

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ARSTITEADUSKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

Marian Tarrend

**Raku energeetilist seisundit reguleerivate geenide
ekspressiooni hindamine reaalaaja-PCR abil**

Bakalaureusetöö

Juhendajad Lumme Kadaja PhD
Lilian Kadaja-Saarepuu PhD

TARTU 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Oksüdatiivsed ja glükolüütilised lihased.....	7
1.2. Lihsraku energeetiline metabolism.....	8
1.3. Lihsraku energeetilise metabolismi kaasaegsed kontseptsioonid.....	10
1.4. Rakkude energeetiline puudulikkus kui lihashaiguste alus.....	11
1.5. Oksüdatiivse fosforüülimise reguleerimine kaltsiumioonide toimetel.....	12
1.6. Vananemisega kaasnev sarkopeenia	13
1.7. Skeletilihase müogenees	15
1.8. Replikatiivne vananemine	16
1.9. Wolframiin 1 geeni ekspressioon ja seos haigustega	18
2. EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1. Töö eesmärgid.....	19
2.2. Materjal ja meetodika.....	19
2.2.1. Reaktiivid	19
2.2.2. Uuritavad, koed ja rakukultuurid.....	19
2.2.3. Totaalse RNA eraldamine	20
2.2.4. RNA kvaliteedi hindamine ja kontsentratsiooni määramine.....	20
2.2.5. RNA pöördtranskribeerimine	22
2.2.6. Reaalaja-PCR	24
2.2.7. Tööprotokoll ja DNA dissotsiatsioonikõverate analüüs.....	25
2.2.8 mRNA taseme suhteline kvantiteerimine.....	27
2.2.8 Amplikonide elektroforeetiline analüüs agarosgeelis	27
2.2.9. Andmete statistiline töötlus	28
2.3. Tulemused	28
2.3.1. Kreatiinkinaasi valke kodeerivate geenide ekspressiooni muutused.....	28

2.3.2. Ca ²⁺ -aktiveeritavate mitokondriaalsete transportvalkude mRNA tasemete hindamine oksüdatiivsetes ja glükolüütilistes lihastes	32
2.4. Arutelu.....	34
KOKKUVÕTE.....	36
SUMMARY	37
KIRJANDUSE LOETELU	39
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	49
TÄNUAVALDUSED	50
LIHTLITSENTS	51

KASUTATUD LÜHENDID

ANT – adeniinnukleotiid translokaas

CK – kreatiinkinaas

CKB/Ckb – ajutüüpi kreatiinkinaasi geen inimesel/hiirel

CKM/Ckm – lihastüüpi kreatiinkinaasi geen inimesel/hiirel

CKMT1/Ckmt1 – ubikviitne kreatiinkinaasi geen inimesel/hiirel

CKMT2 /Ckmt2 – sarkomeerne kreatiinkinaasi geen inimesel/hiirel

CK-PCr – kreatiinkinaasne energiaülekande süsteem

Cr – kreatiin

CT – lävetsükkel

DIDMOAD - *Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus*, optiline atroofia ja kurtus

DMEM – *Dulbecco* modifitseeritud *Eagle* keskkond

ER – endoplasmaatiline retiikulum

ITS – insuliin/transferrin/seleniit süsteem

MHC – müosiini raske ahel

MRF – müogeenne regulatoorne faktor

MYOG - müogeniin

NRT – negatiivne pöördtranskriptsiooni kontroll (*no reverse transcriptase*)

NTC – negatiivne kontroll (*no template control*)

OXPHOS – oksüdatiivne fosforüülimine

PCr – fosfokreatiin

RT – pöördtranskriptsioon

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid

SR – sarkoplasmaatiline retiikulum

T_m - sulamistemperatuur

TMR – tuumamagnetresonants

UV/VIS – ultraviolet/nähtav

VDAC – mitokondri välismembraani poriinkanal

WFS1/Wfs1 – Wolframi sündroom 1 geen inimesel/hiirel

WS – Wolframi sündroom

-/- – *Wfs1*-puudulik hiir

+/+ – muutmata genoomiga hiir (*wild-type*)

SISSEJUHATUS

Raku energeetilise seisundi ja energeetilise puudulikkuse tekkepõhjuste uurimine on ülioluline, kuna teadaolevalt sõltub sellest haiguse patofüsioloogiline mehhanism, samuti haiguse prognoos ja ravi efektiivsus. Raku energeetilise puudulikkuse kujunemist käsitletakse kui südame- ja skeletilihase haiguste alusmehhanismi.

Käesolevas töös on hinnatud geenide ekspressiooni seoses mitme olulise omavahel haakuva probleemi uurimisega selliste lihasraku energeetilise puudulikkusega kaasnevate häirete puhul nagu sarkopeenia ning endoplasmaatilise retiikulumi talitlushäired (ER stress) ja diabeedi-sarnane seisund *Wfs1* hiirtel. Seega oli antud töös erilise tähelepanu all rakusisene kreatiinkinaasne energiaülekanne ja selles ülekandes osalevaid valke kodeerivate geenide ekspressiooni hindamine seoses vananemisega kaasneva sarkopeeniaga, mis on teatavasti seotud skeletilihaste oksüdatiivse võimekuse alanemisega peamiselt mitokondriaalse genoomi oksüdatiivse kahjustuse tõttu. Paralleelselt uuriti lihasrakkude energeetilise metabolismiga seotud geenide ekspressiooni rakkude replikatiivse vananemise korral *in vitro*. Hinnati ka nende geenide ekspressioonitaset, mis on seotud mitokondrite võimega akumulierida kaltsiumioone, kuna tsütosoolse kaltsiumi ülesandeks on koordineerida raku töökoormust ja adenosiin trifosfaadi (ATP) tekkeprotsessi mitokondrites. Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates on vastavalt teemale käsitletud lihasraku energeetilise metabolismi klassikalisi ja kaasaegseid kontseptsioone, raku energeetilise puudulikkuse kujunemise mehhanisme inimese skeletilihases vananemisega kaasneva sarkopeenia puhul ning diabeedi ja ER stressi tingimustes, kasutades transgeensetel hiirtel rajanevat mudelit. Töö keskendub peamiselt muutustele lihasrakkudes. Skeetilihased on olulised liikumisvõimes ja abiks hingamisel, mistõttu lihasmassi kadu ja lihasnõrkus (sarkopeenia) kujutab vananedes endast olulist probleemi halvendades inimeste elukvaliteeti. On teada, et lihasrakkude energeetiline seisund halveneb mitmete haiguste puhul, nagu näiteks diabeet ja sarkopeenia. Seega on tähtis uurida neid faktoreid ja molekulaarseid mehhanisme, mis kontrollivad skeletilihase arengut ja füsioloogiat või mängivad rolli haiguste patogeneesis.

Töös saadud tulemused aitavad kontrollida üldisemat hüpoteesi, mille kohaselt lihashaigused, tüüpilised patoloogilised ja vananemisega seotud protsessid on vahendatud ühise kahjustusmehhanismi – raku energeetilise puudulikkuse kaudu. Lähtuvalt sellest hüpoteesist oli töö peamiseks eesmärgiks hinnata lihasraku energeetilist seisundit reguleerivate geenide ekspressioonitaset erinevates patoloogilistes tingimustes ja selgitada välja, milliste uuritud geenide ekspressioonitaseme muutused viitavad lihasraku energeetilise puudulikkuse kujunemisele.

Uurimistöö eksperimentaalne osa teostati Tartu Ülikooli arstiteaduskonna bio- ja siirdemeditiini instituudi patofüsioloogia osakonnas ning on seotud kahe praeguseks lõppenud ja ühe käimasoleva teadusprojektiga: 1) MYOAGE - Eaga seotud lihasnõrkuse mõistmine ja sellega võitlemine; 2) Raku energeetiline puudulikkus kui südame- ja skeletilihase haiguste alus ja kaitsemehhanismide sihtmärk; 3) Oksüdatiivse fosforüülimise ja energeetilise metabolismi kompartmentatsiooni häirete roll haigestunud ja vananenud lihasrakkude patofüsioloogias.

Märksõnad: energeetiline metabolism, raku energeetiline puudulikkus, sarkopeenia, replikatiivne vananemine, kreatiinkinaasi ekspressioon.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Oksüdatiivsed ja glükolüütilised lihased

Lihaskiudude heterogeensus põhineb kahel peamisel geeniregulatsiooni mehhanismil, mida on kirjeldatud Bottinelli ja Reggiani (2000) poolt järgnevalt:

1) Kvalitatiivne mehhanism: lihasvalgud (nagu müosiin) võivad esineda sarnaste, kuid mitte identsetena s.t isovormidena. Isovormid võivad tuleneda sama perekonna erinevatelt geenidelt või samalt geenilt alternatiivse splaissimise kaudu, mille tulemusena saadakse erinevad valgud.

2) Kvantitatiivne mehhanism: ühe ja sama geeni erinev ekspressioon. Mitmed geenid võivad olla üksteisest sõltumatult üles- või allareguleeritud vastavalt mehaanilisele koormusele, hormoonide toimele jne. Geeniproduktideks olevate valkude proportsioon kujuneb sellisel juhul erinevaks, mille tulemusena kujunevad struktuuri ja funktsiooni iseärasused.

Nii võib lihaseid grupeerida müosiini raskete ahelate (MHC) isovormide profiili alusel, kuid samuti ka kontraktiilsete omaduste järgi aeglasteks ja kiireteks (Bottinelli *et al.*, 1991; Ruff ja Whittlesey, 1991; Larsson ja Moss, 1993; Lynch *et al.*, 1994; Harridge *et al.*, 1996; Widrick *et al.*, 1996) või ka metaboolsete ensüümide aktiivsuste alusel oksüdatiivseteks ja glükolüütilisteks (Stienen *et al.*, 1996).

Lihaskiudude põhitüübid müosiini raskete ahelate isovormide alusel. See jaotus põhineb elektroforeetilisel liikuvusel. Polüakrüülamiid geelelektroforeesi (PAGE) abil on segalihases (inimese *m. pectoralis*) visualiseeritavad kolm MHC fragmenti (Hilber *et al.*, 1999). Kõige kiiremini liikuv MHCI on ekspresseerunud esimest tüüpi kiududes (Tüüp I, aeglased, oksüdatiivsed), kõige aeglasema migratsiooniga MHCIIb aga on iseloomulik IIB tüüpi kiududele (Tüüp IIB, kiired, glükolüütilised). MHCIIa (Tüüp IIA, oksüdatiiv-glükolüütilised) migreerub pisut kiiremini kui IIB. Roti erinevat tüüpi skeletilihastes *m. extensor digitorum longus* (kiire, glükolüütiline) ja *m. soleus* (aeglane, oksüdatiivne) on aga kummaski täheldatav vaid üks domineeriv MHC fragment, vastavalt MHCIIb ja MHCI (Vescovo *et al.*, 1998). Nimetatud isovorme seostatakse müosiini ATPaasi aktiivsusega. IIA- ja IIB-tüüpi kiududes on ATPaasne aktiivsus kõrge ja neid nimetatakse kiireteks kiududeks. Tüüp I kiud on aeglased ja müosiini ATPaasi aktiivsus on neis madal.

Lihaskiudude tüpiseerimine metaboolse profiili alusel. Metaboolselt eristatakse lihaskiude mitokondriaalse hingamisahelaga seotud ensüümide (suktsinaatdehüdrogenaas, tsütokroomoksidaas) ja glükolüütiliste ensüümide (laktaatdehüdrogenaas, püruvaatkinaas) aktiivsuste järgi (Ogata ja Mori, 1964; Peter *et al.*, 1972; Lowry *et al.*, 1978). Vastavalt sellele on mitokondriterikkad ja kõrge hingamisensüümide aktiivsusega kiud oksüdatiivsed ning

madala mitokondrite sisaldusega ja kõrge glükolüütiliste ensüümide aktiivsusega kiud glükolüütilised. Iia-tüüpi kiud on metaboolset oksüdatiiv-glükolüütilised. Aeglaselt kontraheeruvad lihased tarvitavad vähem ATP-d kui kiired ja nad ei väsi nii ruttu kui kiired. Aeglaste oksüdatiivsete lihaste tüüpilisteks näideteks on müokard ja skeletilihaskiud *m. soleus*. Tüüpiline kiire glükolüütiline lihas on *m. extensor digitorum longus* ja *m. rectus femoris* (valge osa).

Varasemad andmed näitavad, et inimese skeletilihase puhul MHCIIa ja IIx mRNA tasemed vananedes vähenevad (Balagopal *et al.*, 2001).

1.2. Lihasraku energeetiline metabolism

Lihasraku energeetika põhijooned. Rakkude diferentseerumise käigus toimub imetajate lihasrakkudes komplekssete ja funktsionaalsete rakukompartimentide moodustumine. Igale lihastüübile (oksüdatiivsed, oksüdatiiv-glükolüütilised, glükolüütilised) on omased morfoloogilised ja biokeemilised iseärasused. Ka raku energeetilise metabolismi organisatsioon sõltub rakutüübist. Näiteks lihasrakk peab olema võimeline tagama efektiivset energiaülekannet energiat andvate ja seda tarbivate kohtade (raku kompartimentide) vahel (Ventura-Clapier *et al.*, 1998). Lihasrakkudele on omane kõrge struktuurse organiseerituse tase: paralleelsete müofibrillikimpude vahel on korrapäraselt mitokondrid kohakuti sarkomeeri A-vöödiga (Raturi ja Simmen, 2013). Lihasrakkude funktsionaalsetes üksustes toimub pidev energiarikka ATP produtseerimine glükolüüsi ja oksüdatiivse fosforüülimise (OXPHOS) protsessides (Ventura-Clapier *et al.*, 1998). Aeglastes oksüdatiivsetes lihastes on peamiselt OXPHOS käigus tekkinud ATP kasutatav kontraktsiooniks ja ioonpumpade tööks ning teisteks energiat vajavateks protsessideks.

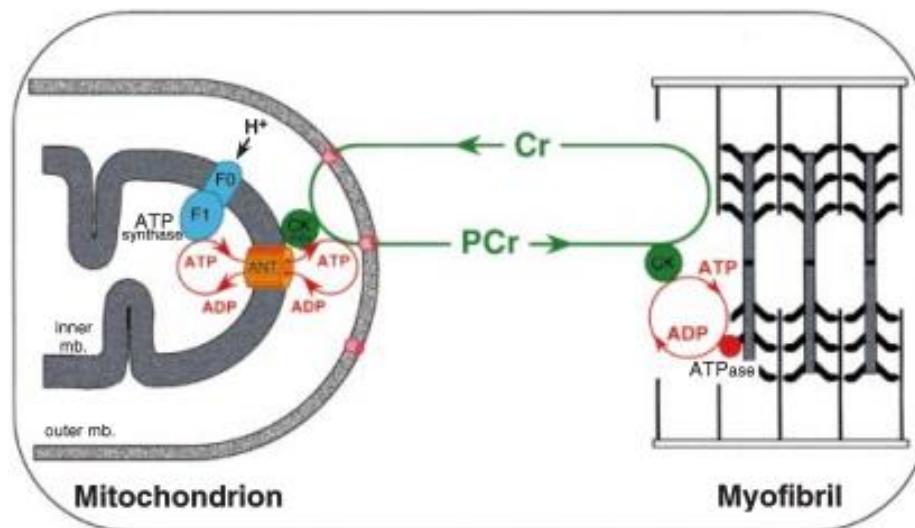
Oksüdatiivsete lihaste rakkudes kantakse ATP mitokondritest müofibrillideni kreatiinkinaasse energiaülekande süsteemi (CK-PCr) kaudu fosfokreatiini molekulide abil (Joonis 1), kuna mitokondrite sisemembraani välisküljel lokaliseeruv kreatiinkinaasi isovorm on funktsionaalses seoses sisemembraani valgu adeniinnukleotiidi translokaasiga (ANT), võimaldades seega OXPHOS protsessis tekkinud ATP arvel fosforüülda kreatiini. Selle reaktsiooni tasakaal on nihutatud fosfokreatiini tekke suunas (Bessman ja Carpenter, 1985; Wyss *et al.*, 1992).

CK on ensüüm (EC 2.7.3.2), mis katalüüsib järgnevat pöörduvat reaktsiooni:



Kuna kreatiini lihasrakus ei teki (imetajate organismis toimub kreatiini biosüntees põhiliselt maksas), siis viiakse kreatiin lihasraku spetsiifilise kreatiini transporteri abil (Straumann *et al.*, 2006).

Lihaskrakus funktsioneeriv CK-PCr süsteem koosneb kahest põhisubstraadist (Cr, PCr) ja erinevatest Cr isovormidest, mis lokaliseeruvad nii mitokondriaalses kui müofibrillaarses osas. Mitokondriaalne CK on positiivse laenguga isoensüüm ja seetõttu seostub elektrokeemiliselt negatiivselt laetud kardioliipiini molekulidega, mis paiknevad mitokondri sisemembraanis ANT läheduses (Walliman *et al.*, 1992; Fritz-Wolf *et al.*, 1996; Saks *et al.*, 2000).



Joonis 1. Kreatiinkinaase energiaülekande süsteem (Saks *et al.*, 2000).
 ANT – adeniinnukleotiidi translokaas; CK_{mito} – mitokondriaalne kreatiinkinaas;
 CK - müofibrillaarne kreatiinkinaas; PCr – fosfokreatiin; Cr – kreatiin.

Selline integratsioon moodustab mitokondri sisemembraanis funktsionaalse mikrokompartmendi, nii et mitokondriaalse CK reaktsioonis tekkinud ADP viiakse ANT poolt mitokondrite maatriksisse, kus ta kontrollib hingamisahelat, mille viiendas kompleksis tekkinud ATP on samuti kasutatav ANT poolt (Walliman *et al.*, 1992; Saks *et al.*, 1994; Kanai *et al.*, 2004).

Kreatiinkinaasne energia ülekanne lihaskrakus. Imetajatel on identifitseeritud kolm dimeerset tsütosoolset isovormi: 1) lihastüüpi CK-MM, mida kodeerib geen *CKM* (Hs) või *Ckm* (Mm); 2) ajutüüpi CK-BB, mida kodeerib geen *CKB* (Hs) või *Ckb* (Mm) ning mille ekspressioonitase lihastes on ülimaldal ja 3) segatüüpi CK-MB, mille erinevaid ahelaid kodeerivad erinevad geenid (Wallimann *et al.*, 1992, 2011; Ventura-Clapier *et al.* 1998). *CKM* geen asub inimesel 19. kromosoomi pikemas õlas (19q), hiirel 7. kromosoomi pikemas õlas (7q) ja *CKB* geen inimesel 14. kromosoomi pikemas õlas (14q) ning hiirel 12. kromosoomi pikemas õlas (12q) (Ensembl).

Lisaks on 2 mitokondriaalset isovormi: 1) ubikviitne, mida kodeerib geen *CKMT1* (Hs) või *Ckmt1* (Mm); 2) sarkomeerne, mida kodeerib geen *CKMT2* (Hs) või *Ckmt2* (Mm). Mitokondriaalsed isovormid erinevad tsütosoolsetest nii biokeemilistelt kui ka immunokeemilistelt omadustelt (Ventura-Clapier *et al.*, 1998). Mitokondriaalsed isovormid paiknevad mitokondri väliskompartmendis (Wallimann *et al.*, 1992, 2011). *CKMT2/Ckmt2* geeni produktiks olev valk esineb sarkomeersetes kudedes ja on ko-ekspressioneeritud *CKM* poolt. Ubikviitne *CKMT1/Ckmt1* geeni produktiks olev valk on ko-ekspressioneeritud *CKB* poolt (Payne *et al.*, 1991; Wyss *et al.*, 1992).

CK isovormide kompartmentatsioon lihasrakus on eeldus selleks, et funktsionaalne CK-PCr süsteem saaks toimida (Wallimann *et al.*, 1992). CK-PCr energiaülekande süsteem on kui ühenduslüli ATP-d tootva üksuse (glükolüüs ja mitokondriaalne oksüdatiivne fosforülatsioon) ja subtsellulaarsete ATP-d utiliseerivate üksuste (ATPaasid) vahel. Mitokondri välismembraanil paiknev CK süsteem on vahetult seotud ATP ekspordiga mitokondritest, mis toimub läbi ANT ja seeläbi vabastab PCr-i tsütosooli (Wallimann *et al.* 2011). Mitokondri välismembraanis on poriin kanal (VDAC), millel on selektiivne läbilaskvus ATP ja ADP suhtes, aga PCr saab vabalt liikuda (Timohhina *et al.* 2009). Kreatiinkinaasne mitokondriaalne isoensüüm toodab mitokondrite membraanidevahelises osas PCr-i, mis suunatakse läbi VDAC-i tsütoplasmasse ja läbi kreatiinkinaasse ülekande süsteemi edasi energia tarbimise sihtpunktidesse, kus teised kreatiinkinaasi isovormid kasutavad seda ATP taastootmiseks (Anmann *et al.*, 2013). ADP, mis tekib mitokondriaalse kreatiinkinaasi reaktsioonis, suunatakse läbi ANT tagasi mitokondri maatriksisse, kus ATP süntetaas toodab uuesti ATP-d (Anmann *et al.*, 2013). CK süsteem on eriti oluline südame- ja skeletilihastes. Kiired glükolüütilised (valged) lihaskiud, mis töötavad kiirelt, aga väsivad samuti kiiresti, sisaldavad märkimisväärselt kõrgemates kogustes CK ja PCr-i. Vastupidiselt aeglased oksüdatiivsed (punased) lihaskiud ehk südamelihaskiud, mis töötavad järjepidevalt ja on vastupidavad väsimusele, sisaldavad vähem CK-d ja PCr-i (Sahlin *et al.*, 1997).

Valgu tasemel on kahedimensionaalse elektroforeesi abil näidatud, et inimese skeletilihases *v. lateralis* (nelipealihase) lihastüüpi kreatiinkinaasi valgu sisaldus vananedes väheneb (Gelfi *et al.*, 2006). Reaalaja-PCR abil saadud andmed selle kohta (mRNA tase) puuduvad, mistõttu oli käesolevas töös üheks eesmärgiks võrrelda *CKM* ja *CKMT2* mRNA taset noorte ja vanade inimeste nelipealihases.

1.3. Lihasraku energeetilise metabolismi kaasaegsed kontseptsioonid

Lihasraku energeetilise metabolismi organisatsioon on niivõrd keeruline, et seda peetakse õigeks kirjeldada ja analüüsida süsteemibioloogiast lähtudes kasutades molekulaarsete

süsteemide bioenergeetika kontseptsiooni. Viimased arengud lihasrakkude uurimisel on näidanud, et energiavoogude ja mitokondrite funktsiooni regulatsioonimehhanisme *in vivo* tuleb mõista molekulaarsete süsteemide bioenergeetika raames, arvestades et energeetiline metabolism ei ole mitte ainult biokeemiliste reaktsioonide süsteem, vaid olulised on ka ruumiline organisatsioon ja rakusiseste interaktsioonide dünaamika (Saks *et al.*, 2007). Interaktsioonid rakukomponentide vahel viivad uute omaduste ilmnemiseni süsteemi tasandil nagu näiteks intratsellulaarne kompartmentatsioon ja funktsionaalsed seosed valgukomplekside vahel (Saks *et al.*, 2007). Molekulaarsete süsteemide bioenergeetika kirjeldab integreeritud energeetilise metabolismi protsesse rakus kasutades matemaatilist modelleerimist, kuid lähtudes eksperimentaalsete uuringute andmetest. Matemaatilise modelleerimise teel on näidatud, et aeglase oksüdatiivsete lihaste rakkudes metaboliitide difusioonitakistus ei ole jaotunud rakus ühtlaselt, vaid on lokaliseerunud teatud piirkondades (Vendelin *et al.*, 2004). See tõik toetas uut vastloodud kontseptsiooni. Lihasaraku energeetilise metabolismi kaasaegse kontseptsiooni kohaselt moodustavad oksüdatiivsetes lihasrakkudes mitokondrite ja müofibrillide ning sarkoplasmaatilise retiikulumi ATPaasid komplekse, mis funktsioneerivad kui rakusisesed energiaüksused, olles lihasraku energeetilise metabolismi põhimooduliteks, mille piires toimub energia ülekande kreatiin- ja adenülaatkinaasete süsteemide vahendusel ning vaid mingil määral adeniinnukleotiidide otsese ülekande teel (Saks *et al.*, 2001; Seppet *et al.*, 2001). See avastus muudab oluliselt varasemat paradigmat, et adeniinnukleotiidide liikumine mitokondrite ja ATPaaside vahel toimub lihtsa difusiooni teel. Oksüdatiivsetes lihastes kontrollivad ADP difusiooni energeetiliste üksuste piires teatud tsütoskeleti valgud, milledest on kindlasti tuvastatud β -tubuliin (Puurand *et al.*, 2003; Guerrero *et al.*, 2010; Guzun *et al.*, 2011). Kadaja *et al.* (2004) on näidanud, et ülalnimetatud mitokondrite ja ATPaaside kompleksid võivad olla patogeensete antikehade märklauaks ja nende talitlushäireid on registreeritud nii südame- (Vandroux *et al.*, 2004) kui ka muskuloskeetaalsete haiguste puhul (Braun *et al.*, 2001; Eimre *et al.*, 2006). Viimatimainitud töödes on näidatud, et otsene ATP/ADP ülekande mitokondrite ja ATPaaside vahel aktiveerub düstrofiinipuudulikkusega hiirte südames (Braun *et al.*, 2001) puusaliigese artroosi korral (Eimre *et al.*, 2006). Teised autorid on sedastanud sellise muutuse tsütoplasmaatilise ja mitokondriaalse CK puudulikkusega lihases (Kaasik *et al.*, 2003). Koosvõetuna võivad need häired viia raku energeetilise puudulikkuse kujunemiseni.

1.4. Rakkude energeetiline puudulikkus kui lihashaiguste alus

Haigused, tüüpilised patoloogilised ja vananemisega seotud protsessid võivad olla vahendatud ühise kahjustusmehhanismi – raku energeetilise puudulikkuse kaudu. Näiteks on

südamepuudulikkuse korral TMR (tuumamagnetresonants) abil tuvastatud PCr/ATP signaali suhte muutus, alanenud on ka kreatiini ja kreatiini transporteri tase, mi-CK ekspressiooni maharegulatsioon, mi-CK ja ANT seose häirumine ja vähenenud CK-MM ekspressioon (De Sousa *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2001), mis viitavad CK-ga vahendatud energia-ülekandevõrgu muutustele (Nascimben *et al.*, 1996; Neubauer *et al.*, 1997). Kuna aga enamik neist muutustest on tuvastatud katseloomade rõhuülekoormuse tingimustes, võivad need olla mitte seostatavad inimese haigusega, eriti selle lõppstaadiumis, mil domineerib mahu ülekoormus. Roosimaa *et al.* (2013) on näidanud, et inimese mahu ülekoormuse tõttu laienenud südamekodades suureneb *HK2* (heksokinaas 2) geeni ekspressioon, seostumine mitokondritega ja osatähtsus OXPHOSi aktivatsioonis. Seega toimib kompensatoorne mehhanism, mis käivitub müokardi mahu ülekoormuse tõttu suurenenud energiavajaduse korral. Südamelihase kohta on veel näidatud, et müokardi ületreeningujärgses seisundis on häiritud funktsionaalne seos mitokondriaalsete ensüümide, adenülaatkinaasi (AK2) ja ANT vahel, mille tõttu väheneb adenosiindifosfaadist (ADP) sõltuva OXPHOS üldine kapatsiteet (Kadaja *et al.*, 2010). Kuna selle protsessi käigus sünteesitakse südamelihase energiaallikaks olevat ATP-d, siis järelikult halveneb ületreenituse korral rakkude energeetiline seisund. Need andmed näitavad, et rakkude energeetilise puudulikkuse kujunemisel on olulisel kohal mitokondrite talitluse häired, mis võivad olla tingitud oluliste geenide alaekspressioonist või valkude biosünteesi vähenemisest.

1.5. Oksüdatiivse fosforüülimise reguleerimine kaltsiumioonide toimetel

Klassikalise kontseptsiooni kohaselt kontrollib tsütoplasma kaltsium mitokondrite hingamist kaltsium uniporter, mis toimub valgu kaudu kaltsiumioonide difusiooni teel mitokondrite maatriksisse. Selle tulemusena aktiveeritakse dehüdrogenaasid (püruvaat dehüdrogenaas, isotsitraat dehüdrogenaas ja 2-oksoglutaraat dehüdrogenaas) (Denton ja McCormack, 1985; Heineman ja Balaban, 1990; McCormack ja Denton, 1990; Hansford ja Zorov, 1998). Ent hiljuti on avastatud uus mehhanism, mille vahendusel kaltsiumioonid stimuleerivad hingamist ilma, et kaltsium akumuleeruks maatriksisse (Gellerich *et al.*, 2008, 2010; Seppet *et al.*, 2009). Nendes töodes on näidatud, et kui ajurakkude tsütoplasmas kaltsiumi sisaldus (füsioloogilise kontsentratsiooni piires) suureneb, kasvab mitokondri sisemembraani välisküljel lokaliseeruva glutamaat-aspartaat transporteri (aralari) aktiveerimise tulemusena mitokondrites glutamaat-sõltuva oksüdatiivse fosforüülimise kiirus. Esmased katsed näitavad, et ajurakkudes on glütserool-3-fosfaadist sõltuv hingamine samuti ekstramitokondriaalse kaltsiumi poolt aktiveeritav. Praegu uuritakse, kas need ekstramitokondriaalse kaltsiumi poolt aktiveeritavad mehhanismid toimivad ka lihasrakkudes ja kas nad patoloogiliste seisundite

(sarkopeenia, ER stress) puhul häiruvad. Vastavate geenide ekspressiooni on hinnatud ka käesolevas töös.

Hoolimata senisest uurimistööst ei mõisteta mitokondrite funktsiooni regulatsiooni-mehhanisme ikka veel täielikult. Paljud andmed näitavad, et tsütosoolse Ca^{2+} ülesandeks on koordineerida raku töökoormust ja ATP regenereerimist mitokondrites. Praegu valitseb seisukoht, et Ca^{2+} uniporterit poolt haaratud tsütosoolse kaltsiumi ioonid aktiveerivad mitokondrite maatriksi ensüüme: püruvaadi dehüdrogenaasi, α -ketoglutarat dehüdrogenaasi ja isotsitraat dehüdrogenaasi. Ent hiljuti on leitud, et Ca^{2+} -ioonid reguleerivad glutamaat-sõltuvat hingamist staadiumis 3, varustades aralari ehk mitokondriaalse glutamaat/aspartaat kandja abil mitokondreid glutamaadiga. Kuna ruteenium punane seda aktivatsiooni ei mõjuta, siis glutamaadi transport mitokondritesse on kontrollitud vaid ekstramitondriaalse Ca^{2+} poolt. Selline avastus näitab, et järelikult intramitokondriaalse kõrval reguleerib oksüdatiivset fosforüülimist ka mitokondriteväline kaltsium. See mehhanism toimib kui mitokondriaalne „gaasipedaal“, varustades OXPHOS protsessi nõudluse korral substraadiga. Need tulemused on kooskõlas hiljutiste Satrustegui *et al.* (2007) järeldustega, mille kohaselt aralar kui malaadi-aspartaadi tsükli osa, on kaasatud H^+ transportimises NADH-lt mitokondritesse. Kirjanduse andmed viitavad sellele, et mitokondrite pinnal eksisteerivad regulatoorsed Ca^{2+} -ioone siduvad kohad võivad olla teatud neurotoksiliste valkude märklauaks, nagu näiteks muteerunud huntingtiin ja teised. Nende valkude seostumine Ca^{2+} -ioone siduvate saitidega võib esile kutsuda kaltsiumi-regulatsiooni häireid põhjustades raku energeetilist puudulikkust ja neurodegeneratsiooni (Gellerich *et al.*, 2008).

1.6. Vananemisega kaasnev sarkopeenia

Sarkopeenia on vananemisega kaasnev haigus, mille puhul väheneb nii lihasmass kui ka lihasjõud (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010). Tuuakse välja kolme peamist sümptomit: (1) vähenev lihasmass; (2) vähenev lihasjõud; (3) vähenev füüsiline võimekus (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010). Esimest korda kasutas mõistet „sarkopeenia“ Irwin Rosenberg 1989. aastal. Seda, et sarkopeenia on geriaatiline ehk vanadushaigus, mis progresseerub inimese vananedes, näitavad andmed haiguse esinemisest valdavalt vanemates populatsioonides (Iannuzzi-Sucich *et al.*, 2002; Chien *et al.*, 2008).

Sarkopeenia on multifaktoriaalne haigus. Sarkopeenia patogeneesis omavad tähtsust mitmed erinevad faktorid. Inimese eluea jooksul toimunud mõjutustest võiks nimetada selliseid nagu vale toitumus, kroonilised haigused, voodihaigus ja ka teatud ravimite tarvitamine (Thompson, 2007; Paddon-Jones *et al.*, 2008; Sayer *et al.*, 2008). Geriaatrilisi haigusi on palju: osteoporoos, dementsus, kognitiivsed häired, depressioon, nägemishäired, diabeet ja

teised (Inouye *et al.*, 2007). Sarkopeenia lihaskoes on võrreldav osteoporoosiga luukoes (Morley, 2012).

Vananedes aeglustub rakkude taastootmine, millega kaasneb paljude lihaste funktsionaalsuse vähenemine. See väljendub lihaste nõrkuses ja liigutuste aegluses. Suureneb aeglaste lihaskiudude osakaal. Vananedes toimuv skeletilihase massi vähenemine on siiski põhjustatud nii kiirete kui ka aeglast tüüpi lihaskiudude mõõtmete ja hulga vähenemisest. On leitud, et kiirete kiudude (tüüp II) vähenemine algab varem (Lexell *et al.*, 1983). Lihasmassi vähenemist põhjustavad veel anaboolne resistentsus valkudele (Farnfield *et al.*, 2012) ja katabolismi domineerimine. Krooniline põletik (Visser *et al.*, 2002) ja vähene füüsiline aktiivsus (Castillo *et al.*, 2003) aitavad samuti kaasa sarkopeenia kujunemisele.

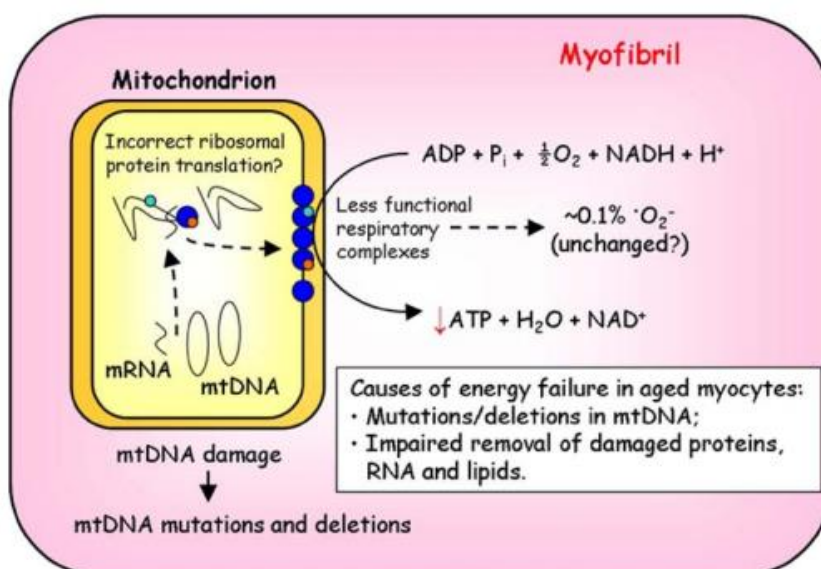
Rakutasandil toimub ensüümide efektiivsuse langus ja rakkude jagunemise aeglustumine. Näiteks ensüümi telomeraasi muutused põhjustavad kromosoomide lühenemist, samuti intensiivistub rakkude apoptoos ja nekroos (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010).

Närvisüsteemiga seotult väheneb ka motoneuronite hulk kesknärvisüsteemis või on olemasolevad motoneuronid kahjustatud (Aagaard *et al.*, 2010).

Sarkopeeniat eristatakse diagnoosimisel kahte tüüpi: primaarne ja sekundaarne. Primaarne on seotud ainult vanusega, aga sekundaarset sarkopeeniat võib esineda ka noortel inimestel seoses teatud haigustega (endokriinhaigused, organpuudulikkus), inaktiivse eluviisiga või vale toitumisega. Vanematel inimestel diagnoositakse enamasti multifaktoriaalset sarkopeeniat, sest tihti pole võimalik välja tuua, kas haiguse on tinginud ainult loomulik vananemine või lisaks ka muud põhjused (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010).

Lihaskiud (müotsüüdid) koosnevad paljudest müofibrillidest ja on mitmetuumalised. Igas müotsüüdis on sadu tuhandeid mitokondreid, kus OXPHOS käigus tekib ATP, mis on teatavasti lihase ja ionopumpade tööks vajalik energiaallikas. Aja jooksul kuhjuvad mitokondrites ROS stressist põhjustatud kahjustused (Harman, 1956, 1972; Miquel *et al.*, 1980). Tsellulaarsed mehhanismid sarkopeenia puhul on seotud eelkõige mitokondrite väärtalitlusega, mis põhjustab rakkude apoptoosi (Strasser *et al.*, 1999; Dirks ja Leeuwenburgh, 2002; Short *et al.*, 2005; Whitman *et al.*, 2005). Mitokondrid on apoptoosi reguleerivaks tsentriks (Pollack ja Leeuwenburgh, 2001) ja võivad seda indutseerida kasutades kas kaspas-sõltuvat või kaspas-sõltumatut rada (Danial ja Korsmeyer, 2004). Samuti on leitud, et mitokondrid võivad apoptoosi reguleerida, kui see interakteerub ER-iga (Chen *et al.*, 2002). Stressiolukorras, näiteks ATP puudusest tingitud kaltsiumi homeostaasi rikkumise korral (Harriman *et al.*, 2002) võib ER indutseerida mitokondrist tsütokroom c vabanemise, mis initsieerib apoptoosi (Chen *et al.*, 2002). ER võib olla seotud ka vananemisega kaasneva lihasapoptoosiga: katsetes on näidatud, et vanade rottide

skeletilihastes on suurenenud prokaspas-12 ekspressioon ja seeläbi ka apoptoos (Dirks ja Leeuwenburgh, 2004; Chung ja Ng, 2005; Dirks *et al.*, 2006). Apoptoosi stiimuleid on palju, üheks neist ongi mitokondrite vääraltitlus, mis võib olla põhjustatud elulise tähtsusega makromolekulide (DNA, mtDNA, RNA, valgud) oksüdatiivsete kahjustuste akumulatsioonist (Dirks *et al.*, 2006). Postmitoetiliste rakkude mitokondrid muutuvad vananedes: nad paisuvad, kristade ala väheneb, maatriksi seisukord halveneb (Wilson ja Franks, 1975). Pideva hapniku vabade radikaalide poolt tekitatud stressi tingimustes ja mtDNA mutatsioonide kuhjudes väheneb nende mitokondriaalsete ensüümide aktiivsus, mis osalevad tsitraaditsükli, beetaoksüdatsioon ja OXPHOS protsessis ning seetõttu produtseeritakse ka vähem ATP-d (Ozawa, 1995). Kirjeldatud mitokondrite funktsioonihäired viivad lõpuks raku energiapuuduseni.

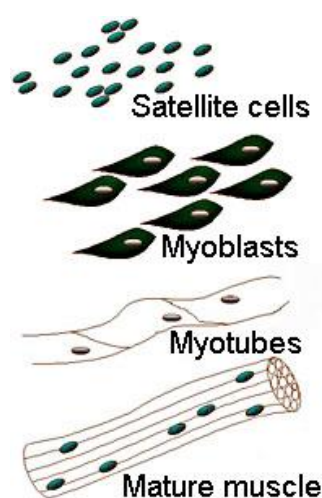


Joonis 2. Võimalik selgitus lihaskiududes vanemisest tingitud energiapuuduse tekkimiseks (Dirks *et al.*, 2006). Vanemisega kaasnevad mtDNA, RNA, lipiidide ja valkude kumulatiivsed kahjustused viivad lihase funktsiooni progressiivse languseni ja ATP tootmise vähenemiseni. See võib vananedes toimuda ka ilma ROS tekke intensiivistumiseta (Kujoth *et al.*, 2005). MtDNA mutatsioonid ja deletsioonid nagu ka rRNA või tRNA oksüdatsioon (joonisel tähistatud rohelisega) võivad põhjustada mitokondrite hingamisahela defektsete (joonisel tähistatud oranžiga) valkude teket.

1.7. Skeletilihase müogenees

Skeletilihas koosneb mitmetuumalistest rakkudest nn. müofiibritest e. lihaskiududest. Müogenees (lihaskiudude moodustumise protsess) saab alguse lihase satelliitrakkudest, mis on mitootiliselt uinuvad eellasrakud ja paiknevad lihaskiu perifeersetel aladel (Joonis 3). Neid kirjeldati esmakordselt juba 1961. aastal Mauro poolt, kuigi ametlikke tõendeid, et

satelliitrakud on teatud tüüpi tüvirakud tollal veel polnud ning nende anatoomiline seos lihastega oli tuvastatav vaid elektronmikroskoopia abil. Praeguseks on teada mitmed satelliitrakkude markerid nagu M-kadheriin, Pax7, Myf5 (Seale *et al.*, 2000; Péault *et al.*, 2007). Teatud stiimuli toimides satelliitrakud aktiveeruvad (sisenedes rakutsükliisse). Nende järeltulijateks on müogeensed prekursorrakud (müoblastid), mis läbivad mitu jagunemistsüklit enne kui liituvad müotuubideks ja edasi küpseteks lihaskiududeks. Müogeneesi kontrollivad mitmed transkriptsioonifaktorid nagu Myf5, Mrf4, MyoD ja müogeniin (MyoG). Satelliitrakkude lihaskiududeks diferentseerumisele eelneb *Pax* geenide allaregulatsioon, millega kaasneb müogeniini ekspressioon (Dhawan ja Rando, 2005; Relaix *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2014).



Joonis 3. Skeletilihase müogenees. Müogenees saab alguse satelliitrakkudest, mis on spetsiifilised tüvirakud. Nendest lähtudes tekivad müoblastid, mis diferentseerumise käigus liituvad müotuubideks, nii kujunebki lihas. Nagu jooniselt näha, sisaldavad satelliitrakke ka väljakujunenud lihased. (<http://neuromuscular.wustl.edu/mother/myogenesis.html>)

1.8. Replikatiivne vananemine

Vananedes toimub lihaskoes ja –rakkudes palju muutusi. Suuremate muutustena võib välja tuua lihasmassi ja –jõu vähenemise, rakkudes muutub nende morfoloogia, metabolism, geeniekspressioon, valkude protsessimine jne. Rakkude replitseerudes toimub aga pidevalt telomeeride lühenemine. Skeletilihastes, mis koosnevad müotsüütidest ja satelliitrakkudest, ei ole telomeeride lühenemine nii drastiline, vaid nende pikkus jääb enam-vähem samaks, kuid nad lühenevad siis, kui tegemist on mõne tõsise kahjustusega (Ponsot *et al.*, 2012). On teada, et lihaste regeneratsioon on vanadel inimestel aeglasem kui noorematel. Regeneratiivne võimekus on seotud nii satelliitrakkude arvuga kui ka nende võimega signaale vastu võtta

ning edastada. Samas võib seda mõjutada ka organism kui keskkond (Bigot *et al.*, 2008). Vananedes vähenev kasvufaktorite ja hormoonide (näiteks IGF-1) tase võib aeglustada rakkude regeneratsiooniprotsessi (Benbassat *et al.*, 1997). Lisaks on probleemseteks põhjusteks ka motoneuronite ja mikrovereringe funktsiooni vähenemine (Doherty *et al.*, 1993).

Vananevad müoblastid on rakud, mis ei saa enam rakutsükklisse siseneda, aga on võimelised diferentseeruma (Renault *et al.*, 2000). Vananevatest müoblastidest arenenud müotuubid on märkimisväärselt väiksemad kui noortest müoblastidest arenenud (Bigot *et al.*, 2008). Samuti on MRF-de (müogeenne regulatoorne faktor) ja CKI-de (tsükliin-sõltuvate kinaaside inhibiitor) ekspressioon vananevates rakkudes madalam ja ka hilisem (mõlemad on võtmefaktoriteks diferentseerumisprotsessi alguses). Eraldi võib välja tuua, et diferentseerumise alguses on MyoD valgu ja selle DNA-ga seondumise võime võrreldes noorte satelliitvalkudega märkimisväärselt vähenenud. Kuigi võiks öelda, et vähenemine võib olla põhjustatud ka üldise transkriptsiooni ja valgu stabiilsuse vähenemisest vanades rakkudes, siis DNA-ga seondumise vähenemine näitab selgelt MyoD funktsiooni kaotust hiirtes (Bigot *et al.*, 2008). Lisaks on vähenenud täiskasvanud MyoD-defitsiitsete (MyoD^{-/-}) hiirte lihastest eraldatud satelliitrakkude diferentseerumisvõime (Sabourin *et al.*, 1999).

Kuna on andmeid, et vananedes väheneb tüvirakkude võime produtseerida järglasrakke (Day *et al.*, 2010), siis selle tulemusena väheneb ka satelliitrakkude arv ja seeläbi lihassmass (Schultz ja Lipton, 1982; Renault *et al.*, 2002a,b; Kadi *et al.*, 2004; Brack *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2007; Shefer *et al.*, 2006, 2010). Nagu selgub ka ülalmainitud andmetest, moduleerib vananemine satelliitrakkude osalust diferentseerumisprotsessis (Lorenzon *et al.*, 2004; Beccafico *et al.*, 2007; Bigot *et al.*, 2008; Pietrangelo *et al.*, 2009). On teada, et vananenud satelliitrakud ekspresseerivad valku S100B. See on anti-müogeenne valk, mis stimuleerib proliferatsiooni, aga inhibeerib diferentseerumist (Beccafico *et al.*, 2011). Lisaks sellele kaotavad vananenud satelliitrakud võime piisavalt ekspresseerida neid fakroteid (MyoD ja müogeniin), mis on seotud müogeense diferentseerumise erinevate faasidega (Bigot *et al.*, 2008). Vastupidiselt noorte uuritavate lihastest pärit rakkudele, viitab vananenud lihaste satelliitrakkude geeniekspressiooni muster oksüdatiivsetele kahjustustele, tsütoskeleti muutustele, FOXO-sõltuva atroofia programmide aktivatsioonile, müotuubide moodustumise pidurdumisele ja Ca²⁺-sõltuva signaaliülekanne kahjustumisele (Lorenzon *et al.*, 2004; Fulle *et al.*, 2005; Beccafico *et al.*, 2007; Luin *et al.*, 2008; Pietrangelo *et al.*, 2009).

Väärrib märkimist, et vanade lihaste rakkudes ilmnevad just nende geenide regulatsioonihäireid, mis teostavad kontrolli mitokondriaalsete ja glükolüütiliste ensüümide üle (Bortoli *et al.*, 2005) – seega otseselt raku energeetilist seisundit mõjutavate valkude üle.

Nende muutuste funkionaalsed tagajärjed on ebaselged. Praeguseks on uuritud *in vitro* vananemise toimet energeetilisele metabolismile kultuuris kasvatatud müoblastides (Nehlin *et al.*, 2011; Minet ja Gaster, 2012). Seega on ilmne, et replikatiivse vananemise käigus väheneb müoblastide võime diferentseeruda.

1.9. Wolframiin 1 geeni ekspressioon ja seos haigustega

Hiire Wolframi sündroom 1 homolog e. Wolframiin 1 (*Wfs1*) geen asub viienda kromosoomi pikas õlas (5q). Western meetodiga on näidatud, et *Wfs1* ekspressioonitase on südame- ja skeletilihases küllaltki kõrge, ent siiski mõnevõrra madalam kui pankrease Langerhansi saarekestes ja ajukoes (Yamada *et al.*, 2006). *Wfs1* geeni produkt wolframiin on glükoproteiin, mis paikneb transmembraanselt endoplasmaatilises võrgustikus (Inoue *et al.* 1998; Strom *et al.* 1998), mida lihasrakus nimetatakse sarkoplasmaatiliseks võrgustikuks (SR). Geeni funktsiooni kohta on lihasrakus vähe teada, kuid energeetilisest seisukohast on oluline, et *Wfs1* on seotud selliste bioloogiliste protsessidega nagu SR Ca^{2+} homeostaasiga ja glükoosi homeostaasiga, kuna Ca^{2+} -ioonidel on täita oluline roll mitokondrite regulatsioonis ja glükoos on oluline substraat raku energiaga varustamisel glükolüüsi kaudu. Kaltsiumi põhjustatud regulatsioonihäired, glükoosipuudus jt tegurid kutsuvad esile endoplasmaatilise retiikulumi talitluse häireid (ER stress). *Wfs1* reguleerib rakutsükli ja apoptoosirada peaaesjalikult pankrease β -rakkudes (Yamada *et al.*, 2006). Samuti on näidatud, et pankreaserakkudes glükoos stimuleerib *Wfs1* translokeerumist plasmamembraani, kus ta interakteerudes adenülaattsüklaasiga on võimeline reguleerima insuliini produktsiooni ja sekretsiooni (Fonseca *et al.*, 2012).

Wfs1 geeniga seotud haigustest rääkides võib esmalt mainida Wolframi sündroomi, mis on autosomaalne retsessiivne haigus ning mida vahel väljendatakse ka koodnimedusega DIDMOAD (*Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, optiline atroofia ja kurtus*). *Wfs1* hiirte diabeedi-sarnase seisundiga (Luuk *et al.*, 2009) võivad kaasneda skeletilihase energeetilise metabolismi muutused, kuid seda aspekti pole teadaolevalt seni uuritud.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

2.1.1. Hinnata lihasraku energeetilist seisundit reguleerivate geenide ekspressioonitaset erinevates tingimustes ja lihastüüpides (sarkopeenia, replikatiivne vananemine *in vitro*, Wfs1 hiirte aeglased oksüdatiivsed ja kiired glükolüütilised skeletilihased).

2.1.2. Selgitada välja kreatiinkinaasi erinevaid isovorme kodeerivate geenide ekspressioonitaseme muutused müoblastide diferentseerumisel müotuubideks ning leida seoseid diferentseerumise ning energeetilise metabolismi muutuste vahel.

2.1.3. Selgitada välja, milliste uuritud geenide ekspressioonitaseme muutused viitavad lihasraku energeetilise puudulikkuse kujunemisele.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Reaktiivid

β-merkaptopetaanool ja *SYBR Green I*[®] (Sigma-Aldrich); tahke TBE originaal (NAXO Ltd) 5-kordse puhverlahuse (0.445M tris-boraati ja 10 mM EDTA) valmistamiseks; agaros *TopVision LE GQ*, 2-kordne ja 6-kordne laadimispuhver ja RNA suurusmarker *RNA Ladder, High Range* (Fermentas; DNA suurusmarker *Atlas Star 100 bp* ja DNA värv *TitanSight* (BioAtlas).

2.2.2. Uuritavad, koed ja rakukultuurid

Eksperimentaalsed uuringud on kooskõlas Euroopa Nõukogu inimõiguste ja biomeditsiini konventsiooniga ning WMA Helsingi deklaratsiooniga. Projektid, mille raames töö toimus, on saanud Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee või loomkatsete eetika komitee loa.

1) Noorte (20–30 a.) ja vanade (70–80 a.) inimeste reie nelipealihase (*m. vastus lateralis*) transkutaansed lihasbiopsiad ning nendest pärit müoblastide ja müotuubide kultuurid.

2) Eksperimentides kasutatavad rakukultuurid olid valmistatud dots. Andres Piirsoo töögrupi poolt. Inimese müoblastide primaarne kultuur saadi skeletilihase biopsiamaterjalist. *In vitro* vananemise uurimiseks võrreldi müoblaste pärast teist ümberkülvi e. passaaži ja pärast 6. ümberkülvi.

Mononukleaarsete rakkude diferentseerumine indutseeriti DMEM kasvukeskkonnas ITS süsteemi juuresolekul. Müoblastid ühinesid sellises diferentseerumiskeskkonnas mitmetuumalisteks müotuubideks.

3) Muutmata genoomiga (*wild-type*) ja mutantsete *Wfs1* hiirte (*Wfs1* geenis puudub 8. ekson) kiired glükolüütilised (*m. rectus femoris*) ja aeglased oksüdatiivne skeletilihased (*m. soleus*). Katsetes kasutati isasloomi.

2.2.3. Totaalse RNA eraldamine

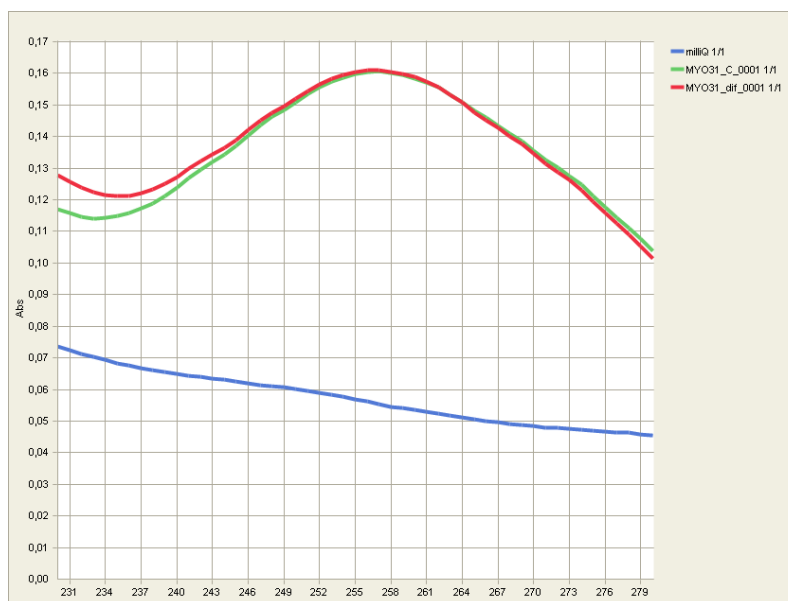
RNA eraldamine lihaskoest. Biopsiad toodi kliinikust spetsiaalses RNAd säilitavas lahuses *RNAlater*[®] (Ambion). Hiire skeletilihastest eraldati RNA vahetult pärast prepareerimist või kasutati lihaskoost, mida hoiti -80°C juures. RNA eraldati lihaskoest firmatoote *RNeasy*[®] *Fibrous Tissue Mini Kit* (Qiagen) abil järgides tootja protokoll (RNeasy[®] *Fibrous Tissue Handbook*, 2006, lk 14-19). Esmalt lisati lüüsimislahusele β -merkaptopetanooli (valkude struktuuris S-S e. väävelsildade lõhkumiseks ja samal ajal ka rakkude lüüsimisel vabanevate valkude ribonukleaaside inaktiveerimiseks denatureerimise teel). Seejärel tõsteti sinna 30–50 mg kudet, mida homogeniseeriti 10 kuni 30 sekundit, kasutades roteeruvate lõiketeradega homogenisaatorit (Janke ja Kunkel). Järgnes proteinaas K töötlus. RNA seoti etanooli juuresolekul eraldamiskoloni membraaniga, pesti selleks ettenähtud lahustega ning lõpuks elueeriti 35 μl RNAasivaba veega. Sel viisil saadud totaalse RNA preparaati sisaldab eeldatavalt kõiki mRNA järjestusi, mille pikkus ületab 200 nukleotiidi. Kuna transport-RNAd on valdavalt lühemad, siis on preparaati mRNA-rikastatud.

RNA eraldamine müoblastidest ja müotüübidest. RNA eraldati rakkudest *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen) abil ning töös järgiti tootja protokoll (RNeasy[®] *Plus Mini Handbook*, 2005, lk. 18-23). Ühe proovi kohta võeti ligikaudu 3 miljonit rakku. Peale β -merkaptopetanooli sisaldava lüüsimislahuse lisamist rakkudele, pipeteeriti moodustuv lüsaat homogeniseerimiseks spetsiaalsesse koloni *QIAshredder* (Qiagen). Rakulüsaat voolutati kolonnist läbi tsentrifuugimise teel ja viidi üle *RNeasy spin column* (Qiagen) koloni ning peale korduva pesemise elueeriti koloni seondunud nukleiinhape 30 μl RNAasivaba veega.

2.2.4. RNA kvaliteedi hindamine ja kontsentratsiooni määramine

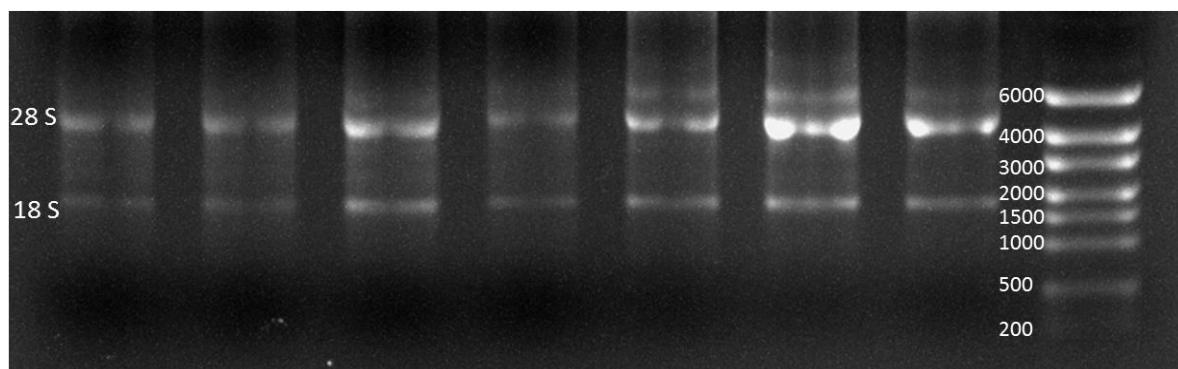
RNA preparaadi puhtuse ja kontsentratsiooni hindamine neeldumisspektri alusel. RNA neeldumisspekter registreeriti toatemperatuuril vesilahuses UV/VIS spektrofotomeetriga *Multiskan GO* (Thermo Scientific) lainepikkuste vahemikus 230 kuni 280 nm (Joonis 4). RNA (ka DNA) neeldumismaksimum on 260 nm. Neeldumine lainepikkusel 230 nm näitab kontaminatsiooni selliste orgaaniliste ühenditega nagu näiteks tiotsüanaadid, fenolaadid ja karbohüdraadid. TRIzol reagent kui fenoolne ühend annab neeldumise 230 nm ja 270 nm juures. Neeldumine 280 nm juures näitab peamiselt valguliste kontaminantide sisaldust preparaadis. Neeldumiste suhet 260 nm ja 280 nm juures peetakse nukleiinhappe puhtust iseloomustavaks informatiivseks näitajaks. Eeldatakse, et nimetatud suhe peab olema

ligikaudu 2. Seda kriteeriumit arvestati ka käesolevas töös. RNA kontsentratsioonid mõõdeti neeldumismaksimumi (260 nm) juures järgnevalt: 96-kohalisele plaadile *UV-star* (Greiner bio-one) kanti 96 µl deioniseeritud vett (milliQ) vett, millele lisati 3 µl RNA vesilahust. 0-proovina (blank) lisati ühte plaadi süvendisse 99 µl deioniseeritud vett (milliQ). Arvutustel lähtuti neeldumiskõrbest, mille kohaselt küvetis (paksusega 1 cm) oleva RNA vesilahuse kontsentratsioon 40 µg/ml annab neeldumise väärtuseks 1, kuid kalkulatsioonidel võeti arvesse vedelikukihi vertikaalset mõõdet antud mahu juures. RNA kontsentratsiooni oli vaja teada, et laadida optimaalne kogus nukleiinhapet geel-elektroforeesiks, samuti ka selleks, et võtta ettenähtud kogus RNAd pöördtranskribeerimiseks.

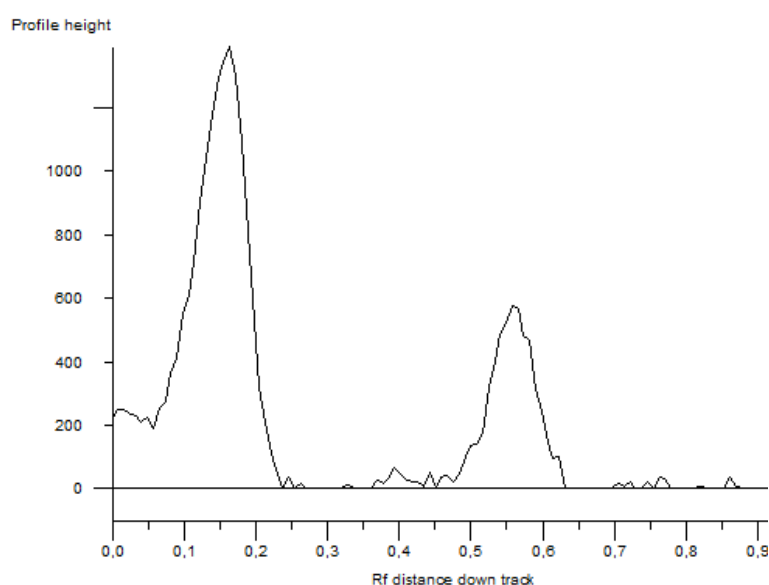


Joonis 4. Müoblastidest (MYO31_C) ja müotuubidest (MYO31_dif) eraldatud RNA originaalspektrid. Roheline joon vastab neeldumisele müoblastidest eraldatud RNA proovis, punane joon vastab neeldumisele müotuubidest eraldatud RNA proovis ja sinine joon näitab neeldumise taset 0-proovis. X-teljel on lainepikkus (nm), Y-teljel on absorptsioon ehk neeldumine.

RNA kvaliteedi elektroforeetiline hindamine. RNA kvaliteedi hindamiseks teostati elektroforees 0,8% agarosgeelis 1-kordses tris-boraat-EDTA (TBE) puhvis (50 mM Tris-boraat, pH 8,3). Kasutati elektroforeesisüsteemi *Multisub Mini* (Biocom Ltd.). Agarosgeel valmistati *Fermentas Top Vision™ LE* (madal elektroendoosmoos) *GQ* agarosist. Vedelale agarosgeelile lisati UV valguses nukleiinhappe visualiseerimiseks ühendit *TitanSight* (BioAtlas). RNA proovide geeli kandmiseks segati need 2-kordse laadimispuhvriga (Fermentas) vahekorras 1:1. Elektroforees toimus 45 minuti jooksul rakendades toitepinget 75 V (5 V/cm). Geelis olev RNA visualiseeriti ja pildistati geelidokumenteerimissüsteemiga SYNGENE (Joonis 5) ning analüüsiti GENETOOLS tarkvara abil (Joonis 6). Eelduseks oli, et nähtavate diskreetsete ribosomaalse RNA fragmentide 28S ja 18S intensiivsuste suhe oleks ligikaudu 2.



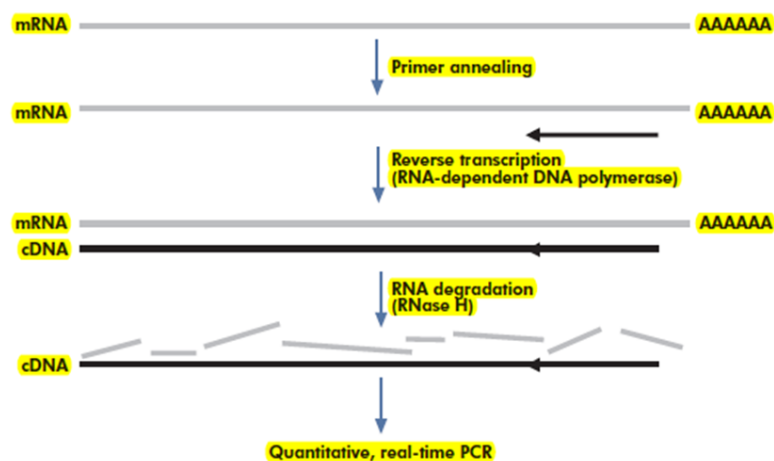
Joonis 5. Näited totaalse RNA elektroforeesi tulemustest (0,8%-lises agarosgeelis). Äärmisele parempoolsele rajale on laaditud RNA suurusmarker *Riboruler High Range* (Fermentas). Numbrid fragmentide juures tähistavad aluste arvu. 28S ja 18S tähistavad ribosomaalse RNA fragmente.



Joonis 6. Näide ribosomaalse RNA fragmentide 28S (vasakul) ja 18S (paremal) suhte hindamisest GENETOOLS tarkvara (Syngene) abil. Piikide kõrguste suhe näitab, et 28S ja 18S suhe vastab ülalmainitud nõutavale kriteeriumile.

2.2.5. RNA pöördtranskribeerimine

Saadud totaalse RNA preparaati sisaldas kõiki mRNA järjestusi, mille pikkus ületab 200 nukleotiidi. Selleks, et uurida geenide ekspressiooni mRNA tasemel reaalkaaja-PCR abil, konverteeriti need üheaheeliseks komplementaarseks DNAks (cDNA). Sellist moodust kasutatakse tänapäeval seoses pöördtranskriptaaside avastamisega sageli, sest mRNA-d on ebastabiilsed ja võivad olla väga lühikese elueaga. RNA pöördtranskribeeriti (RT) cDNA-ks *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen) abil ning järgiti tootja protokollit (*QuantiTect Reverse Transcription Handbook, 2009, lk. 11-13*), mille kohaselt RT protseduurile (Joonis 7)



Joonis 7. cDNA saamise skeem. Practioner (oligoT) seondub mRNA tüüpilise polüA otsaga. *Quantiscript* pöördtranskriptaas evib Rnase H aktiivsust ning degradeerib RNA RNA:DNA hübridist.

eelnes DNA eemaldamise protseduur. See seisnes selles, et RNA vesilahusele, mis sisaldas ligikaudu 1 µg RNAd, *gDNA wipeout* reagenti ja vajadusel lisati veel RNAasivaba vett. Seejärel inkubeeriti proove 42 °C juures 2 minutit. Pöördtranskribeerimise läbiviimiseks oli välja töötatud funktsionaalne tööprotokoll Exceli tabeli formaadis, mille näide on toodud alljärgnevalt (Tabel 1). Osade proovide puhul (kui materjali oli piisavalt) teostati ka NRT reaktsioon kui negatiivne kontroll. Protokollis on näidatud totaalse RNA sisaldused preparaadis ja pöördtranskribeerimiseks võetavad RNA kogused.

RT tulemusena saadud cDNAd hoiti kuni reaalkaja-PCR teostamiseni -20 °C juures.

Tabel 1. Näide tööprotokollist, mida kasutati RNA pöördtranskribeerimisel reaktsioonisegude valmistamisel. Proovide identifitseerimiseks kasutati koe prepareerimise kuupäeva ning staatusele ja koele viitavat lühendit.

RNA pöördtranskribeerimine										
Pöördtranskriptsiooni kuupäev		14.11.2013								
Kasutatud protokoll		QIAGEN Quantitect Reverse Transcription Handbook 03/2009								
Märkused		gDNA WO 2 min, RT 20 min								
		I			II					
	Kogus	gDNA Wipeout Buffer, 7x	RNA	Vesi	Quantiscript Reverse Transcriptase	Quantiscript RT Buffer, 5x	RT Primer Mix	Lõppmaht	C (RNA)	RNA kogus
Proov	korda	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µg/µl	µg
MH Wfs 22.05.2013	1	2	2	10	1	4	1	20	0,61	1
MH WT 18.06.2013	1	2	10	2	1	4	1	20	0,10	1
MH_WT_23_05_2013	1	2	2	10	1	4	1	20	0,68	1
MH_Wfs1_28_05_2013	1	2	3	9	1	4	1	20	0,39	1
					Vesi					
NRT	korda	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µl	µg/µl	µg
MH WT 18.06.2013	1	2	10	2	1	4	1	20	0,10	1

2.2.6. Reaalaja-PCR

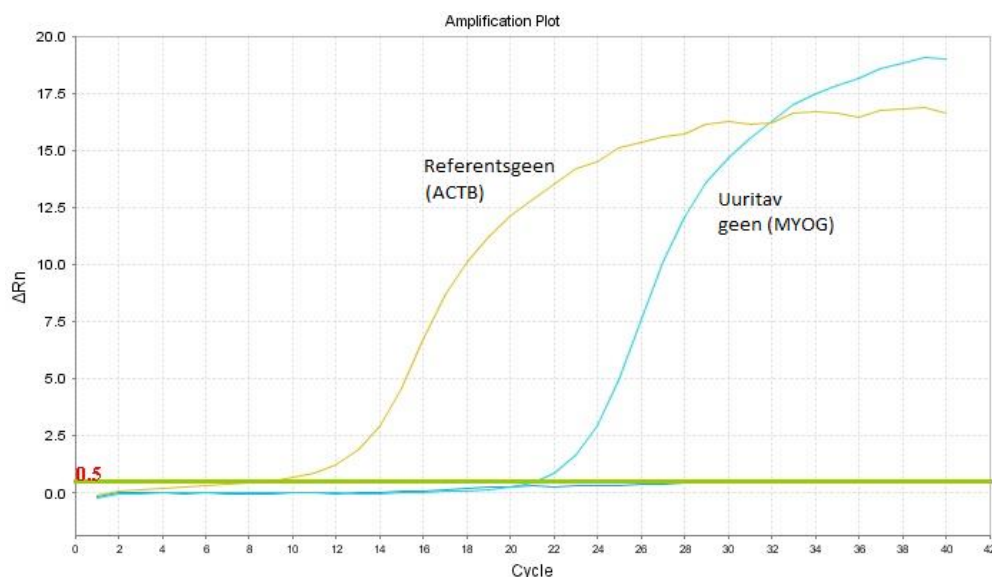
Põhiprintsiibid. Reaalaja-PCR meetod võimaldab fluorestsentsi järgi kvantitatiivselt hinnata produkti akumulierumist reaalajas. Käesolevas töös kasutati DNA visualiseerimiseks ühendit *SYBR Green I*. Põhimõte seisneb selles, et *SYBR Green I* annab tugeva fluorestsentsi seondudes kaheaheelalise DNA molekulidega (dsDNA). Kui *SYBR Green* on seondumata, siis fluorestsents puudub. Kuna PCRi algfaasis on keskkonnas vähe kaheaheelalist DNA-d, siis on fluorestsents nõrgem, kuid mida rohkem dsDNA-d tekib, seda tugevam on fluorestsents (Joonis 8). Antud juhul tuleb aga arvestada sellega, et fluorestsents võib tekkida ka mittespetsiifilise seondumise tulemusena (nt praimerite dimeeride tekke ja genoomse DNA sisalduse puhul). Selleks on otstarbekas disainida praimerid nii, et päri- ja vastassuunaline praimer ei saaks moodustada komplementaarseid järjestusi ning et vähemalt üks praimeritest oleks eksonite ristumiskohast. Spetsiifilise produkti kindlakstegemist võimaldab ka see, kui praimerid on erinevatest eksonitest.

Käesolevas töös kasutatud praimerite nukleotiidsed järjestused ja vastavate amplikonide pikkused on esitatud alljärgnevas tabelis (Tabel 2).

Tabel 2. Kasutatud praimerite nukleotiidsed järjestused, liigspetsiifilisus ja amplikonide pikkused. Hs – *Homo sapiens*, Rn – *Rattus norvegicus* ja Mm – *Mus musculus*. Praimerite järjestused: pärisuunaline (ülalpool) ja vastassuunaline (allpool). Amplikoni pikkused on esitatud aluspaarides.

Geen	Liik	Praimeri järjestus 5'–3'	Amplikoni pikkus (bp)
ACTB β-aktiin	Rn	AGCCATGTACGTAGCCATCCA	81
	Mm	AGCCATGTACGTAGCCATCCA	
ACTB β-aktiin	Hs	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	140
		AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	
B2M β2-mikroglobuliin	Hs	TGTCTTTCAGCAAGGACTGG	148
		GATGCTGCTTACATGTCTCG	
CKB Kreatiinkinaas B	Mm	TCGTGGCATATGGCACAATG	114
		CGGGTGAACACTTCCTTCATG	
CKM Kreatiinkinaas M	Rn	GTCCGTGGAAGCTCTCAACAG	133
	Mm	CAGAGGTGACACGGGCTTGT	
CKMT2 Mitokondriaalne CK	Mm	AGCAAGGATCCACGCTTTTCT	126
		TCTGCCGATCCGATCTATGTT	
GAPDH Glütseeraldehüd-3- fosfaat	Mm	TGAAGCAGGCATCTGAGGG	102
		CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG	
HPRT1 Hüpoksantiin-ribosüül- transferaas	Hs	GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG	101
		GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG	
HPRT1 Hüpoksantiin-ribosüül- transferaas	Rn	GCAGTACAGCCCCAAAATGG	85
	Mm	AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA	
MPC1 Mitokondriaalne püruvaadi kandja 1	Rn	GATGACTTTCGCCCTCTG	156
	Mm	CGCTTACTCATCTCGTAGTT	

MPC2 Mitokondriaalne püruvaadi kandja 2	Mm	ACCGACTCATGGATAAAGTG	119
		CACCAATCCCCATTTCATTA	
SLC25A11 Malaat- α -ketoglutaraat antiporter (OGC)	Hs	GACTCAGGCTACTTCTCTG	164
	Rn	ACATCCAGCCCATTCTT	
	Mm		
SLC25A12 Glutamaat-aspartaat antiporter AGC (aralar1)	Rn	ACTGTACCGAGGTCTGAT	152
	Mm	CTCCAGCGCAACCTC	
SLC25A13 Glutamaat-aspartaat antiporter AGC (tsitriin)	Rn	AGGTGACTAAGGAGGAGTT	115
	Mm	GTCATGCGCCCCCTC	
SLC25A22 Mitokondriaalne glutamaadi kandja 1	Rn	AGGGGAGCAGCAGTAA	104
	Mm	AGCTTCTGTCCATCCTTAG	
MYOG Müogeniin	Hs	CAGTGCACTGGAGTTCAGCG	139
		TTCATCTGGGAAGGCCACAGA	



Joonis 8. Tüüpilised amplifikatsiooni originaalkõverad. Need kõverad on saadud esitades lävetsükliatele vastavad fluorestsentsi väärtused, mis on võrdelised tekkinud reaktsiooniprodukti hulga (ΔR_n). Etteantud läveks on 0.5. Uuritava geeni (*MYOG*) lävetsükli erinevus (ΔCT) referents ehk *housekeeping* geeniga võrreldes on 11. X-teljel on PCR tsükli arv, Y-teljel reaktsiooniprodukti juurdekasv (ΔR_n).

2.2.7. Tööprotokoll ja DNA dissotsiatsioonikõverate analüüs

Selles töös kasutati reaalaja-PCRi tegemiseks *QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit* (Qiagen) järgides tootja protokoll (i>QuantiTect® SYBR® Green PCR Handbook, 2009, lk 12-14) ning kasutades *StepOnePlus™* (Applied Biosystems) süsteemi. Reaktsiooni maht igas PCR plaadi (Applied Biosystems) süvendis oli 11 μ l.

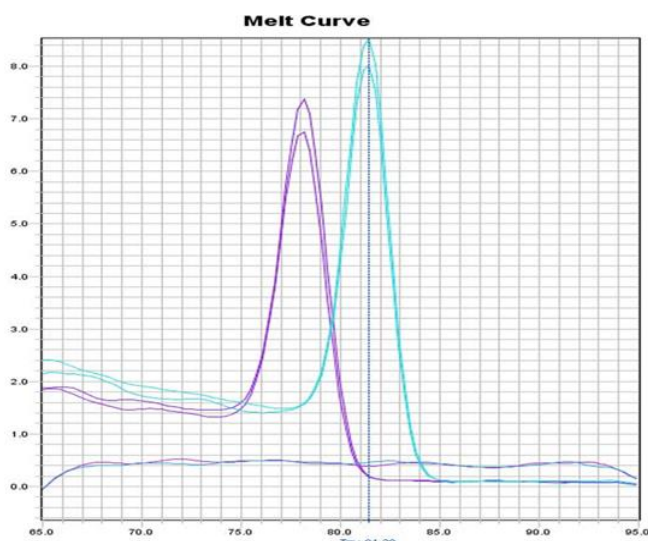
PCR režiim: Esmalt polümeraasi aktiveerimine 15 min 95 °C juures, seejärel 35-40 tsükli:

1. Denaturatsioon 15 sekundit 94 °C juures
2. Praimeri seondumine 30 sekundit 56 °C juures
3. DNA süntees 30 sekundit 72 °C juures

PCR-järgselt, DNA dissotsiatsiooniprotokolli järgi, saab välja selgitada ebasoovitavate praimerite dimeriseerumist. Praimerite dimeerid ilmnevad piikidena madalamatel temperatuuridel.

Antud töös, iga reaalaja-PCR eksperimendi lõpus (tavaliselt peale 35. tsükli) koostati ka nn dissotsiatsiooniprotokoll. Paljud reaalaja-PCR instrumendid, sealhulgas *StepOnePlus™*, mida kasutati antud töös, võimaldavad kohe pärast viimast PCR tsükli määrata reaktsiooniproductide dissotsiatsiooni- ehk sulamistemperatuuri (T_m). T_m määramiseks tõstab instrument ettenähtud vahemikus pidevalt temperatuuri ning samaaegselt registreerib fluorestsentsi. Viimase tugevus sõltub *SYBR Green I* seostumisest kaheahelalise produktiga. Madalamatel temperatuuridel, kui ahelad ei ole lahti keerdunud, fluorestsents oluliselt ei vähene. Ahelate lahtikeerdumise suurenedes (T_m piirkonnas) fluorestsents nõrgeneb kiiresti, sest dsDNA denatureerumise tõttu *SYBR Green I* enam ei seostu. Registreeritud fluorestsentsist arvutab tarkvara negatiivse tuletise temperatuuri järgi ja genereerib nn dissotsiatsioonikõverad, mis vastavad olukorrale, mil 50% DNA ahelatest on lahtikeerdunud. Näitena on esitatud ühes teatud konkreetses eksperimendis saadud dissotsiatsioonikõverad (Joonis 9).

T_m sõltub põhiliselt konkreetsete praimerite omadustest ja mingil määral ka reaktsioonikeskkonnast. Dissotsiatsiooniprotokolli T_m järgi on võimalik kontrollida amplikonide spetsiifilisust.



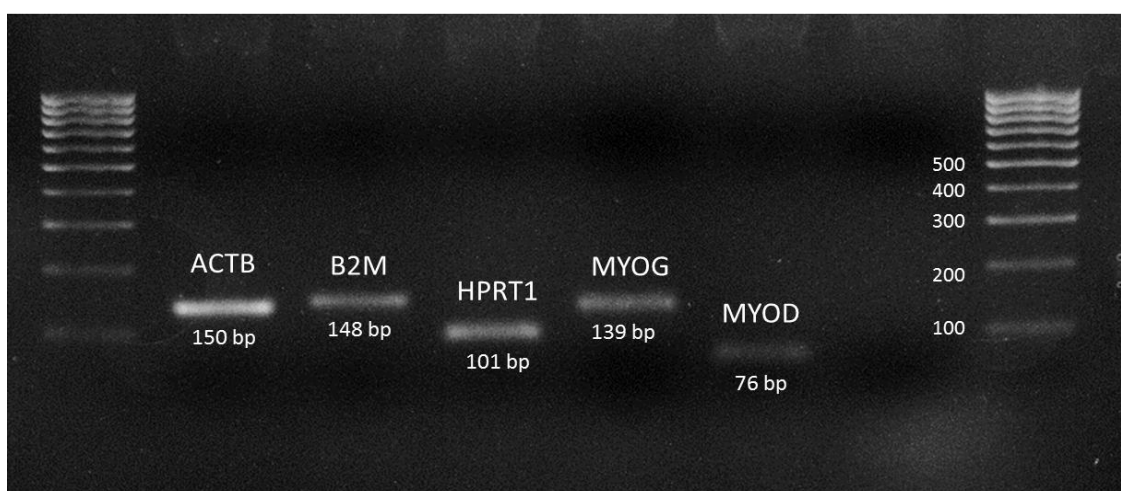
Joonis 9. CKMT2 (lilla joon) ja HPRT1 (sinine joon) dissotsiatsioonikõverad. Jooniselt on näha, et olulist praimerite dimeriseerumist ei esine. *CKMT2* ja *HPRT1* T_m on vastavalt 78,1 °C ja 81,4 °C. Negatiivsed kontrollid (NTC) näitavad, et PCR produkti ei tekkinud. X-teljel on temperatuur (°C), Y-teljel on negatiivne tuletis (-dF/dT).

2.2.8 mRNA taseme suhteline kvantiteerimine

Teatud momendil ületatakse lävi ehk etteantud fluorestsentsi tase (Joonis 8). Tsükli, mille ajal toimub selle läve ületamine, nimetatakse lävetsükliks (CT). Mida rohkem on paljundatavat algmaterjali, seda kiiremini akumulereerub eksponentsiaalselt kulgevas reaktsioonis kaheahelaline produkt ja seda varasemas tsükli ületatakse lävi. Seega, mRNA erinevate tasemete tõttu toimub läve ületamine erinevates tsüklikes. Siit tuleneb lävetsükli erinevuse mõiste (ΔCT). Suhtelisel kvantiteerimisel arvutatakse lävetsüklike erinevus referents- ehk koduhoidja-geenide suhtes. mRNA tasemete võrdlemisel erinevates kudedes ja rakutüüpides või normi ja patoloogia puhul on eelduseks see, et nende geenide ekspressioon peab jääma muutumatuks. Antud töös olid referentsgeenidena (*housekeeping*) kasutusel *HPRT1*, *ACTB*, *GAPDH* ja *B2M*. Nendest kolme viimase sobivust müoblastide uuringuks on ka spetsiaalselt testitud ning on leitud, et *B2M* ekspressioon on stabiilseim (Stern-Straeter *et al.*, 2009). Erinevus kordades võrreldavate ekspressiooni-tasemete vahel arvutati $\Delta\Delta CT$ meetodil (Livak ja Schmittgen, 2001).

2.2.8 Amplikonide elektroforeetiline analüüs agarosgeelis

Kuigi reaalaaja-PCR puhul ei ole otsest vajadust lõpp-produkti elektroforeetiliseks hindamiseks, on vahel otstarbeks veenduda, kas kasutatud praimerite abil on saadud ettenähtud pikkusega amplikonid. Näide taolisest kontrollist on esitatud joonisel 10. Võrreldes praimerite kohta käivat informatsiooni (Tabel 2) ja elektroforeetiliselt määratud amplikonide pikkusi, võib öelda, et nende geenispetsiifiliste praimeritega on saadud ettenähtud pikkusega järjestused.



Joonis 10. Reaalaaja PCR amplikonide elektroforees 1.8%-lises agarosgeelis. Äärmistel radadel on DNA suurusmarker *Atlas Star 100 bp* (BioAtlas), DNA fragmentide pikkused on esitatud aluspaarides.

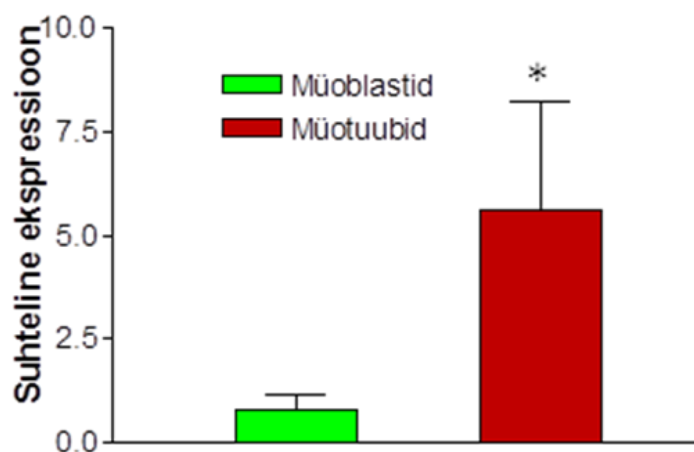
2.2.9. Andmete statistiline töötlus

Katseandmete organiseerimine ja elementaarne statistiline töötlus teostati *MS Office Microsoft Excel 2010* programmiga ning detailsemalt töödeldi *GraphPad Prism 3* abiga. Uuritud proovid ja saadud andmed on sisestatud ja säilitatud patofüsioloogia uurimisgrupi ühiskasutuses olevasse *MS Office Access* andmebaasi. Originaalfailid on salvestatud kasutatud reaalaaja-PCR süsteemiga ühendatud arvuti kõvakettale. Andmeid analüüsiti põhiliselt kahe-suunalise, paaritu t-testi abil. Rakkude erinevatele ümberkülvidele vastavate andmete võrdlemisel kasutati kahe-suunalist paaris t-testi. Mediaane võrreldi Mann-Whitney testiga.

2.3. Tulemused

2.3.1. Kreatiinkinaasi valke kodeerivate geenide ekspressiooni muutused

Arvestades CK isovormide olulisust ja CK energiaülekanDESüsteemi keskset rolli rakkude energeetilise seisundi kujunemisel (kirjeldatud punktis 1.2., lk. 8), hinnati vastavate geenide ekspressiooni mRNA tasemel mitmetes erinevates tingimustes (lihasraku arenemine, vananemisega kaasnev sarkopeenia, volframiini defitsiit). Saadud tulemused on esitatud joonisel 11, millel on kujutatud CK lihastüüpi isovormi ekspresseerumist rakkude diferentseerumisprotsessis müoblastidest müotuubideks.



Joonis 11. CKM geeni ekspressioonitaseme muutus müoblastide diferentseerumisel müotuubideks.

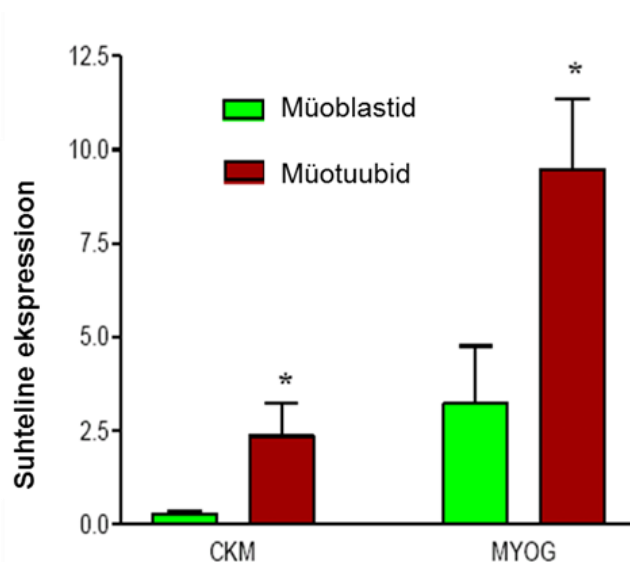
Ekspressioonitasemed on arvatud endogeense kontrolli (*ACTB* geeni ekspressioonitaseme) suhtes.

* – statistiliselt oluline erinevus müoblastide ja müotuubide vahel ($p < 0.05$); $n = 5$.

Mõõdeti viielt uuritavalt inimeselt pärit rakke. Selgus, et *CKM* tase inimese nelipealihasest (*m. vastus lateralis*) pärit kultuuristatud müoblastides oli ülimald ning diferentseerumisprotsessis tõusis ekspressioonitase oluliselt. Eriti suur nihe toimus

müotuubidest küpse lihasraku (müofibri) moodustumisel. Müoblastides kui lihasraku eellastes avaldus kõige tugevamini hoopis *CKB* ning mitokondriaalse CK sarkomeerset ega ka ubikviitset vormi kodeerivad *CKMT2* ja *CKMT1* nendes ei ekspresseerunud.

CKM on sageli kasutusel lihasrakkude markerina ja nagu selgub ka ülalmainitust, iseloomustab selle geeni ekspressioonitase rakkude diferentseerumise astet. Ühes katseseerias mõõdeti paralleelselt *CKM* ja müogeense transkriptsioonifaktori müogeniini (*MYOG*) ekspressiooni. Tulemused on esitatud joonisel 12. Selgus, et mõlemad mRNA tasemed on oluliselt kõrgemad müotuubides, mis näitab diferentseerumisprotsessi toimumist. Võib öelda, et inimese skeetilihase arenevates rakkudes *CKM* ja *MYOG* koekspressseeruvad. *CKM* geeni produkt, lihastüüpi isovormil, on täita lihase funktsioonis oluline roll. See valk on lihases seotud müofibrillidega ja osaleb teistes tähtsates rakusisestes interaktsioonides.

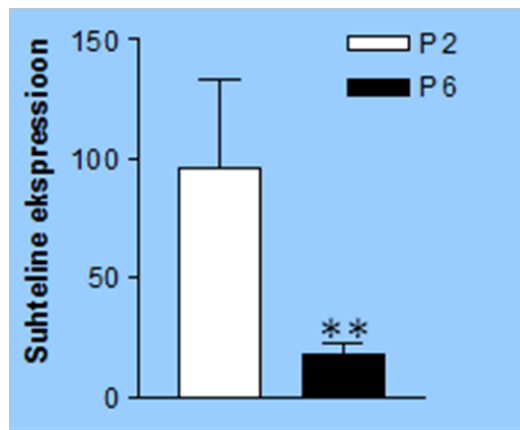


Joonis 12. Diferentseerumismarkerite ekspressiooni muutused mRNA tasemel müoblastide diferentseerumisel müotuubideks.

Ekspressioonitasemed on arvatud *ACTB* ja *B2M* suhtes.

* – statistiliselt oluline erinevus müoblastide ja müotuubide vahel ($p < 0.05$); $n=5$.

Selleks, et saada lisaandmeid, mis viitavad CK rollile rakkude erinevatel eluetappidel, uuriti replikatiivset vananemist *in vitro* rakukultuuris, võrreldes *CKB* geeni ekspressioonitaset teise ja kuuenda passaaži (ümberkülvi) müoblasti rakkudes. Joonisel 13 esitatud tulemused näitavad, et *CKB* tase oli kuuendaks ümberkülviks oluliselt langenud.

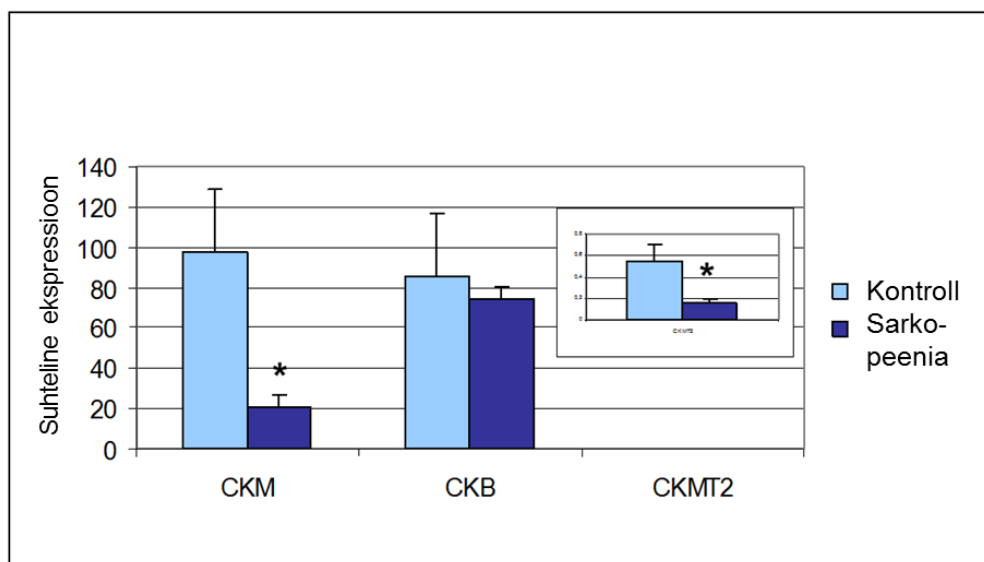


Joonis 13. CKB geeni ekspressioonitaseme muutus müoblastide replikaatiivsel vananemisel rakukultuuris *in vitro*.

Ekspressioonitasemed on arvatatud *B2M* suhtes ja skaleeritud 1000 korda.

** – statistiliselt oluline erinevus müoblastide ja müotuubide vahel ($p=0.0095$); $n=6$.

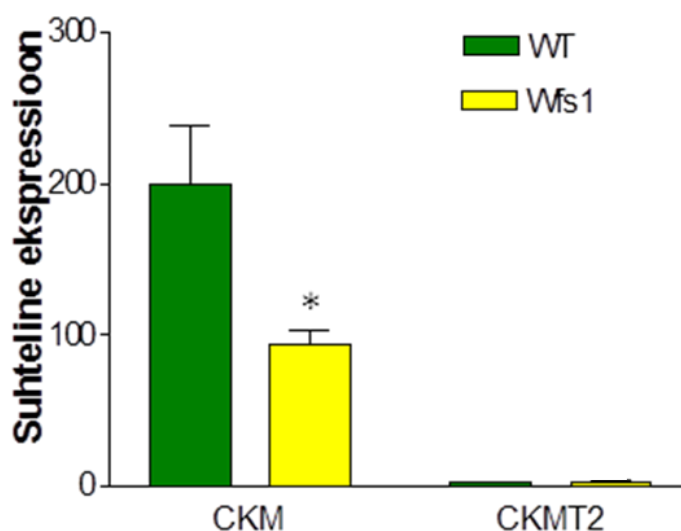
Rakkude vananemise ilmingud *in vitro* esinesid nii noorte kui ka vanade inimeste lihastest pärit rakkudes, olenemata sellest, et neid kasvatati sarnastes tingimustes ja seega vananenud organismi mõju oli elimineeritud, mistõttu tulemused summeeriti. *CKM* ja *CKMT2* ekspressioon ei olnud müoblastide 6. ümberkülvi puhul detekteeritav. Sellel lihasraku arenguastmel ekspresseerub ilmselt vaid *CKB*, mille osakaal rakkude küpsemisel langeb, kusjuures *CKMT2* ja *CKM* ekspressioonitase tõuseb. Vananemisega kaasneva sarkopeenia uurimisel määrati kreatiinkinaases energiaülekanDES osalevatele valkudele vastavad mRNA tasemed noortelt (kontrollgrupp) ja vanadelt (sarkopeenia) uuritavatelt võetud lihasbiopsiatest lähtudes (Joonis 14).



Joonis 14. Kreatiinkinaasi geenide ekspressioonitaseme muutused vananemisega kaasneva sarkopeenia korral. Kuna *CKMT2* tase oli võrreldes teiste geenidega väga madal, siis on vastav joonis sisestatud erinevas skaalas.

Sarkopeenia korral erinesid just lihastüüpi isovorme kodeerivate geenide ekspressioonitasemed (*CKM* ja *CKMT2*). Ajutüüpi *CKB* mRNA tase jäi ligikaudu samaks. Analoogilisi tulemusi kreatiinkinaasi ekspressiooni kohta skeletilihases seoses vananemisega on esitatud ka varem, kuid need on saadud loomkatsetes ja mõõdetud valgu tasemel (Piec *et al.*, 2005; O’Connell *et al.*, 2007). Käesoleva töö tulemused näitavad, et nimetatud muutused toimuvad ka inimese skeletilihases mRNA tasemel.

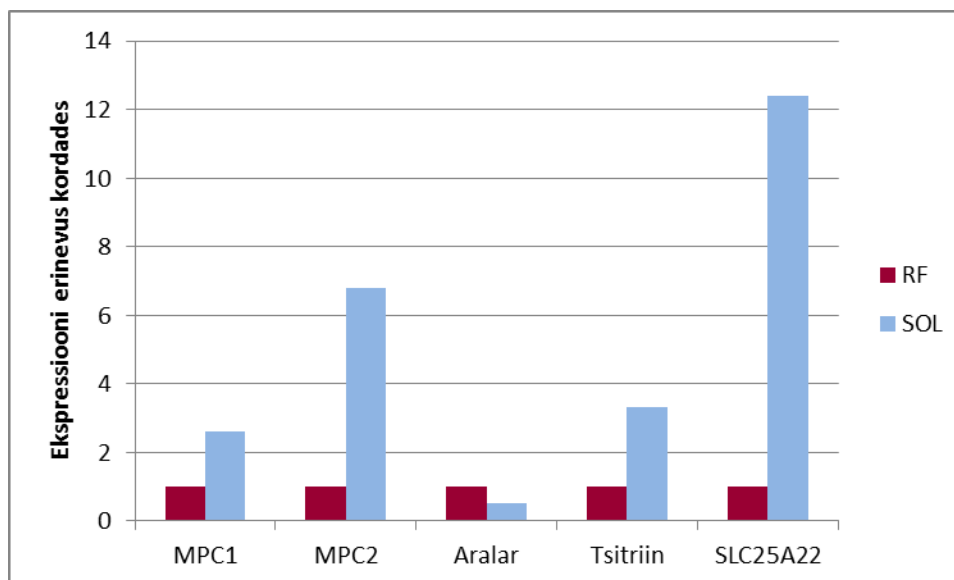
Hiljuti sedastati, et aju-tüüpi *CKB* on posttranslatsiooniliselt reguleeritav AMP-aktiveeritava proteiinkinaasi (AMPK) poolt, kusjuures fosforüleeritud *CK* lokaliseerub endoplasmaatilises retiikulumis (Rios *et al.*, 2014). Autorid leiavad, et need valgud koopereeruvad omavahel energeetilise stressi tingimustes. Kuna volframiin on ER membraaniseoseline valk ja *Wfs1* geenil on oluline roll ER stressi regulatsioonis (Fonseca *et al.*, 2010), uuriti antud töö raames *CK* geenide ekspressiooni *Wfs1*-puudulikkusega hiirte skeletilihases *m. rectus femoris*, et saada esmast teavet selle kohta, kas volframiini-puudulikkus mõjutab kreatiinkinaasetsüsteemi. Tulemused joonisel 15 näitavad, et *Ckm* mRNA tase langeb oluliselt *Wfs1* hiirte lihastes, kuid *Ckmt2* puhul olulist erinevust ei tuvastatud. Joonisel on samuti näha, et mitokondriaalset isovormi kodeeriva *Ckmt2* tase on glükolüütilises lihases ülimadal, mis on seletatav sellega, et glükolüütiliste lihaste rakkudes on vähe mitokondreid nagu on näidatud hamstri erinevate lihastüüpide kohta (Sullivan ja Pittman, 1987). Seetõttu oli ka mRNA taseme täpne kvantiteerimine küllaltki keeruline. Arvestades *Ckm* geeni produktiks oleva valgu olulist funktsionaalset rolli lihasrakus, võib arvata, et volframiini defitsiit on seotud raku energeetilise puudulikkusega.



Joonis 15. Lihasespetsiifiliste *CK* geenide ekspressioon *Wfs1* hiirte glükolüütilises skeletilihases *m. rectus femoris*. Andmed on esitatud geomeetriliste keskmistena kolme *housekeeping* geeni (*ACTB*, *GAPDH*, *HPRT1*) alusel. * – statistiliselt oluline erinevus võrreldes *wild-type* hiirtega ($p < 0,05$); $n=6$.

2.3.2. Ca²⁺-aktiveeritavate mitokondriaalsete transportvalkude mRNA tasemete hindamine oksüdatiivsetes ja glükolüütilistes lihastes

Käesolevas töös võrreldi reaalaaja-PCR abil mitokondriaalsete transportvalkude ekspressiooni mRNA tasemel hiire glükolüütilises (*m. rectus femoris*) ja oksüdatiivses (*m. soleus*) skeetilihases (Joonis 16).



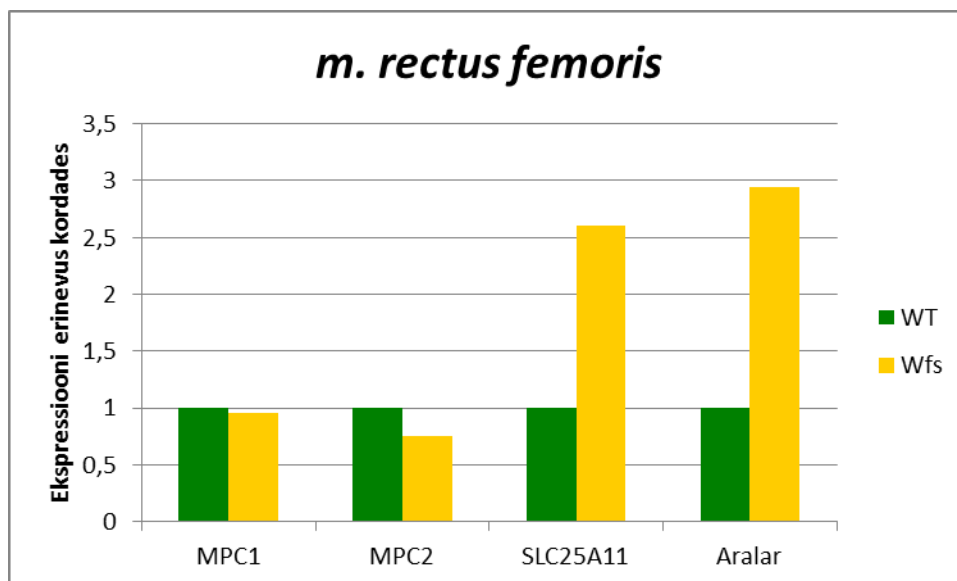
Joonis 16. Mitokondriaalseid transportvalke kodeerivate geenide ekspressioon lihastes *m. rectus femoris* (RF) ja *m. soleus* (SOL). Erinevus kordades on arvatatud $2^{-\Delta\Delta CT}$ meetodil ja *ACTB* suhtes. MPC1 – mitokondriaalne püruvaadi kandja 1; MPC2 – mitokondriaalne püruvaadi kandja 2; SLC25A22 – mitokondriaalne glutamaadi kandja.

Jooniselt selgub, et mitokondriaalsete valkude mRNA tase võrreldes glükolüütilisega on oksüdatiivses lihases oluliselt kõrgem, kuid aralar1 ja tsitriin on lihastüübi spetsiifilised. Oksüdatiivses lihases domineerib tsitriin, glükolüütilises aga aralar. Aralar varustab OXPHOS protsessi glutamaadiga, mis on üks mitokondriaalsetest võtmesubstraatidest. Hiljutised andmed näitavad, et OXPHOS võib olla otseselt aktiveeritav ekstramitokondriaalse kaltsiumiga ja on välja selgitatud, et aralar osaleb selles regulatsioonis (Gellerich *et al.*, 2009). Tsitriini peetakse lihaskudede lõikes südamespetsiifiliseks (del Arco *et al.*, 2002), kuid ilmselt ekspresseerub tsitriin mRNA tasemel ka oksüdatiivses skeetilihases, millele viitavad antud töös hiire *soleuse* uurimisel saadud tulemused. Võimalik, et südames ja oksüdatiivsetes skeetilihastes täidab aralari funktsionaalset rolli tsitriin, kuid see probleem vajab edasist uurimist. Konkreetsed kirjanduse andmed selle kohta puuduvad.

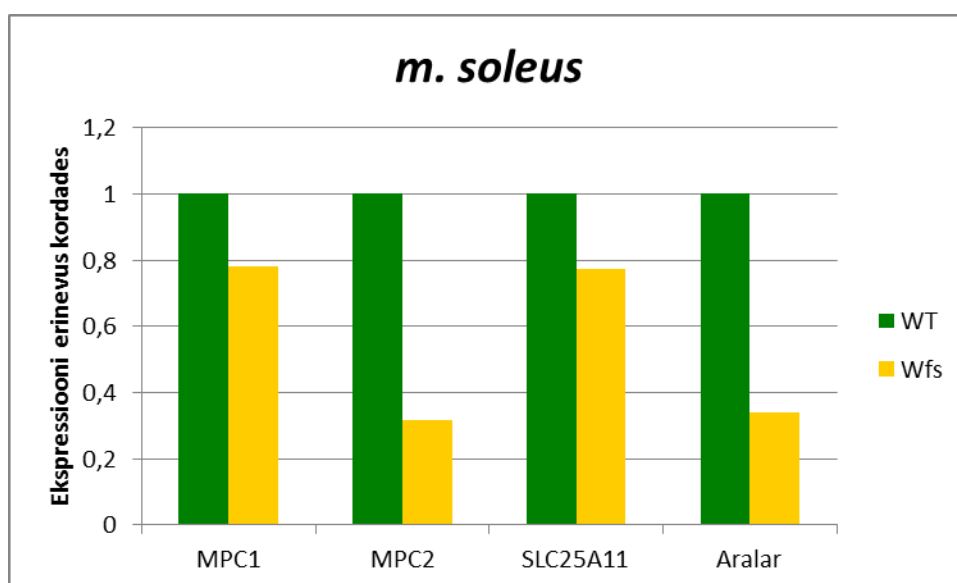
Järgnevalt uuriti, kas ülal kirjeldatud mitokondriaalsete transportvalkude ekspressioon on muutunud volframdefitsiidi tingimustes. Kuna oksüdatiivses ja glükolüütilises lihases võivad

toimed olla erinevad, siis hinnati uuritavate geenide ekspressioonitaset nendes eraldi (*m. rectus femoris*, Joonis 17 A ja *m. soleus*, Joonis 17 B).

A)



B)



Joonis 17. Mitokondriaalseid transportvalke kodeerivate geenide ekspressioon normaalses ja volframiindefitsiidi tingimustes. WT – *wild-type* hiir; Wfs – volframiindefitsiitne hiir. MPC1 – mitokondriaalne püruvaadi kandja 1; MPC2 – mitokondriaalne püruvaadi kandja 2; SLC25A11 – malaat- α -ketoglutarat antiporter.

Saadud andmed näitavad, et Wfs1 hiirte *m. rectus femoris* puhul (Joonis 17 A) esineb aralar1 üleekspressioon, mis võib olla tingitud nn. gaasipedaali efekti realiseerumisest (kirjeldatud punktis 1.5 lk. 13) seoses rakkude energiapuudulikkuse kujunemisega. Üllatuslikult näitab Wfs1 hiirte oksüdatiivses lihases (*m. soleus*) aralar1 ekspressioonitase hoopis vähenemise

tendentsi (Joonis 17 B). On alust arvata, et *soleuses* nimetatud ekstramitokondriaalse Ca²⁺-ioonide ja aralar1 vahendatud kompensatoorne mehhanism ei toimi. Siin võib rolli mängida hoopis tsitriin, kuna selle valgu mRNA osakaal hiire *soleuses* on käesoleva töö andmetel suurem.

2.4. Arutelu

Käesolevas töös hinnati raku energeetilist seisundit reguleerivate geenide ekspressiooni. Rõhuasetus oli CK geenidel võttes arvesse kreatiinkinaasse energiatülekande süsteemi olulist rolli lihasrakkude energiaga varustamisel. Ekspressioonitasemed määrati reaalkaaja-PCR meetodil, rakendades suhtelise kvantiteerimise printsiipi $\Delta\Delta CT$ meetodil (Livak ja Schmittgen, 2001). Sellist lähenemisviisi on eriti kohane kasutada biomeditsiinilistes uuringutes, kuna nii saab kohe välja tuua erinevuse kordades näiteks haigete ja tervete, vanade ja noorte, erinevate kudede jms vahel.

Seoses meditsiini arenguga ja paremate elutingimustega on viimase 50-60 aasta jooksul eurooplaste keskmine eluiga oluliselt kasvanud, mille tõttu on üle 65-aastaste inimeste osakaal populatsioonis märkimisväärselt tõusnud. Kuna vanemad inimesed põevad tihti eaga seotud haigusi, siis selline tendents suurendab ühiskonna koormust nii meditsiinilises kui ka majanduslikus plaanis. Nende probleemidega tegelemine nõuab nii sobivat meditsiinilist ravi kui ka sotsiaalset tuge, aga ka ulatuslikku teadustööd vananemisega seotud aladel – bioloogiast sotsioloogiani, kus uuritavateks ongi vanemad inimesed (Goodpaster *et al.*, 2006). Seetõttu toetab Euroopa Liit paljusid sellealaseid teadusliku uurimistöö projekte. Antud töös uuriti ühe sellise projekti (MYOAGE) raames vananemisega kaasnevat sarkopeeniat. Saadud andmed vanade inimeste sarkopeenilise skeletilihase (*m. vastus lateralis*) CK geenide mRNA profiili muutuste kohta on täiesti uused. Tulemused viitavad sellele, et rakkude energeetilisel puudulikkusel on sarkopeenia patogeneesis oluline roll.

Töös leiti seoseid lihasrakkude diferentseerumisastme ja energeetilise metabolismi organiseerituse taseme (CK süsteemi väljakujunemise) vahel. Selleks, et mõista, kas vananemisega kaasnevad muutused lihastes on tingitud organismi kui terviku vananemisest või esinevad need ka raku tasemel *in vitro*, võrreldi vanadelt ja noortelt inimestelt pärit lihasrakke kultuuris. Hoolimata ühesugusest keskkonnast olid vananemise ilmingud täheldatavad ka rakukultuuris.

Wfs1-defitsiitsete hiirte mudeli abil oli võimalik uurida Wolframi sündroomi sarnast seisundit, et saada teavet Wfs1 puudulikkuse korral võimalike aset leidvate energeetilise metabolismi muutuste kohta. Eeldatavalt esinevad Wfs1 hiirtel süsivesikute ainevahetuse häired, sest glükoosi tolerantsi testiga on kindlaks tehtud, et nad ei suuda kontrollida oma

veresuhkru taset. Süsivesikud on aga oluline energiaallikas eriti glükolüütilistele lihastele. Lihasespetsiifilist CK isovormi kodeeriva *Ckm* geeni ekspressioonitase *Wfs1* hiirte lihases *m. rectus femoris* oli oluliselt langenud, mis näitab rakkude energeetilise seisundi halvenemist volframiini defitsiidi tingimustes. Leitud ekspressiooni muutus oli kooskõlas teiste uurimisgrupi liikmete poolt lihaskoe homogenaadis mõõdetud CK totaalse aktiivsuse vähenemisega. Glükolüütilistes lihastes tulenebki CK aktiivsus peamiselt lihastüüpi isovormi arvelt, mis on *Ckm* geeni produkt.

Tulemused võimaldavad teha järgmised järeldused:

- 1) Lihaskude energeetilise seisundi reguleerimisel omavad olulist tähtsust kreatiinkinaasi perekonna geenid. See ilmneb järgmistest asjaoludest:
 - a. Kreatiinkinaasi isovormide profiil ja neid kodeerivate geenide ekspressioonitase muutub rakkude diferentseerumisel müoplastidest müotubideks ja edasiselt kuni küpsete müotsüütide (müofiibrile) moodustumiseni.
 - b. Kreatiinkinaasi geenide ekspressioonitase langeb teatud patoloogilistes tingimustes nagu sarkopeenia ja diabeedisarnane seisund.
- 2) Energeetilist metabolismi reguleerivate geenide alaekspressioon on üks tegur rakkude energeetilise puudulikkuse kujunemisel. Selline kahjustusmehhanism ilmneb nii vananemise kui ka diabeedisarnase seisundi puhul ja on ilmselt seotud ka ER stressiga.

KOKKUVÕTE

Töös uuriti lihasrakkude energeetilist seisundit reguleerivate geenide ekspressioonitaset reaallaja-PCR abil erinevates tingimustes: 1) rakkude diferentseerumisaste; 2) vananemisega kaasnev sarkopeenia; 3) rakkude replikatiivne vananemine *in vitro*; 4) *Wfs1* hiired kui eksperimentaalne mudel diabeedisarnase seisundi ja ER stressiga kaasneva uurimiseks. Tulemused on esitatud kahes alapunktis: kreatiinkinaasi valke kodeerivate geenide ekspressiooni muutused ja Ca^{2+} -aktiveeritavate mitokondriaalsete transportvalkude mRNA tasemete hindamine oksüdatiivsetes ja glükolüütilistes lihastes.

Kreatiinkinaasne energiaülekanne süsteem omab lihasraku energeetilises metabolismis võtmerolli, mistõttu hinnati CK süsteemi valke kodeerivate geenide ekspressiooni muutuseid müogeneesi käigus, sarkopeenilistes lihastes ja volframiini defitsiidi puhul. Tulemustest selgus, et müoblastide diferentseerumisel müotubideks tõusis oluliselt lihastüüpi CK (*CKM*) ekspressioonitase, samas müoblastides domineeris *CKB*. *CKM* ja *MYOG* geenid iseloomustavad rakkude diferentseerumise astet, nad koekspressseeruvad skeetilihase arenevates rakkudes, olles müotubides oluliselt kõrgema ekspressioonitasemega kui müoblastides. Selleks, et saada lisateavet CK osatähtsusest rakkude erinevatel eluetappidel, uuriti replikatiivset vananemist *in vitro* rakukultuuris võrreldes teist ja kuuendat ümberkülvi. Peale kuuendat ümberkülvi oli müoblastides *CKB* tase oluliselt langenud. Vanade inimeste sarkopeenilistes lihastes erinesid oluliselt lihastüüpi *CKM* ja *CKMT2* geenide mRNA tasemed võrreldes kontrollgrupiga (noored). *Wfs1*-puudulikkusega hiire skeetilihast *m. rectus femoris* uurides selgus, et *Ckm* mRNA tase on volframiinpuudulikkuse korral oluliselt madalam *wild-type* hiirest, mis näitab seda, et antud sündroom, millega kaasneb diabeedisarnane seisund ja ER stress, on seotud raku energeetilise puudulikkusega.

Metaboolselt erinevates (oksüdatiivsetes ja glükolüütilistes) lihastes võib energeetilist seisundit reguleerivate geenide, eriti nende, mille produktideks on mitokondriaalsed valgud, ekspressioonitase olla erinev. Käesolevas töös määrati Ca^{2+} -aktiveeritavate mitokondriaalsete transportvalkude mRNA taset hiire aeglases oksüdatiivses (*m. soleus*) ja kiires glükolüütilises (*m. rectus femoris*) lihases. Selgus, et oksüdatiivses lihases on nimetatud mitokondriaalseid valke kodeerivate geenide ekspressioonitase kõrgem. Samasid valke kodeerivaid gene uuriti ka volframdefitsiidi tingimustes *Wfs1*-hiirte lihastes. Glükolüütilise *m. rectus femoris* puhul esines aralar1 üleekspressioon, mis näitab, et ER stressi tingimustes ja raku energeetilise puudulikkuse kujunemisel võib hakata kompensatoorselt toimima OXPHOS aktivatsioonimehhanism ekstramitokondriaalse kaltsiumi poolt. Oksüdatiivse *m. soleus* puhul sellist toimeefekti ei täheldatud.

Estimation of expression level of the genes regulating cellular energy state by real-time PCR

Marian Tarrend

Summary

The present work addresses several interrelated aspects regarding to gene expression in sarcopenia, ER stress and experimentally induced diabetic state. Sarcopenia is associated with cellular energetic depression. The results of current work should control and confirm more general hypothesis according to which muscle disease typical pathological and aging related processes are mediated by common mechanism of failure – cellular energetic depression.

The review of literature was written with emphasis on cellular energy metabolism and creatine kinase system. In this system the mitochondrial and extramitochondrial creatine kinases work in opposite directions, and are functionally coupled to adenine nucleotide translocase and ATPases, respectively. Creatine kinase energy transfer network has of critical importance in cellular energy supply.

The main purposes of the work were:

- a) To assess gene expression level of the genes regulating cellular energy state in different conditions and in different muscle types (sarcopenia, replicative aging *in vitro*, slow-twitch oxidative and fast-twitch glycolytic skeletal muscles of *Wfs1* mice).
- b) To find out gene expression level of the genes encoding creatine kinase isoforms in the differentiation from myoblasts to myotubes and find links between differentiation and changes of energetic metabolism.
- c) To find out which of the expression level changes of the genes studied indicate the formation of cellular energetic depression.

The expression of the genes was assessed with reverse transcription real-time PCR. The process of collecting fluorescence data during PCR was performed by StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using intercalator-based method, also well-known as SYBR Green method.

The results showed that development of CK system occurs during the myogenesis. Sarcopenia was accompanied with significant decrease in *CKM* and *CKMT2* expression, that points to the situation that energy supply was disturbed in skeletal muscle of elderly people. In addition, the expression of Ca^{2+} -activated mitochondrial carriers of metabolic substrate was compared in slow-twitch oxidative and fast-twitch glycolytic muscles of wild-type and *Wfs1* mice, imitating diabetes-like and ER stress condition.

Obtained results allow to conclude the following:

- 1) Creatine kinase gene family members (*CKM*, *CKB*, *CKMT2*) have a major importance in regulating energy state of muscle cell. It is concluded by following facts:
 - a. Expression level of the genes encoding creatine kinase isoforms changes in differentiation process from myoblasts to myotubes and subsequently until mature myocytes (myofibers) are formed.
 - b. The expression level of the creatine kinase genes decreases in several pathological conditions such as sarcopenia and diabetes-like state.
- 2) Underexpression of the genes regulating energy metabolism is one factor leading to cellular energetic depression. That kind of mechanism of failure appears in both, in elderly and in diabetes-like state and is probably related to ER stress.

KIRJANDUSE LOETELU

Aagaard, P., Suetta, C., Caserotti, P., Magnusson, S. P., Kjaer, M. (2010) Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: strength training as a countermeasure. *Scand J Med Sci Sports*. 20(1): 49-64.

Anmann, T., Varikmaa, M., Tepp, K., Timohhina, N., Ševtšuk, I., Tšekulajev, V., Saks, V., Käämbre, T. (2013) Südamerakkude sünnijärgse arengu bioenergeetilised aspektid: struktuuri ja funktsiooni vaheliste seoste väljakujunemine. *Eesti Arst* 92(7): 372–381

Balagopal, P., Schimke, J.C., Ades, P., Adey, D., Nair, K.S. (2001) Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 280(2): E203-208.

Beccafico, S., Puglielli, C., Pietrangelo, T., Bellomo, R., Fanò, G., Fulle, S. (2007) Age-dependent effects on functional aspects in human satellite cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1100: 345-352.

Beccafico, S., Riuzzi, F., Puglielli, C., Mancinelli, R., Fulle, S., Sorci, G., Donato, R. (2011) Human muscle satellite cells show age-related differential expression of S100B protein and RAGE. *Age (Dordr)*. 33(4): 523-541

Benbassat, C.A., Maki, K.C., Unterman, T.G. (1997) Circulating levels of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 and -3 in aging men: relationships to insulin, glucose, IGF, and dehydroepiandrosterone sulfate levels and anthropometric measures. *J Clin Endocrinol Metab*. 82(5): 1484-1491.

Bessmann, S. P., Carpenter, C. L. (1985) The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Ann. Rev. Biochem*. 54: 831-862.

Bigot, A., Jacquemin, V., Debaq-Chainiaux, F., Butler-Browne, G.S., Toussaint, O., Furling, D., Mouly, V. (2008) Replicative aging down-regulates the myogenic regulatory factors in human myoblasts. *Biol Cell*. 100(3): 189-199.

Bortoli, S., Renault, V., Mariage-Samson, R., Eveno, E., Auffray, C., Butler-Browne, G., Piétu, G. (2005) Modifications in the myogenic program induced by in vivo and in vitro aging. *Gene*. 347(1): 65-72.

Bottinelli, R., Reggiani, C. (2000) Human skeletal muscle fibers: molecular and functional diversity. *Progress in Biophys. & Mol. Biol*. 73: 195-262.

Bottinelli, R., Schiaffino, S., Reggiani, C. (1991) Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibers from rat skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 437: 655-672.

Brack, A.S., Bildsoe, H., Hughes, S.M. (2005) Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J Cell Sci*. 118(Pt 20): 4813-4821.

Braun, U., Paju, K., Eimre, M., Seppet, E., Orlova, E., Kadaja, L., Trumbeckaite, S., Gellerich, F.N., Zierz, S., Jockusch, H., Seppet, E.K. (2001) Lack of dystrophin is associated with altered integration of the mitochondria and ATPases in slow-twitch muscle cells of MDX mice. *Biochim Biophys Acta*. 1505(2-3): 258-270.

- Castillo, E.M., Goodman-Gruen, D., Kritz-Silverstein, D., Morton, D.J., Wingard, D. L., Barrett-Connor, E. (2003) Sarcopenia in elderly men and women: the Rancho Bernardo study. *Am J Prev Med.* 25(3): 226-231.
- Chen, Q.M., Tu, V.C. (2002) Apoptosis and heart failure: mechanisms and therapeutic implications. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2(1): 43-57.
- Chien, M.Y., Huang, T.Y., Wu, Y.T. (2008) Prevalence of sarcopenia estimated using a bioelectrical impedance analysis prediction equation in community-dwelling elderly people in Taiwan. *J Am Geriatr Soc.* 56(9): 1710-1715.
- Chung, L., Ng, Y.C. (2005) Age-related alterations in expression of apoptosis regulatory proteins and heat shock proteins in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1762(1):103-109.
- Collins, C.A., Zammit, P.S., Ruiz, A.P., Morgan, J.E., Partridge, T.A. (2007) A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging. *Stem Cells.* 25(4): 885-894.
- Cruz-Jentoft, A.J., Baeyens, J. P., Bauer, J. M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martin, F. C., Michel, J. P., Rolland, Y., Schneider, S. M., Topinková, E., Vandewoude, M., Zamboni, M.; European Working Group on Sarcopenia in Older People. (2010) Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing.* 39(4): 412-423.
- Danial, N. N., Korsmeyer, S. J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell.* 116(2): 205-219.
- Day, K., Shefer, G., Shearer, A., Yablonka-Reuveni, Z. (2010) The depletion of skeletal muscle satellite cells with age is concomitant with reduced capacity of single progenitors to produce reserve progeny. *Dev Biol.* 340(2): 330-343.
- De Sousa, E., Veksler, V., Minajeva, A., Kaasik, A., Mateo, P., Mayoux, E., Hoerter, J., Bigard, X., Serrurier, B., Ventura-Clapier, R. (1999) Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure. *Circ Res.* 85(1): 68-76.
- del Arco, A., Morcillo, J., Martínez-Morales, J.R., Galián, C., Martos, V., Bovolenta, P., Satrústegui, J. (2002) Expression of the aspartate/glutamate mitochondrial carriers *aralar1* and *citrin* during development and in adult rat tissues. *Eur J Biochem.* 269(13): 3313-3320.
- Denton, R. M., McCormack, J.G. (1985) Physiological role of Ca²⁺ transport by mitochondria. *Nature.* 315(6021): 635.
- Dhawan, J., Rando, T.A. (2005) Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* 15(12): 666-673.
- Dirks, A. J., Hofer, T., Marzetti, E., Pahor, M., Leeuwenburgh, C. (2006) Mitochondrial DNA mutations, energy metabolism and apoptosis in aging muscle. *Ageing Res Rev.* 5(2): 179-195.
- Dirks, A., Leeuwenburgh, C. (2002) Apoptosis in skeletal muscle with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 282(2): R519-527.
- Dirks, A.J., Leeuwenburgh, C. (2004) Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free Radic Biol Med.* 36(1): 27-39.

- Doherty, T.J., Vandervoort, A.A., Brown, W.F. (1993) Effects of ageing on the motor unit: a brief review. *Can J Appl Physiol.* 18(4): 331-358.
- Eimre, M., Puhke, R., Alev, K., Seppet, E., Sikkut, A., Peet, N., Kadaja, L., Lenzner, A., Haviko, T., Seene, T., Saks, V.A., Seppet, E.K. (2006) Altered mitochondrial apparent affinity for ADP and impaired function of mitochondrial creatine kinase in gluteus medius of patients with hip osteoarthritis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290(5): R1271-1275.
- Farnfield, M.M., Breen, L., Carey, K.A., Garnham, A., Cameron-Smith, D. (2012) Activation of mTOR signalling in young and old human skeletal muscle in response to combined resistance exercise and whey protein ingestion. *Appl Physiol Nutr Metab.* 37(1): 21-30.
- Fonseca, S.G., Ishigaki, S., Osowski, C.M., Lu, S., Lipson, K.L., Ghosh, R., Hayashi, E., Ishihara, H., Oka, Y., Permutt, M.A., Urano, F. (2010) Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest.* 120(3): 744-755.
- Fonseca, S. G., Urano, F., Weir, G. C., Gromada, J., Burcin, M. (2012) Wolfram syndrome 1 and adenylyl cyclase 8 interact at the plasma membrane to regulate insulin production and secretion. *Nat Cell Biol.* (10): 1105-1112.
- Fritz-Wolf, K., Schnyder, T., Wallimann, T., Kabsch, W. (1996) Structure of mitochondrial creatine kinase. *Nature.* 381(6580): 341-345.
- Fulle, S., Belia, S., Di Tano, G. (2005) Sarcopenia is more than a muscular deficit. *Arch Ital Biol.* 143(3-4): 229-234.
- Ge, X., Zhang, Y., Park, S., Cong, X., Gerrard, D.E., Jiang, H. (2014) Stac3 inhibits myoblast differentiation into myotubes. *PLoS One.* 9(4): e95926
- Gelfi, C., Vigano, A., Ripamonti, M., Pontoglio, A., Begum, S., Pellegrino, M. A., Grassi, B., Bottinelli, R., Wait, R., Cerretelli, P. (2006) The human muscle proteome in aging. *J Proteome Res.* (6): 1344-1353.
- Gellerich, F. N., Gizatullina, Z., Nguyen, H. P., Trumbeckaite, S., Vielhaber, S., Seppet, E., Zierz, S., Landwehrmeyer, B., Riess, O., von Hörsten, S., Striggow, F. (2008) Impaired regulation of brain mitochondria by extramitochondrial Ca²⁺ in transgenic Huntington disease rats. *J Biol Chem.* 283(45): 30715-30724.
- Gellerich, F. N., Gizatullina, Z., Trumbeckaite, S., Nguyen, H. P., Pallas, T., Arandarcikaite, O., Vielhaber, S., Seppet, E., Striggow, F. (2010) The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium. *Biochim Biophys Acta.* 1797(6-7): 1018-1027.
- Gellerich, F.N., Gizatullina, Z., Arandarcikaite, O., Jerzembek, D., Vielhaber, S., Seppet, E., Striggow, F. (2009) Extramitochondrial Ca²⁺ in the nanomolar range regulates glutamate-dependent oxidative phosphorylation on demand. *PLoS One.* 4(12): e8181.
- Goodpaster, B.H., Park, S.W., Harris, T.B., Kritchevsky, S.B., Nevitt, M., Schwartz, A.V., Simonsick, E.M., Tyllavsky, F.A., Visser, M., Newman, A.B. (2006) The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 61(10): 1059-1064.

- Guerrero, K., Monge, C., Brückner, A., Puurand, U., Kadaja, L., Käämbre, T., Seppet, E., Saks, V. (2010) Study of possible interactions of tubulin, microtubular network, and STOP protein with mitochondria in muscle cells. *Mol Cell Biochem.* 337(1-2): 239-249.
- Guzun, R., Karu-Varikmaa, M., Gonzalez-Granillo, M., Kuznetsov, A.V., Michel, L., Cottet-Rousselle, C., Saaremäe, M., Kaambre, T., Metsis, M., Grimm, M., Auffray, C., Saks, V. (2011) Mitochondria-cytoskeleton interaction: distribution of β -tubulins in cardiomyocytes and HL-1 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1807(4): 458-469
- Hansford, R. G., Zorov, D. (1998) Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Mol Cell Biochem.* 184(1-2): 359-369.
- Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11(3): 298-300.
- Harman, D. (1972) Free radical theory of aging: dietary implications. *Am J Clin Nutr.* 25(8): 839-843.
- Harridge, S. D. R., Bottinelli, R., Canepari, M., Pellegrino, M. A., Reggiani, C., Esbjornsson, M., Saltin, B. (1996) Whole-Muscle and Single-Fiber Contractile Properties and Myosin Heavy Chain Isoforms in Humans. *Pflugers Archiv.* 432: 913-920.
- Harriman, J.F., Liu, X.L., Aleo, M.D., Machaca, K., Schnellmann, R.G. (2002) Endoplasmic reticulum Ca(2+) signaling and calpains mediate renal cell death. *Cell Death Differ.* 9(7): 734-741.
- Heineman, F. W., Balaban, R.S. (1990) Control of mitochondrial respiration in the heart in vivo. *Annu Rev Physiol.* 52: 523-542.
- Hilber, K., Galler, S., Gohlsch, B., Pette, D. (1999) Kinetic properties of myosin heavy chain isoforms in single fibers from human skeletal muscle. *FEBS Lett.* 455: 267-270.
- Iannuzzi-Sucich, M., Prestwood, K.M., Kenny, A.M. (2002) Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in healthy, older men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 57(12): M772-777.
- Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., Behn, P., Kalidas, K., Bernal-Mizrachi, E., Mueckler, M., Marshall, H., Donis-Keller, H., Crock, P., Rogers, D., Mikuni, M., Kumashiro, H., Higashi, K., Sobue, G., Oka, Y., Permutt, M. A. (1998) A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet.* 20(2): 143-148.
- Inouye, S.K., Studenski, S., Tinetti, M.E., Kuchel, G.A. (2007) Geriatric syndromes: clinical, research, and policy implications of a core geriatric concept. *J Am Geriatr Soc.* 55(5): 780-791.
- Kaasik, A., Veksler, V., Boehm, E., Novotova, M., Ventura-Clapier, R. (2003) From energy store to energy flux: a study in creatine kinase-deficient fast skeletal muscle. *FASEB J.* 17(6): 708-710.
- Kadaja, L., Eimre, M., Paju, K., Roosimaa, M., Põdrämägi, T., Kaasik, P., Pehme, A., Orlova, E., Mudist, M., Peet, N., Piirsoo, A., Seene, T., Gellerich, F.N., Seppet, E.K. (2010) Impaired oxidative phosphorylation in overtrained rat myocardium. *Exp Clin Cardiol.* 15(4): e116-127.
- Kadaja, L., Kisand, K.E., Peet, N., Braun, U., Metsküla, K., Teesalu, K., Vibo, R., Kisand, K.V., Uibo, R., Jockusch, H., Seppet, E.K. (2004) IgG from patients with liver diseases inhibit mitochondrial respiration in permeabilized oxidative muscle cells: impaired function of intracellular energetic units? *Mol Cell Biochem.* 256-257(1-2): 291-303.

- Kadi, F., Charifi, N., Denis, C., Lexell, J. (2004) Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle Nerve*. 29(1): 120-127.
- Kanai, A., Epperly, M., Pearce, L., Birder, L., Zeidel, M., Meyers, S., Greenberger, J., de Groat, W., Apodaca, G., Peterson J. (2004) Differing roles of mitochondrial nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 286(1): H13-21.
- Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T. D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., Hofer, T., Seo, A.Y., Sullivan, R., Jobling, W.A., Morrow, J.D., Van Remmen, H., Sedivy, J.M., Yamasoba, T., Tanokura, M., Weindruch, R., Leeuwenburgh, C., Prolla, T.A. (2005) Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*. 15;309(5733): 481-484.
- Larsson, L., Moss, R. L. (1993) Maximum Velocity of Shortening in Relation to Myosin Isoform Composition in Single Fibers From Human Skeletal Muscles. *J. Physiol*. 472: 595-614.
- Lexell, J., Henriksson-Larsén, K., Winblad, B., Sjöström, M. (1983) Distribution of different fiber types in human skeletal muscles: effects of aging studied in whole muscle cross sections. *Muscle Nerve*. 6(8): 588-595.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4): 402-408.
- Lorenzon, P., Bandi, E., de Guarrini, F., Pietrangelo, T., Schäfer, R., Zweyer, M., Wernig, A., Ruzzier, F. (2004) Ageing affects the differentiation potential of human myoblasts. *Exp Gerontol*. 39(10): 1545-1554.
- Lowry, C. V., Kimmey, J. S., Felder, S., Chi, M. M., Kaiser, K. K., Passonneau, P. N., Kirk, K. A., Lowry, O. H. (1978) Enzyme patterns in single human muscle fibers. *J Biol Chem*. 253(22): 8269-8277.
- Luin, E., Lorenzon, P., Wernig, A., Ruzzier, F. (2008) Calcium current kinetics in young and aged human cultured myotubes. *Cell Calcium*. 44(6): 554-566.
- Luuk, H., Plaas, M., Raud, S., Innos, J., Sütt, S., Lasner, H., Abramov, U., Kurrikoff, K., Kõks, S., Vasar, E. (2009) Wfs1-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment. *Behav Brain Res*. 198(2): 334-345.
- Lynch, G. S., McKenna, M. J., Williams, D. A. (1994) Sprint-Training Effects On Some Contractile Properties of Single Skinned Human Muscle Fibers. *Acta Physiol. Scand*. 152: 295-306.
- Mauro, A. (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 9: 493-495.
- McCormack, J. G., Denton, R. M. (1990) The role of mitochondrial Ca²⁺ transport and matrix Ca²⁺ in signal transduction in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1018: 287-291.
- Minet, A.D., Gaster, M. (2012) Cultured senescent myoblasts derived from human vastus lateralis exhibit normal mitochondrial ATP synthesis capacities with correlating concomitant ROS production while whole cell ATP production is decreased. *Biogerontology*. 13(3): 277-285.
- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J., Johnson, J. E. Jr. (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*. 15(6): 575-591.

- Morley, J.E. (2012) Sarcopenia in the elderly. *Fam Pract.* 29 Suppl 1: i44-i48.
- Nascimben, L., Ingwall, J.S., Pauletto, P., Friedrich, J., Gwathmey, J.K., Saks, V., Pessina, A.C., Allen, P.D. (1996) Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation.* 94(8): 1894-1901.
- Nehlin, J.O., Just, M., Rustan, A.C., Gaster, M. (2011) Human myotubes from myoblast cultures undergoing senescence exhibit defects in glucose and lipid metabolism. *Biogerontology.* 12(4): 349-365.
- Neubauer, S., Horn, M., Cramer, M., Harre, K., Newell, J.B., Peters, W., Pabst, T., Ertl, G., Hahn, D., Ingwall, J.S., Kochsiek, K. (1997) Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 96(7): 2190-2196.
- O'Connell, K., Gannon, J., Doran, P., Ohlendieck, K. (2007) Proteomic profiling reveals a severely perturbed protein expression pattern in aged skeletal muscle. *Int J Mol Med.* 20(2): 145-153.
- Ogata, T., Mori, M. (1964) Histochemical study of oxidatives enzymes in invertebrate muscles. *J Histochem Cytochem.* 12: 183-187.
- Ozawa, T. (1995) Mitochondrial DNA mutations associated with aging and degenerative diseases. *Exp Gerontol.* 30(3-4): 269-290.
- Paddon-Jones, D., Short, K.R., Campbell, W.W., Volpi, E., Wolfe, R.R. (2008) Role of dietary protein in the sarcopenia of aging. *Am J Clin Nutr.* 87(5): 1562S-1566S.
- Payne, R. M., Haas, R. C., Strauss, A. W. (1991) Structural characterization and tissue-specific expression of the mRNAs encoding isoenzymes from two rat mitochondrial creatine kinase genes. *Biochem. Biophys. Acta* 1089: 352-361.
- Péault, B., Rudnicki, M., Torrente, Y., Cossu, G., Tremblay, J.P., Partridge, T., Gussoni, E., Kunkel, L.M., Huard, J. (2007) Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther.* 15(5): 867-877.
- Peter, J. B., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A., Stempel, K. E. (1972) Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry.* 11(14): 2627-2633.
- Piec, I., Lustrat, A., Alliot, J., Chambon, C., Taylor, R.G., Bechet, D. (2005) Differential proteome analysis of aging in rat skeletal muscle. *FASEB J.* 19(9): 1143-1145.
- Pietrangelo, T., Puglielli, C., Mancinelli, R., Beccafico, S., Fanò, G., Fulle, S. (2009) Molecular basis of the myogenic profile of aged human skeletal muscle satellite cells during differentiation. *Exp Gerontol.* 44(8): 523-531.
- Pollack, M., Leeuwenburgh, C. (2001) Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 56(11): B475-482.
- Ponsot, E., Echaniz-Laguna, A., Delis, A.M., Kadi, F. (2012) Telomere length and regulatory proteins in human skeletal muscle with and without ongoing regenerative cycles. *Exp Physiol.* 97(6): 774-784.
- Puurand, U., Kadaja, L., Seppet, E.K. (2003) Kindred DNA amplification from two distinct populations of cDNA fragments. *Biotechniques.* 34(5): 994-1000.

- Raturi, A., Simmen, T. (2013) Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta.* 1833(1): 213-224.
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A., Buckingham, M. (2006) Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol.* 172(1): 91-102.
- Renault, V., Piron-Hamelin, G., Forestier, C., DiDonna, S., Decary, S., Hentati, F., Saillant, G., Butler-Browne, G.S., Mouly, V. (2000) Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp Gerontol.* 35(6-7): 711-719.
- Renault, V., Rolland, E., Thornell, L.E., Mouly, V., Butler-Browne, G. (2002) Distribution of satellite cells in the human vastus lateralis muscle during aging. *Exp Gerontol.* 37(12): 1513-1514.
- Renault, V., Thornell, L.E., Butler-Browne, G., Mouly, V. (2002) Human skeletal muscle satellite cells: aging, oxidative stress and the mitotic clock. *Exp Gerontol.* 37(10-11): 1229-1236.
- Ríos, S.R., Lamarche, F., Cottet-Rousselle, C., Klaus, A., Tuerk, R., Thali, R., Auchli, Y., Brunisholz, R., Neumann, D., Barret, L., Tokarska-Schlattner, M., Schlattner, U. (2014) Regulation of brain-type creatine kinase by AMP-activated protein kinase: Interaction, phosphorylation and ER localization. *Biochim Biophys Acta.* pii: S0005-2728(14)00109-1.
- Roosimaa, M., Põdramägi, T., Kadaja, L., Ruusalepp, A., Paju, K., Puhke, R., Eimre, M., Orlova, E., Piirsoo, A., Peet, N., Gellerich, F.N., Seppet, E. (2013) Dilation of human atria: increased diffusion restrictions for ADP, overexpression of hexokinase 2 and its coupling to oxidative phosphorylation in cardiomyocytes. *Mitochondrion.* 13(5): 399-409.
- Rosenberg, I. (1989) Summary comments: epidemiological and methodological problems in determining nutritional status of older persons. *Am J Clin Nutr.* 50: 1231–1233.
- Ruff, R., Whittlesey, D. (1991) Ca-Sr-tension relationships and contraction velocities of human muscle fibers. *Muscle Nerve* 14: 1219-1226.
- Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Seale, P., Asakura, A., Rudnicki, M.A. (1999) Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J Cell Biol.* 144(4): 631-643.
- Sahlin, K., Söderlund, K., Tonkonogi, M., Hirakoba, K. (1997) Phosphocreatine content in single fibers of human muscle after sustained submaximal exercise. *Am J Physiol.* 273(1 Pt 1): C172-178.
- Saks, V. A., Khuchua, Z. A., Vasiljeva, E., Belikova, Y. O., Kuznetsov, A. V. (1994) Metabolic compartmentation and substrate channeling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in *in vivo* regulation of cellular respiration - a synthesis. *Mol. Cell. Biochem.* 133/134: 155-192.
- Saks, V., Kaambre, T., Guzun, R., Anmann, T., Sikk, P., Schlattner, U., Wallimann, T., Aliev, M., Vendelin, M. (2007) The creatine kinase phosphotransfer network: thermodynamic and kinetic considerations, the impact of the mitochondrial outer membrane and modelling approaches. *Subcell Biochem.* 46: 27-65.
- Saks, V.A., Kaambre, T., Sikk, P., Eimre, M., Orlova, E., Paju, K., Piirsoo, A., Appaix, F., Kay, L., Regitz-Zagrosek, V., Fleck, E., Seppet, E. (2001) Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem J.* 356(Pt 2): 643-657.

- Saks, V.A., Kongas, O., Vendelin, M., Kay, L. (2000) Role of the creatine/phosphocreatine system in the regulation of mitochondrial respiration. *Acta Physiol Scand.* 168(4): 635-641.
- Satrústegui, J., Contreras, L., Ramos, M., Marmol, P., del Arco, A., Saheki, T., Pardo, B. (2007) Role of aralar, the mitochondrial transporter of aspartate-glutamate, in brain N-acetylaspartate formation and Ca(2+) signaling in neuronal mitochondria. *J Neurosci Res.* 85(15): 3359-3366.
- Sayer, A.A., Dennison, E.M., Syddall, H.E., Jameson, K., Martin, H.J., Cooper C. (2008) The developmental origins of sarcopenia: using peripheral quantitative computed tomography to assess muscle size in older people. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 63(8): 835-840.
- Schultz, E., Lipton, B.H. (1982) Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age. *Mech Ageing Dev.* 20(4): 377-383.
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., Rudnicki, M.A. (2000) Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell.* 102(6): 777-786.
- Seppet, E., Gruno, M., Peetsalu, A., Gizatullina, Z., Nguyen, H. P., Vielhaber, S., Wussling, M. H., Trumbeckaite, S., Arandarcikaite, O., Jerzembeck, D., Sonnabend, M., Jegorov, K., Zierz, S., Striggow, F., Gellerich, F. N. (2009) Mitochondria and energetic depression in cell pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 10(5): 2252-2303.
- Seppet, E.K., Kaambre, T., Sikk, P., Tiivel, T., Vija, H., Tonkonogi, M., Sahlin, K., Kay, L., Appaix, F., Braun, U., Eimre, M., Saks, V.A. (2001) Functional complexes of mitochondria with Ca,MgATPases of myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *Biochim Biophys Acta.* 1504(2-3): 379-395.
- Shefer, G., Rauner, G., Yablonka-Reuveni, Z., Benayahu, D. (2010) Reduced satellite cell numbers and myogenic capacity in aging can be alleviated by endurance exercise. *PLoS One.* 5(10): e13307.
- Shefer, G., Van de Mark, D.P., Richardson, J.B., Yablonka-Reuveni, Z. (2006) Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol.* 294(1): 50-66.
- Short, K.R., Bigelow, M.L., Kahl, J., Singh, R., Coenen-Schimke, J., Raghavakaimal, S., Nair, K.S. (2005) Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(15): 5618-5623.
- Stern-Straeter, J., Bonaterra, G.A., Hörmann, K., Kinscherf, R., Goessler, U.R. (2009) Identification of valid reference genes during the differentiation of human myoblasts. *BMC Mol Biol.* 10: 66.
- Stienen, G. J. M., Kiers, J., Bottinelli, R., Reggiani, C. (1996) Myofibrillar ATPase activity in skinned human skeletal muscle fibers: fiber type and temperature dependence. *J. Physiol.* 493: 299-307.
- Strasser, H., Tiefenthaler, M., Steinlechner, M., Bartsch, G., Konwalinka, G. (1999) Urinary incontinence in the elderly and age-dependent apoptosis of rhabdosphincter cells. *Lancet.* 354(9182): 918-919.
- Straumann, N., Wind, A., Leuenberger, T., Wallimann, T. (2006) Effects of N-linked glycosylation on the creatine transporter. *Biochem J.* 393(Pt 2): 459-469.
- Strom, T.M., Hörtnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K. D., Meitinger, T. (1998) Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD)

- caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet.* 7(13): 2021-2028.
- Sullivan, S.M., Pittman, R.N. (1987) Relationship between mitochondrial volume density and capillarity in hamster muscles. *Am J Physiol.* 252(1 Pt 2): H149-155.
- Thompson, D. D. (2007) Aging and sarcopenia. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 7(4): 344-345.
- Timohhina, N., Guzun, R., Tepp, K., Monge, C., Varikmaa, M., Vija, H., Sikk, P., Kaambre, T., Sackett, D., Saks, V. (2009) Direct measurement of energy fluxes from mitochondria into cytoplasm in permeabilized cardiac cells in situ: some evidence for Mitochondrial Interactosome. *J Bioenerg Biomembr.* 41(3): 259-275.
- Vandroux, D., Schaeffer, C., Tissier, C., Lalande, A., Bès, S., Rochette, L., Athias, P. (2004) Microtubule alteration is an early cellular reaction to the metabolic challenge in ischemic cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem.* 258(1-2): 99-108.
- Vendelin, M., Eimre, M., Seppet, E., Peet, N., Andrienko, T., Lemba, M., Engelbrecht, J., Seppet, E.K., Saks, V.A. (2004) Intracellular diffusion of adenosine phosphates is locally restricted in cardiac muscle. *Mol Cell Biochem.* 256-257(1-2): 229-241.
- Ventura-Clapier, R., Kuznetsov, A., Veksler, V., Boehm, E., Anflous, K. (1998) Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem.* 184(1-2): 231-247.
- Vescovo, G., Ceconi, C., Bernocchi, P., Ferrari, R., Carraro, U., Ambrosio, G. B., Libera, L. D. (1998) Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline-induced cardiac hypertrophy and failure. Relation to blood flow and degree of muscle atrophy. *Cardiovasc. Res.* 39: 233-241.
- Visser, M., Kritchevsky, S.B., Goodpaster, B.H., Newman, A.B., Nevitt, M., Stamm, E., Harris, T.B. (2002) Leg muscle mass and composition in relation to lower extremity performance in men and women aged 70 to 79: the health, aging and body composition study. *J Am Geriatr Soc.* 50(5): 897-904
- Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M., Schlattner, U. (2011) The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids.* 40(5): 1271-1296.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., Eppenberger, H. M. (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J.* 281 (Pt 1): 21-40.
- Whitman, S. A., Wacker, M. J., Richmond, S. R., Godard, M. P. (2005) Contributions of the ubiquitin-proteasome pathway and apoptosis to human skeletal muscle wasting with age. *Pflugers Arch.* 450(6): 437-446.
- Widrick, J. J., Trappe, S. W., Blaser, C. A., Costill, D. L., Fitts, R. H. (1996) Isometric force and maximal shortening velocity of single muscle fibers from elite master runners. *Am. J. Physiol.* 271: C666-C675.
- Wilson, P. D., Franks, L. M. (1975) The effect of age on mitochondrial ultrastructure and enzymes. *Adv Exp Med Biol.* 53: 171-183.

Wyss, M., Smeitink, J., Wevers, R. A., Walliman, T. (1992) Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim. Biophys Acta* 1102: 119-166.

Yamada, T., Ishihara, H., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Tokita, A., Satake, C., Tashiro, F., Katagiri, H., Aburatani, H., Miyazaki, J., Oka, Y. (2006) WFS1-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells. *Hum Mol Genet.* 15;15(10): 1600-1609.

Ye, Y., Gong, G., Ochiai, K., Liu, J., Zhang, J. (2001) High-energy phosphate metabolism and creatine kinase in failing hearts: a new porcine model. *Circulation.* 103(11): 1570-1576.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://enzyme.expasy.org/>

<http://www.ensembl.org/index.html>

<http://neuromuscular.wustl.edu/mother/myogenesis.html>

TÄNUAVALDUSED

Olen tänulik võimaluse eest osaleda Euroopa Liidu, Eesti teadusfondi ning Haridus- ja Teadusministeeriumi poolt rahastatud teadusprojektides:

MYOAGE - Eaga seotud lihasnõrkuse mõistmine ja sellega võitlemine;

Raku energeetiline puudulikkus kui südame- ja skeletilihase haiguste alus ja kaitsemehhanismide sihtmärk;

Oksüdatiivse fosforüülimise ja energeetilise metabolismi kompartmentatsiooni häirete roll haigestunud ja vananenud lihasrakkude patofüsioloogias.

Täna väga dots. Andres Piirsood ja tema töögruppi rakukultuuride valmistamise ja rakkude mikroskoopia ning morfoloogilise analüüsi abil saadud võrdlusandmete eest.

Erilised tänud juhendajatele Lumme Kadajale ja Lilian Kadaja-Sarapuule kasulike näpunäidete ja abivalmiduse eest lõputöö valmimisel.

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Marian Tarrend (sünnikuupäev: 05.02.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose „Raku energeetilist seisundit reguleerivate geenide ekspressiooni hindamine reaalka-PCR abil“, mille juhendaja on Lumme Kadaja,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 23.05.2014