

# GDNF:n säätelemien geenien ilmentyminen kehittyvässä munuaisessa

Antti Perttula, LK

Helsinki 26.06.2008

Tutkielma

Ohjaajat: Kirsi Sainio ja Hannu Sariola

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

[antti.perttula@helsinki.fi](mailto:antti.perttula@helsinki.fi)

## HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos Institution – Department Biolääketieteen laitos	
Tekijä/Författare – Author Antti Perttula			
Työn nimi – Arbetets titel – Title GDNF:n säätelemien geenien ilmentyminen kehittyvässä munuaisessa			
Oppiaine – Läroämne – Subject Kehitysbiologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Tutkielma	Aika – Datum – Month and year 26.06.2008	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 29	
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Gliasoluperäinen hermokasvutekijä (GDNF) aiheuttaa muutoksen n. 300 geenin ilmentymisessä munuaisen kehityksen aikana. Geenien paikantaminen auttaa käsittämään solujen toimintaa elinten kehittymisen aikana. Lisäksi GDNFn toiminnan ymmärtäminen voi mahdollistaa Parkinsonin taudin uusien hoitomuotojen kehittämisen.</p> <p>Tässä työssä geenien ilmentymistä tutkittiin in situ –hybridisaatiomenetelmällä ja siten pyrittiin selvittämään viiden geenin merkitystä munuaisen kehityksessä. Visnlike-protein-1 (VSNL-1) lienee tutkituista geneistä olennaisin, ja se saattaa olla uusi munuaisen kehitykselle välttämättömän induktori, joka ilmentyy Wolffin tiehyessä ja uretersilmussa. Plakofilin ilmentyy Wolffin tiehyessä sekä uretersilmussa epiteelien välisissä liitoksissa. Kondroitiini-sulfaatti proteoglykaani (CSPG) ilmentyy myös Wolffin tiehyessä sekä virtsanjohtimessa. Dixed-2 ja Mrlp2 ilmentyvät hiiren sikiökehityksen aikana koko munuaisessa ilman erityistä sijaintia.</p> <p>(100 sanaa)</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords GDNF, kindey, development VSNL1, plakophilin, CSPG, MRLP, dixed-2, metanephros, organogenesis,			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

1.1.0 Johdanto .....	4
2.1 Pronefroksen kehittyminen .....	4
2.11 Pronefroksen kehityksen avainmolekyylit .....	5
2.2 Mesonefroksen kehittyminen .....	6
2.21 Mesonefroksen kehityksen avainmolekyylit .....	7
2.3 Metanefroksen kehittyminen .....	9
2.4 GDNF:n biokemiallisen toiminnan perusteet .....	12
2.41 GDNF:n sukupuu .....	13
2.411 GFL-ligandien reseptorit .....	13
2.42 Signaalinvälityksen mekanismi .....	14
2.421 RET-välitteinen signaointi .....	14
2.5 Tutkimuksen geenit .....	15
3.0 Aineisto .....	18
4. 0Tulokset .....	22
5.0 Pohdinta .....	25
Lähdeluettelo .....	29

## 1.1.0 Johdanto

Munuainen säätelee elimistössä nestetilavuuksia ja elektrolyyttitasapainoa. Lisäksi munuainen erittää elimistöön peptidihormonia, reniiniä, joka osallistuu veden määrän ja verenpaineen säätelyyn. Reniini aiheuttaa angiotensiinin erittymisen, joka puolestaan aiheuttaa osittain janon tunteen ja säätelee verisuonten tonusta ja siten verenpainetta. Munuainen suodattaa verestä kuona-aineet sekä ylimääräiset elektrolyytit ja erittää ne ylimääräisen veden mukana virtsaan, sillä veren tilavuuden ja osmolaliteetin on pysyttävä tasaisena terveen elämän ylläpitämiseksi. Siksi munuaisen toiminta ja kehitys on tarkasti ja monipuolisesti säädeltyä. Munuainen on myös organogeneesin mallielin, koska munuaisen kehityksen aikana aktivoituu valtaosa kehitysbiologian tällä hetkellä tunnetuista mekanismeista. Tämä tutkielma käsittelee munuaisen virtsankeräämisjärjestelmän kehittymistä säätelevän kasvutekijän GDNF (Gliasoluperäinen hermokasvutekijä) vaikutuksia muitten geenien ilmentymiseen sekä ilmentymisen todentamisesta *in situ* –hybridisaatiotekniikalla. Tutkielmani jatkaa Jouni Kvistin Pro Gradu –tutkielmaa ”Munuaissilmun muodostukseen vaikuttavien geenien tutkiminen geenisiruilla.”, jonka tuloksena todettiin GDNF:n aiheuttavan noin 300 geenin ilmentymisen muutoksen; näistä viiden ilmentymistä munuaisessa tarkastellaan tässä tutkielmassa.

(1)

## 2.1 Pronefroksen kehittyminen

Munuaisen kehittyminen alkaa, kun välimesodermistä peräisin olevasta, virtsaneritys- ja sukupuolielinten lähtökohtana toimivasta urogenitaaliharjanteesta kehitty nefrinen mesenkyymi ja nefrinen tiehyt. Nefrinen tiehyt tunnetaan pronefroksen kehittymisen jälkeen Wolffin tiehyenä. Nisäkkäillä munuainen kehitty kolmen vaiheen kautta, jotka ovat pronefros, mesonefros sekä metanefros, joista viimeisestä kehitty varsinainen munuainen. Kaksi ensin mainittua surkastuvat pois munuaisen kehityksen edetessä. Ihmisellä pronefroksen merkitys on tärkeämpi munuaisen myöhemmän kehityksen kuin fysiologisen toiminnan kannalta. Ihmisen pronefros ei suodata verta eikä eritä virtsaa olemassaolonsa aikana. Sen sijaan vesieläimillä pronefros toimii alkeellisena munuaisena.

Ihmisellä pronefros kehittyy 3. sikiöviikolla intermediaarisesta mesodermistä para-aksiaalisen ja lateraalisen mesodermien väliin todennäköisesti anterioristen somiittien indusoimana. Kynsisammakolla tehdyssä kokeessa anterioristen somiittien poistaminen aiheutti pronefroksen rakenteiden täydellisen puuttumisen (2). Amniooteilla eli vesieläimillä pronefros muistuttaa rakenteeltaan kehittyntä munuaista muodostuen tubuluksista, tiehyeestä, ja glomuksesta. Glomus vastaa suodattamisesta, tiehyt poistaa urean ja tubulukset absorboivat veden, ravintoaineet ja elektrolyytit. Ihmisellä pronefros surkastuu pois 3,5 sikiöviikon jälkeen.

Vaikka nykytietämyksen valossa pronefros ei ole nisäkkäillä toiminnallisesti merkittävä, on sen kehityksen tutkimuksesta on kuitenkin ollut hyötyä mesonefroksen ja metanefroksen kehityksen mekanismien ymmärtämiseksi – ja päinvastoin. Useimmiten pronefroksen kehityshäiriöt johtavat letaaleihin urogenitaalialueen organogeneesin häiriöihin.

## 2.11 Pronefroksen kehityksen avainmolekyylit

Pronefroksen kehitykseen vaikuttavista kasvutekijöistä on kartoitettu muutamia. Näiden lisäksi tiedetään rakenteita, jotka osallistuvat induktioprosessiin vielä tuntemattomin mekanismein. Kuitenkin on vaikeaa todistaa tarkasti, mitkä kasvu- ja transkriptiotekijät ovat yksinoikeudella pronefroksen kehityksessä olennaisia, koska pronefroksen kehityksessä tarvittuja kasvutekijöitä tarvitaan useimmiten myös myöhempien vaiheiden kehityksessä, jolloin aikaisempien kehitysvaiheiden häiriöt jäävät letaalin lopputuloksen varjoon. Tällöin pronefroksen rakenteen häiriintyminen aiheuttaa kehityshäiriöitä myöhemmissä rakenteissa.

Yksi tärkeimmistä transkriptiotekijäperheistä on Lim, jonka jäsenistä munuaisen kehityksen kannalta tärkeän *lmx-1b*:n poistaminen hiiren genomista vaikuttaa munuaisten lisäksi myös raajojen muodostukseen. Toinen oleellinen transkriptiotekijä samaisesta perheestä on Lim1, joka ilmentyy myös välimesodermissä, mesodermissä, nefrisessä tiehyeessä ja munuaissilmussa, ja on tärkeässä osassa myös myöhemmissä munuaisen kehityksen vaiheissa. Lim-1 toiminnan estymisen vaikutukset käsittellään metanefroksen yhteydessä.

Toinen välttämätön transkriptiotekijäperhe munuaisen kehityksen kannalta on Pax (paired box), joista etenkin Pax2 ja Pax8 ovat pronefroksen kehittymisessä

avainasemassa. Hiirellä Pax2:n puuttuminen aiheuttaa kaikkien eri munuaisten vaiheiden kehityksen häiriintymisen. Samalla myös virtsateiden sekä genitaalialueen kehitys jää puutteelliseksi. (3)

Pax8 toiminnan estyminen ei kuitenkaan aiheuta hiiren munuaisissa yhtä vakavia puutteita, koska Pax8 ja Pax2 välillä on jonkinasteista toiminnallista päällekkäisyyttä, eli redundanssia. Nämä proteiinit ovatkin 71,9%sti identtisiä ja siten toimintakin on osittain samankaltaista. Pax-8 poistogeeniset hiiret kuolevat pian syntymänsä jälkeen kilpirauhasen puutteelliseen toimintaan.

Lasten pahanlaatuisen munuaiskasvaimen aiheuttava Wilmsin tuumorigeenin *Wt1:n* mutaatio on myös olennainen pronefroksen muodostumisessa. *Wt1* vaikuttaa sekä positiivisesti että negatiivisesti monien muiden geenien transkriptioon ja vaihtoehtoiseen silmukointiin. Myös *Wt1* mutaatioiden vaikutukset käsitellään tarkemmin metanefroksen yhteydessä.

Kasvun säätelijöistä yksi tärkeimpiä myöhemmin käsiteltävän GDNF:n ohella on signaalimolekyyli *Wnt4*, jonka toiminnan estyessä munuaiseen ei kehity nefroneita. Tästä johtuen hiiripoikaset kuolevat 24 tunnin sisällä syntymästään (4). Mitä luultavimmin vakavien kehityshäiriöiden ketjureaktio saa tässäkin tapauksessa alkunsa jo pronefroksen kehityksen aikana.

## 2.2 Mesonefroksen kehittyminen

Mesonefros kehittyy samaisesta välimesodermistä kuten muutkin munuaisen vaiheet, E9 ikäisellä hiirisikiöllä. Ihmisellä vastaava vaihe on 3,5 sikiöviikon kohdalla. Tärkeimpinä rakenteina mesonefroksessa näkyvät nefrisestä tiehyestä kehittynyt Wolffin tiehyt sekä kaudaaliset että kraniaaliset tubulukset, jolloin rakenteet vastaavat jo kohtuullisessa määrin metanefroksen rakenteita. Mesonefroksessa tubulukset ovat GDNF:n ilmentymisen puuttuessa Wolffin tiehyeen vieressä selkeässä rivissä, kun taas metanefroksessa tubulukset muodostavat kolmiulotteisemman puuston GDNF:n indusoimana. Kokoojaputkia ei mesonefroksessa kuitenkaan ole. Tubuluksia on nisäkkäillä vaihteleva määrä, ihmisellä 30-34, mikä viittaa osaltaan mesonefroksen suodatustoimintaan ihmissikiön kehityksen aikana. Lisäksi suodatustoiminnan puolesta puhuvat ihmisen mesonefroksen suuri koko ja hiussuoniverkosto. Selkeää yksimielisyyttä ei asiasta kuitenkaan ole.

Nefronit kehittyvät nefrogeenisestä juosteesta, joka kulkee Wolffin tiehyeen vieressä. Wolffin tiehyt onkin munuaisen kehityksessä tärkeässä asemassa sekä toiminnallisesti kloaakkiin johtavana putkena että kehitysbiologisesti keskeisenä induktioalueena. Mesonefroksen toimiessa suodatettu alkuvirtsaa ei siis poistu virtsarakon kautta – mikä kehittyä vasta metanefroksen rakenteiden yhteydessä - vaan kloakin, eli viemärisuolen kautta, jossa anaali- ja virtsatiet eivät ole vielä erottuneet. Lisäksi jotkut mesonefroksen osat erilaistuvat testosteronin vaikutuksesta sukupuolielimien osiksi. Pojilla osasta mesonefroksen putkia erilaistuvat lisäkivestiehyet. Wolffin tiehyestä muodostuu pojilla siemenjohdin; tyttösiikiöillä nämä tarpeettomat rakenteet surkastuvat apoptoottisesti ja sen sijaan Müllerian tiehyet erilaistuvat. Pojilla puolestaan Müllerin tiehyet surkastuvat koska Y-kromosomin SRY-alueella sijaitsee anti-Müllerian hormonin geeni, joka estää pojilla Müllerin tiehyeen erilaistumisen gynekologiseksi elimiksi. Mesonefros on ihmisellä paitsi toimintansa puolesta myös yleisestikin pronefrosta aktiivisempi elin moninaisten kehitysbiologisten ilmiöiden, kuten solujen migraation, apoptoosin, erilaistumisen sekä hormonivälitteisen kehittymisen tapahtuma-alueena. Moni näistä tapahtumista liittyy juuri sukurauhasten erilaistumiseen, jossa mesonefros on tärkeä tekijä. Vastaavasti sukurauhaset osallistuvat mesonefroksen erilaistumiseen hormonierityksen kautta (5). Lisäksi mesonefros on oleellinen hematopoiesiin ja lisämunuaisen kehityksen kannalta (6).

## 2.21 Mesonefroksen kehityksen avainmolekyylit

Kaikissa munuaisen kehitysvaiheissa ilmentyvät kasvutekijät ovat osittain samoja. Suuria yhtäläisyyksiä löytyy etenkin mesonefroksen ja metanefroksen avainmolekyyliden väliltä. Siten Pax2 ja Wt1 ovat tärkeitä myös mesonefroksen kehityksessä. Mesonefroksessa Pax2 toiminnan puute aiheuttaa kehityshäiriöitä ureterissa ja lopputuloksena seuraakin totaalinen munuaisten, ureterien ja genitaalialueiden mesonefroksista peräisin olevien rakenteiden aplasia. Wt1 puolestaan vaikuttaa vastavuoroisesti munuaissilmun syntyyn ja lisäksi wt1 poistogeenisissä hiirissä metanefrinen mesenkyymi häviää apoptoottisesti ja gonadit sekä metanefros eivät kehity. *Wt1* poistogeenisillä hiirillä myös mesonefroksen putkirakenteiden kehitys häiriintyy ja kaudaaliset nefronit jäävät muodostumatta (7). Wolffin tiehyessä ja uretersilmussa ilmentyvä transkriptiotekijä GATA-3 puolestaan

stimuloi Wolffin tiehyen kasvua. GATA-3:n toiminnan estyessä Wolffin tiehyt jää vajaaksi pituudeltaan ja aiheuttaa siten heikentyneen indusoinnin, jolloin mesonefroksen putkirakenteita kehittyy vain vähän. GATA-3 osallistuu muidenkin elinjärjestelmien kehitykseen mm. hermoston sekä lisäkilpirauhasten erilaistumiseen. (8)

Mesonefroksen kehityshäiriöt usein liittyvät sen indusoimaan genitaalialueen kehitykseen. Homeoottisen transkriptiotekijän *Hoxa11* geenin mutaatio johtaa naarashiirillä kohdun ja uroshiirillä siemenjohtimien epämuodostumiseen aiheuttaen molemmilla sukupuolilla hedelmättömyyden. (9) Toinen homeoboxgeeni *Hoxd11* puolestaan aiheuttaa *Hoxa11* poistogeeniseen hiirikantaa risteytettynä vaikeita kehityshäiriöitä koko urogenitaalialueella (10). Hox-geenien mutaatioiden vaikutukset näkyvät etenkin kaavoittumisen epäonnistumisena. Yhden geenin puutos ei juuri vaikuta, mutta kahden hox-geenin mutaatio saa aikaan kolmiulotteiselta rakenteeltaan poikkeavan munuaisen. Kolmen Hox-geenin mutaatioissa minkäänlaista munuaista ei muodostu. Ilmeisesti Hox-geenien yhteispelissä on redundanssia, joka yksittäisissä mutaatioissa pystyy pelastamaan hiirisikiön kehityksen, mutta muutokset useammassa Hox-geenissä aiheuttavat hiirten kuoleman pian syntymän jälkeen.

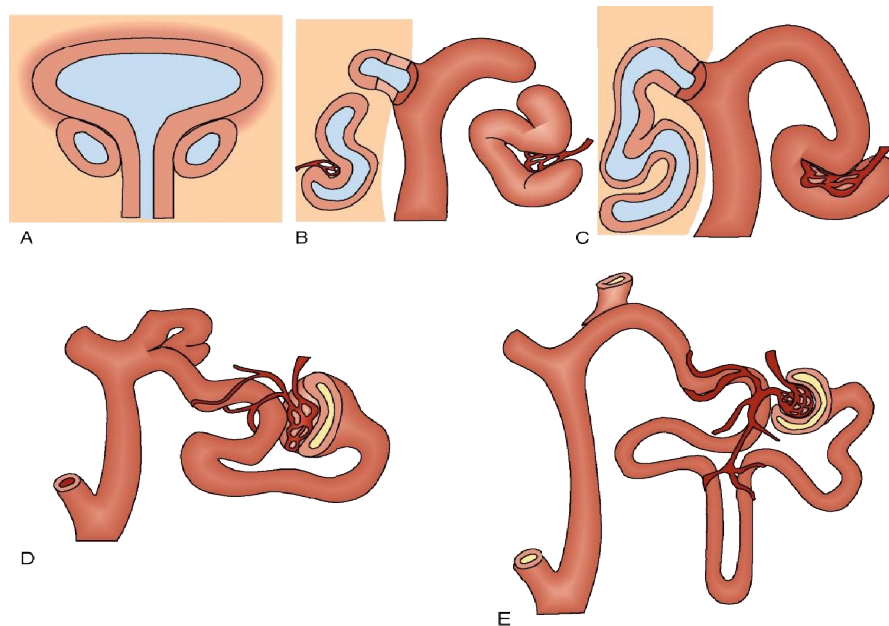
Mesonefroksesta on peräisin osa testosteronia tuottavista kivesten Leydigin soluista. Siten merkittävä osa sukurauhasten kehityshäiriöihin johtavista tapahtumista perustuu osaltaan mesonefroksen kehityshäiriöihin. Esimerkiksi mesonefrisistä stroomasoluissa ilmentyvä Wnt-4 estää testosteronin tuotantoa ja häiriintynyt signaalivälitys aiheuttaa naarashiirillä maskulinisaatiota. (11)

Sukupuolen määräytyminen on biologisesti monimutkaisempi ilmiö kuin kulttuurimme antaa ymmärtää. Näyttääkin siltä, että mutaatiot sekä muut kehityshäiriöt eivät kunnioita perinteisten sukupuolinormiemme ja -käsityksiemme rajoja. Useimpien mutaatioiden seurauksena genotyyppi ja fenotyyppi eivät vastaa toisiaan. Tämänkaltaisia sukupuolirajat hämärtäviä mutaatioita on useita eikä niistä aiheutuvien ongelmien hoitoon ole juurikaan laadittu hoitosuosituksia. Mikäli kasvatus ja mahdolliset kirurgiset korjausleikkaukset onnistuvat hyvin, on ainoa lapselle koitava haitta hedelmättömyys, ja tämäkin vain silloin jos sukupuolirooli on valittu genotyyppiä vastaan.



## 2.3 Metanefroksen kehittyminen

Metanefros, toisin kuin sitä edeltäneet rakenteet, kehittyy nisäkkäillä toimivaksi elimeksi. Metanefroksen kehittyminen alkaa hiirellä vaiheessa E11 ja ihmisellä 5. sikiöviikolla, kun Wolffin tiehyt alkaa kasvaa kaudaalisesti. Lopuksi se muodostaa uretersilmun, joka toimii lähtökohtana kokoojaputkiston muodostavalle haarautumisketjulle.



**Kuva 1.**

**A:** Keskellä uretersilmu, jonka alla kaksi silmun indusoimaa munuaisrakkulaa, joista nefronit muodostuvat. **B:** Rakkuloista muodostuu nk. S-putket, joiden alakaraan kasvaa hiussuonen endoteelisoluja. **C:** S-putket liittyvät yläosastaan kokoojaputkeen. Alasakaran hiussuonista muodostuu glomeruluksen hiussuonikeränen. **D:** Bowmanin kapselin solukko muodostuu alasakaran uloimmista epiteelisoluista. Tubulus mutkistuu ja yläsakaran osista muodostuu distaalinen tiehyt. **E:** S-putken keskiosista muodostuu proksimaalinen tubulus, nouseva- ja laskeva kiemuratiehyt ja Henlen linko. (12)

Uretersilmu kasvaa induktioiden siivittämänä metanefrisen mesenkyymien sisään ja haarautuu useita kertoja muodostaessaan kokoojaputkia ja muita virtsan kokoomisjärjestelmän osia. Invaasionsa yhteydessä uretersilmu ilmentää mm. *Lim-1* geenin, jonka puute aiheuttaa normaalisti hiirisikiöiden kuoleman E10 mennessä puutteellisen gastrulaation seurauksena. Gastrulaation onnistuessa harvoilta selvinneiltä *Lim1*-poistogeenisiltä hiirisikiöiltä puuttuvat munuaiset ja sukupuolielimet. *Lim1* on mitä todennäköisimmin ilmentymiskuvionsa perusteella

laajavaikutteinen transkriptiotekijä; tarkempi mekanismi ja rooli on kuitenkin selvittämättä, koska *Lim1* poistogeenisille hiirille ei kehity edes mesonefrosta. (13)

Merkittävä geeni munuaisen, ja monien muidenkin elinten kehityksessä, on *Eya1*, joka banaani-kärpäsessä (*Drosophila melanogaster*) puuttuessaan aiheuttaa silmien puuttumisen (*Drosophila Eyes Absent*). Ihmisissä vastaava mutaatio aiheuttaa BOR-syndrooman (Branchio-Oto-Renal), jonka selkeimpinä oireina ovat kuurous ja munuaisen kehityshäiriöt. *Eya1*:n puuttuessa uretersilmu jää muodostumatta, koska *Eya1*:n vaikuttaa sängen monen geenin ilmentymiseen, mukaanlukien GDNF:n, joka on kriittinen molekyyli uretersilmun invaasiossa metanefriseen mesenkyymiin. (14)

Munuaisen suodatustoiminnan perusyksiköt nefronit kehittyvät metanefrisen mesenkyymien induktioiden seurauksena hiirellä E11,5 – E20 välisenä aikana ja ihmisellä 5. sikiöviikosta alkaen aina raskauden loppuun asti. Geeneinä vaikuttavat muun muassa *Wt1* ja *Pax-2*, jotka sängen monimutkaisesti säätelevät nefronien kehitystä. *Wt1* muun muassa toimii sekä aktivoiden että estäen tarvittavien geenien transkriptiota sekä säätelee kehittyvässä munuaisessa apoptoosia. (15). *Wt1* mutanteissa hiirissä tubuluksia ei kehity. Ihmisellä *WT1* mutaatiot aiheuttavat Wilmsin tuumorikasvainten lisäksi eri syndroomia munuaisissa ja sukurauhasissa ja *Wt1*-poistogeenisillä hiirillä munuaista muodostavat solut kuolevat apoptoottisesti (16).

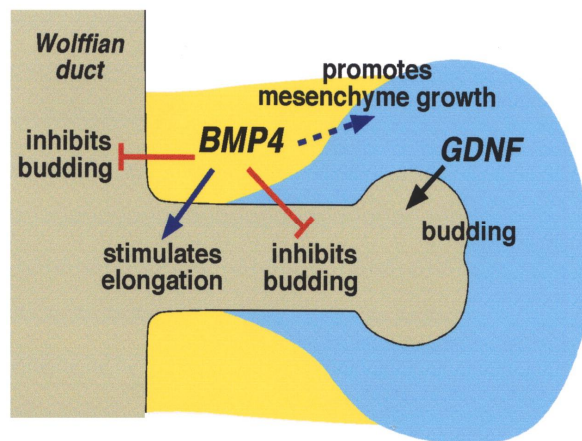
Kuten aikaisemmin mainittiin, kriittisenä kasvutekijänä kokoojaputkiston kehityksessä toimii GDNF, jonka puuttuessa mesenkyymistä uretersilmua, saati toimivia munuaisia, ei muodostu. Lisäksi uretersilmun kehittymisessä vaikuttaa ainakin kymmenkunta molekyyliä, joista osa mahdollistaa silmun haarautumisen ja kasvun, kun taas osa estää haarautumisen vääristä kohdista.

Molekyylit	Tehtävä	Toiminta
Activin A	Signalointi	Haarautumisen negatiivinen säätely (esto)
BMP-2, BMP-7	Signalointi	Haarautumisen säätely
GDNF, c-RET, GFR- $\alpha$ 1	Signalointi	Uretersilmun kasvu Wolffin tiehyestä sekä haarautumisen jatkuminen
Integriinit	Soluadheesio	Tukee haarautumisessa ja haarojen kasvussa
Metalloproteinaasit MMP2, MMP9	Hajottaminen	Mahdollistaa haarojen kasvun ”syömällä” tilaa uretersilmun haaroille
Proteiini kinaasi A	Solunsisäinen signalointi	Haarautumisen negatiivinen säätely (esto)
Proteiini kinaasi C	Solunsisäinen signalointi	Haarautumisen positiivinen säätely
TGF $\beta$	Signalointi	Viivyttää haarautumista, sallii haarojen kasvun

**Taulukko 1. Munuaisen haarautumismorfogeneesiä säätelevät molekyylit (17)**

## 2.4 GDNF:n biokemiallisen toiminnan perusteet

GDNF eristettiin rotan gliasoluista vuonna 1993. Siitä toivottiin yksinkertaista ratkaisua Parkinsonin taudin hoitoon, koska GDNF:n oli todettu ylläpitävän rotan aivoissa substantia nigran dopaminergisia neuroneita. Ensimmäiset pettymykset toiveisiin tulivat kuitenkin varhain, kun Parkinsonin taudin malleiksi tarkoitetut *GDNF*-poistogeeniset hiiret kuolivat heti syntymän jälkeen. Syyksi paljastui munuaisten aplasia, eli puuttuminen. GDNF:n paljastuminen laajavaikutteiseksi kasvutekijäksi johtikin GDNF:n tutkimuksen laajemmalle, unohtamatta kuitenkin Parkinsonin taudin kohdalla saavutettuja rohkaisevia tuloksia. Hermokasvutekijänä substantia nigran keskeisten vaikutusten lisäksi GDNF:n on todistettu ylläpitävän myös erilaisia periferisten, sympaattisten, parasympaattisten sekä suoliston enteristen neuronien alatyyppejä. Enterisen hermotuksen synnynnäinen puuttuminen ohutsuolen alueella tunnetaan Hirschsprungin tautina ja sen aiheuttajaksi on löydetty GDNF:n ja sitä sitovan reseptorin RET:in lisäksi puolenkymmentä muuta geeniä. Nykyään geneettisen selityksen taudilleen saakin jo 50% Hirschsprung -potilaista. Lisäksi GDNF/RET signaaloinnin on todettu olevan tärkeänä tekijänä sympaattisen



hermoston varhaiskehityksessä sekä aiheuttavan väärin aktioituuessaan syöpää erityisesti kilpirauhasen rakenteissa. (17)

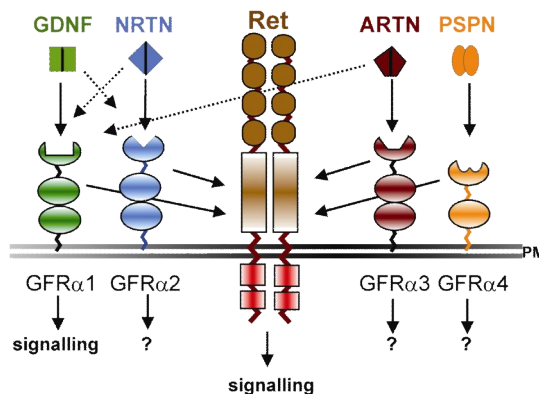
Munuaisten kehityksessä GDNF saa aikaan uretersilmun tunkeutumisen metanefriseen mesenkyymiin ja ylläpitää kokoojaputkiston haarautumista.

**Kuva 2. GDNF aikaansaa munuaissilmun muodostumisen, kun taas haarojen kasvun saa aikaan BMP4 (Bone Morphogenic Protein), joka myös estää munuaissilmun kehittymistä väärin paikkoihin. (12)**

## 2.41 GDNF:n sukupuu

GDNF ja sen kanssa samankaltaiset kasvutekijät kuuluvat rakenteensa ja toimintansa perusteella TGF- $\beta$  kasvutekijäsuurperheeseen. Yhteistä tämän suurperheen jäsenillä on muun muassa rakenteellisesti kysteiinisolmu; toiminnallisesti ne vaikuttavat homodimeereinä. Muita ns. GFL eli GDNF-family ligands -molekyylejä ovat neurturiini, artemiini ja persefiini. Niiden aminohapposekvenssi on pitkälti identtinen, mutta toiminnallisesti ne eroavat selkeästi toisistaan. (18)

### 2.411 GFL-ligandien reseptorit



**Kuva 3. GFL:ien sitoutuminen reseptoreihinsa. Sitoutumisen jälkeen RET siirtyy kompleksin luo ja signaalinvälitys alkaa. (18)**

GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2, GFR $\alpha$ 3 ja GFR $\alpha$ 4, jotka sitoutuvat GFL:iin (kuva 3.) järjestyksessä GDNF, neurturin (NRTN), artemin (ARTN), persephin (PSPN). GDNF sitoutuu sekundäärisesti myös GFR $\alpha$ 2 ja vastaavasti neurturin pystyy sitoutumaan GFR $\alpha$ 1:n kanssa. (18)

*GDNF*-poistogeenisillä hiirillä todettujen kaltaisia puutoksia saadaan aikaan myös muiden GFL-ligandien tai niiden reseptorien mutaatioilla. Esimerkiksi Hirschsprungin tauti johtuu mutaatioista joko GFL -ligandeissa, tai itse signaloinnista vastaavassa RET geenissä. RETin lisäksi GFL:n toiminnan kannalta olennaisia ovat glykolysolifosfatidyli-inositoli -ankkuriperheen GFR $\alpha$  reseptorit

## 2.42 GDNF signaalinvälityksen mekanismit

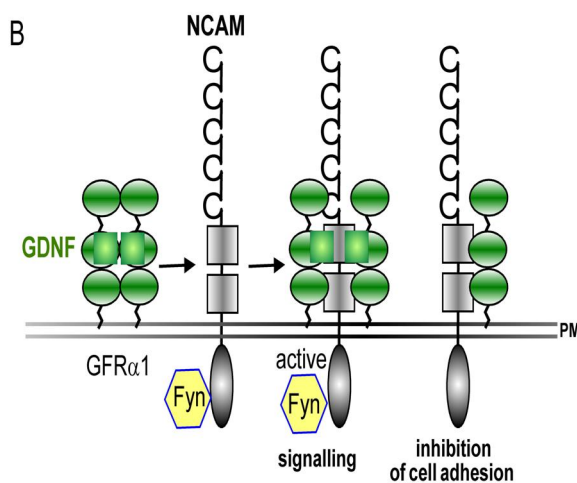
GDNF/RET signaloinnilla on monia mekanismeja viestin välittämiseksi solun sisällä. Signaalitransduktio jakautuu karkeasti RETistä riippumattomaan (RET independent) ja RET välitteiseen (RET mediated) signointiin, joka jaetaan edelleen *cis* ja *trans* muotoihin, eli solukalvolla ja solujen välillä tapahtuvaan signointeihin.

## 2.43 RET-välitteinen ja RETistä riippumaton signointi

*Cis* signaloinnin arvellaan tapahtuvan, kun jokin GFL sitoutuu lipidilautoilla sijaitsevan  $GFR\alpha$ n kanssa ja kompleksi houkuttelee homodimeerisen RET:in samaisen lipidilautan läheisyyteen. Tämän seurauksena kaksi RET-molekyyliä dimerisoituu, tyrosiinitähteet fosforyloituvat ja signaalivälitys alkaa.

*Trans* –signaalivälityksessä liukoinen  $GFR\alpha$  liittyy yhteen GFLn kanssa ja muodostaa kompleksin, joka reagoi valmiiksi homodimerisoituneen ja siten aktiivisen RETin kanssa. *Trans* –välitys on hitaampaa, harvinaisempaa ja tunnettu selkeästi huonommin kuin *cis* –välitys.

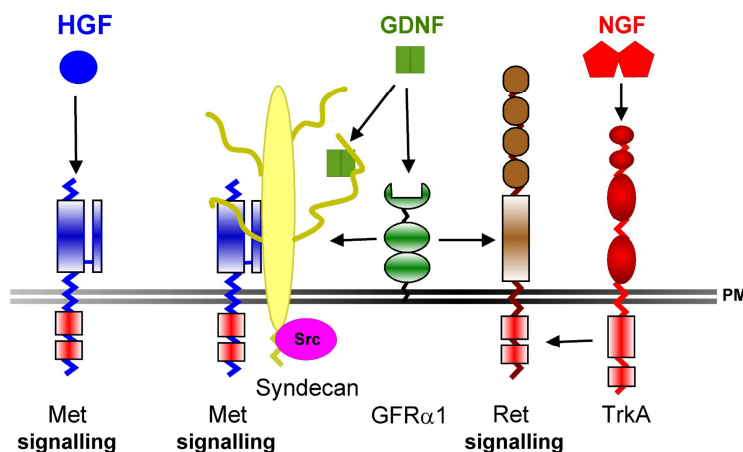
RETistä riippumaton signointi tapahtuu puolestaan muiden solukalvon läpäisevien proteiinien kautta. Ehdolla signaalinvälityksen vaihtoehtoisten reittiketjujen ensimmäisiksi proteiineiksi ovat NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) ja tyrosiinikinaasireseptori Met. Näistä NCAMin reitti on paremmin tunnettu.



**Kuva 4. NCAM sitoutuu GDNF- $GFR\alpha$  dimeerin kanssa ja saa aikaan sytoplasmassa Fyn-molekyylin aktivoitumisen. Aktivoituneen signaalireitin ansiosta solujen jakautuminen alkaa. Vastaavasti GDNF:n puuttuessa solujen välisten liitosten kehittyminen estyy solunjakautumista hidastaen. (18)**

NCAMin signaalivälityksen vaste riippuu sitoutuvista proteiineista. Solukalvolla sijaitsevaan NCAM:iin sitoutuu poikkeuksetta  $GFR\alpha 1$ , joka parantaa merkittävästi kompleksin sitoutumista GDNF:iin. Mikäli GDNF:ia ei ole saatavilla, solujen välinen adheesio heikkenee, kun taas GDNFn vaikutus edistää neuronien kehittymistä. Vaikka signaalivälityksen toiminnan hienomekaniikka onkin vielä epäselvää, on kuitenkin ilmeistä että NCAM:n vaste riippuu GDNFn läsnäolosta tai sen puutteesta.

(18)



**Kuva 5. Met signaloinnin yhteydessä  $GFR\alpha 1$  jäljittelee hepatosyyttien kasvutekijää (HGF) ja fosforyloi reseptori Met:in. Syndekaani puolestaan toimii paikallisena GDNFn konsentraation säätelijänä, jonka ansiosta GDNFn pitoisuudet ovat solukalvolla korkeat. Tämä edesauttaa Met signaloinnin käynnistymistä. Solun sisällä käynnistymistä säätelevät myös Src -kinaasit. Myös TrkA aktivoituessaan SMAD signaloinnin kautta fosforyloi RETin. Lisäksi GDNF lisää TrkA:n ekspressiota ja siten edistää NGF:n signalointia.**

(18, 19)

## 2.5 Tutkimuksessa tarkastellut geenit

### CSPG

Kondroitiini sulfaatti proteoglykaani (CSPG) on hepariinisulfaatti proteoglykaanin (HSPG) ohella tärkein solun ulkoisen matriksin glykosaminoglykaani.

Glykosaminoglykaanit sitovat vettä ja siten myös kasvutekijöitä ja toimivat mm. munuaisen haarautumisen yhteydessä haarautumisen säätelijöinä. CSPG on pääsääntöisesti munuaisen kehitykseen vaikuttava glykosaminoglykaani, mutta CSPG:n täsmällinen tehtävä on silti edelleen hämärän peitossa. Kuitenkin on selvää, että jonkinlaista redundanssia ilmenee, koska CSPG-poistogeenisillä hiirillä ei ole havaittu munuaisten kehityshäiriöitä. CSPGtä esiintyy munuaisen kehityksen yhteydessä etenkin metanefrisen mesenkyymissä (20) samoilla alueilla, joissa GDNF ilmentyy.

### Plakofiliini 1

Plakofiliinit kuuluvat solukalvolla adheesiokomplekseissa sijaitsevien delta-kateniini -molekyylien joukkoon ja toimivat välttämättöminä kiinnitysproteiineina desmosomien ja epiteelisolujen välisissä liitoksissa. Hiirillä mutaatiot plakofiliineissa voivat aiheuttaa mm. kardiomyopatiaa. (21)

### VSNL-1

Visinin-like protein-1 (VSNL-1 tai VILIP-1) tunnetaan tuumorisuppressorigeeninä, joka runsaasti ilmentyessään voi estää tietyissä karsinooissa syöpäsolukon leviämisen ympäröiviin kudoksiin (22). Pääsääntöisesti VSNL-1 esiintyy keskushermostossa ja osallistuu soluviestintään ja keskushermoston erilaistumiseen. Toiminnallisilta ominaisuuksiltaan VSNL-1 on kalsiumia sitova proteiini, joka ilmentyy hermoston lisäksi monen elimen kehityksen yhteydessä mm. haiman Langerhansin saarekkeissa ja  $\beta$ -soluissa, sekä lisää haiman solujen nikotiinireseptorien määrää (23). Lisäksi VSNL-1 pystyy sitoutumaan ja stabiloimaan kaksijuosteista RNAta, mikä viittaa vahvasti geeniekspression säätelyyn (24).

VSNL-1 on tutkittu vasta sängen vähän ja pääosa tutkimuksesta on keskittynyt VSNL-1 keskushermostovaikutusten selvittelyyn. VSNL-1n ilmentymisessä on havaittu muutoksia ennen kaikkea skitsofreeniaa ja Alzheimerin tautia sairastavilla potilailla. Terveeseen verrokkiryhmään suhteutettuna skitsofreenikkopotilaiden aivonäytteissä havaittiin VSNL-1 ilmentymisen lisääntyneen interneuroneissa ja



vähentyneen pyramidaalisissa neuroneissa vasemman lohkon hippokampuksessa. Oikean puolen hippokampuksessa vastaavaa muutosta ei havaittu. (25)

Alzheimerin taudissa VSNL-1n ilmentyminen hippokampuksessa ja aivokuorella on muuttunut poikkeavan signaalivälityksen seurauksena ja samanlainen ilmiö voidaan havaita farmakologisella skitsofrenian hiirimallilla. (25)

VSNL-1:n tutkimus kehittyvässä munuaisessa on vielä alkutekijöissään, eikä edes VSNL-1 poistogeenistä hiirimallia ole olemassa. Kuitenkin vaikuttaa siltä, että VSNL-1 on GDNF:n aiheuttaman signalointiketjun merkittävimpiä molekyylejä, koska GDNF käsitellyissä metanefroksissa VSNL-1 ilmentymisen moninkertaistuu. (26)

Mitokondriaalinen ribosomaalinen proteiini L2 (MRPL) ja DIXD-2 ovat vielä sangen tuntemattomia. Niiden toiminnasta ei ole juurikaan tietoa.

### 3.0 Materiaalit ja menetelmät

Reagenssi	Käytetty lyhenne
Litiumkloridi	LiCl
Dithiotreitoli	DTT
Dietyylipyrokarbonaatti	DEPC
Paraformaldehydi	PFA
Fosfaattipuskuroitukeittosuolaliuos	PBS
Dulbecco PBS	PBS+ MgCl <sub>2</sub> +Ca <sup>2+</sup>
PBS + Tween	PBT
Natriumkloridi/natriumsitraatti –puskuri	SSC
Natriumdodekyylisulfaatti	SDS
Maleiinihappopuskuri	MAB
MAB+ 0,1 % Tween	MABT
Boehringer Mannheim Blocking Reagent	BBR
50% formamidi , 5 x SSC, pH 4,5 ja 1% SDS	Solution 1
0,7 ml MAB, 2% BBR, 1% lampaan seerumia	Solution 2
100 mM NaCl 100 mM Tris (pH 9.5) 50 mM MgCl <sub>2</sub> 0.1% Triton X-100 MilliQ vesi	NTMT

#### Koettimen syntetisointi

Koetin on etsityn geenin ilmentymispaikan osoittava vastin RNA -jakso. Koodaavasta DNA -juosteesta syntetisoidaan sitä vastaavaan mRNAhan kiinnittyvä eli hybridisoituva komplementaarinen RNA -juoste.

Koettimet valmistettiin sekoittamalla aluksi:

5× transkriptio puskuria (Promega)	4 µl
0.1M DTT	2 µl
Nukleotidien sekoitus (sisältää DIG leiman) (Boehringer Mannheim)	2 µl
linearisoitua plasmidia (1 µg/µl)	1 µl
RNAasi inhibiittoria (Promega)	0.5 µl
T7 tai T3 RNA polymeraasi	0,7 µl
DEPC H <sub>2</sub> O	9,8 µl

Seoksen annettiin inkuboitua 37 °C kahden tunnin ajan, jonka jälkeen otettiin näyte ja tarkastettiin koetin geelielektroforeesin avulla. Näytteeseen lisättiin RNAasi vapaata-DNAasi-entsyymiä ylimääräisen DNAn poistamiseksi ja liuosta inkuboitui 37 °C 15 min. Tämän jälkeen liuokseen lisättiin 300 µl etanolia, 100 µl DEPC H<sub>2</sub>O sekä 10 µl LiCl pelletin saostamiseksi. Näyte laitettiin -20 °C pakkaseen vähintään 30 min ajaksi. Tämän jälkeen näyte sentrifugoitiin 4 °C:ssa (Eppendorf 5415 R, 13200 rpm) 10 min ajan, jolloin syntetisoitu RNA tiivistyy näyteputken seinämään nk. pelletiksi. Pelletti pestiin 75% etanolilla sekä kuivumisen nopeuttamiseksi lopuksi 100% etanolilla. Pelletti liuotettiin 50% formamidi-liuokseen ja säilytettiin -20 °C pakastimessa.

#### Kudosnäytteiden valmistelu

Tutkimus toteutettiin ulkosiittoista NMRI -hiirikantaa käyttäen. Hiiriemoilta preparoitiin sikiöt päivänä 11 ja sikiöistä preparoitiin stereomikroskoopin alla Dulbecco-PBS -liuoksessa tarvittut kudokset eli tässä tapauksessa urogenitaaliharjanne. Näytteet poimittiin Nuclepore 0,1 µm polykarbonaattifiltterille (Whatman UK), ja niitä kasvatettiin ns. Trowell-tyyppisessä kudosviljelmässä. Tämän jälkeen kudokset käsiteltiin -20 °C metanolilla kudosten permiabiliteetin kasvattamiseksi. Lopuksi näytteet fiksoitiin 4% paraformaldehydissä (PFA) yön yli. Seuraavana päivänä näytteet käsiteltiin PBT:llä ja PBTllä laimennetulla, nousevalla metanolisarjalla (25%, 50%, 75% ja 2X 100%) 5 minuuttia/pesu. Metanolikäsitteilyn

tarkoituksena on poistaa kudoksista vesi sekä lisätä läpäisevyyttä. Tämä on välttämätöntä, koska kudoksenäytteitä säilytetään  $-20^{\circ}\text{C}$  pakastimissa ja jäätyessään vesi rikkoisi kudokset tehden ne käyttökelvottomiksi.

Näytteiden normaali vesipitoisuus palautettiin prehybridisaatiovaiheessa. Kaikkien seuraavien liuoksien puskurina on PBT.

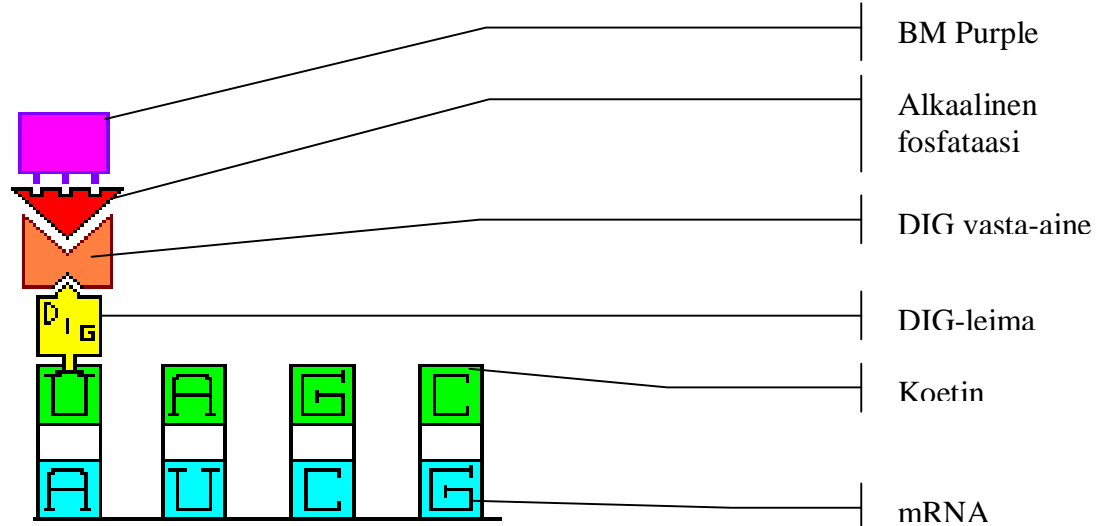
Näytteet käytetään samaisen metanolisarjan läpi päinvastaisessa järjestyksessä. Metanolijäämien poistamiseksi näytteet pestiin PBT:llä kahdesti, jonka jälkeen näytteet valkaistiin liuoksessa, jossa on 6 % vetyperoksidia. Tämän jälkeen näytteet pestiin kolmesti PBT:ssä, jonka jälkeen näytteet käsiteltiin 12 min ajan  $10\ \mu\text{g/ml}$  proteinaasi K liuoksella, joka hajottaa kudosten proteiinia ja parantaa koettimen läpäisevyyttä. Seuraavaksi näytteet käsiteltiin  $2\ \text{mg/ml}$  glysiini liuoksessa, jonka jälkeen näytteet pestiin jälleen kahdesti PBT:llä. Näytteet fiksoitiin uudelleen 4% PFA/0,2 % glutaraldehydi -liuoksella 20 minuutin ajan. Lopuksi ennen hybridisaatiota näytteet käsiteltiin prehybridisaatio liuoksella (50% formamidia, 5X SSC, 1% SDS,  $50\ \mu\text{g/ml}$  hiivan tRNA<sub>t</sub>,  $50\ \mu\text{g/ml}$  hepariinia). Prehybridisaatio aloitettiin laittamalla näytteet Eppendorf 2-ml "safe lock" -koeputkiin, jossa näytteitä pidetään  $65^{\circ}\text{C}$  lämpötilassa tunnin ajan. RNAhan hybridisoituva koetin lämmitettiin ensin  $80^{\circ}\text{C}$ , jonka jälkeen lämpötila laskettiin jäiden avulla lähelle  $0^{\circ}\text{C}$  ns. self-annealing -tapahtuman estämiseksi. Tämän jälkeen koetin laitettiin näytteiden sekaan  $1\ \mu\text{g/ml}$  vahvuisena liuoksena ja jätettiin  $70^{\circ}\text{C}$  lämpötilaan yön yli.

Hybridisaation jälkeen tehtävät pesut ja vastakappaleen inkubointi

Näytteitä pestiin nk. Solution 1:ssä, mikä sisältää 50% formamidia, 5 x SSC, pH 4,5 ja 1% SDS  $70^{\circ}\text{C}$  :ssa kolme kertaa 30 min, joista viimeisen pesun kohdalla lämpötilaa lasketaan  $65^{\circ}\text{C}$  :een. Tämän jälkeen näytteet pestiin kolmesti (3X 30min) solution 2:ssa (50% formamidi, 2x SSC, pH 4,5)  $65^{\circ}\text{C}$  lämpötilassa. Näiden jälkeen pesut jatkuivat maleiinihappopuskurissa (MAB), johon on lisätty 0,1% Tweeniä (MABT). Tämäkin pesu toistettiin kolmesti, kuitenkin sillä poikkeuksella edellisiin nähden, että aika on 5 min.

Seuraavaksi näytteet inkuboitiin MAB-puskurissa, johon lisättiin 10% lampaan seerumia ja 2% BBR - blokkusainetta. BBR ja MAB sulatettiin ja seerumi lisättiin

liuokseen. Liuoksen annettiin inkuboitua 1-3 tuntia huoneenlämmössä. Lopuksi liuos vaihdettiin Solution 2:en, mikä sisälsi 0,7 ml MAB, 2% BBR, 1% lampaan seerumia ja lopuksi itse koetin yhdistettynä DIG vasta-aineeseen-alkaliseen fosfataasiin ja siten että näiden suhde koko liuokseen on 1:2000. Liuos laitettiin jääkaappiin 4 °C yön yli.



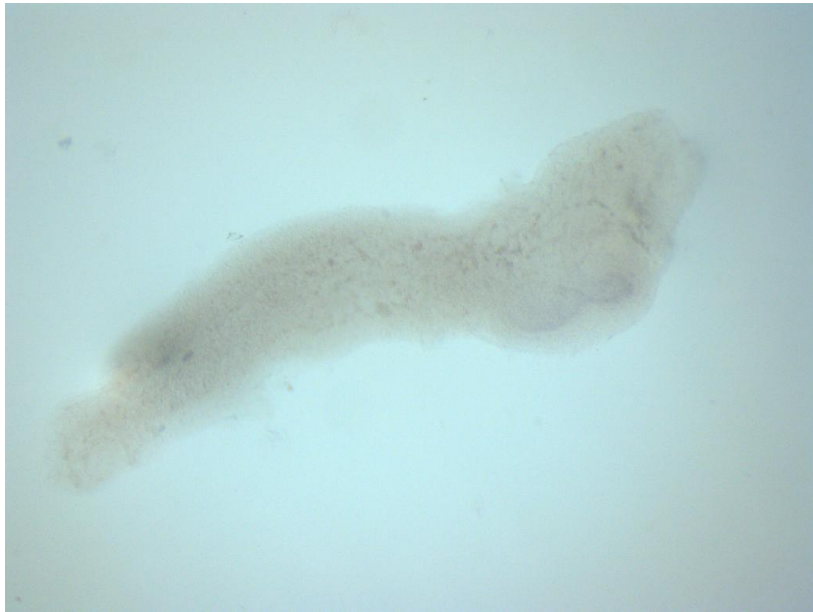
**Kuva 6. Lähetti RNAhan (mRNA) kiinnittyvän vastin-RNA koettimen urasiili on DIG-leimattu. Leimaan tarttuu vasta-aine, johon puolestaan on kiinnitetty alkaalinen fosfataasi, joka pilkkoo BM-purple -väriainetta. Pilkkoutumisen seurauksena syntynyttä sakkaa kertyy ilmentymiskohtiin.**

Koettimen lisäämisen jälkeen näytteitä pestiin ensin 3 X 5 min ja näiden jälkeen 5 X 1h 4 °C MABT -liuoksessa. Seuraavana päivänä näytteet pestiin kolmesti 10 min ajan NTMT- puskuriliuoksessa. Tämän jälkeen näytteet siirrettiin viljelymaljalle, ja maljoihin lisättiin BM Purplea 0,4 ml, joka toimii reaktion lopullisena substraattina, sekä 2mM levamisolea, joka estää soluissa esiintyvää luonnollista alkaalista fosfataasia. Viljelymalja laitettiin pimeään, koska reaktion substraattina toimiva BM purple hajoaa valon vaikutuksesta. Näytteitten värjäytyvyyttä tarkasteltiin säännöllisin väliajoin, ensimmäisen kerran 30 min jälkeen ja sen jälkeen noin tunnin välein. Mikäli hybridisaatio on onnistunut, värisakka muodostuu epäsuoran immunohistokemiallisen reaktion kautta (kuva 5.) mRNA-probe -hybridiin ja mikroskoopissa katsottuna näkyy selkeä geenin ilmentymisalueen vastaava kuvio. Kun sakkaa on muodostunut tarpeeksi ja ilmentyminen on kyllin selkeä, voidaan BM purple vaihtaa puskuriin (PBT). Seuraavana päivänä näytteet fiksoidaan 4% PFAlla. Lopuksi lisättiin näytemaljoihin glyserolia näytteiden läpinäkyvyyden parantamiseksi.

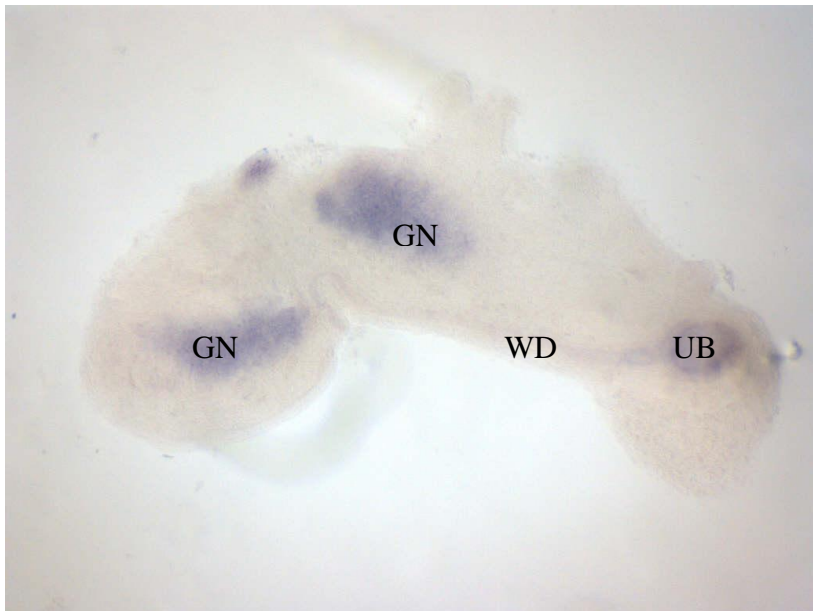
Näytteet irroitettiin filtteristä ja kuvattiin Leica LED 2000 stereomikroskoopin ja Colorview I digitaalikameran yhdistelmällä.

#### 4.0 Tulokset

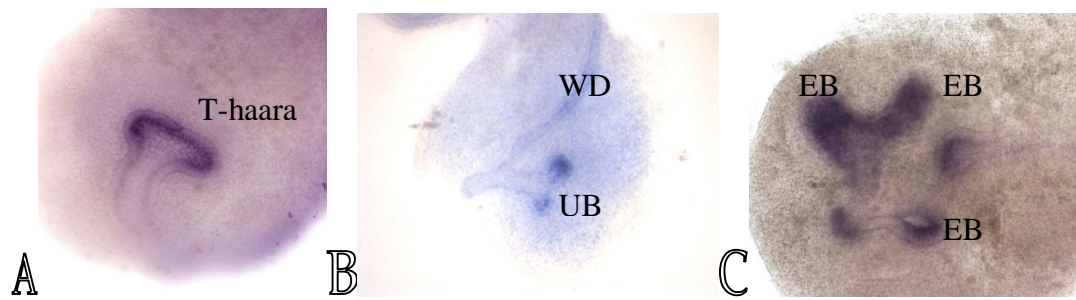
Tutkimukseni kohdistui viiteen geeniin (MRPL, dixed, cspg, plakofilin, ja vsn1). Geenien ilmentyminen havaitaan tummansinisena alueena urogenitaalialueella.



**Kuva 5. Villi tyyppi E11 hiiren urogenitaalialue, sense kontrolli. Suurennos 54X**



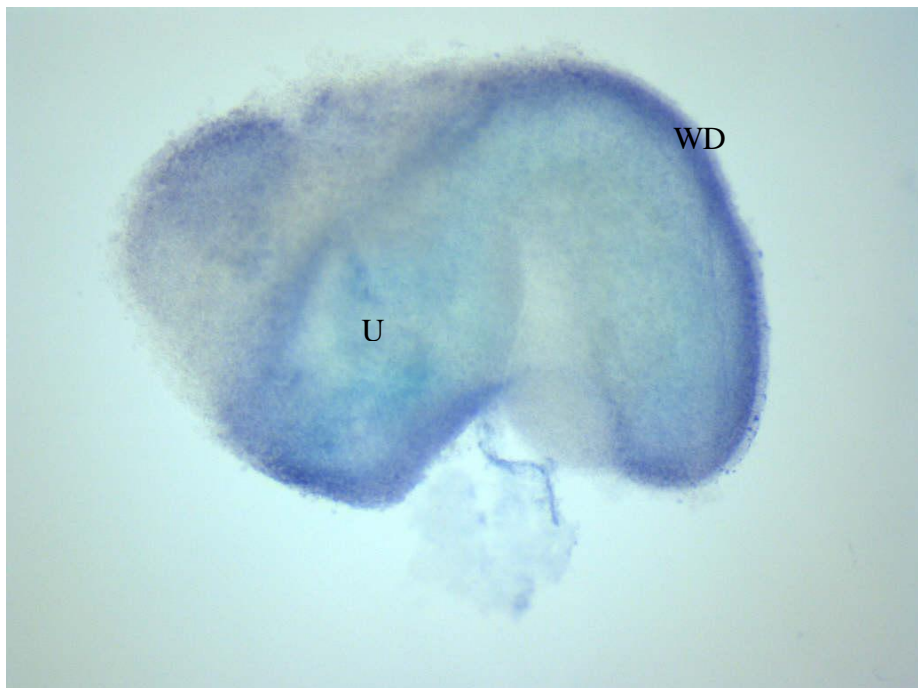
**Kuva 6. Plakofilin ilmentyminen urogenitaalialueella E11. Plakofiliini ilmentyy epiteelisolujen liitoksissa ja siten Wolffin tiehyt (WD) uretersilmuineen (UB) näkyy selvästi, samoin kehittyvät sukurauhaset (GN). Suurennos 54X.**



**Kuva 7A.** VSNL-1n ilmentyminen munuaissilmun haarautumisen nk. T-haara vaiheessa. Suurennos 240X

**Kuva 7B.** VSNL-1 ilmentyy Wolffin tiehyessä (WD), josta kasvaa uretersilmu (UB), joka jatkaa haarautumista metanefriseen mesenkyymiin. Suurennos 120X

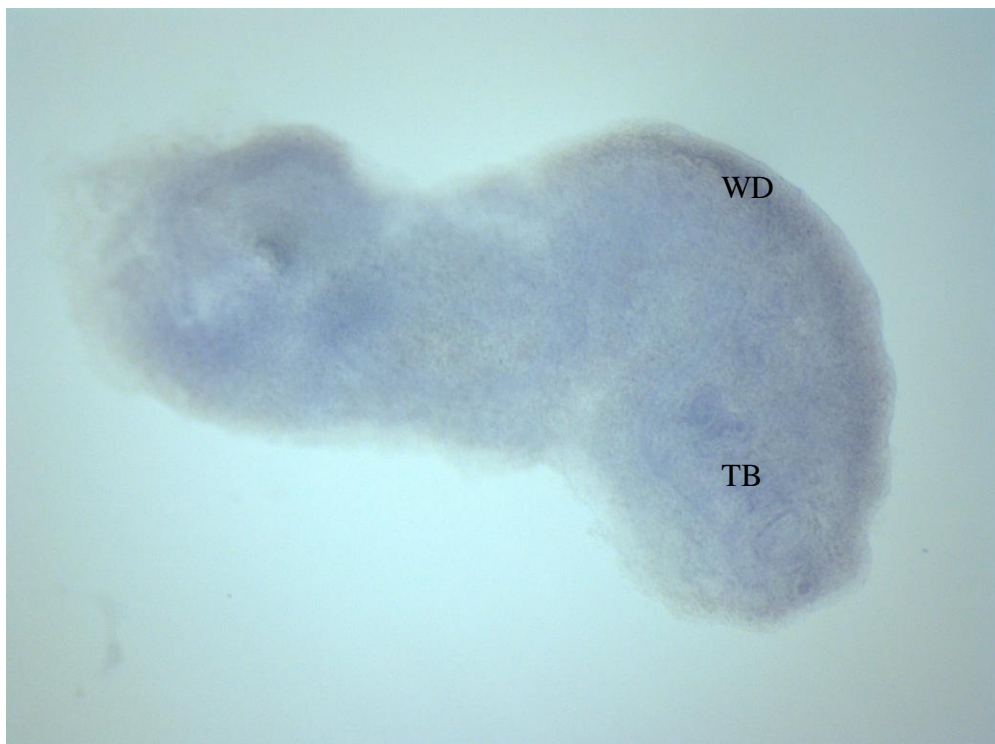
**Kuva 7C.** GDNF käsittely saa aikaan VSNL1 *in situ* hybridisoidussa metanefroksessa ylimääräisten (ektooppisten) munuaissilmujen (EB) muodostumisen. Suurennos 120X



**Kuva 8.** CSPG ilmentyy Wolffin tiehyessä(WD) sekä heikosti virtsanjohtimen (U) rakenteissa. E11 Suurennos 54X



**Kuva 9. Diced-2 ilmentyy heikosti koko urogenitaalialueella. Rakenteista erottuvat Wolffin tiehyt (WD), virtsanjohdin (U), sekä metanefroksen putkirakenteet (TB). E11 Suurennos 54X**



**Kuva 10. Mrpl ilmentyy heikosti mutta laaja-alaisesti. Wolffin tiehyen (WD) lisäksi alaosassa erottuu nefronien ja metanefristen tubulusten rakenteita (TB). E11 Suurennos 54X.**



## 5.0 Pohdinta

Tutkimuksessani analysoitiin viiden geenin ilmentymistä hiiren urogenitaali alueen kehityksen E11 vaiheessa. Edellä kuvatut tulokset osoittavat RNA *in-situ* – hybridisaation soveltuvan erinomaisesti ilmentymisen tutkimiseen. *In situ* – hybridisaatio on periaatteeltaan yksinkertainen ja helposti omaksuttavissa. Monipuolisena ja validina tutkimusmetodinä sitä voidaan käyttää kaikissa kudoksissa geeniekspression ilmentämiseen ja, kuten tässä tutkielmassa, aiemmin saatujen tulosten arvioimiseen.

Tulokset vahvistavat ja täsmentävät Jouni Kvistin pro gradu työn ”Munuaissilmun muodostukseen vaikuttavien geenien tutkiminen geenisiruilla.” tuloksia, jotka paljastivat ainoastaan GDNF:n indusoimat geenit. Kyseisessä kokeessa urogenitaali alueesta leikattiin pois osa Wolffin tiehyttä, joka käsiteltiin GDNF:llä 16 tunnin ajan. Tämän jälkeen tutkittiin geenisirulla ja Real Time PCR –menetelmää käyttäen mitkä geenit aktiivisuudessa oli tapahtunut muutoksia. Kokeen järjestely oli kuitenkin siinä määrin keinotekoinen että oli välttämätöntä saada selville missä em. geenit ilmentyvät luonnollisessa ja systeemisessä elinjärjestelmässä ilman ylimääräistä GDNF:n lisäystä. Tavoitteena oli saada yleiseen tietoon munuaisen geenien ilmentyminen eri kehityksen vaiheissa. Lisäksi munuainen toimii haaraautuvien sisäelinten koe- ja mallielimenä ja siten siitä saadun tiedon avulla voidaan saada uutta suuntaa myös muiden elinten tutkimukseen.

Oma tutkimukseni koski viittä GDNF:n säätelemää geeniä – loppujen 64 geenin osalta työ on edennyt jo pitkälle. Tutkimukseni luotettavuus on VSNL-1n, CSPGn ja plakofiliinin osalta on vähintäänkin hyvä, eikä tutkimuksen toistaminen toisi merkittävää hyötyä. Sen sijaan Dixed-2:n ja Mrpl:n osalta *in-situ*-hybridisaatio vaatii olosuhteiden optimointia. Näyttää kuitenkin siltä että Dixed-2:n sekä MRPL2:n merkitys munuaisen kehityksen kannalta on vähäinen.

Tutkimistani geneistä *VSNL-1* paljastui merkittävimmäksi geeniksi. Sen tutkimus on munuaisen kehityksen suhteen vielä alkutekijöissään, koska valtaosa molekyyliin kohdistuvasta tutkimuksesta painottuu sen keskushermostovaikutuksiin. Munuaisen

kehityksessä GDNF:n ja VSNL-1 toiminnan analogisuus on merkittävää (24) ja olisi mielenkiintoista tutkia, kuinka monen geenin ilmentymiseen VSNL-1 puolestaan vaikuttaa. Lisäksi VSNL-1  $\text{Ca}^{2+}$  sitovana ja säätelevänä molekyylinä on todennäköisesti tärkeä munuaisen kehityksessä, sillä mikäli  $\text{Ca}^{2+}$  -signaalivälitys estetään, ei minkäänlaista munuaista muodostu. (26)

VSNL1:n potentiaali terapeuttisessa käytössä on laaja. Tuumorisuppressorigeeninä sillä mahdollisesti voitaisiin pysäyttää tiettyjen karsinoomien eteneminen. Näin syöpäkasvain olisi vaarattomampi kantajalleen ja siten myös helpompi kohde muille hoidoille, kuten syöpäleikkauksille ja sädehoidolle. Erityisen mielenkiintoinen tutkimuskohde olisi mahdollinen VSNL1 ilmentymisen aivokasvainten yhteydessä. VSNL1:llä voitaisiin mahdollisesti hidastaa kasvaimen kasvua ympäröivään kudokseen. Mikäli kasvu saataisiin pysähtymään, potilas saisi lisää elinaikaa.

Toiseksi VSNL1:stä voitaisiin mahdollisesti käyttää neurologisten sairauksien kuten Parkinsonin ja Alzheimerin tautien hoidossa. Parkinsonin taudissa voitaisiin mahdollisesti jatkaa GDNF:n tutkimuksen viitoittamalla polulla. Mikäli VSNL1:llä on samat vaikutukset tehonsa menettäneisiin substantia nigra dopaminergisiin neuroneihin kuin GDNF:llä, VSNL1 toisi astetta täsmällisemmän vaikutuksen, eli säädeltyjen geenien määrä olisi hieman pienempi. Lisäksi täsmällisempi vaikutus on myös turvallisempi, sillä sivuvaikutuksia olisi oletettavasti vähemmän.

Alzheimerintaudin taudin hoidossa VSNL1:n käyttö rajoittuisi ennaltaehkäisyyn ja taudin puhkeamisvaiheen hoitoon, koska Alzheimerin taudin myöhemmän vaiheen oireet, kuten huonomuistisuus ja kognitiiviset muutokset, johtuvat  $\beta$ -amyloidiplakeista, jotka ovat jotka näkyvät aivokudoksen selkeinä mikro- ja makrotason muutoksina. VSNL1 -pohjaisella hoitomuodolla voitaisiin siten estää ja hidastaa taudin etenemistä. Parantavaa hoitoa on tuskin mahdollistakaan kehittää.

Kolmanneksi VSNL1:n käytön mahdollisuutena voidaan pitää psyykkisten sairauksien, etenkin vaikeahoitoisten psykoosien hoidossa. Tämän kaltaisen terapian kehittäminen ei ole vielä ajankohtaista, koska molekyylibiologian ja kliinisen psykiatrian yhteistyö ottaa vasta ensiaskeleitaan. Antamalla potilaiden aivokudokseen

täsmällisesti kasvutekijää, korjattaisiin sairauden syitä, eikä seurauksia, kuten nykyisillä antipsykoosilääkkeillä. Näin ollen luotaisiin kokonaan uudenlainen terapiaratkaisu, jossa hoidettaisiin ongelmaa solutasolla, nykyisen välittäjäaineiden määrään perustuvan terapian rinnalle. Tutkimuksen järjestäminen olisi kuitenkin äärimmäisen hankalaa; mahdollisen alentuneen oikeustoimikelpoisuuden vuoksi tieteelliseen tutkimukseen tarvittava potilaan tietoisesta suostumuksesta arvo olisi vähintäänkin kyseenalainen ja yleisestikin tutkimus olisi eettisesti vaativa.

Tutkimuksen aikana merkittäviä vaikeuksia ei esiintynyt, sen sijaan kirjoittamisvaihe opintojen sekä väitöskirjatutkimuksen ohessa tehtynä venyi tarpeettoman pitkäksi.

## Kiitokset

Lopuksi haluan kiittää tutkielman ohjaajiani, dosentti Kirsi Sainiota ammattitaitoisesta ja tarkasta ohjauksesta ja opastuksesta tieteellisen kirjoittamisen saralla sekä professori Hannu Sariolaa alkuperäisestä ideasta sekä kieliasun tarkastamisesta. Erityismaininnat kuuluvat ennen kaikkea työn ohjaajaani FT Satu Kuurelle, jonka alaisuudessa tein tarvittavan laboratoriotyön, Agnes Viherälle, joka opetti ”laboratoriokäsityön”, sekä Roxana Olalle, jonka kokemus *in situ* –hybridisaatioiden tekemisessä oli suureksi avuksi. Tutkimus on luonteeltaan joukkuelaji joten kiitos kuuluu myös yleisesti koko kehitysbiologian osaston väelle.

## Lähdeluettelo

(1) Jouni Kvist. Munuaissilmun muodostukseen vaikuttavien geenien tutkiminen geenisiruilla. Pro gradu. 2005 Oulun Yliopisto

(2) Mauch TJ. Yang G. Wright M. Smith D. Schoenwolf GC. Signals from trunk paraxial mesoderm induce pronephros formation in chick intermediate mesoderm. *Developmental Biology*. 220(1):62-75, 2000.

(3) Torres M. Gomez-Pardo E. Dressler GR. Gruss P. Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development*. 121(12):4057-65, 1995.

(4) Stark K. Vainio S. Vassileva G. McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature*. 372(6507):679-83, 1994

(5) Cunha GR. Chung LW. Shannon JM. Taguchi O. Fujii H. Hormone-induced morphogenesis and growth: role of mesenchymal-epithelial interactions. [Review] *Recent Progress in Hormone Research*. 39:559-98, 1983.

(6) Durand C. Dzierzak E. Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica*. 90(1):100-8, 2005.

(7) Sainio K. Hellstedt P. Kreidberg JA. Saxen L. Sariola H. Differential regulation of two sets of mesonephric tubules by WT-1. *Development*. 124(7):1293-9, 1997

(8) George KM. Leonard MW. Roth ME. Liew KH. Kioussis D. Grosveld F. Engel JD. Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development*. 120(9):2673-86, 1994.

(9) Hsieh-Li, H. M., Witte, D. P., Weinstein, M., Branford, W., Li, H., Kersten, S., Potter, S. S. Hoxa11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development* 121(10) : 1373-1385, 1995

- (10) Davis AP. Witte DP. Hsieh-Li HM. Potter SS. Capecchi MR. Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature*. 375(6534):791-5, 1995.
- (11) Vainio S. Heikkila M. Kispert A. Chin N. McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*. 397(6718):405-9, 1999.
- (12) Sariola H. Frilander M. Heino T. Jernvall J. Partanen J. Sainio K. Salminen M. Thesleff I. *Kehitysbiologia Solusta yksilöksi*. Käsikirja. Duodecim kustannus 2003.
- (13) Shawlot W. Behringer RR. Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature*. 374(6521):425-30, 1995.
- (14) Abdelhak S. Kalatzis V. Heilig R. Compain S. Samson D. Vincent C. Weil D. Cruaud C. Sahly I. Leibovici M. Bitner-Glindzicz M. Francis M. Lacombe D. Vigneron J. Charachon R. Boven K. Bedbeder P. Van Regemorter N. Weissenbach J. Petit C. A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nature Genetics*. 15(2):157-64, 1997.
- (15) Hohenstein P. Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, *WT1*. *Human Molecular Genetics*. 15 Spec No 2:R196-201, 2006.
- (16) Gubler, M., Jeanpierre, C., *Wt1-Associated Disorders*. Käsikirja *The Kidney*, toim Vize, P. D., Woolf, A., Bard, J.B., 395-409 Kustantaja Associated Press 2003.
- (17) Davies, J., *Development of the Ureteric Bud*. Käsikirja *The Kidney*, toim Vize, P. D., Woolf, A., Bard, J.B., 165- 179 Kustantaja Associated Press 2003.
- (18) Sariola H. Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *Journal of Cell Science*. 116(Pt 19):3855-62, 2003
- (19) Peterson S. Bogenmann E. The RET and TRKA pathways collaborate to regulate neuroblastoma differentiation. *Oncogene*. 23(1):213-25, 2004 Jan 8.

- (20) Steer DL. Shah MM. Bush KT. Stuart RO. Sampogna RV. Meyer TN. Schwesinger C. Bai X. Esko JD. Nigam SK. Regulation of ureteric bud branching morphogenesis by sulfated proteoglycans in the developing kidney. *Developmental Biology*. 272(2):310-27, 2004.
- (21) McGrath JA. Inherited disorders of desmosomes. *Australasian Journal of Dermatology*. 46(4):221-9, 2005.
- (22) Wickborn C. Klein-Szanto AJ. Schlag PM. Braunewell KH. Correlation of visinin-like-protein-1 expression with clinicopathological features in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Molecular Carcinogenesis*. 45(8):572-81, 2006.
- (23) Dai FF. Zhang Y. Kang Y. Wang Q. Gaisano HY. Braunewell KH. Chan CB. Wheeler MB. The neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor protein visinin-like protein-1 is expressed in pancreatic islets and regulates insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 281(31):21942-53, 2006
- (24). Mathisen PM. Johnson JM. Kawczak JA. Tuohy VK. Visinin-like protein (VILIP) is a neuron-specific calcium-dependent double-stranded RNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. 274(44):31571-6, 1999.
- (25) Bernstein HG. Becker A. Keilhoff G. Spilker C. Gorczyca WA. Braunewell KH. Grecksch G. Brain region-specific changes in the expression of calcium sensor proteins after repeated applications of ketamine to rats. *Neuroscience Letters*. 339(2):95-8, 2003 Mar 20.
- (26) Sainio, K. Julkaisematon tieto

Kuvien käyttöön saatu lupa.