiset, maksa, sappikivet, haima ja sukuelimet (Lu ym., 2007). Ituradassa tapahtuvat *HNF1B*:n mutaatiot aiheuttavat epämuodostumia edellä mainittuihin rakenteisiin (Kato & Motoyama, 2009). Geeni löydettiin ensin avainsäätelijänä maksasta, mutta myöhemmin sen huomattiin ilmentyvän myös muissa epiteelin peittämissä kudoksissa, erityisesti munuaisissa. *HNF1B*-geenin koodaama proteiini säätelee kudosspesifisesti geenien ilmentymistä vielä alkionkehityksen jälkeenkin, erityisesti munuaisissa, maksassa ja haimassa (Igarashi ym., 2005). Mutaatiot geenissä aiheuttavat etupäässä erilaisia munuaissairauksia ja diabetes-syndroomaa sekä joissakin syövässä *HNF1B*-geenin ilmeneminen on muuttunut (Kato & Motoyama, 2009).

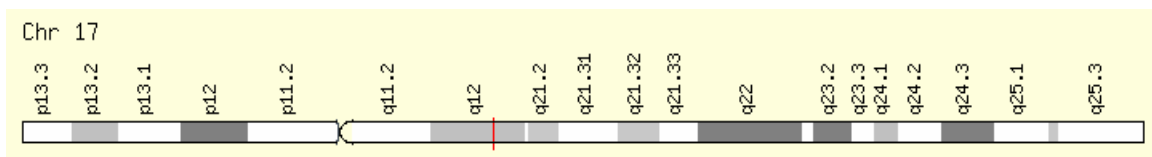
#### 2.4.1 *HNF1B*-geenissä raportoidut mutaatiot

Yli kolmekymmentä eri sairauksia aiheuttavaa mutaatiota on raportoitu *HNF1B*:n DNA-sekvenssissä. Näihin mutaatioihin kuuluu missense-, nonsense- ja frameshift-mutaatioita sekä insertioita ja deleetioita (Lu ym., 2007). Nonsense- ja frameshift-mutaatiot ovat jakautuneet tasaisesti koodaavan sekvenssin alueelle, mutta missense-mutaatiot ovat kerääntyneet pääasiassa DNA:han sitoutuvaan alayksikköön. Missense-mutaatiot ovat mielenkiintoisia, koska ne voivat helposti muokata proteiinin rakenteen kohdespesifisyyttä ja toiminnallisuutta ilman, että proteiinin toiminnallisuus lakkaa kokonaan. Suurimassa osassa raportoiduista tapauksista *HNF1B*-mutaatiot on yhdistetty erilaisiin munuaissairauksiin ja tietyt mutaatiot on yhdistetty lapsuusiän diabetekseen ja MODY (maturity-onset diabetes of the young) -diabetekseen (Igarashi ym., 2005). Transkriptiotekijät, jotka ovat tärkeässä asemassa alkionkehityksessä, osallistuvat usein myös kasvaimen muodostukseen ja onkin osoitettu, että *HNF1B*:n ilmentyminen on lisääntynyt munasarjasyövässä ja toisaalta sen ilmentyminen on vähentynyt munuaissyövässä (Kato & Motoyama, 2009). Kitanaka ym. (2004) raportoivat tutkimuksesta, jossa missense-mutaatio *HNF1B*-geenissä aiheutti promoottori- ja soluspesifisen transkription vähenemisen myös *HNF1A*-geenissä ja *HNF1A*:n sitoutuminen kohdepromoottoriin estyi. Tietyt *HNF1B*:n mutaatiot voivat siis vaikuttaa myös *HNF1A*:n aktiivisuuteen määräytyissä kudoksissa ja kohdegeeneissä.



#### 2.4.2 *HNF1B*-geenin rakenne ja kromosomialue 17q

*HNF1B*-geenissä on yhdeksän eksonia ja se sijaitsee kromosomikohdassa 17q12 (kuva 3), q-käsivarren sentromeerisellä puolella. Geenin orientaatio on DNA:n miinusjuosteessa, missä se koodaa 557 aminohapon pituista proteiinia. Geenistä on tunnistettu useita vaihtoehtoisia esi-mRNA:n leikkautumiskohtia ja proteiinin eri muotoja koodaavia transkriptejä, mutta kaikkien muotojen biologista toimivuutta ei ole määritetty. (Human genes, gene database, [www.genecards.org](http://www.genecards.org).)



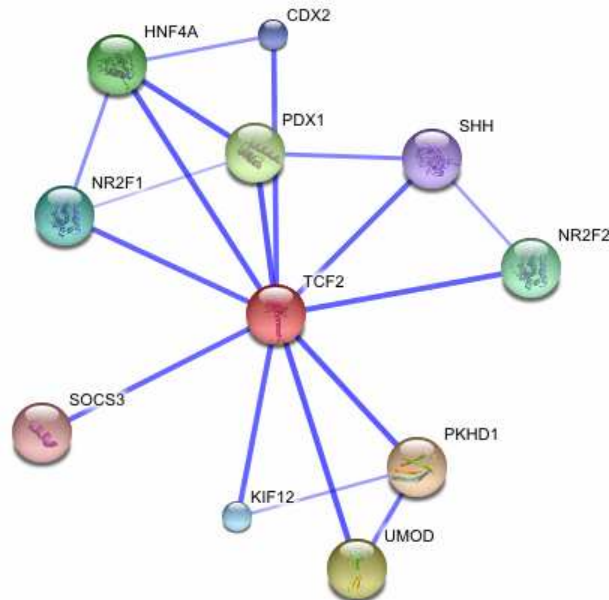
Kuva 3. Kromosomi 17, johon on punaisella merkitty geenin *HNF1B* lokus. (Human genes, gene database -verkkosivu, [www.genecards.org](http://www.genecards.org).)

Kromosomista 17 on löydetty useita monistuneita alueita ja kromosomipoikkeavuuksia (Chen ym., 2009). 17q-käsivarressa on suuria monistuneita alueita, joissa homologinen sekvenssifragmentti toistuu. Kromosomipoikkeavuudet alueella on yhdistetty moniin sairauksiin, joista esimerkkinä rintasyövälle altistavat BRCA 1 ja 2 deleetiot (Chen ym., 2009). Chen ym. ovat tarkastelleet monistuneiden rakenteiden alkuperää evoluutiossa ja huomanneet, että rakenteet ovat rajoittuneita kädellisille nisäkkäille ja ne voidaan yhdistää kahden retrotransposonin toimintaan. Nämä retrotransposonit näyttävät olevan edelleen aktiivisia, joten myös uusia monistuvia alueita voi syntyä. Cardone kollegoineen (2008) on myös tutkinut kromosomin 17 rakenteellisia muutoksia evoluutiossa. Tutkimuksessa on paljastunut, että kohdat 17q12/21 ja 17q23 ovat toimineet katkaisukohtina kromosomin uudelleenjärjestäytymisissä ja niissä on edelleen paljon monistuneita alueita. Kandidaattigeeni *HNF1B* sijaitsee lokuksessa 17q12, joten se paikantuu kromosomikohtaan, mikä on ollut hyvin aktiivinen evoluution aikana.

#### 2.4.3 *HNF1B*:n kohdegeenit

Kuvan 4 kaaviolla on esitetty *HNF1B*:n ja muiden geenien välisiä vuorovaikutuksia. Suurin osa geneistä, joiden aktiivisuutta *HNF1B* säätelee, osallistuvat maksa-, munuais- tai haimasolujen toimintojen säätelyyn. *HNF1B*-geenin koodaama proteiini

sitoutuu kohdegeenin promoottorialueeseen yleensä aktivoiden geenin ilmentymistä, tosin joissakin tapauksissa myös geenin hiljentämisestä on raportoitu (Igarashi ym., 2005). Monet kohdegeeneistä koodaavat myös itse transkriptiotekijöitä, joten säätelyverkosto jatkuu edelleen eri geenien säätelyllä.



*Kuva 4.* Kuvassa on esitetty *HNF1B*:n sekä muiden geenien välisiä vuorovaikutuksia. Keskimmäisenä *HNF1B* (*TCF2*) ja ympärillä geenit, joiden aktiivisuuteen *HNF1B* vaikuttaa. (STRING 8.2 -verkkosivu, 2010 <http://string.embl.de/>.)

*HNF1B* tiedetään säätelevän geenien ilmentymistä erityisesti munuaisissa, maksassa ja haimassa sekä muissa epiteelin peittämissä elimissä. Ei kuitenkaan tunneta kaikkia kohdegeenejä, joihin *HNF1B*:n säätely kohdistuu. Gong ym. (2009) raportoivat *Kif12* (kinesin family member 12) -geenistä, joka on yksi *HNF1B*:n kohdegeeneistä munuaisissa. *Kif12* geenin oli jo aikaisemmin todettu aiheuttavan polykystistä munuaissairautta. Tutkimuksessa *HNF1B*-mutaatiot inhiboivat *Kif12* transkriptiota sekä viljellyissä soluissa sekä hiirimallissa. *Kif12*-perheen geenit osallistuvat solun napojen oikeaan suuntaamiseen solunjakautumisen aikana, joten poikkeukset *Kif12*-geenissä voivat aiheuttaa soluun epänormaalia polaarisuutta, mitä on havaittu munuaissairauksissa.

Ma kollegoineen (2007) tunnisti toisen *HNF1B*:n kohdegeenin munuaisista, *SOCS3*:n (suppressor of cytokine signalling-3). Tässä tutkimuksessa *HNF1B* geenin hiljentäminen hiiren munuaisissa aiheutti kystien muodostumista. Mutaatiot tai suuret

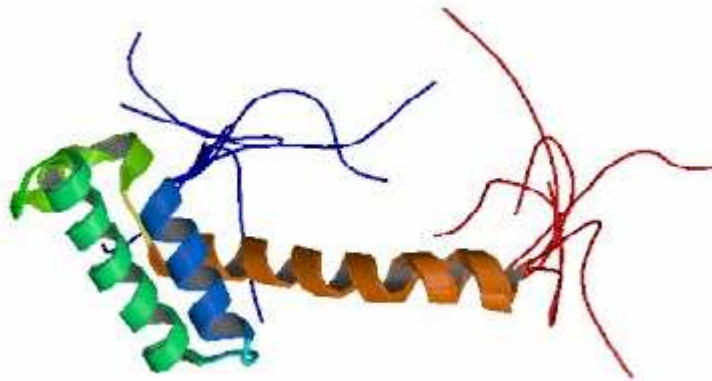
deleetiot *HNF1B* geenissä aiheuttavat MODY-syndroomaa, jota kutsutaan myös nimellä RCAD (renal cysts and diabetes), koska sairastuneilla on useita munuaisvaurioihin johtavia munuaiskystoja. Sairauteen liittyy myös synnynnäisiä epämuodostumia munuaisissa, maksassa tai sukupuolielimissä. Tutkimuksessa *SOCS3* geenin ilmentymistasot nousivat munuaisen epiteelisoluisissa, jotka ilmensivät *HNF1B*-mutanttia tai hiirimallissa, jossa *HNF1B* geeni oli hiljennetty. *HNF1B* sitoutuu *SOCS3* geenin promoottoriin estäen geenin ilmentymistä. Kun *SOCS3*-proteiinitaso nousee *HNF1B*-mutaatioiden johdosta, se estää HGF:n (hepatocyte growth factor) aiheuttamaa tubulogeneesiä eli putkimaisten rakenteiden muodostumista organogeneesin aikana. HGF:n inhibitio estää edelleen Erk- ja STAT-3- proteiinien fosforylointia estäen Costa ym kohdekudosten muodostumista. Tällä mekanismilla *HNF1B* säätelee elinten muodostumista *SOCS3* ilmentymistä kontrolloimalla alkionkehityksen aikana. *SOCS3*:n ilmentymistasoja kontrolloimalla voisi mahdollisesti hoitaa myös munuaissairauksia, jotka ovat aiheutuneet *HNF1B*-mutaatioiden seurauksena.

Näiden geenien lisäksi *HNF1B* vaikuttaa transkriptiotekijänä usean muun geenin aktiivisuuteen, joista seuraavana muutama esimerkki. *PKHD1* (Polycystic kidney and hepatic disease 1 precursor) -geeni koodaa solukalvon lävistävää proteiinia, jossa on useita immunoglobuliinin kaltaisia domeeneja (Bergmann ym., 2004). Mutaatiot tässä geenissä aiheuttavat polykystistä munuaissairautta (Bergmann ym., 2005). *UMOD* (Uromodulin precursor) -geenin koodaama proteiini on virtsan runsain ja tärkein proteiini ja muutokset proteiinia koodaavassa geenissä altistavat munuaissairauksille (Hart ym., 2002). *UMOD*-proteiini voi toimia inhibiittorina kalsiumin kiteytymistä vastaan munuaisissa ja sen erityis virtsaan suojaa virtsatieinfektioilta. *HNF4A* on transkriptiotekijä *HNF1B*:n tavoin ja se säätelee useiden geenien aktiivisuutta lähinnä maksassa (Costa ym., 2003). Geenillä on todennäköisesti osuus maksan, munuaisten ja suolen muodostumisessa alkionkehityksen aikana. Mutaatiot *HNF4A*-geenissä on yhdistetty II-tyypin diabetekseen (Love-Gregory & Permutt, 2007).

#### 2.4.4 HNF1B-proteiinin rakenne

HNF1B-proteiini (kuva 5) on muodostunut 557 aminohaposta ja se on kooltaan 61324 Da suuruinen. HNF1B:ssä on kolme erillistä toiminnallista alayksikköä, joista dimeerisaatio-alayksikkö vastaa sitoutumisesta HNF1A-proteiinin kanssa. Lisäksi

HNF1B:ssä on DNA:han sitoutuva POU-alayksikkö sekä aktivoitumista välittävä alayksikkö. Aminohapot ovat konservoituneita DNA:han sitoutuvassa alayksikössä sekä dimerisaatio-alayksikössä, mutta näiden väliset osat sekä C-terminaalinen osa sisältävät vaihtelevia aminohappoja. Vaihtelevat aminohapot mahdollistavat HNF1B:n vuorovaikutukset eri proteiinien kanssa. Vaikka DNA:han sitoutuvat osat ovat konservoituneita HNF1B:n ja HNF1A:n välillä, proteiinit sitoutuvat eri kohdegeeneihin jopa samassa solussa. Munuaissolusta on tunnistettu 25 potentiaalista kohdegeeniä HNF1B:lle, mutta vain yhdeksän kohdegeeniä HNF1A:lle. (Lu ym., 2007.)



Kuva 5. HNF1B-proteiinin 3-D rakenne (2DA6, PDB (Protein data bank) -verkkosivu, <http://www.rcsb.org/pdb>)

HNF1B on POU-transkriptiotekijä, joka osallistuu transkriptiotekijöiden hierarkkiselle reitille säädellensä tiettyjen elinten kehitystä ja toimintaa. Nimi POU tulee ensimmäisistä löydettyistä proteiineista, joissa oli rakenteelle ominaiset alayksiköt: Pit-1, Oct1 ja UNC-86. POU transkriptiotekijät säätelevät monien neuroendokriinisten elinten kehitystä ja ne sitoutuvat DNA:han POU-homeodomeinien välityksellä. Suurin osa HNF1B:n mutaatiota kantavista aminohappotähteistä sijaitsee DNA:han sitoutuvassa osassa tai sen läheisyydessä. Kaikki tutkitut eri sairauksille altistavat mutaatiot vaikuttavat juuri DNA:n sitomisominaisuuksiin. *HNF1B*-mutaatioiden ennustetaan vaikuttavan ratkaisevasti proteiinin stabiilisuuteen, jolloin väärin laskostunut proteiini voi kerääntyä soluun ja sitä voidaan hajottaa ennen aikaisesti. Yhteen vetona HNF1B/DNA -kompleksin tutkimuksista voidaan sanoa, että mutaatiot vähentävät merkittävästi transkription aktiivisuutta vaikuttaen todennäköisesti loss-of-function -mekanismilla. (Lu ym., 2007.)

#### 2.4.5 HNF1A ja HNF1B muodostavat dimeerisen rakenteen

HNF1B-proteiini voi muodostaa heterodimeerisen rakenteen yhdessä toisen maksaspesifisen transkriptiotekijän HNF1A:n kanssa tai esiintyä homodimeerisessä muodossa. Molemmat dimeeriset muodot ovat toimivia, mutta biologinen vaikutus muuttuu rakenteesta riippuen. Lisäksi monia vaihtoehtoisia esi-mRNA:n leikkautumiskohtia on kuvattu, mutta näiden eri rakenteiden biologista toimivuutta ei ole tutkittu. HNF1B:n rakenne on hyvin samankaltainen kuin HNF1A:lla ja sen sekvenssistä 70 % on identtistä. HNF1A- ja HNF1B-proteiineja koodaa kaksi erillistä geeniä ja proteiinit ovat toiminnallisesti erillisiä kudosspesifisyyden ja ajoituksen suhteen. *HNF1A*-geeni sijaitsee kromosomissa 12 kun taas *HNF1B* kromosomissa 17. *HNF1B* ilmenee haiman kantasoluissa ennen erilaistumista endo- tai eksokriiniseksi soluiksi, kun taas *HNF1A* osallistuu etupäässä ylläpitämään elinten toimivia muotoja jo erilaistuneissa soluissa. Toisaalta *HNF1B*-geeni osallistuu myös monien elinten toimintaan valmiissa kudoksessa. Molemmista geneistä on löydetty erillisiä mutaatioita, jotka on yhdistetty diabetekseen ja munuaisen kehityshäiriöihin. Sukuelinten kehityshäiriöt ovat pääasiassa seurausta HNF1B:n mutaatioista. (Lu ym., 2007.)

#### 2.4.6 HNF1B-geenin yhteys eturauhassyöpään

Ensimmäisen kerran kromosomialue 17q yhdistettiin eturauhassyöpään vuonna 2003, kun Lange ym. (2003) raportoivat perheaineistossa tehdystä kytkentäanalyysistä. Kyseisessä tutkimuksessa vahvin kytkentä kromosomiin 17 saatiin perheistä, joissa oli neljä tai useampia eturauhassyöpään sairastuneita. Varsinaisesti *HNF1B*-geeni on yhdistetty suurentuneeseen eturauhassyöpäriskiin ensimmäisen kerran islantilaisessa genomilaajuudessa assosiaatiotutkimuksessa (GWAS), jossa oli mukana 1501 eturauhassyöpää sairastavaa miestä sekä 11290 kontrollia (Gudmundsson ym., 2007). Tutkimuksessa oli mukana neljä erillistä tapaus-verrokkiryhmää (islantilainen, hollantilainen, espanjalainen ja yhdysvaltalainen ryhmä), jotka vahvistivat kolmen sekvenssivariantin (rs4239217, rs757210, rs4430796) assosiaation eturauhassyöpään kromosomissa 17. Näiden varianttien altistama syöpäriski on verrattain pieni yksilötasolla, mutta varianttien yleisyyden vuoksi, populaatiotasolla riski on kohtalainen.

Gudmundssonin ym. julkaisema tulos vahvistettiin myöhemmin myös Englannissa (Eeles ym., 2008) ja Yhdysvalloissa (Thomas ym., 2008) tehdyissä tutkimuksissa. Vuonna 2008 myös Sun kollegoineen raportoi useista *HNF1B*-geenistä löytyneistä varianteista, jotka olivat vahvasti assosioituneita eturauhassyöpään. Tämä tutkimus oli myös tapaus-verrokkitutkimus, jossa aineistona oli käytetty ruotsalaisia ja amerikkalaisia henkilöitä. Waters ym. (2009) tutkivat useiden geenivarianttien yleisyyttä aineistossa, johon kuului näytteitä eri etnisistä ryhmistä, kuten eurooppalaiset, amerikkalaiset, afroamerikkalaiset, latinalaista alkuperää olevat sekä japanilaiset. Myös tässä tutkimuksessa *HNF1B*-geenimuutokset assosioituivat suurentuneeseen eturauhassyöpäriskiin. *HNF1B*-geeniä on tutkittu myös suomalaisessa perheaineistossa, jossa kromosomialue 17q on noussut esiin (George ym., käsikirjoitus).

On todennäköistä, että transkriptiotekijä osallistuu syövän kehittymiseen aiheuttaen säätelemänsä geenin poikkeavan ilmentymisen syövän syntyyn vaikuttavalla signaalireitillä. *HNF1B*-geenin on osoitettu osallistuvan eri kasvainten syntyyn. Ituradan ja somaattisten solujen *HNF1B*-muutoksia on löydetty esimerkiksi munuaissolujen karsinoomassa (Kato & Motoyama, 2009). Tämän perusteella voidaan sanoa, että *HNF1B*-geeni luokitellaan munuaisten tuumorisuppressorigeeniksi. Geneettinen yhteys eturauhassyöpään viittaa siihen, että *HNF1B*-geenillä voisi mahdollisesti olla samanlainen rooli eturauhasessa (Frayling ym., 2008).

#### 2.4.7 *HNF1B* yhdistävä tekijä eturauhassyövän ja diabeteksen välillä

Eturauhassyövän ja diabeteksen välistä yhteyttä on tutkittu paljon ja tulokset näistä tutkimuksista ovat jokseenkin ristiriitaisia. Epidemiologiset tutkimukset viittaavat siihen, että tyypin 2 diabetesta sairastavilla miehillä on pienempi riski sairastua eturauhassyöpään kuin miehillä, jotka eivät sairasta diabetesta (Frayling ym., 2008). Will ym. (1999) puolestaan raportoivat, että viisi vuotta tai pidempään diabetesta sairastaneilla miehillä olisi suurentunut riski sairastua eturauhassyöpään. Enemmistö tutkimuksista kuitenkin osoittaa, että diabeteksella olisi eturauhassyövässä ehkäisevä rooli.

*HNF1B*-geenistä on löydetty muutoksia, jotka johtavat MODY (maturity onset diabetes of the young) -syndroomaan diabeteksessa (Frayling ym., 2008). Pieni ryhmä 2-tyypin diabetekseen sairastuneista henkilöistä sairastuu tautiin noin kahdenkymmenen ikävuoden tienoilla, eikä sairaudelle tyypillisesti vanhemmalla iällä. Suurella osalla nuorena sairastuneista on vahva perhehistoria diabeteksen suhteen, jolloin sairastuneet kantavat tiettyjä geenivariantteja, jotka altistavat heidät sairaudelle. Diabeteksen lisäksi *HNF1B*-geeni on jo monissa tutkimuksissa yhdistetty eturauhassyöpään (Sun ym., 2008, Gudmundsson ym., 2007). On kuitenkin vielä epäselvää, toimiiko *HNF1B*-geeni nimenomaan yhdistävä tekijä näiden sairauksien välillä. On myös mahdollista, että kyseinen geeni vaikuttaa molemmissa sairauksissa riippumatta toisen sairauden tilasta.

Diabeteksen ja eturauhassyövän välille voidaan löytää monia yhdistäviä tekijöitä ja tietyn diabeteksen riskitekijän voidaan katsoa suojelevan eturauhassyövältä tai altistavan sille. Yhdistäviksi tekijöiksi on ehdotettu monia diabetekseen liitettäviä piirteitä, kuten erilaiset insuliinitasot, saatavilla olevan insuliinin kaltaisen kasvutekijän 1 (IGF-1) määrä, leptiinin määrä, vapaata testosteronin määrä sekä lääkehoidot (Giovannucci & Michaud, 2007). Ainakin tietyillä hypoglykemian hoitoon tarkoitetuilla lääkkeillä kuten metformiinilla voi olla syöpäriskiä vähentävä vaikutus. Tämä väite on yhdenpitävä tutkimusten kanssa, joissa eturauhassyövän riski vähenee, mitä kauemmin ihminen on sairastanut diabetesta, eli toisin sanoen saanut lääkitystä tautiin (Giovannucci ym., 1998).

Koska diabetesta sairastavilla miehillä on pienentynyt riski sairastua eturauhassyöpään, tätä yhteyttä selittävää geneettistä tekijää on pyritty selvittämään. Winckler ym. (2007) tunnistivat SNP:n rs757210 *HNF1B*-geenistä, joka oli lievästi assosioitunut tyypin II diabetekseen (OR 1.12, 95 % CI 1.07–1.18). Pian tämän jälkeen Gudmundsson ym. (2007) raportoivat *HNF1B*-geenivariantista rs4430796 intronissa 2, yhdistettynä suurentuneeseen eturauhassyöpäriskiin (OR 1.22, 95 % CI 1.15–1.30). Tämän jälkeen tutkittiin saman SNP:n (rs4430796) yhteyttä tyypin II diabetekseen, jolloin SNP:n samalle alleelille A löydettiin yhteys myös tyypin II diabetekseen (Frayling ym., 2008). SNP:llä rs4430796 oli II tyypin diabeteksessa eturauhassyöväälle vastakkainen suojaava vaikutus (OR 0.91, 95% CI 0.87–0.94,  $p=2.7 \times 10^{-7}$ ).

Vuonna 2010 julkaistussa tutkimuksessa Stevens kollegoineen selvitti diabeteksen ja eturauhassyövän välistä yhteyttä. Tässä tutkimuksessa kolme *HNF1B*:n SNP:iä (rs11649743, rs4430796, ja rs7501939) olivat assosioituneet vähentyneeseen eturauhassyöpäriskiä ja vähäisesti kohonneeseen diabetesriskiin (Stevens ym., 2010). Tutkimuksessa haluttiin selvittää, voisivatko nämä SNP:t vähentää eturauhassyöpäriskiä spesifisesti diabeteksestä riippuvaisella mekanismilla. Tätä tutkittiin tapaus-verrokki aineistolla, jossa verrattiin geenivarianttien ja eturauhassyövän yhteyttä diabetesta sairastavilla miehillä ja vastaavasti miehillä, jotka eivät sairastaneet diabetesta. SNP:ien yhteys eturauhassyöpään ei kuitenkaan merkittävästi muuttunut diabetes-statuksesta johtuen. Jos geenivariantin yhteys eturauhassyöpään välittyisi diabeteksestä riippuvaisella mekanismilla, eturauhassyövän riski pitäisi olla merkittävästi vähentynyt, kun diabetes-tila on huomioitu. Näin ei kuitenkaan ollut, joten on mahdollista, että *HNF1B* vaikuttaa eturauhassyövän riskiin esim. muuttamalla hormonitasoja tai kasvuun liittyvien proteiinien ilmentymistä. Tällaista yhteyttä tautien välille on ehdotettu jo aikaisemminkin. Stevens ym. tutkimus viittaa siihen, että kyseiset SNP:t (rs11649743, rs4430796, ja rs7501939) eivät selitä eturauhassyövän ja diabeteksen yhteyttä, vaan ovat erikseen assosioituneet sekä diabeteksen että eturauhassyöpään.

Loeb ym. (2009) tutkivat diabeteksen ja eturauhassyövän aggressiivisuuden yhteyttä *HNF1B*:n SNP:n rs2230796 kantajilla. Eturauhassyövän patologinen tila näytti olevan samankaltainen riippumatta siitä, sairastivatko miehet diabetesta vai eivät. Tutkimus oli tehty verrattain pienellä aineistolla, mikä saattoi vääristää tuloksia, mutta tästä huolimatta tulos viittaisi siihen, että diabetes ei yksinään vaikuta assosiaatioon 17q12 riskialleelin ja eturauhassyövän aggressiivisuuden välillä (Loeb ym., 2009). Tulos oli samansuuntainen kuin Stevensin ym. aikaisempi tutkimustulos, jossa tautien yhteyttä ei voitu selittää *HNF1B* geenivarianteilla.

Löydettyjen geenivariaatioiden biologisia vaikutuksia ei vielä tunneta. On mahdollista, että tietty variaatiokohta osallistuu toisen geenin säätelyyn. *HNF1B*-geeni koodaa transkriptiotekijää, joka säätelee monien muiden geenien ilmentymistä monien elimien aikaisessa kehityksessä, kuten haiman  $\beta$ -solujen ja sukuelinten kehityksessä. Kun tiedetään enemmän *HNF1B*:n kohdegeeneistä ja säätelyreiteistä, voi myös diabeteksen ja eturauhassyövän yhteys selvitä. Tällä hetkellä näyttää siltä, että diabeteksella olisi



ehkäisevä rooli eturauhassyövässä, mutta sairauksien välillä vaikuttavia geenejä ei ole vielä onnistuttu kiistatta tunnistamaan.

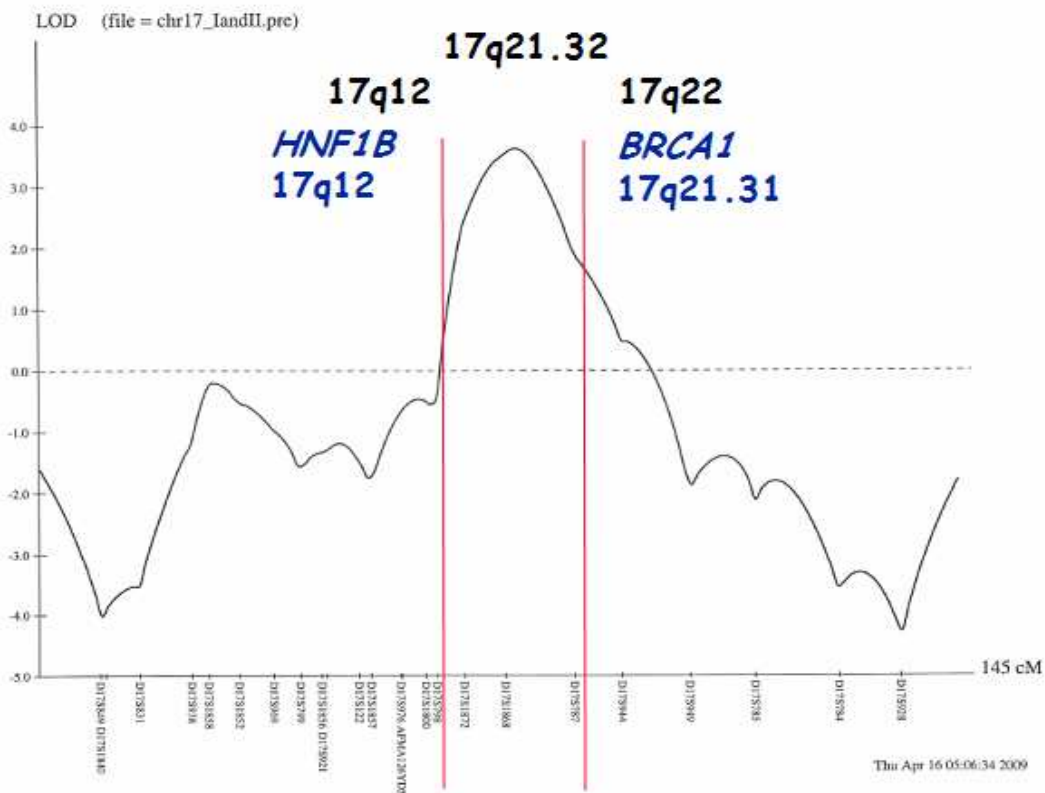
### 3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen tavoitteena oli löytää perinnölliselle eturauhassyövälle altistavia muutoksia kytkeytyneen kromosomialueen 17q12 kandidaattigeenistä *HNF1B* sekä tutkia geenin promoottorialuetta. Lisäksi oli tarkoitus selvittää kahden jo aikaisemmin eturauhassyöpään yhdistetyn HNF1B-geenivariantin, rs4430796 ja rs11649743, yleisyys suomalaisessa väestössä ja varianttien yhteys eturauhassyöpään Suomessa. Tavoitteena oli myös testata High resolution melting (HMR) -menetelmän toimivuutta mutaatioiden havaitsemiseksi sekä optimoida uutta menetelmää toimivaksi.

## 4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 4.1 Näytteet

Aineistona käytettiin suomalaisia eturauhassyöpäperheitä, jotka valittiin tutkimukseen mukaan aikaisemmin tehdyn genomilaajuisen kytKentäanalyysin perusteella (George ym., käsikirjoitus). KytKentä-analyysissä esiin nousi kromosomialue 17q21-22, jolle saatiin merkittävä LOD (logarithm of odds) -arvo 3,6 (kuva 6). Analyysissä oli mukana 44 eturauhassyöpäperhettä, joista 16 kytkeytyntä perhettä valittiin mukaan tähän tutkimukseen. Kytkeytyneistä perheistä tutkittiin kaikkiaan 137 näytettä, joista 57 oli eturauhassyöpään sairastuneita henkilöitä. Mukaan valikoituneissa perheissä oli kaikissa vähintään kolme eturauhassyöpään sairastunutta henkilöä ja seitsemässä perheessä jopa viisi sairastunutta. Useissa perheissä oli todettu eturauhassyöpää, joka on luokiteltu aggressiiviseksi ICPCG:n (International Consortium for Prostate Cancer Genetics) kriteerien mukaan.



*Kuva 6.* Kuvassa on esitetty genomilaajuisessa kytKentäanalyysissä saatu tulos, jossa kromosomialue 17q21-22 on saanut merkittävän LOD-arvon 3,6 (George ym., käsikirjoitus).

Perhenäytteiden lisäksi mukana oli näytteitä Tampereen yliopistollisen sairaalan urologian poliklinikan potilailta. Nämä potilaat edustivat tutkimuksessa sporadista syöpää eli heillä ei ollut perhetaustaan perustuvaa alttiutta sairastua eturauhassyöpään. Sporadisia näytteitä käytettiin perheaineiston perusteella löytyneiden geenivariaatioiden lisätutkimuksiin, jotta nähtiin kantoivatko sporadista syöpää sairastavat henkilöt samoja geenivariantteja. Lisäksi sporadista aineistoa käytettiin tutkittaessa kahta jo aikaisemmin raportoitua eturauhassyövälle altistavaa geenivariaatiota (rs4430796 ja rs11649743) suomalaisessa väestössä. Kontrollinäytteinä tutkimuksessa käytettiin Suomen Punaisen Ristin anonyymejä verenluovuttajia, sekä miehiä että naisia. Genomiset DNA-näytteet oli eristetty EDTA-verinäytteistä (valkosoluista) käyttäen käyttäen Promega Wizard -kittiä.

## 4.2 Sekvensointi

Kandidaattigeenin sekvensointi suoritettiin Sangerin menetelmästä johdetulla syklisellä menetelmällä, jossa DNA-näyte monistettiin ensin PCR (polymerase chain reaction) -reaktion avulla. PCR-tuote puhdistettiin entsymaattisesti ylimääräisten nukleotidien ja alukkeiden poistamiseksi, jonka jälkeen tuotteelle tehtiin sekvensointi-PCR -reaktio, joka luettiin ABI PRISM -analysaattorilla ja analysoitiin Sequencer 4.9 -ohjelmalla. *HNF1B*-kandidaattigeenin yhdeksän eksonia sekvensoitiin ensin 137 näytteestä, jotka kuuluivat 17q21-22 kromosomialueeseen linkattuihin perheisiin. Eksonit, joista löydettiin sekvenssivariaatioita, sekvensoitiin myöhemmin myös kontrollinäytteistä, joita oli kaikkiaan 192 näytettä. Geenin eksoni-alueiden lisäksi sekvensoitiin noin 1000 emäsparin alue ennen geenisekvenssin alkua, jotta mahdolliset promoottorialueen mutaatiot saataisiin selvitettyksi.

### 4.2.1 Alukkeiden suunnittelu

Sekvensointireaktiota varten suunniteltiin alukkeet, jotka sitoutuivat spesifisesti haluttuun kohtaan genomista DNA:ta. Alukkeet sitoutuvat halutun geenifragmentin molemmille puolille, toinen geenin lukusuunnassa ja toinen vastakkaisessa suunnassa. Alukkeiden avulla voidaan ensin monistaa haluttua DNA-fragmenttia PCR-reaktiolla, jonka jälkeen alukkeita voidaan käyttää DNA-fragmentin sekvensointiin.

Taulukko 2. *HNF1B*-geenin sekvensoinnissa käytetyt alukkeet.

Eksoni	Forward-alue 5' → 3' Reverse-alue 5' → 3'	T <sub>a</sub> (°C)	Monistettavan alueen pituus (bp)
1A	F_CTTCTGCTCTCCAGGTCTGC R_GTGGCCGTTGGTGAGAGTAT	59,3	527
1B	F_CACGTCGCTCCAGCAAGAA R_GACTTCTCTGGTGGGAAACGG	62,0	445
2	F_TGCATAGACCATAGGTAGCACC R_GAGGGCAAAGGTCACTTCAG	62,0	342
3	F_GGTTGCAAAGCTTAGTTAGACG R_GTCTCAATATCCCAGGACCG	59,3	467
4	F_ACTCCCAACCAAGACTGCTG R_TAAGATCCGTGGCAAGAACC	59,3	400
5	F_CAAGAGGTGCCGAGTCATTG R_TTGAGGCAGGCCTTGTGAG	59,3	319
6	F_GAACTAGTCATGCCAAGGAATC R_CCACATTAATTTGCTTCCCA	55,0	302
7	F_GGCTCAAATGATGGCATC R_CGAGAAAGTTCAGACCCAGA	57,2	355
8	F_CTACCTGAGGAGATGGGAGCT R_CTTGCCACAACCTCTGCA	59,3	298
9A	F_GGTTGAGTTGGGCATCATC R_CTCAAGATCATGTGGGATGG	55,7	575
9B	F_GAACTGAGCCAAACACACTG R_GTTCTCGGTGGAACCATG	59,3	612
9C	F_AGACAATCCACTCTCAGGAGG R_GGCTTCACTTCCCACTTAGG	64,0	385
Promoottori 1	F_CTCGTCTACAGAGCTCGTCC R_GTGAAGGAGTCCGGGAGA	65	397
Promoottori 2	F_GGAGCTTCACTTTGGCTAC R_GTGAGAGCCAGAGGAAGC	57,2	386
Promoottori 3	F_CTCTACTCTTCGCTTCCTCC R_CTTCTAACTTGCCATGATCG	57,2	425

Nykyään alukkeiden suunnittelua voi helpottaa monilla bioinformatiikan ohjelmilla, jotka etsivät automaattisesti sekvenssistä alukkeelle sopivan kohdan. Tässä tutkimuksessa käytetyt alukkeet suunniteltiin ilman avustavia ohjelmia kohdesekvenssiä vastaavaksi. Alukkeiden pituudet vaihtelivat välillä 18 - 22 nukleotidiä ja monistettavan alueen pituus oli 300 - 600 nukleotidiä. Tutkimuksessa käytetyt alukeparit, kiinnittymislämpötilat ja monistettavien DNA-fragmenttien pituudet on esitetty taulukossa 2. Alukkeiden toiminnallisuus tarkistettiin käyttäen apuna UCSC:n (University of California Santa Cruz) Genome Browser -verkkosivulla olevaa In Silico PCR -ohjelmaa, joka laskee alukkeiden todennäköiset sulamislämpötilat

sekä kertoi monistettavan kromosomialueen mahdolliset homologiset kohdat genomissa.

Alukkeet testattiin ennen varsinaista näytteiden sekvensointia, jotta löydettiin oikeat kiinnittymislämpötilat PCR-reaktiota varten. Syntyvän sekvenssin laatu tarkistettiin Sequencer 4.9 -ohjelmalla ennen varsinaisten näytteiden sekvensointia käyttäen testi-DNA:ta. Alukkeet tilattiin kaupalliselta valmistajalta, Sigma Aldrichilta (Saint Louis, MO 63103, USA).

#### 4.2.2 PCR-reaktio

Jotta genomista DNA:ta voidaan sekvensoida, sitä on ensin monistettava PCR-reaktiolla. PCR-reaktio perustuu lämpötilavaihtelua kestävään DNA-polymeraasi-entsyymiin, jolla voidaan eksponentiaalisesti monistaa haluttua DNA-fragmenttia. PCR-reaktiossa vuorottelevat denaturointivaihe, alukkeiden kiinnittymisvaihe ja pidennysvaihe ja jokaisen syklin jälkeen DNA:n määrä on kaksinkertaistunut. Monistusta varten suunnitellut spesifiset alukkeet kiinnittyvät DNA-juosteisiin, jotka ovat erotettu yksijuosteiseen muotoon ensimmäisessä denaturointireaktiossa.

*Taulukko 3.* PCR-reaktiossa tarvittavat reagenssit yhtä reaktiota kohden.

<b>Reagenssi</b>	<b>Määrä</b>
H <sub>2</sub> O	16,85 µl
5 x puskuri	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
dNTP seos (10 mM)	0,5 µl
Forward-aluke (10 µM)	1,5 µl
Reverse-aluke (10 µM)	1,5 µl
Taq-polymeraasi entsyymi	0,15 µl
DNA-templaatti	50-100 ng

PCR-reaktiot pipetoitiin laminaarikaapissa filtterikärjillä kontaminaatioiden estämiseksi. PCR-reaktioon tarvittavat reagenssit yhtä reaktiota kohden on esitetty taulukossa 3. Tutkittavia DNA-näytteitä käsiteltiin 96-kuoppalevyllä, jotta pystyttiin monistamaan useita näytteitä samanaikaisesti. Reagensseista valmistettiin seos, jotta reagenssit pystyttiin pipetoimaan koko 96-kuoppalevylle pipetointikaukaloa apuna käyttäen. Näytteiden DNA-templaattit, joita oli 2 µl (25ng/ µl) per näyte, oli pipetoitu valmiiksi kuoppien pohjalle ja sentrifugoitu kuoppalevyn pohjaan kontaminaatioiden

välttämiseksi. PCR-koneessa käytetty ohjelma on esitetty taulukossa 4. Alkudenaturoinnin jälkeen vaiheet 2 - 4 toistettiin 34 kertaa, jotta DNA-tuotetta saatiin monistettua haluttu määrä.

*Taulukko 4.* PCR-koneen DNA:n monistamiseen käytetty ohjelma.

<b>Vaihe</b>	<b>Lämpötila (°C)</b>	<b>Aika</b>
1. alkudenaturaatio	95	10 min
2. denaturaatio	95	30 s
3. alukkeiden kiinnittyminen	T <sub>a</sub> (alukkeelle ominainen kiinnittymislämpötila)	30 s
4. pidennys (DNA-synteesi)	72	45 s
5. lopullinen elongaatio	72	5 min
6. jäädytys	11	1 min

#### 4.2.3 PCR-tuotteiden geielektroforeesiajo

PCR-reaktion onnistuminen varmistettiin ajamalla PCR-tuotteet agarosigeelille. Geeliltä voitiin erottaa tuotteen kokoa vastaava bandi, mikäli alukkeet olivat toimineet halutulla tavalla ja oikeankokoinen tuote oli muodostunut. Geeliltä nähtiin myös, mikäli PCR-reaktiossa oli syntynyt sivutuotteita. Mikäli geelillä näkyi haluttu tuote, eikä sivutuotteita havaittu, voitiin jatkaa sekvensointivaiheeseen.

Geeli valmistettiin agarosijauheesta ja 0,5 x TE-puskurista, esim. 1,5 g agarosia ja 65 ml 0,5 x TE-puskuria. Seos kuumennettiin mikrossa homogeeniseksi ja geelin jäähdettyä noin 60 °C:een, siihen lisättiin 4 µl valoherkkää SyberSafe-reagenssia, jotta tuotteiden bandit voitiin nähdä UV-valaistuksessa. Geeli valettiin ajokelkkaan, johon asetettiin kammot näytteitä varten. Geeliä ajettiin noin 30 min 150 V jännitteellä, jonka jälkeen geeli valokuvattiin UV-valaistuksessa. Verrattaessa molekyylipainomarkkeriin voitiin tuotteiden oikea koko tarkistaa.

#### 4.2.4 PCR-tuotteiden puhdistus

PCR-tuotteiden puhdistus suoritettiin entsymaattisella EXOSAP-puhdistusmenetelmällä. Yhden PCR-tuotteen puhdistukseen tarvittiin 0,024 µl Exonucleaasi I -entsyymiä (New England Biolabs Cat. No. M0293S, 20U/µl), 0,25 µl SAP (Shrimp Alkalinen Phosphatase) -reagenssiä (Roche Cat. No. 1 758 250, 1U/µl)

sekä 9,725 µl steriloitua vettä. EXOSAP-reagensseista valmistettiin seos, jota pipetoitiin 10 µl per PCR-tuote. Reagenssiseosta pidettiin jäällä entsyymien lämpöherkkyyden vuoksi. Reagenssien lisäyksen jälkeen näytteitä inkuboitiin 30 min +37 °C:ssa, jonka jälkeen suoritettiin 5 min denaturaatio 95 °C:ssa. EXOSAP-menetelmällä poistettiin entsyymaattisesti ylimääräiset nukleotidit ja alukkeet PCR-tuotteesta, jotta tuote olisi puhdas sekvensointireaktiota varten.

#### 4.2.5 Sekvensointi-PCR

Puhdistetusta näytteestä pipetoitiin sekvensointi-PCR reaktiot, käyttäen Big Dye -terminaattori menetelmää (Applied Biosystems). Menetelmä on syklinen sekvensointimenetelmä, jossa hyödynnetään DNA-polymeraasin toimintaa ja muokattuja dideoksinukleotidejä. DNA-polymeraasi ei pysty liittämään uutta nukleotidia dideoksinukleotidin jälkeen, joten synteesi pysähtyy. Dideoksinukleotidiä on reaktioseoksessa vain vähän, joten synteesi loppuu satunnaisesti eri kohdassa sekvenssiä ja syntyy useita erimittaisia DNA-palasia, jotka voidaan tunnistaa fluoresenssileiman perusteella. Templaattina käytettiin puhdistettua, kaksijuosteista DNA:ta.

Sekvensointireaktiot tehtiin erikseen molempiin suuntiin, geenin lukusuunnassa ja vastakkaisessa suunnassa, jolloin tulos oli luotettavampi ja sekvenssin analysointi helpompaa. Kontrollinäytteiden osalta sekvensointireaktiot tehtiin vain toiseen suuntaan, mikäli saatu sekvenssi oli hyvälaatuista. Reaktiot pipetoitiin jäällä Big Dye -entsyymien lämpöherkkyyden takia. Reagenssit yhtä reaktiota kohden on esitetty taulukossa 5. Reaktiot ajettiin PCR-koneessa seuraavalla ohjelmalla: 30 s 96 °C, 20 s 50 °C ja 4 min 60 °C. Reaktiovaiheet toistettiin 26 kertaa, jonka jälkeen seurasi yhden minuutin jäähditys 11 °C:ssa.

*Taulukko 5.* Sekvensointi-PCR -reaktioon tarvittavat reagenssit yhtä reaktiota kohden.

<b>Reagenssi</b>	<b>Määrä (µl)</b>
2,5 x sekvensointi-puskuri	3
aluke (0,8 µM)	2
BigDye-entsyymi	1
puhdistettu PCR-tuote	3
H <sub>2</sub> O	1



#### 4.2.6 Sekvensointi-PCR-tuotteiden puhdistus etanolisaostuksella

Sekvensointi-PCR -reaktion jälkeen näyte puhdistettiin etanolisaostuksella. Yhtä näytettä kohden pipetoitiin 25 µl absoluuttista etanolia sekä 1 µl 3M natriumasettaattia. Reagensseista valmistettiin jälleen seos ja reagenssit pipetoitiin 96-kuoppalevyllä pipetointikaukaloa apuna käyttäen. Tämän jälkeen näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä 10 min. Inkubaation jälkeen sentrifugoitiin 30 min 3500 rpm, jonka jälkeen suurin osa supernatantista imeytettiin selluloosapaperiin ja sentrifugoitiin vielä ylösalaisin 1 min 2000 rpm jäljelle jääneen supernatantin poistamiseksi. Näytekuoppiin lisättiin seuraavaksi 100 µl 70 % -etanolia ja sentrifugoitiin 10 min 3500 rpm. Tämän jälkeen supernatanti poistettiin kuten edellä. Ennen sekvensointia ABI PRISM -analyysointilaitteella näytteisiin lisättiin 12 µl Hi-Di-formamidia.

#### 4.2.7 Sekvensointi ABI PRISM -analyysointilaitteella

Sekvenssin luenta tapahtui ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (PE Biosystems, Foster City, CA, USA) -laitteella, jossa ohut lasikapillaari tunnistaa eripituiset fluoresoivat DNA-fragmentit lasersäteiden avulla. ABI PRISM -analyysointilaitteessa on 16 lasikapillaaria ja DNA-sekvenssin tunnistus perustuu fluoresenssivaloon. Sekvenssin luenta tapahtui IMT:n (Institute of Medical Technology) COFA sekvenssointipalvelussa.

#### 4.2.8 Sekvenssin analysointi Sequencer 4.9 -ohjelmalla

Sekvenssin analysointi suoritettiin Sequencer 4.9 -ohjelmalla. ABI PRISM -analyysointilaitteella tuotetaan raakasekvenssiä, joka muutetaan luettavaan muotoon Sequencer-ohjelmalla. Ohjelma yhdistää samaa eksonia vastaavat näyttesekvenssit päällekkäin samaan contigiin, jolloin eroavuudet sekvenssissä on helppo nähdä. Ohjelmaan voi tuoda myös sekvensoitavan geenin referenssisekvenssin, jolloin ohjelma näyttää referenssisekvenssistä poikkeavat kohdat automaattisesti.

Sekvenssoinnissa syntyy usein huonolaatuista sekvenssiä sekvensoitavan fragmentin alkuun sekä loppuun. Alkuun muodostuu huonolaatuista sekvenssiä, ennen kuin entsyymi alkaa kunnolla toimia ja loppuosa voi olla huonolaatuista, koska entsyymi pystyy muodostamaan vain rajallisen mittaisia DNA-fragmentteja. Huonolaatuista sekvenssiä täytyykin poistaa mekaanisesti molemmista päistä, ennen kuin ohjelma tunnistaa sen. Pienten korjausten jälkeen ohjelma järjestää eri näytteiden päällekkäiset

sekvenssit samaan contigiin sekä geenin lukusuunnassa että vastakkaisessa suunnassa oleville juosteille, jolloin sekvenssivariaatiot on helppo tunnistaa.

Kaikissa tapauksissa geenin luenta ei kuitenkaan ole aivan näin yksinkertaista. Esimerkiksi heterotsygootti-insertio- tai -deleetiokohdissa kromosomin eri juosteissa oli erilaiset sekvenssit, jolloin ohjelma ei pystynyt tunnistamaan sekvenssiä insertiokohdan jälkeen. Tällaisessa tapauksessa sekvenssin analysointi vaati hieman enemmän pohdintaa ja eri suuntaan menevien juosteiden vertailua, jotta muutoskohdan rakenne voitiin selvittää. Jos sekvenssi sisältää toistojaksoja, joissa kopioluku vaihtelee eri näytteiden välillä ja lisäksi sekvenssissä esiintyy muuta variaatiota, sekvenssin luenta voi olla todella haasteellista.

#### 4.3 Genotyypaus TaqMan<sup>®</sup>-menetelmällä

TaqMan<sup>®</sup>-menetelmää käytettiin sekvensoinnissa löytyneiden geenivariaatioiden tutkimiseen suuremmassa aineistossa. Lisäksi menetelmää käytettiin genotyypatessa kahta jo aikaisemmin raportoitua eturauhassyövälle altistavaa geenivariaatiota (rs4430796 ja rs11649743) suomalaisessa väestössä. Aineistona genotyypauksessa käytettiin sporadisia näytteitä Tampereen yliopistollisen sairaalan urologian poliklinikan potilailta.

TaqMan<sup>®</sup>-menetelmä perustuu fluoresenssileimattuihin koettimiin, jotka hybridioituessaan tutkittavan näytteen kanssa emittoivat fluoresenssivaloa. PCR-reaktion aikana koettimet sitoutuvat komplementaariseen kohdesekvenssiin, mikäli näytteessä on tutkittava alleeli. DNA-polymeraasi leikkaa näytteeseen sitoutuneesta koettimesta FAM<sup>TM</sup>- tai VIC<sup>®</sup>-reportterileiman sisältävän sekvenssin, jolloin näytteen tietty alleeli voidaan tunnistaa fluoresenssin avulla. Eri genotyypit erotetaan erivärisen fluoresenssisignaalin perusteella ja tulokset analysoidaan lopuksi SDS software version 2.2 -ohjelmalla, 7900 HT -analysaattorilla (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA 94404, USA). SNP Genotyping Assayt voi tilata suoraan Applied Biosystems -valmistajalta.

Reagensseista valmistettiin ensin seos, josta TECAN Freedom Evo -pipetointirobottia apuna käyttäen pipetoitiin reagenssit 384-kuoppalevyille. Reagenssit yhtä reaktiota

kohden on esitetty taulukossa 6. Yhden reaktion kokonaistilavuus oli 5 µl. Robotti pipetoi myös templaatti-DNA:t neljältä 96-kuoppalevyllä 384-kuoppalevylle. PCR-reaktiot ajettiin PCR-koneessa seuraavalla ohjelmalla: 95 °C 10 min, 92 °C 15 s, 60 °C 1 min. Lopuksi näyte jäädytettiin 8 asteeseen. Reaktiovaiheet toistettiin 39 kertaa, jotta tuotetta saatiin monistettua riittävä määrä.

*Taulukko 6.* TaqMan<sup>®</sup>-genotyypausreaktioon tarvittavat reagenssit yhtä reaktiota kohden.

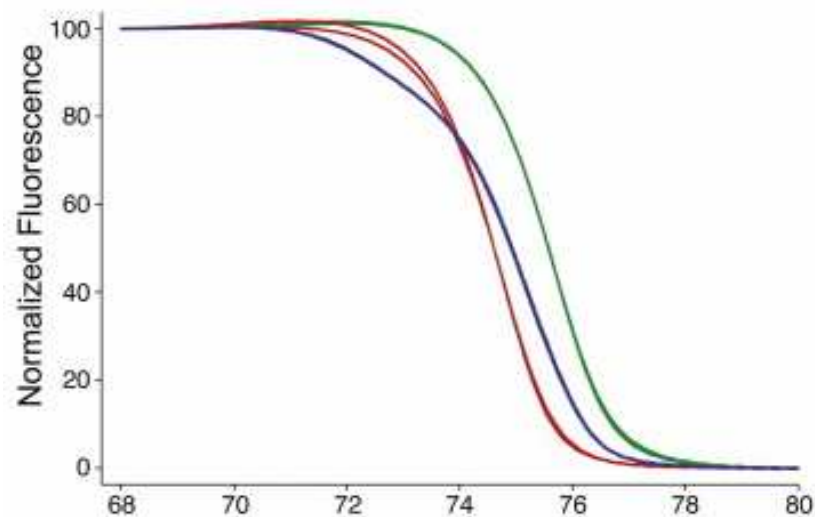
Reagenssi	Määrä (µl)
TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, No AmpErase <sup>®</sup> UNG (2x)	2,5
40x Assay Mix	0,0625
dH <sub>2</sub> O	1,4375
Genomic DNA (25ng/ µl)	1

#### 4.4 Genotyypaus High resolution melting (HMR) -menetelmällä

HMR-menetelmä perustuu eri genotyyppien erilaiseen DNA:n sulamislämpöön. DNA:n kaksoiskierteinen rakenne sitoo fluoresoivaa väriainetta, jolloin fluoresenssin intensiteetti laskee DNA-rakenteen sulaessa yksijuosteiseen muotoon lämpötilan noustessa. Kun fluoresenssisignaali on piirretty lämpötilan nousua vastaan, normalisoidusta sulamiskäyrästä voidaan erottaa erikseen villityyppi, heterotsygootti ja homotsygoottinäytteet (kuva 7), koska eri genotyypit sulavat eri lämpötilassa yksijuosteiseen muotoonsa (Erali ym., 2008). Menetelmä on nopea tapa erotella suuresta näytemäärästä erilaiset genotyypit. Jos halutaan nähdä sekvenssi yhden emäksen tarkkuudella, tulee näyte vielä sekvensoida perinteisin keinoin. Menetelmä kuitenkin nopeuttaa sekvensointia, koska kaikkia näytteitä ei tarvitse erikseen sekvensoida. HMR-menetelmällä voidaan tutkia myös geenin promoottorialueen metylaatioprofiilia.

Alukkeet HMR-analyysia varten suunniteltiin Beacon Designer TM 7.50 (Premier Biosoft international, Palo Alto, CA 94303, USA) -ohjelmalla, joka etsi sekvenssistä sopivat kohdat alukkeille, jotta niille ei löytynyt homologiaa muualta genomista. Alukkeiden tuli myös sitoutua mahdollisimman lähelle tutkittavaa sekvenssivariaatiota, jotta tutkittava alue ei olisi liian pitkä analysoitavaksi menetelmällä. Alukkeet tilattiin kaupalliselta valmistajalta, Sigma Aldrichilta (Saint Louis, MO 63103, USA) HPLC-

puhdistettuina. Jokainen alukepari optimoitiin ensin alukkeen konsentraation sekä lämpötilan suhteen, jonka jälkeen optimoitiin vielä DNA-templaatin konsentraatio kyseiselle alukeparille. Tämän jälkeen alukkeita testattiin varsinaista HMR-analyysiä varten, jossa lämpötilaa nostettiin hyvin pienin askelin mahdollistaen pieninkin sekvenssimuutoksen näkymisen muodostuvassa sulamiskäyrässä.



*Kuva 7.* High resolution melting -analyysin normalisoitu sulamiskäyrä, jossa villityyppiä kuvaa vihreä käyrä, heterotsygoottimuutosta sininen käyrä ja homotsygoottimuutosta punainen käyrä (Erali ym., 2008).

Jokaiselle näytteelle valmistettiin oma reaktioseos, josta pipetoitiin kolme rinnakkaista näytettä, jotta tulos olisi luotettava ja helposti tulkittavissa. Jokaisessa rinnakkaisessa näytteessä tuli olla täsmälleen sama määrä templaatti-DNA:ta. Menetelmä on hyvin herkkä, mistä johtuen pipetointi suoritettiin laminaarikaapissa erityistä huolellisuutta käyttäen. Tarvittavat reagenssit yhtä näytettä kohden on esitetty taulukossa 7 ja analyysissä käytetty ohjelma taulukossa 8. Analyysivaiheet 2 - 3 toistettiin 39 kertaa, jonka jälkeen seurasi minuutin denaturaatio ja lämpötilan lasku 50 °C:een. Tämän jälkeen lämpötilaa nostettiin 0,2 °C aina 10 s välein, jotta sulamiskäyrät eri näytteille saatiin muodostettua. HMR-analyysi suoritettiin reaaliaikaisella PCR-laitteella (CFX384 Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories Ltd, Herts HP2 7DX, United Kingdom) ja tulokset analysoitiin Premium precision melt analysis software -ohjelmalla (Bio-Rad Laboratories Ltd, Herts HP2 7DX, United Kingdom).

Taulukko 7. HMR-analyysiin tarvittavat reagenssit yhtä reaktiota kohden.

Reagenssi	Määrä (µl)
SsoFast™ EvaGreen® supermix	5
Forward-aluke (10 µM)	0,5
Reverse-aluke (10 µM)	0,5
DNA-templaatti (25ng/ µl)	1
H <sub>2</sub> O	3

Taulukko 8. HMR-analyysissä käytetty ohjelma.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika
1. alkudenaturaatio	98	3 min
2. denaturaatio	98	10 s
3. alukkeiden kiinnittyminen	T <sub>a</sub> (alukkeelle ominainen kiinnittymislämpötila)	30 s
4. denaturaatio	98	1 min
5. jäähtytys	50	1 min
6. sulamiskäyrän muodostus	65 - 95 0,2 °C nousu/ 10 s	

#### 4.5 Tilastolliset analyysit

Lopullinen tulosten analysointi tehtiin käyttäen erilaisia tilastollisia menetelmiä. HNF1B-geenin sekvenssistä löydetyille muutoksille laskettiin Hardy-Weinberg (HW) -tasapainot, jotta nähtiin vastasivatko aineostossa havaitut genotyypifrekvenssit odotettuja frekvenssejä. Tuloksille laskettiin myös ristitulosuhte eli odd-ratio (OR) sekä 95 % luottamusväli, joiden avulla tarkasteltiin, kuinka todennäköisesti tietty muutos assosioitui eturauhassyöpään.

HW-tasapainot laskettiin seuraavalla kaavalla  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , jossa genotyypin AA frekvenssi on  $p^2$ , genotyypin aa frekvenssi on  $q^2$  ja genotyypin Aa frekvenssi on  $pq + qp = 2pq$ . Kun populaatio on Hardy-Weinberg tasapainotilassa niin havaitut genotyypifrekvenssit vastaavat odotettuja genotyypifrekvenssejä, toisin sanoen genotyyppien suhde pysyy vakiona sukupolvesta toiseen. Jos yhtälö ei toteudu aineiston genotyypifrekvensseillä, muutoskohta on epätasapainossa.

Lisäksi eri genotyypeille laskettiin ristitulosuhteet (OR) ja vastaavat 95 % luottamusvälit. Ristitulosuhteet laskettiin seuraavalla kaavalla.

$$OR = \frac{\frac{a}{c}}{\frac{b}{d}} \leftrightarrow \frac{(a \times d)}{(c \times b)}$$

Kaavassa a kuvaa riskigenotyyppien lukumäärää sairailta, c muutoskohdan muiden genotyyppien lukumäärää sairailta, b riskigenotyyppien lukumäärää kontrolleilla ja d muiden genotyyppien lukumäärää kontrolleilla. Mikäli jokin kaavan arvoista a, b, c tai d oli nolla, lisättiin kaikkiin tekijöihin 0,5, jotta ristitulosuhteet pystyttiin laskemaan kaavaa käyttäen.

95 % luottamusvälit laskettiin seuraavalla kaavalla: otoskeskiarvo  $\pm$  1,96 x keskivirhe, jossa otoskeskiarvo oli luonnollinen logaritmi OR-arvosta ja keskivirhe neliöjuuri lausekkeesta  $(1/a+1/b+1/c+1/d)$ . Lopuksi lausekkeen (otoskeskiarvo  $\pm$  1,96 x keskivirhe) tulokset korotettiin potenssiin  $e^x$ , jotta saatiin luottamusväli kyseiselle OR-arvolle. Mikäli luottamusväliin ei mahtunut arvoa 1, OR-arvoa voitiin pitää tilastollisesti merkittävänä. Alle yhden oleva OR-arvo merkitsi muutoksen suojaavaa vaikutusta taudissa, kun taas yli yhden oleva arvo viittasi altistavaan vaikutukseen.

## 5 TULOKSET

### 5.1 Sekvensoinnin ja TaqMan-genotyypauksen perusteella saadut tulokset

#### 5.1.1 HNF1B-geenissä havaitut muutokset

HNF1B-geenin sekvenssistä löytyi kymmenen muutoskohtaa, joista kaksi (444G>A ja 1484G>A) löytyi eksonialueelta. Eksonista kaksi löytynyt pistemutaatio 444G>A oli hiljainen muutaatio, joka ei muuttanut kodonin koodaamaa aminohappoa. Eksonista seitsemän löytynyt missense-mutaatio 1484G>A sen sijaan aiheutti glysiini-aminohapon vaihtumisen seriiniksi (G495S). Lisäksi intronista kaksi löytyi neljän emäksen insertio (IVS2-71\_72insTGTC) noin 70 nukleotidiä ennen koodaavan sekvenssin alkua. Loput löytyneet muutokset olivat pistemutaatioita, joista yksi löytyi intronista kahdeksan (IVS8-22T>C) ja kuusi muuta 3'UTR-alueelta (IVS9+99C>A, IVS9+100G>A, IVS9+274A>T, IVS9+384A>G, IVS9+444C>A ja IVS9+924C>G). Taulukkoon 9 on koottu *HNF1B*-geenistä löytyneet muutokset ja niiden eri genotyyppien määrät ja genotyypifrekvenssit eturauhassyöpää sairastavilla perhenäytteillä sekä kontrolleilla.

Kymmenestä *HNF1B*-geenissä havaituissa mutaatioista yhdeksän löytyi SNP (single nucleotide polymorphism) -tietokannasta ja vain yksi muutos, eksonin kaksi hiljainen pistemutaatio (444G>A), on uusi. Taulukkoon 10 on koottu tunnettujen muutosten rs-numerot sekä alleelifrekvenssit niille muutoksille, joiden tiedot oli merkitty NCBI:n (National Center for Biotechnology Information) SNP-tietokantaan.

Kahta muutoskohtaa IVS9+274A>T (rs2689) ja IVS9+444C>A (rs2688) tutkittiin vielä suuremmassa aineistossa. Lisätutkimuksissa genotyypattiin noin 700 sporadista syöpää sairastavien henkilöiden näytteitä sekä noin 700 kontrollinäytettä. Genotyypattujen näytteiden eri genotyyppien määrät sekä genotyypifrekvenssit on esitetty taulukossa 11.

*Taulukko 9.* Talukkoon on koottu *HNF1B*-geenistä löytyneet muutokset ja niiden genotyyppien määrät perheaineistossa eturauhassyöpää sairastavilla sekä kontrolleilla (suluissa genotyyppifrekvenssit).

<b>Eksoni/ Introni</b>	<b>Nukleotidi- muutos</b>	<b>Genotyypin määrä perhenäytteet (eturauhassyöpää sairastavat), 57 näytettä</b>	<b>Genotyypin määrä, kontrollit, 191 näytettä</b>
Eksoni 2	444G>A	GG 51 (89 %) GA 6 (11 %)	GG 181 (95 %) GA 10 (5 %)
Introni 2	IVS2- 71_72insTGTC	villityyppi 8 (14 %) heterotsygootti- insertio 20 (35 %) homotsygootti- insertio 29 (51 %)	villityyppi 12 (6 %) heterotsygootti- insertio 75 (39 %) homotsygootti- insertio 104 (54 %)
Eksoni 7	1484G>A	GG 51 (89 %) GA 4 (7 %) AA 2 (4 %)	GG 183 (96 %) GA 8 (4 %)
Introni 8	IVS8-22T>C	TT 5 (9 %) TC 12 (21 %) CC 40 (70 %)	TT 11 (6 %) TC 72 (38%) CC 108 (57%)
3'UTR	IVS9+99C>A	CC 45 (79 %), CA 12 (21 %)	CC 137 (72 %) CA 50 (26 %) AA 4 (2 %)
3'UTR	IVS9+100G>A	GG 3 (5 %) GA 8 (14 %) AA 46 (80 %)	GG 8 (4 %) GA 38 (20 %) AA 145 (76 %)
3'UTR	IVS9+274A>T	AA 13 (23 %) AT 23 (40 %) TT 21 (37 %)	AA 53 (28 %) AT 92 (48 %) TT 46 (24 %)
3'UTR	IVS9+384A>G	AA 53 (93%) AG 4 (7 %)	AA 174 (91 %) AG 17 (9 %)
3'UTR	IVS9+444C>A	CC 24 (42 %) CA 8 (14 %) AA 25 (44%)	CC 41 (21 %) CA 84 (44 %) AA 66 (35 %)
3'UTR	IVS9+924C>G	CC 42 (74 %) CG 15 (26%)	CC 122 (64 %) CG 62 (32 %) GG 7 (4 %)



*Taulukko 10.* Taulukossa on esitetty NCBI:n SNP-tietokannasta löytyneet rs-numerot tunnetuille mutaatioille sekä alleelifrekvenssit, mikäli ne oli ilmoitettu. Muutoksilla rs2229295 ja rs1800929 alleelifrekvenssit on laskettu aineistosta, jossa oli mukana näytteitä 15 eri etnisistä ryhmistä.

<b>Introni/ Eksoni</b>	<b>Nukleotidi-muutos</b>	<b>SNP-ID</b>	<b>Alleelifrekvenssi (HapMap-CEU)</b>
Eksoni 2	444G>A	uusi	
Introni 2	IVS2-71_72insTGTC	rs55672944	
Eksoni 7	1484G>A	rs1805035	
Introni 8	IVS8-22T>C	rs3110641	
3'UTR	IVS9+99C>A	rs2229295	C 0.85 A 0.15
3'UTR	IVS9+100G>A	rs1800929	G 0.15 A 0.85
3'UTR	IVS9+274A>T	rs2689	A 0.53 T 0.47
3'UTR	IVS9+384A>G	rs1058166	A 0.95 G 0.05
3'UTR	IVS9+444C>A	rs2688	C 0.39 A 0.61
3'UTR	IVS9+924C>G	rs10962	C 0.81 G 0.19

*Taulukko 11.* Taulukossa on esitetty muutosten IVS9+274A>T ja IVS9+444C>A genotyyppien määrät sporadisilla näytteillä sekä kontrollinäytteillä (suluissa genotyyppifrekvenssit).

<b>Eksoni/ introni</b>	<b>Nukleotidi- muutos</b>	<b>Genotyypin määrä, sporadiset näytteet</b>	<b>Genotyypin määrä, kontrollinäytteet</b>
3'UTR	IVS9+274A>T	AA 204 (29 %) AT 335 (49 %) TT 151 (22 %)	AA 182 (26 %) AT 341 (50 %) TT 167 (24 %)
3'UTR	IVS9+444C>A	CC 112 (16 %) CA 324 (47 %) AA 260 (37 %)	CC 108 (15 %) CA 360 (50 %) AA 257 (35 %)

### 5.1.2 HNF1B-geenin promoottorialueen sekvenssivariaatiot

Geenin koodaavan alueen lisäksi sekvenssoitiin noin 1000 nukleotidin alue ennen transkription aloituskohtaa. Tällä alueella arvioitiin sijaitsevan ainakin osa geenin promoottorialueesta. Noin 800 nukleotidin alueelta ennen geenin alkua ei löytynyt minkäänlaisia sekvenssivariaatioita. Tämän jälkeen sekvenssi yllättäen muuttui hyvin vaihtelevaksi. Sekvenssistä löytyi 16 nukleotidin mittainen toistojakso (TGCCTCACCATCCTAG), jonka määrä eri näytteissä vaihteli keskimäärin kahdesta viiteen toistojaksoon. Tämän lisäksi alueelta löytyi myös muita sekvenssivariaatioita. Toistojakson vaihtelut sekä muut sekvenssivariaatiot tekivät sekvenssoinnista mahdollottoman, koska toistojakson deleetiot/ insertiot (duplikaatiot) esiintyivät sekä heterotsygootteina että homotsygootteina muutoksina ja lisäksi vaihtelivat eri

näytteiden välillä. Sekvensoinnilla ei pystytty tuottamaan kokonaisia fragmentteja kyseistä alueesta. Sequencer 4.9 -ohjelma ei myöskään pystynyt muodostamaan loogista sekvenssiä ja todellinen sekvenssi oli mahdoton päätellä erilaisten variaatioiden joukosta. Sekvensointia kokeiltiin useilla erilaisilla alukkeilla, mutta lopputulos oli sama.

Tämän työn puitteissa promoottorialueen sekvenssin selvittäminen yhden emäksen tarkkuudella oli mahdotonta, mutta varmuudella voidaan sanoa, että kyseisellä alueella on paljon erilaisia sekvenssivariaatioita. Nämä variaatiot ovat yleisiä pistemutaatioita suurempia ja vaihtelevampia. Muutoksia löytyi sekä eturauhassyöpää sairastavien perheiden näytteistä että kontrollinäytteistä, mutta tarkkoja lukumääriä eri muutoksille on mahdotonta sanoa.

### 5.1.3 Kahden HNF1B-geenin eturauhassyöpään assosioituvan SNP:n genotyypit suomalaisessa väestössä

Tässä tutkimuksessa löydettyjen muutoskohtien lisäksi tutkittiin kahta jo aikaisemmin eturauhassyöpään yhdistettyä sekvenssivarianttia suomalaisessa aineistossa. *HNF1B*-geenivarianttien rs4430796 (introni 2) ja rs11649743 (introni 4) on jo aikaisemmin osoitettu olevan assosioituneita suurentuneeseen eturauhassyöpäriskiä (Sun ym., 2008). Kyseiset sekvenssivariantit genotyypattiin noin 740 näytteestä, jotka olivat sporadista syöpää sairastavilta henkilöiltä. Lisäksi genotyypattiin noin 740 kontrollinäytettä. Näytteiden eri genotyyppien määrät sekä genotyyppifrekvenssit on esitetty taulukossa 12.

*Taulukko 12.* Taulukossa on esitetty kahden sekvenssivariantin, rs4430796 ja rs11649743, genotyyppien määrä sporadisilla syöpänäytteillä sekä kontrollinäytteillä (suluissa genotyyppifrekvenssit).

<b>SNP-ID</b>	<b>Genotyypin määrä, sporadiset näytteet</b>	<b>Genotyypin määrä, kontrollinäytteet</b>
rs4430796	GG 87 (12 %) GA 294 (40 %) AA 355 (48 %)	GG 108 (15 %) GA 300 (41 %) AA 317 (44 %)
rs11649743	AA 13 (2 %) AG 187 (25 %) GG 542 (73 %)	AA 11 (1 %) AG 177 (24 %) GG 557 (75 %)

## 5.2 Tilastolliset analyysit

### 5.2.1 Hardy-Weinbergin tasapaino

Kontrollinäytteet olivat muutosten suhteen Hardy-Weinbergin (HW) -tasapainossa ( $p > 0.05$ ), paitsi muutoksen IVS9+100G>A suhteen. Eturauhassyöpää sairastavien näytteet eivät olleet HW-tasapainossa muutosten 1484G>A, IVS8-22T>C, IVS9+100G>A ja IVS9+444C>A osalta. Aineistona tutkimuksessa käytettiin 17q-linkattujen perheiden eturauhassyöpää sairastavia henkilöitä, joita oli tutkimuksessa mukana 57 näytettä. Kontrollinäytteitä oli yhteensä 191 henkilöltä. Aineisto on kuitenkin verrattain pieni varsinkin syöpää sairastavien osalta, mikä voi selittää Hardy-Weinbergin epätasapainon. Taulukkoon 13 on koottu p-arvot HW-tasapainolaskuista.

Taulukko 13. Taulukossa on esitetty eri genotyyppien jakautumista kuvaavat p-arvot HW-tasapainolaskuista.

<b>Eksoni/ intron</b>	<b>Nukleotidi- muutos</b>	<b>p-arvo, perhenäytteet (eturauhassyöpää sairastavat)</b>	<b>p-arvo, kontrollit</b>
Eksoni 2	444G>A	0,7291	0,7103
Introni 2	IVS2-71_72insTGTC	0,1557	0,7549
Eksoni 7	1484G>A	<b>0,0002</b>	0,2516
Introni 8	IVS8-22T>C	<b>0,0069</b>	0,8255
3'UTR	IVS9+99C>A	0,3744	0,8208
3'UTR	IVS9+100G>A	<b>0,0009</b>	<b>0,0126</b>
3'UTR	IVS9+274A>T	0,1820	0,6251
3'UTR	IVS9+384A>G	0,7836	0,5198
3'UTR	IVS9+444C>A	<b>2,434E-07</b>	0,1464
3'UTR	IVS9+924C>G	0,2527	0,7992

### 5.2.2 OR:t ja vastaavat 95 %:n luottamusvälit

Muutoskohtien eri genotyypeille laskettiin ristitulosuhteet eli odd-ratiot (OR:t) sekä vastaavat 95 %:n luottamusvälit, joiden arvot on koottu taulukkoon 14. Introni 8 olevan IVS8-22T>C -mutaation TC genotyypillä (heterotsygoottimuutos) on suojaava vaikutus eturauhassyövässä, kun taas CC genotyyppi (homotsygoottimuutos) assosioituu suurentuneeseen eturauhassyöpäriskiin. 3'UTR-alueella olevan

IVS9+444C>A -mutaation CC genotyyppi (villityyppi) on assosioitunut suurentuneeseen syöpäriskiin, kun taas genotyypillä CA on suojaava vaikutus

*Taulukko 14.* Taulukossa on esitetty löytyneiden muutoskohtien genotyypit, OR:t ja 95 %:n luottamusvälit. Eturauhassyöpään assosioituneet genotyypit on lihavoitu.

<b>Eksoni/ Introni</b>	<b>Nukleotidimuutos</b>	<b>Genotyyppi</b>	<b>OR</b>	<b>95 % CI</b>
Eksoni 2	444G>A	GG	0,575	0,19 - 1,76
		GA	1,740	0,57 - 5,31
		AA	3,330	0,07 - 169,7
Introni 2	IVS2- 71_72insTGTC	villityyppi	2,435	0,94 - 6,29
		heterotsygootti- insertio	0,836	0,45 - 1,55
		homotsygootti- insertio	1,238	0,68 - 2,24
Eksoni 7	1484G>A	GG	0,372	0,12 - 1,12
		GA	1,726	0,50 - 5,96
		AA	17,252	0,82 - 364,7
Introni 8	<b>IVS8-22T&gt;C</b>	TT	1,573	0,52 - 4,73
		<b>TC</b>	<b>0,432</b>	<b>0,21 - 0,89</b>
		<b>CC</b>	<b>1,969</b>	<b>1,03 - 3,75</b>
3'UTR	IVS9+99C>A	CC	1,478	0,73 - 3,01
		CA	0,752	0,37 - 1,54
		AA	0,362	0,019 - 6,83
3'UTR	IVS9+100G>A	GG	1,271	0,33 - 4,96
		GA	0,474	0,19 - 1,19
		AA	1,692	0,77 - 3,71
3'UTR	IVS9+274A>T	AA	0,769	0,38 - 1,54
		AT	0,728	0,40 - 1,33
		TT	1,839	0,98 - 3,46
3'UTR	IVS9+384A>G	AA	1,294	0,42 - 4,01
		AG	0,772	0,25 - 2,40
		GG	3,330	0,065 - 169,7
3'UTR	<b>IVS9+444C&gt;A</b>	<b>CC</b>	<b>2,474</b>	<b>1,32 - 4,66</b>
		<b>CA</b>	<b>0,238</b>	<b>0,11 - 0,51</b>
		AA	1,479	0,81 - 2,70
3'UTR	IVS9+924C>G	CC	1,584	0,82 - 3,06
		CG	0,743	0,38 - 1,44
		GG	0,214	0,012 - 3,80

IVS9+444C>A -mutaatiota tutkittiin myös suuremmissa aineistossa sporadisilla syöpänäytteillä. Sporadisessa syövässä muutos ei ollut assosioitunut eturauhassyöpään. CA genotyypin OR-arvo oli 0,883 ja 95 % luottamusväli 0,72 - 1,09. Myös sporadisilla näytteillä genotyypillä CA näyttäisi olevan kuitenkin enemmän suojaava kuin altistava vaikutus. Myös IVS9+274A>T muutosta tutkittiin suuremmissa aineistossa sporadisilla

näytteillä. Sporadisen aineiston perusteella lasketut OR:t ja 95 %:n luottamusvälit eri genotyypeille on esitetty taulukossa 15. Muutokset eivät olleet assosioituneet eturauhassyöpään sporadisessa aineistossa.

*Taulukko 15.* Taulukossa on esitetty sporadisesta aineistosta lasketut OR:t ja 95 %:n luottamusvälit eri genotyypeille.

<b>Eksoni/ Introni</b>	<b>Nukleotidimuutos</b>	<b>Genotyyppi</b>	<b>OR</b>	<b>95 % CI</b>
3'UTR	IVS9+274A>T	AA	1,172	0,93 - 1,48
		AT	0,966	0,78 - 1,19
		TT	0,877	0,68 - 1,13
3'UTR	IVS9+444C>A	CC	1,096	0,82 - 1,46
		CA	0,883	0,72 - 1,09
		AA	1,086	0,87 - 1,35

Kaksi eturauhassyöpään yhdistettyä muutoskohtaa, rs4430796 ja rs11649743, genotyypattiin suomalaisella aineistolla. Eri genotyypeille laskettiin OR:t sekä vastaavat 95 %:n luottamusvälit, joiden arvot on esitetty taulukossa 16. Tilastollisilla testeillä ei saatu merkittäviä arvoja genotyypeille eli SNP:t eivät ole assosioituneet eturauhassyöpään suomalaisessa väestössä tämän tutkimuksen perusteella. Genotyypit olivat kuitenkin jakautuneet samansuuntaisesti kuin ruotsalaisella ja amerikkalaisella väestöllä tehdyssä tutkimuksessa.

*Taulukko 16.* Taulukossa on esitetty sporadisella aineistolla lasketut OR:t ja 95 %:n luottamusvälit eri genotyypeille kahden SPN:n osalta rs4430796 ja rs11649743.

<b>SNP-ID</b>	<b>GENOTYYPPI</b>	<b>OR</b>	<b>95 % CI</b>
rs4430796 G>A	GG	0,766	0,57 - 1,04
	GA	0,942	0,76 - 1,16
	AA	1,199	0,98 - 1,47
rs11649743 A>G	AA	1,190	0,53 - 2,67
	AG	1,081	0,85 - 1,37
	GG	0,915	0,73 - 1,15

### 5.3 Alleelifrekvenssit

Talulukossa 17 on esitetty alleelifrekvenssit perhenäytteille, kontrolleille sekä eurooppalaiselle väestölle (HapMapCEU) niiden muutosten osalta, jotka oli ilmoitettu NCBI:n SNP-tietokannassa. Muutoksilla IVS9+99C>A ja IVS9+100G>A alleelifrekvenssit eurooppalaiselle väestölle on laskettu aineistosta, jossa oli mukana

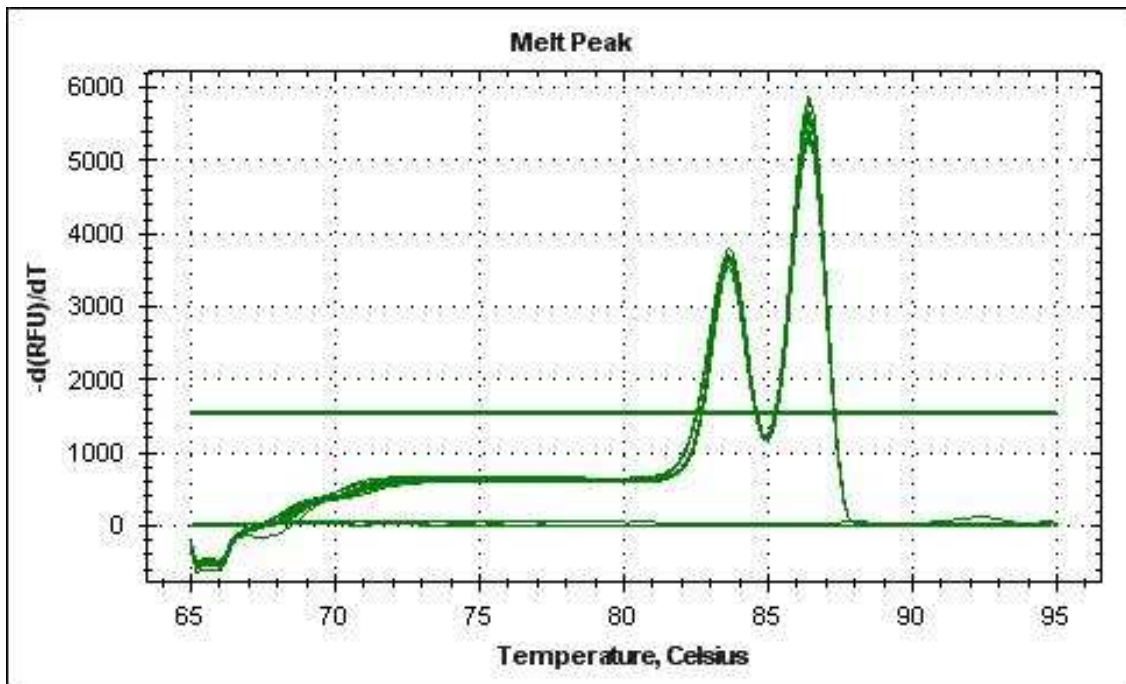
näytteitä 15 eri etnisistä ryhmistä. Taulukossa on lihavoitu variantit, jotka olivat assosioituneet eturauhassyöpään suomalaisessa väestössä.

*Talukko 17.* Alleelifrekvenssit perhenäytteille, kontrolleille ja eurooppalaiselle väestölle (HapMapCEU).

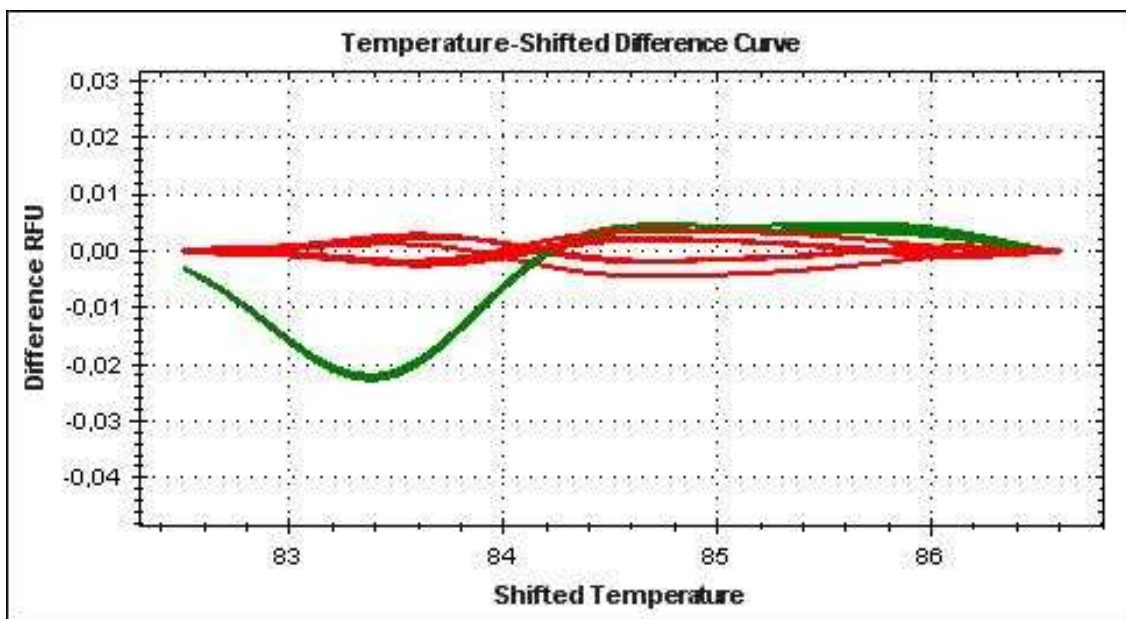
<b>Eksoni/ Introni</b>	<b>Nukleotidi- muutos</b>	<b>Alleeli- frekvenssit, perhenäytteet (syöpää sairastavat)</b>	<b>Alleeli- frekvenssit, kontrollit</b>	<b>Alleeli- frekvenssi HapMapCEU</b>
Eksoni 2	444G>A	G 0.95 A 0.05	G 0.97 A 0.03	
Eksoni 7	1484G>A	G 0.93 A 0.07	G 0.98 A 0.02	
<b>Introni 8</b>	<b>IVS8-22T&gt;C</b>	<b>T 0.19</b> <b>C 0.81</b>	<b>T 0.25</b> <b>C 0.75</b>	
3'UTR	IVS9+99C>A	C 0.89 A 0.11	C 0.85 A 0.15	C 0.85 A 0.15
3'UTR	IVS9+100G>A	G 0.12 A 0.88	G 0.14 A 0.86	G 0.15 A 0.85
3'UTR	IVS9+274A>T	A 0.43 T 0.57	A 0.52 T 0.48	A 0.53 T 0.47
3'UTR	IVS9+384A>G	A 0.96 G 0.04	A 0.96 G 0.04	A 0.95 G 0.05
<b>3'UTR</b>	<b>IVS9+444C&gt;A</b>	<b>C 0.49</b> <b>A 0.51</b>	<b>C 0.43</b> <b>A 0.57</b>	<b>C 0.39</b> <b>A 0.61</b>
3'UTR	IVS9+924C>G	C 0.87 G 0.13	C 0.80 G 0.20	C 0.81 G 0.19

#### 5.4 HMR-menetelmän optimointi

HMR-menetelmällä oli tarkoitus genotyyppata intronissa kaksi olevaa insertiokohtaa suuremmassa aineistossa. HMR-analyysia varten tilatut alukkeet eivät kuitenkaan monistaneet lainkaan DNA:ta. Tämän jälkeen kokeiltiin perinteistä sekvensointia varten suunniteltuja alukkeita, jotka yllättäen toimivat myös tässä menetelmässä. Alukkeiden konsentraatiota ja lämpötilaa optimoitaessa ne näyttivät toimivan hyvin, mutta varsinaisten näytteiden kanssa huomattiin epäspesifisen tuotteen muodostuminen. HMR-analyysistä saadusta sulamislämpötilan kuvaajasta (kuva 9) voidaan nähdä alukkeiden epäspesifinen sitoutuminen, mikä näkyy kuvaajassa kahden sulamispiikin muodostumisena.



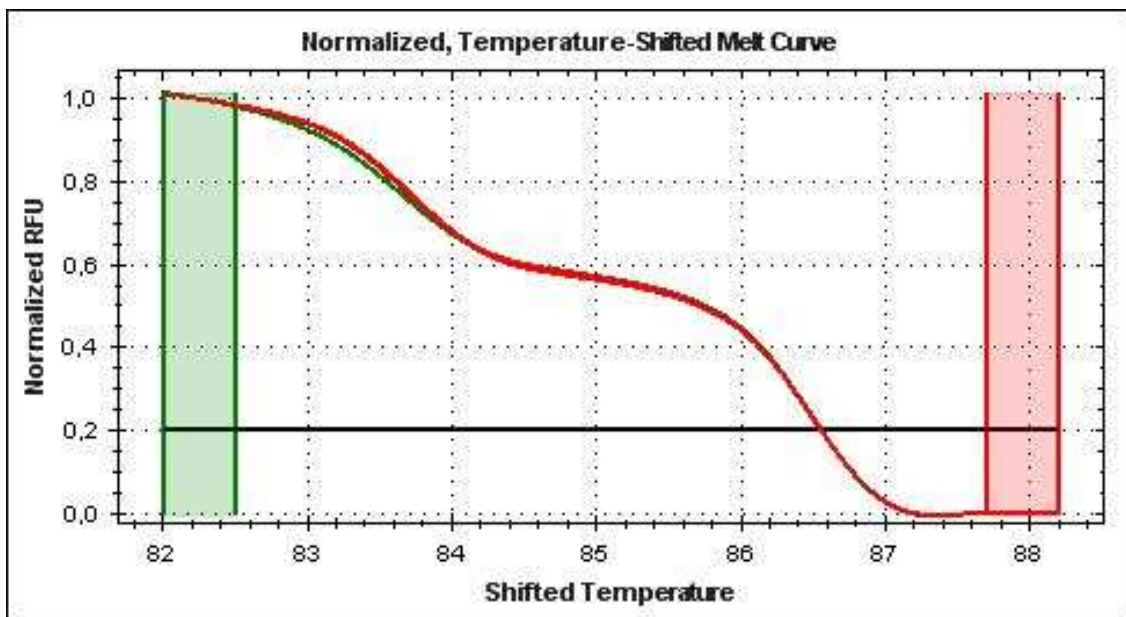
Kuva 9. Näytteiden sulamislämpötilaa kuvaavasta käyrästä voi nähdä kahden eri tuotteen sulaminen eri lämpötiloissa.



Kuva 10. Lämpötilariippuvainen erotuskäyrä, josta heterosygoottinäytteen voi erottaa helposti (vihreä), mutta kahden muun näytteen erottaminen on vaikeaa.

Ennen varsinaisten näytteiden analysointia oli tarkoitus testata menetelmää näytteillä, joiden genotyypit tunnettiin jo sekvensoinnin pohjalta. HMR-menetelmällä oli tarkoitus saada yhdenmukainen tulos sekvensoinnissa saatujen tulosten kanssa. Menetelmällä olisi pitänyt pystyä erottamaan näytteistä kolme eri genotyyppiä, mutta vain heterosygoottinäyte pystyttiin tunnistamaan varmasti (kuva 10). Kaksi eri

homotsygoottinäytettä, villityyppi ja homotsygoottimuutos, olivat vaikeammin erotettavissa. Lisäksi normalisoidussa sulamiskäyrässä näkyi selkeästi kaksi tuotetta, mikä saattoi vaikuttaa lopputulokseen (kuva 11). Koska menetelmällä ei erotettu kolmea eri genotyyppiä testinäytteistä, ei kyseistä insertio-kohtaa ollut mahdollista tutkia suuremmassa aineistossa tämän työn puitteissa. Jos menetelmää optimoitaisiin edelleen, löytyisi varmasti tapoja, jolla menetelmä saataisiin toimivaksi suurten aineistojen genotyypauksessa.



*Kuva 11.* Normalisoitu sulamiskäyrä, josta voi nähdä kahden eri tuotteen sulamisen eri lämpötiloissa. Sulamiskäyrässä olevat kaksi notkahdusta kuvaavat kahden eri tuotteen sulamista.



## 6 POHDINTA

### 6.1 Menetelmien tarkastelu

#### 6.1.1 Sekvensointi

Sekvensointi-menetelmä on jo pitkään ollut perusmenetelmänä käytössä ryhmässä ja sen eri työvaiheet oli optimoitu jo valmiiksi toimivaksi. PCR-tuotteen puhdistus oli tosin vaihdettu hiljattain entsyymaattiseen reaktioon perustuvaan EXOSAP-menetelmään, jonka toimivuus oli toisinaan vaihtelevaa. Verrattaessa aikaisempaan filterilevyillä tapahtuvaan PCR-tuotteen puhdistukseen, entsyymaattinen menetelmä oli hyvin helppo ja nopea suorittaa, mutta puhdistuksen teho oli vaihtelevampaa kuin aikaisemmin käytössä olleessa menetelmässä.

Sekvensointi on hyvin luotettava ja tarkka menetelmä uusien mutaatioiden havaitsemiseksi sekvenssistä, mutta toisaalta se on myös hyvin aikaa vievä ja kallis. Tuloksen luotettavuuteen voi vaikuttaa mahdolliset kontaminaatiot, mikäli näyte-DNA:t pääsevät sekoittumaan sekvensoinnin eri työvaiheiden aikana. Tämä riski on aina olemassa, mutta kontaminaatioita pyrittiin välttämään huolellisilla työtavoilla. Lisäksi perhenäytteitä ja kontrollinäytteitä käsiteltiin aina erillisinä näytteiden kontaminaation välttämiseksi. Näytteistä sekvensoitiin molemmat DNA-juosteet, jolloin havaittu mutaatio pystyttiin tarkistamaan molemmista juosteista. Kontrollinäytteistä ei pääasiallisesti sekvensoitu, kuin toinen juoste, mikäli mutaatiokohta oli helposti analysoitavissa. Sekvenssin analysointi tehtiin manuaalisesti Sequencer 4.9 -ohjelmaa apuna käyttäen, jolloin virheen mahdollisuus analysointivaiheessa on otettava huomioon.

Vaikka sekvensoinnilla yleensä saadaan geenisekvenssin rakenne selvitettyä yhden emäksen tarkkuudella, tässä työssä huomattiin myös sekvensoinnin rajallisuus. *HNF1B*-geenin intronista kaksi löytynyt neljän emäksen insertio pystyttiin vielä havaitsemaan, mutta promoottorialueelta löytyneet toistojakso-monistumat olivat jo mahdottomia selvittää yksityiskohtaisesti. Molempien muutoskohtien sijaitseminen toistojakso-

alueella teki sekvenssin lukemisesta erityisen haasteellista, koska Sequencer 4.9 -ohjelma ei pystynyt paikallistamaan muutoksen tarkkaa paikkaa toistojaksojen sisällä.

### 6.1.2 Genotyypaus TaqMan-menetelmällä

Genotyypaus suoritettiin TaqMan-menetelmällä, joka perustuu fluoresenssileimattuihin koettimiin, jotka hybridioituessaan tutkittavan näytteen kanssa emittoivat fluoresenssivaloa. Menetelmä on hyvin käyttökelpoinen suurien aineistojen nopeaan genotyypaukseen, jos tutkittava mutaatiokohta tunnetaan entuudestaan. Genotyypaus-assayn tunnetulle muutokselle voi tilata kaupalliselta valmistajalta, Applied Biosystemsiltä. Näytteet ja mastermix-seos pipetoidaan 384-kuoppalevyille robotilla, jolloin kontaminaation riski on melko pieni. Virheen mahdollisuus on olemassa analysointivaiheessa, kun suuria tiedostoja muokataan tilastollisten analyysien aikana. Menetelmä on kuitenkin kokonaisuudessaan melko luotettava.

### 6.1.3 Genotyypaus High resolution melting (HMR) -menetelmällä

HMR-menetelmä perustuu eri genotyyppien erilaiseen DNA:n sulamislämpöön. DNA:n kaksoiskierteinen rakenne sitoo fluoresoivaa väriainetta, jolloin näytteiden sulamiskäyrästä voidaan erottaa eri genotyypit erilaisen sulamiskäyrän perusteella. Menetelmä on nopea tapa erotella suuresta näytemäärästä erilaiset genotyypit ja se nopeuttaa sekvensointia huomattavasti, koska kaikkia näytteitä ei tarvitse erikseen sekvensoida. Samanlaisen sulamiskäyrän muodostavista näytteistä voidaan valita yksi näyte sekvensoitavaksi, jolloin voidaan selvittää kaikkien samaa genotyyppiä olevien näytteiden geenisekvenssi.

Menetelmä ei siedä lainkaan alukkeiden epäspesifistä sitoutumista, kun taas perinteisessä sekvensoinnissa mahdollisista pienistä sivutuotteista päästään eroon puhdistuksella ja sekvensointi-PCR-reaktion valmistamisella puhdistetusta PCR-tuotteesta. Alukkeiden suunnittelu nousee HMR-menetelmässä entistä tärkeämpään rooliin. Huolellisesta suunnittelusta huolimatta on mahdollista, että alukkeet eivät muodosta tuotetta. Näin kävi myös tässä työssä, kun HMR-analyysiä varten suunnitellut alukkeet eivät monistaneet laisinkaan DNA:ta. Alukkeet testattiin yhdessä toisen geenin monistukseen tarkoitettujen HMR-alukkeiden kanssa, jotka toimivat moitteetta. Näin ollen reagensseissa tai työtavoissa ei ollut vikaa. Alukkeita testattiin

useissa lämpötiloissa ja alukkeiden eri konsentraatioissa, mutta niillä ei saatu minkäänlaista tuotetta aikaan.

Tavallista sekvensointireaktiota varten suunnitellut alukkeet kuitenkin toimivat myös tässä menetelmässä, mutta muodostivat sivutuotteen. Sivutuotteen muodostuminen häiritsi todennäköisesti analyysiä sen verran, että eri genotyyppejä ei pystytty tunnistamaan. Menetelmä vaatii vielä tällä hetkellä paljon optimointia, jotta sitä voitaisiin käyttää suurien aineistojen tutkimiseen. Optimointi on spesifinen kullekin tutkitulle sekvenssivariaatiolle ja uusi alukepari vaatii aina uuden optimoinnin. Tutkittava DNA-fragmentti tulee olla melko lyhyt, jotta variaatiot voidaan tunnistaa. Mikäli sekvenssistä löytyy monia muutoksia pienen alueen sisällä, voi näiden tunnistaminen tällä menetelmällä olla melko haasteellista ja vaatia edelleen perinteisen sekvensoinnin.

Sekvensointia korvaaville menetelmille olisi kuitenkin varmasti paljon kysyntää, joten menetelmää kannattaa edelleen optimoida toimivaksi. HMR-analysointiohjelman kesto on vain noin 1,5 tuntia, mikä on hyvin lyhyt aika verrattuna kaksi työpäivää vievään sekvensointiin. Mikäli analyysi saadaan toimivaksi, se nopeuttaisi huomattavasti geenisekvenssien tutkimista. Tähän työhön tarkoitettun ajan puitteissa menetelmän testaus tämän pidemmälle ei ollut mahdollista, mutta mahdollisesti jo pienillä muutoksilla se voitaisiin saada toimivaksi.

Myös tuloksen luotettavuuden ja kontaminaation välttämisen kannalta HMR-analyysi on parempi vaihtoehto verrattuna perinteisiin menetelmiin. Näytteitä ei tarvitse käsitellä niin moneen kertaan, jolloin kontaminaatioiden riski pienenee. Perinteisessä sekvensoinnissa kuoppalevyllä olevat PCR-tuotteet tulee ensin puhdistaa, jonka jälkeen niistä pipetoidaan sekvensointi-PCR-reaktiot, jotka vielä saostetaan ennen analyysiä. Näiden käsittelyjen aikana kontaminaatoriski kasvaa huomattavasti verrattuna HMR-analyysiin, jossa tarvitaan vain yksi pipetointikerta, jonka jälkeen tulokset voidaan lukea koneelta.

## 6.2 HNF1B:n sekvenssistä löytyneiden muutosten tarkastelu

DNA-sekvenssissä esiintyy paljon vaihtelua, joka voidaan jakaa yleisiin variaatioihin eli polymorfioihin ja harvinaisiin variaatioihin eli mutaatioihin. Polymorfia viittaa yleiseen muutokseen, johon ei välttämättä liity fenotyypin muutosta kun taas mutaatiolla tarkoitetaan yleensä ilmiänsä muuttavaa geenivarianttia. Monitekijäisten tautien tutkimuksessa kyseinen luokittelu ei kuitenkaan ole kovin yksiselitteinen ja eturauhassyövän genetiikassa frekvenssiltään yleisetkin polymorfiat voivat altistaa sairaudelle yhdessä muiden geenivariaatioiden kanssa (Macinnis ym., 2009).

HNF1B-geenin sekvenssistä löytyi kaikkiaan kymmenen variaatiokohtaa, joista kaksi löytyi eksonialueelta. Näistä vain toinen 1484G>A aiheutti aminohapon muutoksen glysiinistä seriiniksi (G495S). Aminohapon muutoskohta sijaitsee proteiinin transaktivaatio-alayksikössä, joka on vastuussa HNF1B:n ja muiden proteiinien välisistä vuorovaikutuksista (Lu ym., 2007). Alayksikkö sijaitsee proteiinin C-terminaaliossa, missä se yhdessä muiden proteiinien kanssa vastaa kohdegeenin transkription säätelyä (Lu ym., 2007). Transaktivaatio-alayksikössä on yleensä enemmän vaihtelua aminohappojen välillä, kuin DNA:han sitoutuvassa alayksikössä tai dimerisaatio-alayksikössä. Muutoskohta ei siis suoraan vaikuta proteiinin sitoutumiseen kohde-DNA:n kanssa, mutta vuorovaikutukset muiden proteiinien kanssa voivat epäsuorasti vaikuttaa kohdegeenin transkription säätelyyn.

Variantti 1484G>A oli HW-tasapainossa ( $p = 0,25163$ ,  $n=191$ ) kontrollinäytteiden osalta, kun taas perhenäytteet eivät olleet tasapainossa ( $p = 0,0002$ ,  $n=57$ ). Epätasapaino voi johtua perheaineiston pienestä koosta ( $n=57$ ), mutta toisaalta se voi myös olla merkki valinnasta sairauden takia. Muutos ei kuitenkaan ollut assosioitunut eturauhassyöpään, kun mutaatiokohdan eri genotyypeille laskettiin OR:t ja vastaavat 95 % luottamusvälit. Homotsygoottimuutoksen OR-arvo oli siitä huolimatta suuri (OR 17,25, 95% CI 0,82 - 364,7), kun taas villityypin OR-arvo oli pieni (OR 0,37, 95% CI 0,12 - 1,12). Perheaineiston kokoa kasvattamalla muutoskohta voisi mahdollisesti saada merkittävän arvon ja olla assosioitunut syöpään.

Mielenkiintoinen huomio muutoksen 1484G>A osalta oli sen löytyminen vain kahdesta perheestä. Työssä tutkittiin 16 eturauhassyöpää sairastavaa perhettä, joista vain

kahdesta löytyi tämän mutaation kantajia. Näissä perheissä kaikki eturauhassyöpään sairastuneet kantoivat kyseistä mutaatiota joko heterotsygootti- tai homotsygoottimuutoksena, mutta toisaalta myös osa vielä terveistä henkilöistä kantoi mutaatiota kyseisissä perheissä. Vaikka mutaatio ei saisi tilastollisesti merkittäviä arvoja populaatiotasolla, sen merkitys yksilötasolla voi olla suuri. Näissä kahdessa perheessä muutoksella on todennäköisesti biologinen merkitys, vaikka sen vaikutus ei näkyisikään tilastollisissa testeissä.

Kaksi muutoksista löytyi introni-alueelta, IVS2-71\_72insTGTC ja IVS8-22T>C. Kumpikaan muutoksista ei sijainnut intronien leikkauskohdassa, joten ne eivät todennäköisesti ainakaan suoraan vaikuta intronien silmukointiin. Intronissa kaksi sijaitseva neljän emäksen insertio oli hyvin yleinen muutos sekä perhenäytteissä että kontrolleissa, eikä näin ollen ollut yhdistettävissä eturauhassyöpään. Intronissa kahdeksan oleva pistemutaatio IVS8-22T>C oli myös yleinen muutos aineistossa, mutta silti yleisempi perhenäytteissä. Mutaatio ei ollut HW-tasapainossa perhenäytteiden osalta ( $p=0,0069$ ,  $n=57$ ), kun taas kontrollinäytteet olivat tasapainossa. Eri genotyypeille lasketut OR:t kertoivat CC-genotyypin olevan assosioitunut eturauhassyöpään (OR 1,97, 95% CI 1,03 - 3,75), kun taas TC genotyypillä oli suojaava vaikutus (OR 0,43, 95% CI 0,21 - 0,89). SPN:n IVS8-22T>C heterotsygoottigenotyyppi suojaa sairaudelta, kun taas homotsygoottigenotyyppi altistaa sille. Vastaava asetelma ei ole vieras genetiikassa ja malliesimerkkinä voidaan pitää sirppisoluanemian geneettistä taustaa. Sairaus on perinnöllinen, jossa altistavan mutaation heterotsygoottigenotyyppi suojelee malarialta, mutta ei aiheuta taudin oireita (Creary ym., 2007). Homotsygoottigenotyypissä punasolut muuttuvat sirppimäisiksi aiheuttaen vaikean sairauden, joka johtaa usein kuolemaan jo lapsuusiässä. Tässä sairaudessa homotsygoottigenotyyppi siis altistaa taudille, kun taas heterotsygoottigenotyyppi antaa suojan toista sairautta vastaan (Creary ym., 2007).

Intronialueen muutokset eivät suoraan vaikuta syntyvän proteiinin rakenteeseen, mutta niillä voi olla vaikutusta intronien sekundaarirakenteen muodostumiseen ja silmukointiin, mikä voi edelleen vaikuttaa ratkaisevasti geenien aktiivisuuteen. Eukaryooteilla suurin osa intronien silmukoinnista tapahtuu spliseosomin katalysoimana, jolloin hyvin monimutkainen RNA-proteiinikompleksi tunnistaa ja asettelee intronien leikkautumiskohdat oikeaan asemaan eksonien yhdistämistä varten.

Tämän kompleksin lisäksi myös pre-mRNA:n sekundaarirakenne vaikuttaa leikkautumisaktiivisuuteen. (Buratti & Baralle, 2004.)

RNA-molekyyleillä on luonnollinen taipumus muodostaa stabiileja sekundaari- ja tertiäärirakenteita. Muutokset näissä rakenteissa vaikuttavat moniin prosesseihin, joissa rakenne toimii itse säätelijänä. RNA:n sekundaarirakenteen muutokset voivat luonnollisesti vaikuttaa silmukointiin intronien leikkautumiskohtien läheisyydessä, jolloin silmukointia ja eksonien yhdistymistä ei voi tapahtua. Tämän lisäksi sekundaarirakenteen muutokset voivat vaikuttaa leikkautumistapahtumaa avustaviin voimistaviin tai hiljentäviin cis-elementteihin estäen näiden sitoutumisen. Kun pre-mRNA:n sekundaarirakenne on muuttunut, avustavat proteiinit eivät pysty sitoutumaan kohdesekvenssiinsä, jolloin elementtien vaikutus lakkaa. (Buratti & Baralle, 2004.) Intronialueista transkriptoidaan myös mikro-RNA-molekyylejä RNA:n silmukoinnin ja dicer-entsyymin avustama (Ying & Lin, 2006). Introniset miRNA:t voivat sitoutua mRNA:han vaikuttaen geenien ilmentymiseen. On oletettavaa, että muutokset intronien sekundaarirakenteessa vaikuttavat myös miRNA-molekyylien muodostamiseen.

Intronialueen sekvenssivariaatiolla voi siis olla monia seuraamuksia, vaikka suora vaikutusta syntyvän proteiinin rakenteeseen ei ole. Pistemutaatioilla voi olla vaikutusta sekundaarirakenteeseen, jos ne sijoittuvat ratkaisevaan kohtaan sekundaarirakenteen muodostumisen kannalta. Intronista kaksi löytynyt neljän emäksen insertio voi helposti muuttaa sekundaarirakennetta osuessaan ratkaisevaan kohtaan molekyylissä. Sekundaarirakenteen muutoksilla voi edelleen olla monia seurauksia geenin aktiivisuuteen, kuten edellä on kuvattu. Tässä työssä löytyneiden intronisten muutosten vaikutusta *HNF1B*-geenin aktiivisuuteen on kuitenkin vaikea ennustaa, koska pre-mRNA:n 3-D rakennetta ei tunneta. Intronissa kahdeksan oleva pistemutaatio IVS8-22T>C oli kuitenkin tilastollisten testien perusteella assosioitunut eturauhassyöpään, joten jokin vaikutus muutoksella on geenin ilmentymiseen. Myös kaksi aikaisemmin raportoitua *HNF1B*-geenin eturauhassyöpään assosioituvaa muutosta (Sun ym., 2008) sijaitsivat intronialueilla, joten niiden vaikutus on geeninsäätelyssä.

Suurin osa pistemutaatioista löytyi 3'UTR alueelta. Näistä IVS9+444C>A oli mielenkiintoinen, koska se näytti olevan yhteydessä syöpään. Genotyypin CC sai merkittävän OR-arvon 2,47 (95% CI 1,32 - 4,66) ja genotyyppi CA arvon 0,238 (95%

CI 0,11 - 0,51). Tämä viittaisi siihen, että referenssigenotyyppi altistaisi syövälle ja kontrollit kantaisivat syövältä suojaavaa mutaatiota. Kontrollinäytteet olivat HW-tasapainossa muutoksen suhteen, mutta perhenäytteille laskettu p-arvo oli hyvin pieni ( $p = 2,434E-07$ ,  $n=57$ ). Homotsygoottimuutoksen omaava AA-genotyyppi ei ollut assosioitunut syöpään ja oli melko yleinen sekä perhenäytteissä että kontrolleissa. Suuremmalla sporadisella aineistolla tehdyissä genotyypauksissa IVS9+444C>A muutos ei saanut merkittäviä arvoja (CC: OR 1,10, 95% CI 0,82 - 1,46, CA: OR 0,88, 95% CI 0,72 - 1,09). Tämä viittaisi siihen, että muutos assosioituu vain perinnölliseen eturauhassyöpään, eikä lainkaan sporadiseen syöpään. Tuloksia analysoitaessa tulee kuitenkin jälleen muistaa perheaineiston koko (57 näytettä), joka voi hieman vääristää tilastollisten testien tuloksia. Perheaineiston kokoa kasvattamalla voitaisiin varmistaa muutoksen todellinen yhteys perinnölliseen eturauhassyöpään.

Suurin osa löytyneistä muutoksista sijaitsi 3'UTR-alueella. Vaikka mutaatiot 3'UTR-alueella eivät suoraan vaikuta syntyvän proteiinin rakenteeseen, niillä voi olla monia vaikutuksia geenin säätelyssä. Suurin osa mRNA:n säätelyelementeistä sijaitsee UTR-alueilla, joista 3'UTR-alue säätelee muun muassa mRNA:n metaboliaa kuten tumaan kuljetusta, lokalisaatiota solussa, translaation tehokkuutta ja mRNA:n stabiilisuutta (Andreassi & Riccio, 2009). Elementit voivat olla pituudeltaan muutamasta nukleotidista jopa yhteen kiloemäkseen (kb). Elementti voi olla useana kopiona 3'UTR-alueella tai eri elementit voivat yhdessä osallistua säätelytapautumaan (Andreassi & Riccio, 2009). Geenien ilmentymistä säätelevät mikro-RNA:t (miRNA:t) sitoutuvat myös 3'UTR-alueelle. Mikro-RNA:t säätelevät geenien aktiivisuutta transkription jälkeisesti sitoutumalla 3'UTR-alueella sijaitsevaan kohde-mRNA:han estäen sen translaation tai kohdentamalla mRNA:n hajotettavaksi. Mikro-RNA:t osallistuvat moniin säätelytehtäviin elimistössä, esim. eri elinten kehitykseen, ylläpitoon ja sairaustilan muodostumiseen. (Olena & Patton, 2010.)

On osoitettu, että 3'UTR-alueen keskimääräinen pituus ihmisen geeneissä on noin 740 nukleotidiä, mikä on enemmän kuin muilla nisäkkäillä. Tämä viittaa siihen, että ihmisen genomi on kehittynyt käyttämään hyväkseen 3'UTR-aluetta geenien transkription jälkeisessä säätelyssä. Eri mRNA-molekyylejä tutkittaessa 3'UTR-alueen on raportoitu osallistuvan mRNA:n stabiilisuuden, translaation ja lokalisaation säätelyyn. Erityisesti alue nukleotidien 45 ja 86 välissä 3'UTR:ssä osallistuu mRNA:n

lokalisatioon. Myös 3'UTR-alueen sekundaarirakenteella on vaikutus geenin aktiivisuuteen. Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että 3'UTR-alueella sijaitsevat SNP:t voivat vaikuttaa geenien aktiivisuuteen ja jopa tautialttiuteen. (Hesketh, 2004.)

3'UTR alueelta löytnyt muutos IVS9+100G>A ei ollut HW-tasapainossa perhenäytteiden eikä kontrollien osalta (perhenäytteet:  $p=0,0009$ ,  $n=57$ , kontrollit:  $p=0,0126$ ,  $n=191$ ). Muutos ei kuitenkaan ollut assosioitunut eturauhassyöpään laskettujen OR-arvojen perusteella. HW-epätasapaino johtuu yleensä joko genotyypitysvirheestä, sattumasta, virheellisestä oletuksesta genotyyppien jakautumisessa tai valinnasta sairaudesta johtuen (Wittke-Thompson ym., 2009). HW-tasapainoa on myös yleisesti käytetty kuvaamaan markkerin toimivuutta suuren mittakaavan genotyyppauksissa, jolloin epätasapainon on ajateltu johtuvan genotyyppauksessa tapahtuneesta virheestä. Joissakin assosiaatiotutkimuksissa potilasnäytteiden HW-epätasapainon on ajateltu kertovan biologisesta yhteydestä sairauteen, eikä niinkään genotyypitysvirheestä. Näissäkin tutkimuksissa kontrollien on kuitenkin vaadittu olevan HW-tasapainossa. (Wittke-Thompson ym., 2009.)

Muutoskohta IVS9+100G>A ei ollut HW-tasapainossa perhenäytteiden, eikä kontrollien osalta. Näin ollen voisi olettaa, että sekvensoinnissa olisi tapahtunut jokin virhe tai alukkeet eivät olisi sitoutuneet kohdesekvenssiin halutulla tavalla. Jos sekvenssissä on tunnistamaton polymorfia juuri sillä kohdalla, johon PCR-alue sitoutuu, voidaan sekvenssiä tulkita väärin. Tällöin heterotsygoottimuutokset voidaan virheellisesti lukea homotsygooteiksi, kun toinen alleeli ei monistu yhtä tehokkaasti kuin toinen (Wittke-Thompson ym., 2009). Muutoksen IVS9+100G>A osalta juuri homotsygoottimuutoksia on aineistossa paljon, 80 % perhenäytteistä ja 76 % kontrollinäytteistä. Tätä voisi selittää alukkeen epätäydellinen sitoutuminen, mutta toisaalta samaa aluketta on käytetty viereisen nukleotidimuutoksen IVS9+99C>A havaitsemiseen, joka oli HW-tasapainossa sekä perhenäytteiden että kontrollien osalta. Aluke on siis todennäköisesti kuitenkin sitoutunut sekvenssiin oikein. Kenties kahden pistemutaation sijaitseminen vierekkäisissä nukleotideissa on häirinnyt sekvenssinlukua. Kuitenkin, jos verrataan aineiston perusteella saatuja alleelifrekvenssejä eurooppalaisen väestön alleelifrekvensseihin muutoksen IVS9+100G>A osalta, luvut ovat hyvin samansuuntaiset (suomalaiset perhenäytteet G 0.12 A 0.88, suomalaiset kontrollit G 0.14 A 0.86 ja eurooppalainen väestö G 0.15 A



0.85). Ehkä genotyypityksessä ei sittenkään ole tapahtunut virhettä, vaan homotsygoottimuutos on syystä tai toisesta yleinen niin suomalaisessa väestössä kuin myös muualla Euroopassa.

Verrattaessa muiden tässä tutkimuksessa löytyneiden muutoskohtien alleelifrekvenssejä eurooppalaisen väestön alleelifrekvensseihin, luvut näyttävät hyvin samansuuntaisilta varsinkin suomalaisten kontrollinäytteiden osalta (taulukko 17). Perhenäytteiden alleelifrekvenssit poikkeavat hieman enemmän kaikkien muutoskohtien osalta, mitä voidaan selittää jo perheaineiston pienemmällä koolla. Eturauhassyöpään assosioituneen SNP:n IVS9+444C>A osalta perhenäytteiden frekvenssit eroavat melko paljon eurooppalaisen väestön alleelifrekvensseistä (perhenäytteet: C 0.49 A 0.51, kontrollit: C 0.43 A 0.57, eurooppalainen väestö: C 0.39 A 0.61). SNP:n IVS9+444C>A referenssigenotyyppi CC oli assosioitunut eturauhassyöpään. Tämä voi olla perinnölliseen eturauhassyöpään liittyvä ilmiö, jolloin kontrollit sekä eurooppalainen väestö kantaisivat suojaavaa muutosalleelia. Toisaalta kyse voi olla myös sattumasta, koska suomalainen perheaineisto oli hyvin pieni, vain 57 henkilöä. Myös variantin IVS9+274A>T perhenäytteiden alleelifrekvenssit poikkeavat paljon eurooppalaisen väestön sekä suomalaisten kontrollien vastaavista luvuista (perhenäytteet: A 0.43 T 0.57, kontrollit: A 0.52 T 0.48, eurooppalainen väestö: A 0.53 T 0.47). Tämä SNP ei saanut merkittäviä arvoja tilastollisissa analyyseissä, eikä siten ollut yhdistetty eturauhassyöpään. TT genotyyppi oli kuitenkin huomattavasti yleisempi perhenäytteissä kuin kontrolleissa, joten mahdollisesti suuremmalla perheaineistolla genotyyppi voisi saada tilastollisesti merkittävän arvon ja olla assosioitunut suurentuneeseen syöpäriskiin. Muutoskohtaa tutkittiin myös suuremmalla sporadisella aineistolla, mutta SNP ei myöskään tämän aineiston perusteella ollut yhdistettävissä syöpään.

### 6.3 HNF1B:n promoottorialueen sekvenssin tarkastelu

*HNF1B* geenin promoottorialueen sekvenssivariaatiot muodostuivat yhdeksi tämän työn mielenkiintoisimmista osista. Tätä aluetta ei tosin pystytty yksityiskohtaisesti sekvensoimaan, mutta noin 800 nukleotidiä ennen geenin 5'UTR-alueen alkua löytyi hyvin aktiivinen alue erilaisille duplikaatioille ja sekvenssivariaatioille. Alueelta löytyi 16 nukleotidin mittainen toistojakso, jossa toistojen määrä vaihteli eri näytteiden välillä

homo- ja heterotsygoottimuutoksina. Lisäksi alueelta löytyi myös joitakin muita variaatiokohtia. Alueella sijaitsee useiden transkriptiofaktoreiden kiinnittymiskohtia, joten näin suuret sekvenssivariaatiot vaikuttavat varmasti transkriptioon tavalla tai toisella. HNF1B-proteiini toimii itse transkriptiotekijänä muiden geenien säätelyssä, joten poikkeavuudet sen oman transkription säätelyssä voivat aiheuttaa hyvin laajoja seuraamuksia sen säätelemissä kudoksissa, esim. maksassa ja munuaisissa ja mahdollisesti myös sukupuolirauhasissa.

Kromosomin 17 rakenteellisista poikkeavuuksista on raportoitu aikaisemminkin ja erityisesti 17q-käsivarresta on löytynyt suuria duplikoituneita alueita, joissa homologinen sekvenssifragmentti toistuu (Chen ym., 2009 Abstrakti, ASHG konferenssi 2009). Nämä duplikaatioalueet on yhdistetty kahden retrotransposonin toimintaan, jotka voivat olla edelleen aktiivisia. Tutkimuksissa on myös paljastunut, että kohdat 17q12/21 ja 17q23 ovat toimineet katkaisukohtina kromosomin uudelleenjärjestäytymisissä evoluution aikana ja niissä on edelleen paljon duplikoituneita rakenteita (Cardone ym., 2008). Duplikaatiot on liitetty moniin sairauksiin ja herääkin kysymys, voisiko löydetty toistojaksojen variaatiot olla yhteydessä suurentuneeseen syöpäriskiin. HNF1B sijaitsee kromosomikohdassa 17q12 eli alueella, joka on ollut hyvin aktiivinen evoluution aikana. Aluetta täytyy kuitenkin tutkia edelleen suuremmalla aineistolla ja menetelmällä, jolla promoottorisekvenssi saadaan selvitettyksi yksityiskohtaisesti. Lisätutkimuksien jälkeen voidaan arvioida paremmin monistumien yhteyttä syöpään.

#### 6.4 Kahden eturauhassyöpään yhdistetyn SNP:n tarkastelu suomalaisessa väestössä

Kaksi jo aikaisemmin eturauhassyöpään yhdistettyä muutoskohtaa *HNF1B*-geenissä, rs4430796 ja rs11649743, genotyypattiin suomalaisella aineistolla. Eri genotyypeille laskettiin OR:t sekä vastaavat 95 %:n luottamusvälit, mutta genotyypeille ei saatu tilastollisesti merkittäviä arvoja eli yhteyttä suurentuneeseen syöpäriskiin suomalaisessa väestössä ei löytynyt. Sun ym. (2008) raportoivat kyseisten geenivarianttien yhteydestä eturauhassyöpään perustuen tutkimukseen, jossa aineistona käytettiin viittä eri väestöryhmää. Tutkimuksessa on verrattu homotsygootti- tai heterotsygoottimuutosta yksinään referenssigenotyyppiin, jolloin arvot ovat tilastollisesti merkittäviä. Tässä tutkimuksessa OR-arvot on laskettu vertaamalla tutkittavaa genotyyppiä aina kahteen

muuhun mahdolliseen (esim. homotsygotigenotyyppi vastaan hetrotsygootti- ja referenssigenotyyppi). Sun ym. tutkimuksessa on tehty oletus, että referenssigenotyyppi on aina luonnollinen, ei sairauteen yhdistyvä genotyyppi. Näin ei kuitenkaan välttämättä aina ole. Kun suomalaisella väestöllä saadut tulokset analysoidaan tilastollisesti saman periaatteen mukaan, SNP:n rs4430796 homotsygoottimuutos saa tilastollisesti merkittävän OR-arvon ja on assosioitunut suurentuneeseen eturauhassyöpäriskiin (OR 1,39, 95 % CI 1,01 - 1,92). Taulukossa 18 on vertailtu suomalaisen aineiston sekä Sun ym. (2008) tutkimuksessa olleiden ruotsalaisen sekä amerikkalaisen aineiston perusteella laskettuja OR-arvoja sekä alleelifrekvenssejä rs4430796- ja rs11649743 -geenivarianttien osalta.

*Taulukko 18.* Taulukkoon on koottu kahden tutkitun SPN:n alleelifrekvenssit ja OR:t sekä vastaavat 95 % luottamusvälit kolmessa tutkitussa väestöryhmässä (Sun ym., 2008).

<b>SNP-ID, riskialleeli</b>	<b>Väestöryhmä</b>	<b>Alleeli frekvenssit</b>		<b>OR (95% CI)</b>	
		Sairaat	Kontrollit	Heterotsygootti- muutos	Homotsygootti- muutos
<b>rs4430796 alleeli A</b>				AG vastaan GG	AA vastaan GG
	CAPS	0.61	0.56	1.09 (0,92 - 1,29)	1.49 (1,25 - 1,79)
	JHH	0.58	0.51	1.28 (0,98 - 1,68)	1.70 (1,25 - 2,30)
	suomalainen väestö	0.68	0.64	1.22 (0,88 - 1,68)	1,39 (1,01 - 1,92)
<b>rs11649743 alleeli G</b>				GA vastaan AA	GG vastaan AA
	CAPS	0.80	0.77	1.22 (0,91 - 1,64)	1.46 (1,10 - 1,94)
	JHH	0.84	0.82	0.99 (0,53 - 1,88)	1.16 (0,63 - 2,17)
	suomalainen väestö	0.86	0.87	0.89 (0,39 - 2,05)	0.82 (0,37 - 1,85)

CAPS (eng. population-based case-control study from Sweden) kuvaa ruotsalaisella aineistolla tehtyä tapaus-verrokkitutkimusta ja JHH (eng. hospital-based case-control study from Johns Hopkins Hospital) vastaavasti amerikkalaisen Johns Hopkinsin sairaalan aineistolla tehtyä tapaus-verrokkitutkimusta. Taulukosta voi nähdä, että SNP:n rs4430796 osalta suomalaisella aineistolla saadut tulokset eivät poikkea muista

merkittävästi. SNP:n rs11649743 osalta näyttää siltä, että GG genotyyppi suomalaisessa väestössä yleisempi kontrolleilla kuin sairailta, toisin kuin muissa väestöryhmissä. Tosin SNP rs11649743 ei ole assosioitunut eturauhassyöpään kuin ruotsalaisen väestön homotsygoottimuutoksen suhteen. Alleelifrekvenssit ovat suomalaisessa väestössä samansuuntaiset, kuin ruotsalaisessa ja amerikkalaisessa väestössä. Suomalaisista kontrollinäytteistä löytyy hieman enemmän riskialleelia G verrattuna muihin ryhmiin.

## 6.5 Tutkimuksen tulevaisuus

Tässä tutkimuksessa vain kaksi löydettyä varianttia saivat tilastollisesti merkittävän arvon yhteydestä eturauhassyöpään. Nämä variantit sijaitsivat intonisella ja 3'UTR alueilla, mikä ei periaatteessa vähennä niiden merkitystä taudille altistavana tekijänä, mutta tarkkaa vaikutusta on vaikea ennustaa. Muutokset vaikuttavat *HNFI*B-geenin säätelyyn ja toisaalta muutokset transkriptiotekijän säätelyssä voivat vaikuttaa muihin geeneihin hyvin monella tapaa. Geenin promoottorialueelta löytyi myös mielenkiintoinen toistojaksovariaatio, jota kannattaa tutkia jatkossa tarkemmin uusien menetelmin. Kuitenkaan geenistä ei ehkä löytynyt niin vahvaa assosiaatiota eturauhassyöpään, kuin genomilaajuinen kytkentäanalyysi 3,6 LOD-arvolla olisi antanut odottaa. Havaittuja muutoskohtia kannattaa tutkia vielä suuremmassa aineistossa assosiaation varmistamiseksi, mutta lisäksi tulee tutkia myös mahdollisia haplotyyppiassosiaatioita. Vaikka yksittäisellä alleelilla ei olisi niin vahvaa altistavaa vaikutusta, useiden alleelien periytyminen yhdessä voi aiheuttaa vahvemman altistavan vaikutuksen taudille.

Tutkimusta kannattaa alkaa kohdistamaan myös muihin alueen geeneihin. Alueella on useita geenejä, jotka olisivat mahdollisia kandidaattigeeneiksi. Seuraava askel olisi hienokartoittaa kytkeytyvän alueen ympäristöä *HNFI*B:n lisäksi ja paikantaa uusia mahdollisia kandidaattigeenejä. Kytkentäanalyysin LOD-arvo 3,6 kertoo vahvasta kytkennästä alueella. Kuudessatoista tutkimukseen valitussa, kromosomiin 17 kytkeytyneessä perheessä oli kaikissa vähintään kolme eturauhassyöpään sairastunutta henkilöä ja seitsemässä perheessä jopa viisi sairastunutta. Useissa perheissä oli todettu eturauhassyöpää, joka oli luokiteltu aggressiiviseksi ICPCG:n kriteerien mukaan. Korkea LOD-arvo on siis vahva merkki alueella sijaitsevasta riskigeenistä. Yksi

vaihtoehto olisi selvittää kaikkien alueen geenien muutokset käyttäen nopeampia uuden sukupolven sekvensointimenetelmiä.

## 7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksen tavoitteena oli löytää perinnölliselle eturauhassyövälle altistavia muutoksia kromosomialueen 17q12 kandidaattigeenistä *HNF1B*. Alueelta löytyi kaksi muutoskohtaa IVS8-22T>C ja IVS9+444C>A, jotka olivat assosioituneet eturauhassyöpään. Toinen muutoksista sijaitsi intronissa kahdeksan ja toinen 3'UTR-alueella, joten näiden muutosten vaikutus geenin ilmentymiseen välittyy todennäköisesti geenin säätelyn kautta. Yksityiskohtaisempaa biologista vaikutusta on vaikea ennustaa tämän tutkimuksen perusteella, mutta *HNF1B* toimii transkriptiotekijänä sukupuolirauhasten epiteelisolujen muodostumisessa, mihin mutaatioiden vaikutuksen voisi ennustaa kohdistuvan.

Tutkimuksessa oli myös tarkoituksena tutkia geenin promoottorialuetta, josta löydettiin hyvin aktiivinen alue erilaisille variaatioille. Noin 800 nukleotidiä ennen geenisekvenssin alkua löytyi 16 nukleotidin toistojakso, jonka toistojen määrä vaihteli eri näytteiden välillä. Alueella sijaitsee useiden transkriptiofaktoreiden kiinnittymiskohtia, joten näin suuret sekvenssivariaatiot vaikuttavat varmasti transkriptiotekijöiden kiinnittymiseen ja edelleen *HNF1B*:n säätelemien geenien ilmentymiseen. Tarkempia tutkimuksia kuitenkin tarvitaan, jotta pystytään arvioimaan toistojakso-monistumien yhteyttä eturauhassyöpään. Sekvensointi ei menetelmänä soveltunut tämän alueen tutkimiseen, joten aluetta täytyy tutkia uusin lähestymistavoin.

Tutkimus tehtiin melko pienellä aineistolla, varsinkin perhenäytteiden osalta, joten suuremmat näytemäärät antaisivat tutkimukselle luonnollisesti lisäarvoa. Lopullisia johtopäätöksiä ei voida tehdä tähän aineistoon perustuen, mutta geenistä ei ehkä kuitenkaan löytynyt niin vahvaa assosiaatiota eturauhassyöpään, kuin genomilaajuinen kytkentäanalyysi 3,6 LOD-arvolla olisi antanut odottaa. Toisaalta eturauhassyöpä on monitekijäinen tauti, jonka aiheuttaa todennäköisesti eri geenien yhteisvaikutukset. Ehkä myös nämä havaitut muutokset aiheuttavat yhdessä muiden geenimuutosten kanssa riskin sairastua eturauhassyöpään, ainakin joidenkin sairastuneiden kohdalla.

Uusien muutoskohtien etsimisen lisäksi selvitettiin kahden jo aikaisemmin eturauhassyöpään yhdistetyn *HNF1B*-geenivariantin, rs4430796 ja rs11649743, yhteys

eturauhassyöpään suomalaisessa väestössä. SNP:n rs4430796 homotsygoottimuutos oli assosioitunut suurentuneeseen eturauhassyöpäriskiinkin myös suomalaisessa väestössä, kun taas SNP rs11649743 ei ollut yhdistettävissä syöpään. Tulokset ovat samansuuntaiset kuin muidenkin väestöjen perusteella saadut tulokset. Varianttien biologinen vaikutus on vielä epäselvä, mutta niiden sijaitseminen intronisella alueella viittaa säätelytehtävään.

Tutkimuksen tavoitteena oli myös optimoida High resolution melting (HMR) -menetelmää. Menetelmän testaus jäi kuitenkin melko vähäiseksi laitehankinnan viivästymisen vuoksi, mutta intronin kaksi insertiokohdan tutkimiseen kokeiltiin HMR-menetelmää. Huolellisesta suunnittelusta huolimatta alukkeiden kanssa ilmeni ongelmia, mistä johtuen menetelmällä ei erotettu eri genotyyppejä edes testinäytteistä, joiden genotyypit tiedettiin jo etukäteen. Mikäli alukkeet kuitenkin saadaan monistamaan haluttua tuotetta ilman sivutuotteita ja alukkeiden optimointi onnistuu, menetelmä on hyvin käyttökelpoinen suurten aineistojen nopeaan tutkimiseen. Menetelmä tuskin koskaan tulee syrjäyttämään sekvensointia kokonaan, sillä tarkan sekvenssin selvittämiseksi on edelleen sekvensoitava ainakin joitakin saman genotyypin omaavista näytteistä. Geenisekvenssien tutkiminen nopeutuu ja helpottuu kuitenkin huomattavasti HMR-menetelmällä, verrattuna perinteiseen sekvensointiin.

## LÄHDELUETTELO

American Cancer Society -verkkosivu. 29.10.2009. <http://www.cancer.org>

Andreassi C, Riccio A. To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends Cell Biol* 2009;9:465-474.

Bach I, Mattei MG, Cereghini S, Yaniv M. Two members of an HNF1 homeoprotein family are expressed in human liver. *Nucleic Acids Res* 1991;13:3553-3559.

Bergthorsson JT, Johannesdottir G, Arason A, Benediksdottir KR, Agnarsson BA, Bailey-Wilson JE, Gillanders E, Smith J, Trent J, Barkardottir RB. Analysis of HPC1, HPCX, and PCaP in Icelandic hereditary prostate cancer. *Hum Genet* 2000;4:372-375.

Bergmann C, Küpper F, Schmitt CP, Vester U, Neuhaus TJ, Senderek J, Zerres K. Multi-exon deletions of the PKHD1 gene cause autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *J Med Genet* 2005;42:1-5.

Bergmann C, Senderek J, Küpper F, Schneider F, Dornia C, Windelen E, Eggermann T, Rudnik-Schöneborn S, Kirfel J, Furu L, Onuchic LF, Rossetti S, Harris PC, Somlo S, Guay-Woodford L, Germino GG, Moser M, Büttner R, Zerres K. PKHD1 mutations in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hum Mutat.* 2004;23:453-63.

Berthon P, Valeri A, Cohen-Akenine A, Drelon E, Paiss T, Wohr G, Latil A, Millasseau P, Mellah I, Cohen N, Blanche H, Bellane-Chantelot C, Demenais F, Teillac P, Le Duc A, de Petriconi R, Hautmann R, Chumakov I, Bachner L, Maitland NJ, Lidereau R, Vogel W, Fournier G, Mangin P, Cussenot O. Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *Am J Hum Genet* 1998;6:1416-1424.

Bostwick DG, Liu L, Brawer MK, Qian J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Rev Urol* 2004;4:171-179.

Buratti E, Baralle FE. Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Mol Cell Biol* 2004;24:10505-10514.

Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001;2:91-99.

Cardone MF, Jiang Z, D'Addabbo P, Archidiacono N, Rocchi M, Eichler EE, Ventura M. Hominoid chromosomal rearrangements on 17q map to complex regions of segmental duplication. *Genome Biol* 2008;2:R28.

Carpten J, Nupponen N, Isaacs S, Sood R, Robbins C, Xu J, Faruque M, Moses T, Ewing C, Gillanders E, Hu P, Bujnovszky P, Makalowska I, Baffoe-Bonnie A, Faith D, Smith J, Stephan D, Wiley K, Brownstein M, Gildea D, Kelly B, Jenkins R, Hostetter G, Matikainen M, Schleutker J, Klinger K, Connors T, Xiang Y, Wang Z, De Marzo A, Papadopoulos N, Kallioniemi OP, Burk R, Meyers D, Gronberg H, Meltzer P, Silverman R, Bailey-Wilson J, Walsh P, Isaacs W, Trent J. Germline mutations in the



ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nat Genet* 2002;2:181-184.

Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;8:3367-3371.

Carter HB, Coffey DS. The prostate: an increasing medical problem. *Prostate* 1990;1:39-48.

Chen D, Miettinen T, Leppä V, Choi O, Palotie A, Peltonen L, Saarela J. Evolutionary History and Associated Chromosomal Abnormalities of a Segmental Duplicated Superstructure found on Chromosome 17. ASHG (American Society of Human Genetics) -konferenssi 2009;Tiivistelmä.

Collins A. Approaches to the identification of susceptibility genes. *Parasite Immunol* 2009;5:225-233.

Costa RH, Kalinichenko VV, Ai-Xuan L, Holterman, Wang X. Transcription Factors in Liver Development, Differentiation, and Regeneration. *Hepatology* 2003;38:1331-1347.

Conlon EM, Goode EL, Gibbs M, Stanford JL, Badzioch M, Janer M, Kolb S, Hood L, Ostrander EA, Jarvik GP, Wijsman EM. Oligogenic segregation analysis of hereditary prostate cancer pedigrees: evidence for multiple loci affecting age at onset. *Int J Cancer* 2003;5:630-635.

Cooney KA, McCarthy JD, Lange E, Huang L, Miesfeldt S, Montie JE, Oesterling JE, Sandler HM, Lange K. Prostate cancer susceptibility locus on chromosome 1q: a confirmatory study. *J Natl Cancer Inst* 1997;13:955-959.

Creary M, Williamson D, Kulkarni R. Sickle cell disease: current activities, public health implications, and future directions. *J Womens Health (Larchmt)* 2007;5:575-582.

Cui J, Staples MP, Hopper JL, English DR, McCredie MR, Giles GG. Segregation analyses of 1,476 population-based Australian families affected by prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2001;5:1207-1218.

Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Olama AA, Guy M, Jugurnauth SK, Mulholland S, Leongamornlert DA, Edwards SM, Morrison J, Field HI, Southey MC, Severi G, Donovan JL, Hamdy FC, Dearnaley DP, Muir KR, Smith C, Bagnato M, Arden-Jones AT, Hall AL, O'Brien LT, Gehr-Swain BN, Wilkinson RA, Cox A, Lewis S, Brown PM, Jhavar SG, Tymrakiewicz M, Lophatananon A, Bryant SL, UK Genetic Prostate Cancer Study Collaborators, British Association of Urological Surgeons' Section of Oncology, UK ProtecT Study Collaborators, Horwich A, Huddart RA, Khoo VS, Parker CC, Woodhouse CJ, Thompson A, Christmas T, Ogden C, Fisher C, Jamieson C, Cooper CS, English DR, Hopper JL, Neal DE, Easton DF. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 2008;3:316-321.

Eturauhassyöpöpotilaiden tuki ry:n (ERSY:n) verkkosivu. 27.5.2010. <http://www.psa.fi>.

Frayling TM, Colhoun H, Florez JC. A genetic link between type 2 diabetes and prostate cancer. *Diabetologia* 2008;10:1757-1760.

Gibbs M, Stanford JL, McIndoe RA, Jarvik GP, Kolb S, Goode EL, Chakrabarti L, Schuster EF, Buckley VA, Miller EL, Brandzel S, Li S, Hood L, Ostrander EA. Evidence for a rare prostate cancer-susceptibility locus at chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* 1999;3:776-787.

Giovannucci E, Michaud D. The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas. *Gastroenterology* 2007;6:2208-2225.

Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Diabetes mellitus and risk of prostate cancer (United States). *Cancer Causes Control* 1998;1:3-9.

George A, Wahlfors T, Nati H, Sipmsom C, Cropp CD, Tammela T, Bailey-Wilson J, Schleutker J. Genome-wide linkage scan for prostate cancer susceptibility in Finland: Evidence for novel loci on 4q13, 14q32 and 15q26 and confirmation of signal on 17q21-22. *Käsikirjoitus*.

Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst* 1994;21:1600-1608.

Gong Y, Ma Z, Patel V, Fischer E, Hiesberger T, Pontoglio M, Igarashi P. HNF-1beta regulates transcription of the PKD modifier gene Kif12. *J Am Soc Nephrol* 2009;1:41-47.

Grönberg H, Damber L, Damber JE, Iselius L. Segregation analysis of prostate cancer in Sweden: support for dominant inheritance. *Am J Epidemiol* 1997a;7:552-557.

Grönberg H, Xu J, Smith JR, Carpten JD, Isaacs SD, Freije D, Bova GS, Damber JE, Bergh A, Walsh PC, Collins FS, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB. Early age at diagnosis in families providing evidence of linkage to the hereditary prostate cancer locus (HPC1) on chromosome 1. *Cancer Res* 1997b;21:4707-4709.

Gudmundsson J, Sulem P, Steinthorsdottir V, Bergthorsson JT, Thorleifsson G, Manolescu A, Rafnar T, Gudbjartsson D, Agnarsson BA, Baker A, Sigurdsson A, Benediktsdottir KR, Jakobsdottir M, Blondal T, Stacey SN, Helgason A, Gunnarsdottir S, Olafsdottir A, Kristinsson KT, Birgisdottir B, Ghosh S, Thorlacius S, Magnusdottir D, Stefansdottir G, Kristjansson K, Bagger Y, Wilensky RL, Reilly MP, Morris AD, Kimber CH, Adeyemo A, Chen Y, Zhou J, So WY, Tong PC, Ng MC, Hansen T, Andersen G, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Tres A, Fuertes F, Ruiz-Echarri M, Asin L, Saez B, van Boven E, Klaver S, Swinkels DW, Aben KK, Graif T, Cashy J, Suarez BK, van Vierssen Trip O, Frigge ML, Ober C, Hofker MH, Wijmenga C, Christiansen C, Rader DJ, Palmer CN, Rotimi C, Chan JC, Pedersen O, Sigurdsson G, Benediktsson R, Jonsson E, Einarsson GV, Mayordomo JI, Catalona WJ, Kiemeny LA, Barkardottir RB, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nat Genet* 2007;8:977-983.

Guy M, Kote-Jarai Z, Giles GG, Al Olama AA, Jugurnauth SK, Mulholland S, Leongamornlert DA, Edwards SM, Morrison J, Field HI, Southey MC, Severi G, Donovan JL, Hamdy FC, Dearnaley DP, Muir KR, Smith C, Bagnato M, Arden-Jones AT, Hall AL, O'Brien LT, Gehr-Swain BN, Wilkinson RA, Cox A, Lewis S, Brown PM, Jhavar SG, Tymrakiewicz M, Lophatananon A, Bryant SL; UK Genetic Prostate Cancer Study Collaborators; British Association of Urological Surgeons' Section of Oncology; UK ProtecT Study Collaborators, Horwich A, Huddart RA, Khoo VS, Parker CC, Woodhouse CJ, Thompson A, Christmas T, Ogden C, Fisher C, Jameson C, Cooper CS, English DR, Hopper JL, Neal DE, Easton DF, Eeles RA. Identification of new genetic risk factors for prostate cancer. *Asian J Androl* 2009;11:49-55.

Hart TC, Gorry MC, Hart PS, Woodard AS, Shihabi Z, Sandhu J, Shirts B, Xu L, Zhu H, Barmada MM, Bleyer AJ. Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *J Med Genet* 2002;39:882-92.

Hesketh J. 3'-Untranslated regions are important in mRNA localization and translation: lessons from selenium and metallothionein. *Biochem Soc Trans* 2004;Pt 6:990-993.

Human genes, gene database –verkkosivu. 27.5.2010. [www.genecards.org](http://www.genecards.org).

Igarashi P, Shao X, McNally BT, Hiesberger T. Roles of HNF-1b in kidney development and congenital cystic diseases. *Kidney Int* 2005;68:1944–1947.

Kato N, Motoyama T. Hepatocyte nuclear factor-1beta(HNF-1beta) in human urogenital organs: its expression and role in embryogenesis and tumorigenesis. *Histol Histopathol* 2009;11:1479-1486.

Kitanaka S, Miki Y, Hayashi Y, Igarashi T. Promoter-specific repression of hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 beta and HNF-1 alpha transcriptional activity by an HNF-1 beta missense mutant associated with Type 5 maturity-onset diabetes of the young with hepatic and biliary manifestations. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;3:1369-1378.

Korver W, Guevara C, Chen Y, Neuteboom S, Bookstein R, Tavtigian S, Lees E. The product of the candidate prostate cancer susceptibility gene ELAC2 interacts with the gamma-tubulin complex. *Int J Cancer* 2003;3:283-288.

Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994;5181:2037-2048.

Lange EM, Gillanders EM, Davis CC, Brown WM, Campbell JK, Jones M, Gildea D, Riedesel E, Albertus J, Freas-Lutz D, Markey C, Giri V, Dimmer JB, Montie JE, Trent JM, Cooney KA. Genome-wide scan for prostate cancer susceptibility genes using families from the University of Michigan prostate cancer genetics project finds evidence for linkage on chromosome 17 near BRCA1. *Prostate* 2003;4:326-334.

Loeb S, Helfand BT, Kan D, Isaacs WB, Catalona WJ. Does diabetes mellitus modify the association between 17q12 risk variant and prostate cancer aggressiveness? *BJU Int* 2009;9:1200-1203.

Love-Gregory L, Permutt MA. HNF4A genetic variants: role in diabetes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:397-402.

Lu P, Rha GB, Chi YI. Structural basis of disease-causing mutations in hepatocyte nuclear factor 1beta. *Biochemistry* 2007;43:12071-12080.

Ma Z, Gong Y, Patel V, Karner CM, Fischer E, Hiesberger T, Carroll TJ, Pontoglio M, Igarashi P. Mutations of HNF-1beta inhibit epithelial morphogenesis through dysregulation of SOCS-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;51:20386-20391.

Macinnis RJ, Antoniou AC, Eeles RA, Severi G, Guy M, McGuffog L, Hall AL, O'Brien LT, Wilkinson RA, Dearnaley DP, Arden-Jones AT, Horwich A, Khoo VS, Parker CC, Huddart RA, McCredie MR, Smith C, Southey MC, Staples MP, English DR, Hopper JL, Giles GG, Easton DF. Prostate cancer segregation analyses using 4390 families from UK and Australian population-based studies. *Genet Epidemiol* 2009;

McIndoe RA, Stanford JL, Gibbs M, Jarvik GP, Brandzel S, Neal CL, Li S, Gammack JT, Gay AA, Goode EL, Hood L, Ostrander EA. Linkage analysis of 49 high-risk families does not support a common familial prostate cancer-susceptibility gene at 1q24-25. *Am J Hum Genet* 1997;2:347-353.

Monroe KR, Yu MC, Kolonel LN, Coetzee GA, Wilkens LR, Ross RK, Henderson BE. Evidence of an X-linked or recessive genetic component to prostate cancer risk. *Nat Med* 1995;8:827-829.

Nakazato H, Suzuki K, Matsui H, Ohtake N, Nakata S, Yamanaka H. Role of genetic polymorphisms of the RNASEL gene on familial prostate cancer risk in a Japanese population. *Br J Cancer* 2003;4:691-696.

Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL, Isaacs WB. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J Urol* 2004;5 Pt 2:S6-11; discussion S11-2.

Nienstedt W, Hänninen O, Arstila A, Björkqvist S-E. Lisääntyminen. Ihmisen fysiologia ja anatomia. *Werner Söderström Osakeyhtiö* 1999;438.

Nurmi M, lukkarinen O, Ruutu M, Taari K, Tammela T. *Urologia*. Helsinki, Kustannus Oy Duodecim 2002,37-39.

Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 2010;3:540-545.

Paiss T, Bochum S, Herkommer K, Maier C, Roesch K, Taweemonkonsap T, Haeussler J, Hautmann RE, Vogel W. Hereditary prostate cancer in germany. *Eur Urol* 2001;12-18.

Pakkanen S, Baffoe-Bonnie AB, Matikainen MP, Koivisto PA, Tammela TL, Deshmukh S, Ou L, Bailey-Wilson JE, Schleutker J. Segregation analysis of 1,546 prostate cancer families in Finland shows recessive inheritance. *Hum Genet* 2007;2:257-267.

PDB (Protein data bank) –verkkosivu. 27.5.2010. <http://www.rcsb.org/pdb>.

RefGene-verkkosivu. 27.5.2010. <http://refgene.com>.

Rökman A, Ikonen T, Mononen N, Autio V, Matikainen MP, Koivisto PA, Tammela TL, Kallioniemi OP, Schleutker J. ELAC2/HPC2 involvement in hereditary and sporadic prostate cancer. *Cancer Res* 2001;16:6038-6041.

Rökman A, Ikonen T, Seppälä EH, Nupponen N, Autio V, Mononen N, Bailey-Wilson J, Trent J, Carpten J, Matikainen MP, Koivisto PA, Tammela TL, Kallioniemi OP, Schleutker J. Germline alterations of the RNASEL gene, a candidate HPC1 gene at 1q25, in patients and families with prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2002;5:1299-1304.

Rökman A. In search of high-penetrant hereditary prostate cancer susceptibility genes in Finland. 2004; Väitöskirja.

Saarelma O. Lääkärikirja Duodecim. Duodecim terveyskirjasto. 27.5.2010. <http://www.terveysportti.fi/terveyskirjasto>.

Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genet* 2004;R103-21.

Schaid DJ, McDonnell SK, Blute ML, Thibodeau SN. Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. *Am J Hum Genet* 1998;6:1425-1438.

Schleutker J, Matikainen M, Smith J, Koivisto P, Baffoe-Bonnie A, Kainu T, Gillanders E, Sankila R, Pukkala E, Carpten J, Stephan D, Tammela T, Brownstein M, Bailey-Wilson J, Trent J, Kallioniemi OP. A genetic epidemiological study of hereditary prostate cancer (HPC) in Finland: frequent HPCX linkage in families with late-onset disease. *Clin Cancer Res* 2000;12:4810-4815.

Seppälä EH, Ikonen T, Autio V, Rökman A, Mononen N, Matikainen MP, Tammela TL, Schleutker J. Germ-line alterations in MSR1 gene and prostate cancer risk. *Clin Cancer Res* 2003;14:5252-5256.

Smith JR, Freije D, Carpten JD, Grönberg H, Xu J, Isaacs SD, Brownstein MJ, Bova GS, Guo H, Bujnovszky P, Nusskern DR, Damber JE, Bergh A, Emanuelsson M, Kallioniemi OP, Walker-Daniels J, Bailey-Wilson JE, Beaty TH, Meyers DA, Walsh PC, Collins FS, Trent JM, Isaacs WB. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* 1996;5291:1371-1374.

Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 1990;4:337-347.

Stevens VL, Ahn J, Sun J, Jacobs EJ, Moore SC, Patel AV, Berndt SI, Albanes D, Hayes RB. HNF1B and JAZF1 genes, diabetes, and prostate cancer risk. *Prostate* 2010; 70:601-607.

Sun J, Zheng SL, Wiklund F, Isaacs SD, Purcell LD, Gao Z, Hsu FC, Kim ST, Liu W, Zhu Y, Stattin P, Adami HO, Wiley KE, Dimitrov L, Sun J, Li T, Turner AR, Adams TS, Adolfsson J, Johansson JE, Lowey J, Trock BJ, Partin AW, Walsh PC, Trent JM, Duggan D, Carpten J, Chang BL, Gronberg H, Isaacs WB, Xu J. Evidence for two independent prostate cancer risk-associated loci in the HNF1B gene at 17q12. *Nat Genet* 2008;10:1153-1155.

Suomen syöpärekisteri -verkkosivu. 29.10.2009. [www.cancerregistry.fi](http://www.cancerregistry.fi).

Tavtigian SV, Simard J, Teng DH, Abtin V, Baumgard M, Beck A, Camp NJ, Carillo AR, Chen Y, Dayananth P, Desrochers M, Dumont M, Farnham JM, Frank D, Frye C, Ghaffari S, Gupte JS, Hu R, Iliev D, Janecki T, Kort EN, Laity KE, Leavitt A, Leblanc G, McArthur-Morrison J, Pederson A, Penn B, Peterson KT, Reid JE, Richards S, Schroeder M, Smith R, Snyder SC, Swedlund B, Swensen J, Thomas A, Tranchant M, Woodland AM, Labrie F, Skolnick MH, Neuhausen S, Rommens J, Cannon-Albright LA. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nat Genet* 2001;2:172-180.

Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, Kraft P, Wacholder S, Orr N, Yu K, Chatterjee N, Welch R, Hutchinson A, Crenshaw A, Cancel-Tassin G, Staats BJ, Wang Z, Gonzalez-Bosquet J, Fang J, Deng X, Berndt SI, Calle EE, Feigelson HS, Thun MJ, Rodriguez C, Albanes D, Virtamo J, Weinstein S, Schumacher FR, Giovannucci E, Willett WC, Cussenot O, Valeri A, Andriole GL, Crawford ED, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF, Jr, Hoover R, Hayes RB, Hunter DJ, Chanock SJ. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet* 2008;3:310-315.

Wiklund F, Jonsson BA, Goransson I, Bergh A, Gronberg H. Linkage analysis of prostate cancer susceptibility: confirmation of linkage at 8p22-23. *Hum Genet* 2003;4:414-418.

Wiklund F, Jonsson BA, Brookes AJ, Stromqvist L, Adolfsson J, Emanuelsson M, Adami HO, Augustsson-Balter K, Gronberg H. Genetic analysis of the RNASEL gene in hereditary, familial, and sporadic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004;21:7150-7156.

Will JC, Vinicor F, Calle EE. Is diabetes mellitus associated with prostate cancer incidence and survival? *Epidemiology* 1999;3:313-318.

Winckler W, Weedon MN, Graham RR, McCarroll SA, Purcell S, Almgren P, Tuomi T, Gaudet D, Bostrom KB, Walker M, Hitman G, Hattersley AT, McCarthy MI, Ardlie KG, Hirschhorn JN, Daly MJ, Frayling TM, Groop L, Altshuler D. Evaluation of common variants in the six known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes for association with type 2 diabetes. *Diabetes* 2007;3:685-693.

Witte JS. Prostate Cancer Genomics: Toward a New Understanding. *Nat Rev Genet* 2009;10:77-82.

Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am.J.Hum.Genet* 2005;6:967-986.

Xu J, Zheng SL, Komiya A, Mychaleckyj JC, Isaacs SD, Hu JJ, Sterling D, Lange EM, Hawkins GA, Turner A, Ewing CM, Faith DA, Johnson JR, Suzuki H, Bujnovszky P, Wiley KE, DeMarzo AM, Bova GS, Chang B, Hall MC, McCullough DL, Partin AW, Kassabian VS, Carpten JD, Bailey-Wilson JE, Trent JM, Ohar J, Bleecker ER, Walsh PC, Isaacs WB, Meyers DA. Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet* 2002;2:321-325.

Xu J, Meyers D, Freije D, Isaacs S, Wiley K, Nusskern D, Ewing C, Wilkens E, Bujnovszky P, Bova GS, Walsh P, Isaacs W, Schleutker J, Matikainen M, Tammela T, Visakorpi T, Kallioniemi OP, Berry R, Schaid D, French A, McDonnell S, Schroeder J, Blute M, Thibodeau S, Gronberg H, Emanuelsson M, Damber JE, Bergh A, Jonsson BA, Smith J, Bailey-Wilson J, Carpten J, Stephan D, Gillanders E, Amundson I, Kainu T, Freas-Lutz D, Baffoe-Bonnie A, Van Aucken A, Sood R, Collins F, Brownstein M, Trent J. Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nat Genet* 1998;2:175-179.

Ying SY, Lin SL. Current perspectives in intronic micro RNAs (miRNAs). *J Biomed Sci* 2006;1:5-15.