

Kaisu Hiltunen

Afgaaninvinttikoiran hemofilia A:han liittyvien ehdokasgeenivarianttien validointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko AMK

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

20.4.2017

Tekijä(t) Otsikko	Kaisu Hiltunen Afgaaninvinttikoiran hemofilia A:han liittyvien ehdokasvarianttien validointi
Sivumäärä Aika	37 sivua + 3 liitettä 20.4.2017
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Eläinlääketieteen lisensiaatti Maria Kaukonen Professori Hannes Lohi Lehtori Hannele Pihlaja
<p>Tämän työn tarkoituksena oli tutkia kahta geneettistä varianttia, joiden epäillään aiheuttavan hemofilia A:n afgaaninvinttikoiralla. Hemofilia A on perinnöllinen verenvuototauti, jota esiintyy monilla lajeilla, ihminen ja koira mukaan lukien. Koirangeenit-tutkimusryhmän tekemät varianttilöydöt sijaitsevat <i>F8</i>-geenissä, ja tämän työn tarkoitus oli validoida nämä ehdokasvariantit. Variantit löydettiin analysoitaessa sairaan yksilön eksomisekvensointiaineistoa.</p> <p><i>F8</i>-geenin eksonissa 14 sijaitsevan pistemutaation validointia varten näytteiksi valittiin 24 tervettä sairaan yksilön sukulaista. Testatuista koirista viidellä uroskoiralla oli hemitsygoottisena tutkittava variantti ja kahdeksan naarasta oli kantajia. Sairaana yksilön fenotyyppi oli hyvin vakava hemofilia, joten terveet genotyypiltään hemitsygootit yksilöt todistavat hypoteesia vastaan. Eksonissa 14 sijaitseva kandidaattivariantti ei siis todennäköisesti aiheuta hemofiliaa afgaaninvinttikoirilla, ainakaan yksinään. Eksonin 13 silmukointialueelta löytyneen insertiomutaation selvittelyssä sekvensoitiin yhteensä 19 koira, joista neljällä terveellä sukulaisella oli sama genotyyppi kuin sairaalla uroksella. Jos tulokset olisivat olleet lupaavia, olisi näytteitä analysoitu enemmän, mutta tämä määrä riitti todistamaan, että nämä variantit eivät todennäköisesti aiheuta sairautta.</p> <p>Tutkimusaineistona olivat suomalaiset puhdasrotuiset afgaaninvinttikoirat, joista omistaja oli luovuttanut EDTA-verinäytteet koirien DNA-pankkiin. Tutkittaville varianteille suunniteltiin alukkeet PCR- ja sekvensointireaktioita varten. DNA:ta monistettiin PCR-menetelmällä, ja ulkopuolinen taho suoritti sekvensoinnin kapillaarsekvensoinnilla. Tuloksia käsiteltiin Sequencher-ohjelmalla.</p> <p>Tässä tutkimuksessa ei voitu poissulkea mutaatioiden osallisuutta monitekijäisessä hemofiassa. Tutkimusta jatketaan keskittymällä mutaatioihin von Willebrandin tekijää koodaavassa geenissä. Näiden proteiinirakenteita muuttavien mutaatioiden yhteisvaikutus <i>F8</i>-geenin mutaatioiden kanssa voi olla hyytymistekijä VIII:n vajeen taustalla. Geenivirheen löytäminen mahdollistaisi geenitestin kehittämisen koirien jalostuksen avuksi.</p>	
Avainsanat	hemofilia A, tekijä VIII, <i>F8</i> , geenit, geenitesti, ehdokasgeeni, kandidaattigeeni

Author(s) Title Number of Pages Date	Kaisu Hiltunen Validating gene mutations behind haemophilia A in Afghan Hound 37 pages + 3 appendices 20 April 2017
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Maria Kaukonen, Veterinary Medicine Licentiate Hannes Lohi, Professor Hannele Pihlaja, Lecturer
<p>The purpose of this study was to investigate two gene variants of an Afghan Hound that was diagnosed with hemophilia A. The variants are in the gene that codes factor VIII, which is important part of the coagulation cascade. The goal of this study was to validate if the previously found missense mutation in exon 14 and the 1 bp insertion mutation in the splicing area of exon 13 as the cause of hemophilia in the affected individual. The affected dog's phenotype was severe hemophilia and the dog had to be euthanized because of it. Therefore, clinically healthy hemizygote were not expected.</p> <p>A sample set of 24 healthy relatives of the affected dog was chosen for the investigation of the missense mutation. From the tested dogs five males had the same genotype as the affected individual and eight bitches were carriers of the mutation. This indicates strongly that the studied missense mutation is not causative. For the insertion, 19 samples were sequenced, of which 4 healthy male dogs were carriers. Had the results been more promising, more samples would have been sequenced, but this was large enough to prove the studied variants were not the cause of the illness, at least not alone.</p> <p>The study cohort in this study included Finnish purebred, privately owned Afghan Hounds, of which EDTA blood samples had been donated to the Canine DNA bank. Primers were designed for both variants with Primer3 and DNA amplified in PCR reactions. Products were subsequently Sanger sequenced and data was visualized with Sequencher DNA sequence analysis software.</p> <p>These results do not exclude the possibility of the mutations being affecting factors of multi-factorial inheritance. The research will continue with checking variants in the gene that codes the von Willebrand factor. These missense mutations combined with the mutations in <i>F8</i>-gene might cause factor VIII deficiency. If the causative variant is found, a gene test could be developed. Testing dogs would benefit breeding and support a healthier future for dogs.</p>	
Keywords	hemophilia A, factor VIII, <i>F8</i> , genes, gene test, candidate gene

Sisällys

1	Lyhenteet	5
2	Johdanto	1
3	Koirien geenitutkimus	2
3.1	Koira ihmisen sairauksien eläinmallina	2
3.2	Koirien geenitestaus luo terveemmän tulevaisuuden roduille	3
4	Koirien historia	4
4.1	Afgaaninvinttikoiria	5
5	Hemofilia	6
5.1	Etiologia ja kliininen kuva	6
5.2	Hyytymisjärjestelmä	7
5.3	Tekijä VIII	8
5.4	F8-geeni ja mRNA ekspressio	9
6	Aineisto ja menetelmät	11
6.1	DNA:n eristys verestä	12
6.2	Konsentraation ja puhtauden mittaaminen	13
6.3	DNA:n monistus polymeraasiketjureaktiolla	14
6.4	Alukkeiden suunnittelu	15
6.4.1	Suunnitteluohjelmat	16
6.5	PCR ja agarosigeelielektroforeesi	17
6.5.1	Automatisoitu Sanger sekvensointi	19
6.6	DNA-sekvenssien analysointi ja tilastollinen analyysi	20
7	Tulokset	21
7.1	Missense mutaation tulokset	21
7.2	Insertiomutaation tulokset	25
8	Pohdinta	28
8.1	Tulosten merkitys ja jatkotutkimusehdotukset	28
8.2	Työn eettisyys ja luotettavuus	30
8.2.1	Insertiomutaation tulokset	31

8.3	Hyödynnettävyys työelämässä	32
8.4	Tulosten julkaisu	32
	Lähteet	33
	Liitteet	
	Liite 1. Sukupuu 1	
	Liite 2. Sukupuu 2	
	Liite 3. Hyytymistutkimusten tulokset	

1 Lyhenteet

AU	Absorbance Unit (Absorbanssi yksikkö)
AHA	Acquired Hemophilia A (Hankinnainen hemofilia A)
bp	basepair (emäspari)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoksiribonukleiinihappo)
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates (deoksinukleotidi trifosfaatit)
dsDNA	double strand DNA (kaksijuosteinen DNA)
EDTA	Ethylenediaminetetra acetic acid (Etyleenidiamiinitetraetikkahappo)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MSM	Magnetic Separation Module (Magneettinen eristys moduuli)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymeraasiketjureaktio)
PEVISA	Periytyvien vikojen ja sairauksien vastustamisohjelma
RR	Relative risk (Suhteellinen riski)
TF	Tissue Factor (kudostekijä)
UCSC	University of California Santa Cruz
vW-tauti	von Willebrandin tauti
WWF	von Willebrandin faktori/tekijä

2 Johdanto

Helsingin yliopistossa ja Folkhälsanin tutkimuskeskuksessa toimiva Koirien geenitutkimusryhmä pyrkii selvittämään koirien perinnöllisten sairauksien taustalla olevia geenivirheitä. Tutkimuksen kohteina ovat myös ulkonäkö, fyysinen rakenne ja käyttäytymisen piirteet. Ryhmän tavoite on tunnistaa geenivirheitä ja kehittää geenitestejä koirien jalostuksen apuvälineeksi. Geenitestien avulla voidaan tunnistaa kantajia, sekä estää myöhään puhkeavien sairauksien yleistymistä koiraroduissa. Testeistä voi olla myös apua epäselvien sairauksien diagnosoinnissa.

Käynnissä on lukuisia projekteja, joissa on mukana paljon eri rotuja. Tautigeeniprojek-teissa selvitetään muun muassa erilaisten autoimmuunisairauksien, keuhkosairauksien, neurologisten sairauksien ja sydänsairauksien taustalla olevia geenivirheitä. Opinnäyte-työni liittyy projektiin, joka selvittää afgaaninvinttikoirilla esiintyvän verenvuototaudin, he-mofilia A:n, geneettistä taustaa. Ilmi on tullut yksi tapaus, jossa sairas pentu jouduttiin lopettamaan vakavien spontaanien verenvuotojen vuoksi ja verikokeissa hyytymistekijä VIII:n määrä plasmassa oli hyvin matala (Liite 3). Kyseisen koiran verinäytteestä eriste-tystä DNA:sta tehdystä eksomisekvensoinnista saatua aineistoa verrattiin koiran refe-renssigenomiin, joka on määritetty bokserista vuonna 2005 (Lidblad-Toh ym. 2005.) Ver-tailusta saatiin kartta yksilön eksonisista eli proteiinia koodaavien alueiden varianteista ja sitä verrattiin terveisiin muiden rotujen koiriin.

Vertailuaineistosta valittiin tutkittavaksi lupaavimmat sairaan yksilön variantit, joista tässä työssä tarkastellaan kahta ehdokasvarianttia: pistemutaatiota *F8*-geenin eksonissa 14 ja insertiomutaatiota eksonin 13 silmukointi alueella. Pistemutaatio g.122955217G>C ai-heuttaa aminohappotasolla muutoksen p.1556G>A. Insertiomutaatio g.122966610-11insT sijaitsee 11 emäksen pituisessa T-toistojaksossa ja päätettiin tutkia siitä huoli-matta, että se ei kestänyt filtteröintiä. Filtteröinnissä verrattiin sairaan koiran eksomisek-vensoinnin tuloksia 396:n muun rotuisen terveeseen koiran eksomisekvensoinnin tuloksiin. Filtteröinti suoritettiin siten, että varianteiksi laskettiin kaikki sairaan koiran homotsygoot-tiset alleelit, joita ei löydy filtteröinnissä olevilta koirilta. Opinnäytetyössäni tutkin ovatko löydetyt variantit sairauden taustalla. Tämän työn tarkoitus on siis selvittää varianttien esiintyvyyttä muissa suvun koirissa molekyyli-genetiikan menetelmillä, ja muodostaa joh-

topäätös, ovatko kyseiset variantit sairauden taustalla. Jos tulokset olisivat olleet lupaavampia, olisi tutkittu kaikkien afgaaninvinttikoirien näytteet, jotka on luovutettu tutkimusryhmän ylläpitämään koirien biopankkiin.

3 Koirien geenitutkimus

3.1 Koira ihmisen sairauksien eläinmallina

Eläinmallit ovat tärkeitä biologian perustutkimuksessa ja prekliinisissä tutkimuksissa, joissa pyritään ymmärtämään sairauden patofysiologiaa, löytämään hoitoja ja arvioimaan niiden tehokkuutta ja turvallisuutta ennen ihmiskokeita. Tällä hetkellä ihmisen sairauksien lääketieteellisissä tutkimuksissa käytetään eläinmalleina muun muassa hiiriä, koiria ja sikoja. Näitä kaikkia on käytetty myös ihmisen hemofilian tutkimuksessa sekä hemofilian hoitojen kehityksessä. Koirien hemofilia A ja B ovat hyvin samankaltaisia kuin ihmisen vastaavat sairaudet. Tämän ansiosta koiramalleista on ollut paljon apua hoitojen testaamisessa ja edelleen kehittämisessä. (Ching-Tzu ym. 2016.) Hemofilia A:ta luonnostaan sairastavia koiria on hyödynnetty jo useiden vuosien ajan tutkittaessa geeniterapian turvallisuutta ja tehokkuutta hoitomuotona (Callan ym. 2016; Connelly ym. 1996). Ensimmäinen *in vivo* hemofilia A:n geeniterapiatutkimus (Connelly ym.) tehtiin koiralle ja se julkaistiin jo vuonna 1996.

Koirilla on monia piirteitä, jotka tekevät niistä erityisen arvokkaita malleja ihmisen harvinaissairauksille. Koirilla on satoja luonnostaan esiintyviä perinnöllisiä sairauksia, joille löytyy läheinen vastine ihmisen sairauksista, kuten esimerkiksi epilepsia, jotkut syövät, silmäsairaudet ja autoimmuunisairaudet. Ainutlaatuinen populaatiohistoria, jalostus ja rotujen sisäinen vähäinen perinnöllinen vaihtelu ovat johtaneet siihen, että tietyt harvinaissairaudet ovat yleistyneet roduissa (Lindblad-Toh ym. 2005). Ihmistutkimuksissa näiden sairauksien periytymismallien tunnistaminen voi olla haastavaa, ja koiratutkimus on erinomainen apuväline ihmisen harvinaissairauksien ja kehityshäiriöiden ymmärtämisessä. (Hytönen – Lohi 2016.)

Suurena eläimenä karvaiset koirat tarjoavat fysiologisesti ja kliinisesti todenmukaisemman mallin ihmisen sairauksille verrattuna esimerkiksi hiireen. Se on pitkäikäisempi ja

geneettinen samankaltaisuus ihmisen kanssa on noin 95 %. Koirista voidaan saada tutkimusmateriaalia, jollaista on vaikeampi kerätä suurilta määriltä ihmisiä. Soluja, kudoksia ja muita invasiivisia toimenpidettä vaativien materiaalien keräämisessä eläimien käyttäminen on usein ainoa realistinen mahdollisuus. Ihmisten osallistuminen vaivalloisiin tutkimuksiin voisi olla vähäisempää ja siihen liittyisi enemmän byrokratiaa. (Hytönen - Lohi 2016.)

Suosituksen lemmikkieläimen tutkimisessa on omat etunsa kuten se, että koirista on usein saatavilla hyvin kattavia ja tarkkoja sukupuita. Lisäksi koira jakaa ihmisen elinympäristön ja sen vaikutukset. Koirien omistajat ovat mahdollistaneet paljon olemalla aktiivisia toimijoita ja tuomalla koiriaan näyttöön ja täyttämällä käyttäytymistä ja terveystietoja koskevia lomakkeita. Tällä hetkellä tutkimusryhmän ylläpitämässä koirien DNA-pankissa on näytteet noin 60 000 koirasta. Rotujärjestöt ja niiden alaiset rotua harrastavat yhdistykset ovat innokkaita tukemaan koirien geenitutkimusta. Geenitietoa voidaan hyödyntää koirien jalostuksessa kaupallisten geenitestien muodossa ja testaus kuuluu joidenkin rotujen jalostuksen tavoiteohjelmaan. Kaiken kaikkiaan koirien geenitutkimus lisää tietoa erilaisista häiriöistä ja auttaa kehittämään parempia hoitoja niin ihmisten kuin koirienkin perinnöllisiin sairauksiin. (Hytönen - Lohi 2016.)

3.2 Koirien geenitestaus luo terveemmän tulevaisuuden roduille

Koirien geenitutkimuksen avulla saadaan ehdokasgeenejä perinnöllisille sairauksille ja geenivirheen löytäminen mahdollistaa geenitestin kehittämisen kyseisiin sairauksiin. Suomen Kennelliiton Perinnöllisten vikojen ja sairauksien vastustamisohjelma (PEVISA) sisältää ehtoja puhdasrotuisten koirien pentujen rekisteröintiin liittyen ja näihin ehtoihin sisältyy muun muassa terveystutkimuksia. Ehtojen avulla yritetään varmistaa, että rodunjalostuksen pääpaino on aina terveyteen ja luonteeseen liittyvien ongelmien ehkäisyssä ja että rodun geneettinen monimuotoisuus on turvattu (Kennelliitto PEVISA-sääntö 2008: 1). Kennelliitto ry:n rotukohtaisiin erityisehtoihin (2016) kuuluu osalla roduista myös geenitestejä. Geenitestit yhdessä huolellisesti suunniteltujen jalostuksen tavoiteohjelmien kanssa ovat tehokas tapa ennaltaehkäistä tai vähentää perinnöllisten vikojen ja sairauksien leviämistä roduissa.

Geenitestit myös säilyttävät rotujen geneettistä monimuotoisuutta, sillä niiden avulla voidaan käyttää mahdollisimman montaa yksilöä jalostuksessa. Puhtaissa roduissa, joissa geenipooli on hyvin pieni, on tämä erittäin tärkeää rodun kestäväen kehityksen kannalta.

Kasvattajien yleinen tapa reagoida geenitesteihin on olla käyttämättä jalostuksessa muita kuin homotsygootteja villityppi koiria. Kuitenkin esimerkiksi resessiivisissä autosomaalisissa sairauksissa, joissa mutaatio voi olla yleinen rodussa, on tarpeen käyttää myös kantajia jalostustarkoituksiin, jotta rodun geneettinen diversiteetti ei kapene tarpeettoman paljon. Tällöin tulee huomioida, että kumppanilla ei saa olla kyseistä mutaatiota. (Mellersh 2012.)

Kaikki tapaukset eivät ole yhtä yksinkertaisia, kuten esimerkiksi monitekijäisesti periytyvät lonkkaviat, sokeritauti eli diabetes mellitus ja autoimmuunisairaudet. Tulevaisuudessa geenitiedon määrä tulee kasvamaan valtavasti ja yhä uusia geenitestejä tulee kasvattajien käyttöön. Kompleksisen tiedon hyödyntäminen tulee olemaan haastavaa ja vaatii asiantuntijoiden valvontaa ja ohjeistusta. (Wilson – Wade 2012; Mellersh 2012.) Wilson ja Wade (2012) ehdottavat ratkaisuksi kansainvälistä organisaatiota, jonka tehtävä on toimia rotupohjaisen geneettisen analyysin ja tiedonjakamisen keskuksena. Tällainen vastaava organisaatio on jo perustettu lypsykarjan perimän parantamiseksi ja olisi aiheellinen myös koirarotujen terveyden edistämiseksi ja geneettisen monimuotoisuuden säilyttämiseksi. Näin voitaisiin varmistaa, että kallisarvoiset tutkimustulokset tuottaisivat mahdollisimman suuren hyödyn ja että geenitestien väärinkäyttö ei kaventaisi geneettistä monimuotoisuutta rotujen sisällä.

4 Koirien historia

Canis lupus familiaris eli tutummin kesykoira on sudesta kesyyntymisen kautta muodostunut alalaji. Kesyyntymisen arvellaan tapahtuneen noin 11 000 – 32 000 vuotta sitten (Wang ym. 2013; Freedman ym 2014). Arvioiden väliset suuret erot johtuvat siitä, että koirien mutaatiotaajuudesta, eli siitä kuinka usein mutaatioita tapahtuu aikayksikköä kohden, tiedetään varsin vähän. Eri arviot mutaationopeudesta johtavat eri aika-arvioihin koiran kesyyntymisestä. (Larson – Bradley 2014.) Freedman ym. (2014) havaitsivat, että mitkään nykyiset susien kehityslinjat oletetuista kesyyntymisen keskipisteistä ei ole merkittävästi läheisempää sukua koiran kanssa. He nostavatkin koiran alkuperän kysymyksen uudelleen pohdittavaksi.

4.1 Afgaaninvinttikoiria



Kuvio 1. Afgaaninvinttikoiria. Commons.Wikimedia 2011.

Afgaaninvinttikoiria luokitellaan itämaiseksi vinttikoiraksi, tarkemmin sanottuna se on osa keskiaasialaisten vinttikoirien ryhmää. Nimensä mukaisesti rodun kotiseutu on Afganistan ja sen lähialueet: Pakistan, Intia ja Iran. (Suomen afgaanit ry:n Jalostuksen tavoiteohjelma 2006: 6.) Afgaaninvinttikoiria on yksi varhaisimmin erkaantuneista roduista. Afgaaninvinttikoiria sekä toinen keskiaasialainen vinttikoirarotu, Saluki, kuuluvat selkeästi omaan fylogeneettiseen haaraan koirarotujen sukupuussa, joka muodostettiin mikrosatelliittimarkkereiden geneettisen variaation perusteella. (Parker ym. 2004.) Afgaaninvinttikoiria käytettiin alun perin pienten ja keskikokoisten riistaeläinten metsästyksen. Metsästäessä nämä koirat toimivat hyvin itsenäisesti: ne juoksevat saaliin kiinni ja tappavat sen. Nykyisin afgaaninvinttikoiria on suosittu seurakoiria ja näyttelyissä runsaasti edustettu rotu. (Suomen afgaanit ry:n Jalostuksen tavoiteohjelma 2006: 6.)

5 Hemofilia

5.1 Etiologia ja kliininen kuva

Hemofiliat ovat verenvuotosairauksia, jossa potilaalla on joko hyyttymistekijän VIII, IX tai XI vaje tai täydellinen puutos. Hemofiliat jaetaan kolmeen eri ryhmään sen perusteella, mistä hyyttymistekijästä on kyse: hemofilia A:ssa puuttuu tekijä VIII, B:ssä tekijä IX ja C:ssä tekijä XI. Kukin edellä mainittu tekijä on osa sisäistä hyyttymisketjua ja siten tärkeä fysiologiselle hyyttymistapahtumalle. (Lassila – Riikonen – Armstrong 2015: 484.) Ihmisillä tekijän VIII vajetta perinnöllisessä hemofiliassa hoidetaan antamalla ihmisen hyyttymistekijää VIII suonensisäisenä infuusiona. Tämä on sinänsä tehokas hoito, mutta joskus potilaan elimistö kehittää allovesta-aineita eksogeenistä hyyttymistekijää vastaan. (Witmer - Young 2013.)

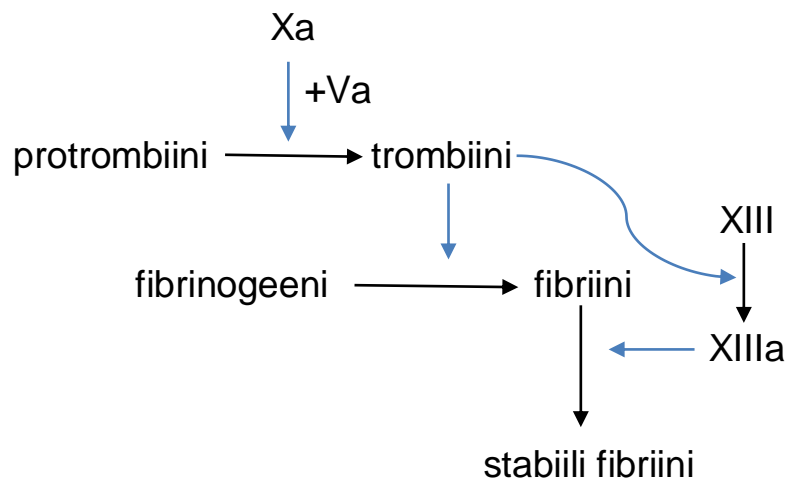
Hemofiliat periytyvät X-kromosomaalisesti, eli kantajamiehet ovat aina sairaita. Arviolta 30 % heterosygooteista kantajanaisista kärsii alentuneesta hyyttymisaktiivisuudesta (alle 40 %), vaikka perheen varsinaisesti sairaalla yksilöllä olisi vain lievä hemofilia A. Näin ollen myös kantajanaisilla on kohonnut riski ylenmääräisille verenvuodoille vakavien traumojen ja invasiivisten toimenpiteiden yhteydessä. (Plug ym. 2000.) Sama pätee myös koirille: kantajien hyyttymisarvot ovat geneettisesti normaalien ja sairaiden yksilöiden välimaastossa (Brooks 1999).

Muut kuin perinnölliset hemofiliat ovat erittäin harvinaisia sairauksia, mutta myös hankinnaisia hemofilioita on kuvattu. Autoimmuunihäiriöstä johtuvassa hemofiliassa potilaan spontaanisti tuottamat autoavasta-aineet johtavat tekijä FVIII:n vajeeseen. Hankinnainen hemofilia A (AHA) eroaa perinnöllisestä siten, että siinä aiemmin normaali hemostaasi häiriintyy muodostuvien vasta-aineiden seurauksena. (Von Depka 2002.) Perinnöllisessä hemofiliassa kliininen kuva on samanlainen syntymästä asti. Myös verenvuodot ovat erilaisia: potilaista, joilla on hankinnainen hemofilia, 87 % kärsii vakavista verenvuodoista (Green – Lechner 1981). AHA potilailla on tyypillisesti suuria ihonalaisia verenvuotoja, jotka ilmenevät spontaanisti tai pienten traumojen jälkeen, kun taas perinnölliselle hemofilialle ominaiset verenkertymät nivelissä ovat harvinaisia (Von Depka 2002). Vain puolet hankinnaisista hemofilioista on osattu yhdistää johonkin aiheuttavaan tekijään ja loput tapauksista on idiopaattisia. Altistaviksi tekijöiksi on todettu muun muassa autoimmuunisairaudet, malignit kasvaimet ja hematologiset muutokset, ihosairaudet

(psoriasis, pemfigus), hengitysteiden sairaudet (astma, keuhkohtauma), allergiset lääkeainereaktiot ja raskaus. (Grethlein – Kessler - Nagalla 2016.) AHA:a hoidetaan immunosuppressiivisilla lääkkeillä (Baudo – Cataldo 2015).

5.2 Hyytymisjärjestelmä

Normaalisti toimivassa kehossa tapahtuva suonivaurio aktivoi verihiutaleita, jotka kiinnittyvät suonen seinämään (adheesio) ja tarttuvat toisiinsa (aggregaatio) ja siten muodostavat hyytymän. Tämän prosessin aikana käynnistyvän hyytymiskaskadin aktivoi kudostekijä eli TF, kun se joutuu kontaktiin veressä olevan tekijän VII kanssa. TF ja FVII muodostavat vaurioalueelle entsyymikompleksin, joka käynnistää sarjan reaktioita, joihin osallistuu joukko veren hyytymistekijöitä. (Chung – Xu – Davie 2013: 110.) TF:n ja VII:n kompleksi katalysoi faktori X:n muuttumista Xa:ksi kahdella tavalla: suoraan tai epäsuorasti aktivoimalla tekijän IX. Riippumatta siitä, kumpaa reittiä FX:n aktivoituminen tapahtuu, on lopputulos sama. (Morrisey – Broze 2013: 163-164)

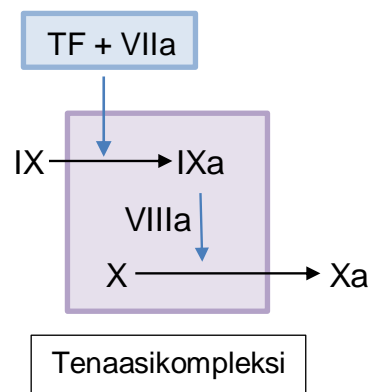


Kuvio 2. Hyytymän muodostuminen. Pieni a-kirjain symboloi hyytymistekijän aktiivista muotoa. (Lassila 2015: 39)

Aktivoitunut tekijä X muuntaa protrombiinin trombiiniksi (kuvio 2). Tekijän Xa lisäksi protrombiinin muuntuminen trombiiniksi vaatii kofaktorin FVa:n, kalsiumin ja fosfolipidien läsnä oloa. (Chung – Xu – Davie 2013: 110; Lassila 2015: 37,39.) Trombiinilla on suuri merkitys hemostaasissa, sillä se aktivoi verihiutaleita, säätelee liuottavaa järjestelmää, stimuloi hyytymistä estäviä tapahtumia sekä muuntaa liukoisen fibrinogeenin liukene mattomaksi fibriiniverkoksi. (Lassila 2015: 31, 38) Fibrinogeenin tehtävä on stabiloida

tukos muuntamalla liukenemattomaksi fibriiniksi. Tarkemmin sanottuna hyytymiskaskadissa trombiini pilkkoo fibrinogeenistä kaksi fibrinopeptidiä, FPA ja FPB, ja näin muodostuu liukoisia fibriinimomomeerejä. Monomeerit muodostavat polymeerejä, jotka haaroittuvat. Fibriinin haaroittuessa, ja trombiinin aktivoiman tekijän XIII:n stabiloidessa säikeet, muodostuu liukenematon hyytymä. (Lassila 2015: 37)

5.3 Tekijä VIII



Kuvio 3. Veren hyytymisjärjestelmän tenaasikompleksi (Lassila 2015: 39)

Tenaasikompleksi muodostuu IXa:sta, VIIIa:sta ja X:stä ja sen seurauksena tekijä X aktivoituu (kuvio 3). Reaktiossa IXa on entsyymi, VIIIa on kofaktori, ja X on substraatti. Plasman hyytymistekijän VIIIa:n tarttuessa tekijään IXa muodostuu kompleksi, joka lohkaisee X:stä palan. Hyytymistekijöiden lisäksi reaktiossa täytyy olla läsnä kalsiumioneja ja fosfolipidejä. Muodostunut Xa katalysoi trombiinin muodostumista. (Kaufman – Fay – Popolo – Ortel 2013: 179.) Tenaasi saa nimensä siitä, että se pilkkoo tekijää X eli kymmenen (engl. *ten*).

FVIII:n kantajamolekyylinä toimiva kofaktori, von Willebrandin tekijä eli VWF, kuljettaa FVIII:n suonivaurion alueelle, missä FVIII:n aktivaatio tapahtuu rajoitetun proteolyysin kautta (Terraube – O'Donnell – Jenkins 2010). VWF myös stabiloi tekijä VIII:aa verenkierrossa ja pitää sen tason riittävänä spontaanien verenvuotojen estämiseksi. Tekijöiden välinen kiinnittyminen perustuu laajoihin vuorovaikutuksiin VWF:n D'D3 domeenin ja FVIII:n kevyen ketjun välillä. (Chiu ym. 2015.) Mutaatiot VWF:n FVIII-sitoutumisalueella johtaa madaltuneeseen affiniteettiin tekijöiden välillä ja siten lieviin/keskivakaviin FVIII puutoksiin (Lillicrap 2013).

Trombiinin katalysoimassa reaktiossa heterodimeerinen FVIII pilkkoutuu kahdeksi alayksiköksi, A1 ja A2. (Regan – Fay 1995.) Trombiini aktivoi siis FVIII:aa, ja näin yhä enemmän protrombiinia aktivoituu trombiiniksi (Pieters – Linhout – Hemker 1989). Tästä seuraa luonnollisesti hyytymisreaktion voimistuminen.

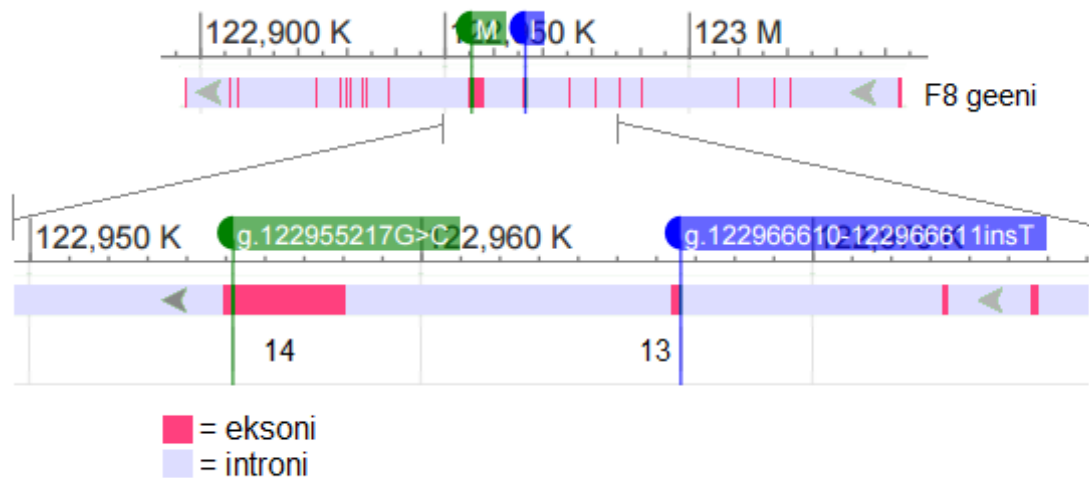
5.4 *F8*-geeni ja mRNA ekspressio

Tekijä VIII:tä koodaava geeni, *F8*, sijaitsee ihmisellä ja koiralla X-kromosomissa. Koiran *F8*-geenissä on 26 eksonia. Koiran *F8* eksonit ja intronit ovat järjestäytyneet hyvin samalla tavalla kuin ihmisen, mutta ihmisellä on kyseisessä geenissä 36 eksonia. Kokonaisuudessaan, NM_000132.3 ja NM_001003212.1 referenssisekvenssien mukaan, koiran ja ihmisen *F8*-geenit ovat 85,3 %:sesti identtisiä.

Pääasiallinen VIII:n syntetisaatiopaikka elimistössä on pitkään ollut kiistanalainen, mutta viimeaikaisissa tutkimuksissa on selvinnyt, että tekijää VIII syntetisoidaan paljon maksassa hiussuonipoukamien endoteelisoluissa (Shahani ym. 2014) sekä endoteelisoluissa ympäri kehoa (Fahs – Hille – Shi – Weiler – Montgomery 2014). Myös muiden kuin endoteelisolujen on havaittu ekspressoivan FVIII:aa: hiirimallissa ihmisen hematopoieettisten CD34+ solujen transplantaatiot saivat plasman tekijän VIII aktiiviteetin nousemaan 5 %:a (Zanolini ym. 2015). Zanolini ym. (2015) raportoivat FVIII:n ekspressiota suurimmassa osassa myeloidisen linjan soluja: monosyytit, makrofagit, megakaryosyytit ja dendriittisolut ekspressoivat FVIII:aa sekä mRNA:na että proteiininä. Aikaisemmat maksatransplantaatiokokeet FVIII-vajeisilla koirilla ja hemofilia A:ta sairastavilla ihmisillä tukevat myös väitteitä, että FVIII:aa syntetisoi pääasiassa maksassa ja retikuloendoteeliaalijärjestelmässä (Kaufman ym. 2013: 182).

Koirilta tunnetaan *F8*-geenistä paljon erilaisia mutaatioita, jotka aiheuttavat hemofilia A:ta. Chapel Hillin ylläpidetystä hemofilia A:ta sairastavien koirien linjasta tunnistettiin ihmisellä yleistä *F8*-geenin mutaatiota muistuttava inversio (Lozier ym. 2002). Vuonna 2016 (Lozier ym.) löydettiin vanhaenglanninlammaskoiralta eksonista 12 pistemutaatiosta seurannut ennenaikainen stop kodoni, joka aiheutti vakavan hemofilia A:n kyseiselle urokselle. Bokserilta on löydetty eksonista 10 hemofilia A:n aiheuttava pistemutaatio (Christopherson – Bacek – King – Boudreaux 2014). Pistemutaation seurauksena A2 domeenin aminohappo 471 vaihtui arginiinista proliiniin. Samassa julkaisussa raportoitiin myös toinen koirilla hemofiliaa aiheuttava missensemutaatio: hemofilia A diagnoosin saaneelta saksanpaimenkoiralta löytyi G>A pistemutaatio eksonista 11, joka aiheutti

aminohapon vaihtumisen tyrosiinistä kysteiniin positiossa 548 (Christopherson – Bacek – King – Boudreaux 2014).



Kuvio 4. Can.Fam3.1 referenssisekvenssin (Lindblad-Toh ym. 2005) eksonikartta koiran *F8*-geenistä. Merkitty eksonit 14 ja 13 sekä tutkittavat mutaatiokohdat.

Opinnäytetyössä tutkittavat mutaatiot g.122955217G>C ja g.122966610-11insT sijaitsevat *F8:n* eksoneissa 14 ja 13 (kuvio 4). Ensin mainitussa pistemutaatiossa G:n vaihtuminen C:ksi aiheuttaa aminohappotasolla glysiinin vaihtumisen alaniiniksi (taulukko 1). Insertiomutaatio sijaitsee eksonin 13 silmukointi alueella, mutta ei kuulu proteiinia koodaavaan sekvenssiin. Silmukointialueella sijaitsevat mutaatiot eivät yhtä todennäköisesti vaikuta tuotteen toimintaan, mutta voivat johtaa virheelliseen RNA:n silmukointiin ja siten puutteellisesti toimivaan tuotteeseen tai tuotteen täydelliseen puutokseen (Kivirikko 2006: 67; Griffiths – Miller – Suzuki – Lewontin – Gelbart 2000: 467)

Taulukko 1. Emäsekvenssin ja aminohappojärjestyksen muutos g.122955217G>C pistemutaatiossa

	Villityyppi	Pistemutaatio
Emäsjärjestys	... CCT GGA AGG...	... CCT GCA AGG...
Aminohappojärjestys	... PRO GLY THR...	... PRO ALA THR...

6 Aineisto ja menetelmät

Tutkimusaineistoa rajattaessa tulee varmistaa, että valitut yksilöt edustaisivat tutkittavaa populaatiota, tässä tutkimuksessa siis afgaaninvinttikoiria, ja sen alleelifrekvenssiä tasa-puolisesti. Tämä on toimiva tutkimusasetelma tutkittaessa populaatiossa yleisesti esiin-tyvää polymorfismia, jonka uskotaan selittävän tutkittavan sairauden tai muun piirteen. Kuitenkin tutkittaessa harvinaisempia sairauksia, kuten hemofiliaa, käytetään yleensä sukupohjaista lähestymistapaa. (Zondervan – Cardon 2007.) Tässä opinnäytetyössä tutkittiin kahden potentiaalisesti hemofiliaa aiheuttavan mutaation esiintymistä sairaan koi-ran suvussa (kts. liite 1 ja 2). Tutkimusaineistona olivat suomalaiset puhdasrotuiset af-gaaninvinttikoirat, joista omistaja oli luovuttanut EDTA-verinäytteet koirien DNA-pank-kiin.

Sairaalta yksilöltä oli otettu hyytymistutkimukset ennen lopettamista (kts. liite 3). Protrom-biiniaika oli 9 sekuntia (viitearvo <8,8 s) ja APTT tulos oli vielä selkeämmin koholla: hui-mat 25,8 sekuntia viitearvon ollessa 13,5 sekuntia. APTT mittaa hyytymistekijöiden XII, XI, IX, VIII, X, V, II ja I yhteisvaikutusta (HUSLAB 2017). Trombiiniaika oli normaalin rajoissa, joten hyytymistutkimusten tuloksiin vaikuttavat trombiini-inhibiittorit ja hepariini voidaan katsoa poissuljetuiksi (HUSLAB 2016). D-dimeerin konsentraatio plasmassa oli hiukan koholla, mikä luultavasti johtuu suurista verenvuodoista. D-dimeeri on fibriinin ha-joamistuote, jota vapautuu verenkiertoon verihyytymän liuetessa. (Eskelinen 2016.) Koi-ran FVIII-aktiivisuus oli erittäin matala, vain 3 %. FXI:n ja VWF:n aktiivisuudet olivat nor-maalin rajoissa.

Tässä työssä testattiin g.122955217G>C mutaation suhteen yhteensä 25:n koiran näyt-teet. Toisessa tutkittavassa mutaatioissa g.122966610-122966611insT sekvensoitiin vä-hemmän näytteitä: sairaan koiran lisäksi tutkittiin 17 näytettä. Validointiin mukaan otetut mutaatiot oli valittu sairaan koiran eksomisekvensointiaineiston analysoinnin perusteella. Insertiomutaatio ei kestänyt filttä, mutta se tutkittiin silti. Jos tulokset olisivat olleet lupaavia, olisi enemmänkin afgaaninvinttikoirien näytteitä sekvensoitu, mutta tämä otos riitti todistamaan, että nämä variantit eivät yksinään aiheuta hemofilia A:ta.

6.1 DNA:n eristys verestä

Useimmissa genetiikan menetelmissä, DNA:n täytyy olla eristettynä solumateriaalista ja muista mahdollisista kontaminanteista. DNA:ta voidaan eristää suuresta joukosta eri näytemateriaaleja, esimerkiksi eri kudoksista, syljen poskisolusta tai veren valkosoluista. Tässä työssä käytetyt näytteet on eristetty EDTA-verinäytteistä. EDTA-putkissa oli verta 1-3 ml.



Kuvio 5. Chemagic Magnetic Separation Module I (MSM I)

Eistäminen suoritettiin Chemagic Magnetic Separation Module I (MSM I) -laitteella, joka on puoliautomaattinen DNA:n ja RNA:n eristysrobotti (PerkinElmer Chemagen Technologie GmbH, Baeswieler, Saksa). Laite erottaa DNA:n näytteen muusta materiaalista magneettihelmien ja metallisauvojen avulla. DNA sitoutuu halkaisijaltaan 1,5 µm kokoi- siin magneettihelmiin, jotka koostuvat nanoluokan kokoisista magneettipartikkeleista ja PVA (polyvinyyli alkoholi) väliaineesta. Sekoittajasauvojen sisällä olevien metallisauvo- jen magnetisointi saa magneettihelmet ja niihin sitoutuneen DNA:n sitoutumaan sauvoi- hin. Kun sähkömagneetti kytketään pois päältä, helmet vapautuvat uuteen liuokseen. Menetelmässä ei siis siirretä nestettä seuraaviin vaiheisiin vaan ainoastaan magneetti-

helmipelletti, joka muodostuu sauvan päähän. (PerkinElmer 2017: 4-5, 7.) Joskus lopullisessa DNA eluaatissa on magneettihelmijäämiä. Kyseiset partikkelit eivät häiritse PCR:ssä tai useimmissa muissa jatkoreaktioissa, mutta voivat lisätä tausta-absorbanssia UV mittauksissa. (PerkinElmer 2013.)

6.2 Konsentraation ja puhtauden mittaaminen



Kuvio 6. Nanodrop spektrofotometri

Eristettyjen näytteiden konsentraatiot ja puhtaus mitattiin NanoDrop™ 1000 spektrofotometrillä, jolla voidaan mitata proteiineja ja nukleiinihappoja (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, Yhdysvallat). Laite mittaa absorbanssin näytepisarasta, jonka tilavuus on vain 1 μ l. (Thermo Fischer 2008: 1-1.) Mittaukseen vaadittava pieni näytemäärä on erittäin hyödyllinen siksi, että mitattu materiaali heitetään pois mittauksen jälkeen. Mittausta on hyvin vaikea suorittaa steriilisti, eikä näytettä yleensä enää kerätä takaisin käyttöä varten. (Suominen – Ollikka 2004: 67.)

Näyte pipetoidaan optisen valokuidun päälle. Tämä toimii vastaanottavana valokuitukaapelina. Näytteen päälle lasketaan toinen kaapeli, joka taas on valon lähde. Kaapelit ovat

kumpikin kontaktissa näytteen kanssa ja niiden välille muodostuu nestesilta pintajännitteen ansiosta. Spektrofotometinen mittaus käynnistetään tietokoneella olevasta ohjelmasta. Jokaisen näytteen välissä pyyhitään pisara pois käyttäen pehmeää liinaa. (Thermo Fischer 2008: 1-1, 3-2.)

Kaksijuosteisen DNA-liuoksen absorptio 260 nm:ssä on 1,0 ja kokeellisesti on osoitettu, että tämä vastaa dsDNA-konsentraatiota 50 µg/ml (Suominen - Pärssinen – Pelkonen 2013: 110). Ohjelma laskee mitatusta absorbanssista Lambert-Beerin lain avulla näytteen konsentraation. Lambert-Beerin lain mukaan

$c=(A \cdot e)/b$, jossa c =konsentraatio (ng/µl), A =absorbanssi (AU), e =molaarinen absorptiokerroin, b =näytteen paksuus. (Thermo Fischer 2008: 19-2.)

Puhtauden kuvaamiseen käytetään suhdelukuja A_{260}/A_{280} ja A_{260}/A_{230} . Proteiinit absorboivat voimakkaimmin 280 nm aallonpituudella, mutta myös DNA absorboi jonkun verran 280 nm:ssä. Puhtaalle DNA:lle suhdeluku $A_{260}/A_{280} = 1,8$. Jos DNA-liuoksen A_{260}/A_{280} luku on alentunut, näytteessä on todennäköisesti proteiini-, fenoli- tai jokin muu kontaminaatio. (Suominen ym. 2013: 110-111; Thermo Fischer 2008: 5-2 – 5-3.) A_{260}/A_{230} suhdeluku on sekundaarinen mittausmenetelmä DNA:n puhtaudelle. Odotetut arvot puhtaalle DNA:lle ovat väliltä 1,8-2,2. Jos liuoksen A_{260}/A_{230} luku on tuntuvasti odotettua alempi, on näytteessä kontaminaatio, joka absorboi aallonpituudella 230 nm. (Thermo Fischer 2008: 5-3)

6.3 DNA:n monistus polymeerasiketjureaktiolla

Polymeerasiketjureaktiolla engl. *PCR Polymerase Chain Reaction* monistetaan DNA:ta, joka sijaitsee kahden tunnetun DNA-jakson välissä. Monistettavan alueen rajaavat alukkeet, jotka suunnitellaan kahden eri tunnetun DNA-jakson nukleotidijärjestyksen mukaisiksi. Reaktio perustuu lämpöä kestävään DNA-polymeeraasiin ja monta kertaa peräkkäin toistettavaan kahdentumisreaktioon. (Suominen ym. 2013: 153) PCR-syklin tuotteena syntyy kaksinkertainen määrä DNA-nauhaa alkuperäiseen määrään nähden. (Suominen ym. 2013: 154) PCR reaktion avulla tulisi monistaa tavallisia metodeja käytettäessä vain maksimissaan 3 kb (3000 emäsparin) pituisia DNA fragmentteja. Sitä pidempiäkin, jopa 10 kb kokoisia on mahdollista monistaa PCR menetelmällä. Tällöin tulokset eivät välttämättä ole yhtä johdonmukaisia ja monistuksen tehokkuus laskee. (Brown 2006: 184.)

6.4 Alukkeiden suunnittelu

PCR:n onnistuminen on kiinni hyvin suunnitelluista ja toimivista alukkeista. Alukkeiden valinnassa tulee huomioida monia seikkoja ja siksi niiden suunnittelutyötä helpottamaan on kehitetty erilaisia ohjelmia. Suunnitteluohjelmat mm. etsivät tunnetusta sekvenssistä sopivia sitoutumiskohtia alukkeille, laskevat niiden sulamislämpötilan (eli T_m) ja taipumuksen muodostaa hiusneuladimeerejä. Jos alukkeet eivät ole tarkoin suunniteltuja, on mahdollista, että ei synny lainkaan tuotetta tai syntyvä tuote ei ole spesifinen tai se on väärästä kohdasta DNA:ta. (Suominen ym. 2013: 158; Brown 2006: 184.)

Alukkeiden emäsjärjestyksien tulee olla komplementtaarisia monistettavaa sekvenssiä reunustavien alueiden kanssa. Alukkeiden 3' päiden tulee olla toisiaan kohti, kun ne hybridisoituvat kiinni monistettavan DNA pätkän eri puolille. Emäsjärjestyksestä miettiessä on kiinnitettävä huomiota myös alukkeen pituuteen. Lyhyet alukkeet voivat sitoutua useampaan kohtaan genomissa ja tuottaa epäspesifejä tuotteita. Liian pitkät alukkeet eivät myöskään ole optimaalisia, sillä alukkeen pituus vaikuttaa reaktion lopputuotteen määrään heikentävästi. Tämä johtuu siitä, että liian pitkät alukkeet eivät ehdi sitoutua syklien aikana. Käytännössä yli 30 emäksen pituisia alukkeita ei käytetä lähes koskaan. (Brown 2006: 184-185)

Sopivaa pituutta pohtiessa voi miettiä kuinka todennäköistä on, että sattumanvaraisessa nukleotidijärjestyksessä on juuri kyseinen sekvenssi. Tämä voidaan laskea korottamalla 4 potenssiin alukkeen emäksien lukumäärällä. Esimerkiksi jos käytetään aluketta, joka muodostuu 9 emäksestä, voidaan sen odottaa tulevan vastaan kerran $4^9 = 262\,144$ emäsparin välein. Tämä kuulostaa epätodennäköiseltä, mutta kun otetaan huomioon, että koiran koko genomissa on 2,38 Gb emäspareja (Lindblad-Toh ym. 2005) on selvää, että aluke ei ole tarpeeksi pitkä. 2 380 000 000 emäksen joukosta yhdeksän emäksen pituisen alukkeen voi odottaa löytävän noin 9000 sitoutumispaikkaa. Alukkeen minimi pituutena voidaan pitää esimerkiksi 17 emästä. Tuolloin alukkeen sattumanvarainen löytyminen tapahtuisi todennäköisyyslaskennan mukaan $4^{17} = 17\,179\,869\,184$ emäksen välein, mikä on noin 7,2 kertaa koiran koko genomien pituinen. (Brown 2006: 184-185.)

Alukkeen nukleotidijärjestys määrää sen liittymisvaiheen eli annealing-lämpötilan. Jos lämpötila on liian korkea ei alukkeen sitoutumista juosteeseen tapahdu. Lämpötila vaikuttaa myös liittymisen spesifisyyteen. Jos lämpötila on liian matala, syntyy mismatch-hybridejä. Toisin sanoen aluke sitoutuu templaatissa kohtaan joka ei ole täydellisen

komplementaarinen sen emäsjärjestyksen kanssa. Ideaalinen annealing-vaiheen lämpötila on tarpeeksi korkea estääkseen epäspesifin sitoutumisen, mutta riittävän matala, jotta sitoutumista voi tapahtua. (Brown 2006: 184-185)

Alukeparin sulamislämpötilalla tarkoitetaan sitä lämpötilaa, jossa puolet alukkeista ovat kiinnittyneinä templaatteihin ja puolet ovat irrallaan liuoksessa. Alukepari olisi pystyttävä suunnittelemaan siten, että niiden T_m :t poikkeavat toisistaan enintään 2 °C, muutoin niiden sitoutuminen ei onnistu yhtä hyvin annealing-vaiheessa eli alukkeiden kiinnitysvaiheessa. (Suominen ym. 2013: 159.) T_m :n voi määrittää kokeellisesti tai laskea kaavan avulla. $T_m = (4 \times [G+C]) + (2 \times [A+T])$ °C, jossa $[G+C]$ on G ja C nukleotidien lukumäärä ja $[A+T]$ on vastaavasti A ja T nukleotidien lukumäärä alukkeessa. (Brown 2006: 187.)

6.4.1 Suunnitteluohjelmat

Käytin alukkeiden suunnitteluun Primer3web online-ohjelmaa (<http://primer3.ut.ee>) ja hain kohdealueen genomisen sekvenssin UCSC-tietokannasta (University of California Santa Cruz). Kun kohdealueen sekvenssi on haettu tietokannasta, se syötetään Primer3Web ohjelmaan. Ohjelma toimii siten, että kopioidaan n. 30 riviä sekvenssiä ja merkitään hakasulkeilla vähintään 30 emäksen jakso, joka sisältää mielenkiinnon kohteena olevan emäsjärjestyksen. Optimaalinen monistettavaksi valittava alue on muutama sata emästä. Liian lyhyt emäsjakso on ongelmallinen, koska sekvenssin laatu on yleensä heikkoa sekvenssin alussa ja lopussa. Luotettavin tulos saadaan, kun haluttu kohde on keskellä muutaman sadan emäksen pituisessa sekvenssissä.

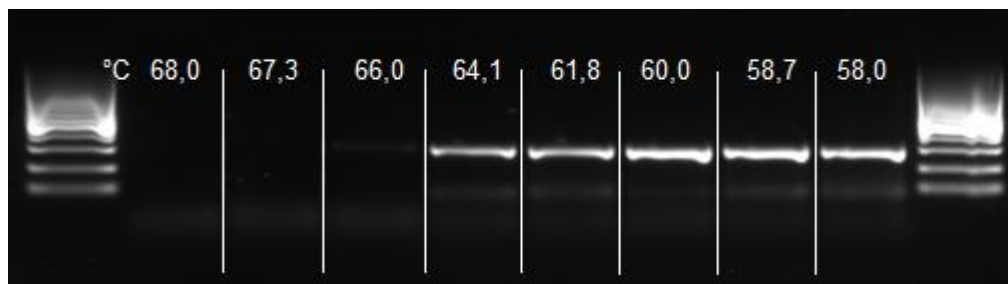
Kun painaa "Pick primers" ohjelma hakee tämän alueen edeltä ja jäljestä optimaaliset sekvenssit alukkeille. Tämän jälkeen tarkistetaan UCSC:stä, että alukkeet ovat spesifejä. Tähän on kätevä työkalu nimeltä "In silico -PCR", johon alukkeiden sekvenssit syötetään. Pudotusvalikosta valittiin koiran genomi ja Dec. 2013 genomien kasaus. Painamalla "submit" ohjelma etsii mahdolliset sitoutumispaikat valitusta genomista. Suunnittelemani alukkeilla (taulukko 2.) ei ollut tämän ohjelman mukaan epäspesifejä sitoutumispaikkoja.

Taulukko 2. Alukkeiden tiedot

Alukkeen nimi	Tutkittava mutaatio	Alukesekvenssit	Tuotteen pituus
F8_hemof	g.122955217G>C	5'-AAGACACCATTTTGCCCCTG-3'	277 bp
		5'-CGGCGACTATGAAAATCAGGG-3'	
F8_hfins	g.122966610-11insT	5'-CTTGGGAATAAGGTAATGGGCA-3'	396 bp
		5'-TGCCACTCTCTCCTGTTCTC-3'	

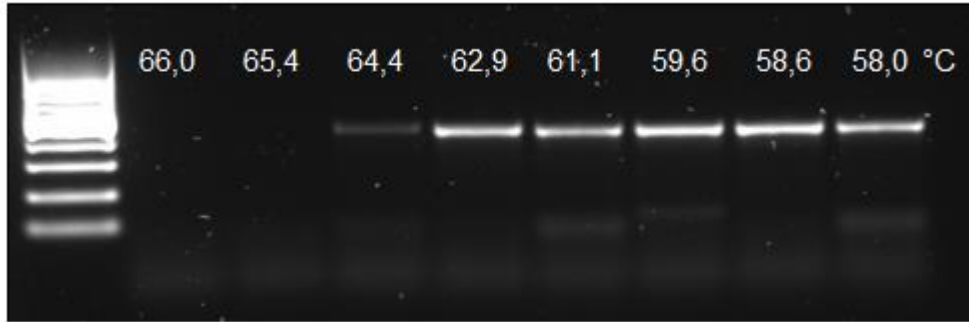
6.5 PCR ja agarosigeelielektroforeesi

Alukkeilla tehtiin ensin gradientti PCR, jossa testattiin erilaisia alukkeiden kiinnittymislämpötiloja optimaalisten PCR-reaktio-olosuhteiden löytämiseksi. Suunnitteluohjelmien laskemat lämpötilat ovat suuntaa antavia ja eivät välttämättä toimi todellisessa reaktiossa. Gradientti tehdään kuten tavallinen PCR reaktio, mutta siinä käytetään ohjelmaa, jossa jokaiselle kuopalle on asetettu oma alukkeiden kiinnittymislämpötila. Kussakin kuopassa käytettiin saman koiran DNA näytettä, jotta tuloksia voidaan vertailla keskenään.



Kuvio 7. F8_hemof -alukkeilla tehdyn gradientti-PCR:n tulokset geelielektroforeesi kuvassa. Geelikaivojen yläpuolelle on merkitty kyseisessä PCR-reaktiossa käytetty alukkeiden kiinnittymislämpötila. PCR-tuotteiden ulkoreunalle on pipetoitu markkeri (100 bp ladder), jotta syntyneiden PCR-tuotteiden kokoa voidaan arvioida.

F8_hemof alukkeiden gradientin geelikuvasta (kuvio 7) huomataan, että vahvin bändi on muodostunut reaktiossa, jossa alukkeiden kiinnittyminen tapahtui 60,0 °C lämpötilassa. Muodostuneen tuotteen koko on hiukan alle 300 bp. Tässä lämpötilassa näkyy myös 100 bp:n kohdalla heikoiten ylimääräinen raita, jonka alkuperä on epäselvä. Kyseessä voi olla jokin alukkeen muodostama epäspesifi tuote tai alukkeiden sitoutuminen toisiinsa. Gradientin perusteella käytettiin PCR reaktioissa (taulukko 3) kiinnittymislämpötilaa 60 °C.



Kuvio 8. F8_hfins -alukkeilla tehdyn gradientti-PCR:n tulokset geielektroforeesi kuvassa. Geelikaivojen yläpuolelle on merkitty kyseisessä PCR-reaktiossa käytetty alukkeiden kiinnittymislämpötila. PCR-tuotteiden ulkoreunalle on pipetoitu markkeri (100 bp ladder), jotta syntyneiden PCR-tuotteiden kokoa voidaan arvioida.

F8_hfins -alukkeilla tehdystä gradientti-PCR:stä (kuvio 8) muodostuneen tuotteen koko on noin 400-500 emästä. Gradientin perusteella käytettiin annealing lämpötilana 59 °C (taulukko 3). Tässä lämpötilassa on selkeästi syntynyt tuotetta ja on vähiten ylimääräisiä tuotteita. Koska tuote on suurempi kuin F8-hemof alukeparilla annetaan tuotteen pidentyä kauemmin (50 s) PCR:ssä (taulukko 3).

Taulukko 3. Käytetyt PCR ohjelmat

F8_hemof -alukepari	vaihe		lämpötila (°C)	aika
	alkudenaturaatio		95	5:00
35 x	→	denaturaatio	95	0:30
		alukkeiden kiinnittyminen	60	0:30
		pidentyminen	72	0:45
loppupidentyminen		72	10:00	
pito		4	∞	

F8_hfins -alukepari	vaihe		lämpötila (°C)	aika
	alkudenaturaatio		95	5:00
35 x	→	denaturaatio	95	0:30
		alukkeiden kiinnittyminen	59	0:30
		pidentyminen	72	0:50
loppupidentyminen		72	10:00	
pito		4	∞	

PCR:ssä käytettiin BIO-RAD:in T100™ Thermal Cycler -laitetta. Käytetyt PCR ohjelmat on kuvattu taulukossa 3. Ennen tuotteiden käsittelyä sekvensointia varten varmennettiin PCR:n onnistuminen agarosigeelielektroforeesilla. Valmistetut geelit olivat 1% agarosigeelejä, joihin lisättiin GelRed väriainetta.

Jos geelikuvassa oli kaikki kunnossa, tehtiin näytteille Exo-SAP käsittely, ja näytteet toimitettiin sekvensoitavaksi FIMM:ille (Institute for Molecular Medicine Finland). ExoSAP-IT® on entsyymattinen käsittely, jonka avulla eliminoidaan irralliset alukkeet ja dNTP:t, jotta ne eivät häiritse jatkoreaktioissa. Reaktioon lisätään kahden entsyymin seosta. Eksonukleaasi I ja SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) degradoivat ylijääneet alukkeet ja dNTP:t. (Bell 2008.) Pistemutaatio eksonissa 14 sekvensoitiin käyttämällä etualuketta (englanniksi *forward primer*). Insertioalue sekvensoitiin kumpaankin suuntaan.

6.5.1 Automatisoitu Sanger sekvensointi

Sekvensointi tarkoittaa menetelmää, jolla selvitetään DNA:n tarkka nukleotidijärjestys. Sekvensointiin on kehitetty useita eri menetelmiä, jotka perustuvat eripituisten DNA-fragmenttien muodostumiseen. Näistä nykypäivänä eniten käytetty on Sangerin menetelmä, koska siinä ei tarvitse käyttää toksisia reagensseja, ja koska sen automatisointi on suhteellisen helppoa. (Brown 2006: 207)

Aluke toimii vastinjuosteen synteessin aloituskohtana. (Brown 2006: 207-206) Automatisoidussa Sanger-sekvensoinnissa dideoksinukleotidit leimataan eri fluorokromeilla. Reaktioseoksessa on myös normaaleja deoksinukleotideja, ja jokaisen emäksen korvautuminen fluoresoivalla nukleotidilla on yhtä todennäköistä. Näin ollen dideoksinukleotidit, jotka pysäyttävät DNA-ketjun synteessin, sitoutuvat sattumanvaraisesti syntyvään juosteeseen ja lopputuloksena on eripituisia polynukleotidijuosteita, joiden 3'-päässä on fluoresoiva dideoksinukleotidi. Kapillaarielektroforeesin avulla juosteet erotellaan kokonsa perusteella. Detektori tunnistaa sen ohittavien polynukleotidien emittoivan fluoresenssi-signaalin ja syöttää datan tietokoneelle, joka muuttaa signaalin vastaavaksi nukleotidiksi. (Brown 2006: 212-213.)

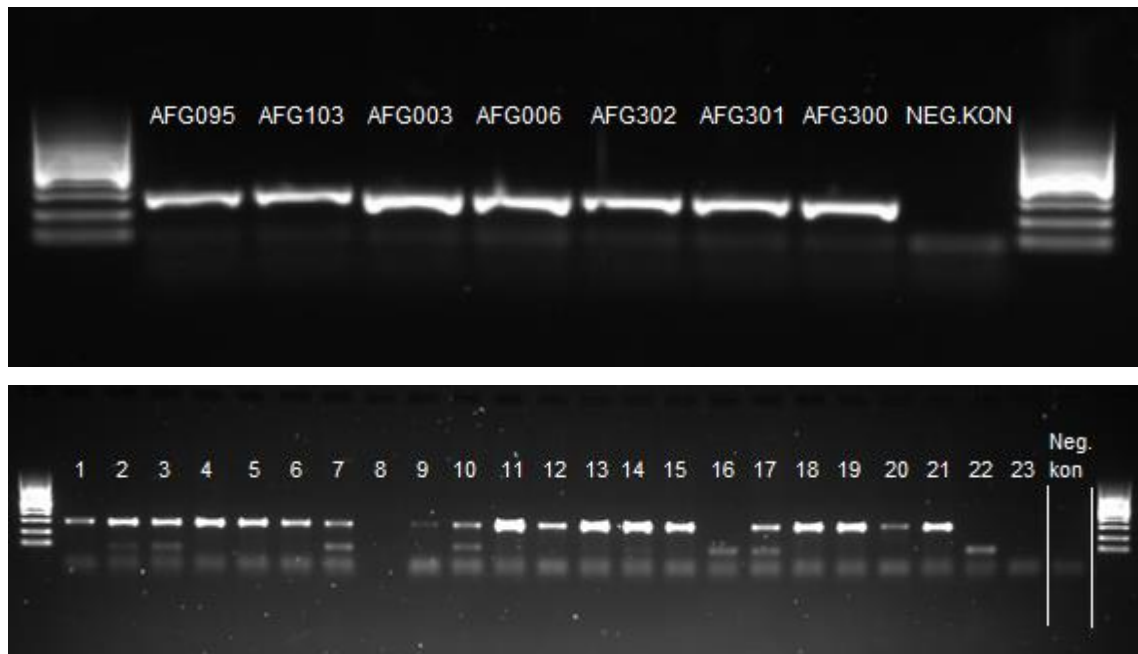
6.6 DNA-sekvenssien analysointi ja tilastollinen analyysi

Sekvensoinnin tulokset analysoitiin Sequencher -ohjelmalla, jolla voi tarkastella sekvenssejä. Insertiomutaation tuloksia tulkittaessa jouduttiin miettimään, miten heterotsygootit genotyypit voidaan tunnistaa. Sequencher tulkitse kaikki naaraat villityyppi homotsygooteiksi insertion suhteen. Tämä tulos herätti epäilyksiä, sillä se olisi epätodennäköistä ja osa Sequencherin antamien tulosten mukaisista genotyypeistä ei ollut mahdollisia mendelistisen periytymisen mallin puitteissa. Koska sekvenssi oli hyvin monimutkaista luettavaa sellaisenaan, käsiteltiin kromatogrammeja siten, että niistä poistettiin näkyvistä kaikki muut paitsi yksi emäs. Kaikkein selkeimmin erot heterotsygoottien ja homotsygoottien välillä saatiin näkyviin katsomalla C-emäksen signaalipiikkejä (kuvio 11). Villin tyypin kromatogrammi näyttää C-emäksen suhteen samalta kuin insertiomutaation omaavan uroksen kromatogrammit, koska näissä genotyypeissä ei synny vastinkromosomien pituuseron aiheuttamaa epärytmittymistä. Tällä menetelmällä ei voitu erottaa näitä kahta genotyyppiä toisistaan, vaan insertion omaavat hemitsygootit yksilöt erotettiin villistä tyypistä laskemalla T-emästen lukumäärä (kuvio 12).

Tuloksia käsiteltiin Microsoftin Excelillä ja SPSS:llä. Koska otoskoko on opinnäytetyössä varsin pieni ja kohteet dikotomisia muuttujien suhteen, käytän tilastollisen merkitsevyyden arvioimiseen Fischerin tarkkaa testiä. Fisherin testiä käytetään yleisesti silloin kun yhdessä tai useammassa solussa on arvo nolla tai kun yli 25 % soluista on arvoltaan vähemmän kuin 5. Aminohappoa vaihtavan mutaation tuloksien käsittelyssä olen yhdistänyt yhdeksi joukoksi alleelin C suhteen hemitsygootit yksilöt ja toiseksi joukoksi kaikki ylijäävät genotyypit (taulukko 5). Insertiomutaation tuloksien käsittelyssä villit tyypit ja heterotsygootit on yhdistetty yhdeksi joukoksi ja insertiomutaation suhteen hemitsygootit yksilöt toiseksi (taulukko 6). Jaot perustuvat oletukseen, että sairastuakseen yksilön tulee olla homo- tai hemitsygootti mutaation suhteen.

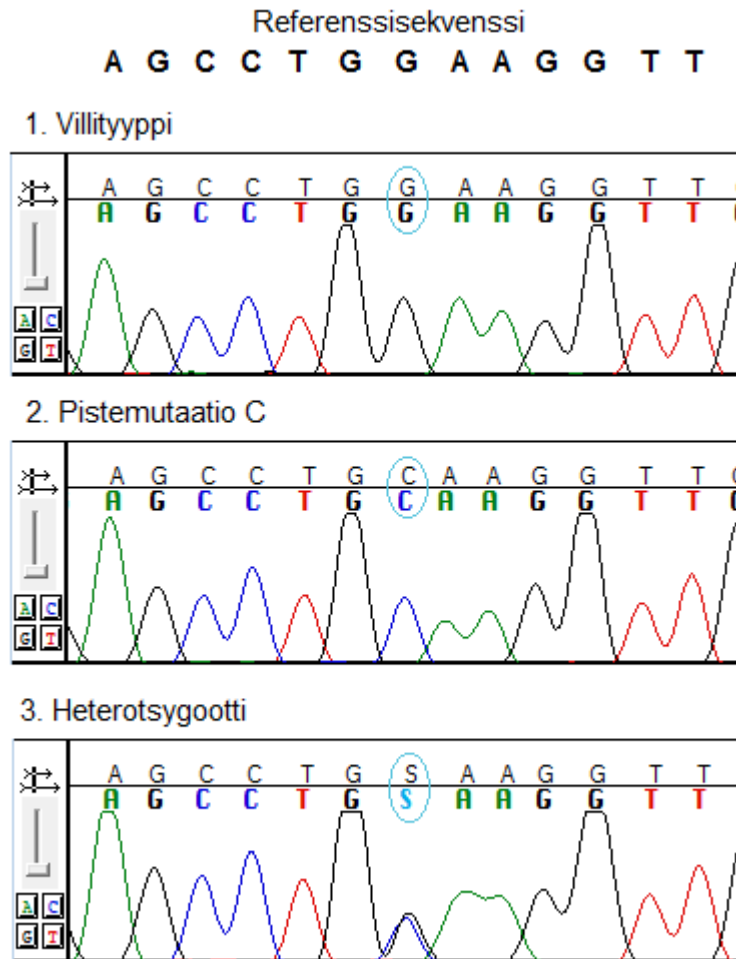
7 Tulokset

7.1 Missense mutaation tulokset



Kuvio 9. PCR tuotteiden geelikuvat, Generuler 100 bp markkeri. Näytteet numeroitu paikan mukaan alemmassa kuvassa. Ylemmässä kuvassa tunnisteena näyte ID.

Geelikuvista (kuvio 9) näkee, että suurin osa näytteistä on monistunut PCR:ssä ja on syntynyt tuotetta, joka on suurin piirtein 300 emäsparin pituista. Vesikontrollit ovat puhtaita, eli reagensseissa ei ole kontaminaatiota. Osassa näytteitä (paikat 2, 3, 7, 10, 14, 16, 17, 22) nähdään ylimääräinen alkuperältään tuntematon bändi, joka on noin 100 emäsparin pituinen. Ylimääräinen tuote ei häirinnyt sekvensointia. Muutama näyte ei monistunut odotetulla tavalla, mutta näytteet sekvensoitiin siitä huolimatta. Näytteessä kahdeksan ei näy minkäänlaista bändiä, mikä viittaisi näytteen haihtuneen PCR:n aikana tai muuten toimimattomaan PCR-reaktioon. Näyte haihtuu helposti, jos levyn kansitarra ei ole kiinnittynyt kunnolla. Näytteessä numero 9 on muodostunut vain haalea tuote, mikä johtuu mahdollisesti heikkolaatuisesta näytteestä tai haihtumisesta. Kaksi viimeisintä näytettä on epäonnistunut luultavimmin, koska niissä näytteen DNA-konsentraatiot olivat hyvin matalia ja mitatut puhtausasteet huonoja.

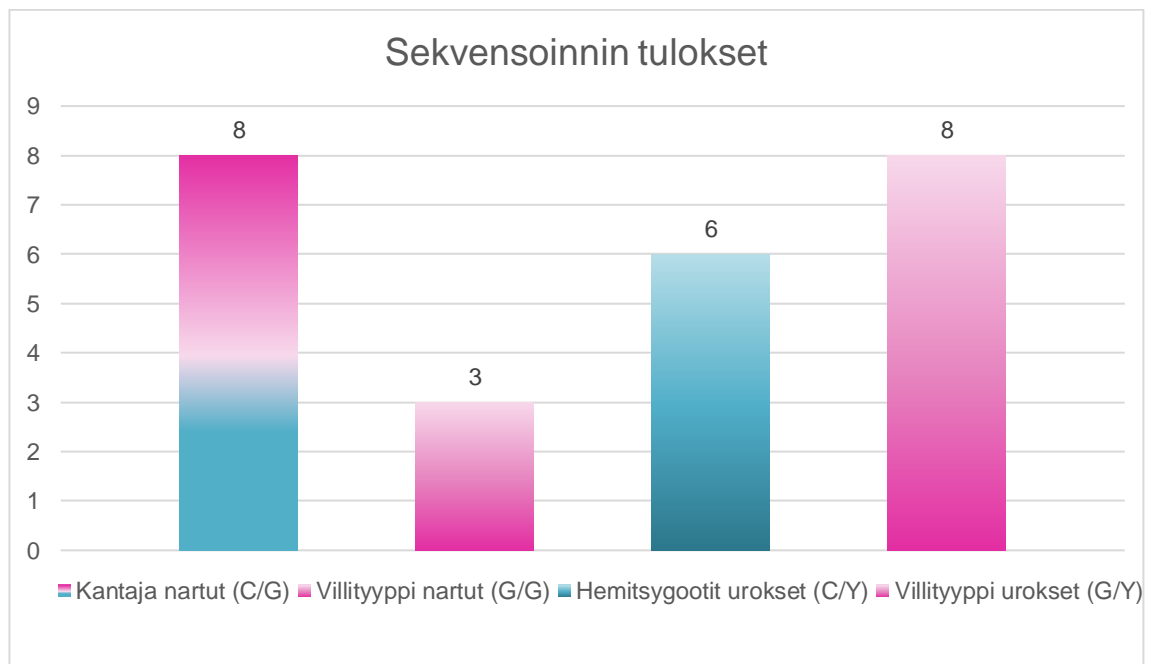


Kuvio 10. Villityypin, pistemutaation suhteen hemitsygootin sekä heterotsygootin eli kantajan kromatogrammit.

Sekvensointituloksissa havaittiin neljää eri genotyyppiä variantin suhteen: villityyppi homotsygootti G/G (narttu), heterotsygootti kantaja G/C (narttu), villityyppi hemitsygootti G/Y (uros) ja hemitsygootti pistemutaatio C/Y (uros). Hemitsygootti tarkoittaa yksilöä, jossa tietyt geenit esiintyvät vain yksinkertaisina eli haploidina. Toisin sanoen osa yksilön geeneistä esiintyy ilman vastingeeniä, kuten tässä tapauksessa urospuoliset ovat X-kromosomin suhteen hemitsygootteja. (Tirri – Lehtonen – Lemmetyinen – Pihakaski – Portin 2001: 224.) Ilmiasultaan näiden hemitsygoottien yksilöiden oletetaan olevan samanlaisia kuin vastaavat homotsygootit yksilöt. Homotsygootti viittaa diploidiin tai polyploidiseen eliöön, jolla on vastinkromosomiensa geenipaikoissa samaperintäiset eli samat alleelit (Tirri ym. 2001: 246), kuten esimerkiksi tässä työssä naarailta havaittu genotyyppi G/G.

Sequencher DNA -sekvenssin analysointi ohjelman visualisoimissa kromatogrammeissa nämä eri genotyypit nähdään ympyröityinä G, C ja S kirjaimina (kuvio 10). IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) koodien mukaisesti S on G tai C. Olen visualisoinut eri genotyyppien lukumääriä taulukossa 4.

Taulukko 4. Sekvensoinnin tulokset 24:tä terveestä sukulaisesta ja yhdestä sairaasta yksilöstä. C ja G ovat saman lokuksen eri alleeleja. Y symboloi uroksen hemitsygoottista genotyyppiä, eli uroksella on vain yksi alleeli X-kromosomin geenistä.



Opinnäytetyöni nollahypoteesina oli lause ”*F8*-geenin tutkittavalla mutaatiolla ja hemofilia A:lla ei ole yhteyttä.” Nollahypoteesia ei voida koskaan todistaa oikeaksi, mutta se voidaan falsifioida. Vaihtoehtoinen hypoteesi olisi siis muotoa: ”*F8*-geenin aminohappoa muuttava mutaatio aiheuttaa hemofilia A:n.”

Fischerin tarkan testin antama P-arvo (taulukko 5) on suurempi kuin 0,05 ja täten nollahypoteesi jää voimaan.

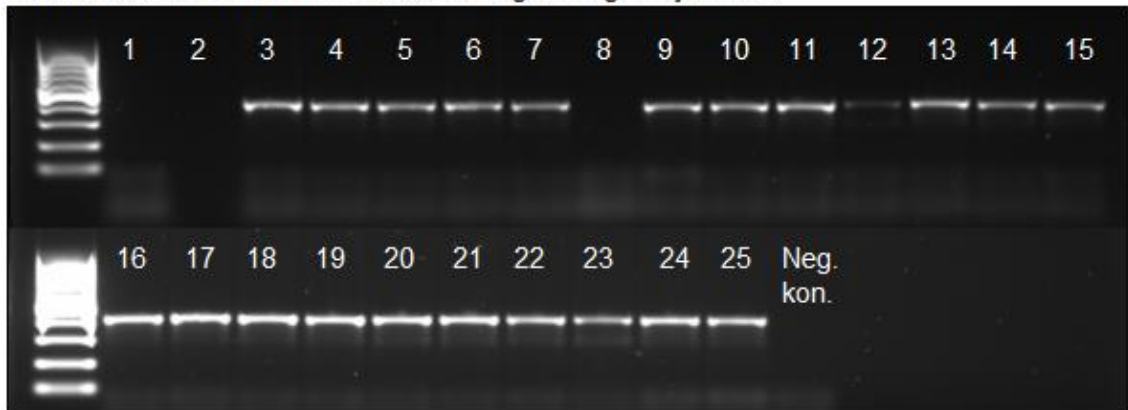
Taulukko 5. Tulosten ristiintaulukointi (SPSS). Taulukossa riskitekijän omaavat yksilöt, joilla on sairauden syyksi epäilty geenivariantti hemitsygoottisena (C/Y). Tähän joukkoon kuuluisi myös genotyyppi C/C, jos sitä olisi testatuissa yksilöissä esiintynyt. Riskittömäksi määritellyt genotyypit ovat C/G, G/Y ja G/G. Y symboloi uroksen hemitsygoottista genotyyppiä, eli uroksella on vain yksi alleeli X-kromosomin geenistä.

Fisherin tarkka testi, P-arvo = 0,240			Fenotyyppi		Yhteensä
			Normaali	Hemofilia A	
Genotyyppi	Ei riskitekijää	Lukumäärä	19	0	19
		Genotyypin %-osuus	100,0%	0,0%	
	On riskitekijä	Lukumäärä	5	1	6
		Genotyypin %-osuus	83,3%	16,7%	
Yhteensä		Lukumäärä	24	1	25
		% koko otannasta	96,0%	4,0%	

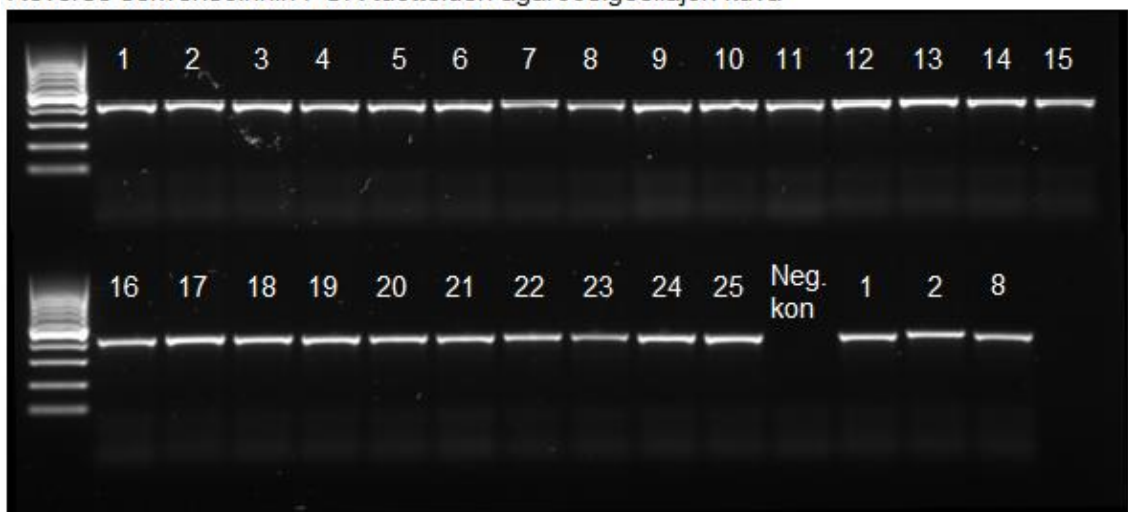
7.2 Insertiomutaation tulokset

F8-hfins -alukkeilla sekvensoitiin yhteensä 25 näytettä sairas yksilö mukaan lukien. Lopujen lopuksi saatiin luettavaa sekvenssiä vain 19 näytteestä. Tästä otannasta viideltä urokselta, joista yksi oli sairas yksilö, löytyi insertiomutaatio g.122966610-11insT hemitsoygoottisena (taulukko 6). Kolme narttua oli heterotsoygootteja ja loput yksilöt viallejä tyyppjä.

Forward sekvensoinnin PCR tuotteiden agarosigeelijaon kuva



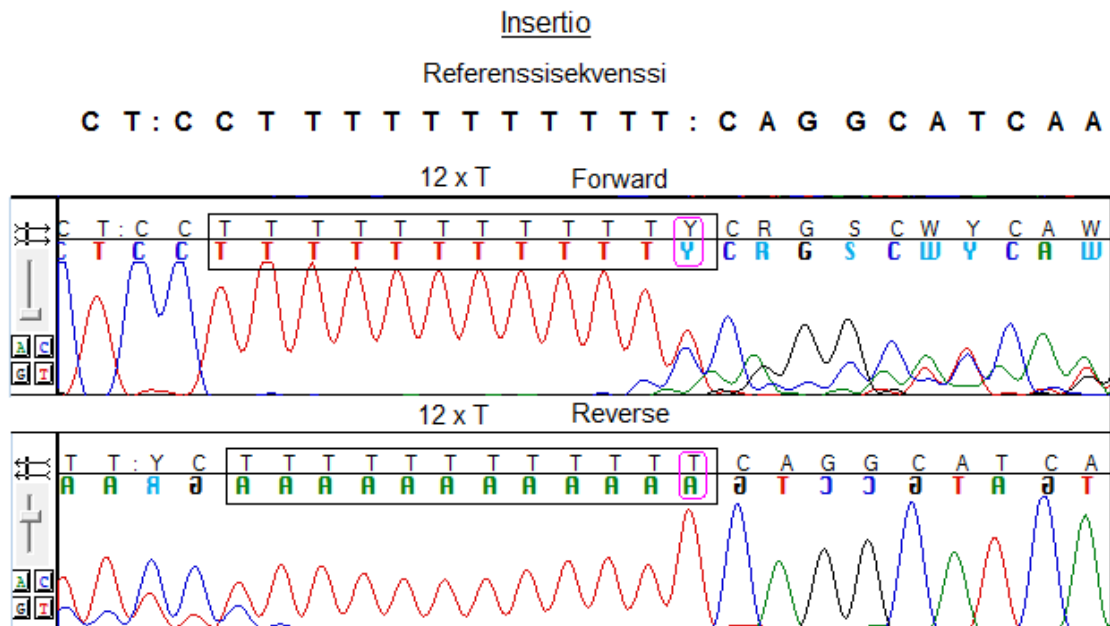
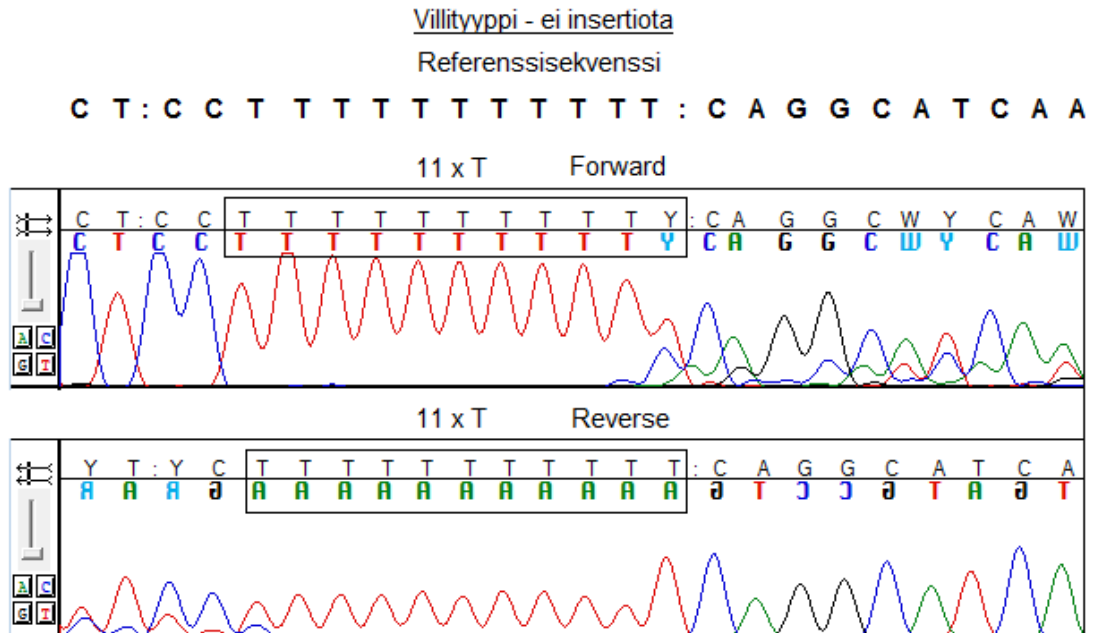
Reverse sekvensoinnin PCR tuotteiden agarosigeelijaon kuva



Kuvio 11. PCR tuotteiden geelikuvat, Generuler 100 bp markkeri. Näytteet numeroitu paikan mukaan.

Ensimmäisessä PCR:ssä oli osa näytteistä epäonnistunut (kuvio 11), mutta tuotteet sekvensoitiin silti käyttäen forward aluketta. Kun kävi ilmi, että sekvensoitava alue on haastava, päätettiin suorittaa sekvensointi myös reverse suuntaan. Uuteen PCR:ään laitettiin

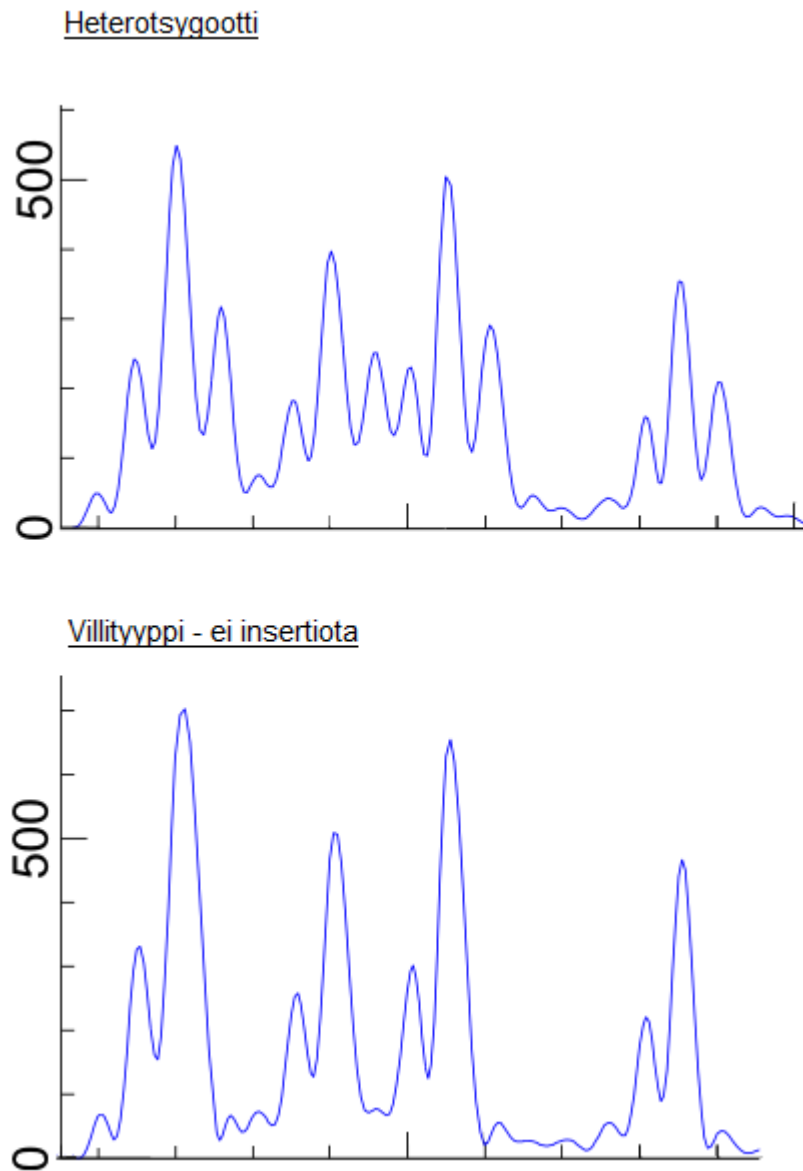
näytteet 1, 2 ja 8 kahdesti, jotta voitaisiin samalla kertaa suorittaa näiden näytteiden forward sekvensointi uudestaan.



Kuvio 12. Kromatogrammit insertiosta ja villistä tyypistä (Sequencher -ohjelma). Kaksoispiste merkitsee tyhjää paikkaa eli kyseisessä sekvenssissä ei ole emästä tässä kohdassa. Y on IUPAC systeemin mukaisesti T tai A.

Insertiomutaation suhteen näytteet sekvensoitiin kumpaankin suuntaan, koska alue oli haastava. Insertio sijaitsi pitkässä T-emäs toistojaksossa ja se voi aiheuttaa ongelmia

sekvensoinnissa. Kuvio 12:ssa näkyy, kuinka sekvenssi muuttuu T-toistojakson jälkeen lukukelvottomaksi. Sekvenssin sekoittuminen nähdään eteenpäin sekvensoidussa juosteessa toistojakson oikealla puolella ja vastakkaiseen suuntaan sekvensoidussa juosteessa toistojakson vasemmalla puolella.



Kuvio 13. Insertiomutaation kromatogrammeista vektorigrafiikan avulla muodostettu kuva C emäksen signaalin piikeistä T-toistojakson oikealla puolella. Signaalin intensiteetti kuvattu Y-akselilla. Emästen sijainnit X-akselilla ovat 5'-3'-suunnassa vasemmalta oikealle luettaessa.

Koska sekvenssi oli hyvin monimutkaista luettavaa sellaisenaan, käsiteltiin kromatogrammeja siten, että niistä poistettiin näkyvistä kaikki muut paitsi sytosiinin aiheuttama signaalipiikki. Kuviossa 13 on esitetty forward -alukkeilla sekvensoitujen näytteiden C emäksen kromatogrammit heterotsygotista ja villistä tyypistä. Villissä tyypissä nähdään yksi ylimääräinen piikki ennen varsinaista signaalia eli yhteensä kaksi signaalipiikkiä. Heterotsygotilla yksilöllä nähdään myös tämä ylimääräinen matalampi signaali ennen varsinaisen emäksen aiheuttamaa piikkiä, mutta lisäksi emäksen jälkeen on vielä kolmas ylimääräinen piikki. Heterotsygotian aiheuttama sekvenssien epäyrtymittyminen yhdistettynä toistojakson häiritsevään vaikutukseen johtaa siis kolmeen signaalipiikkiin, vaikka DNA-sekvenssissä oikeasti on vain yksi C-emäs. Juosteiden eripituiset sekvenssit aiheuttavat elektroforeesiin perustuvassa erottelussa ongelman.

Taulukko 6. Insertiomutaation tulokset. Villit tyypit ja heterotsygotit on yhdistetty yhdeksi riviksi taulukossa. "Insertio" joukko sisältää insertion suhteen hemitsygotit urokset. Tähän joukkoon kuuluisi myös homotsygotit nartut, jos niitä olisi otoksesta löytynyt.

Fisherin tarkka testi, P-arvo = 0,263			Fenotyyppi		Yhteensä
			Normaali	Hemofilia A	
Genotyyppi	Villityyppi / Heterotsygootti	Lukumäärä	14	0	14
		Genotyypin %-osuus	100,0%	0,0%	
	Insertio	Lukumäärä	4	1	5
		Genotyypin %-osuus	80,0%	20,0%	
Yhteensä		Lukumäärä	18	1	19
		% koko otannasta	94,7%	5,3%	

Fisherin tarkka testi antoi P-arvoksi 0,263, joten nollahypoteesi "hemofilia A:lla ja tutkitavalla insertiomutaatiolla ei ole yhteyttä" jää voimaan.

8 Pohdinta

8.1 Tulosten merkitys ja jatkotutkimusehdotukset

Sekä insertiomutaatiota g.122966610-11insT että aminohappoa muuttavaa pistemutaatiota g.122955217G>C löytyi hemitsygoottisena terveiltä uroksilta. 27 koiran otoksesta

löytyi 9 kantajanarttua ja 5 tervettä urosta, joilla oli g.122955217G>C mutaatio hemitsygoottisena. 19 koiran otoksesta neljällä terveellä uroksella oli insertiomutaatio g.122966610-11insT hemitsygoottisena. Näillä kaikilla neljällä terveellä insertiomutaation omaavilla uroksilla oli myös mutaatio g.122955217G>C, joten näiden kummankin mutaation yhteisvaikutuskaan ei aiheuta hemofiliaa.

Tulokset osoittavat, että tutkitut mutaatiot eivät yksinään aiheuta hemofiliaa. Koska kaikki potentiaaliset *F8*-geenin variantit tutkittiin, jää sairauden geneettinen tausta toistaiseksi selvittämättä. Mahdollista on myös, että eksomisekvensointiaineiston filtteriöinnissä kausatiivinen mutaatio ei ole jäänyt kiinni. Filtteriöinnissä oletuksena on, että sairas koira on homostygootti mutaation suhteen ja että terveet kontrollit ovat homostygootteja villityypin suhteen. Yksikin mutaation kantaja siis pudottaa kyseisen variantin pois tuloslistasta, mikä on yksi mahdollinen selitys sille, miksi sairautta aiheuttava variantti ei olisi jäänyt filtteriöinnissä kiinni. Muita selittäviä syitä sille, että mutaatiota ei löytynyt on myös. Kyseessä voi olla hankinnainen hemofilia tai eräs von Willebrandin taudin muoto.

Sairaana koiran eksomisekvensointiaineistoa verrattiin ensin koiran referenssigenomiin, jotta saatiin listattua perimän kohdat, joissa sairaalla afgaaninvinttikoiralla perimä poikkeaa referenssistä. Jos referenssigenomin bokserilla (Linblad-Toh ym. 2005) on ollut heterotsygoottisena variantti, on se jäänyt pois tuloslistasta jo tässä vaiheessa. Filtteriöinnissä verrattiin sairaan koiran eksomisekvensoinnin tuloksia 396:n muun rotuisen terveen koiran eksomisekvensoinnin tuloksiin. Filtteriöinti suoritettiin siten, että varianteiksi laskettiin kaikki sairaan koiran homostygoottiset alleelit, joita ei löydy filtteriöinnissä olevilta koirilta. Myös kantajuus yhdelläkään vertailukoiraista riittää suodattamaan variantin filtteriöintidatasta. Eli, jos filtteriöintiin käytetyistä koirista yksikin on ollut heterotsygootti mutaation suhteen, on se jäänyt pois sairaan koiran eksonivarianttikartasta.

Perinnöllisen hemofilian lisäksi esiintyy myös hankinnaista hemofiliaa, joka on erittäin harvinainen sairaus. Arvioitu esiintyvyys ihmisillä vaihtelee välillä 0,2 – 1,48 tapausta miljoonaa ihmistä kohti (Franchini – Gandini – Paolantonio – Mariani 2005; Collins ym. 2007). Koirilla ei ole diagnosoitu AHA:aa, mutta muista inhibiittoreista johtuvista koagulaation ja fibrinolyyysin häiriöistä on julkaisuja (Bauer – Moritz 2008). Ihmisillä diagnoosi tehdään kohonneista FVIII inhibiittori eli autovasta-aine tasoista ja madaltuneesta FVIII tasosta (Kimura – Kuriymama – Kuninaga – Sasaki 2015). Koska sairas koira jouduttiin lopettamaan ja siten näiden testien tekeminen on mahdotonta, jää hankinnaisen hemofilian mahdollisuus avonaiseksi kysymykseksi.

Koirat, joilla maksavian vuoksi ei syntetisoidu normaalisti maksan tuotteita, tai joilla on laimentumiseen liittyvä veren hyytymishäiriö, voivat ilmentää merkittävän alhaisia FVIII:C tasoja. Kuitenkin näissä tapauksissa on selkeä taustalla oleva muu sairaus ja muiden hyytymistekijöiden yhtäaikainen puuttuminen. (Aslanian ym. 2014.) Sairaalla yksilöllä puuttui ainoastaan FVIII verenkierrosta ja siten maksavika on epätodennäköinen selitys.

Von Willebrandin tauti on yleisin verenvuotosairaus koirilla ja ihmisillä (Denis - Wagner 1999). Tyypin 2N von Willebrandin taudissa mutaatio tekijä VIII:n sitoutumisalueella aiheuttaa madaltuneen affiniteetin VWF:n ja FVIII:n välille (Sadler 1997). 'N' tulee sanasta Normandy, joka johtaa luultavimmin juurensa ensimmäiseen tämän tyyppiseen kuvattuun von Willebrand tapaukseen, naiseen joka oli alun perin Normandiasta (Mazurier – Dieval – Jorieux – Delobel – Goudemand 1990). Hänen kliininen kuvansa oli tyypillinen tälle sittemmin määritellylle vW-taudin variantille: matala FVIII, normaalia hieman pidempi hyytymisaika ja muuten normaalit hyytymistekijäarvot (Sadler 1997; Mazurier 1990).

Jatkotutkimuksissa voisi selvittää VWF roolia afgaaninvinttikoirien FVIII vajeen taustalla. Eksomisekvensointiaineistosta voisi katsoa variantit kyseisestä geenistä ja sekvensoida muilta rodun koirilta kyseisiä variantteja. Sairaalla yksilöllä on kolme aminohappoa vaihtavaa mutaatiota VWF geenissä, jotka eivät kestäneet filtteröintiä, mutta ovat silti mielenkiintoisia. Lisäksi voitaisiin katsoa kaikki variantit *F8*:sta riippumatta siitä, kestävätkö ne filtteröintiä vai ei, ja katsoa aiheuttaako jokin kombinaatio *F8*:n ja *VWF*:n mutaatioista taudin afgaaninvinttikoirilla.

8.2 Työn eettisyys ja luotettavuus

Opinnäytetyössä noudatettiin kaikissa vaiheissa eettisiä periaatteita ja hyvää tieteellistä käytäntöä. Tutkimusryhmällä on Eläinkoelautakunnan myöntämä lupa verinäytteiden ja ihobiopsioiden ottoon koirista ja kissoista. Verinäytteenotto on toimenpiteenä nopea ja aiheuttaa eläimelle vain lievää kipua neulanpiston seurauksena. Verinäytteenotto kuuluu siis eläinkoelautakunnan mukaan lievän vakavuusluokan toimenpiteisiin (Hankelupalautakunta ELLAn ohjeita 2014). Näytteenoton haitat ovat pienet verrattuna geenitutkimuksen tuomiin hyötyihin. Tutkimuksen avulla saatujen geenilöytöjen avulla voidaan kehittää geenitestejä sairauksien vastustamiseksi ja varhaisdiagnostiikan edistämiseksi. Poskisolunäytteiden käyttö ei yleensä ole mahdollista, kun etsitään uusia kandidaattigeenejä. Uusia geenejä etsivässä tutkimuksessa käytetään menetelmiä, jotka vaativat suuria

määriä hyvin puhdasta DNA:ta. Poskisolunäytteen DNA saanto on paljon huonompi kuin EDTA-veren ja siksi ryhmä käyttää eläinten verta tutkimuksissa.

Tässä opinnäytetyössä käytetyt näytteet olivat peräisin yksityishenkilöiden lemmikeistä, jotka jatkoivat normaalia elämää tutkimukseen osallistumisen jälkeen. Tutkimusryhmä ei kasvata yhtäkään eläintä tutkimustarkoituksiin. Tutkittavat sairaudet ovat spontaaneja eli luonnollisia eikä niitä siis ole indusoitu. Ennen näytteenottoa tutkimusryhmä pyrkii selvittämään tarvittavia näytemääriä ja rajoittamaan näytekerauta vain tarpeellisiin näytteisiin. Lisäksi ryhmä tekee yhteistyötä kansainvälisten laboratorioden kanssa jakamalla näytteitä. Näin joudutaan ottamaan mahdollisimman vähän näytteitä.

Laboratoriotyössä noudatin yleistä huolellisuutta ja tarkkuutta ja hyviä laboratoriotyökentelytapoja. Kaikki putket merkittiin asianmukaisesti, jotta näytteet olivat tunnistettavissa. Näytteitä käsiteltiin mahdollisimman huolellisesti, näytesekaannusten ja ristikon-taminaation välttämiseksi. Työskentelytavat olivat aseptisia ja kontaminaatioita pyrittiin välttämään. Negatiiviset kontrollit osoittavat, että käytetyt PCR-reagenssit ovat olleet puhtaita.

Valitut menetelmät ovat parhaat mahdolliset tutkimusongelman ratkaisuun, joten opinnäytetyöni sisäinen validiteetti on mielestäni hyvä. Mainittakoon silti, että insertiomutaation osalta olisi mahdollista tehdä vielä luotettavampia lisätutkimuksia käyttäen toistojaksoille optimoituja PCR reagensseja ja reaktiolämpötiloja, mutta opinnäytetyöhön varattu aika ei riittäisi tähän. Lisäksi tulokset eivät kannusta tämän ehdokasgeenivariantin lisäselvittelyihin.

Olen pohtinut monipuolisesti tulosten merkitystä ja mahdollisia muita selityksiä alhaiselle FVIII-tasolle, joten tulkintani on niin pätevä kuin saatavilla olevilla tiedoilla voidaan muodostaa. Tulosten tulkinnassa on mietitty johtopäätösten biologista mielekkyyttä enemmän kuin tilastollisten tunnuslukujen merkitystä, koska otoskoko on hyvin pieni. Opinnäytetyöni ulkoinen validiteetti on näiden asioiden puitteissa hyvä.

8.2.1 Insertiomutaation tulokset

Insertiomutaation kromatogrammeja oli erityisen haastavaa tulkita, koska insertiota edeltävä T-toistojakso sekoitti sekvensointia. Sekvenssin sekoittuminen voisi myös viitata heterotsygoottiseen genotyyppiin, ellei sekvenssin sekoittuminen olisi havaittavissa

myös uroksilla, jotka siis omaavat vain yhden alleelin geenistä. Heterotsygoottien yksilöiden sekvenssit olivat toistojakson aiheuttaman häiriön lisäksi vielä enemmän sekaisin tämän vastingeenien epärytmittymisen vuoksi.

A/T toistojaksot voivat johtaa sekvensointiaineiston laadun heikkenemiseen sekä lisäksi ongelmiin PCR:ssä. Sekvensointidatan heikkeneminen voi johtua siitä, että detektori ei pysty erottamaan, kuinka monta identtistä emästä on ohittanut sen peräjälkeen. On esitetty myös, että Taq DNA polymeraasin aktiivisen alueen täytyessä yhden emäksen toistojaksosta polymeraasi irtoaa helpommin templaattijuosteesta. Tämä johtaisi herkästi virheellisen tuotteen syntymiseen ja niin sanottujen ”änkytys” artefaktujen muodostumiseen. Tällöin todellinen toistojakson emästen lukumäärä voi vääristyä. (Fazekas, Steeves, Newmaster 2010.) Insertiomutaation tuloksiin kannattaa siis suhtautua varauksella ja tarvittaessa tulokset voi tarkistaa uusimalla PCR:n optimoiden sen A/T-rikkaalle toistojaksolle.

8.3 Hyödynnettävyys työelämässä

Opinnäytetyön tuloksista on paljon hyötyä tutkimusryhmälle, vaikka tulokset eivät olleet odotetunlaisia. Nyt, kun nämä kaksi mutaatiota on osoitettu epätodennäköisiksi tautigeneiksi, tutkimusryhmä voi keskittyä muiden varianttien tutkimiseen. Tutkimuksia jatketaan sekvensoimalla sukulaiskoirilta *VWF*-geenin FVIII sitoutumisaluetta koodaavasta sekvenssistä löytyneet variantit. Ilman jatkotutkimusehdotuksia olisi tutkimusta jatkettu vasta, kun uusia sairaita yksilöitä ilmenisi. Nyt taudin geneettisen taustan selvittely jatkuu viivästyksettä. Työelämä hyötyi konkreettisten tulosten ja jatkotutkimusehdotusten muodossa opinnäytetyöstäni.

8.4 Tulosten julkaisu

Opinnäytetyö julkaistaan Ammattikorkeakoulujen rehtorineuvoston Arene ry:n tarjoamassa palvelussa, Theseuksessa. Siellä työ tulee olemaan vapaasti saatavilla kaikille. Työyhteisössä tuloksista tiedotetaan diaesityksen muodossa ryhmäpalaverissa, johon osallistuu suurin osa tutkimusryhmän jäsenistä.

Lähteet

Aslanian, Mary – Sharp, Claire – Rozanski, Elizabeth – Laforcade, Armelle – Rishniw, Mark – Brooks, Marjory 2014. Clinical outcome after diagnosis of hemophilia A in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 245(6). 677-683.

Baudo, Francesco – de Cataldo, Francesco 2015. The problem of acquired hemophilia. *Blood* 125(7). 1052-1053.

Bauer, Natalie – Moritz, Andreas 2008. Coagulopathies in the dog and cat. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere* 36(4). 235-246

Bell, Jonathan 2008. A Simple Way to Treat PCR Products Prior to Sequencing Using ExoSAP-IT®. USB Corporation, Cleveland, Ohio. *BioTechniques* 44(6). 834.

Brooks, Marjory 1999. A Review of Canine Inherited Bleeding Disorders: Biochemical and Molecular Strategies for Disease Characterization and Carrier Detection. *The Journal of Heredity* 90(1). 112-118.

Brown, Terence 2006. *Gene cloning & DNA analysis - An Introduction*. 5. painos. Blackwell Publishing.

Callan, Mary Beth – Haskins, Mark E. – Wang, Ping – Zhou, Shangzhen – High, Katherine A. – Arruda, Valder R. 2016. Successful Phenotype Improvement following Gene Therapy for Severe Hemophilia A in Privately Owned Dogs. *Plos One* 11 (3).

Ching-Tzu, Yen - Meng-Ni, Fan - Yung-Li, Yang - Sheng-Chieh, Chou - I-Shing, Yu - Shu-Wha, Lin 2016. Current animal models of hemophilia: the state of the art. *Thrombosis Journal* 14 (1). 22.

Chiu, Po-Lin – Bou-Assaf, George – Seth Chhabra, Ekta – Chambers, Melissa – Peters, Robert – Kulman, John – Walz, Thomas 2015. Mapping the interaction between factor VIII and von Willebrand factor by electron microscopy and mass spectrometry. *Blood* 126(8). 935-938.

Christopherson, Pete – Bacek, Lenore – King, Kevin – Boudreaux, Mary 2014. Two novel missense mutations associated with hemophilia A in a family of Boxers, and a German Shepherd dog. *Veterinary Clinical Pathology* 43(3). 312-316.

Chung, Dominic W. - Xu, Wenfeng – Davie, Earl W. 2013. *The Blood Coagulation Factors and Inhibitors: Their Primary Structure, Complementary DNAs, Genes, and Expression*. Teoksessa Marder, Victor j. – Aird, William C. – Bennett, Joel S. – Schulman, Sam – White, Gilbert (toim.): *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practise*. Sixth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 110-145.

Collins, Peter – Hirsch, Sybil – Baglin, Trevor – Dolan, Gerald – Hanley, John – Makris, Michael – Keelins, David – Liesner, Ri – Brown, Simon – Hay, Charles 2007. Acquired hemophilia A in the United Kingdom: a 2-year national surveillance study by the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Blood* 109(5). 1870-1877.

Commons.wikimedia 2011. Verkkodokumentti. <https://commons.wikimedia.org/wiki/Afghan_Hound#/media/File:AKC_Helena_Fall_Dog_Show_2011.jpg>

Connelly, Sheila – Mount, Jane – Mauser, Amy – Gardner, Joann M. – Kaleko, Michael – McClelland, Alan – Lothrop, Clinton D. Jr 1996. Complete short-term correction of canine hemophilia A by in vivo gene therapy. *Blood* 88 (10). 3846-3853.

Denis, Cecile – Wagner, Denisa 1999. Insights from von Willebrand disease animal models. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56(11). 977-990.

Eskelinen, Seija 2016. Fibrinoin D-dimeerit plasmasta (P-FiDD). *Duodecim Terveyskirjasto*. Verkkodokumentti. Luettu 2.4.2017. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03358>

Fahs, Scot – Hille, Matthew – Shi, Qizhen – Weiler, Hartmut – Montgomery, Robert 2014. A conditional knockout mouse model reveals endothelial cells as the principal and possibly exclusive source of plasma factor VIII. *Blood* 123 (24). 3706-3713.

Fazekas, Aron – Steeves, Royce – Newmaster, Steven 2010. Improving sequencing quality from PCR products containing long mononucleotide repeats. *BioTechniques* 48(4). 277-285

Freedman, Adam – Gronau, Ilan – Schweizer, Rena – Ortega-Del Vecchyo, Diego – Han, Eunjung – Silva, Pedro – Galaverni, Marco - Fan, Zhenxin – Marx, Peter – Lorente-Galdos, Belen – Beale, Holly, Ramirez, Oscar – Hormozdiari, Farhad – Alkan, Can – Vilà, Carles - Squire, Kevin – Geffen, Eli – Kusak, Josip – Boyko, Adam – Parker, Heidi – Lee, Clarence – Tadiogola, Vasisht – Siepel, Adam – Bustamante, Carlos – Harkins, Timothy – Nelson, Stanley – Ostrander, Elaine – Marques-Bonet, Tomas – Wayne – Novembre, John 2014. Genome Sequencing Highlights the Dynamic Early History of Dogs. *PLOS Genetics* 10 (1).

Green, D – Lechner, K 1981. A survey of 215 non-hemophiliac patients with inhibitors to Factor VIII. *Thrombosis and Haemostasis* 45(3). 200-203.

Grethlein, Sara – Kessler, Craig – Nagalla, Srikanth (toim.) 2016. Acquired Hemophilia. *Medscape verkkodokumentti*. Päivitetty 24.3.2016. Luettu 25.3.2017.

Griffiths, Anthony – Miller, Jeffrey – Suzuki, David – Lewontin, Richard – Gelbart, William 2000. *An Introduction to Genetic Analysis*. Seitsemäs painos.
Hawkins, Trevor 1998. DNA purification and isolation using magnetic particles. Patentti. <<https://www.google.com/patents/US5705628>>

Hankelupalautakunta ELLAn ohjeita. 3 Toimenpiteiden vakavuus -arviointi ja luokittelu. hyväksytty hankelupalautakunnan kokouksessa 5.6.2014. Verkkodokumentti. Luettu 20.4.2017.

HUSLAB 2016. Trombiiniaika, plasmasta. Tutkimusohjekirja. Päivitetty 30.9.2016. Luettu 2.4.2017. Luettavissa myös sähköisesti: <<https://huslab.fi/ohjekirja/2782.html>>

HUSLAB 2017. Tromboplastiiniaika, aktivoitu, osittainen, plasmasta. Tutkimusohjekirja. Päivitetty 20.1.2017. Luettu 2.4.2017. Luettavissa myös sähköisesti: <<https://huslab.fi/ohjekirja/2783.html>>

Hytönen, Marjo - Lohi, Hannes 2016. Canine models of human rare disorders. *Rare Dis.* 4 (1). e1241362.

Kaufman, Randal – Fay, Philip – Popolo, Laura – Ortel, Thomas 2013. Factor V and Factor VIII. Teoksessa Marder, Victor j. – Aird, William C. – Bennett, Joel S. – Schulman, Sam – White, Gilbert (toim.): Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practise. Sixth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 179-196.

Kennelliitto ry 2008. Perinnöllisten vikojen ja sairauksien vastustamissääntö (PEVISA-sääntö). Verkkodokumentti. Hyväksytty suomen kennelliiton hallituksessa 28.2.2008. <http://www.kennelliitto.fi/sites/default/files/media/pevisa-saanto_0.pdf> Luettu 8.3.2017.

Kennelliitto ry 2014. Ohje jalostuksen tavoiteohjelman laatimisesta. Verkkodokumentti. Hyväksytty 6.2.2014. Tarkennettu 7.4.2016. <http://www.kennelliitto.fi/sites/default/files/media/jto-ohje_0.pdf> Luettu 8.3.2017.

Kennelliitto ry 2016. Rotukohtaiset erityisehdot. Verkkodokumentti. Päivitetty 7/2016. <http://www.kennelliitto.fi/sites/default/files/media/pevisa_ja_rotukohtaiset_erytisehdot_2016_0_1.pdf> Luettu 8.3.2017.

Kimura, Kenji – Kuriyama, Akira – Kuninaga, Naoki – Sasaki, Akira 2015. Acquired Hemophilia. Internal Medicine 54(7). 865.

Kivirikko, Kere 2006. DNA:n muutokset: mutaatiot ja polymorfismit. Teoksessa Aula, Pertti – Kääriäinen, Helena – Palotie, Aarno: Perinnöllisyyslääketiede. 3. uudistettu painos. Duodecim kustannusyhtiö.

Larson, Greger – Bradley, Daniel 2014. How Much Is That in Dog Years? The Advent of Canine Population Genomics. PLOS Genetics 10 (1). e1004093.

Lassila, Riitta – Riikonen, Pekka – Armstrong, Elina 2015. Hemofiliat ja muut perinnölliset hyytymistekijöiden vajaukset. Teoksessa Porkka, Kimmo – Lassila, Riitta – Remes, Kari – Savolainen, Eeva-Riitta (toim.): Veritaudit. 4. uudistettu painos. Duodecim kustannusyhtiö.

Lassila, Riitta 2015. Veren hyytyminen ja fibrinolyysi. Teoksessa Porkka, Kimmo – Lassila, Riitta – Remes, Kari – Savolainen, Eeva-Riitta (toim.): Veritaudit. 4. uudistettu painos. Duodecim kustannusyhtiö.

Lillicrap, David 2013. von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. Blood 122(23). 3735-3740.

Lindblad-Toh, Kerstin - Wade, Claire - Mikkelsen, Tarjei - Karlsson, Elinor -, David B. Jaffe - Kamal, Michael - Clamp, Michele - Chang, Jean - Kulbokas, Edward - Zody, Michael - Mauceli, Evan – Xie, Xiaohui – Breen, Matthew – Wayne, Robert – Ostrander, Elaine – Ponting, Chris – Galibert, Francis – Smith, Douglas – deJong, Pieter – Kirkness, Ewen – Alvarez, Pablo – Biagi, Tara – Brockman, William – Butler, Jonathan – Chin, Chee-Wye – Cook, April – Cuff, James – Daly, Mark – DeCaprio, David – Gnerre, Sante – Grabherr, Manfred – Kellis, Manolis – Kleber, Michael – Bardeleben, Carolyne – Goodstadt, Leo – Heger, Andreas – Hitte, Christophe – Kim, Lisa – Koepfli, Klaus-Peter – Parker, Heidi – Pollinger, John – Searle, Stephen – Sutter, Nathan – Thomas, Rachael – Webber, Caleb 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. Nature. 438 (7069). 803-819. Luettavissa myös sähköisesti: < <http://www.nature.com/nature/journal/v438/n7069/full/nature04338.html>>

Lozier, Jay – Dutra, Amalia – Pak, Evgenia – Zhou, Nan – Zheng, Zhili – Nichols, Timothy – Bellinger, Dwight – Read, Marjorie – Morgan, Richard 2002. The Chapel Hill hemophilia A dog colony exhibits a factor VIII gene inversion. *PNAS* 99(20). 12991-12996.

Lozier, Jay – Kloos, Mark – Merricks, Elizabeth – Lemoine, Nathaly – Whitford, Margaret – Raymer, Robin – Bellinger, Dwight – Nichols, Timothy 2016. Severe Hemophilia A in a Male Old English Sheep Dog with a C→T Transition that Created a Premature Stop Codon in Factor VIII. *Comparative Medicine* 66(5). 405-411.

Mazurier, Claudine – Dieval, J – Jorieux, Sylvie – Delobel, J – Goudemand, M 1990. A new von Willebrand factor (vWF) defect in a patient with factor VIII (FVIII) deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet vWF. Characterization of abnormal vWF/FVIII interaction. *Blood* 75(1). 20-26.

Mellersh, Cathryn 2012. DNA testing and domestic dogs. *Mammalian Genome* 23 (1/2). 109-123.

Morrissey, James – Broze, George 2013. Tissue Factor and the Initiation and Regulation (TFPI) of Coagulation. Teoksessa Marder, Victor j. – Aird, William C. – Bennett, Joel S. – Schulman, Sam – White, Gilbert (toim.): Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practise. Sixth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 163-178.

Niskanen, Julia – Salmela, Elina – Lohi, Hannes 2017. Ancestry – a Tool for Trimming Complex Pedigrees. *The Journal of Open Source Software* 2(11).

NM_000132.3. Homo sapiens coagulation factor VIII (F8), transcript variant 1, mRNA. NCBI referenssisekvenssi.

NM_001003212.1. Canis lupus familiaris coagulation factor VIII (F8), mRNA. NCBI referenssisekvenssi.

Parker, Heidi – Kim, Lisa – Sutter, Nathan – Carlson, Scott – Lorentzen, Travis – Malek, tiffany – Johnson, Gary – DeFrance, Hawkins – Ostrander, Elaine – Kruglyak, Leonid 2004. Genetic Structure of the Purebred Domestic Dog. *Science* 304 (5674). 1160-1164.

PerkinElmer 2013. Purification Protocol for 3 ml of Blood Using the chemagic Magnetic Separation Module I and the chemagic Dispenser. Kittiohje. Versio 131209.

PerkinElmer 2014. Product Note chemagic MSM I instrument. Verkkodokumentti. <http://www.chemagen.com/fileadmin/user_upload/Downloads/PDFs/Literature/PRD_chemagic_MSM-I_lowres.pdf>

PerkinElmer 2017. Brochure chemagen Technology. Verkkodokumentti. <http://www.chemagen.com/fileadmin/user_upload/Downloads/PDFs/Literature/BRO_chemagen_Technology_lowres_CT6521-30-1607.pdf>

Pieters, Jean – Lindhout, Theo – Hemker, Coenraad 1989. In Situ-Generated Thrombin Is the Only Enzyme That Effectively Activates Factor VIII and Factor V in Thromboplastin-Activated Plasma. *Blood* 74 (3). 1021-1024. Luettavissa sähköisesti: <<http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/74/3/1021.full.pdf>>

Plug, Iris – Mauser-Bunschoten, Eveline – Bröcker-Vriends, Annette – Ploos van Amstel, Hans Kristian – van der Dom, Johanna – van Diemen-Homan Joanna – Willemse, José – Rosendaal, Frits 2006. Bleeding in carriers of hemophilia. *Blood* 108 (1). 52-56.

Regan, Lisa – Fay, Philip 1995. Cleavage of Factor VIII Light Chain Is Required for Maximal Generation of Factor VIIIa Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (15). 8546-8552.

Sadler, J. Evan 1997. Appendix II: A revised classification of Von Willebrand disease. *Haemophilia* 3(s2).1365-2516.

Shahani, Tina – Covens, Kris – Lavend'homme, Renaud – Jazouli, N – Sokal, E – Peerlinck, Kathelijne – Jacquemin, Marc 2014. Human liver sinusoidal endothelial cells but not hepatocytes contain factor VIII. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12 (1). 36-42.

Suomen Afgaanit ry 2006. Jalostuksen tavoiteohjelma 2007-2011. Päivitetty vuosille 2012-2016. Verkkodokumentti. Hyväksytty rotujärjestön yleiskokouksessa 24.9.2006. Päivitetty marraskuussa 2011. <http://www.saunalahti.fi/safa/JTO%20valmis_net-tiin.pdf> Luettu 8.3.2017.

Suominen, Ilari - Ollikka, Pauli 2004. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3-2. painos. Opetushallitus. Hakapaino Oy, Helsinki.

Suominen, Ilari - Pärssinen, Raimo - Haajanen, Kari - Pelkonen, Jani 2013. Geenitekniikka. 2. korjattu painos. Turun Ammattikorkeakoulu.

Terraube, Virginie – O'Donnell, James S. – Jenkins, Vincent 2010. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia* 16(1). 3-13.

Thermo Scientific 2008. NanoDrop 1000 Spectrophotometer. V3.7 User's Manual. <<http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>>

Tirri, Rauno – Lehtonen, Juhani – Lemmetyinen, Risto – Pihakaski, Seppo – Portin, Petter 2001. *Biologian sanakirja*. 1. uudistettu painos. Otavan Kirjapaino Oy.

Wang, Guo-dong – Zhai, Weiwei – Yang, He-chuan – Fan, Ruo-xi - Cao, Xue – Zhong, Li – Wang, Lu – Liu, Fei – Wu, Hong – Cheng, Lu-guang – Poyarkov, Andrei – Poyarkov, Nikolai JR – Tang, Shu-sheng – Zhao, Wen-ming – Gao, Yun – LV, Xue-mei – Irwin, David – Savolainen, Peter – Wu, Chung-I – Zhang, Ya-ping 2013. The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans. *Nature Communications* 4. Artikkelin nro: 1860.

Wilson, Bethany – Wade, Claire 2012. Empowering international canine inherited disorder management. *Mammalian Genome* 23 (1/2). 195-202.

Witmer, Char – Young, Guy 2013. Factor VIII inhibitors in hemophilia A: rationale and latest evidence. *Therapeutic Advances in Hematology* 4(1). 59-72.

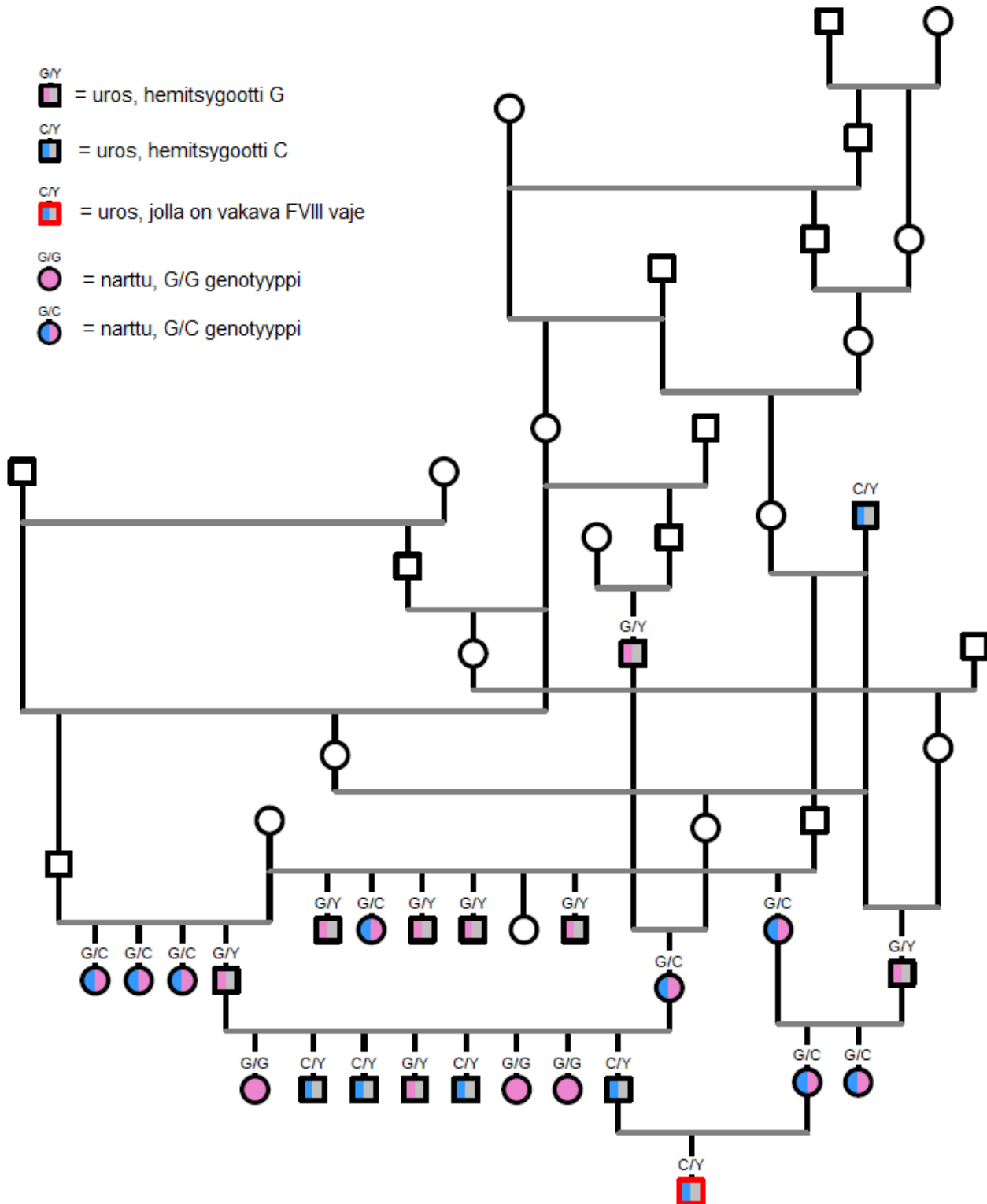
Von Depka, Mario 2002. Novoseven: mode of action and use in acquired haemophilia. *Intensive Care Med* 28 (2). 222-227.

Zanolini, Diego – Simone, Merlin – Feola, Maria – Ranaldo, Gabriella – Amoruso, Angela – Gaidano, Gianluca – Zaffaroni, Mauro – Ferrero, Alessandro – Brunelleschi, Sandra – Valente, Guido – Gupta, Sanjeev – Prat, Maria – Follenzi, Antonia 2015. Extrahepatic Sources Of Factor VIII Potentially Contribute To The Coagulation Cascade Correcting The Bleeding Phenotype Of Mice With Hemophilia A. *Haematologica* 100 (7). 881-892.

Zondervan, Krina T. – Cardon, Lon R. 2007. Designing candidate gene and genome-wide case-control association studies. *Nature Protocols* 2 (10). 2492-2501.

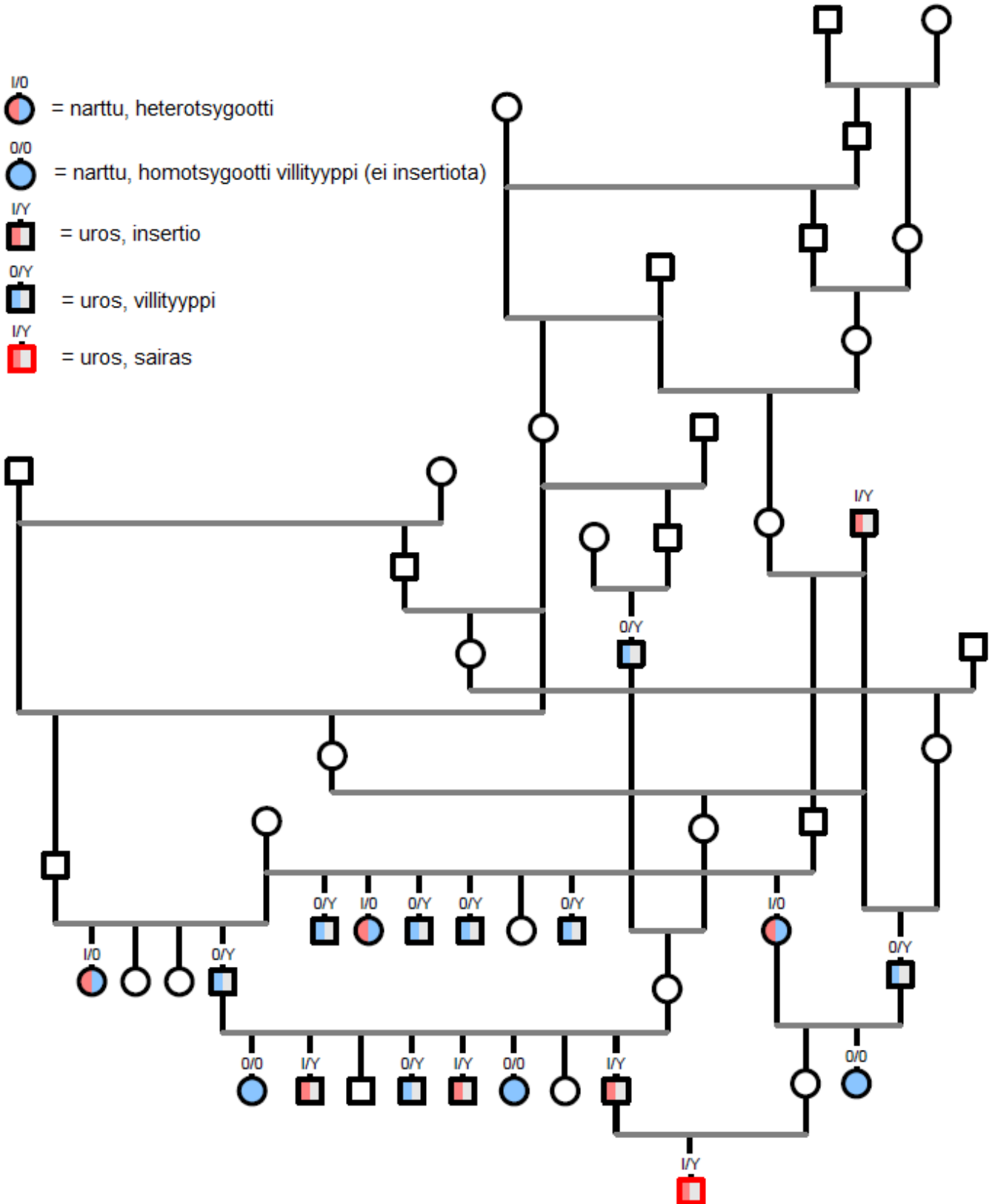
Sukupuusi 1

Sairaalan yksilön sukupuu. Aminohappoa muuttavan mutaation esiintyminen suvussa. Sukutiedot haettu Kennelliiton sivuilta ja jäsennetty AncesTrim ohjelmalla (Niskanen – Salmela – Lohi 2017). Sukupuusta on poistettu yksilöt, jotka eivät ole merkityksellisiä tässä tutkimuksessa.



Sukupuu 2

Sairaan yksilön sukupuu. Insertiomutaation esiintyminen suvussa.



Hyytymistutkimusten tulokset

Sairaalan yksilön verikokeiden tulokset. Tulokset saatu koiran omistajalta.

Määrittys	Tulos	Min	Max	Huom!
Coagulation Screening Large (koira)				
Hematologiset				
Määrittys	Tulos	Min	Max	Huom!
PT (Quick's test, protrombiiniaika)	9 Sec	0	8,8	
aPTT	25,8 Sec	0	13,5	TULOS TARKISTETTU.
Fibrinogeeni	1,3 g/l	1,2	2,9	
Thrombin time	13,6 Sec	0	18	
D-Dimeeri	0,86 µg/ml	0,023	0,65	
Antitrombiini III	139 %	107,9	128	
Factor VIII	3 %	70	135	
Factor IX	93 %	75	140	
von Willebrand's factor	103 %	55	150	Factor 8 associated antigen