

GONADHYPOPLASIA LAPINLEHMILLÄ

RUOTSISSA JA SUOMESSA

KIT, ektooppinen KIT ja KIT-ligandin välinen interaktio, joka altistaa alkutisolujen migraatiohäiriöön lapinlehmärodun sikiöillä, joilla on neljä kopiota KIT-geenistä



Kalle Hakala
Lisensiaatintutkielma 2012
Helsingin yliopisto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Kliinisen tuotanto-
eläinlääketieteen osasto
Lisäntymistiede



Tiedekunta □ - Fakultet – Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto □ - Avdelning – Department Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto	
Tekijä □□□ - Författare – Author Kalle Hakala			
Työn nimi □□ - Arbetets titel – Title Gonadihypoplasia lapinlehmillä Ruotsissa ja Suomessa			
Oppiaine □ - Läroämne – Subject Lisääntymistiede			
Työn laji □□ - Arbetets art – Level Lisensiaatintutkielma		Aika □□ - Datum – Month and year 2.5.2012	Sivumäärä □□ - Sidoantal – Number of pages 32
Tiivistelmä □□ - Referat – Abstract			
<p>Tämän lisensiaatintutkielman tavoitteena on selvittää pohjoissuomenkarjan naudoilla esiintyvän gonadien hypoplasian eli sukurauhasten vajaakehittyneisyyden syitä. Sukurauhasten vajaakehittyneisyyden tiedetään johtuvan itusolujen puutteesta sukurauhasissa. Itusolujen puutos on havaittavissa jo varhaisessa sikiönkehityksen vaiheessa ja sen epäillään johtuvan häiriöstä alkuitusolujen soluvaelluksessa. KIT-reseptorin (tunnetaan myös nimellä Ckit tai C-Kit) tiedetään olevan merkittävässä roolissa alkuitusolujen soluvaelluksessa ja nykyisten geenitutkimusmenetelmien avulla pyrittiin selvittämään sen osuutta pohjoissuomenkarjan sukurauhasten vajaakehittyneisyydessä.</p> <p>Yhteensä 303 pohjoissuomenkarjan nautaa tutkittiin kliinisesti sukurauhasten vajaakehittyneisyyden varalta. Sonniin ja sonnivasikoiden tutkimus suoritettiin mittaamalla ja tunnustelemalla niiden kivekset. Lehmillä ja hiehoilla munasarjat tutkittiin rektaalaisesti palpoimalla. Lisäksi osalta eläimiä otettiin 9 ml laskimoverta EDTA-putkeen DNA-tutkimusta varten. Lehmillä ja hiehoilla todettiin toinen tai molemmat munasarjat vajaakehittyneiksi, mikäli niiden koko oli hyvin pieni tai ne olivat mahdottomat löytää rektaalitutkimuksessa. Sonneilla kives todettiin vajaakehittyneeksi, jos sen koko oli korkeintaan kolmasosa normaalin kiveksen koosta. Sonnivasikoilla kives todettiin vajaakehittyneeksi, jos sen koko oli korkeintaan puolet normaalin kiveksen koosta. Lisäksi 42 eläimen sukurauhaset tutkittiin teurastuksen tai kliinisen kastraation jälkeen. Vajaakehittyneeksi sukurauhaset todettiin aiemmin kuvatus mukaisesti ja histologisten leikkeiden avulla, jos niistä ei löytynyt sukusoluja tai niiden esiasteita. DNA-näytteet genotyyпитettiin 96 naudan osalta Illumina BovineHD sirun ja Illumina's <i>Beadstudio</i> ohjelmiston avulla. Koko genominlaajuista assosiaatiotutkimusta (GWAS) varten naudat jaettiin ryhmiin sairauden ja värityksen mukaan.</p> <p>Tutkituista 345 pohjoissuomenkarjan naudoista 16 eläimellä oli hypoplastiset sukurauhaset. Genotyyppaustulosten mukaan kromosomi 29 oli vahvasti yhteydessä sukurauhasten vajaakehittyneisyyteen ja kopioluvun vaihteluita (CNV) löytyi kaikkiaan 2101 kappaletta ja kromosomista 6 löydetty CNV sisälsi KIT-geenin kokonaisuudessaan. Toinen kromosomista 29 löydetty CNV-segmentti oli GWAS-tutkimuksessa löydetyn alueen välittömässä läheisyydessä.</p> <p>Kromosomista 29 löydetty ektooppinen KIT-geeni liittyy sukurauhasten vajaakehitykseen pohjoissuomenkarjan naudoilla. Löydös on hypoteesin mukainen, mutta tarkkaa sukurauhasten vajaakehityksen syytä ei tutkimuksen tuloksista pystytä määrittelemään.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Gonadihypoplasia, KIT, ektooppinen KIT, KIT copy number variation			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikin kampuskirjasto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktör och ledare – Director and Supervisor(s) Työn johtaja: Magnus Andersson . Työn ohjaaja: Heli Venhoranta			

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO.....	1
2 KIRJALLISUUSKATSAUS.....	3
2.1 Gonadihypoplasia ja migraatiohäiriö.....	3
2.2 KIT ja soluvaellus.....	7
2.3 KIT-ligandi ja soluvaellus.....	10
2.4 Ektooppinen KIT ja KIT copy number variation.....	12
3 AINEISTO JA MENETELMÄT.....	15
3.1 Nautojen kliininen tutkimus.....	15
3.2 Sukurauhasten tutkimus teurastuksen tai kliinisen kastration jälkeen.....	17
3.3 Geenitutkimusmenetelmät.....	18
4 TULOKSET.....	20
4.1 Gonadihypoplastiset yksilöt.....	20
4.2 Genotyypaus tulokset.....	20
5 POHDINTA.....	21
7 LÄHTEET.....	27
7.1 Väitöskirjat.....	27
7.2 Artikkelit.....	28

1 JOHDANTO

Perinnöllistä sukurauhasten vajaakehittyneisyyttä eli gonadien hypoplasiaa on tavattu 1900-luvun alusta Ruotsin tunturirodun naudoilla (Eriksson 1943). Pohjoissuomenkarjan (PSK) eli lapinlehmien kannan ollessa pienimmillään on rodun perimän rikastamiseksi käytetty Ruotsin tunturirodun eläimiä. Tällöin kehityshäiriö on oletettavasti siirtynyt myös pohjoissuomenkarjaan.

Erikssonin (1943) väitöskirjassa havaittiin vajaakehittyneisyyden olevan väistävasti eli resessiivisesti periytyvää, sekä sen ilmenemisyleisyyden eli penetranssin olevan epätäydellistä. Settergren (1964) puolestaan havaitsi väitöskirjassaan sukurauhasten vajaakehittyneisyyden olevan yhteydessä valkoturkkisiin yksilöihin. Ruotsissa sairauden esiintymishuippu oli vuonna 1935, jolloin kaikista tutkituista eläimistä 25,6 % oli sairaita (Eriksson 1943). Karsimalla hypoplastiset naudat jalostuksesta ja käyttämällä muiden rotujen sonneja saatiin sairauden esiintymistä ruotsin tunturirodun sisällä huomattavasti pieneneään (Eriksson 1943).

Gonadihypoplasia lapinlehmillä on tila, jossa useimmiten vasen sukurauhanen jää selvästi toista pienemmäksi. Gonadihypoplasia voi koskea kummanpuoleista sukurauhasta tahansa tai se voi olla myös molemminpuoleista. (Eriksson 1943). Hypoplastinen sukurauhanen on kooltaan selvästi normaalia sukurauhasta pienempi ja se on yleensä toimimaton (Settergren 1964). Toispuoleisesti hypoplastiset yksilöt ovat kuitenkin täysin fertiilejä toisen sukurauhasen toimiessa normaalisti (Eriksson 1943).

Hiirillä on olemassa dominoivan valkotäpläisyyden geeni, jonka suhteen homotsygootit yksilöt ovat valkoisia, steriileitä ja aneemisia. Näillä hiirillä alkuitusolujen eli siittiö- tai munasolujen esiasteiden soluvaellus on puutteellista ja steriileetti johtuu itusolujen puutteesta sukusoluissa. (Geissler ym. 1980). Settergren (1964) kirjoitti vastaavasta häiriöstä hiirillä ja epäili naudoilla esiintyvän gonadihypoplasian johtuvan alkuitusolujen puutteellisesta kyvystä vaeltaa kehittyviin sukurauhasiin.

Alkuitusolut eli sukusolujen esivaiheet vaeltavat sikiökehityksen alkuvaiheessa suoliliepeen kautta sukupuoliharjanteeseen, jossa ne lopulta erilaistuvat sikiön sukupuolen mukaan siittiöiksi tai munasoluiksi. Alkuitusolujen migraation eli soluvaelluksen edellytyksenä on solujen kyky liikkua kehittyvässä alkiossa oikeaan suuntaan ympäristöstä saatavan informaation avulla. Virheet alkuitusolujen ohjailussa johtavat epäjohdonmukaiseen tai liian hitaaseen vaellukseen, jolloin alkuitusolut eivät tapaa kohdekudosta riittävän nopeasti ja ne apoptoituvat eli joutuvat ohjattuun solukuolemaan. (Richardson & Lehmann 2010). Useiden tekijöiden tiedetään vaikuttavan alkuitusolujen selviämiseen soluvaelluksen aikana (Kierszenbaum & Tres 2001).

Hiirillä dominoivan valkotäpläisyyden tiedetään aiheutuvan mutaatiosta geenialueella, jossa sijaitsee KIT-tyrosiinikinaasia koodaava geeni (Buehr ym 1993). KIT on reseptoriproteiini, joka on merkittävässä asemassa alkuitusolujen, verisolujen ja melanosyyttien soluvaelluksessa ja lisääntymisessä. KIT-ligandi on KIT-reseptorin aktivoiva proteiini ja on siksi yhtä merkittävä soluvaelluksessa kuin reseptorinsa. (Wehrle-Haller & Weston 1995, De Felici 2000).

Nyky menetelmin on gonadihypoplastisilta lapinlehmiltä saatu paikannettua ektooppinen KIT-geeni (Venhoranta ym. 2012 julkaisematon).

Tässä tutkielmassa pohditaan ektooppisen KIT-geenin johdosta aiheutuvia muutoksia alkuitusolujen soluvaellukseen lapinlehmillä. Koska naudoilla on tiettyjä poikkeuksia alkuitusolujen määrittelyssä ja tutkimustieto alkuitusolujen soluvaelluksesta on lajilla vielä puutteellista (Wrobel & Süß 1998), käytetään kirjallisuutena soveltuvien osin muilla lajeilla saatuja tutkimustuloksia alkuitusolujen soluvaelluksesta. Geenitutkimusmenetelmien kehittyä on sukurauhasten vajaakehittyneisyyden syitä pystytty tarkastelemaan uudella tavalla.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Gonadihypoplasia ja migraatiohäiriö

Ruotsin tunturirodulla ja pohjoissuomenkarjalla tavattu sukurauhasten vajaakehittyneisyys eli gonadien hypoplasia ilmenee kivesten tai munasarjojen selvästi normaalia pienempänä kokona. Hypoplasia voi ilmentyä molempia sukurauhasia koskevana bilateraalisena muotona, tai vain toista sukurauhasta koskevana unilateraalisenä muotona. Useimmin hypoplastiseksi jää vasemmanpuoleinen sukurauhanen. (Eriksson 1943).

Hypoplastisissa sukurauhasissa on joko normaalia vähemmän, tai ei ollenkaan itusoluja (Eriksson 1943). Itusolut erilaistuvat alkiokehityksessä sukupuoliharjanteeseen vaeltavista alkuitusoluista ja jatkavat sukurauhasissa

erilaistumisestaan, kiveksissä siittiöiksi ja munasarjoissa follikkeleiden ympäröimiksi munasoluiksi (Richardson & Lehmann 2010). Hypoplastisten sukurauhasten rakenne ja apusolut ovat itusolujen puutetta lukuun ottamatta normaaleita. (Eriksson 1943). Kiveksissä sukupuolihormonien tuotanto on normaalia, mutta hypoplastisissa munasarjoissa ei ole estrogeenin tuotantoa follikkelien puutteen takia (Eriksson 1943).

Molemmipuolisesti sukurauhasten osalta täysin vajaakehittyneet eläimet ovat steriilejä. Tällaisille hiehoille ei tule koskaan kunnollista kiimaa ja niiden toissijaiset sukupuoliominaisuudet ovat yleensä heikosti kehittyneet samanikäisiin normaaleihin yksilöihin verrattuna. Sonnit sen sijaan omaavat normaalin tai jopa ylikorostuneet libidon ja ovat hyvinkin innokkaita astumaan. Erot sukupuolten välillä ovat selitettävissä sukupuolihormonien erilaisen tuotannon avulla. Ulkoisen kiiman merkkien aiheuttaa hiehoilla estrogeeni, jota ei follikkelien puuttuessa tuoteta. Sonneilla taas sukupuolikäytöksen aiheuttaa testosteroni, jota hypoplastisten kivesten Leydigin solut tuottavat normaalisti. Toispuoleisesti hypoplastisilla eläimillä toimiva sukurauhanen riittää normaaliin lisääntymiseen, mutta näyttäisi siltä, että ne karsitaan normaalia nuorempina karjasta. (Eriksson 1943). Toispuoleisesti hypoplastisten eläinten normaali munasarja on hieman suurempi kuin kumpikaan täysin normaalien eläinten munasarjoista (Settergren 1964).

Hypoplastiset munasarjat voidaan jakaa kolmeen eri luokkaan rektaalilöydösten perusteella. Täydellisessä hypoplasiassa munasarja on pieni ja litteä, eikä siinä tunnu olevan mitään merkkejä follikkeleista tai keltarauhasesta. Osittaisessa

hypoplasiassa munasarjan toinen pää on selvästi paksumpi ja siinä saattaa olla kystia, mutta normaalia munasarjatoimintaa ei ole havaittavissa. Välimuotoisessa hypoplasiassa munasarja on pavun muotoinen ja siinä saattaa olla tunnettavissa follikkeleita ja epätasaisuutta, joka voisi johtua vanhojen keltarauhasien jättämistä valkoarvista. Välimuotoisesti molemminpuolisesti hypoplastisilla yksilöillä voi myös olla heikkoja merkkejä kiimasta. Histologisten tutkimusten löydökset munasarjoista olivat yhteneviä rektaalitutkimusten löydösten kanssa ja jaettavissa vastaavasti kolmeen ryhmään. Sikiötutkimuksissa havaittiin alkuitusolujen määrän olevan hypoplastisissa sukurauhasissa pieni jo varhaisessa kehitysvaiheessa. (Settergren 1964).

Puberteetin aikana kivesten kasvun ollessa nopeinta, alkavat hypoplastiset kivekset jäädä selvästi normaaleita kiveksiä pienemmäksi (Kuva 1). Tällöin niiden erottaminen normaaleista kiveksistä tunnustelemalla tulee mahdolliseksi. Histologisesti hypoplastiset kivekset voidaan tunnistaa normaaleista jo ennen puberteettiä. Munasarjojen tapaan voidaan hypoplastiset kivekset jakaa kolmeen eri luokkaan. (Eriksson 1943).



Kuva1. Oikeanpuoleisen kiveksen hypoplasia

Hiiritutkimuksissa on havaittu alkuitusolujen määrän olevan selvästi pienempi dominoivan valkotäpläisyyden geenin (KitW) suhteen homotsygooteilla hiirillä, kuin niiden normaaleilla lajitovereilla. Lisäksi näillä hiirillä on huomattu alkuitusolujen lisääntymisessä ja vaelluksessa olevan merkittäviä eroavaisuuksia normaaleihin hiiriin verrattaessa. (Buehr 1993). Itusolujen puutoksen lapinlehmien vajaakehittyneissä sukurauhasissa onkin arveltu johtuvan alkuitusolujen virheellisestä vaelluksesta kehittyvään sukurauhaseen tai niiden heikentyneestä kyvystä lisääntyä yksilönkehityksen aikana (Settergren 1964).

Hiirellä on havaittu takasuolen endodermin laajentumisen vaikuttavan alkuitusolujen liikkeeseen soluvaelluksen alkutaipaleella. Sairailta hiirillä, joilla

endodermi ei laajene alkuitusolut eivät pääse aloittamaan soluvaellustaan normaalisti. (Hara ym. 2009). Vastaavaa havaittiin tutkittaessa alkuitusolujen vaellusta KitW hiirillä, joilla vaelluksen puuttumisen arvioitiin johtuvan viallisesta KIT-geenistä (Buehr 1993). Naudalla ruskuaispussin nopea laajeneminen on aiheuttanut epäilyä alkuitusolujen aktiivisen soluvaelluksen osuudesta niiden etsiytymisessä sukupuoliharjanteen tuntumaan. Myöskään sukupuoliharjanteen erittämien kemotaktisten aineiden osuutta alkuitusolujen etsiytymiseen harjanteeseen on epäilty, sillä alkuitusoluja havaittiin kehittyvän suk rauhasen lähistöllä jo ennen kuin sukupuoliharjanne on kehittynyt. Sukupuoliharjanteeseen ja sieltä kehittyvään suk rauhaseen siirtyvät alkuitusolut liikkuvat kehittyvien kudosten mukana ja aktiivisen vaelluksen kautta. (Wrobel & Süß 1998).

2.2 KIT ja soluvaellus

KIT (tunnetaan myös nimellä Ckit tai C-Kit) on transmembraaninen eli solukalvon läpäisevä reseptoriproteiini. Se aktivoi useita signaalinvälittäjäproteiineja solussa, jotka vastaavat soluspesifisten vasteiden säätelystä joko suoraan tai välillisesti jälkiaktivaation kautta. (Sette ym. 2000, Besmer ym. 1986). Solun sisäisten eri signaalinvälitysjärjestelmien aktivoituminen KIT-reseptorin toimesta riippuu siitä, mikä on solun kehityksen vaihe juuri sillä hetkellä (Sette ym. 2000). KIT aktivaatiolla on pleiotrooppinen eli moneen eri tapahtumaan osallistuva vaikutus ja sitä tarvitaan muun muassa alkuitusolujen, melanosyyttien esimuotojen ja verisolujen soluvaellukseen,

lisääntymiseen ja elossa säilymiseen (Wehrle-Haller & Weston 1995, Sette ym. 2000, Fésüs ym. 2006). KIT-reseptorin on myös todettu ohjaavan alkuitusolujen kiinnittymistä Sertolin soluihin kivesten normaalissa kehityksessä (Jordan ym. 1999). KIT on erittäin tärkeässä roolissa alkuitusolujen soluvaelluksen onnistumisen kannalta, mutta niiden syntyyn sikiönkehityksen aikana ei sillä ole havaittu olevan merkitystä. Alkuitusolut pystyvät liikkumaan ilman KIT aktivaatiotakin, mutta silloin niiden liike on epämääräistä. (Jordan ym. 1999)

KIT-geeni (Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog) koodaa kolmea eri lähetti-RNA:ta joista kaksi käännetään transmembraanisiksi KIT-reseptoreiksi. Reseptorien isomuotojen erot syntyvät erilaisesta silmikoinnista, ja niistä toisella afosforylaation määrä on toista isomuotoa korkeampi. Lisäksi translaation jälkeen proteiineja saatetaan muokata glykosylaation avulla eli liittämällä proteiiniin hiilihydraattiosia. Kolmas lähetti-RNA koodaa huomattavasti pienempää proteiinia, joka on vain osa täysmittaisen reseptorin solunsisäisestä rakenteesta. Transmembraanisia KIT-proteiineja esiintyy alkuitusoluilla soluvaelluksen aikana ja niiden esiintyminen loppuu kun solut alkavat erilaistua päästyään sukurauhasten esiasteisiin. Pienempää solunsisäistä osaa on havaittu lähinnä meioosin jälkeisissä itusoluissa. (Sette ym 2000, Merkwitz ym. 2011).

Näiden isomuotojen lisäksi on löydetty liuennut muoto, jossa normaalista transmembraanisesta KIT-reseptorista on irtautunut lähes koko solunulkoinen osa. Tämä liuennut KIT syntyy proteolyyttisten eli proteiineja pilkkovien reaktioiden kautta ja proteolyysin tapahtumisen taajuus on suoraan riippuvainen

sen hetkisestä kalsiumpitoisuudesta. Liennut KIT aiheuttaa ligandin kanssa reagoidessaan sen, ettei lienneeseen muotoon tarttunut ligandi enää pääse tarttumaan transmembraaniseen muotoon ja aktivoimaan solunsisäisiä signaalireittejä. Liennut KIT on olettavasti yksi elimistön normaaleista tavoista säädellä vapaan KIT-ligandin esiintymistä. Lisäksi liennut KIT on elimistön keino säädellä solun pinnalla olevien KIT-reseptorien määrää. (Merkwitz ym. 2011).

Hiirillä esiintyy 39 eri KIT mutaatiota, joista 37:ssä on muutoksia pigmentaatioissa, 22:ssa muutoksia verenkuvassa ja vain 15:sta on muutoksia sukusoluissa. Täysin toimimatonta KIT-reseptoria koodaavan mutatoituneen geenin on todettu aiheuttavan häiriöitä sukurauhasten kehityksessä jo heterotsygooteilla geenin kantajilla. Eriasteiset mutaatiot geenissä siis aiheuttavat eriasteisia häiriöitä solujen vaelluksessa. (Wu ym. 2010).

Kesysikojen valkoisen värin on havaittu johtuvan KIT mutaatiosta, joka aiheuttaa muutoksia melanosyyttien esimuotojen normaaliin soluvaellukseen. Tutkimuksessa laskettiin myös sikojen valkosolut, jolloin havaittiin valkoisilla kesysioilla olevan hieman alhaisemmat valkosoluarvot kuin villisioilla. (Marklund ym. 1998). Myöhemmin on tutkittu myös kesysikojen sukuelimiä ja hedelmällisyyttä, eikä niissä havaittu olevan poikkeavuuksia villisian sukuelimiin verrattaessa. Joten kesysikojen tapauksessa ei KIT mutaation havaittu aiheuttavan muutoksia alkuitusolujen soluvaellukseen, eikä heikentävän kesysikojen lisääntymiskykyä. (Fésüs ym. 2006). Naudoilla ei KIT-geenin yhteyttä sukurauhasten vajaakehittyneisyyteen ole aiemmin vielä tutkittu.

2.3 KIT-ligandi ja soluvaellus

Hiiritutkimuksissa on löydetty myös toinen mutaatio, jolla on vastaava ilmiasu kuin KitW genotyypin hiirillä. Näiltä hiiriltä löydetty mutaatio ei ole KIT-reseptoria koodaavassa geenissä, vaan KIT-ligandia koodaavassa geenissä. KIT-ligandi on hyvin lajispesifinen ja vaikuttaa alkuitusolujen soluvaelluksen lisäksi niiden kehitykseen ja lisääntymiseen. (Sette ym. 2000). Alkuitusolut eivät säily elatusaineella kovin pitkään ilman somaattisia soluja, jolloin keksittiin somaattisten solujen tuottaman KIT-ligandin alkuitusoluja elossa pitävä vaikutus (De Felici 2000).

KIT-ligandi on proteiini, jota esiintyy transmembraanisessa ja liuenneessa muodossa. Liuennut muoto syntyy proteolyttisesti solunulkoisen osan irrotessa vapaaksi molekyyliksi. (Sette ym. 2000). Liuenneen muodon on havaittu riittävän pitämään melanosyyttien esiasteet hengissä ja aloittamaan soluvaelluksen, mutta vasta transmembraanisen muodon läsnäolo saa aikaan solujen lopullisen erilaistumisen ja eloonjäämisen (Wehrle-Haller & Weston 1995). Alkuitusolut tarttuvat transmembraaniseen KIT-ligandiin ja sen esiintyminen lisää alkuitusolujen tarttumista somaattisten solujen pintaan (Merkwitz ym. 2011, De Felici 2000). Alkuitusolujen tarttuminen somaattisiin soluihin saattaisi De Felicin (2000) mukaan olla eräs keinoista estää niiden aberrantti eli epätavallista reittiä kulkeva soluvaellus. Melanosyyttien esiasteet seuraavat soluvaellusreittein varrella hetkellisesti ilmenevää KIT-ligandi aaltoa, joten KIT-ligandilla vaikuttaisi olevan myös kemotaktista merkitystä soluvaelluksen aikana eli solut vaeltavat kohti KIT-ligandin suurempaa

pitoisuutta (Wehrle-Haller & Weston 1995). Myös mast-solujen eli sidekudoksessa sijaitsevien tulehdussolujen vaellusreitit varrella olevien solujen on havaittu tuottavan KIT-ligandia, jolla on arveltu olevan merkitystä soluvaelluksen reittivalinnassa (Kinashi & Springer 1994).

Sekä vapaata että transmembraanista KIT-ligandia löytyy useista eri kudoksista, mutta niiden keskinäiset osuudet kokonaispitoisuudesta vaihtelevat yksilön- ja solujenkehityksen eri kehitysvaiheiden mukaan (Sette ym. 2000). Siitä miten paljon KIT-ligandia on liuenneena tai transmembraanisena ei ole tietoa, mutta KIT-ligandin pitoisuus saattaa vaikuttaa siihen rupeavatko vaikutuksen kohteena olevat melanosyyttien esiasteet jakautumaan mitoottisesti vai aloittavatko ne soluvaelluksen (Wehrle-Haller & Weston 1995). Vapaan KIT-ligandin lisäys saa alkuitusolut liikkeelle uudestaan vaikka ne olisivatkin jo pysähtyneet kohteeseensa. Lisäksi vapaan KIT-ligandin puute aiheuttaa solujen liiallista kerääntymistä transmembraanista KIT-ligandia tuottavan solukon läheisyyteen. Tämän on arvioitu viittaavan siihen, että vapaan KIT-ligandin tehtävä soluvaelluksen aikana olisi luoda pohja alkuitusolujen liikkeelle ja transmembraaninen muoto toimisi vaeltavien solujen reittioppaina. (Gu 2011).

Alkuitusolut tarvitsevat vaelluksensa aikana KIT-ligandia ympäristöstään pysyäkseen elossa ja liikkuakseen (Wehrle-Haller & Weston 1995). Tämä on havaittu useissa eri yhteyksissä, jolloin muuten erittäin kestävät alkuitusolut siirtyvät ohjattuun solukuolemaan eli apoptoosiin ilman KIT-ligandin vaikutusta. Alkuitusoluilla apoptoosiin siirtymistä ohjaa bax-proteiini, jota on löydetty erityisen runsaasti vaeltavista alkuitusoluista. Yksilöillä joilta bax-proteiinin

välittämä solukuolema on estetty, havaittiin alkuitusolujen säilyvän elossa yksilönkehityksen aikana myös ilman KIT-ligandia. Tällaisilla yksilöillä alkuitusolujen soluvaellus on häiriintynyt. (Runyan ym. 2006). Vastaavanlaisia havaintoja on tehty melanosyyttien esiasteita tutkimalla. Hiirillä, joilla solukuolema oli estetty, havaittiin että soluvaellusta ei tapahdu ilman KIT-ligandia. (Wehrle-Haller ym. 2001). Näiden tutkimusten johtopäätöksenä oli että KIT-ligandin elossa pitävät, soluvaelluksen käynnistävät sekä ylläpitävät vaikutukset voidaan erottaa toisistaan eri mekanismeilla tapahtuviksi (Runyan ym. 2006, Wehrle-Haller ym. 2001).

Liuenneen KIT-ligandin määrä on suurimmillaan alkuitusolujen soluvaelluksen aikana (Sette ym. 2000). Transmembraanisen KIT-ligandin määrä taas on korkeimmillaan sukurauhasten kehittyessä (Merkwitz ym 2011).

2.4 Ektooppinen KIT ja KIT copy number variation

Ektooppinen geeni on poikkeavassa paikassa sijaitseva geeni, jonka sijainti on muuttunut joko kromosomin sisäisesti tai sitten paikka on vaihtunut eri kromosomiin. Tämä saattaa vaikuttaa geenin ilmenemiseen riippuen siitä mitkä geenit ovat normaalisti aktiivisia solussa. Ektooppista geeniä ei välttämättä kopioida viesti-RNA:ksi, mikäli sen promoottorialue ei tue geenin transkriptiota. Eri geenien toimintaa onkin tutkittu siirtämällä haluttu geeni ektooppiseksi geeniksi tietyn promoottorin jatkeeksi. Eri geeneillä saattaa olla erilaiset vaikutukset yksilön eri kehitysvaiheissa ja silloin niiden virheellinen ilmeneminen saattaa aiheuttaa täysin päinvastaisen vasteen kuin normaalisti. (Phelps & Brand 1998). Copy number variation (CNV) eli kopioluvun vaihtelu tarkoittaa

tietyin geenin monistumista ja se on yksi tärkeimmistä ilmiöistä geneettisten muutosten joukossa (Seo B ym. 2007). Tietyn geenin kopion ektooppinen sijainti yksilön genomissa normaalin lisäksi on eräs kopioluvun vaihtelun muodoista.

Hiiressä on olemassa värimutaatio patch, jossa KIT-reseptoria koodaava geeni on ektooppisena kromosomissa viisi. Näillä hiiressä on havaittu olevan normaali KIT-ligandin tuotanto ja lisäksi melanosyyttien esivaiheilla on normaalit KIT-reseptorit ja ne reagoivat ligandiin normaalisti. Tietyissä kehitysvaiheissa kun melanosyyttien esivaiheet olivat jo aloittaneet vaelluksensa, havaittiin alkioissa KIT-geenin lähetti-RNA:ta runsaasti ektooppisissa paikoissa. Ektooppisesti esiintyvä KIT-reseptori vaikutti tutkimuksessa myös niin, että KIT-ligandia ei ektooppisten reseptorien alueella ollut havaittavissa normaaleja määriä. Ja tämän perusteella olisi todennäköistä, että ektooppinen KIT aiheuttaisi kilpailutilanteen ligandista, vaeltavien solujen ja ektooppisesti esiintyvien reseptorien välille. (Wehrle-Haller ym. 1996).



Kuva 2. Kyyttöväriyksinen lapinlehmä.

Eräillä nautaroduilla on havaittu kyyttöväriyksisen (Kuva 2) eli värin, jossa selkä on valkea ja kyljet värilliset, olevan yhteydessä ektooppiseen KIT-geeniin kromosomissa 29. Normaalisti KIT-geeni sijaitsee kromosomissa 6, mutta joillain nautoilla se on kopioitunut myös kromosomiin 29. Tämä ektooppinen KIT-geeni on toimiva ja luultavimmin aiheuttaa KIT-proteiinin liiallisen ilmentymisen sikiön kehityksen aikana. Nautojen valkoinen väri aiheutui melanosyyttien puuttumisesta, joten oletettavasti KIT-proteiinin liiallinen tuotanto heikentää melanosyyttien vaellusta. Lisäksi joillain nautaroduilla vastaavan värimuutoksen aiheuttaa myös normaalin KIT-geenin ja sen säätelyalueiden väliin kopioitunut pala väärää kromosomia. Tällöin geenin

säätely estyy ja se pääsee ilmenemään liikaa. Tutkimuksen perusteella Ruotsin tunturirodulla ja tällöin myös pohjoissuomenkarjalla on perimässään molemmat mutaatiot. Kuitenkaan millään muulla kyyttöväriytyksen omaavalla rodulla ei tiedetä olevan perinnöllistä sukurauhasten vajaakehittyneisyyttä. (Durkin ym. 2012).

Nykyisen kesysian värytys on pääsääntöisesti valkoinen ja siihen on huomattu vaikuttavan KIT-geenin monistuminen kromosomissa. KIT-geenin kahdentuminen aiheuttaa säätelyllisen epätasapainon reseptorin ja ligandin välillä ja on epäilty että kaksinkertainen määrä KIT-reseptoria aiheuttaisi kilpailutilanteen KIT-ligandista ja siksi estäisi sioilla melanosyyttien normaalin kehittymisen. Fenotyypiltään valkoisista sioista on olemassa kahta genotyyppiä, joiden välillä on erona monistuneen KIT-geenin mutaatio. Tällöin mutatoitunut KIT-geeni tuottaa oletettavasti viiallisen reseptorin. Reseptorin toiminnallisen häiriön on todettu hiirillä ja sioilla aiheuttavan suuremmat muutokset ilmiössä, kuin pelkän säätelyllisen häiriön. (Marklund ym. 1998).

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Nautojen kliininen tutkimus

Eläinten tutkiminen suoritettiin tilakäynneillä lehmien ja hiehojen osalta rektaalaisesti palpoimalla munasarjat. Kaikki yli 16 kuukauden ikäiset hiehot ja lehmät tutkittiin pois lukien yli 5 kuukautta tiineet eläimet. Nuorempien eläinten tutkiminen olisi ollut eläinten koon ja munasarjatoiminnan osalta epävarmaa. Yli

5 kuukautta kestäneiden tiineyksien osalta ei olisi välttämättä voitu tuntea munasarjoja kohdun suuren koon ja syvällä vatsaontelossa olevan sijainnin johdosta. Sonneilta ja sonnivasikoilta tunnusteltiin kivekset mahdollisten koko- ja symmetriaerojen varalta ja niistä mitattiin sekä ympärysmitta, että pituus. Sukurauhasten tutkimisen jälkeen osalta eläimiä otettiin 9 millilitraa laskimoverta EDTA-putkeen DNA-tutkimusta varten. Nautojen tutkiminen aloitettiin tammikuussa 2010 ja tutkimusta jatkettiin kesäkuuhun 2011 asti. Kaiken kaikkiaan 303 pohjoissuomenkarja nautaa tutkittiin kliinisesti.

Lehmillä ja hiehoilla tutkimuksessa sukurauhasten osalta vajaakehittyneiksi määriteltiin eläimet, joilla toinen tai molemmat munasarjat olivat hyvin pienet tai mahdottomat löytää rektaalitutkimuksessa (Kuva 3). Näissä tapauksissa pyrittiin mahdollisuuksien mukaan uusimaan tutkimus myöhempänä ajankohtana vajaakehittyneisyyden varmistamiseksi. Sonnivasikoilla määriteltiin toisen puolen kives vajaakehittyneeksi, jos sen koko oli korkeintaan puolet isommasta kiveksestä. Sonneilla taas vastaavasti todettiin kives vajaakehittyneeksi, jos sen koko oli korkeintaan kolmasosa suuremman kiveksen koosta (Kuva 4).

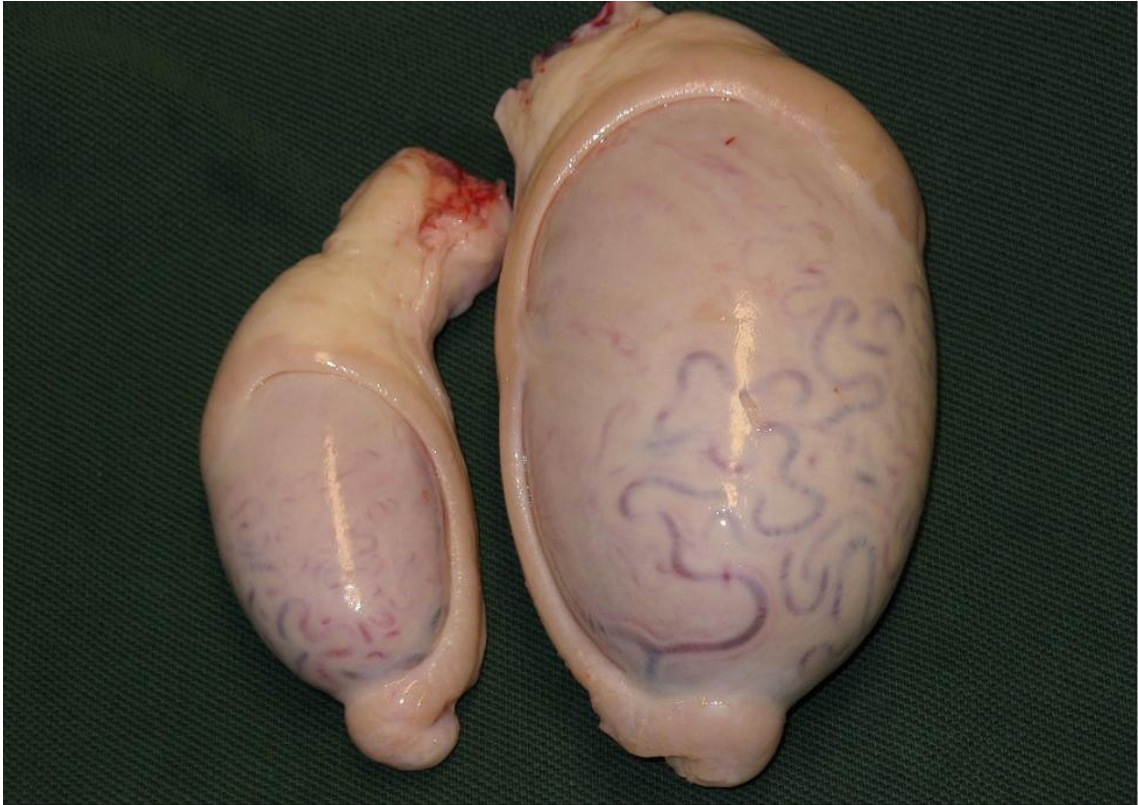
3.2 Sukurauhasten tutkimus teurastuksen tai kliinisen kastration jälkeen

Osa sukurauhasista tutkittiin vasta teurastuksen tai kliinisen kastration jälkeen. Tällöin teurastaja tai eläinlääkäri otti kivekset tai munasarjat (kohdun kanssa) talteen ja lähetti ne Saaren yksikköön tutkittavaksi. Sukurauhasia tarkasteltiin päällisin puolin ja niiden painot mitattiin. Lisäksi niistä otettiin myös histologiset näytteet ja DNA-näytteet. Sukurauhanen todettiin vajaakehittyneeksi yllä mainituin perustein ja histologisten leikkeiden avulla, joista ei löytynyt

sukusoluja tai niiden esiasteita. Yhteensä 42 pohjoissuomenkarjan naudan sukurauhaset tutkittiin teurastuksen tai kastration jälkeen vuosien 2010 ja 2011 aikana.



Kuva 3. Vasemmanpuoleisen munasarjan hypoplasia.



Kuva 4. Vasemmanpuoleisen kiveksen hypoplasia.

3.3 Geenitutkimusmenetelmät

Genotyypaukseen valittiin 96 naudan näytteet, joista 81 oli kerätty vuosien 2010-2011 aikana, 11 oli ennen vuotta 2010 kerättyjä yksittäisiä näytteitä ja kolme näytettä saatiin Ruotsin tunturirodun naudoista.

Näytteet genotyypitettiin kaupallisen Illumina BovineHD Bead sirun ja Illumina's *BeadStudio* ohjelmiston avulla. Genotyypitys epäonnistui 2 eläimen osalta ja ne jätettiin materiaalin ulkopuolelle. Tutkimukseen jäi 94 eläimen genotyypityksen tulokset.

Assosiaatiotutkimuksia varten eläimet jaettiin ryhmiin sairauden ja värityksen

mukaan. Ryhmät on esitelty taulukossa 1. Naudat joilla yli 30 % karvapeitteen pinta-alasta oli pigmentoitunut, laskettiin värillisten ryhmään. Arvio tehtiin silmämääräisesti tilakäynnillä tai kuvasta.

Taulukko 1. Nautojen jaottelu turkin värin ja hypoplasian esiintymisen suhteen

	Valkoiset	Värilliset	Ei tietoa väristä	Yht.
Hypoplastiset	Ryhmä 1. 22 kpl	-	-	22 kpl
Normaalit	Ryhmä 2. 24 kpl	Ryhmä 3. 18 kpl	30 kpl	Ryhmä 4. 72 kpl
Yht.	46 kpl	18 kpl	30 kpl	94 kpl

Eläimet jaettiin ryhmiin koko genomin laajuista assosiaatiotutkimusta varten (Taulukko 1) ja niitä verrattiin keskenään. Ryhmää 1 verrattiin ryhmiin 2, 3 ja 4. Ja ryhmiä 2 ja 3 verrattiin keskenään. Aineistosta tehtiin Fisherin eksakti testi Shaun Purcellin (2007) kehittämällä koko genomin assosiaatioihin tarkoitettulla *PLINK*-ohjelmalla. SNP:t (single-nucleotide polymorphism) testattiin myös Bonferronin menetelmällä, jossa P-arvot jaetaan testien määrällä. Korjatun raja-arvon ($P < 7,71 \times 10^{-8}$) alle jääviä tuloksia pidettiin merkittävinä.

Kopioluvunvaihtelun havaitsemiseksi tulokset analysoitiin *PennCNV*-ohjelmalla (Wang ym. 2007) ja tulosten tilastollinen merkitsevyys varmistettiin Fisherin eksaktilla testillä.

4 TULOKSET

4.1 Gonadihypoplastiset yksilöt

Vuosien 2010 ja 2011 aikana tutkittiin yhteensä 345 pohjoissuomenkarjan nautaa. Näistä 16 oli hypoplastisia, 231 normaaleja ja 98 kohdalla selkeää diagnoosia ei voitu tehdä. Hypoplastisista naudoista 14 oli vasemmanpuoleisesti vajaakehittyneet sukurauhaset ja 2 oikeanpuoleisesti vajaakehittyneet sukurauhaset.

4.2 Genotyyppaus tulokset

Genomin laajuudessa assosiaatiotutkimuksessa (GWAS) ryhmien 1. ja 3. välillä (Taulukko 1) löytyi 16 merkittävää assosiaatiota kromosomissa 29 ($P=5,59 \times 10^{-12}$). Toisessa GWAS-tutkimuksessa ryhmien 1. ja 4. välillä löytyi 5 merkittävää assosiaatiota kromosomista 29 ja 1 merkittävä assosiaatio kromosomista 23 ($P=7,88 \times 10^{-10}$). Ryhmien 1. ja 2. sekä ryhmien 2. ja 3. välillä tehdyssä GWAS-tutkimuksessa ei löytynyt merkittävää assosiaatiota. Nämä löydökset viittaavat vahvasti siihen että kromosomi 29 on yhteydessä gonadien hypoplasiaan. Kromosomista 23 löydetty yksi merkittävä assosiaatio on todennäköisesti virhepositiivinen löydös.

Kopioluvun vaihteluita (CNV) löydettiin kaikilta tutkituilta 94 eläimeltä yhteensä 2101 kappaletta. Kromosomista 6 löydetty CNV-alue sisältää kokonaan KIT-geenin ja se liittyy merkittävästi gonadien hypoplasiaan. Tämä CNV löytyi kaikilta 22 hypoplastiselta ja 35 terveeltä kontrolliryhmän eläimiltä. Toinen CNV-segmentti kromosomissa 29 löytyi 16 hypoplastiselta ja 43 terveeltä eläimeltä. Kromosomista 29 löytynyt CNV on GWAS-tutkimuksessa löydetyn alueen välittömässä läheisyydessä.

5 POHDINTA

Lapinlehmillä tavattavassa sukurauhasten vajaakehittyneisyydessä ovat kivekset tai munasarjat muuten normaaleita, mutta niiden koko on selvästi tavallista pienempi ja niistä puuttuvat itusolut. Erikoisen tilasta tekee se, että juuri vasemmanpuoleinen kives tai munasarja on se jonka kehityksessä on useimmiten puutteita. Toispuoleisesti sukurauhasiltaan vajaakehittyneiden normaalin lisääntymiskyvyn aiheuttaa osittain toimivan sukurauhasen suurempi koko ja oletettavasti korkeampi aktiivisuus (Settergren 1964). Itusolujen puute sukurauhasissa voisi johtua yksilönkehityksen alkuvaiheen virheestä, jossa alkitusolut jäisivät kokonaan muodostumatta. Silloin molempien sukurauhasten tulisi olla pieniä ja ilman itusoluja. Tämän perusteella on kuitenkin todennäköisempää, että ongelman takana on häiriö alkuitusolujen soluvaelluksessa tai lisääntymisessä.

Sukurauhasten vajaakehittyneisyyden on havaittu olevan yhteydessä valkoiseen turkin väriin (Settergren 1964) ja sitä on havaittu erityisesti eläimillä,

joilla ei ole pigmenttiä muualla kuin turvassa ja korvissa. Lapinlehmät ovat tyypillisesti pääosin valkoisia, mutta ne saattavat olla kyljiltään värillisiä. Durkin ym. (2012) löysi kyljistään pigmentoituneilta naudoilta ektooppisen KIT-geenin kromosomista 29, joka on löydetty nyt myös lapinlehmiltä (Venhoranta ym. 2012). Samoin nykyään lihantuotannossa suosittavilla turkiltaan ja iholtaan pääasiassa valkoisilla sikaroduilla, on havaittu olevan kopio KIT-geenistä perimässään (Marklund ym. 1998). Sioilla tai muilla nautaroduilla, kuin pohjoissuomenkarjalla tai tunturirodulla, ei kuitenkaan ole havaittu sukurauhasissa vajaakehityksen merkkejä tai alentunutta hedelmällisyyttä (Durkin ym. 2012, Fésüs ym. 2006).

Hiirillä on raportoitu useita mutaatioita sekä KIT-reseptorissa, että sen ligandissa. Niiden ilmiäsuojen eroavaisuudet riippuvatkin hyvin pitkälti siitä, miten vakavasti KIT-reseptorin ja ligandin väliseen vuorovaikutukseen mutatoituneiden geenien tuotteet vaikuttavat. Voimakkaimmat muutokset on havaittu tapauksissa, joissa geenituotteet ovat kokonaan toimimattomia ja lievempiä muutoksia on hiirillä, joiden KIT-geenin mutaatioilla on lähinnä säätelyllistä merkitystä (Marklund ym. 1998). Kopoluvun vaihtelu ja ektooppinen ilmeneminen ovat molemmat geenin säätelyyn vaikuttavia tekijöitä, jotka saattavat muuttaa geenin normaalia ilmentymistä.

Sukurauhasten osalta vajaakehittyneiltä lapinlehmiltä on nyt löydetty sekä kopio KIT-geenistä että sen ektooppinen sijainti kromosomissa 29. KIT on merkittävässä roolissa itusolujen, melanosyyttien ja verisolujen kehityksessä, soluvaelluksessa ja elossa pysymisessä, joten sen mahdollisesti liiallinen määrä

olisi sopiva löydös lapinlehmien sukurauhasten vajaakehitykseen. Ilmiasun muutokset selittäisi KIT-reseptorin ja KIT-ligandin välisen interaktion häiriöt, KIT aktivaation vähyys voisi aiheuttaa alkuitusolujen epätäydellisen vaelluksen.

KIT ilmenee erittäin runsaana alkuitusoluissa, joten moninkertainen määrä sitä aiheuttaa ligandista kilpailutilanteen alkuitusolujen kesken. Koska juuri liuennut muoto aiheuttaa alkuitusolujen määrätietoisien soluvaelluksen, voisi olettaa että liian vähäinen ligandin määrä suhteessa reseptoreihin aiheuttaisi osalle alkuitusoluista vaikeuksia soluvaelluksen aloittamisessa. Tämä taas johtaisi siihen, etteivät nämä riittämättömästi KIT-ligandia saavat alkuitusolut ehdi vain hetkellisesti soluvaelluksen aloituspaikasta alkavan KIT-ligandiaallon mukaan, vaan jäisivät liian kauas KIT-ligandin alkuitusoluja houkuttelevasta vaikutusalueesta ja alkaisivat mennä apoptoosiin KIT-ligandin puuttuessa niiden saatavilta. Tätä teoriaa tukee osittain se, että ligandin puutteessa alkuitusolujen liikkuminen on myös hitaampaa (Jordan ym. 1999).

Ektooppinen KIT aiheuttaa myös kilpailutilanteen KIT-ligandista ja sen on hiirillä tehdyissä tutkimuksissa havaittu melanosyyttien esiasteilla aiheuttavan kykenemättömyyttä hakeutua lateraaliseen vaellusreitille (Wehle-Haller ym. 1996). Kyseessä on vastaavanlainen tilanne, kuin alkuitusolujen pinnalla esiintyvän KIT-reseptorin liiallisessa määrässä. Ektooppisesti väärässä kromosomissa sijaitseva KIT ei välttämättä ole pääsääntöisesti alkuitusoluissa esiintyvä, vaan sen esiintyminen voi hyvinkin tapahtua myös muissa kudoksissa. Tällöin liuenneen KIT-ligandin määrä normaalilla alueellaan voi olla liian pieni. Lisäksi ektooppinen KIT saattaa ilmetä väärän kromosomisijaintinsa

johdosta sellaisina aikoina yksilönkehityksessä, että sen vaikutukset eivät ole vastaavia, kuin peräkkäin samassa kromosomissa sijaitsevin kopioiden. Tällöin sen vaikutukset voivat olla arvaamattomia ja se saattaa aiheuttaa vain hetkittäisiä kilpalutilanteita KIT-ligandista.

KIT voi esiintyä myös proteolyysin irrottamana vapaana, solunulkoisessa tilassa olevana muotona (Merkwitz ym 2011). Vapaana oleva KIT ei aktivoi solun signaalireittejä, vaan sitoo KIT-ligandia estäen sen sitoutumisen solun pinnalla oleviin KIT-reseptoreihin. Vapaan KIT-reseptorin epäillään osallistuvan KIT-ligandin konsentraatiogradientin luomiseen sitomalla vapaata KIT-ligandia (Merkwitz ym. 2011). Liiallinen vapaan KIT-reseptorin määrä pienentäisi vapaan KIT-ligandin määrää niin että osa alkuitusoluista jäisi normaalin konsentraatiogradientin vaikutuspiirin ulkopuolelle. Transmembraaniset KIT-ligandit voivat peittyä liiallisesta vapaasta KIT-reseptorista. Tämä estäisi transmembraanisen KIT-ligandin alkuitusoluja elossa pitävät ja lisääntymistä lisäävät vaikutukset. Tällöin alkuitusolujen määrä jäisi jo heti alkuunsa selvästi normaalia pienemmäksi.

Alkuitusolujen normaalista poikkeava soluvaellus ja lisääntyminen selittyisivät KIT-reseptorin ja KIT-ligandin välisellä epäsuhteella, mutta syytä juuri vasemmanpuoleisen sukurauhasen vajaakehityksen yleisyyteen se ei selitä. Ektooppisen KIT-reseptorin aiheuttamat puutteet melanosyyttien esiasteiden kyvyssä päästä lateraaliselle vaellusreitille (Wehrle-Haller ym. 1996) voisivat toimia mallina myös alkuitusolujen tapauksessa. Tällöin alkuitusolujen lateraalinen liike häiriytyisi, eivätkä ne jostain syystä kulkeutuisi kunnolla juuri

vasemmanpuoleiseen sukupuoliharjanteeseen.

Pohjoissuomenkarjan naudoilla esiintyvä ektooppinen KIT voi olla mutatoitunut ja toimimaton, jolloin alkuitusolujen liike ja elossa pysyminen voisi sitä kautta olla normaalista poikkeava. Mikäli geenituote olisi täysin toimimaton, niin vaikutuksien tulisi olla voimakkaampia. Kesysiolla on perimässään kopio KIT-geenistä. KIT-geenin suhteen on olemassa kahta eri genotyyppiä, joista toisella KIT-geenin kopio koodaa toimimatonta KIT-reseptoria. Sioilla on havaittu, että toimimaton KIT aiheuttaa jo heterotsygoottina merkittävät muutokset melanosyyttien esiasteiden soluvaellukseen ja näin ollen valkoisen ihon ja turkin värin (Marklund ym. 1998). Tämä olisi todennäköistä, jos mutatoitunut KIT sitoisi KIT-ligandin normaalisti eikä aktivoisi solun sisäisiä signaalireittejä. Mikäli KIT-ligandin kiinnittyminen toimimattomaan mutatoituneeseen KIT-reseptoriin olisi epätäydellistä, niin yksi normaalisti toimiva KIT-geeni voisi riittää alkuitusolujen ja melanosyyttien esiasteiden tavanomaiseen käyttäytymiseen soluvaelluksessa. Tässä tapauksessa yksilönkehityksessä ei pitäisi tapahtua normaalista poikkeavaa ja tällaisten eläinten pitäisi olla sekä sukurauhasten, että värityksen osalta normaaleja.

Myös muita mahdollisuuksia alkuitusolujen puutokseen sukurauhasissa on esitetty. Esimerkiksi yksilönkehityksen aikana alkuitusolujen kanssa tekemisissä olevien rakenteiden poikkeava kehitys voi aiheuttaa sen, etteivät alkuitusolut pääse normaalille vaellusreitilleen (Hara ym 2009). Silloin vaellusreitien varrella olevat rakenteet saattavat aiheuttaa fyysikaalisen, läpäisemättömän esteen alkuitusoluille. Tällöin alkuitusolut joutuvat liian kauaksi KIT-ligandin

vaikutuspiiristä ja menevät apoptoosiin. Kyseenalaiseksi tämän tyyppisen kehityshäiriön tapahtumisen lapinlehmien sukurauhasten vajaakehityksessä, tekee se että toinen sukurauhanen yleensä kuitenkin kehittyy normaalisti. Fysikaalisen esteen luulisi kokonaan estävän alkuitusolujen soluvaelluksen. Lisäksi genotyyppitys ei antanut merkkejä siitä, että muut kuin KIT-geeni olisivat osallisia pohjoissuomenkarjan naudoilla esiintyvään sukurauhasten vajaakehittyneisyyteen.

Lapinlehmien sukurauhasten vajaakehittyneisyyden ja ektooppisen KIT-geenin välillä on vahva yhteys, mutta se ei vielä riitä todistamaan että normaalia suurempi KIT-reseptorien määrä olisi syynä alkuitusolujen soluvaelluksen puutteisiin. Lisääntynyt reseptorien määrä aiheuttaa todennäköisesti samanlaisen muutoksen alkuitusolujen vaelluskäyttäytymiseen, kuin KIT-ligandin puutos. Erityisesti liuenneen KIT-ligandin puutoksessa soluvaellus on puutteellista (Wehrle-Haller ym. 1995). Liuenneen KIT-ligandin vähäinen määrä on myös todennäköisin syy Buehrin (1993) havaitsemaan alkuitusolujen liialliseen keräytymiseen hiirillä. Tämän tyyppinen kasautuminen johtuu todennäköisesti transmembraaniseen KIT-ligandiin kiinnittyvistä alkuitusoluista, jotka eivät liiku liuenneen KIT-ligandin puutteessa.

Yksilönkehityksen erot hiiriin verrattuna ja erityisen pitkät solujen kulkemat matkat naudoilla tekevät nauta- ja hiirimalleista osin vertailukelvottomia. Aktiivista alkuitusolujen soluvaellusta kehittyvään sukupuoliharjanteeseen on naudalla pidetty mahdottomana nopean koon kasvun takia ja muiden solukoiden liikkeiden on arveltu avustavan sitä (Wrobel & Süß 1998). Tämän

voisi päätellä vaikuttavan siihen, ettei sukurauhasten vajaakehittymisen ilmeneminen ole kovinkaan täydellistä eläimillä joilla on runsaasti KIT-geenejä. Tällöin sukurauhasten kehityksen virheet KIT ylimäärässä rajoittuisivat pääsääntöisesti siihen vaiheeseen, kun alkuitusolut siirtyvät kehittyvään sukupuoliharjanteeseen. Tällöin niiden normaali liike liunneen KIT-ligandin vaikutuksesta ja tarttuminen transmembraaniseen KIT-ligandiin saattavat sattumanvaraisesti aiheuttaa sen, ettei toiseen tai molempiin sukurauhasiin pääse ollenkaan alkuitusoluja.

Pohjoissuomenkarjalla esiintyvän ektooppisen KIT-geenin liittymisestä sukurauhasten vajaakehittyneisyyteen on näyttöä, mutta vajaakehittyneisyyden aiheuttavia mekanismeja ei vielä tiedetä ja tutkimukset aiheeseen liittyen ovat vielä kesken. On mahdollista, että ektooppinen KIT-geeni poikkeaa normaalista KIT-geenistä ja siksi aiheuttaa muutokset värin lisäksi myös alkuitusolujen soluvaellukseen tai lisääntymiseen. Durkin ym. (2012) eivät havainneet tutkimuksissaan poikkeavuuksia tutkimuksessa käytettyjen nautojen sukurauhasissa, mutta vajaakehittyneisyyden pieni ilmenemistäajuus saattaa olla syynä tähän.

7 LÄHTEET

7.1 Väitöskirjat

Eriksson K. Hereditary forms of sterility in cattle, biological and genetical investigations. Håkan Ohlssons Boktryckeri, Lund 1943

Settergren I. The ovarian morphology in clinical bovine gonadal hypoplasia with some aspects of its endocrine relations. *Acta veterinaria scandinavica* 1964, Volume 5 supplementum 1.

7.2 Artikkelit

Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu FH, Bergold PJ, Lederman L, Snyder HW, Brodeur D, Zickerman EE, Hardy WD. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* 1986, 320: 415-421.

Buehr Mia, McLaren Anne, Bartley Aine, Darling Susan. Proliferation and migration of primordial germ cells in We/We mouse embryos. *Developmental Dynamics* 1993, 198: 182-189.

De Felici M. Regulation of primordial germ cell development in the mouse. *Int. J. Dev. Biol.* 2000, 44: 575-580.

Durkin K, Coppieters W, Drögemüller C, Ahariz N, Cambisano N, Druet T, Fasquelle C, Haile A, Horin P, Huang L, Kamatani Y, Karim L, Lathrop M, Moser S, Oldenbroek K, Rieder S, Sarteler A, Sölkner J, Stålhammar H, Zelenika D, Zhang Z, Leeb T, Georges M, Charlier C. Serial translocation by means of circular intermediates underlies colour sidedness in cattle. *Nature* 2012, 482: 81-86.

Fésüs L, Péter S, Osváth Z, Zsolnai A, Komlósi I, Rátky J. Influence of the Dominant White/KIT Genotypes on the Reproductive Organs of Pigs. *Journal of*

reproduction and development 2006, 52: 707-713.

Geissler E, McFarland E, Russel E. Analysis of pleiotropism at the dominant white spotting (W) locus of the house mouse: A description of ten new alleles. *Genetics* 1980, 97: 337-361.

Godin I, Wylie C, Heasman J. Genital ridges exert long-range effects in mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* 1990, 108: 357-363.

Gu Y, Runyan C, Shoemaker A, Surani AM, Wylie C. Membrane-Bound Steel Factor Maintains a High Local Concentration for Mouse Primordial Germ Cell Motility, and Defines the Region of Their Migration. *PLoS ONE* 2011, 6(10): e25984

Hara K, Kanai-Azuma M, Uemura M, Shitara H, Taya C, Yonekawa H, Kawakami H, Tsunekawa N, Kurohmaru M, Kanai Y. Evidence for crucial role of hindgut expansion in directing proper migration of primordial germ cells in mouse early embryogenesis. *Developmental Biology* 2009, 330: 427-439.

Jordan SA, Speed RM, Bernex F, Jackson IJ. Deficiency of Trp53 rescues the male fertility defects of Kit(W-v) mice but has no effect on the survival of melanocytes and mast cells. *Developmental Biology* 1999, 215: 78-90.

Kierszenbaum AI, Tres LI. Primordial germ cell-somatic cell partnership: A balancing cell signaling act. *Molecular reproduction and development* 2001, 60: 277-280.

Kinashi T, Springer TA. Steel factor and c-kit regulate cell-matrix adhesion. *Blood* 1994, 83: 1033-1038.

Marklund S, Kijas J, Rodriguez-Martinez H, Rönstrand L, Funa K, Moller M, Lange D, Edfors-Lilja I, Andersson L. Molecular basis for the dominant white phenotype in the domestic pig. *Genome research* 1998, 8: 826-833.

Merkwitz C, Lochhead P, Tsikolia N, Koch D, Sygnecka K, Michiharu S, Spanel-Borowski K, Ricken AM. Expression of KIT in the ovary, and the role of somatic precursor cells. *Prog Histochem Cytochem* 2011, doi:10.1016/j.proghi.2011.09.001

Phelps CB, Brand AH. Ectopic gene expression on *Drosophila* using GAL4 system. *A companion to methods in enzymology* 1998, 14: 367:379.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ, Sham PC. PLINK: A tools set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The american journal of human genetics* 2007, 18: 559-575.

Richardson BE, Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Molecular Cell Biology* 2010, 10: 37-49.

Runyan C, Schaible K, Molyneaux K, Wang Z, Levin L, Wylie C. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development* 2006, 133: 4861-4869.

Seo B, Park E-W, Ahn S-J, Lee S-H, Kim J-H, Im H-T, Lee J-H, Cho I-C, Kong I-K, Jeon J-T. An accurate method for quantifying and analyzing copy number variation in porcine KIT by an oligonucleotide ligation assay. *BMC Genetics* 2007, 8: 81.

Sette C, Dolci S, Geremia R, Rossi P. The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int. J. Dev. Biol.* 2000, 44: 599-608.

Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, Grant SFA, Hakonarson H, Bucan M. PennCNV: An integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome research* 2007, 17: 1665-1674.

Wehrle-Haller B, Meller M, Weston JA. Analysis of melanocyte precursors in Nf1 mutants reveals that MGF/KIT signaling promotes directed cell migration independent of its function in cell survival. *Developmental Biology* 2001, 232: 471-483.

Wehrle-Haller B, Morrison-Graham K, Weston JA. Ectopic c-kit expression affects the fate of melanocyte precursors in Patch mutant embryos. *Developmental Biology* 1996, 177: 463-474.

Wehrle-Haller B, Weston JA. Soluble and cell-bound forms of steel factor play distinct roles in melanocyte precursor dispersal and survival on the lateral neural crest migration pathway. *Development* 1995, 121: 731-742

Wrobel K-H, Süß F. Identification and temporospatial distribution of bovine primordial germ cells prior to gonadal sexual differentiation. *Anatomy and Embryology* 1998, 197: 451-467

Wu BJ, Yin LJ, Yin HP, Ying XS, Yang WW, Zeng YM, Zhu J, Kang XD, Liu GJ, Yu LP, Gu ME, Wu PL. A mutation in the Kit gene leads to novel gonadal phenotypes in both heterozygous and homozygous mice. *Hereditas* 2010, 147: 62-69