

Perinnöllisen gelsoliiniamyloidoosin proteiiniekspression poikkeavuudet ja amyloidin muodostuksen estäminen

Marika Kyyrönen HLK

Tutkielma

2008

marika.kyyronen@helsinki.fi

Ohjaajat:

Prof. Veli-Jukka Uitto

Dos. Marc Baumann

Helsingin yliopisto

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Hammaslääketieteen laitos	
Tekijä – Författare – Author Marika Kyyrönen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Perinnöllisen gelsoliiniamyloidoosin proteiiniekspression poikkeavuudet ja amyloidin muodostuksen estäminen			
Oppiaine – Läroämne – Subject			
Työn laji – Arbetets art – Level Tutkielma	Aika – Datum – Month and year 6.2008	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 31	
Tiivistelmä – Referat – Abstract Suomalaisen perinnöllisen gelsoliiniamyloidoosin syntymekanismit ovat vielä epäselviä. Tässä tutkimuksessa pyrittiin selvittämään, mitkä muut syyt voisivat johtaa gelsoliiniamyloidoosissa ilmenevien oireiden syntyyn amyloidisäikeiden muodostumisen lisäksi. Potilaasta eristettyjä sileälihassoluja kasvatettiin ja niistä eristettiin proteiinit. Näiden solujen proteiiniekspressiota verrattiin kontrollisileälihassolujen proteiiniekspressioon. Ekspressio erot selvitettiin SDS-PAGE-analyysillä ja Coomassie-värjäyksellä sekä anti-FAF-, alfa-aktiini- ja beeta-aktiini-vasta-ainevärjäyksillä. Proteiinit tunnistettiin massaspektrometrillä. Tässä tutkimuksessa tunnistetut kaikki viisi proteiinia (alfa-aktiini, aneksiini A1, aneksiini A2, aneksiini V ja vimentiini), joiden ekspressiot erosivat gelsoliiniamyloidoosia sairastavan potilaan- ja kontrolli-sileälihassolujen välillä, ovat yhteyksissä solun tukirankaan ja erityisesti aktiinisäikeiden muokkaukseen. Lisäksi solut värjätiin alfa-aktiinvasta-aineella. Aktiinitukiranka oli rikkonainen verrattuna kontrollisolujen aktiinitukirankaan. Tämän tutkimuksen perusteella voidaan siis olettaa gelsoliiniamyloidoosin oireiden johtuvan amyloidin kertymisen lisäksi viallisesta aktiinitukirangan homeostasiasta. Amyloidin muodostuminen on kuitenkin yksi tärkeimmistä oireiden syistä. Koska gelsoliiniamyloidoosiin ei ole vielä olemassa spesifistä hoitoa, olisi sellainen tärkeää löytää. Siksi tässä tutkimuksessa selvitettiin ryhmämme kehittämän amyloidi-inhibiittori kykyä estää amyloidisäikeiden muodostuminen Tioflaviini-T-mittauksilla (ThT). Inhibiittori osoittautui tehokkaaksi amyloidisäikeiden muodostumisen estäjäksi. Amyloidi-inhibiittori voisikin olla tulevaisuudessa lääke gelsoliiniamyloidoosiin.			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Gelsolin, amyloidosis, hereditary diseases, actin, actin-binding protein			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muuta tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	<u>4</u>
2. KIRJALLISUUSKATSAUS	<u>5</u>
2.1. Amyloidi-sairaudet.....	<u>5</u>
2.2. Taudin genetiikka.....	<u>5</u>
2.3. Gelsoliini-proteiini ja amyloidin syntyminen	<u>6</u>
2.4. Histopatologiset löydökset.....	<u>8</u>
2.5. Taudin alku ja eteneminen.....	<u>9</u>
2.6. Silmä oireet.....	<u>10</u>
2.7. Neurologiset oireet	<u>10</u>
2.8. Iho-oireet.....	<u>11</u>
2.9. Hampaiston ja suun alueen ongelmat.....	<u>11</u>
2.10. Muut oireet.....	<u>11</u>
2.11. Diagnoosi ja hoito	<u>12</u>
3. MENETELMÄT	<u>13</u>
3.1. Solukasvatus	<u>13</u>
3.2. Solujen varmentaminen sileälihassoluiksi.....	<u>13</u>
3.3. Solujen hajotus ja soluseoksen proteiinikonsentraation määrittäminen.....	<u>14</u>
3.4. Immunovärjäykset.....	<u>14</u>
3.5. Proteiinien tunnistus massaspektrometrillä ja proteomitiedon analyysi	<u>15</u>
3.6. Tioflaviini-T-mittaukset (ThT)	<u>16</u>
4. TULOKSET	<u>18</u>
4.1. AGel-sileälihassolujen erilainen aktiinisäikeiden rakenne.....	<u>18</u>
4.2. Proteiiniekspressio tutkimukset osoittavat eroavaisuuksia AGel- ja kontrolli- sileälihassolujen välillä	<u>19</u>
4.3. ThT- mittaukset osoittavat inhibiittorimolekyylien estävän amyloidin muodostumista	<u>21</u>
6. LÄHTEET.....	<u>27</u>

1. JOHDANTO

Gelsoliiniamyloidoosi (AGel), joka tunnetaan myös nimellä suomalainen perinnöllinen amyloidoosi (FAF), Meretojan tauti ja tyypin IV amyloidi polyneuropatia, on suomalaisen tautiperintöön kuuluva sairaus. Se on autosomaalinen dominoivasti periytyvä. Vuonna 1969 Meretoja raportoi tästä uudesta perinnöllisestä systeemiamyloidoosista, jonka ominaispiirteisiin kuuluivat sarveiskalvon verkkomainen rappeuma, kraniaalinen neuropatia sekä erilaiset iho- munuais- ja sydänoireet (1). Amyloidisairauksien oletetaan syntyvän, kun mutatoitunut proteiini laskostuu väärin ja aggregoituu muodostaen amyloidikasaumia solun sisä- tai ulkopuolelle (2). Gelsoliiniamyloidoosi johtuu G654→A (3) tai harvemmin G654→T (4) mutaatiosta gelsoliini-proteiinia ilmentävässä geenissä. Tämä mutaatio aiheuttaa proteiinin aminohapossa 187 muutoksen Asp187Asn (5) tai Asp187Tyr (4). Suurin osa potilaista on heterotsygootteja mutaation suhteen, mutta myös homotsygootteja potilaita tiedetään olevan (1).

Tässä tutkimuksessa kasvatettiin gelsoliiniamyloidoosia sairastavasta potilaasta eristettyjä sileälihassoluja. Potilas oli heterotsygootti G654→A mutaation suhteen. Soluille tehtiin proteomitutkimuksia, joista selvitettiin yksittäisten proteiinien mahdollisia ekspressioeroja kontrollisolujen ja AGel-solujen välillä. AGel- ja kontrollisoluista eristetyt proteiinifraktiot analysoitiin SDS-PAGE:lla sekä identifioitiin immunoblottauksella ja Coomassievärjäyksellä. Coomassievärjätystä geelistä eristetyt proteiinit tunnistettiin massaspektrometrillä. Proteiiniekspressio erojen selvittäminen voi auttaa ymmärtämään paremmin gelsoliiniamyloidoosin syntymekanismia. Tässä tutkimuksessa selvitettiin myös ryhmämme kehittämän amyloidi-inhibiittorin tehokkuutta inhiboida amyloidisäikeiden muodostusta. Amyloidi-fibrillien muodostumista mitattiin Tioflaviini-T-mittauksilla (ThT). Amyloidi-inhibiittori voisi tulevaisuudessa olla mahdollinen lääke gelsoliiniamyloidoosiin.

2. KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1. Amyloidi-sairaudet

Gelsoliiniamyloidoosi kuuluu amyloidisairauksiin, jotka johtuvat viallisten proteiinien kerääntymisestä solun ulkoiseen tilaan, ekstrasellulaarimatriksiin vaikea liukoisena amyloidina. Erilaisia amyloidi sairauksia tunnetaan tällä hetkellä yli 30 (2,6). Suomalaisilla tavattavia amyloidooseja gelsoliiniamyloidoosin lisäksi ovat tulehduksellisiin sairauksiin liittyvä AA-amyloidoosi, plasmasoludyskrasioiden yhteydessä esiintyvä AL-amyloidoosi ja dialyysihoitoon liittyvä Ab2M-amyloidoosi (7). Amyloidia muodostavia proteiineja tunnetaan noin 20, joilla kaikkilla on yhteinen β - levy rakenne amyloidogeenisessä tilassa. Yksi hyvin tunnetuista proteiineista on β - amyloidi, joka syntyy Alzheimerin taudissa. Alzheimerin taudissa amyloidin kertyminen on paikallista toisin kuin gelsoliini amyloidoosissa (8).

2.2. Taudin genetiikka

Gelsoliiniamyloidoosi on autosomaalisesti dominoivasti periytyvä sairaus. Taudin penetranssi on 100 % (9). Gelsoliiniamyloidoosi johtuu yhden emäksen mutaatiosta kromosomissa 9 sijaitsevassa gelsoliini-geenissä, jossa nukleotidi 654 on muuttunut guaniinista adeniiniksi (3) tai tyymiiniksi (4). Kaikista suomalaisista potilaista on löydetty mutaatio G654A (10) kuten myös hollantilaisista (5), espanjalaisista (59), eräistä amerikkalaisista (11), Iranilaisista (58) ja kaikista japanilaisista potilaista (12). Sen sijaan tsekkiläiset ja tanskalaiset (5) ja ranskalaiset (60) potilaat kantavat mutaatiota G654T (5).

Potilaat ovat pääsääntöisesti heterotsygootteja, jolloin amyloidin muodostukseen kykenevää gelsoliinia on vain puolet gelsoliinin kokonaismäärästä. Mutatoituneen geenin suhteen homotsygootteja on hyvin vähän. Homotsygooteilla potilailla amyloidogeenisten fragmenttien tuotto on huomattavasti runsaampaa kuin heterotsygooteilla (13).

Suomalaista perinnöllistä amyloidoosia sairastaville suvulle ei ole löytynyt yhteistä esi-isää, vaikka suurin osa niistä kantaakin samaa mutaatiota (14). Voimme kuitenkin olettaa, että suomalaiset amyloidoosipotilaat ovat peräisin samasta esi-isästä, jonka gelsoliini-geeni on mutatoitunut 600 vuotta sitten. Suurella osalla potilaista on sukujuuret Etelä-Hämeessä tai Kymenlaaksossa. Meretoja on arvellut, että tauti on kulkeutunut Lammilta ensin Valkealaan 1300–1400-luvulla ja sieltä edelleen muualle Kymenlaaksoon (1). Suomessa arvioidaan olevan noin 1000 tautigeenin kantajaa. Se, että suomalaista perinnöllistä amyloidoosia esiintyy maailman laajuisesti, johtuu todennäköisesti siitä, että gelsoliini-geenin nukleotidissa 654 sattuu mutaatioita useammin kuin muualla. Nukleotidi 654 on siis mutaatioiden ns. ”hot spot-kohta” (5).

2.3. Gelsoliini-proteiini ja amyloidin syntyminen

Gelsoliini on aktiiniin sitoutuva proteiini, jota ilmennetään sekä solun sisällä, että solun ulkopuolella (15). Eritettävää muotoa kutsutaan myös plasma-gelsoliiniksi. Sama geeni kromosomissa 9 ilmentää molempia muotoja (16,17) mutta niiden transkription aloituskohdat ja silmukointi eroavat toisistaan (18). Sytosolinengelsoliini on kooltaan 80 kDa. Se säätelee aktiinisäikeiden dynamiikkaa ja liikettä. Gelsoliini hajottaa aktiinisäikeitä ja aiheuttaa siten niiden nopean lyhenemisen. Tämän jälkeen gelsoliini sitoutuu aktiinisäikeiden vapaisiin nopeasti kasvaviin päihin ja estää niiden pitenemisen. Fosfoinositidin sitoutuminen gelsoliiniin poistaa sen aktiinisäikeiden päästä, jolloin filamenttien pidentyminen on jälleen mahdollista. Gelsoliini myös auttaa muodostamaan lyhyitä aktiinisäikeitä liittämällä aktiinimonomeerejä yhteen (19). Suomalaisessa perinnöllisessä amyloidoosissa mutatoituneen gelsoliinin toiminta aktiinisäikeiden muokkauksessa on vielä epäselvää. Aiemmin on esitetty, että mutaatio ei haittaisi aktiinin modulaatiota. Tämän uskotaan johtuvan siitä, että gelsoliiniperheeseen kuuluu useita proteiineja, joilla on gelsoliinin kanssa samankaltaisuuksia. Nämä gelsoliinin sukulaisproteiinit voisivat osittain korvata heikentyneen mutatoituneen gelsoliinin toimintaa (20). Toisaalta on myös saatu tuloksia, joiden mukaan mutatoitunut plasma-gelsoliini ei pysty samalla tavalla muokkaamaan aktiinisäikeitä kuin villityyppinen gelsoliini (21).

Plasmagelsoliini on kooltaan 83 kDa ja se eroaa sytosolisesta gelsoliinista 25 aminohappoa pitkällä aminopään pidennyksellä ja domeenissa 2 olevalla disulfidisillalla (15). Vamman tai apoptoosin yhteydessä aktiinia vapautuu verenkiertoon, jolloin plasma-gelsoliinin uskotaan poistavan aktiinia verenkierrosta ja estävän näin veren viskositeetin nousun (22). Gelsoliinilla on myös osoitettu olevan rooli hermosolujen viejähaarakkeiden filopodien vetäytymisessä, hermosolujen ionikanavien modulaatiossa ja apoptoosin säätelijänä sekä välittäjänä (19).

Sekä sytosolinen, että plasma-gelsoliini koostuvat kuudesta domeenista, joista domeeneilla 1, 2 ja 4 on aktiiniin sitoutuva kohta (23). Kaikissa kuudessa domeenissa on kalsium-ioneja sitova kohta. Ca^{2+} :n sitoutuminen vapaaseen gelsoliiniin saa proteiinissa aikaan rakenteen muutoksen, joka sallii sen sitoutumisen aktiiniin (24). Kaikki kuusi domeenia ovat hyvin homologisia. Ne ovat luultavasti peräisin geenin triplikaatiosta, jota on seurannut duplikaatio (17).

Gelsoliiniamyloidoosissa gelsoliini-geenin pistemutaatiosta johtuen on domeenissa 2 kohdassa 187 vaihtunut aminohappo asparagiinihaposta asparagiiniksi tai tyrosiiniksi (4,5). Aminohapon muutos johtaa gelsoliinin poikkeavaan pilkkomiseen erikokoisiksi fragmenteiksi ja edelleen amyloidin kertymiseen (25). On osoitettu, että fibroblastit, jotka on transfektoitu muuntuneella plasma-gelsoliinilla saavat aikaan useita proteolyttisiä fragmentteja, jotka ovat villityyppisen gelsoliinin pilkkomiseen verrattuna poikkeavia. Sen sijaan ei ole todistettu, että sytoplasmassa sijaitseva gelsoliini olisi amyloidi fragmenttien lähde (26,27). Plasma-gelsoliini syntetisoidaan solulimakalvostossa ja kuljetetaan Golgin kautta solun pinnalle, mistä se eritetään solun ulkoiseen tilaan (28). Mutantti-gelsoliinin ensimmäisestä pilkkomisesta on vastuussa Trans-Golgi verkostossa oleva entsyymi, furiini (α -gelsolinaasi). Trans-Golgi verkostossa on paljon kalsium-ioneja, jotka stabiloivat villityyppistä gelsoliinia sitoutumalla domeenissa 2 oleviin kalsium-ioneja sitoviin kohtiin ja estävät näin furiinin toiminnan. Mutantti-gelsoliini ei pysty sitomaan kalsium-ioneja ja on siksi vapaa furiinin toimesta tapahtuvalle proteolyysille. Furiini pilkkoo tästä

kokonaisesta 83 kDa gelsoliinista 68 kDa:n kokoisen C-terminaalisen osan, joka eritetään yhdessä kokonaisen gelsoliinin kanssa ekstrasellulaari tilaan. Kohta, josta furini pilkkoo gelsoliinin, sijaitsee domeenissa 2 (29). Syntynyt 68 kDa:n kokoinen fragmentti toimii β -gelsolinaasin substraattina. β -gelsolinaasiksi on tunnistettu solukalvossa oleva integraalinen proteiini, MT1-matrix metalloproteaasi, joka on aktiivinen ekstrasellulaaritulassa. Tämän metalloproteaasin pilkkomisen tuloksena syntyy amyloidogeeniset 8 ja 5 kDa:n fragmentit. Luultavasti proteaasin toimesta syntyy 8 kDa:n fragmentin pilkkomisen kautta 5 kDa:n fragmentti (30). 8 kDa:n fragmentti koostuu gelsoliinin aminohapoista 173–243 ja sisältää muuntuneen aminohapon 187 (25,31). Heterotsygooteilla FAF-potilailla on verenkierrossa kokonaisen plasma-gelsoliinin lisäksi pienempiä gelsoliini fragmentteja 70–45 kDa:n välillä. Normaalia gelsoliinia on suurin osa verenkierrossa olevasta gelsoliinista. Homotsygooteilla puolestaan on verenkierrossa eniten 65 kDa:n fragmenttia, jossa on amyloidia muodostava osa sekä 55 kDa:n fragmenttia, jossa ei ole amyloidia muodostavaa osaa (13).

2.4. Histopatologiset löydökset

Suomalaisessa perinnöllisessä amyloidoosissa amyloidia on kertynyt useisiin eri kudoksiin. Gelsoliiniamyloidia on värjätty immunohistokemiallisin menetelmin kudoksetäistä ja sitä on löydetty munuaisista, ihosta, sydäimestä, kilpirauhasista, sylkirauhasista, peräsuolesta ja keskushermostosta (32). Eniten amyloidia on verisuonten seinämissä ja tyvikalvoissa. Amyloidia löytyy elimistä riippumatta kaikista arterioista, pääasiassa keskikokoisista ja pienistä arterioista sekä kapillaareista, mutta ei juurikaan laskimoista (14,33).

Lähes poikkeuksetta amyloidikertymiä on silmissä. Silmissä amyloidi on pääasiassa sijoittunut Bowmanin kalvon alle kiinnittyneenä epiteelin tyvikalvoon. Amyloidi kertymät ovat rakenteeltaan verkkomaisia (34).

Amyloidi kertymiä on osoitettu olevan keskushermoston, ääreishermoston ja autonomisenhermoston alueella (35-37). Ääreishermostossa amyloidia on pääasiassa perineuriumissa ja verisuonten seinämissä, mutta myös jonkin verran endoneuriumissa sekä Schwannin solujen välissä. Keskushermostossa amyloidia on todettu löytyvän aivojen ja

selkäytimen ohuesta kalvosta (pehmeä- ja lukinkalvo) sekä kovakalvosta (33,35,37). Myeliinin vähenemistä halkaisijaltaan pienissä aksoneissa on raportoitu, mutta suuremmissa, pääasiassa myeloituneissa aksoneissa, on todettu aksonaalista neuropatiaa ilman demyelinaatiota (35).

Ihosta on löydetty amyloidia lähes poikkeuksetta eri suvuissa ympäri maailman (14). Amyloidikertymiä voidaan todeta ihosta jo 20-vuotiaalla. Ihossa amyloidi kertyy pääasiassa epidermaalisiin ekkriinisiin hikirauhasiin ja talirauhasten tyvikalvoihin, mutta amyloidia on myös todettu olevan verinahassa sekä verisuonien seinämissä (38).

Munuaisissa amyloidia on glomeruluksissa (39), joissa sitä voi olla vaihtelevia määriä riippuen siitä, onko kyseessä homo- vai heterotsygootti potilas. Nuorilla heterotsygooteilla voi olla vain muutamia hyalinisoituneita glomeruluksia, kun puolestaan homotsygooteilla lähes kaikki glomerulukset voivat olla hyalinisoituneet (39,40).

Sydänkudoksessa amyloidia on kertynyt valtimoiden seinämiin, joidenkin valtiomoiden ympärillä olevaan sidekudokseen, perikardiumiin sekä yksittäisten sydänlihassolujen väliin (36). Amyloidia on lisäksi todettu olevan sileiden lihassolujen väleissä, peri- ja endomysiumissa, luurankolihassolujen pinnalla ja niiden verisuonissa (35,36,38).

2.5. Taudin alku ja eteneminen

Heterotsygooteilla kantajilla taudin eteneminen on hyvin hidasta. Ensimmäiset oireet yleensä ilmenevät 20–30 ikävuoden välillä. Ensimmäinen oire on usein sarveiskalvon verkkomainen rappeuma. Monet potilaat voivat olla muuten oireettomia (1,14,41). Neurologiset- ja iho-oireet ilmenevät yleensä 30- 60 ikävuoden aikana (14). Heterotsygooteilla kantajilla tauti ei varsinaisesti johda kuolemaan, mutta taudin kantajien kuolleisuus verrattuna suomalaisten kuolleisuuteen, on kasvanut (42). Homotsygooteilla tauti puhkeaa jo teini-ikässä ja oireet ovat heterotsygootteja paljon vaikeammat ja heillä on myös riski kuolla ennenaikaisesti jo kolmenkymmenen vuoden ikäisenä (42,43).

2.6. Silmä oireet

Sarveiskalvon verkkomainen rappeuma on tyypillinen kaikille potilaille. Oireina ovat valoherkkyys, yleinen silmien ärsyyntyminen, sarveiskalvon eroosio, tulehdukset ja ajoittainen näön heikkeneminen. Oireet pahenevat iän myötä. Näkö voi heiketä huomattavasti ja joissakin tapauksissa se voi johtaa jopa sokeuteen (1,14).

2.7. Neurologiset oireet

Gelsoliini amyloidoosiin liittyy etenevä kraniaalinen neuropatia, joka alkaa kasvohermon halvauksella heterotsygyoteilla noin kolmen- neljänkymmenen vuoden iässä. Kasvojen myokymiat ovat myös yleisiä. Kolmoishermon vaurio aiheuttaa sarveiskalvon ja kasvojen tunnon sekä puremalihaksen toiminnon heikentymisen. Useita vuosikymmeniä taudin puhkeamisen jälkeen, ilmenee erityisesti alempien aivohermojen vaurioita, joka voi johtaa vaikeaan bulbaariseen pareesiin. Vanhemmilla potilailla ilmenee kielen liikehermon (*nervus hypoglossus*, XII aivohermo), kieli-kitahermon (*nervus glossopharyngeus*, IX aivohermo) ja kiertäjähhermon (*nervus vagus*, X aivohermo) vaurioita. Tämä ilmenee vaikeuksina pureskella ja niellä, mutta myös puhe- ja ääntämishäiriöitä voi ilmetä (1,14).

Perifeeristen somaattisten hermojen aiheuttamaa lievää oireilua on havaittu useilla potilailla. Oireet alkavat 40–50 vuotiaana ja ilmenevät yleensä ensin jaloissa tunnottomuutena ja parestesiana. Kädet ovat kömpelöt ja pienien esineiden käsittely ja tunnistaminen on vaikeutunut. Lisäksi voi esiintyä rannekanava syndroomaa kuten myös lihasten heikkoutta ja surkastumista (14,35).

Gelsoliiniamyloidoosissa on havaittu lieviä autonomisen hermoston toimintahäiriöitä, mahasuolikanavan häiriöitä, ortostaattista hypotensiota, huimausta, pyörtyilyä, dysuriaa, impotenssia ja vähentynyttä hikoilua (14,36). Myös joitakin keskushermostoon liittyviä häiriöitä on ilmennyt osalla potilaista. Ne tulevat esiin ataksiana ja tarkoissa neuropsykologisissa tutkimuksissa esiintulevina kognitiivisina vaikeuksina (37).

2.8. Iho-oireet

Noin 40- vuotiaana kallon ja otsan iho paksuuntuu ja tulee löysäksi. Myöhemmin potilaille voi kehittyä yleistynyt *cutis laxa*. Potilaiden iho voi muuttua kuivaksi ja kutisevaksi, kulmakarvat voivat lähteä ja potilas voi menettää hiuksensa ja raajojen ihokarvansa. Heillä voi ilmetä lisäksi likenoideja pigmentti alueita ja ihon atrofiaa. Kaikilla gelsoliiniamyloidoosi potilailla on maailmanlaajuisesti ominaiset kasvonpiirteet johtuen löysästä ja roikkuvasta ihosta, kasvohermon halvauksesta ja lihasten surkastumisesta (1,14).

2.9. Hampaiston ja suun alueen ongelmat

Potilaat ovat kuvanneet toistuvia ientulehduksia, suunkuivumista ja hampaiden irtoamista, mutta näiden oireiden yhteyttä gelsoliini amyloidoosiin ei ole juurikaan tutkittu. Tutkimuksissa on selvinnyt, että potilaiden syljen erityis on voimakkaasti vähentynyt (44), johtuen luultavasti siitä, että amyloidia kertyy sylkirauhasiin ja erityisesti parotisrauhaseen (33), joka tuottaa suurimman osan seroosista ja hyvin vesimäisestä syljestä. Potilaiden paradontogeenien määrä oli lisääntynyt ja potilaiden kielellä on todettu useissa tapauksissa olevan sieni kasvustoa. Nämä voivat johtua vähentyneestä syljen erityksestä. On myös osoitettu, että hampaiden puutokset painottuvat poikkeuksellisesti molaarialueelle. Syytä tähän ei toistaiseksi tiedetä (44).

2.10. Muut oireet

Harvinaisempina oireina gelsoliini amyloidoosia sairastavilla potilailla voi ilmetä makroglosiaa, uniapneaa, kilpirauhasen toiminnan häiriöitä (45), artroosia ja osteoporoosia (1). Munaisen toiminnan häiriöt ovat yleensä heterotsygooteilla hyvin vähäiset ja ilmenevät useinmiten proteiuriana (38). Vanhemmilla potilailla voi ilmetä sydämen johtumishäiriöitä ja he voivat tarvita sydämen tahdistimen. Joillakin potilailla on havaittu kylmänarkuutta ja joidenkin oireiden vaikeutumista kylmässä. Tämän uskotaan johtuvan taudin verisuonistoon aiheuttamista vaikutuksista (14).

2.11. Diagnoosi ja hoito

Amyloidin esiintyminen kudoksissa voidaan selvittää ottamalla kudoksiä näyte esim. ihonalaisesta rasvasta tai peräsuolesta. Nämä näytteet värjätään immunohistokemiallisin menetelmin. Nykyään voidaan taudin kantaja selvittää myös DNA- testein. Mutaation voi osoittaa verinäytteestä eristetyistä DNA:sta. DNA- testin avulla voidaan löytää oireettomat tautigeenin kantajat ja se myös helpottaa sikiödiagnoosiikkaa (7,14).

Suomalaiseen perinnölliseen amyloidoosiin ei ole olemassa spesifistä hoitoa, vain ainoastaan oireenmukainen hoito. Monia yksittäisiä oireita voidaan hoitaa lääkkeillä ja *Cutis laxa*- oireita hoidetaan plastiikkakirurgisilla leikkauksilla (14,46).

3. MENETELMÄT

3.1. Solukasvatus

Gelsoliini amyloidoosi johtuu G654→A tai harvemmin G654→T nukleotidin mutaatiosta gelsoliini-geenissä kromosomissa 9. Kasvatettavat solut ovat peräisin heterotsygootilta potilaalta, jolla on G654→A mutaatio. AGel arterioiden hankinnan oli hyväksynyt Kirurgian alan eettinen toimikunta. Potilaan arterioista (kirurginen näyte) eristettiin sileälihassoluja. Arterioista preparoitiin 2-3 mm paksuja paloja, jotka laitettiin 30 mm:n petrimaljalle lumen puoli alaspäin. Niiden annettiin kuivua noin 20 min ennen median lisäystä, jotta palat eivät irtoaisi maljan pohjasta. Soluja kasvatettiin DMEM:ssä, johon oli lisätty 10 %:n FBS (fetal bovine serum), L- glutamiinia, penisilliiniä ja streptomysiiniä (GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK). Kasvatus lämpötila oli +37 °C ja hiilidioksidi pitoisuus 5 %. Ensimmäiset solut alkoivat ilmestyä näkyviin ensimmäisen viikon jälkeen.

Solut infektoitiin ihmisen papilloomavirus konstruktilla p6/p7 solujen kasvatuksen varhaisessa vaiheessa, jotta solulinjat saatiin osittain kuolemattomiksi. Infektio varmistettiin kasvattamalla soluja G418:n (400 µg/ml) kanssa kymmenen päivää. Solut testattiin mykoplasmaproteiini-negatiivisiksi DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) tunnistus kitillä. (Roche, Mannheim, Germany).

3.2. Solujen varmentaminen sileälihassoluiksi

Kasvatetut solut varmistettiin sileälihassoluiksi tekemällä α -aktiini värjäys, joka on sileälihassoluille spesifinen värjäys, koska vain sileälihassolut ekspressoivat kyseistä aktiini tyyppiä. Kolme päivää ennen värjäystä solumaljalle laitettiin ohuita lasseja, joiden päälle solujen annettiin kasvaa. Kun solut olivat kasvaneet tarpeeksi, lasit siirrettiin -20 °C:een metanoliin (HPLC- grade, Rathburn Chemicals Ltd, Walkerburn, Scotland) ja haudotettiin -

20 °C:ssa 4 minuuttia. Tämän jälkeen lasit pestiin PBS:llä 3x 10 min, jota seurasi 30 minuutin blokkaukset 3 % BSA:lla (Sigma, St Louis, MO, USA). Lasit pestiin jälleen kuten edellä. Laseja inkuboitiin primäärissä vasta-aineessa 1 h kosteassa kammiossa, huoneen lämmössä. Vasta-aineena käytettiin hiiressä valmistettua monoklonaalista vasta-ainetta sileälihassolun α -aktiinia vastaan (Sigma Chemical Company ST Louis U.S.A). Primääri vasta-aine laimennettiin 1:40 000. Ennen sekundaari vasta-aineen lisäystä lasit pestiin kuten edellä. Sekundaari vasta-aine oli FITC- konjugoitu anti-hiiri IgG vasta-aine (Molecular Probes Inc, Leiden, the Netherlands), josta käytettiin 1:250 laimennosta. Lopuksi lasit vielä pestiin 4x 10 min PBS:llä ennen solujen mikroskopointia. 80–90 % soluista oli positiivisia α -aktiinin suhteen.

3.3. Solujen hajotus ja soluseoksen proteiinikonsentraation määrittäminen

Solut hajotettiin puskurilla, joka sisälsi 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 1 % ja proteiini- inhibiittori koktailin (Roche Diagnostics GmbH, Manneheim, Germany). Lyysaus kesti 15 minuuttia ja tämän ajan soluja pidettiin jäällä. Lyysauksen jälkeen solut kaavittiin maljalta, sonikoitiin vesisonikaattorilla 3x 30 sekuntia ja sentrifugoitiin 10 minuuttia 13 000 rpm. Supernatantti otettiin talteen ja siitä määritettiin proteiinien kokonaismäärä käyttämällä 2-D Quant kittiä (Amersham Biosciences Co, San Francisco, CA, USA). Määrittäminen tehtiin valmistajan ohjeen mukaan.

3.4. Immunovärjykset

Sekä kontrolli solujen, että AGel solujen solulyysaatit ajettiin 10 %: lle SDS/PAGE mini-geeleille. Geelit joko värjättiin Coomassie blue värillä tai blotattiin PVDF (polyvinylidienifluoridi) kalvolle (Bio-Rad, Richmond, CA, U.S.A) puolikuivalla blotterilla 45 mA/ 2 h. Blottauksen jälkeen kalvo blokkattiin 5 %:lla maitoliuoksella (rasvaton) yön yli +4 °C:ssa. Blokkauksella estetään primääri vasta-aineen epäspesifinen sitoutuminen. Maitojauhe oli liotettu TBS/ 0.05 % Tween20- liuokseen (TBST). Blokkauksen jälkeen kalvo pestiin 3 x 10min TBST:llä. Tämän jälkeen kalvoa haudotettiin 1h huoneen lämmössä primäärillä polyklonaalisella anti-FAF vasta-aineella. Vasta- aine oli

GST-8 kDa gelsoliini fragmenttia vastaan (J.W. Kelly Department of Chemistry, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) (61). Primääri vasta-aine oli laimennettu 1:200. Primääri vasta-aine haudutusta seurasi jälleen kalvon pesut kuten edellä ja sekundaari vasta-aine haudutus alkaliinisella fosfataasilla konjugoidulla anti-kani vasta-aineella, josta käytettiin laimennosta 1:1000 (Sigma Chemical Company ST. Louis U.S.A). Sekundaari vasta-ainetta haudutettiin myös 1h. Kalvo värjättiin käyttämällä BCIP/NBT värinkehitysluosta (Bio-Rad, Richmond, CA, U.S.A.). Värjäys tehtiin valmistajan antamien ohjeiden mukaan.

Immunoblottaus tehtiin myös hiiren monoklonalisella anti- β -aktiini primäärisellä vasta-aineella (Sigma Chemical Company ST. Louis U.S.A) (laimennos 1:5000), hiiren monoklonalisella sileälihassolun anti- α -aktiini primäärisellä vasta-aineella (Sigma Chemical Company ST. Louis U.S.A) (1:40 000) ja vuohen polyklonaalisella anti-vimentini primäärisellä vasta-aineella (Sigma Chemical Company ST. Louis U.S.A) (1:1000). Primääri vasta-aine inkubaatioita seurasi pesut PBS/ 0.1 % Tween 20:llä ja inkubaatio ECL plex vuohi anti-hiiri Cy3 sekundaari vasta-aineella (GE Healthcare UK) tai kani anti-vuohi Cy3 sekundaari vasta-aineella (GE Healthcare UK). Molemmista sekundaari vasta-aineista käytettiin laimennosta 1:25 000.

Alfa-aktiini ja beta-aktiini värjäys suoritettiin samalle kalvolle. Ensin tehtiin beta-aktiini värjäys, minkä jälkeen blottista poistettiin beta-aktiinileima seuraavasti. Blotti kasteltiin metanollilla, huuhdeltiin vedellä ja pestiin kaksi kertaa PBS:llä. Blottia inkuboitin asetonitriilissä 10 min huoneenlämmössä ravistelijassa ja 30 min 50 °C liuoksessa, joka sisälsi 62.5 mM Tris-Hcl pH 6.7, 2 % SDS ja 100 mM merkaptotetanolia. Lopuksi blotti pestiin kaksi kertaa 10 min PBS:llä ja laitettiin 5 % maitojauheliuokseen (rasvaton) blokkautumaan yön yli.

3.5. Proteiinien tunnistus massaspektrometrillä ja proteomitiedon analyysi

Proteiinit, jotka ekspressoituivat eri tavalla AGel-soluissa verrattuna kontrolli-soluihin, leikattiin Coomassie blue värjätyiltä geeleiltä. Ensin geelipaloista poistettiin väri 0.25 M

ammoniumvetykarbonaatilla (NH_4HCO_3)/asetonitriilillä haudottamalla 20 min 37 °C: ssa. Tämän jälkeen geelipalat pestiin ja dehydroitiin asetonitriilillä ja proteiinit pelkistettiin 20 mM DDT:llä inkuboimalla 56 °C: ssa 30 min ennen alkylointia. Alkylointi tehtiin 55 mM:lla jodoasetamidilla (Sigma Chemical Company ST Louis U.S.A)/ 100 mM NH_4HCO_3 : lla huoneen lämmössä pimeässä 15 min ajan. Kun geelipalat oli pesty 100 mM NH_4HCO_3 :lla ja dehydroitu asetonitriilillä, jokaiseen proteiininäytteeseen lisättiin 10–15 µg modifioitua trypsiiniä (Promega, Madison, WI, USA) 0,1 M NH_4HCO_3 – 10 % asetonitriilissä. Lopullinen trypsiini konsentraatio oli 0.01 µg/µl. Geelipaloja inkuboitiiin kyseisessä trypsiiniliuoksessa yön yli 37 °C:ssa. Peptidit liuotettiin geelipaloista inkuboimalla ensin 25 mM NH_4HCO_3 :ssa ja sitten kaksi kertaa 5 % muurahaishapossa 15 min ajan huoneen lämmössä.

Peptideistä poistettiin suolat käyttämällä Zip Tip µC-18 käänteisfaasikromatografia pylvästä (ZipTip, Millipore, Bedford, MA, USA). Näytteet eluoiitiin 50 % asetonitriilillä/ 0.1 % trifluoroasetatihapolla. 2x 1,5 µl näytettä pipetoitiin MALDI (matrix assisted laser desorption time of light mass spectrometry) levyille, johon myös lisättiin MALDI-matriksi (33 % asetonitriili – 0.1 % trifluorihappo, joka kyllästettiin α- syano-4-hydroksikanelihapolla [Sigma Chemical Company ST. Louis U.S.A]).

MALDI- TOF analyysit tehtiin Autoflex Instrumentilla (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Proteiinien tunnistukset tehtiin etsimällä peptidien massat Mascot (<http://www.matrix-science.com>) tietokannasta.

3.6. Tioflaviini-T-mittaukset (ThT)

Amyloidi-fibrillien muodostumista mitattiin ThT-mittauksilla. ThT: n on osoitettu sitovan amyloidia tuottaen emissio spektrin ja fluoresenssi signaalin, joka on verrannollinen muodostuneen amyloidin määrään (43). ThT-mittauksilla seurattiin ryhmämme valmistamien keinokeisten amyloidi fragmenttien amyloidin muodostusta. Amyloidin muodostumista mitattiin myös valmistamiemme inhibiittorimolekyylien kanssa, joiden tarkoituksena on estää säikeistymistä. Mittauksia varten AGel-mutanttipetiidiä

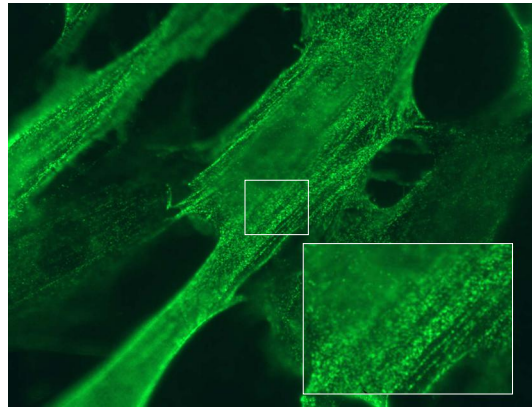
(FNNGNCFILDLGNN: JPT Peptide Technologies GmbH, Berliini, Saksa) liuotettiin veteen niin, että konsentraatio oli 1 mg/ml. Peptidi liukeni kuitenkin huonosti veteen, minkä vuoksi liukenematon sakka sentrifugoitiin alas ja supernatantti konsentroidiin nelinkertaiseksi vakuumikuivaimessa. Inhibiittori (GNCFPLDLG: JPT Peptide Technologies GmbH, Berliini, Saksa) ja positiivinen kontrolli; Beta-amyloidi (A β) (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV: American peptide company, INC) liuotettiin myös veteen, johon ne liukenivat hyvin. Inhibiittorin konsentraatio oli 1mg/ml:ssa, kuten oli myös positiivisen kontrollin. Noin 30 μ g AGel-peptidiä ja saman verran inhibiittoria otettiin yhteen mittaukseen. Mittauksiin otettiin seuraavat näytteet: 30 μ g AGel peptidiä, 30 μ g AGel peptidiä + 30 μ g inhibiittoria, A β ja lisäksi pelkkä PBS näyte ja pelkkä puskuri näyte. Mittauksia tehtiin neljänä päivänä ja tämän ajan näytteitä haudutettiin +37 °C:ssa PBS:ssä. Mittaukset tehtiin lioksessa, jossa oli 50mM glysiiniä ja 2 μ M ThT:tä. Fluoresenssi mitattiin 435 nm:n ja 485 nm:n eksitaatio ja emissio maksimeilla Hitachi F-2000 fluoresenssi spektrofotometrillä 800 sekunnin ajan. Mittaukset toistettiin kolme kertaa.

4. TULOKSET

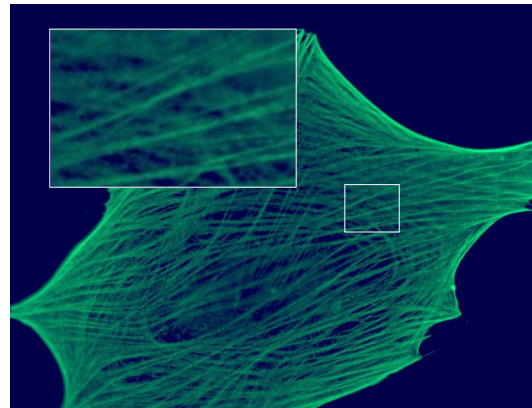
4.1. AGel-sileälihassolujen erilainen aktiinisäikeiden rakenne

AGel-solujen ja kontrollisolujen α -aktiini värjäyksiä verrattiin toisiinsa. AGel-solujen aktiinitukirangan huomattiin eroavan kontrollista (Kuva 1.). Aktiinitukiranka on AGel-soluissa rakeisempi ja se näyttää rikkonaiselta verrattuna kontrolliin.

A)



B)



Kuva 1. Monoklonaalisella anti-alfa-aktiini vasta-aineella värjättyjä sileälihassoluja. Kuvat on otettu 60 kertaisella suurennoksella. **A)** AGel-solu, jonka aktiini säikeet näyttävät rakeisilta. **B)** Kontrollisolun yhtenäinen aktiinisäikeistö.

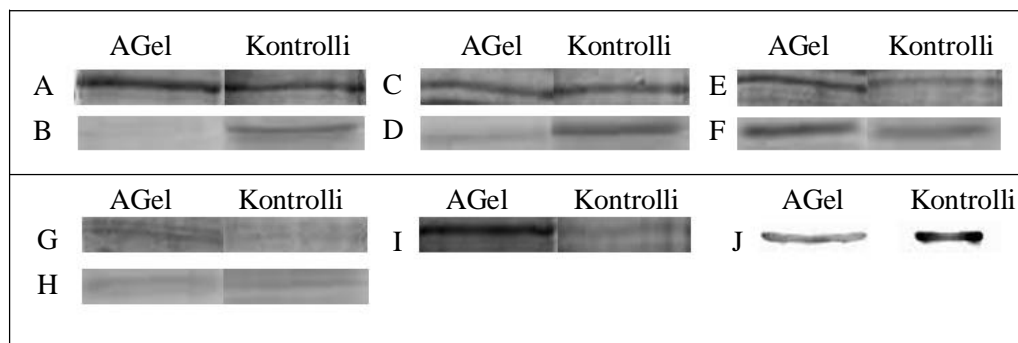
4.2. Proteiiniekspressio tutkimukset osoittavat eroavaisuuksia AGel- ja kontrollisilealihassolujen välillä

Solulinjojen proteiiniekspressio erojen tutkimisessa käytettiin yksidimensionaalista geelielektroforeesia. Kuusi proteiinia, jotka ekspressoituivat erilailla AGel- ja kontrollisoluissa, valittiin PMF (peptide mass fingerprinting) massaspektrometri analyysiin. AGel- ja kontrollisoluista eristetyt proteiinifraktiot analysoitiin SDS-PAGE:lla ja identifioitiin immunoblottauksella ja Coomassievärjäyksellä. Proteiiniekspressio erot todettiin joko suorasta proteiinivärjäyksestä Coomassievärillä tai anti-GST-8 kDa gelsoliini FAF-vasta-ainevärjäyksestä (30) (Kuva 2.). Immunoblottauksen mukaan neljä proteiinia ekspressoitui selvästi erilailla AGel- soluissa verrattuna kontrollisoluihin (Kuva 2.)

Yksikään havaituista proteiineista ei pitänyt sisällään yhtenäistä gelsoliini proteiinia molekyylipainoltaan 81–83 kDa. Havaituille proteiineille suoritettiin PMF-analyysi. Proteiinit tunnistettiin beta-aktiiniksi, aneksiini A1:ksi, aneksiini A2:ksi ja aneksiini V:ksi. Vertaamalla immunoblottauksesta saatuja eroja ja Coomassievärillä värjätystä geelistä saatuja eroja huomattiin lisäksi yksi proteiini (Kuva 2.), joka ekspressoitui eritavalla Coomassievärjäyksessä, mutta ei ollut nähtävissä immunoblottauksessa. Tämä proteiini tunnistettiin vimentiiniksi.

Kaikki proteiinit tunnistettiin suurella tilastollisella merkittävyydellä ($p > 0.05$). Tunnistetuista proteiineista viidellä on yhteyksiä solun tukirangan muokkaukseen ja erityisesti aktiinifilamentti homeostasiaan. Nämä proteiinit olivat joko yli- tai ali-ekspressoituja AGel-soluissa, mikä tukee havaintoa huonosti järjestäytyneestä aktiinitukirangasta kuten solukuvat osoittavat (Kuva 1.). Kaksi Coomassievärillä värjättyä vyöhykettä piti sisällään kaksi päällekkäin esiintyvää proteiinia, minkä vuoksi niille tehtiin uusi analyysi. Yksi kontaminoituista proteiineista tunnistettiin beeta-aktiiniksi ja toinen glyseraldehydi-3-fosfaatti dehydrogenaasiksi. Immunoblottaukset spesifisillä alfa- ja beeta-aktiini vasta-aineilla osoittivat, että beeta-aktiinin ekspressio oli sama AGel-soluissa ja kontrollissa ja että ekspressio ero johtui alfa-aktiinista (Kuva 2.). Koska glyseraldehydi-3-fosfaatti dehydrogenaasin ei tiedetä olevan osallinen aktiinifilamentti homeostasiaan, ei

tämän proteiinin tutkimusta jatkettu pidemmälle. Ekspressioeron tässä vyöhykkeessä uskotaan siis johtuvan aneksiini A1: stä. Tunnistetut proteiinit on listattu taulukkoon 1.



Kuva 2. SDS-PAGE analyysi (Coomassie-värijäys) ja vasta-ainevärijäys polyklonaalisella anti-FAF vasta-aineella. A. Coomassie-värijäys (α - ja β -aktiini); B. Vasta-ainevärijäys anti-FAF vasta-aineella A-kohdan vyöhykkeestä; C. Coomassie-värijäys (Aneksiini A1 ja glyseraldehydi-3-fosfaatti dehydrogenaasi); D. Vasta-ainevärijäys anti-FAF vasta-aineella C-kohdan vyöhykkeestä; E. Coomassie-värijäys (aneksiini A2); F. Vasta-ainevärijäys anti-FAF vasta-aineella E-kohdan vyöhykkeestä; G. Coomassie-värijäys (aneksiini V); H. Vasta-ainevärijäys anti-FAF vasta-aineella G-kohdan vyöhykkeestä; I. Coomassie värijäys (Vimenttiini); J. Vasta-ainevärijäys anti- α -aktiini vasta-aineella A-kohdan vyöhykkeestä. A-kohdan vyöhykkeen β -aktiini vasta-ainevärijäyksessä ei ollut ekspresioeroa AGel solujen ja kontrollisolujen välillä. Tunnistetut proteiinit on myös listattuna taulukkoon 1.

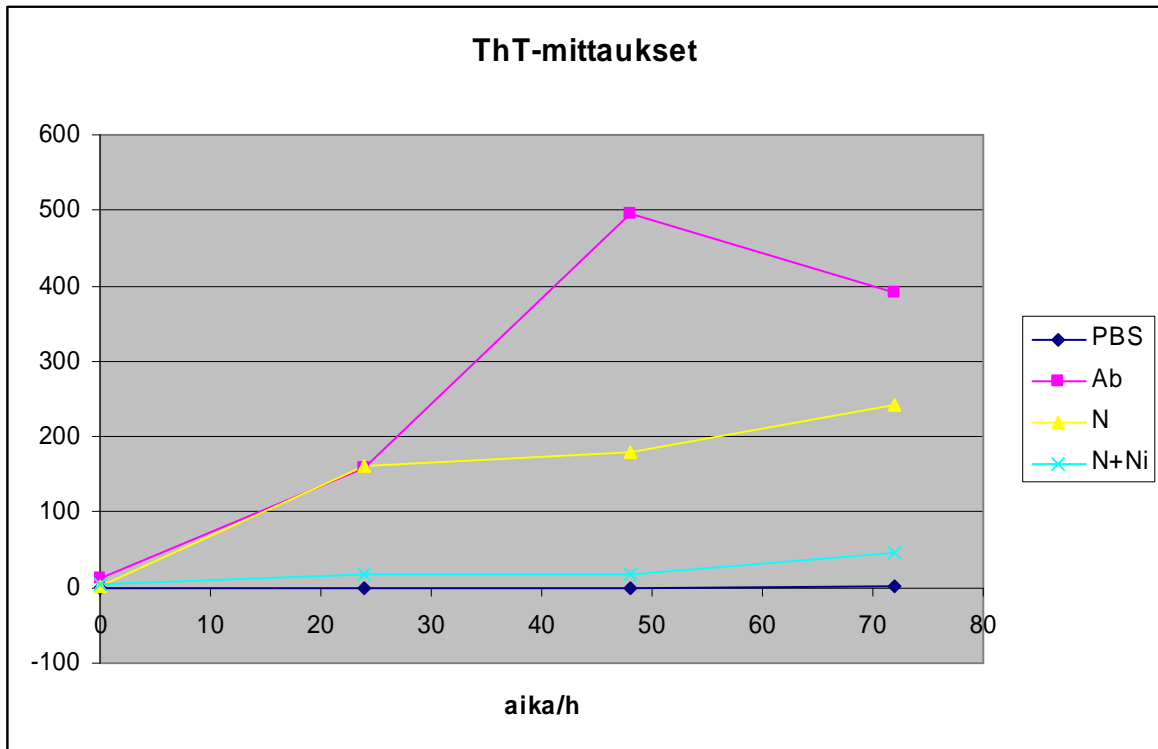
Taulokko 1. PMF:llä tunnistetut proteiinit

Täplän no., proteiini, (koodi)	Pisteet (Pisteet, joiden p<0.05)	Kattavuus	tunnistettavuusarvo
ACTB- proteiini, (gi 15277503)	89 (65)	24%	8
Anneksiini A1, (ANXA1_HUMAN)	58 (55)	23%	6
Glyseraldehydi-3-fosfaatti dehydrogenaasi, (G3P_HUMAN)	65 (55)	31%	7
Anneksiini A2 muoto 2, (gi 4757756)	208 (65)	45%	19
Anneksiini V, (gi 809185)	86 (65)	26%	6
Vimentini, (gi 62414289)	277 (65)	48%	25

Taulokko 1. PMF:llä tunnistetut proteiinit. Tunnistettavuusarvo=tunnistettujen peptidien määrä proteiinin teoreettisesta kokonaispeptidi määrästä.

4.3. ThT- mittaukset osoittavat inhibiittorimolekyylien estävän amyloidin muodostumista

Amyloidin muodostumista mitattiin ThT-mittauksilla käyttäen näytteinä pelkkiä AGel-peptidejä sekä AGel-peptidejä inhibiittorimolekyylien kanssa. Näiden näytteiden tuloksia verrattiin keskenään, kun ensin kummankin näytteen tuloksista oli poistettu nollanäytteen aiheuttama tausta. Mittauksissa kävi ilmi, että amyloidi-fibrillejä muodostui mutanteista AGel-peptideistä lähes yhtä paljon, kuin positiivisena kontrollina toimineesta beta-amyloidista. Sen sijaan, kun AGel-peptidejä inkuboitii inhibiittorin kanssa, fibrillien muodostuminen hidastui huomattavasti (Kuva 3). Koe toistettiin kolme kertaa.



Kuva 3. Yhden ThT- mittaussarjan tulokset, josta näkee, että AGel-peptidit (N) ovat muodostaneet amyloidifibrillejä selkeästi enemmän kuin AGel-peptidit inhibiittorin kanssa (N+Ni). Positiivisena kontrollina oli beta-amyloidi (Ab). Beta-amyloidia ei inkuboitu inhibiittorin läsnäollessa.

5. POHDINTA

Gelsoliini on kudoksissa yleisesti esiintyvä aktiiniin sitoutuva proteiini, joka osallistuu solujen morfologian, liikkuvuuden, signaloinnin ja apoptoosin kontrollointiin. Yksi sen tärkeimmistä tehtävistä on aktiini-mikrofilamenttien muokkaus. Gelsoliinin merkitys AGel-amyloidoosin synnyssä on kuitenkin pysynyt heikosti tunnettuna. Vielä ei ole pystytty suoraan osoittamaan, että gelsoliinin toiminnan menetys tai heikkeneminen tai vain gelsoliinin virheellinen laskostuminen, johtaisi taudin kehittymiseen.

Useat tutkimukset osoittavat, että AGel-mutaatiolla on vaikutuksia gelsoliinin kykyyn muokata aktiinisäikeitä. AGel mutaatio aiheuttaa Ca^{2+} -sitoutumisalueen menetyksen gelsoliinin domeenissa 2, mikä osittain estää proteiinin vaikutuksia aktiiniin. Mutaation seurauksena gelsoliinin stabiilisuus heikkenee ja se altistuu Golgissa furiini proteaasin pilkkomiselle. Furiinin aiheuttama pilkkominen saa aikaan eritettävän fragmentin synnyn, joka pilkotaan edelleen ekstrasellulaarimatriksissa amyloidia tuottavaksi peptidiksi (29,30). Normaalisti tietyt rakenteelliset muutokset gelsoliinissa aktivoivat sen ja mahdollistavat interaktiot aktiinin kanssa. Siksi onkin ehdotettu, että tarvittavien konformaationaalisten muutosten puute mutatoituneessa gelsoliinissa johtaisi gelsoliiniamyloidoosiin (47).

Tässä tutkimuksessa tunnistetut kaikki viisi proteiinia, joiden ekspressiot erosivat gelsoliiniamyloidoosia sairastavan potilaan- ja kontrolli-sileälihassolujen välillä, ovat yhteyksissä solun tukirankaan. Lisäksi solujen alfa-aktiini värjäykset osoittavat, että AGel-solujen aktiinitukiranka on rikkonainen. Nämä tulokset tukevat aiempaa tutkimusta, jossa homotsygoottin potilaan plasmasta eristetty mutantti gelsoliiniproteiini on osoittanut viallisen aktiinisäikeiden hajotus ja nukleaatio aktiivisuuden (21).

Aktiinit

Aktiinit ovat evoluutiossa hyvin konservoituneita proteiineja, jotka osallistuvat useisiin erilaisiin solun liikkumiseen liittyviin tapahtumiin ja niitä ekspressoidaan kaikissa eukaryoottisolussa. Selkärangaisissa tunnetaan kolme päätyyppiä eri aktiini muotoja. Niitä ovat alfa-, beeta- ja gamma-aktiinit. Alfa-aktiineja on lihaskudoksissa ja niillä on tärkeä rooli lihassolujen supistuskoneistossa. Alfa-aktiinin ekspresio oli alhaisempi AGel-sileälihassoluissa.

Anneksiinit

Anneksiinit ovat Ca^{2+} -säädelyjä proteiineja. Tämä ominaisuus liittyy useisiin solukalvoon liittyviin tapahtumiin kuten kalvodomeenien, solukalvon ja solun tukirangan välisiin yhteyksien säädelyyn organisointiin, tiettyihin eksosytoottisiin ja endosytoottisiin kuljetustapahtumiin ja ionivirtojen säätelyyn solukalvon läpi (48).

Anneksiini A1: Anneksiini A1 on F-aktiiniin sitoutuva proteiini ja se myös interaktoi profiliinin kanssa, joka on G-aktiiniin sitoutuva proteiini ja aktiini polymerisaation säätelijä (49). Anneksiini A1:n on ehdotettu osallistuvan solun sisään suuntautuvaan vesikulaatioon (48). Anneksiini A1:n ekspresio oli alhaisempi AGel soluissa kuin kontrolli soluissa.

Anneksiini A2: Anneksiini A2 on tärkeä aktiinista riippuvassa vesikkeleiden kuljetuksessa. Spontaanisti liikkuvissa soluissa anneksiini A2:n on osoitettu kerääntyvän dynaamisille aktiini-rikkaille ulokkeille ja että sen puutos johtaa stressisäikeiden syntyyn ja eteenpäintyöntymis- ja takaisinvetäytymisaktiivisuuden katoamiseen. Anneksiini A2:lla on oleellinen rooli membraaniin liittyvän aktiinitukirangan muokkautuvuuden ylläpitämisessä (50). Se osallistuu myös membraanilipidien organisointiin aktiinitukirangan kiinnittymiskohdissa. Anneksiini A2:n on osoitettu olevan osa F-aktiinirikkaita häntiä, jotka kuljettavat vastamuodostuneita endosytoottisia vesikkeleitä solukalvolta solun sisälle, mutta useat tutkimukset ovat myös osoittaneet, että anneksiin A2 on osallisena kalsium-säädelyyn eksosytoosiin (48). Anneksiini A2:n ekspresio oli lisääntynyt AGel- soluissa.

Weeds *et. al.* on osoittanut mutatoituneella gelsoliini-proteiinilla olevan viallinen aktiinia hajoittava ja nukleoiva aktiivisuus (21). Todellakin, alfa-aktiinin ekspresio on vähentynyt ja lisäksi AGel-soluissa poikkeavasti ekspressoituneet aneksiini A1 ja A2 säätelevät aktiinin polymerisaatiota kuten myös itse gelsoliini. Aneksiini A1 ja A2 sekä gelsoliini sitoutuvat F-aktiiniin.

Aneksiini V: Aneksiini V:llä on antikoagulantti ominaisuuksia ja sen on osoitettu olevan hyödyllinen tunnistettaessa apoptoottisia soluja, koska se sitoutuu kalsiumin läsnäollessa ensisijaisesti negatiivisesti varautuneisiin fosfolipideihin kuten fosfatidyylikeriiniin ja vain vähissä määrin fosfatidyylikoliiniin ja sfingomyeliiniin. Aneksiini V näyttäisi myös olevan osallinen aterotromboosin estossa (51). Aneksiini V:n ekspresio oli lisääntynyt AGel- soluissa.

Gelsoliinia on verihytaleiden sytoplasmassa. Verihytaleet muuttavat muotoaan nopeasti aktivoiduttuaan, jolloin niiden soluntukiranka muuttaa huomattavasti muotoaan. Gelsoliiniamyloidoosia sairastavilla potilailla tämä muodon muutos on hitaampi kuin terveillä (54,55). Mielenkiintoista on, että aneksiini V:n on huomattu siirtyvän kortikaaliselle membraanisytoskeletonille verihytaleiden aktivaation jälkeen. Tähän siirtymiseen näyttää liittyvän sekä sitoutuminen solukalvoon että spesifiseen aktiiniin, gamma-aktiiniin (56,57).

Vimentiini

Vimentiini kuuluu välimuotoisia säikeitä muodostavien proteiinien ryhmään. Se on kaikkein yleisin välimuotoisia säikeitä muodostava proteiini ja ensimmäinen, jota ekspresoidaan solujen erilaistumisen aikana. Vimentiinin ekspresiotasot muuttuvat eri kehitysvaiheiden aikana ja sen sekvenssi on samankaltainen kaikilla selkärangaisilla, mikä osoittaa että vimentiini on fysiologisesti tärkeä (52). Verisuonten sileälihassolut eroavat muista sileälihassoluista siten, että ne ekspressoivat erityistä aktiinityyppejä ja vallitsevasti vimentiini-säikeitä (53).

Yksinkertainen selitys vimentiniin yliekspressioon voisi olla solun yritys kompensoida aktiinifilamenttien muodostumisen vähentymistä.

Tässä tutkimuksessa osoitetaan, että gelsoliini amyloidoosi johtuu osittain metabolisesta puutoksesta aktiini-homeostasiassa. Tämä edelleen johtaa useisiin toimintahäiriöihin, jotka kaikki ovat jollakin tavalla yhteydessä soluntukirangan muokkaukseen. Tässä tutkimuksessa ilmitulleet tulokset laajentavat ymmärrystä siitä, mikä rooli aktiinilla on gelsoliiniamyloidoosissa ja auttaa selvittämään biokemiallisia tapahtumia, jotka johtavat gelsoliiniamyloidoosiin. Taudin syntymekanismien selvittämisen lisäksi olisi tietenkin tärkeää löytää taudille spesifinen hoito. Tänä päivänä gelsoliiniamyloidoosille ei vielä ole olemassa spesifistä hoitoa. Hoitona käytetään vain oireiden mukaista hoitoa. Amyloidin muodostus on tärkeä taudin oireiden aiheuttaja ja sen muodostumisen estäminen tai vähentäminen olisi tärkeää. Amyloidin muodostuminen voidaan estää inhibiittorilla ja tässä tutkimuksessa tehdyt kokeet osoittavat, että inhibiittorin kehittäminen lääkkeeksi ei ole mahdotonta. Taudin oireet johtuvat luultavasti myös muustakin kuin amyloidin kertymisestä kudoksiin kuten viallisesta aktiinitukirangan homeostasiasta. Tämän vuoksi pelkkä amyloidin muodostumisen inhibitio ei luultavasti poista kaikkia oireita, mutta erittäin tärkeä merkitys amyloidin muodostumisella kuitenkin kiistämättä on. Siksi onkin tärkeää jatkaa tämän inhibiittorin kehittämistä niin, että se vielä joskus voisi olla oleellinen osa gelsoliiniamyloidoosin hoitoa.

6. LÄHTEET

- (1) Meretoja J. Familial systemic paramyloidosis with lattice dystrophy of the cornea, progressive cranial neuropathy, skin changes and various internal symptoms. A previously unrecognized heritable syndrome. *Ann.Clin.Res.* 1969 Dec;1(4):314-324.
- (2) Carrell RW, Gooptu B. Conformational changes and disease--serpins, prions and Alzheimer's. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 1998 Dec;8(6):799-809.
- (3) Maury CP, Kere J, Tolvanen R, de la Chapelle A. Finnish hereditary amyloidosis is caused by a single nucleotide substitution in the gelsolin gene. *FEBS Lett.* 1990 Dec 10;276(1-2):75-77.
- (4) Ghiso J, Haltia M, Prelli F, Novello J, Frangione B. Gelsolin variant (Asn-187) in familial amyloidosis, Finnish type. *Biochem.J.* 1990 Dec 15;272(3):827-830.
- (5) de la Chapelle A, Tolvanen R, Boysen G, Santavy J, Bleeker-Wagemakers L, Maury CP, et al. Gelsolin-derived familial amyloidosis caused by asparagine or tyrosine substitution for aspartic acid at residue 187. *Nat.Genet.* 1992 Oct;2(2):157-160.
- (6) Dobson CM. Protein folding and disease: a view from the first Horizon Symposium. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2003 Feb;2(2):154-160.
- (7) Pettersson T, Tornroth T, Maury P. Diagnostics and therapy of amyloidosis. *Duodecim* 1999;115(11):1201-1211.
- (8) Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-fibrilloses (second of two parts). *N.Engl.J.Med.* 1980 Jun 12;302(24):1333-1343.
- (9) Hiltunen T, Kiuru S, Hongell V, Helio T, Palo J, Peltonen L. Finnish type of familial amyloidosis: cosegregation of Asp187----Asn mutation of gelsolin with the disease in three large families. *Am.J.Hum.Genet.* 1991 Sep;49(3):522-528.
- (10) Paunio T, Kiuru S, Hongell V, Mustonen E, Syvanen AC, Bengstrom M, et al. Solid-phase minisequencing test reveals Asp187----Asn (G654----A) mutation of gelsolin in all affected individuals with Finnish type of familial amyloidosis. *Genomics* 1992 May;13(1):237-239.
- (11) de la Chapelle A, Kere J, Sack GH,Jr, Tolvanen R, Maury CP. Familial amyloidosis, Finnish type: G654----a mutation of the gelsolin gene in Finnish families and an unrelated American family. *Genomics* 1992 Jul;13(3):898-901.
- (12) Sunada Y, Shimizu T, Nakase H, Ohta S, Asaoka T, Amano S, et al. Inherited amyloid polyneuropathy type IV (gelsolin variant) in a Japanese family. *Ann.Neurol.* 1993 Jan;33(1):57-62.

- (13) Maury CP, Sletten K, Totty N, Kangas H, Liljestrom M. Identification of the circulating amyloid precursor and other gelsolin metabolites in patients with G654A mutation in the gelsolin gene (Finnish familial amyloidosis): pathogenetic and diagnostic implications. *Lab.Invest.* 1997 Oct;77(4):299-304.
- (14) Kiuru S. Gelsolin-related familial amyloidosis, Finnish type (FAF), and its variants found worldwide. *Amyloid* 1998 Mar;5(1):55-66.
- (15) Yin HL, Kwiatkowski DJ, Mole JE, Cole FS. Structure and biosynthesis of cytoplasmic and secreted variants of gelsolin. *J.Biol.Chem.* 1984 Apr 25;259(8):5271-5276.
- (16) Kwiatkowski DJ, Westbrook CA, Bruns GA, Morton CC. Localization of gelsolin proximal to ABL on chromosome 9. *Am.J.Hum.Genet.* 1988 Apr;42(4):565-572.
- (17) Kwiatkowski DJ, Stossel TP, Orkin SH, Mole JE, Colten HR, Yin HL. Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. *Nature* 1986 Oct 2-8;323(6087):455-458.
- (18) Kwiatkowski DJ, Mehl R, Yin HL. Genomic organization and biosynthesis of secreted and cytoplasmic forms of gelsolin. *J.Cell Biol.* 1988 Feb;106(2):375-384.
- (19) Kwiatkowski DJ. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1999 Feb;11(1):103-108.
- (20) Kangas H, Ulmanen I, Paunio T, Kwiatkowski DJ, Lehtovirta M, Jalanko A, et al. Functional consequences of amyloidosis mutation for gelsolin polypeptide -- analysis of gelsolin-actin interaction and gelsolin processing in gelsolin knock-out fibroblasts. *FEBS Lett.* 1999 Jul 9;454(3):233-239.
- (21) Weeds AG, Gooch J, McLaughlin P, Maury CP. Variant plasma gelsolin responsible for familial amyloidosis (Finnish type) has defective actin severing activity. *FEBS Lett.* 1993 Nov 29;335(1):119-123.
- (22) Lee WM, Galbraith RM. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *N.Engl.J.Med.* 1992 May 14;326(20):1335-1341.
- (23) McGough AM, Staiger CJ, Min JK, Simonetti KD. The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. *FEBS Lett.* 2003 Sep 25;552(2-3):75-81.
- (24) Choe H, Burtnick LD, Mejillano M, Yin HL, Robinson RC, Choe S. The calcium activation of gelsolin: insights from the 3A structure of the G4-G6/actin complex. *J.Mol.Biol.* 2002 Dec 6;324(4):691-702.

- (25) Maury CP, Alli K, Baumann M. Finnish hereditary amyloidosis. Amino acid sequence homology between the amyloid fibril protein and human plasma gelsoline. *FEBS Lett.* 1990 Jan 15;260(1):85-87.
- (26) Paunio T, Kangas H, Kalkkinen N, Haltia M, Palo J, Peltonen L. Toward understanding the pathogenic mechanisms in gelsolin-related amyloidosis: in vitro expression reveals an abnormal gelsolin fragment. *Hum.Mol.Genet.* 1994 Dec;3(12):2223-2229.
- (27) Kangas H, Paunio T, Kalkkinen N, Jalanko A, Peltonen L. In vitro expression analysis shows that the secretory form of gelsolin is the sole source of amyloid in gelsolin-related amyloidosis. *Hum.Mol.Genet.* 1996 Sep;5(9):1237-1243.
- (28) Page LJ, Huff ME, Kelly JW, Balch WE. Ca²⁺ binding protects against gelsolin amyloidosis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2004 Oct 1;322(4):1105-1110.
- (29) Chen CD, Huff ME, Matteson J, Page L, Phillips R, Kelly JW, et al. Furin initiates gelsolin familial amyloidosis in the Golgi through a defect in Ca²⁺ stabilization. *EMBO J.* 2001 Nov 15;20(22):6277-6287.
- (30) Page LJ, Suk JY, Huff ME, Lim HJ, Venable J, Yates J, et al. Metalloendoprotease cleavage triggers gelsolin amyloidogenesis. *EMBO J.* 2005 Dec 7;24(23):4124-4132.
- (31) Haltia M, Prelli F, Ghiso J, Kiuru S, Somer H, Palo J, et al. Amyloid protein in familial amyloidosis (Finnish type) is homologous to gelsolin, an actin-binding protein. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1990 Mar 30;167(3):927-932.
- (32) Maury CP. Immunohistochemical localization of amyloid in Finnish hereditary amyloidosis with antibodies to gelsolin peptides. *Lab.Invest.* 1991 Mar;64(3):400-404.
- (33) Meretoja J, Teppo L. Histopathological findings of familial amyloidosis with cranial neuropathy as principal manifestation. Report on three cases. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.[A]* 1971;79(5):432-440.
- (34) Kivela T, Tarkkanen A, Frangione B, Ghiso J, Haltia M. Ocular amyloid deposition in familial amyloidosis, Finnish: an analysis of native and variant gelsolin in Meretoja's syndrome. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 1994 Sep;35(10):3759-3769.
- (35) Kiuru-Enari S, Somer H, Seppalainen AM, Notkola IL, Haltia M. Neuromuscular pathology in hereditary gelsolin amyloidosis. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 2002 Jun;61(6):565-571.
- (36) Kiuru S, Matikainen E, Kupari M, Haltia M, Palo J. Autonomic nervous system and cardiac involvement in familial amyloidosis, Finnish type (FAF). *J.Neurol.Sci.* 1994 Oct;126(1):40-48.

- (37) Kiuru S, Salonen O, Haltia M. Gelsolin-related spinal and cerebral amyloid angiopathy. *Ann.Neurol.* 1999 Mar;45(3):305-311.
- (38) Kiuru S. Familial amyloidosis of the Finnish type (FAF). A clinical study of 30 patients. *Acta Neurol.Scand.* 1992 Oct;86(4):346-353.
- (39) Meretoja J, Jokinen EJ, Collan Y, Lahdevirta J. Renal biopsy findings in familial amyloidosis with corneal lattice dystrophy. An immuno-histochemical, light-microscopical and electron-microscopical study. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.Suppl.* 1972;233:228-238.
- (40) Maury CP. Homozygous familial amyloidosis, Finnish type: demonstration of glomerular gelsolin-derived amyloid and non-amyloid tubular gelsolin. *Clin.Nephrol.* 1993 Jul;40(1):53-56.
- (41) Meretoja J. Comparative histopathological and clinical findings in eyes with lattice corneal dystrophy of two different types. *Ophthalmologica* 1972;165(1):15-37.
- (42) Meretoja J. Genetic aspects of familial amyloidosis with corneal lattice dystrophy and cranial neuropathy. *Clin.Genet.* 1973;4(3):173-185.
- (43) Maury CP, Kere J, Tolvanen R, de la Chapelle A. Homozygosity for the Asn187 gelsolin mutation in Finnish-type familial amyloidosis is associated with severe renal disease. *Genomics* 1992 Jul;13(3):902-903.
- (44) Juusela P. Hampaiston ja suun alueen ongelmat perinnöllisessä gelsoliiniamyloidoosissa. 2004.
- (45) Kiuru S, Nieminen T, Partinen M. Obstructive sleep apnoea syndrome in hereditary gelsolin-related amyloidosis. *J.Sleep Res.* 1999 Jun;8(2):143-149.
- (46) Rintala AE, Alanko A, Makinen J, Nordstrom R, Salo H. Primary hereditary systemic amyloidosis (Meretoja's syndrome): clinical features and treatment by plastic surgery. *Scand.J.Plast.Reconstr.Surg.Hand Surg.* 1988;22(2):141-145.
- (47) Burtnick LD, Urosev D, Irobi E, Narayan K, Robinson RC. Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF. *EMBO J.* 2004 Jul 21;23(14):2713-2722.
- (48) Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2005 Jun;6(6):449-461.
- (49) Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol.Rev.* 2002 Apr;82(2):331-371.
- (50) Hayes MJ, Shao D, Bailly M, Moss SE. Regulation of actin dynamics by annexin 2. *EMBO J.* 2006 May 3;25(9):1816-1826.

- (51) Cederholm A, Frostegard J. Annexin A5 as a novel player in prevention of atherothrombosis in SLE and in the general population. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2007 Jun;1108:96-103.
- (52) Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp.Cell Res.* 2007 Jun 10;313(10):2050-2062.
- (53) Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Ckhas-tonay C, Vandekerckhove J, et al. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1981 Jan;78(1):298-302.
- (54) Kiuru S, Javela K, Somer H, Kekomaki R. Altered platelet shape change in hereditary gelsolin Asp187Asn-related amyloidosis. *Thromb.Haemost.* 2000 Mar;83(3):491-495.
- (55) Witke W, Sharpe AH, Hartwig JH, Azuma T, Stossel TP, Kwiatkowski DJ. Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin. *Cell* 1995 Apr 7;81(1):41-51.
- (56) Tzima E, Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH. Annexin V relocates to the platelet cytoskeleton upon activation and binds to a specific isoform of actin. *Eur.J.Biochem.* 2000 Aug;267(15):4720-4730.
- (57) Tzima E, Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH. Annexin V binds to the actin-based cytoskeleton at the plasma membrane of activated platelets. *Exp.Cell Res.* 1999 Aug 25;251(1):185-193.
- (58) Ardalan MR, Shoja MM, Kiuru-Enari S. Amyloidosis-related nephrotic syndrome due to a G654A gelsolin mutation: the first report from the Middle East. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2007 Jan;22(1):272-275.
- (59) Huerva V, Velasco A, Sanchez MC, Mateo AJ, Matias-Guiu X. Lattice corneal dystrophy type II: clinical, pathologic, and molecular study in a Spanish family. *Eur.J.Ophthalmol.* 2007 May-Jun;17(3):424-429.
- (60) Chastan N, Baert-Desurmont S, Saugier-veber P, Derumeaux G, Cabot A, Frebourg T, et al. Cardiac conduction alterations in a French family with amyloidosis of the Finnish type with the p.Asp187Tyr mutation in the GSN gene. *Muscle Nerve* 2006 Jan;33(1):113-119.
- (61) Ratnaswamy G, Koepf E, Bekele H, Yin H, Kelly JW. The amyloidogenicity of gelsolin is controlled by proteolysis and pH. *Chem.Biol.* 1999 May;6(5):293-304

