

Maria Kurkela

Sileälihassolujen tutkimus suomalaisessa gelsoliiniamyloidoosissa

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Laboratorioanalyttikko (AMK)
Laboratorioalan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
21.5.2015

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Maria Kurkela Sileälihassolujen tutkimus suomalaisessa gelsoliiniamyloidoosissa 19 sivua 21.5.2015
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaajat	tutkija (FM) Susanna Koskelainen lehtori Tiina Soininen
<p>Suomalainen gelsoliiniamyloidoosi on suomalaiseen tautiperintöön kuuluva sairaus, jonka kuvasi ensimmäisenä silmälääkäri Jouko Meretoja vuonna 1969. Autosomissa vallitsevasti periytyvän sairauden tyypillisimmät oireet ovat sarveiskalvon verkkomainen rappeuma, hitaasti etenevä kasvohermohalvaus ja ihon ennenaikainen löystyminen. Lisäksi esiintyy muun muassa sydän- ja munuaisoireita.</p> <p>Suomalainen gelsoliiniamyloidoosi johtuu pistemutaatiosta gelsoliinia koodaavassa geenissä. Gelsoliini on aktiinia muokkaava proteiini, josta on olemassa solunsisäinen ja solunulkoinen muoto. Kumpaakin muotoa koodaa sama geeni. Geenimutaation vuoksi gelsoliini pilkkoutuu väärin, jonka seurauksena muodostuu amyloidogeenisiä fragmentteja, joista polymerisoituu liukenematonta amyloidia. Amyloidia kertyy eri kudoksiin, erityisesti verisuonten seinämiin ja solujen tyvikalvoihin. Vain solunulkoisen gelsoliinin on havaittu muodostavan amyloidogeenisiä fragmentteja.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston kliinisen proteiiniKemian yksikössä Meilahdessa. Työn tarkoituksena oli selvittää sileän lihaksen α-aktiinin vasta-ainetta käyttäen, löytyisikö gelsoliiniamyloidoosia sairastavien ja kontrollina toimineiden terveiden ihmisten verisuoninäytteistä eristetyistä sileälihassoluista ja kudokseteistä eroja. Sileälihassolujen on havaittu tuottavan runsaasti solunsisäistä gelsoliinia. Työssä käytettyjä menetelmiä olivat western blot, solujen vasta-ainevärijäys ja verisuonileikkeiden immunohistologinen värijäys.</p> <p>Western blot –menetelmällä karakterisoitiin tutkittavat solut eli tarkistettiin, että tutkittavat solut olivat sileälihassoluja eikä fibroblasteja, jotka voivat helposti kontaminoida primäärisolukasvatuksen. Solujen vasta-ainevärijäyksellä saatiin esiin sileälihassolujen aktiininirangat, joissa ei kuitenkaan havaittu eroja potilas- ja kontrollisolujen välillä. Verisuonileikkeiden immunohistologisella värijäyksellä saatiin näkyviin seinämän keskikerros, joka koostuu pääosin sileälihassoluista. Sileälihassolujen havaittiin olevan epäjärjestyksessä potilaan verisuonen seinämässä, mikä kertoi seinämän rakenteen hajoamisesta. Sileälihassolujen määrissä seinämän keskikerroksessa potilaan ja kontrollin välillä ei huomattu olevan eroa.</p>	
Avainsanat	suomalainen gelsoliiniamyloidoosi, sileälihassolu, aktiini, vasta-aine

Author Title	Maria Kurkela Study of smooth muscle cells in Finnish gelsolin amyloidosis
Number of Pages Date	19 pages 21 May 2015
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Susanna Koskelainen, Research Scientist (MSc) Tiina Soininen, Principal Lecturer
<p>Finnish gelsolin amyloidosis belongs to the Finnish disease heritage, and it was discovered by ophthalmologist Jouko Meretoja in 1969. The disease is autosomally dominantly inherited. The main symptoms are corneal lattice dystrophy, slowly progressive cranial neuropathy and abnormal skin laxity. Cardiac and renal abnormalities may occur among other symptoms.</p> <p>Finnish gelsolin amyloidosis is caused by a single base mutation in a gelsolin gene. Gelsolin is an actin-modulating protein, which is expressed in an intracellular and an extracellular form. Both of the forms are encoded by a single gene. Due to the mutation, gelsolin misfolds, which leads to the formation of amyloidogenic fragments and eventually to amyloid. Amyloid accumulates in different organs, especially in blood vessel walls and in cellular basement membranes. The extracellular gelsolin solely forms amyloidogenic fragments.</p> <p>This thesis was carried out at Meilahti Clinical Proteomics Core Facility of the University of Helsinki. The purpose of this thesis was to study smooth muscle cells and tissue sections of gelsolin amyloidosis patients and healthy controls to find differences between them. The samples were isolated from blood vessel samples. It has been observed that smooth muscle cells produce high amounts of intracellular gelsolin. The methods used in this thesis were Western blot, immunostaining of the cells and immunohistological staining of blood vessel sections. The same primary antibody, anti-α smooth muscle actin, was used in all methods.</p> <p>The Western blot method was used to characterize the studied cells to verify that the cells were smooth muscle cells instead of fibroblasts. Fibroblasts can easily contaminate primary cell culture. By immunostaining of the smooth muscle cells, it was possible to study actin cytoskeletons of the cells. No differences were observed between the patient cells and control cells. The blood vessel wall was analysed with immunohistological staining. The middle layer consists mainly of smooth muscle cells. It was noticed that the smooth muscle cells in the blood vessel wall of the patient were disoriented. The number of the smooth muscle cells in the middle layer of the blood vessel wall was approximately the same between patients and controls.</p>	
Keywords	Finnish gelsolin amyloidosis, smooth muscle cell, actin, antibody

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Suomalainen gelsoliiniamyloidoosi	2
2.2	Gelsoliini	4
2.3	Valtimoverisuoni ja sileälihassolut	6
2.4	Aktiini	7
3	Työn tarkoitus	8
4	Materiaalit ja menetelmät	9
4.1	Materiaalit	9
4.2	Primaarinen vasta-aine	9
4.3	Soluviljelymenetelmät	9
4.4	Solujen vasta-ainevärijäys	11
4.5	Western blot	11
4.6	Immunovärijäys avidiini-biotiinikompleksi- eli ABC-menetelmällä	12
5	Tulokset ja tulosten tarkastelu	14
6	Yhteenveto	17
	Lähteet	18

Lyhenteet

ABC	avidiini-biotiinikompleksi (avidin-biotin complex)
anti- α -SMA	sileän lihaksen α -aktiinin vasta-aine (anti- α -smooth muscle actin)
BSA	naudan seerumin albumiini (bovine serum albumin)
DAB	3,3'-diaminobentsidiini
DAPI	4',6-diamidino-2-fenyyli-indoli
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetyylisulfoksidi
FBS	naudan sikiön seerumi (fetal bovine serum)
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos (phosphate buffered saline)
PBST	fosfaattipuskuroitu suolaliuos, jossa 0,1 % Tween-20
PFA	paraformaldehydi
SDS	natriumdodekyylisulfaatti (sodium dodecyl sulfate)
SMC	sileälihassolu (smooth muscle cell)

1 Johdanto

Amyloidoosilla eli amyloiditautilla tarkoitetaan elimistön tilaa, jossa kudoksiin ja elimiin kertyy proteiinista tai sen osista peräisin olevaa liukenematonta materiaalia eli amyloidia. Sitä voi muodostua esimerkiksi siten, että proteiini laskostuu väärin geenimutaation seurauksena ja pilkotaan virheellisesti, jolloin syntyy amyloidifragmentteja ja edelleen amyloidia. Amyloidia voi kertyä paikallisesti vain tiettyyn kohtaan elimistöä tai useisiin eri kudoksiin, jolloin kyseessä on systeeminen amyloidoosi. (Pettersson ym. 1999.)

Amyloiditaudeista tunnetuin on varmaankin Alzheimerin tauti. Siinä aivoihin hermosolujen ulkopuolelle muodostuu amyloidiplakkeja, jotka vaurioittavat soluja vaikeuttaen tiedonkäsittelyä ja heikentäen muistia. (Juva 2013.) Muita yleisiä amyloidooseja ovat kroonisiin tulehduksellisiin sairauksiin liittyvä reaktiivinen amyloidoosi (AA-amyloidoosi), kevytketjuamyloidoosi eli AL-amyloidoosi ja seniili ATTR-amyloidoosi. (Pettersson ym. 1999; Salonen 2013.)

Harvinaisempia amyloiditauhteja ovat perinnölliset amyloidoosit, kuten suomalainen gelsoliiniamyloidoosi. Se on autosomissa vallitsevasti periytyvä sairaus, jossa geenimutaation seurauksena väärin pilkkoutuneesta gelsoliiniproteiinista peräisin olevat amyloidogeeniset fragmentit kertyvät amyloidina elimistön eri kudoksiin. Silmän sarveiskalvon verkkomainen rappeuma, hitaasti etenevä kasvohermoalvaus ja ihon poikkeava löystyminen eli cutis laxa ovat taudille tyypillisimpiä oireita. Tautiin ei ole spesifistä hoitoa. (Kiuru-Enari & Haltia 2013.)

Tässä opinnäytetyössä oli tarkoituksena tutkia suomalaista gelsoliiniamyloidoosia sairastavien ja kontrollina toimineiden terveiden ihmisten verisuoninäytteistä eristettyjä sileälihassoluja ja kudoksetäydä mahdollisten erojen löytämiseksi. Työssä käytettyjä menetelmiä olivat western blot, solujen vasta-ainevärjäys ja verisuonileikkeiden immunohistologinen värjäys. Kaikissa menetelmissä käytettiin samaa primaarista, sileän lihaksen α -aktiinin vasta-ainetta.

2 Teoria

2.1 Suomalainen gelsoliiniamyloidoosi

Suomalaiseen tautiperintöön kuuluvan gelsoliiniamyloidoosin kuvasi ensimmäisenä silmälääkäri Jouko Meretoja vuonna 1969 (Meretoja 1969). Meretojan tautinakin tunnettu sairaus periytyy autosomissa dominantisti, jolloin toisen vanhemmista ollessa sairas puolet lapsista perii taudin. Taudin penetranssi eli ilmenemisyleisyys on 100 %, eli kaikilla taudin puhkeamisiän ylittäneillä tautimutaation kantajilla esiintyy oireita. Taudinkantajia arvellaan Suomessa olevan lähes tuhat. (Meretoja 1976; Kiuru-Enari & Haltia 2010.)

Meretojan (1976) tutkimuksen mukaan suuri osa suvuista, joissa amyloidoosia esiintyy, on lähtöisin Etelä-Hämeen Lammilta tai Kymenlaaksosta. Erityisen monen amyloidipotilaan juuret ovat Kymenlaakson Valkealassa. Vaikka tauti löydettiin ja sitä on raportoitu eniten Suomessa, sitä esiintyy myös muualla Euroopassa, Aasiassa sekä Pohjois- ja Etelä-Amerikassa (Kiuru-Enari & Haltia 2010).

Gelsoliiniamyloidoosi ilmenee verkkomaisena sarveiskalvorappeumana, hitaasti etenevänä kasvohermohalvauksena ja ihon poikkeavana löystymisenä (cutis laxa). Ensimmäisenä havaitaan yleensä sarveiskalvorappeuma silmän biomikroskooppikuvauksessa. Sarveiskalvon verkkomaisessa rappeumassa sarveiskalvon stroomaan kertyy amyloidia juoviksi muodostaen verkkomaisen kuvion. Amyloidijuovia löytyy etenkin sarveiskalvon reunaosista. (Meretoja, 1971; Kiuru-Enari & Haltia 2013.)

Sarveiskalvorappeuma alkaa yleensä 25–30 vuoden iässä, mutta siihen liittyviä sarveiskalvon haavaumia esiintyy tavallisesti vasta yli 40-vuotiailla. Yleisiä oireita ovat silmien kuivuminen, valonarkuus ja ärtyminen. Muita oireita ovat sarveiskalvon eroosiot ja toistuvat tulehdukset. Sarveiskalvorappeuma voi aiheuttaa näkökyvyn pysyvän heikkenemisen tai jopa sokeutumisen. Rappeumaan saattaa liittyä myös muita silmätauteja, kuten avokulmaglaukoomaa ja kaihia. (Meretoja, 1971; Kiuru-Enari & Haltia 2013.)

Gelsoliiniamyloidoosi aiheuttaa useita neurologisia oireita, joista tyypillisin on aivohermojen, etenkin kasvohermon, neuropatia. Neuropatia alkaa noin 30–40-vuotiaana ja se etenee hitaasti johtaen kasvohermohalvaukseen. Halvaus voi alkaa toispuoleisena, mutta kehittyä yleensä molemminpuoliseksi. Potilailla saattaa esiintyä esimerkiksi kasvoilla tuntohäiriöitä ja lihasten nykimistä sekä kuulon alenemista. Vanhemmiten voi esiintyä nielemisvaikeuksia ja syljen valumista. Gelsoliiniamyloidoosi vaikuttaa myös ääreishermostoon aiheuttamalla potilaille muun muassa käsien ja jalkojen kärkiosien tuntohäiriöitä, refleksien heikentymistä ja lihasheikkoutta. Ääreishermoston toimintahäiriöt ovat kuitenkin usein lieviä. (Kiuru-Enari & Haltia 2010; Kiuru-Enari & Haltia 2013.)

Ihon poikkeava löystyminen eli cutis laxa on tyypillinen gelsoliiniamyloidoosin aiheuttama oire, joka aikaansaa kasvonpiirteiden ennenaikaisen vanhenemisen. Yhdessä kasvohermohalvauksen kanssa cutis laxa aiheuttaa gelsoliiniamyloidoosi-potilaille tyypilliset kasvojen roikkuvat piirteet (kuva 1). Yli 40-vuotiailla potilailla iho on poikkeavan löysää usein päänahan ja otsan alueella, vanhemmilla myös muualla kasvoissa, käsissä ja selässä (kuva 1). Iho on kuiva ja kutiava ja mustelmia saattaa tulla helposti. Cutis laxa rajoittaa kasvonilmeitä ja näkökenttää sekä haittaa suun käyttöä mukaan lukien puhumista. (Kiuru-Enari ym. 2005; Kiuru-Enari & Haltia 2013.)



Kuva 1. Cutis laxa eli ihon poikkeava löystyminen on gelsoliiniamyloidoosin tyypillinen oire, joka aiheuttaa potilaalle kasvojen roikkuvat piirteet (vasemmanpuoleinen kuva). Iho on hyvin löystynyttä myös muun muassa selässä (oikeanpuoleinen kuva). Sari Kiuru-Enarin ottamat kuvat julkaistu potilaan luvalla (Kiuru-Enari ym. 2005).

Edellä mainittujen oireiden lisäksi gelsoliiniamyloidoosi voi aiheuttaa sydän- ja munuaisoireita. Keski-ikäisillä potilailla sydänongelmia esiintyy harvemmin kuin ikääntyneillä. Munuaisoireet ovat heterotsygoottisilla geenivirheen kantajilla (eli ovat perineet geenivirheen vain toiselta vanhemmalta) yleensä lieviä. Homotsygooteilla kantajilla niin munuais- kuin muutkin oireet ovat yleensä vaikea-asteisia. Heillä tauti saattaa alkaa jo teini-ikässä ja johtaa kuolemaan alle 30-vuotiaana. (Kiuru-Enari & Haltia 2010.)

Suomalaiseen gelsoliiniamyloidoosiin ei ole olemassa spesifistä hoitoa. Vaivoja voidaan kuitenkin helpottaa oireenmukaisilla hoidoilla. Etenkin silmäoireiden säännöllinen hoitaminen parantaa potilaan elämänlaatua merkittävästi. (Kiuru-Enari & Haltia 2013.)

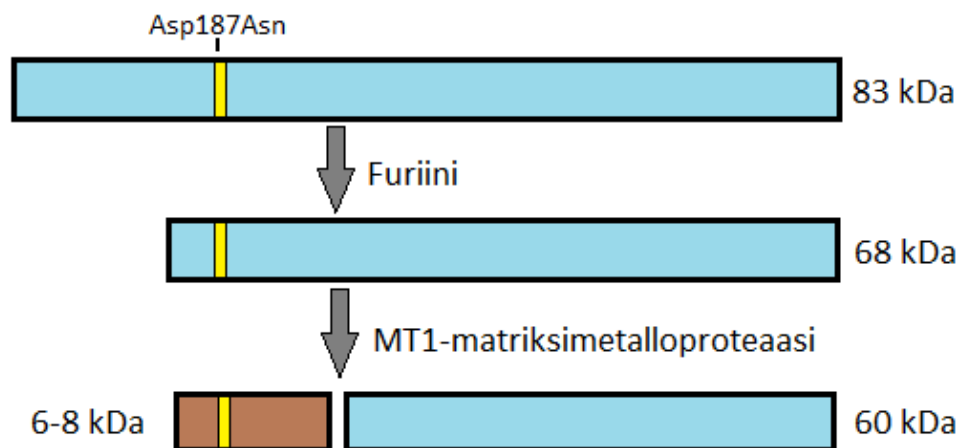
2.2 Gelsoliini

Gelsoliini on aktiiniin sitoutuva ja sitä pilkkova proteiini, jota esiintyy useimmissa ihmisen kudoksissa. Siitä on olemassa kahta erilaista muotoa; solunsisäinen, joka on kooltaan 80 kDa, sekä solun ulkopuolelle erittyvä muoto eli plasmagelsoliini (kooltaan 83 kDa). Sama kromosomissa 9 sijaitseva geeni koodaa kumpaakin muotoa. (Yin & Stos- sel 1979; Yin ym. 1984; Kwiatkowski ym. 1986; Kwiatkowski ym. 1988.)

Solunsisäinen gelsoliini vaikuttaa toiminnallaan solun rakenteeseen ja liikkumiseen. Se sitoutuu aktiiniin pilkkoen sen kahtia. Samalla gelsoliini muodostaa aktiinifilamentin plus-päähän cap-rakenteen eli tulpan, jolloin uudet aktiinimonomeerit eivät voi liittyä filamenttiin. Gelsoliinin sitoutuminen aktiiniin on Ca^{2+} -ionien ja pH:n säätelemää. Fosfoinositidien vaikutuksesta se taas irtoaa aktiinista, jonka jälkeen aktiinifilamentti voi jälleen polymerisoitua. Plasmagelsoliini toimii samoin, mutta se pilkkoo verenkiertoon solukuoleman tai kudonvaurion vuoksi vapautunutta aktiinia. (Kwiatkowski 1999; Dominguez & Holmes 2011.)

Gelsoliini muodostuu kuudesta keskenään homologisesta domeenista. Inaktiivisissa oloissa, eli kun kalsiumia ei ole läsnä, se muodostaa tiiviin rakenteen, jolloin aktiinia sitovat osat ovat piilossa. Gelsoliinin kanssa samaan proteiiniperheeseen kuuluvat ad-severiini, adseveriini (D5), capG, flightless, villiini, advilliini ja supervilliini. (Kwiatkowski 1999; Dominguez & Holmes 2011.)

Meretojan taudissa gelsoliinia koodaavassa geenissä olevan pistemutaation seurauksena nukleotidi 654 on vaihtunut guaniinista adeniiniksi. Tämä aiheuttaa muutoksen proteiinin primäärirakenteessa, jossa asparagiinihappo (aminohappo 187) vaihtuu asparagiiniksi. Vaihduksesta johtuen Arg172:n ja Ala173:n välinen tavallisesti piilossa oleva peptidisidos paljastuu furiiniproteaasille trans-Golgi-verkostossa. Tätä kutsutaan α -gelsolinaasivaiheeksi, josta alkaa gelsoliinin poikkeava pilkkoutuminen (kuva 2). Sen tuloksena potilaiden plasmasta löytyy 68 kDa:n gelsoliinifragmentteja normaalin gelsoliinin lisäksi. β -gelsolinaasivaiheessa MT1-matriksimetalloproteaasi pilkkoo 68 kDa:n gelsoliinifragmentteja 60 kDa:n ja 6-8 kDa:n kokoisiksi fragmenteiksi. Näistä pienistä fragmenteista polymerisoituu liukenematonta amyloidia, jota kertyy kudoksiin. Geenimutaatio on sama sekä solunsisäisessä että -ulkoisessa gelsoliinissa, mutta vain solunulkoisen gelsoliinin on havaittu muodostavan amyloidogeenisiä fragmentteja. Suomalaisessa gelsoliiniamyloidoosissa amyloidia kerääntyy erityisesti verisuonten seinämiin ja solujen tyvikalvoihin. (Maury ym. 1991; Kangas ym. 1996; Kiuru-Enari & Haltia 2010.)

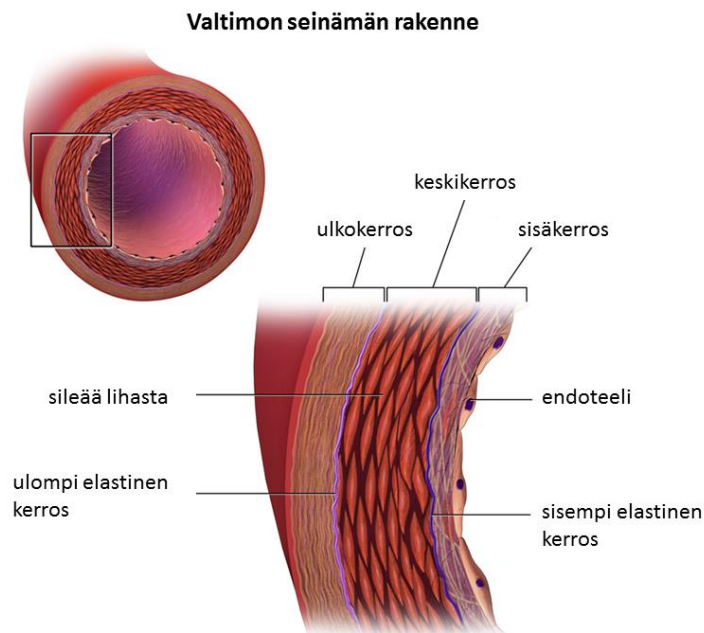


Kuva 2. Gelsoliiniproteiinin poikkeava pilkkoutuminen. Geenimutaation vuoksi Arg172:n ja Ala173:n välinen peptidisidos paljastuu furiinin pilkkottavaksi, jolloin muodostuu 68 kDa:n gelsoliinifragmentti. Syntynyt fragmentti pilkkoutuu edelleen MT1-matriksimetalloproteaasin vaikutuksesta. Tuloksena on 60 kDa:n kokoinen gelsoliinifragmentti sekä 6 tai 8 kDa:n amyloidogeeninen fragmentti. Amyloidogeeninen fragmentti on kuvattu ruskealla ja mutaatikohta keltaisella.

2.3 Valtimoverisuoni ja sileälihassolut

Verenkierron tehtävänä on huolehtia ravintoaineiden, kuten hapen ja glukoosin viemisestä kudoksiin sekä tuoda pois kuona-aineita kuten hiilidioksidia. Veri kulkee elimistössä verisuonistoa pitkin. Valtimot kuljettavat verta sydäimestä poispäin. Ne haaroittuvat pienemmiksi valtimoiksi ja kudoksissa edelleen hiussuoniksi. Ravinto- ja kuona-aineiden vaihto veren ja kudosten välillä tapahtuu hiussuonistossa. Sieltä veri palautuu laskimoiden kautta takaisin sydämeen. (Nienstedt ym. 1999: 184–185.)

Hiussuonen seinämä muodostuu levyepiteelisolukerroksesta eli endoteelista ja sidekudoksisesta tyvikalvosta. Muissa verisuonissa (laskimot ja valtimot) seinämän sisäkerros eli *tunica intima* muodostuu endoteelista ja sidekudoksesta. Keskimmäinen kerros, *tunica media*, on enimmäkseen sileälihaskudosta. Ulkokerros eli *tunica adventitia* on kollageenisäikeistä sidekudosta. Vaikka valtimoiden ja laskimoiden seinämät ovat rakenteeltaan samanlaisia, ne eroavat seinämän paksuudessa. Valtimon seinämä on paksumpi ja kerrokset erottuvat selvästi poikkileikkauksesta (kuva 3). (Nienstedt ym. 1999: 201–202.)



Kuva 3. Valtimoverisuonen seinämän rakenne. Kuvassa näkyy sileälihassolujen sijoittuminen seinämän keskikerroksessa. (Blausen gallery 2014.)

Valtimoverisuonen seinämän paksuin kerros on sileästä lihaksesta koostuva *tunica media*. Sileää lihasta löytyy tyypillisesti putkimaisten ja pussimaisten elinten seinämistä, verisuonten lisäksi muun muassa hengitysteistä ja ruuansulatuskanavasta. Sileälihassolut ovat pieniä ja sukkulamaisia yksitumaisia soluja. Tyypillisen solun pituus on 0,02-0,5 mm ja paksuus 3-10 μm . Sileälihassolujen aktiini- ja myosiinifilamentit eivät ole järjestäytyneet sarkomeereiksi, eikä niissä siten ole havaittavissa poikkijuovaisuutta. Tämän vuoksi aktiini- ja myosiinifilamentit voivat liukua toistensa ohi pitkästikin, jolloin sileä lihas voi venyä tai supistua sopivan kokoiseksi supistusvoiman kärsimättä. Vaikka sileän lihaksen supistusvoima on pienempi ja supistumisnopeus hitaampi kuin poikkijuovaisella lihaksella, se kuitenkin pystyy pitämään supistustilaa kauemmin yllä väsymättä. (Nienstedt ym. 1999: 82–83; Hiltunen ym. 2009: 277.)

Sileälihaskudos toimii tahdosta riippumattomasti, joko automaattisesti tai autonomisen hermoston säätelemänä. Automaattisesti toimivat sileälihassolut eivät tarvitse hermoimpulssia supistuakseen. Supistuminen alkaa useimmiten tahdistinalueilta, joista se etenee muihin soluihin aukkoliitosten kautta. Tällaisia automaattisia soluja löytyy esimerkiksi mahalaukun ja suolten seinämistä. Autonomisen hermoston säätelemiä sileälihassoluja löytyy muun muassa silmistä ja verisuonten seinämistä. Ne tarvitsevat hermostolta toimintakäskyn supistuakseen. (Niendstedt ym. 1999: 82–83; Hiltunen ym. 2009: 277–278.)

2.4 Aktiini

Aktiini on monissa eukaryoottisolussa runsaslukuisin proteiini ja sen konsentraatio voi olla jopa yli 100 μM . Se on hyvin konservoitunut eli säilynyt evoluution kuluessa lähes muuttumattomana, mistä johtuen eri eliölajien aktiinit eivät juuri eroa toisistaan. (Cherng ym. 2008: 7-8.)

Aktiinin pallomaista monomeeriä kutsutaan G-aktiiniksi (globular). Polymerisoituessaan se muodostaa kierteistä säiettä, jota kutsutaan F-aktiiniksi (filamentous). Nämä aktiinisäikeet eli mikrofilamentit osallistuvat solun tukirangan muodostamiseen. Aktiini liittyy siten olennaisesti muun muassa solun liikkumiseen ja solun muodon ylläpitämiseen. (Cherng ym. 2008: 7-8; Dominquez & Holmes 2011.)

Selkärankaisilla aktiinista esiintyy kolmea eri päämuotoa. Muodot eroavat toisistaan vain muutamien aminohappojen osalta. Suurimmat erot löytyvät niiden aminoterminaalisisistä päistä, jotka ovat 50–60 %:sesti homologisia, kun taas muun sekvenssin osalta homologisuus on jopa yli 90 %. α -aktiineja löytyy yleensä lihassoluista, β - ja γ -aktiineja taas muista soluista. Sileän lihaksen α -aktiinin molekyylipaino on 42 kDa. (Skalli ym. 1986; Cherng ym. 2008: 7-8; Dominguez & Holmes 2011.)

3 Työn tarkoitus

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää sileän lihaksen α -aktiinin vasta-ainetta (anti- α -SMA) käyttäen, löytyisikö suomalaista gelsoliiniamyloidoosia sairastavien ja kontrollina toimineiden terveiden ihmisten verisuoninäytteistä eristetyistä sileälihassoluista ja kudoksetiloista eroja. Sileälihassolujen on havaittu tuottavan runsaasti gelsoliinia, erityisesti solunsisäistä muotoa (Fock ym. 2005), jonka vuoksi ne on valittu soluviljelyyn ja tutkimuksen kohteeksi. Työssä käytettiin kolmea menetelmää: western blottausta, solujen vasta-ainevärjäystä ja verisuonileikkeiden immunohistologista värjäystä.

Western blot –menetelmää käytettiin solujen karakterisointiin, eli osoittamaan ovatko tutkittavat solut todella sileälihassoluja vai fibroblasteja. Fibroblastit ovat sidekudokseen soluväliainetta erittäviä, kehittyviä soluja (Nienstedt ym. 1999: 59; Hiltunen ym. 2009: 192). Ne saattavat helposti kontaminoida primäärisoluviljelmän.

Solujen vasta-ainevärjäyksellä tutkittiin niiden morfologiaa. Vasta-aineella saatiin esiin solujen aktiinitukirangat. Verisuonileikkeiden immunohistologisen värjäyksen avulla voitiin tarkastella suonien seinämän rakennetta ja sileälihassolujen määrää.

4 Materiaalit ja menetelmät

4.1 Materiaalit

Materiaalina opinnäytetyössä käytettiin plastiikkakirurgisista operaatioista saatujen gelsoliiniamyloidoosipotilaiden ja taudin suhteen terveiden kontrollien verisuoninäytteistä perustettuja primaarisolulinjoja ja kudosteikkaita. Sileälihassolulinjoja oli yhteensä 13: 7 potilassolulinjaa ja 6 kontrollisolulinjaa.

4.2 Primaarinen vasta-aine

Työssä käytettiin Sigman monoklonaalista sileän lihaksen α -aktiinin vasta-ainetta (anti- α -SMA, engl. anti- α -Smooth Muscle Actin, klooni 1A4, tuotenumero A2547). Vasta-aine on tuotettu immunisoidusta hiirestä saatujen pernan solujen ja hiiren myeloomasolujen fuusion seurauksena muodostuneiden hybridoomasolujen avulla. Immunogeeninä tuotossa on käytetty sileän lihaksen α -aktiinin aminoterminaalisen päään synteettistä peptidiä yhdistettynä KLH:iin (Keyhole Limpet Hemocyanin).

4.3 Soluviljelymenetelmät

Sulatus

Nestetyössä säilytyksessä olleet solut sulatettiin pitämällä niitä vesihauteessa (+37 °C) pari minuuttia. Sulanutta solususpensiota sekoitettiin pipetoimalla sisään ja ulos muutaman kerran. Suspensio siirrettiin steriiliin muoviputkeen ja lisättiin 5 ml kasvatusliuosta, minkä jälkeen sekoitettiin pipetin avulla. Kasvatusliuoksena oli Dulbecco's Modified Eagle Medium -liuosta (DMEM), jossa oli 10 % naudan sikiön seerumia (FBS), 1 % Glutamaxia (Life Technologies) ja 1 % penisilliini-streptomysiini-antibioottiliuosta. Solususpensiota sentrifugoitiin 10 minuuttia 405 g:n voimalla. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti poistettiin ja tilalle lisättiin 5 ml kasvatusliuosta, johon solupelletti suspensioitiin. Solususpensio siirrettiin kasvatusmaljalle (\varnothing 6 cm). Soluja kasvatettiin inkubointikaapissa +37 °C:ssa 5 % CO₂:ssa.

Kasvatusliuoksen vaihto ja solujen jakaminen

Kun soluviljelmä oli kasvamassa täyteen eli lähestymässä konfluenssia, solut jaettiin. Vanha kasvatusliuos poistettiin maljalta ja viljelmä pestiin kerran fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS; 15 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,4, 150 mM NaCl). Halkaisijaltaan 6 cm:n maljalle riitti 5 ml puskuria. Pesun jälkeen maljalle pipetoitiin trypsiini-EDTA:ta (6 cm:n maljalle 1 ml) ja inkuboitiin +37 °C:ssa 2 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen maljaa kopautettiin kevyesti pohjasta solujen irrottamiseksi kunnolla. Irtoaminen voitiin tarkastaa myös mikroskopoimalla. Maljalle lisättiin 5 ml kasvatusliuosta ja solujen irtoaminen varmistettiin vielä pipetoimalla suspensiota edestakaisin muutaman kerran ennen siirtoa steriiliin putkeen. Suspensiota sentrifugoitiin 10 minuuttia (405 x g). Muodostunut supernatantti poistettiin ja putkeen pipetoitiin 10 ml kasvatusliuosta. Pelletti suspensioitiin liuokseen, jonka jälkeen suspensio siirrettiin maljalle (Ø 10 cm). Malja siirrettiin inkubaattoriin (+ 37 °C, 5 % CO₂).

Mikäli solut eivät olleet konfluentteja, riitti pelkkä kasvatusliuoksen vaihto. Tällöin vanha liuos poistettiin maljalta ja solut pestiin kerran PBS-liuoksella. Pesun jälkeen lisättiin uusi kasvatusliuos.

Solujen pakastaminen

Solut voitiin pakastaa, kun ne olivat lähestymässä konfluenssia. Kasvatusliuos poistettiin maljalta ja viljelmä pestiin kerran PBS-liuoksella. Solut irrotettiin trypsiini-EDTA-liuoksella, jota pipetoitiin 1-2 ml halkaisijaltaan 10 cm:n maljalle ja inkuboitiin +37 °C:ssa 2 minuuttia. Tämän jälkeen maljalle lisättiin kasvatusliuosta ja solujen irtoaminen varmistettiin pipetoimalla pari kertaa edestakaisin. Suspensio siirrettiin putkeen ja sentrifugoitiin 10 minuuttia (405 x g). Supernatantti poistettiin ja solupelletti suspensioitiin 800 µl:aan pakastusmediaa. Pakastusmediana käytettiin FBS:a, jossa oli 8 % dimeetyylisulfoksidia (DMSO). Suspensio siirrettiin kryoputkeen, joka laitettiin isopropanolia sisältävään pakastusastiaan. Soluja pidettiin vuorokausi pakastimessa -80 °C:ssa, ennen kuin ne siirrettiin nestetyypisäilytykseen.

4.4 Solujen vasta-ainevärjäys

Värjäystä varten maljojen pohjille laitettiin pieniä laseja, joiden päälle viljelmän annettiin kasvaa. Lasit kerättiin 6-kuoppalevyille PBS-liuokseen. Solut kestävästi pitämällä niitä 4 % paraformaldehydiliuoksessa (PFA) noin 20 minuuttia.

Ennen värjäystä PFA-kestävöidyt solut permeabilisoitiin eli tehtiin läpäiseviksi 0,3 % Triton X-100-PBS-liuoksella, jota pipetoitiin 1 ml/kuoppa ja inkuboitiin 15 minuuttia. Permeabilisoinnin jälkeen pestiin 3 x 10 minuuttia PBS-liuoksella. Pesujen jälkeen soluja pidettiin kyllästysliuoksessa tunnin ajan. Kyllästysliuoksena oli 3 % naudan seerumin albumiinia (BSA, Biowest) PBS-liuoksessa. Tämän jälkeen pestiin jälleen 3 x 10 minuuttia PBS-liuoksella.

Vasta-aineinkubointia varten PBS-liuos poistettiin kuoppa kerrallaan. Primaarivasta-aineena käytetty anti- α -SMA laimennettiin 1:4000 PBS-liuokseen ja sitä pipetoitiin 30 μ l/lasilevy. Inkuboitiin 1 tunti, jonka kuluttua pestiin taas 3 x 10 minuuttia PBS-liuoksella. Sekundaarivasta-ainelaimennosta (Alexa 488 anti-mouse, Invitrogen, laim. 1:250 PBS-liuokseen) pipetoitiin myös 30 μ l/lasi ja inkuboitiin tunnin ajan. Sitten pestiin PBS-liuoksella 4 x 10 minuuttia.

Solut peitettiin Vectashieldin DAPI Mounting media –aineella. Peiteainetta pipetoitiin objektilasille 2 μ l, lasilevyä kuivattiin hieman suodatinpaperiin ja laskettiin pisaran päälle solupuoli alaspäin. Peiteaineessa mukana oleva 4',6-diamidino-2-fenyyli-indoli (DAPI) värjää solujen tumat.

4.5 Western blot

Blottausta varten näytteet ajettiin Bolt™ 4-12 % Bis-Tris Plus –geelille (Novex Life Technologies). Jokaiseen näytteeseen lisättiin 7 μ l puskuriseosta, jossa oli Bolt™ LDS Sample Buffer (4x) –puskuria ja Bolt™ Reducing Agent (10x) –liuosta suhteessa. Sitten näytteitä lämmitettiin + 70 °C:ssa 10 minuuttia, jonka jälkeen ne ajettiin geelillä 165 V:n jännitteellä 35 minuuttia. Ajopuskurina oli MES SDS Running Buffer ja proteiinistandardina Precision Plus Protein™ All Blue Standards (Bio-Rad).

Geelijaon jälkeen tehtiin blottaus iBlot-laitteella, mikä kesti 10 minuuttia. Nitroselluloosakalvo kyllästettiin tämän jälkeen 5 % BSA/PBS-liuoksessa tunnin ajan huoneenlämmössä. Tunnin jälkeen kyllästysliuos kaadettiin pois ja tilalle lisättiin primaarinen vastaaine 1 % BSA/PBST (PBS, jossa 0,1 % Tween-20)-liuoksessa. Vasta-aineen laimennos oli 1:1000. Kalvo vietiin vasta-aineliuoksessa kylmiöön, jossa se oli ravistelussa yön yli.

Seuraavana päivänä kalvo pestiin 3 x 10 minuuttia PBST-liuoksella, jonka jälkeen sitä pidettiin sekundaarisessa vasta-aineessa (IRDye 680 LT goat-anti-mouse, Sarstedt) ravistelussa tunnin ajan huoneenlämmössä. Vasta-aine oli laimennettu suhteessa 1:20 000 1 % BSA/PBST-liuokseen, jossa oli myös 0,02 % natriumdodekyylisulfaattia (SDS) epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi. Tästä eteenpäin kalvoa suojattiin valolta sekundaarisen vasta-aineen valoherkkyyden vuoksi. Vasta-ainekäsittelyn jälkeen kalvoa pestiin jälleen 3 x 10 minuuttia PBST-liuoksella, jonka jälkeen se siirrettiin PBS-liuokseen. Nitroselluloosakalvo kuvattiin IR-alueen (700–800 nm) skannerilla (Odyssey, LI-COR).

4.6 Immunovärjäys avidiini-biotiinikompleksi- eli ABC-menetelmällä

Kudoskäsittelyn ja parafiiniin valamisen jälkeen leikkeet voitiin värjätä. Parafiinileikkeitä inkuboitin aluksi +56 °C:ssa 30 minuuttia parafiinin pehmittämiseksi ja leikkeiden kiinnittämiseksi laselle. Parafiinin poistamiseksi lasoja pidettiin 3 x 10 minuuttia ksyleenisä, jonka jälkeen ne siirrettiin laskevan alkoholisarjan kautta mQ-veteen. Laskeva alkoholisarja käsitti 2 x 5 minuutin inkuboinnin absoluuttisessa etanolissa, 2 x 5 minuuttia 95 % etanolissa ja 5 minuuttia 70 % etanolissa. Vedessä lasoja pidettiin 2 x 5 minuuttia.

Seuraavaksi leikkeet esikäsiteltiin keittämällä niitä sitraattipuskurissa (pH 6) epitooppien esiinsaamiseksi. Keitto tapahtui kuumentamalla puskurissa olevia leikkeitä mikroaaltouunissa 4 x 5 minuuttia, varoen ylikiehumista. Keiton jälkeen leikkeitä pidettiin mQ-vedessä 5 minuuttia.

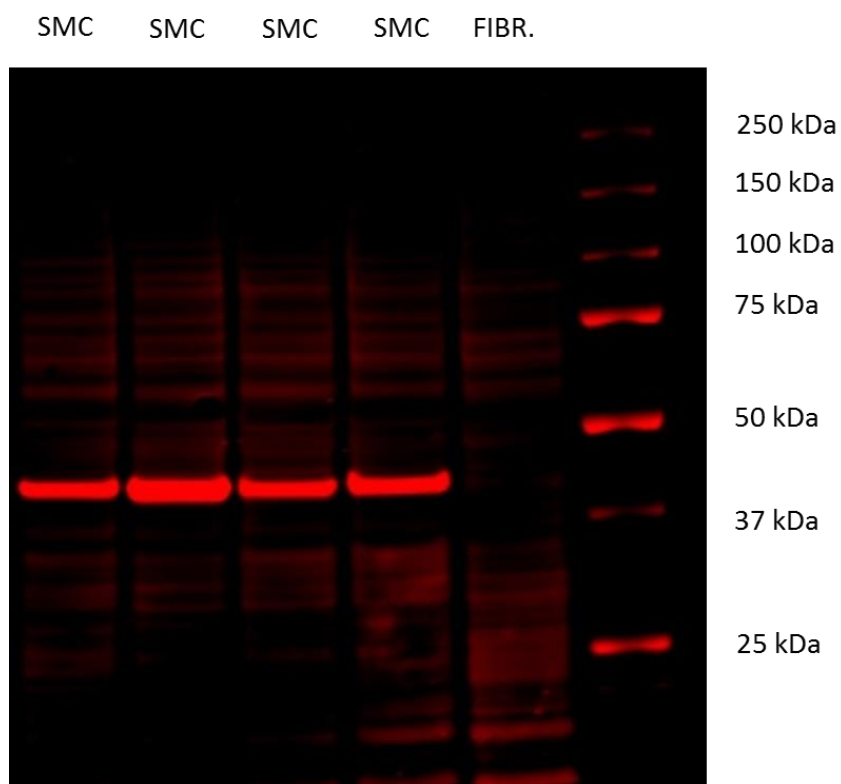
Seuraavaksi näytteiden epäspesifistä peroksidaasia vähennettiin inkuboimalla niitä 30 minuuttia vastavalmistetussa metanoli-vetyperoksidiliuoksessa, jonka jälkeen lasit pestiin 3 x 5 minuuttia PBS-liuoksella. Leikkeitä kyllästettiin hevosen seerumilla 1 tunti. Seerumi oli laimennettu 1 % BSA/PBS-liuokseen. Kyllästämisen jälkeen leikkeitä inkuboitiin yön yli +4 °C:ssa primaarivasta-aineessa, joka laimennettiin 1 % BSA/PBS-liuokseen suhteessa 1:4000.

Seuraavana päivänä näytteet pestiin 3 x 5 minuuttia PBS-liuoksella ennen sekundaarista vasta-ainetta. Hevosessa tuotettu hiiren IgG-vasta-aineita tunnistava biotinyloitu sekundaarivasta-aine (Vector) laimennettiin PBS-liuokseen ja leikkeitä inkuboitiin siinä 30 minuuttia. Tämän jälkeen laseja pestiin jälleen 3 x 5 minuuttia PBS-liuoksella. Seuraavaksi leikkeitä pidettiin 30 minuuttia ABC-reagenssissa, joka valmistettiin Vectorin Vectastain Elite ABC System –kitin ohjeiden mukaan. Sitten toistettiin PBS-pesu (3 x 5 minuuttia).

3,3'-diaminobentsidiiniliuos (DAB-liuos), jonka avulla vasta-ainereaktio voidaan havainnoida, valmistettiin DAB Substrate Kit for Peroxidase –kitin (Vector Laboratories) ohjeiden mukaan. DAB:n annettiin vaikuttaa leikkeillä noin 10 minuuttia, tarkkaillen mikroskoopilla värireaktion kehittymistä. Tämän jälkeen niitä huuhdeltiin 10 minuuttia vesijohtovedessä ja sen jälkeen mQ-vedessä. Huuhtelun jälkeen leikkeet värjättiin Mayerin hematoksyliinillä, jolloin saadaan näkyviin solujen tumat. Hematoksyliinin annettiin vaikuttaa 3-4 minuuttia, jonka jälkeen huuhdeltiin taas 10 minuuttia vesijohtovedessä ja mQ-vedessä.

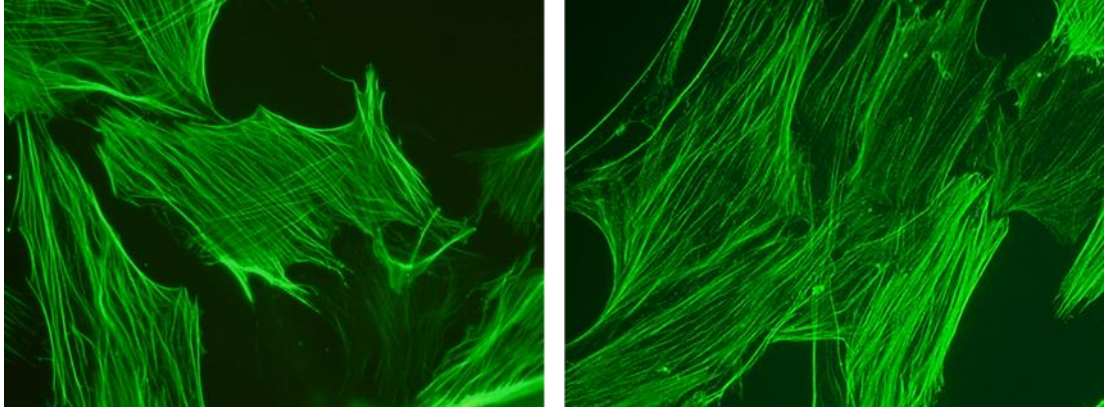
5 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Fibroblastisolut voivat kontaminoida primaarisoluviljelmän, joten tutkittavat sileälihassolut karakterisoitiin western blottausta käyttäen (kuva 4). Blottauksessa näytteinä oli sileälihassoluja kolmestatoista eri linjasta, joista kuvassa on esitettyä 4 ja yksi fibroblastilinja. Koska käytetty primaarinen vasta-aine on spesifistä sileän lihaksen α -aktiinille, vain sileälihassoluilla nähdään positiiviset proteiinvyöhykkeet 42 kDa:n kohdalla. Fibroblastinäyte antaa negatiivisen tuloksen. Tästä voidaan todeta, että tutkittavat solut todella ovat sileälihassoluja ja vasta-aine toimii kuten pitääkin eli tunnistaa oikean epitoopin.



Kuva 4. Western blot. Sileälihassolut (SMC, engl. smooth muscle cell) näkyvät kuvassa positiivisina ja fibroblastinäyte (FIBR.) negatiivisena.

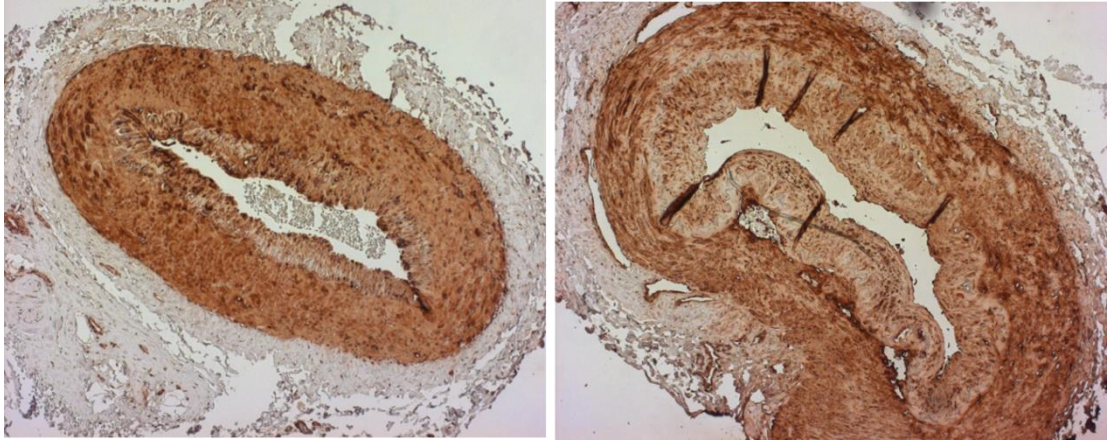
Kuvassa 5 on esitetty solujen vasta-ainevärjäyksen tuloksia. Värjäyksellä saatiin esiin sileälihassolujen aktiinitukirangat. Värjätyt solut olivat peräisin yhteensä kolmestatoista eri sileälihassolulinjasta. Kuvassa on yhden potilassolulinjan ja yhden kontrollisolulinjan soluja.



Kuva 5. Solujen immunovärjäys. Vasemmanpuoleisessa kuvassa on kontrollisoluja ja oikealla potilassoluja.

Suomalaista gelsoliiniamyloidoosia tutkittaessa on huomattu vain solunulkoisen gelsoliinin muodostavan amyloidogeenisiä fragmentteja (Kangas ym. 1996). Kummastakin gelsoliinimuodosta on kuitenkin vastuussa sama geeni, joten kummallakin muodolla on sama mutaatio. Solunsisäinen gelsoliini vaikuttaa muun muassa solun rakenteeseen aktiinia muokkaamalla. Tämän perusteella voisi olla mahdollista, että potilaan sileälihassolujen aktiinifilamenteista löytyisi jotain eroa verrattuna kontrollisoluihin. Erot aktiinitukirangoissa voisivat antaa viitteitä geenimutaation vaikutuksista solunsisäisen gelsoliinimuodon toimintaan. Tässä työssä tehtyjen värjäysten perusteella mitään mainittavampia poikkeavuuksia ei kuitenkaan löytynyt. Sekä kontrolli- että potilassolut värjäytyivät hyvin. α -SMA-värjäyksillä ei siis voitu havaita eroja potilas- ja kontrollisolujen aktiinitukirankojen välillä.

Immunohistologista värjäystä käyttämällä tutkittiin verisuonten seinämien rakenteita ja sileälihassolujen määrää seinämän keskikerroksessa eli *tunica mediassa*. Kontrolli- ja potilasleikkeitä vertailtiin mahdollisten erojen havaitsemiseksi. Värjätyt verisuonileikkeet löytyvät kuvasta 6.



Kuva 6. Verisuonileikkeiden immunohistologinen värjäys. Vasemmalla on kuva kontrollileikkeestä ja oikealla potilaan verisuonileikkeestä.

Verisuonten *tunica media* näkyy kuvissa tummanruskeana. Se muodostuu pääasiassa sileästä lihaskudoksesta. Potilaan verisuonileikkeen *tunica mediassa* näkyy vaaleita laikkuja tummanruskean osion keskellä. Vaaleat alueet merkitsevät sitä, että sileälihasolut ovat seinämässä epäjärjestyksessä ja verisuonen seinämän rakenne on siis hajonnut. Potilaan *tunica median* sileälihassolujen määrässä kontrolliin verrattuna ei havaittu eroa.

6 Yhteenveto

Opinnäytetyössä tarkasteltiin suomalaista gelsoliiniamyloidoosia sairastavien ja kontrollina toimineiden terveiden ihmisten verisuoninäytteistä eristettyjä sileälihassoluja ja kudოსleikkeitä, yrittäen löytää niiden väliltä eroavaisuuksia. Sileälihassolujen on huomattu sisältävän paljon gelsoliinia, erityisesti solunsisäistä muotoa (Fock ym. 2005). Käytössä oli kolme menetelmää: western blot, solujen vasta-aineväryäys ja verisuonileikkeiden immunohistologinen väryäys. Kaikissa menetelmissä käytettiin samaa primaarista, Sigman monoklonaalista sileän lihaksen α -aktiinille spesifistä vastaainetta.

Western blottauksella osoitettiin tutkittavien solujen olevan sileälihassoluja. Lisäksi todettiin, että käytetty vasta-aine tunnisti oikean epitopin, eli se reagoi sileälihassoluista löytyvän, 42 kDa:n kokoisen α -aktiinin kanssa.

Solujen vasta-aineväryäksen avulla tutkittiin sileälihassolujen aktiinirankoja, etsien eroja kontrolli- ja potilassolujen väliltä. Värykset kyllä onnistuivat, mutta mitään suurempia poikkeavuuksia ei löytynyt.

Verisuonileikkeiden väryyksellä tutkittiin verisuonten seinämien rakennetta ja sileälihassolujen määrää. Potilaan verisuonileikkeestä löytyi vaaleita alueita ruskeaksi värytyneen, pääosin sileästä lihaskudoksesta muodostuneen keskikerroksen eli *tunica median* keskeltä. Nämä vaaleat alueet kertovat verisuonen seinämän hajonneesta rakenteesta, jossa sileälihassolujen järjestys seinämän keskikerroksessa on muuttunut kontrolliin verrattuna. Sileälihassolujen määrässä sen sijaan ei havaittu eroa.

Lähteet

- Blausen.com staff. Blausen gallery 2014. Wikiversity Journal of Medicine. DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 20018762. Own work. <
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen_0055_ArteryWallStructure.png#/media/File:Blausen_0055_ArteryWallStructure.png> Viitattu 26.4.2015.
- Cherng, S., Young, J. & Ma, H. 2008. Alpha-smooth muscle actin (α -SMA). The Journal of American Science 4(4); 7-8.
- Dominguez, Roberto & Holmes, Kenneth C. 2011. Actin structure and function. Annual Review of Biophysics 40; 169-186.
- Fock, U., Jockusch, B. M., Schubert, W.-D. & Hinssen, H. 2005. Topological assignment of the N-terminal extension of plasma gelsolin to the gelsolin surface. Biochemical Journal 385; 659-665.
- Hiltunen, E., Holmberg, P., Jyväsjärvi, E., Kaikkonen, M., Lindblom-Yläne, S., Nienstedt, W. & Wähälä, K. 2010. Galenos – Johdanto lääketieteen opintoihin. Helsinki: WSOYpro Oy.
- Juva, Kati. 2013. Alzheimerin tauti. <www.terveyskirjasto.fi>. Lääkärikirja Duodecim. Duodecim 23.9.2013. Viitattu 13.2.2015.
- Kangas, H., Paunio, T., Kalkkinen, N., Jalanko, A. & Peltonen, L. 1996. *In vitro* expression analysis shows that the secretory form of gelsolin is the sole source of amyloid in gelsolin-related amyloidosis. Human Molecular Genetics 5; 1237-1243.
- Kiuru-Enari, S., Keski-Oja, J. & Haltia, M. 2005. Cutis laxa in hereditary gelsolin amyloidosis. British Journal of Dermatology 152; 250-257.
- Kiuru-Enari, Sari & Haltia, Matti. 2010. Perinnöllinen gelsoliiniamyloidoosi – 40 vuotta Meretojan tautia. Duodecim 126; 1162–1171.
- Kiuru-Enari, Sari & Haltia, Matti. 2013. Hereditary gelsolin amyloidosis. Handbook of Clinical Neurology 115; 659-681.
- Kwiatkowski, D., Stossel, T., Orkin, S., Mole, J., Coltens, H. & Yin, H. 1986. Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. Nature 323; 455-458.
- Kwiatkowski, D., Westbrook, C., Bruns, G. & Morton, C. 1988. Localization of gelsolin proximal to ABL on chromosome 9. American Journal of Human Genetics 42; 565-572.

Kwiatkowski, David J. 1999. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 11; 103-108.

Maury, P., Kere, J., Baumann, M. & de la Chapelle, A. 1991. Suomalaisen perinnöllisen amyloidoosin geenivirhe löytynyt. *Duodecim* 107; 1344–1345.

Meretoja, Jouko. 1969. Familial systemic paramyloidosis with lattice dystrophy of the cornea, progressive cranial neuropathy, skin changes and various internal symptoms. *Annals of Clinical Research* 1; 314-324.

Meretoja, Jouko. 1971. Amyloidioireyhtymä ja verkkomainen sarveiskalvodystrofia. *Duodecim* 87; 1412–1419.

Meretoja, Jouko. 1976. Tautiperintöämme: suomalainen amyloiditauti. *Suomen Lääkäriliitto* 31; 2234–2235.

Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila, A. & Björkqvist, S-E. 1999. Ihmisen fysiologia ja anatomia. Helsinki: WSOY.

Pettersson, T., Törnroth, T. & Maury, P. 1999. Amyloidoosin diagnostiikka ja hoito. *Duodecim* 115; 1201–1211.

Salonen, Jonna. 2013. Amyloidoosi (amyloiditauti). <www.terveyskirjasto.fi>. Lääkärikirja *Duodecim*. *Duodecim* 30.3.2013. Viitattu 13.2.2015.

Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzonana, G., Gillessen, D. & Gabbiani, G. 1986. A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *The Journal of Cell Biology* 103; 2787-2796.

Yin, H. & Stossel, T. 1979. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 281; 583-586.

Yin, H., Kwiatkowski, D., Mole, J. & Cole, F. 1984. Structure and biosynthesis of cytoplasmic and secreted variants of gelsolin. *The Journal of Biological Chemistry* 259; 5271-5276.