



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap

Pyruvatkinasbrist

Genetik och klinisk bild hos katt, hund och
människa

Pyruvate kinase deficiency
- Genetics and clinical manifestation in
cat, dog and human

Felicia J. Bergqvist

*Uppsala
2019*

Pyruvatkinasbrist

- Genetik och klinisk bild hos katt, hund och människa

Pyruvate kinase deficiency

- Genetics and clinical manifestation in cat, dog and human

Felicia J. Bergqvist

Handledare: Åsa Ohlsson, Sveriges lantbruksuniversitet,
institutionen för husdjursgenetik

Examinator: Maria Löfgren, Sveriges lantbruksuniversitet,
institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kursansvarig institution: Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsvetenskap

Kurskod: EX0862

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: pyruvatkinasbrist, PK-brist, katt, hund, människa, PKLR, mutation, symptom

Key words: pyruvate kinase deficiency, PK deficiency, cat, dog, human, PKLR, mutation, symptoms

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	3
Genetisk bakgrund	3
<i>Mutation hos katt</i>	4
<i>Mutationer hos hund</i>	4
<i>Mutationer hos människa</i>	5
Klinisk bild.....	6
<i>Kliniska symptom hos katt</i>	6
<i>Kliniska symptom hos hund</i>	7
<i>Kliniska symptom hos människa</i>	8
Diskussion.....	8
Litteraturförteckning	12

SAMMANFATTNING

Pyruvatkinasbrist är en av de vanligaste ärftliga hemolytiska anemierna som orsakas av enzymbrist. Sjukdomen har observerats hos människor över hela världen och hos flertalet raser av hund och katt. Orsaken till sjukdomen är mutationer i genen *PKLR*, vilket påverkar enzymet pyruvatkinas som ingår i glykolysen och är bland annat livsviktig för de röda blodkropparnas energiförsörjning. I den här litteraturstudien beskrivs den genetiska bakgrunden till pyruvatkinasbrist, den kliniska bilden samt likheter och skillnader i dessa mellan de tre djurslagen katt, hund och människa.

Hos människa har över 250 mutationer i genen *PKLR* hittats. Vissa mutationer har påträffats mer frekvent i särskilda geografiska områden, bland annat: 1529G→A i norra och centrala Europa samt USA, 1456C→T i södra Europa och 1436G→A i Indien. Hos hund har däremot bara fem rasspecifika mutationer hittats: en frameshift-mutation hos basenji, en nonsensmutation hos labrador retriever, två olika missense-mutationer hos mops respektive beagle, samt en insertionsmutation hos west highland white terrier och cairnterrier. För felin pyruvatkinasbrist har endast en missense-mutation identifierats som orsak, och mutationen har hittats hos ett tiotal kattraser.

Pyruvatkinasbrist kan vara svårt att diagnostisera då symptomen ofta är diffusa och därmed svåra att upptäcka. Sjukdomen kan vid första anblick yttra sig i form av bleka slemhinnor, trötthet och motionsintolerans. Vid klinisk undersökning ses avvikande blodvärden, järnöverskott och hepatosplenomegali. Katter och människor uppvisar ofta ikterus, ett symptom som sällan ses hos hund. Likaså är gallsten en komplikation som frekvent drabbar människor och katter med pyruvatkinasbrist, men det har än så länge aldrig rapporterats hos hund. Hos hundar och människor har man sett hjärtförstoring till följd av den kroniska anemin som sjukdomen innebär. Unikt för hund är att de även utvecklar en progressiv osteoskleros och myelofibros.

Hos människa har vissa typer av mutationer associerats till en allvarligare klinisk bild av sjukdomen. Denna association är överensstämmande med vad som setts hos hund, där basenji och labrador retriever identifierats med en frameshift-mutation respektive en nonsens-mutation. Dessa hundraser har uppvisat allvarligare symptom i jämförelse med övriga raser med andra typer av mutationer. Vad gäller katt kvarstår dock frågetecken, då en variation i sjukdomens allvarlighetsgrad kan ses trots samma mutation. Flera av de drabbade kattraserna har visats vara relaterade till abessinier, men huruvida mutationen först uppkommit i abessinier eller i den ursprungliga slumpavlade kattpopulationen kan diskuteras.

Slutsatsen är att det förekommer en variation i genetisk bakgrund och klinisk bild hos individer med pyruvatkinasbrist. Mer forskning krävs för att identifiera ytterligare mutationer som troligen ännu är oupptäckta, framför allt inom hund- och kattpopulationen. På så sätt kan nya DNA-tester utvecklas, drabbade individer kan diagnostiseras och genom selektiv avel kan sjukdomens frekvens minskas.

SUMMARY

Pyruvate kinase deficiency is one of the most common hereditary hemolytic anemias caused by an enzyme deficiency. The disease has been observed in humans all over the world and in multiple breeds of dog and cat. The cause of this disease are mutations in the gene *PKLR*. These mutations affect the enzyme pyruvate kinase, which is involved in glycolysis and is essential in the energy supply of the red blood cells. In this thesis, the genetic background and clinical manifestation of pyruvate kinase deficiency will be described. Similarities and differences in this area between cats, dogs and humans will also be discussed.

In humans, more than 250 different mutations in *PKLR* associated with pyruvate kinase deficiency have been found. This thesis is focusing on three mutations associated to specific geographical areas: 1529G→A in northern and central Europe and in the US, 1456C→T in southern Europe and 1436G→A in India. In dogs, five breed-specific mutations have been found: a frameshift mutation in Basenji, a nonsense mutation in Labrador Retriever, two different missense mutations in Pug and Beagle, respectively, and an insertion mutation in West Highland White Terrier and Cairn Terrier. Only one missense mutation has been identified to cause feline pyruvate kinase deficiency and it has been found in multiple cat breeds.

There are difficulties in diagnosing individuals with pyruvate kinase deficiency because of diffuse clinical symptoms. The first observable signs are often pale mucous membranes, fatigue and exercise intolerance. Clinical examination can reveal abnormal blood counts, iron overload and hepatosplenomegaly. Cats and humans often exhibit icterus, a symptom which is rarely seen in dogs. Another complication that frequently occur in humans and cats affected by pyruvate kinase deficiency is gallstones, and so far, this has not been reported in dogs. Humans and dogs on the other hand, have both shown cardiomegaly as a result of chronic anemia. A unique feature only seen in pyruvate kinase deficient dogs is the development of osteosclerosis and myelofibrosis.

In humans, certain mutations have been associated to severe clinical manifestation. An association between mutation and severity of disease has also been observed in dogs. The Basenji and the Labrador retriever are carriers of a frameshift mutation and a nonsense mutation, respectively, and more severely affected by the disease compared to other breeds. When it comes to cats, questions remain since a variation in the severity of disease can be seen, despite it being the same mutation. Several of the affected cat breeds are related to the Abyssinian, but whether the mutation first occurred in the Abyssinian or in the original random-bred cat population can be debated.

In conclusion, there is a variation in genetics and clinical manifestation in individuals affected by pyruvate kinase deficiency. More research is needed in order to identify additional mutations, particularly within the dog and cat population, since many are probably still undiscovered. This way, new DNA tests can be developed, affected individuals can be diagnosed and through selective breeding, the frequency of the disease can be controlled.

INLEDNING

Pyruvatkinasbrist är en av de vanligaste orsakerna till ärftlig hemolytisk anemi relaterad till enzymbrist (Ferrier, 2017). Sjukdomen har beskrivits hos människor, hundar och katter i många olika delar av världen och nya bakomliggande mutationer till sjukdomen upptäcks ständigt hos människa, men bara en har hittills konstaterats hos katt (Giger, 2010). Hos alla djurslag förekommer det även en stor variation i symptom och allvarlighetsgrad hos de drabbade, vilket ibland gör det svårt att upptäcka sjukdomen och somliga som är affekterade av pyruvatkinasbrist blir inte diagnostiserade förrän senare i livet (Giger, 2010).

Pyruvatkinas (PK) ingår som enzym i glykolysen och katalyserar den irreversibla reaktionen då fosfoenolpyruvat omvandlas till pyruvat. Resultatet av reaktionen blir att ATP bildas. Vid PK-brist kan inte glykolysen fungera normalt, vilket leder till nedsatt produktion av ATP. Mogna erythrocyter, vilka saknar mitokondrier, är helt beroende av glykolysen för utvinning av ATP. ATP är nödvändigt för att erythrocyterna ska behålla sin form och funktion, utan det förkortas cellernas livslängd och en hemolytisk anemi utvecklas (Ferrier, 2017).

Syftet med den här litteraturstudien är att beskriva den genetiska bakgrunden och kliniska bilden av PK-brist hos katt, hund och människa baserat på publicerade studier, för att sedan diskutera likheter och skillnader inom och mellan djurslagen. Frågeställningar som ska besvaras är: Vad är den genetiska bakgrunden till PK-brist hos katt, hund och människa? Vilken är den kliniska bilden hos respektive djurslag? Finns det likheter och/eller skillnader i symptom inom och mellan djurslagen? Kan eventuella skillnader i symptom ha en genetisk orsak? Genom att besvara dessa frågor ska en mer samlad och övergripande bild av sjukdomen och dess genetik ges.

MATERIAL OCH METODER

Litteratursökning har gjorts i databaserna Web of Science, PubMed, Google Scholar och Primo. Sökord som användes var pyruvate kinase, pk, deficiency, cat, feline, gene, genetic, mutation, dog och canine i ett flertal olika kombinationer. Begränsning till "other animals" på PubMed gjordes i avseende att få artiklar inriktade på andra djur än människa. Fler vetenskapliga artiklar hittades i referenslistor. Likaså har facklitteratur inom biokemi och veterinärmedicin använts.

LITTERATURÖVERSIKT

Genetisk bakgrund

Pyruvatkinas har fyra isoformer, så kallade isozymer, vilka är vävnadsspecifika och transkriberas från två olika gener: *PKM* och *PKLR* (Giger, 2010). *PKM* kodar för M1- respektive M2-isozym, de så kallade muskel-isoformerna. Dessa skapas genom alternativ splicing av RNA (Noguchi *et al.*, 1986). *PKLR* kodar för isozymerna som främst produceras i lever (L-PK) och i röda blodkroppar (R-PK) (Giger, 2010). *PKLR* består av 12 exoner och 11 introner, där det första och andra exonet kodar specifikt för R- respektive L-typen. Vilket isozym som bildas från *PKLR* avgörs genom att olika promotorer aktiveras (Noguchi *et al.*, 1987).

R-PK som enzym består av 574 aminosyror och är en homotetramer, således är det uppbyggt av fyra identiska subenheter. Varje subenhet är indelad i fyra domäner: N, A, B och C. Domän

A sträcker sig från aminosyra 85 till 159 samt aminosyra 263 till 431. Den här domänen är högt konserverad jämfört med domän B och C som är mer föränderliga. Den aktiva ytan, där fosfoenolpyruvat som substrat binder in, är belägen i en klyfta mellan domän A och domän B. Interaktioner mellan och inom de olika subenheterna har stor betydelse för enzymets funktion (van Wijk *et al.*, 2009).

PK-brist nedärvs autosomalt recessivt och kliniska symptom kan därför ses hos individer som är homozygota för en orsakande mutation i *PKLR* (Zanella *et al.*, 2007). Heterozygoter visar generellt inte några tecken på sjukdom. Bland människor med klinisk PK-brist är de flesta kombinerat heterozygota, vilket innebär att de bär på två olika orsakande mutationer (van Wijk *et al.*, 2009).

Mutation hos katt

Hos katt har endast en orsakande mutation i *PKLR* hittats men hos ett flertal raser (Grahn *et al.*, 2012). Mutationen är en punktmutation vid position 304 i intron 5, där guanin byts ut till adenin vilket leder till en felaktig splicing. Följden blir en deletion av 13 baspar vid 3'-ändan på exon 5. Det resulterar i ett förkortat protein där hela 57 % av det slutliga proteinet förloras (Grahn *et al.*, 2012). I studien av Grahn *et al.* (2012) utfördes *in silico* translation av genprodukten. Det visade på en förskjutning av läsramen, vilket orsakade en felaktig translation av de första tjugo aminosyrorerna i exon 6 och gav därefter ett för tidigt stoppkodon vid position 248. Det är dock ännu inte klarlagt hur mutationen på intron 5 ger upphov till den felaktiga splicingen (Grahn *et al.*, 2012). PK-brist hos katt dokumenterades först hos rasen abessinier och somali, vilket är en långhårig variant av abessinier. Sjukdomen har sedan dess även beskrivits hos korthåriga huskatter (Giger, 2010). I studien av Grahn *et al.* (2012) hittades den orsakande mutationen för PK-brist hos ytterligare raser, bland andra bengal, egyptisk mau och singapura. Hos dessa tre raser har inkorsning av abessinier skett för rasernas utveckling. I samma studie påvisades dessutom mutationen hos norsk skogkatt, sibirisk katt och maine coon som har sitt geografiska ursprung från vilda kattpopulationer i Skandinavien, Ryssland respektive USA (Grahn *et al.*, 2012). Bland dessa raser är det inte känt att abessinier eller annan affekterad ras har korsats in, men eftersom mutationen hittades även hos dessa är det troligt att katter som burit på den muterade allelen någon gång har avlats in. Det kan vara avelskatter eller katter med vilt ursprung i syfte att expandera rasen eller frambringa en önskad fenotyp (Grahn *et al.*, 2012).

Mutationer hos hund

PK-brist har rapporterats hos flera olika hundraser, däribland basenji, beagle, west highland white terrier (WHWT) och cairnterrier (Giger, 2010). Basenji var den första hundrasen där PK-brist upptäcktes och hos vilken sjukdomen har varit vanligast förekommande. Hos basenji har en mutation identifierats som innebär en deletion av ett baspar i exon 5 i *PKLR*. Konsekvensen blir en förskjutning av läsramen, så kallad frameshift-mutation och att ett mycket förkortat protein bildas (Giger, 2010).

I en studie av Gultekin *et al.* (2012) identifierades mutationer hos flera hundar av olika ras som alla led av kronisk regenerativ anemi och som visade sig vara orsakat av PK-brist. En av de raser som deltog i studien var labrador retriever. Där identifierades en punktmutation i exon 7 i *PKLR*, närmare bestämt cytosin som hade bytts ut till tymin vid position 799. Konsekvensen

av ett sådant utbyte blir en nonsensmutation där glutamin ändras till ett stoppkodon, vilket resulterar i att ett förkortat protein bildas. De två affekterade labradorerna som deltog i studien var båda homozygota för mutationen (Gultekin *et al.*, 2012).

En mutation för PK-brist hittades även hos en mops, som visade sig vara homozygot för en annan punktmutation i exon 7. Hos mops hade tymin bytts ut till cytosin på plats 848, vilket innebär en missense-mutation där aminosyran valin ändras till alanin i proteinsekvensen. För att undersöka hur utbytet av aminosyran påverkar proteinets funktion, användes ett program kallat Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT). Enligt SIFT-analys tolereras endast aminosyrorna valin och isoleucin vid mutationens position. Mutationen orsakar en aminosyraändring bara några få aminosyror bort från enzymets aktiva yta, platsen där enzymets substrat binder in. Dessutom befinner sig mutationen i en region som är högt konserverad mellan flera däggdjursarter (Gultekin *et al.*, 2012).

Även beagle undersöktes för orsakande mutationer bakom PK-brist. Likaså där hittades en punktmutation i exon 8 i *PKLR* (Gultekin *et al.*, 2012). Utbytet i det här fallet var guanin till adenin vid position 994, vilket får följden att glycin ändras till serin i proteinet. Baserat på SIFT-analys tolereras bara glycin på platsen för den aktuella aminosyra-ändringen, vilken dessutom är belägen i en välkonserverad region. Av den anledningen är det troligt att mutationen ger upphov till ett ofunktionellt enzym (Gultekin *et al.*, 2012).

I en tidigare studie av Skelly *et al.* (1999) identifierades en mutation associerad till PK-brist hos WHWT. Mutationen som hittades var en insertion av sex baspar vid 3'-ändan av exon 10 i *PKLR*. Insertion av sex baspar resulterar i att ytterligare två aminosyror bildas, treonin och lysin. Detta ger ingen förskjutning av läsramen, men har troligtvis effekt på enzymets aktivitet (Skelly *et al.*, 1999). Samma mutation har även hittats hos hundar av rasen cairnterrier, vilket kan förklaras med att de två hundraserna är närbesläktade (Gultekin *et al.*, 2012).

Mutationer hos människa

År 2016 hade omkring 260 olika mutationer i *PKLR* rapporterats hos människa (Canu *et al.*, 2016). De vanligaste typerna av mutationer i humana *PKLR* är i fallande ordning: punktmutation, deletion eller insertion samt mutation i intron eller promoter (vilket kan påverka splicing). Punktmutationer är överlägset vanligast och utgjorde år 2016 72 % av de identifierade mutationerna (Canu *et al.*, 2016).

En del av mutationerna som påträffats har en tydlig koppling till geografiska områden där de förekommer mer frekvent (Zanella & Bianchi, 2000). En av dessa mutationer som påvisats vid PK-brist är 1529G→A, vilken är vanligast förekommande i USA samt norra och centrala Europa. Mutationen är en punktmutation där kvävebasen guanin på position 1529 i genens exon 11, byts ut mot adenin. Utbytet leder till att aminosyran glutamin ersätter arginin på dess plats i proteinet. Konsekvensen blir ett instabilt enzym (Lenzner *et al.*, 1997), då aminosyrautbytet sker på en plats i C-domänen som är viktig för interaktionen mellan subenheter (Zanella *et al.*, 1997). Vid analys av 29 patienter från Centraleuropa, alla drabbade av hemolytisk anemi på grund av PK-brist, sågs mutationen i nästan hälften av alla alleler som analyserades. Av de som bar på mutationen var nio patienter homozygota och sex personer var kombinerat heterozygota (Lenzner *et al.*, 1997). I en annan studie från USA, påvisades mutationen hos

omkring 28 % av patienterna som var drabbade av PK-brist. I studien ingick 20 patienter, men även 102 fall som tidigare rapporterats i litteraturen togs med i beräkningen. Det har visat sig att de flesta homozygoter med 1529G→A uppvisar en svår anemi (Beutler & Gelbart, 2000). Mutationen har nyligen identifierats i homozygot tillstånd hos en flicka med allvarliga kliniska symptom i Brasilien (Svidnicki *et al.*, 2018). Likaså har mutationen hittats i homozygot form i en familj, där fyra av fem syskon behövde genomgå både splenektomi (borttagande av mjälte) och kolecystektomi (borttagning av gallstenar) (Zanella *et al.*, 1997).

En annan mutation som hittats hos patienter med PK-brist är 1456C→T, som främst förekommer bland populationen i södra Europa. Mutationen har påvisats vara vanligast förekommande vid studier som gjorts i både Portugal (Manco *et al.*, 1999) och Italien (Zanella *et al.*, 1997). Mutationen 1456C→T innebär att cytosin byts ut mot tymin i exon 11 i *PKLR*. Det resulterar i att aminosyran tryptofan translateras istället för arginin, vid position 486 i proteinet (Zanella *et al.*, 1997). Utbytet till tryptofan verkar ha en liten påverkan på enzymets molekylära egenskaper, då tryptofans sidokedja passar in på platsen utan att orsaka någon strukturell störning. Den enda påverkan som har setts är sänkt katalytisk effekt (Valentini *et al.*, 2002), som kan bero på lägre affinitet för enzymets substrat fosfoenolpyruvat (Zanella *et al.*, 1997). Mutationen hittas för det mesta i kombinerat heterozygot tillstånd. Hos patienter som är homozygota för mutationen ses generellt milda kliniska symptom, vilket skulle kunna förklaras av de få molekylära förändringarna som mutationen ger upphov till (Valentini *et al.*, 2002). Samma mutation har i en tidigare studie visat sig vara vanligast förekommande även i Spanien (Zarza *et al.*, 1998), men i en nyare undersökning hamnar mutationen på andra plats avseende frekvens bland spanska patienter med PK-brist (Montllor *et al.*, 2017).

Två studier från Indien visar att den vanligast förekommande PK-mutationen bland den indiska populationen är 1436G→A. Mutationen innebär ett utbyte av guanin till adenin och konsekvensen blir att aminosyran arginin ersätts av histidin på dess plats i proteinet (Warang *et al.*, 2013). Det här utbytet sker i närheten av bindningsstället för enzymets substrat, och följden blir att histidins sidokedja pekar in i fickan där substratet ska binda in. Sidokedjan är hydrofob och tar dessutom upp mycket plats vid bindningsstället, vilket resulterar i en påtaglig försämring av enzymets katalytiska effekt (Kedar *et al.*, 2009). Detta kan förklara den allvarliga kliniska bilden som kan ses hos vissa patienter vilka är homozygota för mutationen. Mutationen 1436G→A har bland annat identifierats hos ett nioårigt barn som tagit emot tjugo blodtransfusioner, innan patienten genomgick splenektomi (Warang *et al.*, 2013). Det föreligger dock en otydlighet i litteraturen om mutationen är belägen vid ett splicing-ställe eller enbart är en missense-mutation i exon 10, då Warang *et al.* (2013) och Kedar *et al.* (2009) hävdar båda delarna.

Klinisk bild

Kliniska symptom hos katt

Katter uppvisar generellt intermittenta symptom och en intermittent anemi vid PK-brist, vilket ibland inte märks av förrän katten är av högre ålder (Giger, 2010). I en studie av Kohn & Fumi (2008) samlades information om sjukdomsförloppet hos 25 katter med PK-brist. Forskarna rapporterar att hos ungefär hälften av de deltagande katterna (11/25) hade djurägarna inte uppmärksammat några tecken på sjukdom. Katterna var då i ålder mellan ungefär nio månader

till nästan åtta år. Hos den andra halvan av deltagande katter (14/25) hade kliniska symptom uppkommit redan då katterna varit ett par månader till uppemot fem år gamla. De kliniska symptom som kunde ses var letargi, diarré, bleka slemhinnor, inappetens, dålig pälskvalitet, viktminskning, ikterus samt pica. Ett fåtal djurägare som deltog i studien kunde även se en koppling mellan stressfyllda situationer och uppkomsten av kliniska symptom hos katten. Exempel på faktorer som skulle kunna utlösa hemolys är infektion samt påfrestande situationer såsom förlossning eller utställning (Kohn & Fumi, 2008). Vid biokemisk analys av plasma sågs även att flera av katterna hade varierande grad av retikulocytos, hyperbilirubinemi och hyperglobulinemi. En del katter uppvisade även mild grad av ökad aktivitet hos leverenzymmer. Mild till måttlig splenomegali har även beskrivits hos katter med PK-brist (Kohn & Fumi, 2008).

Komplikationer som kan uppkomma hos katter med PK-brist är hemosideros, bilirubinkoletiasis (gallstenar av bilirubin) och extrahepatisk biliär obstruktion (van Geffen *et al.*, 2008). I en fallrapport av van Geffen *et al.* (2008) beskrivs hur en somalikatt, med bekräftad PK-brist, hade återkommande anorexi, letargi, kräkningar och ikterus. Vid ultraljudsundersökning kunde gallstenar och extrahepatisk gallgångsobstruktion påvisas. Gallstenarna bestod till 100 % av bilirubin. Likaså kunde splenomegali ses, då mjälten var mycket förstörd. Vid histopatologisk undersökning av lever och mjälte kunde man även konstatera hemosideros (van Geffen *et al.*, 2008). Ytterligare en fallrapport beskriver fynd av extrahepatisk biliär obstruktion till följd av bilirubin-gallstenar hos en somalikatt med PK-brist (Harvey *et al.*, 2007).

Kliniska symptom hos hund

Hos WHWT på Irland och i Storbritannien har följande kliniska fynd beskrivits i en fallrapport: bleka slemhinnor, blåsljud samt palperbar hepatomegali och splenomegali (Juvet *et al.*, 2013). De tre hundarna som ingick i fallrapporten var pigga och livliga. De uppvisade till en början ytterst få symptom såsom bleka slemhinnor eller milda tecken på motionsintolerans. Vid blodutstryk kunde ökad erytropoes ses samt polykromasi, anisocytos och kärnförande erythrocyter. Även mild högersidig hjärtförstoring kunde ses hos hundarna, vilket antogs vara till följd av den kroniska anemin. Bildning av gallstenar har inte rapporterats som komplikation hos hundar med PK-brist (Juvet *et al.*, 2013).

I en annan studie där hundar av olika ras undersöktes, kunde liknande symptom som hos WHWT ses (Gultekin *et al.*, 2012). Tre hundar av raserna labrador retriever, mops och beagle uppvisade alla svår anemi, blekhet, motionsintolerans och perioder av allvarlig svaghet. Vid klinisk undersökning kunde även hyperbilirubinuri och mild hyperbilirubinemi ses, men ingen av hundarna hade ikterus. Blodanalys från labradoren visade hyperferritinemi och hög järnkonzentration i serum (Gultekin *et al.*, 2012). En annan labrador i samma studie hade tilltagande kliniska symptom med dålig prognos, vilket ledde till att hunden avlivades vid två års ålder. Vid obduktion kunde bland annat diffus ikterus och järnackumulering ses. Järnackumuleringen sågs i form av hemosideros och hemokromatos, det vill säga med negativ påverkan på leverns funktion (Gultekin *et al.*, 2012).

Ett kliniskt fynd som är unikt för hundar drabbade av PK-brist är progressiv osteoskleros och myelofibros. I en fallstudie på en beagle med diagnostiserad PK-brist, sågs fibrös vävnad och

organiserat trabekulärt ben i mörghålan vid histopatologisk undersökning av femur (Giger *et al.*, 1991). Även hos en 19 månader gammal WHWT-valp, som på grund av PK-brist lidit av svimningar i perioder samt konstant bleka slemhinnor, upptäcktes ökad bentäthet vid röntgen vilket är en indikation på osteoskleros. Det är ännu oklart varför hundar med PK-brist utvecklar en progressiv myelofibros och osteoskleros, och dessa kliniska fynd har inte påträffats hos varken katt eller människa (Hlavac *et al.*, 2012).

Kliniska symptom hos människa

I en undersökning av Grace *et al.* från 2018 intervjuades 21 vuxna människor med diagnosen PK-brist. Frågorna som ställdes handlade om vilka symptom personerna upplevde och hur sjukdomen påverkade deras vardag. De vanligaste symptomen som beskrevs var: gula ögon och gul hud (gulsot), trötthet, utmattning, minskad uthållighet, andfåddhet, blek hud, yrsel, svaghet, koncentrationssvårigheter samt värk i ben och/eller leder. Personerna som deltog i studien nämnde även att sjukdomen hade negativ inverkan på deras dagliga liv, då de behövde vila oftare, hade svårt att träna eller delta i sporter samt att de blev mer mottagliga för sjukdomar (Grace *et al.*, 2018).

I en annan studie av Zanella & Bianchi (2000) där den kliniska bilden hos 52 patienter noterades, beskrevs anemi, gulsot i varierande grad samt lindrig till måttlig splenomegali hos ungefär två tredjedelar av patienterna. Ett annat vanligt kliniskt tecken som kunde ses var neonatal hyperbilirubinemi (Zanella & Bianchi, 2000). Ett sällsynt symptom som har rapporterats vid PK-brist är hydrops fetalis, vilket innebär ödem i flera av fostrets kroppsdelar och ses i kombination med anemi (Hamdan, 2017). Komplikationer till PK-brist som förekommer relativt ofta hos människor, är gallsten och järnöverskott (Zanella & Bianchi, 2000). Gallsten till följd av PK-brist kan förekomma även hos patienter i ung ålder. Hos en drabbad patient hittades gallstenar då personen endast var fyra år gammal (Manco *et al.*, 1999). Järnöverskott drabbar framför allt personer som regelbundet får blodtransfusioner (Giger, 2010), men det har även rapporterats hos mer än hälften av alla patienter med PK-brist som inte har mottagit någon transfusion. Hos personer som är svårt drabbade av PK-brist kan även viss myokardiell hypertrofi ses, som ett resultat av ökad hjärtminutvolym och kroppens försök att kompensera för anemin (Zanella & Bianchi, 2000).

DISKUSSION

Den genetiska bakgrunden till PK-brist skiljer sig mellan de olika djurslagen, men gemensamt är mutationer i *PKLR*. Den vanligaste typen av mutation hos samtliga djurslag är punktmutation. Mutationerna som hittats hos de olika djurslagen är spridda över nästan hela genen och lokaliserade i olika exon. Hos katt har endast en punktmutation konstaterats i intron 5 och den förekommer i ett tiotal olika kattraser. Mutationen i intron 5 resulterar i felaktig splicing och deletion av baspar i exon 5 i *PKLR*. Slutprodukten blir ett kraftigt förkortat protein (Grahn *et al.*, 2012). Hos hund har ingen liknande mutation identifierats, men däremot har fem olika rasspecifika mutationer hittats hittills. Mutationen som hittats hos rasen basenji är belägen i exon 5 och är en frameshift-mutation, där konsekvensen blir ett förkortat protein (Giger, 2010). Hos både WHWT och cairnterrier, som är två närbesläktade raser, har en insertionsmutation identifierats (Gultekin *et al.*, 2012). Mutationen är belägen i exon 10 i *PKLR* och ger translation av ytterligare två aminosyror (Skelly *et al.*, 1999). Hos mops och beagle har

forskare identifierat två olika missense-mutationer i exon 7, respektive exon 8. Mutationen leder i båda fallen till ändring av en aminosyra i proteinsekvensen. Hos labrador retriever har en nonsens-mutation hittats, också belägen i exon 7, vilket leder till att ett förkortat protein bildas (Gultekin *et al.*, 2012).

Betydligt fler mutationer har hittats som orsak till PK-brist hos människor, närmare 260 olika mutationer i *PKLR*. I den här litteraturstudien tas tre missense-mutationer upp, vilka har visats förekomma mer frekvent i vissa geografiska områden. I norra och centrala Europa samt i USA är mutationen 1529G→A vanligast förekommande (Lenzner *et al.*, 1997). I södra Europa förekommer mutationen 1456C→T oftare (Zanella *et al.*, 1997; Manco *et al.*, 1999), medan i Indien hittas mutationen 1436G→A mer frekvent (Kedar *et al.*, 2009; Warang *et al.*, 2013). Både mutation 1529G→A och 1456C→T är belägna i exon 11 i *PKLR* (Lenzner *et al.*, 1997; Zanella *et al.*, 1997). Mutationen 1436G→A är istället lokaliserad i genens exon 10 (Kedar *et al.*, 2009). Det här visar på att det förekommer skillnader i genetiken bakom PK-brist, men att hos katt, hund och människa kan flera mutationer ses som leder till ett förkortat protein. Det kan kopplas till sjukdomens uppkomst, då ett förkortat protein innebär avvikelser i enzymets funktion.

Vad gäller den kliniska bilden har både likheter och skillnader beskrivits i litteraturen. De generella symptom som kan ses hos samtliga djurslag är bleka slemhinnor och/eller blek hud, trötthet/letargi och motionsintolerans (Kohn & Fumi, 2008; Gultekin *et al.*, 2012; Grace *et al.*, 2018). Hos samtliga djurslag har även järnöverskott, i form av hemosideros, beskrivits i olika undersökningar (van Geffen *et al.*, 2008; Gultekin *et al.*, 2012). Att detta även kan ses hos patienter som inte genomgått transfusion hänger ihop med att en ihärdig hemolytisk anemi kan resultera i överdriven järnabsorption från tarmen (Owen & Harvey, 2012). Gallsten har beskrivits som en komplikation till PK-brist hos både katter och människor (Zanella & Bianchi, 2000; van Geffen *et al.*, 2008), men är inget som setts hos hundar med PK-brist. Även ikterus är ett vanligt förekommande symptom vid PK-brist och ses frekvent hos katter och människor med sjukdomen (Kohn & Fumi, 2008; Grace *et al.*, 2018). Symptomet har även förekommit hos enstaka hundar (Gultekin *et al.*, 2012), men det verkar vara mer sällsynt jämfört med hos katt och människa. Bland hundar och människor har även viss grad av hjärtförstoring setts, vilket tros vara till följd av den kroniska anemin då hjärtat tvingas arbeta hårdare för att försöka kroppen med blod (Zanella & Bianchi, 2000; Juvet *et al.*, 2013). Hjärtförstoring har inte beskrivits hos katt, vilket skulle kunna kopplas till att katter med PK-brist ofta uppvisar en intermitterande anemi. Att anemin är intermitterande och inte ständigt ihållande, som hos hund och människa, kan innebära att kroppen inte utsätts för lika stor påfrestning och därmed inte behöver arbeta lika hårt för att kompensera för anemin.

För hund har de unika fynden osteoskleros och myelofibros beskrivits i ett flertal studier. Hund är det enda djurslag som utvecklar en progressiv osteoskleros vid PK-brist och det har setts hos nästan alla drabbade hundar. Orsaken till hundars utvecklande av osteoskleros och myelofibros är okänd (Hlavac *et al.*, 2012), men om det kan vara relaterat till en störd erythropoes på grund av PK-brist är något som bör studeras vidare. Skelly *et al.* (1999) rapporterar att mutationer som hittats hos människa är lokaliserade i närliggande områden till de mutationer som hittats hos basenji och WHWT, men trots det har osteoskleros inte setts hos människor med PK-brist. I en studie beskriver dock personer med sjukdomen att de lider av ben- och ledvärk (Grace *et*

al., 2018). Om det är relaterat till PK-brist eller har en annan bakomliggande orsak är inte klarlagt, men det vore intressant att utreda med tanke på de fynd som gjorts hos hundar med PK-brist.

Hos människa har man sett att vissa mutationer är associerade med en allvarligare klinisk bild av sjukdomen. I en studie där detta undersöktes, visade det sig att patienter med milda kliniska symptom oftare var kombinerat heterozygota för två missense-mutationer. Allvarliga symptom var istället associerade med mutationer som innebär stoppkodon i den första delen av genen som kodar för proteinet, frameshift-mutation eller mutationer som påverkar splicing. Likaså har mutationen 1529G→A i homozygot tillstånd visat sig ge en allvarlig klinisk bild (Zanella & Bianchi, 2000). Det här överensstämmer med den humana mutationen 1436G→A i Indien som sägs vara belägen vid ett splicing-ställe, då homozygoter för mutationen har uppvisat svåra kliniska symptom (Kedar *et al.*, 2009).

Forskare har även sett att den hemolytiska anemin hos hundraserna basenji och labrador retriever verkar vara av allvarligare grad jämfört med vad som ses hos beagle och WHWT. I en studie av Gultekin *et al.* (2012) blev labradorerna inte äldre än fem år gamla på grund av progressiva symptom trots understödande behandling, medan WHWT och beagles i andra studier har setts leva i många år trots svår anemi (Gultekin *et al.*, 2012; Juvet *et al.*, 2013). Att det här kan förklaras av genetik är mycket möjligt. Hos labrador retriever identifierades en nonsens-mutation vilket ger upphov till ett stoppkodon, och hos basenji har en frameshift-mutation hittats. Båda raserna har alltså mutationer som hos människa har förknippats med en allvarlig klinisk bild. I jämförelse är de mutationer som identifierats hos beagle och WHWT en missense-mutation respektive insertionsmutation (utan förskjutning av läsramen). Dessa mutationer påverkar förmodligen inte det slutliga enzymet i lika stor utsträckning avseende struktur och funktion. Mutationen som hittats hos katt innebär en felaktig splicing och därmed ett förkortat protein (Grahn *et al.*, 2012), hur det då kan finnas en så stor variation i sjukdomens kliniska uttryck hos olika katter är något som bör undersökas mer. Om man tittar på mutationen i sig bör den enligt studier på människa ge en allvarlig klinisk bild, då den påverkar splicing och kan leda till förändrat proteinuttryck. Att kliniska symptom är svåra att upptäcka hos katt kan förklaras med kattens naturliga beteende att dölja smärta och svaghet. Det är även möjligt att det finns en genetisk förklaring då många frågor angående PK-brist hos katt ännu är obesvarade. Till exempel finns det än så länge ingen förklaring till det faktum att sjukdomen yttrar sig intermittent hos katt men är mer kronisk hos hund och människa. Det har även diskuterats om det krävs yttre faktorer för att utlösa symptom hos katt. En del djurägare i en studie såg ett samband mellan exponering för stressiga situationer och uppkomst av kliniska symptom hos deras katter (Kohn & Fumi, 2008). Variation i sjukdomens kliniska uttryck kan även bero på individuella skillnader, till exempel förmågan att kompensera för anemin.

Grahn *et al.* (2012) diskuterar sambandet mellan att samma mutation har hittats hos många olika kattraser, och att majoriteten av de drabbade raserna har utvecklats från eller har inkorsning av abessinier. Kattraser i världen har främst selekterats fram utifrån utseende, såsom färg, pälsmönster och typ av päls. Då majoriteten av alla kattraser har utvecklats de senaste 50-75 åren samt har ursprung i en slumpmässigt avlad kattpopulation (Kurushima *et al.*, 2013), finns en möjlighet att denna ärftliga sjukdom funnits redan i den ursprungliga populationen. Vid selektion för abessiniers fenotypiska egenskaper kan den muterade allelen slumpmässigt ökat i

frekvens, vilket gör att sjukdomen främst hittas hos katter relaterade till abessinier. Dock behöver det inte innebära att alla raser där man hittat mutationen är relaterade till abessinier, utan att de kan ha utvecklats ur samma ursprungspopulation. Mutationen i *PKLR* kan ha uppkommit av en slump i ursprungspopulationen, innan selektion för olika raser påbörjades. Något som Grahn *et al.* (2012) nämner är att i början av rasutvecklingen hos katt fanns inga diagnostiska tester tillgängliga. Sjukdomens orsakande mutation var heller inte identifierad, vilket kan ha lett till oavsiktlig spridning av mutationen vid utveckling av kattraser. Det skulle kunna förklara varför mutationen även hittas i maine coon, norsk skogkatt och sibirisk katt. Grahn *et al.* (2012) framför teorin om att man av slumpen använt katter som burit på den muterade genen, när målet varit att expandera dessa raser eller åstadkomma ett specifikt exteriört drag. Då abessinier är den kattra som testats för PK-brist under längst tid, har uppfödare kunnat applicera vetskapen om mutationen till sin avel och medvetet selekterat för att inte avla vidare på individer som är bärare av mutationen. Inom andra kattraser har mutationen kvarstått där det inte varit lika aktuellt att selektera bort den affekterade allelen vid avel (Grahn *et al.*, 2012).

Eftersom sjukdomen uppvisar en bred variation i sitt uttryck försvåras den symptom-baserade diagnostiseringen. Det skulle kunna innebära att individer med PK-brist blir feldiagnostiserade eller förblir odiagnostiserade, särskilt om DNA-test för den specifika orsakande mutationen inte finns tillgängligt. Ett problem med de utvecklade DNA-testerna för PK-brist är att de endast hittar den utvalda mutation man letar efter, det vill säga de mutationer som har identifierats inom djurslaget eller rasen. Individer med samma sjukdom, men med en oidentifierad mutation blir då inte diagnostiserade såvitt inte hela genen sekvenseras. Fler studier för att hitta ytterligare mutationer och utveckla fler DNA-tester är därför nödvändigt enligt egen åsikt. Detta dels för att kunna ställa diagnos hos individer med PK-brist och dels för att kunna upptäcka bärare av orsakande mutationer. Individer som är bärare av mutationer i *PKLR* bör tas hänsyn till vid avel inom hund- och kattpopulationer. Det är även viktigt med kunskap om rasspecifika mutationer för att förenkla screening och diagnostisering, något som poängterats av Gultekin *et al.* (2012) vad gäller hund.

De slutsatser som kan dras är att genetiken bakom sjukdomen skiljer sig mellan djurslag och även inom djurslag i två av fallen, fastän samma gen verkar vara drabbad. Då över 250 mutationer i *PKLR* har hittats hos människa och även ett flertal hos hund, verkar det suspekt att endast en mutation skulle förekomma hos katt. Jag anser att sannolikheten är stor att fler PK-mutationer hos både katt och hund ännu är oupptäckta. Det finns även en variation i klinisk bild både mellan och inom djurslagen, vilket gör diagnostiseringen mer komplicerad. Symptomens allvarlighetsgrad kan i vissa fall associeras till den genetiska bakgrunden och typen av mutation som orsakat sjukdomen. Många frågor är dock ännu obesvarade och mer forskning behövs för att vidareutveckla kunskapen om ytterligare orsakande mutationer, därigenom kan nya DNA-tester tas fram och diagnostisering kan förbättras samt underlättas. Förhoppningen är att fler drabbade individer inom alla djurslag kan få hjälp, och att kunskapen kan användas till att genom selektiv avel minska sjukdomens frekvens på djursidan.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Beutler, E. & Gelbart, T. (2000). Estimating the prevalence of pyruvate kinase deficiency from the gene frequency in the general white population. *Blood*, 95(11), pp 3585–3588.
- Canu, G., De Bonis, M., Minucci, A. & Capoluongo, E. (2016). Red blood cell PK deficiency: An update of PK-LR gene mutation database. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 57, pp 100–109.
- Ferrier, D.R. (2017). *Lippincott's illustrated reviews. Biochemistry*. 7. ed., Philadelphia: Wolters Kluwer.
- van Geffen, C., Savary-Bataille, K., Chiers, K., Giger, U. & Daminet, S. (2008). Bilirubin cholelithiasis and haemosiderosis in an anaemic pyruvate kinase-deficient Somali cat. *Journal of Small Animal Practice*, 49(9), pp 479–482.
- Giger, U. (2010). Hereditary erythrocyte enzyme abnormalities. I: Weiss, D.J. & Wardrop, K.J., *Schalm's veterinary hematology*. 6. Ed., Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, s. 179–185.
- Giger, U., Mason, G. D. & Wang, P. (1991). Inherited erythrocyte pyruvate kinase deficiency in a beagle dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 20(3), pp 83–86.
- Grace, R. F., Cohen, J., Egan, S., Wells, T., Witherspoon, B., Ryan, A., Salek, S. S., Bodie, S. & Klaassen, R. J. (2018). The burden of disease in pyruvate kinase deficiency: Patients' perception of the impact on health-related quality of life. *European Journal of Haematology*, 101(6), pp 758–765.
- Grahn, R. A., Grahn, J. C., Penedo, M. C. T., Helps, C. R. & Lyons, L. A. (2012). Erythrocyte Pyruvate Kinase Deficiency mutation identified in multiple breeds of domestic cats. *Bmc Veterinary Research*, 8, p 207.
- Gultekin, G. I., Raj, K., Foureman, P., Lehman, S., Manhart, K., Abdulmalik, O. & Giger, U. (2012). Erythrocytic Pyruvate Kinase Mutations Causing Hemolytic Anemia, Osteosclerosis, and Secondary Hemochromatosis in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(4), pp 935–944.
- Hamdan, A.H (2017). Hydrops fetalis. I: *Medscape drugs & diseases* Tillgänglig: <https://emedicine.medscape.com/article/974571-overview> [2019-03-11]
- Harvey, A. M., Holt, P. E., Barr, F. J., Rizzo, F. & Tasker, S. (2007). Treatment and long-term follow-up of extrahepatic biliary obstruction with bilirubin cholelithiasis in a Somali cat with pyruvate kinase deficiency. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9(5), pp 424–431.
- Hlavac, N. R. C., Lacerda, L. A., Conrado, F. O., Huenning, P. S., Seibert, M., Gonzalez, F. H. D. & Giger, U. (2012). Hemolytic anemia caused by hereditary pyruvate kinase deficiency in a West Highland White Terrier dog. *Archivos De Medicina Veterinaria*, 44(2), pp 195–200.
- Juvet, F., Giger, U., Battersby, I., Menaut, P., Syme, H. M. & Mooney, C. T. (2013). Erythrocyte pyruvate kinase deficiency in three West Highland white terriers in Ireland and the UK. *Irish Veterinary Journal*, 66, p 12.
- Kedar, P., Hamada, T., Warang, P., Nadkarni, A., Shimizu, K., Fujji, H., Ghosh, K., Kanno, H. & Colah, R. (2009). Spectrum of novel mutations in the human PKLR gene in pyruvate kinase-deficient Indian patients with heterogeneous clinical phenotypes. *Clinical Genetics*, 75(2), pp 157–162.
- Kohn, B. & Fumi, C. (2008). Clinical course of pyruvate kinase deficiency in Abyssinian and Somali cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10(2), pp 145–153.
- Kurushima, J. D., Lipinski, M. J., Gandolfi, B., Froenicke, L., Grahn, J. C., Grahn, R. A. & Lyons, L. A. (2013). Variation of Cats under Domestication: Genetic Assignment of Domestic Cats to Breeds and Worldwide Random Bred Populations. *Animal genetics*, 44(3), pp 311–324.

- Lenzner, C., Nürnberg, P., Jacobasch, G., Gerth, C. & Thiele, B.-J. (1997). Molecular Analysis of 29 Pyruvate Kinase-Deficient Patients From Central Europe With Hereditary Hemolytic Anemia. *Blood*, 89(5), pp 1793–1799.
- Manco, L., Ribeiro, M. L., Almeida, H., Freitas, O., Abade, A. & Tamagnini, G. (1999). PK-LR gene mutations in pyruvate kinase deficient Portuguese patients. *British Journal of Haematology*, 105(3), pp 591–595.
- Montllor, L., Mañú-Pereira, M. D. M., Llaudet-Planas, E., Gómez Ramírez, P., Sevilla Navarro, J. & Vives-Corróns, J. L. (2017). Red cell pyruvate kinase deficiency in Spain: A study of 15 cases. *Medicina Clinica*, 148(1), pp 23–27.
- Noguchi, T., Inoue, H. & Tanaka, T. (1986). The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 261(29), pp 13807–13812.
- Noguchi, T., Yamada, K., Inoue, H., Matsuda, T. & Tanaka, T. (1987). The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. *Journal of Biological Chemistry*, 262(29), pp 14366–14371.
- Owen, J. L. & Harvey, J. W. (2012). Hemolytic Anemia in Dogs and Cats Due to Erythrocyte Enzyme Deficiencies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 42(1), pp 73–84 (Hematology).
- Skelly, B., Wallace, M., Rajpurohit, Y. R., Wang, P. & Giger, U. (1999). Identification of a 6 base pair insertion in West Highland White Terriers with erythrocyte pyruvate kinase deficiency. *American journal of veterinary research*, 60, pp 1169–1172.
- Svidnicki, M. C. C. M., Santos, A., Fernandez, J. A. A., Yokoyama, A. P. H., Magalhães, I. Q., Pinheiro, V. R. P., Brandalise, S. R., Silveira, P. A. A., Costa, F. F. & Saad, S. T. O. (2018). Novel mutations associated with pyruvate kinase deficiency in Brazil. *Revista Brasileira De Hematologia E Hemoterapia*, 40(1), pp 5–11.
- Valentini, G., Chiarelli, L. R., Fortin, R., Dolzan, M., Galizzi, A., Abraham, D. J., Wang, C., Bianchi, P., Zanella, A. & Mattevi, A. (2002). Structure and Function of Human Erythrocyte Pyruvate Kinase: Molecular basis of nonspherocytic hemolytic anemia. *Journal of Biological Chemistry*, 277(26), pp 23807–23814.
- Warang, P., Kedar, P., Ghosh, K. & Colah, R. (2013). Molecular and clinical heterogeneity in pyruvate kinase deficiency in India. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 51(3), pp 133–137.
- van Wijk, R., Huizinga, E. G., van Wesel, A. C. W., van Oirschot, B. A., Hadders, M. A. & van Solinge, W. W. (2009). Fifteen novel mutations in PKLR associated with pyruvate kinase (PK) deficiency: structural implications of amino acid substitutions in PK. *Human Mutation*, 30(3), pp 446–453.
- Zanella, A. & Bianchi, P. (2000). Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 13(1), pp 57–81.
- Zanella, A., Bianchi, P., Baronciani, L., Zappa, M., Bredi, E., Vercellati, C., Alfinito, F., Pelissero, G. & Sirchia, G. (1997). Molecular Characterization of PK-LR Gene in Pyruvate Kinase-Deficient Italian Patients. *Blood*, 89(10), pp 3847–3852.
- Zanella, A., Bianchi, P. & Fermo, E. (2007). Pyruvate kinase deficiency. *Haematologica-the Hematology Journal*, 92(6), pp 721–723.
- Zarza, Alvarez, Pujades, Nomdedeu, Carrera, Estella, Remacha, Sánchez, Morey, Cortes, Lungmus, Pé., Bureo & Corróns, V. (1998). Molecular characterization of the PK-LR gene in pyruvate kinase deficient Spanish patients. *British Journal of Haematology*, 103(2), pp 377–382.