

**Iän ja fyysisen aktiivisuuden yhteys supistumisominaisuuksiltaan
erityyppisten luustolihasproteiinien
O-GlcNAcylationiin**

Elina Kalliokanta
Pro gradu -tutkielma
Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Solu- ja molekyylibiologia
16.4.2014

ALKUSANAT

Tämä pro gradu -tutkielma tehtiin Jyväskylän yliopiston terveystieteiden laitoksella vuosien 2012 - 2013 aikana.

Haluan kiittää ohjaajiani Vuokko Kovasta ja Minna Toivosta asiantuntevasta ja kärsivällisestä ohjauksesta, sekä mielenkiintoisesta tutkimusaiheesta. Kiitän myös Itävallan Wienin yliopiston eläinlääketieteellistä tiedekuntaa yhteistyöstä, sekä Jyväskylän yliopiston terveystieteiden laitoksen laboratorion henkilökuntaa saamastani avusta.

Lopuksi haluaisin osoittaa lämpimät kiitokset perheelleni ja ystäväilleni, jotka ovat tukeneet ja kannustaneet minua tutkimustyön eri vaiheissa.

Jyväskylässä 16.4.2014

Elina Kalliokanta

Tekijä:	Elina Kalliokanta
Tutkielman nimi:	Iän ja fyysisen aktiivisuuden yhteys supistumisominaisuuksiltaan erityyppisten luustolihasen proteiinien O-GlcNAcylation
English title:	The association of age and physical activity with protein O-GlcNAcylation in two different skeletal muscle types
Päivämäärä:	16.4.2014 Sivumäärä: 43
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Solu- ja molekyylibiologia
Tutkielman ohjaaja(t):	FT, dosentti Vuokko Kovanen ja FM Minna Toivonen

Tiivistelmä: Iäkkäiden ihmisten määrä kasvaa maailmanlaajuisesti ja yksi merkittävimmistä ikääntymisen aiheuttamista muutoksista on luustolihasen heikentyminen. Sarkopenian eli lihaskadon myötä koko elimistön liikuntakyky heikkenee ja alttius sairastumiselle metabolisiin sairauksiin, kuten diabetekseen, kasvaa merkittävästi. Aikuisiässä harrastetun, säännöllisen liikunnan on todettu hidastavan lihasvoiman ja -massan heikentymistä, mutta useista tutkimuksista huolimatta liikunnan vaikutusmekanismeja molekyyllitasolla ei tunneta vielä kovin hyvin.

O-GlcNAcylation (happeen sitoutunut β -N-asetyyli-glukosamiini) on heksosamiinin synteesireitin (*engl. hexosamine biosynthetic pathway*, HBP) päätekohta, jossa lopputuotteena muodostuneen korkeaenergisien UDP(uridiinidifosfo-N-asetyyli)-GlcNAc-substraatin GlcNAc-sokeriosa liitetään proteiinien seriini- tai treoniini-aminohappoihin happimolekyylin välityksellä. O-GlcNAcin liittämistä katalysoi O-GlcNAc-transferaasi (OGT) ja poistamisesta vastaa O-GlcNAcaasi (OGA) -entsyymi.

O-GlcNAcylationin vaihtelu yhdistetään moniin ikääntymisen aiheuttamiin sairauksiin, mutta iän vaikutuksesta OGT- ja OGA-geenien aktivoitumiseen ja proteiinien O-GlcNAcylationiin luustolihasessa tiedetään suhteellisen vähän. Tähänastisissa tutkimuksissa on keskitytty lyhytaikaisen harjoittelun vaikutusten seuraamiseen. Sen sijaan, elinikäisen fyysisen aktiivisuuden vaikutuksista OGT- ja OGA-geenien ilmentymiseen ja proteiinien O-GlcNAcylationiin ei ole tutkimustietoa eläinten eikä ihmisten luustolihasista.

Tämän pro gradu -tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, miten ikä ja elinikäinen fyysinen aktiivisuus ovat yhteydessä OGT- ja OGA-geenien ilmentymiseen sekä proteiinien kokonais-O-GlcNAcylationin tason rotan *soleus*- ja *extensor digitorum longus (EDL)* -luustolihasissa. Fyysisen aktiivisuuden vaikutusta tutkittiin 5 kk:n iästä 23 kk:n ikään sekä vapaaehtoisesti juoksupyörällä harjoitelleilla että juoksumatolla juoksetuilla rotilla. Iän vaikutusta selvitettiin tutkimalla 5 ja 23 kk:n ikäisiä harjoittelemattomia rotia.

OGT- ja OGA-geenien ilmentyminen määritettiin lähetti-RNA-tasolla reaaliaikaisella kvantitatiivisella polymeerasiketjureaktio (*engl. real time quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR) -menetelmällä. Proteiinien kokonais-O-GlcNAcylationin määrittämiseksi käytettiin Western blot -menetelmää.

Tulokset osoittivat, että *soleus*-lihaksessa sekä OGT- että OGA-geenin ilmentymistaso oli merkittävästi suurempi kuin *EDL*-lihaksessa. Iän todettiin lisäävän OGT-geenin ilmentymistä *soleus*-lihaksessa. Elinikäinen fyysinen aktiivisuus vähensi OGT-geenin ilmentymistä ja lisäsi proteiinien O-GlcNAcylationia sekä *soleus*- että *EDL*-lihaksessa. Fyysinen aktiivisuus vähensi myös OGA-geenin ilmentymistä *EDL*-lihaksessa. OGT-geenin ilmentyminen korreloi positiivisesti OGA-geenin ilmentymisen kanssa kummassakin luustolihasessa.

Tässä tutkimuksessa osoitettiin ensimmäistä kertaa, miten ikä ja elinikäinen fyysinen aktiivisuus ovat yhteydessä proteiinien O-GlcNAcylationiin ja OGT- ja OGA-geenien ilmentymiseen supistumisominaisuuksiltaan erilaisissa luustolihasissa. Tutkimustulokset vahvistavat käsitystä iän yhteydestä OGT-geenin lähetti-RNA-tason nousuun, juoksuharjoittelun yhteydestä proteiinien O-GlcNAcylationin nousuun, sekä lihasten vähäisen käytön yhteydestä proteiinien O-GlcNAcylationin laskuun luustolihasessa. Tulokset viittaavat myös siihen, että OGT- ja OGA-geenien ilmentymisen säätely ovat kytkeytyneet toisiinsa. Siitä, säätelevätkö OGT- ja OGA-geenien ilmentymistä samat tekijät, missä määrit ja mitä nämä tekijät ovat, tarvitaan lisää tutkimustietoa.

Avainsanat: O-GlcNAc, OGT, OGA, luustolihas, ikääntyminen, fyysinen aktiivisuus

Author: Elina Kalliokanta
Title of thesis: The association of age and physical activity with protein O-GlcNAcylation in two different skeletal muscle types
Finnish title: Iän ja fyysisen aktiivisuuden yhteys supistumisominaisuuksiltaan erityyppisten luustoli hasten proteiinien O-GlcNAcy laatioon
Date: 16.4.2014 **Pages:** 43
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell and Molecular Biology
Supervisors: PhD, docent Vuokko Kovanen and MSc Minna Toivonen

Abstract: The world population is rapidly ageing and one of the most serious consequences of ageing is the development of sarcopenia. "Sarcopenia" refers to age-related muscle wasting which causes functional decline and impaired mobility and significantly increases the risk for e.g. metabolic diseases, including diabetes. Resistance training, and especially strength training, has been shown to be useful for both the prevention and treatment of sarcopenia. Although many studies have focused on structural and functional characteristics of age-related skeletal muscle weakness, still lack of knowledge exists about the exact molecular mechanisms underlying the development of sarcopenia.

O-GlcNAcylation (O-linked β -N-acetylglucosamine) is the last step of the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) where the end-product, UDP-GlcNAc substrate, is produced and its β -D-N-acetylglucosamine (GlcNAc) unit is added to serine or threonine residues of nuclear and cytoplasmic proteins. O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) catalyzes the addition and O-GlcNAcase (OGA) catalyzes the removal of a single GlcNAc unit.

Changes in the levels of protein O-GlcNAcylation have been associated with a number of age-related diseases, although relatively little is known about the impact of age on OGT and OGA enzyme activity and O-GlcNAcylation of skeletal muscle proteins. So far, recent studies have focused on the effects of short-term physical exercise, while the effects of life-long physical activity on the OGT and OGA gene expression and protein O-GlcNAcylation in skeletal muscle has not been reported.

In the current study the effects of life-long physical activity in terms of voluntary running wheel and forced treadmill training were studied with rats training from the age of 5 months to the age of 23 months. The groups of 5 and 23 months old untrained rats served as control groups and were used to determine the association of age with protein O-GlcNAcylation. Skeletal muscle protein glycosylation via O-GlcNAcylation was studied at the transcript level of OGT and OGA enzymes in the *soleus* and *extensor digitorum longus* (*EDL*) muscles. Also the total amount of O-GlcNAcyated proteins was determined.

Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to measure the OGT and OGA transcript levels. The total levels of O-GlcNAcyated proteins were measured by using Western blot method. These results showed that the levels of OGT and OGA transcripts were significantly higher in *soleus* muscle than in *EDL* muscle in all study groups. Old animals had also higher levels of OGT transcripts than young adults in the *soleus* muscle. Life-long physical activity decreased the expression of OGT and increased the total levels of protein O-GlcNAcylation in both muscle types. In *EDL* muscle OGA expression was decreased following life-long voluntary running wheel training. The expression of OGT correlated significantly with that of OGA in both muscle types.

For the first time, we showed here that age and life-long physical activity affect the expression of OGT and OGA genes and total levels of O-GlcNAcyated proteins in two different skeletal muscle types. Together with other studies these results add the knowledge that age is associated with increased expression of OGT gene, both voluntary and forced endurance-type training enhance muscle protein O-GlcNAcylation, and sedentary lifestyle is associated with diminished O-GlcNAcylation in skeletal muscle. The results also suggest that the expression of OGT and OGA genes are regulated in tandem and deserves further studies.

Keywords: O-GlcNAc, OGT, OGA, skeletal muscle, aging, physical activity

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	7
1.1. Hitaat ja nopeat lihassolut	7
1.2. Proteiinien O-GlcNAcylation luustolihasissa	8
1.3. Ikääntyminen ja proteiinien O-GlcNAcylation luustolihasissa	12
1.4. Fyysinen harjoittelu ja proteiinien O-GlcNAcylation luustolihasissa	13
2. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	15
3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	16
1.1. Koe-eläimet ja koejärjestelyt	16
1.2. RNA:n eristys ja reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR (RT-qPCR)	17
1.3. Western blot	18
1.4. Tilastollinen analyysi	20
4. TULOKSET	21
4.1. OGT- ja OGA-geenejä ilmentetään voimakkaammin rotan <i>soleus</i> - kuin <i>extensor digitorum longus (EDL)</i> -lihaksessa	21
4.2. Ikä lisää OGT-geenin ilmentymistä rotan <i>soleus</i> -lihaksessa	21
4.3. Fyysinen harjoittelu vähentää OGT-geenin ilmentymistä ja lisää proteiinien kokonais-O-GlcNAcylationia rotan <i>soleus</i> - ja <i>EDL</i> -lihaksissa	23
4.4. OGT-geenin ilmentyminen korreloi positiivisesti OGA-geenin ilmentymisen kanssa sekä <i>soleus</i> - että <i>EDL</i> -lihaksessa	25
5. TULOSTEN TARKASTELU	26
5.1. O-GlcNAcylation supistumisominaisuuksiltaan erityyppisissä lihaksissa	28
5.2. Iän yhteys lihasproteiinien O-GlcNAcylationiin	29
5.3. Fyysisen aktiivisuuden yhteys lihasproteiinien O-GlcNAcylationiin	31
5.4. OGT- ja OGA-entsyymien ilmentymisen säätely ovat kytkeytyneet toisiinsa?	36
5.5. Yhteenveto	36
6. LÄHDELUETTELO	39

LYHENTEET

EDL	Ojentajalihas (<i>engl. extensor digitorum longus</i>)
GAPDH	Glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi
GFAT	Glutamiinifruktoosi-6-fosfaattiamidotransferaasi
HAT	Histoniasetyylitransferaasi
JM	Juoksumattoryhmä
JP	Juoksupyöräryhmä
K	Kontrolliryhmä
N	Nuorten ryhmä
OGA	O-GlcNAcaasi
O-GlcNAc	Hapteen sitoutunut β -N-asetyyliglukosamiini (<i>engl. O-linked β-N-acetylglucosamine</i>)
OGT	O-GlcNAc-transferaasi
RT-qPCR	Reaaliaikainen kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio (<i>engl. real time quantitative polymerase chain reaction</i>)
UDP	Uridiinidifosfaatti

1. JOHDANTO

Läikkäiden ihmisten määrä kasvaa maailmanlaajuisesti ja yksi merkittävimmistä ikääntymisen aiheuttamista muutoksista on luustolihasen heikentyminen. Sarkopenia eli lihaskato heikentää ennen kaikkea ikääntyvän ihmisen terveyttä ja sitä kautta elämänlaatua, mutta se aiheuttaa myös kustannuksia sosiaali- ja terveydenhuollolle. Lihaskadon myötä koko elimistön liikuntakyky heikkenee ja alttius metabolisille sairauksille, kuten diabetekselle, kasvaa merkittävästi (ks. yleiskatsaus Thompson, 2009). Tutkimusten mukaan aikuisiässä harrastetun, säännöllisen liikunnan on todettu hidastavan lihasvoiman ja -massan heikentymistä (Faulkner ym., 2007; Ryall ym., 2008), mutta useista tutkimuksista huolimatta ymmärrys liikunnan vaikutusmekanismeista molekyylitasolla on vielä puutteellista.

1.1. Hitaat ja nopeat lihassolut

Luustolihas koostuu pitkistä poikkijuovaisista, monitumaisista lihassoluista. Lihassoluja ympäröi endomysiumiksi nimetty sidekudosrakenne, joka liittyy lihassolukalvoa eli sarkolemmaa ympäröivään tyvikalvoon. Lihassolut ovat järjestäytyneet rinnakkain lihassolukimpuiksi, joita puolestaan tukee perimysiumiksi kutsuttu sidekudosverkosto. Perimysium on liittyneenä koko lihasta ympäröivään epimysium-kalvoon, jonka kautta muodostuu yhteys jänteen kautta luuhun. Lihassolun solukalvon ja tyvikalvon välissä sijaitsevat lihassolujen kantasolut eli satelliittisolut, jotka voivat aktivoitua esimerkiksi sarkolemman tai tyvikalvon vaurioituessa ja solukuoleman yhteydessä.

Poikkijuovaiset lihassolut jaetaan kahteen pääluokkaan, I- ja II-tyypin soluihin, jotka eroavat toisistaan aineenvaihdunnaltaan, rakenteeltaan ja toiminnaltaan. Eri lihassolutyypit ilmentävät tietyistä lihasproteiineista, kuten tropomyosiinista, troponiinista ja myosiinista, eri isomuotoja. Pääasiassa lihassolut luokitellaan myosiinin raskasketju (MyHC, *engl. myosin heavy chain*) -isomuodon mukaisesti. Tyypin I lihassolut ovat hitaasti supistuvia, MyHC I -isoformia ilmentäviä, ensisijaisesti oksidatiivista energia-aineenvaihduntaa hyödyntäviä soluja, jotka sisältävät enemmän mitokondrioita ja myoglobiinia kuin tyypin II solut. Koska tyypin I solut tuottavat energiansa pääsääntöisesti aerobisesti, ne soveltuvat parhaiten pitkäkestoiseen suoritukseen. Tyypin II lihassolut voidaan jakaa edelleen

kolmeen alaryhmään: Iia, Iib ja Iix. II-tyyppin solut ovat nopeita, MyHC II -isoformeja ilmentäviä soluja, jotka tuottavat energiaa pääasiassa glykolyysin avulla. Koska tyyppin II solut tuottavat tehokkaasti energiaa glykolyysin avulla myös anaerobisesti, ne soveltuvat erityisen hyvin lyhytkestoiseen, räjähtävää voimantuottoa vaativaan lihastoimintaan.

Lepovaiheen aikana lihassolut tuottavat suurimman osan tarvitsemastaan energiasta aerobisesti mitokondriossa. Lihassupistuksen aikana solujen energiantarve kuitenkin kasvaa, kun sarkomeerin keskiosassa sijaitsevat aktiini- ja myosiinisäikeet liukuvat toistensa lomitse. Fyysisen aktiivisuuden yhteydessä tarvittavan korkeaenergisien yhdisteiden, ATP:n (adenosiinitrifosfaatti), tuotanto tehostuu, jolloin myös hiilihydraattien (glukoosin ja glykokeenin) ja rasvahappojen (lipidien ja triglyseridien) käyttö energianlähteenä lisääntyy. Katabolisten eli hajoittavien reaktioiden aikana glukoosia pilkkotaan ensin glykolyysissä, jonka jälkeen pilkkomisreaktio jatkuu mitokondriossa. Triglyserideistä vapautuneet rasvahapot kuljetetaan mitokondrioihin, joissa niiden sisältämä energia sidotaan ATP:hen hapettamalla beta-oksidaatioksi -kutsutussa reaktioketjussa. ATP:hen sidottu energia käytetään kaikkiin energiaa vaativiin solujen toimintoihin mukaan lukien lihassupistukseen. Yksilön kunto, fyysisen harjoittelun kesto ja intensiteetti vaikuttavat siihen, tuotetaanko ATP:ta aerobisesti vai anaerobisesti. Matalatehoisen ja pitkäkestoisen harjoittelun aikana ATP:n valmistukseen tarvittava energia vapautetaan aerobisesti hitaiden lihassolujen glykokeenivarastoista glykolyysissä ja sitruunahappokierrossa. Rasvahapoista energia vapautetaan beta-oksidaatiossa. Aerobinen prosessi tuottaa enemmän ATP:ta kuin anaerobinen, ja vastaa siten paremmin solujen energiantarpeeseen matalatehoisen pitkäkestoisen harjoittelun aikana. Harjoittelun intensiteetin kasvaessa rekrytoidaan nopeita lihassoluja, joissa hiilihydraattien sisältämä energia vapautetaan lihassolun käyttöön anaerobisen glykolyysin avulla (Jeukendrup ym., 2002; Pette ym., 2002).

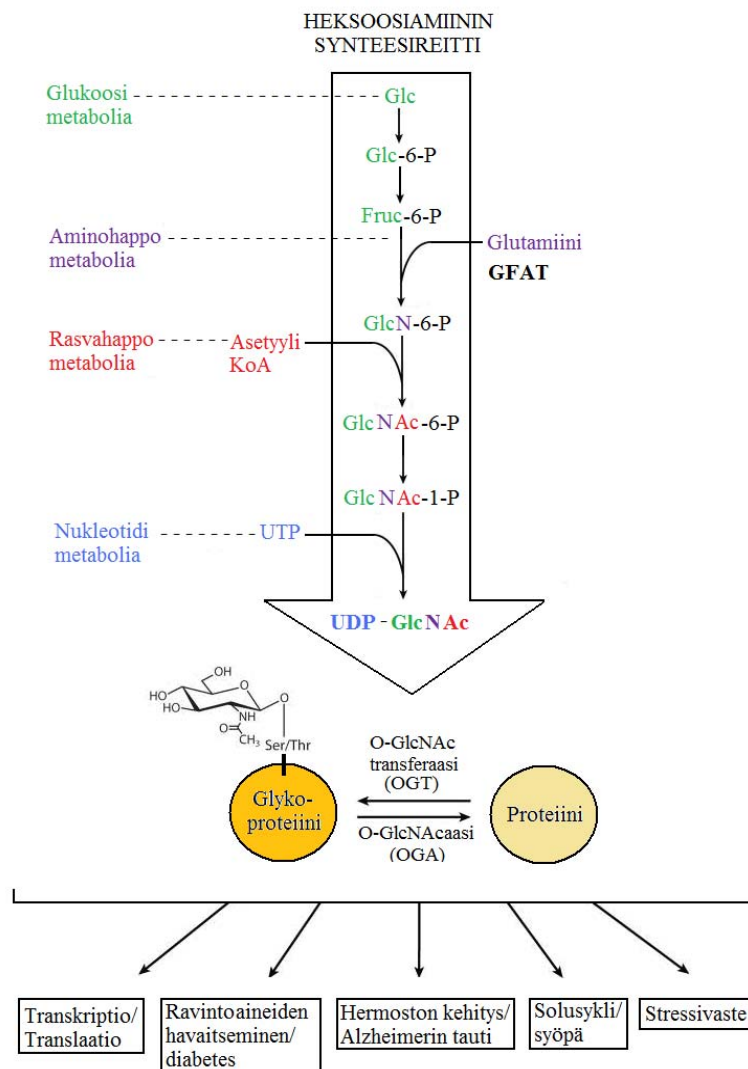
1.2. Proteiinien O-GlcNAcylation luustolihasessa

Luustolihasen toiminta on riippuvaista glukoosin saannista. Glukoosin määrä puolestaan vaikuttaa proteiinien glykosylaatioon, jossa proteiinien toimintaa säädellään liittämällä niihin hiilihydraattijohdannaisia translaation aikana tai sen jälkeen. Glykosylaatio voidaan jakaa kahteen päätyyppiin, N- ja O-välitteiseen. O-välitteinen glykosylaatio on spesifinen

tuman, solukalvon ja sytosolin proteiineille. Endoplasmisen kalvoston tai Golgin laitteen proteiineissa ei ole todettu O-välitteistä glykosylaatiota (Torres ja Hart, 1984; Holt ja Hart, 1986). O- β -N-asetyyli-glukosaminylaatio (O-GlcNAcylation) on yksi yleisimmistä O-välitteisistä glykosylaatioista monisoluisilla eukaryooteilla (ks. yleiskatsaus Roth ym., 2012). O-GlcNAcyloitujen proteiinien määrää säätelevät useat eri tekijät ja O-GlcNActasojen vaihtelu on yhdistetty moniin kroonisiin sairauksiin kuten diabetekseen, hermostosairauksiin sekä syöpään (Hanover, 2001). O-GlcNAcylation on proteiinien fosforylaation verrattavissa oleva reaktio, jossa proteiinien toimintaa säädellään entsyymivälitteisesti liittämällä niiden rakenteeseen O-GlcNAc-sokeriosia. Viimeaikaiset tutkimustulokset ovat osoittaneet fosforylaation ja O-GlcNAcylation toimivan yhteistyössä solun toimintoja säätelevinä tekijöinä, sillä niiden on todettu vaikuttavan samojen kohdeproteiinien toimintaa (Wang ym., 2007; Wang ym., 2008; Wang ym., 2010; ks. yleiskatsaus Zeidan ja Hart 2010).

Uridiindifosfaatti (UDP) -GlcNAc-substraatti muodostuu heksosamiinin synteesireitin päätekohtassa. O-GlcNAcylationissa substraatin GlcNAc-sokeriosa liitetään proteiinien seriini- tai treoniini-aminohappoihin happimolekyylin välityksellä O-GlcNAc-transferaasin (OGT) katalysoimassa reaktiossa. O-GlcNAcin poistaminen tapahtuu O-GlcNAcaasi (OGA) -entsyymin avulla. Heksosamiinin synteesireitillä toimii myös glutamiinifruktoosi-6-fosfaattiamidotransferaasi (GFAT) -entsyymi, joka säätelee glukoosin pilkkomisnopeutta hajottamalla fruktoosi-6-fosfaattia (Fru-6-P) glukosamiini-6-fosfaatiksi (GlcN-6-P) (kuva 1) (ks. yleiskatsaus Hart ym., 2011). O-GlcNAcylation tiedetään säätelevän useita solun eri toimintoja, kuten transkriptiota (Yang ym., 2002) ja translaatiota (Ohn ym., 2008), signaalinvälitystä (Yang ym., 2008), proteiinien kuljetusta (Geng ym., 2012), solusykliä (Slawson ym., 2005) sekä kasvua ja kehitystä (O'Donnell ym., 2004). O-GlcNAcylation ensisijaisena tehtävänä on toimia ravinnonsaantia ja solustressiä säätelevänä tekijänä (Wells ym., 2003), sillä monien metabolireittien välituotteet osallistuvat heksosamiinin synteesireitin toimintaan vaikuttaen O-GlcNAcylationissa käytettävän UDP-GlcNAc-substraatin muodostamiseen. Glukoosi on merkittävin UDP-GlcNAcin muodostumista säätelevistä ravintoaineista, ja tutkimusten mukaan arviolta 2 - 3 % soluun kuljetetusta glukoosista kulkee heksosamiinin synteesireitin kautta (Marshall ym., 1991). Glukoosin sisäänoton tehostuessa myös heksosamiinin synteesireitin läpi kulkevan glukoosin määrä

kasvaa ja O-GlcNAcyylaatiokapasiteetti lisääntyy (Walgren ym., 2003). Solustressin aikana O-GlcNAcyylaatiotason akuutilla lisääntymisellä on ehdotettu olevan solua suojeleva vaikutus, sillä sen tiedetään osallistuvan proteiinien hajotusta (Zhang ym., 2003) ja apoptoosia aiheuttavien signaalireittien säätelyyn (Zachara ym., 2004; Liu ym., 2006). Pitkäaikaisella altistumisella on puolestaan todettu olevan yhteys monien sairauksien, kuten syövän, hermostosairauksien ja diabeteksen patologiaan (ks. yleiskatsaus Hart ym., 2011).



Kuva 1. Kaavakuva UDP-GlcNAc-substraatin synteesireitistä ja proteiinien O-GlcNAcyylaatiosta. Heksosamiinin synteesireitille osallistuvat useat eri metaboliset yhdisteet ja lopputuotteena muodostuu UDP-GlcNAc-substraatti. GFAT-entsyymi säätelee glukoosin pilkkomisnopeutta katalysoimalla fruktoosi-6-

fosfaatin (Fru-6-P) hajoittamista glutamiini-6-fosfaatiksi (GlcN-6-P). O-GlcNAcylaatiassa substraatin sokeriosa (GlcNAc) kiinnitetään kohdeproteiinin seriini/treoniini yksiköihin OGT-entsyymin katalysoimassa reaktiossa. GlcNAcin poistoa proteiinista katalysoi OGA-entsyymi. O-GlcNAcyloidut proteiinit säätelevät useita eri solun toimintoja (Kuva on muokattu julkaisusta Hart ym., 2011; kuva 1).

GlcNAc-sokeriosan liittamisestä proteiineihin ja sen poistamisesta proteiineista vastaa kaksi eri entsyymiä, jotka ovat rakenteeltaan ja toiminnaltaan hyvin samanlaisia. GlcNAcin liittämistä katalysoiva OGT-entsyymi muodostuu entsyymiproteiinin C-terminaalien katalyyttisestä yksiköstä sekä proteiini-proteiini liitoksen tarvittavasta tetratrikopeptidin (TPR) toistojaksosta (Kreppel ja Hart., 1999). OGT:n toiminta on suoraan riippuvaista GlcNAcin saatavuudesta, mutta myös OGT-entsyymin itsensä aktiivisuutta säädellään O-GlcNAcylaatiolla (Kreppel ja Hart., 1999). OGA-entsyymi koostuu OGT:n tavoin katalyyttisestä osasta ja proteiinien väliseen liitokseen osallistuvasta HAT (histoni asetyylitransferaasi) -yksiköstä (Toleman ym., 2004). OGA:n tehtävänä on poistaa GlcNAc-sokeriosa proteiinista ja vaikuttaa siten O-GlcNAcyloitujen proteiinien määrään solussa. O-GlcNAcylation sääteley on hyvin monimutkaista, sillä sen kokonaistason vaihteluun vaikuttavat OGT- ja OGA-entsyymien ja UDP-GlcNAcin lisäksi myös GFAT-entsyymien aktiivisuus (Weigert ym., 2003) sekä solunulkoiset olosuhteet, kuten veren glukoosipitoisuus (Taylor ym., 2008; Taylor ym., 2009) ja vapaiden rasvahappojen määrä (Weigert ym., 2003). Weigert ym. (2003) ja Fülöp ym. (2006) tekemässä tutkimuksessa osoitettiin, että heksosamiinin synteesireitin läpi lisääntynyt ravintoaineiden virtaus olisi ensisijainen proteiinien O-GlcNAcylaatiota säätelevä tekijä. Sydän- ja luustolihasesta tehdyissä tutkimuksissa UDP-GlcNAcin määrän nousun havaittiin olevan seurausta kohonneista veren glukoosi- ja rasvahappopitoisuuksista. Tutkimuksessa myös GFAT-entsyymiproteiinien määrä lisääntyi. Sen sijaan OGT:n ilmentyminen proteiinitasolla säilyi lähes muuttumattomana (Weigert ym., 2003; Fülöp ym., 2006).

Useat tutkimukset ovat osoittaneet O-GlcNAcylaatiolla olevan merkitystä lihassolujen rakenteen, signaalinvälityksen ja toiminnan säätelyssä (Arias ym., 2004; Hedou ym., 2007 ja 2009; Ogawa ym., 2012). O-GlcNAcylation merkitystä luustolihasolujen toimintaa säätelevänä tekijänä korostaa myös havainto, jonka mukaan rotan luusto- ja sydänlihaksessa OGT:n aktiivisuus on 2 - 4 kertaa suurempi kuin maksassa, jolla on myös keskeinen tehtävä insuliinin kohde-eliminänä (Yki-Järvinen, 1997). Rottien luustolihasista tehdyissä tutkimuksissa havaittiin useiden supistumiseen osallistuvien proteiinien (mm.

aktiinin ja myosiinin) olevan O-GlcNAcyloituja (Hedou ym., 2007; Hedou ym., 2009). O-GlcNAcylation on myös todettu estävän supistumiseen osallistuvien proteiinien hajotusta rotan luustolihasessa (Cieniewski-Bernard ym., 2004) sekä parantavan lihassupistumiseen osallistuvien proteiinien kykyä sitoa kalsiumioneja (Hedou ym., 2007).

1.3. Ikääntyminen ja proteiinien O-GlcNAcylation luustolihasessa

Lihaskato eli sarkopenia on yksi merkittävistä ikääntymisen aiheuttamista seurauksista. Sarkopenian kehittymiseen vaikuttavia tekijöitä on useita, kuten heikkolaatuinen ravinto, krooniset sairaudet, vähäinen liikunta sekä ikääntymiseen liittyvä proteiinisynteesin väheneminen lihaksissa (ks. yleiskatsaus Doherty, 2003). Ikääntymisen myötä rasvattoman kehonpainon osuus vähenee samanaikaisesti, kun rasva- ja sidekudoksen määrä lisääntyy. Ikääntymisen aiheuttaman lihasmassan vähenemisen tiedetään olevan yhteydessä lihassoluissa tapahtuviin kvalitatiivisiin ja kvantitatiivisiin muutoksiin. Ikääntymisen vaikutuksesta lihassolujen koko pienenee, motoristen yksiköiden määrä vähenee ja voiman tuotossa tarvittavien (nopeiden) II tyypin solujen määrä muuttuu suhteessa I (hitaiden) tyypin solujen määrään. Tyypin II lihassolujen vähenemisen on ehdotettu olevan seurausta solujen kokonaismäärän vähenemisestä tai tyypin I suuntaan tapahtuvista rakennemuutoksista. Uusimmat tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet ikääntymisen myötä tyypin I suuntaan tapahtuvan solutyypimuutoksen olevan vähäisempää kuin aikaisemmin on esitetty (ks. yleiskatsaus Andersen, 2003).

O-GlcNAcylation on havaittu olevan yhteydessä moniin ikääntymisen aiheuttamiin sairauksiin, mutta suhteellisen vähän kuitenkin tiedetään siitä, miten ikääntyminen vaikuttaa OGT- ja OGA-geenien aktivoitumiseen ja proteiinien O-GlcNAcylation luustolihasessa. Lihastrofian tiedetään aiheutuvan merkittävästä lihasmassan (Thomason ja Booth, 1990) ja lihassolujen proteiinien vähenemisestä (MacDonald ym., 1995), minkä seurauksena lihaksen kyky toimia supistusvoimaa vaativissa tehtävissä heikkenee. Proteolyyttisen järjestelmän ja apoptoosireittien aktivoitumisen on todettu olevan osasy syy lihaseikkouden kehittymiseen (Hunter ym., 2002; Franch ja Price, 2005). Rotan sydänlihaskudoksesta tehdyissä soluviljelykokeissa havaittiin, että korkeiden

glukoosipitoisuuksien vallitessa apoptoositekijöiden aktivoituminen ja määrän lisääntyminen estä solujen kasvua ja aiheutti solukuolemia (Fiordaliso ym., 2001). Huang`n ym. (2010) julkaisemassa tutkimuksessa OGA:n aktiivisuuden estämisellä havaittiin olevan yhteys proteiinien O-GlcNAcyklaatiotason nousuun, apoptoositekijöiden aktivoitumiseen sekä proteosomien toiminnan heikentymiseen hiiren luustolihasessa (Huang ym., 2010). Ikääntymisen aiheuttaman luustolihasen heikkenemisen on ehdotettu olevan yhteydessä heikentyneeseen insuliiniresistenssiin, jonka tiedetään vähentävän PI3K/Akt -reitien aktiivisuutta ja lihasproteiinien synteesiä (Wang ym., 2006). O-GlcNAcyklaatiolla on todettu olevan yhteys insuliiniresistenssin muodostumiseen hiiren luustolihasessa (Buse ym., 2002; McClain ym., 2002), ja etenkin pitkäaikaisen altistumisen korkeille O-GlcNAcyklaatiotasolle on todettu aiheuttavan insuliiniresistenssiä (Arias, 2004).

1.4. Fyysinen harjoittelu ja proteiinien O-GlcNAcyklaatio luustolihasessa

Fyysinen harjoittelu aiheuttaa lihaskudoksessa useita rakenteellisia, fysiologisia ja biokemiallisia muutoksia. Säännöllinen liikunta parantaa lihasten supistumiskykyä, hengitys- ja verenkiertoelimistön toimintaa sekä glukoosiaineenvaihduntaa lisäämällä insuliiniherkkyyttä (ks. yleiskatsaus Borghouts ja Keizer, 2000). Fyysisen harjoittelun on todettu hidastavan ikääntymisen aiheuttamaa lihasvoiman heikkenemistä lisäämällä lihaskestävyyttä sekä parantamalla fyysistä suorituskykyä (Evans, 1995; Waters ym., 2010). Kestävyysharjoittelun vaikutuksesta lihaskudosta ympäröivien hiussuonten määrä lisääntyy, jotta lihassolut saavat tarpeitaan vastaavan määrän ravintoaineita ja happea. Tämän seurauksena myös metaboliaa ylläpitävä proteiinisynteesi lisääntyy ja mitokondrioiden määrä kasvaa (Short ym., 2004; Harber ym., 2009). Toistuvan, matalatehoisen kestävysharjoittelun vaikutuksesta tyypin I lihassolujen suhteellinen määrä kasvaa, jotta lihaskudos kykenee vastaamaan väsymättä suureen määrään hitaita supistuksia (Pette ym., 2002).

Koe-eläintutkimuksissa fyysisen aktiivisuuden on todettu vaikuttavan proteiinien kokonais-O-GlcNAcyklaatiotasoon sydän- ja luustolihasessa (Belke, 2011; Bennett ym., 2013; Cox ja Marsh, 2013). Hiirten sydänlihaksella tehdyissä tutkimuksissa todettiin kuusi viikkoa kestäneen uintiharjoittelun vähentävän proteiinien kokonais-O-GlcNAcyklaatiotasoa sekä OGT-geenin ilmentymistä lähetti-RNA-tasolla (Belke, 2011; Bennett ym., 2013). Cox`n ja

Marsh`n (2013) julkaisemassa tutkimuksessa neljä viikkoa kestäneen juoksumattoharjoittelun todettiin lisäävän proteiinien kokonais-O-GlcNAcylaatiotasoa sekä OGT:n että OGA:n ilmentymistä proteiinitasolla hiiren sydänlihaksessa (Cox ja Marsh, 2013). Fyysisen harjoittelun yhteyksistä luustolihasproteiinien O-GlcNAcylaatioon on julkaistu tähän mennessä vain yksi ihmisillä tehty tutkimus, jossa vuodelevon aikaisen yhdistetyn kestävyys- ja vastusharjoittelun todettiin ylläpitävän proteiinien kokonais-O-GlcNAcylaatiotasoa luustolihaksessa (Mounier ym., 2009). Tähänastisissa tutkimuksissa on keskitytty lyhytaikaisen harjoittelun vaikutusten seuraamiseen, eikä elinikäisen fyysisen aktiivisuuden vaikutuksista OGT- ja OGA-geenien ilmentymiseen eikä yksittäisten proteiinien tai proteiinien kokonais-O-GlcNAcylaatiotasoon ole tähän mennessä raportoitu eläinten eikä ihmisten luustolihaksissa.

2. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tässä pro gradu -tutkimuksessa selvitettiin iän ja elinikäisen fyysisen aktiivisuuden yhteyttä OGT- ja OGA-geenien ilmentymiseen sekä proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoon rotan *soleus* ja *extensor digitorum longus (EDL)* -lihaksissa. *Soleus* on rotalla asentoa ylläpitävä, hidas, aerobista energia-aineenvaihduntaa hyödyntävä, pääasiassa tyypin I lihassoluista koostuva lihas ja *EDL* on nopea, anaerobista energia-aineenvaihduntaa hyödyntävä, pääasiassa tyypin II lihassoluista koostuva ojentajalihas. Fyysisen aktiivisuuden vaikutuksia tutkittiin sekä vapaaehtoisesti juoksupyörällä harjoitelleilla että juoksumatolla juoksutetuilla rotilla. Rotat harjoittelivat 5 kuukauden iästä 23 kuukauden ikään. Iän vaikutusta lihasten O-GlcNAcyylaatioon selvitettiin tutkimalla 5 kuukauden ja 23 kuukauden ikäisiä harjoittelemattomia rottia.

Tutkimuksella pyrittiin vastaamaan erityisesti seuraaviin kysymyksiin:

- 1) Onko supistumisominaisuuksiltaan erilaisten luustolihasten välillä eroa OGT- ja OGA-geenien ilmentymisessä ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasossa?
- 2) Vaikuttaako ikä OGT- ja OGA-geenien ilmentymiseen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoon?
- 3) Vaikuttaako juoksupyöräharjoittelu OGT- ja OGA-geenien ilmentymiseen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoon?
- 4) Vaikuttaako juoksumattoharjoittelu OGT- ja OGA-geenien ilmentymiseen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoon?
- 5) Onko OGT- ja OGA-geenien ilmentyminen yhteydessä proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoon tutkituissa lihaksissa?

3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

1.1. Koe-eläimet ja koejärjestelyt

Tämä tutkimus on osa Jyväskylän yliopiston terveystieteiden laitoksen ja Wienin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan välistä tutkimusyhteistyötä (prof. A. Viidik & M. Skalicky, dos. V. Kovanen). Koe-eläintutkimus toteutettiin ja näytteet otettiin Wienin eläinlääketieteiden laitoksella vuosien 1998 - 2000 aikana (Viidik ja Skalicky, 2003). Jyväskylässä tehtävää osatutkimusta varten näytteet tuotiin Jyväskylän yliopiston terveystieteiden laitokselle ja säilytettiin -80 °C:ssa.

Yhden kuukauden ikäisenä rotat (*Sprague-Dawley*) luovutettiin Himbergin yliopiston (Itävalta) lääketieteellisestä tiedekunnasta Wienin eläinlääketieteellisen tiedekunnan käyttöön. Himbergissä eläimiä säilytettiin patogeeni vapaissa olosuhteissa (*engl. specific pathogen free conditions*). Kokeen aikana eläinten hyvinvointia seurattiin eläinlääkärin toimesta. Koe-eläimiä pidettiin 5 kuukauden ikäiseksi asti 5 eläintä/häkki. Häkki oli kooltaan 56 x 35 x 19 cm (pituus, leveys, korkeus) ja ruokinnassa käytettiin 1324 -ylläpitorehua (Altromin®). 4 kuukauden iässä koe-eläinten halukkuus juoksumattoharjoitteluun testattiin ja ne jaettiin sen mukaisesti juoksupyörällä ja juoksumatolla harjoitteleviin ryhmiin (n = 32), joiden harjoittelu jatkui 23 kuukauden ikään saakka. Lisäksi tutkimuksessa oli 5 ja 23 kuukauden ikäisten rottien harjoittelemattomat kontrolliryhmät. Kokeen aikana eläimiä pidettiin 1/häkki (pituus x leveys x korkeus: 23 x 19.5 x 14 cm) ja ruokinnassa käytettiin myös 1324 -ylläpitorehua (Altromin®). Ravinnon ja veden saanti oli kaikilla ryhmillä *ad libitum*. Vesipullot vaihdettiin kaksi kertaa viikossa. Eläintilojen kosteus (40 - 50 %), lämpötila (22 ± 1°C) ja valoisan ajan pituus (12 tuntia) pidettiin vakiona. Juoksupyörän käyttöä ja juoksuprofiilia seurattiin elektronisten laitteiden (ZAK Medizin Technik, Markheiderfeld, Saksa) avulla. Juoksupyörän ympärysmitta oli 100 cm ja leveys 9 cm. Kierroslukua seurattiin infrapunasensoreiden avulla ja 24 tunnin aikana juostu matka mitattiin. Juoksuhalukkuuden lisäämiseksi päivittäistä ravinnon saantia rajoitettiin 90 %:iin kontrolliryhmän ravinnon saannista. Juoksumattoharjoittelua oli kaksi kertaa päivässä (2 x 20 minuuttia) ja viitenä päivänä viikossa. Juoksualue/rotta oli 9 cm leveä ja 60 cm pitkä. Matto liikkui tasaisella nopeudella 20 m/min. Näin ollen

päivittäinen juoksumatka juoksumatolla oli 800 m. Molempien ryhmät harjoittelivat ja niiden juoksuharjoittelua seurattiin 18 kuukauden ajan 5 kuukauden ikäisestä 23 kuukauden ikään asti. Kokeen aikana rottien juoksumäärä väheni 5 kuukauden ikäisestä (17 500 m/viikko) 23 kuukauden ikään tultaessa (7000 m/viikko). Kokeen päätyttyä eläimet nukutettiin ja puolet eläimistä lopetettiin dekapikaatiolla ja puolet sydänpunktiolla. Lihaskudosnäytteet jäädytettiin nestemäisellä typellä ja säilytettiin kudospankissa -80 °C:ssa. Eläinkokeet on tehty Itävallassa voimassa olevien koe-eläintutkimuksia säätelevien lakien ja asetusten mukaan ja niillä on asianmukainen koe-eläinlupa (*engl. Austrian Commission for Animal Test Affairs*, TVNr.: GZ 68.205/59 - Pr/4/96) Vastuullinen tutkija koe-eläinasiassa on professori Andrus Viidik. Tässä pro gradu -tutkimuksessa käytetty aineisto koostui juoksupyörä- (n = 12) ja juoksumattoryhmästä (n = 8) sekä nuorten ja vanhojen harjoittelemattomasta kontrolliryhmästä (n = 10). Kaikilta ryhmiltä käytettiin *soleus* ja *extensor digitorum longus (EDL)* -lihasten näytteitä. RNA- ja proteiiniieristykset tehtiin Jyväskylän yliopiston terveystieteiden laitoksen laboratoriossa.

1.2. RNA:n eristys ja reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR (RT-qPCR)

Lihaskudosnäytteiden RNA eristettiin TRIzol® reagenssilla valmistajan ohjeen mukaan (Invitrogen™, Life Technologies Ltd, Paisley, UK), jonka jälkeen RNA:n konsentraatio mitattiin NanoDrop1000 -spektrofotometrillä (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). RNA-näytteet käsiteltiin DNAasi entsyymillä ja käännettiin komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) käyttäen kaupallista kittiä valmistajan ohjeen mukaan (Turbo DNA-free™ Kit ja High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Ambion, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). RNA-juoste käännettiin cDNA:ksi Eppendorf Mastercycler -laitteella ja ohjelmalla: 25 °C 10 minuuttia, 37 °C 120 minuuttia, 85 °C 5 minuuttia ja jäädytys 4 °C:seen. Mittauksia varten näytteitä säilytettiin -80 °C:ssa.

OGT:n, OGA:n ja GAPDH:n (glyseraldehydi 3-fosfaatti dehydrogenaasi) lähetti-RNA-tasot määritettiin RT-qPCR -menetelmällä. Määrityksessä käytettiin kaupallista reaktioseosta (iQ™ SYBR® Green Supermix, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) sekä kaupallisia alukkeita (Oligomer Oy) (taulukko 1).

Taulukko 1. RT-qPCR analyysissä käytettyjen alukkeiden nukleotidisekvenssit.

Aluke	5'-pää (<i>engl. forward</i>)	3'-pää (<i>engl. reverse</i>)
GAPDH	5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACT-3'	5'-ATTCTTCCACCTTTGATGC-3'
OGT	5'-ACAGCTCTTCGTCTGTGTCC-3'	5'-AGCAAACCTCTGGGAAGACCT-3'
OGA	5'-AGCCAACTATGTTGCCATCC-3'	5'-AGTCATCACCACGTCCTTCC-3'

Alukkeiden sulamislämpötilan (*engl. annealing temperature*) optimoimiseksi alukkeet testattiin 50 - 62 °C:een lämpötiloissa kahdella eri alukelaimennoksella (1:10 ja 1:100). GAPDH:n mittauksessa käytettiin reaktioseosta (25 µl), joka sisälsi 5 ng cDNA:ta, 300 nM alukkeita ja 1x iQ SYBR Green -reagenssia. OGT:n ja OGA:n mittauksessa reaktioseos sisälsi 10 ng cDNA:ta, 300 nM alukkeita ja 1x iQ SYBR Green -reagenssia. Standardisuoran laimennossarja (100 ng, 20 ng, 2 ng, 0,2 ng) tehtiin referenssinäytteestä, joka oli kaikista eri cDNA-näytteistä koottu seos. Näytteet pipetoitiin 96 -kuoppalevylle (Multiplate® PCR Plates™, Bio-Rad) ja ajettiin RT-qPCR -laitteella (CFX96™ Real Time System C1000 Touch™ Thermal Cycler, Bio-Rad). RT-qPCR -ohjelmassa oli denaturaatiovaihe (95 °C 10 minuuttia), 40 sykliä pidennysvaihetta (95 °C 10 sekuntia, 60 °C 30 sekuntia ja 72 °C 30 sekuntia) ja loppuvaihe (65 °C 5 sekuntia, 95 °C, 4 °C ∞). Tulokset analysoitiin CFX Manager 3.0 -ohjelmalla (Bio-Rad). Ajokertojen väliset erot normalisoitiin referenssinäytteellä, ja standardisuoralta saatuja arvoja käytettiin eri geenien monistumisen tehokkuuden (*engl. efficiency, E*) määrittämiseksi. Jokaisen geenin suhteellinen määrä (*engl. relative quantity, RQ*) laskettiin kaavalla $RQ = E^{(Cq(\text{referenssinäyte}) - Cq(\text{kohde geeni}))}$. OGT:n ja OGA:n lähetti-RNA-määrät normalisoitiin GAPDH:n määrällä. GAPDH:n lähetti-RNA-tasoissa ei havaittu eroa eri lihastyypin välillä.

1.3. Western blot

Lihaskudosnäytteet homogenoitiin kaupallisessa homogointipuskurissa (*engl. tissue extraction reagent 1*, Invitrogen™), joka sisälsi 25 µM antipain-liuosta (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Saksa), 50 µM kymostatiinia (Calbiochem), 1 mM bentsamidiini hydrokloridihydraattia (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 0,5 mM PMSF (fenyylimetyylisulfonyylifluoridi) (Sigma Aldrich), 50 µM PUGNAc (O-(2-Asetamidi-2-deoksi-D-glukopyranosylidiini)amino N-fenyylkarbamaatti) (Sigma Aldrich), 1 mM pepstatiini A:ta (Sigma Aldrich) ja 1 mM Pierce Halt™ proteaasi- ja fosfataasi-

inhibiittorisekoitusta sekä 1 mM EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo) liuosta (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL USA). Näytteet homogenisoitiin Tissue Lyzer -laitteella (Qiagen, Austin, Texas, USA) 5 x 2 minuuttia x 30 Hz. Näytteitä pidettiin 4 °C:ssa 30 minuutin ajan kevyesti sekoittaen ja sentrifugoitiin 4 °C:ssa 10 000g 10 minuutin ajan. Sentrifugointi toistettiin. Proteiinkonsentraatio määritettiin kaupallisella kitillä (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) valmistajan ohjeen mukaan. Absorbanssi mitattiin Multiscan GO -spektrofotometrillä (Thermo Scientific) aallonpituudella 565 nm. Western blot -analyysiä varten näytteitä säilytettiin -80 °C:ssa.

O-GlcNAcyloitujen proteiinien kokonaismäärä selvitettiin Western blot -menetelmällä. Jokaisesta ryhmästä analysoitiin 8 satunnaisesti valitun koe-eläimen lihasnäytteet. Geeli-elektroforeesijossa käytettiin 60 µg proteiininäimennosta/kaivo, johon lisättiin 4x näytekuria (4x Protein Sample Loading buffer, LI-COR, Lincoln, NE, USA). Näytteitä pidettiin 95 °C:ssa 10 minuutin ajan, jonka jälkeen varsinaiset näytteet, referenssinäyte (50 µg proteiinia/näyte) ja standardinäyte (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad) pipetoitiin geelille (Criterion Precast TGX, 4 - 20 %, Bio-Rad). Referenssinäytteenä käytettiin kaikista näytteistä valmistettua seosta, jonka tarkoituksena oli normalisoida geelien välisiä eroja eri ajokerroilla. Geelit ajettiin 4 °C:ssa 300 V 30 minuutin ajan. Blottaus tehtiin nitroselluloosakalvolle (GE Healthcare Life Sciences, Amersham™ Hybond™-ECL, Saksa) 4 C°:ssa 2 tunnin 45 minuutin aikana 300 mA:ssa. Kalvoa inkuboitiin Ponceau S -liuoksessa (0,2 % ponceau S + 5 % etikkahappo) huoneenlämmössä 15 minuutin ajan, huuhdeltiin vedellä ja siirrettiin PBS-liuokseen 5 minuutin ajaksi. Ponceau S -värjäyksen avulla varmistettiin proteiinien siirtyminen geeliltä kalvolle. Blokkauksessa käytettiin kaupallista liuosta (Odyssey Blocking Buffer, LI-COR), jossa kalvoa pidettiin 4 C°:ssa yön yli. Blokkausvaiheen tarkoituksena oli estää vasta-aineiden epäspesifinen sitoutuminen kalvon proteiineihin.

Immunodetektiossa käytettiin kaupallista O-GlcNAc primäärivasta-ainetta (Mouse Monoclonal Anti-β-O-GlcNAc Clone CTD110.6, Sigma Aldrich) ja vuohen anti-Mouse IgG sekundaarivasta-ainetta (H+L) (DyLight 680 conjugate, Pierce). Vasta-ainelaimennokset (CTD110.6 1:1000 ja anti-Mouse 1:2500) valmistettiin 3 % BSA-PBS-0,1 % + Tween20 -liuokseen. Primäärivasta-aineen annettiin olla kalvolla

huoneenlämmössä keinuttaen 1 tunnin ajan. Vasta-aine huuhdeltiin 4 x 5 minuuttia PBS-0,1 % + Tween20 -liuoksella. Sekundaarivasta-aine lisättiin ja kalvon annettiin olla keinutuksessa huoneenlämmössä 45 minuutin ajan, minkä jälkeen vasta-aine huuhdeltiin 4 x 5 minuuttia PBS - 0,1 % + Tween20 -liuoksella. Kalvoa huuhdeltiin lopuksi PBS:llä ja skannattiin Odyssey CLx -laitteella (LI-COR) 700 nm aallonpituudella. Proteiiniyöhykkeiden kvantitoinnissa käytettiin Odysseyn Image Studio 2.0.38 -ohjelmaa (LI-COR). Ajokertojen väliset erot normalisoitiin referenssinäytteellä. Western blot -analyysistä saadut proteiinien kokonais-O-GlcNAcylaatitasot on ilmoitettu ilman GAPDH-normalisointia, koska *soleus*- ja *EDL*-lihaksissa GAPDH:n määrät osoittautuivat poikkeavan huomattavasti toisistaan. GAPDH:ta oli huomattavasti vähemmän *soleus*- kuin *EDL*-lihaksessa. Äskettäin Galpin ym. (2012) ovat raportoineet GAPDH:n määrän vaihtelusta tyyppin I ja II luustolihasten välillä. Tämän pro gradu -työn yhteydessä ei valitettavasti ollut mahdollista uusia Western blot -analyysijä.

1.4. Tilastollinen analyysi

Tulosten tilastolliset analyysit tehtiin IBM SPSS Statistics 20 -ohjelmalla (SPSS, Inc., Somers, NY, USA). Havaintojen asettuminen normaalijakauman mukaisesti testattiin Shapiro-Wilk -testillä ja varianssien homogenisuus Levenen testillä. Koska aineisto ei jakautunut normaalisti ryhmien väliseen vertailuun käytettiin Kruskal-Wallis -testiä. Ryhmien parittaiset vertailut tehtiin Mann-Whitney U -testillä. Korrelaatioanalyysissä käytettiin Spearman -testiä, koska aineisto ei jakautunut normaalisti. Tulosta pidettiin merkitseväenä kun $p < 0,05$.

4. TULOKSET

4.1. OGT- ja OGA-geenejä ilmentetään voimakkaammin rotan *soleus*- kuin *extensor digitorum longus (EDL)* -lihaksessa

Taulukossa 2. on esitetty *soleus*- ja *EDL*-lihasten OGT- ja OGA-geenien lähetti-RNA-tasot sekä proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotaso. OGT- ja OGA-geenien ilmentyminen oli merkitsevästi korkeammalla tasolla *soleus*-lihaksessa kuin *EDL*-lihaksessa: *soleus*-lihaksen lähetti-RNA-tasot olivat 3 - 4 kertaiset verrattuna *EDL*-lihaksen tasoihin.

Taulukko 2. *Soleus*- ja *EDL*-lihasten OGT- ja OGA-entsyymien lähetti-RNA-tasot ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotaso.

	Ryhmä	<i>Soleus</i> x ± SD (n)	p-arvo (lihasten välillä)	<i>EDL</i> x ± SD (n)
OGT (lähetti-RNA)	N	25,47 ± 5,50 (10)	0,001	10,70 ± 7,19 (10)
	K	37,11 ± 11,39 (10)	0,000	8,84 ± 2,20 (10)
	JP	24,43 ± 5,04 (12)	0,000	6,30 ± 2,85 (12)
	JM	37,65 ± 42,97 (8)	0,001	8,04 ± 3,24 (8)
OGA (lähetti-RNA)	N	33,45 ± 18,47 (10)	0,001	11,64 ± 6,13 (10)
	K	40,72 ± 20,11 (10)	0,001	15,07 ± 6,28 (10)
	JP	31,89 ± 8,85 (12)	0,000	6,22 ± 4,03 (12)
	JM	48,48 ± 40,17 (8)	0,003	12,88 ± 7,44 (8)
O-GlcNAc	N	1,35 ± 0,80 (10)	0,916	1,09 ± 0,33 (10)
	K	0,86 ± 0,36 (10)	0,462	0,88 ± 0,22 (10)
	JP	1,75 ± 0,86 (12)	0,834	1,40 ± 0,30 (12)
	JM	1,29 ± 0,47 (8)	1,000	1,23 ± 0,23 (8)

OGT = O-GlcNAc-transferaasin lähetti-RNA-taso (a.u., yksikötön asteikko, *engl. arbitrary units*), OGA = O-GlcNAcaasin lähetti-RNA-taso (a.u.), O-GlcNAc = kokonais-O-GlcNAcyylaatiotaso (a.u.), N = nuoret, harjoittelemattomat, K = vanhat, harjoittelemattomat (kontrolliryhmä), JP = juoksupyöräryhmä, JM = juoksumattoryhmä.

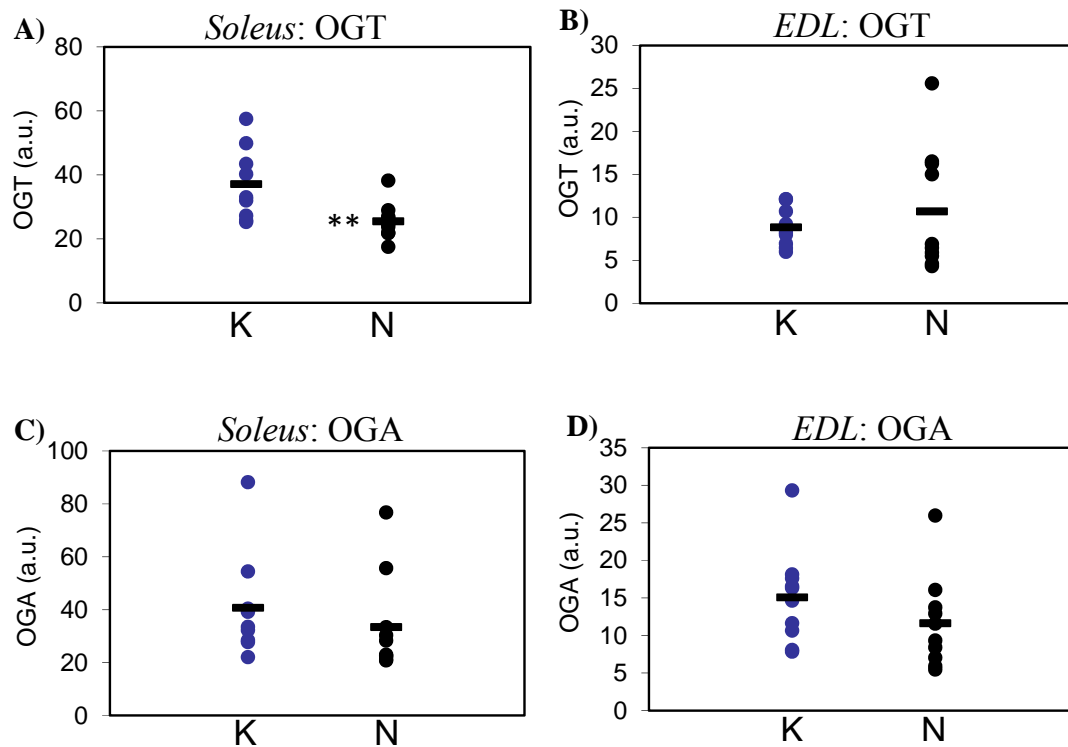
4.2. Ikä lisää OGT-geenin ilmentymistä rotan *soleus*-lihaksessa

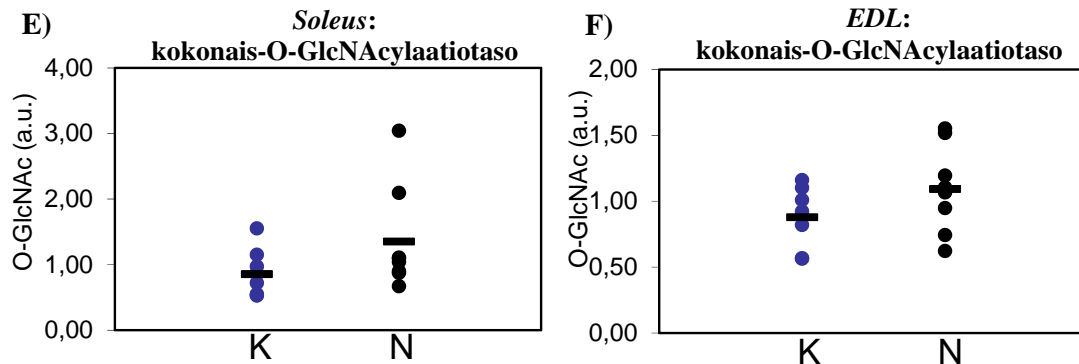
Taulukossa 3. ja kuvassa 2. on esitetty OGT- ja OGA-geenien lähetti-RNA-tasot sekä proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasot *soleus*- ja *EDL*-lihaksissa sekä nuorilla että vanhoilla harjoittelemattomilla rotilla. *Soleus*-lihaksen OGT-geenin ilmentymisen tasossa oli tilastollisesti merkitsevä ero verrattaessa 5 ja 23 kuukauden ikäisiä harjoittelemattomia rottia (taulukko 3. ja kuva 2. A)). OGA-geenin ilmentymisessä eikä proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasossa ollut merkitsevää eroa kummassakaan lihaksessa nuorten ja vanhojen rottien välillä (taulukko 3. ja kuva 2. C) - F)).

Taulukko 3. Iän vaikutus OGT- ja OGA-geenin ilmentymiseen lähetti-RNA-tasolla ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoon *soleus*- ja *EDL*-lihaksessa.

	Lihäs	K x ± SD (n)	N x ± SD (n)	p-arvo
OGT (lähetti-RNA)	<i>soleus</i>	37,11 ± 11,39 (10)	25,47 ± 5,50 (10)	0,007
	<i>EDL</i>	8,84 ± 2,20 (10)	10,70 ± 7,19 (10)	0,650
OGA (lähetti-RNA)	<i>soleus</i>	40,72 ± 20,11 (10)	33,45 ± 18,47 (10)	0,165
	<i>EDL</i>	15,07 ± 6,28 (10)	11,64 ± 6,13 (10)	0,112
O-GlcNAc	<i>soleus</i>	0,86 ± 0,36 (10)	1,35 ± 0,80 (10)	0,115
	<i>EDL</i>	0,88 ± 0,22 (10)	1,09 ± 0,33 (10)	0,141

OGT = O-GlcNAc-transferaasin lähetti-RNA-taso (a.u., yksikötön asteikko, *engl. arbitrary units*), OGA = O-GlcNAcaasin lähetti-RNA-taso (a.u.), O-GlcNAc = kokonais-O-GlcNAcyylaatiotaso (a.u.), N = nuoret, harjoittelemattomat, K = vanhat, harjoittelemattomat (kontrolliryhmä).





Kuva 2. A) – F) OGT- ja OGA-geenin ilmentyminen lähetti-RNA-tasolla ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcylaatiotaso nuorten ja vanhojen harjoittelemattomien rottien *soleus*- ja *EDL*-lihaksessa. OGT = O-GlcNAc-transferaasin lähetti-RNA-taso (a.u.), OGA = O-GlcNAcaasin lähetti-RNA-taso (a.u.), O-GlcNAc = proteiinien kokonais-O-GlcNAcylaatiotaso (a.u.), K = vanhat, harjoittelemattomat (kontrolliryhmä), N = nuoret, harjoittelemattomat. ** $p < 0,01$.

4.3. Fyysinen harjoittelu vähentää OGT-geenin ilmentymistä ja lisää proteiinien kokonais-O-GlcNAcylaatiota rotan *soleus*- ja *EDL*-lihaksissa

Taulukossa 4. ja kuvassa 3. on esitetty OGT- ja OGA-geenin lähetti-RNA-tasot sekä proteiinien kokonais-O-GlcNAcylaatiotasot *soleus*- ja *EDL*-lihaksissa vapaaehtoisesti juoksupyörällä harjoitelleilla ja juoksumatolla juoksetuilla sekä harjoittelemattomilla rotilla. Sekä juoksumatto- että juoksupyöräharjoittelu saivat aikaan muutoksia molempien lihasten mitatuissa O-GlcNAcylaatiota kuvaavissa muuttujissa, mutta hieman eri tavoin.

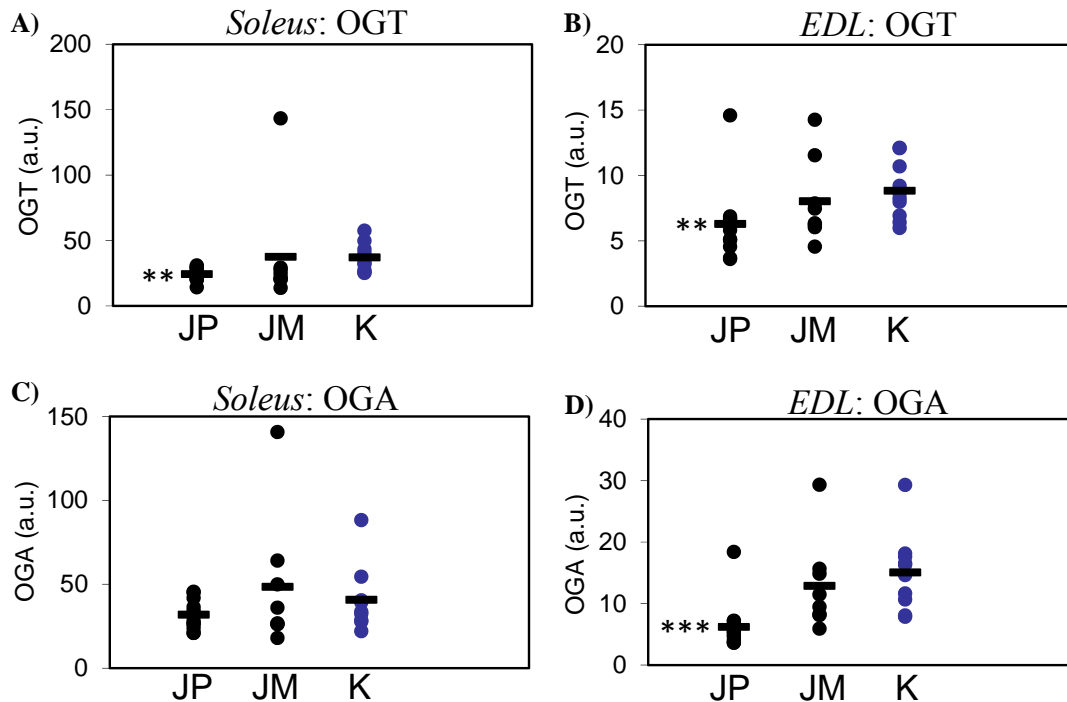
Sekä *soleus*- että *EDL*-lihaksessa OGT-geenin ilmentyminen oli tilastollisesti merkitsevästi matalammalla tasolla juoksupyörällä harjoitelleilla kuin harjoittelemattomilla rotilla (taulukko 4. ja kuva 3. A) ja B)). OGA-geenin lähetti-RNA-taso oli tilastollisesti merkitsevästi matalampi juoksupyörällä harjoitelleilla kuin harjoittelemattomilla rotilla, mutta vain *EDL*-lihaksessa (taulukko 4. ja kuva 3. C) ja D)). Juoksupyörällä harjoitelleiden rottien sekä *soleus*- että *EDL*-lihaksen proteiinien kokonais-O-GlcNAcylaatiotaso oli tilastollisesti merkitsevästi suurempi verrattuna harjoittelemattomien rottien lihasproteiinien kokonais-O-GlcNAcylaatioon (taulukko 4. ja kuva 3. E) ja F)).

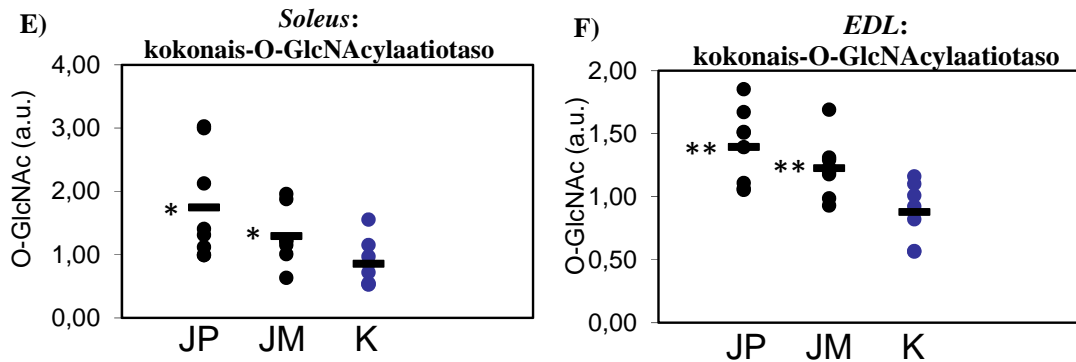
Soleus-lihaksessa OGT- eikä OGA-geenin ilmentymisessä havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa juoksumatto- ja kontrolliryhmän välillä (taulukko 4. ja kuva 3. A)). Juoksumatolla juoksutettujen rottien sekä *soleus*- että *EDL*-lihaksen proteiinien kokonais-O-GlcNAcylationitaso oli tilastollisesti merkitsevästi suurempi verrattuna harjoittelemattomien rottien lihasproteiinien kokonais-O-GlcNAcylationiin (taulukko 4. ja kuva 3. E) ja F)).

Taulukko 4. Fyysisen aktiivisuuden vaikutus OGT- ja OGA-geenin ilmentymiseen lähetti-RNA-tasolla ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcylationitasoon *soleus*- ja *EDL*-lihaksessa.

	Lihäs	K x ± SD (n)	JP x ± SD (n)	p-arvo (K vs. JP)	JM x ± SD (n)	p-arvo (K vs. JM)
OGT (lähetti-RNA)	<i>soleus</i>	37,11 ± 11,39 (10)	24,43 ± 5,04 (12)	0,004	37,65 ± 42,97 (8)	0,073
	<i>EDL</i>	8,84 ± 2,20 (10)	6,30 ± 2,85 (12)	0,007	8,04 ± 3,24 (8)	0,248
OGA (lähetti-RNA)	<i>soleus</i>	40,72 ± 20,11 (10)	31,89 ± 8,85 (12)	0,320	48,48 ± 40,17 (8)	0,700
	<i>EDL</i>	15,07 ± 6,28 (10)	6,22 ± 4,03 (12)	0,001	12,88 ± 7,44 (8)	0,328
O-GlcNAc	<i>soleus</i>	0,86 ± 0,36 (10)	1,75 ± 0,86 (12)	0,012	1,29 ± 0,47 (8)	0,037
	<i>EDL</i>	0,88 ± 0,22 (10)	1,40 ± 0,30 (12)	0,005	1,23 ± 0,23 (8)	0,006

OGT = O-GlcNAc-transferaasin lähetti-RNA-taso (a.u., yksikötön asteikko, engl. arbitrary units), OGA = O-GlcNAcaasin lähetti-RNA-taso (a.u.), O-GlcNAc = kokonais-O-GlcNAcylationitaso (a.u.), K = vanhat, harjoittelemattomat (kontrolliryhmä), JP = juoksupyöräryhmä, JM = juoksumattoryhmä.



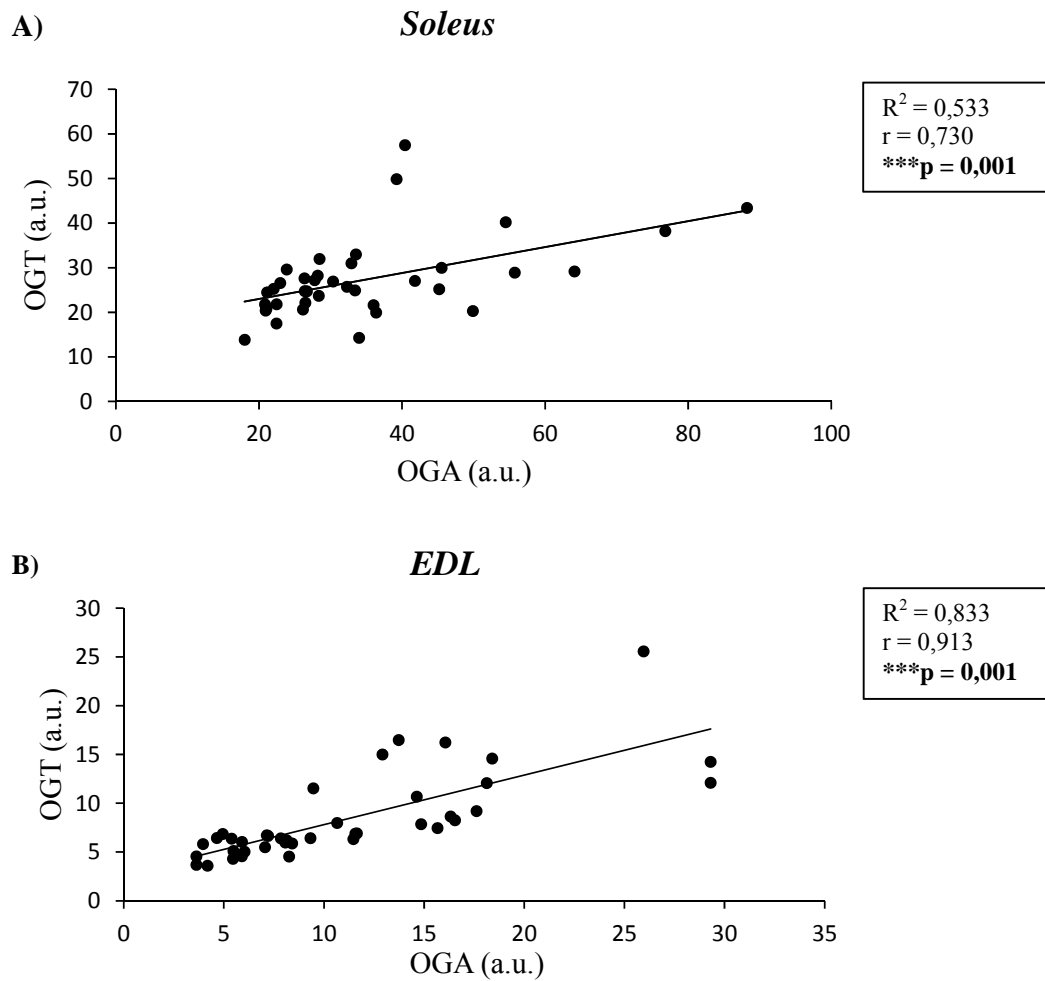


Kuva 3. A) - F) OGT- ja OGA-geenin ilmentyminen lähetti-RNA-tasolla ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotaso juoksupyörällä harjoitelleiden, juoksumatolla juoksetettujen ja harjoittelemattomien rottien *soleus*- ja *EDL*-lihaksessa. OGT = O-GlcNAc-transferaasin lähetti-RNA-taso (a.u.), OGA = O-GlcNAcaasin lähetti-RNA-taso (a.u.), O-GlcNAc = proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotaso (a.u.), JP = juoksupyöräryhmä, JM = juoksumattoryhmä, K = vanhat, harjoittelemattomat (kontrolliryhmä). *p < 0,05, **p < 0,01, *p < 0,001.**

4.4. OGT-geenin ilmentyminen korreloi positiivisesti OGA-geenin ilmentymisen kanssa sekä *soleus*- että *EDL*-lihaksessa

Korrelaatiot laskettiin yhdistämällä kaikki ryhmät. *Soleus*-lihaksessa OGT-geenin lähetti-RNA-taso korreloi tilastollisesti merkitsevästi OGA-geenin lähetti-RNA-tason kanssa (kuva 4. A)), mutta merkitsevää korrelaatiota proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotason ja OGT- ja OGA-geenin ilmentymisen välillä ei *soleus*-lihaksessa havaittu.

Myös *EDL*-lihaksessa OGT- ja OGA-geenin ilmentymisen välillä oli tilastollisesti merkitsevä positiivinen korrelaatio (kuva 4. B)). OGA-geenin lähetti-RNA-tason ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotason välillä oli tilastollisesti merkitsevä negatiivinen korrelaatio (Spearman: $r = -0,307$, *p = 0,037). OGT-geenin ilmentymisen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotason välillä ei havaittu merkitsevää korrelaatiota *EDL*-lihaksessa.



Kuva 4. OGT- ja OGA-geenien ilmentymisen välinen yhteys A) soleus- ja B) EDL-lihaksissa. OGT = O-GlcNAc-transferaasin lähetti-RNA-taso (a.u.), OGA = O-GlcNAcaasin lähetti-RNA-taso (a.u.).

5. TULOSTEN TARKASTELU

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää koe-eläinasetelmassa, miten ikä ja fyysinen aktiivisuus vaikuttavat supistumisominaisuuksiltaan erityyppisten luustolihasproteiinien O-GlcNAcylaatioon. O-GlcNAcylaation avulla säädelään proteiinien toimintaa liittämällä happimolekyylin välityksellä GlcNAc-sokeriosia seriini- tai treoniini-aminohappoihin. GlcNAcin liittämistä katalysoi O-GlcNAc-transferaasi (OGT) ja poistamista O-GlcNAcaasi (OGA) -entsyymi. Tietoisuus O-GlcNAcylaation merkityksestä proteiinien toimintaa säätelevänä tekijänä on lisääntynyt viimevuosien aikana, kun tutkimukset ovat osoittaneet O-GlcNAcylaatiotasojen vaihtelun olevan yhteydessä

erilaisten mm. ikääntymisen myötä esiintyvien sairauksien syntyyn (ks. yleiskatsaus Zachara ja Hart, 2004). Lihaskato eli sarkopenia on yksi merkittävistä ikääntymisen aiheuttamista seurauksista, ja koe-eläintutkimuksissa O-GlcNAcyylaatiolla on havaittu olevan yhteys lihasproteiinien homeostaasin ylläpitoon ja lihasatrofian säätelyyn luustolihasissa (Cieniewski-Bernard ym., 2005; Mounier ym., 2009; Huang ym., 2010). Fyysistä aktiivisuutta pidetään merkittävimpana keinona lihasmassan ja -kestävyyden ylläpitämiseksi (Dudley ym., 1991; Schulze ym., 2002), mutta molekyyllitasolla liikunnan vaikutusmekanismeja lihassolun toimintaan ei useista tutkimuksista huolimatta tunneta kovin hyvin. Tässä pro gradu -tutkimuksessa selvitettiin iän ja elinikäisen fyysisen aktiivisuuden vaikutusta OGT- ja OGA-entsyymien ilmentymiseen lähetti-RNA-tasolla sekä proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoon rotan *soleus*- ja *EDL*-lihaksissa.

Lihaskudostyyppin vaikutusta entsyymien ilmentymiseen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoon verrattiin kahden supistumisominaisuuksiltaan erilaisen luustolihasen (*soleus* ja *EDL*) välillä. Sekä OGT- että OGA-geenin ilmentyminen oli merkitsevästi suurempaa *soleus*- kuin *EDL*-lihaksessa kaikissa tutkituissa koe-eläinryhmissä.

Iän vaikutusta entsyymien ilmentymiseen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoon selvitettiin vertaamalla nuorten, sukukypsien, 5 kuukauden ikäisten harjoittelemattomien rottien lihaksia vanhojen, 23 kuukauden ikäisten harjoittelemattomien rottien lihaksiin. Tulokset osoittivat, että ikä on yhteydessä OGT-geenin ilmentymisen nousuun *soleus*-lihaksessa. Muita tilastollisesti merkitseviä eroja entsyymien geenitason ilmentymisessä ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasossa nuorten ja vanhojen rottien välillä ei havaittu.

Fyysisen aktiivisuuden vaikutusta tutkittiin sekä vapaaehtoisesti juoksupyörällä harjoitelleilla että juoksumatolla juoksetetuilla rotilla 5 kuukauden iästä 23 kuukauden ikään. Juoksupyöräharjoittelun todettiin vähentävän OGT-geenin ilmentymistä sekä *soleus*- että *EDL*-lihaksessa. OGA:n lähetti-RNA-tasossa todettiin merkitsevä ero *EDL*-lihaksessa: juoksupyörällä harjoitelleilla rotilla OGA-geeni ilmeni merkitsevästi matalammalla tasolla kuin kontrollieläimillä tai juoksumatolla juoksetetuilla rotilla. Sekä *soleus*- että *EDL*-

lihaksessa proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoa oli merkitsevästi suurempi juoksupyörällä harjoitelleilla ja juoksumatolla juoksetetuilla kuin harjoittelemattomilla eläimillä.

Tässä pro gradu -tutkimuksessa selvitettiin myös OGT- ja OGA-geenien ilmentymisen yhteyttä proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoon luustolihasessa. Entsyymien ilmentymisen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaation välillä ei ollut merkitsevää korrelaatiota. Sen sijaan OGT:n ja OGA:n ilmentymisen välillä havaittiin merkitsevä positiivinen korrelaatio sekä *soleus*- että *EDL*-lihaksessa. Korrelaatiokerroin oli suurempi *EDL*- kuin *soleus*-lihaksessa, mutta lihasten välinen ero ei ollut merkitsevä.

5.1. O-GlcNAcyylaatio supistumisominaisuuksiltaan erityyppisissä lihaksissa

Tämän tutkimuksen yksi tärkeä löydös oli, että OGT- ja OGA-geenin ilmentyminen lähetti-RNA-tasolla vaihtelee supistumisominaisuuksiltaan erilaisten lihasten välillä. *Soleus*-lihaksessa sekä OGT- että OGA-geenin ilmentymisen taso oli 3 - 4 kertainen *EDL*-lihaksen verrattuna riippumatta eläinten iästä tai fyysisestä aktiivisuudesta. Tämä viittaa siihen, että kapasiteetti proteiinien toiminnan säätelyyn O-GlcNAc-välitteisesti olisi suurempaa hitaassa, asentoa ylläpitävässä ja aerobista energia-aineenvaihduntaa hyödyntävässä *soleus*-lihaksessa kuin nopeammassa, dynaamiseen lihastoimintaan sopeutuneessa ja glykolyyttistä energia-aineenvaihduntaa hyödyntävässä *EDL*-lihaksessa. Tämä johtopäätös on yhdenmukainen Cieniewski-Bernard'n ym. (2005) julkaisemien tutkimustulosten kanssa, joiden mukaan myös OGT-entsyymin aktiivisuus on suurempi rotan *soleus*- kuin *EDL*-lihaksessa. Vaikka tuloksen yleistettävyydestä kaikkiin hitaisiin ja nopeisiin luustolihasiin tarvitaan lisänäyttöä, oletettavaa on, että supistumisominaisuuksiltaan erityyppisissä lihassoluissa on eroa sekä proteiinien O-GlcNAcyylaatiossa että O-GlcNAcyylaatiokapasiteetissa. Näin ollen myös O-GlcNAcyylaatiovälitteinen solunsisäinen signaali voi vaihdella lihassolutyypeittäin.

5.2. Iän yhteys lihasproteiinien O-GlcNAcylointiin

Tässä pro gradu -tutkimuksessa tutkituista kahdesta luustolihasesta ja tutkituista muuttujista vain *soleus*-lihaksen OGT-geenin lähetti-RNA-taso oli matalampi nuorilla kuin vanhoilla rotilla, mikä viittaa lihasspesifiin ikävasteeseen proteiinien O-GlcNAcylointiin ja O-GlcNAc-välitteisessä signaloinnissa. Lihastyypistä riippuvaa ikävastetta tukee myös Fülöp ym. (2008) rotan *gluteus maximus*-lihaksella ja sydänlihaksella tekemä tutkimus. Nuorten, 5 kuukauden ikäisten ja vanhojen, 24 kuukauden ikäisten rottien *gluteus maximus*-lihaksessa ei ollut merkitsevää eroa OGT:n eikä OGA:n lähetti-RNA-tasoissa eikä entsyymiproteiinien määrissä. GFAT:n lähetti-RNA-taso oli suurempi vanhojen kuin nuorten ryhmässä, mutta UDP-GlcNAcin määrässä ei havaittu merkitsevää muutosta. Sen sijaan sydänlihaksessa ikä lisäsi OGA-geenin ilmentymistä lähetti-RNA-tasolla. OGT-geenin lähetti-RNA-taso säilyi muuttumattomana, mutta proteiinitasolla OGT:n määrä väheni merkitsevästi. Proteiinien kokonais-O-GlcNAcylointi-tasot olivat merkitsevästi suuremmat vanhojen kuin nuorten ryhmässä sekä luusto- että sydänlihaksessa. Luustolihasessa O-GlcNAcylointi-tason nousu oli maltillinen (30 - 40 %), kun taas sydänlihaksessa muutos oli jopa kaksinkertainen. Tutkimustulokset osoittavat, että sydänlihas saattaisi olla alttiimpi iän yhteydessä tapahtuvalle O-GlcNAcylointi-tason nousulle kuin luustolihas. Iän voidaan myös olettaa vaikuttavan proteiinien O-GlcNAcylointiin säätelemällä OGT:n ilmentymistä eri tavalla sydän- ja luustolihasessa, sillä OGT:n ilmentyminen väheni merkitsevästi O-GlcNAcylointi-tason noustessa sydänlihaksessa, mutta ei luustolihasessa. Sydänlihaksessa O-GlcNAcylointi-tason nousun ehdotettiin selittyvän kohonneella GFAT-entsyymien lähetti-RNA-tasolla sekä UDP-GlcNAc-tasoilla (Fülöp ym., 2008).

Fülöp`n ym. (2006) aikaisemmin julkaisemat tutkimustulokset sydänlihaksesta kuitenkin tukevat tässä pro gradu -tutkimuksessa esitettyjä tuloksia iän yhteydestä proteiinien kokonais-O-GlcNAcylointi-tasoon. Fülöp ym. (2006) tarkastelivat iän yhteyttä sydänlihaksen O-GlcNAcylointiin nuorilla sukukypsillä, 6 viikon ikäisillä, ja nuorilla aikuisilla, 22 viikon ikäisillä rotilla. Tutkimuksessa käytettiin sekä terveitä että diabetesta sairastavia rottia. Ikä vähensi merkitsevästi OGT:n ilmentymistä proteiinitasolla ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcylointi-tasoa sekä terveillä että diabetesta sairastavilla

rotilla. Kokonais-O-GlcNAcyylaatiotason laskusta riippumatta ikä lisäsi merkitsevästi suurimassaisten, yli 205 kDa proteiinien O-GlcNAcyylaatiota sekä UDP-GlcNAcin määrää diabetisilla, mutta ei terveillä rotilla. Vanhoilla diabetisilla rotilla todettiin myös sydämen toiminnan heikentyneen. Verrattaessa kahta eri rottakantaa ts. *Zucker* ja *Sprague-Dawley*, todettiin, että OGT:n ilmentyminen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotaso olivat merkitsevästi matalampia vanhojen kuin nuorten ryhmässä kannasta riippumatta (Fülop ym., 2006).

Fülop`n ym. (2006) tutkimuksessa käytettiin varsin nuoria rottia. Kuuden viikon ikäiset rotat ovat juuri saavuttamassa 6 - 7 viikon sukukypsyytiän ja 22 viikon ikäiset rotat ovat parhaimmillaan lisääntymisikäisiä. Tässä pro gradu -tutkimuksessa nuorimmat 5 kuukauden ikäiset rotat vastasivat Fülop`n ym. (2006) tutkimuksen vanhinta ryhmää ja vanhimmat 23 kuukauden ikäiset eivät enää olleet lisääntymisikäisiä vaan lähempänä eliniän odotteen loppupäätä. Näin ollen Fülop`n ym. (2006) tutkimus käsittelee ensisijaisesti kasvukauden ja lisääntymisiän aikaisia tapahtumia. Rotilla tehdyissä tutkimuksissa lihasmassan on todettu vähentyvän merkitsevästi 9 kuukauden iästä 27 - 30 kuukauden ikään (Holloszy ym., 1991; Brown ym., 1992). Näin ollen pidempi tarkasteluväli osoittaa paremmin ikääntymisen vaikutusta lihasproteiinien O-GlcNAcyylaatioon ja tason yhteyttä lihasten heikkenemiseen. Rottien sydänlihaksesta tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet iän vaikuttavan yksittäisten proteiinien O-GlcNAcyylaatioon eri tavalla terveillä ja diabetesta sairastavilla rotilla. Fülop`n ym. (2006) tekemässä tutkimuksessa ikä lisäsi suurikokoisten proteiinien O-GlcNAcyylaatiota sydänlihaksessa diabetesta sairastavilla rotilla. Terveillä eläimillä vastaavanlaista muutosta ei havaittu. Fülop`n ym. (2008) tekemässä tutkimuksessa ikä lisäsi pienikokoisten, alle 50 kDa proteiinien O-GlcNAcyylaatiota terveiden rottien sekä sydän- että luustolihasessa. Tässä pro gradu -tutkimuksessa yksittäisten proteiinien O-GlcNAcyylaatiota ei tutkittu.

Cieniewski-Bernard`n ym. (2005) tutkimuksessa kohonneen OGT:n entsyymiaktiivisuuden havaittiin olevan yhteydessä kohonneeseen O-GlcNAcyylaatiotasoon rotan *soleus*-lihaksessa. Tässä pro gradu -tutkimuksessa ei tehty vastaavanlaista havaintoa. Muissa tutkimuksissa (Fülop ym., 2006; Belke, 2011; Cox ja Marsh, 2013) OGT:n lähetti-RNA- ja/tai proteiinitason on todettu muuttuvan yhtäläisesti proteiinien kokonais-O-

GlcNAcyylaatiotason kanssa sekä luusto- että sydänlihaksessa. Ainoastaan yhdessä tutkimuksessa ikä vähensi OGT:n ilmentymistä proteiinitasolla ja lisäsi proteiinien O-GlcNAcyylaatiota rotan sydänlihaksessa (Fülop ym., 2008). Tämän pro gradu -tutkimuksen johtopäätöksiä OGT- ja OGA-geenien ilmentymisen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotason välisestä yhteydestä rajoittaa se, että Western blot -analyysissä on käytetty normalisoimattomia arvoja (ks. materiaalit ja menetelmät).

Useat eri tutkimukset ovat osoittaneet OGT- ja OGA-entsyymien ilmentymisen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotason muutoksella olevan yhteys insuliiniresistenssin muodostumiseen lihaskudoksessa (Buse ym., 2002; McClain ym., 2002). Buse'n ym. (2002) tutkimuksessa GLUT1:n ilmentymisen kasvu lisäsi heksosamiinin synteesireitin lopputuotteena muodostuneen UDP-GlcNAc-substraatin määrää sekä GLU4 ja/tai GLUT4 glukoosireseptoreihin liittyneiden proteiinien O-GlcNAcyylaatiota hiiren luustolihasessa (Buse ym., 2002). McClain ym. (2002) havaitsivat OGT:n lähetti-RNA-tason nousun olevan yhteydessä insuliiniresistenssin muodostumiseen hiiren luustolihasessa. Ylimäärin OGT:ta ilmentävien (*engl. overexpression*) hiirten ryhmässä seerumin insuliini- ja leptiinipitoisuuden havaittiin olevan suurempi kuin OGT:n normaalimäärää ilmentävien kontrolliryhmässä. Näin ollen OGT:lla saattaisi olla keskeinen rooli insuliinin vaikutuskohteena heksosamiinin synteesireitillä, sillä insuliinitasojen nousun havaittiin lisäävän OGT:n ilmentymistä GLUT4:n proteiinitason sekä glukoosietä rasvahappotasojen pysyessä muuttumattomina (McClain ym., 2002). Tässä pro gradu -tutkimuksessa esitetyt tulokset yhdessä muiden tutkimustulosten kanssa vahvistavat käsitystä iän yhteydestä OGT:n lähetti-RNA-tason nousuun. Tutkimustulokset tukevat hypoteesia, että OGT:n tason nousu olisi yhteydessä ikääntymisen myötä esiintyvän insuliiniresistenssin muodostumiseen luustolihasessa.

5.3. Fyysisen aktiivisuuden yhteys lihasproteiinien O-GlcNAcyylaatioon

Tässä pro gradu -tutkimuksessa selvitettiin kahden erilaisen juoksuharjoittelun yhteyttä luustolihasproteiinien O-GlcNAcyylaatioon. Proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatioissa tapahtuneet muutokset olivat samansuuntaiset ja tilastollisesti merkitsevät kummassakin

harjoitteluryhmässä sekä *soleus*- että *EDL*-lihaksessa verrattaessa tulosta harjoittelemattomien kontrolliryhmään. Proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasossa oli kuitenkin eroa juoksupyörä- ja juoksumattoryhmän välillä kummassakin lihaksessa. Harjoittelumuotojen välinen ero proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasossa saattaisi selittyä stressitekijöiden vaikutuksella. Tutkimukset ovat osoittaneet pakotetun juoksumattoharjoittelun aiheuttavan koe-eläimille enemmän stressiä kuin vapaaehtoisen juoksupyöräharjoittelun (Tharp ja Pruess, 1991; Moraska ym., 2000). Solustressin tiedetään olevan yhteydessä proteiinien O-GlcNAcyylaatioon (ks. yleiskatsaus Groves ym., 2013), ja stressin lisääntyminen saattaisi tässä tapauksessa vähentää luustolihasproteiinien O-GlcNAcyylaatiota. O-GlcNAcyylaatiotason muutos saattaisi selittyä osittain myös samojen kohdeaminohappojen ja -proteiinien fosforylaatiolla (Wang ym., 2007; Wang ym., 2008; Wang ym., 2010), sillä fosforyloinnin seurauksena vähemmän paikkoja vapautuu O-GlcNAcyylaatiolle ja vaikutus havaittaisiin kokonais-O-GlcNAcyylaatiotason pienenemisenä.

Mounier ym. (2009) selvittivät vuodelevon ja vuodelevon aikana tehdyn yhdistetyn kestävyys- ja vastusharjoittelun vaikutuksia lihaksen supistusominaisuuksiin ja niitä sääteleviin proteiineihin *vastus lateralis*- ja *soleus*-lihaksessa. Vuodelevon todettiin olevan yhteydessä proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotason laskuun ja lihasten heikkenemiseen *vastus lateralis*-lihaksessa. Proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoa ei mitattu *soleus*-lihaksesta. O-GlcNAcyylaatiotason pienenemisen ja heikentyneen voimantuotokyvyn ehdotettiin olevan yhteydessä heikentyneeseen Ca^{2+} :n sitoutumiseen. Myös Hedou`n ym. (2007) tekemässä tutkimuksessa proteiini-proteiini vuorovaikutuksen muodostumiseen osallistuvan O-GlcNAc-yksikön todettiin vähentävän Ca^{2+} :n affiniteettia luustolihaksessa (Hedou ym., 2007). Mounier`n ym. (2009) tutkimuksen mukaan vuodelevon aikainen yhdistetty kestävyys- ja vastusharjoittelu ehkäisi proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotason muutosta. Mahdollisena selityksenä pidettiin supistumiseen osallistuvien proteiinien ilmentymistason säilymistä ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotason ylläpitoa, jonka on havaittu estävän proteiinien hajotusta (Cieniewski-Bernard ym., 2004). Harjoittelun vaikutuksesta sekä nopeiden että hitaiden lihassolujen poikkipinta-alan, maksimivoimantuoton ja kalsiumaffiniteetin havaittiin säilyneen tai jopa lisääntyneen vuodelevosta huolimatta sekä *vastus lateralis*- että *soleus*-

lihaksessa. Selityksenä lihasvoiman säilymiselle ehdotettiin kalsiumin sitoutumisvoimakkuuden säilymistä lihassupistumiseen osallistuvissa proteiineissa (Mounier ym., 2009). Nämä tutkimustulokset tukevat hypoteesia, jonka mukaan tässä pro gradu -tutkimuksessa havaittu proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotason nousu juoksuharjoitteluun osallistuneiden ryhmässä saattaisi suojella lihasproteiineja hajoitukselta ja ylläpitää lihasten supistustoimintaa fyysisen harjoittelun yhteydessä.

Cox`n ja Marsh`n (2013) tekemässä tutkimuksessa maltillinen juoksumattoharjoittelu lisäsi proteiinien O-GlcNAcyylaatiota diabetesta sairastavien hiirten sydänlihaksessa. Tutkimuksessa neljän viikon juoksumattoharjoittelu lisäsi merkittävästi proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoa sekä pienten että keskikokoisten proteiinien O-GlcNAcyylaatiota. OGT:n ja OGA:n lähetti-RNA-tasoissa ei havaittu muutosta. Juoksumattoharjoittelun vaikutusta tutkittiin myös terveillä hiirillä, mutta merkittävää muutosta entsyymien ilmentymisessä lähetti-RNA-tasolla ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasossa ei havaittu. Tutkimuksessa selvitettiin myös juoksumattoharjoittelun yhteyttä fysiologisen hypertrofian muodostumiseen osallistuvan proteiinikompleksin (mSin3A/HDAC1/2) O-GlcNAcyylaatioon. Kompleksin aktiivisuudessa ei havaittu suurta muutosta, mutta sillä ehdotettiin olevan rooli maltillisen harjoittelun positiivisten vaikutusten ilmenemiseen diabetesta sairastaneiden eläinten sydänlihaksessa (Cox ja Marsh, 2013). Proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasossa tapahtuneet muutokset ovat yhtenevät tässä pro gradu -tutkimuksessa esitettyjen tulosten kanssa. OGT- ja OGA-geenien ilmentyminen lähetti-RNA-tasolla eroaa Cox`n ja Marsh`n (2013) julkaisemista tutkimustuloksista. Tutkimusten välinen ero entsyymien geenien ilmentymisessä saattaisi selittyä tutkimuksessa käytettyjen eläinten terveydentilalla (diabetes vs. terveet) ja lihaskudostyypillä (sydän- vs. luustolihas).

Tässä pro gradu -tutkimuksessa esitetyt tulokset juoksupyörä- ja juoksumattoharjoittelun vaikutuksesta proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoon eroaa uintiharjoittelusta saaduista tutkimustuloksista. Belke`n (2011) julkaisemassa tutkimuksessa seurattiin kuusi viikkoa kestäneen uintiharjoittelun vaikutusta OGT- ja OGA-entsyymien ilmentymiseen lähetti-RNA- ja proteiinitasolla sekä proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoon hiirten sydänlihaksessa. Tutkimuksessa OGT:n ja OGA:n lähetti-RNA-taso oli merkittävästi

pienempi harjoitteluryhmässä kuin harjoittelemattomien ryhmässä, kuten myös tässä pro gradu -tutkimuksessa. Uintiharjoittelu vähensi merkitsevästi OGA:n ilmentymistä myös proteiinitasolla, mutta OGT:n ilmentymistä proteiinitasolla ei tutkittu. Uintiharjoittelu vähensi myös proteiinien O-GlcNAcyklaatiota (Belke, 2011), kun taas tässä pro gradu -tutkimuksessa juoksuharjoittelu lisäsi proteiinien O-GlcNAcyklaatiota. Bennett`n ym. (2013) julkaisemassa tutkimuksessa proteiinien kokonais-O-GlcNAcyklaatiotaso oli merkitsevästi pienempi uintiharjoitteluryhmässä kuin harjoittelemattomien kontrolliryhmässä diabetesta sairastaneiden hiirten sydänlihaksessa. OGT-geenin lähetti-RNA-tasossa ei havaittu muutosta. Sen sijaan OGA-geenin ilmentyminen oli lähetti-RNA- ja proteiinitasolla suurempaa harjoitteluryhmässä kuin kontrolliryhmässä (Bennett ym., 2013). Uintiharjoittelusta saadut tutkimustulokset eroavat myös Cox`n ja Marsh`n (2013) julkaisemista juoksuharjoittelun tuloksista. Cox`n ja Marsh`n (2013) tekemässä tutkimuksessa juoksuharjoittelu lisäsi proteiinien O-GlcNAcyklaatiota diabetesta sairastaneiden hiirten sydänlihaksessa. Näin ollen voidaan esittää, että lihasten erilainen kuormittuminen juoksu- ja uintiharjoittelussa ilmenee myös lihasproteiinien O-GlcNAcyklaatioissa ja mahdollisesti myös O-GlcNAcyklaatio-välitteisessä signaloinnissa.

O-GlcNAcyklaatiotason vaihtelun yhteyttä lihaksen rakenteeseen ja toimintaan on tutkittu sekä sydän- että luustoliuksessa. Useat tutkimukset ovat osoittaneet proteiinien kokonais-O-GlcNAcyklaatiotason muutoksella olevan yhteys fysiologisen hypertrofian ja lihasatrofian muodostumiseen. Watson`n ym. (2010) julkaisemassa tutkimuksessa O-GlcNAcyklaatiotason nousulla havaittiin olevan yhteys sydänlihaksen heikentyneeseen toimintaan hiirillä (Watson ym., 2010), kun taas Belke (2011) yhdisti O-GlcNAcyklaatiotason laskun fysiologisen hypertrofian muodostumiseen hiiren sydänlihaksessa (Belke ym., 2011). Watson ym. (2010) osoittivat, ettei patologisen hypertrofian tapauksessa lihasmassan määrän lisääntyminen ole automaattisesti yhteydessä O-GlcNAcyklaatiotason nousuun sydänlihaksessa (Watson ym., 2010). Huang ym. (2010) julkaisemassa tutkimuksessa OGA-geenin vaimentamisella havaittiin olevan yhteys O-GlcNAcyklaatiotasojen nousuun ja apoptoositekijöiden aktivoitumiseen hiiren luustoliuksessa. OGA-entsyymin toiminnan estämisen havaittiin myös aiheuttavan huomattavaa lihasatrofiaa ja jopa koe-eläinten kuolemaa (Huang ym., 2010). Lawler`n ym. (2003) julkaisemassa tutkimuksessa lihasten käyttämättömyyden todettiin lisäävän solujen

oksidatiivista stressiä. Oksidatiivisen stressin vaikutuksesta proteiineja suojelevan O-GlcNAcylation määrä väheni ja proteiinien hajoitus lisääntyi, jonka seurauksena havaittiin lihasten heikkenemistä (Lawler ym., 2003).

Tässä pro gradu -tutkimuksessa esitetyt tulokset vastaavat Cieniewski-Bernard`n ym. (2005) julkaisemia tutkimustuloksia harjoittelemattomuuden vaikutuksesta proteiinien kokonais-O-GlcNAcylationin laskuun *soleus*-lihaksessa. *EDL*-lihaksen suhteen tutkimustulokset eivät olleet yhtenevät tutkimusten välillä. Cieniewski-Bernard`n ym. (2005) tutkimuksessa 14 ja 28 päivää kestäneen raajojen käyttämättömyyskokeen (*engl. hindlimb unloading*) jälkeen proteiinien kokonais-O-GlcNAcylationin taso oli merkittävästi alhaisempi käyttämättömässä *soleus*-lihaksessa kuin käytössä olleessa lihaksessa. Käyttämättömänä olleen *soleus*-lihaksen havaittiin myös merkittävästi atrofioiduneen. Käyttämättömässä *soleus*-lihaksessa OGT:n entsyymiaktiivisuus oli pienempi ja OGA:n suurempi kuin käytössä olleessa lihaksessa. *EDL*-lihaksessa proteiinien kokonais-O-GlcNAcylationin taso oli merkittävästi suurempi käyttämättömässä lihaksessa kuin käytössä olleessa *EDL*-lihaksessa, eikä merkittävää lihaksen heikkenemistä havaittu. Käyttämättömässä *EDL*-lihaksessa kummankin entsyymin aktiivisuus oli suurempi kuin käytössä olleessa lihaksessa. OGT- ja OGA-entsyymien ilmentymisessä lähetti-RNA-tasolla ei havaittu merkittävää muutosta kummassakaan lihaksessa (Cieniewski-Bernard ym., 2005), kun taas tässä pro gradu -tutkimuksessa entsyymien ilmentyminen oli suurempaa harjoittelemattomien ryhmässä kuin harjoitteluryhmissä sekä *soleus*- että *EDL*-lihaksessa.

Tämä pro gradu -tutkimus tuo esille aivan uutta tietoa elinikäisen fyysisen aktiivisuuden yhteydestä OGT- ja OGA-geenien ilmentymiseen ja proteiinien O-GlcNAcylationiin luustoliikaksessa. Tässä tutkimuksessa esitetyt tulokset vahvistavat käsitystä juoksuharjoittelun yhteydestä proteiinien kokonais-O-GlcNAcylationin nousuun luustoliikaksessa, ja aikaisemmin julkaistuihin tutkimustuloksiin viitaten voidaan esittää, että O-GlcNAcylationin tason nousu suojelisi lihasproteiineja hajoitukselta ja ylläpitäisi lihasten supistustoimintaa fyysisen harjoittelun yhteydessä. Proteiinien alhaisempi kokonais-O-GlcNAcylationin taso harjoittelemattomien ryhmässä kuin harjoitteluryhmissä

saattaa myös olla yhteydessä luustolihasen toiminnalliseen ja rakenteelliseen heikkenemiseen.

5.4. OGT- ja OGA-entsyymien ilmentymisen säätely ovat kytkeytyneet toisiinsa?

OGT- ja OGA-entsyymien geenien ilmentymisen välillä todettiin merkitsevä positiivinen korrelaatio sekä *soleus*- että *EDL*-lihaksessa. Korrelaatiokertoimet olivat kummassakin lihaksessa korkeat eikä lihasten välillä ollut merkitsevää eroa. OGA:n lähetti-RNA-taso näyttäisi selittävän 50 - 80 % OGT:n lähetti-RNA-tasosta. Tämä viittaa siihen, että näiden kahden entsyymin ilmentymisen säätely on vahvasti kytkeytynyt yhteen ainakin RNA-tasolla. OGT:n ja OGA:n lähetti-RNA-tasojen yhtäläisestä (*engl. tandem*) muuttumisesta on raportoitu myös hiiren sydänlihaksessa (Belke, 2011). Siitä, säätelevätkö OGT- ja OGA-geenien ilmentymistä samat tekijät, missä määrin ja mitä nämä tekijät ovat, tarvitaan lisää tutkimustietoa.

Tässä tutkimuksessa selvitettiin myös OGT- ja OGA-entsyymien ilmentymisen yhteyttä proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoon *soleus*- ja *EDL*-lihaksessa. Entsyymien ilmentymisen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotason välillä ei havaittu korrelaatioita tässä tutkimuksessa. Entsyymien lähetti-RNA- ja/tai proteiinitasojen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotason välisestä yhteydestä sydän- ja luustolihasessa on toistaiseksi vain vähän havaintoja (Cieniewski-Bernard ym., 2005; Fülöp ym., 2006; Belke, 2011). OGT- ja OGA-geenien ilmentymisen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotason välisestä korreloimattomuudesta huolimatta eri kokoluokkaan kuuluvien proteiinien kohdalla korrelaatiota saattaisi esiintyä.

5.5. Yhteenveto

Tämän tutkimuksen tulosten perusteella voidaan todeta, että ikä ja elinikäinen fyysinen aktiivisuus vaikuttavat OGT- ja OGA-geenien ilmentymiseen lähetti-RNA-tasolla ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyylaatiotasoon supistumisominaisuuksiltaan erilaisissa

luustolihaaksissa. Tässä tutkimuksessa osoitettiin, että ikä lisää OGT-geenin ilmentymistä *soleus*-lihaksessa, ja yhdessä muiden tutkimustulosten kanssa (Buse ym., 2002; McClain ym., 2002; Fülöp ym., 2006) tämä havainto vahvistaa käsitystä iän yhteydestä OGT-geenin lähetti-RNA-tason nousuun ja tason nousun mahdollisesta yhteydestä ikääntymisen myötä esiintyvän insuliiniresistenssin muodostumiseen luustolihaaksessa. Fyysinen harjoittelu vähensi OGT-geenin ilmentymistä ja lisäsi proteiinien O-GlcNAcyklaatiota sekä *soleus*- että *EDL*-lihaksessa. Fyysinen harjoittelu lisäsi myös OGA:n ilmentymistä *EDL*-lihaksessa. Proteiinien kokonais-O-GlcNAcyklaatiotasoina oli kuitenkin eroa juoksupyörä- ja juoksumattoryhmän välillä kummassakin lihaksessa. Osaselityksenä tälle voidaan esittää juoksumattoharjoitteluun liitettävien stressitekijöiden vaikutusta. Tässä tutkimuksessa esitetyt tulokset vahvistavat myös käsitystä juoksumattoharjoittelun yhteydestä proteiinien kokonais-O-GlcNAcyklaatiotason nousuun luustolihaaksessa, ja yhdessä muiden tutkimustulosten kanssa (Mounier ym., 2009; Cox ja Marsh, 2013) voidaan esittää O-GlcNAcyklaatiotason nousun suojelevan lihasproteiineja hajoitukselta ja ylläpitävän lihasten supistustoimintaa fyysisen harjoittelun yhteydessä. Harjoittelemattomuudesta saadut tulokset ovat yhtenevät luustolihaisten käyttämättömyydestä julkaistujen tutkimustulosten kanssa (Cieniewski-Bernard ym., 2005) ja vahvistavat käsitystä lihasten vähäisen käytön yhteydestä proteiinien kokonais-O-GlcNAcyklaatiotason laskuun ja tason alenemisen mahdollisesta yhteydestä luustolihaisten heikkenemiseen.

OGT- ja OGA-geenien ilmentyminen oli merkitsevästi suurempaa *soleus*- kuin *EDL*-lihaksessa riippumatta iästä tai fyysisen aktiivisuuden tasosta. Tässä tutkimuksessa OGT- ja OGA-geenien ilmentymisen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyklaatiotason välillä ei havaittu korrelaatiota. Sen sijaan OGT-geenin ilmentyminen korreloi positiivisesti OGA-geenin ilmentymisen kanssa sekä *soleus*- että *EDL*-lihaksessa. Tulokset viittaavat siihen, että OGT:n ja OGA:n geenien ilmentymistä saattaisivat osittain säädellä samat tekijät eri lihaskudostyypeissä. Lisää tutkimustietoa kuitenkin tarvitaan entsyymien ilmentymisen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcyklaatiotason välisestä yhteydestä sekä entsyymien geenien ilmentymistä säätelevistä tekijöistä.

O-GlcNAcyklaatiota säätelevät OGT- ja OGA-entsyymien lisäksi myös monet muut tekijät, kuten GFAT:n aktiivisuus, ravinteiden saatavuus ja stressi, joiden vaikutusta ei tässä

tutkimuksessa otettu huomioon. Useat tutkimustulokset ovat myös osoittaneet, että OGT:n ja OGA:n ilmentyminen lähetti-RNA-tasolla ei välttämättä ole suoraan yhteydessä ilmentymiseen proteiinitasolla. Lisäksi tiedot ovat vielä varsin puutteellisia kyseisten entsyymien aktiivisuudesta, joka viime kädessä saa aikaan proteiinien O-GlcNAcylation. Tulevaisuuden tutkimuksessa nämä näkökohdat olisi hyvä ottaa huomioon, kun selvitetään erilaisten tekijöiden vaikutusta näiden entsyymien geenien ilmentymiseen ja proteiinien kokonais-O-GlcNAcylationtasoon, joka puolestaan ohjaa ja säätelee spesifisti yksittäisten proteiinien toimintaa.

Länsimaisen väestön ikääntyessä yhä enemmän tutkimustietoa tarvitaan ikääntymisen myötä ilmenevän lihaskadon mekanismien ymmärtämiseksi ja lihasten heikkenemisen ennaltaehkäisemiseksi sekä hoitokeinojen löytämiseksi. Tässä pro gradu -työssä esitetyt tulokset antavat uutta tietoa O-glycosylaatiivälitteisen signaloinnin merkityksestä lihasten toiminnan säätelyssä ikääntymisen ja elinikäisen fyysisen aktiivisuuden yhteydessä supistumisominaisuuksiltaan erityyppisissä luustolihasissa.

6. LÄHDELUETTELO

- Andersen, J.L. 2003. Muscle fiber type adaptation in the elderly human muscle. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 13:40-47.
- Arias, E.B., J. Kim ja G.D. Cartee. 2004. Prolonged incubation in PUGNAc results in increased protein O-linked glycosylation and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes.* 53:4921-4930.
- Belke, D.D. 2011. Swim-exercised mice show a decreased level of protein O-GlcNAcylation and expression of O-GlcNAc transferase in heart. *J. Appl. Physiol.* 111:157-162.
- Bennett, C.E., V.L. Johnsen, J. Shearer ja D.D. Belke. 2013. Exercise training mitigates aberrant cardiac protein O-GlcNAcylation in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sci.* 92:657-663.
- Borghouts, L.B. ja H.A. Keizer. 2005. Exercise and insulin sensitivity: a review. *Int. J. Sports. Med.* 1:1-12.
- Brown, M., T.P. Ross ja J.O. Holloszy. 1992. Effects of ageing and exercise on soleus and extensor digitorum longus muscles of female rats. *Mech. Ageing Dev.* 63:69-77.
- Buse, M.G., K.A. Robinson, B.A. Marshall, R.C. Hresko ja M.M. Mueckler. 2002. Enhanced O-GlcNAc protein modification is associated with insulin resistance in GLUT1-overexpressing muscles. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:241-250.
- Chatham, J.C., L.G. Not, N. Fulop ja R.B. Marchase. 2008. Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma. *Shock.* 4:431-440.
- Cieniewski-Bernard, C., B. Bastide, T. Lefebvre, J. Lemoine, Y. Mounier ja J.C. Michalski. 2004. Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol. Cell Prot.* 3:577-585.
- Cieniewski-Bernard, C., Y. Mounier, J. Michalski ja B. Bastide. 2005. O-GlcNAc level variations are associated with the development of skeletal muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.* 100:1499-1505.
- Cox, E.J ja S. A. Marsh. 2013. Exercise and diabetes have opposite effects on the assembly and O-GlcNAc modification of the mSin3A/HDAC1/2 complex in the heart. *Card. Diab.* 12:101.
- Doherty, T.J. 2003. Invited review: Aging and sarcopenia. *J. Appl. Physiol.* 95:1717-1727.
- Dudley, G.A, P.A. Tesch, B.J. Miller ja P. Buchanan. 1991. Importance of eccentric actions in performance adaptations to resistance training. *Aviat. Space Environ. Med.* 62:543-550.
- Evans, W.J. 1995. Effects of exercise on body composition and functional capacity of the elderly. *The Journals of Gerontology. Series A: Biol. Sci. Med. Sci.* 50:147-150.
- Faulkner, J.A., L.M. Larkin, D.R. Clafflin ja S.V. Brooks. 2007. Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34:1091-1096.
- Fiordaliso, F., A. Leri, D. Cesselli, F. Limana, B. Safai, B. Nadal-Ginard, P. Anversa ja J. Kajstura. 2001. Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes.* 50:2363-2375.
- Franch, H.A. ja S.R. Price. 2005. Molecular signaling pathways regulating muscle proteolysis during atrophy. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 8:271-275.

- Fülöp, N., M.M. Mason, K. Dutta, P. Wang, A.J. Davidoff, R.B. Marchase ja J.C. Chatham. 2006. Impact of type 2 diabetes and aging on cardiomyocyte function and O-linked N-acetylglucosamine levels in the heart. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292:1370–1378.
- Fülöp, N., W. Feng, D. Xing, K. He, L.G. Nöt, C.A. Brocks, R.B. Marchase, A.P. Miller ja J.C. Chatham. 2008. Aging leads to increased levels of protein O-linked N-acetylglucosamine in heart, aorta, brain, and skeletal muscle in Brown-Norway rats. *Biogerontology.* 9:139-151.
- Galpin, A.J., U. Raue, B. Jemiolo, T.A. Trappe, M.P. Harber, K. Minchev ja S. Trappe. 2012. Human Skeletal Muscle Fiber Type Specific Protein Content. *Anal. Biochem.* 425:175–182.
- Geng, F., W. Zhu, R.A. Anderson, B. Leber ja D.W. Andrews. 2012. Multiple post-translational modifications regulate E-cadherin transport during apoptosis. *J. Cell Sci.* 125:2615-2625.
- Groves, J.A., A. Lee, G. Yildirim ja N.E. Zachara. 2013. Dynamic O-GlcNAcylation and its roles in the cellular stress response and homeostasis. *Cell Stress and Chaperones.* 18:535-558.
- Hanover, J.A. 2001. Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. *FASEB J.* 15:1865-1876.
- Hart, G.W., C. Slawson, G. Ramirez-Correa ja O. Lagerlof. 2011. Cross Talk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease. *Ann. Rev. Biochem.* 80:825-58.
- Harber, M.P., J.D. Crane, J.M. Dickinson, B. Jemiolo, U. Raue ja T.A. Trappe. 2009. Protein synthesis and the expression of growth-related genes are altered by running in human vastus lateralis and soleus muscles. *Am. J. Physiol. Reg., Integ. Comp. Physiol.* 296:708–714.
- Hedou, J., B. Bastide, A. Page, J.C. Michalski ja W. Morelle. 2009. Mapping of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification sites in key contractile proteins of rat skeletal muscle. *Proteomics.* 9:2139-2148.
- Hedou, J., C. Cieniewski-Bernard, Y. Leroy, J-C. Michalski, Y. Mounier ja B. Bastide. 2007. O-linked N-acetylglucosaminylase is involved in the Ca²⁺ activation properties of rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 14:10360–10369.
- Holloszy, J.O., M. Chen, G.D. Cartee ja J.C. Young. 1991. Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. *Mech. Ageing Dev.* 60:199-213.
- Holt, G.D. ja G.W. Hart. 1986. The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* 261:8049-8057.
- Huang, P., S. Ho, K. Wang, B.C. Roessler, F. Zhang, Y. Hu, D.B. Bowe, J.E. Kudlow ja A.J. Paterson. 2010. Muscle-specific overexpression of NCOAT^{GK}, splice variant of O-GlcNAcase, induces skeletal muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300:456–465.
- Hunter, R.B., E. Stevenson, A. Koncarevic, H. Mitchell-Felton, D.A. Essig ja S.C. Kandarian. 2002. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J.* 16:529–538.
- Jeukendrup, A.E. 2002. Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 967:217-235.
- Kreppel, L.K., M.A. Blomberg ja G.W. Hart. 1997. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 272:9308–9315.
- Kreppel, L.K. ja G.W. Hart. 1999. Regulation of a Cytosolic and Nuclear O-GlcNAc Transferase: Role of the tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 274:32015-22.

- Lawler, J.M., W. Song ja S.R. Demaree. 2003. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 35:9-16.
- Liu, J., Y. Pang, T. Chang, P. Bounelis, J.C. Chatham ja R.B. Marchase. 2006. Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2:303-312.
- MacDonald, K.S. ja R.H. Fitts. 1995. Effect of hindlimb unloading on rat soleus fiber force, stiffness, and calcium sensitivity. *J. Appl. Physiol.* 79:1796–1802.
- McClain, D.A., W.A. Lubas, R.C. Cooksey, M. Hazel, G.J. Parker ja D.C. Love. 2002. Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:10695–9.
- Marshall, S., V. Bacote ja R.R. Traxinger. 1991. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 266:4706-4712.
- Moraska, A., T. Deak, R.L. Spencer, D. Roth ja M. Fleshner. 2000. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am. J. Phys. – Reg., Integ. Comp. Phys.* 279:1321-1329.
- Mounier, Y., V. Tiffreau, V. Montel, B. Bastide ja L. Stevens. 2009. Phenotypical transitions and Ca^{2+} activation properties in human muscle fibers: effects of a 60-day bed rest and countermeasures. *J. Appl. Physiol.* 106:1086-1099.
- O'Donnell, N., N.E. Zachara, G.W. Hart ja J.D. Marth. 2004. *Ogt*-Dependent X-Chromosome-Linked Protein Glycosylation Is a Requisite Modification in Somatic Cell Function and Embryo Viability. *Mol. Cell Biol.* 24:41680-1690.
- Ogawa, M., H. Mizofuchi, Y. Kobayashi, G. Tsuzuki, M. Yamamoto, S. Wada ja K. Kamemura. 2012. Terminal differentiation program of skeletal muscle myogenesis is negatively regulated by O-GlcNAc glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1820:24-32.
- Ohn, T., N. Kedersha, T. Hickman, S. Tisdale ja P. Anderson. 2008. A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat. Cell Biol.* 10:1224 – 1231.
- Pette, D. 2002. The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *Can. J. Appl. Physiol.* 27:423-448.
- Roth, Z., Y. Galit ja K. Isam. 2012. Identification and quantification of protein glycosylation. *Int. J. Carb. Chem.*
- 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.
- Schulze, K., P. Gallagher ja S. Trappe. 2002. Resistance training preserves skeletal muscle function during unloading in humans. *Med. Sci. Sports Exercise* 34:303-313.
- Short, K.R., J.L. Vittone, M.L. Bigelow, D.N. Proctor ja K.S. Nair. 2004. Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. *Am. J. Physiol. Endoc. Metab.* 286:92-101.
- Slawson, C., N.E. Zachara, K. Vosseller, W.D. Cheung, M.D. Lane ja G.W. Hart. 2005. Perturbations in O-Linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 280:32944-32956.
- Tharp, G.D. ja T.L. Preuss. 1991. Mitogenic response of T-lymphocytes to exercise training and stress. *J. App. Phys.* 70:62535-2538.

- Taylor, R.P., T.S. Geisler, J.H. Chambers ja D.A. McClain. 2009. Up-regulation of O-GlcNAc transferase with glucose deprivation in HepG2 cells is mediated by decreased hexosamine pathway flux. *J. Biol. Chem.* 284:3425-3432.
- Taylor, R.P., G.J. Parker, M.W. Hazel, Y. Soesanto, W. Fuller, M.J. Yazzie ja D.A. McClain. 2008. Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of O-linked N acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* 283:6050-6057.
- Thomason, D.B. ja F.W. Booth. 1990. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J. App. Phys.* 68:1–12.
- Thompson, L.V. 2009. Age-related muscle dysfunction. *Exp. Gerontol.* 44:106-111.
- Toleman, C., A.J. Paterson, T.R. Whisenhunt ja J.E. Kudlow. 2004. Characterization of the Histone Acetyltransferase (HAT) Domain of a Bifunctional Protein with Activable O-GlcNAcase and HAT Activities. *J. Biol. Chem.* 279:53665-53673.
- Torres, C-R. ja G.W. Hart. 1984. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 259:3308–3317.
- Viidik, A. ja M. Skalicky. 2003. Voluntary exercise and mild food restriction effectively retard the collagen biomarker of aging. *Aging Clin. Exp. Res.* 6:475-81.
- Walgren, J.L.E., T.S. Vincent, K.L. Schey ja M.G. Buse. 2003. High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including α -tubulin. *Am. J. Phys. – Endocri. Met.* 284:424-434.
- Wang, X., Z. Hu, J. Hu, J. Du ja E.W. Mitch. 2006. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology.* 147:4160–4168.
- Wang, Z., N.D. Udeshi, C. Slawson, P.D. Compton, K. Sakabe, W.D. Cheung, J. Shabanowitz, D.F. Hunt ja G.W. Hart. 2010. Extensive Crosstalk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation Regulates Cytokinesis. *Sci. Signal.* 3:104.
- Wang Z., M. Gucek ja G.W. Hart. 2008. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: Site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:13793-13798.
- Wang, Z., A. Pandey ja G.W. Hart. 2007. Dynamic Interplay between O-Linked N-Acetylglucosaminylation and Glycogen Synthase Kinase-3 dependent Phosphorylation. *Mol. Cell Prot.* 6:1365-1379.
- Waters, D.L., R.N. Baumgartner, P.J. Garry ja B. Vellas. 2010. Advantages of dietary, exercise-related, and therapeutic interventions to prevent and treat sarcopenia in adult patients: an update. *Clin. Interv. Aging* 5: 259-270.
- Watson, L.J., H.T. Facundo, G.A. Ngoh, M. Ameen, R.E. Brainard, K.M. Lemma, B.W. Long, S.D. Prabhu , Y. Xuan ja S.P. Jones. 2010. O-linked β -N-acetylglucosamine transferase is indispensable in the failing heart. *PNAS* 41:17797-17802.
- Weigert, C., K. Klopfer, C.Kausch, K.Brodbeck, M.Stumyoll, H.U.Häring ja E.D. Schleicher. 2003. Palmitate-induced activation of the hexosamine pathway in human myotubes: increased expression of glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase. *Diabetes.* 52:650-656.
- Wells, L., K. Vosseller ja G.W. Hart. 2003. A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. *Cell Mol. Life Sci.* 60:2:222-228.

- Yang, X., F. Zhang ja J.E. Kudlow. 2002. Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: Coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell*. 110:69–80.
- Yang, X., P.P. Ongusaha ja P.D. Miles. 2008. Phosphoinositide signaling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature*. 451:964-969.
- Yki-Jarvinen, H., C. Vogt, P. Iozzo, R. Pipek, M.C. Daniels, A. Virkamaki, S. Makimattila, L. Mandarino, R.A. DeFronzo, D. McClain ja W.K. Gottschalk. 1997. UDP-N-acetylglucosamine transferase and glutamine: fructose 6-phosphate amidotransferase activities in insulin-sensitive tissues. *Diabetologia*. 1:76-81.
- Zachara, N.E. ja G.W. Hart. 2006. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochem. Biophys. Acta*. 1761:599-617.
- Zachara, N.E., N. O'Donnell, W.D. Cheung, J.J. Mercer, J.D. Marth ja G.W. Hart. 2004. Dynamic O-GlcNAc Modification of Nucleocytoplasmic Proteins in Response to Stress: A survival response of mammalian cells. *J. Biol. Chem*. 279:30133-30142.
- Zeidan, Q. ja G.W. Hart. 2010. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J. Cell Sci*. 123:13–22.
- Zhang, F., K. Su, X. Yang, D.B. Bowe, A.J. Paterson ja J.E. Kudlow. 2003. O-GlcNAc Modification Is an Endogenous Inhibitor of the Proteasome. *Cell*. 115:715-725.
- Zinker, B.A., D.B. Lacy, D. Bracy, J. Jacobs ja D.H. Wasserman. 1993. Regulation of Glucose Uptake and Metabolism by Working Muscle: An In Vivo Analysis. *Diabetes* 42:956-965.