

**APOLIPOPROTEIINI A1 ILMENTYMINEN JA OKSIDATIIVISEEN
FOSFORYLAATIOON OSALLISTUVAT PROTEIINIKOMPLEKSIT**

Seerumi- ja lihaskudosanalyysit kaksosilla

Marianne Montonen

Liikuntalääketieteen pro gradu – tutkielma
Terveystieteiden laitos
Jyväskylän yliopisto
Kevät 2016

TIIVISTELMÄ

Montonen, M. 2016. Apolipoproteiini A1 ilmentyminen ja oksidatiiviseen fosforylaatioon osallistuvat proteiinikompleksit: seerumi- ja lihaskudosanalyysit kaksosilla. Terveystieteiden laitos, Jyväskylän yliopisto, liikuntalääketieteen pro gradu – tutkielma, 54 sivua, 2 liitettä.

HDL-partikkelien merkitys rasva- ja kolesteroliyhdisteiden kuljettajana on tunnettu jo pitkään, mutta viimeaikaiset tutkimustulokset ovat antaneet viitteitä niiden monenlaisista muista tehtävistä elimistössä. Esimerkiksi HDL-partikkelien pääproteiinin, apolipoproteiini A1:n (ApoA1), on arveltu liittyvän luurankolihasproteiinien toimintaan ja esiintyvän myös muissa kudoksissa, kuin maksassa tai seerumissa. Tässä tutkielmassa tarkasteltiin ApoA1-proteiinin sekä oksidatiiviseen fosforylaatioon osallistuvien proteiinien ilmentymistä luurankolihasproteiinissa fyysiseltä aktiivisuudelta eroavilla kaksosilla. Lisäksi tutkittiin, onko seerumin ApoA1-pitoisuudella yhteyttä luurankolihasproteiinien ilmentymiseen osallistuviin proteiineihin.

Työssä käytettiin Jyväskylän yliopiston TwinActive (2007) - tutkimukseen kerättyä kaksosaineistoa (n=20; aktiivisia=10 ja inaktiivisia=10) sekä lihasnäytteistä analysoituja DNA geenisirutuloksia, proteiinien geenien ilmentymisen tarkasteluun. Lisäksi vuosina 2014 – 2016 jäljellä olevista lihasnäytteistä (n=13) tehtiin tätä tutkielmaa varten erillisiä analyysejä kvantitatiivista polymeerasiketjureaktiota sekä Western blot - menetelmää hyödyntäen. Tulosten tilastollinen analysointi toteutettiin IBM SPSS 22 - ohjelmistolla.

Kaksosparien vapaa-ajan liikunnallinen aktiivisuus erosi 30 vuoden ajan keskimäärin 9 MET tuntia/päivä ($p \leq 0,05$). Mann Whitney U-testillä arvioituna, seerumin ApoA1- ja ApoA1/ApoB-suhteessa ei havaittu eroja ryhmien välillä. Sen sijaan ApoA1-geeni ilmentyi kaksosten lihasnäytteissä mRNA-tasolla, mutta ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi ryhmien välillä. Niin ikään ApoA1- ja HDL- partikkelien toimintaan liittyvien reseptorien (ABCA₁, ABCG₁, SR-B₁, HNFα/γ) ja entsyymien geenejä (LCAT, CETP, PLPT, HL, PON_{1,2,3}) ilmentyi kaksosten lihasnäytteissä mRNA-tasolla.

Western blot - määrittelyissä oksidatiiviseen fosforylaatioon liittyvien proteiinien tasoissa ei havaittu eroja ryhmien välillä (n=13). Menetelmä arvioi kuitenkin ainoastaan yhden proteiinin ilmentymistä kussakin kompleksissa. Sen sijaan DNA geenisiruanalyysin perusteella 17 geenin ilmeneminen erosi tilastollisesti merkitsevästi ($p \leq 0,05$) ryhmien välillä (n=20). Aktiivisilla kaksosilla geenien ilmentyminen näytti olevan tehokkaampaa etenkin kompleksin 1 proteiineissa kuin inaktiivisilla kaksosilla. Seerumin ApoA1- muuttujilla ei ollut yhteyttä luurankolihasproteiinien ilmentymiseen (n=13).

Tutkielma osoitti, että ApoA1-geeniä sekä ApoA1- ja HDL-partikkelien toimintaan liittyvien reseptorien ja entsyymien geenejä ilmentyi luurankolihasproteiinissa ihmisillä. ApoA1 ilmentymisen taso oli kuitenkin vähäistä verrattuna muiden tässä työssä tutkittujen geenien ilmentymisen tasoihin. Niin ikään ApoA1 ilmentyminen proteiinitasolla sekä toiminta luurankolihasproteiinissa ihmisillä jäivät ratkaisematta. Fyysisen aktiivisuuden erot näyttivät vaikuttavan luurankolihasproteiinien oksidatiiviseen fosforylaatioon osallistuvien proteiinien ilmentymiseen mRNA-tasolla, samasta perimästä huolimatta. Fyysisellä aktiivisuudella saattaa olla positiivisia vaikutuksia esimerkiksi ikääntymisen mukanaan tuomiin muutoksiin mitokondrioiden proteiinikompleksien rakenteissa. Tässä työssä tehdyt havainnot kaipaavat tarkennusta esimerkiksi solujen toiminnallisia mittauksia hyödyntämällä.

Asiasanat: apolipoproteiini A1, oksidatiivinen fosforylaatio, fyysinen aktiivisuus

ABSTRACT

Montonen, M. 2016. Apolipoprotein A1 gene expression and the protein complexes involved in oxidative phosphorylation: serum and muscle analyses in twin pairs. Department of Health Sciences, University of Jyväskylä, Master's Thesis of Sport and Exercise Medicine, 54 pp, 2 appendices.

The importance of HDL particles as the key components of the reverse cholesterol transport is well known. However recent studies have shown several other functions of HDL particles. For instance apolipoprotein A1 (ApoA1), the main protein of HDL particle has been associated with the components of skeletal muscle. Additionally ApoA1 have been shown to exist in other tissues than liver, or serum. The aim of this study was to investigate the gene expression of ApoA1 in human skeletal muscle. Furthermore the additional purpose of this study was to examine the expression of proteins involved in oxidative phosphorylation, and their association with serum ApoA1 in twin pairs discordant for leisure time physical activity.

The research data of TwinActive study (n=20; active=10 and inactive=10) which was conducted in the University of Jyväskylä in 2007 were utilized in the present study. The participants volunteered to give muscle samples in 2007. DNA microarray results (n=20) which had been carried out in 2008 of these samples were utilized in this study. Additionally separate analyses of the remaining muscle samples (n=13) were carried out with quantitative polymerase chain reaction and Western blot methods. The statistical analysis was carried out utilizing IBM SPSS 22 - software.

Twin pairs had been discordant for physical activity on average 9 MET hours/day ($p \leq 0,05$) over 30 years. There were no difference between the groups in serum ApoA1 and ApoA1/ApoB ratio evaluated by Mann Whitney U - test. However ApoA1 gene was expressed in skeletal muscle samples of all participants at the mRNA level. The expression did not differ significantly between the groups. Additionally specific ApoA1 and HDL receptors (ABCA₁, ABCG₁, SR-B₁, HNF α/γ) and enzymes (LCAT, CETP, PLPT, HL, PON_{1,2,3}) were expressed in skeletal muscles.

Western blot method did not reveal differences in the proteins of oxidative phosphorylation between the groups (n=13). However the method analysed only one protein of each complex. In contrast DNA microarray analysis showed that expression of 17 genes differed significantly between the groups (n=20). Especially genes coding the proteins of complex 1 appeared to be upregulated in the physically active twins (n=10). Serum ApoA1 variables were not associated with proteins of oxidative phosphorylation (n=13).

This study showed that the ApoA1 gene and genes involved in ApoA1 and HDL particles were expressed in human skeletal muscle. However the gene expression level of ApoA1 was low compared to the expression of other genes examined in this study. ApoA1 expression at the protein level as well as function in skeletal muscle in humans remained unresolved. Discordance in physical activity affected the expression of proteins involved in oxidative phosphorylation despite the identical or mainly identical genetic factors. Physical activity may have positive effects to the structures of protein complexes and it may delay age-dependent alterations in oxidative phosphorylation. The results of this study can be clarified for example utilizing the functional measurements of the skeletal muscle cells.

Key words: apolipoprotein A1, oxidative phosphorylation, physical activity

KÄYTETYT LYHENTEET

ABCA ₁	ATP binding cassette A class 1, ApoA1 kalvoreseptori
ABCG ₁	ATP-binding cassette transporter G class 1, HDL kalvoreseptori
ApoA1	Apolipoproteiini A1
ApoB	Apolipoproteiini B
ATP	Adenyylitriofosfaatti
CETP	Cholesteryl ester transfer protein, HDL-partikkeliä muokkaava entsyymi
cDNA	Komplementaarinen DNA, käännetty lähetti-RNA:sta
DNA	Deoksiribonukleinihappo, sisältää solun geneettisen materiaalin
DNA microarray	DNA geenisiruanalyysi, tuhansien geenien ilmentymisen määritysmenetelmä
DZ	Dizygootti kaksospari, jakavat noin puolet geeniperimästään
GAPDH	Glyseraldehydi-3-fosfaatti dehydrogenaasi, tutkielmassa käytetty housekeeping geeni luurankolihasnäytteille
GSEA	Gene set enrichment analysis, geenisarjojen analysointimenetelmä
HDL	High density lipoprotein, HDL-partikkeli
HL	Hepatic lipase, HDL-partikkeliä muokkaava entsyymi
Housekeeping geeni	Geeni, jota tarvitaan solujen perustoimintojen ylläpitoon ja, jota käytetään geenianalyseissä tulosten normalisoimiseen
LCAT	Lecithin cholesterol acyltransferase, HDL-partikkeliä muokkaava entsyymi
LDL	Low density lipoprotein, LDL-partikkeli
Lähetti-RNA	Lähetiribonukleinihappo (mRNA), sisältää kopioidun, tiettyä proteiinia koodaavan DNA materiaalin
MET	Metabolinen ekvivalentti, lepoaineenvaihdunnan kerroin
MET tunti	Fyysistä aktiivisuutta kuvaava määre, joka saadaan fyysisen aktiivisuuteen käytetyn ajan (tunneissa) ja tehon tulona
MET minuutti	Fyysistä aktiivisuutta kuvaava määre, joka saadaan fyysisen aktiivisuuteen käytetyn ajan (minuuteissa) ja tehon tulona
MZ	Monozygootti kaksospari, jakavat saman geeniperimän
PLTP	Phospholipid transfer protein, HDL-partikkeliä muokkaava entsyymi
PON	Paraoxonase, alaluokat 1, 2, 3. HDL-partikkeliä muokkaavia entsyymejä
Pre-β-HDL	Esiaste-HDL, pieni HDL-partikkeli
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction, kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio, mRNA-tason geenien ilmentymisen analysointimenetelmä
RNA	Ribonukleinihappo
SPSS	IBM SPSS 22 Statistics, tilastoanalyysiohjelmisto
SR-B ₁	Scavenger receptor B class 1, HDL kalvoreseptori
VO ₂	Hapenkulutus
VO _{2max}	Maksimaalinen hapenkulutus (elimistön korkein hapenkulutus)
VO _{2peak}	Submaksimaalinen hapenkulutus (elimistön korkein mittaamalla arvioitu hapenkulutus)
Western blot	Proteiinien määritysmenetelmä

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

1 JOHDANTO	1
2 LUURANKOLIHASTEN MITOKONDRIOT	2
2.1 Elektroninsiirtoketju	2
2.2 Oksidatiivinen fosforylaatio	3
3 PROTEIINIEN ILMENTYMISEN MÄÄRITTÄMINEN LUURANKOLIHAKSISTA	4
4 HDL-PARTIKKELI.....	5
4.1 HDL-partikkelin rakenteen muovautuminen	6
4.2 Apolipoproteiini A1	7
5 AEROBINEN KUNTO JA FYYSINEN AKTIIVISUUS	9
5.1 Aerobisen kunnon, fyysisen aktiivisuuden ja liikunnan määrän arvioiminen	9
5.2 Aerobisen liikunnan vaikutukset oksidatiiviseen fosforylaatioon	10
5.3 Aerobisen liikunnan vaikutukset ApoA1:teen	11
5.4 Aerobisen liikunnan vaikutukset oksidatiivisen fosforylaation ja ApoA1 yhteyteen	12
6 KAKSOSAINIESTO LIIKUNTA- JA TERVEYSMUUTTUIEN TARKASTELUSSA	13
7 TUTKIMUSKYSYMYKSET	14
8 MENETELMÄT.....	15
8.1 Tutkimusaineisto.....	15
8.2 Tutkimusaineistosta valitut muuttajat.....	17
8.3 Tilastolliset menetelmät	17
8.4 Laboratoriomenetelmät.....	18
8.4.1 DNA geenisiruanalyysi	19
8.4.2 Proteiiniomuuttujien määrittäminen luurankolihasnäytteistä.....	20
8.4.3 ApoA1 ilmentymisen määrittäminen luurankolihasnäytteistä	21

9 TULOKSET.....	23
9.1 Tutkittavien taustatiedot.....	23
9.2 Seerumin ApoA1-pitoisuus.....	24
9.3 Soluhengitykseen liittyvien proteiinien ilmentyminen lihasnäytteissä.....	25
9.4 Seerumin ApoA1-pitoisuuden yhteys lihasnäytteiden proteiinimäärityksiin	27
9.5 ApoA1-geenin ilmentyminen lihasnäytteissä	28
9.6 ApoA1- ja HDL-partikkeleihin liittyvien geenien ilmentyminen lihasnäytteissä	28
10 POHDINTA	30
10.1 Tutkittavien erot vapaa-ajan fyysisessä aktiivisuudessa	30
10.2 Menetelmien luotettavuus	31
10.3 Perimän merkitys seerumin HDL- ja ApoA1-pitoisuuteen.....	32
10.4 Fyysisen aktiivisuuden erojen merkitys luurankolihasen soluhengitysproteiineihin ..	34
10.5 Seerumin ApoA1 yhteys soluhengitykseen osallistuviin proteiineihin	36
10.6 ApoA1 ilmentyminen kaksosten luurankolihas kudoksissa.....	36
10.7 Muiden valittujen proteiinien ilmentyminen luurankolihas kudoksissa	39
10.7 Jatkotutkimusaiheet	40
LÄHTEET	42
LIITTEET	

1 JOHDANTO

Vuonna 2015 maailman terveysjärjestö arvioi sydän- ja verenkiertoelimistön sairauksien olevan merkittävin kuolinsyy koko maailmassa (World Health Organization 2015). Säännöllisen fyysisen aktiivisuuden ja aerobisen liikunnan on todettu alentavan näiden sairauksien sekä kuolleisuuden riskiä (Kujala 2006) ja vähäisen fyysisen aktiivisuuden puolestaan lisäävän häiriöitä elimistön aineenvaihdunnassa (Booth ym. 2012; Konopka & Haber 2014). Fyysisen aktiivisuuden ohella korkean seerumin HDL-pitoisuuden (high density lipoprotein) on havaittu suojaavan väestöä sydän- ja verenkiertoelimistön sairauksilta sekä liittyvän korkeampaan elinajanodotteeseen (Rivanto & Landmesser 2013; Subedi ym. 2014).

HDL-partikkelien merkitys rasva- ja kolesteroliyhdisteiden kuljettajana on tunnettu jo pitkään, mutta viimeaikaiset tutkimustulokset ovat antaneet viitteitä niiden monenlaisista muista tehtävistä elimistössä (Gordon ym. 2011; Mineo & Shaul 2013; Rye ym. 2016). Muun muassa HDL-partikkelien pääproteiinin, apolipoproteiini A1:n (ApoA1), on arveltu liittyvän luurankolihashen energia-aineenvaihduntaan (Drew ym. 2009; Lehti ym. 2013) ja esiintyvän myös muissa kudoksissa, kuin maksassa tai seerumissa (Zhang ym. 2011). Vaikka havaintoja ApoA1:n yhteydestä luurankolihashudosten toimintaan on esitetty (Gets & Reardon 2010; Lehti ym. 2013), näyttö näiden tekijöiden välillä kaipaava tarkennusta. Esimerkiksi ApoA1:n ilmentyminen luurankolihashudoksissa ihmisillä on jäänyt selventymättä. Toisaalta se, miten fyysinen aktiivisuus tai sen vastakohta vähäinen fyysinen aktiivisuus vaikuttavat seerumin ApoA1-pitoisuuteen tai oksidatiiviseen fosforylaatioon osallistuvien proteiinien ilmentymiseen samasta perimästä huolimatta, ovat kaivanneet tarkennusta.

Tämän työn tarkoituksena oli tutkia ApoA1-geenin ilmentymistä luurankolihashudoksissa sekä yhteyttä oksidatiiviseen fosforylaatioon liittyviin proteiineihin vapaa-ajan fyysiseltä aktiivisuudelta eroavilla kaksosilla. Aineistona käytettiin Jyväskylän yliopiston TwinActive (2007) - tutkimukseen osallistuneilta kaksospareilta (n=20) kerättyä aineistoa sekä tutkielmaa varten tehtyjen lihaskudosnäyteanalyysien (n=13) tuloksia. Kiitän liikuntalääketieteen professori Urho Kujalaa (Jyväskylän yliopisto) aineiston luovuttamisesta tämän tutkielman käyttöön. Suuri kiitos työni asiantuntevasta, inspiroivasta ja luottamuksellisesta ohjaamisesta kuuluu tutkija Maarit Lehdelle (Liikunnan ja kansanterveyden edistämissäätiö, LIKES).

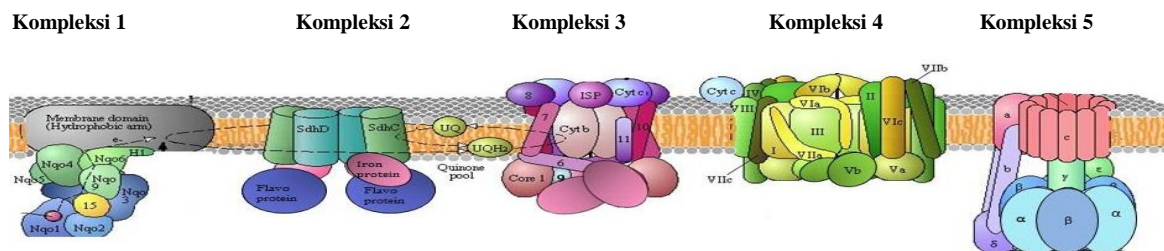
2 LUURANKOLIHASTEN MITOKONDRIOT

Luurankolihasolut ovat keskeisessä roolissa elimistön metabolian säätelyssä vaikuttaen muun muassa elimistön glukoosi- ja rasva-aineenvaihduntaan (Egan & Zierath 2013). Solut voidaan erotella hitaiden, happea käyttävien (tyyppi I) sekä nopeiden, glykolyyttisten (tyyppi IIa, b ja x) solujen pääluokkiin (Picard ym. 2012). Lihaskudoksen energiantuotto-organellit, mitokondriot, sijaitsevat solukalvojen alla tai solujen sisäosissa (Hoppeler & Flück 2003). Ne muokkautuvat metabolisten muutosten sekä erinäisten säätelytekijöiden vaikutuksesta esimerkiksi kasvaen, fuusioituen yhteen tai jakautuen erilleen (Alberts ym. 2008, 815).

Mitokondrioiden proteiinit luovat hienostuneen järjestelmän energiamolekyylien, kuten hiilihydraattien ja lipidien pilkkomiseen. Muuntaessaan näiden yhdisteiden sisältämää energiaa solun käyttöön, mitokondriot hyödyntävät soluille kuljetettuja happimolekyyliä (Duchen 2004). Näihin prosesseihin liittyvien sekä mitokondrioiden sisäkalvolla sijaitsevien proteiinien toimintaa kutsutaan elektroninsiirtoketjeksi (Alberts ym. 2008, 817).

2.1 Elektroninsiirtoketju

Elektroninsiirtoketjun proteiinikompleksit 1-4 (NADH dehydrogenaasi-ubikinoni, sukkinatti dehydrogenaasi, ubikinoni-sytokromi c reduktaasi ja sytokromi c oksidaasi) koostuvat kymmenistä alayksiköistä, joita syntesoidaan joko lihassolun tai sen mitokondrioiden geneettisestä materiaalista. Kompleksi 1 on suurin ja mutaatiot sen alayksiköiden geneissä johtavat vakaviin, mutta toisaalta harvinaisiin sairauksiin (Mimaki ym. 2012). Kompleksit 1, 3 ja 4 osallistuvat elektronien siirtämisen lisäksi vetyionien kuljettamiseen mitokondrioiden sisältä ulkopuolelle (Chan 2006) ja kompleksi 2 toimii osana sitruunahappokiertoa (Sun ym. 2005). Kompleksien välillä liikkuvat ubikinoni Q ja sytokromi c toimivat elektroninsiirtäjinä (Molyneux ym. 2008; Lenaz & Genova 2009) (Kuvio 1).

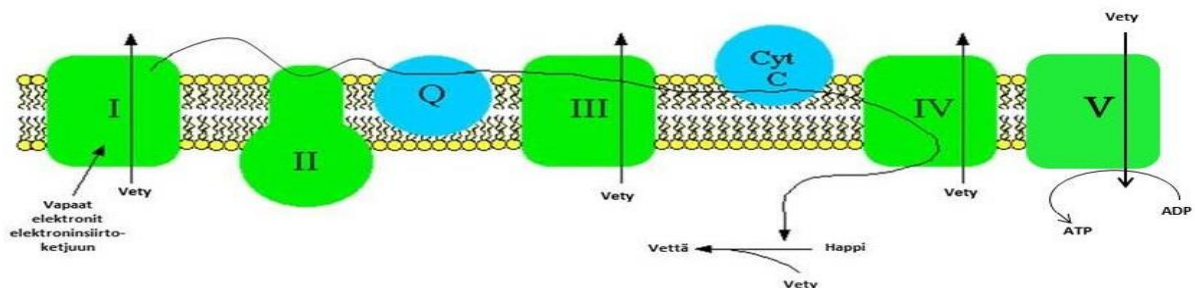


KUVIO 1. Kompleksit 1-5 vasemmalta oikealle (Brockington ym. 2010).

Vähäisen fyysisen aktiivisuuden, ikääntymisen ja metabolisten sairauksien on havaittu vaikuttavan muun muassa elektroninsiirtoketjun proteiinien geenien ilmentymisen vähentymiseen (Chanséaume & Morio 2009). Tämä näyttäisi olevan yhteydessä edelleen luurankolihasen rasva- ja sokeriaineenvaihdunnan häiriöihin (Zierath ym. 2005, 168; Thrush ym. 2013). Epäiltäväksi on kuitenkin jäänyt se, ovatko kompleksien tai niiden alayksiköiden rakenteiden ja toimintojen häiriöt syy vai seuraus metabolisten häiriötilojen kehittymiseen (Boushel ym. 2007; Hirst 2013).

2.2 Oksidatiivinen fosforylaatio

Luurankolihasen oksidatiivinen fosforylaatio eli soluhengitys tapahtuu mitokondrioiden sisäkalvolla, jossa reaktion muodostavat elektroninsiirtoketju sekä ATP-kanavat (kompleksi 5, ATP-syntaasi) (Nelson & Cox 2013, 733). Reaktio käynnistyy, kun elektroninsiirtäjät tuovat pilkkomisprosesseista vastaanotettuja elektroneja mitokondrioiden sisäkalvolle (Sherwood 2007, 33), jossa kompleksit 1-4 sekä elektroninsiirtäjät vastaanottavat ja luovuttavat elektroneja toisilleen. Samalla kompleksit 1, 3 ja 4 siirtävät vetyioneja mitokondrioiden sisäosista kalvojen välitilaan muodostaen kalvojännitteen sisäpuolen ollessa positiivisesti ja ulkopuoli negatiivisesti varautunut (Heino & Vuento 2010, 107, 109) (Kuvio 2).



KUVIO 2. Sisäkalvon elektroninsiirtoketju ja ATP-kanava (I-V), jossa tapahtuu oksidatiivinen fosforylaatio (kuvio Caprette 1996 mukaan). Kompleksit I-IV ja elektroninsiirtäjät kuljettavat elektroneita luovuttaen ne hapelle. Kompleksit I, III ja IV siirtävät vetyioneja kalvojen välitilaan ja ATP-kanavat päästävät vedyt sisätilaan, muodostaen ATP-molekyylejä.

Tapahtumasarjan lopuksi kompleksi 4 luovuttaa elektronit happimolekyyleille. ATPaasit käyttävät puolestaan kalvojännitettä hyväkseen tuottaessaan ATP-energiamolekyylejä solun käyttöön vetyionien virratessa takaisin kanavien läpi mitokondrioiden sisäpuolelle (Heino & Vuento 2010, 107, 109).

3 PROTEIINIEN ILMENTYMISEN MÄÄRITTÄMINEN LUURANKOLIHAKSISTA

Solujen geenit ovat kaksijuosteisissa DNA-molekyyleissä (Jorde ym. 2006, 6) ja geenien ilmentymiseksi kutsutaan tapahtumaa, jossa DNA-juosteesta kopioidaan lähetti-RNA (mRNA) -ketjuja. Lähetti-RNA-juosteista kopioidaan edelleen proteiineja solun käyttöön. Geenien ilmentymistä säätelevät kuitenkin monet tekijät, kuten fyysisen aktiivisuuden määrä (Leskinen ym. 2010). Joissakin olosuhteissa DNA-molekyylistä saatetaan kopioida mRNA-juosteita prosessin etenemättä proteiinitasolle ja tällaista tapahtumaa kutsutaan mRNA- tai molekulaaritason geenien ilmentymiseksi (Hwang ym. 2010).

Ihmisillä lähes kaikki DNA-jaksot on tunnistettu ja ne ovat selattavissa tietokannoista. Useimpien geenien merkitys soluissa ymmärretään kuitenkin edelleen huonosti ja haasteeseen on pyritty vastaamaan geenitekniikan avulla (Monni ym. 2002). Käytetyin menetelmä geenien ilmentymisen tarkasteluun on kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio (qPCR, Q-RTPCR) (Barber ym. 2005). Menetelmän aluksi näytteestä eroteltu mRNA käännetään komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA), jonka jälkeen tällaista, jotakin tiettyä proteiinia koodittavaa mRNA-kopiota voidaan monistaa. Tulosten perusteella arvioidaan, ilmentyykö näytteessä proteiinia koodittavaa mRNA:ta ja, millaisina pitoisuuksina sitä ilmentyy (Ståhlberg ym. 2004). DNA geenisiruilla voidaan puolestaan tarkastella tuhansien geenien ilmentymistä näytteissä samanaikaisesti (Mahoney ym. 2005; Rankinen & Bouchard 2005, 43). Tekniikassa mikroskooppilaseille asetettuihin koettimiin (probet) hybridisoidaan näytteen cDNA:ta ja leimataan se fluorensioivalla leimalla tulosten tarkastelemiseksi (Monni ym. 2002).

Geenien ilmentymistä proteiinitasolla voidaan puolestaan tarkastella esimerkiksi Western blot -menetelmän avulla, jossa proteiineja erotellaan molekyylipainonsa mukaan geelillä ja siirretään kalvolle. Kun kalvoa käsitellään vasta-aineilla, analyysiin valitut proteiinit saadaan esiin tulosten tarkastelua varten (Mahmood & Yang 2012). Mahdollisia vaihteluita näytteen mRNA- tai proteiinitasoissa voidaan puolestaan normalisoida housekeeping geneillä (Barber ym. 2005). Tällöin tuloksia verrataan geeniin, joka ilmentyy tasaisesti solussa sen sisäisistä tai ulkoisista muutoksista huolimatta (Zhu ym. 2008). Lihasnäytteissä käytetyimpiä housekeeping genejä ovat glyseraldehydi-3-fosfaatti dehydrogenaasi (GAPDH) (Barber ym. 2005) sekä β - tubuliini (Li & Shen 2013).

4 HDL-PARTIKKELI

Seerumin korkean HDL-pitoisuuden (high density lipoprotein) on todettu suojaavan väestöä sydän- ja verenkiertoelimistön sairauksilta sekä alentavan kuolleisuuden riskiä (Rivanto & Landmesser 2013; Subedi ym. 2014). HDL-partikkelien tunnetuin toimintamuoto on osallistua kolesteroli- ja rasvayhdisteiden kuljetusketjuun seerumissa vieden näitä yhdisteitä perifeerisistä kudoksista kohti maksaa, LDL-partikkelien (low density lipoprotein) siirtäessä niitä puolestaan kohti perifeerisiä kudoksia (Uehara & Saku 2014). HDL-partikkeleilla sekä niiden rakenneosilla on kuitenkin havaittu olevan myös monia muita tehtäviä elimistössä (Mineo & Shaul 2013), kuten anti-inflammatorisia ja anti-oksidiivisia ominaisuuksia seerumissa (Fito ym. 2009; Gordon ym. 2011; Kotosai ym. 2013). Eräät tutkijaryhmät ovatkin esittäneet HDL-partikkelien laadulla olevan merkittävämpi yhteys terveyteen kuin HDL-kolesterolipitoisuudella (Rothblat & Phillips 2010).

Seerumissa täysikokoisen HDL-partikkelin pinnan muodostavat apolipoproteiinit (Apo) ja vapaat kolesteroli- ja lipidiyhdisteet, kuten fosfolipidit. Hiukkasen pinnan apolipoproteiineista noin 70% on ApoA1:tä ja 20% -A2:ta. Lisäksi joukko muita apolipoproteiineja osallistuu HDL-partikkelien toimintaan (Scanu & Edelstein 2008). Partikkelin sisäosiin pakkautuvat neutraalit lipidit, kuten triglyseridit sekä esterimuotoon muokatut kolesteroliyhdisteet (Movva & Rader 2008; Asztalos ym. 2014, 39). Näiden yhdisteiden aineenvaihdunta poikkeaa partikkelin pintarakenteiden aineenvaihdunnasta siten, että esimerkiksi kolesteroliyhdisteiden pilkkoutuessa maksassa, apolipoproteiinit pilkkoutuvat munuaisissa (Kovanen & Viikari 2000, 629). HDL-partikkeleille onkin ominaista jatkuva muutos seerumissa ja selkeyttääkseen näitä rakenteellisia sekä toiminnallisia eroja, tutkijaryhmät ovat luokitelleet niitä alaluokkiin (Rothblat & Phillips 2010) (Taulukko 1).

TAULUKKO 1. Seerumin HDL-partikkelit. Mukailtu Rothblat & Phillips (2010) mukaan.

Partikkelin nimi	Partikkelin koko	Muu nimitys	Alaluokat
ApoA1-proteiini	31 kDa	Diskoidaalinen ApoA1 (kaksi ApoA1 yhdessä)	
HDL-pre- β	5,4-7,0 nm	Esiaste-HDL	Pre- β_1 , Pre- β_2 , Pre- β_3
HDL ₃	7,2-8,8 nm	Suuri HDL-partikkeli	HDL _{3a} , HDL _{3b} , HDL _{3c}
HDL ₂	8,8-12,9 nm	Erittäin suuri HDL-partikkeli	HDL _{2a} , HDL _{2b}

kDa = kilodaltonia; nm = nanometriä; ApoA1 = Apolipoproteiini A1; HDL = high density lipoprotein

4.1 HDL-partikkelin rakenteen muovautuminen

Seerumissa HDL-partikkelien rakenne muovautuu erinäisten entsyymien toiminnan vaikutuksesta (Asztalos ym. 2014, 42-45). Nämä entsyymit muokkaavat muun muassa seerumin vapaita rasvayhdisteitä ja HDL-partikkeliin siirrettäviä kolesteroliyhdisteitä (Scanu & Edelstein 2008; Wróblewska 2011). Taulukossa 2 on esitelty keskeisimpiä entsyymejä, jotka vaikuttavat HDL-partikkelin rakenteeseen ja toimintaan.

TAULUKKO 2. Keskeisimmät HDL-partikkeliä muokkaavat entsyymit seerumissa (Deakin & James 2004; Mackness & Mackness 2014, 274-275; Villard & Guerin 2014, 71-74).

Entsyymin nimi ja lyhenne ^a	Toiminta
Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT)	Seerumin vapaan kolesterolin esteröiminen. HDL-pre- β -partikkelin muokkaaminen HDL ₂ - ja HDL ₃ -partikkeliksi.
Phospholipid transfer protein (PLTP)	HDL-partikkelin muokkaaminen suuremmaksi tai pienemmäksi.
Cholesteryl ester transfer protein (CETP)	Kolesteryyliestereiden ja triglyseridien kuljettaminen seerumissa HDL- ja apolipoproteiini B:tä sisältävien partikkelien (LDL) välillä. CETP pitoisuus on suoraan verrannollinen HDL ₂ -pitoisuuteen plasmassa.
Hepatic lipase (HL)	Lipolyyttinen entsyymi. HDL ₂ - ja ₃ -partikkelien muokkaaminen pienemmiksi partikkeleiksi. Käänteisesti verrannollinen seerumin HDL ₂ -pitoisuuteen.
Paraoxonase (PON) (PON ₁ , PON ₂ ja PON ₃)	PON ₁ ja PON ₃ : HDL-partikkelin muokkaaminen seerumissa. Saattavat vaikuttaa HDL-partikkelien antioksidatiivisiin ominaisuuksiin. PON ₂ : saattaa vaikuttaa HDL-partikkelien toimintoihin sekundäärisesti HDL-reseptorien välityksellä, sillä sijaitsee solujen sisäosissa.

^a Ei suomenkielistä vastinetta; HDL = high density lipoprotein; LDL = low density lipoprotein

HDL-hiukkasen rakenneosat vaikuttavat sen kykyyn sitoutua perifeeristen kudosten solukalvoille ja erityisiin HDL-reseptoreihin (Luo ym. 2010). Esimerkiksi lihassolujen solukalvoilla ilmentyvä ABCA₁-reseptori (ATP-binding cassette transporter A class 1) kykenee luovuttamaan kolesteroli- ja rasvayhdisteitä ainoastaan ApoA1- tai pre- β -HDL-partikkeleille. Sen sijaan pääasiassa maksasolujen solukalvoilla ilmentyvä SR-B₁-reseptori (scavenger receptor B class 1) kykenee vastaanottamaan näitä yhdisteitä ainoastaan täysikokoisilta HDL₂- ja ₃-partikkeleilta (Ramasamy 2014) (Taulukko 3).

TAULUKKO 3. Keskeisimmät HDL-reseptorit (Ramasamy ym. 2014; Zannis ym. 2015, 57-58, 76, 83).

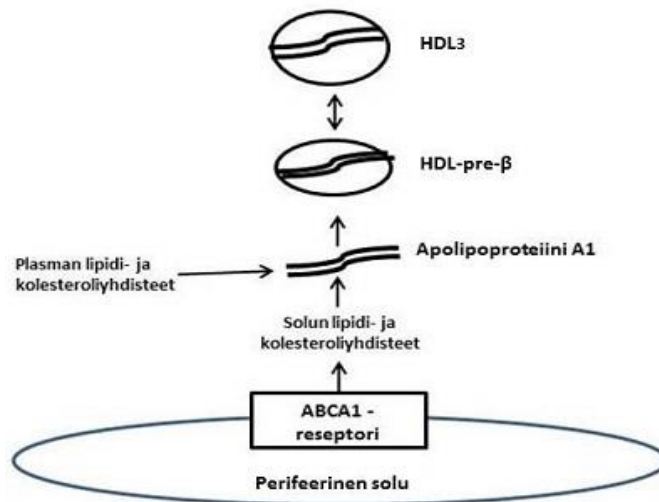
Reseptorin nimi ja lyhenne ^a	Ilmentyminen	Toiminta
ATP-binding cassette transporter class A1 (ABCA ₁)	Solukalvoilla sekä solun sisäisissä vesikkeleissä maksa-, munuais-, aivo- ja lihaskudoksissa, makrofageissa.	Solun sisäisten fosfolipidien ja kolesterolin luovuttaminen ApoA1- tai HDL-pre-β-partikkeleille.
ATP-binding cassette transporter G class 1 (ABCG ₁)	Solukalvoilla, Golgin laitteessa ja solun sisäisissä vesikkeleissä keuhko- ja aivokudoksissa sekä pernassa.	Solun sisäisten fosfolipidien ja kolesterolin luovuttaminen HDL ₂ - ja HDL ₃ -partikkeleille.
Scavenger receptor B class 1 (SR-B ₁)	Solukalvoilla ja solun sisäisissä vesikkeleissä maksa- ja endoteelisissa kudoksissa.	Rasva- ja kolesteroliyhdisteiden vastaanottaminen HDL ₂ - ja 3-partikkeileilta.

^a Ei suomenkielistä vastinetta; HDL = high density lipoprotein; ApoA1 = apolipoproteiini A1

4.2 Apolipoproteiini A1

HDL-partikkelien synteesin ja toiminnan kannalta merkittävimpänä proteiinirakenteena pidetään apolipoproteiini A1:tä (ApoA1) (Asztalos ym. 2014, 39), sillä sen ilmentymis- ja poistumisnopeudet seerumissa näyttäisivät olevan keskeinen HDL-pitoisuuden säätelijä (Kovanen & Viikari 2000, 629). ApoA1:n päätehtävänä on vastaanottaa kolesteroli- ja rasvayhdisteitä, joka puolestaan johtaa HDL-pre-β-partikkelien syntymiseen (Luo ym. 2010).

Ihmisillä yksittäiset ApoA1 molekyylit näyttäisivät syntesoituvan maksassa ja ohutsuolistossa (Asztalos ym. 2014, 39-41), joista ne kuljetetaan nopeasti solujen ulkopuoliseen tilaan (Rye & Barter 2014). Kaksi ApoA1 molekyylä sitoutuu välittömästi toisiinsa muodostaen levymäisen ApoA1-partikkelin, joka puolestaan sitoo herkästi fosfolipidejä ja kolesteroliyhdisteitä (Gangani ym. 2008) joko suoraan plasmasta (Asztalos ym. 2014, 40-41) tai sellaisten kudosten solukalvoilta, jotka ilmentävät kalvorseptori ABCA₁:tä (Shao 2012). Vastaanotettuaan tarpeeksi näitä yhdisteitä, ApoA1 jää muodostuneen HDL-pre-β-partikkelin pinnalle, toimien pintaproteiinina ja osana partikkelin rakennetta (Wróblewska 2011) (Kuvio 3). Solujen ulkopuoliseen tilaan jääneet yksittäiset ApoA1 molekyylit kuljetetaan nopeasti pilkottaviksi munuaisiin (Rye & Barter 2014).



KUVIO 3. Yhdistynyt ApoA1-partikkeli vastaanottaa lipidi- ja kolesteroliyhdisteitä joko suoraan seerumista tai ABCA₁-reseptorin kautta perifeerisistä kudoksista. Lopulta ApoA1-proteiinit jäävät muodostuneiden HDL-partikkeleiden pinnalle.

Osa tutkijaryhmistä on todennut seerumin ApoA1-pitoisuuden olevan laadukkaampi terveyden määrittäjä kuin karkeammin mitatun HDL-kolesterolipitoisuuden (Florvall ym. 2006; Boekhold ym. 2013). Toiset tutkijaryhmät ovat puolestaan esittäneet apolipoproteiini B (ApoB) ja ApoA1-suhteen määrittämisen olevan selkein arviointimenetelmä ennustamaan esimerkiksi sydän- ja verisuonisairauksien riskiä (McQueen ym. 2008). Seerumin ApoB-pitoisuuden on todettu olevan yhteydessä LDL-hiukkasten määrään (Kujala ym. 2013) ja ApoA1-pitoisuuden on korreloivan HDL-kolesterolipitoisuuden kanssa (Kovanen & Viikari 2000, 629).

ApoA1-proteiineilla on kuitenkin arvioitu olevan myös muita kuin HDL-partikkelien syntesoitumiseen liittyviä tehtäviä elimistössä (Drew ym. 2009; Gets & Reardon 2010; Lehti ym. 2013). ApoA1:n on arveltu vaikuttavan muun muassa insuliini- ja sokeriaineenvaihduntaan joko primäärisesti (Drew ym. 2009; Rye ym. 2016) tai ABCA₁-reseptorinsa kautta (Gets & Reardon 2010). Lisäksi ApoA1:n on havaittu ilmentyvän myös muissa kudoksissa, kuin maksassa tai seerumissa. Zhang ym. (2011) totesivat hiirien luurankolihasolujen ilmentävän ApoA1-proteiinia ja liittyvän luurankolihasolujen sisältämien lipididroplettien toimintaan, mutta havaintoja ApoA1-proteiinin ilmentymisestä ihmisten lihaskudoksissa ei toistaiseksi ole tehty. Lisäksi ApoA1:n merkitys laajemmin luurankolihasen terveyteen on jäänyt selventymättä.

5 AEROBINEN KUNTO JA FYYSINEN AKTIIVISUUS

Aerobinen kunto voidaan määrittellä useiden fysiologisten tekijöiden kertymänä, joita fyysisesti aktiivinen elämäntapa ja säännöllinen liikuntaharjoittelu ylläpitävät sekä kehittävät (Konopka & Harber 2014). Fyysinen aktiivisuus kuuluu osaksi aerobisen liikunnan käsitettä, tarkoittaen kaikkea vapaaehtoista liikkumista, sisältämättä suunniteltua ja säännöllistä harjoittelua (Vuori 2011, 19-20). Heikentyneen aerobisen kunnan ja vähäisen fyysisen aktiivisuuden on todettu olevan yhteydessä useisiin verenkiertoelimistön sairauksiin sekä kuolleisuuteen (Kujala 2006) ja yleisten liikuntasuositusten mukaan, aikuisten tulisi toteuttaa fyysistä aktiivisuutta mahdollisimman usein päivittäin. Suositusten mukaan kohtuukuormitteista aerobista liikuntaa (55-70% VO_{2max}) tulisi toteuttaa vähintään kaksi ja puoli tuntia tai raskasta liikuntaa ($\geq 80\%$ VO_{2max}) tunti ja 15 minuuttia viikoittain (Liikunta 2012).

Säännöllisen fyysisen aktiivisuuden ja aerobisen harjoittelun seurauksena hengitys- ja verenkiertoelimistö sekä hermosto adaptoituvat lisääntyneisiin hapen- ja energiantarpeisiin (Kenney ym. 2012, 248, 260). Niin ikään luurankolihasolut adaptoituvat säännölliseen aktivointiin niiden määrän ja poikkipinta-alan kasvaessa (Konopka & Haber ym. 2014; Zhen ym. 2010), glykokeeni- ja rasvavarastojen lisääntyessä (Hollooszy ym. 1998) sekä aineenvaihdunnan kehittyessä (Keskinen ym. 2010, 51).

5.1 Aerobisen kunnan, fyysisen aktiivisuuden ja liikunnan määrän arvioiminen

Elimistön aerobista kuntoa voidaan arvioida hapenottokyvyn (VO_2) mittausmenetelmin, joiden on todettu olevan yhteydessä hengityselimistön suoritustehoisuuteen ja luurankolihasaisten aineenvaihduntaan (Keskinen ym. 2010, 51). Maksimaalisen hapenottokyvyn menetelmä (VO_{2max}) arvioi elimistön suurinta tehoa kuljettaa happea ja tuottaa energiaa fyysisen kuormituksen aikana (Levine 2008). Normaaliväestön aerobisen kunnan arvioimiseen riittää usein kuitenkin vähemmän kuormittava, submaksimaalisen hapenottokyvyn (VO_{2peak}) testi (Keskinen ym. 2010, 112).

Submaksimaalista hapenottokykyä arvioidaan suorittamalla progressiivisesti kehittyvä polkupyöräergometri- tai juoksumattotesti (McArdle ym. 2015, 237-238). Laboratorio-

olosuhteissa mittauksiin voidaan liittää sydämen sykkeen tai veren laktaattipitoisuuden seurantamenetelmiä (Keskinen ym. 2010, 110-111). Tulos ilmoitetaan hengitysilman absoluuttisena tilavuutena minuutissa suhteutettuna kehonpainoon ($\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) ja siihen vaikuttavat muun muassa henkilön ikä ja sukupuoli (Nummela ym. 2010, 53). Fyysisen aktiivisuuden ja liikunnan määrää, useutta sekä intensiteettiä voidaan puolestaan arvioida kyselyin sekä objektiivisin mittarein (Fogelholm ym. 2011, 79). Kyselyt ovat käytännöllisiä laajojen henkilömäärien fyysisen aktiivisuuden arvioimiseen (Dishman ym. 2013, 39), mutta objektiivisin mittarein (syke-, aktiivisuus- tai askelmittarit) saatetaan saada tarkempi arvio aktiivisuuden määrästä ja intensiteetistä, mikäli arviointijakso on riittävän pitkä (Fogelholm ym. 2011, 79). Vaikka molempien menetelmien validiteettia ja reliabiliteettia on kritisoitu, ne ovat olleet edelleen yhtä käytettyjä terveystutkimuksissa (van Poppel ym. 2010; Hearst ym. 2012).

Mittareista kerätyt tulokset voidaan muuntaa MET-yksiköiksi (metabolic equivalent, lepoaineenvaihdunnan kerroin), jotka kuvaavat fyysisen kuormituksen ja energiankulutuksen tasoa suhteutettuina kehonpainoon (Fogelholm ym. 2011, 78). MET-yksikkö vastaa energiankulutuksena yhtä kilokaloria painokiloa kohden ($1 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}$) tunnissa ja hapenkulutuksena noin $3,5 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Näin ollen 1-3 MET käsittää matalan, 3-6 MET kohtuullisen ja yli 6 MET raskaan intensiteetin kuormitusta (McArdle ym. 2015, 200). Toisaalta vähemmän fyysisesti aktiivisille tai iäkkäille henkilöille, matalan intensiteetin kuormitus saattaa vastata kohtuukuormitteista liikuntaa (Jette ym. 1990). Henkilön aktiivisuutta saatetaan kuvata myös liikuntakertojen useuden, MET-yksiköillä määritetyn intensiteetin ja ajan tulona (MET tunnit/MET minuutit) (Fogelholm 2011, 78).

5.2 Aerobisen liikunnan vaikutukset oksidatiiviseen fosforylaatioon

Aerobisen kunnan on todettu olevan yhteydessä mitokondrioiden muokkautumiseen niiden adaptoituessa aerobiseen kuormitukseen kasvaen ja lisääntyen määrällisesti (Kenney ym. 2012, 263; Boyd ym. 2013). Lisäksi mitokondrioiden sisäosien entsyymien määrä lisääntyy (McArdle ym. 2015, 466) ja elektroninsiirtoketjun proteiineja koodaavien geenien aktivoituminen tehostuu (Leskinen ym. 2010). Tämän seurauksena oksidatiivisen fosforylaation kapasiteetti kasvaa (Coggan & Williams 1995, 195-196) ja energiamolekyylien pilkkominen sekä ATP-molekyylien tuottaminen tehostuvat (Goto & Radák 2005, 66-67).

Näyttäisi siltä, että lihassolujen oksidatiivisen fosforylaation kapasiteettia voidaan kehittää läpi elämän (Konopka ym. 2013). Etenkin matalatehoinen aerobinen harjoittelu ($\leq 50\%$ VO_{2max}) sekä runsas fyysinen aktiivisuus näyttäisivät lisäävän vapaiden rasvahappojen kuljettumista lihassoluihin ja mitokondrioiden sisäosiin (Spriet 2014), jolloin näiden molekyylien hyödyntäminen energianlähteenä kehittyy (McArdle 2015, 466). Vaikka aerobisen kapasiteetin ($VO_{2max/peak}$) kehittymistä näyttäisivät edistävän voimakkaasti hengitys- ja verenkiertoelimistön adaptoituminen kuormitukseen (Keskinen ym. 2010, 51), on säännöllisen fyysinen aktiivisuuden todettu vaikuttavan positiivisesti moniin terveystuottajiin, vaikka sillä ei olisi merkittäviä vaikutuksia mitattuihin $VO_{2max/peak}$ -arvoihin (Haskell ym. 1985; Chanséaume & Morio 2009).

5.3 Aerobisen liikunnan vaikutukset ApoA1:teen

Aerobisen liikunnan ja seerumin HDL-kolesterolipitoisuuden yhteyttä on tarkasteltu useissa interventioissa (Kelley ym. 2004; Kelley ym. 2011; Kelley ym. 2012). Eräät tutkijaryhmät ovat painottaneet ainoastaan kohtuu- tai kovatehoisen aerobisen harjoittelun kohottavan HDL-pitoisuutta tehokkaasti (Leon & Sanchez 2001; Kodama ym. 2007). Tällaisen harjoittelun on todettu vaikuttavan ennen kaikkea positiivisemmin HDL-tasojen nousuun kuin LDL-tasojen laskuun (Vaisberg ym. 2012). Toisaalta fyysisesti aktiivisen elämäntavan on havaittu vaikuttavan positiivisesti etenkin HDL-partikkelien rakenteen muokkautumiseen (Kraus ym. 2002; Aadland ym. 2013; Kujala ym. 2013).

Seerumin ApoA1-vasteita aerobiseen kuormitukseen on tutkittu verrattain vähemmän. Olchawa ym. (2004) todensivat aerobisen kunnon (VO_{2max}) olevan yhteydessä seerumin ApoA1- ja HDL-pre- β -partikkelien pitoisuuteen, jonka seurauksena myös HDL-kolesterolipitoisuus oli keskimäärin 21% korkeampi kestävyysurheilijoilla, kuin muutoin fyysisesti aktiivisilla henkilöillä. He arvelivat urheilijoiden suuremman lihasvolyymiin liittyvän ainakin korkeampiin HDL-pre- β -tasoihin (Olchawa ym. 2004). Sen sijaan ApoA1- tai HDL-pre- β -partikkelien havaittiin lisääntyvän myös muilla kuin urheilijoilla aerobisen liikunnan seurauksena (Jafari ym. 2003; Sviridov ym. 2003; Tofighi ym. 2015). Jafari ym. (2003) ja Sviridov ym. (2003) havaitsivat HDL-pre- β -partikkelien lisääntyvän seerumissa aerobisen liikuntasuorituksen seurauksena sekä terveillä, että tyypin 2 diabetesta sairastavilla

henkilöillä. ApoA1 ilmentymisen havaittiin niin ikään lisääntyvän seerumissa ylipainoisilla, vähän liikkuvilla naisilla 12 viikkoa kestäneen aerobisen liikuntaintervention seurauksena (Tofighi ym. 2015). Toisaalta fyysisesti aktiivisen elämäntavan merkitykset ApoA1-tasoon ovat jääneet selventymättä.

Tofighi ym. (2015) havaitsivat myös ApoA1-reseptori ABCA₁ ilmentymisen lisääntyneen seerumissa liikuntaintervention johdosta, mikä viittasi ApoA1-proteiinin lisääntyneeseen tarpeeseen fyysisen kuormituksen seurauksena. Sviridov ym. (2003) tarkensivat puolestaan ApoA1-pitoisuuden kohonneen merkitsevästi vain laskimo-, mutta ei valtimoverenkierrossa tutkituilla ryhmillä, mikä jätti epäilyn työskentelevien lihasten roolista ilmentymisen tasoon.

5.4 Aerobisen liikunnan vaikutukset oksidatiivisen fosforylaation ja ApoA1 yhteyteen

Havaintoja HDL-partikkelien tai ApoA1-proteiinin yhteydestä luurankolihasolujen toimintaan on esitetty (Drew ym. 2009; Leskinen ym. 2010; Lehti ym. 2013). Leskinen ym. (2010) havaitsivat kaksostutkimuksessaan kohonneen seerumin HDL-kolesterolipitoisuuden olevan yhteydessä mitokondrioiden oksidatiiviseen kapasiteettiin liittyvien geenisarjojen ilmentymiseen (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA). He havaitsivat fyysisesti aktiivisempien kaksosten oksidatiiviseen fosforylaatioon liittyvien geenien ilmentymisen olevan tehokkaampaa kuin inaktiivisten kaksosten ja arvelivat, että mitokondrioiden kapasiteetti käyttää rasvahappoja energianlähteenä oli kehittynyt, jonka seurauksena HDL-partikkelien tarve kuljettaa rasvahappoja seerumissa oli lisääntynyt (Leskinen ym. 2010).

ApoA1:n havaittiin puolestaan liittyvän luurankolihasolujen mitokondrioiden toimintaan hiiri- ja *in vitro* - tutkimuksin (Lehti ym. 2013). Lehti ym. (2013) todensivat ApoA1-proteiinia yli-ilmentävien hiirien olevan paremmassa fyysisessä kunnossa ja säilyttävän paremmin mitokondriaalisen kapasiteetin ikääntyessään, kuin villityypin tai ApoA1:tä vähemmän ilmentävien hiirien. Lisäksi luurankolihasolujen altistus ApoA1:lle *in vitro* tehosti solujen oksidatiivista kapasiteettia, mikä jätti epäilyn proteiinin roolista oksidatiivisen kapasiteetin säätelyssä (Lehti ym. 2013). Vaikka havaintoja seerumin ApoA1:n yhteydestä mitokondrioiden oksidatiivisen fosforylaatioon onkin tehty, mekanismit näiden tekijöiden taustalla ovat jääneet selventymättä. Niin ikään ApoA1-proteiinin yhteys luurankolihasolujen toimintoihin ihmisillä on jäänyt tarkentumatta.

6 KAKSOSAINEISTO LIIKUNTA- JA TERVEYSMUUTTUJIEN TARKASTELUSSA

Perintötekijöillä on todettu olevan vaikutusta useisiin terveysmuuttujiin, kuten seerumin lipoproteiineihin (Kovanen & Viikari 2000, 629) sekä aerobisen kunnon kehittymiseen liikuntaharjoittelun seurauksena (Rankinen & Bouchard 2005, 46). Arviot perintötekijöiden vaikutuksista näihin terveysmuuttujiin vaihtelevat ja esimerkiksi fyysisen aktiivisuuden periytyvyyden on todettu vaihtelevan 20-70% välillä (Dishman ym. 2013, 521-522). Arvioiden laajuus saattaa johtua siitä, että terveysmuuttujien periytyvyys ei ole ainoastaan yhden geenin säätelemää vaan niihin vaikuttavat useat geneettiset tekijät (Jorde ym. 2006, 255). Toisaalta viimeaikaisissa tutkimuksissa on osoitettu, että esimerkiksi vasteet aerobiseen harjoitteluun ovat yksilöllisiä ja geneettisten tekijöiden vaikutusten tarkastelu on selventänyt edelleen sitä, miksi toiset hyötyvät liikunnasta enemmän kuin toiset (Rankinen & Bouchard 2005, 46-48)

Perinnöllisistä tekijöistä huolimatta, moniin terveysmuuttujiin voidaan vaikuttaa ympäristötekijöillä (Rottensteiner ym. 2015) ja kaksostutkimusasetelma sopii tämän ilmiön tarkasteluun (Bouchard ym. 2011). Kaksospareilla voidaan luoda tutkimusasetelmia, joissa parit jakavat saman tai lähes saman geneettisen aineiston (Rankinen & Bouchard 2005, 46). Monotsygootit (MZ) parit ovat syntyneet samasta munasolusta, jakaen lähes saman geneettisen aineiston (DNA sekvenssin), kun puolestaan ditsygootit (DZ) parit ovat syntyneet erillisistä munasoluista, jakaen noin puolet geneettisestä materiaalistaan (Bouchard ym. 2011). Kaksospari on saattanut elää lapsuutensa samassa elinympäristössä tai erillään (Elder ym. 2012), mikä saattaa vaikuttaa tulosten tarkasteluun (Jorde ym. 2006, 257-258).

Luotettavin tutkimusasetelma saadaan silloin, kun kaksosparit jakavat saman geneettisen perimän (MZ), saman elinympäristön ja ovat samaa sukupuolta, jolloin vähäisetkin erot parien välillä kertovat ympäristötekijöiden vaikutuksista tarkasteltavaan muuttujaan (Dishman ym. 2013, 521-522). Toisaalta monien ympäristö- ja terveysmuuttujien tutkimiseen riittää usein DZ-asetelma tai sen yhdistäminen MZ-asetelmaan, sillä kaksoset ovat geneettisiltä ominaisuuksiltaan hyvin lähellä toisiaan (Jorde ym. 2006, 256).

7 TUTKIMUSKYSYMYKSET

Tässä tutkielmassa selvitettiin ApoA1-proteiinin esiintymistä seerumi- ja luurankolihaskudoksissa sekä oksidatiiviseen fosforylaatioon liittyvien proteiinien eroja vapaa-ajan fyysiseltä aktiivisuudelta eroavilla kaksosilla. Tutkimusongelmien selvittämiseksi muodostettiin viisi tutkimuskysymystä, jotka jaettiin kahteen aihealueeseen (Kuvio 4).

Aihealue 1

1) Onko fyysisellä aktiivisuudella vaikutusta seerumin ApoA1-pitoisuuteen tutkittavilla kaksosilla?

H0: Fyysisellä aktiivisuudella ei ole vaikutusta seerumin ApoA1-pitoisuuteen

H1: Fyysisellä aktiivisuudella on vaikutusta seerumin ApoA1-pitoisuuteen

Fyysiseltä aktiivisuudelta eroava elämäntapa näytti vaikuttavan HDL-pitoisuuteen ja -partikkelien muokkautumiseen kaksosilla (Kujala ym. 2013)

2) Onko fyysisellä aktiivisuudella vaikutusta oksidatiiviseen fosforylaatioon liittyvien proteiinien ilmentymiseen tutkittavilla kaksosilla?

H0: Fyysisellä aktiivisuudella ei ole vaikutusta näiden proteiinien ilmentymiseen

H1: Fyysisellä aktiivisuudella on vaikutusta näiden proteiinien ilmentymiseen

Kaksospareilla havaittiin eroja geenien ilmentymisessä geenisarjatutkimuksin (GSEA) (Leskinen ym. 2013)

3) Onko seerumin ApoA1-pitoisuus yhteydessä oksidatiiviseen fosforylaatioon liittyvien proteiinien ilmentymiseen tutkittavilla kaksosilla?

H0: Seerumin ApoA1-pitoisuudella ja oksidatiivisen fosforylaation proteiineilla ei ole yhteyttä tutkittavilla kaksosilla

H1: Seerumin ApoA1-pitoisuudella ja oksidatiivisen fosforylaation proteiineilla on yhteyttä tutkittavilla kaksosilla

ApoA1:tä yli-ilmentävät hiiret säilyttivät paremmin mitokondrioiden kapasiteetin ikääntyessään, kuin villityypin hiiret ja lihassolujen altistus ApoA1:lle in vitro kohotti solujen oksidatiivista kapasiteettia (Lehti ym. 2013)

Aihealue 2

4) Ilmentyykö apolipoproteiini A1 luurankolihaskudoksessa tutkittavilla kaksosilla?

H0: ApoA1 ei ilmenny luurankolihaskudoksessa kaksosilla

H1: ApoA1 ilmenny luurankolihaskudoksessa kaksosilla

ApoA1:n havaittiin ilmentyvän luurankolihaskudoksissa hiirillä (Zhang ym. 2011)

5) Ilmentyykö ApoA1:n tai HDL-partikkelien rakenteeseen tai toimintaan liittyviä proteiineja luurankolihaskudoksessa tutkittavilla kaksosilla?

H0: Muita valittuja proteiineja ei ilmenny luurankolihaskudoksessa kaksosilla

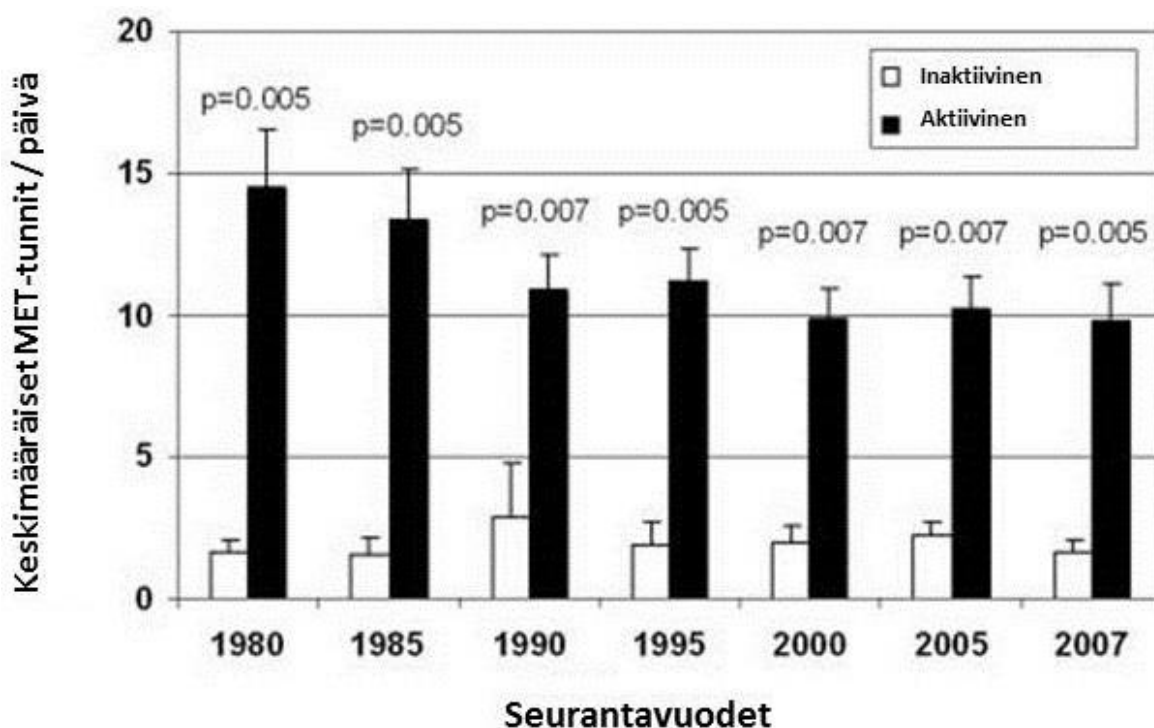
H1: Muita valittuja partikkelien proteiineja ilmenny luurankolihaskudoksessa kaksosilla

KUVIO 4. Pro gradu - työn tutkimusongelmien selvittämiseksi laaditut kysymykset.

8 MENETELMÄT

8.1 Tutkimusaineisto

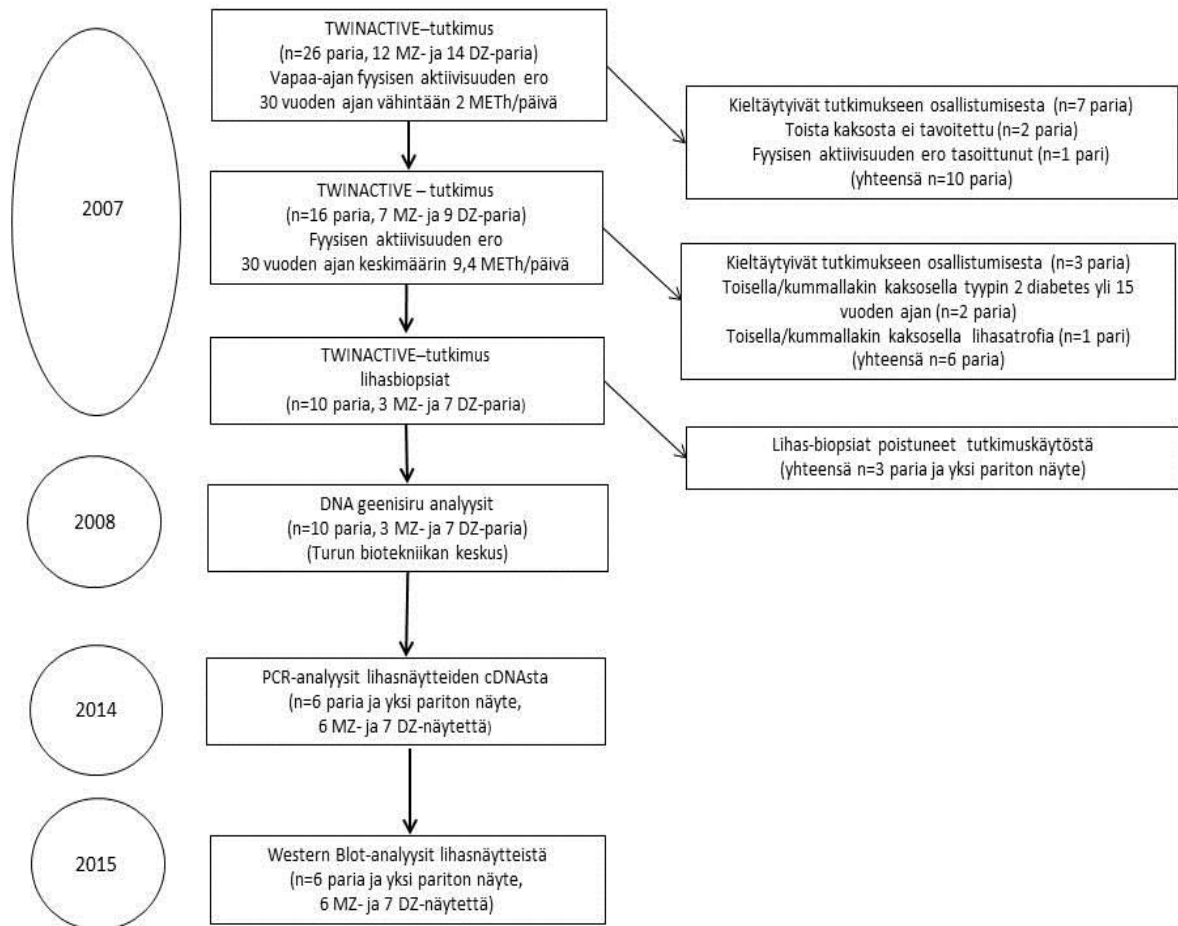
Tutkielmassa käsiteltiin Jyväskylän yliopiston toteuttaman TwinActive - tutkimuksen aineistoa, joka kuului osaksi terveystieteen tiedekunnan laajempaa kaksosseurantatutkimusta. Laajemmassa seurannassa kaksospareja ja heidän liikunnallista aktiivisuuttaan oli tarkasteltu suhteessa useisiin terveystieteen tiedekunnan laajempaa kaksosseurantatutkimusta. TwinActive - tutkimukseen vuonna 2007 valikoitui 16 vapaaehtoista kaksosparia (n=32 henkilöä), joista kumpikin osapuoli oli elossa eikä heillä ollut merkittäviä toimintakykyä haittaavia sairauksia. Tutkittavien vapaa-ajan liikunnallisen aktiivisuuden määrää, intensiteettiä ja useutta oli tarkasteltu takautuvien haastattelukyselyin seitsemänä eri ajankohtana vuodesta 1980 vuoteen 2007 asti. Muunnettaessa haastattelukyselyiden fyysistä aktiivisuutta kuvaavat vastaukset MET tunneiksi havaittiin, että kaksosparien (n=32) vapaa-ajan fyysisen aktiivisuuden ero oli keskimäärin 9,4 MET tuntia/päivä (p=0,005) (Kujala ym. 1998; Leskinen ym. 2010) (Kuvio 5).



KUVIO 5. TwinActive - tutkimukseen osallistuneiden kaksosparien (n=32) keskimääräisen vapaa-ajan fyysisen aktiivisuuden ero (MET tuntia/päivä) seitsemänä ajanjaksona mitattuna (1980 - 2007). Kuvio Leskinen ym. (2010) mukaan.

TwinActive - tutkimuksen lihasnäytteiden keruuvaiheeseen valikoitui puolestaan kymmenen vapaaehtoista kaksosparia (n=20 henkilöä), joilta kyseltiin viimeisen 12 kuukauden aikaisen vapaa-ajan liikunnan määrää, useutta ja intensiteettiä vielä kerran. Haastattelukyselyn pohjana käytettiin Kuopion yliopiston sovellettua sydän- ja verenkiertosairauksien riskianalyysilomaketta (Liite 1). Lihasnäytteiden keruun lisäksi tutkittavilta kerättiin seeruminäytteet, mitattiin kehonkoostumusta ja he suorittivat pyöräergometrillä submaksimaalisen hapenottokyvyn (VO_{2peak}) testin.

Vuoteen 2015 mennessä osa tutkittavilta kerätyistä lihasnäytteistä oli hyödynnetty loppuun. Sen vuoksi tätä työtä varten toteutettuihin lihasanalyysiin valikoitui lopulta 13 näytettä. Näin ollen osassa tuloksia voitiin vertailla ainoastaan näiden analyysien tuloksia aiemmin kerättyyn muuhun aineistoon (Kuvio 6).



KUVIO 6. Tutkittavien valikoituminen. Vasemmalla on esitetty aika (vuosina), keskellä tutkittavien määrä ja oikealla tutkittavat, jotka valikoituivat pois vuoteen 2007 mennessä.

8.2 Tutkimusaineistosta valitut muuttujat

TwinActive - tutkimukseen osallistuneiden kaksosparien fyysisen aktiivisuuden eroja, aerobista kapasiteettia (VO_{2peak}) sekä seerumi-, rasva- ja lihaskudosmuuttujia oli tarkasteltu aiemmissa tutkimusjulkaisuissa (Leskinen ym. 2009; Leskinen ym. 2010; Kujala ym. 2013; Leskinen ym. 2013). Näitä julkaisuja varten kerättyä ja valmiiksi SPSS tilasto-ohjelmistoon kirjattua aineistoa voitiin hyödyntää myös tässä tutkielmassa. Aiemmin kerätystä aineistosta tarkasteltiin tutkittavien sukupuolijakaumaa sekä perinnöllisyyttä mono- ja ditsygoottisuuden osalta. Lisäksi tutkittavien ikää, pituutta, painoa sekä painoindeksiä vertailtiin taustamuuttujina.

Tutkittavien kehon rasvaprosenttia oli analysoitu InBody – menetelmällä (InBody-laite 2005-00215720, Biospace, Europe) ja mittauksista saatuja tuloksia voitiin hyödyntää tämän tutkielman taustamuuttujavertailussa. Kaksosten liikunnallisen aktiivisuuden määrää vertailtiin sekä 12 kuukauden takautuvan haastattelun (2007), että koko seurantajakson (1980 - 2007) keskimääräisinä MET tunteina ja aerobisen kunnan tasoa submaksimaalisen hapenottokyvyn testituloksina. Seerumimuuttujista lähempään tarkasteluun valittiin tutkittavien ApoA1-pitoisuutta sekä ApoA1/ApoB-suhdetta kuvaavat arvot.

8.3 Tilastolliset menetelmät

Aineiston tilastollinen analysointi toteutettiin IBM SPSS Statistics 22 -ohjelmiston avulla. Osassa tilastollisia analyysejä voitiin hyödyntää kaikkien lihasnäytteen luovuttaneiden kaksosten aineistoa ($n=20$) ja osassa ainoastaan tähän työhön toteutettujen lihasnäyteanalyysien tuloksia ($n=13$). Tutkielmaan valittujen muuttujien normaalijakaumaa testattiin Shapiro-Wilk-testillä ($n=20$) ja testin perusteella suurin osa valituista muuttujista ei noudattanut normaalijakaumaa. Niin ikään tutkittavien määrä oli pieni, jonka vuoksi taustamuuttujien tarkasteluun sopi parametriton Mann-Whitney U-testi, jossa käytettiin Monte Carlon tarkkaa arvoa (100 000).

Tutkittava kaksosaineisto jaettiin aktiivisten ja inaktiivisten (joko $n=10/10$ tai $n=6/7$) henkilöiden ryhmiin. Mann-Whitney U-testin avulla valittujen muuttujien keskimääräiset arvot (mediaanit) asetettiin suuruusjärjestykseen ja havainnoille annettiin järjestysluvut.

Tilastollisen merkitsevyyden raja-arvoksi asetettiin 0,05 ($p \leq 0,05$), Metsämuurosen (2009, 441) mukaan. Testin määritelmän mukaan valittujen ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää ($p \leq 0,05$) eroa, jos havaintojen keskikohdat (mediaanit) jakautuivat tasaisesti ryhmien välille. Ryhmien välillä puolestaan oli eroa, jos havainnot jakautuivat epätasaisesti ryhmien välillä (Metsämuuronen 2009, 386-387). Toisin sanoen, jos aktiiviset saivat suurempia keskilukuja ja inaktiiviset pienempiä, ryhmien välillä oli tilastollisesti merkitsevää eroa ($p \leq 0,05$).

Tilastollisia menetelmiä hyödynnettiin myös tarkasteltaessa sitä, oliko seerumin ApoA1-proteiinilla yhteyttä oksidatiiviseen fosforylaatioon osallistuvien proteiinien pitoisuuteen tutkittavilla kaksospareilla ($n=13$) (tutkimusongelma 3). Tilastolliseksi menetelmäksi valittiin Spearmanin korrelaatiokerroin (ρ), sillä se sopi pienten ja normaalisti jakautumattomien aineistojen analysoimiseen (Metsämuuronen 2009, 366). Tilastollisen merkitsevyyden raja-arvoksi asetettiin 0,05 ($p \leq 0,05$).

8.4 Laboratoriomenetelmät

Vuonna 2008 lihasnäytteistä eristetty komplementaarinen DNA (cDNA) lähetettiin Turun biotekniikan keskuksen DNA geenisiruanalyysiin (DNA microarray). Näistä analyyseistä kerätyistä tuloksista lähempään tarkasteluun valittiin oksidatiiviseen fosforylaatioon liittyvien proteiinien geenejä (Liite 2) sekä ApoA1- ja HDL-partikkelien toimintaan liittyvien proteiinien geenejä. Tarkemmat tiedot yksittäisten proteiinien geeneistä haettiin kirjallisuutta ja HUGO Gene Nomenclature Committee - tietokantaa hyödyntämällä ennen DNA geenisirutulosten tarkastelua. Yksityiskohdat ApoA1- ja HDL-partikkelien toimintaan liittyvien proteiinien geeneistä haettiin puolestaan kirjallisuutta sekä National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene - tietokantaa selaamalla.

Tutkielmaa varten tehtiin lisäksi erillisiä analyysejä jäljellä olevista lihasnäytteistä ($n=13$). Näissä analyyseissä tutkittiin ApoA1 ilmentymistä mRNA-tasolla sekä oksidatiiviseen fosforylaatioon liittyvien geenien ilmentymistä proteiinitasolla. Pro gradu-työn tekijä suoritti analyysejä vuonna 2007 kerätyillä ja vuoteen 2014 asti säilytyillä näytteillä. Analyyseistä saadut muuttujat lisättiin SPSS-ohjelmistoon tulosten tarkastelua varten.

8.4.1 DNA geenisiruanalyysi

TwinActive - tutkimukseen kerätyistä lihasnäytteistä (n=20) oli tehty komplementaarisia DNA (cDNA) – näytteitä vuonna 2007. Lyhyesti kuvattuna homogenoiduista lihasnäytteistä (FastPrep FP120 laite, MP Biomedicals, Illkirch, Ranska) erotettiin totaali-RNA käyttäen trizol-reagenssimenetelmää käyttäen (Invitrogen, Carlsbad, CA), jonka jälkeen RNA:n puhtaus ja laatu tarkistettiin (Experion laite, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Puhtaan RNA:n raja-arvoksi hyväksyttiin OD_{260/280} (suhteella 1.8). 500 nanogrammasta totaali-RNA:ta käännettiin cDNA:ksi (Illumina RNA amplification kit, Ambion, Austin, TX), jonka jälkeen cDNA:n puhtaus ja laatu jälleen tarkistettiin (Experion laite, Bio-Rad Laboratories, USA).

Vuonna 2008 osa näistä cDNA – näytteistä (n=20) lähetettiin DNA geenisiruanalyysiin Turun biotekniikan keskuksen (Turun yliopisto). Ennen analyysiä cDNA:n puhtaus tarkastettiin biotekniikan laitoksen toimesta uudelleen. Geenisiruanalyysit toteutettiin käyttäen kaupallisia Illumina HumanWG-6 v3.0 v3.0 Expression BeadChips (Illumina Inc., San Diego, USA) - siruja, jotka sisälsivät alukkeet (probe) 48 803 mRNA-kopiolle. Analyysissä jokaiselle probelle tehtiin noin 30-50 mittausta yhtä näytettä kohti, jonka jälkeen kunkin näytteen kullekin mRNA-kopiolle mitattiin ilmentymisen tasoa kuvaava signaali-intensiteetti-arvo. Toisin sanoen prosessin tuloksena saatiin numeerinen arvo, joka oli suoraan verrannollinen mRNA-määrään näytteessä.

Mittauksen jälkeen arvot normalisoitiin Quantile normalization - metodilla ei-biologisista syistä johtuvan vaihtelun vähentämiseksi aineistossa. Tämä menetelmä oli yleisesti käytetty mikrosirudatan yhteydessä. Lisäksi tuloksille laskettiin Pearsonin (r^2) korrelaatioarvot, analysoitujen mittausten samankaltaisuuden varmentamiseksi. Samankaltaisuutta kuvaavalla asteikolla (0-1), arvo 0 merkitsi täydellistä epäkorrelaatiota näytteiden välillä ja arvo 1 puolestaan täydellistä korrelaatiota. Näiltä biologisilta näytteiltä odotettiin vähintään 0,95 korrelaatiota. Tutkittavien ryhmien väliseen vertailuun käytettiin puolestaan R-ohjelmiston t-testiä. Tulokset oli raportoitu valmiiksi Turun biotekniikan keskuksessa, mutta tulosten analysoiminen ja johtopäätösten tekeminen jäivät pro gradu-työn tekijälle. Tässä tutkielmassa ryhmien välisen, tilastollisesti merkitsevän eron raja-arvoksi asetettiin 0,05 ($p \leq 0,05$). Toisaalta Laiho ym. (2008) mukaan tutkimusyksiköiden sisäiseen käyttöön voitiin asettaa suuntaa-antavia, löysempiä raja-arvoja ($p \leq 0,10$), jolloin hyväksyttiin suurempien virheellisten

positiivisten löydösten lukumäärä tuloksissa, mikä otettiin huomioon työn tulosten pohdinnassa.

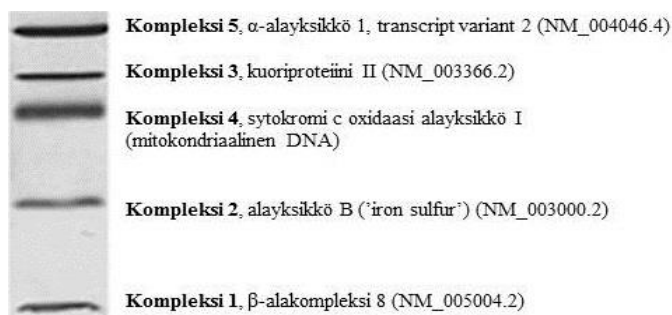
Geenisiruanalyysin tuloksista lähempään tarkasteluun valittiin yhteensä 96 geeniä, jotka liittyivät oksidatiivisen fosforylaation proteiineihin ja komplekseihin 1-5. Haettaessa geenien tarkempia tietoja NCBI Gene - tietokannasta havaittiin, että geenisirutulosten selailuun täytyi poimia myös yksittäisten geenikopoiden vaihtoehtoiset muodot (transcript variant). Lisäksi DNA-tuloksista lähempään tarkasteluun valittiin ApoA1-proteiinia koodittava geeni sekä HDL- ja ApoA1-partikkelien toimintaan liittyvien kalvoreseptorien (ABCA₁, ABCG₁ ja SR-B₁) sekä tumareseptorien (HNF4 α ja HNF4 γ) geenit ja niiden vaihtoehtoiset muodot. Lopuksi tarkasteltiin ApoA1- ja HDL-partikkelin rakenteen muokkautumiseen liittyvien entsyymien geenien (LCAT, CETP, PLTP, PON₁, PON₂, PON₃ ja HL) esiintymistä näytteissä.

8.4.2 Proteiininuuttujen määrittäminen luurankolihasnäytteistä

Kaksosten (n=20) lihasnäytteet kerättiin *m. vastus lateralis* lihaksista yön yli kestäneen paaston jälkeen. Proteiininanalyysjä varten säilötyt näytteet puhdistettiin, jäädytettiin ja homogenoitiin nestetyypessä (-160°C). Sen jälkeen näytteet asetettiin puskuriliuokseen (20 mM HEPES (pH 7,4), 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 100 mM β -glycerofosfaatti, 1 mM Na₃VO₄, 2 mM DTT, 1% NP-40, 0,2% sodium deoxycholate ja 3% proteaasi ja fosfataasi inhibiittori cocktail (P 78443; Pierce, Rockford, IL). Sen jälkeen lihashomogenaatit sentrifugoitiin 10 000g (10min) ja niiden kokonaisproteiinipitoisuudet määritettiin (KoneLab laite, Thermo Scientific, Suomi). Nämä näytteet säilöttiin -80°C vuonna 2007 ja tätä tutkielmaa työstettäessä näytteitä oli jäljellä enää 13 kappaletta.

Oksidatiivisen fosforylaation proteiineja määritettiin Western blot -menetelmällä. Kutakin näytettä lämmitettiin +50°C (10 minuuttia) ja ladattiin geeliin (Criterion TGX, 4-20% (cat#567-1094) Precast Gels, Bio-Rad), jota ajettiin 150V (voltage) sähkövirrassa (45 minuuttia). Ajopuskuriliuoksena käytettiin EF liuosta (Trizma Base 25 mM, glycine, SDS). Ajon jälkeen geeliä tasapainotettiin siirrostuspuskurissa (CAPS-puskuri, metanoli). Siirrostuskalvona käytettiin kaupallista kalvoa (Nitrocellulose Blotting Membrane, AmershamTM; ProtramTM (cat# G9925577), Bio-Rad). Siirrostuslaite kasattiin niin, että proteiinien oli mahdollista siirtyä kalvolle. Siirrostus suoritettiin 300mA (milliampeeri)

sähkövirrassa (2,5 tuntia), jonka jälkeen kalvoa blokattiin (Odyssey blocking buffer, LI-COR Biosciences, USA) tunnin ajan vapaiden hydrofobisten pintojen peittämiseksi. Sen jälkeen ylimääräinen blokkausliuos pestiin (Tris base, NaCl). Primäärivasta-aineina käytettiin MitoProfile (Total OXPHOS rodent WB antibody cocktail ab110413, AbCam, USA), laimennoksella 1:500 ja GAPDH (antibody rabbit polyclonal 600-401-A33, Rockland), laimennoksella 1:20 000. MitoProfile tunnisti komplekseissa yleisimmin esiintyvät proteiinit (Kuvio 7).



KUVIO 7. MitoProfile-vasta-aine tunnisti kuviossa osoitetut proteiinit (AbCam 2016).

Kalvoa pidettiin vasta-ainelaimennoksissa 12 tuntia, jolloin ne ehtivät tarttua tutkittaviin proteiineihin. Sen jälkeen ylimääräiset vasta-aineet pestiin (TBS+tween 0,2%) ja kalvoa käsiteltiin fluorensioivan leiman sisältävillä sekundäärivasta-aineilla (IRDye 800CW Donkey Anti-Mouse, Odyssey LI-COR, laimennos 1:20 000 ja IRDye 680LT Donkey Anti-Rabbit, Odyssey LI-COR, laimennos 1:20 000). Kalvoa pidettiin sekundäärivasta-ainelaimennoksissa tunnin ajan, jotta ne ehtivät tarttua primäärisiin vasta-aineisiin, jonka jälkeen ylimääräiset sekundäärivasta-aineet pestiin (TBS+Tweeen 0,2%). Lopuksi kalvo kuvattiin ja tulokset analysoitiin (Odyssey kuvantamislaitte, CLx-ohjelma, LI-COR). Analyysissä määritettiin fluorensioivan vasta-aineen signaali-intensiteetti-arvoja, jotka kertoivat tarkasteltavan proteiinin pitoisuudesta näytteessä.

8.4.3 ApoA1 ilmentymisen määrittäminen luurankolihasnäytteistä

ApoA1-geenin ilmentymistä luurankolihasissa tarkasteltiin DNA geenisiruanalyysin lisäksi qPCR - menetelmää hyödyntäen. Vuonna 2007 käännettyjä cDNA – näytteitä oli kuitenkin hyödynnetty jo merkittävä määrä aiempiin tutkimuksiin. Sen vuoksi niitä oli jäljellä enää vähän vuoteen 2014 mennessä. qPCR-analyysi (7300 real-time PCR system, Applied

Biosystems, Foster City, USA) toteutettiin kaikista näytteistä (n=13) valmistetulla yhteisliuoksella.

Analyyseissä hyödynnettiin ApoA1 (Hs00163641_m1) ja housekeeping GAPDH (Hs99999905_m1) geenien valmistajien mukaisia ilmenemisanalyysijä. Lyhyesti kuvattuna cDNA näytteistä tehtiin laimennossarja, jonka ApoA1-geenimäärityksillä voitiin arvioida ApoA1-geenin ilmentymistä mRNA-tasolla näytteissä ja GAPDH-geenimäärityksillä puolestaan cDNA:n säilymistä ja näytteiden eheyttä pakastamisen johdosta. qPCR-analyysin reaktiolaimennoksessa käytettiin fluorensioivan leiman sisältävää TaqMan - liuosta (Gene Expression Mastermix, Applied Sciences).

9 TULOKSET

9.1 Tutkittavien taustatiedot

TwinActive - tutkimuksen lihasnäytteiden keruuvaiheeseen valikoitui kymmenen vapaa-ajan fyysiseltä aktiivisuudeltaan eroavaa kaksosparia (n=20 henkilöä). Tutkittavista kolme oli mono- (MZ) ja seitsemän dizygootteja (DZ) pareja. Neljä paria (n=8 henkilöä) olivat naisia ja kuusi paria (n=12 henkilöä) miehiä. Tutkittavat jaettiin ryhmiin vapaa-ajan liikunnallisen aktiivisuuden mukaan, jolloin sekä aktiivisten, että inaktiivisten henkilöiden ryhmässä oli 10 tutkittavaa henkilöä. Vuoteen 2016 mennessä lihasnäytteitä oli jäljellä 13 kappaletta, jolloin osaan tutkimusongelmien tarkasteluun jäi kuuden aktiivisen ja seitsemän inaktiivisen tutkittavan ryhmät. Näistä näytteistä kuusi oli kerätty MZ- ja kuusi DZ- kaksospareilta ja lisäksi analyysihin hyväksyttiin yksi pariton DZ-näyte. Näistä tutkittavista kuusi henkilöä oli miehiä ja seitsemän naisia.

Kaksoset olivat keskimäärin 60-vuotiaita eikä heidän keskimääräinen pituus tai kehon paino eronneet tilastollisesti merkitsevästi aktiivisen ja inaktiivisen ryhmän välillä. Tutkittavien keskimääräinen painoindeksi asettui normaalipainon (18-25kg/m²) ylärajalle eikä ryhmien välillä ollut eroa painoindeksin suhteen. Kehon rasvaprosentissa havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero ryhmien välillä ($p \leq 0,05$), kun tutkittavien määrä oli suurempi (n=20), mutta määrän pienentyessä (n=13) eroa ei havaittu ryhmien välillä. Sen sijaan vapaa-ajan liikunnallisen aktiivisuuden määrä erosi merkittävästi ryhmien välillä niin takautuvan haastattelun perusteella ($p \leq 0,001$), kuin 30 vuoden seurantajakson keskimääräisiä arvoja tarkasteltaessa ($p \leq 0,001$).

Submaksimaalisen hapenottokyvyn (VO_{2peak}) tuloksia vertailtaessa, tutkittavien sukupuolella ei näyttänyt olevan merkittävää vaikutusta tulosten vertailuun eikä niitä sen vuoksi tarkasteltu erikseen. Näin ollen suuremmissa tutkittavien joukossa (n=20) ryhmien välillä oli tilastollisesti merkitsevää eroa ($p \leq 0,05$), aktiivisten kaksosten saadessa korkeampia tuloksia verrattuna inaktiivisiin. Sen sijaan eroa ei havaittu tutkittavien määrän vähentyessä (n=13) (Taulukko 4).

TAULUKKO 4. Tutkittavien taustamuuttajat TwinActive - tutkimuksen (n=20) ja vuonna 2014 – 2016 jäljellä olevien lihasnäytteiden (n=13) osalta.

	TwinActive – tutkimus vuonna 2007 (n=20)		p-arvo _a	Jäljellä olevat näytteet tutkittavilta henkilöiltä vuonna 2014 - 2016 (n=13)		p-arvo _a
	Aktiiviset (n=10) med (kh)	Inaktiiviset (n=10) med (kh)		Aktiiviset (n=6) med (kh)	Inaktiiviset (n=7) med (kh)	
Ikä (v)	60 (5)	60 (5)		59 (5)	59 (5)	
Pituus (cm)	169 (9)	171 (10)		166 (8)	166 (6)	
Paino (kg)	69 (12)	78 (23)	0,52	70 (11)	69 (6)	0,95
Painoindeksi (BMI)	24 (3)	26 (4)	0,08	25 (3)	25 (1)	0,73
Rasvaprosentti (%)	20 (6)	25 (6)	0,05*	22 (6)	25 (6)	0,63
Keskiarvoinen MET 12 kk ajalta (METH/päivä)	8 (4)	2 (2)	<0,001***	9 (4)	2 (2)	0,002**
Keskiarvoinen MET 30 vuoden ajalta (METH/päivä)	11 (3)	2 (2)	<0,001***	12 (3)	2 (2)	0,001***
VO_{2peak} (ml*kg⁻¹*ml⁻¹)	33 (5)	28 (4)	0,04*	31 (5)	28 (3)	0,24

v = vuotta, kk = kuukautta, cm = senttimetriä, kg = kilogrammaa, ml = millilitraa

BMI = painoindeksi, MET = metabolic equivalent, lepoaineenvaihdunnan kerroin, METH = MET tuntia

a Ryhmien väliset erot testattiin Mann-Whitney U-testillä, med = mediaani, kh = keskihajonta

*p-arvo ≤0,05, tilastollisesti merkitsevä ero ryhmien välillä

**p-arvo <0,01, tilastollisesti hyvin merkitsevä ero ryhmien välillä

***p-arvo ≤0,001, tilastollisesti erittäin merkitsevä ero ryhmien välillä

9.2 Seerumin ApoA1-pitoisuus

Suomalaiseen FINRISKI - tutkimukseen perustuen, seerumin ApoA1-pitoisuuden viitearvot määriteltiin erikseen miehille 1,1–2,0g/l (grammaa litrassa) ja naisille 1,2–2,3g/l (Leiviskä ym. 2011). Tähän työhön valikoitujen tutkittavien (n=20) seerumin keskimääräisiä apolipoproteiiniä muuttajia ei kuitenkaan arvioitu erikseen miesten ja naisten suhteen, sillä sukupuoli ei vaikuttanut merkittävästi tulosten vertailuun. Näin ollen kaksosten seerumin keskimääräinen ApoA1-pitoisuus asettui FINRISKI – tutkimuksen viitearvoihin eikä ryhmien välillä havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja. Lisäksi tarkasteltiin tutkittavien seerumin ApoB/ApoA1-suhdetta, jonka tuli asettua 0,3-1,0mmol/l (millimoolia litrassa) (HusLab 2014). Kaksosilla ApoB/ApoA1-suhde asettui näihin viitearvoihin eikä ryhmien välillä havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja (Taulukko 5).

Taulukko 5. Tutkittavien seerumin ApoA1-muuttujien keskimääräiset arvot.

TwinActive – tutkimus vuonna 2007 (n=20) med (kh)	p-arvo_a	Jäljellä olevat näytteet vuonna 2014 - 2016 (n=13) med (kh)	p-arvo_a
ApoA1 (g/l)		ApoA1 (g/l)	
Aktiiviset (n=10)		Aktiiviset (n=6)	
Inaktiiviset (n=10)	0,74	Inaktiiviset (n=7)	0,63
Kaikki tutkittavat (n=20)		Kaikki tutkittavat (n=13)	
ApoB/ApoA1 (mmol/l)		ApoB/ApoA1 (mmol/l)	
Aktiiviset (n=10)		Aktiiviset (n=6)	
Inaktiiviset (n=10)	0,25	Inaktiiviset (n=7)	0,53
Kaikki tutkittavat (n=20)		Kaikki tutkittavat (n=13)	

g/l = grammaa litrassa; mmol/l = millimoolia litrassa; med = mediaani; kh = keskihajonta

a Tutkittavien ryhmien keskiarvojen väliset erot testattiin Mann-Whitney U-testillä.

*p-arvo $\leq 0,05$, tilastollisesti merkitsevä ero ryhmien välillä

**p-arvo $< 0,01$, tilastollisesti hyvin merkitsevä ero ryhmien välillä

***p-arvo $\leq 0,001$, tilastollisesti erittäin merkitsevä ero ryhmien välillä

9.3 Soluhengitykseen liittyvien proteiinien ilmentyminen lihasnäytteissä

Tarkasteltaessa DNA geenisiruanalyysin tuloksia, kaikki oksidatiiviseen fosforylaatioon liittyvien proteiinien geenit ilmentyivät kaksosparien lihasnäytteissä (Taulukko 6, Liite 2). Mikrosirukokeessa näytteestä analysoidulle geenille mitattiin sen ilmentymisen tasoa kuvaava signaali-intensiteetti-arvo, joka oli verrannollinen geenin ilmentymiseen mRNA-tasolla. Oksidatiiviseen fosforylaatioon liittyvistä ja proteiinikomplekseja koodaavista geneistä yhteensä 17 kappaletta erosi tilastollisesti merkitsevästi ($p \leq 0,05$) ryhmien välillä. Eniten eroavia genejä löytyi kompleksin 1 proteiineista.

Yhteensä 15 alayksikössä geenien ilmentyminen oli aktiivisilla tehokkaampaa kuin inaktiivisilla ($p \leq 0,05$). Sen sijaan kahden geenin kohdalla ilmentyminen oli runsaampaa puolestaan inaktiivisilla kuin aktiivisilla ($p \leq 0,05$), mikä lisäsi ristiriitaisuutta havaittuihin tuloksiin. Näitä genejä olivat kompleksin 1 proteiinia Fe-S 1 (NM_005006.5) ja kompleksin 3 erästä proteiinialayksikköä (NM_006830.2) koodittavat geenit (Taulukko 6).

TAULUKKO 6. Tilastollisesti merkitsevästi ($p \leq 0,05$) eroavat geenit ryhmien välillä, jotka liittyivät oksidatiiviseen fosforylaatioon.

	Proteiini, jota geeni koodittaa (Sekvenssikoodi)	Aktiiviset (n=10) ka (kh) _a	Inaktiiviset (n=10) ka (kh) _a	p-arvo_b
Kompleksi 1 NADH dehydrogenaasi /ubiquinoni	α -subkompleksit 3, 10, 10, 11, 13 (NM_004542.2)	8427 (611)	7551 (375)	0,003**
	(NM_004544.2)	814 (190)	730 (144)	0,01**
	(NM_004544.2)	574 (93)	512 (60)	0,03*
	(NM_175614.2)	2357 (291)	2163 (224)	0,03*
	(NM_015965.4)	2381 (246)	2231 (176)	0,05*
	β -subkompleksit 2, 11 (NM_004546.2)	6108 (686)	5636 (631)	0,01**
	(NM_019056.3)	6486 (608)	6094 (472)	0,04*
	α/β -subkompleksi 1 (NM_005003.2)	7036 (788)	6513 (633)	0,01**
	Fe-S proteiini 1 (NM_005006.5)	406 (59)	481 (59)	0,006***
	Subkompleksi määrittämätön (NM_002494.2)	1431 (84)	1333 (138)	0,03*
Kompleksi 2 Sukkinaatti dehydrogenaasi	Alayksikkö A, flavoproteiini (NM_004168.1)	2062 (199)	1874 (218)	0,01**
Kompleksi 3 Ubiquinoni-sytokromi c reduktaasi	Alayksikkö (NM_006830.2)	137 (14)	149 (14)	0,02*
Kompleksi 4 Sytokromi c oksidaasi	Alayksikkö 6a <i>polypeptidi 1</i> (NM_005205.2)	11802 (1158)	11018 (716)	0,05*
	Alayksikkö 6b <i>polypeptidi 1</i> (NM_001863.3)	9311 (1162)	8706 (660)	0,05*
	Alayksikkö 8 (NM_004074.2)	12642 (1211)	11755 (604)	0,04*
Kompleksi 5 ATP syntaasi	AlayksikköF2, <i>transcript variant 3</i> (NM_001003714.1)	2705 (384)	2441 (210)	0,01**
	ATP5S-kaltainen ('like') (NM_018035.1)	1009 (124)	942 (131)	0,05*

ka = keskiarvo; kh = keskihajonta;

transcript variant = proteiinia koodaavan lähetti-RNA:n vaihtoehtoinen muoto

a DNA geenisiruanalyysin signaali-intensiteetti-arvo

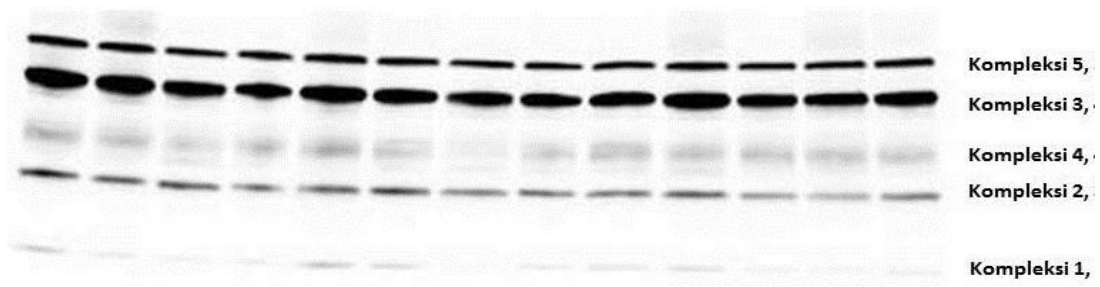
b Ryhmien väliset erot testattiin R-ohjelmiston t-testillä

*p-arvo $\leq 0,05$, tilastollisesti merkitsevä ero ryhmien välillä

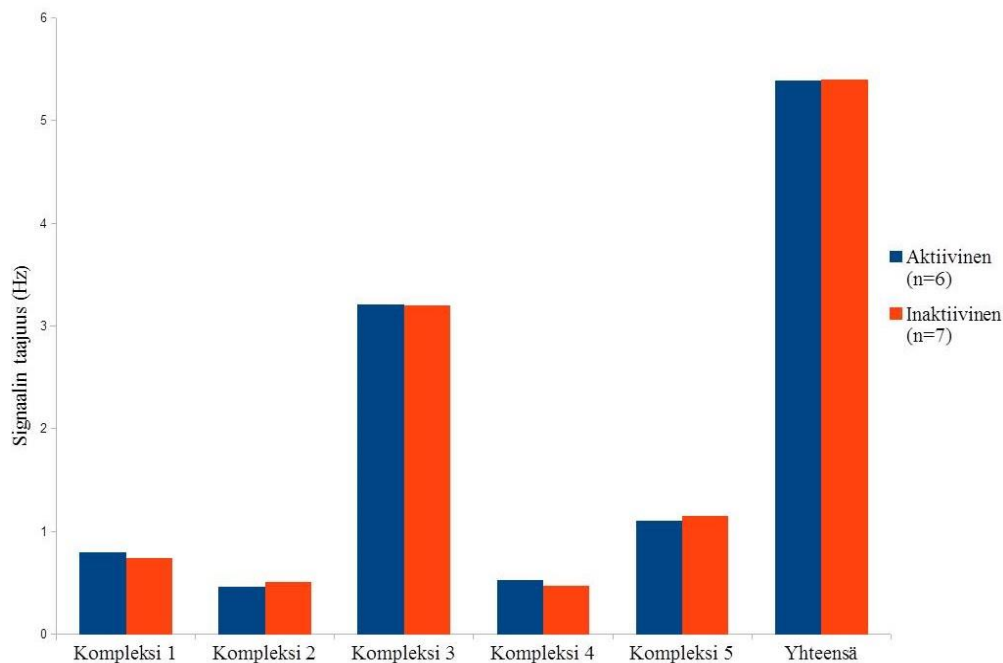
**p-arvo $< 0,01$, tilastollisesti hyvin merkitsevä ero ryhmien välillä

***p-arvo $\leq 0,001$, tilastollisesti erittäin merkitsevä ero ryhmien välillä

Oksidatiiviseen fosforylaatioon osallistuvien kompleksien ilmentymistä tarkasteltiin proteiinitasolla, Western blot - menetelmää hyödyntäen. Menetelmässä käytetty primääriivasta-aine (MitoProfile) havaitsi kussakin kompleksissa esiintyvien proteiinien signaali-intensiteetti-arvoja, joiden tarkemmat tiedot esitettiin kuviossa 7. Nämä proteiinit esiintyvät kaikkien tutkittavien (n=13) lihasnäytteissä (Kuvio 8), mutta tilastollisesti merkitseviä ($p \leq 0,05$) eroja ei havaittu ryhmien välillä (Kuvio 9). Tämä ilmiö näkyi myös DNA geenisiruanalyysissä mRNA-tasolla näiden proteiinien osalta (Liite 2).



KUVIO 8. Oksidatiiviseen fosforylaatioon liittyvät proteiinit esiintyvät tutkittavien lihasnäytteissä (n=13).



KUVIO 9. Oksidatiivisen fosforylaatioon liittyvien proteiinien ilmentymisessä ei havaittu eroja ryhmien välillä (n=13). Ryhmien välisiä eroja tutkittiin Mann Whitney U-testin avulla.

9.4 Seerumin ApoA1-pitoisuuden yhteys lihasnäytteiden proteiinimäärityksiin

Tutkielmassa selvitettiin lisäksi seerumin ApoA1-pitoisuuden yhteyttä määritettyihin lihasproteiineihin kaksosilla. Työssä aiemmin esitetyissä kappaleissa todettiin, ettei ryhmien välillä havaittu tilastollisesti merkitseviä eroa valittujen seerumimuuttujien (n=20/n=13) tai oksidatiiviseen fosforylaatioon osallistuvien proteiinien (Western blot) tasoissa (n=13). Tarkasteltaessa kaikkia tutkittavia yhtenä ryhmänä (n=13), seerumin ApoA1-pitoisuudella tai ApoB/ApoA1-suhteella ei ollut tilastollisesti merkitsevää yhteyttä lihaskudoksen proteiinimäärityksiin ($p \geq 0,05$).

9.5 ApoA1-geenin ilmentyminen lihasnäytteissä

Tutkielman toisen aihealueen tarkoituksena oli selvittää, ilmentyikö ApoA1-proteiini kaksosten luurankolihasnäytteissä. qPCR-analyysin tulosten perusteella havaittiin, että ApoA1-geeni ilmentyi mRNA-tasolla kaksosten luurankolihasnäytteistä tehdyssä yhteisliuoksessa. Tämä havaittiin niin, että näytteiden mRNA:sta käännetystä cDNA:sta voitiin tunnistaa ApoA1-geenialue, johon menetelmässä käytetty aluke tarttui. Näin ollen lihasten ApoA1-geenialueesta oli kopioitu mRNA-juosteita, jotka havaittiin näytteessä. Erillinen qPCR-analyysi housekeeping geenillä sen sijaan osoitti, että vuonna 2007 käännetyt cDNA-näytteet olivat edelleen eheitä.

qPCR-analyysin perusteella ei kuitenkaan voitu erotella sitä, oliko fyysisesti aktiivisella elämäntavalla merkitystä ApoA1-geenin ilmentymisen tasoon, sillä analyysissä käsiteltiin kaikilta tutkittavien näytteitä yhdessä eikä erikseen. Sen sijaan ApoA1-geeni näytti ilmentyvän lihaskudoksessa myös kaksosten (n=20) DNA geenisiruanalyysissä ja nämä tulokset osoittivat, että tutkittavien ryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa geenin ilmentymisen tasoissa ($p \geq 0,05$) (Taulukko 7).

TAULUKKO 7. Geenisiruanalyysissä havaittu ApoA1 ilmentyminen lihasnäytteissä (n=20).

Proteiini, jota geeni koodittaa (Sekvenssikoodi)	Aktiiviset ka (kh) _b (n=10)	Inaktiiviset ka (kh) _b (n=10)	p-arvo _a
ApoA1 (NM_000039.1)	41 (3)	40 (2)	0,58
ApoA1binding protein (NM_144772.1)	603 (60)	563 (78)	0,12

ka = keskiarvo, kh = keskihajonta

a Ryhmien väliset erot testattiin R-ohjelmiston t-testillä

b DNA geenisiruanalyysin signaali-intensiteettiarvo

*p-arvo $\leq 0,05$, tilastollisesti merkitsevä ero ryhmien välillä

9.6 ApoA1- ja HDL-partikkeleihin liittyvien geenien ilmentyminen lihasnäytteissä

DNA geenisiruanalyysin tulosten perusteella havaittiin, että ApoA1- ja HDL-partikkelien toimintaan liittyvien reseptorien ja entsyymien genejä ilmentyi kaksosten luurankolihasnäytteissä mRNA-tasolla. Näistä esimerkiksi kalvoreseptori SR-B₁:n oli havaittu aiempien tutkielmien mukaan ilmentyvän muun muassa maksakudoksessa. Alla olevaan taulukkoon on listattu DNA geenisiruanalyysissä havaitut tulokset (Taulukko 8).

TAULUKKO 8. DNA geenisiruanalyyssissä (n=20) havaittujen ApoA1- tai HDL-partikkelien toimintaan liittyvien reseptorien sekä entsyymien geenit.

	Proteiini, jota geeni koodittaa (Sekvenssikoodi)	Aktiiviset ka (kh) _b (n=10)	Inaktiiviset ka (kh) _b (n=10)	p-arvo_a
Kalvoreseptorit	ABCA ₁ (NM_005502.2)	746 (239)	709 (140)	0,80
	ABCG ₁ , transcript variant 1, 2, 3, 5 ja 7 (NM_207630.1)	48 (3)	50 (4)	0,12
	(NM_016818.2)	185 (51)	181 (50)	0,69
	(NM_207174.1)	50 (4)	51 (5)	0,72
	(NM_207627.1)	48 (4)	48 (3)	0,89
	(NM_207629.1)	90 (26)	76 (9)	0,05*
	SR-B ₁ (NM_005505.3)	136 (20)	136 (15)	0,97
Tumareseptorit	HNF4 α , transcript variant 3 ja 6 (NM_178850.1)	45 (3)	46 (3)	0,66
	(NM_001030004.1)	45 (1)	45 (3)	0,67
	HNF4 γ (NM_004133.3)	44 (3)	45 (2)	0,61
Entsyymit	CETP (NM_000078.1)	56 (4)	59 (5)	0,19
	LCAT (NM_000229.1)	55 (6)	54 (3)	0,67
	PLTP, transcript variant 1 ja 2 (NM_006227.2)	49 (3)	48 (4)	0,42
	(NM_182676.1)	148 (22)	137 (21)	0,29
	PON ₁ (NM_000446.3)	51 (10)	47 (5)	0,10
	PON ₂ (NM_000305.2)	383 (54)	387 (57)	0,77
	PON ₃ (NM_000940.1)	59 (6)	58 (4)	0,57
	HL (NM_000236.1)	39 (1)	40 (4)	0,36

ka = keskiarvo, kh = keskihajonta

a Ryhmien väliset erot testattiin R-ohjelmiston t-testillä

b DNA geenisiruanalyyssin signaali-intensiteetti-arvo

*p-arvo $\leq 0,05$, tilastollisesti merkitsevä ero ryhmien välillä

10 POHDINTA

Tutkielmaan valikoituneiden kaksosten vapaa-ajan fyysinen aktiivisuus oli eronnut merkittävästi yli 30 vuoden ajan. Kaksosista MZ-parit jakoivat lähes saman ja DZ-parit noin 50% saman geneettisen aineiston, jonka vuoksi aineisto oli ainutlaatuinen fyysisen aktiivisuuden erojen tarkasteluun. Jyväskylän yliopiston pitkäaikainen kaksosseuranta mahdollisti sen, että vuonna 2007 TwinActive - tutkimukseen valikoituivat vain sellaiset kaksosparit, joiden fyysinen aktiivisuus oli eronnut eniten. Sen lisäksi tutkittavilta kerätty laaja aineisto mahdollisti erilaisten kudosmuuttujien vertailun.

TwinActive - tutkimus oli Helsingin yliopiston kansanterveystieteen laitoksen eettisen toimikunnan hyväksymä ja siinä noudatettiin hyviä tieteellisiä käytäntöjä. Kaksosparit olivat vapaaehtoisia ja antoivat kirjallisen suostumuksen tutkimuksen erivaiheisiin osallistumisesta. Tämän työn tekijä ei osallistunut aineiston keruuseen vaan käsitteli muuttujia ID-tunnisteiden avulla, jolloin tutkittavien henkilötiedot, kuten nimi tai asuinpaikkakunta pysyivät tunnistamattomina.

10.1 Tutkittavien erot vapaa-ajan fyysisessä aktiivisuudessa

Kaksosten vapaa-ajan fyysistä aktiivisuutta oli arvioitu 12 kuukauden takautuvan kyselyn avulla (Liite 1), joka toteutettiin teemahaastatteluin, mikä saattoi lisätä vastausten luotettavuutta. Toisaalta takautuva ajanjakso oli pitkä ja sisälsi esimerkiksi eri vuodenaikojen muistelua. Näin ollen tulokset olivat saattaneet sisältää ali- tai yliparantointia esimerkiksi fyysisen aktiivisuuden määrästä. Muun muassa Hearst ym. (2012) epäilivät kyselylomakkeiden validiteettia ja reliabiliteettia edellä mainittujen syiden takia. Toisaalta edeltävissä julkaisuissa oli havaittu, että kaksoset olivat eronneet esimerkiksi kehonkoostumukseltaan (Leskinen ym. 2009; Waller ym. 2010; Leskinen ym. 2013) ja kaksosten rasvaprosentti sekä submaksimaalinen hapenottokyky erosivat ryhmien välillä (n=20). Näin ollen pitkäaikainen fyysisen aktiivisuuden ero oli luultavasti ollut todellinen ja vaikuttanut kaksosten fenotyyppeihin.

Ryhmät nimettiin ”aktiiviseksi” (engl. active) ja ”inaktiiviseksi” (engl. inactive) vapaa-ajan fyysisen aktiivisuuden määrän (MET_h) ja edeltävien julkaisujen mukaan (Leskinen ym. 2010;

Waller ym. 2010; Kujala ym. 2013). Ryhmiä vertailtiin näin ollen keskenään eikä arvioitu sitä, olivatko henkilöt keskimääräistä aktiivisempia vai inaktiivisempia verrattuna samaa sukupuolta tai ikäluokkaa oleviin henkilöihin. Kaksostutkimusta varten ei kuitenkaan toteutettu erillistä interventiota, jossa toinen ryhmä olisi ollut aktiivisempi ja toinen esimerkiksi vuodelevossa. Sen vuoksi todenmukaisemmin ryhmät olisi voitu nimetä ”aktiivisiksi” (engl. active) ja ”vähemmän aktiivisiksi” (engl. sedentary).

10.2 Menetelmien luotettavuus

Tutkielmassa analysoitujen lihasnäytteiden mRNA oli eristetty vuonna 2007, jolloin näytteiden puhtaus oli tarkistettu ja ainoastaan puhdas cDNA hyväksytty säilöttäväksi. Näytteistä tehdyistä analyyseistä oli julkaistu tutkimusartikkeleita (Leskinen ym. 2010; Kujala ym. 2013), mutta vuosiin 2014 - 2016 mennessä näytteitä oli säilytetty pitkään, mikä saattoi heikentää tämän työn tulosten luotettavuutta. Tässä työssä käytetyt analysointimenetelmät olivat monivaiheisia ja edellyttivät tekniikoiden hyvää hallintaa. Työn tekijä harjoitteli tekniikoita ennen varsinaisten näytteiden käsittelyä, mutta menetelmissä mahdollisesti sattuneet virheet saattoivat vaikuttaa tuloksiin. qPCR- ja Western blot - analyyseissä näytteiden (n=13) eheys tarkistettiin, jonka lisäksi tulokset normalisoitiin housekeeping geenin avulla, mikä saattoi puolestaan vahvistaa tulosten luotettavuutta.

Vuonna 2008 näytteistä kerätyt cDNA - näytteet lähetettiin DNA geenisiruanalyysiin (Turun yliopisto), jossa niiden puhtaus tarkistettiin uudelleen. Kokeessa käytettiin yleisesti hyväksytyjä menetelmiä sekä kaupallista geenisirua, joka sisälsi alukkeet huomattavalle määrälle mRNA-kopioita (48 803). Kaupallisesti tuotettu siru oli luotettavampi kuin itse tehty, sillä sirujen valmistajat pyrkivät vähentämään cDNA:han liittyviä ongelmia ja tuottamaan tasalaatuisia tuotteita (Illumina 2010). Sirutuloksia käsiteltiin tilastollisin menetelmin ei-biologisten tekijöiden vähentymiseksi (Laiho 2008), mikä saattoi lisätä tulosten luotettavuutta.

Kaksosparit olivat iältään noin 60-vuotiaita, joten mahdollisia ikäänymisestä johtuvia muutoksia oli ehtinyt tapahtua tutkittavissa kudoksissa. Kaksosten vapaa-ajan fyysisen kuormituksen määrää tai laatua ei kontrolloitu, mikä olisi saattanut lisätä fyysisen aktiivisuuden vaikuttavuuden arvioimista tutkittaviin muuttujiin. Lisäksi tutkittavia oli

vähäinen määrä, mikä vaikutti tulosten yleistettävyyteen. Tarkasteltu aineisto oli kuitenkin ainutlaatuinen pitkäaikaisen fyysisen aktiivisuuden ja vähäisemmän fyysisen aktiivisuuden aikaansaamien rakenteellisten ominaisuuksien tutkimiseen. Saatuja tuloksia voidaankin hyödyntää suuntaa-antavina ilmiöinä elinikäisen fyysisen aktiivisuuden erojen vaikutuksista valittuihin kudosmuuttujiin.

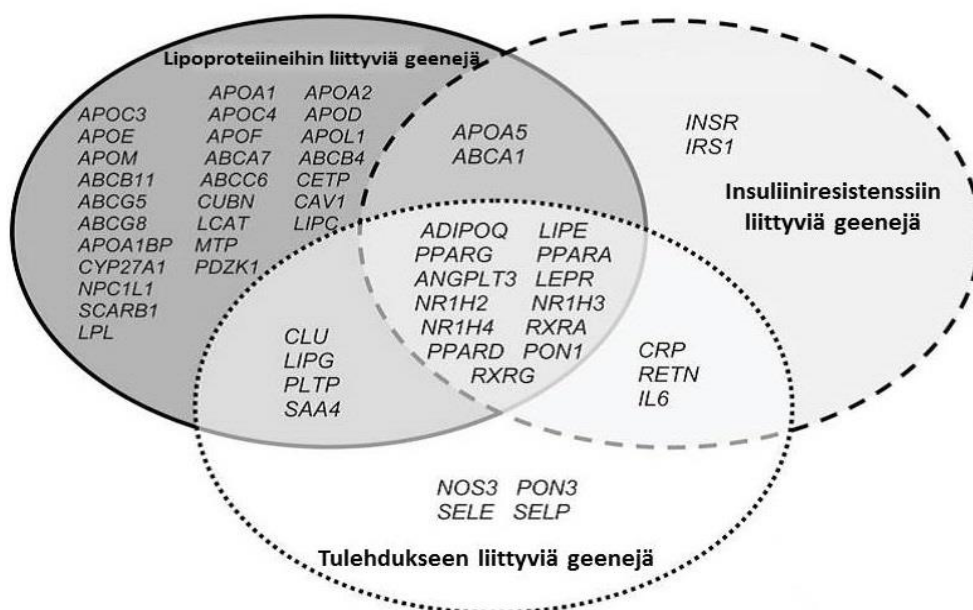
10.3 Perimän merkitys seerumin HDL- ja ApoA1-pitoisuuteen

Seerumin HDL-kolesterolipitoisuuden on epäilty olevan yhteydessä elimistön suoritustehosiisuuteen ja säännöllisen, kohtuu- tai kovatehoisen aerobisen liikunnan kehittävän HDL-tasojen tehokkaasti (Olchawa ym. 2004; Kodama ym. 2007). Kaksostutkimukset ovat sen sijaan osoittaneet perimän vaikuttavan seerumin HDL-kolesteroliin liikuntaharjoittelusta huolimatta (Williams ym. 2005). Niin ikään yksilöllisen HDL-kolesterolin ”lähtötason” on havaittu vaikuttavan HDL-tasojen kehittymisen ja liikuntakapasiteetin yhteyteen, sillä esimerkiksi Williams ym. (1994) mukaan sellaiset henkilöt, joilla oli korkeampi HDL-pitoisuuden lähtötaso, jaksoivat juosta pidempiä matkoja viikossa kuin ne, joilla oli alhaisempi lähtötaso.

Tässä työssä selvitettiin fyysiseltä aktiivisuudelta eroavien elintapojen merkitystä valittuihin apolipoproteiiniimuuttujiin samasta geeniperimästä huolimatta. Seerumin ApoA1- tai ApoB/ApoA1-suhteessa ei havaittu eroja ryhmien välillä (n=20), mikä saattoi johtua perimästä tai tutkittavien määrästä. Aiemmissa julkaisuissa on kuitenkin havaittu, että kaksosparien aktiivisella ryhmällä seerumin HDL-kolesterolipitoisuus ja suurempien HDL-partikkelien määrä olivat korkeampia kuin inaktiivisella ryhmällä (Leskinen ym. 2010; Kujala ym. 2013). Edeltävissä julkaisuissa kaksosaineiston tuloksia yhdistettiin laajempaan aineistoon (Kujala ym. 2013) tai niissä hyödynnettiin erilaisia tilastollisia menetelmiä kuin tässä työssä (Leskinen ym. 2010). Tässä tutkielmassa tilastomenetelmänä käytettiin pienille aineistoille soveltuvaa testiä (Mann Whitney U-testi), jossa vertailtiin kahden ryhmän arvoja keskenään. Sen sijaan testi saattoi jättää huomioimatta kaksosaineistolle erityisiä piirteitä.

Vastavuoroisesti vähäisen fyysisen aktiivisuuden ja metabolisten sairauksien on todettu liittyvän seerumin alhaiseen HDL-kolesterolipitoisuuteen (Zhang ym. 2013). Ahmadzadeh & Azizi (2014) listasivat artikkelissaan ryhmän geenejä, jotka liittyivät sekä seerumin alhaiseen

HDL-pitoisuuteen, että yleisimpiin metabolisiin sairauksiin, kuten insuliiniresistenssiin (Kuvio 10).



KUVIO 10. Eräitä insuliiniresistenssiin tai tulehdukseen liittyviä geenejä, jotka ovat joko suoraan tai epäsuoraan yhteydessä seerumin lipoproteiineihin (Ahmadzadeh & Azizi 2014).

HDL-partikkelien rakenneproteiinien monien roolien tarkasteluun onkin herätty vasta hiljattain ja tutkimuskenttä laajenee analyysimenetelmien tarkentuessa. Muun muassa Surakka ym. (2012) havaitsivat erään geenilokaation variaation (geenilokus rs2483058, introni SRGAP2) vaikuttavan seerumin HDL-kolesterolipitoisuuteen MZ-kaksospareilla. Sellaiset henkilöt, jotka kantoivat geenin C-alleelia, näyttivät olevan herkempiä ympäristötekijöiden vaikutuksille samasta perimästä huolimatta. Aiemmin geenin oli havaittu liittyvän erilaisiin syöpiin, mutta sen yhteyttä lipoproteiinimuuttujiin ei ollut tutkittu (Surakka ym. 2012). Liikuntaharjoittelun ja toisaalta vähäisen aktiivisuuden vaikutukset tällaisten geenivariaatioiden kantajille saattaisivat olla merkityksellisiä ja selittää sitä, miksi joillakin henkilöillä seerumin HDL-kolesteroli pysyy alhaisena liikuntaharjoittelusta huolimatta.

Niin ikään ApoA1-proteiinia muistuttavia lääkeyhdisteitä on kehitelty niin ihmis- kuin eläintutkimuksin (Reddy ym. 2014; White ym. 2014). Parhaimmillaan näiden lääkeyhdisteiden positiiviset vaikutukset saattaisivat ratkaista alhaisen HDL-kolesterolipitoisuuden kohentumisen dilemman erinäisistä geneettisistä taustoista huolimatta.

Toistaiseksi lääkeinterventioiden positiiviset vaikutukset ovat jääneet kuitenkin lyhytaikaisiksi eivätkä ole korvanneet liikunnallisen aktiivisuuden merkitystä ensisijaisena hoitomuotona (Zhang ym. 2013; White ym. 2014).

Lähitulevaisuudessa Ahmadzadeh & Azizin (2014) listaus laajentunee edelleen, sillä tarkennusta erilaisten kandidaattigeenien sekä geenisäätelijöiden, kuten microRNA-juosteiden yhteyksistä lipidimuuttujiin kerätään lisää (Butler ym. 2015; Flowers ym. 2015). Näiden säätelytekijöiden tunnistaminen saattaisi tarkentaa geneettisiä tekijöitä sekä selventää sitä, miksi ainoastaan kohtuu- tai kovatehoinen aerobinen harjoittelu vaikuttaa tehokkaimmin HDL-kolesterolin kehittymiseen. Toisaalta tarkennusta kaivattaisiin edelleen siitä, mitkä tekijät vaikuttavat ApoA1-proteiinin ilmentymiseen sekä sen vallitsevaan pitoisuuteen ja nopeisiin poistamistapahtumiin seerumissa. Niin ikään alustavat havainnot HDL-pre- β -partikkelien ilmentymisen tehostumisesta akuutin fyysisen kuormituksen seurauksena (Jafari ym. 2003; Sviridov ym. 2003) kaipaisivat lisää näyttöä.

10.4 Fyysisen aktiivisuuden erojen merkitys luurankolihasien soluhengitysproteiineihin

Kompleksi 1 (NADH dehydrogenaasi-ubikinoni) aloittaa oksidatiivisen fosforylaation tapahtumaketjun, ollen keskeisin tekijä mitokondrioiden soluhengitys- ja energiametaboliassa (Sharma ym. 2009). Kompleksin 1 onkin todettu olevan suurin ja monimutkaisin proteiinikompleksi sen useiden tehtävien sekä alayksiköidensä ansiosta (Gorman ym. 2015), ja eläinkokeissa sen toimintahäiriöiden on epäilty olevan suoraan verrannollinen oksidatiivisen fosforylaation häiriöihin (Irwin ym. 2013). Tämän työn kaksosten lihaskudoksessa ilmentyneitä geenejä oli aiemmin arvioitu GSEA menetelmän avulla (Leskinen ym. 2010), jossa geenejä oli klusteroitu toiminnallisiin ryhmiin, kuten oksidatiivisen fosforylaatioon liittyviin geenisarjoihin sekä arvioitu näitä geenisarjoja ryhmien välillä (Leskinen ym. 2010). Tässä työssä tutkittiin puolestaan oksidatiiviseen fosforylaatioon liittyviä geenejä tarkemmin, jolloin pystyttiin arvioimaan yksittäisten proteiinialayksiköiden ilmentymistä kokonaisten geenisarjojen sijaan. Työssä havaittiin 17 proteiinialayksikön geenien ilmentymisen eroavan tilastollisesti merkitsevästi ($p \leq 0,05$) ryhmien välillä ja näistä 10 geeniä liittyi kompleksin 1 proteiineihin. Muita tilastollisesti merkitseviä eroja löytyi yhdestä tai korkeintaan muutamasta alayksiköistä kunkin kompleksin kohdalla. Eroavissa geneeissa pääasiassa aktiivisilla havaittiin korkeampia arvoja kuin inaktiivisilla henkilöillä.

Mitokondrioiden vähentyneen määrän ja rakenteellisten muutosten on osoitettu liittyvän vähäiseen liikuntaan, metabolisiin sairauksiin sekä ikääntymiseen (Chanséaume & Morio 2009). Toisaalta aerobisen harjoittelun on todettu vaikuttavan positiivisesti edellä mainittuihin muuttujiin (McPhee ym. 2011; Konopka ym. 2013). Yksittäisten proteiinialayksiköiden geenien ilmentymistä erilaisten metabolisten tai fyysisten kuormitustekijöiden seurauksena on tutkittu verrattain vähän. Ling ym. (2007) ja Ritov ym. (2010) havaitsivat kompleksien geenien ilmentymisen ja etenkin kompleksin 1 proteiinipitoisuuden vähentyneen insuliiniresistenssiä ja tyypin 2 diabetesta sairastavilla ihmisillä. Lisäksi Ling ym. (2007) epäilivät erään kompleksin 1 alayksikön (NDUFB6) ilmentymisen vähentyvän ikääntymisen seurauksena (Ling ym. 2007).

Tämän työn lihasnäytteissä (n=13) oli ehtinyt tapahtua ikääntymisestä johtuvia muutoksia. Lisäksi ryhmien välisten erojen tarkasteluun valittiin tiukat raja-arvot ($p \leq 0,05$), jolloin havaintojen ulkopuolelle saattoi jäädä useita positiivisia löydöksiä, jotka kertoivat biologisista muutoksista komplekseissa (Laiho ym. 2008). Havaitut geenien ilmentymisen erot ryhmien välillä saattoivat johtua muista tekijöistä, kuin ainoastaan fyysisen aktiivisuuden vaikutuksista. Toisaalta löyhempiä raja-arvoja käytettäessä ($p \leq 0,1$) havaittiin, että yhteensä 25 geenin ilmentymisessä oli eroja niin, että aktiivisilla ilmentymisen taso oli voimakkaampaa kuin inaktiivisilla, mikä saattoi viitata siihen, että fyysisesti aktiivisella elämäntavalla oli merkitystä geenien tehokkaampaan ilmentymiseen samasta perimästä huolimatta. Epäiltäväksi jäi, olisiko näitä havaintoja voitu vahvistaa hyödyntämällä suurempaa tutkittavien määrää.

Sen sijaan yksittäisten alayksiköiden geenien ilmentymisen vaikutukset laajemmin mitokondrioiden toimintaan tai esimerkiksi metabolisiin sairauksiin on huonosti tunnettu (Sharma ym. 2009). Tässä työssä ei havaittu eroja kompleksien ilmentymisen tasoissa proteiinitasolla. Western blot - menetelmässä käytetyt vasta-aineet analysoivat kuitenkin ainoastaan yhden proteiinin ilmentymistä kussakin kompleksissa. Valmistajan mukaan esimerkiksi liikuntaharjoittelun aikaansaamat fysiologiset ja patologiset muutokset vaikuttivat valittujen proteiinien ilmentymiseen ja ilman näitä proteiineja tiettyjä kompleksejakaan (1-5) ei olisi havaittu näytteessä (AbCam 2016). Toisaalta DNA geenisiruanalyyseissä havaitut tulokset olivat yhteneviä Western blot - tulosten kanssa, sillä tutkituissa proteiineissa ei havaittu eroa ryhmien välillä myöskään mRNA-tasolla. Saatujen tulosten perusteella ei voitu

kuitenkaan arvioida, miten yksittäisten alayksiköiden ilmentyminen tai niissä havaitut erot ryhmien välillä mRNA-tasolla olisivat näkyneet proteiinitasolla. Lisäksi näytteiden toiminnalliset mittaukset jäivät uupumaan.

10.5 Seerumin ApoA1 yhteys soluhengitykseen osallistuviin proteiineihin

Seerumin HDL-kolesterolipitoisuuden on epäilty kohoavan fyysisen aktiivisuuden seurauksena muun muassa sen vuoksi, että sen toiminta voisi liittyä tehostuneisiin rasvahappojen kuljetustapahtumiin työskenteleville soluille (Leskinen ym. 2010). HDL-partikkelien herkkyys sitoa seerumin rasvayhdisteitä (Gangani ym. 2008) on saattanut vaikuttaa tällaisten johtopäätösten kehittymiseen. Toisaalta luurankoli hasten, HDL-muuttujien ja liikunnan yhteyksiä on pohdittu aiemminkin muun muassa niin, että seerumin suurten HDL-partikkelien on havaittu lisääntyneen säännöllisen fyysisen aktiivisuuden johdosta (Kujala ym. 2013) ja pienten partikkelien määrän kohoavan puolestaan lihavuuden seurauksena (Pietiläinen ym. 2009). Eräät tutkijaryhmät ovat esittäneet seerumin HDL-kolesterolipitoisuuden kohoamisen liittyvän lihasmassan kehittymiseen (Olchawa ym. 2004) ja toiset tietynlaiseen lihassolutyypijakaumaan (pääasiassa tyyppin I solut) (Tikkanen ym. 1996).

Samanaikaiset muutokset elimistön metaboliassa liikuntaharjoittelun seurauksena saattaisivat johtaa samanaikaisiin muutoksiin sekä seerumin lipidiaineenvaihdunnassa, että työskentelevien lihasten mitokondrioissa (Leaf ym. 2003). Sen sijaan ApoA1-proteiinin edistämät vaikutukset mitokondrioiden aerobisessa kapasiteetissa *in vivo*- ja koe-eläintutkimuksin (Lehti ym. 2013) herättivät epäilyn näiden tekijöiden yhteydestä. Viitteet näiden muuttujien välisestä yhteydestä jäivät kuitenkin tässä tutkielmassa ratkaisematta, sillä yhteyttä muuttujien välillä ei havaittu. Kontrolloidumpi liikuntainterventio ja siihen liittyvä tutkimusasetelma olisivat saattaneet sopia paremmin näiden tekijöiden yhteyden tarkasteluun.

10.6 ApoA1 ilmentyminen kaksosten luurankoli haskudoksissa

Aiemmissa julkaisuissa ApoA1-geenin oli havaittu ilmentyvän hiirien luurankoli haskudoksissa ja sijaitsevan solun sisäisissä lipiidiproleteissa (Zhang ym. 2011). Tämän tutkielman analyyseissä havaittiin, että ApoA1-geeni ilmentyi lihasnäytteissä (n=13)

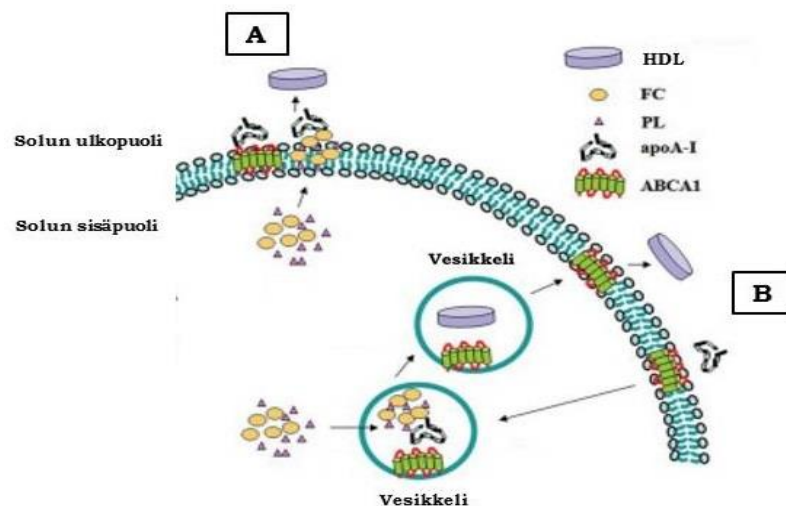
myös ihmisillä. qPCR-analyysissä kaksosten lihasnäytteistä voitiin tunnistaa geeniä koodaava alue. DNA geenisiruanalyysi puolestaan vahvisti havaitun tuloksen ja selvensi, ettei tutkittavien fyysisesti aktiivisilla elämäntapojen eroilla näyttänyt olevan merkitystä ilmentymiseen tasoon. Verrattaessa ApoA1-geenin ilmentymisen tasoa oksidatiiviseen fosforylaatioon liittyvien proteiinien ilmentymisen tasoihin, ApoA1-geenin signaali-intensiteetti-arvo näytti olevan verrattain vähäistä molemmissa tutkittavissa ryhmissä. Niin ikään Zhang ym. (2011) havaitsivat ilmentymisen tason olevan hiirillä luurankolihas kudoksissa vähäisempää kuin esimerkiksi maksa- tai ohutsuoliston kudoksissa. He epäilivät, ettei proteiinin ilmentymiseen lihaksissa oltu sen vuoksi kiinnitetty aiemmin huomiota (Zhang ym. 2011). Varsinaisia viitearvoja ilmentymisen tasolle ei kuitenkaan laadittu ja sen vuoksi tämän ja Zhang ym. (2011) tutkielmien havaintojen tueksi kaivataan edelleen vahvistavaa näyttöä.

Niin ikään ApoA1-toimintaan ja muokkautumiseen liittyvien entsyymien geenien havaittiin ilmentyvän lihasnäytteissä. Seerumikudoksissa ApoA1- ja HDL-partikkelin muokkaustapahtumat ovat nopeita (Aztalos ym. 2014, 39-45) ja tämän työn tulosten perusteella epäiltäväksi jäi, olisiko ApoA1-partikkelilla ja sen muokkaamiseen osallistuvilla entsyymeillä samankaltaisia rooleja niin lihas- kuin seerumikudoksissa. Arvioit siitä, millaisessa solunsisäisessä tai -ulkoisessa tarpeessa ApoA1-proteiinia tai sitä muokkaavia entsyymejä syntesoitaisiin luurankolihas soluissa, jäivät kuitenkin tässä tutkielmassa ratkaisematta.

Kalvoreseptori ABCA₁:n oli osoitettu syntesoituvan lihaskudoksessa ja sijaitsevan solujen ulkokalvoilla sekä solun sisäisten vesikkeliin kalvopinnoilla (Neufeld ym. 2001). Aiempien julkaisujen mukaan niiden oli havaittu luovuttavan lipidi- ja kolesteroliyhdisteitä ainoastaan ApoA1- tai HDL-pre-β-partikkeleille. Reseptorin ja ApoA1-partikkelien yhteistyön sujuvuuden oli niin ikään todettu olevan ensisijaista elimistön kolesterolitasapainon säätelylle, sillä seerumin HDL-pitoisuus näytti olevan suoraan verrannollinen ABCA₁-pitoisuuteen solukalvoilla (Wang & Smith ym. 2014). Vastavuoroisesti seerumin ApoA1-partikkelien määrän oli todettu säätelevän ABCA₁-tarvetta ja toimivan ulkopuolisena inhibiittorina reseptorin nopeille hajotustapahtumille solun sisällä (Lu ym. 2008). Tämän tutkielman perusteella ABCA₁-reseptorin ilmentymisessä ei havaittu eroja ryhmien välillä, joten proteiinin ilmentymiseen vaikuttivat näillä tutkittavilla luultavasti muut tekijät, kuin vapaa-

ajan fyysisen aktiivisuuden määrä. Tämä saattoi kuitenkin vahvistaa havaintoa siitä, etteivät myöskään valittujen seerumimuuttujien tasot eronneet ryhmien välillä.

Mekanismit ApoA1- ja ABCA₁-proteiinien yhteistyöstä tarkentunevat edelleen. Toistaiseksi tutkimusalue on keskittynyt kolesteroliaineenvaihduntaan lähinnä seerumi- ja makrofagikudoksissa, joissa erilaisia signalointireittejä ApoA1- ja ABCA₁-proteiinien välillä on tunnistettu (Luu ym. 2013). Suuntaa-antavia viitteitä on kerätty myös siitä, että ABCA₁ kykenisi kuljettamaan ApoA1-partikkeleita endosytoosin avulla solun ulkopuolelta sisäisiin vesikkeleihin (Zhao ym. 2012). Mikäli ApoA1 syntesoituisi proteiinitasolle luurankolihas kudoksissa, sen proteiinituote saatettaisiin kuljettaa välittömästi kudosten ulkopuoliseen tilaan. Toisaalta Zhang ym. (2011) havainto hiirillä saattaisi viitata siihen, että ApoA1 jäisi solujen sisäpuolelle. Näin ollen solussa syntesoitunut ApoA1-partikkeli saattaisi sitoutua nopeasti ABCA₁-reseptoriin ja kulkeutua solun ulkopuolelle eksosytoosin avulla (Kuvio 11).



HDL = high density lipoprotein, FC = vapaa kolesteroli, PL = fosfolipidi

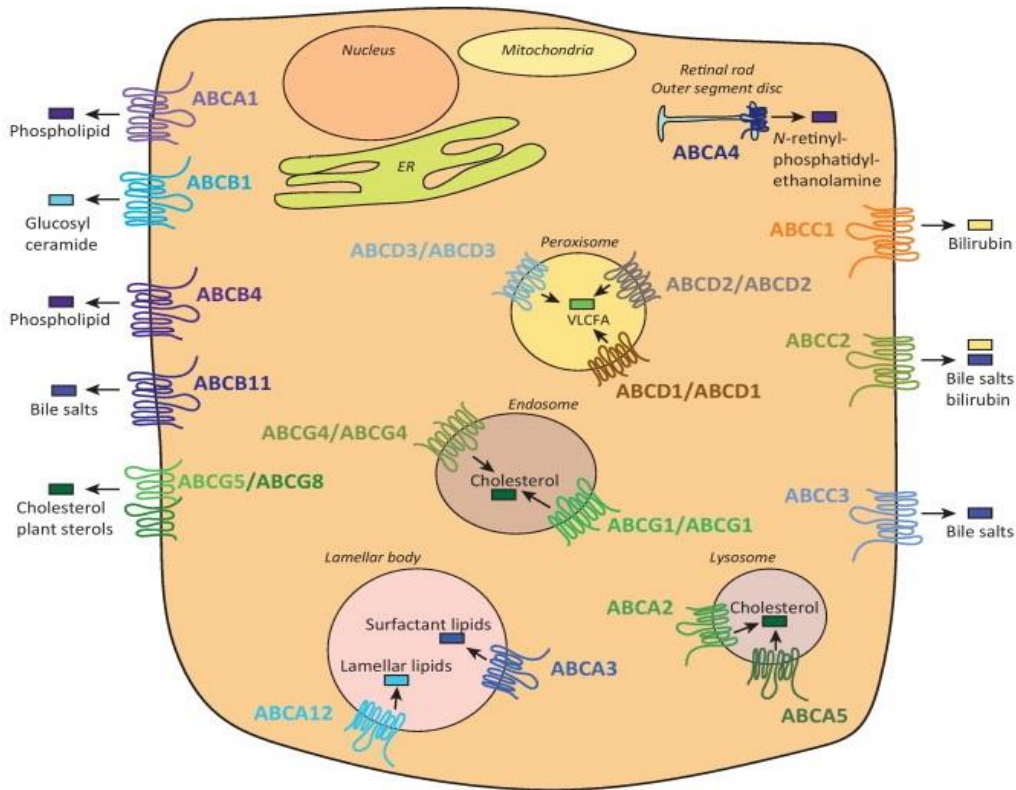
KUVIO 11. Zhao ym. 2012 listaamat hypoteesit ApoA1- ja ABCA₁-proteiinien yhteistyöstä. A:Kalvoreseptori ABCA₁ luovuttaa solunsisäiset lipidi- ja kolesteroli yhdisteet ApoA1:lle. B: ABCA₁ kuljettaa ApoA1-partikkelin soluun endosytoosin kautta ja luovuttaa lipidi- ja kolesteroliyhdisteet vesikkeleissä, jonka jälkeen HDL-partikkelit vapautuvat solusta eksosytoosin kautta.

Vaikka tässä työssä lihasnäytteiden cDNA:n puhtaus tarkistettiin useaan otteeseen, analyysien perusteella ei voitu olla täydellisen varmoja siitä, sisälsivätkö näytteet ainoastaan lihassolujen mRNA:ta. Mahdollista on, että näytteet sisälsivät pieniä määriä lihaskudokseen kuuluvien verisuonien geneettistä aineistoa, joten tuloksia ei voida käsitellä täysin soluspesifisesti. Tarkentavat ja useaan otteeseen havaitut tulokset saattaisivat kumota tai vahvistaa tämän analyysimenetelmistä johtuneen virhelähteen merkityksiä. Niin ikään ApoA1-ilmentymisen tarkastelu proteiinitasolla jäi uupumaan, mikä olisi edelleen vahvistanut käsitystä siitä, että ApoA1:llä olisi aktiivisia rooleja lihassolujen sisäosissa.

10.7 Muiden valittujen proteiinien ilmentyminen luurankolihas kudoksissa

Tutkielmassa havaittiin myös muiden kalvoreseptorien kuin ApoA1 toimintaan keskeisesti liittyvien ABCA₁:n ilmentyvän lihasnäytteissä. Muun muassa SR-B₁ - kalvoreseptorigeeni (NM_005505.3), jonka aiempien julkaisujen mukaan on arveltu ilmentyvän pääasiassa maksakudoksissa ja vastaanottavan suuremmilta HDL-partikkeleilta kolesteroli- ja rasvayhdisteitä (Ramasamy ym. 2014), näytti ilmentyvän mRNA-tasolla myös kaksosten luurankolihas kudoksissa. Fyysisen aktiivisuuden erot näyttivät vaikuttaneen näillä tutkittavilla ainoastaan ABCG₁ (transcript variant 7) ilmentymisen tasoihin siten, että aktiivisilla geenin ilmentyminen oli tehokkaampaa kuin vähemmän aktiivisilla. Aiempien julkaisujen mukaan, reseptorigeenin oli havaittu ilmentyvän makrofageissa ja adiposyyteissä ja luovuttavan suuremmille HDL-partikkeleille lipidi- sekä kolesteroliyhdisteitä (Ramasamy ym. 2014).

Havaittujen reseptorien merkitys erilaisissa kudoksissa on edelleen huonosti tunnettu. Frisdal & Le Goff (2015) arvelivat, että ABCG₁ liittyi triglyseridien kertymiseen ja lihavuuden kehittymiseen rasvasoluissa hiirillä sekä ihmisillä. Tässä tutkielmassa havaittu transcript variant - muoto saattoi osallistua muihin kuin ApoA1-partikkeleihin liittyviin tehtäviin. Toisaalta sillä saattoi olla Frisdal & Le Goff. (2015) mukaisesti rasva-aineenvaihduntaan, kuten solun lipididroplettien säätelyyn liittyviä tehtäviä yhdessä ApoA1-partikkelin kanssa. Kuviossa 11 on esitelty ABC-reseptorien tunnetuimpia tehtäviä soluissa Tarling ym. (2013) mukaan.



KUVIO 12. ABC-reseptorien tunnetuimpia tehtäviä soluissa (Tarling ym. 2013).

10.7 Jatkotutkimusaiheet

Tutkittavien fyysisen aktiivisuuden erot näyttivät vaikuttaneen eräiden oksidatiiviseen fosforylaatioon osallistuvien proteiinien ilmentymiseen. Menetelmien kehittyessä yksittäisten kompleksien ja niiden alayksiköiden yhteydestä lihassolujen terveyteen saataneen tarkentavaa tietoa. Fyysisen ja toisaalta vähäisen fyysisen aktiivisuuden merkitysten tarkastelua yksittäisten proteiinialayksiköiden ilmentymiseen ja toimintaan voitaisiin edelleen jatkaa. Esimerkiksi kokoavia kirjallisuuskatsauksia voitaisiin luoda tutkimustiedon kertyessä.

DNA geenisiruteknikka mahdollisti tämän tutkielman useiden yksittäisten proteiinien analysoimisen geenitasolla ja näiden tulosten hyödyntämistä voitaneen edelleen jatkaa. Esimerkiksi muiden apolipoproteiiniluokkien ja ABC-reseptoriperheen geenien sekä lipidiaineenvaihduntaan liittyvien muiden tekijöiden selvittäminen lihaskudoksissa avaisi metabolisia ilmiöitä geenitasolla sekä tarkentaisi fyysisen aktiivisuuden tai inaktiivisuuden merkityksiä samasta perimästä huolimatta. Toisaalta kaksosilta kerättyjä lipidikudosten

geenisiruanalyysituloksia voitaisiin vertailla lihasnäytetuloksiin näiden proteiinien geenien osalta.

Valittujen kudoksenäytteiden toiminnalliset mittaukset jäivät uupumaan, sillä työssä käsiteltiin ainoastaan pitkään säilöttyjä ja metabolisilta toiminnoiltaan passiivisia soluja. Tällöin kudoksenäytteestä voitiin tutkia ainoastaan rakenteellisia ominaisuuksia tietynä mittausajankohtana. Vaikka joitakin suuntaa-antavia eroja kudosten rakenteellisissa ominaisuuksissa havaittiin, näitä tuloksia voitaisiin vahvistaa jatkotutkimuksin esimerkiksi uusien kudoksenäytteiden toiminnallisilla testauksilla ja toistomittausasetelmilla.

Toisaalta kaksoset eivät suorittaneet erillistä liikuntainterventioita, joten sellaisten yhdistäminen valittujen muuttujien tarkasteluun saattaisi tuoda lisähavaintoja fyysisen aktiivisuuden vaikutuksista lihas- ja lipoproteiini muuttujiin tai niiden yhteyteen. Lisäksi pohdinnassa mainittu lihassolutyypin vertailu ja yhteys valittuihin seerumimuuttujiin jäivät tästä tutkielmasta uupumaan. Esimerkiksi kestävyys- ja voimalajien edustajien vertailu tai akuutin ja säännöllisen liikuntaharjoittelun vaikutukset ApoA1 synteesitason tasoon saattaisivat selventää partikkelien rooleja tietynlaisen elimistön kuormituksen seurauksena. Lisäksi HDL-partikkelien muokkautumiseen ja luurankolihasolujen proteiini muuttujien yhteyteen liittyviä havaintoja voitaisiin edelleen tarkentaa erilaisia liikuntainterventioita hyödyntämällä.

Tutkielmassa havaittu ApoA1-geenin ilmentyminen luurankolihas kudoksissa ihmisillä kaipaa vahvistusta. Suurempi tutkittavien määrä ja havainnot geenin ilmentymisestä proteiinitasolla jäivät uupumaan. Lisäksi tarkempi määrittäminen ApoA1:n roolista luurankolihas kudoksessa jäi ratkaisematta. Niin ikään ApoA1-proteiinin ilmentymisen vasteita liikuntaharjoitteluun on tutkittu edelleen verrattain vähän. Tutkielman erinäisiä proteiini-analyysien tuloksia voidaan jatkossa soveltaa geenien yhteyksien tarkasteluun tässä työssä käsittelemättömien muuttujien osalta.

LÄHTEET

AbCam. 2016. Total OXPPOS Rodent WB Antibody Cocktail (ab110413). Viitattu 9.5.2016. http://www.abcam.com/total-oxphos-rodent-wb-antibody-cocktail-ab110413.html#description_images_1.

Aadland, E., Andersen, J. R., Anderssen, S. A. & Kvalheim, O. M. 2013. Physical activity versus sedentary behavior: associations with lipoprotein particle subclass concentrations in healthy adults. *PLoS One* 27:8(12), e85223. DOI: 10.1371/journal.pone.0085223.

Ahmadzadeh, A. & Azizi, F. 2014 Genes associated with low serum high-density lipoprotein cholesterol *Archives of Iranian medicine* 17(6), 444-450. DOI: 014176/AIM.0013.

Alberts, B. (toim.). 2008. *Molecular biology of the cell*. 5th edition. Garland Science.

Asztalos, B. F., Tani, M. & Ishida, B. 2014. The complexity of high-density lipoproteins. Teoksessa Komoda, T. (toim.) *The HDL handbook: biological functions and clinical implications*. 2nd edition. Elsevier.

Barber, R. D., Harmer D. W., Coleman, R. A. & Clark, B. J. 2005. *Physiological Genomics* 21(3), 389-395.

Boekholdt, S. M., Arsenault, B. J., Hovingh, G. K., Mora, S., Pedersen, T. R., Larosa, J.C. ym. 2013. Levels and changes of HDL cholesterol and apolipoprotein A-I in relation to risk of cardiovascular events among statin-treated patients: a meta-analysis. *Circulation* 128(14), 1504-1512. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002670.

Booth, F. W., Roberts, C. K. & Laye, M. J. 2012. Lack of exercise is a major cause of chronic disease. *Comprehensive Physiology* 2, 1143–1211. DOI: 10.1002/cphy.c110025.

Bouchard, C., Rankinen, T. & Timmons, J. A. 2011. Genomics and genetics in the biology of adaptation to exercise. *Comprehensive Physiology* 1(3), 1603-1648. DOI: 10.1002/cphy.c100059.

Boushel, R., Gnaiger, E., Schjerling, P., Skovbro, M., Kraunsøe, R. & Dela, F. 2007. Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* 50, 790–796. DOI: 10.1007/s00125-007-0594-3.

Boyd, J. C, Simpson, C. A., Jung, M. E. & Gurd, B. J. 2013. Reducing the intensity and volume of interval training diminishes cardiovascular adaptation but not mitochondrial biogenesis in overweight/obese men. *PLoS* 5:8(7), e68091. DOI: 10.1371/journal.pone.0068091.

Brockington, A., Heath, P. R., Holden, H., Kasher, P., Bender, F. L. P., Claes, F. ym. 2010. Downregulation of genes with a function in axon outgrowth and synapse formation in motor neurones of the VEGF δ/δ mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Genomics* 11 (203). DOI: 10.1186/1471-2164-11-203.

Butler, M. G., McGuire, A. & Manzardo, A. M. 2015. Clinically relevant known and candidate genes for obesity and their overlap with human infertility and reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32(4), 495-508. DOI: 10.1007/s10815-014-0411-0.

Caprette, D. R. 1996. Overview of mitochondria structure and function – resources for introductory & intermediate level laboratory courses. Rice University, Experimental Biosciences. Viitattu 20.10.2015.
<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/mitochondria/mitoverview.html>.

Chan, D. C. 2006. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125(7), 1241-1252. DOI:10.1016/j.cell.2006.06.010.

Chanséaume, E. & Morio, B. 2009. Potential mechanisms of muscle mitochondrial dysfunction in aging and obesity and cellular consequences. *International Journal of Molecular Sciences* 10(1), 306-324.

Coggan, A. R. & Williams, B. D. 1995. Metabolic adaptations to endurance training: substrate metabolism during exercise. Teoksessa Hargreaves, M. & Spriet, L. (toim.) *Exercise Metabolism*. 2nd edition. Human Kinetics.

Deakin, S. P. & James, R. W. 2004. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clinical Science* 107, 435-447.

Dishman, R. K., Heath, G. W. & Lee I.-M. 2013. Physical activity epidemiology. 2nd Edition. Human Kinetics.

Drew, B. G., Duffy S. J., Formosa M. F., Natoli A. K., Henstridge D. C., Penfold S. A. ym. 2009. High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 119(15), 2103-2111. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.843219.

Duchen, M. R. 2004. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 53, S96-102.

Egan, B. & Zierath, J. R. 2013. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism* 17, 2(5), 162–184. DOI:10.1016/j.cmet.2012.12.012.

- Fogelholm, M. 2011. Fyysisen aktiivisuuden ja liikunnan arviointi. Teoksessa Vuori, I., Taimela, S. & Kujala, U. (toim.). Liikuntalääketiede. 3.-4.painos. Vantaa: Duodecim.
- Frisdal, E. Le Goff, W. 2015. Adipose ABCG1: A potential therapeutic target in obesity? *Adipocyte* 9; 4(4), 315-318. DOI: 10.1080/21623945.2015.1023491.
- Gangani, R.A., Silva, D., Huang, R., Morris, J., Fang, J., Gracheva, E. O. ym. 2008. Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes. *PNAS* 105(34), 12176–12181.
- Getz, G. S. & Reardon, C. A. 2010. High-density lipoprotein function in regulating insulin secretion: possible relevance to metabolic syndrome. *Atherosclerosis, Trombosis, and Vascular Biology* 30(8), 1497-1499. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.210583.
- Gordon, S. M., Hofmann, S., Askew, D. S. & Davidson, W. S. 2011. High density lipoprotein: it's not just about lipid transport anymore - Review. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 22(1), 9-15. DOI: 10.1016/j.tem.2010.10.001.
- Gorman, G. S., Blakely, E. L., Hornig-Do, H. T., Tuppen, H. A., Greaves, L. C. & He, L. 2015. Novel MTND1 mutations cause isolated exercise intolerance, complex I deficiency and increased assembly factor expression. *Clinical Science* 128(12), 895-904. DOI: 10.1042/CS20140705.
- Goto, S. & Radák, Z. 2005. Proteins and exercise. Teoksessa Mooren, F. C. & Völker, K. (toim.) *Molecular and cellular exercise physiology. Human Kinetics*, 66-67.
- Fito, M., Grau, M., Marrugat, J. & Covas M. I. 2009. Cholesterol-HDL levels and functionality of the HDL particle, its anti-inflammatory/antioxidant properties. Teoksessa Pagano, I. S. & Strait, N. B. (toim.) *HDL and LDL cholesterol: physiology and clinical significance*. Nova Science Publishers, Inc.
- Florvall, G., Basu, S. & Larsson, A. 2006. Apolipoprotein A1 is a stronger prognostic marker than are HDL and LDL cholesterol for cardiovascular disease and mortality in elderly men. *The Journal of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences* 61(12), 1262-1266.
- Flowers, E., Won, G. Y. & Fukuoka, Y. 2015. MicroRNAs associated with exercise and diet: a systematic review. *Physiological Genomics* 47(1), 1-11. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00095.2014.
- Haskell, W. L., Montoye, H. J. & Orenstein, D. 1985. Physical activity and exercise to achieve health-related physical fitness components. *Public Health Reports* 100(2), 202-212.

Hearst, M. O, Sirard, J. R, Lytle, L., Dengel, D. R. & Berrigan, D. 2012. Comparison of 3 measures of physical activity and associations with blood pressure, HDL, and body composition in a sample of adolescents. *Journal of physical Activity & Health* 9(1), 78-85.

Heino, J. & Vuento, M. 2010. *Biokemian ja solubiologian perusteet. 2. painos.* Helsinki: WSOYpro.

Hirst, J. 2013. Mitochondrial Complex I. *Annual Review of Biochemistry* 82, 551-575. DOI: 10.1146/annurev-biochem-070511-103700.

Holloszy, J. O., Kohrt, W. M. & Hansen, P. A. 1998. The regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. *Frontiers in Bioscience* 15(3), D1011-1027.

Hoppeler, H & Flück, M. 2003. Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Medicine and Science in Sport and Exercise* 35(1), 95–104.

HUGO Gene Nomenclature Committee. Gene Family: Mitochondrial respiratory chain complexes. <http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/639>

HusLab. 2014. FS-Lipoproteiini, apo B/apoA1-suhde. Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Viitattu 28.12.2015. <http://huslab.net/ohjekirja/20706.html>.

Hwang, H., Bowen, B. P., Lefort, N., Flynn, C. R., De Filippis, E. A., Roberts, C. ym. 2010. Proteomics analysis of human skeletal muscle reveals novel abnormalities in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 59(1), 33-42. DOI: 10.2337/db09-0214.

Illumina. 2010. HumanWG-6 v3.0 v3.0 Expression BeadChips. Viitattu 9.5.2016. http://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_mrna_expression.pdf

Irwin, M. H., Parameshwaran, K. & Pinkert, C. A. 2013. Mouse models of mitochondrial complex I dysfunction 45(1), 34-40. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.08.009.

Jafari, M., Leaf, D. A., Macrae, H., Kasem, J., O'conner, P., Pullinger, C. ym. 2003. The effects of physical exercise on plasma prebeta-1 high-density lipoprotein. *Metabolism* 52(4), 437-442.

Jette, M., Sidney, K. & Blumchen, G. 1990. Metabolic equivalents (METS) in exercise testing, exercise prescription, and evaluation of functional capacity. *Clinical Cardiology* 13(8), 555-565.

Jorde, L. B., Carey, J. C., Bamshad, M. J. & White, R. L. 2006. *Medical Genetics*, 3rd edition. Philadelphia U.S.: Mosby An Affiliate of Elsevier Science.

Kelley, G. A., Kelley, K. S. & Tran, Z. T. 2004. Aerobic Exercise and Lipids and Lipoproteins in Women: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of Womens Health* 13(10), 1148–1164. DOI:10.1089/jwh.2004.13.1148.

Kelley, G. A., Kelley, K. S., Roberts, S. & Haskell, W. 2011. Efficacy of aerobic exercise and a prudent diet for improving selected lipids and lipoproteins in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Medicine* 9(74). DOI: 10.1186/1741-7015-9-74.

Kelley, G. A., Kelley, K. S., Roberts, S. & Haskell, W. 2012. Comparison of aerobic exercise, diet or both on lipids and lipoproteins in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical Nutrition* 31(2), 156–167. DOI:10.1016/j.clnu.2011.11.011.

Kenney, W. L., Wilmore, J. H. & Costill, D. L. 2012. *Physiology of sport and exercise*. 5th edition. Human Kinetics.

Keskinen, O. P., Mänttari, A. & Keskinen, K. L. 2010. Aerobisen kestävyuden arviointi kenttätesteillä. Teoksessa Keskinen, K. L., Häkkinen, K. & Kallinen, M. (toim.) *Kuntotestauksen käsikirja*. 2. painos. Helsinki: Tammerprint Oy.

Kodama, S., Tanaka, S., Saito, K., Shu, M., Sone, Y., Onitake, F. ym. 2007. Effect of aerobic exercise training on serum levels of high-density lipoprotein cholesterol: a meta-analysis. *JAMA Internal Medicine* 167 (10), 999-1008. DOI:10.1001/archinte.167.10.999.

Konopka, A. R., Suer, M. K., Wolff, C. A. & Harber, M. P. 2013. Markers of Human Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis and Quality Control: Effects of Age and Aerobic Exercise Training. *The Journals of Gerontology. Series A* 69(4), 371-378. DOI: 10.1093/gerona/glt107.

Konopka, A. R. & Harber, M. P. 2014. Skeletal muscle hypertrophy after aerobic exercise training. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 42(2), 53–61. DOI: 10.1249/JES.0000000000000007.

Kotosai, M., Shimada, S., Kanda, M., Matsuda N., Sekido, K., Shimizu, Y. ym. 2013. Plasma HDL reduces nonesterified fatty acid hydroperoxides originating from oxidized LDL: a mechanism for its antioxidant ability. *Lipids* 48(6), 569-578. DOI:10.1007/s11745-013-3779-1.

Kovanen, P. & Viikari, J. 2000. *Dyslipidemia*. Teoksessa Välimäki, M., Sane, T. & Dunkel, L. *Endokrinologia*. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Kraus, W. E., Houmard, J. A., Duscha, B. D., Knetzger, K. J., Wharton, M. B., McCartney J. S. ym. 2002. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *The New England Journal of Medicine* 347(19), 1483-1492.

Kujala, U. M., Kaprio, J., Sarna, S. & Koskenvuo, M. 1998. Relationship of leisure-time physical activity and mortality: the Finnish twin cohort. *JAMA* 279(6), 440-444.

Kujala, U. M. 2006. Benefits of exercise therapy for chronic diseases. *British Journal of Sports Medicine* 40(1), 3-4.

Kujala, U. M., Mäkinen, V. P., Heinonen, I., Soininen, P., Kangas, A. J., Leskinen, T. H. ym. 2013. Long-term leisure-time physical activity and serum metabolome. *Circulation* 127(3), 340-348. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.105551.

Laiho, A. 2008. DNA geenisiruanalyysien tulokset: Projekti:070084 Urho Kujala sirutyypin Illumina Human_WG-6 V3. Finnish DNA microarray centre Turku centre for biotechnology.

Leaf, D. A. 2003. The effect of physical exercise on reverse cholesterol transport. *Metabolism* 52(8), 950-957.

Lehti, M., Donelan, E., Abplanalp, W., Al-Massadi, O., Habegger, K. M., Weber, J. ym. 2013. High-density lipoprotein maintains skeletal muscle function by modulating cellular respiration in mice. *Circulation* 128(22), 2364-2371. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001551.

Leiviskä, J., Sundvall, J., Alfthan, G., Jauhiainen, M. & Salomaa, V. 2011. Apolipoprotein A-I, apolipoprotein B, and apolipoprotein B/apolipoprotein A-I ratio: reference intervals compared with values in different pathophysiological conditions from the FINRISK 2007 study. *Clinica Chimica Acta* 412(11-12), 1146-1150. DOI: 10.1016/j.cca.2011.03.015.

Lenaz, G. & Genova, M. L. 2009. Mobility and function of coenzyme Q (ubiquinone) in the mitochondrial respiratory chain. *FEBS Letters* 584(6):563-73. DOI: 10.1016/j.bbabo.2009.02.019.

Leskinen, T., Sipilä, S., Alen, M., Cheng, S., Pietiläinen, K. H., Usenius, J. P. ym. 2009. Leisure-time physical activity and high-risk fat: a longitudinal population-based twin study. *International Journal of Obesity* 33(11), 1211-1218. DOI: 10.1038/ijo.2009.170.

Leskinen, T., Rinnankoski-Tuikka, R., Rintala, M., Seppänen-Laakso, T., Pöllänen, E., Alen, M. ym. 2010. Differences in Muscle and Adipose Tissue Gene Expression and Cardio-Metabolic Risk Factors in the Members of Physical Activity Discordant Twin Pairs. *PlosOne* 5(9), e12609. DOI:10.1371/journal.pone.0012609.

Leskinen, T., Sipilä, S., Kaprio, J., Kainulainen, H., Alen, M. & Kujala, U. M. 2013. Physically active vs. inactive lifestyle, muscle properties, and glucose homeostasis in middle-aged and older twins. *AGE* 35, 1917-1926. DOI: 10.1007/s11357-012-9486-7.

Leon, A. S. & Sanchez, O. A. 2001. Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 33(6), S502-S515. DOI:10.1097/00005768-200106001-00021.

Levine, B. D. 2008. VO_{2max} : what do we know, and what do we still need to know? *The Journal of Physiology* 586(1), 25-34.

Li, R. & Shen, Y. 2013. An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sciences* 92(13), 747-751. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.02.014.

Liikunta. 2012. Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Käypä hoito - johtoryhmän asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. Viitattu 30.11.2015. www.kaypahoito.fi.

Ling, C., Poulsen, P., Simonsson, S., Rönn, T., Holmkvist, J., Almgren, P. ym. 2007. Genetic and epigenetic factors are associated with expression of respiratory chain component NDUFB6 in human skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation* 117(11), 3427-3435.

Lodish, H., Kaiser, C. A., Bretscher, A., Amon, A., Berk, A., Krieger, M., Ploegh, H. & Scott, M. P. 2013. *Molecular cell biology*. 7th edition. W. H. Freeman and Company.

Lu, R., Arakawa, R., Ito-Osumi, C., Iwamoto, N. & Yokoyama, S. 2008. ApoA-I facilitates ABCA₁ recycle/accumulation to cell surface by inhibiting its intracellular degradation and increases HDL generation. *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28(10), 1820-1824. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.169482.

Luo, D., Cao, D., Xiong, Y., Peng, X. & Liao, D. 2010. A novel model of cholesterol efflux from lipid-loaded cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 31, 1243-1257. DOI:10.1038/aps.2010.93.

Luu, W., Sharpe, L. J., Gelissen, I. C. & Brown, A. J. 2013. The role of signalling in cellular cholesterol homeostasis. *IUBMB Life*. 65(8), 675-684. DOI: 10.1002/iub.1182.

Mackness, M. & Mackness, B. 2014. Current aspects of paraoxonase-1 research. Teoksessa Komoda, T. (toim.) *The HDL handbook: biological functions and clinical implications*. 2nd edition. Elsevier.

Mahoney, D. J., Parise, G., Melov, S., Safdar, A. & Tarnopolsky, M. A. 2005. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB Journal* 19(11), 1498-1500. DOI: 10.1096/fj.04-3149fje.

Mahmood, T. & Yang, P.-C. 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting 4(9), 429-434. DOI: 10.4103/1947-2714.100998.

Marzetti, E., Calvani, R., Cesari, M., Buford, T. W., Lorenzi, M., Behnke, B. J. & Leeuwenburgh, C. 2013. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling

pathways to clinical trials. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45(10), 2288-2301. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.06.024.

McArdle, W. D., Katch, F. I. & Katch, V. L. 2015. *Exercise physiology – energy, nutrition, and human performance*. 8th Edition. Baltimore MD: Lippincott Williams & Wilkins.

McPhee, J. S., Williams, A. G., Perez-Schindler, J., Degens, H., Baar, K. & Jones, D. A. 2011. Variability in the magnitude of response of metabolic enzymes reveals patterns of coordinated expression following endurance training in women. *Experimental Physiology* 96(7), 699-707. DOI: 10.1113/expphysiol.2011.057729.

McQueen, M. J., Hawken, S., Wang, X., Ounpuu, S., Sniderman, A., Probstfield, J. ym. 2008. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins as risk markers of myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): a case-control study. *Lancet* 19;372(9634), 224-233. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61076-4.

Metsämuuronen, J. 2009. Tutkimuksen tekemisen perusteet ihmistieteissä, 4.laitos. 1.painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, D. R. & Ryan, M. T. 2012. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817(6), 851-862. DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.08.010

Mineo, C. & Shaul, P. W. 2013. Thematic review series: high density lipoprotein structure, function, and metabolism regulation of signal transduction by HDL. *Journal of Lipid Research* 54(9), 2315-2324. DOI: 10.1194/jlr.R039479.

Molyneux, S. L., Young, J. M., Florkowski, C. M., Lever, M. & George, P. M. 2008. Coenzyme Q10: is there a clinical role and a case for measurement? *Clinical Biochemistry* 29, 71-82.

Monni, O., Hautaniemi, S. & Kallioniemi, O. 2002. Geenisiruteknikka ja siihen liittyvä bioinformatiikka. *Duodecim* 118, 1157–1166.

Movva, R. & Rader, D. J. 2008. Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function. *Clinical Chemistry* 54:5, 788-800. DOI: 10.1373/clinchem.2007.101923.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. Gene. Viitattu 9.5.2016.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2013. *Lehninger – Principles of biochemistry*. 6th Edition. W. H. Freeman and Company.

Neufeld, E. B., Remaley, A. T., Demosky, S. J., Stonik, J. A., Cooney, A. M., Comly, M. ym. 2001. Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *Journal of Biological Chemistry* 20; 276(29), 27584-27590

Nummela, A. Kestävyyssuorituskykyä selittävät tekijät. 2010. Teoksessa Keskinen, K. L., Häkkinen, K. & Kallinen, M. (toim.) *Kuntotestauksen käsikirja*. 2. painos. Helsinki: Tammerprint Oy.

Olchawa, B., Kingwell, B. A., Hoang, A., Schneider, L., Miyazaki, O., Nestel, P. ym. 2004. Physical fitness and reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24(6), 1087-1091.

Picard, M., Hepple, R. T. & Buelle, Y. 2012. Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *American Journal of Physiology: Cell Physiology* 15; 302(4), C629-41. DOI: 10.1152/ajpcell.00368.2011.

Pietiläinen, K. H., Söderlund, S., Rissanen, A., Nakanishi, S., Jauhiainen, M., Taskinen M. R. ym. 2009. HDL subspecies in young adult twins: heritability and impact of overweight. *Obesity* 17(6), 1208-12014. DOI: 10.1038/oby.2008.675.

Ramasamy, I. 2014. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 52 (12), 1695–1727.

Rankinen, T. & Bouchard, C. 2005. Genes, genetic heterogeneity, and exercise phenotypes. Teoksessa Mooren, F. C. & Völker, K. (toim.). *Molecular and cellular exercise physiology*. Human Kinetics.

Reddy, S. T., Navab, M., Anantharamaiah, G. M. & Fogelman, A. M. 2014. Apolipoprotein A-I mimetics. *Current Opinion in Lipidomics* 25(4), 304-308. DOI: 10.1097/MOL.0000000000000092.

Ritov, V. B., Menshikova, E. V., Azuma, K., Wood, R., Toledo, F. G., Goodpaster, B. H. ym. 2010. Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 298(1), E49-58. DOI: 10.1152/ajpendo.00317.2009.

Riwanto, M. & Landmesser, U. 2013. High density lipoproteins and endothelial functions: mechanistic insights and alterations in cardiovascular disease. *Journal of Lipid Research* 54(12), 3227-3243. DOI:10.1194/jlr.R037762.

Rothblat, G. H. & Phillips, M. C. 2010. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Current Opinion in Lipidology* 21(3), 229-238.

Rottensteiner, M., Leskinen, T., Niskanen, E., Aaltonen, S., Mutikainen, S., Wikgren, J. ym. 2015. Physical activity, fitness, glucose homeostasis, and brain morphology in twins. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 47(3), 509-518. DOI: 10.1249/MSS.0000000000000437.

Rye, K. A. & Barter, P. J. 2014. Regulation of high-density lipoprotein metabolism. *Circulation Research* 114(1), 143-156. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300632.

Rye, K. A., Barter, P. J. & Cochran, B. J. 2016. Apolipoprotein A-I interactions with insulin secretion and production. *Current Opinion on Lipidology* 27(1), 8-13. DOI: 10.1097/MOL.0000000000000253.

Scanu, A. M. & Edelstein, C. 2008. HDL: bridging past and present with a look at the future. *FASEB Journal* 22(12), 4044-4054. DOI: 10.1096/fj.08-117150.

Shao, B. 2012. Site-specific oxidation of apolipoprotein A-I impairs cholesterol export by ABCA₁, a key cardioprotective function of HDL. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821(3), 490-501. DOI:10.1016/j.bbalip.2011.11.011.

Sharma, L. K., Lu, J. & Bai, Y. 2009. Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Current Medicinal Chemistry* 16(10), 1266-1277.

Sherwood, L. 2007. *Human physiology: from cells to systems*. 6th Edition. Thompson Brooks/Cole, 33.

Spriet, L. L. 2014. New insights into the interaction of carbohydrate and fat metabolism during exercise. *Sports Medicine* 44 (1), S87-96. DOI: 10.1007/s40279-014-0154-1.

Ståhlberg, A., Håkansson, J., Xian, X., Semb, H. & Kubista, M. 2004. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical Chemistry* 50(3), 509-515.

Subedi, B. H., Joshi, P. H., Jones, S. R., Martin, S. S., Blaha, M. J. & Michos, E. D. 2014. Current guidelines for high-density lipoprotein cholesterol in therapy and future direction. *Vascular Health and Risk Management* 8 (10), 205–216. DOI:10.2147/VHRM.S45648.

Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M. & Rao, Z. 2005. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 1;121(7), 1043-1057.

Surakka, I., Whitfield, J. B., Perola, M., Visscher, P. M., Montgomery, G. W., Falchi, M. ym. 2012. A genome-wide association study of monozygotic twin-pairs suggests a locus related to variability of serum high-density lipoprotein cholesterol. *Twin Research and Human Genetics* 15(6), 691–699. DOI: 10.1017/thg.2012.63.

Sviridov, D., Kingwell, B., Hoang, A., Dart, A. & Nestel, P. 2003. Single session exercise stimulates formation of pre B₁-HDL in leg muscle. *Journal of Lipid Research* 44 (3), 522-526. DOI: 10.1194/jlr.M200436-JLR.

Tarling, E. J., de Aguiar Vallim, T. Q., & Edwards, P. A. 2013. Role of ABC transporters in lipid transport and human disease *Trends in Endocrinology and Metabolism* 24 (7), 342–350. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2013.01.006>

Thrush, A. B., Dent, R., McPherson, R. & Harper, M. E. 2013. Implications of mitochondrial uncoupling in skeletal muscle in the development and treatment of obesity. *The FEBS Journal* 280(20), 5015-5029. DOI: 10.1111/febs.12399.

Tikkanen, H. O, Näveri, H. & Härkönen, M. 1996. Skeletal muscle fiber distribution influences serum high-density lipoprotein cholesterol level. *Atherosclerosis* 120(1-2), 1-5.

Tofighi, A., Rahmani, F., Jamali Qarakanlou, B., Babaei, S. 2015. The effect of regular aerobic exercise on reverse cholesterol transport A1 and apo lipoprotein a-I gene expression in inactive women. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 25, 17(4), e26321. DOI: 10.5812/ircmj.17(4)2015.26321.

Uehara, Y. & Saku, K. 2014. High-density lipoprotein and atherosclerosis: Roles of lipid transporters. *World Journal of Cardiology* 6(10), 1049-1059. DOI:10.4330/wjc.v6.i10.1049.

Vaisberg, M., Bachi, A. I. I., Latrilha, C., Dioguardi, G. S., Bydlowski, S. P. & Maranhao, R. C. 2012. Lipid transfer to HDL is higher in marathon runners than in sedentary subjects, but is acutely inhibited during the run. *Lipids* 47, 679-686.

van Poppel, M. N., Chinapaw, M. J., Mokkink, L. B., van Mechelen, W. & Terwee, C. B. 2010. Physical activity questionnaires for adults: a systematic review of measurement properties. *Sports Medicine* 40(7), 565-600. DOI: 10.2165/11531930-000000000-00000.

Villard, E. F. & Guerin, M. 2014. Reverse cholesterol transport in HDL metabolism: modulation of structural and functional features of HDL particles. Teoksessa Komoda, T. (toim.) *The HDL handbook: biological functions and clinical implications*. 2nd Edition. Elsevier.

Vuori. 2011. Liikunta, kunto ja terveys. Teoksessa Vuori, I., Taimela, S. & Kujala, U. (toim.). *Liikuntalääketiede*. 3.-4.painos. Vantaa: Duodecim.

Waller, K., Kaprio, J. & Kujala, U. M. 2010. Associations between long-term physical activity, waist circumference and weight gain: a 30-year longitudinal twin study. *International journal of Obesity* 32(2), 353-361.

- Wang, S. & Smith, J. D. 2014. ABCA₁ and nascent HDL biogenesis *Biofactors* 40(6):547-54. DOI: 10.1002/biof.1187
- White, C. R., Garber, D. W. & Anantharamaiah, G. M. 2014. Anti-inflammatory and cholesterol-reducing properties of apolipoprotein mimetics: a review. *Journal of Lipid Research* 55(10), 2007-2021. DOI: 10.1194/jlr.R051367.
- Williams, P. T., Stefanick, M. L., Vranizan, K. M. & Wood, P. D. 1994. The effects of weight loss by exercise or by dieting on plasma high-density lipoprotein (HDL) levels in men with low, intermediate, and normal-to-high HDL at baseline. *Metabolism* 43(7), 917-924.
- Williams, P. T., Blanche, P. J. & Krauss, R. M. 2005. Behavioral versus genetic correlates of lipoproteins and adiposity in identical twins discordant for exercise. *Circulation* 112(3), 350-356.
- World Health Organization. 2015. Cardiovascular diseases (CVDs). Viitattu 24.9.2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.
- Wróblewska, M. 2011. The origin and metabolism of a nascent pre-β high density lipoprotein involved in cellular cholesterol efflux - Review. *Acta biochimica Polonica* 58(3), 275-285.
- Zannis, V.I., Fotakis, P., Koukos, G., Kardassis, D., Ehnholm, C., Jauhiainen, M. ym. 2015. HDL biogenesis, remodeling, and catabolism. *Teoksessa von Eckardstein, A. & Kardassis, D. (toim.) High density lipoproteins from biological understanding to clinical exploitation. Springer Open, 57- 58, 76, 83.* DOI: 10.1007/978-3-319-09665-0.
- Zhang, H., Wang, Y., Li, J., Yu, J., Pu, J., Li, L. ym. 2011. Proteome of Skeletal Muscle Lipid Droplet Reveals Association with Mitochondria and Apolipoprotein A-I. *Journal of Proteome Research* 10(10), 4757-4768. DOI: 10.1021/pr200553c.
- Zhang, B., Kawachi, E., Miura, S., Uehara, Y., Matsunaga, A., Kuroki, M. ym. 2013. Therapeutic approaches to the regulation of metabolism of high-density lipoprotein. Novel HDL-directed pharmacological intervention and exercise. *Circulation* 127(11), 2651-2663.
- Zhao, G. J., Yin, K., Fu, Y. C. & Tang C. K. 2012. The interaction of ApoA-I and ABCA1 triggers signal transduction pathways to mediate efflux of cellular lipids. *Molecular Medicine* 18(1), 149-58. DOI: 10.2119/molmed.2011.00183.
- Zhen, Y., Okutsu, M., Akhtar, Y. N. & Lira, V. A. 2010. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 110, 264-274. DOI:10.1152/jappphysiol.00993.2010.

Zhu, J., He F., Hu, S. & Yu, J. 2008. On the nature of human housekeeping genes. *Trends in Genetics* 24(10), 481-484. DOI: 10.1016/j.tig.2008.08.004.

Zierath, J. R., Hawley, J. A., Dyck, D. J. & Bonen, A. 2005. Energy turnover and substrate utilization. Teoksessa Mooren, F. C. & Völker, K. (toim.). *Molecular and cellular exercise physiology*. Human Kinetics, 168.

TAULUKKO 9. Kaksosten lihasnäytteissä (n=20) ilmentyneiden proteiinien geenit, jotka liittyivät oksidatiiviseen fosforylaatioon

	Proteiini, jota geeni koodittaa (Sekvenssikoodi)	Aktiiviset ka (kh) _b (n=10)	Inaktiiviset ka (kh) _b (n=10)	p-arvo _a
Kompleksi 1 α-alayksikkö	Alakompleksit 1, 4, 5, 7, 8, 9, 12 (NM_004541.2)	15868 (1101)	15402 (805)	0,27
	(NM_002489.2)	17669 (1094)	17905 (1043)	0,66
	(NM_005000.2)	57 (4)	59 (5)	0,35
	(NM_005001.2)	1629 (102)	1651 (112)	0,68
	(NM_014222.2)	4594 (569)	4507 (356)	0,63
	(NM_005002.3)	2341 (231)	2238 (265)	0,16
	(NM_018838.3)	5431 (466)	5190 (287)	0,13
	4-kaltainen ('like') 2 (NM_020142.3)	247 (44)	231 (44)	0,20
	Kokoavat tekijät ('assembly factors') 1, 2 (NM_016013.2)	495 (161)	518 (131)	0,38
	(NM_174889.3)	1105 (108)	1090 (65)	0,72
β-alayksikkö	Alakompleksit 1, 3, 4, 4c, 5, 6 <i>transcript variant 1</i> , alakompleksit 7, 8, 10 (NM_004545.3)	137 (30)	126 (20)	0,25
	(NM_002491.1)	7956 (1082)	7513 (650)	0,50
	(NM_004547.4)	40 (3)	39 (2)	0,10
	(NM_004547.4)	66 (5)	66 (4)	0,87
	(NM_002492.2)	6049 (766)	6033 (677)	0,97
	(NM_002493.3)	1077 (157)	1017 (107)	0,28
	(NM_004146.4)	5642 (503)	5330 (161)	0,07
	(NM_005004.2)	7676 (986)	7321 (731)	0,17
	(NM_004548.1)	5863 (871)	5890 (843)	0,84
	PREDICTED: samanlainen kuin alakompleksi 4 <i>transcript variant 2</i> (XM_001125915.1)	67 (6)	65 (4)	0,29
Flavoproteiini	Flavoproteiini 1, 2, 3, 3c, <i>transcript variant 1</i> (NM_007103.2)	2081 (236)	1726 (102)	0,53
	(NM_021074.1)	6582 (381)	6550 (435)	0,85
	(NM_001001503.1)	79 (12)	75 (13)	0,10
	(NM_021075.3)	178 (50)	178 (40)	0,69
	Määrittämätön alakompleksi	Alakompleksi 2 (NM_004549.3)	59 (6)	57 (3)
Fe-S proteiinit	PREDICTED: samanlainen kuin alayksikkö 5 (XM_926402.1)	12262 (2884)	11837 (2300)	0,70
	Fe-S proteiinit 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 (NM_004550.3)	173 (34)	167 (32)	0,58
	(NM_004551.1)	5980 (275)	5830 (439)	0,29
	(NM_002495.1)	5687 (661)	5575 (569)	0,60
	(NM_004552.1)	8103 (469)	7637 (500)	0,07
	(NM_004553.2)	47 (3)	47 (4)	0,91
	(NM_024407.3)	4709 (713)	4404 (577)	0,12
	(NM_002496.1)	5664 (568)	5297 (610)	0,06

Kompleksi 2	Alayksikkö A, flavoproteiini (NM_004168.1)	2062 (199)	1874 (218)	0,13
	Alayksikkö B ('iron sulfur') (NM_003000.2)	7131 (946)	6912 (600)	0,35
	Alayksikkö C, integraalinen kalvoproteiini ja <i>transcript variant 4</i> (NM_003001.2)	589 (92)	590 (76)	0,83
	(NM_001035513.1)	293 (59)	301 (33)	0,37
	Alayksikkö D, integraalinen kalvoproteiini (NM_003002.1)	2083 (319)	2148 (227)	0,44
Kompleksi 3	Sidosproteiinit ('binding') (NM_006294.2)	2404 (185)	2250 (233)	0,13
	(NM_006294.2)	175 (24)	178 (25)	0,54
	Liitosproteiinit ('hinge') (NM_006004.2)	9354 (847)	8877 (639)	0,15
	(NM_006004.1)	393 (99)	396 (94)	0,88
	Alayksikkö VII _c (NM_014402.4)	14049 (1365)	13594 (805)	0,38
	Kuoriproteiinit I, II (NM_003365.2)	4073 (286)	3839 (328)	0,11
	(NM_003366.2)	1622 (304)	1569 (230)	0,52
Sytokromi c	Sytokromi c-1 (NM_001916.3)	7562 (676)	7415 (733)	0,50
	Sytokromi c _c somaattinen ja somaattisen kaltainen ('like') 1, <i>kromosomissa 6</i> (NM_018947.4)	465 (166)	512 (110)	0,16
	(NR_001561.1)	189 (32)	207 (34)	0,50
Kompleksi 4	Alayksikkö Va (NM_004255.2)	14623 (1332)	14166 (1402)	0,44
	Alayksikkö VIb <i>polypeptidi 2</i> ja VIc (NM_144613.3)	46 (3)	47 (2)	0,21
	(NM_144613.4)	44 (2)	45 (3)	0,72
	(NM_004374.2)	10994 (723)	10543 (526)	0,15
	Alayksikkö VIIa <i>polypeptidit 1 ja 2</i> (NM_001864.2)	26160 (3144)	26209 (2501)	0,92
	(NM_001865.2)	5392 (600)	5403 (467)	0,92
	Alayksiköt VIIb, VIIb2, VIIc (NM_001866.2)	6135 (534)	5814 (485)	0,15
	(NM_130902.2)	41 (3)	41 (2)	0,61
	(NM_001867.2)	22167 (1615)	22591 (944)	0,38
	Alayksikkö 4 isoformi 2, 5b, 6a <i>polypeptidi 1</i> , 8C (NM_032609.2)	114 (13)	108 (13)	0,08
	(NM_001862.2)	17200 (1327)	16220 (960)	0,07
	(NM_004373.2)	204 (51)	183 (14)	0,08
	(NM_182971.2)	47 (4)	46 (3)	0,29

Kompleksi 5	Alayksikkö B1 (NM_001688.4)	1382 (284)	1250 (192)	0,26
Alakompleksi F0	Alayksikkö c (alayksikkö 9) <i>isoformi 2 transcript variant 2</i> (NM_005176.4)	7462 (494)	7019 (331)	0,07
	Alayksikkö C1 (alayksikkö 9), <i>transcript variant 1, 2</i> (NM_005175.2)	559 (157)	528 (220)	0,29
	(NM_001002027.1)	4987 (884)	4613 (712)	0,10
	Alayksikkö C2 (alayksikkö 9), <i>transcript variant 1, 2</i> (NM_001002031.2)	127 (21)	118 (26)	0,09
	(NM_005176.5)	133 (15)	132 (12.9)	0,74
	Alayksikkö C3, <i>transcript variant 3</i> (NM_001002258.4)	143 (21)	144 (24)	0,95
	Alayksikkö d, <i>transcript variant 1, 2</i> (NM_006356.2)	11585 (1438)	11445 (929)	0,80
	(NM_001003785.1)	10695 (1255)	10410 (959)	0,40
	Alayksikkö E ja F2, <i>transcript variant 1</i> (NM_007100.2)	14335 (924)	13692 (533)	0,28
	(NM_004889.2)	3372 (453)	3180 (232)	0,14
	Alayksikkö F6, <i>transcript variant 1, 3, 5</i> (NM_001003703.1)	1792 (349)	1805 (252)	0,74
	(NM_001003696.1)	12677 (1232)	12665 (871)	0,97
	(NM_001003701.1)	11857 (1066)	11520 (804)	0,37
	Alayksikkö G (NM_006476.4)	7520 (1282)	6910 (661)	0,26
	Alayksikkö s (tekijä B), <i>transcript variant 1, 2, 3</i> (NM_001003803.1)	298 (33)	295 (49)	0,62
	(NM_001003805.1)	628 (90)	614 (72)	0,53
	(NM_015684.2)	229 (36)	224 (42)	0,55
Alakompleksi F1	α alayksikkö 1, <i>transcript variant 2</i> (NM_004046.4)	20079 (1832)	20219 (1761)	0,87
	β polypeptidi (NM_001686.3)	24663 (1975)	23652 (1518)	0,21
	γ alayksikkö, <i>transcript variant 1</i> (NM_001687.4)	7717 (1681)	7958 (1354)	0,67
	\triangle polypeptidi 1, <i>transcript variant 2</i> (NM_005174.2)	4276 (650)	4281 (630)	0,97
	O alayksikkö (NM_001697.2)	11135 (933)	10712 (999)	0,26
	ATPaasi inhibiittori tekijä 1, <i>transcript variant 3</i> (NM_178191.1)	158 (30)	172 (31)	0,56

ka = keskiarvo; kh = keskihajonta

transcript variant = proteiinia koodaavan lähetti-RNA:n vaihtoehtoinen muoto

a DNA geenisiruanalyysin signaali-intensiteettiarvo

b Ryhmien väliset erot testattiin R-ohjelmiston t-testillä

*p-arvo $\leq 0,05$, tilastollisesti merkitsevä ero ryhmien välillä