

OULUN YLIOPISTO
UNIVERSITY of OULU

Fucosidosis englanninspringerspanieleilla

LuK-tutkielma

Anette Heikkuri

Ekologian & Genetiikan yksikkö

Oulun yliopisto

21.05.2017

Avainsanat: fucosidosis, englanninspringerspanieli, α -L-fukosidaasi, lysosomaalinen kertymäsairaus, entsyymiterapia

SISÄLLYS

1. Johdanto	1
2 Mikä on Fucosidosis?	3
2.1 Taustaa	3
2.2 Oireet	5
2.3 Kudoslöydökset	7
3 Hoitokeinot	9
4 Sairauden geneettinen tausta	12
5 Lähdeluettelo	14

1 Johdanto

Englanninspringerspanieleilla on kaikkien jalostettujen koirarotujen tapaan rotutyypillisiä perinnöllisiä sairauksia, jotka on saatu kartoitettua ja joihin on kehitelty jo toimivat kliiniset tutkimusmenetelmät. Myös periytyminen on suurimmasta osasta sairauksia tiedossa, ja nykyään jalostukseen käytettävät yksilöt voidaankin seuloa jo varhaisessa vaiheessa geenitestien avulla. Rodun yksi vakavimmista ongelmista viime vuosikymmeninä on ollut etenevä verkkokalvon rappeuma eli PRA (progressive retinal artrophy), jonka *CORD1* –mutaatioon on saatu kehitettyä geenitestiä. Testillä on tähän asti seulottu sairaat, kantajat ja mutaatiosta vapaat yksilöt ja saatu selkeästi vähennettyä sairaiden määrää populaatiossa välttämällä kantajien ja sairaiden jalostukseen käyttöä sekä linjaamista tunnettuihin kantajiin. Enenevässä määrin on kuitenkin alkanut esiintyä erityyppistä, niin kutsuttua klassista PRA:ta, ja nyttemmin rotujärjestö Suomessa on siirtänyt PRA *CORD1*-geenitestauksen rodun jalostuksen tavoiteohjelmassa (JTO) suositusten listalle (Springerspanielit ry, Jalostustoimikunta 2017).

Muita englanninspringerspanieleille tyypillisiä sairauksia ovat pääasiassa silmäsairaudet, kuten perinnöllinen harmaakaihi eli HC (hereditary cataract), retinan dysplasia eli RD (retinal dysplasia) ja glaukooma. Retinan dysplasiasta esiintyy kolme eri muotoa, joiden ei ole osoitettu olevan perinnöllisesti toisiinsa kytköksissä. Muodot voivat siis vaihdella harmittomasta multifokaalista retinan dysplasiasta (mRD) vakavampiin geograafiseen (gRD) ja totaaliin retinan dysplasiaan (tRD). Silmäsairaudet rodulla ovat pääasiassa resessiivisesti perinnöllisiä eikä tyypillisimpiin sairauksiin ole kehitetty erikseen geenitestiä, kun sairaiden seulonta on ollut suhteellisen helppoa jo Suomen Kennelliiton PEVISA:n (perinnöllisten vikojen ja sairauksien vastustamisohjelma) vaatimien tutkimusten ansiosta. Jonkin verran esiintyy myös allergioita, epilepsiaa ja muita autoimmuunisairauksia, kuten esimerkiksi AIHA (autoimmuuni hemolyyttinen anemia). Autoimmuunisairauksista kärsivät koirat pyritään karsimaan jalostuksesta, mutta tarkempia geenitestejä ei ole käytössä. PEVISA vaatii tutkittaviksi tyypillisimpien perinnöllisten silmäsairauksien

(HC, RD, PRA) lisäksi myös lonkkanivelet mahdollisen dysplasian vuoksi. Rodulla on kuitenkin pääasiassa terveet lonkat ja prosentuaalisesti vakavaa lonkkaniveldysplasiaa (asteet D ja E) on hyvin vähän (SKL, jalostustietojärjestelmä). Mikään terveystulos englanninspringerspanielilla ei sinänsä kumminkaan karsi sitä jalostuksesta, vaan mahdollinen jalostuskäytön suunnittelu jää kasvattajien arvioiden varaan. Ainoat Suomen Kennelliiton määrittämät, jalostuskäytön poissulkemisen varmistavat tutkimustulokset ovat huonoimmat mahdolliset tulokset lonkka- ja kyynärniveleröntgentutkimuksista, eli HD-arvo 'E' ja ED (elbow dysplasia) -arvo '3.' Yleisesti ottaen englanninspringerspanieli on kuitenkin rotuna erittäin perusterve perhekoira ja mahdollinen vakavasti sairas yksilö on harvinaisuus. On myös tulkinnanvaraista esimerkiksi lonkkien suhteen, mikä on sairas nivel ja mikä ei. Jokin D-lonkkainen koira voi olla yleisesti ottaen terve ja kivuton, elinvoimainen koira ja elää vanhaksi tavanomaiseen tapaan. Jokin A-lonkkainen koira taas saattaa kärsiä liian tiukoista, matalista lonkkamaljoistaan ja olla muutoin sairas ja lyhytikäinen. Koiranjalostajan onkin omattava sekä runsaasti tietoa että maalaisjärkeä tehdessään jalostusvalintoja ja koiria on katsottava kokonaisuuksina.

Fucosidosis-sairaita koiria ei ole havaittu Suomessa lainkaan, mutta jalostukseen käytettävät yksilöt testataan geenitestillä (Skelly, B. J. *et al.* 1999) myös sen varalta, sillä ulkomaisten koirien jalostuskäyttö on runsasta. Yleisesti ottaen fucosidosisista esiintyy kaikkialla maailmassa. Fucosidosis on vakava, fataali sairaus, joka periytyy autosomaalisesti resessiivisesti ja sen suhteen ollaan jalostuksessakin ehdottomia; ainoastaan täysin sairaudesta geneettisesti vapaat yksilöt ovat jalostuskelpoisia. Tämäkin on kuitenkin rotujärjestön suositus ja jonkin verran on nähty käytettävän esimerkiksi fucosidosis-vapaalle nartulle urosta, jonka sairausstatus ei ole selvillä (Springerspanielit ry, Jalostustoimikunta). Itse rodun kasvattajana ja rotujärjestön jalostustoimikunnan nykyisenä jäsenenä (2017) tarkastelen kandidaatintyössäni tarkemmin nimenomaan fucosidosisista ja tutkimuksen nykytilaa, sillä on hyvin erikoista, että englanninspringerspanieli on ainut koirarotu, jolla tämä harvinainen sairaus on todettu. Tietävästi sitä ei ole tavattu myöskään muilla koiraeläimillä, joten englanninspringerspanielin

fucosidosiksen sijaan voisimme hyvin puhua koiraeläinten fucosidosiksesta (Canine fucosidosis).



Kuva 1. Englanninspringerspanieli. Kuvan koira on terve rodun edustaja. Kuva: Hannu Leinonen

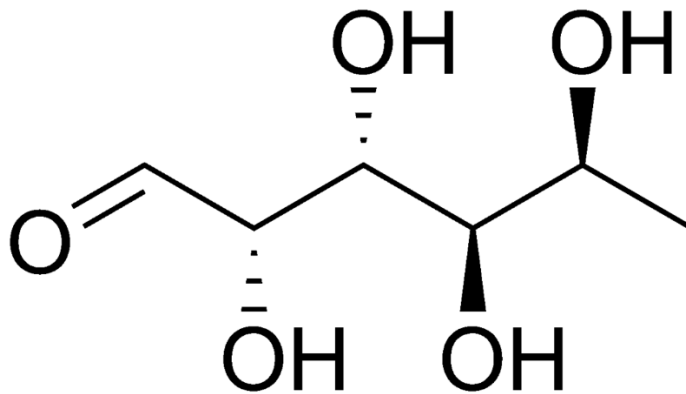
2 Mikä on Fucosidosis?

2.1 Taustaa

Ensimmäinen varsinainen tutkimus liittyen nimenomaan englanninspringerspanieleihin tämän sairauden osalta tehtiin Australian Queenslandissa. Tästä tutkimuksesta on julkaistu artikkeli 1983 (Kelly, W. R. *et al.*). Tutkimuksessa käsiteltiin kahta englanninspringerspanieliä samasta pentueesta. Toinen oli uros ja toinen narttu; molemmilla havaittu fucosidosikselle tyypillisiä oireita hermostossa, kuten laajalle levinnyttä solujen vakuoloitumista lukuisissa elimissä sekä ääreis- että keskushermostossa, sekä laajentumista muun muassa spinaaliganglioissa ja kiertäjähermossa. Näiden yksilöiden emällä havaittiin myös alentunutta α -L-fukosidaasi -entsyymin aktiivisuutta leukosyyteissä, aktiivisuuden ollessa alle puolet oletetusta normaaliarvosta. Uroksella havaittiin selkeä α -L-

fukosidaasin toimintavaje fibroblasteissa ja leukosyyteissä, eli elimistön sidekudoksen väliainetta tuottavissa perussoluissa ja valkosoluissa. Biokemialliset, patologiset ja kliiniset piirteet vastaavat pitkälti ihmisen fucosidosisista. Kaiken kaikkiaan huomattiin, että englanninspringerspanieli on varsin potentiaalinen ja hyvin soveltuva eläinmalli tutkimukseen ihmisen vastaavalle fucosidosis-sairaudesta (Kelly, W. R. *et al.* 1983).

Koiraeläinten fucosidosis on koiraroduista ainoastaan englanninspringerspanieleilla havaittu neurologisesti etenevä sairaus, vaikka näin kutsuttuna nimi johtaa harhaan. Sairaus onkin oikealta nimeltään niin sanottu LSD (lysosomaalinen kertymäsairaus, lysosomal storage disease) eli sairaus, jossa elinten lysosomeihin kertyy ylimääräisiä yhdisteitä. Tämä johtuu kyseisiä yhdisteitä hajottavan entsyymin puutteesta tai vajeesta, eli elimistö ei tuota entsyymiä tarpeeksi tai ollenkaan. Tässä tapauksessa entsyymi on α -L-fukosidaasi, jota on kahta eri muotoa (I ja II). Tämä entsyymi on tärkeä lysosomientsyymi eli erikoistunut monimutkaisiin aineenvaihdunnallisiin prosesseihin ja niin sanottujen kuona-aineiden hajotukseen ja poistoon soluista. Hajottamattomien yhdisteiden kertyminen aivoihin ja muualle hermostoon aiheuttaa tyypilliset sairauden oireet. Yhdisteet ovat fukoosia sisältäviä glykoasparagiineja, joita on tunnistettu lähinnä kolmea eri tyyppiä (Abraham, D. *et al.* 1984). Niiden erot syntyvät ketjun pituuden eroista ja nämä taas siitä, onko yhdisteessä lisäksi galaktoosia ja mannoosia. Lisäksi virtsasta voidaan havaita fukosyyli-glykokonjugaatteja.



Kuva 2. Fukoosi

Abraham, D. *et al.* 1984 havaitsivat tutkimuksessaan, että sairastuneen koiran aivoissa on vain 5%-suuruinen jäännös tavallisesta entsyymimäärästä α -L-fukosidaasia. Entsyymivaje on samanaikainen molemmissa α -L-fukosidaasin muodoissa, ja ilmiö on hyvin samankaltainen verrattaessa koiraa ja ihmistä saman sairauden osalta.

2.2 Oireet

Vastasyntyneellä pennulla ei ole vielä havaittavissa vakuoloitumista aivoissa eikä tietenkään alhaisen kehityksen vuoksi havaita muitakaan, muun muassa luonteenpiirteisiin liittyviä sairaudelle tyypillisiä muutoksia. Jo neljän kuukauden iässä voidaan huomata selkeää fukoosiyhdisteiden varastoitumista elimiin ruumiinavaustutkimuksessa. Varsinaisia kliinisiä oireita käyttäytymisessä ja motoriikassa aletaan nähdä riippuen yksilön sairauden etenemisestä, joka on varsin yksilöllistä. Tämä tapahtuu useimmiten kymmenestä kahteentoista ikäkuukauden välillä, mutta oireet voidaan havaita jopa vasta kahdeksastatoista ikäkuukaudesta neljän vuoden ikään asti (Kondagari, G. S. *et al.* 2011b & Animal Genetics 2017).

Kliiniset oireet ovat puhtaasti neurologisia johtuen fukoosiyhdisteiden kertymisestä ääreis- ja keskushermostoon. Hermosto reagoi kertymiseen ja laajentumiseen herkemmin kuin muut elimet, vaikka kertymistä ja vakuoloitumista tapahtuu kaikkien elinten lysosomeissa. Oireisto koostuu laaja-alaisista motorisista häiriöistä sekä häiriöistä käyttäytymisessä. Ataksia on hyvin tyypillistä ja nivelet voivat vaikuttaa yliliikkuvilta, yksilö unohtaa oppimansa eikä vaikuta olevan aina läsnä. Myös kuuroutta ja sokeutta esiintyy jonkin verran. Usein fucosidosis-sairaalla koiralla paino tippuu ja tasapaino liikkeessä on vaikeaa säilyttää.

Yleisesti ottaen oireisto on jaettu sairauden eri vaiheisiin hieman erilaiseksi ja jako osoittaa selkeästi oireiden vakavoitumisen sairauden edetessä.

Vaiheet ovat prekliininen, varhainen kliininen ja myöhäinen kliininen.

Prekliininen vaihe käsittää iältään syntymähetkestä seitsemän kuukauden

ikään asti sairaita yksilöitä. Oireet ovat vielä varsin vähäisiä ja huomaamattomia, kuten esimerkiksi koiran ongelmia itsehillinnässä sekä yleistä levottomuutta. Varhaisessa kliinisessä vaiheessa, jossa ikähaitari on kategorioitu yhdestätoista kuukaudesta kuudentoista kuukauden ikään, havaitaan jo muun muassa lievää ataksiaa, joka on hyvin tyypillistä sairaudelle. Lisäksi koiran asentojen aistimuksessa voi tapahtua pieniä muutoksia jo tässä vaiheessa ja oppiminen hidastuu. Usein havaitaan myös hypermetriaa, joka on yhdenlainen tyyppi ataksiasta. Myöhäinen kliininen vaihe käsittää iän kahdeksastatoista kuukaudesta kolmeen kymmeneen kuukauteen. Tässä vaiheessa oireet ovat jo vakavia. Käytös ja liikkeet alkavat olla täysin koiran kontrollista riippumattomia. Ataksia on selkeää ja hypermetria muuttunut vakavaksi, koiralla voi esiintyä nielemisvaikeuksia ja spontaania nystagmusta eli silmävärvettä. Liikehdintä ja käytös ovat pakonomaisia ja voivat vaikuttaa jopa epileptisiltä. Koira kouristelee ja vapisee, unohtaa yhä selkeämmin oppimansa asiat ja on flegmaattinen. Useimmiten näin selkeiden oireiden ilmettyä tila johtaa kuolemaan tai eutanasiaan jo muutaman viikon kuluessa oireiden puhkeamisesta (Kondagari, G. S. *et al.* 2011b).

Jonkin verran englanninspringerspanieleilla on havaittu myös epilepsiaa ja siihen viittaavia oireita ilman varsinaisia epilepsiaan viittaavia löydöksiä, jotka olisivat johtaneet diagnoosiin. Jotain tutkimusta olisi mielestäni siis syytä suunnitella myös jatkoon, jotta me kasvattajina saisimme yleisesti tietoon, mikä rodun taustassa saa aikaan neurologisia oireita.

Jalostustoimikuntamme on vastaanottanut tietoa koirista yksityiskohtaisesti, mutta yhä enemmän olisi syytä kannustaa koiranomistajia myös otattamaan DNA-näytteet koiristaan jatkoa varten. Tiedossamme on, että osa oireilevien koirien omistajista on lähettänyt näytteet Hannes Lohen geenitutkimukseen, joten toivon mukaan tulevaisuudessa tähänkin kysymykseen saadaan vastauksia.

2.3 Kudoslöydökset

Näkyvien oireiden lisäksi tärkeitä ovat kudoslöydökset, jotka viimeistään selkeästi osoittavat sairauden olevan koira-eläinten fucosidosis. Tällaisia vammoja on havaittavissa lukuisia erityisesti hermoston eri osissa. Hermostollinen tulehdus ja neuronikato ovat yksiä tyypillisimmistä löydöksistä. Jo elämän ensimmäisen kuukauden aikana voidaan havaita neuronien aksonien dystrofiaa ja niitä ympäröivän myeliinin muodostumisen viivettä tai heikentymistä eli hypomyelinaatiota johtuen substraattien kertymisestä keskushermostoon. Sitä mukaa kun hermostollinen tulehdus ja apoptoottinen solukuolema hermostossa etenee, korostuvat myös hermoston toimintahäiriöt lisääntyneinä oireina, kuten epävakaina asentoina ja vakavana ataksiana. Kondagari, G. S. *et al.* 2011b - tutkimuksen mukaan isoaivojen etuosassa saadaan merkkiaineilla näkymään selkeästi hermostovauriot, kuten astroosytoosi, lysosomien laajentuminen (fukoosiyhdisteiden kertymisen vuoksi) sekä apoptoosi (ohjelmoitu solukuolema) sairastuneiden ollessa iältään kahdestatoista seitsemääntoista kuukautta. Astroosytoosissa siis hermoston mekaanista tukea antavia ja vaurioitunutta hermokudosta korjaavia astroosyytteja tuhoutuu. Jo hieman nuoremmilla koirilla merkkiaineet tarttuvat selkeästi huonommin, mikä kertoo sairauden merkittävän nopeasta etenevästä luonteesta. Tämä myös todistaa hyödyn sairauden jakamisesta eri kliinisiin vaiheisiin; fucosidosis etenee noin kuuden kuukauden sykleissä, joissa oireet muuttuvat luonteeltaan vakavammiksi.

Fletcher, J. L. *et al.* 2016 -tutkimuksessa havaittiin kiinnostavana seikkana, että parvovirusinfektion sairastanut ja siitä selvinnyt fucosidosis-koira osoitti selkeämpiä hermostollisia vaurioita kuin parvoa sairastamaton koira. Oletettu syy tässä on korostunut immuunivaste sekundaarista infektiota eli parvoa vastaan ja näin ollen lisääntyntä fukosyloitunutta substraattia ei saada riittävässä määrin poistettua fagosytoimalla (solusyönnillä).

Fucosidosis-aivoissa huomataan myös muodoltaan pyramidaalista neuronikatoa, mikrogliosia (keskushermoston arpeutumista eli fibroblastien kehittyminen fibrosyyteiksi on häiriintynyt) sekä katoa

Purkinjen soluissa (pikkuaivokuoren suuria, spesifisiä hermosoluja). Muun muassa näitä seikkoja tarkasteltiin tutkimuksessa, jossa verrattiin hermoston rappeutumisen eroja fucosidosis-sairaaseen koiran aivoista vanhan koiran aivojen tavanomaiseen degeneraatioon (Kondagari, G. S. *et al.* 2011c). Vanhenevissa aivoissa lysosomien katabolinen toimintakyky heikkenee aivan kuten lysosomaalisissa sairauksissakin. Vanhenemiseen liittyy myös esimerkiksi hitaasti etenevä neuronien degeneraatio. Tässä tilassa luonnollinen lysosomaalinen toimintaheikkous johtaa apoptoosiin oksidatiivisen stressin kautta, toisin kuin kertymäsairaudessa, joka etenee jo alussa varsin nopeasti. Tutkimuksessa huomattiin, että fucosidosiksen solukuolema voi myös johtua solujen välisen kalsiumsignaaloinnin puuttellisuudesta, mikä lisää oksidatiivista stressiä ja häiritsee biokemiallisia reaktioteitä kalsiumtasapainon häiriintyessä. Joka tapauksessa ero normaalisti vanheneviin aivoihin oli selkeä; muutokset vanhenevissa aivoissa ovat useimmiten hiuksenhienoja verrattaessa aggressiivisesti ja nopeasti etenevään degeneraatioon sairaisissa aivoissa. Esimerkiksi astrozytoosi ja mikrogliaosi on vain lievää, verisuonten paksuuntuminen hillittyä. Vanhoissa aivoissa huomataan kuitenkin selkeää apoptoosia sekä neuronien pyramidaalista katoa (Kondagari, G. S. *et al.* 2011c). Englanninspringerspanieleilla tavataan joitain neurologisia oireita ainoastaan vanhoilla koirilla ilmenneinä. Olisi mielenkiintoista tutkia, onko esimerkiksi muiden rotujen aivojen vanhenemisprosessi samankaltainen verrattuna englanninspringerspanieleihin, vai onko tällä rodulla joitain perinnöllisesti tai anatomisesti merkittäviä, spesifisiä eroja.

Fletcher, J. L. *et al.* 2014 keskittyivät tutkimuksessaan oligodendrosyytteihin ja muutoksiin niissä sairauden edetessä hankkien eksaktimpaa tietoa sairauteen liittyvästä hypomyelinaatiosta. Oligodendrosyytit kuuluvat siis myös hermotukikudokseen, mutta ovat astrozyytteja pienempiä ja niiden tehtävänä on tuottaa keskushermoston myeliinitupet. Samalla he tutkivat myös muita kudoksenäytteitä keskushermostosta käyttäen erilaisia, muun muassa elektronimikroskopian ja immunohistokemian sovelluksia. Oligodendrosyyttien havaittiin vakuoloituvan etenevästi, mutta samalla niiden tuhoutuminen apoptoosin

kautta stabiloitui pikkuhiljaa. Vakuoloituminen alkoi koiran ollessa noin viiden viikon ikäinen ja jatkui kuudentoista viikon ikään saakka, jolloin lopulta kaikki oligodendrosyytit osoittivat merkkejä tästä ilmiöstä. Saman ikäisillä koirilla valmiiden kehittyneiden oligodendrosyyttien varsinainen tuhoutuminen stabiloitui. Varsinaisen hypomyelinaation syyn ei uskota olevan pelkästään aksonaalisten neurofilamenttien ja oligodendrosyyttien välinen häiriintynyt vuorovaikutus, sillä neurofilamentteja tuhoutui lähinnä sairauden myöhäisessä kliinisessä vaiheessa. Tätä tukee myös se, että oligodendrosyyttejä ei juurikaan tuhoutunut kokonaan, ainakaan merkittävässä mittakaavassa, jotta se olisi vaikuttanut hypomyelinaatioon ensisijaisena tekijänä.

3 Hoitokeinot

Ainoana sopivana eläinmallina ihmisen vastaavalle fucosidosis-sairaudelle englanninspringerspanieli on hyvin tärkeä työkalu terapiamuotojen kehityksessä. Tutkimuksessa koiran kaltaisen suuren koe-eläimen käyttö on kuitenkin haastavaa johtuen sen aikaa vievästä kehityskaaresta ja sairaiden yksilöiden vähäisestä määrästä. Tilojen tutkimuslaitoksella tulisi olla sopivat siis sekä näiden keskikokoisten koirien pennuttamiseen että niiden koko elämän kattamiseen, sillä rodun varsinaiset, viralliset kasvattajat pyrkivät geenitestien avulla välttämään sairaiden koirien kasvattamisen viimeiseen asti eikä heiltä sopivia tutkimusyksilöitä varmasti löydy ainakaan helposti. Lisäksi mukaan astuu eettinen kysymys koirien käyttämisestä koe-eläimenä. Koirien koe-eläinkäytön ongelmallisuudesta huolimatta terapiamuotoja on saatu kehitettyä jo lukuisia ja hyötyä on sekä eläimille että ihmisille tämän etenevän, vakavan sairauden hoidossa.

Tutkimuksen alkuaikoina kokeiltiin luuydinsiirtojen tehoa fucosidosiksen hoidossa. Havaittiin, että tällainen hoitomuoto nosti α -L-fukosidaasin aktiivisuutta sisäelimissä, hermokudoksessa, plasmassa sekä leukosyyteissä. Luuydinsiirrolla ei ollut vaikutusta, kun sairaalla yksilöllä oli jo havaittu klinisiä oireita, mutta pitkäaikainen ja jatkuva hoito jo varhaisessa

vaiheessa aloitettuna hidasti sekä neurologisten oireiden syntymistä että itse sairauden etenemistä (Taylor, R. M. *et al.* 1992).

Kun luuydinsiirrot oli havaittu toimiviksi fucosidosiksen hoidossa, alettiin miettiä, olisiko mahdollista kehittää helpommin ja nopeammin käytettävissä oleva hoitokeino sairauteen. Lopulta onnistuttiin ekspressoimaan rekombinaattimuoto α -L-fukosidaasi -entsyymistä ja lyhenteenä tästä koiraeläinten rekombinaatti- α -L-fukosidaasista käytetään rFUC:a (Bielicki, J. *et al.* 2000). Entsyymiä onnistuttiin tuottamaan koiraeläinten Madin-Darby -munuaissoluissa sekä kiinanhamsterin ovariosoluissa, jonka jälkeen sitä puhdistettiin homogeeniseksi affiniteetikromatografian avulla. Kuitenkin jo ennen tätä oli ehditty pariin otteeseen tutkia astetta edistyksellisempää terapiamuotoa verrattuna luuydinsiirtoihin, nimittäin geeninsiirtoa retrovirusvektorin avulla fibroblasteihin (1992) sekä hematopoieettisiin kantasoluihin (1997).

Occhiodoro, T. *et al.* 1992 saivat normalisoitua sairaiden koirien ja ihmisten fibroblastien toiminnan siirtämällä niihin α -L-fukosidaasin geenin käyttäen retroviruksia vektoreina. Entsyymipuutoksen korjaus johti onnistuneeseen hajotusprosessiin ja kertynyttä fukoosiyhdistettä saatiin poistettua hoidetuista fibroblastien lysosomeista aivan kuin ne olisivat olleet terveitä. Itse geeni saatiin retrovirusvektoriin kloonamalla α -L-fukosidaasia koodaava täysimittainen cDNA-klooni siihen. Tämä tutkimus oli jo suuri edistysaskel ja loi mittavasti toivoa tulevaisuudelle ja uusien hoitomuotojen kehitykselle. Seuraavaksi Ferrara, M. L. *et al.* 1997 -tutkimuksessa hyödynnettiin tietoa sekä luuydinsiirroista että geeniterapiasta tekemällä retrovirus-välitteinen geeninsiirto hematopoieettisiin kantasoluihin. Oli huomattu, että luuydinsiirroissa hematopoieettiset kantasolut kykenevät välittämään keskushermostoon haluttua entsyymiä tuottavia tytärsoleja ja vaikuttamaan näin sairauden etenemiseen. Tutkimus ei kuitenkaan ollut kovin menestyksenkäs eikä toivottua vastetta saatu aikaan suurista odotuksista huolimatta.

Merkittävää edistystä alkoi tapahtua, kun tuttu tekijätiimi tämän sairauden tutkimuksen osalta otti jälleen ohjat käsiinsä. Kondagari, G. S. *et al.* 2011a saivat kehitettyä intrakisternaalisen entsyymiterapian, joka tuotti sekä

loistavaa vastetta tutkimusyksilöissä että oli riskitön keino saada tuloksia tehokkaasti ja ilman komplikaatioita. Hoito ei aiheuttanut tulehdusvastetta tai vasta-aineiden tuotantoa hoidetuissa koirissa toisin kuin luuydinsiirtohoitot. Entsyymiterapiaa saaneet koirat saivat massaa ja kauttaaltaan niiden tila parani hoidon myötä. Itse idea tällaiseen hoitomuotoon tuli veri-aivoesteen hankaloittavasta vaikutuksesta lysosomaalisten kertymäsairauksien hoidossa. Keksittiin, että entsyymiä voidaan injektoida intrakisternaalisesti aivoihin, jolloin veri-aivoeste saadaan väistettyä. Entsyymiä injektoidiin kolmesti kuukauden välein ja se tavoitti muun muassa maksan, kohdunkaulan imusolmukkeen, luuytimen ja koko keskushermoston, kun injektiot aloitettiin pennuille kahdeksan viikon iästä alkaen. Entsyymitasot nousivat laajalti liki normaaleihin rajoihin tai vähintäänkin merkittävästi. Kaikkein merkittävin nousu tapahtui selkäytimessä ja aivorungossa; entsyymitasot olivat 39-73% normaalista terveen koiran vastaavasta entsyymikonsentraatiosta. Hoito myös vähensi merkittävästi fukoosiyhdisteiden määrää muun muassa imusolmukkeissa, maksassa sekä suurimmassa osassa keskushermostoa. Jo näinkin lyhyt hoitajakso jätti pysyvän jäljen ja kohonnutta α -L-fukosidaasi -aktiivisuutta sekä kertymäyhdisteiden häviämistä havaittiin vielä selkäydinnesteessä jopa kuoleman jälkeen otetuissa näytteissä. Myöhemmin pääosin samasta tutkijatiimistä koostunut ryhmä testasi tarkemmin, kuinka suuret määrälliset erot saadaan vasteissa verrattaessa intrakisternaalista entsyymiterapiaa saaneita koiria ja lume-hoitoa saaneita vastaavia sairaita yksilöitä (Kondagari, G. S. *et al.* 2015). Tulokset osoittivat selkeästi entsyymiterapian tuottamaa hyötyä fucosidosiksen neuropatologiassa. Silti huomattiin, että muun muassa Purkinjen solujen tuhoutuminen ei vähentynyt, mutta sen sijaan hoito sai niiden apoptoosialttiuden vähentymään.

4 Sairauden geneettinen tausta

Koiraeläinten fucosidosis periytyy yksinkertaisella kaavalla eli autosomaalisesti resessiivisesti. Molempien vanhempien siis täytyy olla vähintään sairausalleelin kantajia, jotta niiden jälkeläisestä tulee sairas. Mielenkiintoinen piirre sairastuneissa koirissa on myös se, että koiraat eivät ole kykeneväisiä lisääntymään, mutta naaraat ovat fertiililydeltään täysin normaaleja. Tähän uskotaan olevan syynä fucosidosiksen aiheuttamat laajat vauriot lisäkiveksissä ja sitä kautta ongelmat siittiöiden normaalissa tuotannossa ja kuljetuksessa ejakulaation aikana (Taylor, R. M. *et al.* 1989).

Lysosomaalisen α -L-fukosidaasi -entsyymin vajeen ja fukosyloituneiden oligosakkaridien kertymisen elimiin aiheuttaa neljäntoista emäsparin lukukehysdeleetio *FUCAI*-geenissä, joka koodaa α -L-fukosidaasi -entsyymiä. Jo aiemmin mainitussa Fletcher, J. L. *et al.* 2014 tekemässä oligodendrosyyttitutkimuksessa tutkittiin myös geeniekspressiota ja havaittiin, että *PLP1*-, *CNP*- ja *MAL*-geenien toimintakyky on alentunut sairailta yksilöillä.

Oligodendrosyytteihin ja myeliiniin linkittyviä geenejä on tutkittu myös spesifimmin saman tiimin toimesta jo vuonna 2011 (Fletcher, J. L. *et al.* 2011). Tutkimuksessa verrattiin entsyymikorvausterapiaa saaneita koiria hoitamattomiin sekä terveisiin yksilöihin. Terapiamenetelmänä käytettiin tarkalleen ottaen IT-ERT -terapiaa, jossa siis toiminnallista entsyymin rekombinaattimuotoa siirretään suoraan aivo-selkäydinnesteeseen paikkaamaan entsyymivajetta. Tutkimuksessa havaittiin, että eroa geenien ekspressiossa ei juurikaan ollut verrattaessa fucosidosis-sairasta hoitamattomia ja entsyymikorvaushoitoa saanutta yksilöä. Terveen ja sairaan yksilön välillä havaittiin kuitenkin erilaistuneita geenejä ja niillä oli selkeä vaikutus muun muassa sairauden tulehdukseen, hematologisen systeemin kehitykseen ja toimintaan, solujen signaalointiin ja kalsium-metaboliaan. Kahdeksankymmentäkolme geeniä oli päällekytkettyjä ja vastaavasti viisikymmentäkolme geeniä huonommin ekspressoituvia

normaalitilanteeseen verrattuna, kun tarkasteltiin eroja sairaiden (sekä hoidetut että hoitamattomat yksilöt) ja terveiden kontrolliyksilöiden välillä. Tiiviin tarkastelun alla olleita lysosomaalisia geenejä oli selkeästi päällekytkettyinä useampi kappale, kuten esimerkiksi β -glukuronidaasia koodaava *GUSB* ja α -mannosidaasia koodaava *MAN2B1*. Oletetusti α -L-fukosidaasia koodaava *FUCA1* oli hyvin erilaistunut eikä neljäntoista emäsparin deleetiostaan johtuen ekspressoitunut laisinkaan. Lukuisia myeliinin tuotantoon ja ylläpitoon liittyviä geenejä havaittiin huonosti ekspressoituviksi. Apoptoosia ja tulehdusta säätelevät geenireitit olivat selkeästi aktiivisempia sairaisissa yksilöissä kontrolleihin verrattuna. Myeliinin tärkeimpiä rakenteellisia proteiineja, proteolipidiproteiinia sekä myeliinin perusproteiinia koodaavat geenit olivat vahvasti poiskytkettyjä eli ekspressoituivat huonosti. Samoin oli oligodendrosyyttikatoa säätelevän geenireitin kohdalla. Tutkittuja, huonosti ekspressoituvia geenejä olivat seuraavat tärkeät näitä prosesseja säätelevät geenit: *OPALIN* (Oligodendrocytic Myelin Paranodal And Inner Loop Protein), *MOG* (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein), *MOBP* (Myelin-Associated Oligodendrocyte Basic Protein), *MAL* (Mal, T-Cell Differentiation Protein), *CNP* (2',3'-Cyclic Nucleotide 3' Phosphodiesterase), *MAG* (Myelin Associated Glycoprotein), *OSP/CLDN11* (Claudin 11), proteolipidiproteiini 1:ä koodaava *PLP1* sekä *MBP* (Myelin Basic Protein) (Fletcher, J. L. *et al.* 2011 & GeneCards 2017).



Kuva 3 Englanninspringerspanieli. Kuvan koira on terve, skandinaavinen rodun edustaja. Kuva: Eija Heikkuri

5 Lähdeluettelo

Abraham D, Blakemore WF, Dell A, Herrtage ME, Jones J, Littlewood JT, Oates J, Palmer AC, Sidebotham R & Winchester B (1984) The enzymic defect and storage products in canine fucosidosis. *Biochem J* 222(1): 25-33.

Animal Genetics (2017),

http://www.animalgenetics.us/Canine/Genetic_Disease/CF.asp

Bielicki J, Muller V, Fuller M, Hopwood JJ & Anson DS (2000) Recombinant canine α -L-fucosidase: Expression, purification, and characterization. *Mol Genet Metab* 69(1): 24-32.

Ferrara ML, Occhiodoro T, Fuller M, Hawthorne WJ, Teutsch S, Tucker VE, Hopwood JJ, Stewart GJ & Anson DS (1997) Canine fucosidosis: A model for retroviral gene transfer into haematopoietic stem cells. *NEUROMUSCULAR DISORD* 7(5): 361-366.

Fletcher JL, Kondagari GS, Vite CH, Williamson P & Taylor RM (2014) Oligodendrocyte loss during the disease course in a canine model of the lysosomal storage disease fucosidosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 73(6): 536-547.

Fletcher JL, Kondagari GS, Wright AL, Thomson PC, Williamson P & Taylor RM (2011) Myelin genes are downregulated in canine fucosidosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1812(11): 1418-1426.

Fletcher JL & Taylor RM (2016) Associations between neurologic dysfunction and lesions in canine fucosidosis. *Genes Brain Behav* 15(4): 420-428.

GeneCards 2017, <http://www.genecards.org/>

Kelly WR, Clague AE, Barns RJ, Bate MJ & MacKay BM (1983) Canine α -l-fucosidosis: A storage disease of Springer Spaniels. *Acta Neuropathol* 60(1-2): 9-13.

Kondagari GS, Fletcher JL, Cruz R, Williamson P, Hopwood JJ & Taylor RM (2015) The effects of intracisternal enzyme replacement versus sham treatment on central neuropathology in preclinical canine fucosidosis. *Orphanet J Rare Dis* 10(1).

Kondagari GS, King BM, Thomson PC, Williamson P, Clements PR, Fuller M, Hemsley KM, Hopwood JJ & Taylor RM (2011) Treatment of canine fucosidosis by intracisternal enzyme infusion. *Exp Neurol* 230(2): 218-226.

Kondagari GS, Ramanathan P & Taylor R (2011) Canine fucosidosis: A neuroprogressive disorder. *Neurodegenerative Dis* 8(4): 240-251.

Kondagari GS, Yang J & Taylor RM (2011) Investigation of cerebrocortical and cerebellar pathology in canine fucosidosis and comparison to aged brain. *Neurobiol Dis* 41(3): 605-613.

- Occhiodoro T, Hopwood JJ, Phillip Morris C & Anson DS (1992) Correction of α -L-fucosidase deficiency in fucosidosis fibroblasts by retroviral vector-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 3(4): 365-369.
- Skelly BJ, Sargan DR, Herrtage ME & Winchester BG (1996) The molecular defect underlying canine fucosidosis. *J Med Genet* 33(4): 284-288.
- Skelly BJ, Sargan DR, Winchester BG, Smith MO, Herrtage ME & Giger U (1999) Genomic screening for fucosidosis in English Springer Spaniels. *Am J Vet Res* 60(6): 726-729.
- Springerspanielit r.y. (2017),
http://www.springerspanielit.com/JTO_ess/JTO_ess.htm
- Suomen Kennelliitto (2017),
<https://jalostus.kennelliitto.fi/frmEtusivu.aspx?R=125>
- Taylor RM, Farrow BRH & Stewart GJ (1992) Amelioration of clinical disease following bone marrow transplantation in fucosidase-deficient dogs. *Am J Med Genet* 42(4): 628-632.
- Taylor RM, Martin ICA & Farrow BRH (1989) Reproductive abnormalities in canine fucosidosis. *J Comp Pathol* 100(4): 369-380.