



Kandidaatintutkielma

Aspartyyli-glukosaminuria

Katariina Narraway

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet

Sisällys

1. Johdanto	4
2. Taudinkuva.....	5
2.1. Oireet	5
2.2. Diagnoosi.....	6
2.3. Hoito	6
3. Aspartyyli-glukosaminidaasi	7
3.1. Rakenne	7
3.2. Synteesi.....	9
3.3. Ligandin sitoutuminen.....	11
3.4. Toimintamekanismi	12
4. Taudin synty	13
4.1. AGA-geeni.....	13
4.1.1. AGA-geenin mutaatiot	14
5. Tulevaisuuden näkymät.....	17
6. Yhteenveto	19
7. Kirjallisuuslähteet.....	20

Käytetyt lyhenteet

AAV	Adeno-associated virus
AGA	Aspartyyli-glukosaminidaasi
AGU, AGU-tauti	Aspartyyli-glukosaminuria
AH	α -ketjun α -heliksi
AS	α -ketjun β -juoste
BH	β -ketjun α -heliksi
BS	β -ketjun β -juoste
GlcNAc	N-asetyyli-glukosamiini
kDa	Kilodalton
pKa	Happovakion negatiivinen kymmenkantainen logaritmi

1. Johdanto

Aspartyyli-glukosaminuria (AGU) on harvinainen hermostoa rappeuttava lysosomaalinen varastointisairaus. AGU-tauti johtaa kuolemaan 60 ikävuoteen mennessä sen vaikea-asteisen luonteen vuoksi. Suomalaisen perustajavaikutuksen seurauksena AGU-tautia tavataan Suomessa huomattavasti enemmän kuin muualla maailmassa, vaikka sitä tavataan kaikissa populaatioissa (Goodspeed et al., 2022). Täten AGU-tauti on yksi 36:sta suomalaiseen tautiperintöön kuuluvasta sairaudesta, ja sen esiintyvyys Suomessa on 1:18000 (Norio, 2003). AGU-tauti on Suomen yleisin peittyvästi periytyvä sairaus (Arvio & Mononen, 2016).

AGU-tauti havaittiin ensimmäistä kertaa vuonna 1967 sattumalta, kun Jorma Palo tutki fenyyliketonurian esiintymistä Suomessa. Samana vuonna tauti havaittiin myös kahdessa brittiläisessä sisaruksessa (Norio, 2003).

AGU-tauti aiheutuu aspartyyli-glukosaminidaasi-entsyymiä (AGA) koodaavan geenin mutaatioista, jotka aiheuttavat AGA:n aktiivisuuden heikkenemisen. Aspartyyli-glukosaminidaasi on lysosomaalinen entsyymi, joka osallistuu N-linkitettyjen glykoproteiinien hajotukseen lysosomeissa (Riikonen et al., 1996). Kun AGA:n aktiivisuus on puutteellinen, aspartyyli-glukosamiinia ja muita glykoasparagiineja kertyy solujen lysosomeihin. Tämä vahingoittaa etenkin aivojen soluja, mikä johtaa vaikeaan kehitysvammaisuuteen. Tyypillisiin oireisiin kuuluu puhe- ja oppimiskykyjen heikentyminen ja myöhemmällä iällä myös epileptiset kohtaukset ovat yleisiä (Norio, 2003).

Suomessa yleisin AGU-tautia aiheuttava mutaatio, AGU_{Fin} major, esiintyy 98 % suomalaisista AGU-potilaista, ja arviolta yksi 50-60 suomalaisesta kantaa tätä mutaatiota (Arvio & Mononen, 2016). Kyseinen mutaatio on kaksoispistemutaatio, joka inaktivoi AGA-entsyymin. AGU_{Fin} major -mutaatiota tavataan myös Ruotsissa ja Norjassa. Suomessa harvinaisempi mutaatio, AGU_{Fin} minor, aiheutuu kahden nukleotidin häviämistä. (Norio, 2003).

AGU-taudille ei vielä ole parannukeinoja, mutta useiden eri menetelmien mahdollisuuksia AGU-taudin hoidossa tutkitaan. Tällä hetkellä AGU-taudin hoito perustuu ilmenevien oireiden hoitamiseen. AGU-tauti on mahdollista diagnosoida lapsivesitutkimuksissa ja Suomessa myös geenitestillä (Norio, 2003).

Tämän kirjallisuuskatsauksen tarkoitus on esitellä yleisesti aspartyyli-glukosaminuria ja sen mahdolliset hoitokeinot. Lisäksi tutkielmassa tarkastellaan yksityiskohtaisemmin AGU-taudin taustalla olevia biokemiallisia syitä.

2. Taudinkuva

Suomessa valtaosa AGU-taudin esiintymistä johtuu yhdestä kaksoispistemutaatiosta, mutta tautia esiintyy kaikissa populaatioissa eri mutaatioiden seurauksina. Taudinkuva on kuitenkin hyvin samanlainen kaikilla AGU-potilailla (Arvio & Arvio, 2007).

AGU-tautia sairastavien kehitys tapahtuu sikiövaiheessa usein ilman ongelmia. Varhaislapsuudessa potilas oppii uusia taitoja hitaasti, mutta varmasti (Arvio & Arvio, 2007). Yleensä lapsen kehitys on normaalia toiseen tai kolmanteen ikävuoteen asti, ja lapsena he kykenevät suhteellisen itsenäiseen arkeen (Arvio & Arvio, 2007; Harjunen et al., 2020). Osa potilaista voi olla 7-10 vuoden ikäisenä lähellä ikätovereitaan kognitiivisten taitojen osalta. Tällöin heillä usein on enemmän vaikeuksia käsittelytaidoissa kuin verbaalisessa ymmärtämisessä (Harjunen et al., 2020). Murrosiän aikana oppiminen kuitenkin heikentyy ja noin kymmenen vuoden tasainen vaihe alkaa. Tämän vaiheen aikana potilas voi menettää joitain taitoja. Joillain potilailla voi olla hämmennyksen kausia murrosiän aikana, ja nämä jaksot voivat usein olla kunnan heikkenemisen ensimerkkejä. AGU-potilaiden kykyjen huippu saavutetaan 13-16 -vuotiaina, jolloin he ovat terveiden 5-6 -vuotiaiden tasolla. 25-28 ikävuoden jälkeen tapahtuu nopeaa kehitysvammaisuuden etenemistä sekä henkisesti että fyysisesti. Keski-ikäiset potilaat ovat vaikeasti kehitysvammaisia, hiljaisia ja rauhallisia, mutta aggressiivisia, kun heitä häiritään. Tällöin he myös tarvitsevat muiden apua jatkuvasti (Arvio & Arvio, 2007).

Naiset elävät keskimäärin 40-vuotiaiksi, ja miehet 35-vuotiaiksi. Yleisin kuolemansyy on keuhkokuume, minkä vuoksi potilaiden kunto heikkenee huomattavasti ennen menehtymistä. Potilaista tulee yhä väsyneempiä ja he voivat kokea aivojen liikesäätelyn häiriöitä (Arvio & Arvio, 2007).

2.1. Oireet

Aspartyyli-glukosaminurian pääpiirteisiin kuuluvat heikentynyt aivotoiminta, henkinen kasvu ja elinajan odote. Täten AGU-taudin selkein piirre on kehitysvammaisuus. Sairauden ensioireisiin kuuluu kasvupyrähdys varhaislapsuuden aikana, ja AGU-lapsilla on tavallista suurempi pää (Arvio & Arvio, 2007). Ensioireisiin kuuluu lisäksi myös puhekyvyn viivästynyt kehitys sekä kömpelyys (Harjunen et al., 2020). Keski-ikäisillä on puolestaan tavallista

pienempi pää ja he ovat lyhyitä. Murrosikä myös alkaa nuorena; tytöillä alkaa kuukautiset noin kymmenen vuoden ikäisenä, ja nuorilla pojilla on isot kivekset. Murrosikäisillä tytöillä paino usein nousee, mutta vanhetessa se putoaa merkittävästi. AGU-potilaiden jalat ovat tyypillisesti ohuet ja heillä on pihtipolvet. Lisäksi potilaiden vatsa pullistuu, mikä korostuu selkärangan kaareutumisesta (Arvio & Arvio, 2007).

2.2. Diagnoosi

Vanhemmat usein vievät lapsensa lääketieteellisiin tutkimuksiin puheen kehityksen viivästymisen, keskittymisvaikeuksien, kömpelyden, ja joissain tapauksissa levottomuuden vuoksi. AGU-tauti diagnosoidaan potilaille Suomessa keskimäärin 5,5 vuoden ikäisenä ja muualla maailmassa 10 vuoden ikäisenä (Arvio & Arvio, 2007; Harjunen et al., 2020).

AGU-taudin diagnosointi tapahtuu tutkimalla virtsan oligosakkarideja ja glykosyyliasparagiinien aktiivisuutta. Lisätutkimuksia tehdään, jos aspartyyli-glukosamiinia ja muita glykoasparagiineja on kertynyt virtsaan. Tällöin mitataan glykosyyliasparagiinien aktiivisuutta esimerkiksi veren seerumista, leukosyyteistä tai fibroblasteista (Arvio & Mononen, 2016).

AGU-tautia voidaan myös etsiä ennen synnytystä tutkimalla aspartyyli-glukosaminidaasin aktiivisuutta lapsivesinäytteen soluviljelmissä, suonikalvon näytteissä tai suoraan lapsivesinäyteessä. Lapsivesinäytteen glykoasparagiinien suora analysointi ei kuitenkaan välttämättä anna luotettavia tuloksia (Arvio & Mononen, 2016). AGU_{Fin} major- ja minor-mutaatioiden tutkimiseksi on kehitetty DNA testejä, joilla voidaan testata, kantaako yksilö AGU-tautia aiheuttavia alleleja (Arvio & Mononen, 2016).

2.3. Hoito

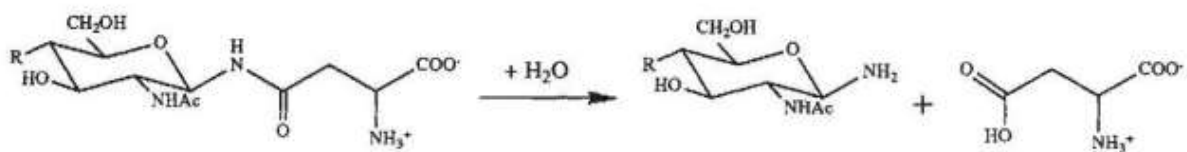
Aspartyyli-glukosaminurialle ei tällä hetkellä ole olemassa parannusta. Joillekin potilaille on Suomessa ja Ruotsissa testattu luuytimen siirtoa, mutta se on osoittautunut tehottomaksi. Täten AGU-tautia hoidetaan aina ilmenevien oireiden mukaisesti (Arvio & Mononen, 2016).

AGU-potilaat tarvitsevat paljon hoitoa, etenkin heidän ensimmäisten ja viimeisten elinvuosien ajan. Potilaat ovat useimmiten terveitä kouluikäisinä. Antibioottien lisäksi AGU-potilaat tarvitsevat kirurgista hoitoa; kitarisanpoistoa, korvaputkien laittoja, tyräleikkauksia, sekä jalkapöytäluiden operaatioita. Keski-ikäisillä potilailla kehitty

tulehduksia syvälle ihoon, kroonisia märkäpesäkkeitä ja fisteleit^ä pakaroihin sekä käsiin. Näiden hoitamiseksi he tarvitsevat antibiootteja ja kirurgisia toimenpiteit^ä. Useat aikuiset potilaat saavat myö^s antiepileptisiä lääkkeit^ä ja psykofarmaseuttista hoitoa (Arvio & Arvio, 2007).

3. Aspartyyli^glukosaminidaasi

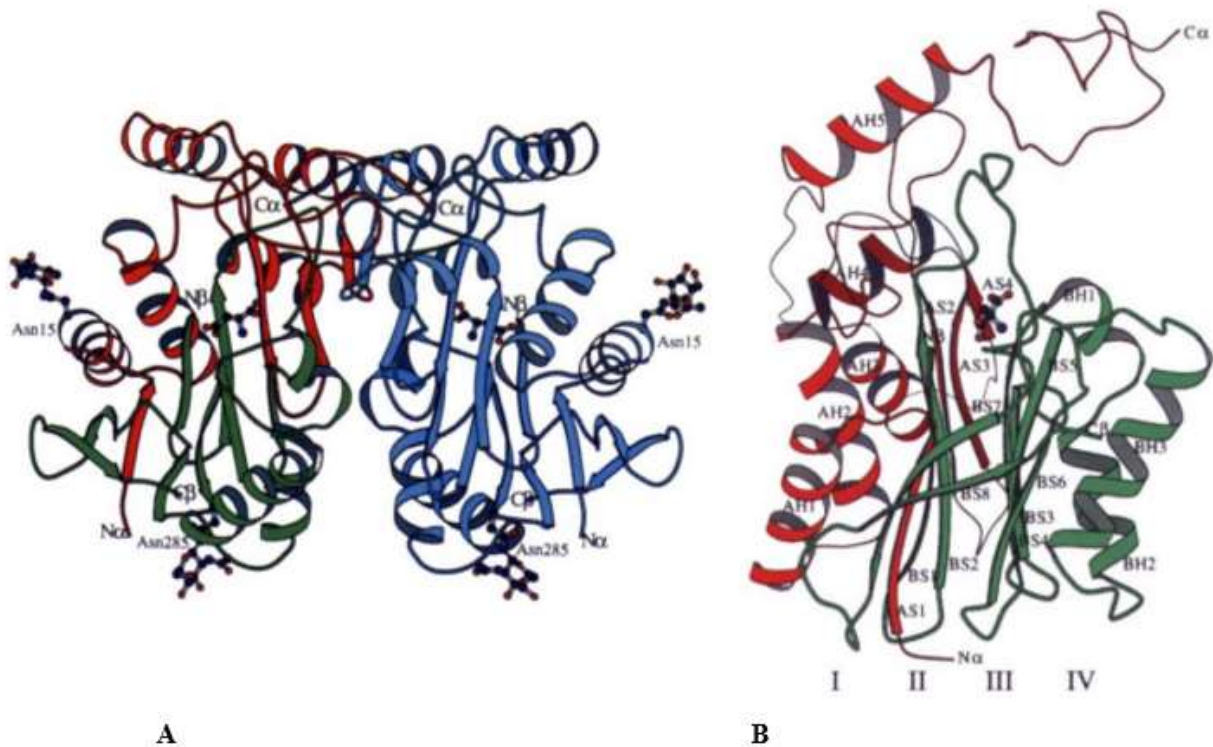
Aspartyyli^glukosaminidaasi on tärkeä lysosomaalinen hydrolaasi, joka katalysoi glykoproteiinien oligosakkaridin ja asparagiinin välisen N-glykosidisen sidoksen hydrolyysiä. Reaktiossa muodostuu asparagiinihapon ionimuotoa aspartaattia ja 1-aminoglykaania (kuva 1). Muodostunut 1-aminoglykaani hydrolysoidaan ilman entsyymejä ammoniakiksi ja oligosakkaridiksi. AGA hydrolysoi vain substraatteja, joiden L-asparagiinilla on vapaat α -amino- ja α -karboksyyli^rihmät (Oinonen et al., 1995). AGA vaikuttaa olevan ensimmäinen nisäkä^sproteiini, joka kuuluu uuteen proteiiniperheeseen N-terminaalinkleofiilihydrolaaseihin, Ntn-hydrolaasit (Riikonen et al., 1996).



Kuva 1. Aspartyyli^glukosaminidaasin katalysoima reaktio. Entsyymi katalysoi L-asparagiinin ja glykaanin välisen amidisidoksen katkaisua. Reaktiotuotteet ovat 1-aminoglykaani ja aspartaatti, joka on asparagiinihapon ionimuoto (Oinonen et al., 1995).

3.1. Rakenne

Ihmisen lysosomaalinen aspartyyli^glukosaminidaasi on kvaternäärirakenteeltaan heterotetrameerinen molekyyli. AGA:n alayksiköt ovat järjestäytyneet $\alpha_2\beta_2$ rakenteeksi, ja entsyymi on kooltaan 50x50x70 Å (Oinonen et al. 1995). Kuvassa 2 on esitetty heterotetrameerisen ja -dimeerisen AGA:n rakenteet.



Kuva 2. A. Heterotetrameerinen AGA, josta puolet on merkitty punaisella ja vihreällä, ja toinen puoli sinisellä. Kaikki neljä glykosylaatiokohtaa on esitetty. Reaktion tuote, aspartaatti, sitoutuu lähelle β -ketjun katalyyttisen N-terminaalin loppua (N β). B. Heterodimeerinen AGA. Punaisella on merkitty α -ketju, ja β -ketju on vihreällä. α -kierteiden ja β -juosteiden eri kerrokset on merkitty I, II, III ja IV. Katalyyttinen Thr183 on merkitty kuvaan β -ketjun N-terminaaliin merkinnällä N β . Kuvaan on merkitty eri sekundäärisiä rakenne-elementtejä (Oinonen et al., 1995).

α - ja β -ketjut muodostavat läheisesti kytkeytyneen yksittäisen heterodimeerisen domeenin, jossa alayksiköiden järjestys on $\alpha\beta\beta\alpha$. Domeenin ytimessä on yksi β -laskos, jossa on kahdeksan juostetta; BS8, BS7, AS1, BS1, BS2, AS2, AS3, AS4. AS3 ja AS4 ovat keskenään samansuuntaisia muiden juosteiden ollessa vastakkaissuuntaisia. Toisessa β -laskoksessa on neljä vastakkaissuuntaista β -juostetta; BS6, BS5, BS4, BS3. Nämä kaksi β -juostetta ovat lähekkäisiä sekä yhdensuuntaisia, ja niiden molemminpuolin löytyy α -kierre. α -kierteitä ja β -juosteita yhdistävät silmukat sijaitsevat yhdellä puolella proteiinia tarjoten silmukoita aktiiviselle kohdalle. Entsyymien ytimen ulkopuolella on α -ketjun pitkä C-terminaalinen polypeptidi. Polypeptidin rakenne koostuu yhdestä α -kierteestä ja pitkästä epäsäännöllisestä 24 aminohapon silmukkarakenteesta, jota ylläpitää disulfidisilta. Tämän polypeptidin toimintoa ei kuitenkaan tunneta (Oinonen et al., 1995).

AGA sisältää yhdeksän kysteiniä, jotka muodostavat neljä disulfidisiltaa: Cys41-Cys46, Cys140-Cys156, Cys263-Cys283 ja Cys294-Cys322. Lisäksi yhdeksäs, disulfidisiltoja muodostamaton kysteini löytyy paikalta 38 (Oinonen et al., 1995).

$\alpha\beta$ -heterodimeerit yhdistyvät vetysidoksilla ja hydrofobisilla vuorovaikutuksilla. Proteiinin pakkautumiseen vaikuttavat vuorovaikutukset muodostuvat BH2 α -kierteen taipumisesta, α -kierteen C-terminaalista, sekä molemmista heterodimeereistä löytyvien α -kierteiden ja β -juosteiden välisistä silmukoista. Kyseiset silmukat ovat rakenteiden BS2-BS3, BH1-BH2 sekä AH3-AH4 välissä. Kahden heterodimeerin rajapinnassa on suhteellisen pienet van der Waalsin voimat. Poikkeuksena tähän on kuitenkin yhden heterodimeerin histidiini His101, joka tunkeutuu toiseen heterodimeeriin ja muodostaa vetysidoksia asparagiinihapon Asp238:n karboksyyliiryhmän sekä isoleusiinin Ile208:n pääketjun typen kanssa (Oinonen et al., 1995).

Koska aspartyyli-glukosaminidaasi on lysosomaalinen entsyymi, se tarvitsee lysosomiin kuljetusta varten fosfotransferaasin tunnistussignaalin. Kaksi osaa AGA:n fosfotransferaasin tunnistussignaalista sijaitsee α -alalyksikön C-terminaalissa. Ensimmäinen osa koostuu aminohapoista lysiini Lys177 ja tyrosiini Tyr178, ja toinen osa aminohaposta Lys183 (Lähteen Oinonen et al., 1995 numeroinnin mukaan Lys183 olisi Lys160). Nämä lysiinit sijaitsevat entsyymin pinnalla, jolloin fosfotransferaasi on todennäköisesti suorassa yhteydessä niihin. Kolmas osa tunnistussignaalia, Lys214, sijaitsee β -alalyksikössä kahden β -juosteen välisessä mutkassa. Tämäkin ulottuu entsyymistä pois päin, mutta β -alalyksikön vuorovaikutuspinta on rajoittunut. Jokaisessa AGA-molekyylissä on kaksi tunnistusaluetta fosfotransferaasille (Tikkanen et al., 1997).

3.2. Synteesi

Aspartyyli-glukosaminidaasi syntetisoidaan yksittäisenä 42 kDa:n polypeptidin esiasteena, jonka jälkeen se välittömästi halkaistaan solulimakalvostossa. Epäaktiivisen esiasteen halkaisu tapahtuu aminohappojen asparagiinihapon ja treoniinin, Asp182 ja Thr183, välistä. β -alalyksikön N-terminaalinen treoniini, Thr183, on välttämätön katalyysitoiminnolle. Katkaisun seurauksena muodostuu α - ja β -alalyksiköt, jotka ovat vastaavasti 27 ja 17 kDa kokoisia. Alalyksiköt glykosyloidaan heterogeenisesti ja niihin vaikuttaa ei-kovalenttisia vuorovaikutuksia (Oinonen et al., 1995; Riikonen et al., 1996). Alalyksiköt pakkautuvat yhteen

muodostaen lopullisen heterotetrameerisen rakenteen. Tämä post-translationalinen katkaisu aktivoi entsyymien (Oinonen et al., 1995).

Valmiin AGA-molekyylin kolmiulotteisen rakenteen perusteella proteolyyttisten entsyymien on vaikea päästä katalyyttisen Thr183 luo sen ollessa syvällä suppilomaisen aktiivisen kohdan sisällä. Tämän perusteella peptidin katkaisu kahteen alayksikköön on autokatalyyttinen prosessi, joka tapahtuu esiasteen dimerisaation myötä (Oinonen et al., 1995). Ajatusta tukee myös se, että primaarirakenteisen proteiinin seriini 72 on kaukana paikan 234 arginiinista, 257 treoniinista ja 204 histidiinista. Kuitenkin entsyymien laskostumisen seurauksena, ennen alayksiköihin katkaisemista, nämä aminohapot sijaitsevat lähekkäin. (Peltola et al., 1996).

Kahden esiastemolekyylin dimerisaatio on edellytys AGA:n oikeaoppiselle proteolyyttiselle aktivoinnille. Sen seurauksena saadaan $(\alpha\beta)_2$ tetrameeri, jolla on kaksi aktiivista kohtaa (Riikonen et al., 1996). Kahden $\alpha\beta$ -dimeerin välistä vuorovaikutusta vakauttaa niiden välinen BH1 α -heliksi ja sen jälkeinen silmukka. Heliksin ja silmukan aminohapot ovat mahdollisesti myös tärkeitä osia polypeptidin laskostumisessa (Saarela et al., 2001).

Aspartyyliglukosaminidaasin kysteiniinien 63 ja 69 (Oinonen et al., 1995 mukaan 41 ja 46) välillä oleva disulfididisidos on kaikista lähimpänä α -alayksikön N-terminaalia. Kun tämän sidoksen jompi kumpi kysteini korvataan toisella aminohapolla, esiasteisen polypeptidin proteolyyttinen käsittely viivästyy. Vaikka polypeptidit saadaan käsiteltyä loppuun asti, huomataan entsyymien spesifisen aktiivisuuden laskeneen. Siis N-terminaalisen disulfididisidoksen muodostumisen estäminen vaikuttaa AGA:n katalyyttiseen toimintaan. C-terminaalisen disulfididisidoksen (Oinonen et al., 1995 mukaan Cys140 ja Cys156 välillä) häirintä aiheuttaa vakavia häiriöitä aikaisessa vaiheessa esiastemolekyylin laskostumisessa. Esiasteen proteolyyttisen prosessoinnin häiritseminen aiheuttaa molemmissa tapauksissa esiasteiden hajottamista solulimakalvostolla (Riikonen et al., 1996).

AGA:n maturaatio saavutetaan loppuun lysosomeissa, joissa muodostuneesta α -alayksiköstä leikataan lyhyt peptidiketju C-terminaalista muodostaen 24 kDa:n kokoisen alayksikön. β -alayksikön C-terminaalia myös leikataan muodostaen 16 kDa:n alayksikön. Nämä lysosomaaliset katkaisut eivät vaikuta AGA:n katalyyttiseen aktiivisuuteen. (Riikonen et al., 1996).

AGA saadaan vietyä lysosomiin lopullista käsittelyä varten mannoosi-6-fosfaatti-reseptorien avulla. Ne tunnistavat ja sitovat mannoosi-6-fosfaattia niiden proteiinien oligosakkaridiketjuihin, joiden kuuluu kulkeutua lysosomeihin. Prosessi tapahtuu Golgin laitteessa ja se alkaa UDP-N-asetyyyliglukosamiini-1-fosfotransferaasilla. Tämä

fosfotransferaasi tunnistaa lysosomaalisten entsyymien rakenteesta määrävän tekijän, jonka seurauksena se katalysoi N-asetyyli-glukosamiinin (GlcNAc) siirtämistä oligosakkaridiketjun mannoosiin linkitettyihin aminohappoihin. Sitten N-asetyyli-glukosamiini-1-fosfodiesteri- α -N-asetyyli-glukosaminidaasi paljastaa mannoosi-6-fosfaatti-markkerin poistamalla sitä peittävän GlcNAc:n. Mannoosi-6-fosfaatti-reseptorit tunnistavat ja sitovat markkerin, ja AGA kuljetetaan lysosomiin (Tikkanen et al., 1997).

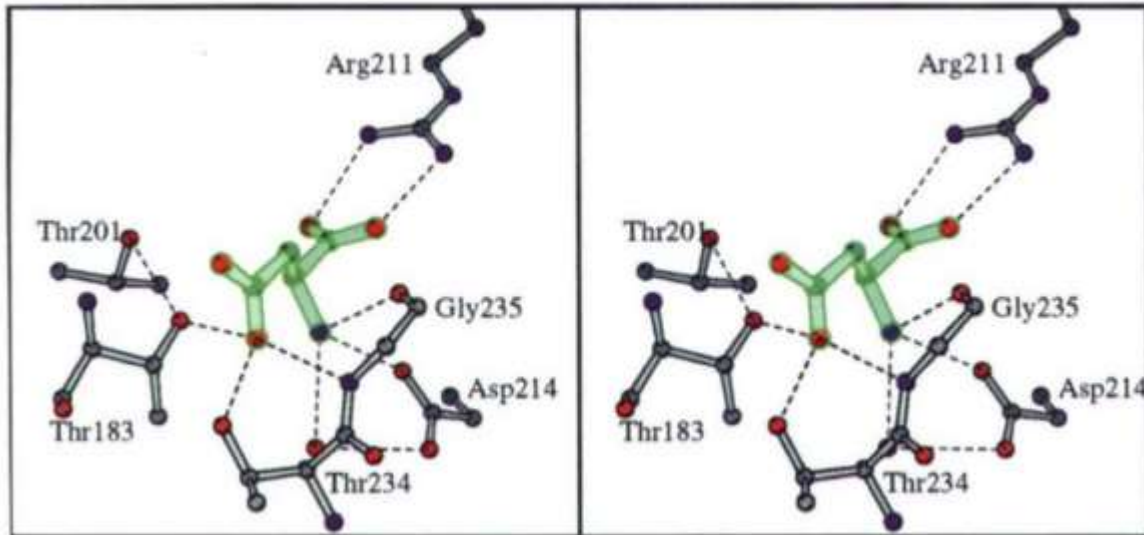
3.3. Ligandin sitoutuminen

Aspartyyli-glukosaminidaasin kompleksoitumista reaktiotuotteen, aspartaatin, kanssa tutkittiin selvittämällä AGA:n ja ligandin muodostaman kompleksin kiderakennetta (Oinonen *et al.* 1995). AGA:n aktiivinen kohta on Thr183:n lähellä oleva syvä suppilomainen tasku, jonka kapeaan päähän sitoutuu substraatin L-asparagiini, ja substraatin glykaani täyttää leveämmän aukon. Tästä johtuen AGA ei voi hydrolysoida substraatteja, joiden asparagiinin α -amino- ja α -karboksyyli-ryhmät eivät ole vapaita. Tämä kuitenkin mahdollistaa vaihtelua substraatin hiilihydraattiosuudessa. Suurin osa ligandin sitoutumiseen ja katalyysiin osallistuvista aminohapoista sijaitsee α -kierteiden ja β -juosteiden eri kerroksia yhdistävistä silmukoista (Oinonen et al., 1995).

Reaktiotuotteen, aspartaatin, kanssa muodostuu viisi vetysidosta. Nämä sidoksia muodostavat aminohapot sijaitsevat β -ketjussa, ja ne ovat hyvin säilyneet entsyymien eri muodoissa. Aspartaatin α -karboksyyli-ryhmä muodostaa vetysidoksia arginiini Arg211 kanssa. α -aminoryhmä puolestaan muodostaa vetysidoksia sekä asparagiinihapon (Asp214) että pääketjun glysiinin (Gly235) karbonyylihapen kanssa. Lisäksi aspartaatin O δ 1-happi muodostaa vetysidoksen treoniinien Thr183:n ja Thr234:n kanssa, sekä pääketjun Gly235 typen kanssa. Kuudes aktiivisen kohdan hyvin säilynyt aminohappo on Thr201, joka muodostaa vetysidoksen Thr183 kanssa. Nämä aspartaatin kanssa reagoivat aminohapot löytyvät BS2-BS3, sekä BS4-BH1 välisistä silmukoista. Kuvassa 3 on esitetty aspartaatin sitoutuminen aspartyyli-glukosaminidaasin aktiiviseen kohtaan (Oinonen et al., 1995).

Useat hiilihydraatteja sitovat proteiinit käyttävät aromaattisia aminohappoja sitoakseen ligandeja. AGA:ssa on kaksi aromaattista aminohappoa, tryptofaani Trp11 ja fenyylialaniini Phe278. Nämä sijaitsevat lähellä aspartaatin sitoutumiskohtaa, AS1-AH1 sekä BH3-BS5 silmukoiden välillä, joten on mahdollista, että ne osallistuvat hiilihydraattiosan

sitomiseen. Ajatusta tukee se, että Trp11 korvaaminen fenyyialaniinilla tai seriinillä aiheuttaa inaktivoitua entsyymiä (Oinonen et al., 1995).



Kuva 3. Stereokuva aspartaatin sitoutumisesta aspartyyli-glukosaminidaasin aktiiviseen kohtaan. Ligandi on esitetty kuvassa vihreällä ja vetysidokset ovat kuvassa katkoviivoina (Oinonen et al., 1995).

3.4. Toimintamekanismi

Aspartyyli-glukosaminidaasi katalysoi amidisidosten hydrolysointia. Tämän toimintamekanismin epäillään olevan seriiniproteaasin kaltainen katalyyttinen reaktio. AGA:n kaltaisilla Ntn-hydrolaaseilla ei kuitenkaan ole katalyyttistä kolmikkoa aktiivisessa kohdassa kuten seriiniproteaaseilla, vaan N-terminaalinen aminohappo. Kyseinen aminohappo toimii sekä nukleofiilina että katalyyttisenä emäksenä. N-terminaalisen treoniinin Thr206:n γ -happi ($O\gamma$) (lähteen Oinonen et al., 1995 mukaan Thr183) toimii nukleofiilina ja α -aminoryhmä toimii emäksenä AGA:n katalyyttisessä reaktiossa (Pera & Kollman, 1997).

Seriiniproteaaseissa kovalenttinen sidos muodostuu entsyymien hydroksyylihapen ja substraatin karbonyylihiilen välille. AGA:n tapauksessa kyseinen karbonyylihiili on lähellä entsyymien paikalla 183 olevan treoniinin γ -happea. Thr183:n hydroksyyli-ryhmä muodostaa vetysidoksen Thr201:n happeen, mikä todennäköisesti vaikuttaa Thr183:n katalyyttisiin ominaisuuksiin. Lisäksi Thr234:n sivuketjun $O\gamma$ ja glysiinin Gly235:n pääketjun typpi-atomi muodostavat AGA:n oksianioniaukon, jota käytetään entsyymien katalysoimassa reaktiossa.

Oksianioniaukko stabiloi negatiivisesti varautunutta karbonyylihiilen happea reaktion siirtymä vaiheessa (Oinonen et al., 1995).

AGA:n tapauksessa myös substraatin protonoidulla α -aminoryhmällä on aktiivinen rooli katalyyttisessä toiminnossa. Tämä aminoryhmä stabiloi reaktiossa muodostunutta oksianionia ja alentaa N-terminaalien nukleofiilisen Thr206:n pKa:ta elektrostaattisilla voimilla. Tämä AGA:n katalyyttisen mekanismin erityinen ominaisuus mahdollisesti selittää AGA:n korkean katalyyttisen aktiivisuuden myös happamassa pH:ssa. Lysosomaalisilla entsyymeillä on yleensä hapan pH optimi. Kuitenkin AGA:n pH-maksimi on usein pH 7-9 välillä, joten kyky toimia myös happamassa pH:ssa on oleellista toimiakseen lysosomeissa (Peräkylä & Rouvinen, 1996).

4. Taudin synty

Aspartyyli-glukosaminuria on seurausta lysosomaalisen amidaasin, aspartyyli-glukosaminidaasin, puutteellisesta aktiivisuudesta. Entsyymi vastaa glykoasparagiinien hajotuksesta, ja sen puutteellisen aktiivisuuden vuoksi glykoasparagiineja, erityisesti aspartyyli-glukosamiinia, alkaa kertymään lysosomeihin (Saarela et al., 2001).

AGU-tauti periytyy resessiivisesti, jolloin yksilön tulee saada molemmilta vanhemmiltaan AGA-geenin aspartyyli-glukosaminuriaa aiheuttavat alleelit (Saarela et al., 2001).

4.1. AGA-geeni

Ihmisen AGA-geenin sijainti on määritelty olevan neljännen kromosomin pitkässä haarassa kohdassa 34-35 (4q34-35). Geenistä löytyy yksi merkittävä transkription aloituskohta, joka löytyy 298 nukleotidin päästä translaation aloituskodonista ATG:stä. Lisäksi geenistä löytyy myös kaksi pienempää transkription aloituskohtaa; 286 ja 395. AGA-geenin promoottorista ei löydy TATA-laatikolle ominaista sekvenssiä. Tämän perusteella AGA-geeni voitaisiin laskea osaksi housekeeping-geenejä, jotka ovat välttämättömiä solun tavallisten toimintojen ylläpitämiseksi. (Uusitalo et al., 1997).

Ihmisen AGA-geenin säätely tapahtuu ydinpromoottorilla, joka sisältää kaksi toiminnallisesti tärkeää Sp1-transkriptiotekijän sitoutumiskohtaa. Ydinpromoottori saattaa myös sisältää sitoutumiskohdan myötävaikuttavalle AP-2-transkriptiotekijälle. Lisäksi,

kauempana promoottorialueesta löytyy alue, joka inhibiittorisesti kontrolloi geenin ekspressiota (Uusitalo et al., 1997).

Aspartyyli-glukosaminidaasia löytyy pieniä määriä kaikissa kudoksissa. AGA-geenin lähetti-RNA:n tasot pysyvät kutakuin vakiona kaikissa kudoksissa, mutta geenin ekspressointi osoittaa selkeää soluspesifisyyttä. Aivokuoren solut, hepatosyytit ja munuaisten proksimaalisen tubuluksen solut tuottavat eniten aspartyyli-glukosaminidaasia. Tämä viittaa siihen, että AGA-geenin säätely tapahtuu translaation jälkeen, eikä post-transkriptionaalisesti (Enomaa et al., 1993).

4.1.1. AGA-geenin mutaatiot

Aspartyyli-glukosaminuria muodostuu, kun ihmisen aspartyyli-glukosaminidaasin aktiivisuus heikkenee. Tämä puolestaan johtuu AGA-geenissä olevista mutaatioista, jotka aiheuttavat rakenteellisia muutoksia entsyymiin.

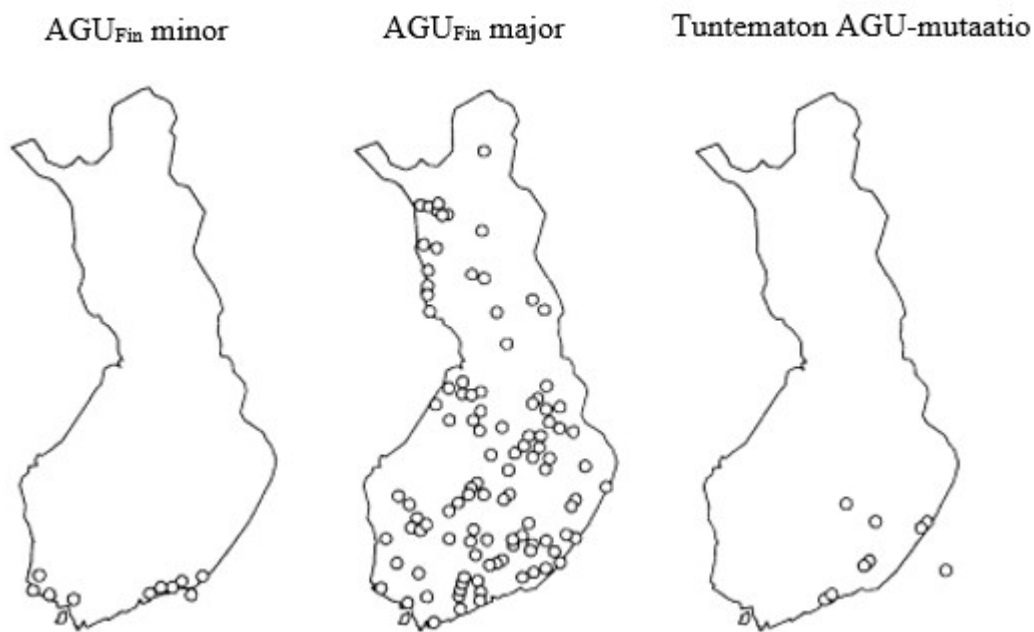
AGU_{Fin} major -mutaatio edustaa 98 % Suomessa esiintyvistä AGU-alleeleista perustajavaikutuksen seurauksena (Saarela et al., 2001). Toinen mutaatio, AGU_{Fin} minor, esiintyy noin kahdella prosentilla suomalaisista AGU-tautia sairastavista. AGU-tautia voi myös aiheuttaa yhdistelmä kahta eri mutaatiota AGA-geenin alleeleissa (Valkonen et al., 1999).

Suomessa tavataan pieniä määriä AGU-potilaita, joiden toisen alleelin mutaatio on AGU_{Fin} major, ja toisessa alleelissa on jokin tuntematon AGU_{Fin} -mutaatio. Valkonen et al. (1999) tutki kymmenen AGU-tautia sairastavan potilaan haplotyyppiä. Neljällä potilaalla oli toisessa alleelissa AGU_{Fin} major ja toisessa oli tuntematon AGU_{Fin} -mutaatio. Tutkimuksessa selvisi, että näillä neljällä potilaalla oli jokaisella eri tuntematon mutaatio. Tämän perusteella voitiin todeta, että Suomessa esiintyy vähintään kuutta erilaista AGU-tautia aiheuttavaa mutaatiota. Kuvassa 4 on esitetty suomalaisten AGU-potilaiden isovanhempien synnyinpaikat (Valkonen et al., 1999).

Aspartyyli-glukosaminidaasi-geenin koodaavasta alueesta on löydetty ei-suomalaisten keskuudesta jopa 13 eri mutaatiota. Kuusi näistä aiheuttaa ennenaikaisia lopetuskodoneja, ja neljä pistemutaatioita aiheuttaen aminohapon korvautumisen toisella. Lisäksi on löydetty yksi silmukointia häiritsevä mutaatio, yksi häviämää aiheuttava mutaatio sekä yksi insertiota aiheuttava mutaatio (Peltola et al., 1996).

Eri AGU-taudin aiheuttavista alleeleista pistemutaatiot, joiden seurauksena muodostuu eri aminohappo, ovat yleisimpiä niiden esiintyvyyden ollessa 65 %, kun taas häviämää aiheuttavia mutaatioita on 27 %. Pistemutaatioista 40 % aiheuttaa glysiinin

korvautumisen, eikä proliinia korvaavia pistemutaatioita ole tavattu. Molemmilla aminohapoilla on tietyt roolit polypeptidin rakenteessa. Glysiini mahdollistaa tiukkoja käänköksiä ja se mahtuu rajallisiin rakenteellisiin ympäristöihin sen pienen sivuketjun ansiosta. Sen sijaan proliini vähentää polypeptidin rakenteellista joustavuutta. Glysiiniin liittyvien mutaatioiden määrä korostaa sen merkitystä entsyymien tukirangalle paikoissa, joissa aktivoituminen ja katalyyysi tapahtuu. Lisäksi entsyymien laskostumiselle, ja sitä myötä disulfidididosten muodostumiselle tarpeellinen joustavuus tulee glysiinistä (Saarela et al., 2001).



Kuva 4. Suomalaisten AGU-potilaiden isovanhempien synnyinpaikat (Valkonen et al., 1999).

4.1.1.1. *AGU_{FIN} major*

Yleisin AGU-tautia aiheuttava mutaatio, *AGU_{FIN} major*, aiheutuu kaksoispistemutaation seurauksena: Arginiini korvautuu glutamiinilla (R161Q) ja kysteiini korvautuu seriinillä (C163S) (lähteen Oinonen et al., mukaisesti R138Q ja C140S). Mutaatio muodostuu, kun DNA-sekvenssin kohdan 482 nukleotidi guaniini korvautuu adeniinilla, ja kohdan 488 guaniini korvautuu sytosiinilla. Mutaation seurauksena tapahtuva arginiinin korvautuminen glutamiinilla ei kuitenkaan vaikuta aspartyyli-glukosaminidaasin solunsisäiseen prosessointiin tai kuljetukseen (Riikonen et al., 1994).

Cys163 sijaitsee rakenteellisesti tärkeässä paikassa, joka ei kykene sopeutumaan korvautuneeseen aminohappoon (Saarela et al., 2001). Cys163:n korvautuminen aiheuttaa sen, ettei disulfididisidosta muodostu Cys179:n kanssa (Oinonen et al., 1995 mukaan Cys156). Tämä disulfididisidos vastaa α -alalyksikön C-terminaalien silmukan ylläpitämisestä, ja sen puutos aiheuttaa esiastemolekyylin laskostumisen sekä proteolyyttisen aktivoitumisen epäonnistumisen (Riikonen et al., 1996). Epäonnistuneen laskostumisen myötä mutatoitunut AGA hajotetaan ennenaikaisesti (Saarela et al., 2001).

Jo pelkästään tämä korvautuminen voi inaktivoida entsyymien, ja kyseinen mutaatio aiheuttaa epäaktiivisen entsyymien kertymistä solulimakalvostoon. (Riikonen et al., 1994). Solulimakalvostolle kertymisen taustalla voi olla se, että Cys163 sijaitsee lähellä lysiiniä 177 ja tyrosiiniä 178. Kyseiset aminohapot, Lys177 ja Tyr178, muodostavat yhden kolmesta fosfotransferaasin tunnustuskohdasta. Cys163:n korvautuminen häiritsee fosforylaatiota ja täten voi estää lysosomaalisen kohdistamisen (Saarela et al., 2001).

Tutkimalla kudoksenäytteiden asparyyli-glukosaminidaasin pitoisuuksia (Enomaa et al., 1993) selvisi, että entsyymien α - ja β -alalyksikköä löytyi kaikista AGU-potilaiden antamista kudoksenäytteistä, paitsi aivoista. Näytteiden alalyksikköiden pitoisuudet olivat kuitenkin huomattavasti alhaisempia kuin kontrollinäytteissä. Tämän perusteella mutaatiosta huolimatta murto-osa entsyymistä prosessoidaan alalyksiköiksi ja valmis entsyymi päätyy kohteeseensa, lysosomeihin (Enomaa et al., 1993).

4.1.1.2. AGU_{FIN} minor

Toinen, huomattavasti pienempi Suomessa esiintyvä AGU-tautia aiheuttava mutaatio on nimeltään AGU_{Fin} minor. On mahdollista, että kaikki AGU_{Fin} minor -mutaatiot ovat lähtöisin yhdestä mutatoituneesta kromosomista (Valkonen et al., 1999).

Mutaation aiheuttaa kahden nukleotidin häviämä AGA-geenin toisesta eksonista, jolloin muodostuu ennenaikainen lopetuskodoni. Kaikki AGU_{Fin} minor -mutaatiot ovat kahden eri alleelin yhdistelmiä toisen alleelin sisältäessä AGU_{Fin} major -mutaation (Valkonen et al., 1999).

4.1.1.3. AGA-entsyymien aktiivisen kohdan mutaatio

Ensimmäinen AGU-taudin mutaatio, jossa aktiivisen kohdan aminohappo korvautuu toisella, on löytynyt useasta ei-suomalaisesta perheestä. Nämä perheet, joissa mutaatio esiintyy, eivät kuitenkaan ole kytkeytyneet toisiinsa. Kyseinen mutaatio löytyy AGA-geenin toisesta eksonista ja siinä paikan 214 nukleotidi tyymiini korvautuu sytosiinillä (T214C). Tämä yhden nukleotidin pistemutaatio aiheuttaa sen, että entsyymiä valmistettaessa seriini paikalla 72 korvautuu proliinilla (S72P). Mutaatio ei häiritse aspartyylyglukosaminidaasin laskostumista, vaan estää AGA:n esiasteen normaalia katkaisua solulimakalvostolla kahdeksi alayksiköksi. Tälle mutaatiolle ominaista on kuitenkin se, että esiasteisen entsyymin polypeptidiketju voi prosessoitua osittain solun ulkopuolella. Mutaatio ei estä fosforylointia lysosomeihin kuljetusta varten, ja täten muodostunut aktiivinen entsyymi siirtyy kohdesoluihin endosytoosin kautta (Peltola et al., 1996). Lysosomissa α -alayksikön C-terminaalia lyhennetään, minkä seurauksena muodostuu epänormaali Pro- β -alayksikkö (Saarela et al., 2001).

Paikan 72 seriini on lähellä AGA:n aktiivista kohtaa, ja sen hydroksyylyliryhmä on liittynyt vetysidoksin paikan 206 katalyyttisen treoniinin α -aminoryhmään (lähteen Oinonen et al., 1995 mukaan Thr183). Koska Thr206 sijaitsee β -alayksikön aminoterminaalissa, voi Ser72 täten muokata treoniinin kemiallisia ominaisuuksia. Seriniin ja treoniinin välinen vetysidos ei kuitenkaan ole välttämätön katalyyksille, sillä seriinin korvautuminen alaniililla ei aiheuta samoja ongelmia entsyymin toiminnassa (Peltola et al., 1996).

Aspartyylyglukosaminidaasin kiderakenteen perusteella seriinin korvautuminen proliinilla ei aiheuta merkittäviä muutoksia entsyymin rakenteeseen, ja polypeptidiketju laskostuu oikein mutaatiosta huolimatta. Tämän vuoksi on yllättävää, että S72P -mutaatio aiheuttaa vakavia prosessointihäiriöitä (Peltola et al., 1996). S72P-mutatoituneen entsyymin solunulkopuolisesta aktivoimisesta ja endosytoosista soluihin johtuen sen entsyymaattinen aktiivisuus on vain noin 30 % normaaliin aspartyylyglukosaminidaasiin verrattuna (Saarela et al., 2001).

5. Tulevaisuuden näkymät

Viimeisen 20 vuoden aikana on edistetty merkittävästi useiden eri lysosomaalisten sairauksien hoitoa (Parenti et al., 2013). Entsyymikorvaushoitoa on tutkittu yhtenä mahdollisena AGU-taudin parannuskeinona. In vitro -tutkimuksissa viallisen entsyymin korvaaminen ihmisen rekombinantti glykoasparaginaasilla on osoittautunut tehokkaaksi keinoksi korjata AGU-taudin aiheuttamia aineenvaihdunnallisia ongelmia (Mononen et al., 1995). Lysosomaaliset

hydrolaasit päätyvät lysosomeihin mannoosi- tai mannoosi-6-fosfaattireseptorien avulla, joita löytyy myös solukalvolta. Täten lysosomaalisia entsyymejä voidaan viedä soluihin endosytoosin avulla, jonka jälkeen ne kulkeutuvat lysosomeihin. Tämän reitin avulla voidaan viedä rekombinanttientsyymejä soluihin ja kudoksiin, joissa aspartyyli-glukosaminidaasi ei toimi kunnolla (Parenti et al., 2013).

Entsyymien aktiivisuuden lisäämistä on tutkittu esimerkiksi kantasolusiirrolla tai farmakologisilla saperoneilla. Kantasolusiirroissa luovuttajan solut tuottavat aktiivista aspartyyli-glukosaminidaasia, joka voi korvata viallisen entsyymien potilaan soluissa. Saperonit puolestaan osallistuvat proteiinien laskostumiseen ja täten voivat auttaa AGU-taudin hoidossa niissä tapauksissa, joissa aspartyyli-glukosaminidaasin laskostuminen epäonnistuu. Saperonit auttavat aspartyyli-glukosaminidaasin laskostumisessa ja parantavat sen vakautta, minkä seurauksena entsyymien aktiivisuus lisääntyy. Jo pieni ero aktiivisen entsyymien määrässä voi auttaa potilasta. Saperonien käytössä on etuja verrattuna entsyymikorvaushoitoon tai kantasolusiirtoon: saperoneja voidaan antaa potilaalle suun kautta, eivätkä ne aiheuta immuunivastetta. (Arvio & Mononen, 2016; Parenti et al., 2013).

Yksi lupaavaksi osoittautunut farmakologinen saperoni on Cystadane-niminen lääkevalmiste. Cystadane koostuu betaiinista, joka on pieni glysiiniä muistuttava ligandi. Luonnossa esiintyvä betaiini liittyy ihmisen fysiologiaan ja aineenvaihduntaan useilla eri tavoilla. Betaiini esimerkiksi ehkäisee lipidien kertymistä maksassa, ja se toimii tärkeänä metyyli-ryhmän luovuttajana. Betaiini voisi parantaa AGA:n laskostumista ja täten sen aktiivisuutta AGU-potilaiden fibroblasteissa parantamalla solujen metabolista tilaa ja vähentämällä solulimakalvoston tai lysosomien kokemaa stressiä. Paremmat olosuhteet lysosomeissa voivat myös mahdollistaa entsyymien aktiivisuuden lisääntymisen epäsuorilla vaikutuksilla (Banning et al., 2016).

Entsyymien aktiivisuuden lisäämistä on tutkittu myös yhdistämällä saperonit entsyymikorvaushoidon kanssa, ja toisaalta myös vähentämällä entsyymien substraatin määrää inhiboimalla substraatin synteesiä. Substraatin vähentämistä on käytetty jo joidenkin lysosomaalisten sairauksien hoidossa (Arvio & Mononen, 2016; Parenti et al., 2013).

Myös geeniterapiaa on tutkittu AGU-taudin hoitokeinona (Arvio & Mononen, 2016). Lysosomaaliset varastosairaudet, kuten AGU-tauti, sopivat hyvin geeniterapian kohteiksi, sillä ne ovat monogeenisiä sairauksia. Tällöin sairaus aiheutuu yhden geenin mutaatiosta, ja teoriassa sairaus parantuu korvaamalla mutatoitunut geeni. Geeniterapia saa aikaan huomattavasti pidempiaikaisia vaikutuksia kuin muut hoitokeinot. Geeninsiirrossa on tutkittu useita eri viruksia, joista lupaavin on adenovirus (Parenti et al., 2013).

Adenovirusvektori AAV9 on osoittautunut erityisen turvalliseksi ja tehokkaaksi keinoksi kuljettaa normaalia AGA-geeniä keskushermostoon. Nämä vektorit eivät aiheuta tauteja eivätkä jakaudu. Lisäksi ne pystyvät vaikuttamaan sekä jakautuviin että ei-jakautuviin soluihin. Vaikka kyseessä on virusvektori, AAV-vektorit eivät pysty tuottamaan viruksen proteiineja. AAV9-vektoria on onnistuneesti kokeiltu AGU-hiirillä, joiden aspartyyli-glukosaminidaasin tuotanto lisääntyi keskushermostossa ja muualla elimistössä geeniterapian seurauksena (Chen et al., 2021).

6. Yhteenveto

Aspartyyli-glukosaminuria on peittyvästi eli resessiivisesti periytyvä harvinainen sairaus. Sairastuakseen lapsen tulee saada molemmilta vanhemmiltaan AGU-tautia aiheuttavat AGA-geenin alleelit. AGU-tauti kuuluu Suomalaiseen tautiperintöön, sillä se on huomattavasti yleisempi Suomessa kuin muualla maailmassa. Suomessa AGU-tauti diagnosoidaan keskimäärin 5,5 vuoden ikäisenä. Muualla maailmassa diagnosointi tapahtuu noin 10 vuoden ikäisenä. Sairaus voidaan diagnosoida tutkimalla virtsan oligosakkaridejä, sekä glykoasparagiinin aktiivisuutta. AGU-tauti voidaan diagnosoida myös ennen syntymää esimerkiksi lapsivesinäytteestä. Suomessa on kehitetty DNA testejä, joilla voidaan tarkistaa, onko yksilö AGU-taudin kantaja.

AGU-potilas elää yleensä suhteellisen normaalia lapsuutta. Lapsena heillä on usein enemmän ongelmia tiedonkäsittelytaidoissa kuin verbaalisissa taidoissa. Murrosiässä oppiminen kuitenkin heikkenee ja seuraavan kymmenen vuoden aikana potilas voi menettää joitain taitoja. AGU-potilaiden kykyjen huippu usein saavutetaan 13-16-vuotiaina, jolloin he ovat terveiden 5-6-vuotiaiden tasolla. Murrosiän jälkeen kunto alkaa heikkenemään nopeasti, jolloin myös hoidon tarve lisääntyy merkittävästi. Keskimääräinen elinaika on naisille 40 vuotta ja miehille 35 vuotta. AGU-taudille ei ole tällä hetkellä parantavaa hoitokeinoa, joten potilaita hoidetaan aina ilmenevien oireiden mukaisesti. Useita mahdollisia parannuskeinoja tutkitaan ahkerasti.

AGU-tauti aiheutuu aspartyyli-glukosaminidaasin puutteellisesta aktiivisuudesta. Aspartyyli-glukosaminidaasi on tärkeä lysosomissa toimiva hydrolaasi. AGA:n heikko aktiivisuus aiheuttaa glykoasparagiinien, erityisesti aspartyyli-glukosamiinin, kertymisen elimistöön. Aspartyyli-glukosaminidaasi syntetisoidaan yksittäisenä polypeptidin esiasteena, jonka katkaisu kahteen alayksikköön aktivoi entsyymin. Aspartyyli-glukosaminidaasia

koodaavan geenin mutaatiot aiheuttavat AGU-tautia. Näitä mutaatioita tunnetaan useita erilaisia, ja ne aiheuttavat erilaisia rakeenteellisiä muutoksia entsyymiin.

Suomessa yleisin mutaatio, AGU_{Fin} major, aiheuttaa kaksoispistemutaation seurauksena kahden aminohapon korvautumisen toisella. Näistä ensimmäinen on arginiinin korvautuminen glutamiinilla, ja toinen on kysteinin korvautuminen seriinillä. Ensimmäinen korvautuminen ei itsessään aiheuta ongelmia entsyymille, mutta jälkimmäinen korvautuminen heikentää entsyymin toimintaa häiritsemällä sen laskostumista. Tällöin entsyymin proteolyttinen aktivoituminen epäonnistuu. Suomessa toinen, huomattavasti harvinaisempi mutaatio, AGU_{Fin} minor, aiheutuu kahden nukleotidin häviämistä. Häviämä aiheuttaa ennenaikaisen lopetuskodonin, mikä puolestaan tuottaa epäaktiivisen entsyymin. Suomen ulkopuolelta on löytynyt useita eri mutaatioita. Yksi näistä esiintyy useammassa eri perheessä, ja siinä entsyymin aktiivisen kohdan seriini korvautuu proliinilla. Tämä korvautuminen estää AGA:n esiasteen normaalia katkaisua kahdeksi alayksiköksi, ja täten entsyymi ei aktivoidu.

Yksi lupaava menetelmä AGU-taudin parantamiseen on adenovirusvektorin AAV9 käyttäminen geeninsiirrossa. Menetelmä on onnistuneesti auttanut AGU-hiiriä lisäämään aspartyyli-glucosaminidaasin tuotantoa. Muihin kokeellisiin hoitokeinoihin kuuluu farmakologisten saponien käyttö entsyymin aktiivisuuden lisäämisessä, tai esimerkiksi entsyymin substraatin synteesin inhibointi.

7. Kirjallisuuslähteet

- Arvio, M., & Mononen, I. (2016). Aspartylglycosaminuria: a review. In *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 11, Issue 1, pp. 1–10). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0544-6>
- Arvio, P., & Arvio, M. (2007). Progressive nature of aspartylglucosaminuria. *Acta Paediatrica*, *91*(3), 255–257. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2002.tb01707.x>
- Banning, A., Gülec, C., Rouvinen, J., Gray, S. J., & Tikkanen, R. (2016). Identification of Small Molecule Compounds for Pharmacological Chaperone Therapy of Aspartylglucosaminuria. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep37583>
- Chen, X., Snanoudj-Verber, S., Pollard, L., Hu, Y., Cathey, S. S., Tikkanen, R., & Gray, S. J. (2021). Pre-clinical Gene Therapy with AAV9/AGA in Aspartylglucosaminuria Mice Provides Evidence for Clinical Translation. *Molecular Therapy*, *29*(3), 989–1000. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.11.012>
- Enomaa, N. E., Lukinmaa, P.-L., Ikonen, E. M., Waltimo, J. C., Palotie, A., Paetau, A. E., & Peltonen, L. (1993). Expression of Aspartylglucosaminidase in Human Tissues from Normal Individuals and Aspartylglucosaminuria Patients'. In *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry Original Article* (Vol. 41, Issue 7).

- Goodspeed, K., Horton, D., Lowden, A., Sguigna, P. v., Booth, T., Wang, Z. J., & Edgar, V. B. (2022). A cross-sectional natural history study of aspartylglucosaminuria. *JIMD Reports*, 63(5), 425–433. <https://doi.org/10.1002/jmd2.12294>
- Harjunen, E. L., Laine, M., Tikkanen, R., & Helenius, P. (2020). Detailed profile of cognitive dysfunction in children with aspartylglucosaminuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 43(2), 318–325. <https://doi.org/10.1002/jimd.12159>
- Mononen, I., Heisterkamp, N., Dunder, U., Romppan, E.-L., Noronkoski, T., Kuronen, I., & Groffen, J. (1995). Recombinant glycosylasparaginase and in vitro correction of aspartylglucosaminuria. *FASEB Journal*, 9(5), 428–433. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.5.7896015>
- Norio, R. (2003). The Finnish disease heritage III: The individual diseases. In *Human Genetics* (Vol. 112, Issues 5–6, pp. 470–526). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0877-1>
- Oinonen, C., Tikkanen, R., Rouvinen, J., & Peltonen, L. (1995). • *Three-dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase*. <http://www.nature.com/nsmb>
- Parenti, G., Pignata, C., Vajro, P., & Salerno, M. (2013). New strategies for the treatment of lysosomal storage diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 31(1), 11–20. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1187>
- Peltola, M., Tikkanen, R., Peltonen, L., & Jalanko, A. (1996). Ser72Pro active-site disease mutation in human lysosomal aspartylglucosaminidase: abnormal intracellular processing and evidence for extracellular activation. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 5, Issue 6).
- Pera, M., & Kollman, P. A. (1997). *A Simulation of the Catalytic Mechanism of Aspartylglucosaminidase Using ab Initio Quantum Mechanics and Molecular Dynamics*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Peräkylä, M., & Rouvinen, J. (1996). Ab initio quantum mechanical model calculations on the catalytic mechanism of aspartylglucosaminidase (AGA): A serine protease-like mechanism with an N-terminal threonine and substrate-assisted catalysis. *Chemistry - A European Journal*, 2(12), 1548–1551. <https://doi.org/10.1002/chem.19960021212>
- Riikonen, A., Ikonen, E., Sormunen, R., Lehto, V.-P., Peltonen, L., & Jalanko, A. (1994). Dissection of the Molecular Consequences of a Double Mutation Causing a Human Lysosomal Disease. *DNA and Cell Biology*, 13(3), 257–264. <https://doi.org/10.1089/dna.1994.13.257>
- Riikonen, A., Rouvinen, J., Tikkanen, R., Julkunen, I., Peltonen, L., & Jalanko, A. (1996). *Primary Folding of Aspartylglucosaminidase SIGNIFICANCE OF DISULFIDE BRIDGES AND EVIDENCE OF EARLY MULTIMERIZATION**.
- Saarela, J., Laine, M., Oinonen, C., von Schantz, C., Jalanko, A., Rouvinen, J., & Peltonen, L. (2001). Molecular pathogenesis of a disease: structural consequences of aspartylglucosaminuria mutations. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 10, Issue 9).
- Tikkanen, R., Peltola, M., Oinonen, C., Rouvinen, J., & Peltonen, L. (1997). Several cooperating binding sites mediate the interaction of a lysosomal enzyme with phosphotransferase. *EMBO Journal*, 16(22), 6684–6693. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.22.6684>
- Uusitalo, A., Tenhunen, K., Tenhunen, J., Matikainen, S., Peltonen, L., & Jalanko, A. (1997). *Expression and Regulation of the Human and Mouse Aspartylglucosaminidase Gene**. <http://www-jbc.stanford.edu/jbc/>

Valkonen, S., Hietala, M., Savontaus, M. L., & Aula, P. (1999). Origin of Finnish mutations causing aspartylglucosaminuria. *Hereditas*, *131*(3), 191–195. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1999.t01-1-00191.x>