



Kandidaatintutkielma

B₁₂-vitamiini ja Imerslund-Gräsbeck syndrooma

Anna Puronurmi

Oulun yliopisto
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta
2019

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet

1. Vitamiinit	4
2. B-vitamiinit	4
3. B ₁₂ -vitamiini	6
3.1. B ₁₂ -vitamiinin rakenne	8
3.2. B ₁₂ -vitamiinin synteesi	10
3.3. Kuljetus	12
3.4.1. Haptocorrin, Sisäinen tekijä ja Transkobalamiini	13
3.4.2. Cubam-reseptori	14
3.4.3. Multidrug resistance protein 1	16
3.4.4. CD320-reseptori	16
3.4.5. Megalin-reseptori	16
4. B ₁₂ -vitamiinin puute	17
5. Imerslund-Gräsbeck syndrooma	18
5.1. CUBN	19
5.2. AMN	20
5.3. GIF	20
6. Kirjallisuusviitteet	21

Käytetyt lyhenteet

FAD	Flaviini adeniini dinukleotidi
FMN	Flaviini mononukleotidi
NAD/NADH	Nikotiiniamidi adeniini dinukleotidi
NADP/NADPH	Nikotiiniamidi adeniini dinukleotidi fosfaatti
ACP	Asyyliiryhmän kantajaproteiini
PLP	Pyridoksaali 5' fosfaatti
THF	Tetrahydrofolaatti
SAM	<i>S</i> -adenosylmethionine
MeCbl	Metyylikobalamiini
AdoCbl	5'-deoksiadenosyylikobalamiini, adenosyylikobalamiini
DMB	Dimetyylibensimidazoli
ALA	5-aminolevuliinihappo
PBG	Porphobilinogen
HC	Haptocorrin
IF	Sisäinen Tekijä
TC	Transkobalamiini
MRP1	Multidrug resistance protein 1
CUBN	Kubiliini
AMN	Amnionless
GIF	Sisäistä tekijää koodaava geeni
EGF	Epidermaalinen kasvutekijä
MSD	Solukalvon läpäisevä osa
NBD	Nukleotidien sitoutumiskohta
LDLR	Low-density lipoprotein receptor
MMA	Metyylimalonyylihappo
IGS	Imerslund-Gräsbeck syndrooma
IFD	Sisäisen tekijän puute

1. Vitamiinit

Vitamiinit ovat ravintoaineita, joita ihmisen keho ei pysty tuottamaan, joten ne on saatava ravinnosta. Niillä on lukuisia tehtäviä, vaikka niitä tarvitaan vain vähän. Vitamiinit jaetaan vesi- ja rasvaliukoisiin vitamiineihin. Vesiliukoisiin vitamiineihin kuuluvat B- ja C-vitamiinit, kun taas rasvaliukoisiin kuuluvat A-, D-, K- ja E-vitamiinit. Niitä tarvitaan normaalin aineenvaihdunnan ylläpitämiseen ja vitamiinin puute aiheuttaa tietyn sairauden (Bender et al., 2018).

2. B-vitamiinit

B-vitamiinit ovat vesiliukoisia ja niitä on yhteensä kahdeksan; tiamiini, riboflaviini, niasiini, pantoteenihappo, B₆-vitamiini, biotiini, foolihappo ja B₁₂-vitamiini. B-vitamiinit ovat erityisen tärkeitä, sillä ne ovat koentsyymien prekursoreita. Koentsyymit ovat kofaktoreita, jotka liittyvät entsyymeihin prosteettiseksi ryhmäksi tai ovat kosubstraatteja. Entsyymit voivat katalysoida kofaktorien avulla reaktioita, jotka eivät ilman niitä onnistuisi (Voet et al., 2008). Vesiliukoiset vitamiinit imeytyvät ohutsuolessa mineraalisuolojen kanssa joko solunulkopuolisten proteiinien tai aktiivisen kuljetuksen avulla (Bender et al., 2018).

Hiilihydraattien aineenvaihdunnassa tiamiini difosfaatti toimii koentsyyminä oksidatiivisessa dekarboksylaatioissa, jossa poistetaan hiilidioksidi yhdisteestä. Tiamiini difosfaatti on mukana α -ketoglutaraatti-dehydrogenaasi-kompleksissa, pyruvaattidehydrogenaasi-kompleksissa ja keto acid dehydrogenaasi-kompleksissa sekä transketolaasissa. Tiamiinin puutteesta seuraa beriberi, jonka oireita ovat aineenvaihdunnan poikkeavuus, sydämen vaajatoiminta, ääreishermoston hermotulehdus (peripheral neuritis) ja pyruvaatti-laktaatti-asidoosi. Se aiheuttaa pyruvaatin kertymisen, sillä pyruvaattia ei voida muuttaa asetyyli-KoA:ksi. Pyruvaatti voidaan muuttaa laktaatiksi ja täten molempia kertyy plasmassa. Tiamiinin puutos on yleinen alkoholisteilla, sillä alkoholi estää sen imeytymistä (Bender et al., 2018).

Riboflaviinista (B₂-vitamiini) tuotetaan flaviini adeniini dinukleotidia (FAD) ja flaviini mononukleotidia (FMN) koentsyymeiksi. FAD ja FMN toimivat hapetus-pelkistysreaktioissa elektronien siirtäjinä (Bender et al., 2018). FAD:lla on konjugoitunut rengasrakenne ja se voi pelkistyä FADH₂:ksi vastaanottaen kaksi elektronia. FMN:lla on samankaltainen rakenne kuin FAD:lla ja FMN voi pelkistyä kahdesti FMNH₂:ksi. FAD toimii elektroninsiirtäjänä esimerkiksi sitruunahappokierrossa ja oksidatiivisessa fosforylaatioissa.

FMN toimii elektroninsiirtäjänä elektroninsiirtoketjussa kompleksi I:ssä. FAD:n ja FMN:n pelkistymisreaktiot ovat reversiibeileitä, jolloin elektroninsiirtäjät saadaan uudelleen käyttöön (Voet et al., 2008).

Niasiini on poikkeuksellinen vitamiini, sillä sitä voidaan tuottaa ihmisen kehossa tryptofaanista. Niasiini esiintyy nikotiinihappona ja nikotiiniamidina, josta tuotetaan koentsyymit nikotiiniamidi adeniini dinukleotidi (NAD) ja nikotiiniamidi adeniini dinukleotidi fosfaatti (NADP). NAD ja NADP ovat rakenteeltaan muuten samanlaisia, mutta NAD:n adeniinin toisessa hiilessä on hydroksyyli-ryhmä ja NADP:n adeniinin toisessa hiilessä on fosfaattiryhmä. NAD ja NADP toimivat riboflaviinikoentsyymien tapaan hapetus-pelkistysreaktioissa, joissa NAD⁺ pelkistyy NADH:ksi ja NADP⁺ pelkistyy NADPH:ksi. NAD on muun muassa mukana sitruunahappokierrossa, jossa se pelkistyy ja vie saamansa elektronit oksidatiiviseen fosforylaatioon. NADP on elektroninsiirtäjänä esimerkiksi rasvahappojen biosynteesin kahdessa reaktiossa (Bender et al., 2018).

Pantoteenihappo on mukana Koentsyymi A:n (KoA) ja asyyli-ryhmän kantajaproteiinin (ACP) rakenteessa. Koentsyymi A:ssa ja ACP:ssa pantoteenihappo muodostaa sidoksen kysteiniiniin, joka voi muodostaa tioesterisidoksen asetyyliin tai asyyliin. Pantoteenihappo toimii asyylin ja asetyylin kantajana. KoA toimii muun muassa rasvahappojen oksidaatiossa ja sitruunahappokierrossa. ACP toimii rasvahappojen synteesissä (Bender et al., 2018).

B₆-vitamiinilla on kuusi muotoa, jotka ovat pyridoksiini, pyridoksiini 5' fosfaatti, pyridoksaali, pyridoksaali 5' fosfaatti, pyridoksamiini ja pyridoksamiini 5' fosfaatti. Pyridoksaali 5' fosfaattia (PLP) on eniten B₆-vitamiinin muodoista ja sillä on monia tehtäviä aineenvaihdunnassa. PLP on mukana glykogeeni fosforylaasin kofaktorina, dekarboksylaatioissa, transaminaatioissa ja hormoni-reseptori-kompleksin poistamisessa DNA:sta (Bender et al., 2018).

Biotiini toimii metyylicrotonyyli-KoA-karboksylaasissa (methylcrotonyl-CoA carboxylase), asetyyli-KoA-karboksylaasissa, propionyyli-KoA-karboksylaasissa ja pyruvaattikarboksylaasissa hiilidioksidin siirtäjänä. Biotiini esiintyy ruoissa biosytiinina, josta voidaan karboksyloidaa karboksyyli-biosytiini. Biotiinin puutetta ei ole tunnistettu. Tosin runsas valkuaisien nauttiminen voi aiheuttaa biotiinin puutetta, koska kananmunan valkuainen sisältää biotiinia sitovaa avidin-proteiinia, jolloin biotiini sitoutuu avidin-proteiiniin ja biotiini ei ole solujen käytettävissä (Bender et al., 2018).

Foolihapon aktiivinen koentsyymimuoto on tetrahydrofolaatti (THF), joka saadaan pelkistämällä foolihappo kaksi kertaa. Tetrahydrofolaatteja on useita ja niiden hapettumistaso sekä niiden kantama funktionaalinen ryhmä vaihtelee. Tetrahydrofolaatit siirtävät C₁-yksikön

tymiinin synteessissä, histidiinin hajotuksessa, homokysteiniin synteessissä metioniinista ja seriinin muuntamisessa glysiiniksi. Biotiini ja SAM (*S*-adenosylmethionine) siirtävät myös C₁-yksikön, tosin usea hapettumistaso tekee tetrahydrofolaatista monipuolisemman (Voet et al., 2008).

3. B₁₂-vitamiini

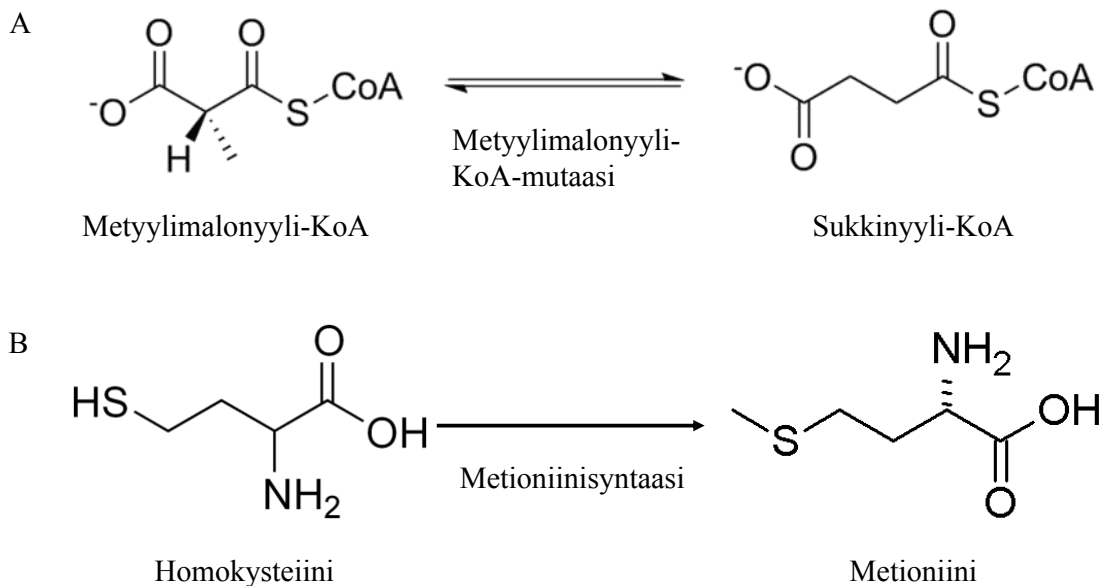
Viimeinen vesiliukoinen vitamiini on B₁₂-vitamiini, jonka toinen nimitys kobalamiini. Kobalamiinit kuten muut B-vitamiinit ovat orgaanisia yhdisteitä, joita ihminen tarvitsee pienissä määrin. B₁₂-vitamiinia saadaan eläinten kudoksista, joihin tämä vitamiini kertyy, kun bakteerit ovat sitä syntetisoineet suolistossa tai mahassa. Maitotuotteet, kala, kananmunat, liha ja äyriäiset ovat parhaita B₁₂-vitamiinin lähteitä. Puute voi kehittyä vegaaneille, sillä B₁₂-vitamiinin lähteet ovat eläinperäisiä, tosin tietty syötävä levä ja fermentoidut soijapavut (*tempe*) sisältävät jonkin verran B₁₂-vitamiinia. Sitä voidaan varastoida ihmiskehossa maksaan, lihaksiin, munuaisiin, pernaan, sydämeen, aivoihin ja aivolisäkkeeseen. Lisäksi B₁₂-vitamiinilla on pitkä puoliintumisaika, joten ihminen selviää, vaikka ravinnosta puuttuisi B₁₂-vitamiini jonkin aikaa (Combs, 2012).

Kobalamiineja ovat metyylikobalamiini (MeCbl), syanokobalamiini, aquokobalamiini, hydroksikobalamiini (hydroxycobalamin) ja 5'-deoksiadenosyylikobalamiini (AdoCbl, adenosyylikobalamiini). Niitä tarvitaan solussa kahden B₁₂-vitamiinista riippuvaisen entsyymin kofaktoreiksi. Metyylikobalamiini ja 5'-deoksiadenosyylikobalamiini ovat ainoat, joita ihminen voi hyödyntää aineenvaihdunnassa. Mitokondriossa sijaitseva metyyylimalonyyli-KoA-mutaasi ja sytoplasmassa sijaitseva metioniinisyntaasi ovat B₁₂-vitamiinista riippuvaiset entsyymit (Combs, 2012; Dong et al., 1999). Metyyylimalonyyli-KoA tarvitsee toimiakseen prosteettiseksi ryhmäkseen 5'-deoksiadenosyylikobalamiinin ja metioniinisyntaasi tarvitsee metyylikobalamiinin. Metyyylimalonyyli-KoA-mutaasin ja metioniinisyntaasin katalysoimat reaktiot ovat esitetty kuvassa 1. (Voet et al., 2008).

Metyyylimalonyyli-KoA-mutaasi on mukana propionyyli-KoA:n muuttamisessa sukkinyyli-KoA:ksi. Propionyyli-KoA:ta syntyy parittomien rasvahappojen β-oksidaation viimeisellä kierroksella ja haarautuneiden aminohappojen valiinin, isoleusiinin ja metioniinin hajotuksessa. Ensimmäiseksi propionyyli-KoA karboksyloidaan propionyyli-KoA-karboksylaasin toimesta, jolla on prosteettisena ryhmänä biotiini, reaktio tarvitsee ATP:tä. Tuotteeksi saadaan (*S*)-metyyylimalonyyli-KoA, joka isomerisoituu (*R*)-metyyylimalonyyli-KoA:ksi metyyylimalonyyli-KoA-rasemaasin avulla. Metyyylimalonyyli-KoA-mutaasi katalysoi

viimeisen reaktion, jossa (*R*)-metyylimalonyyli-KoA:n hiilirunko järjestetään uudelleen ja saadaan sukkinyyli-KoA. Tämä on edullista aineenvaihdunnalle, sillä sukkinyyli-KoA on yksi sitruunahappokierron (TCA) yhdisteistä ja täten se voidaan suoraan hyödyntää mitokondriossa tapahtuvassa TCA:ssa (Voet et al., 2008).

Metioniinisyntaasi katalysoi reaktiota, jossa homokysteini muutetaan metioniiniksi. Metioniinisyntaasista puhutaan myös 5-metyylitetrahydrofolaatti-homokysteini-metyylitransferaasina, joka tarvitsee toimiakseen metyylikobalamiinin sekä 5-metyylitetrahydrofolaatin, jonka prekursori on foolihappo. Homokysteiniin liitetään metyyliyryhmä metioniinisyntaasin toimesta, jossa 5-metyylitetrahydrofolaatti toimii metyyliyryhmän luovuttajana, jolloin saadaan metioniini (Bjørke Monsen and Ueland, 2003). Metioniini on tärkeä molekyyli aineenvaihdunnassa, sillä se on välttämätön aminohappo ja sitä tarvitaan proteiinien muodostukseen. Toisaalta metioniinin hajotuksessa muodostetaan (*S*)-adenosyylimetioniinia (SAM), joka toimii useassa reaktiossa metyyliyryhmän luovuttajana, esimerkiksi SAM luovuttaa metyyliyryhmän histonien metylaatioissa. Metioniinin puute ja sitä kautta SAM:n puute vaikuttaa laajalti aineenvaihduntaan ja fysiologisiin toimintoihin (Voet et al., 2008).



Kuva 1. Metyylimalonyyli-KoA-mutaasin ja metioniinisyntaasin katalysoimat reaktiot. A) Metyylimalonyyli-KoA-mutaasi katalysoi metyylimalonyyli-KoA:n muuttamisen sukkinyyli-KoA:ksi. Metyylimalonyyli-KoA-mutaasin kofaktorina toimii 5'-deoksiadenosyylikobalamiini. B) Metioniinisyntaasi katalysoi metioniinin metyloinnin homokysteiinistä. Metioniinisyntaasin kofaktorina toimii metyylikobalamiini. (Tiedot lähteestä (Voet et al., 2008)).

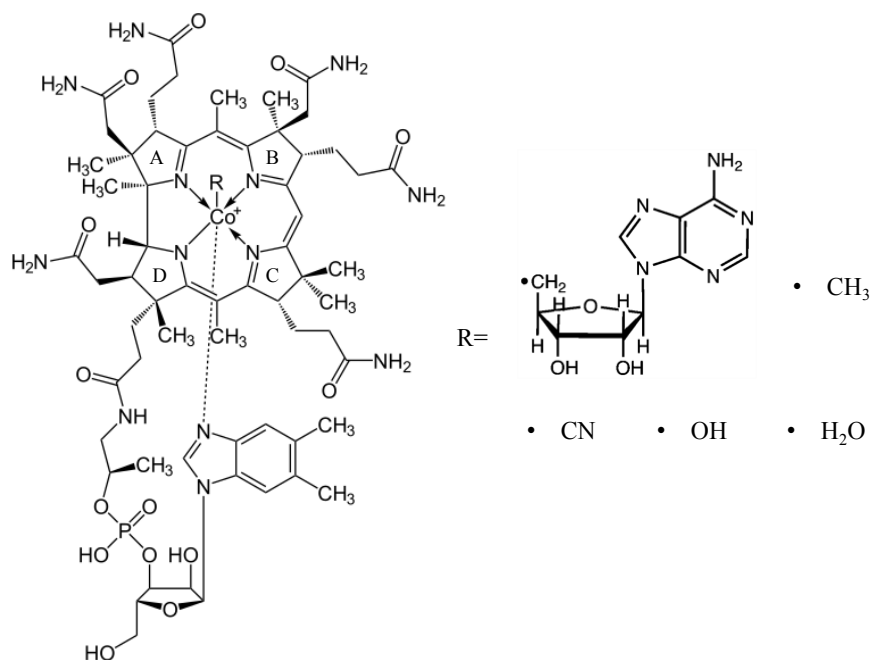
3.1.B₁₂-vitamiinin rakenne

Biologisesti aktiiviset kobalamiinit ovat metyylikobalamiini ja 5'-deoksiadenosyylikobalamiini, joiden rakenteet selvitettiin röntgensädeanalyysillä, jonka avulla selvisi, että molemmilla on rombinen kiderakenne (Lenhert and Hodgkin, 1961; Rossi et al., 1985). MeCbl:n ja AdoCbl:n rakenteet eroavat toisistaan yhden sivuketjun verran. Metyylikobalamiinilla tämä sivuketju on metyyliiryhmä ja 5'-deoksiadenosyylikobalamiinilla se on 5'-deoksiadenosiiniryhmä. Kuitenkin kobalamiinien rakenne on muuten yhdenmukainen (Rossi et al., 1985).

Kobalamiinien rakenne (kuva 2.) koostuu koboltti-ionista, corrin-rakenteesta, 5,6-dimetyylilibensimidazolista (DMB), riboosista, fosfaattista, propanoliamiiniryhmästä ja asetaatista (Hodgkin et al., 1956; Jensen and Ryde, 2003). Corrin-rakenne koostuu pyrroline- ja pyrrolidine-rengasrakenteista, jotka ovat toisissaan kiinni kovalenttisillä sidoksilla. Pyrroline ja pyrrolidine-ryhmien tyypitatomit ovat kohdistuneet corrin-rengasrakenteen keskelle. Nämä

ryhmät ovat sitoutuneet rakenteen keskellä olevaan koboltti-ioniin. Tämä muistuttaa porfyriinien rengasrakennetta ja syystäkin, sillä kobalamiinien rengasrakenne syntetisoidaan porfyriinien synteessin välituotteesta. Kobalamiinien corrin-rakenteessa on kahdeksan metyyliryhmää, kun taas porfyriinien rakenteessa metyyliryhmiä on vain kaksi. Corrin-rakenteen metyyliryhmät ovat c-alkyloitu metioniinin toimesta (Shemin and Bray, 1964).

5,6-dimetyylilibensimidazoli on sitoutunut koboltti-ioniin corrin-rakenteessa typpiatomien kautta siten, että DMB on tason alapuolella. DMB:hen on sitoutunut riboosi, joka on sitoutunut fosfaattipropanoliamiini-ryhmään. Fosfaattipropanoliamiini on sitoutunut propionihappo tähteeseen, joka on sitoutunut corrin-rakenteen D-renkaaseen. Kobolttin viimeiseen sitoutumiskohtaan voi sitoutua vesi, 5'-deoksiadenosiini-, metyyli-, hydroksyyli- tai ntriiliryhmä. Tämä viimeinen sidos kobolttiin on kobalamiinin reaktiivinen kohta (Hodgkin et al., 1956; Jensen and Ryde, 2003).



Kuva 2. B₁₂-vitamiinin koko rakenne on kuvassa vasemmalla, jossa R merkitsee sivuketjun paikan ja vitamiinin reaktiivisen kohdan. Kuvassa oikealla ovat mahdolliset sivuketjut, joita ovat 5'-deoksiadenosiini-, metyyli-, ntriili- ja hydroksyyli-ryhmä sekä vesi. Biologisesti aktiiviset B₁₂-vitamiinin muodot ovat 5'-deoksiadenosyylikobalamiini ja metyylikobalamiini. (Tiedot lähteestä (Bender et al., 2018)).

3.2.B₁₂-vitamiinin synteesi

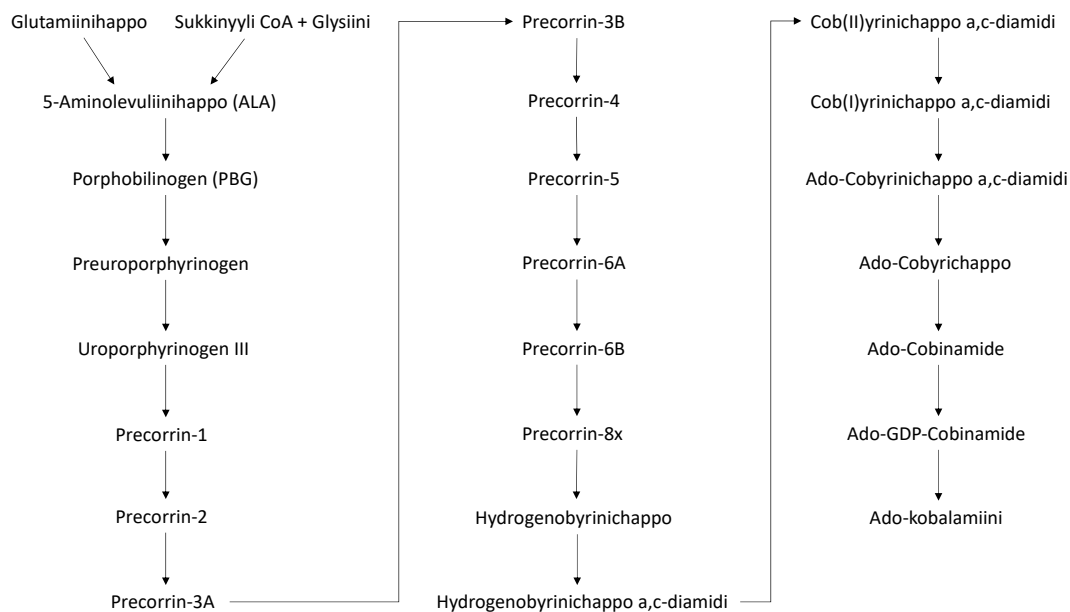
B₁₂-vitamiinin synteesi on yksi luonnon monimutkaisimmista biosynteeseistä. Sen synteesi alkaa uroporphyrinogen III:sta, josta haarautuvat myös esimerkiksi klorofylli a:n ja hemoglobiinin hemin synteetit. Uroporphyrinogen III pitää kuitenkin ensin syntetisoida (Battersby, 1994; Raux et al., 2000).

Vain 5'-deoksiadenosyylikobalamiinin synteesi on esitetty ja havainnollistettu kuvassa 3. 5'-deoksiadenosyylikobalamiinin synteesi alkaa 5-aminolevuliinihapon (ALA) tuottamisesta joko glysiinistä ja sukkinyyli-KoA:sta tai glutamiinihaposta. Glysiinin ja Sukkinyyli-KoA:n reaktiota katalysoi aminolevuliinihapposyntaasi (ALA-syntaasi), joka on PLP-riippuvainen entsyymi. Tässä reaktiossa ALA-syntaasin kofaktoriin sitoutuu glysiini, jonka jälkeen sukkinyyli-KoA voi sitoutua kompleksiin ja tuotteeksi saadaan ALA. Glutamiinihaposta lähtevä reitti tarvitsee kolme erillistä entsyymiä tuottamaan ALA. Kaksi ALA-molekyyliä liittyvät toisiinsa ALA-dehydrataasin (ALAD) katalysoimassa reaktiossa, jossa tuotteeksi saadaan porphobilinogen (PBG). Neljä PBG-molekyyliä polymerisoidaan lineaariseksi preuroporphyrinogen:ksi PBG deaminaasin katalysoimassa reaktiossa. Uroporphyrinogen III syntaasi katalysoi reaktion, jossa lineaarinen tetrapyrroli-rakenne suljetaan yhdistämällä D-rengas A-renkaaseen. Tuotteeksi saadaan uroporphyrinogen III (Raux et al., 2000).

Uroporphyrinogen III on synteeseireitin haarautumiskohta, josta lähtee kobalamiinin oma synteesi. Kobalamiinin aerobiseen synteisiin tarvittavia geenejä kutsutaan cob-geeneiksi ja ne ovat järjestyneet operoneihin. Uroporphyrinogen III metyyli transferaasi (cobA) metyloi uroporphyrinogen III:n C-2 aseman käyttäen SAM:a metyyliryhmän luovuttajana ja tuotteeksi saadaan precorrin-1. CobA metyloi precorrin-1:n C-7 aseman samaan tapaan kuin aiemmin ja tuotteeksi saadaan precorrin-2. Kolmas metyyliryhmä, jonka luovuttaa SAM, liitetään cobI entsyymillä C-20 asemaan ja tuotteeksi tulee precorrin-3A. Precorrin-3B muodostetaan precorrin-3A:sta cobG entsyymillä katalysoimassa reaktiossa. CobJ katalysoi seuraavan reaktion, jossa muodostuu precorrin-4, jolla on uusi metyloitu asema C-17. CobM katalysoi reaktion, jossa metyloidaan C-11 asema ja muodostuu precorrin-5. CobF katalysoi precorrin-6A:n muodostumisen, josta on lähtenyt metylaatio C-20 asemasta ja uusi metylaatio on C-1 asemassa. CobK katalysoi precorrin-6B:n muodostumisen, jossa C-19 asemaan tulee hydridi. CobL katalysoi seuraavan reaktion, jossa metyloidaan C-5 ja C-15 asemat sekä C-12 aseman asetaatin dekarboksylaatio, jolloin muodostuu precorrin-8x, joka on metyloitunut C-1, -2, -5, -7, -11, -12, -15 ja -17 asemissa. Viimeisessä corrin-rakenteen synteetin reaktiossa cobH

katalysoi hydrogenobyriinichapon muodostumisen, jossa metyyliryhmä siirtyy C-11 asemasta C-12 asemaan (Battersby, 1994; Raux et al., 2000).

Koboltti-ioni lisätään seuraavaksi corrin-rakenteeseen, tosin ensin hydrogenobyriinichappo muutetaan cobB:n katalysoimana hydrogenobyriinichappo a,c-diamidiksi. CobN,S,T-entsyymikompleksi katalysoi kobolttin lisäämisen corrin-rakenteeseen ja tuotteeksi saadaan cob(II)yrnichappo a,c-diamidi, joka pelkistetään cob(I)yrnichappo a,c-diamidi:ksi cob(II)reduktaasin toimesta. CobO entsyymi katalysoi adenosyyliryhmän lisäämisen koboltti-ioniin ja tuotteeksi saadaan ado-cobyriinichappo a,c-diamidi. Tämä tuote yhdistää aerobisen ja anaerobisen synteesireitit, joiden merkittävimmät erot ovat hapen tarve ja kobolttin lisäyksen ajankohta. CobQ katalysoi jäljellä olevien sivuketjujen amidaation ja tuotteeksi saadaan ado-cobyriinichappo. CobCD α katalysoi aminopropanolin lisäyksen D-renkaassa jäljellä olevaan asetaattisivuketjuun ja muodostunut tuote on ado-cobinamide. CobP katalysoi fosfaatin lisäyksen aminopropanoliin ja muodostunut tuote on ado-GDP-cobinamide. CobV katalysoi viimeisen reaktion, jossa fosfaattiin sitoutuu α -ribazole, jonka typpiatomi muodostaa sidoksen koboltti-ioniin. Muodostunut tuote on 5'-deoksiadenosyylikobalamiini (Raux et al., 2000).

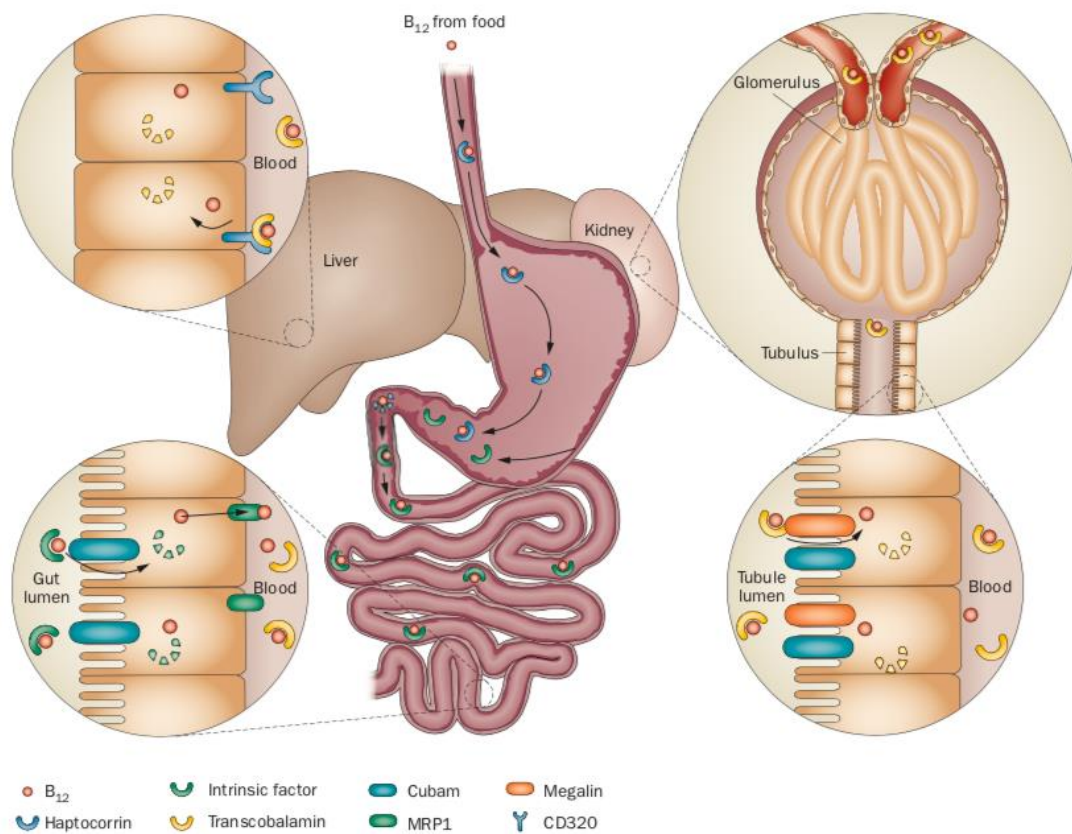


Kuva 3. 5'-deoksiadenosyylikobalamiinin yksinkertaistettu synteesireitti. (Tiedot lähteestä (Raux et al., 2000)).

3.3.Kuljetus

Ruoasta saadaan B₁₂-vitamiinia ja se kuljetetaan ruuansulatuskanavan läpi soluille hyödynnettäväksi. Tämä kuljetusreitti hyödyntää useita kuljetusproteiineja. B₁₂-vitamiinin imeytyminen ruuansulatuskanavasta tapahtuu ohutsuolen lopussa. Tämä kuljetusreitti ruoasta soluille on havainnollistettu kuvassa 4 (Bender et al., 2018; Nielsen et al., 2012).

Ruoassa B₁₂-vitamiini on sitoutunut proteiineihin, joista se vapautetaan mahanesteen ja pepsiinin avulla. Vitamiinin vapautus tapahtuu ylemmässä maha-suolikanavassa, jossa se sitoutuu haptocorrin-kuljetusproteiiniin (HC) suojaten sen mahalaukun happamalta ympäristöltä. Pohjukaissuolessa haiman erittämät entsyymit hajottavat HC-kuljetusproteiinin ja B₁₂ vapautuu HC-kuljetusproteiinista. Vapaan B₁₂-vitamiinin sitoo sisäinen tekijä (IF), jota erittävät mahalaukun seinämän katesolut. Pohjukaissuolen proteolyttiset entsyymit eivät pysty hajottamaan sisäistä tekijää. B₁₂ -sisäinen tekijä -kompleksi sitoutuu ohutsuolen loppupäässä cubam-reseptoriin, joka on spesifinen tälle kompleksille. Koko kompleksi otetaan endosytoosilla ohutsuolen enterosyyttiin sisään. Enterosyytissä B₁₂-IF-kompleksi hajotetaan lysosyymissä ja B₁₂ vapautuu. B₁₂ voidaan erittää ulos solusta basolateraaliseläpinnalta plasmassa vapaa ABC transportteri multidrug resistance protein 1:n (MRP1) kautta. Plasmassa vapaa B₁₂ sitoutuu transkobalamiini-kuljetusproteiiniin (TC), joka toimittaa B₁₂:sta kudoksille. B₁₂-transkobalamiini sitoutuu transmembraaniseen CD320-reseptoriin, joka esiintyy lähes kaikissa kudoksissa. B₁₂-TC-kompleksi otetaan soluihin endosytoosilla. Tosin esimerkiksi munuaisissa CD320-reseptorin sijaan B₁₂-TC-kompleksi sitoutuu megalin-reseptoriin, joka on sijoittunut proksimaalisten tubulien apikaalisellepinnalle. Proksimaalisissa tubuleissa esiintyy myös cubam-reseptorin toiminnalliset alayksiköt ja ne ovat vuorovaikutuksessa megalin-reseptorin kanssa. Megalin-reseptoria tarvitaan B₁₂-vitamiinin sekä useiden muiden plasman proteiinien takaisinimeytymiseen munuaisissa (Nielsen et al., 2012; Storm et al., 2013).



Kuva 4. B₁₂-vitamiinin kuljetus ruoasta soluille kuljetusproteiinien avulla. B₁₂-vitamiinia kuvataan oranssilla pallolla, sininen puolikaari kuvaa haptocorrin-kuljetusproteiinia, vihreä puolikaari kuvaa sisäistä tekijää, keltainen puolikaari kuvaa transkobalamiinia, sininen soikea kalvolla oleva muoto on cubam-reseptori, vihreä soikea kalvolla oleva muoto on multidrug resistance protein 1, oranssi soikea kalvolla oleva muoto on megalin-reseptori ja sininen y:n muotoinen kalvolla oleva muoto on CD320-reseptori. (Tiedot lähteestä Nielsen et al., 2012).

3.4.1. Haptocorrin, Sisäinen tekijä ja Transkobalamiini

Haptocorrin sitoo B₁₂-vitamiinia ja sitä esiintyy muun muassa syljessä, mahanesteessä ja plasmassa. Haptocorrin on kooltaan 60 kDa ja sitä on glykolysoitu huomattavasti. Haptocorrin sitoo B₁₂-vitamiinin lisäksi sen johdannaisia (Combs, 2012; Nielsen et al., 2012). Geeni, joka koodaa HC:ta sijoittuu ihmisellä kromosomiin 22 (Mathews et al., 2007).

Sisäinen tekijä on tärkeä B₁₂-vitamiinin kuljetusproteiini, koska nämä kaksi yhdistettä kiinnittyvät toisiinsa muodostaen kompleksin, joka vaaditaan kiinnittymään ohutsuolessa cubam-reseptoriin. Cubam-reseptorin avulla B₁₂-vitamiini pääsee soluun. Cubam ei tunnista

vapaata B₁₂-vitamiinia tai vapaata sisäistä tekijää, joten kompleksin muodostuminen on ainoa tapa saada B₁₂ sisään soluun (Nielsen et al., 2012). Sisäinen tekijä ihmisellä on kooltaan 60 kDa ja koostuu 399 aminohaposta ja lisäksi sisäinen tekijä on glykosyloitu merkittävästi. Sisäistä tekijää koodaava geeni ihmisellä on kromosomissa 22. Sen rakenne koostuu kahdesta alayksiköstä, joiden rajapinnalle kiinnittyy B₁₂-vitamiini. α -alayksikkö koostuu yhteen kietoutuneista α -helikseistä ja β -alayksikkö koostuu β -levyistä (Mathews et al., 2007).

Transkobalamiini on kolmas B₁₂-vitamiinin kuljetusproteiini ja se muistuttaa rakenteeltaan sisäistä tekijää. TC:n α -alayksikkö koostuu 300 aminohaposta ja IF:n tapaan muodostavat yhteen kietoutuneita kaksoiskierteitä. TC:n β -alayksikkö koostuu 100 aminohaposta ja ne muodostavat kahdeksan β -levyä ja yhden α -heliksin. Ihmisen TC:n alayksiköt yhdistää yhdeksän aminohappoa pitkä joustava liitos. TC:tä ei ole glykosyloitu ja sitä koodaava geeni on kromosomissa 11, toisin kuin HC:lla ja IF:llä. B₁₂-vitamiini sitoutuu TC:n kahden alayksikön rajapinnalle samoin kuin IF:ssä (Mathews et al., 2007; Wuerges et al., 2006).

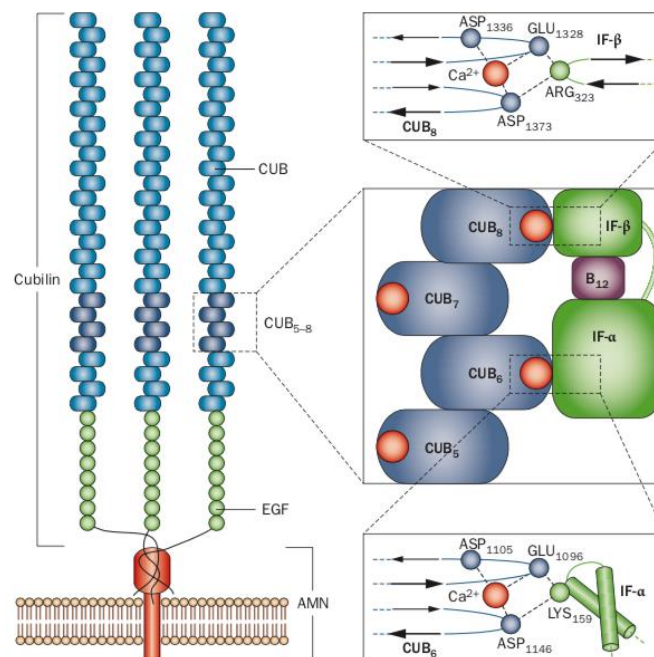
3.4.2. Cubam-reseptori

Cubam-reseptori koostuu kahdesta proteiinista, jotka ovat kubiliini (CUBN) ja amnionless (AMN). Kuvassa 5. on esitetty cubam-reseptorin rakenne. Kubiliini on osittain kalvolle kiinnittynyt reseptorin osa ja sen koko on 460 kDa. AMN on reseptorin solukalvon läpäisevä osa ja sen koko on 48 kDa. Cubam esiintyy absorboivan epiteelin apikaalisella membraanilla kuten munuaisten proksimaalisissa tubuleissa ja ohutsuolen loppupäässä. Kubiliinin C-terminaali yhdistyy AMN-proteiiniin ja kubiliini haarautuu kolmeen osaan N-terminaalissa. Kubiliinin kaikki haarautuneet osat alkavat kahdeksalla epidermaalaisella kasvutekijällä (EGF) ja jokaiseen haarautuneeseen kubiliinin osaan on yhdistyneenä 27 CUB-alayksikköä. B₁₂-sisäinen tekijä -kompleksin sitoo kubiliinin CUB 5-8 alayksiköt, joista CUB 6 ja 8 alayksiköt tunnistavat tämän kompleksin. CUB 6 reagoi sisäisen tekijän α -alayksikön ja CUB 8 reagoi sisäisen tekijän β -alayksikön kanssa. Molemmassa vuorovaikutuskohdissa kalsiumioni sijoittaa kubiliinista kaksi negatiivisesti varautunutta aminohappoa siten, että ne ovat suorassa yhteydessä sisäisen tekijän positiivisesti varautuneeseen aminohappoon (Nielsen et al., 2012).

Kubiliinin kolme haarautunutta ketjua muodostavat yhteen kietoutuneen β -kaksoiskierteisen rakenteen N-terminaalissa. Jokaisen haarautuneen ketjun päässä on β -hiusneula (β -hairpin) rakenne. Pituudeltaan rakenne on 80 Ångströmiä (Å) ja sen läpimitta on

30 Å. C-terminaalissa kolme haarautunutta kubiliiniketjua muodostavat coiled coil -rakenteen, joka sitoutuu amnionless:n N-terminaaliin (Larsen et al., 2018).

Amnionless:n rakenne voidaan eritellä useampaan osaan. Amnionless:n sytoplasmisen osa on pituudeltaan 60 Å ja se sisältää kaksi signaalisekvenssiä adaptoriproteiineille. Signaalisekvenssi on muotoa Phe-X-Asn-Pro-X-Phe, jossa X merkitsee adaptorin sitoutumiskohdan. Signaalisekvenssin avulla ligandi voidaan ottaa klatriiniin ympäröimiin kalvorakkuloihin ja solun sisään. Sytoplasmisen osa yhdistyy solukalvon läpäisevään osaan, joka yhdistyy SEA-alayksikköön solun ulkopuolella. SEA-alayksikön rakenne koostuu $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -laskoksista ja SEA jatkuu kysteiniirikkaalla alueella, jolla ei ole selvää sekundäärirakennetta lukuun ottamatta yhtä α -kaksoiskierrettä. Amnionless:n N-terminaaliosassa ovat kaksi viimeistä alayksikköä β -heliksi 1 ja β -heliksi 2. Molemmat kaksoiskierrerakenteet kiertyvät oikealle ja rakenteet muistuttavat ylösalaisin käännettä kolmekulmaista pyramidia, joiden keskukset ovat hydrofobisia. β -heliksi 2 yhdistyy kysteiniirikkaaseen alueeseen ja sen hydrofobinen keskus on suojattu kahdella α -heliksillä. β -heliksi 1 ja β -heliksi 2 yhdistyvät toisiinsa, tosin β -heliksi 1 on vuorovaikutuksessa kubiliinin kanssa (Larsen et al., 2018).



Kuva 5. Cubam-reseptorin yksinkertaistettu rakenne. Kubiliinin CUB-alayksiköt ovat sinisellä ja tummansinisellä ovat CUB 5-8 alayksiköt, jotka sitovat IF-B₁₂-kompleksin. Vihreällä on havainnollistettu EGF-toistojaaksot ja punaisella AMN-proteiini. Kuvassa on havainnollistettu sisäisen tekijän rooli reseptoriin sitoutumisessa kalsiumionin läsnä ollessa. (Tiedot lähteestä (Nielsen et al., 2012)).

3.4.3. Multidrug resistance protein 1

Multidrug resistance protein 1 (MRP1) tunnetaan myös nimellä ATP-binding cassette (ABC)-drug transporter (ABCC1). MRP1 esiintyy ei-polarisoiduissa soluissa ja ohutsuolen epiteelin polarisoitujen solujen basolateraalaisella pinnalla. MRP1:n avulla voidaan kuljettaa vapaata B₁₂-vitamiinia sytoplasmasta plasmaan (Beedholm-Ebsen et al., 2010). MRP1 on kooltaan 190 kDa ja se koostuu kahdesta solukalvon läpäisevästä proteiinin osasta (membrane-spanning domain, MSD), joiden jatkeina ovat nukleotidien sitoutumiskohta (nucleotide binding domain, NBD). Molemmat MSD-alayksiköt koostuvat kuudesta solukalvon läpäisevästä α -heliksistä ja NBD-osat ovat solukalvolla lähellä sytoplasmaa. MRP1:llä on vielä kolmas MSD-alayksikkö, jossa on viisi solukalvon läpäisevää osaa, joista yhdellä on ylimääräinen N-terminaali solun sisällä (Rosenberg et al., 2001).

3.4.4. CD320-reseptori

CD320-reseptori kuuluu low-density lipoprotein receptor (LDLR) perheeseen, jonka jäsenillä on tärkeitä fysiologia toimintoja esimerkiksi kolesterolin endosytoosi soluihin. CD320-reseptoria hyödynnetään, kun B₁₂-vitamiinia otetaan soluun TC-B₁₂-kompleksin muodossa ja CD320-reseptori on hyvin spesifinen TC-B₁₂-kompleksille. N-terminaalinen osa CD320-reseptorissa on solun ulkopuolella ja se koostuu kahdesta LDLR-A-alayksiköstä, joita yhdistää EGF:n kaltainen alayksikkö. Toinen LDLR-A-alayksikkö on yhteydessä solukalvon läpäisevään α -heliksiin ja solun sisällä sijaitsee proteiinin C-terminaali, joka on yhteydessä solukalvon läpäisevään osaan. Solun ulkopuolinen osa sitoo TC-B₁₂-kompleksin vain sen α -alayksiköstä reseptoriin ja lisäksi CD320 tarvitsee kalsiumioneja toimiakseen (Alam et al., 2016).

3.4.5. Megalin-reseptori

Megalin-reseptori kuuluu LDLR-perheeseen kuten CD320. Megalin:n primäärinen rakenne on 4600 aminohappoa ja on kooltaan 600 kDa. Megalin-reseptoria koodaava geeni sijaitsee kromosomissa 2. Megalin on tyypin 1 kalvoproteiini, joten sen N-terminaali on solun ulkopuolella ja C-terminaali solun sisäpuolella. Solun ulkopuolinen osa koostuu neljästä LDLR-A-toistojaksosta, jotka ovat kysteiinirikkaita. Nämä toistojaksot muodostavat sitoutumiskohdat ligandille ja niitä erottavat 17 EGF:n kaltaista toistojaksoa sekä kahdeksan

spacer-aluetta, joissa on YWTD-toistojaksoja. Näitä toistojaksoja on myös ennen solukalvon läpäisevää 22 aminohapon osaa. Solun sisäpuolella C-terminaalinen osa on 213 aminohappoa, joka sisältää useita SH3-alueita, yhden SH2-alueen, kaksi NPXY-sekvenssiä ja yhden NPXY:n kaltaisen sekvenssin (Christensen and Birn, 2002).

4. B₁₂-vitamiinin puute

B₁₂-vitamiinin puute johtuu sen liian vähäisestä saannosta, imeytymishäiriöstä tai B₁₂-IF-reseptorien viallisesta toiminnasta. Kasvissyöjät kuuluvat riskiryhmään, jolle voi kehittyä B₁₂-vitamiinin puute, sillä he eivät käytä eläinperäisiä tuotteita. Keski-ikäiset ja vanhukset kuuluvat B₁₂-vitamiinin puutteen riskiryhmään kasvissyöjien kanssa. B₁₂-vitamiinin puute on harvinainen vauvoilla sekä Lapsilla ja nuorilla, jotka syövät länsimaisen ruokavalion mukaan (Bjørke Monsen and Ueland, 2003; Hvas and Nexø, 2006).

B₁₂-vitamiinin puutteen yksi oire on megaloblastinen anemia, jossa punasolujen määrä on laskenut ja punasolujen koko on kasvanut. Lisäksi megaloblastiseen anemiaan liittyy huimaus ja väsymys. Puutteeseen liittyy myös neurologisia oireita, joita ovat käsien ja jalkojen puutuminen, masennus, keskittymisvaikeudet, huono muisti, ärtyvyys, dementia, psykoosi ja mania. Muita oireita ovat hedelmättömyys, glossiitti ja valkopälvi. Glossiitti on tulehdus kielessä ja valkopälvi johtuu ihon väriainetta tuottavien solujen hyljinnästä (Combs, 2012; Nielsen et al., 2012).

Puute voidaan määrittää hyödyntäen B₁₂-vitamiinin puutteen biokemiallisia merkkiaineita. Yleisiä biokemiallisia merkkiaineita puutteelle ovat plasman kobalamiinit, joiden lisäksi käytetään metyyylimalonyylihappoa (MMA), totaali homokysteiiniä (tHcy) ja transkobalamiinia. Homokysteiini on hyvin spesifinen merkkiaine, koska B₁₂-vitamiinin poissa ollessa homokysteiiniä ei muuteta metioniiniksi metioniinisyntaasin avulla ja täten homokysteiiniä kertyy plasmaan. MMA on toinen spesifinen merkkiaine, sillä metyyylimalonyyli-KoA-mutaasin toimimattomuus kobalamiinin puutteessa johtaa metyyylimalonyyli-KoA:n hydrolyysiin tuottaen MMA:ta, joka kertyy plasmaan, seerumiin ja virtsaan (Bjørke Monsen and Ueland, 2003; Hvas and Nexø, 2006).

B₁₂-vitamiinin imeytymishäiriö johtuu mahalaukun seinämän katesolujen puutteellisesta sisäisen tekijän erityksestä. Pernisioosi anemia on yksi imeytymishäiriön aiheuttaja, joka syntyy autoimmuunisen anemian (krooninen tyypin A atrofinen gastriitti) seurauksena. Pernisioosi anemiassa mahan katesolut surkastuvat, mikä johtaa IF:n tuotannon loppumiseen ja suolahapon tuotannon vähenemiseen. Hapottomassa ympäristössä B₁₂-

vitamiinia ei voida vapauttaa proteiineista ja ilman sisäistä tekijää ohutsuolessa ei voida B₁₂-vitamiinia ottaa soluihin sisään. Tuloksena on B₁₂-vitamiinin puute (Combs, 2012).

Helicobacter pylori -tulehdus (krooninen tyypin B atrofinen gastriitti) on toinen imeytymishäiriön aiheuttaja. Tulehdus aiheuttaa vahinkoa enimmäkseen mahaan, jonka seurauksena mahassa ei enää tuoteta suolahappoa, mikä helpottaa bakteerien lisääntymistä suolistossa. Suolahapon puutteessa B₁₂-vitamiinia ei vapauteta proteiineista ja täten *Helicobacter pylori* -tulehdus aiheuttaa B₁₂-vitamiinin puutteen (Combs, 2012).

Mahalaukun sairaudet voivat olla imeytymishäiriön aiheuttajia ja vaikuttaa B₁₂-vitamiinin hyödyntämiseen. Mahalaukun sairaudessa suolahapon ja IF:n tuottaminen on vähentynyt, koska mahan katesolut ovat vahingoittuneet. Tämä voi johtaa hypokromiseen anemiaan (hypochromic anemia) tai megaloblastiseen anemiaan mahalaukun poiston läpikäyvillä ja non-autoimmuunissa atrofisessa gastriitissa, joiden tuloksena on B₁₂-vitamiinin puute (Combs, 2012).

Protonipumpun estäjien krooninen käyttö on neljäs imeytymishäiriön aiheuttaja. Se aiheuttaa hapottoman ympäristön mahalaukkuun, koska protonipumpun estäjät estävät katesoluja tuottamasta suolahappoa. Hapottomassa ympäristössä proteiineista ei voida irrottaa B₁₂-vitamiinia, joten tuloksena on sen puute (Combs, 2012).

5. Imerslund-Gräsbeck syndrooma

Imerslund-Gräsbeck syndrooma (IGS) on autosomaalinen resessiivinen geneettinen häiriö, joka estää B₁₂-vitamiinin imeytymisen. IGS aiheutuu mutaatioista kahdessa cubam-reseptoria koodaavissa geeneissä. Nämä geenit ovat CUBN ja AMN. Yleisimpiä oireita IGS:ssa ovat proteiinin liiallinen erittyminen virtsaan, toistuvat tulehdukset ja megaloblastinen anemia. IGS on alun perin diagnosoitu Suomessa ja Norjassa samaan aikaan. Myöhemmin tapauksia on esiintynyt ympäri maailmaa, tosin tapaukset on voitu diagnosoida väärin IGS:ksi. Mutaatio sisäistä tekijää koodaavassa geenissä (GIF) aiheuttaa IF:n puutteen (IFD), joka johtaa B₁₂-vitamiinin puutteeseen. Tapaukset voivat olla joko IFD tai IGS, mutta ne ovat vaikeasti erotettavissa (Storm et al., 2013).

5.1.CUBN

Mutaatiot kubiliinin geenissä ovat vallitsevia Suomessa toisin kuin Norjassa. Kubiliinia koodaava geeni sijoittuu ihmisellä kromosomiin 10 ja se koostuu 3623 aminohaposta. CUBN:ssa on havaittu kolme isoa poistomutaatiota ja 30 pistemutaatiota. Kubiliinilla on 67 eksonia ja IGS:n mutaatiot ovat sijoittuneet 1-28 eksoneihin. Eksonit 1-28 koostuvat amnionless-proteiinin sitoutumiskohdasta, EGF toistojaksoista ja B₁₂-IF-kompleksin sitoutumiskohdista. Eksoneissa 29-67 ei ole havaittu IGS mutaatioita ja tämä havainto viittaa siihen, että mutaatiot tällä alueella eivät vaikuta B₁₂-vitamiinin imeytymiseen (Storm et al., 2013; Tanner et al., 2012).

Kubiliinin yleisin mutaatio on suomalainen perustajamutaatio eksonissa 27. Mutaatio on kohdistunut 1297 proliiniin, joka on hyvin konservoitunut ja sijaitsee CUB 8 alayksikössä. Tässä mutaatiossa yksi nukleotidi on vaihtunut, mikä johtaa aminohapon vaihtumiseen proliinista leusiiniksi. Kubiliinilla on muitakin mutaatioita, jotka ovat etnisesti spesifisiä. CUBN:n kolmesta poistomutaatiosta yksi poistaa sekvenssin 5'-päästä eksoniin 27 asti ja kaksi muuta poistavat koko geenin. Loput mutaatiot ovat joko poistomutaatioita tai nukleotidin vaihtumismutaatioita (Storm et al., 2013; Tanner et al., 2012).

42 N-glykosylaatio kohta on ennustettu kubiliinille sekä amnionless-riippuvaisia glykosylaatio kohtia on löydetty kubiliinista. N-glykosylaatio on tärkeää proteiinikompleksien muodostukseen, proteiinien laskostumiseen, solunsisäiseen kuljetukseen ja pysyvyyteen. Kubiliini- ja amnionless-proteiinien solunsisäiseen kuljetukseen vaaditaan N-glykosylaatioita kubiliinin CUB-alayksikköihin. Kubiliini ja amnionless ovat toisistaan riippuvaisia ja amnionless-välitteinen glykosylaatio kubiliiniin tarvitaan, jotta molemmat voivat ilmentyä solukalvolla. Mutaatiot CUBN:n geenissä estää cubam-reseptorin pääsyn pois endoplasmiselta kalvolta, koska mutatoitunut kubiliini ei läpäissyt väärin laskostuneiden proteiinien tarkistusta (Udagawa et al., 2018).

Kubiliinin avulla soluihin kuljetetaan B₁₂-vitamiinia ja munuaisten proksimaalisissa tubuleissa kubiliinin avulla verenkiertoon imeytyy takaisin apolipoproteiiniA-I/high-density lipoproteiinia (apoA-I/HDL) ja albumiinia. Proksimaalisissa tubuleissa näiden yhdisteiden endosytoosi tapahtuu kubiliini-megalin-kompleksin kautta. Kubiliinin puute aiheuttaa albumiinin ja apoA-I/HDL:n lisääntyneen määrän virtsassa ja täten voi aiheuttaa niiden puutteen (Aseem et al., 2014).

5.2.AMN

Norjassa on huomattava määrä mutaatioita amnionless geenissä, joka on sijoittunut ihmisellä kromosomiin 14 ja se koostuu 453 aminohaposta. Perustajavaikutus on vallitseva AMN mutaatioissa, joita on löydetty 27 ja ne sijoittuvat geenin koko pituudelle. Solukalvon läpäisevä osa aminohappoketjussa ja sitä reunustavat GC-rikkaat alueet ovat suosittuja kohtia mutaatioille. Yleisin AMN mutaatio tapahtuu mRNA:lle, jonka muokkauksessa eksoni 4 jätetään välistä ja täten valmiista mRNA:sta puuttuu yksi eksoni. Toiseksi yleisimmässä AMN mutaatioissa eksoni 9 menetetään, mikä johtuu mRNA:n sekvenssin erilaisesta koodauksesta, koska nukleotidiketjusta on poistettu 15 emäsparin osa (Tanner et al., 2012).

Amnionless-proteiinia tarvitaan suolistossa ja munuaisissa kubiliinin sijoittamiseen solukalvolle. Mutaatio AMN geenissä, joka poistaa osan sekvenssistä, voi aiheuttaa sekä B₁₂-vitamiinin puutetta että proteiinien kertymistä virtsaan, sillä cubam-reseptori ei toimi (Tanner et al., 2012).

5.3.GIF

Sisäistä tekijää koodaava geeni sijoittuu kromosomiin 11 ja se koostuu 417 aminohaposta. Mutaatiot GIF geenissä aiheuttavat sisäisen tekijän puutteen. Useat IFD:n mutaatiot vaikuttavat silmukointiin ja mutaatioita on koko geenin pituudella. GIF:ssä on havaittu 18 mutaatiota ja yleisin mutaatio on silmukointikohtamutaatio ensimmäisessä intronissa. IGS ja IFD molemmat johtavat B₁₂-vitamiinin puutteeseen, tosin proteiinien kertymistä virtsaan ei tapahdu sisäisen tekijän puutteessa (Tanner et al., 2012). IFD ja IGS ovat hankalia erottaa toisistaan, jos IGS:ssa ei esiinny proteiinien kertymistä virtsaan. Nämä kaksi voidaan erottaa Schillings-testin avulla, joka hyödyntää radioaktiivista kobalamiinia. Testissä mitataan radioaktiivisen kobalamiinin määrää virtsassa, mikä kertoo sen imeytymisestä elimistöön. IF:n puutteessa radioaktiivinen kobalamiini kertyy virtsaan, toisin kuin IGS:ssa näin ei tapahdu. Schillings-testiä ei enää kuitenkaan ole mahdollista käyttää, joten IFD ja IGS erotetaan toisistaan geneettisen analyysin avulla, joka huomioi GIF-, CUBN- ja AMN-geenit (Storm et al., 2013; Tanner et al., 2005).

6. Kirjallisuusviitteet

- Alam A, Woo J-, Schmitz J, Prinz B, Root K, Chen F, et al. (2016) Structural basis of transcobalamin recognition by human CD320 receptor. *Nature Communications* 7.
- Aseem O, Smith BT, Cooley MA, Wilkerson BA, Argraves KM, Remaley AT, et al. (2014) Cubilin maintains blood levels of HDL and albumin. *Journal of the American Society of Nephrology* 25(5): 1028-1036.
- Battersby AR (1994) How nature builds the pigments of life: The conquest of vitamin B 12. *Science* 264(5165): 1551-1557.
- Beedholm-Ebsen R, Van De Wetering K, Hardlei T, Nexø E, Borst P and Moestrup SK (2010) Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood* 115(8): 1632-1639.
- Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW and Weil PA (2018) *Harper's Illustrated Biochemistry*. New York, N.Y: McGraw-Hill Education LLC.
- Bjørke Monsen AL and Ueland PM (2003) Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence. *American Journal of Clinical Nutrition* 78(1): 7-21.
- Christensen EI and Birn H (2002) Megalin and cubilin: Multifunctional endocytic receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3(4): 256-266.
- Combs GF (2012) *The Vitamins*. London: Academic Press.
- Dong S, Padmakumar R, Banerjee R and Spiro TG (1999) Co-C bond activation in B12-dependent enzymes: Cryogenic resonance Raman studies of methylmalonyl-coenzyme a mutase. *Journal of the American Chemical Society* 121(30): 7063-7070.
- Hodgkin DC, Kamper J, MacKay M, Pickworth J, Trueblood KN and White JG (1956) Structure of vitamin B12. *Nature* 178(4524): 64-66.
- Hvas A- and Nexø E (2006) Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency. An update. *Haematologica* 91(11): 1506-1512.
- Jensen KP and Ryde U (2003) Theoretical Prediction of the Co-C Bond Strength in Cobalamins. *Journal of Physical Chemistry A* 107(38): 7539-7545.

Larsen C, Etzerodt A, Madsen M, Skjødt K, Moestrup SK and Andersen CBF (2018) Structural assembly of the megadalton-sized receptor for intestinal vitamin B12 uptake and kidney protein reabsorption. *Nature Communications* 9(1).

Lenhert PG and Hodgkin DC (1961) Structure of the 5,6-dimethylbenzimidazolylcobamide coenzyme. *Nature* 192(4806): 937-938.

Mathews FS, Gordon MM, Chen Z, Rajashankar KR, Ealick SE, Alpers DH, et al. (2007) Crystal structure of human intrinsic factor: Cobalamin complex at 2.6-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(44): 17311-17316.

Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CB, Nexø E and Moestrup SK (2012) Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 9(6): 345-354.

Raux E, Schubert HL and Warren MJ (2000) Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12): A bacterial conundrum. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57(13-14): 1880-1893.

Rosenberg MF, Mao Q, Holzenburg A, Ford RC, Deeley RG and Cole SPC (2001) The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1): Crystallization and single-particle analysis. *Journal of Biological Chemistry* 276(19): 16076-16082.

Rossi M, Glusker JP, Randaccio L, Summers MF, Toscana PJ and Marzilli LG (1985) The Structure of a B12 Coenzyme: Methylcobalamin Studies by X-ray and NMR Methods. *Journal of the American Chemical Society* 107(6): 1729-1738.

Shemin D and Bray RC (1964) *The Biosynthesis of the Corrin Structure of Vitamin B12*.

Storm T, Zeitz C, Cases O, Amsellem S, Verroust PJ, Madsen M, et al. (2013) Detailed investigations of proximal tubular function in Imerslund-Gräsbeck syndrome. *BMC Medical Genetics* 14(1).

Tanner SM, Sturm AC, Baack EC, Liyanarachchi S and De La Chapelle A (2012) Inherited cobalamin malabsorption. Mutations in three genes reveal functional and ethnic patterns. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 7(1).

Tanner SM, Li Z, Perko JD, Öner C, Çetin M, Altay Ç, et al. (2005) Hereditary juvenile cobalamin deficiency caused by mutations in the intrinsic factor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(11): 4130-4133.

Udagawa T, Harita Y, Miura K, Mitsui J, Ode KL, Morishita S, et al. (2018) Amnionless-mediated glycosylation is crucial for cell surface targeting of cubilin in renal and intestinal cells. *Scientific Reports* 8(1).

Voet D, Voet JG and Pratt CW (2008) *Principles of Biochemistry*. Hoboken, NJ [u.a.]: Wiley.

Wuerges J, Garau G, Geremia S, Fedosov SN, Petersen TE and Randaccio L (2006) Structural basis for mammalian vitamin B12 transport by transcobalmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(12): 4386-4391.