

Hormonikorvaushoito ja luurankolihasisto: estrogeenisten ja
progestogeenisten komponenttien vaikutukset
lihassoluviljelmässä



Mia Horttanainen
Pro gradu
Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Alkusanat

Tämä pro gradu-työ tehtiin Jyväskylän yliopiston terveystieteiden laitoksella. Tutkimus on osa FM Paula Ronkaisen väitöskirjaa ja kuuluu laajempaan tutkimuskokonaisuuteen, jossa tavoitteena on selvittää ikääntyvän luurankoliuksen massan ja voiman heikkenemiseen liittyviä mekanismeja geeni- ja molekyyllitasolla.

Haluan lämpimästi kiittää ohjaajaani Vuokko Kovasta, mahdollisuudesta päästä mukaan tähän mielenkiintoiseen ja ajankohtaiseen tutkimusprojektiin sekä avusta, tuesta ja luottamuksesta tekemiseeni koko gradun tekoni ajan. Suuren suuri kiitos kuuluu myös toiselle ohjaajalleni Paula Ronkaiselle innostavasta, asiantuntevasta ja päättäväisestä, mutta omille ajatuksilleni tilaa antavasta ohjauksesta sekä loputtomasta tuesta ja kannustuksesta työni kaikissa vaiheissa. Eija Pölläselle ja Juha Hulmille haluan osoittaa lämpimät kiitokset kaikesta avusta ja yhteistyöstä. Paavo Rahkilalle kuuluu kiitokset neuvoista ja yhteistyöstä aina yhtä vaativien C₂C₁₂-solujen viljelyssä.

Lopuksi haluan koko sydämeistäni kiittää puolisoani, Lauria, joka on jaksanut kannustaa ja tukea minua saamaan työni valmiiksi. Sekä ihania ipanoitani Riinaa ja Saaraa, jotka uskollisesti jaksoivat kulkea viikonloppuisin mukanani ”hoitamassa” soluja ja ovat pelkällä olemassa olollaan antaneet voimia tähän projektiin. Iso kiitos kuuluu myös vanhemmilleni ja sisaruksilleni, joita ilman en olisi se mitä olen.

Rahallisesta tuesta suuri kiitos Pentti K. Vilppulan rahastolle.

Jyväskylässä 29.6.2010

Mia Horttanainen

Tekijä:	Mia Horttanainen
Tutkielman nimi:	Hormonikorvaushoito ja luurankolihasisto: estrogeenisten ja progestogeenisten komponenttien vaikutukset lihassoluviljelmässä
English title:	Hormone Replacement Therapy and Skeletal Muscles: effects of estrogenic and progestogenic compounds in muscle cell culture
Päivämäärä:	29.6.2010 Sivumäärä: 54
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Solubiologia
Tutkielman ohjaaja(t):	Vuokko Kovanen (FT), Paula Ronkainen (FM)

Tiivistelmä: Yksi merkittävimmistä ikääntymiseen liittyvistä tapahtumista on luurankolihasen heikentyminen. Sarkopenia eli lihaskato heikentää ennen kaikkea ikääntyvän ihmisen terveyttä ja sitä kautta elämänlaatua, mutta sen kustannukset myös sosiaali- ja terveydenhuollolle ovat suuret. Naisilla lihasten suorituskyky heikkenee merkittävästi vaihdevuosien aikana, jolloin myös estrogeenin ja progesteronin tasot laskevat. Etenkin 17 β -estradiolin (E₂) tuotanto munasarjoissa loppuu vaihdevuosien aikana. Estrogeenin tiedetään vaikuttavan primaaristen sukupuoliominaisuuksien lisäksi myös moniin muihin kudoksiin, kuten luuhun ja lihaksiin. Vaihdevuosien mukanaan tuomia oireita hoidetaan usein estradiolia ja progestogeenia sisältävillä hormonikorvaushoidoilla (HRT), mutta sen vaikutuksia lihaksiin on tutkittu vähän. Myöskään hormonien vaikutusmekanismeista molekyyllitasolla lihaksessa ei ole tarkkaa käsitystä.

Fosfoinositidi-3-kinaasi (PI3K) signalointireitin tiedetään keskeisesti liittyvän solun kasvun säätelyyn. Solun kasvun kannalta reitin tärkeimmät kohteet ovat Akt (proteiinikinaasi B) ja mTOR (*engl.* mammalian target of rapamycin), joiden aktivoituminen johtaa mm. proteiinisynteesiin ja edelleen solun kasvuun. PI3K:n aktivoitumisen esimerkiksi IGF-1:n vaikutuksesta tiedetään johtavan Akt:n ja edelleen mTOR:in fosforyloitumiseen. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää vaihdevuosioreisiin käytettävän HRT:n vaikutuksia hiiren C₂C₁₂-myotuubeissa. Erityisesti haluttiin selvittää yhdistelmähoidon eri komponenttien, E₂:n ja noretisteroniasetaatin (NETA) vaikutuksia PI3K/Akt-reitin aktiivisuuteen sekä Akt:n, mTOR:n, estrogeenireseptoreiden (ER) ja androgeenireseptorin (AR) geenien ilmenemiseen.

Soluja käsiteltiin joko E₂:lla tai NETA:lla (1nM/10nM). Akt:n ja mTOR:n fosforyloitumista tutkittiin Western blottausta apuna käyttäen neljässä aikapisteessä (5, 20, 40 min, 2 h). Akt:n, mTOR:n, ER:ien sekä AR:n geenien ilmentyminen puolestaan määritettiin kvantitatiivisen PCR:n avulla aikapisteissä 0, 2, 6 ja 24 tuntia. Kontrollisolut kerättiin kaikissa aikapisteissä, mukaan lukien 0 tuntia.

Tulosten mukaan hormonikorvaushoidon eri komponenteilla ei näyttäisi olevan merkitsevää vaikutusta lihaksen hypertrofiareitille kuuluvien proteiinien, Akt:n ja mTOR:n, aktivoitumiseen hiiren C₂C₁₂-lihassolulinjassa. NETA:lla näyttäisi olevan positiivista vaikutusta Akt:n aktiivisen muodon määrään, mutta ero suhteessa kontrolliin ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevää. Tutkittujen geenien ilmenemisessä, suhteessa kontrollisoluihin, ei myöskään havaittu merkitseviä eroja.

Tutkimustulokset osoittivat, että tutkittaessa myotuubien erilaistumisprosessin aikaisia tapahtumia, kontrollisolujen seuranta läpi tutkimuksen aikajakson on erittäin tärkeää, jotta voitaisiin erottaa erilaistumistapahtumaan itseensä ja soluille tehtyyn käsittelyyn liittyvät muutokset. Samankaltaisen tutkimusasetelman toistaminen ihmisen primaarisoluviljelmässä voisi tarkentaa saamiamme tuloksia ja antaisi lisävastauksia tutkimusongelman perusteellisempaan selvittämiseen.

Avainsanat: sarkopenia, lihas, hormonikorvaushoito, estradioli, noretisteroniasetaatti, Akt, mTOR

Author: Mia Horttanainen
Title of thesis: Hormone Replacement Therapy and Skeletal Muscles: effects of estrogenic and progestogenic compounds in muscle cell culture
Finnish title: Hormonikorvaushoito ja luurankolihasisto: estrogenisten ja progestogeenisten komponenttien vaikutukset lihassoluviljelmässä
Date: 29.6.2010 **Pages:** 54
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisor(s): PhD Vuokko Kovanen, M.Sc Paula Ronkainen

Abstract: One of the most serious consequences of ageing is its detrimental effects on the musculature. "Sarcopenia" refers to age-related muscle wasting- slow but aggressive loss of muscle mass and decline of muscle strength. Sarcopenia causes functional decline and impaired mobility and thereby also decrease the quality of life, but also the impact on public social- and healthcare are major. In women, muscle performance decreases during menopause at the same time when the levels of ovarian hormone decrease. Especially the concentration of ovarian 17 β -estradiol (E₂), decreases dramatically during the menopause. Estrogen affects the primary sex characteristics but also many other non-classical target tissues such as muscle and bone. Hormone replacement therapy (HRT) is a treatment designed for women who have reached or passed menopause to treat menopausal symptoms. The mechanisms by which HRT possibly affects the musculature are mainly unknown.

Fosfoinositide-3-kinase (PI3K) signaling pathway is known to be one of the most important pathways that regulate atrophy and hypertrophy in the skeletal muscles. Activation of Akt (protein kinase B) and mTOR (mammalian target of rapamycin) by phosphorylation leads to protein synthesis and cell growth. For example IGF-1 is known to stimulate PI3K. The aim of this study was to investigate the effects of HRT on C₂C₁₂ mouse myotubes. Especially, how and where the different effective agents of combined HRT, namely E₂ and progesterone (norethisterone acetate, NETA) affect muscle cells. The activation of Akt and mTOR at protein level was quantified and the expression of the genes encoding the respective proteins and also genes encoding estrogen receptors (ER α and ER β) and androgen receptor (AR) was measured.

Myotubes were treated with E₂ or NETA (1 nM/10 nM). Phosphorylation of Akt and mTOR was quantified in four different time points (5, 20, 40 min, 2 h) using Western blotting. Gene expression of *Akt*, *mTOR*, *ER α* , *ER β* and *AR* was determined in time points 0, 2, 6 and 24 hours with quantitative PCR. Control cells were collected at each time point, including 0 h.

Any statistically significant effects were not identified either at protein level studies with Akt and mTOR or in gene expression studies with gene encoding Akt, mTOR, ER α , ER β and AR. NETA seemed to exert some positive effect on the phosphorylation of Akt but statistical significance was not reached. These results suggest that the effective agents of HRT do not affect the activation or gene expression of the proteins along PI3K/Akt pathway in C₂C₁₂ mouse myotubes.

One methodological observation was made in the cell culture part of this study. Using myotubes, during their myogenic differentiation process, for this kind of experiments it is very important to track cells with supplement free media along entire time frame of the experiment. Using only one basal control to which cells at each time point would be compared could give false positive results in this kind of experiments. Further research, for example repeating these experiments with human primary cell line, is needed to clarify and specify the answer of our research question.

Keywords: sarcopenia, muscle, hormone replacement therapy, estradiol, norethisterone acetate, Akt, mTOR

Sisällysluettelo

Alkusanat

Tiivistelmä

Sisällysluettelo

Lyhenteet

1. Johdanto	9
1.1 Sarkopenia	9
1.1.1 Luustolihas	9
1.1.2 Sarkopenian kehittyminen, yleisyys ja ehkäisy	11
1.2 Vaihdevuodet	13
1.2.1 Estrogeeni	13
1.2.2 Progesteroni	13
1.2.3 Vaihdevuosissa tapahtuvat hormonimuutokset	14
1.2.4 Vaihdevuodet ja sarkopenia	14
1.3 Steroidireseptorit	16
1.3.1 Steroidireseptorien rakenne	16
1.3.2 Estrogeenireseptorit	17
1.3.3 Estrogeenireseptorisignointi	18
1.3.4 Androgeenireseptori	21
1.4 Fosfoinositidi-3-kinaasi (PI3K/Akt)-signaalintireitti lihassoluissa	22
1.4.1 Akt	22
1.4.2 mTOR	24
1.4.3 Estrogeenin vaikutukset lihassolussa	25
2. Tutkimuksen tarkoitus	27

3. Materiaalit ja menetelmät	28
3.1 Solulinja	28
3.2 Solujen käsittely	28
3.3 Geenitason kokeet	29
3.4 Proteiinitason kokeet	30
3.5 Tilastolliset analyysit	32
4. Tulokset	33
4.1 Geenien ilmeneminen	33
4.2 Proteiinitason kokeet	36
5. Tulosten tarkastelu	39
5.1 E ₂ :n ja NETA:n vaikutus PI3K/Akt-reitillä esiintyvien geenien ilmenemiseen	40
5.2 E ₂ :n ja NETA:n vaikutus Akt:n ja mTOR:n aktivoitumiseen	41
5.3 Soluviljelyssä käytetyn kontrollimallin valinnan merkitys	44
5.4 Yhteenveto	46
6. Lähdeluettelo	47

Lyhenteet

AICAR	5-aminoimidazole-4-korboksiamidi-1- β -D-ribonukleosidi
Akt, PKB	Proteiinikinaasi B
AMPK	5'-adenosiinimionofosfaatti-aktivoitu proteiinikinaasi
AR	Androgeenireseptori
AU	<i>engl.</i> Arbitrary unit
BAD	<i>engl.</i> Bcl-2 associated death agonist
E ₂	17 β -estradioli
4E-BP1	4E:hen sitoutuva proteiini
eIF2B	Eukaryoottinen translaation aloitustekijä 2B
eIF-4E	Eukaryoottinen aloitustekijä 4E
ELK-1	<i>engl.</i> member of ETS oncogene family
eNOS	Endoteelinen typpioksidisyntaasi
ER α	Estrogeenireseptori α
ER β	Estrogeenireseptori β
ERE	<i>engl.</i> Estrogen response element
ERK1/2	<i>engl.</i> Extracellular signal-regulated kinase 1/2
FOXO	<i>engl.</i> Forkhead box O
FSH	Follikkeleita stimuloiva hormoni
GAPDH	Glyseraldehydi 3-fosfaatti dehydrogenaasi
GSK3- β	Glykogeenisyntaasikinaasi 3 β
HRT	Hormonikorvaushoito
IGF-1	Insuliinin kaltainen kasvutekijä
JNK1/2	c-Jun N-terminaalinen kinaasi
MAPK	Mitogeneeni- aktivoitu proteiinikinaasi
mTOR	<i>engl.</i> Mammalian target of rapamycin
NETA	Noretisteroniasetaatti
PARP	Poly ADP-riboosi polymeraasi

PDK1	<i>engl.</i> Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate dependent protein kinase-1
PI3K	Fosfoinositidi-3-kinaasi
PIP	Fosfatidyyli-inositolifosfaatti
PRAS40	<i>engl.</i> Proline-rich Akt substrate 40
S6K1	p70 ribosomaalinen proteiini S6 kinaasi 1
TORC1	<i>engl.</i> Target of rapamycin complex 1
TORC2	<i>engl.</i> Target of rapamycin complex 2
WHI	Women's Health Initiative

1. Johdanto

1.1 Sarkopenia

Vuonna 1989 tohtori Irwin Rosenberg toi sarkopenian tieteenmaailman tietoisuuteen ihmettelemällä miksi iän mukanaan tuomaan lihasmassan vähenemiseen ei kiinnitetty juurikaan huomiota: “No decline with age is more dramatic or potentially more functionally significant than the decline in lean body mass...Why have we not given it more attention? Perhaps it needs a name derived from the Greek. I’ll suggest a couple: sarcomalacia or sarcopenia” (Rosenberg, 1989). Kreikan kielestä suoraan käännettynä sarkopenia tarkoittaa lihan köyhyyttä (*engl.* poverty of flesh). Kirjallisuudessa esiintyy useita erilaisia määritelmiä sarkopenialle, tässä tutkielmassa sarkopenialla kuitenkin tarkoitetaan iän mukanaan tuoman lihasmassan (kuva 1) ja – voiman vähenemistä. Sarkopenian nostaminen tietoisuuteen oli Rosenbergilta viisaasti toimittu, sillä ikääntyvien ihmisten määrä kasvaa jatkuvasti maailmanlaajuisesti. Yksi merkittävimmistä ikääntymiseen liittyvistä tekijöistä on luurankolihasen heikentyminen ja sen negatiiviset vaikutukset ikääntyvien ihmisten terveydentilaan ja elämänlaatuun. Kaikesta huolimatta sarkopenialle ei kuitenkaan, ainakaan toistaiseksi, ole lääketieteellistä tautiluokitusta. Ongelman muodostaa muun muassa se, että esimerkiksi ihmisen lihasmassalle ei ole olemassa absoluuttista arvoa, jolloin kliinisen raja-arvon määrittäminen sarkopenialle on äärimmäisen hankalaa. Euroopan sarkopenia työryhmä (EWGSOP, European Working Group on Sarcopenia in Older People) on julkaisussaan pyrkinyt löytämään ratkaisuja juuri näihin ongelmiin, yhtenäistämään sarkopenian käsitettä sekä kartoittamaan keinoja sarkopenian tarkempaan määrittämiseen (Cruz-Jentoft ym., 2010). Haasteeseen on tartuttu myös EU:ssa, jonka seitsemännen puiteohjelman aiheena on ikääntymiseen liittyvän lihasheikkouden ymmärtäminen ja ehkäisy (*engl.* “Understanding and combating aging-related muscle weakness”).

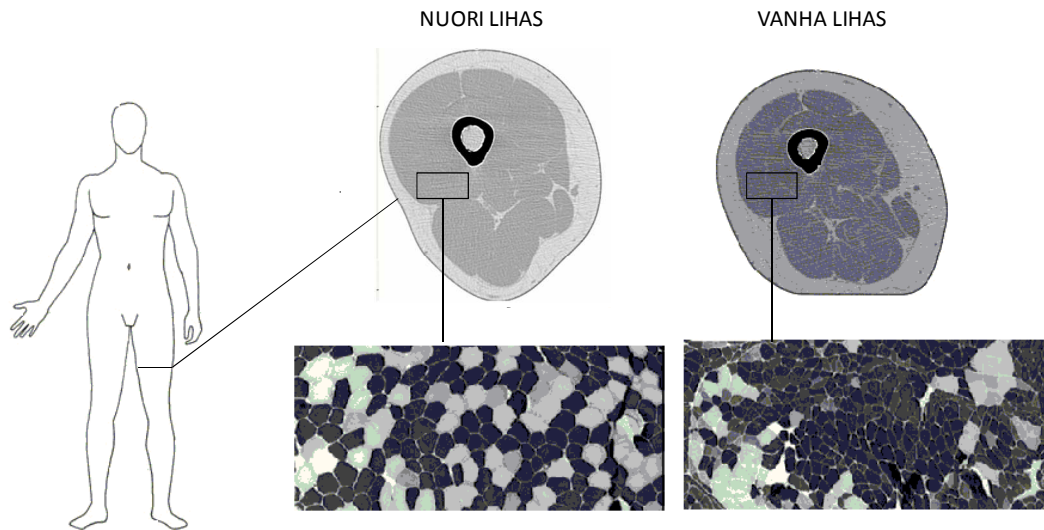
1.1.1 Luustolihas

Suurin osa ihmisen lihaksistosta on luustolihasta eli poikkijuovaista lihasta. Luustolihasolut syntyvät lihassolujen esiastesolujen, myoblastien, erilaistuessa ja yhtyessä monitumaisiksi,

pitkiksi lihassoluiksi eli myotuubeiksi. Näissä pitkissä lihassoluissa sarkomeerit eli solun supistuvat, toiminnalliset yksiköt ovat järjestäytyneet rinnakkain, mistä johtuen lihasolu näyttää poikkijuovaiselta. Lihassolukimppu puolestaan koostuu näistä pitkistä myotuubeista. Ihminen pystyy tahdonalaisesti säätelemään luustolihasensa toimintaa toisin kuin tahdosta riippumattomia sydän- ja sileää lihasta, jotka ovat kaksi muuta lihaskudoksen päätyyppiä.

Poikkijuovaiset lihasolut jaetaan kahteen päätyyppiin, hitaisiin (tyyppi I) ja nopeisiin (tyyppi II) lihassoluihin. Tyypin II solut voidaan jakaa edelleen kolmeen alaryhmään, IIa, IIb ja IIx. Tyypin I solut ovat ohuempia ja hitaampia ja ne sisältävät paljon mitokondrioita verrattuna tyypin II soluihin. Tyypin I solut ovat väriltään punaisia, mikä johtuu niiden korkeasta myoglobiinipitoisuudesta. Myoglobiini on hemoglobiinin kaltainen happea kuljettava molekyyli ja tyypin I solut saavatkin energiansa pääsääntöisesti aerobisesti. Tyypin I solut soveltuvat parhaiten pitkäkestoiseen harjoitteluun, kun taas tyypin II solut sopivat paremmin lyhytkestoiseen, räjähtävään toimintaan. Tyypin II solut supistuvatkin tyypin I soluja nopeammin ja saavat energiansa pääosin anaerobisesti. Väriltään ne ovat vaaleampia, johtuen alhaisesta myoglobiinipitoisuudesta (Harridge, 2007, Brooke ja Kaiser, 1970).

Lihassolujen muodon, koon ja ryhmittymisen lihaksessa on havaittu muuttuvan ikääntymisen myötä (Lexell ja Downham, 1991, Andersen, 2003). Kuvassa 1 esitetyt ATPaasi-värjäyskuvat havainnollistavat ikääntyessä tapahtuvia lihassolujen morfologisia muutoksia. Verrattaessa nuorten ja ikääntyneiden lihassolujen muotoa on havaittu, että nuorilla lihassolut ovat pääsääntöisesti ”kulmikkaampia” kuin vanhemmilla, joilla solut ovat enemmän litistyneitä poikkileikkauskuvassa. Ikääntyneissä lihaksissa lihassolujen on myös havaittu ryhmittyvän lihassolutyypeittäin (*engl* grouping) ja pakkautuvan tiiviimmin toisin kuin nuorilla, joilla lihassolutyypit ovat asettautuneet mosaiikkimaisesti. Solujen muodon ja ryhmittymisen lisäksi lihassolujen koossa on havaittu eroa ja erityisesti tyypin II soluissa ikääntymisestä johtuvan koon pienenemisen on todettu olevan tyypin I soluihin verrattuna voimakkaampaa. Andersenin (2003) tutkimuksen mukaan ikääntyneiden tyypin I solut olivat kooltaan 75 % nuorten tyypin I soluihin verrattuna, kun taas tyypin II soluilla vastaava osuus oli vain 43 % (Andersen, 2003).



Kuva 1. Reiden tietokonetomografiakuva ja lihassolujen ATPaasi-värjäys nuoresta ja vanhasta lihaksesta. Tietokonetomografiakuvista nähdään, että vanhan henkilön raajaassa lihasaition poikkileikkauspinta-ala on pienentynyt ja lihaksen sisäisen rasvan määrä on kasvanut verrattuna nuoreen lihakseen. ATPaasi värjäyksestä voidaan havaita miten ikääntyneessä lihaksessa lihassolut ryhmittyvät ja pakkautuvat toisin kuin nuoressa lihaksessa. Tummat solut: tyyppi I, vaaleat solut: tyyppi IIA, harmaat solut: tyyppi IIX (tai I/IIA). ATPaasi värjäys, pH 4,7. Mittajana 100 μm . ATPaasi kuva on muokattu Andersenin (2003) julkaisusta (Andersen, 2003). Tietokonetomografiakuvat ovat Jyväskylän yliopiston terveystieteiden laitoksen aikaisemmista tutkimuksista.

1.1.2 Sarkopenian kehittyminen, yleisyys ja ehkäisy

Sarkopenian kehittymiseen vaikuttavia mekanismeja ja tekijöitä on useita, kuten heikko ravinto, krooniset sairaudet, vähäinen liikunta ja yksi merkittävimpiä on ikääntymiseen liittyvän proteiinisynteesin väheneminen lihaksissa (Doherty, 2003, Lee ym., 2007, Greenlund ja Nair, 2003). Proteiinit ovat veden jälkeen määrällisesti suurin lihaksen komponenteista, joten lihasten kunnon ylläpidon kannalta on äärimmäisen tärkeää, että rakenteellisesti tärkeitä proteiineja syntetisoidaan ja toisaalta tarpeettomaksi käyneitä hajotetaan. Oleellista kuitenkin on, että hajotusreittien määrä ja nopeus eivät ylitä synteesireittien määrää ja nopeutta. Tutkimukset ovat osoittaneet, että erilaisten proteiinien synteesi lihaksissa vähenee iän myötä jopa 30 % (Welle ym., 1993, Balagopal ym., 1997), mikä vaikuttaa lihasmassan lisäksi myös sen laatuun. Yksi syy proteiinisynteesin vähenemiseen, on geenien luennan väheneminen. Muun muassa eräiden myosiiniraskasketjutyypin lähetti-RNA-tasojen on osoitettu vähenevän merkittävästi ikääntymisen myötä (Welle ym., 1993, Balagopal ym., 1997, Balagopal ym., 2001). Proteiinisynteesin lisäksi sarkopenian etenemiseen ja erityisesti suoraan lihasmassan pienenemiseen vaikuttavat erilaiset solun metaboliaan liittyvät häiriöt, kuten

insuliinisensitiivisyyden ja mitokondrioiden toiminnan väheneminen, jossa sekä mitokondrioiden määrä että aktiivisuus vähenee (Rooyackers ym., 1996, Coggan ym., 1992, Dela ja Kjaer, 2006). Myös hormoneilla on oma osansa sarkopenian synnyssä ja kehittymisessä. Joidenkin hormonien tiedetäänkin olevan tärkeässä osassa lihaksissa esiintyvien proteiinien säätelyssä (Greenlund ja Nair, 2003). Hormonikorvaushoitoon (HRT) liittyvien tutkimusten yhteydessä on havaittu vaihdevuosien aikana tapahtuvan hormonitasojen laskun olevan yhteydessä samanaikaiseen lihasten toimintakyvyn heikkenemiseen (Samson ym., 2000, Sipilä, 2003, Phillips ym., 1993).

Ikääntyvän lihaksen on todettu lihasmassan vähenemisen lisäksi menettävän myös toiminnallista kapasiteettiaan. Tähän liittyviä ilmiöitä ovat mm. voimantuottokapasiteetin ja maksiminopeuden pieneneminen sekä yleinen lihaksen supistumiseen ja rentoutumiseen liittyvä toiminnallinen hidastuminen (Samson ym., 2000, Skelton ym., 1994, Taaffe ym., 2005). Lihasmassa ja -voima vähenevät iän myötä sukupuolesta, etnisyydestä tai varallisuudesta riippumatta. Lihasvoiman on arvioitu vähenevän 1-4 % vuosivauhdilla keski- iän jälkeen (Skelton ym., 1994, Rantanen ym., 1997) ja sarkopenian yleisyyden vanhoilla ihmisillä arvioidaan olevan 20–50 % (Lauretani ym., 2003, Baumgartner ym., 1998, Iannuzzi-Sucich ym., 2002). Jopa terveillä, itsenäisesti elävillä vanhuksilla sarkopenian yleisyys on yli 20 % (Iannuzzi-Sucich ym., 2002). Sarkopenia heikentää ennen kaikkea ikääntyvän ihmisen terveyttä ja sitä kautta elämänlaatua, mutta sen kustannukset myös sosiaali- ja terveydenhuollolle ovat suuret. Iän mukanaan tuoma lihasvoiman heikentyminen ja lihasten surkastuminen on yksi suurimmista toimintakyvyttömyyteen ja edelleen laitoshoitoon päätyminen syistä (Morley ym., 2001). Lisäksi äkillisten kaatumisten ja niistä johtuvien luunmurtumien riski kasvaa (Szulc ym., 2005) sekä mahdollisen liikuntakyvyn heikentymisen myötä alttius metabolisille sairauksille, kuten tyypin 2 diabetekselle, lisääntyy (Greenlund ja Nair, 2003).

Useiden tutkimusten mukaan liikunta hidastaa sarkopenian kehittymistä. Aikuisiässä harrastettavan, säännöllisen liikunnan on todettu hidastavan lihasvoiman ja -massan heikentymistä, mutta koska vanhuuden lihasheikkouden etenemiseen vaikuttavat myös muut tekijät, kuten ravinto ja elimistön hormonitasapaino, sen etenemistä pelkän liikunnan avulla ei pystytä estämään (Iannuzzi-Sucich ym., 2002, Faulkner ym., 2007, Ryall ym., 2008).

1.2 Vaihdevuodet

1.2.1 Estrogeeni

Estrogeeni on kolesterolista ja edelleen androgeenisista steroideista syntetisoitu naissteroidihormoni. Seerumin määrällisesti merkittävin estrogeeni sukukypsillä naisilla on testosteronista syntetisoitu 17β -estradioli (E_2), mutta myös estrogeenin muita muotoja, estronia ja estriolia, esiintyy jonkin verran. Vaihdevuosien jälkeen estrogeenimuotojen suhteet vaihtuvat, jolloin estronista tulee seerumin määrällisesti merkittävin estrogeeni (ks. yleiskatsaus Nelson, 2008). E_2 :ia käytetäänkin vaihdevuosisoireisiin käytettävissä hormonikorvaushoitovalmisteissa.

Estrogeeneja muodostuu munasarjoissa, mutta myös muissa kudoksissa, kuten lihaksessa, rasvassa, maksassa ja aivoissa on todettu esiintyvän estrogeenisynteesiä (Naftolin ym., 1975, Matsumine ym., 1986, Miller, 1991, Brodie ja Inkster, 1993). Estrogeeni kulkeutuu kohdekudoksiinsa verenkierron mukana, yleensä plasmaproteiineihin sitoutuneena. Sen tiedetään vaikuttavan primaaristen sukupuoliominaisuuksien lisäksi myös moniin muihin kudoksiin (Boland ym., 2008). Estrogeenillä on merkittävä rooli muun muassa luun metaboliassa (Manolagas, 2000), hermo- (Joels, 1997), sydän- ja verisuoni- (Mendelsohn ja Karas, 1999) sekä immuunijärjestelmässä (Carlsten ym., 1989). Estrogeenin vaikutuksista lihaksiin ei ole tarkkaa tietoa.

1.2.2 Progesteroni

Keltarauhashormoni eli progesteroni on steroidihormoneihin lukeutuva naissukupuolihormoni. Sitä erittyy pääasiassa keltarauhasesta, mutta pieniä määriä myös lisämunuaisista ja kiveksistä. Raskauden aikana istukka tuottaa suuria määriä progesteronia. Progesteroni vaikuttaa kohdun limakalvon muokkaamiseen kuukautiskierron lopulla ja raskauden aikana limakalvon kypsymiseen sikiön kiinnittymistä varten, lisäksi se estää kohdun supistuksia raskauden aikana. Estrogeenin tiedetään vaikuttavan ainakin osittain progesteronin toimintaan, sillä estrogeeni vaikuttaa progesteronireseptoreiden transkriptioon (Kastner ym., 1990). Progesteronin vaikutuksista lihaksiin ei ole tietoa. Progesteronia kutsutaan luonnolliseksi progestiiniksi

vastakohtana synteettisille progestiineille. Synteettisiä progestiineja käytetään ehkäisyvalmisteissa sekä vaihdevuosien jälkeisessä hormonikorvaushoidossa.

1.2.3 Vaihdevuosissa tapahtuvat hormonimuutokset

Vaihdevuosilla eli menopaussilla tarkoitetaan sitä ajanjaksoa, jolloin munasarjojen toiminta heikkenee ja lopulta sammuu. Munarakkuloiden määrä vähenee, ovulaatiot loppuvat ja estrogeenituotanto hiipuu. Vaihdevuodet alkavat keskimäärin 51 vuoden iässä, mutta ikä vaihtelee yksilöllisesti 45–55 vuoden välillä. Vaihdevuodet jaetaan kolmeen ajanjaksoon, pre-, peri- ja postmenopausiin. Premenopausi alkaa jo ennen kuukautisten poisjääntiä ja sen aikana hormonitoiminta alkaa vähetä. Suurimmat hormonaaliset muutokset tapahtuvat kuitenkin perimenopaussin aikana, joka kestää noin vuoden. Steroidihormonien määrä ja suhteet muuttuvat merkittävästi, kun estronista tulee E₂:n sijaan seerumin määrällisesti merkittävin estrogeeni. Estronin ja E₂:n pitoisuuksien seerumissa on osoitettu vähenevän 35 % ja 67 % ensimmäisen kuuden kuukauden aikana (Rannevik ym., 1986, McKinlay ym., 2008). Estrogeenitason laskun lisäksi myös progesteronin määrän on todettu laskevan vaihdevuosien aikana (ks. yleiskatsaus Nelson, 2008). Hormonitasot laskevat edelleen myös postmenopaussin aikana, mutta huomattavasti hitaammin. Postmenopaussin kuuden ensimmäisen kuukauden aikana aivolisäkkeen etulohkosta erittyvän follikkeleita stimuloivan hormonin (FSH) pitoisuus kasvaa, mikä on seurausta sukupuolihormonien määrän vähenemisestä. FSH:n pitoisuuden kasvua voidaankin pitää vaihdevuosien määrityksen indikaattorina (Sipilä, 2003, Rannevik ym., 1986).

1.2.4 Vaihdevuodet ja sarkopenia

Naisilla lihasten suorituskyky heikkenee merkittävästi vaihdevuosien aikana, jolloin myös elimistön steroidihormonien, estrogeenin ja progesteronin, tasot laskevat (Samson ym., 2000). Vaihdevuosien mukanaan tuomia oireita, kuten hikoilua, väsymystä, ärtyneisyyttä, masentuneisuutta ja aloitekyvyttömyyttä, hoidetaan usein estradiolia tai estradiolia ja progestiinia sisältävällä hormonikorvaushoidoilla (HRT), mutta niiden vaikutuksia lihaksiin on tutkittu melko vähän. Olemassa olevien tutkimustulosten valossa voidaan kuitenkin todeta, että HRT:n käyttö vaihdevuosissa on potentiaalinen sarkopenian kehittymistä hidastava tekijä

iäkkäillä naisilla (Ronkainen ym., 2009, Sipilä ym., 2001). Tutkimuksissa, joiden tutkittavat henkilöt ovat olleet iäkkäitä naisia, on havaittu selvä positiivinen yhteys seerumin estradiolitason ja lihasmassan (Taaffe ym., 2005, Iannuzzi-Sucich ym., 2002) ja –voiman välillä (Taaffe ym., 2005, Sipilä ym., 2001). Greising ym. raportoivat viimeaikaisessa systemaattisessa katsauksessaan meta-analyysin yhteensä 23 tutkimuksen tiedoista estrogeenia sisältävän HRT:n yhteydestä lihasvoimaan. Greising ym. totesivat, että meta-analyysista saatujen tulosten mukaan hoito on yhteydessä 5 % etuun lihasvoimassa verrattuna ei-käyttäjiin (Greising ym., 2009). Hormonitasojen laskusta johtuvista muutoksista ja toisaalta HRT:n vaikutusmekanismeista molekyyllitasolla ei vielä toistaiseksi ole tarkkaa käsitystä. Viimeisimmät tutkimustulokset kuitenkin osoittavat HRT:n aiheuttavan muutoksia mm. proteolyysiin ja energiametaboliaprosesseihin liittyvien geenien ilmenemisessä (Pöllänen ym., 2007).

Vaihdevuosisoireiden hoitoon käytettävät hormonivalmisteet sisältävät joko pelkkää estrogeeniä tai sekä estrogeenia että progestogeenia (yhdistelmähoito). Ensimmäiset estrogeenivalmisteet tuotiin markkinoille jo yli 60 vuotta sitten (Stefanick, 2005). Euroopassa estrogeenivalmisteissa käytetään ensisijaisesti synteettistä estradiolia, joka on yleensä kemiallisilta ja biologisilta ominaisuuksiltaan identtinen naisen munasarjojen tuottaman estradiolin kanssa. Progestogeeninen komponentti on puolestaan synteettinen progestiini, joka vaikuttaa samalla tavalla kuin luonnollinen progesteroni. Valmisteissa käytettävistä progestogeenista medroksiprogesteroniasetaatti on yleisin lukuun ottamatta Skandinaavia ja Iso-Britanniaa, joissa noretisteroniasetaatti (NETA) ja levonorgesteeli ovat HRT:ssa enemmän käytettyjä progestogeenisiä komponentteja (Campagnoli ym., 2005). Yhdistelmähoitoa käytetään niille vaihdevuosissa oleville naisille, joille ei ole tehty kohdunpoistoa, jolloin valmisteiden progestogeeninen komponentti estää kohdun limakalvon paksuuntumisen.

HRT:n käytön turvallisuudesta on käyty kansainvälisellä tasolla kiivaitakin keskusteluja. Keskustelun mahdollisten terveyshaittojen määrystä suhteessa hoidosta saatavaan hyötyyn sai liikkeelle mittava yhdysvaltalainen Women's Health Initiative-tutkimus (WHI). WHI:n ensimmäisen, vuonna 2002 julkaistun raportin tulosten mukaan tutkimuksessa HRT:a käyttävillä naisilla esiintyi enemmän sydänperäisiä kuolemia tai sydäninfarkteja kuin lumelääkettä saaneilla (Rossouw ym., 2002). Vuotta myöhemmin julkistettu lopullinen raportti

kuitenkin kumosi vuotta aiemmin julkaistun tuloksen, koska ero ryhmien välillä ei ollutkaan merkitsevä (Manson ym., 2003). Tutkimustulosten luotettavuutta heikentää myös se, että tutkimukseen osallistuneista naisista merkittävä osa edusti ei-tyypillistä HRT:n käytön aloittajaa, muun muassa tutkittavien keski-ikä oli 63 vuotta. Lisäksi tutkittavista osa oli merkittävästi ylipainoisia ja osalla oli todettu sydän- ja verisuonisairauksien riskitekijöitä. Loppujen lopuksi WHI:n viimeisimmät raportit osoittivat, että 50–59-vuotiaiden hormonihoidoryhmässä todettiin vähemmän sydäntapahtumia (ei tilastollisesti merkitsevää eroa) ja ko. vuosina HRT:n aloittaneiden kokonaiskuolleisuus oli 5-7 vuoden seurantajakson aikana 30 % lumeryhmää pienempi (Mendelsohn ja Karas, 1999, Rossouw ym., 2002). Rintasyöpäriskin todettiin lisääntyneen yhdistelmähoitoryhmässä 26 %, mutta vähenneen 18 % estrogeenihoidolla (Rossouw ym., 2002).

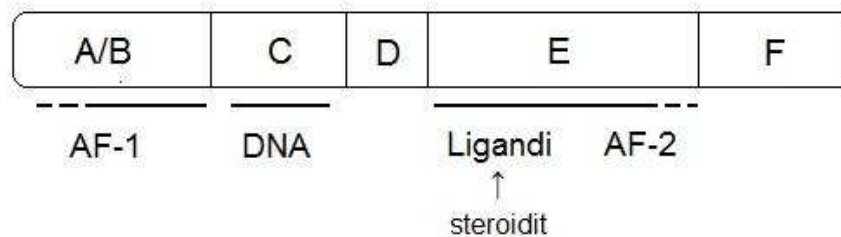
1.3 Steroidireseptorit

Steroidihormoneihin kuuluvat progestiinit, estrogeenit, androgeenit, glukokortikoidit ja mineralokortikoidit. Ne ovat kaikki pieniä, vaikutuksiltaan tehokkaita, lipofiilisiä molekyyliä, jotka ovat osallisena monissa solun biologisissa ja fysiologisissa toiminnoissa, kuten solun jakautumisessa, selviytymisessä, erilaistumisessa sekä metaboliassa. Yleisesti steroidihormonien vaikutukset välittyvät tumareseptoreiden superperheeseen kuuluvien reseptoreiden kautta. Tumareseptorit ovat rakenteeltaan ja toiminnaltaan hyvin toistensa kaltaisia ja niiden uskotaankin muokkautuneen yhdestä "alkuperäisreseptorista" (Aranda ja Pascual, 2001). Kappaleessa 1.3.1 on esitetty yleisesti steroidireseptoreiden rakenne ja kappaleessa 1.3.3 signaalintimekanismit käyttäen esimerkkinä estrogeenireseptorisignointia.

1.3.1 Steroidireseptorien rakenne

Steroidireseptoreilla on hyvin yleisesti tumareseptoreilla esiintyvä, viidestä itsenäisestä, mutta keskenään vuorovaikutuksessa olevasta, toiminnallisesta osasta koostuva rakenne (kuva 2). Reseptorin N-terminaaliosassa olevassa A/B-osassa sijaitsee reseptorin toinen geenien luennan aktiivisuuden vaikuttavista alueista AF-1, jonka toiminnot ovat ligandeista riippumattomia. AF-1 on mukana proteiini-proteiini vuorovaikutuksissa sekä kohdegeenien luennan aktivaatiossa. Molemmat transkription aktiivisuuden vaikuttavat osat, AF-1 ja AF-2,

sisältävät useita aktivaatiodomeeneita. Reseptorin C-osa eli DNA:ta sitova osa on tärkeässä roolissa reseptorin dimerisoitumisessa sekä sen sitoutumisessa oikeaan sekvenssikohtaan kohdegeenin DNA:ssa. D-osa puolestaan toimii ikään kuin siltana DNA:ta sitovan ja ligandeja sitovan osan välissä. Ligandeja sitovassa E-osassa sijaitsee reseptorin toinen aktiivinen kohta AF-2. Sen tehtävänä on osallistua muun muassa ligandien sitomiseen, reseptoreiden dimerisoitumiseen sekä kohdegeenien ilmenemisen säätelyyn. Ligandin sitoutuminen aiheuttaa reseptoreissa konformaatiomuutoksen, jonka seurauksena estrogeenisäädelyjen geenien transkriptionopeus muuttuu. E-osassa on AF-2:n lisäksi kohta, jonka välityksellä reseptori ja kohdegeenien transkriptiota edistävät ja estävät proteiinit (*engl.* co-activator protein, co-repressor protein) ovat keskenään vuorovaikutuksessa. Reseptorin viidennen eli C-terminaalisisessa päässä sijaitsevan F-osan tehtävät eivät vielä toistaiseksi ole tiedossa. Näistä viidestä osasta kolmessa eli A/B-, D- ja E-osissa on havaittu eniten vaihtelua eri steroidireseptorien välillä niin rakenteen kuin aktiivisuudenkin osalta (DeMayo ym., 2002, Nilsson ym., 2001).



Kuva 2. Steroidireseptorien rakenne.

1.3.2 Estrogeenireseptorit

Nykytietämyksen mukaan estrogeenireseptoreiden päätyyppinä on kaksi, estrogeenireseptori α ($ER\alpha$) ja estrogeenireseptori β ($ER\beta$). Sekä $ER\alpha$ että $ER\beta$ kuuluvat tumareseptoreiden steroidi/keltarauhashormoni superperheeseen ja niiden tehtävänä on geenien luennan säätely. $ER\alpha$ ja $ER\beta$ ovat rakenteiltaan lähes toisiaan vastaavia, mutta joitakin toiminnallisia eroja niiden väliltä on kuitenkin havaittu (ks. katsausartikkeli Nilsson ym., 2001, Kuiper ym., 1997). Yksi näistä eroista on A/B-osan aktiivisuus. $ER\alpha$:n A/B-osa on erittäin aktiivinen, kun taas $ER\beta$ A/B-osa aktiivisuus samoissa olosuhteissa on vähäistä (Cowley ja Parker, 1999).

Reseptoreiden DNA:ta sitova osat (C-osat) puolestaan ovat lähes identtiset, eikä niiden toiminnassa ole havaittu eroavaisuuksia (Enmark ym., 1997, Pace ym., 1997).

Estrogeenin kohdekudokset jaetaan ns. klassisiin ja ei-klassisiin kohdekudoksiin. Klassisiin kohdekudoksiin kuuluvat kohtu, maitorauhaset, istukka, keskushermosto, sydän- ja verisuonijärjestelmä sekä luu. Näissä kudoksissa ER α :n määrä on korkea, mutta myös ER β :n ilmentymistä on havaittu. Ei-klassisiin kudoksiin lukeutuvat mm. munasarjat, kivekset, eturauhanen, lisämunuaiset ja iho. Näissä kudoksissa puolestaan ER α :n ilmentyminen on hyvin vähäistä, mutta ER β :n ilmentyminen osassa näistä kudoksista on hyvinkin korkea (Taylor ja Al-Azzawi, 2000). ER α :n ja ER β :n ilmentyminen ihmisen luustolihasessa, joka lukeutuu ei-klassisiin ER:den kohdekudoksiin, on myös osoitettu (Lemoine ym., 2003, Wiik ym., 2009, Wiik ym., 2003).

1.3.3 Estrogeenireseptorisignalointi

Tutkijat olivat pitkään sitä mieltä, että ainoa estrogeenin vaikutusmekanismi oli sitoutua ER:iin, jonka jälkeen tämä estrogeeni-reseptori-kompleksi puolestaan sitoutui tarkoin määrättyyn kohtaan kohdegeenin DNA:ssa (*engl.* estrogen response element, ERE) (Nilsson ym., 2001). Nykyään kuitenkin, tämän niin sanotun klassisen ER:den toimintamekanismin lisäksi, on tiedossa myös useita muita mahdollisia ER:den kautta kulkevia signalointimekanismeja (kuva 3) (Bjornstrom ja Sjoberg, 2005, Hall ym., 2001). On myös osoitettu, että ER:ita esiintyy tuman lisäksi myös muissa solun osissa, kuten solukalvolla, mitokondrioissa sekä tuman ympärillä (Milanesi ym., 2008) ja että kaikki mekanismit eivät vaadi estrogeenin läsnäoloa vaan voivat aktivoitua muidenkin tekijöiden vaikutuksesta. Mekanismit voidaan jaotella klassisiin ja ei-klassisiin mekanismeihin ja ei-klassiset mekanismit edelleen genomisiin ja ei-genomisiin mekanismeihin (Nilsson ym., 2001).

Klassinen estrogeenireseptoreiden toimintamekanismi

Molekyylipainoltaan kevyt rasvaliukoinen estrogeeni läpäisee sekä solu-, että tumakalvon. Estrogeenin sitoutuessa solussa sijaitsevaan ER:iin, ER dimerisoituu ja vapauttaa sen kanssa kompleksin muodostaneet lämpösokkiproteiinit (*engl.* heat shock protein). Hormonin sitoutuminen saa aikaan konformaatiomuutoksen myös reseptorin ligandien sitoutumiskohdassa, mikä mahdollistaa muiden transkription säätelyyn vaikuttavien proteiinien sitoutumisen reseptoriin. Aktiivinen reseptori-estrogeeni-kompleksi sitoutuu tumassa, joko homo- tai heterodimeerina ERE:iin. ERE-alue sijaitsee kohdegeenin säätelyalueella ja on 13 emäsparia pitkä, käänteisesti toistuva palindrominen, sekvenssi. ER:n ERE-sekvenssiin sitoutumisen seurauksena kohdegeenin lähetti-RNA synteesi käynnistyy (Nilsson ym., 2001, Baulieu ym., 1990, Rosenfeld ja Glass, 2001).

ERE:istä riippumattomat ER:den genomiset toiminnot

Toisin kuin klassisen ER:den toimintamallin mukaan, ER:t kykenevät säätelemään kohdegeenien transkriptiota myös ilman suoraa DNA:han sitoutumista. Tässä mekanismissa ER sitoutuu proteiini-proteiini-vuorovaikutuksen välityksellä kohdegeenin DNA:han sitoutuneeseen kompleksiin, joka koostuu transkriptioon vaikuttavien tekijöiden joukosta. Tämän mekanismin avulla ER:t pystyvät säätelemään niiden geenien transkriptiota, joiden DNA:ssa ei ole ERE:jä (Bjornstrom ja Sjoberg, 2005). Noin kolmannes ihmisen ER säädelyjen geenien DNA:sta ei sisällä ERE:iä ja näitä ovat muun muassa insuliinin kaltainen kasvutekijä 1 (IGF-1) (Umayahara ym., 1994) ja ovalbumiini (Gaub ym., 1990).

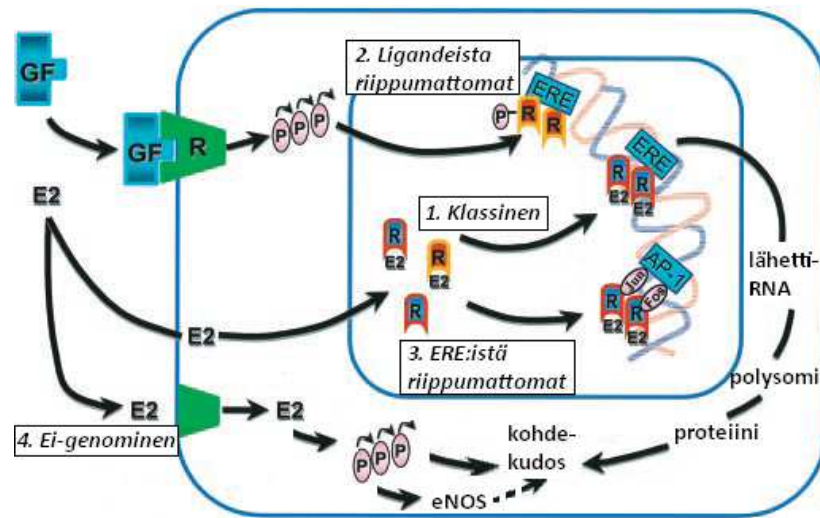
Ligandeista riippumattomat ER:den toiminnot

ER:t eivät välttämättä tarvitse estrogeenista ligandia aktivoituakseen. Aktivoituminen tapahtuu tällöin jonkin muun ulkoisen tekijän, kuten kasvutekijän vaikutuksesta. Merkittävin ligandista riippumaton mekanismi perustuu reseptoreiden aktiivisten kohtien, AF-1 tai AF-2, fosforyloitumiseen (Weigel, 1996, Shao ja Lazar, 1999). Bunone ym. 1996 osoittivat epidermaalisen kasvutekijän aktivoivan ER α :n fosforyloimalla reseptorin AF-1 kohdan tietyn seriinitähteen mitogeneeni-aktivoituneen proteiinikinaasin (MAPK) välityksellä (Bunone ym., 1996). Muita ulkoisia, estrogeenista riippumattomia, ER aktivaattoreita ovat muun muassa

IGF-1, syklinen adenosinimonofosfaatti (cAMP) (Aronica ja Katzenellenbogen, 1993), interleukiini-2 (Smith ym., 1993) sekä dopamiini (Power ym., 1991). Myös ER β :n kohdalla on osoitettu ilmenevän vastaavanlaista ligandista riippumatonta aktivaatiota (Tremblay ym., 1999).

Ei-genominen signaointi

Genomisen signaoinnin lisäksi estrogeenillä on myös ei-genomisia vaikutuksia. Ei-genomiset mekanismit eivät vaikuta suoraan kohdegeenien transkriptioon vaan niiden toiminta liitetään usein erilaisten proteiini-kinaasi kaskadien aktivoitumiseen. Tällaisia estrogeenin aktivoimia kaskadeja ovat mm. MAPK (McMillan ym., 2006) ja PI3K (Vasconsuelo ym., 2008). Ei-genomisten signaalien vaikutukset ovat havaittavissa huomattavasti nopeammin kuin genomisten signaalien vaikutukset. Ei-genomisten signaalien vasteaika, hormonisyötön jälkeen, voi olla vain muutama sekunti, koska aikaa ei kulu transkriptioon ja translaatioon toisin kuin genomisessa signaoinnissa (Deroo ja Korach, 2006).



Kuva 3. E₂ ja estrogeenireseptorisignalointi. 1. Klassinen, ligandista riippuvainen signalointi. 2. Ligandeista riippumattoman signalointi, jossa esimerkiksi jokin kasvutekijä (GF) saa aikaan solunsisäisen proteiinikinaasikaskadin aktivoitumisen ja edelleen ER:n aktivoitumisen. 3. ER:t kykenevät säätelemään myös sellaisten geenien transkriptiota, joiden DNA ei sisällä ERE-sekvenssejä. Tällöin ER sitoutuu kohdegeeniinsä DNA:han muiden proteiini-proteiini-vuorovaikutusten välityksellä. 4. Ei-genomiset signalointimekanismit vaikuttavat kohdekudoksiin usein esimerkiksi proteiinikinaasikaskadien kautta. Kuva on muokattu Björnströmin ja Sjöbergin (2005) sekä Hall ym. (2001) julkaisuista (Bjornstrom ja Sjoberg, 2005, Hall ym., 2001).

1.3.4 Androgeenireseptori

Androgeenit eli mieshormonit vaikuttavat miehille tyypillisten sukupuolitunnusmerkkien kehittymiseen. Voimakkain näihin piirteisiin vaikuttava hormoni on kiveksissä syntyvä testosteroni. Androgeeneja muodostuu molemmilla sukupuolilla lisämunuaisen kuorikerroksessa ja naisilla jonkin verran munasarjoissa. Androgeenireseptori (AR) kautta kulkevalla androgeenisignaalinnalla tiedetään olevan miehen lisääntymiselinten kehittymisen säätelyn lisäksi myös tärkeä rooli muiden kudosten, kuten aivojen ja lihasten kehittämisessä (Herbst ja Bhasin, 2004). Pöllänen ym. tekivät mielenkiintoisen havainnon tutkiessaan vuoden kestäneen yhdistelmä-HRT:n vaikutuksia vaihdevuosi-ikäisten naisten geenien ilmentymiseen lihaksissa. Tutkimukset osoittivat, että AR:ia koodaavan geenin ilmentyminen kasvoi merkittävästi HRT:a käyttävien ryhmässä verrattuna lumelääkettä käyttäneiden ryhmään. AR-geenin ilmentymisen lisääntymiseen vaikuttavia tekijöitä HRT käyttäjien ryhmässä ei kuitenkaan tunneta (Pöllänen ym., 2007).

1.4 Fosfoinositidi-3-kinaasi (PI3K/Akt)-signalointireitti lihassoluissa

Yksi lihasmassan säilymisen kannalta tärkeimmistä tekijöistä on proteiinisynteesin ja proteiinien hajotuksen välinen tasapaino, jonka säätelyssä useiden solun sisäisten signalointireittien tiedetään olevan avainasemassa. Yksi tärkeimmistä lihassolun kasvua säätelevistä tekijöistä on fosfoinositidi-3-kinaasi (PI3K) signalointireitti, jonka tiedetään aktivoituvan anabolisten tekijöiden, kuten IGF-1:n (Rommel ym., 2001) ja insuliinin (Reynolds ym., 2002) vaikutuksesta. Myös E₂:n on havaittu aktivoivan PI3K-reitin hiiren C₂C₁₂-myoblastisoluissa (Vasconsuelo ym., 2008). Aikaisempien tutkimusten mukaan lihassolun kasvaessa PI3K/Akt-reitille kuuluvat proteiinit proteiinikinaasi B (Akt, jolla tarkoitetaan muotoa Akt1, myös PKB) sekä *engl.* mammalian target of rapamycin (mTOR) ovat aktiivisia ja toisaalta inaktiivisia lihaksen heikentyessä (Bodine ym., 2001). Sen lisäksi, että aktiivinen Akt on yksi lihassolun kasvua edistävästä tekijöistä, sillä on myös merkittävä rooli solun selviytymisessä ja apoptoosin säätelyssä (Boland ym., 2008). Aikaisemmat tutkimukset osoittavat, että aktiivisten Akt:n ja mTOR:in kautta kulkeva PI3K/Akt-reitin aktivaatio on edellytys lihassolujen kasvuille ja lihaksen heikentyessä, lihassolun koon säilyttämiselle (Bodine ym., 2001).

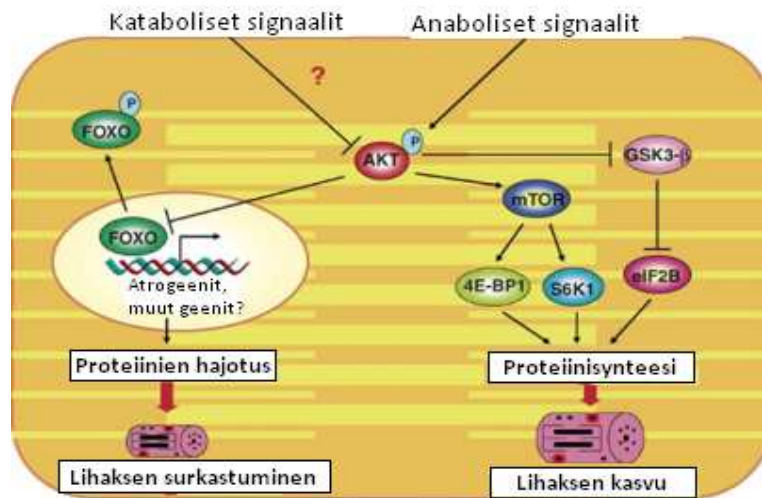
1.4.1 Akt

Proteiinikinaasi B (PKB), toiselta nimeltään Akt on seriini/treoniini kinaasi. Akt:ta on kolme eri muotoa, Akt1, Akt2 ja Akt3, joista pääasiassa Akt1 ja Akt2 esiintyvät luustolihasessa. Akt1:n tiedetään olevaan oleellisessa osassa solunsisäisessä proteiinisynteesin säätelyssä. PI3K/Akt-signalointireitillä Akt sijaitsee alavirtaan suhteessa PI3K:iin. PI3K:n aktivoituminen käynnistää fosfatidyli-inositolifosfatin (PIP) muodostumisen ja edelleen Akt:n fosforyloitumisen ja aktivaation. Akt:ssa on kaksi fosforyloituvaa kohtaa Thr³⁰⁸ ja Ser⁴⁷³, jotka fosforyloituvat eri kinaasien toimesta (Sarbasov ym., 2005, Alessi ym., 1996, Jacinto ym., 2006). Rictor-proteiinin (*engl.* rapamycin-insensitive companion of mTOR) kanssa kompleksin muodostanut mTOR fosforyloi Akt:n Ser⁴⁷³ tähteen (Sarbasov ym., 2005) ja PDK1 (*engl.* phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate dependent protein kinase-1) puolestaan fosforyloi Thr³⁰⁸ tähteen (Alessi ym., 1997). Täydelliseen Akt:n aktiivisuuteen vaaditaan mahdollisesti molempien kohtien fosforyloituminen (Alessi ym., 1996). Akt:n kautta kulkeva

signalointi vaikuttaa moniin solunsisäisiin toimintoihin, joista lihaksen kannalta yksi merkittävimmistä on proteiinisynteesin ja toisaalta proteiinien hajotukseen johtavien reittien säätely (kuva 4).

Proteiinisynteesiin ja edelleen lihassolun kasvuun johtavalla signalointireitillä aktiivinen Akt fosforyloi ja aktivoi mTOR:in (Nave ym., 1999), jonka aktivaatio puolestaan edelleen vaikuttaa proteiinien translaation aloitukseen (Bodine ym., 2001). mTOR:in lisäksi aktiivinen Akt inhiboi, proteiinisynteesin aloitustekijän eIF-2B estäjänä toimivan, glykogeenisyntaasikinaasi 3 β :n (GSK3- β) aktiivisuutta (Nader, 2005).

Akt:n kautta kulkevat signalointireitit vaikuttavat lihassolujen kasvun lisäksi myös proteiinien hajotukseen ja edelleen lihassolujen surkastumiseen johtaviin reitteihin. Näillä reiteillä yksi tärkeimmistä Akt:n vaikutuskohteista ovat transkriptiotekijöihin kuuluva FOXO (*engl.* forkhead box O) proteiinien ryhmä, joista ainakin kolme muotoa on hyvin tunnistettu, FOXO-1, FOXO-3a sekä FOXO-4. FOXO proteiinien tiedetään vaikuttavan moniin biologisiin tapahtumiin, kuten glukoosin tuottoon maksassa, pre-adiposyyttien erilaistumiseen ja kokoon, β -solujen lisääntymiseen haimassa sekä myoblastien erilaistumiseen ja lihasten surkastumiseen (Accili ja Arden, 2004). FOXOja esiintyy pääsääntöisesti tumassa ja ne ovat aktiivisina fosforyloimattomia ja DNA:han sitoutuneita. Akt vaikuttaakin proteiinien hajotukseen johtavaan signalointireittiin inaktivoimalla FOXOja. Akt fosforyloi ja näin ollen inaktivoi FOXO:t. Fosforyloitumisen seurauksena FOXO:t irtoavat kohdegeeniensä DNA:sta, sitoutuvat 14-3-3 proteiineihin ja tämä kompleksi siirtyy edelleen tumasta solulimaan. Akt:n välittämien signaalien loppuessa sekä FOXO:t, että 14-3-3-proteiinit siirtyvät takaisin tumaan, jossa FOXO:t aktivoituvat ja voivat jälleen vaikuttaa kohdegeeniensä transkriptioon (Birnenkamp ja Coffey, 2003).



Kuva 4. Akt:n vaikutus lihaksen kasvuun ja surkastumiseen johtavilla signalointireiteillä. Akt:n aktivaatio saa aikaan proteiinisynteesiin ja edelleen lihaksen kasvuun, mm. mTOR:n ja S6K1:n kautta, johtavien reittien aktivoitumisen ja toisaalta proteiinisynteesiä estävien tekijöiden inaktivoitumisen. Aktiivisena Akt pystyy myös estämään lihaksen surkastumiseen liittyvien geenien (atrogeenit) ilmentymistä ja inaktivoimaan lihaksen surkastumiseen vaikuttavia FOXO proteiineja. Kuva on mukattu Naderin (2005) julkaisusta (Nader, 2005). Akt=proteiinikinaasi B, mTOR= *engl.* mammalian target of rapamycin, GSK3-β= glykogeenisyntaasikinaasi 3β, 4E-BP1=4E:hen sitoutuva proteiini, S6K1 (myös p70^{S6K})=p70 ribosomaalinen proteiini S6 kinaasi 1, eIF2B=eukaryoottinen translaation aloitustekijä 2B, FOXO=*engl.* forkhead box O.

1.4.2 mTOR

Kuten jo edellisessä kappaleessa mainittiin, mTOR kuuluu Akt:n ohella proteiinisynteesiin ja edelleen lihassolun kasvuun johtavalle signalointireitille (kuva 4). mTOR muodostaa joidenkin säätelyproteiinien, kuten raptorin (*engl.* regulatory associated protein of mTOR) ja PRAS40:n (*engl.* proline-rich Akt substrate 40) kanssa TORC1-kompleksin (*engl.* target of rapamycin complex 1) (Kimball, 2007). TORC1-kompleksi aktivoi muun muassa proteiinisynteesiä aktivoivan ja edistävän, p70 ribosomaalisen proteiini S6 kinaasi 1:n (p70^{S6K}) ja toisaalta se inhiboi, eukaryoottisen proteiinisynteesin aloitustekijän (eIF-4E) negatiivisen säätelijän, 4E:hen sitoutuvan proteiinin (4E-BP1) aktiivisuutta (Bodine ym., 2001, Kimball, 2007, Nojima ym., 2003). Aktiivinen TORC2-kompleksi puolestaan fosforyloi Akt:n. Erona TORC1-kompleksiin TORC2-kompleksissa raptorin tilalla on rictor-proteiini (Kimball, 2007).

mTOR:n tiedetään aktivoituvan muun muassa insuliinin (Reynolds ym., 2002) ja Akt:n vaikutuksesta (Nave ym., 1999). Aktiivinen Akt saa aikaan mTOR:n Ser²⁴⁴⁸ aminotähteen fosforyloitumisen, minkä tiedetään olevan merkittävässä roolissa proteiinien translaation säätelyssä (Nave ym., 1999). Toisaalta Chiang ja Abraham (2005) ovat esittäneet, että Akt ei

olisikaan ainut mTOR:in Ser²⁴⁴⁸:n fosforylaatioon vaikuttava tekijä vaan mTOR:sta alavirtaan sijaitseva p70^{S6K} kinaasi ja mahdollisesti mTOR itse säätelisivät myös mTOR:n aktiivisuutta (Chiang ja Abraham, 2005)

1.4.3 Estrogeenin vaikutukset lihassolussa

Estrogeenin tiedetään säätelevän solun sisäisiä signalointireittejä, jotka mahdollisesti johtavat soluja suojaaviin ja solun selviytymisen kannalta oleellisiin vaikutuksiin luustolihasoluissa. Estrogeenillä on todettu olevan useampiakin eri vaikutusreittejä apoptoosin ehkäisyssä hiiren C₂C₁₂-myoblastisoluisissa. E₂:n on osoitettu mm. estävän sytokromi c:n eritystä, kaspasi-3:n aktivoitumista, PARP:n jakautumista sekä DNA:n pilkkoutumista. Lisäksi sen on havaittu torjuvan tyypillisiä morfologisia muutoksia tumassa, mitokondrioiden ja solujen koossa sekä mitokondrioiden jakautumisessa (Vasconsuelo ym., 2008).

Sekä ER α että ER β on havaittu esiintyvän mitokondrioissa (Vasconsuelo ym., 2008, Milanesi ym., 2009). Mitokondriot ovat keskeisessä roolissa solun apoptoosin edistymisen kannalta. Niiden tehtävänä apoptoosiin johtavassa prosessissa on erittäin sytokromi c:tä, joka on apoptoosin kehittymistä edistävä tekijä. Sytokromi c:tä vapautuu mitokondrioista vasteena pro-apoptoottisille ärsykeille. Sen vapautuminen puolestaan aiheuttaa kalsiumin purkautumisen solulimakalvostosta. Kalsiuminpitoisuuden nousu taas aiheuttaa mittavan sytokromi c:n vapautumisen, mikä jälleen toimii positiivisena vaikuttajana kalsiumin purkautumiselle, näin kalsiumpitoisuus voi nousta solun kannalta myrkylliselle tasolle. Kalsiumin vapautumisen lisäksi sytokromi c:n vapautuminen saa aikaan myös kysteiniiniproteaasi kaspasi 9. aktivoitumisen, joka edelleen aktivoi, nisäkässoluissa oleellisimman apoptoosiin johtavan signaalin välittäjän, kaspasi-3:n (Liu ym., 1996). Erityisesti ER β :n arvellaan välittävän E₂:n antiapoptoottisia vaikutuksia C₂C₁₂-solujen mitokondrioissa (Vasconsuelo ym., 2008).

Myös E₂:n ei-genomisia vaikutuksia solun sisäisiin signaalireitteihin lihassoluissa on tutkittu. C₂C₁₂-soluissa E₂:lla on havaittu olevan vaikutusta ainakin MAPK:n (Ronda ym., 2007) sekä PI3K/Akt:n aktivaatioon (Vasconsuelo ym., 2008). MAPK perheeseen kuuluvien JNK1/2:n, ERK1/2:n sekä p38 MAPK:n tiedetään osallistuvan apoptoosin säätelyyn. E₂:n on todettu saavan aikaan ERK1/2:n ja p38 MAPK:n nopean aktivoitumisen, mikä johtaa muun

muassa transkriptiotekijöiden CREB ja ELK-1 fosforyloitumiseen ja edelleen c-fos proteiinin ilmentymiseen (Ronda ym., 2007). c-fos on proto-onkogeeni, joka dimerisoituessaan C-Jun proteiinin kanssa muodostaa transkriptiotekijä aktivaattori proteiinin (AP-1). AP-1 säätelee useita solunsisäisiä prosesseja, kuten erilaistumista, jakautumista ja apoptoosia (Vesely ym., 2009). Lisäksi on havaittu, että E₂ inaktivoi apoptoosin aloitukseen vaikuttavan BAD-proteiinin (*engl.* Bcl-2 associated death agonist). E₂:n aktivoima Akt fosforyloi ja inaktivoi BAD:n, jolloin BAD muodostaa homodimeerin soluliman 14-3-3-proteiinin kanssa. Sitoutuminen 14-3-3-proteiiniin estää BAD:n apoptoottista aktiivisuutta (Vasconsuelo ym., 2008). Nämä tutkimukset osoittavat E₂:n ehkäisevän apoptoosia myös ei-genomisten signaalireittien kautta (Vasconsuelo ym., 2008, Ronda ym., 2007). Kuten jo aiemmin tässä kappaleessa esitettiin, proteiinisynteesiin johtavan PI3K-reitin on todettu olevan aktiivinen lihassolun kasvun aikana ja toisaalta Vasconsuelo ym. ovat raportoineet E₂:n aktivoivan PI3K:ia ja edelleen Akt:ta (Vasconsuelo ym., 2008, Bodine ym., 2001).

HRT:oon liittyvissä tutkimuksissa havaitaan lähes poikkeuksetta suuria yksilöiden välisiä eroja vasteissa yhdistelmä-HRT:on, jolloin käytettävän hoidon molekyyli-tason vaikutusmekanismien selvittäminen on erittäin haastavaa tai jopa mahdotonta. Tutkimuksissa ei myöskään pystytä erottelemaan hoidon eri vaikuttavien ainesosien vaikutuksia. Usein tulosten taustalla arvellaan olevan nimenomaan estrogeeni, vaikka todellisuudessa estrogeenisten ja progestogeenisten komponenttien erillis- ja yhteisvaikutuksia ei voida erotella. Solu- ja soluvälisissä puolestaan lähes kaikki ympäristötekijät voidaan kontrolloida, jolloin kunkin hormonin aikaansaama vaikutus pystytään määrittämään hyvinkin tarkasti. Solutason tutkimus on siis merkittävässä roolissa, kun halutaan selvittää miten yhdistelmä-HRT:n eri komponentit tarkalleen vaikuttavat esimerkiksi kiinnostuksen kohteina oleviin signalointireitteihin ja edelleen lihassolussa tapahtuviin muutoksiin.

2. Tutkimuksen tarkoitus

Ikääntyvien lihaksiston heikkeneminen yhdistetään usein fyysiseen inaktiivisuuteen sekä heikkoon ravitsemukseen. Hormonit osallistuvat kuitenkin oleellisesti yksilönkehitykseen ja elimistössä tapahtuviin muutoksiin läpi elämän myös lihaksistossa. Tässä tutkimuksessa pyrittiin tutkimaan tarkemmin niitä solutason viestintäreittejä, jotka ovat suoraan tai välillisesti yhteydessä hormonikorvaushoidon aiheuttamiin vasteisiin luurankolihasissa. Erityisesti haluttiin saada aivan uutta tietoa yhdistelmähoidon eri vaikuttavien ainesosien – estrogeenin (E_2) ja progesteronin (noretisteroniasetaatti, NETA) – vaikutuksista lihasolussa.

Tutkimuksen tarkoitus oli

1. Tutkia HRT:ssa käytettävien komponenttien vaikutuksia hypertrofisen signaalireittiin (PI3K/Akt) liittyvien geenien, *ER α* ja *ER β* , *AR*, *Akt* sekä *mTOR*, ilmenemiseen.
2. Selvittää HRT:n komponenttien proteiinitason vaikutuksia PI3K/Akt-reitin aktiivisuuteen määrittämällä reitillä esiintyvän Akt- ja mTOR proteiinien sekä näiden fosforyloituneiden (aktiivisten) muotojen ilmentymistä/määrää.

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1 Solulinja

Tutkimuksessa käytettiin kaupallista hiiren C₂C₁₂ (*Mus Musculus*) myoblasti-solulinjaa (ATCC, LGC Standards AB, American Type Culture Collection, Manassas, VA). Solulinjaa ylläpidettiin DMEM+GlutaMAXTM-kasvatusliuoksessa (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4,5 g/l D-Glucose + Pyruvate, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA). Kasvatusliuokseen lisättiin 10 % (loppupitoisuus) inaktivoitua (30 min, + 56 °C) vasikan sikiön seerumia (Fetal Bovine Serum, Gibco, Invitrogen) sekä 1 % penisilliini-streptomysiini-antibioottiseosta (P/S-seos, Gibco, Invitrogen). Antibioottien loppupitoisuudet olivat 90 U/ml penisilliiniä ja 90 µl/ml streptomysiiniä. Solut siirrostettiin kahden tai kolmen vuorokauden välein konfluenssiasteen ollessa 70 - 80 %. Solulinjaa kasvatettiin lämpökaapissa, jonka lämpötila oli + 37 °C ja hiilidioksidipitoisuus 5 %.

3.2 Solujen käsittely

Tutkimuksessa käytettiin myoblasteista erilaistettuja myotuubeja. Myoblastit erilaistettiin myotuubeiksi vaihtamalla 70–80 % konfluenteille maljoille (halkaisija 6 cm) kasvatusliuoksen tilalle DMEM+GlutaMAXTM-kasvatusliuos, johon oli lisätty 2 % hevosen seerumia (Horse Serum, Gibco, Invitrogen) ja 1 % penisilliini-streptomysiiniä (P/S, Gibco, Invitrogen). Soluja erilaistettiin kuusi päivää (lämpötila + 37 °C, hiilidioksidipitoisuus 5 %). Erilaistuneita soluja käsiteltiin sekä proteiinitason että geenitason tutkimuksia varten syöttämällä niille joko E₂:ia tai NETA:ia (Diosynth, Novo Nordiskilta, Kööpenhamina, Tanska). Ennen käsittelyjen aloitusta soluja inkuboitiin vähintään yksi tunti seerumittomassa ja fenolipunattomassa kasvatusliuoksessa DMEM (4,5 g/l D-Glucose, –L-Glutamine, –Pyruvate, Gibco, Invitrogen), johon oli lisätty loppupitoisuudeltaan 1 mM natrium-pyruvaattia (Gibco, Invitrogen), 2 mM L-glutamiinia (Gibco, Invitrogen) sekä 1 % P/S-seosta. Soluja käsiteltiin 1 nM sekä 10 nM hormonipitoisuuksilla (E₂ tai NETA), jotka oli valmistettu em. kasvatusliuokseen. Samaa kasvatusliuosta käytettiin myös kontrollisolujen käsittelyyn. Hormonien kantaliuokset valmistettiin puhtaaseen (96 % w/v) etanoliin. Proteiinitason kokeissa soluille vaihdettiin

käsittelyliuos 5, 20, 40 minuutin ja 2 tunnin ajaksi ja RNA-tason kokeissa 2, 6 ja 24 tunnin ajan. Sekä proteiinitason että geenitason kokeissa oli käsiteltyjen näytteiden lisäksi myös 0 h näyte, jossa solut kerättiin suoraan homogeenointipuskuriin ilman käsittelyä. Lisäksi jokaisella aikapisteellä oli omat kontrollisolut, soluviljelykokeet toistettiin vähintään kolme kertaa.

3.3 Geenitason kokeet

Hormonikäsiteltyjen solujen RNA eristettiin kaupallisella Rneasy Mini-kitillä valmistajan ohjeen mukaan (QIAGEN Corp., Gaithersburg, MD). Eristetyn RNA:n pitoisuus ja puhtausaste määritettiin NanoDrop ND-1000 spektrofotometrillä (Nano Drop Technologies Inc., Wilmington, DE). Yksi mikrogramma RNA:ta käännettiin cDNA:ksi kaupallisella kitillä (High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit, Applied Biosystems) valmistajan ohjeen mukaan. Reaktioseoksen lopputilavuus oli 20 µl, jossa RNA:ta oli 1 µg veteen laimennettuna, lopullinen nukleotidipitoisuus oli 4 mM ja entsyymiä (Multiscribe Reverse Transcriptase, Applied Biosystems) 2,5 U/reaktio. cDNA:ksi kääntö suoritettiin PCR-laitteella (Mastercycler[®], epgradient S, Eppendorf, Foster City, CA), jossa käytettiin seuraavaa ohjelmaa: 10 min + 25 °C, 120 min + 37 °C, 5 sek + 85 °C.

ERα:n, *ERβ:n*, *AR:n*, *Akt:n* ja *mTOR:n* lähetti-RNA-tasot määritettiin qPCR (*engl. quantitative PCR*) menetelmällä. RNA:n lataamisesta ja monistumistehokkuudesta johtuvat mahdolliset erot tasattiin määrittämällä jokaiselle näytteelle endogeenisena kontrollina toimivan *glyseraldehydi3-fosfaattidehydrogenaasin (GAPDH)* lähetti-RNA-taso. Näytteet mitattiin kolmena rinnakkaismäärityksenä. Määrityksissä käytettiin Applied Biosystems'in valmistamia alukkeita ja koettimia (Taqman[®] Gene Expression Assay, *GAPDH*: Mm 99999915_g1, *ESR1 (ERα)*: Mm 00433149_m1, *ESR2 (ERβ)*: Mm 01281854_m1, *AR*: Mm 01238475_m1, *Akt*: Mm 01331624_m1, *mTOR*: Mm 00444968). Alukeparit on suunniteltu siten, että toinen alukkeista sitoutuu kahden eksonin rajalle. Tämän avulla pystytään estämään alukkeiden sitoutuminen mahdollisesti näytteeseen joutuneeseen, intronit sisältävään, genomiseen DNA:han. Reaktioseoksen, jossa alukkeiden ja koettimien lisäksi käytettiin TaqMan[®] Gene Expression Master Mixiä (Applied Biosystems), lopputilavuus oli 25 µl, josta 5 µl veteen laimennettua cDNA:ta. Jokaiselle geenille säädettiin ajoa varten oma standardisuora ja näytelaimennos seuraavasti: *GAPDH*, *ESR1*, *AR*, *mTOR*: näytelaimennos

1:50, standardisuora 0,5 ng; 5 ng; 50 ng; 200 ng, *ESR2*: näytelaimennos 1:10, standardisuora 0,5 ng; 1 ng; 5 ng; 50 ng, *Akt*: näytelaimennos 1:50, standardisuora 0,3 ng; 0,5 ng; 5 ng; 50 ng. Standardisuoraan käytettiin C₂C₁₂-myoblasteja, jotka kerättiin maljoilta käsittelemättöminä aikapisteessä 0 h. Näytteiden lisäksi, jokaisella levyllä oli negatiivinen kontrollinäyte sekä yksi kalibraattorinäyte. Negatiivisessa kontrollinäytteessä cDNA korvattiin vedellä. Ajo suoritettiin qPCR-laitteella (ABI PRISM 7700, Applied Biosystems) seuraavan ohjelman mukaisesti: 2 min + 50 °C, 10 min + 95 °C, 15 sek + 95 °C (50 sykliä), 1 min + 60 °C. Haluttujen geenien ilmentyminen määritettiin suhteellista C_T menetelmää käyttäen (Livak, 1997). Kynnysarvo (*engl.* threshold, C_T) määritettiin manuaalisesti.

3.4 Proteiinitason kokeet

Hormonikäsittelyjen jälkeen solut siirrettiin jäille ja käsittelyliuoksen tilalle vaihdettiin kylmä homogenointipuskuri (20 mM Hepes, pH 7,4, (C₈H₁₈N₂O₄S, Sigma-Aldrich, Seelze, Saksa), 1mM EDTA (etyleenidiaminitetraetaanihappo dinatrium suola dihydraatti, IDRANL®III, Sigma), 5 mM EGTA (etyleeniglykoli-bis-(β-aminoetyylieetteri)N,N,N',N'-tetraetaanihappo, Sigma), 10 mM MgCl₂·6 H₂O (Merck, Whitehouse Station; NJ, USA), 100 mM β-glyserofosfaatti, 1 mM Na₃VO (min 90 % titraus, Sigma), 2 mM DTT (ditiotreitoli, Sigma), 1 % Triton X-100 (polyetyleeniglykoli tert-oktyylifenyylieetteri, Fluka, Buchs, Sveitsi), 40 µg/ml leupeptiini (Fluka), 40 µg/ml aprotiniini (Sigma), 80 µg/ml PMSF (fenyylimetaaniesulfonyylifluoridi, Sigma), 1 µl/100 µl fosfataasi-inhibiittorikoktaili I (Sigma). Kaikki yllämainittujen aineiden kantaliuokset valmistettiin veteen lukuunottamatta PMSF:ia, jonka kantaliuos valmistettiin 2-propanoliiniin. Solut hajoitettiin 20G:n neulalla vetämällä soluliuosta useaan kertaan neulan läpi ruiskuun 15 minuutin aikana. Hajoituksen jälkeen solususpensio sentrifugoitiin (12 000 g, 10 minuuttia, + 4 °C), supernatantin talteen saamiseksi. Kokonaisproteiinimäärän selvittämiseksi supernatanttien proteiinikonsentraatiot määritettiin kaupallisella kolorimetriaan perustuvalla BCA Protein Assay Kitillä (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL) valmistajan ohjeen mukaan. Väriin muodostuminen mitattiin spektrofotometrisellä levylukijalla (iEMS Reader MF, Labsystems Oy, Helsinki, Suomi), aallonpituudella 565 nm. Mittaustulosten perusteella saatiin määritettyä oikea näytemäärä Western immunoblottausta varten.

Proteiininäytteet (n. 35 µg proteiinia/näyte) valmistettiin SDS-PAGE-ajoa (Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, Laemmli 1970) varten näytepuskuriin (6x näytepuskuri: 30 % glyseroli, 15 % β-merkaptoetanol, 18,8 % 1 nM Tris, pH 6,8, 20 % SDS, 0,06 mg/ml bromofenolisininen). Näytteet keitettiin (5 min, + 95 °C), jonka jälkeen näytteet siirrettiin jäälle. Proteiinien erotteluun (BioRad Criterion, Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA) käytettiin 4-15 % kaupallisia gradienttigelijä (Criterion Tris-HCl gel, Bio-Rad Laboratories Inc.). Proteiininäytteiden koon määrittämisessä käytettiin molekyylipainostandardia [Protein ladder (10–250 kDa), New England Biolabs Inc., Ipswich, MA]. Geeljä ajettiin ensin 100 voltin jännitteellä noin 10 minuuttia, jonka jälkeen jännite nostettiin 200 volttiin noin 45 minuutin ajaksi. Ajopuskurina käytettiin yksinkertaista Tris-glysiini-SDS-puskuriliuosta. Erotellut proteiinit siirrettiin ajon jälkeen Bio Radin Criterion blottauslaitteella sähkövirtaa käyttäen (400 mA, 90 min) nitroselluloosakalvolle (Amersham™Hybond™-ECL, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, England).

Proteiinien siirtyminen kalvolle varmistettiin värjäämällä kalvo Ponceau S-liuoksella (0,2 % Ponceau S, 5 % CH₃COOH). Värjätystä kalvosta tarkastettiin silmämääräisesti näytteiden latauksen tasaisuus, jonka jälkeen väri huuhdeltiin pois vedellä. Proteiinien siirtyminen varmistettiin värjäämällä geelit Coomassie Blue-värjäyksellä (huoneenlämmössä, 1 h, keinutuksessa). Värjäyksessä käytettiin Coomassie blue-väriä (0,25 % Coomassie Brilliant blue R-250, 50 % metanoli, 10 % CH₃COOH). Värjäyksen jälkeen geelit siirrettiin värinpoistoliuokseen (5 % metanoli, 7,5 % CH₃COOH, + 4 °C, yön yli). Värinpoiston jälkeen tarkastettiin oliko geelille jäänyt siirtymättömiä proteiineja.

Ponceau S-värjäyksen jälkeen kalvot blokattiin, epäspesifisen värjäytymisen estämiseksi (5 % maito-TBS 0,05 % Tween-20, huoneenlämmössä, 1 h). Tämän jälkeen kalvot immunovärjättiin kaupallisella totaali-Akt primaarivasta-aineella (1:1000, Anti-total-Akt # 9272, Cell Signalling Technology®, Denvers, MA), fosfo-Akt (Ser⁴⁷³) primaarivasta-aineella (1:1000, Anti-phospho-Akt # 9271, Cell Signalling Technology®) tai fosfo-mTOR (Ser²⁴⁴⁸) primaarivasta-aineella (1:1000, Anti-phospho-mTOR # 2971, Cell Signalling Technology®) keinutuksessa, + 4 °C:ssa yön yli. Kaikki vasta-aineet laimennettiin 5 % maito-TBS 0,05 % Tween-20-liuokseen. Värjäyksen jälkeen ylimääräinen vasta-aine pestiin pois TBS 0,05 % Tween -20 liuoksella (3 x 10 min/pesu), jonka jälkeen kalvot siirrettiin sekundaarivasta-

aineliuokseen (1:30 000, Anti-rabbit A9169, Sigma, 1 h, huoneenlämmössä). Sekundaarivastaineinkuboinnin jälkeen kalvot pestiin TBS 0,05 % Tween -20 liuoksella (3 x 10 min/pesu).

Proteiinivyöhykkeet detektoitiin kaupallisella kemiluminesenssikitillä valmistajan ohjeen mukaan (Amersham™ ECL Advance™ Westernblotting Detection Kit, GE Healthcare), jonka jälkeen kalvot kuvattiin röntgenfilmille (Curix 60, Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgia) sekä kuvannettiin densitometrillä (Gel Doc™ XR and ChemiDoc™ XRS, Bio-Rad Laboratories Inc.). Vyöhykkeiden pinta-alaan ja intensiteettiin suhteutetut proteiinitasot määritettiin kuvantamislaitteen ohjelmiston avulla, Contour tool-työkalua apuna käyttäen (Quantity One® 4.6.3, Bio-Rad Laboratories Inc.).

3.5 Tilastolliset analyysit

Tilastoanalyysiin käytettiin SPSS-ohjelmaa (versio 15.0, SPSS, Chicago, IL). Sekä proteiinitason kokeista että RNA-tason kokeista saadut tulokset testattiin toistomittausten varianssianalyysillä (Repeated Measures Analysis of Variance). Riippuvaksi muuttujaksi määritettiin geenitason kokeissa geenien ilmenemisen määrä ja proteiinitason kokeissa fosforyloituneen proteiinin määrä. Within-Subject-muuttujaksi valittiin aika (yhden aikapisteen sisällä tapahtuvat muutokset) ja Between-Subject-muuttujaksi pitoisuus (kokeissa käytetyt hormonipitoisuudet, K, 1 nM, 10 nM). Mikäli varianssianalyysi osoitti muuttujien välillä olevan merkitsevää eroa, käytettiin eroavien ryhmien selvittämiseen Post Hoc-testinä Bonferroni-menetelmää. Tilastollisesti merkitsevän tuloksen raja-arvoksi asetettiin $p \leq 0.05$.

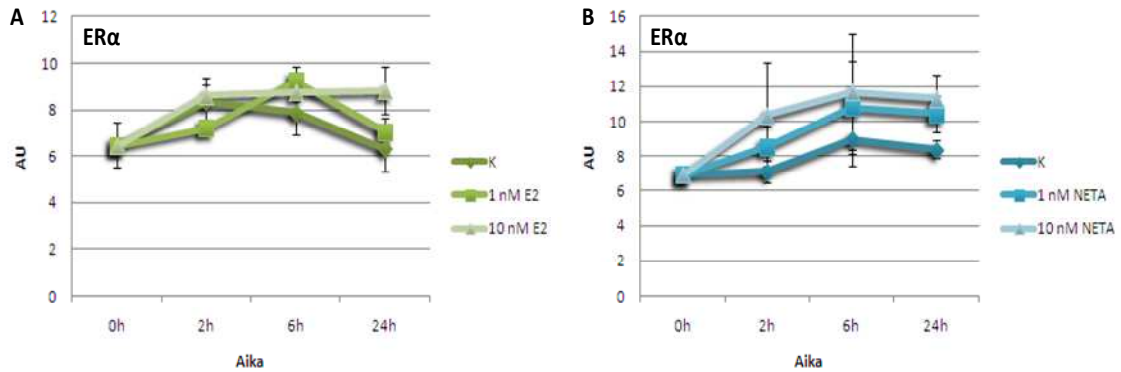
4. Tulokset

4.1 Geenien ilmeneminen

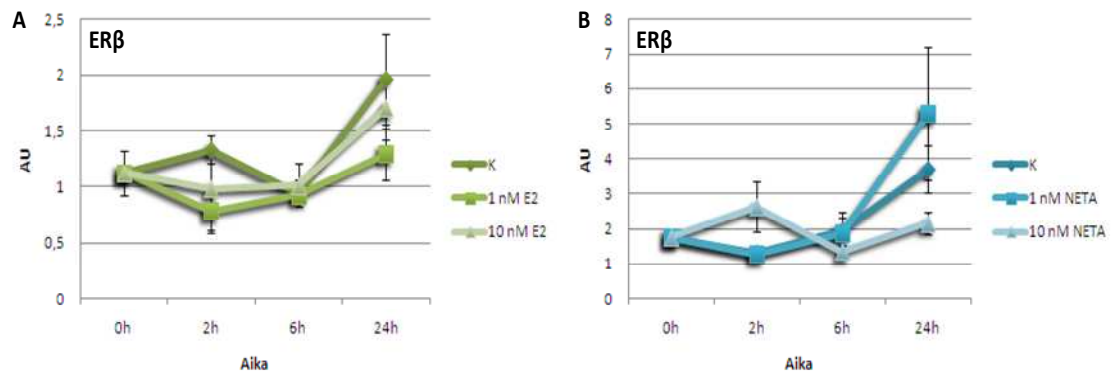
E₂:n ja mahdollisesti progestogeenien signalointireiteille osallistuvien *ERα*:n, *ERβ*:n, *AR*:n, *Akt*:n ja *mTOR*:n lähetti-RNA tasoja tutkittiin hiiren C₂C₁₂-myotuubeissa qPCR:n avulla. Myotuubeja oli käsitelty joko E₂:lla tai NETA:lla. Yleisesti ottaen lähetti-RNA tasoissa ei ilmennyt tilastollisesti merkitseviä eroja eri hormonipitoisuuksien välillä, riippumatta siitä kummalla hormonilla solut oli käsitelty. Eri pitoisuuksien tilastollisessa vertailussa myös tilastollinen voima (*engl.* observed power) jäi heikoksi (< 0,8). Aineistoa tarkasteltiin myös siten, että 0h aikapiste asetettiin ykköseksi, mutta tämä asetelma ei muuttanut tulosta (tulokset eivät näkyvissä).

E₂ ja NETA käsiteltyjen solujen tulokset eri proteiineja koodaaville geeneille, *ERα*, *ERβ*, *AR*, *Akt* ja *mTOR*, on esitetty kuvissa 5-9.

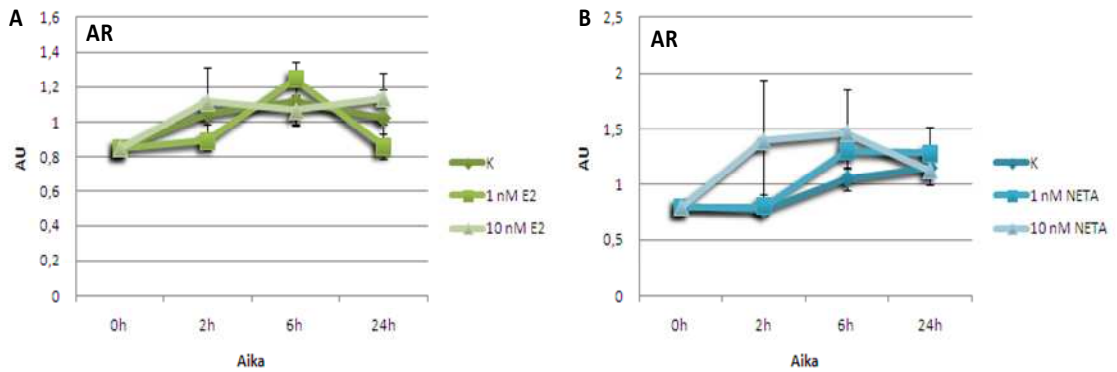
Kuvista voidaan todeta, että lähes kaikkien geenien kohdalla 1 nM ja 10 nM NETA näyttää lisäävän geenien ilmentymistä hormonikäsittelyajan pidentyessä. On kuitenkin tärkeää havaita, että myös kontrollisolut käyttäytyvät pääsääntöisesti ajan suhteen hormonikäsittelyitä vastaavalla tavalla. Näin ollen, koska jokaiselle aikapisteelle käytetään kyseisen aikapisteen omaa kontrollia, tilastollinen testaus ei tuota merkitseviä eroja.



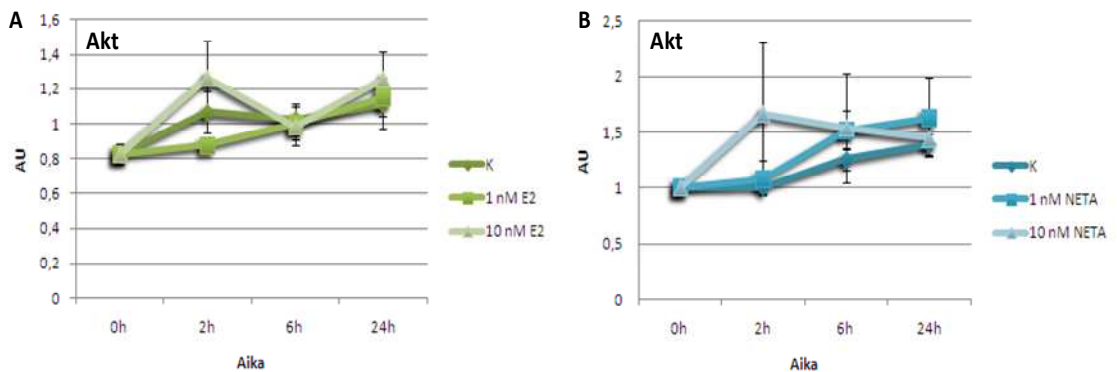
Kuva 5. E₂:n ja NETA:n vaikutus ER α :aa koodaavan geenin ilmentymiseen C₂C₁₂- myotuubeissa. Solut käsiteltiin (A) E₂:lla tai (B) NETA:lla (1 nM/10 nM), neljässä aikapisteessä, joissa jokaisella oli oma kontrollinäyte (kuvattu materiaaleissa ja menetelmissä). Viivat kuvaavat vähintään kolmen määrittelyn keskiarvona saatua ER α -geenin ilmentymistä yksiköttömällä arvoasteikolla (*engl.* arbitrary unit, AU) ajan suhteen. Virhepylväät kuvaavat keskivirhettä. 0h= täysin käsittelemätön solunäyte. Tilastollisesti merkitseviä eroja ei havaittu.



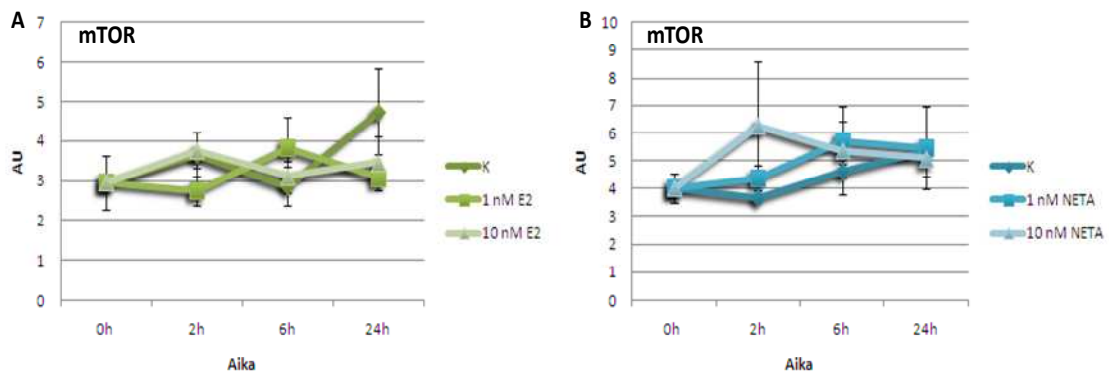
Kuva 6. E₂:n ja NETA:n vaikutus ER β :aa koodaavan geenin ilmentymiseen C₂C₁₂- myotuubeissa. Solut käsiteltiin (A) E₂:lla tai (B) NETA:lla (Kontrolli (1 nM/10 nM), neljässä aikapisteessä, joissa jokaisella oli oma kontrollinäyte (kuvattu materiaaleissa ja menetelmissä). Viivat kuvaavat vähintään kolmen määrittelyn keskiarvona saatua ER β -geenin ilmentymistä yksiköttömällä arvoasteikolla (*engl.* arbitrary unit, AU) ajan suhteen. Virhepylväät kuvaavat keskivirhettä. 0h=täysin käsittelemätön solunäyte. Ei tilastollisesti merkitseviä eroja.



Kuva 7. E₂:n ja NETA:n vaikutus AR:ia koodaavan geenin ilmentymiseen C₂C₁₂-myotuubeissa. Solut käsiteltiin (A) E₂:lla tai (B) NETA:lla (1 nM/10 nM), neljässä aikapisteessä, joissa jokaisella oli oma kontrollinäyte (kuvattu materiaaleissa ja menetelmissä). Viivat kuvaavat vähintään kolmen määrittelyn keskiarvona saatua AR-geenin ilmentymistä yksiköttömällä arvoasteikolla (*engl.* arbitrary unit, AU) ajan suhteen. Virhepylväät kuvaavat keskivirhettä. Oh=täysin käsittelemätön solunäyte. Ei tilastollisesti merkitseviä eroja.



Kuva 8. E₂:n ja NETA:n vaikutus Akt:ta koodaavan geenin ilmentymiseen C₂C₁₂-myotuubeissa. Solut käsiteltiin (A) E₂:lla tai (B) NETA:lla (1 nM/10 nM), neljässä aikapisteessä, joissa jokaisella oli oma kontrollinäyte (kuvattu materiaaleissa ja menetelmissä). Viivat kuvaavat vähintään kolmen määrittelyn keskiarvona saatua Akt-geenin ilmentymistä yksiköttömällä arvoasteikolla (*engl.* arbitrary unit, AU) ajan suhteen. Virhepylväät kuvaavat keskivirhettä. Oh=täysin käsittelemätön solunäyte. Kontrollisolut käyttäytyivät yhtenevästi hormonikäsiteltyjen solujen kanssa, joten tilastollisesti merkitseviä eroja ei havaittu.



Kuva 9. E₂:n ja NETA:n vaikutus mTOR:ia koodaavan geenin ilmentymiseen C₂C₁₂-myotuubeissa. Solut käsiteltiin (A) E₂:lla tai (B) NETA:lla (1 nM/10 nM), neljässä aikapisteessä, joissa jokaisella oli oma kontrollinäyte (kuvattu materiaaleissa ja menetelmissä). Viivat kuvaavat vähintään kolmen määrittelyn keskiarvona saatua *mTOR*-geenin ilmentymistä yksiköttömällä arvoasteikolla (*engl.* arbitrary unit, AU) ajan suhteen. Virhepylväät kuvaavat keskivirhettä. 0h= täysin käsittelemätön solunäyte. Tilastollisesti merkitseviä eroja ei havaittu.

4.2 Proteiinitason kokeet

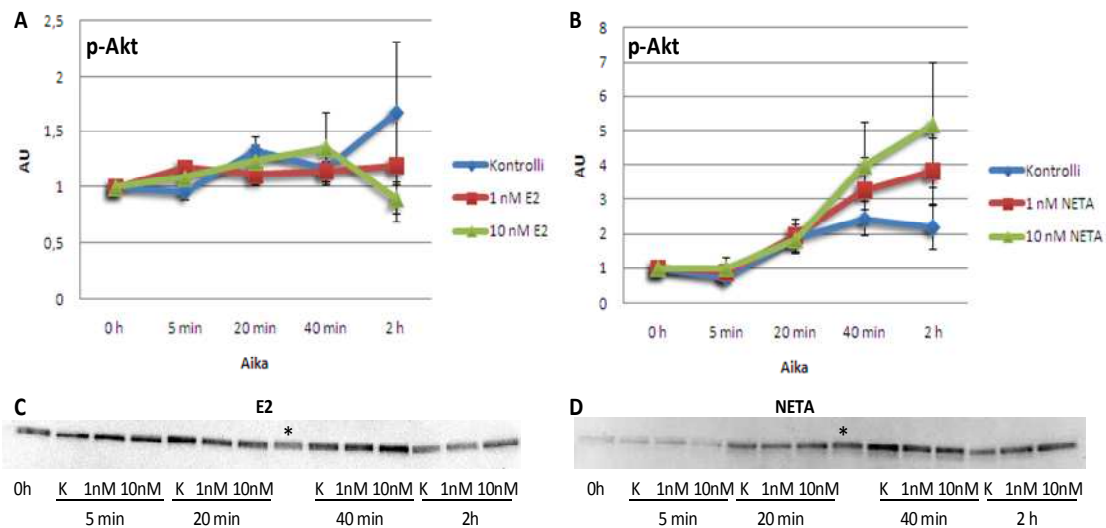
Proteiinitason kokeissa selvitettiin E₂:n ja NETA:n vaikutuksia hypertrofisella PI3K/Akt-signaalointireitillä esiintyvien Akt- ja mTOR-proteiinin aktivoitumiseen C₂C₁₂-myotuubeissa. Jokaisesta näytteestä määritettiin totaali-Akt ja Akt:n fosforyloitunut muoto sekä mTOR:n fosforyloitunut muoto. Yleisesti ottaen eri hormonipitoisuuksien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa ja samoin kuin lähetti-RNA-määrittelyissä tilastollinen voima jäi eri pitoisuuksia vertailtaessa heikoksi (<0,8).

Fosfo-Akt ilmentyi selkeästi kummankin hormonikäsittelyn seurauksena. Totaali-Akt detektoitui hyvin kaikissa näytteissä ja määrä oli odotetusti erittäin tasainen eri näytteiden välillä (tulokset ei näkyvissä). Kuvassa 10 C on esitetty fosfo-Akt-määrittelyn Western blot kuva E₂-käsitellyistä myotuubinäytteistä kontrolleineen ja kuvassa 10A vastaava tulos graafisena kuvana ajan suhteen. Western blot kuvien silmämääräisestä tarkastelusta heränneet epäilyt kontrollinäytteiden yhdenmukaisesta fosforylaatiosta hormonikäsittelyjen solunäytteiden kanssa vahvistuivat tuloksia analysoitaessa, kuten kuvasta 10C ja 10D nähdään.

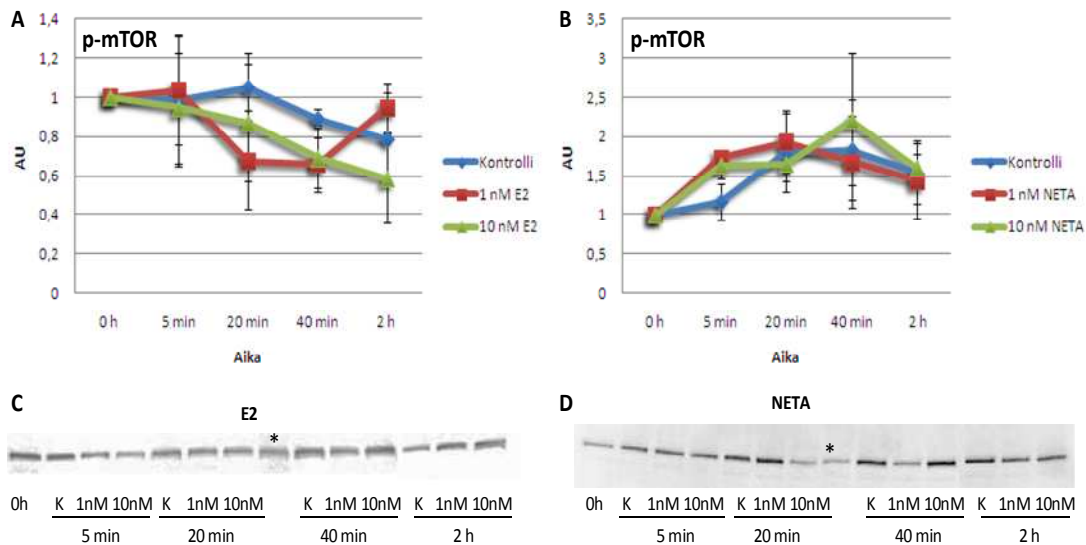
NETA käsittelyiden osalta Akt:n fosforyloitumista tarkasteltaessa voidaan todeta, että 10 nM NETA:lla on mahdollisesti positiivinen vaikutus Akt:n aktivoitumiseen (kuva 10B) aikapisteessä 40 min, joka edelleen vahvistuu 2 h:n aikapisteeseen. Erot eri aikapisteissä,

suhteessa vastaavien aikapisteiden kontrollisoluihin eivät kuitenkaan nousseet tilastollisesti merkitseväksi.

Myöskään fosfo-mTOR:n kohdalla ei havaittu tilastollisesti merkittäviä eroja kummankaan käsittelyn näytteissä (kuva 11) ja kontrollinäytteiden fosforylaatio on hyvin yhdenmukainen hormonikäsiteltyjen näytteiden kanssa.



Kuva 10. Akt:n fosforylaatio C_2C_{12} myotuubeissa. Solut käsiteltiin (A, C) E_2 :lla tai (B, D) NETA:lla (1nM/10nM), viidessä aikapisteessä, joissa jokaisessa oli oma kontrollinäyte, kuvattu materiaaleissa ja menetelmissä. Viivat kuvaavat vähintään kolmen käsittelyn keskiarvona saatua p-Akt:n määrää yksiköttömällä asteikolla (*engl.* arbitrary unit, AU) ajan suhteen. Virhepylväät kuvaavat keskivirhettä. Akt:n fosforylaatio määritettiin Western blottausta apuna käyttäen. (A, C) E_2 -käsittelyissä Akt:n fosforylaatio eri hormonipitoisuuksilla eri aikapisteissä oli tasaista eikä tilastollisesti merkitseviä eroja havaittu. (B, D) NETA-käsittelyissä Akt:n fosforylaation määrä kasvoi ajan suhteen, mutta tilastolliset analyysit eivät kuitenkaan tuottaneet merkitseviä eroja. Jokaisella Western blotilla oli yksi sama näyte eri käsittelyjen vertailun mahdollistamiseksi (*).



Kuva 11. mTOR:n fosforylaatio C_2C_{12} myotubeissa. Solut käsiteltiin (A, C) E_2 :lla tai (B, D) NETA:lla (1nM/10nM), viidessä aikapisteessä, joissa jokaisessa oli oma kontrollinäyte, kuvattu materiaaleissa ja menetelmissä. Viivat kuvaavat vähintään kolmen käsittelyn keskiarvona saatua p-mTOR:n määrää yksiköttömällä arvoasteikolla (*engl.* arbitrary unit, AU) ajan suhteen. Virhepylväät kuvaavat keskivirhettä. P-mTOR määritettiin Western blottaus-menetelmällä (C, D). Tilastollisesti merkitseviä eroja ei havaittu kummankaan käsittelyn kohdalla. Jokaisella Western blotilla oli yksi sama näyte eri käsittelyjen vertailun mahdollistamiseksi (*).

5. Tulosten tarkastelu

Tässä tutkimuksessa selvitettiin yhdistelmä-HRT:ssa tyypillisesti käytettävien, vaikuttavien ainesosien, E_2 :n ja NETA:n vaikutuksia PI3K/Akt-signalointireitin aktivoitumiseen soluviljelyolosuhteissa. Reitin aktiivisuutta hormonikäsittelyiden jälkeen tutkittiin tarkastelemalla reitillä esiintyvien geenien, *ER α* , *ER β* , *AR*, *Akt* ja *mTOR*, ilmenemistä lähettitasolla sekä Akt- ja mTOR-proteiinien fosforylaatiota hiiren C₂C₁₂-myotuubeissa. Tulosten mukaan hormonikorvaushoidon eri komponenteilla ei näyttäisi olevan merkitsevää vaikutusta lihaksen hypertrofiareitille kuuluvien proteiinien, Akt:n ja mTOR:n, aktivoitumiseen eikä tutkittujen geenien ilmenemiseen, suhteessa kontrollisoluihin. NETA näyttäisi vaikuttavan positiivisesti Akt:n aktiivisen muodon määrään, mutta ero suhteessa kontrolliin ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevää.

Vaihdevuosi-ikäisillä naisilla lihasten suorituskyvyn ja massan on havaittu heikkenevän merkittävästi (Samson ym., 2000). Viitteitä seerumin estradiolitasojen sekä lihasmassan ja (Taaffe ym., 2005, Iannuzzi-Sucich ym., 2002) –voiman (Taaffe ym., 2005, Sipilä ym., 2001) välisestä yhteydestä on saatu tutkimuksista, joissa on selvitetty vaihdevuosisoireisiin käytettävän hormonikorvaushoidon vaikutuksia lihasten ominaisuuksiin. Näiden tutkimusten mukaan E_2 :ia ja NETA:a sisältävä HRT parantaa vaihdevuosi-ikäisten naisten lihasten suorituskykyä, massaa ja koostumusta verrattuna lumelääkkeeseen (Taaffe ym., 2005, Sipilä ym., 2001). Hormonitasojen laskusta johtuvista muutoksista ja toisaalta HRT:n vaikutusmekanismeista molekyyllitasolla ei kuitenkaan vielä toistaiseksi ole tarkkaa käsitystä, vaikka viimeaikaiset tutkimukset jotakin viitteitä aiheesta antavatkin (Pöllänen ym., 2007, Vasconsuelo ym., 2008).

PI3K/Akt-signalointireitin tiedetään olevan yksi merkittävimmistä lihaksen kasvun säätelyyn vaikuttavista reiteistä lihassoluissa (Rommel ym., 2001). Akt:n ja mTOR:n kautta kulkevan reitin on havaittu olevan osallisena lihaksen kasvuun ja toisaalta heikentymiseen, niin ihmisen lihaksessa (Leger ym., 2006) kuin hiiren C₂C₁₂-myotuubeissakin (Lee, 2009). Reitin on osoitettu aktivoituvan muun muassa IGF-1:n (Rommel ym., 2001, Lee, 2009) ja fyysisen harjoittelun (Leger ym., 2006) vaikutuksesta, joten on mahdollista, että hypertrofiset signalointireitit ovat osallisena myös HRT:n vaikutusten välittämisessä.

5.1 E₂:n ja NETA:n vaikutus PI3K/Akt-reitillä esiintyvien geenien ilmenemiseen

Lähettiläsoilla haluttiin selvittää käytettyjen hormonien vaikutuksia sekä *ERα*:n että *ERβ*:n ja lisäksi myös *AR*:den ilmentymiseen. Lisäksi selvitettiin onko E₂:lla tai NETA:lla vaikutusta Akt:ta ja mTOR:ia koodaavien geenien ilmenemiseen.

Tulosten mukaan E₂:lla tai NETA:lla ei näyttäisi olevan vaikutusta *ER*:den eikä *AR*:n määrään lähetti-RNA-tasolla. Vaikutuksia *Akt*:n tai *mTOR*:n ilmenemiseen ei myöskään havaittu. Vastaavanlaisia tuloksia on saatu tutkittaessa *ER*:den lähetti-RNA-tasojen määrän vaihtelua vasteena estrogeeniin koe-eläimillä (Barros ym., 2006). Barros ym. osoittivat hiirimallia apuna käyttäen, että estrogeeni itse ei määritä reseptoreidensa ilmentymistä (Barros ym., 2006). Ihmisillä tehdyssä tutkimuksessa Pöllänen ym. (2007) eivät myöskään havainneet estrogeenia (E₂) ja progestiinia (NETA) sisältävän HRT:n vaikuttavan mm. *ERα*:n ja *ERβ*:n lähetti-RNA-tasoihin vaihdevuosi-ikäisten naisten lihaksessa (Pöllänen ym., 2007). *AR*:den lähetti-RNA tasot olivat kuitenkin HRT:a käyttävillä korkeammat verrattuna ei-käyttäjiin. He esittivätkin, että NETA voi vaikuttaa lihaksessa heikon androgeenin tavoin ja näin ollen mahdollisesti vaikuttaa *AR* ilmentymiseen. Tarkkaa tietoa siitä, vaikuttaako *AR* ilmentymiseen ihmisen lihassoluissa E₂ vai NETA, ei kuitenkaan ole (Pöllänen ym., 2007). Tässä tutkimuksessa pyrimme selvittämään E₂:n ja NETA:n erillisvaikutuksia, mutta kummankaan hormonin kohdalla ei saatu tilastollisesti merkitseviä eroja suhteessa kontrollisoluihin. On mahdollista, että *AR*:n ilmentymiseen vaaditaan sekä E₂:n että NETA:n yhteisvaikutus. Toisaalta tulosten vertailussa täytyy kuitenkin huomioida se, että Pöllänen ym. (2007) tulokset ovat vuoden kestäneen intervention lopputuloksia (Pöllänen ym., 2007). Vastaavaa tilaa ei voida saavuttaa yksinkertaisessa soluviljelymallissa.

Hormonien vaikutus *ER*:den lähettitasoihin tämän tutkimusongelman kokonaistarkastelun kannalta on mielenkiintoinen myös siitä syystä, että se voi mahdollisesti antaa viitteitä E₂ ja toisaalta NETA:n signalointimekanismeista. Ainakin E₂:n tiedetään vaikuttavan soluissa useiden eri signalointireittien kautta (kuva 3). Näistä mekanismeista kaikki eivät ole klassisen signalointimekanismin tavoin suoraan *ER*:hin vaikuttavia vaan E₂ voi vaikuttaa myös mm. ei-genomisten ja ligandista riippumattomien vaikutusmekanismien kautta, joita on tarkasteltu lähemmin kappaleessa 5.2 (Bjornstrom ja Sjoberg, 2005, Deroo ja Korach, 2006, Bjornstrom ja Sjoberg, 2002).

5.2 E₂:n ja NETA:n vaikutus Akt:n ja mTOR:n aktivoitumiseen

Saatujen tulosten mukaan E₂ tai NETA ei näyttäisi vaikuttavan Akt:n eikä mTOR:n aktivoitumiseen hiiren myotuubeissa. NETA-käsittelyitä tarkasteltaessa voidaan todeta, että NETA:lla on mahdollisesti positiivinen vaikutus Akt:n aktivoitumiseen (kuva 10), vaikka ero käsiteltyjen ja kontrollisolujen välillä ei noussutkaan tilastollisesti merkitseväksi. Tulos on mielenkiintoinen, koska E₂:ia pidetään yhdistelmä-HRT:n merkittävämpänä komponenttina ja monesti saatetaan unohtaa, etteivät kaikki vaikutukset välttämättä johdu yksin E₂:sta. Progestogeenien vaikutuksista lihaksiin ei kuitenkaan toistaiseksi juuri ole tietoa.

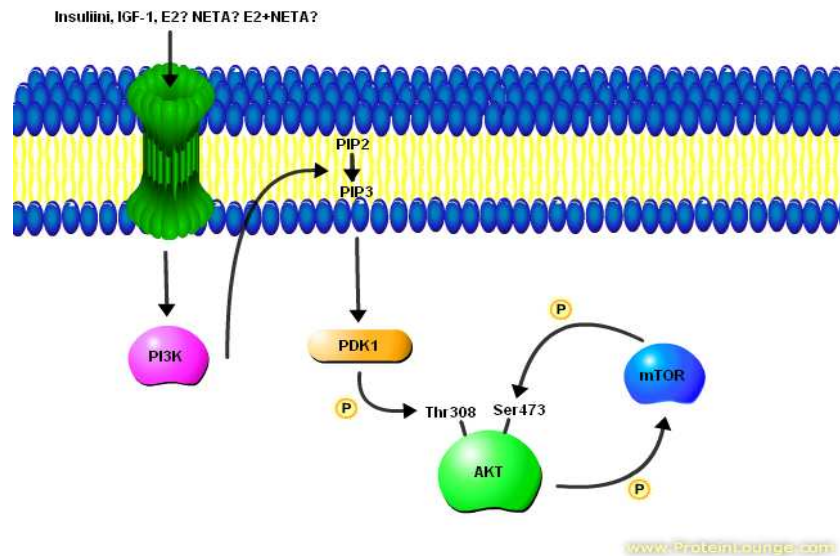
Oletus PI3K/Akt-reitin ja etenkin Akt:n aktivoitumisen lisääntymisestä C₂C₁₂-solulinjassa, erityisesti E₂-käsittelyiden seurauksena, perustettiin aiemmin julkaistuun tutkimukseen (Vasconsuelo ym., 2008). On kuitenkin huomioitava, että Vasconsuelo ym. (2008) ovat käyttäneet kokeissaan erilaistumattomia C₂C₁₂-myoblasteja, jotka poikkeavat merkittävästi tässä tutkimuksessa on käytetyistä erilaistuneista myotuubeista (Vasconsuelo ym., 2008). Tutkimuksessamme myotuubien valinta myoblastien sijaan perustui myotuubien ”kehitysasteeseen”. Lihassyyn kehittyminen alkaa myoblastien yhdistymisestä monitumaisiksi myotuubeiksi, jolloin solujen muoto, toiminnot ja geenien ilmentyminen muuttuvat merkittävästi samalla kun tumien määrä kasvaa yhdestä useisiin kymmeniin. Myotuubien ominaisuuksia voidaan siis pitää jossain määrin yhdenmukaisempina kypsien, monitumaisten lihassolujen ominaisuuksien kanssa verrattuna erilaistumattomiin myoblasteihin. Vasconsuelon ym. (2008) koeasetelman toistamiseksi hormonikäsittelyt suoritettiin kuitenkin, fosfo-Akt:n osalta, myös erilaistumattomille myoblasteille (tuloksia ei esitetty), mutta myotuubikokeisiin nähden myoblasteilla tehdyt tutkimukset eivät tuoneet lopputuloksen kannalta uutta tietoa.

Aikaisempia tutkimustuloksia estrogeenin tai progesteronin vaikutuksista mTOR:n aktiivisuuden myotuubeissa ei tiettävästi ole. Jaffer ym. (2009) ovat raportoineet E₂:n lisäävän mTOR:n aktiivisuutta rotan kohdun myosyyteissä (Jaffer ym., 2009), kun taas Sobolewska ym. (2009) totesivat sekä E₂:n että progesteronin estävän mTOR:n fosforylaatiota naudan nisien epiteelisoluissa (Sobolewska ym., 2009), mikä on yhdenmukaista tämän tutkimuksen tulosten kanssa.

Tulosten mukaan sekä aktiivisen fosfo-Akt:n että fosfo-mTOR:n määrä kontrollisoluissa oli hyvin samalla tasolla verrattuna hormonikäsiteltyihin solunäytteisiin. Fosfo-Akt:n voimakas ilmentyminen käsittelemättömissä kontrollinäytteissä oli yllättävää. Tämä havainto voi mahdollisesti selittyä osaltaan myotuubien erilaistumisprosessiin liittyvällä Akt:n aktivaation merkittävällä kasvulla. Alisi ym. (2008) ovat selvittäneet C₂C₁₂-myoblastien erilaistumisprosessiin liittyvien proteiinien, kuten Akt:n, aktivoitumista. Kyseisessä tutkimuksessa havaittiin, että Akt:n aktivaatio kasvoi merkitsevästi myoblastien erilaistumisprosessin ensimmäisen ja viidennen vuorokauden välillä, kun soluja pidettiin erilaistumisliuoksessa, (Alisi ym., 2008). Myös Bodine ym. (2001) ovat raportoineet Akt:n aktiivisuuden lisääntyvän erityisesti erilaistumisprosessin alku- ja loppuvaiheessa (Bodine ym., 2001). Näiden tutkimustulosten perusteella voidaan olettaa, että solujen Akt:n perusaktivaatiotaso on kokeiden aikaan ollut korkea. Tästä seurauksena hormonikäsitteilyistä johtuvat mahdolliset Akt:n fosforylaatioon johtavat vaikutukset ovat ainakin osaltaan peittyneet solujen elinkaaren tiettyyn ajanjaksoon liittyvään luontaisen Akt:n aktivaatiotason nousun alle. On mahdollista, että myös mTOR:n perusaktivaatiotaso on kokeiden aikana ollut korkea, jolloin hormonikäsitteilyistä johtuvaa mTOR:n aktivoitumista ei pystytty havaitsemaan. Mielenkiintoinen jatkotutkimuksen kohde voisikin olla käsitellä soluja PI3K/Akt-reitin estäjillä, kuten LY294002:lla (Vlahos ym., 1994) ja Wortmannilla (Mizutani ym., 2002) yhdistettynä E₂- ja NETA-käsitteilyihin, jolloin esiin voisivat nousta tutkittavien hormonien mahdolliset vaikutukset Akt:n ja mTOR:n aktivaatioon.

Toisena varteenotettavana jatkotutkimuksen kohteena voi pitää E₂:n ja NETA:n vaikutuksien selvittämistä Akt:n toisen fosforyloituvan kohdan, Thr³⁰⁸:n, fosforylaatioon. Tässä tutkimuksessa selvitettiin Ser⁴⁷³-kohdan aktivoitumista, mutta Akt:n tiedetään fosforyloituvan kahdesta eri kohdasta (Thr³⁰⁸ ja Ser⁴⁷³) ja nykytietämyksen mukaan täydellinen Akt:n aktivaatio vaatii molempien kohtien aktivoitumisen (Alessi ym., 1996, Alessi ym., 1997). Thr³⁰⁸ ja Ser⁴⁷³ fosforyloituvat eri kinaasien toimesta (Sarbasov ym., 2005, Alessi ym., 1997), joten on mahdollista, että myös kokeissa käytetyt hormonit vaikuttaisivat eri kohtien fosforylaatioon eri tavalla. Alessi ym. (1996, 1997), osoittivat aktiivisen PI3K:n fosforyloivan PIP₂:n, jolloin syntyy PIP₃:n, joka edelleen aktivoi PDK1:n. PDK1 taas aktivoi osittain Akt:n lisäämällä fosfaatin 308. treoniiniin (Alessi ym., 1996, Alessi ym., 1997). Viime

vuosina julkaistut tutkimukset osoittavat mTOR-riCTOR-kompleksin puolestaan fosforyloivan Akt:n Ser⁴⁷³-kohdan (Sarbasov ym., 2005). E₂:n ja NETA:n vaikutuksen tarkempi selvittäminen Akt:n aktiivisuuteen vaatisi myös Thr³⁰⁸:n fosforylaatiotasojen määrittämisen. Kuvassa 12 on esitetty Akt:n aktivaatioon johtavia reittejä.



Kuva 12. Akt:n aktivaatioon johtavia reittejä. PI3K:n aktivaatio saa aikaan PIP₂ fosforyloitumisen PIP₃:ksi, joka edelleen aktivoi PDK1:n. PDK1 fosforyloi Akt:n Thr³⁰⁸:n, näin osittain aktivoiden Akt:n. Todennäköistä on, että täydellinen Akt:n aktivaatio vaatii myös Ser⁴⁷³ kohdan fosforyloitumisen. Viimeisimpien tutkimusten mukaan ainakin mTOR-riCTOR-kompleksin oletetaan aktivoivan Akt:ta lisäämällä fosfaatin 473. seriiniin (Sarbasov ym., 2005). Kuva on tehty Pathway Builder-ohjelmalla (Protein Lounge^{BETA}, www.proteinlounge.com).

Toisaalta voi myös olla, että E₂ samoin kun NETA vaikuttavat lihakseen jonkun muun kuin PI3K/Akt-reitin kautta. On havaittu, että ainakin E₂:lla on solukalvolla tapahtuvia, hyvin nopeita ei-genomisia vaikutuksia, joiden vaikutukset tulevat esiin minuutteja, jopa sekunteja, hormonikäsittelyn jälkeen (Deroo ja Korach, 2006). Endoteelisoluissa E₂:n on havaittu saavan aikaan endoteelisen typpioksidisyntaasin (eNOS) nopean aktivoitumisen MAPK:n (Chen ym., 1999) ja PI3K:n välityksellä (Haynes ym., 2000). Aktiivinen eNOS saa aikaan typpioksidin vapautumisen, joka puolestaan edistää verisuonien laajentumista ja tätä kautta vaikuttaa myös lihasten metaboliseen säätelyyn. Endoteelisiä toimintahäiriöitä alkaa esiintyä asteittain vaihdevuosien jälkeen ja näihin toimintahäiriöihin liittyy mm. eNOS:n aktiivisuuden lasku ja edelleen typpioksiditasojen madaltuminen soluissa (Majmudar ym., 2000, Kublickiene ym.,

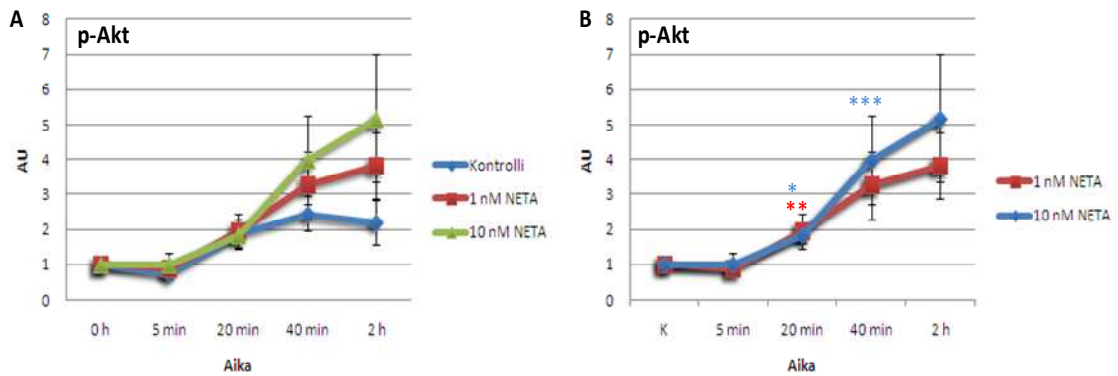
2005). Myös progesteronilla on osoitettu olevan vaikutusta endoteelisen toiminnan ylläpitoon ja lisäksi sen on havaittu stimuloivan typpioksidisynteesiä sekä tukevan E_2 :n vaikutuksia eNOS:n aktivoimiseen johtavilla nopeilla reiteillä (Fu ym., 2008, Simoncini ym., 2004). eNOS:lla tiedetään olevan merkittävä vaikutus myös luustolihasen metabolisessa säätelyssä, erityisesti fyysisen harjoituksen aikana. Jo pieni eNOS määrän väheneminen aiheuttaa metabolisen säätelyn häiriöitä lihassoluissa, vaikuttaa veren sokeripitoisuuden laskuun sekä heikentää suorituskykyä fyysisessä kuormituksessa (Lee-Young ym., 2010). Lee-Young ym. (2010) esittivät eNOS:n säätelämän typpioksidipitoisuuden vaikuttavan myös 5'-adenosiinimionofosfaatti-aktivoituneen proteiinkininaasin (AMPK) aktiivisuuteen. Aktiivinen AMPK toimii proteiinisynteesin säätelyssä estämällä mTOR:n aktiivisuutta ja edelleen proteiinisynteesiä. mTOR:n lisäksi aktiivisen AMPK:n on esitetty inhiboivan myös Akt:ta (Bolster ym., 2002). Toisaalta mTOR:n tiedetään aktivoivan Akt:ta, joten jo mTOR:n inaktivointi itsessään voi aiheuttaa, ainakin osittain, Akt:n inaktivoitumisen. AMPK:n aktivoituminen 5-aminoimidazole-4-karboksiamidi-1- β -D-ribonukleosidin (AICAR) vaikutuksesta on todettu estävän mTOR:n kautta kulkevaa, proteiinisynteesiin johtavaa, reittiä sekä MAPK signaaloinnin aktivoitumista myös C_2C_{12} -myotuubeissa (Williamson ym., 2006). AICAR:n lisäksi myös E_2 :n tiedetään vaikuttavan MAPK toimintaan C_2C_{12} -soluissa (Ronda ym., 2007).

5.3 Soluviljelyssä käytetyn kontrollimallin valinnan merkitys

Soluviljelyssä käytetyn kontrollimallin valinnan merkitys korostui tässä koejärjestelyssä. Tilastanalyysia varten testattiin kahta vaihtoehtoista mallia (tulokset eivät näkyvissä). Saatujen tulosten mukaan voidaan todeta, että tällaisissa tutkimuksissa, joissa käytetään esim. myogeneettisessä erilaistumisprosessissa olevia soluja, olisi hyvin tärkeää esittää kontrollisolut koko tutkimusjaksolla.

Ensimmäisessä mallissa jokaiselle aikapisteelle asetettiin oma kontrolli, jossa solut käsiteltiin fysikaalisesti samoin kuin muut solut samassa aikapisteessä, mutta ilman hormonivalmistetta (kuva 13A). Toisessa mallissa kontrollisolut kerättiin aikapisteessä 0 tuntia, ilman mekaanista käsittelyä ja näitä soluja käytettiin kontrollina kaikille eri aikapisteille (kuva 13B), kuten useissa julkaistuissa tutkimuksissa on tehty (Vasconsuelo ym., 2008, Nave

ym., 1999, Bilbao ym., 2010). Ensimmäisen mallin mukaan toteutettu hormonivalmisteiden vaikutusten kontrollointi osoitti kontrollisolujen käyttäytyvän suhteessa aikaan hyvin samankaltaisesti kuin E₂- ja NETA-käsitellyt solut. Kun taas jälkimmäisen kontrollimallin mukaan näyttäisi hormonikäsiteltyjen- ja kontrollisolujen välillä olevan merkitseviä eroja (kuva 13B). Tulos olisi kuitenkin todennäköisesti epäluotettava, koska se ei huomioisi fyysikaalisesta rasituksesta eikä myogeenisen erilaistumisprosessin etenemisestä johtuvia muutoksia solujen käyttäytymisessä. Näin ollen kontrollimalliksi valittiin koko tutkimuksen aikajakson kattava malli, jonka avulla sekä fyysikaalisen käsittelyn että ajan tuomia vääriä positiivisia vaikutuksia pyrittiin kontrolloimaan.



Kuva 13. Kontrollimallien vertailu. Esimerkkinä Akt:n aktivaation määrittäminen NETA käsitellyissä C₂C₁₂-myotuubeissa. Molemmissa malleissa (A, B) tulokset on esitetty vähintään kolmen käsittelyn keskiarvona saatua p-Akt:n määrää yksiköttömällä asteikolla (*engl.* arbitrary unit, AU) ajan suhteen. Virhepylväät kuvaavat keskivirhettä. Mallissa A (käytetty tässä tutkimuksessa) myotuubit on käsitelty 1nM/10nM NETA:lla, viidessä aikapisteessä, joissa jokaisella oma kontrollinäyte (kuvaus: materiaalit ja menetelmät). Tällä mallilla ei saatu tilastollisesti merkitseviä eroja eri käsittelyjen välille. Mallissa B myotuubit on käsitelty 1nM/10nM NETA:lla neljässä aikapisteessä. Kaikille aikapisteille on yksi yhteinen kontrolli, jossa myotuubit on kerätty käsittelemättömänä (*engl.* basal level). Tällä mallilla saadaan kolme tilastollisesti merkitsevää eroa. Aikapisteessä 20 min 1 nM NETA:lla käsittelyssä näytteessä (*) p-Akt:n määrä on 1,95-kertainen verrattuna kontrollinäytteeseen ($p=0,028$). Samoin 10 nM näytteen (**) p-Akt:n määrän ero suhteessa kontrolliin on tilastollisesti merkitsevä ($p=0,03$). (***) 1 nM NETA, 40 min, $p=0,045$.

5.4 Yhteenveto

Tämän tutkimuksen tulosten valossa voidaan todeta, että E_2 ja NETA eivät, ainakaan yksin, vaikuta C_2C_{12} -myotuubeissa PI3K/Akt-reitillä esiintyvien Akt:n ja mTOR:n aktivoitumiseen eikä kyseisiä proteiineja koodaavien geenien ilmenemiseen. Kyseisillä hormoneilla ei myöskään ole vaikutusta $ER\alpha$:n, $ER\beta$:n eikä AR :n lähetti-RNA-tasoihin C_2C_{12} -myotuubeissa. Selvittämättä jää millainen vaikutus E_2 :n ja NETA:n yhteiskäsittelyillä mahdollisesti olisi. On myös huomioitava, että tulokset on saatu käsittelemällä erilaistuneita monitumaisia, hiiren myotuubeja, joista puuttuu hermotus eivätkä ne ole kiinnittyneet esim. toisiin soluihin tai soluväliaineeseen. Ihmisen lihaksesta eristetty primaarisoluviljelmä voisi antaa mahdollisuuden tutkimusongelman tarkempaan selvittämiseen. Toisaalta solusignalointi on äärettömän monimutkainen järjestelmä, jonka reitit eivät ole suoraviivaisia tai edes aina samaan suuntaan vaikuttavia. Esimerkiksi Akt:n tiedetään osallistuvan, PI3K/Akt-reitin lisäksi, myös useisiin muihin signalointireitteihin. On myös mahdollista, että laajasta kirjallisuuden tarkastelusta ja eri aikapisteiden ja hormonipitoisuuksien testaamisesta huolimatta, hormonien aikaansaamat vaikutukset ovat voineet jäädä havaitsematta esimerkiksi niiden nopeudesta tai pitoisuudesta johtuen. Aikaisemmat tutkimukset (Taaffe ym., 2005, Iannuzzi-Sucich ym., 2002, Ronkainen ym., 2009, Sipilä ym., 2001) siitä, että vaihdevuosissa tapahtuvien hormonimuutosten seurauksena naisten lihasten suorituskyky heikentyy ja että HRT:n käyttö vaikuttaa positiivisesti suorituskyvyn säilymiseen ja hidastaa lihasmassan- ja voiman vähenemistä haastavat kuitenkin jatkamaan solu- ja molekyyli-tasonmekanismien tarkempaa selvittämistä HRT:n käytön taustalla.

6. Lähdeluettelo

- Accili, D. ja K.C. Arden. 2004. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*. 117:421-426.
- Alessi, D.R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen ja B.A. Hemmings. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*. 15:6541-6551.
- Alessi, D.R., S.R. James, C.P. Downes, A.B. Holmes, P.R. Gaffney, C.B. Reese ja P. Cohen. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr.Biol*. 7:261-269.
- Alisi, A., A. Spaziani, S. Anticoli, M. Ghidinelli ja C. Balsano. 2008. PKR is a novel functional direct player that coordinates skeletal muscle differentiation via p38MAPK/AKT pathways. *Cell.Signal*. 20:534-542.
- Andersen, J.L. 2003. Muscle fibre type adaptation in the elderly human muscle. *Scand.J.Med.Sci.Sports*. 13:40-47.
- Aranda, A. ja A. Pascual. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol.Rev*. 81:1269-1304.
- Aronica, S.M. ja B.S. Katzenellenbogen. 1993. Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate and insulin-like growth factor-I. *Mol.Endocrinol*. 7:743-752.
- Balagopal, P., O.E. Rooyackers, D.B. Adey, P.A. Ades ja K.S. Nair. 1997. Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *Am.J.Physiol*. 273:E790-800.
- Balagopal, P., J.C. Schimke, P. Ades, D. Adey ja K.S. Nair. 2001. Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab*. 280:E203-8.
- Barros, R.P., U.F. Machado ja J.A. Gustafsson. 2006. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. *Trends Mol.Med*. 12:425-431.
- Baulieu, E.E., N. Binart, F. Cadepond, M.G. Catelli, B. Chambraud, J. Garnier, J.M. Gasc, G. Groyer-Schweizer, M.E. Oblin ja C. Radanyi. 1990. Receptor-associated nuclear proteins and steroid/antisteroid action. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 595:300-315.
- Baumgartner, R.N., K.M. Koehler, D. Gallagher, L. Romero, S.B. Heymsfield, R.R. Ross, P.J. Garry ja R.D. Lindeman. 1998. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am.J.Epidemiol*. 147:755-763.
- Bilbao, P.S., G. Santillan ja R. Boland. 2010. ATP stimulates the proliferation of MCF-7 cells through the PI3K/Akt signaling pathway. *Arch.Biochem.Biophys*.
- Birkenkamp, K.U. ja P.J. Coffey. 2003. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem.Soc.Trans*. 31:292-297.
- Bjornstrom, L. ja M. Sjoberg. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol.Endocrinol*. 19:833-842.

- Bjornstrom, L. ja M. Sjoberg. 2002. Signal transducers and activators of transcription as downstream targets of nongenomic estrogen receptor actions. *Mol.Endocrinol.* 16:2202-2214.
- Bodine, S.C., T.N. Stitt, M. Gonzalez, W.O. Kline, G.L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, A. Scrimgeour, J.C. Lawrence, D.J. Glass ja G.D. Yancopoulos. 2001. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat.Cell Biol.* 3:1014-1019.
- Boland, R., A. Vasconsuelo, L. Milanese, A.C. Ronda ja A.R. de Boland. 2008. 17beta-Estradiol Signaling in Skeletal Muscle Cells and its Relationship to Apoptosis. *Steroids.* 73:859-863.
- Bolster, D.R., S.J. Crozier, S.R. Kimball ja L.S. Jefferson. 2002. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J.Biol.Chem.* 277:23977-23980.
- Brodie, A. ja S. Inkster. 1993. Aromatase in the human testis. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 44:549-555.
- Brooke, M.H. ja K.K. Kaiser. 1970. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch.Neurol.* 23:369-379.
- Bunone, G., P.A. Briand, R.J. Miksicek ja D. Picard. 1996. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* 15:2174-2183.
- Campagnoli, C., F. Clavel-Chapelon, R. Kaaks, C. Peris ja F. Berrino. 2005. Progestins and progesterone in hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 96:95-108.
- Carlsten, H., R. Holmdahl, A. Tarkowski ja L.A. Nilsson. 1989. Oestradiol- and testosterone-mediated effects on the immune system in normal and autoimmune mice are genetically linked and inherited as dominant traits. *Immunology.* 68:209-214.
- Chen, Z., I.S. Yuhanna, Z. Galcheva-Gargova, R.H. Karas, M.E. Mendelsohn ja P.W. Shaul. 1999. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J.Clin.Invest.* 103:401-406.
- Chiang, G.G. ja R.T. Abraham. 2005. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J.Biol.Chem.* 280:25485-25490.
- Coggan, A.R., R.J. Spina, D.S. King, M.A. Rogers, M. Brown, P.M. Nemeth ja J.O. Holloszy. 1992. Skeletal muscle adaptations to endurance training in 60- to 70-yr-old men and women. *J.Appl.Physiol.* 72:1780-1786.
- Couse, J.F., J. Lindzey, K. Grandien, J.A. Gustafsson ja K.S. Korach. 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology.* 138:4613-4621.
- Cowley, S.M. ja M.G. Parker. 1999. A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 69:165-175.
- Cruz-Jentoft, A.J., J.P. Baeyens, J.M. Bauer, Y. Boirie, T. Cederholm, F. Landi, F.C. Martin, J.P. Michel, Y. Rolland, S.M. Schneider, E. Topinkova, M. Vandewoude ja M. Zamboni. 2010. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing.*

- Dela, F. ja M. Kjaer. 2006. Resistance training, insulin sensitivity and muscle function in the elderly. *Essays Biochem.* 42:75-88.
- DeMayo, F.J., B. Zhao, N. Takamoto ja S.Y. Tsai. 2002. Mechanisms of action of estrogen and progesterone. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 955:48-59; discussion 86-8, 396-406.
- Deroo, B.J. ja K.S. Korach. 2006. Estrogen receptors and human disease. *J.Clin.Invest.* 116:561-570.
- Doherty, T.J. 2003. Invited review: Aging and sarcopenia. *J.Appl.Physiol.* 95:1717-1727.
- Enmark, E., M. Peltö-Huikko, K. Grandien, S. Lagercrantz, J. Lagercrantz, G. Fried, M. Nordenskjöld ja J.A. Gustafsson. 1997. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization ja expression pattern. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 82:4258-4265.
- Faulkner, J.A., L.M. Larkin, D.R. Claflin ja S.V. Brooks. 2007. Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 34:1091-1096.
- Fu, X.D., M. Flamini, A.M. Sanchez, L. Goglia, M.S. Giretti, A.R. Genazzani ja T. Simoncini. 2008. Progestogens regulate endothelial actin cytoskeleton and cell movement via the actin-binding protein moesin. *Mol.Hum.Reprod.* 14:225-234.
- Gaub, M.P., M. Bellard, I. Scheuer, P. Chambon ja P. Sassone-Corsi. 1990. Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell.* 63:1267-1276.
- Greenlund, L.J. ja K.S. Nair. 2003. Sarcopenia--consequences, mechanisms, and potential therapies. *Mech.Ageing Dev.* 124:287-299.
- Greising, S.M., K.A. Baltgalvis, D.A. Lowe ja G.L. Warren. 2009. Hormone therapy and skeletal muscle strength: a meta-analysis. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 64:1071-1081.
- Hall, J.M., J.F. Couse ja K.S. Korach. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J.Biol.Chem.* 276:36869-36872.
- Harridge, S.D. 2007. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. *Exp.Physiol.* 92:783-797.
- Haynes, M.P., D. Sinha, K.S. Russell, M. Collinge, D. Fulton, M. Morales-Ruiz, W.C. Sessa ja J.R. Bender. 2000. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ.Res.* 87:677-682.
- Herbst, K.L. ja S. Bhasin. 2004. Testosterone action on skeletal muscle. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab.Care.* 7:271-277.
- Iannuzzi-Sucich, M., K.M. Prestwood ja A.M. Kenny. 2002. Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in healthy, older men and women. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 57:M772-7.
- Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S.Y. Jung, Q. Huang, J. Qin ja B. Su. 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell.* 127:125-137.

- Jaffer, S., O. Shynlova ja S. Lye. 2009. Mammalian target of rapamycin is activated in association with myometrial proliferation during pregnancy. *Endocrinology*. 150:4672-4680.
- Joels, M. 1997. Steroid hormones and excitability in the mammalian brain. *Front.Neuroendocrinol.* 18:2-48.
- Kastner, P., A. Krust, B. Turcotte, U. Stropp, L. Tora, H. Gronemeyer ja P. Chambon. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9:1603-1614.
- Kimball, S.R. 2007. The role of nutrition in stimulating muscle protein accretion at the molecular level. *Biochem.Soc.Trans.* 35:1298-1301.
- Kublickiene, K., E. Svedas, B.M. Landgren, M. Crisby, N. Nahar, H. Nisell ja L. Poston. 2005. Small artery endothelial dysfunction in postmenopausal women: in vitro function, morphology, and modification by estrogen and selective estrogen receptor modulators. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 90:6113-6122.
- Kuiper, G.G., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson ja J.A. Gustafsson. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 138:863-870.
- Lauretani, F., C.R. Russo, S. Bandinelli, B. Bartali, C. Cavazzini, A. Di Iorio, A.M. Corsi, T. Rantanen, J.M. Guralnik ja L. Ferrucci. 2003. Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia. *J.Appl.Physiol.* 95:1851-1860.
- Lee, C.E., A. McArdle ja R.D. Griffiths. 2007. The role of hormones, cytokines and heat shock proteins during age-related muscle loss. *Clin.Nutr.* 26:524-534.
- Lee, W.J. 2009. Insulin-like growth factor-I-induced androgen receptor activation is mediated by the PI3K/Akt pathway in C2C12 skeletal muscle cells. *Mol.Cells.* 28:495-499.
- Lee-Young, R.S., J.E. Ayala, C.F. Hunley, F.D. James, D.P. Bracy, L. Kang ja D.H. Wasserman. 2010. Endothelial Nitric Oxide Synthase is Central to Skeletal Muscle Metabolic Regulation and Enzymatic Signaling during Exercise In Vivo. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.*
- Leger, B., R. Cartoni, M. Praz, S. Lamon, O. Deriaz, A. Crettenand, C. Gobelet, P. Rohmer, M. Konzelmann, F. Luthi ja A.P. Russell. 2006. Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J.Physiol.* 576:923-933.
- Lemoine, S., P. Granier, C. Tiffoche, F. Rannou-Bekono, M.L. Thieulant ja P. Delamarche. 2003. Estrogen receptor alpha mRNA in human skeletal muscles. *Med.Sci.Sports Exerc.* 35:439-443.
- Lexell, J. ja D.Y. Downham. 1991. The occurrence of fibre-type grouping in healthy human muscle: a quantitative study of cross-sections of whole vastus lateralis from men between 15 and 83 years. *Acta Neuropathol.* 81:377-381.
- Liu, X., C.N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson ja X. Wang. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86:147-157.
- Majmudar, N.G., S.C. Robson ja G.A. Ford. 2000. Effects of the menopause, gender, and estrogen replacement therapy on vascular nitric oxide activity. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 85:1577-1583.

- Manolagas, S.C. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr.Rev.* 21:115-137.
- Manson, J.E., J. Hsia, K.C. Johnson, J.E. Rossouw, A.R. Assaf, N.L. Lasser, M. Trevisan, H.R. Black, S.R. Heckbert, R. Detrano, O.L. Strickland, N.D. Wong, J.R. Crouse, E. Stein, M. Cushman ja Women's Health Initiative Investigators. 2003. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N.Engl.J.Med.* 349:523-534.
- Matsumine, H., K. Hirato, T. Yanaihara, T. Tamada ja M. Yoshida. 1986. Aromatization by skeletal muscle. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 63:717-720.
- McKinlay, S.M., D.J. Brambilla ja J.G. Posner. 2008. The normal menopause transition. *Maturitas.* 61:4-16.
- McMillan, J., S. Fatehi-Sedeh, V.L. Sylvia, V. Bingham, M. Zhong, B.D. Boyan ja Z. Schwartz. 2006. Sex-specific regulation of growth plate chondrocytes by estrogen is via multiple MAP kinase signaling pathways. *Biochim.Biophys.Acta.* 1763:381-392.
- Mendelsohn, M.E. ja R.H. Karas. 1999. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N.Engl.J.Med.* 340:1801-1811.
- Milanesi, L., A. Russo de Boland ja R. Boland. 2008. Expression and localization of estrogen receptor alpha in the C2C12 murine skeletal muscle cell line. *J.Cell.Biochem.* 104:1254-1273.
- Milanesi, L., A. Vasconsuelo, A.R. de Boland ja R. Boland. 2009. Expression and subcellular distribution of native estrogen receptor beta in murine C2C12 cells and skeletal muscle tissue. *Steroids.* 74:489-497.
- Miller, W.R. 1991. Aromatase activity in breast tissue. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 39:783-790.
- Mizutani, T., S. Honzawa, S.Y. Tosaki ja M. Shibasaki. 2002. Total synthesis of (+/-)-wortmannin. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* 41:4680-4682.
- Morley, J.E., R.N. Baumgartner, R. Roubenoff, J. Mayer ja K.S. Nair. 2001. Sarcopenia. *J.Lab.Clin.Med.* 137:231-243.
- Nader, G.A. 2005. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 37:1985-1996.
- Naftolin, F., K.J. Ryan, I.J. Davies, Z. Petro ja M. Kuhn. 1975. The formation and metabolism of estrogens in brain tissues. *Adv.Biosci.* 15:105-121.
- Nave, B.T., M. Ouwens, D.J. Withers, D.R. Alessi ja P.R. Shepherd. 1999. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem.J.* 344 Pt 2:427-431.
- Nelson, H.D. 2008. Menopause. *Lancet.* 371:760-770.
- Nilsson, S., S. Mäkelä, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner ja J.A. Gustafsson. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol.Rev.* 81:1535-1565.

- Nojima, H., C. Tokunaga, S. Eguchi, N. Oshiro, S. Hidayat, K. Yoshino, K. Hara, N. Tanaka, J. Avruch ja K. Yonezawa. 2003. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J.Biol.Chem.* 278:15461-15464.
- Pace, P., J. Taylor, S. Suntharalingam, R.C. Coombes ja S. Ali. 1997. Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J.Biol.Chem.* 272:25832-25838.
- Phillips, S.K., K.M. Rook, N.C. Siddle, S.A. Bruce ja R.C. Woledge. 1993. Muscle weakness in women occurs at an earlier age than in men, but strength is preserved by hormone replacement therapy. *Clin.Sci.(Lond)*. 84:95-98.
- Pöllänen, E., P.H. Ronkainen, H. Suominen, T. Takala, S. Koskinen, J. Puolakka, S. Sipilä ja V. Kovanen. 2007. Muscular transcriptome in postmenopausal women with or without hormone replacement. *Rejuvenation Res.* 10:485-500.
- Power, R.F., S.K. Mani, J. Codina, O.M. Conneely ja B.W. O'Malley. 1991. Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science.* 254:1636-1639.
- Rannevik, G., K. Carlstrom, S. Jeppsson, B. Bjerre ja L. Svanberg. 1986. A prospective long-term study in women from pre-menopause to post-menopause: changing profiles of gonadotrophins, oestrogens and androgens. *Maturitas.* 8:297-307.
- Rantanen, T., P. Era ja E. Heikkinen. 1997. Physical activity and the changes in maximal isometric strength in men and women from the age of 75 to 80 years. *J.Am.Geriatr.Soc.* 45:1439-1445.
- Reynolds, T.H., 4th, S.C. Bodine ja J.C. Lawrence Jr. 2002. Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J.Biol.Chem.* 277:17657-17662.
- Rommel, C., S.C. Bodine, B.A. Clarke, R. Rossman, L. Nunez, T.N. Stitt, G.D. Yancopoulos ja D.J. Glass. 2001. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat.Cell Biol.* 3:1009-1013.
- Ronda, A.C., C. Buitrago, A. Colicheo, A.R. de Boland, E. Roldan ja R. Boland. 2007. Activation of MAPKs by 1alpha,25(OH)2-Vitamin D3 and 17beta-estradiol in skeletal muscle cells leads to phosphorylation of Elk-1 and CREB transcription factors. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 103:462-466.
- Ronkainen, P.H., V. Kovanen, M. Alen, E. Pöllänen, E.M. Palonen, C. Ankarberg-Lindgren, E. Hämäläinen, U. Turpeinen, U.M. Kujala, J. Puolakka, J. Kaprio ja S. Sipilä. 2009. Postmenopausal hormone replacement therapy modifies skeletal muscle composition and function: a study with monozygotic twin pairs. *J.Appl.Physiol.* 107:25-33.
- Rooyackers, O.E., D.B. Adey, P.A. Ades ja K.S. Nair. 1996. Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:15364-15369.
- Rosenberg, I.H. 1989. Summary comments. *Am J Clin Nutr.* 50:1231-1233.
- Rosenfeld, M.G. ja C.K. Glass. 2001. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J.Biol.Chem.* 276:36865-36868.
- Rossouw, J.E., G.L. Anderson, R.L. Prentice, A.Z. LaCroix, C. Kooperberg, M.L. Stefanick, R.D. Jackson, S.A. Beresford, B.V. Howard, K.C. Johnson, J.M. Kotchen, J. Ockene ja Writing Group for the Women's Health

- Initiative Investigators. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 288:321-333.
- Ryall, J.G., J.D. Schertzer ja G.S. Lynch. 2008. Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. *Biogerontology*. 9:213-228.
- Samson, M.M., I.B. Meeuwse, A. Crowe, J.A. Dessens, S.A. Duursma ja H.J. Verhaar. 2000. Relationships between physical performance measures, age, height and body weight in healthy adults. *Age Ageing*. 29:235-242.
- Sarbassov, D.D., D.A. Guertin, S.M. Ali ja D.M. Sabatini. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 307:1098-1101.
- Shao, D. ja M.A. Lazar. 1999. Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J.Clin.Invest*. 103:1617-1618.
- Simoncini, T., P. Mannella, L. Fornari, A. Caruso, M.Y. Willis, S. Garibaldi, C. Baldacci ja A.R. Genazzani. 2004. Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. *Endocrinology*. 145:5745-5756.
- Sipilä, S. 2003. Body composition and muscle performance during menopause and hormone replacement therapy. *J.Endocrinol.Invest*. 26:893-901.
- Sipilä, S., D.R. Taaffe, S. Cheng, J. Puolakka, J. Toivanen ja H. Suominen. 2001. Effects of hormone replacement therapy and high-impact physical exercise on skeletal muscle in post-menopausal women: a randomized placebo-controlled study. *Clin.Sci.(Lond)*. 101:147-157.
- Skelton, D.A., C.A. Greig, J.M. Davies ja A. Young. 1994. Strength, power and related functional ability of healthy people aged 65-89 years. *Age Ageing*. 23:371-377.
- Smith, C.L., O.M. Conneely ja B.W. O'Malley. 1993. Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 90:6120-6124.
- Sobolewska, A., M. Gajewska, J. Zarzynska, B. Gajkowska ja T. Motyl. 2009. IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway. *Eur.J.Cell Biol*. 88:117-130.
- Stefanick, M.L. 2005. Estrogens and progestins: background and history, trends in use, and guidelines and regimens approved by the US Food and Drug Administration. *Am.J.Med*. 118 Suppl 12B:64-73.
- Szulc, P., T.J. Beck, F. Marchand ja P.D. Delmas. 2005. Low skeletal muscle mass is associated with poor structural parameters of bone and impaired balance in elderly men--the MINOS study. *J.Bone Miner.Res*. 20:721-729.
- Taaffe, D.R., A.B. Newman, C.L. Haggerty, L.H. Colbert, N. de Rekeneire, M. Visser, B.H. Goodpaster, M.C. Nevitt, F.A. Tylavsky ja T.B. Harris. 2005. Estrogen replacement, muscle composition, and physical function: The Health ABC Study. *Med.Sci.Sports Exerc*. 37:1741-1747.
- Taylor, A.H. ja F. Al-Azzawi. 2000. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J.Mol.Endocrinol*. 24:145-155.

- Tremblay, A., G.B. Tremblay, F. Labrie ja V. Giguere. 1999. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol.Cell.* 3:513-519.
- Umayahara, Y., R. Kawamori, H. Watada, E. Imano, N. Iwama, T. Morishima, Y. Yamasaki, Y. Kajimoto ja T. Kamada. 1994. Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J.Biol.Chem.* 269:16433-16442.
- Vasconsuelo, A., L. Milanesi ja R. Boland. 2008. 17Beta-estradiol abrogates apoptosis in murine skeletal muscle cells through estrogen receptors: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J.Endocrinol.* 196:385-397.
- Vesely, P.W., P.B. Staber, G. Hoefler ja L. Kenner. 2009. Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutat.Res.*
- Vlahos, C.J., W.F. Matter, K.Y. Hui ja R.F. Brown. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J.Biol.Chem.* 269:5241-5248.
- Weigel, N.L. 1996. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem.J.* 319 (Pt 3):657-667.
- Welle, S., C. Thornton, R. Jozefowicz ja M. Statt. 1993. Myofibrillar protein synthesis in young and old men. *Am.J.Physiol.* 264:E693-8.
- Wiik, A., M. Ekman, O. Johansson, E. Jansson ja M. Esbjornsson. 2009. Expression of both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue. *Histochem.Cell Biol.* 131:181-189.
- Wiik, A., B. Glenmark, M. Ekman, M. Esbjornsson-Liljedahl, O. Johansson, K. Bodin, E. Enmark ja E. Jansson. 2003. Oestrogen receptor beta is expressed in adult human skeletal muscle both at the mRNA and protein level. *Acta Physiol.Scand.* 179:381-387.
- Williamson, D.L., D.R. Bolster, S.R. Kimball ja L.S. Jefferson. 2006. Time course changes in signaling pathways and protein synthesis in C2C12 myotubes following AMPK activation by AICAR. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 291:E80-9.