

Insuliiniresistenssin vaikutus luuytimen me- senkymaalisten stroomasolujen kasvuun ja erilaistu- miseen

Biologia (Fysiologia ja genetiikka)
pro gradu -tutkielma

Laatija:
Aapo Alhokankare

16.01.2024
Turku

Pro gradu -tutkielma

Oppiaine: Biologia (Fysiologia ja genetiikka)

Tekijä: Aapo Alhokankare

Otsikko: Insuliiniresistenssin vaikutus luuytimen mesenkymaalisten stroomasolujen kasvuun ja erilaistumiseen

Ohjaajat: Dosentti Kaisa Ivaska, FM Milja Arponen & dosentti Tiina Henttinen

Sivumäärä: 62 sivua

Päivämäärä: 21.01.2024

Tyypin 2 diabetekseen (T2D) liittyy kasvanut luiden murtumariski, jonka syyt eivät ole täysin selvillä. Luukudos on elävää kudosta, joka uusiutuu jatkuvasti. Luuston jatkuva uusiutuminen vaatii runsaasti energiaa, ja luusto on riippuvainen glukoosiaineenvaihdunnasta. Siten myös veren sokeritasapainoa säätelevällä insuliinilla on tärkeä merkitys luiden uusiutumisessa. T2D:n olennainen tunnusmerkki on insuliiniresistenssi, joka häiritsee tätä glukoositasapainoa. Insuliiniresistenssin kaikkia vaikutuksia luun aineenvaihduntaan ei tunneta, kuitenkin sen tiedetään vaikuttavan alentavasti luusolujen kasvuun. T2D:n ja luiden haurastumiseen on liitetty myös luuytimen rasvoittuminen, jonka syntymekanismeja ei täysin tunneta. Tässä työssä haluttiin selvittää miten puutteellinen insuliinisignalointi vaikuttaa luuytimen mesenkymaalisten stroomasolujen kasvuun, elinkykyyn ja erilaistumiseen. Erityisesti haluttiin selvittää erilaistuvatko yhteiset kantasolut enemmän rasvasoluiksi eli adiposyyteiksi luusolujen eli osteoblastien sijaan. Insuliiniresistenssiä mallinnettiin hiljentämällä siRNA-tekniikalla insuliinireseptorin ja insuliinista riippuvaisen glukoosinkuljettimen GLUT4 toiminta yhdessä ja erikseen Sprague-Dawley rotan luuytimeistä kerätyistä multipotenteista mesenkymaalisisista soluista *in vitro*. Solujen kasvua tutkittiin elävien solujen kuvantamisen avulla ja elinkykyä alamarBlue-testillä. Solujen erilaistumista tutkittiin monipuolisesti adiposyyteille ja osteoblasteille tyypillisten geenien ilmentymisen avulla, soluvärjäyksillä ja testaamalla mm. alkalisen fosfataasin aktiivisuutta. Puutteellinen insuliinisignalointi johti muutoksiin solujen kasvussa, erilaistumisessa ja elinkyvyssä, sillä käsitellyt solut kasvoivat heikommin ja elinkyky oli alentunut. Insuliinisignaloinnin häiritseminen johti solujen vähentyneeseen erilaistumiseen luutamuodostaviksi osteoblasteiksi sekä geeni- että proteiinitasolla. Insuliinireseptorin ja GLUT4-glukoosinkuljettimen hiljentäminen johtivat yksilöllisiin vaikutuksiin solujen erilaistumisessa. GLUT4-hiljennetyissä soluissa nousivat rasvasolujen merkkitekijät ja soluihin ilmaantui rasvapisaroiita. Nämä solut myös kasvoivat heikoimmin. Tämän tutkimuksen perusteella insuliinisignaloinnin estäminen johtaa luuytimen mesenkymaalisten stroomasolujen alentuneeseen erilaistumiseen luutamuodostaviksi osteoblasteiksi. Insuliiniresistenssi ei itsessään erilaistanut soluja rasvasolujen suuntaan, mutta insuliinivälitteisen glukoosinkuljetuksen häiritseminen näin teki.

Avainsanat: Insuliiniresistenssi, insuliinireseptori, GLUT4, luuytimen rasvoittuminen, siRNA, osteoblasti, adiposyytti

Sisällysluettelo

1	Johdanto	1
1.1	Luuytimen mikroympäristö	2
1.1.1	Luuytimen solujen erilaistuminen osteoblasteiksi ja adiposyyteiksi	3
1.1.2	Luuytimen rasvakudos	5
1.2	Glukoositasapainon säätely.....	7
1.2.1	Insuliinisignalointi.....	7
1.2.2	Glukoosin kuljettajaproteiinit.....	9
1.2.3	Insuliiniresistenssi	10
1.3	Glukoosiaineenvaihdunta luun mikroympäristössä	11
1.4	RNA-interferenssi	13
1.4.1	siRNA.....	13
1.4.2	miRNA	14
1.4.3	DSiRNA	15
1.5	Tutkimuksen tavoite.....	16
2	Aineisto ja menetelmät	17
2.1	Työnkulku.....	17
2.2	Luuytimen mesenkymaaliset stroomasolut ja soluviljely	17
2.3	Transfektio siRNA-molekyyleillä.....	19
2.4	RNA:n eristys ja RT-PCR.....	20
2.4.1	RNA:n eristys	20
2.4.2	RNA-näytteiden käänteistranskriptio cDNA:ksi.....	21
2.5	Kvantitatiivinen PCR	21
2.6	Solujen erilaistumista, kasvua ja elinkykyä tutkivat menetelmät	24
2.6.1	Solujen erilaistumisen ja kasvun seuranta IncuCyte-kuvauksella.....	24
2.6.2	Hiljennysten vaikutus solujen elinkykyyn	24
2.6.3	Elävien solujen kvantitoiminen levyltä kalseiini-Am menetelmällä.....	25
2.6.4	Neutraalien rasvahappojen värjääminen	26
2.6.5	Alkalinen fosfataasi.....	26
2.6.6	ALP-värjäys	27
2.6.7	ALP-aktiivisuuden määrittäminen solulyysateista	27
2.7	Tilastolliset menetelmät	28
3	Tulokset.....	30

3.1	Mesenkymaalisten stroomasolujen transfektio	30
3.2	Kvantitatiivinen-PCR.....	30
3.2.1	siRNA-hiljennystehokkuus	30
3.2.2	Adipogeenisen CD36-markkerin qPCR alukkeiden testaus.....	32
3.2.3	Adipogeeniset ja osteogeeniset merkkitekijät siGlut4-soluissa	33
3.2.4	Adipogeeniset ja osteogeeniset merkkitekijät siInsr-soluissa	34
3.2.5	Adipogeeniset ja osteogeeniset merkkitekijät siGlut4+siInsr-soluissa	35
3.2.6	Hiljennysten vaikutus glukoosinkuljettimien GLUT1 ja GLUT3 ekspressioon	36
3.3	Hiljennysten vaikutus solujen kasvuun ja elinkykyyn.....	37
3.4	Hiljennysten vaikutus solujen erilaistumiseen.....	38
3.4.1	ALP-värjäys ja ALP-aktiivisuus	38
3.4.2	Neutraalien rasvahappojen värjääminen	40
4	Tulosten tarkastelu	41
4.1	Insuliinisisignaaloinnin hiljentäminen vaikutti solujen erilaistumiseen	41
4.2	Insuliinisisignaaloinnin estämisen vaikutus GLUT-kuljettimiin, solujen kasvuun ja elinkykyyn.....	43
4.3	Tutkimuksen vahvuudet, tulevaisuuden tutkimusmahdollisuuksia ja hypoteesin taustaa	44
4.4	Yhteenveto	46
5	Kiitokset.....	47
	Lähteet.....	48

Käytetyt lyhenteet

AKT	Seriini/treoniinikinaaseihin kuuluva proteiinikinaasi B
ALP	Alkalinen fosfataasi (engl. Alkaline phosphatase)
AU	Absorbanssiyksikkö (engl. Absorbance unit)
BMP	Bone morphogenetic protein (kasvutekijä)
BMSC	Luuytimen stroomasolu (engl. Bone marrow stromal cell)
BSA	Naudan seerumin albumiini (engl. Bovine serum albumin)
cDNA	Komplementaarinen deoksiribonukleiinihappo (engl. Complementary DNA)
CT	Kynnysarvo (engl. Cycle threshold)
DSiRNA	Dicer-substraatti siRNA (engl. Dicer-substrate small interfering RNA)
FABP4	Fatty acid binding protein 4
FBS	Naudan sikiön seerumi (engl. fetal bovine serum)
FOXO	Transkriptiotekijäperhe Forkhead family box O
GFP	Vihreä fluoresoiva proteiini (engl. Green fluorescent protein)
GLUT	Glukoosin kuljetusproteiini (engl. Glucose transporter)
GSK	Glykogeenisyntaasikinaasi
HSC	Hematopoieettinen kantasolu (eng. Hematopoietic stem cell)
IRS	Insuliinisubstraatti
JNK	c-Jun N-terminaalinen kinaasi
Km	Michaelis-vakio (Michaelis-Menten kinetiikka)
MAPK	Mitogeeni-aktivoitu proteiinikinaasi
MEM	Minimal essential medium
MSC	Mesenkymaalinen stroomasolu (engl. Mesenchymal stromal cell)
NTC	Templaattikontrolli (engl. No template control)
OCN	Osteokalsiini (engl. Osteocalcin)
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (engl. Phosphate buffered saline)
PCR	Polymeraasiketjureaktio (engl. Polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehydi (engl. Paraformaldehyde, PFA)
PI3K	Fosfatidyyli-inositoli-3-kinaasi
piRNA	PIWI-interaction RNA
PNPP	P-nitrofenyyli fosfaatti heksahydraatti dinatrium suola (engl. p-Nitrophenyl phosphate disodium hexahydrate)
PPARG	Transkriptiotekijä peroxisome proliferated-activated receptor γ
PPIB	Peptidylprolyl isomerase B
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA-hiljennys (engl. Ribonucleic acid interference)
RUNX	Transkriptiotekijä Runt-related transcription factor
SGLT	Natriumista riippuvainen glukoosin kuljettajaproteiini (engl. sodium-glucose cotransporter)
siRNA	Lyhyt interferenssiä aiheuttava RNA (engl. Short interfering RNA)
SLC	Solute carrier family (solukalvon kuljettajaproteiini)
SREBP	Steroli säätelyelementtiin tarttuva proteiini (transkriptiotekijä)
UPR	Vaste laskostamattomille proteiineille (engl. Unfolded protein response)

1 JOHDANTO

Tyypin 1 ja tyypin 2 diabeetikoilla on huomattavasti kasvanut riski luunmurtumiin (Janghorbani ym., 2007). Vaikka tyypin 1 ja tyypin 2 diabetesta yhdistää krooninen hyperglykemia, eli kohonnut verensokeri, on niiden taustalla eri mekanismit, jotka vaikuttavat luun metaboliin. Molemmissa tapauksissa syyt luiden haurastumisen taustalla eivät ole täysin selvillä. (Picke ym., 2019.) Tutkimusten avulla on osoitettu vahva yhteys glukoositasojen ja luun aineenvaihdunnan välille, tämä on nostanut uusia tutkimusnäkökulmia selittämään diabeteksen ja kasvaneen murtamariskin taustaa (Napoli ym., 2017).

Luukudos on elävää kudosta, joka uusiutuu jatkuvasti. Luuston jatkuva uusiutuminen vaatii runsaasti energiaa, ja luusto on riippuvainen glukoosiaineenvaihdunnasta. (Lecka-Czernik, 2017.) Glukoosi onkin luuston pääasiallinen energialähde (Srivastava ym., 2022). Siten myös veren sokeritasapainoa säätelevällä insuliinilla on tärkeä merkitys luiden uusiutumisessa (Lecka-Czernik, 2017). Tyypin 2 diabeteksen olennainen tunnusmerkki on insuliiniresistenssi, joka häiritsee tätä sokeritasapainoa (Könner & Brüning, 2012).

Luuytimen mikroympäristössä solujen erilaistumista ohjaavat erilaiset kasvutekijät, signaalintimolekyylit ja epigeneettiset tekijät (Zhu ym., 2016). Luuytimen solujen aineenvaihdunnan mekanismit solujen erilaistumisen aikana eivät ole kuitenkaan täysin selvillä (Ning ym., 2022). Osteoporoosissa ja tyypin 1 diabeetikoilla luuntiheys on laskenut, tyypin 2 diabeetikoilla puolestaan luuntiheys on mitattaessa normaali tai jopa koholla. Korkeasta luuntiheydestä huolimatta luun vahvuuden on kuitenkin todettu olevan heikompi tyypin 2 diabeetikoilla. (Napoli ym., 2017.) Tämän lisäksi tietokonetomografia kuvauksella on nähty kortikaalisen luun eli tiivisluun haurastumista ja trabekulaarisen eli hohkaluun tiheyden kasvamista (Walle ym., 2022).

Yksi selittävä tekijä tyypin 2 diabeteksen yksilölliseen vaikutukseen luiden haurastumiseen saattaa olla insuliiniresistenssi, jonka on havaittu alentavan luun muodostumista *in vivo* (Fulzele ym., 2010). Luun muodostumiseen tarvitaan osteoblasteja, jotka kehittyvät luuytimen mesenkymaalisisista kantasoluista. Tyypin 2 diabetes vaikuttaa haitallisesti osteoblasteihin, mikä edesauttaa mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumista rasvasoluiksi eli adiposyyteiksi.

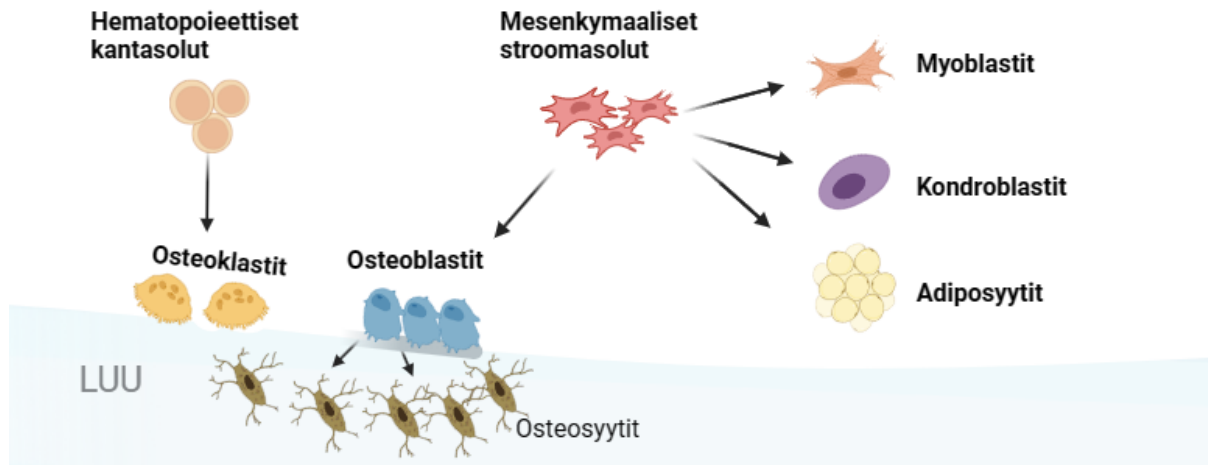
(Picke ym., 2019.) Luuytimen rasvoittuminen, yhdessä muiden tekijöiden kanssa, johtaa kasvaneeseen murtumarisktiin ja murtumat myös paranevat hitaammin (Ma ym., 2014; Picke ym., 2019).

1.1 Luuytimen mikroympäristö

Luu ei ole ainoastaan passiivinen tukirakenne vaan se on elävää kudosta, joka uusiutuu jatkuvasti. Luuston jatkuvassa uusiutumisessa avaintekijänä on tasapainotila luuta muodostavien osteoblastien ja luuta hajottavien osteoklastien välillä. Luu voidaan jakaa kahteen eri tyyppiin: kortikaaliseen luukudokseen ja trabekulaariseen luukudokseen. Trabekulaarinen luu on aktiivisempi aineenvaihdunnallisesti, ja suurin osa luunmuodostuksesta tapahtuu pääasiassa tässä luukudoksessa. (Parfitt, 1994; Manolagas & Jilka, 1995.)

Luu on heterogeeninen materiaali, joka voidaan karkeasti jakaa epäorgaaniseen mineraaliin ja orgaaniseen materiaaliin. Luun koostumuksesta kaksi kolmannesta on epäorgaanista mineraalia. Mineraali on suurimmalta osin kalsiumista ja fosfaatista koostuvaa hydroksiapatiittia, ja lisäksi luusta löytyy muun muassa kalsiumsitraattia ja kalsiumkarbonaattia. Mineralisaatioon tarvitaan alkalista fosfataasia, kalsiumia ja fosfaattia. Luun orgaanisesta aineksesta valtaosa on matriksia eli solunulkoista väliainetta, jonka merkittävin rakenneproteiini on osteoblastien syntetisoima tyypin I kollageeni. Solumassan osuus orgaanisesta aineksestä on vain muutamia prosentteja. (Boskey, 2013.)

Luuytimessä on kaksi merkittävää multipotenttia eli monikykyistä solulinjaa; luuytimen stroomasolut (engl. bone marrow stromal cells, BMSC), joista käytetään myös nimitystä mesenkymaaliset stroomasolut (engl. mesenchymal stromal cells, MSC), sekä hematopoeettiset kantasolut (Manolagas & Jilka, 1995). Luuytimen stroomasolut voivat erilaistua luuta muodostaviksi osteoblasteiksi, luuytimen rasvasoluiksi eli adiposyyteiksi tai kondrosyyteiksi (kuva 1). Hematopoeettisista kantasoluista saavat puolestaan alkunsa luuta hajottavat osteoklastit ja hematopoeettiset solut. (Manolagas & Jilka, 1995.) Osteoblasteista saavat puolestaan alkunsa osteosyytit, jotka ovat lukumäärältään suurin luukudoksen solupopulaatioista, ne säätelevät osteoblastien sekä osteoklastien toimintaa. Osteosyytit erilaistuvat osteoblasteista, jotka ovat jääneet soluväliaineen ympäröimäksi. (Bonewald, 2011.) Luuytimen mikroympäristöllä on suuri rooli luuytimen solujen toimintaan. Mesenkymaaliset ja hematopoeettiset solut reagoivat osin samoille sytokiineille ja muille kasvutekijöille (Suda ym., 1992).



Kuva 1. Yksinkertaistettu kuva luun muodostamisen kannalta oleellisista solutyypeistä. Hematopoeettisista kantasoluista muodostuvista soluista on esitetty vain luuta hajottavat osteoklastit. Mesenkymaaliset stroomasolut voivat erilaistua puolestaan osteoblasteiksi, myoblasteiksi, kondroblasteiksi tai adipsyyteiksi. (Muokattu Manolagas & Jilka, 1995.)

1.1.1 Luuytimen solujen erilaistuminen osteoblasteiksi ja adipsyyteiksi

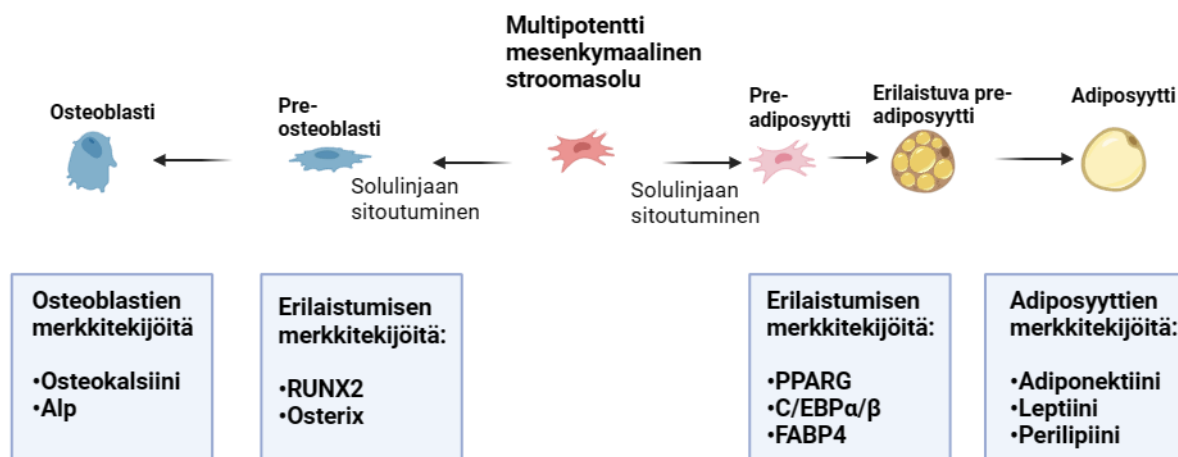
Luuytimessä on toiminnallisesti erilaisia mikroympäristöjä, joiden merkitystä ei täysin tunneta. Multipotentit mesenkymaaliset solut ovat omissa, spesifisissä kantasolulokeroissa (engl. stem cell niche). (Wang ym., 2018.) Multipotenttien mesenkymaalisten stroomasolujen erilaistumista ohjaavat erilaiset kasvutekijät, signaalintimolekyylit ja epigeneettiset tekijät. Sääteilytekijät aktivoivat useiden eri geenien ilmentymistä, mikä lopulta määrittää solulinjan ja fenotyypin. Ei ole kuitenkaan täysin selvillä, miten tiettyyn solutyyppiin erilaistuminen määräytyy ja mitkä kaikki tekijät tähän vaikuttavat. Mekaanisen kuormituksen tiedetään olevan yksi merkittävä tekijä, joka aikaansaa muutoksia osteoklasteissa ja osteoblasteissa. (Zhu ym., 2016.)

Mesenkymaalisten solujen erilaistumista voidaan tutkia solulinjoille tyypillisillä merkkitekijöillä (kuva 2). Mesenkymaalisten stroomasolujen erilaistumiseen osteoblasteiksi vaikuttavat monet niin kutsutut osteogeeniset tekijät, kuten hormonit ja kasvutekijät (Zuo ym., 2015), jotka aktivoivat spesifisiä, geenien transkriptioon vaikuttavia tekijöitä. Osteoblastilinjan keskeisiä transkriptiotekijöitä ovat Osterix ja RUNX2 (engl. runt-related transcription factor). Osterix transkriptiotekijä edistää luutumista lisäämällä osteokalsiinin ja tyypin I kollageenin tärkeimmän komponentin COL1A1 muodostumista aktivoimalla näiden geenien ilmentymistä. (Donat ym. 2021.) Myös RUNX2 transkriptiotekijä vaaditaan solujen erilaistumiseen osteoblastilin-

jaksi. RUNX2 aktivoi osteoblastilinjalle tyypillisten geenien ilmentymistä ja näiden koodaamien proteiinien tuotantoa, kuten COL1A:n ja osteoblastispesifin proteiinin osteokalsiinin tuotantoa. RUNX2 aktivoi myös suoraan luusolujen väliaineen mineralisoitumisen avaintekijän eli alkalisen fosfataasin *Alpl*-geenin ilmentymistä. (Weng & Su, 2013; Donat ym., 2021.)

Luuytimen rasvasolujen esimuotojen fenotyypeistä ei ole yksimielisyyttä, mutta on kuitenkin ehdotettu merkkitekijöitä, joiden avulla näitä esimuotoja voidaan tunnistaa (Tencerova ym., 2019). Luuytimen rasvakudoksen adipogeneesi eli rasvasolujen erilaistuminen on tiukasti transkriptiotekijöiden avulla kontrolloitu prosessi. Prosessin katsotaan olevan kaksivaiheinen; ensin BMP-kasvutekijät (engl. Bone morphogenetic proteins) ohjaavat kantasoluja erilaistumaan tiettyyn solulinjaan, jolloin muotoutuu adiposyytin esimuoto eli niin sanottu preadiposyytti. Preadiposyytti muistuttaa morfologialtaan mesenkymaalista stroomasolua. Erilaistumisen edessä kohti funktionaalista adiposyyttiä solun muoto muuttuu pallomaiseksi ja lipidejä kertyy solun sisään (kuva 2). (Ghaben & Scherer, 2019.)

Adiposyyttien erilaistumisessa keskeisiä transkriptiotekijöitä ovat prosessin alkuvaiheessa aktivoituvat PPAR-gamma (engl. peroxisome proliferator-activated receptor gamma) ja C/EBP-geeniperheen proteiinit (engl. CCAAT/enhancer-binding protein) (Siersbæk ym., 2010). PPAR-gamman on osoitettu olevan välttämätön rasvakudoksen syntymiseen *in vivo* ja *in vitro* (Rosen ym., 1999). Erilaistuva adiposyytti kerää sisäänsä lipidejä, mikä vaikuttaa rasvahappojen kuljetusproteiinia koodaavan *FABP4*:n (engl. Fatty acid binding protein) ilmentymisen lisääntymiseen. Kypsä adiposyytti ilmentää paitsi edellä mainittuja merkkitekijöitä, mutta myös adiponektiini ja leptiini peptidihormoneita sekä lipidipisaroiden pintakalvoon tarttuneita periliipiinejä. (Ghaben & Scherer, 2019.)



Kuva 2. Osteogeneesiin ja adipogeneesiin päävaiheita ja merkkitekijöitä. Preosteoblastit ja preadiposyytit ovat valittuun solulinjaan sitoutuneita soluja, joiden erilaistumista voidaan tutkia erilaisilla merkkitekijöillä. Kypsien osteoblastien merkkitekijöitä ovat solujen erittämä osteokalsiini ja alkalinen fosfaasi. Kypsien adiposyyttien merkkitekijöitä ovat puolestaan adiponektiini, leptiini ja perilipiini. (Muokattu Ghaben & Scherer, 2019.)

1.1.2 Luuytimen rasvakudos

Rasvakudos koostuu rasvasoluista eli adiposyyteistä, jotka varastoivat energiaa triglyserideinä solun sisällä oleviin lipidipisaroihin. Tarvittaessa lipaasit pilkkovat triglyseridejä vapaiksi rasvahapoiksi verenkiertoon energiaksi. (Fazeli ym., 2013.) Luuytimen rasvakudos eli MAT (engl. marrow adipose tissue) sijaitsee luuydinontelon sisällä ja on merkittävä rasvavarasto ihmisellä, sisältäen noin 10 % ihmisen kokonaisrasvamassasta. (Tencerova ym., 2019; Wang ym., 2018).

Luuytimen rasvakudos eli MAT voidaan jakaa kahteen selkeään ryhmään; pysyvään, vähemmän aktiiviseen cMAT:n (engl. constitutive) ja metabolisesti aktiivisempaan rMAT:n (engl. regulated). cMAT sisältää suurempia adiposyyttejä ja sijaitsee tyypillisesti luun ulkoreunoilla, kun taas rMAT on lähempänä muodostuvaa luuta. (Scheller & Rosen, 2014.) MAT eroaa valkoisesta ja ruskeasta rasvakudoksesta. Histologisesti MAT muistuttaa endokriinista valkoista rasvaa, mutta näiden geeni-ilmentymisessä ja aineenvaihdunnassa on eroja. MAT koostuu lähes kokonaan triglyserideistä, ja näiden rasvahapot voivat olla tyydyttyneitä, monitydyttämättömiä tai monitydyttämättömiä. (Fazeli ym., 2013.) MAT:n rasvahappokoostumus eroaa muista rasvakudoksista (Griffith ym., 2009). MAT:n eroja muihin rasvakudoksiin on tutkittu mm. jäniksillä, joilla tehdyissä kokeissa MAT:n adiposyyttien on havaittu olevan 4–6 kertaa pienempiä kuin valkoisen rasvakudoksen adiposyytit. Näin ison hypertrofiaeron voisi olettaa johtuvan lisääntyneestä lipolyysistä tai vähentyneestä triglyseridisynteesistä. Tutkimustulokset kuitenkin

osoittavat, että triglyseridisynteesi on aktiivisempaa MAT:ssa kuin valkoisessa rasvakudoksessa. (Fazeli ym., 2013.)

Luuytimen rasvalla on merkittävä rooli luun homeostaasiin, energian varastointiin ja luuston ja koko kehon aineenvaihduntaan. MAT:ia voidaankin pitää endokriinisena elimenä, sillä sen tuottamat hormonit vaikuttavat sekä paikallisesti, että verenkierron välityksellä ympäri kehoa. (Ghaben & Scherer, 2019.) Tutkimuksissa on osoitettu luuytimen vapaiden rasvahappojen vapautumisella olevan yhteys osteoblastien, osteoklastien ja verisolujen toiminnan säätelyyn (Cornish ym., 2008). MAT:n roolia luun metaboliaan ei kuitenkaan täysin tunneta (Fazeli ym., 2013). Luuytimen onteloissa on aktiivista hematopoieettista luuydintä, jonka tilavuus vähentyy ikääntyessä ja korvaantuu rasvalla (Wang ym., 2018). Aikuisella luuytimestä on noin 70 % rasvaa. Tutkimuksissa on havaittu lisääntyneen luuytimen rasvan vähentävän kortikaalisen luun määrää, luun tiheyttä ja luun kasvunopeutta. Luuytimen rasvoittuminen on myös yhdistetty osteoporoosiin ja osteopeniaan. On silti epäselvää, että onko luuytimen rasvoittumisella itsessään luun kasvuun ja tiheyteen negatiivinen vaikutus vai onko rasvoittuminen vain seurausta luusolujen katoon. (Scheller & Rosen, 2014.)

Runsas viskeraalinen rasvan määrä korreloi negatiivisesti luun tiheyden kanssa aikuisilla. Terveillä naisilla on havaittu luuytimen rasvan ja luun tiheyden kanssa käänteinen korrelaatio; mitä vähemmän luuytimen rasvaa, sitä tiheämpi luu. Kortikaalisen luun määrän on myös todettu olevan suurempaa mitä pienempi on luun rasvakudoksen määrä. Lihavilla henkilöillä lisääntynyt luuytimen rasvakudos korreloi osteoporoosin ja lisääntyneen murtumariskin kanssa. Luutiheyden on havaittu laskevan luuytimen rasvoituessa. Luuydin rasvoittuu ikääntyneillä ja lihavilla henkilöillä, mikä saattaa osaltaan vaikuttaa pitkien luiden osteogeenisten ja hematopoieettisten tekijöiden toimintahäiriöihin. (Fazeli ym. 2013.)

Luuytimen rasvoituessa adiposyytit voivat kasvaa kokoa (hypertrofia) tai adiposyyttien määrä voi lisääntyä (hyperplasia) (Ghaben & Scherer, 2019). Rasvakudoksessa adiposyyttien hypertrofia ja adipogeneesin kautta kasvanut adiposyyttien määrä voi suoraan vaikuttaa aineenvaihduntaan. Adiposyyttien hypertrofia on yhdistetty insuliiniresistenssiin. Adiposyyttien kasvu aiheuttaa mekaanista stressiä naapurisoluisissa ja soluväliaineessa. Solujen kasvanut koko aiheuttaa hapenpuutetta eli hypoksiaa, joka voi johtaa kudoksen tulehdukseen. Isot adiposyytit voivat lisätä lipolyysiä ja tulehdusta edistävien sytokiinien eritystä sekä toisaalta vähentää tulehdusta hillitsevien adipokiinien eritystä. (Ghaben & Scherer, 2019.)

1.2 Glukoositasapainon säätely

Glukoosi on ihmiselle tärkeä nopean energian lähde, ja veriplasman glukoosipitoisuus onkin tiukasti säädelty prosessi elimistössä. Glukoosiaineenvaihduntaan vaikuttavat insuliinin ja sen vastavaikuttajien välinen tasapaino, glukoosin ja vaihtoehtoisten energialähteiden saatavuus sekä glukoosinkulutus. Haiman Langerhansin saarekkeiden β -solujen insuliinineritys säätyy soluväliaineen glukoosipitoisuuden mukaan. Insuliinin tuotantoa tehostaa niin sanottu inkretiini-vaikutus eli insuliinipitoisuus kasvaa enemmän, kun glukoosia annetaan suun kautta kuin suo- neen annettaessa. Esimerkiksi ohutsuolen L-solujen erittämän, insuliinin eritystä haiman β -soluista stimuloivan GLP-1 peptidin määrä kasvaa suun kautta nautituista hiilihydraateista. (Virkamäki & Niskanen, 2009.)

Haiman β -solut valmistavat, varastoivat ja erittävät insuliinia, jota vapautuu glukoosipitoisuu- den kasvaessa. β -soluissa insuliinin esiaste proinsuliini muokataan proinsuliiniksi. Proinsu- liini koostuu insuliinimolekyylin A- ja B- ketjuista sekä näitä yhdistävästä C-peptidistä. Insu- liinin erittyessä β -soluista proinsuliini pilkkoutuu, jolloin muodostuu varsinainen insuliinimo- lekyyli ja C-peptidi. (Guettier & Gorden, 2010; Peltola ym., 2023.)

Plasman glukoosipitoisuuden laskiessa aktivoituvat insuliinin vastavaikuttajat, erityisesti glu- kagoni ja adrenaliini. Langerhansin saarekkeiden α -soluista vapautuva glukagoni lisää glyko- genolyysiä eli glykokeenin hajoamista maksassa ja glukoneogeneesiä eli glukoosin muodosta- mista. Lisämunuaisista erittyvä adrenaliini puolestaan vähentää glukoosin kulutusta lihaksissa ja lisää lipolyysiä rasvakudoksessa. Kun glukoosia ei ole saatavilla, vapaat rasvahapot tuottavat suuren osan energian tarpeesta. (Peltola ym., 2023; Virkamäki & Niskanen, 2009.)

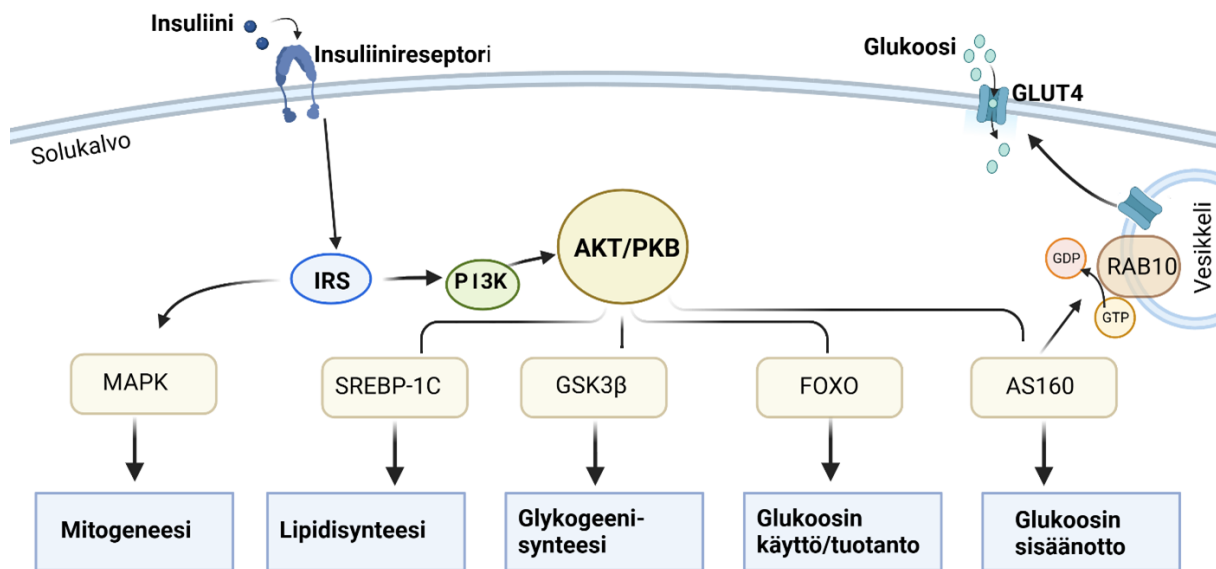
1.2.1 Insuliinisolointi

Insuliini on anabolinen peptidihormoni, joka sitoutuu insuliinireseptoriin ja indusoi solunsisäi- sen insuliinisoloinnin. Insuliini koostuu 21 aminohappoa pitkästä A-ketjusta ja 30 amino- happoa pitkästä B-ketjusta (Virkamäki & Niskanen, 2009). Insuliinireseptori on hormoniresep- tori, joka löytyy lähes kaikista soluista, mutta solutyypin välillä on merkittäviä eroja insulii- nireseptorien määrässä. Adiposyyteissä voi olla yli 200 000 insuliinireseptoria, kun taas puna- soluissa näitä voi olla joitakin kymmeniä. (White, 1997.)

Insuliinireseptori on heterotetrameeri eli se koostuu kahdesta solukalvolla olevasta α - ja kahdesta solukalvon sisäpuolisesta β -osasta. Insuliinireseptori on tyrosiinikinaasireseptori. Reseptori aktivoituu insuliinin sitoutuessa α -osaan, jolloin reseptori dimerisoituu, mikä puolestaan johtaa erityisesti β -osan insuliinireseptorisubstraatti 1:n (IRS-1) tyrosiinin fosforylaatioon. Insuliinireseptorisubstraatteja tunnetaan muitakin, mutta IRS-1 on niistä merkittävin. IRS-1:n tyrosiinin fosforylaatio tehostaa insuliinisignalointia, kun taas IRS 1:n seriinin fosforylaatio estää sitä. (Haeusler ym., 2018; Virkamäki & Niskanen, 2009.)

IRS-1:n fosforylaatio aktivoi insuliinisignalointireitin, jonka alussa fosfatidyli-inositoli-3-ki-naasi (PI3K) aktivoituu. Signalointi etenee ketjureaktion tavoin johtaen monien seriini/treoniini-kinaasien, kuten Akt:n (seriini-treoniinikinaasi, tunnetaan myös nimellä PKB) ja proteiinikinaasi C:n aktivoitumiseen (kuva 3). AS160, joka on eräs Akt:n substraateista, ylläpitää solunsisäistä vesikkelikuljetusta säätelevät Rab-GTPaasit inaktivoituna eli GDP-sitoutuneena Rab- muotona (Rab-GDP). Kun Akt:n aktivoituu, se poistaa AS160:n inhibito-risen toiminnan fosforyloimalla AS160:n, mikä johtaa Rab-GTPaasin aktivaatioon ja solu- vesikkeleissä kiinni olevien, insuliinista riippuvaisten GLUT4 glukoosinkuljettajaproteiinien siirtymiseen solukalvolle. Tämä mahdollistaa glukoosin tehokkaan sisäänoton soluun. Akt saa aikaan myös glykogeenisynteesin lisääntymisen fosforyloimalla synteesiä estävän glykogeeni- syntaasikinaasi 3 β :n eli GSK3 β :n. (Mackenzie & Elliott, 2014; Mueckler & Thorens, 2013.) Insuliinisignaloinnin vaiheet ovat palautuvia, sillä jokaisella aktivoidulla kinaasilla on useim- miten useita fosfataaseja, jotka defosforylaatiolla inaktivoivat kinaasit (Haeusler ym., 2018; Saltiel, 2021).

Insuliinireseptorin aktivaatio vaikuttaa myös Akt:n kautta lipogeneesiin eli veressä olevan yli- määräisen glukoosin muuttamiseen varastorasvaksi. Akt saa aikaan sterolien säätelyelementtiin sitoutuvan SREBP-1c transkriptiotekijän aktivaation. SREBP1-1c tehostaa kolesteroli-, rasva- happo-, triglyseridi- ja fosfolipidisynteesiin tarvittavien geenien ilmentymistä. Insuliini vai- kuttaa glykoneogeneesiin ja glykogenolyysiin Akt:n kautta lisäämällä FOXO transkriptioteki- jäperheen (Engl. Forkhead family box o) geenien ilmentymistä. Insuliinireseptorin aktivaatio vaikuttaa IRS-1 välitteisesti myös mitogeneesiin eli solun kasvuun ja jakautumiseen. Aktivaatio tapahtuu mitogeneeniaktivoidun proteiinikinaasin eli MAPK:n signalointireittiä. (Könner & Brü- ning, 2012.)



Kuva 3. Insuliinisignalointireitin välivaiheita, erityisesti glukoosiaineenvaihdunnan kannalta. Insuliinireseptorin aktivoitua IRS fosforyloituu, mikä aktivoi PI3K -kinaasin ja AKT/PKB:n. Akt fosforyloi AS160:n, mikä saa aikaan GLUT4-glukoosinkuljettimien siirtymisen solukalvolle. Transkriptiotekijä FOXO:n kautta Akt vaikuttaa glykoneogeneesiin ja glykogenolyysiin. Akt:n aktivaatio lisää glykogeenisynteesiä inhiboimalla GSK3 β -toimintaa. Lipidisynteesiin Akt aktivaatio vaikuttaa puolestaan SREBP-1C-transkriptiotekijän aktivaation kautta. IRS fosforylaatio vaikuttaa MAPK- signalointiin ja sitä kautta mitogeneesiin. (Muokattu Könner & Brüning, 2012.)

Insuliini siis edistää glukoosin sisäänottoa, mitogeneesiä, lipidisynteesiä, glukoosin varastoitumista. Insuliini puolestaan hidastaa glukoosin muodostamista ja glykogeenin hajoamista. Insuliini vaikuttaa eri tavalla solutyypistä riippuen, sillä insuliinireseptorin aktivaatio saa aikaan monimuotoiset solutason vasteet, joita kaikkia ei vielä edes tunneta. (Haeusler ym., 2018; Virkamäki & Niskanen, 2009.)

1.2.2 Glukoosin kuljettajaproteiinit

SLC-geeniperheen (engl. Solute Carrier) koodaamat proteiinit toimivat solukalvon kuljettajaproteiineina. SLC-perhe voidaan jakaa pienempiin alaluokkiin, ja yksi alaluokista on SLC2-kuljettimet. SLC2-geeniperheen geenit koodaavat glukoosin kuljettajaproteiineja, joita kutsutaan myös GLUT-proteiineiksi (engl. Glucose Transporter Proteins). GLUT-proteiinit kuljettavat glukoosia passiivisesti solukalvon läpi solun sisälle. GLUTit pystyvät kuljettamaan myös muita monosakkarideja, kuten fruktooseja ja inositoleja. (Holman, 2020; Mueckler & Thorens,

2013.) Glukoosia kuljetetaan soluun myös aktiivisesti Na⁺-välitteisillä glukoosikuljettimilla (engl. Sodium-Glucose Cotransporter, SGLT), mutta kuljetin ei ole kuitenkaan sukua GLUT-kuljettajaproteiineille (Mutanen ym., 2021).

Ihmiseltä on karakterisoitu 14 erilaista GLUT-proteiinia, jotka jaetaan kolmeen alakategoriaan. Ensimmäinen alakategoria sisältää glukoosin kuljettajaproteiinit 1–4, jotka ovat nisäkkäillä yleisimmät kuljettajaproteiinit. GLUT1-4 edesauttavat glukoosin passiivista kuljetusta konsentraatiogradientin suuntaan eli yleensä verenkierrosta soluihin. Kun pitoisuuserot ovat tasaantuneet, glukoosinkuljettajat kuljettavat glukoosia tarvittaviin elimiin plasman glukoosipitoisuuden pysyessä tasaisena. GLUT-kuljetusproteiinit eroavat toisistaan muun muassa siinä, missä kudoksissa ne toimivat ja millä tehokkuudella, miten herkästi ne reagoivat glukoositasojen nousuun ja onko toiminta riippuvainen hormonitoiminnasta. (Mueckler & Thorens, 2013.)

GLUT-proteiinien glukoosin siirtotehokkuus plasmasta soluihin riippuu glukoosipitoisuudesta, ja se ilmaistään Michaelis-Menten kineettisen mallin mukaisesti Km-arvolla (Michaelis-vakio). GLUT1-kuljettajaproteiinit ovat herkkiä pienelle glukoosipitoisuuksien muutokselle (Km = 1 mM) ja ne varmistavat solujen jatkuvan glukoosin saannin. GLUT2, joka kuljettaa glukoosia soluun ja solusta ulos, toimii suurilla glukoosipitoisuuksilla (Km ≈ 17 mM). GLUT3 on tärkeä kuljetin mm. hermosoluissa ja varmistaa myös solujen jatkuvaa energian saantia (Km ≈ 1.5 mM). GLUT4-proteiini, jonka toimintaa insuliini säätelee, ilmenee pääosin rasva-, sydän- ja luurankolihas kudoksissa. GLUT4 on merkittävä glukoosin poistaja verenkierrosta ja keskeinen koko kehon glukoositasapainoa säätelevä tekijä. (Mueckler & Thorens, 2013; Thorens & Mueckler, 2010.) James ym. karakterisoivat GLUT4 vuonna 1988, jonka jälkeen sitä on tutkittu paljon erilaisissa koeasetelmissä. Ei kuitenkaan täysin tunneta, mitkä solunsisäiset tekijät vaaditaan GLUT4:n siirtymiseksi solukalvolle ja mitkä tekijät säätelevät GLUT4:n ilmenemistä eri kudostyypeissä (Thorens & Mueckler, 2010).

1.2.3 Insuliiniresistenssi

Solujen heikentynyttä kykyä reagoida insuliiniin kutsutaan insuliiniresistenssiksi, jonka kehittyminen on oleellinen osa tyypin 2 diabetesta. Tyypin 2 diabetesta edeltää esidiabeettinen vaihe, jolloin haiman β-solut lisäävät insuliinin tuotantoa kompensoidakseen heikentynyttä insuliini-

nivastetta. Insuliinin ylituotanto johtaa veren korkeaan insuliinipitoisuuteen eli hyperinsulinemiaan. Pitkään jatkunut ylikompensaatio johtaa haiman β -solujen toimintahäiriöön, joka johtaa tyypin 2 diabeteksen lopulliseen kehittymiseen. (Könner & Brüning, 2012.)

Insuliiniresistenssissä insuliinin vaikutus insuliinireseptoriin on pääsääntöisesti säilynyt, mutta solunsisäinen insuliinisignalointi on heikentynyt. Tunnetaan myös harvinainen tyypin A-insuliiniresistenssi, jossa geneettisen mutaation vuoksi insuliinireseptori itsessään ei toimi. (Koenner & Bruening, 2012.) Myös IRS-1 proteiinista tunnetaan geneettisiä polymorfioita, jotka johtavat alentuneeseen PI3K aktivaatioon ja edelleen insuliiniresistenssiin, hyperinsulinemiaan, rasvan kerääntymiseen, dyslipidemiaan ja lisääntyneeseen sydäntautiriskiin (Saltiel, 2021).

Lihavuuteen liittyvä kudostulehdus on suurin yksittäinen insuliiniresistenssin aiheuttaja. Krooninen matala-asteinen tulehdus aktivoi solunsisäisiä stressitekijöitä. Yksi tällainen stressitekijä on JNK eli c-Jun N-terminaalinen kinaasi, joka estää IRS-1 toimintaa fosforyloimalla sen seriini-aminohappoja. JNK-kinaasin yksi aktivointikanava on laskostamattomiin proteiineihin (engl. Unfolded Protein Response, UPR) liittyvä vaste. Endoplasmisessa kalvostossa, jossa proteiinit laskostuvat, syntyy UPR-vaste, jos proteiinien laskostamisessa tulee häiriö esimerkiksi solun rasvapitoisuuden noustessa tai jos väärin laskostettuja proteiineja on liikaa. (Mäkinen ym., 2013; Osborn & Olefsky, 2012.)

Kroonisessa matala-asteisessa tulehduksessa rasvasolujen määrän noustessa myös niiden erittämien adipokiinien määrä nousee. Adipokiinit voivat suoraan haitata insuliinisignalointia tai ne aiheuttavat makrofagien määrän lisääntymisen, mikä edistää tulehdukseen verrattavaa tilaa rasvakudoksessa. Makrofagit erittävät tulehdusta edistäviä sytokiineja, jotka lisäävät vapaiden rasvahappojen määrää verenkierrossa. Vapaiden rasvahappojen määrä puolestaan lisää insuliiniresistenssiä tulehdusvasteen seurauksena. (Siersbæk ym., 2010.)

Insuliiniresistenssin kaltaiset hormoni-resistenssit eivät kehity tasaisesti, vaan vaikutukset ovat heterogeenisiä eli ne voivat olla vaikutuksiltaan erilaisia eri solutyypeissä ja elimissä. Insuliiniresistenssin molekyylytason mekanismeja ei vielä täysin tunneta. (Könner & Brüning, 2012.)

1.3 Glukoosiaineenvaihdunta luun mikroympäristössä

Glukoosi on luuston pääasiallinen energialähde (Srivastava ym., 2022). Luuytimen mesenkymaaliset stroomasolut tarvitsevat luun homeostaasin ylläpitoon huomattavan määrän

energiaa. Myös osteoblastien erilaistuminen tarvitsee paljon energiaa. Tämä energia saadaan pääasiallisesti glykolyysistä, joka takaa riittävän ATP:n määrän solun tarpeisiin (Donat ym., 2021; Karner & Long, 2018). Luuytimen energia-aineenvaihduntaa onkin tutkittu paljon. Geneettiset ja funktionaaliset kokeet ovat osoittaneet glukoosi-, rasvahappo- ja aminohappoaineenvaihdunnan säätelevän luuytimen solujen erilaistumista (Confavreux ym., 2009; Ghosh-Choudhary ym., 2020).

Insuliinin on jo pitkään tiedetty lisäävän glukoosin kulutusta luissa (Hahn ym., 1988). Vasta viime vuosina on kuitenkin osoitettu, että luusoluissa GLUT4 toimii insuliinivälitteisen glukoosin sisäänotossa (Li ym., 2016). Insuliinireseptorin puuttumisen osteoblasteilta on puolestaan osoitettu heikentävän luun muodostamista hiirillä (Fulzele ym., 2010). Insuliinivälitteisellä glukoosinkuljetuksella on siis suora merkitys luun kasvuun, ja insuliinin tiedetäänkin olevan keskeinen luun uudistamis- ja aineenvaihduntatekijä (Ferron ym., 2010). Li ym. (2016) tutkivat hiiren osteoblasteja *in vitro* ja he huomasivat GLUT4:n ilmentymisen jopa viisinkertaistuvan osteoblastien erilaistuessa. Työssä osoitettiin *Glut4*-ekspressio hiirellä myös *in vivo*. Arponen ym. (2022) osoittivat puolestaan tutkimuksessaan, että GLUT4 on välttämätön osteoblastien muodostukselle *in vitro*.

Insuliiniresistenssiä luun mikroympäristössä on mallinnettu estämällä insuliinisignalointikaskadin yksittäisten tekijöiden toiminta, mikä mahdollistaa insuliiniresistenssin signalointireittien selvittämisen. Esimerkiksi Akt:n toimintaa on mallinnettu geenimuokatuilla hiirillä, joilla Akt isoformi 2:n (AKT2) toiminta on estetty. *AKT2*-geenin ilmentymisen hiljentäminen johti insuliiniresistenssiin ja glukoosin heikentyneeseen sietoon. *AKT2*:n hiljentäminen johti myös liipatrofiaan eli rasvakudoksen määrän laskuun, joka johtui erityisesti muutoksista adiposyyttien määrässä eikä vain adiposyyttien koossa. (Garofalo ym., 2003.)

Aineenvaihdunnan häiriöt luuytimen mesenkymaalisissa stroomasoluissa häiritsevät luun muodostumisen ja hajottamisen tasapainoa (Ghosh-Choudhary ym., 2020). Shen ym. (2022) selvittivät glykolyysin merkitystä luun aineenvaihduntaan ja he osoittivat lyhytaikaisen energian rajoittamisen laskevan luutamuodostavien merkkitekijöiden ilmentymistä. Lee ym. (2020) puolestaan tutkivat hiirillä glykolyysiä radioaktiivisella glukoosilla ja osoittivat aerobisen glykolyysin tuottavan 80 % kypsien osteoblastien tarvitsemasta energiasta. Yhdessä nämä tutkimukset vahvistavat glukoosiaineenvaihdunnan suurta merkitystä osteoblastien aineenvaihduntaan.

1.4 RNA-interferenssi

RNA-interferenssi (RNAi) on sekvenssispesifinen post-transkriptionaalisesti toimiva geenien hiljennyskoneisto, joka toimii niin eläimillä kuin kasveillakin. RNA-interferenssin olennainen tunnusmerkki on kaksijuosteinen-RNA, jonka sekvenssi on ainakin osittain komplementaarinen hiljennettävän geenin lähetti-RNA:n kanssa. (Fire ym., 1998.) Eukaryooteilla kaksijuosteinen RNA on tärkeä geenien ilmentymisen säätelijä. Se käynnistää erityyppisiä geenihiljennysväyliä, joita kutsutaan RNA-interferenssiksi tai RNA-hiljennykseksi. (Meister & Tuschl, 2004.) RNA-interferenssitutkimuksen läpimurto tapahtui 90-luvulla, kun Guo ja Kemphues (1995) havaitsivat madoilla yksijuosteisten sense- ja antisense-RNA-juosteiden hiljentävän samalla tavalla geenien ilmentymistä. Fire ym. (1998) osoittivat tutkimuksessaan, että kaksijuosteisella RNA:lla oli kymmenkertainen hiljentävä vaikutus verrattuna yksijuosteiseen RNA:han. Artikkelissaan he esittelivät RNA-interferenssiteknologian, jolla voitiin kohdennetusti hiljentää genejä kaksijuosteisella RNA:lla. Ensimmäiset kokeet tehtiin *Caenorhabditis elegans* nematodalla, mutta myöhemmät tutkimukset ovat osoittaneet vastaavien mekanismien löytyvän muiltakin aiotumaisilta. (Hannon, 2002.)

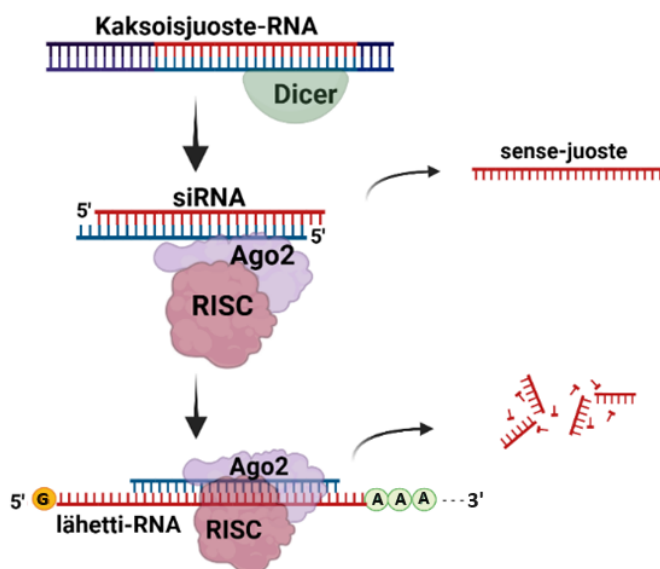
RNA-interferenssiin liittyvät RNA-molekyylit voidaan funktionaalisesti jakaa kolmeen luokkaan: lyhyet interferenssiä aiheuttavat RNA:t eli siRNA:t (engl. small interfering RNA), mikroRNA:t eli miRNA:t (engl. microRNA) ja PIWI-proteiineista riippuvaiset piRNA:t (PIWI-interaction RNA). Tutkituimpia näistä ovat siRNA ja miRNA, jotka säätelevät geeniekspressiota post-transkriptionaalisesti tunnistamalla homologisia sekvenssejä lähetti-RNA:sta. (Traber & Yu, 2023.)

1.4.1 siRNA

Lyhyet interferenssiä aiheuttavat RNA:t eli siRNA:t ovat kaksijuosteisia-RNA molekyylejä, joita erityisesti hyödynnetään RNAi-teknologiassa. Kuvassa 4 on esitetty yksinkertaistettuna siRNA-hiljennyksen periaate nisäkässoluissa. Pitkät kaksijuosteiset täydellisesti komplementaariset RNA-juosteet muokataan lyhyemmiksi, noin 21–23 nukleotidiä pitkiksi 3'-päästä ulkoneviksi siRNA-molekyyleiksi Dicer-RNAasi 3 -luokan endonukleaaseihin kuuluvalla entsyy-

millä. Valmis siRNA kiinnittyy tämän jälkeen argonaut 2 (AGO2) proteiiniin, joka on kiinnittynään RNA indusoimaan hiljennyskompleksiin eli RISC:iin (engl. RNA induced silencing complex). AGO2-RISC kompleksi tunnistaa antisense ja sense-juosteet, antisense-juoste jää kiinni kompleksiin ja sense-juoste vapautetaan tai pilkkotaan. Aktivoitunut AGO2-RISC-kompleksi etsii komplementaarisia alueita lähetti-RNA-molekyyleistä, ja jos komplementaarinen alue on tarpeeksi yhtenäinen, niin kohde-RNA leikataan AGO2-välitteisesti ja lähetti-RNA tuhoutuu. (de Fougères ym., 2007; Meister & Tuschl, 2004; Traber & Yu, 2023.)

AGO2-RISC-kompleksi voi tämän jälkeen etsiä uuden kohteen tuhottavaksi. Kohdelähetti-RNA:ta tunnistettaessa erityisen tärkeä on ohjain-RNA:n 5'-pään kahdeksan ensimmäisen nukleotidin komplementaarisuus kohteen kanssa, sillä mikäli komplementaarisuus ei ole täydellinen, translaatio voi estyä ilman lähetti-RNA:n tuhoutumista. (de Fougères ym., 2007; Traber & Yu, 2023.)



Kuva 4. siRNA-välitteinen geenihiljennys. Dicer pilkkoo kaksoisjuosteisen RNA:n 21-nt. pitkäksi molekyyliksi. AGO2-RISC-kompleksi kiinnittyy antisense-juosteeseen ja sense-juoste vapautetaan. Aktivoitunut AGO2-RISC-koneisto löytää antisense-juosteen välityksellä komplementaarisen alueen lähetti-RNA:sta. AGO2 pilkkoo kohde-RNA:n. (Muokattu de Fougères ym., 2007.)

1.4.2 miRNA

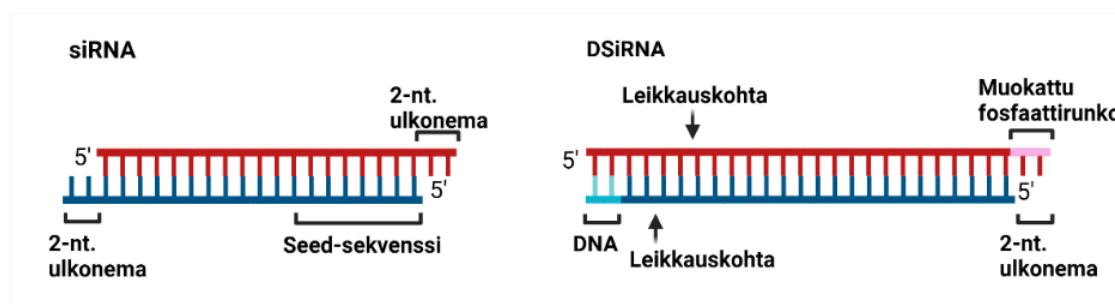
MikroRNA:t ovat luonnossa esiintyessä yleensä endogeenisiä ja ne transkriptoidaan genomista kuten muutkin geenit. Aitotumaisilla miRNA:t transkriptoidaan tumassa hiuspinnin muotoi-

siksi niin kutsutuiksi primary-miRNA-molekyyleiksi (pri-miRNA). Tumassa pri-miRNA:t pilkotaan pienemmiksi pre-miRNA-molekyyleiksi, jotka kuljetetaan solulimaan. Solulimassa pre-miRNA:t pilkotaan vielä lyhyemmiksi, jotta ne voi kiinnittyä RNA-hiljennyksestä vastaavaan RISC koneistoon. Hiljennyskoneisto tarttuu miRNA:n ohjaamana tyypillisesti lähetti-RNA:n 3'-UTR eli transloimattomaan osaan ja inhiboi näin geenin ilmentämistä. miRNA:n kiinnittyminen lähetti-RNA:han voi myös johtaa lähetti-RNA:n hajoamiseen. (Denli ym., 2004; Khvorova ym., 2003; Traber & Yu, 2023.)

1.4.3 DSiRNA

Dicer-substraatti siRNA (engl. Dicer-substrate small interfering RNA) on synteettisesti valmistettu kaksijuosteinen-RNA, joka on optimoitu dicer prosessointia varten. Kuvassa 5 on esitelty DSiRNA, joka on suunniteltu 27 nukleotidin pituiseksi niin, että se kiinnittyy diceriin vain yhdensuuntaisesti. Menetelmä varmistaa, että RISC-kompleksiin kiinnittyy antisense-juoste. 27 nukleotidiä pitkien DSiRNA:iden on todettu soveltuvan RNAi-teknologiaan huomattavasti paremmin kuin 21-nukleotidiä pitkät RNA-juosteet. (de Fougères ym., 2007; D.-H. Kim ym., 2005; Setten ym., 2019.)

DSiRNA-teknologiaa hyödyntävät kaupallisesti esimerkiksi OriGene (OriGene Technologies, 2023). Koska luonnolliset siRNA-molekyylit ovat alttiina solun endo- ja eksonukleaaseille, synteettiset siRNA-molekyylit suojataan fosfaattirungon fosforothioaatti-modifikaatiolla tai vaihtamalla osa RNA nukleotideista DNA:ksi (Setten ym., 2019).



Kuva 5. siRNA ja DSiRNA perusrakenne. siRNA-molekyyli on 21-nt. pitkä ja siinä on 2-nt. pitkät ulkonemat. DSiRNA:n sense-juoste on 27-nt. pitkä, synteettiseen molekyyliin on ulkonemaan osaan muokattu fosfaattirunkoa. Antisense-juosteen 3'-päässä on kaksi DNA-nukleotidiä estämässä eksonukleaasiaktiivisuutta. (Muokattu Setten ym., 2019.)

1.5 Tutkimuksen tavoite

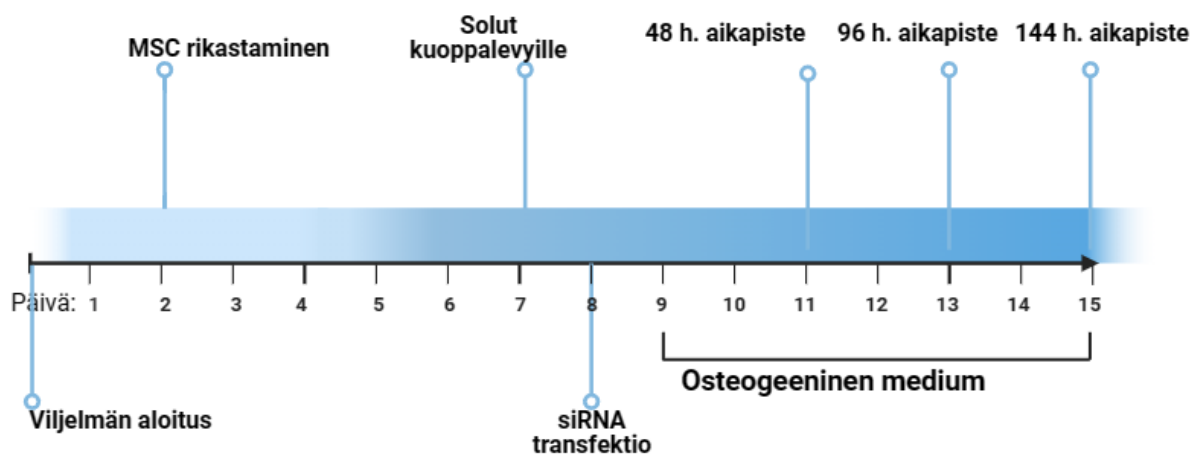
Työn tavoitteena on selvittää miten puutteellinen insuliinisolointi vaikuttaa luuytimen mesenkymaalisten stroomasolujen erilaistumiseen. Puutteellista insuliinisolointia mallinnetaan solutasolla hiljentämällä insuliinireseptorin ja insuliinista riippuvaisen GLUT4- kuljetusmolekyylin toiminta rotan luuytimestä eristetyissä mesenkymaalisisissa soluissa. Hiljentäminen tapahtuu transientisti siRNA-teknologiaa käyttämällä. Solujen erilaistumista, kasvua ja elinkykyä selvitetään geeni-ilmentymisen ja proteiinitasolla, entsyymiaktiivisuuksia mittaamalla sekä kuvantamisen keinoin.

Hypoteesina on, että insuliinivälitteisen signaloinnin estäminen muuttaa kantasolujen erilaistumista ja saattaa suosia solujen erilaistumista rasvasoluiksi luusolujen sijaan.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Työnkulku

Työnkulku soluviljelmän aloituksesta sen lopettamiseen on tiivistetty kuvaan 6. Soluviljelmän aloituksesta viljelmän lopetukseen menee 15 päivää. Luuytimen mesenkymaalaisia stroomasoluja kasvatetaan ja rikastetaan ensin 7 päivän ajan kasvatusmediumissa, minkä jälkeen GLUT4-glukoosinkuljettimen, insuliinireseptorin ja näiden toiminta yhdessä hiljennetään transientisti siRNA-tekniikalla. Hiljennyksen jälkeen solut erilaistetaan osteoblasteiksi osteogeenisellä kasvatusmediumilla. Solujen erilaistumista ja elinkykyä tutkitaan eri menetelmillä ja eri aikapisteissä.



Kuva 6. Työnkulku yksinkertaistettuna soluviljelmän aloituksesta sen lopetukseen. Viljelmä aloitetaan solujen eristämällä luuytimestä, ja mesenkymaalisten stroomasolujen (MSC) annetaan tarttua soluviljelypullon pohjaan kahden päivän ajan, jonka jälkeen MSC:t rikastetaan ja jatkokasvatetaan viisi päivää. Solut siirrostetaan kuoppalevyille, transfektoidaan siRNA:lla ja kasvatetaan enintään 18 tuntia ennen kuin soluille vaihdetaan osteogeeninen medium. Solujen erilaistumista, kasvua ja elinkykyä tutkitaan eri menetelmillä eri aikapisteissä.

2.2 Luuytimen mesenkymaaliset stroomasolut ja soluviljely

Primäärisolut eristettiin naaraspuolisten noin kuukauden ikäisten Sprague-Dawley rottien (*Rattus norvegicus*) pitkistä luista. Solueristys toistettiin kolme kertaa ja jokaisella kerralla solut eristettiin yhden rotan luista. Rotat lopetettiin hiilidioksidainnutuksella ja niskamurrolla, minkä

jälkeen rotat dissektoitiin mahdollisimman pian. Takaraajojen pitkät luut eli reisiluu (lat. femur) ja sääriluu (lat. tibia) irrotettiin kokonaisina. Luiden metafyyisit leikattiin pois ja jäljelle jääneet pitkän luun varret eli diafyyisit kastettiin 70 % etanoliin ja fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (engl. phosphate buffered saline, PBS) (Gibco). Diafyyisit laitettiin 1,5 ml Eppendorf-putkiin, joihin oli laitettu katkaistu pipetinkärki. Luuydin poistettiin diafyyysistä sentrifugoimalla putket 15 sekuntia, 300 g. Fuugauksessa luu jäi pipetinkärkeen ja luuydin sentrifugoitui putken pohjalle. Luista saadut solut yhdistettiin yhteen putkeen, sentrifugoitiin (8 minuuttia, 200 g) ja solumäärä laskettiin Burkerin-kammiolla. Solut jaettiin T75-soluviljelypulloihin (Thermo Scientific) niin, että kokonaissolumäärä pullossa oli 75–150 miljoonaa.

Mesenkymaalisten stroomasolujen, jotka ovat adherenteja soluja (Dominici ym., 2006), annettiin tarttua soluviljelypullon pohjaan soluviljelykaapissa (Panasonic) +37 °C lämpötilassa ja 5 % CO₂-pitoisuudessa kaksi päivää. Tämän jälkeen alustaan kiinnittymättömät solut pestiin pois PBS:llä ja medium vaihdettiin. Mesenkymaalisten stroomasolujen annettiin kasvaa viiden päivän ajan. Solut kasvatettiin ensimmäiset seitsemän päivää αMEM-mediumissa, johon oli lisätty inaktivoitu FBS (15 %), Hepes (10 mM), PenStrep-antibioottiseos (100 U/ml), GlutaMAX™ (2 mM), amphoteriisiini B (2,5 µg/ml) ja deksametasoni (10⁻⁸ M). Soluviljelymediumituotteet olivat Gibco™-tuotteita, paitsi deksametasoni oli Sigma-Aldrichin tuote.

Soluja kasvatettiin seitsemän päivän ajan noin 80 % tiheyteen, minkä jälkeen ne irrotettiin trypsiini-EDTA 0,05 % (Gibco) käsittelyllä. Solut laskettiin Burkerin kammiolla ja jaettiin kuoppalevyille kokeita varten. RNA:n eristystä varten solut jaettiin 6-kuoppalevyille (CytoOne®) niin, että yhdessä kaivossa oli 150 000 tai 200 000 solua 1,5 ml:ssa kasvatusmediumia. Solujen kasvu-, erilaistumis- ja muita tutkimuksia varten solut jaettiin 48-kuoppalevyille (CytoOne®) niin, että yhdessä kaivossa oli 30 000–60000 solua 400 µl:ssa kasvatusmediumia. Lisäksi transfektiokontrolliksi jaettiin 150 000 tai 200 000 solua 40 mm petrialjalle (Orange Scientific). Edellä mainituissa kasvatuksissa käytettiin niin sanottua 10 % αMEM-mediumia, johon oli lisätty inaktivoitu FBS (10 %), Hepes (10 mM), PenStrep-antibioottiseos (100 U/ml) ja GlutaMAX™-seos (2 mM). Soluille vaihdettiin medium kahden päivän välein, mutta poikkeuksena oli solujen erilaistumisen ja kasvun seurantaan (IncuCyte-kuvaus) laitetut 48-kuoppalevyt, joille ei vaihdettu mediumia, vaan solut kasvatettiin alusta saakka 800 µl/kaivo kasvatusmediumia.

2.3 Transfektio siRNA-molekyyleillä

Transfektio ja *Slc2a4*:n (GLUT4) ja *Insr*:n (insuliinireseptori) geenihiljennys toistettiin kolmelle erilliselle soluviljelmälle. *Slc2a4*:n (GLUT4) ja *Insr*:n yhdistelmähiljennys toistettiin kaksi kertaa. siRNA-hiljennys suoritettiin 27-nukleotidiä pitkillä siRNA-molekyyleillä (OriGene Technologies). Taulukossa 1 on esitetty DsiRNA:iden sekvenssit ja kauppanimet. Rotan (*Rattus norvegicus*) GLUT4 ja insuliinireseptori hiljennettiin kolmella eri lähetti-RNA alueelle kohdennetulla siRNA:lla. Näiden lisäksi solut transfektoitiin negatiivisella kontrolli-RNA:lla, jolla ei ole sitoutumiskohtaa rotan genomissa (ns. Scramble, SR30004) ja punaisella fluorokromilla konjugoidulla RNA:lla (SR30002), joka toimi transfektiokontrollina.

Taulukko 1. *Slc2a4*- ja *Insr*-geenien sekä kontrolli-siRNA-molekyyliden sekvenssit. Kohdegeenien hiljentämiseen on kolme eri kohdealuetta A, B ja C.

siRNA:n kohdegeeni	siRNA:n nimi ja sekvenssi (27 mer)
<i>Slc2a4</i>	SR515187A – AUUGCUUCUGGCUAUCACAGUACTC
	SR515187B – GUGAUUGAACAGAGCUACAAUGCAA
	SR515187C – CAGCUCUAGAAUACUUCUGUUCCT
<i>Insr</i>	SR511738A – GGAAGGAUGAACCUGUUUUUACAGT
	SR511738B – AGUGAUUAUCAUCAUGUGCAAACAG
	SR511738C – GGCAAUGCCAAGGAUAUCAUAAGG

Solut transfektoitiin joko yksinään Glut4 tai *Insr* siRNA:lla sekä molemmilla samanaikaisesti siTran 2.0 siRNA transfection reagent –kitillä (OriGene) valmistajan ohjetta mukailten. Lisäksi solut transfektoitiin Scramble siRNA:lla tai punaisella fluorokromilla konjugoidulla RNA:lla (transfektiokontrolli). siRNA hiljennyksissä käytettiin aina neljää rinnakkaista näytettä (N = 4), mutta transfektiokontrollilla transfektoitiin vain yksi 40 mm malja.

Hiljennystä varten solut oli jaettu levyille edellisenä päivänä. Viimeistään puoli tuntia ennen transfektioita soluille vaihdettiin medium niin, että 6-kuoppalevyillä oli 10 % kasvatusmediumia 900 µl/kaivo ja 48-levyillä 200 µl/kaivo. Solut transfektoitiin tietyllä siRNA-konstruktilla niin, että seoksen lopullinen siRNA pitoisuus oli aina 10 nM eli yhdistelmähiljennettyihin tuli 5 nM molempia siRNA:ita. Transfektioseos sisälsi konstruktien lisäksi siTRAN 2.0-reagenssia (6-kuoppalevyille 2,4 µl/kaivo ja 48-levyille 0,5 µl/kaivo) sekä 1x Transfection buffer

–liuosta siten, että lopputilavuus oli 100 µl/6-kuoppalevyn kaivo, 100 µl/40 mm petriمالja ja 30 µl/48-kuoppalevyn kaivo. Valmista siRNA-seosta inkuboitiin 15 minuuttia (RT), minkä jälkeen se lisättiin kaivoille tipoittain. Seoksen annettiin vaikuttaa enimmillään 18 tuntia, jonka jälkeen medium vaihdettiin osteogeeniseen mediumiin. Osteogeeninen medium sisälsi 10 %:sta kasvatusmediumia, johon oli lisätty 70 µg/ml askorbiinihappoa (Sigma) ja 10 mM Natrium-β-glyserofosfaattia (Fluka BioChemika).

Transfektion onnistuminen varmistettiin kuvaamalla transfektiokontrollinäyte eli 40 mm petriمالjalla kasvaneet solut 18 tunnin kuluttua transfektiosta EVOS M5000 (Thermo Scientific) -kuvauslaitteella (viritysaallonpituus 531 ja emissioaallonpituus 593 nm).

Tulososiossa siGlut4 tarkoittaa GLUT4-proteiinia koodaavan *Slc2a4*-geenin siRNA-hiljennystä. Insuliinireseptori-hiljennetyistä soluista käytetään jatkossa siInsr-termiä ja edellisten yhdistelmällä hiljennetyistä soluista käytetään termiä siGlut4+siInsr. Negatiivisella kontrolli-RNA:lla transfektoiduista soluista käytetään termiä Scramble. Tuloksissa ilmoitetut aikapisteet on laskettu aina transfektiosta, joten todellisuudessa solut ovat olleet transfektiomediumissa ilmoitetun aikapisteen ajan lisäksi noin 18 tuntia.

2.4 RNA:n eristys ja RT-PCR

2.4.1 RNA:n eristys

Transfektoiduista soluista eritettiin RNA NucleoSpin RNA Plus Mini Kit -eristyskitillä (Macherey-Nagel) valmistajan protokollaa mukaillen. Transfektion lopetuksesta laskettuna solut kerättiin 48 tunnin, 96 tunnin ja 144 tunnin aikapisteissä. Kuoppalevyiltä poistettiin medium ja solut hajotettiin kitin Lysis Buffer -liuokseen (350 µl/kaivo) ja solut kerättiin kaivon pohjasta solulastalla (cell scraper). Solut pipetoitiin 1,5 ml Eppendorf-putkeen ja säilöttiin välittömästi pakkaseen (-80 °C).

RNA-eristystä varten näytteet sulatettiin jäällä ennen kuin näytteistä poistettiin genominen DNA NucleoSpin gDNA removal –pylväällä. Näytteet pipetoitiin pylvääseen ja ne sentrifugoitiin 30 s, 11000 g. Pylväästä läpi menneeseen nesteeseen lisättiin 100 µl Binding Solution -liuosta ja näytteseos siirrettiin NucleoSpin RNA Plus –pylvääseen ja RNA eritettiin valmistajan

ohjeen mukaan. RNA-konsentraatiot mitattiin NanoDrop One -spektrofotometrillä (Thermo Scientific, ohjelmistoversio 1.4.2). RNA-näytteet säilytettiin pakastimessa -80 °C.

2.4.2 RNA-näytteiden käänteistranskriptio cDNA:ksi

RNA-näytteiden käänteistranskriptio komplementaariseksi DNA:ksi eli cDNA:ksi (engl. complementary deoxyribonucleic acid) tehtiin SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Meridian Bioscience, Ref. BIO-65054, Yhdysvallat) -kitillä valmistajan ohjeen mukaan. cDNA-synteesiin käytettiin 500 ng tai 1000 ng RNA:ta riippuen siitä, mikä oli näytteiden alhaisin RNA pitoisuus. RNA-näytteet sulatettiin jäällä ja 0,2 ml putkiin pipetoitiin haluttu määrä RNA:ta ja lopputilavuus täytettiin nukleasivapaalla vedellä 15 µl:ksi. Putkeen lisättiin 4 µl 5XBuffer puskuria ja 1 µl Reverse Transcriptase -entsyymiä. cDNA-synteesi tehtiin PTC-200 (MJ. Research) PCR-laitteessa (10 min 25 °C, jonka jälkeen 15 min 42 °C, 5 min 85 °C ja lopuksi säilytyslämpötilassa 8 °C). Synteesin jälkeen cDNA:ista tehtiin joko 1:10 tai 1:5 käyttölaimekset nukleasivapaaseen veteen. RNA ja cDNA säilytettiin -80 °C:ssa ja cDNA-käyttölaimekset -20 °C:ssa.

2.5 Kvantitatiivinen PCR

Geenihiljennyksen tehoa ja hiljennysten vaikutusta solujen geeniekspressioon tutkittiin SYBR GREEN qPCR:llä (Higuchi ym., 1992; Holland ym., 1991). Geenihiljennyksen tehokkuutta selvitettiin tutkimalla hiljennettyjen geenien eli *Slc2a4* (GLUT4) ja *Insr* (insuliinireseptori) suhteellisia ekspressiotasoja. Geenihiljennyksen toimivuus testattiin kaikista kolmesta viljelmästä. Osteogeenisinä markkereina käytettiin osteokalsiinia koodaavaa *Bglap*-geeniä ja alkaliseen fosfataasiin liittyvää proteiinia koodaava *Alpl*-geeniä. Adipogeenisinä markkereina käytettiin adiponektiiniä koodaavaa *Adipoq*-geeniä, adiposyyteistä löytyvää rasvahappojen kuljetusproteiinia koodaavaa *Fabp4*-geeniä, adipogeenisen solulinjan transkriptiofaktorin *Pparg*-geeniä ja *CD36*-geeniä, joka koodaa rasvasolujen solukalvosta löytyvää ja rasvahappojen sisäänottoon osallistuvaa CD36-proteiinia. Adipogeeniset ja osteogeeniset markerianalyysit toistettiin pääosin kaksi tai kolme kertaa.

Taulukkoon 2 on koottu käytetyt alukkeet ja koejärjestelyssä niistä käytetyt nimet. Lähetti-RNA tasojen normalisoinnissa niin sanottuna housekeeping-geeninä käytettiin *PPIB*-geeniä (peptidylprolyl isomerase B), joka koodaa syklofiliini B-proteiinia. Pachot ym. (2004) ovat tutkineet *PPIB* soveltuvuutta kontrolligeeniksi ja esimerkiksi Kähkönen ym. (2018) ovat hyödyntäneet *PPIB* B-geeniä mesenkymaalisiin stroomasoluihin liittyvässä tutkimuksessaan.

Taulukko 2. qPCR:ssä käytetyt alukkeet ja niiden sitoutumislämpötila (annealing), forward- ja reverse-sekvenssit sekä alukkeen valmistaja.

Geeni ja sen koodaama proteiini:	Annealing-lämpötila	Forward ja reverse sekvenssit (5'-3')	Valmistaja:
<i>Adipoq</i> adiponektiini	58 °C	F = CCTGGTCACAATGGGATACCG R = CTTAGGACCAAGAACACCTGCG	IDT
<i>Alpl</i> alkalinen fosfataasi	60 °C	F = TGCAGGATCGGAACGTCAAT R = GGGTCTTTCTCTTTCTCTGGCA	IDT
<i>Bglap</i> osteokalsiini	61 °C	F = TGAGTCTGACAAAGCCTTCATGT R = GAAGCCAATGTGGTCCGCTA	Oligomer
<i>CD36</i> glykoproteiini	60 °C	F = GGCAAGTGCAAAGAAGGAAAGC R = GGCTTGACCAGTATGTTGACCT	IDT
<i>Fabp4</i> rasvahappoihin kiinnittyvä proteiini	58 °C	F = CATAACCCTGGATGGTGGGG R = GCCTTTCATGACACATTCCACC	IDT
<i>Insr</i> insuliinireseptori	58 °C	F = GGACCAGGCATCCTGTGAAA R = ATCCTGCCCGTCAAACCTCTG	Oligomer
<i>Pparg</i> PPAR-gamma	58 °C	F = AACTCTGGGAGATCCTCCTGT R = CTGTGTCAACCATGGTAATTTCTTG	IDT
<i>Ppib</i> syklofiliini B	60 °C	F = ACCTGTAGGACGAGTGACCT R = GCTCTTTCCTCCTGTGCCAT	IDT
<i>Slc2a1</i> GLUT1	58 °C	F = GCCGCTTCATCATTGGAGTG R = GAGTCTAAGCCGAACACCTGG	Oligomer
<i>Slc2a3</i> GLUT3	58 °C	F = GATCCTTGTGGCTCAGGTCT R = ATCTCCGTCGCTTGGTCTTC	Oligomer
<i>Slc2a4</i> GLUT4	58 °C	F = CGCGGCCTCCTATGAGATAC R = ACTCAAACCCAACACCTGG	Oligomer

Templaattina käytettiin cDNA-laimennoksia ja jokaisesta tehtiin kaksi rinnakkaista näytettä. PCR-ajoon lisättiin lisäksi aina negatiivinen kontrolli (engl. No Template Control, NTC). Reaktiovolyymi oli 10 µl, josta 5 µl oli 2x DyNAmo Flash SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Ref. F415) -seosta, 0,6 µl nukleasivapaata vettä, 0,2 µl forward -aluketta (25 µM),

0,2 µl reverse-aluketta (25 µM) ja 4 µl laimennettua näytettä (20 ng cDNA) tai nukleasivapaata vettä (NTC). Taulukossa 3 on esitetty käytetty PCR-ohjelma. Ajon päätteeksi tehtiin aina sulamiskäyrä (engl. melting curve), jolla varmistettiin monistettavien kohteiden spesifisyys.

Taulukko 3: Käytetty PCR-ohjelma. Sitoutumislämpötila (annealing) määräytyy taulukon 2 mukaisesti.

Toistomäärä	Vaihe	Asteet	Aika
1X	Alkudenaturaatio	95 °C	15 min.
35X	Denaturaatio	94 °C	10 s
	Annealing	Taulukon 2 mukaisesti	30 s
	Pidentyminen	72 °C	20 s
Sulamiskäyrä (Melt curve): 95 °C - 65 °C 0,5 s/ °C			

qPCR analyysit tehtiin CFX96 Opus RealTime system C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) laitteella ja Bio-Rad CFX Maestro 2.3 (Bio-Rad Laboratories, versio 5.3.022.1030) ohjelmalla. Raakadatan kynns- eli Ct-arvoista (engl. cycle treshhold) laskettiin rinnakkaisten näytteiden keskiarvo, keskihajonta ja variaatioprosentti. Tulokset analysoitiin $\Delta\Delta\text{CT}$ -metodilla (Livak & Schmittgen, 2001), ensin laskettiin ΔCt -arvo vähentämällä näytekohtaisesti *Ppib*-geenin kynnsarvo tutkittavan geenin kynnsarvosta. $\Delta\Delta\text{CT}$ -arvo saadaan vähentämällä näytekohtaiset ΔCT -arvot Scramble-näytteiden ΔCT -keskiarvosta. Saadut tulokset korotettiin kahden potenssiin ja näitä tuloksia verrattiin keskenään.

Käytetyistä alukkeista ainoastaan CD36-alukkeiden spesifisyyttä ja tehokkuutta ei ollut testattu aiemmissa tutkimuksissa. Aluksi selvitettiin National Center for Biotechnology Information ja The Human Protein Atlas Project -tietokannoista, missä kudoksissa CD36 ilmentyy. Kudosekspression perusteella valittiin positiiviset ja negatiiviset näytekontrollit kaupallisista kudosspesifisistä RNA-näytteistä (Zyagen). CD36 alukkeiden sitoutumislämpötila määritettiin BLAST alukkeiden suunnitteluohjelmalla (National Library of Medicine, 2023). Alukkeiden spesifisyys ja tehokkuus testattiin qPCR:llä kuten edellä kerrottu. Oikean kokoisen tuotteen varmistamiseksi qPCR-näyte ajettiin 2,5 % agarosigeelille TAE-puskurissa (tris-asetatti-EDTA) 100V / 100 mA -teholla 45 minuuttia. Molekyylipainomarkkerina käytettiin 50 bp Dna ladder (New England Biolabs Ref. N3236, Yhdysvallat) ja väriaineena Midori Green-väriaine

(Nippon Genetics Cat. MG06). Geeli kuvattiin FastGene FAS-Digi Pro imaging system -kuvauslaitteella (Nippon Genetics Europe).

Kun oltiin varmoja alukkeiden spesifisyydestä eli alukkeet monistivat vain yhtä, oikeankokoista tuotetta, alukkeiden optimaalinen sitoutumislämpötila selvitettiin gradientti-PCR:llä. CFX Maestro-PCR-laite mahdollistaa kahdeksan eri lämpötilan käytön saman ohjelman aikana, joten lämpötilaskaalaksi määriteltiin 54.5 °C – 62.5 °C. Optimaaliseksi sitoutumislämpötilaksi valittiin lämpötila, jossa oli alhaisin kynnysarvo ja jossa sulamiskäyrässä näkyi vain yksi tuote. Tämän jälkeen testattiin alukkeiden tehokkuus qPCR:llä käyttämällä templaattina 1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 ja 1:3125-laimennoksia. PCR tehtiin kuten edellä ja saaduista kynnysarvoista laskettiin regressiosuora ja alukkeiden todellinen tehokkuus alla olevalla kaavalla.

$$\text{Tehokkuus \%} = \left(\left(10^{-\frac{1}{\text{kulmakertoimen}}} \right) - 1 \right) * 100$$

2.6 Solujen erilaistumista, kasvua ja elinkykyä tutkivat menetelmät

2.6.1 Solujen erilaistumisen ja kasvun seuranta IncuCyte-kuvauksella

IncuCyte kuvaus suoritettiin kolmelle erilliselle viljelmälle. Transfektion jälkeen 48-kuoppalevyille (N = 6) pipetoitiin 800 µl osteogeenistä mediumia ja levy siirrettiin IncuCyte® Live-Cell Analysis System S3 (Essen BioScience) -kuvauslaitteeseen, joka oli solukasvatuskaapin sisällä (+37 °C, 5 % CO₂). Kuvauslaite otti aina yhdestä kaivosta 9 kuvaa kahden tunnin välein 10-kertaisella objektiivilla 5–6 päivän ajan. Kvanttaminen tapahtui Incucyte® Base Analysis Software (Sartorius) hallintaohjelmalla. Kuvausdatan perusteella analyysiohjelma määrittää solutiheyden eli konfluenssin ja laskee konfluenssin muutoksen eri aikavälein otetuista kuvista.

2.6.2 Hiljennysten vaikutus solujen elinkykyyn

Solujen elinkyvystä eli viabiliteetista kertova testi suoritettiin viisi kertaa. Viabiliteetin määrittämiseen käytettiin alamarBlue™ HS Cell Viability Reagent (Invitrogen™ Ref. A50100) -kittiä.

Reagenssin toiminta perustuu heikosti fluoresoivan resazurinin pelkistymiseen elävissä soluissa voimakkaasti fluoresoivaksi resorufiiniksi (Invitrogen, 2019).

Solujen annettiin kasvaa 48-levyillä (N = 4–6) 5–6 päivää transfektiosta., minkä jälkeen soluilta poistettiin medium ja kaivoihin pipetoitiin 230 µl 10 % kasvatusmediumia (207 µl) ja alamar-Blue™ -reagenssia (23 µl) sisältävää seosta. Soluja inkuboitiin kasvatuskaapissa (+37 °C, 5 % CO₂) 50 minuuttia. 48-levyn jokaisesta kaivosta pipetoitiin 96-kuoppalevyille rinnakkaiset näytteet sekä kahteen kaivoon pelkkää kasvatusmedium ja alamarBlue™ -seosta. Levyiltä mitattiin fluoresenssi EnSight Plate Reader (Perkin Elmer, Kaleido hallintaohjelma ohjelmistoversio: 3.0.3) lukijalla. Viritysaallonpituutena käytettiin 560 nm ja emissioaallonpituutena 590 nm.

48-levyltä imettiin jäljelle jäänyt liuos pois ja kuoppien pohjaan kiinnittyneet solut pestiin kaksi kertaa PBS:llä, minkä jälkeen solut fiksoitiin huoneenlämmössä 4 %:lla paraformaldehydillä (engl. Paraformaldehyde, PFA) myöhempiä käsittelyjä varten (kts. 2.6.4 ja 2.6.5). Säilytystä varten solukaivot täytettiin PBS:llä ja levyt säilytettiin jääkaapissa +8 °C:ssa.

2.6.3 Elävien solujen kvanttoiminen levyiltä kalseiini-Am menetelmällä

Elävien solujen määrää määritettiin LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells (Invitrogen Ref. L3224) kitin Calcein AM -reagenssilla. Reagenssin toiminta perustuu elävien solujen esteraaseihin, jotka entsymaattisesti muuttavat heikosti fluoresoivan kalseiini Am:n voimakkaasti vihreällä aallonpituudella fluoresoivaksi kalseiiniksi (Molecular Probes, 2005).

Värjäys tehtiin soluille, jotka olivat kasvaneet 48-kuoppalevyillä transfektion lopetuksesta lasikien kuusi päivää. Soluilla poistettiin medium, solut pestiin kaksi kertaa PBS:llä ja kaivoihin pipetoitiin 150 µl 10 % kasvatusmediumia ja 1 µM Calcein AM -reagenssia sisältävää seosta. Levy siirrettiin IncuCyte® Live-Cell Analysis System -kuvaslaitteeseen (Essence bioscience), joka on soluviljelykaapissa (+37 °C, 5 % CO₂). 45 minuutin inkubaation jälkeen soluista otettiin 9 kuvaa/kaivo 470/525 nm aallonpituuksilla. Testi suoritettiin yhden kerran.

2.6.4 Neutraalien rasvahappojen värjääminen

Mahdollisten adiposyyttien havaitsemiseksi soluista värjättiin neutraalit rasvahapot. Värjäys toistettiin kaksi kertaa. Värjäykseen käytettiin 48-levyllä olevia fiksoituja soluja (N = 3–4), solut olivat olleen 5–6 päivää kasvamassa transfektion lopetuksen jälkeen. Värjäykseen käytettiin BODIPY™ 493/503 (Thermo Fisher Scientific Ref. D3922) -reagenssia, joka hydrofobisena sitoutuu solunsisäisiin neutraaleihin rasvahappoihin. Viritysaallonpituus BODIPY -reagenssille on 500 nm ja emissiopiikki on 509 nm. (Molecular Probes, 2003.)

Toisena väriaineena käytettiin HOECHST 33258 (Sigma, B2883-100MG) -väriainetta, joka tarttuu DNA:han värjäten kromosomit ja näin tehden tuman näkyväksi. Viritysaallonpituuden maksimi on HOECHST- reagenssin havaitsemiseksi 346 nm ja emissioaallonpituuden maksimi on 460 nm. (Sigma-Aldrich, 2023.)

Väriaineseos valmisteltiin niin, että kaivoa kohden tuli kokonaistilavuudeksi 200 µl, jossa BODIPY konsentraatio on 1.9 µM ja HOECHST pitoisuus on 5 µg/ml. Varsinaisten näytekaivojen lisäksi värjättiin tyhjä kaivo taustan määrittämiseksi. Fiksoidut solut oli säilytetty PBS:ssä, joka imettiin kaivoista pois ja tilalle pipetoitiin väriaineseosta 200 µl/ kaivo. Levyä inkuboitiin valolta suojattuna huoneenlämmössä 30 minuuttia, minkä jälkeen soluilta imettiin väriaineseos pois ja ne pestiin kaksi kertaa PBS:llä. Värjätyt solut kuvattiin EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific) -kuvauslaitteella. Jokaisesta kaivosta otettiin useampi faasikontrastikuva 10-kertaisella suurennoksella 470/525 nm ja 357/447 nm aallonpituuksilla. Kuvat muokattiin ImageJ (National Institutes of Health, ohjelmaversio: 1.54d) -ohjelmalla. Kuvista poistettiin ensin tausta ImageJ:n taustanpoisto toiminnolla (engl. subtract background), minkä jälkeen vihreän värin kanavalla (470/525 nm) ja sinisen värin kanavalla (357/447 nm) otetut kuvat yhdistettiin (merge channels). Kuvat tallennettiin (.tiff) -muodossa jäljitettävyyden varmistamiseksi.

2.6.5 Alkalinen fosfataasi

Luustossa alkalinen fosfataasi eli ALP on osteoblastien solukalvoon kiinnittynyt entsyymi, joka hydrolysoi fosforihapon monoestereitä emäksisissä pH-olosuhteissa (Kaplan, 1972). ALP estää mineralisaatiota inhiboivan pyrofosfaatin toimintaa hajottamalla pyrofosfaattia entsyymaattisesti

(Gade ym., 2011). Testasimme solujen ALP aktiivisuutta kvantitatiivisella PCR:llä (kappale 2.5), värjämällä soluja ja kvantitoimalla ALP:n määrää solulysaateista.

2.6.6 ALP-värjäys

ALP-värjäys suoritettiin kolme kertaa PFA-fiksoiduille 48-levyllä oleville soluille (N = 3–6), jotka olivat kasvaneet kuusi päivää transfektion lopetuksesta laskien. Värjäys suoritettiin Alkaline Phosphatase Leukocyte Kit 86-R (Sigma-Aldrich Ref. 86R-IKT) -reagenssikitillä.

Värjäystä varten valmisteltiin ensin 1,5 ml Eppendorf-putkeen reagenssisekoite, johon tuli 100 µl FRV-alkaline-liuosta ja 100 µl Na-nitrite-liuosta. Putkea vorteksoitiin 30 s ja inkuboitiin 2 minuuttia huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen reagenssisekoite pipetoitiin putkeen, jossa oli 4,5 ml esilämmitettyä (+37 °C) H₂O:ta. Putkeen pipetoitiin vielä 100 µl Naphtol AS-BI Alkalinen -liuosta. Fiksoiduilta soluilta imettiin PBS pois ja tilalle pipetoitiin 200 µl edellä valmistettua reagenssiseosta. Levyä inkuboitiin 15 minuuttia foliolla peitettynä (RT). Tämän jälkeen reagenssiseos imettiin pois ja solut pestiin PBS:llä kaksi kertaa. PBS imettiin pois ja levyn annettiin kuivaa vetokaapissa yön yli. Levy kuvattiin Scanjet G4040 -skannerilla (Hewlett-Packard), sekä Eclipse TS100 -inversiomikroskoopilla (Nikon), johon on liitetty DS-Fi2-kuvauslinssi ja DS-L3-kuvauslaite (Nikon).

2.6.7 ALP-aktiivisuuden määrittäminen solulysaateista

Testiin käytettiin 48-kuoppalevyä (N = 4), joka oli transfektion lopetuksesta lähtien ollut kuusi päivää osteogeenisessä mediumissa. Soluista imettiin pois medium ja tilalle pipetoitiin 100 µl/kaivo lyysispuskuria (50 mM Tris-HCL, 0.1 % Triton X-100, 0.9 % NaCl, pH 7.6). Solut sulatettiin ja pakastettiin (-80 °C) kolme kertaa, jotta solut irtoavat ja hajoavat lyysispuskuriin. Viimeisen sulatuksen jälkeen solut sekoitettiin pipetillä, jotta seos olisi mahdollisimman homogeeninen. Jokaisesta solulysaatista pipetoitiin 10 µl kahteen 96-kuoppalevyn kaivon. Lysaattien päälle pipetoitiin 100 µl reaktioseosta, joka sisälsi 15 µl 0.1 M PNPP (Sigma-Aldrich) -reagenssia ja 85 µl puskuria (0.1 M Tris, 1 mM MgCl₂, pH 10). Lisäksi tehtiin taustan poistamiseksi taustanäytteet pelkästä reaktioseoksesta. Näytteitä inkuboitiin pimeässä 40 mi-

nuuttia, minkä jälkeen reaktio pysäytettiin pipetoimalla 100 µl/kaivo 1M NaOH:ia. Levyltä mitattiin absorbanssi Ensight Plate reader (Perkin Elmer) -lukijalla päätepistemittauksena 405 nm aallonpituudella.

Solulysaattien proteiinipitoisuus mitattiin Bradford-testillä. Proteiinimäärittystä varten valmistettiin naudan seerumista kerätystä albumiinista (engl. Bovine serum albumin, BSA) laimennossarja (2,0 mg/ml, 1,0 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,0125 mg/ml ja 0,0625 mg/ml). 96-kuoppalevyille (Greiner Bio-One) pipetoitiin ensin rinnakkaiset kaivot sekä standardeista että solulysaateista (10 µl/kaivo). Näytteiden päälle pipetoitiin 200 µl liuosta, joka sisälsi 40 µl Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Ref. 500-0006) -reagenssia ja 160 µl H₂O. Lisäksi tehtiin taustanäyte pelkästä reaktioseoksesta. Levyltä mitattiin absorbanssi Ensight Plate Reader (Perkin Elmer) lukijalla 595 nm-aallonpituudella 5 minuutin kuluttua värin lisäämisestä. Laimennossarjasta määritettiin regressiosuora, jonka perusteella laskettiin näytteiden proteiinkonsentraatiot. Lopuksi ALP-tulokset suhteutettiin proteiinkonsentraatioihin, jolloin saatiin AU eli absorbanssiyksikköä (engl. absorbance units) proteiinipitoisuudessa (mg/ml). Testi tehtiin kerran.

2.7 Tilastolliset menetelmät

Kuvaajat ja tilastolliset analyysit tehtiin GraphPad Prism (GraphPad Software version 9.0) analysoivalla ohjelmalla, jollei muuta mainita. Tutkimusten toistomäärät on kerrottu materiaalit ja menetelmät osiossa. Tuloksissa pylväsdiagrammi osoittaa keskiarvoa, yksittäiset tulokset ovat nähtävissä yksittäisinä pisteinä ja keskihajonta on virhepalkkina. Tuloksiin on valittu esitettäväksi yksittäiset edustavat tulokset ja kuvat testeittäin.

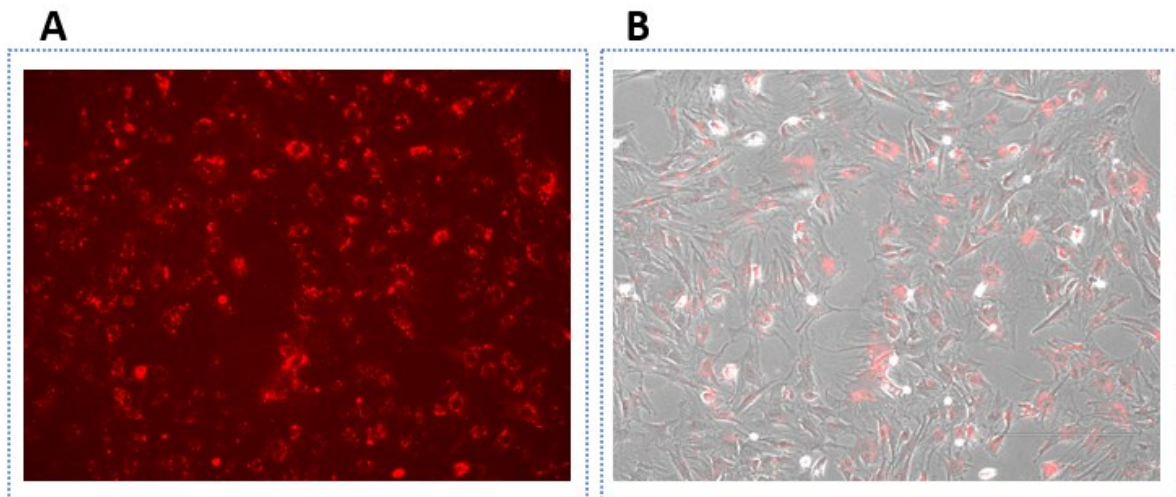
Solujen kasvua kuvaavista Incucyte-tuloksista tutkittiin ensin ovatko ne normaalisti jakautuneita Shapiro-Wilks-testillä (normaalisti jakautunut, jos $P < 0.05$). Tämän jälkeen laskettiin kuvaajien pinta-alat (engl. Area under the curve), joista saatujen arvojen merkitysvyyttä tutkittiin yksisuuntaisella Studentin T-testillä. Kvantitatiivisen PCR:n, viabiliteetti-testin ja Alp-aktiivisuustestin tuloksista määritettiin P-arvot suhteessa käsittelykontrolliin (Scramble) Studentin T-testillä.

Tilastollisen merkitsevyyden rajana pidettiin p-arvoa 0.05. Tilastolliset merkitsevyydet on merkitty kuvaajiin käyttämällä seuraavia raja-arvoja: $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***) ja $P < 0.0001$ (****).

3 TULOKSET

3.1 Mesenkymaalisten stroomasolujen transfektio

Solujen eristäminen, soluviljely ja geenihiljennys toistettiin kolme erillistä kertaa yhtenevin lopputuloksin. Mesenkymaalisten stroomasolujen transfektioiden onnistuminen varmistettiin fluoresoivalla transfektiokontrollilla. Transfektio siTRans-reagenssilla osoittautui toimivaksi metodiksi mesenkymaalisten stroomasolujen transfektoimiseen, sillä transfektion lopetuksen jälkeen soluissa havaittiin DsRed-proteiinin ilmentyminen solujen sytoplasmassa (kuva 7).



Kuva 7. Mesenkymaalisten stroomasolujen transfektio kontrolli-RNA:lla. DsRed-proteiinin ilmentyminen havaitaan punaisena värinä solujen sytoplasmassa. Kuvat on otettu: EVOS mikroskoopilla (10x objektiivi). (A) Kuva on otettu punaisen fluorokromin havaitsemiseen tarkoitetulla filterillä ja (B) on yhdistelmäkuva faasikontrastikuvan kanssa. Fluoresoivat siRNA-molekyylit näkyvät punaisena solujen sytoplasmassa.

3.2 Kvantitatiivinen-PCR

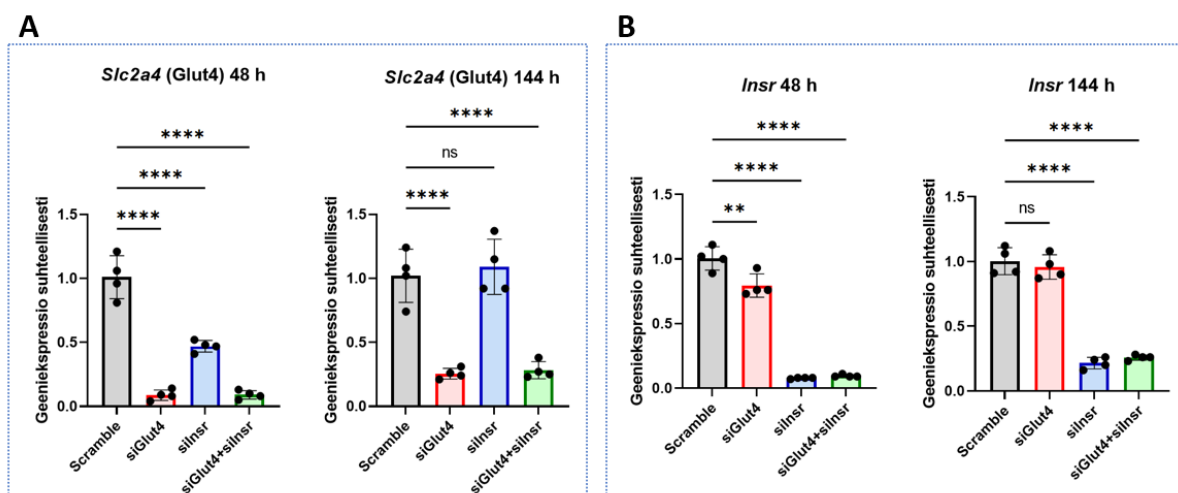
3.2.1 siRNA-hiljennystehokkuus

siRNA-hiljennys laski hiljennettävien geenien ilmentymistä tehokkaasti. Geenihiljennyksen tehokkuutta tutkittiin qPCR-menetelmällä määrittämällä hiljennetyistä soluista *Slc2a4* (GLUT4) ja *Insr* (insuliinireseptori)-tasoja. Kuten kuvasta 8 havaitaan valittu siRNA-pitoisuus (10 nM)

osoittautui tehokkaaksi, sillä lähetti-RNA-tasolla hiljennettyjen geenien ilmentyminen oli suhteessa kontrolliin kaikissa soluviljelmissä alentunut 48 tuntia transfektion lopetuksesta laskien yli 90 %. Hiljennysteho pysyi kuuden päivän ajanjaksolla yli 70 %:ssa.

siGlut4-soluissa (GLUT4 hiljennetty) *Slc2a4* ekspressio oli käsittelykontrolliin (Scramble) verrattuna keskimääräisesti 0.08 kertainen ($P < 0.0001$) ja 144 tuntia transfektiosta 0.25 kertainen ($P < 0.0001$) (kuva 8A). Vastaava hiljennystehokkuus havaittiin myös yhdistelmähiljennetyissä siGlut4+siInsr soluista (48 h; 0.09 kertainen, $P < 0.0001$ ja 144 h; 0.28 kertainen, $P < 0.0001$). Insuliinireseptorin hiljennyksen seurauksena myös GLUT4-glukoosinkuljettimen ilmentyminen vähentyi lyhyellä aikavälillä, sillä siInsr-soluissa (Insr hiljennetty) 48 tunnin aikapisteessä havaittiin *Slc2a4* ilmentymisen vähentyneen merkittävästi Scrambleen verrattuna (0.47 kertainen, $P < 0.0001$) (kuva 8A).

siInsr-soluissa 48 tunnin aikapisteessä *Insr* ekspressio oli 0.08 kertainen ($P < 0.0001$) Scrambleen suhteutettuna ja 144 tunnin aikapisteessä 0.21 kertainen ($P < 0.0001$) (kuva 8B). Vastaava hiljennystehokkuus havaittiin myös yhdistelmähiljennetyissä siGlut4+siInsr-soluissa (48 h; 0.01 kertainen, $P < 0.0001$ ja 144 h; 0.26 kertainen, $P < 0.0001$). GLUT4:n hiljentäminen vaikutti myös lyhytaikaisesti insuliinireseptorin ilmentymiseen, sillä siGlut4-soluissa *Insr* ilmentyminen oli laskenut 48 tunnin aikapisteessä (0.8 kertainen Scrambleen nähden, $P = 0.0016$) (kuva 8B).

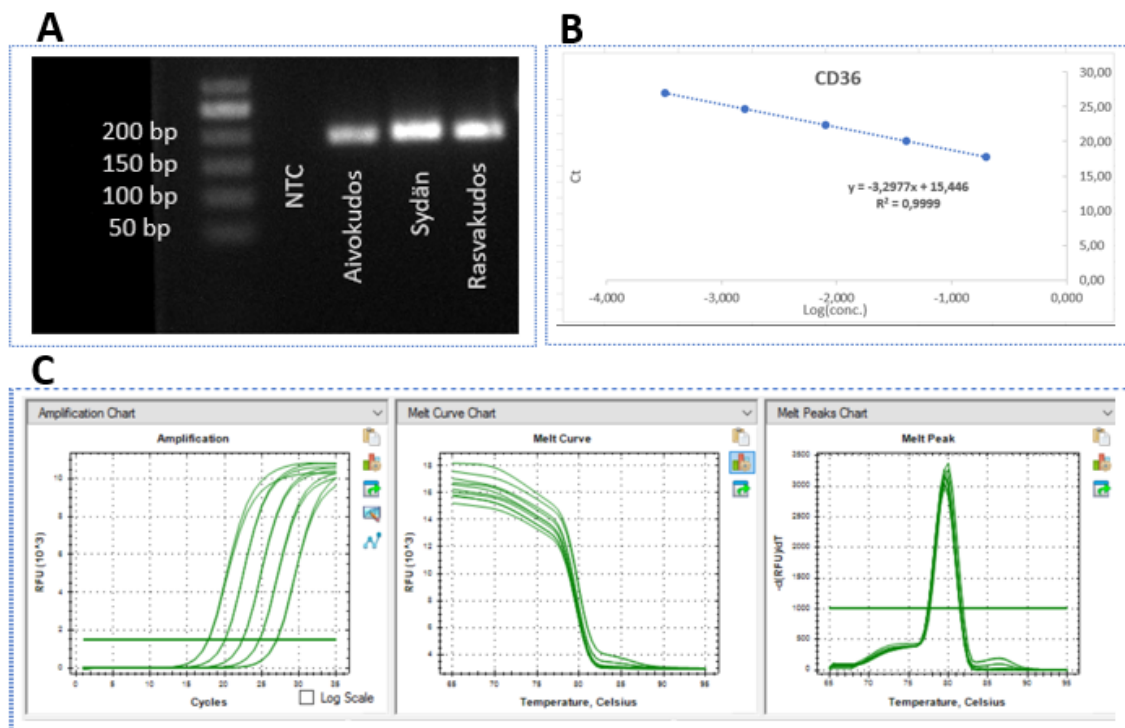


Kuva 8. (A) *Slc2a4* (Glut4) ja (B) *Insr* ekspressiotasojen muutos 48 ja 144 tunnin aikapisteissä eri siRNA:illa hiljennetyissä mesenkymaalisissa stroomasoluissa. Geeniekspressio on suhteutettu kontrolli-siRNA:han (Scramble) nähden. Ns = ei merkittävä ($P > 0.05$), $P < 0.01$ () ja $P < 0.0001$ (****)**

3.2.2 Adipogeenisen CD36-markkerin qPCR alukkeiden testaus

Ennen varsinaisia qPCR analyysyjä, *CD36*-geenin alukkeen spesifisyys testattiin positiivisista kontrollikudoksista (aivokudos, sydän ja rasvakudos). Alukkeet todettiin spesifiseksi *CD36*-geenille, sillä agarosigeeliltä havaittiin noin 200 emäsparin (bp), kokoinen tuote (teoreettinen koko 194 bp) eikä NTC-kontrollissa monistunut vastaavaa tuotetta (kuva 9A). qPCR- ja geelijaio suoritettiin myös haima-, kives ja pitkien luiden RNA:sta negatiivisen kontrollikudoksen karakterisoimiseksi, mutta kaikista edellä mainituista näytteistä monistui kvantitatiivisessa PCR:ssä oikean kokoinen tuote (tuloksia ei esitetty).

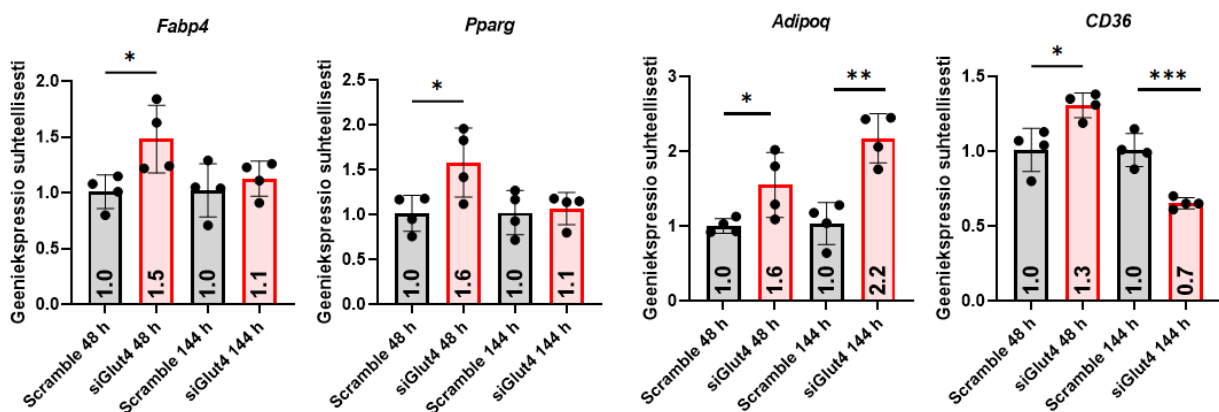
Matalin kynnyisarvo kvantitatiivisessa PCR:ssä testatuissa kudoksenäytteissä oli rasvakudoksessa, ja toiseksi alin kynnyisarvo oli sydänkudoksessa (tuloksia ei esitetty). Rasvakudoksen cDNA-näytteellä tehtiin gradientti-PCR optimaalisen sitoutumislämpötilan valitsemiseksi. Liittymislämpötilaksi valikoitui 60 °C (kuva 9C). Kuvassa 9C on esitetty myös sydänkudoksen cDNA:n laimennossarjan PCR-ajosta saatu sulamiskäyrä (Melt Curve). Laimennossarjan kynnysarvoista (Amplification) määritettiin regressiosuora (kuva 9B). qPCR:n parametrien avulla alukkeiden tehokkuudeksi saatiin 101 %.



Kuva 9. *CD36*-geeniä varten suunniteltujen alukkeiden testaus. (A) positiivisten kontrollikudosten qPCR-tuotteiden geielektroforeesi, (B) alukkeen tehokkuuden määrittystä varten laskettu regressiosuora, sekä (C) tehokkuuden määrittämiseksi tehdyn kvantitatiivisen-PCR-ajon monistuskäyrät (Amplification) ja sulamiskäyrät (Melt Curves).

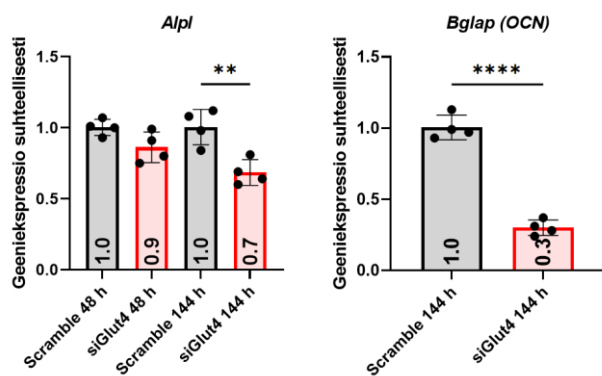
3.2.3 Adipogeeniset ja osteogeeniset merkkitekijät siGlut4-soluissa

Seuraavaksi selvitettiin qPCR:llä, vaikuttaako GLUT4:n hiljentäminen mesenkymaalisten stroomasolujen erilaistumiseen. Kuten kuvasta 10 havaitaan, kaikkien tutkittujen adipogeenisten markkerigeenien *Fabp4*, *Pparg*, *Adipoq* ja *CD36* ilmentyminen lisääntyi siGlut4-hiljenneissä soluissa. 48 tunnin aikapisteessä *Fabp4* oli koholla 1.5 ($P = 0.032$) ja *Pparg* 1.6 kertaisesti ($P = 0.040$) kontrolliin verrattuna. Myös *Adipoq* ja *CD36* geenien ilmentyminen oli merkitsevästi koholla 48 tunnin aikapisteessä (1.6 kertaisesti ($P = 0.049$) ja 1.3 kertaisesti ($P = 0.012$)). Myöhemmässä, 144 tunnin aikapisteessä vain *Adipoq* ilmentyminen oli edelleen merkitsevästi koholla (2.2 kertainen ($P = 0.0019$)). *CD36* geenin ilmentyminen puolestaan väheni 144 tunnin aikapisteessä kontrolliin verrattuna 0.7 kertaiseksi ($P = 0.0009$)).



Kuva 10. Adipogeeniset markkerit siGlut4-soluissa 48 h ja 144 h-aikapisteissä. *Fabp4*, *Pparg*, *Adipoq* ja *CD36*-geenien ilmentyminen suhteessa kontrolliin eli Scrambleen. ($P < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***)

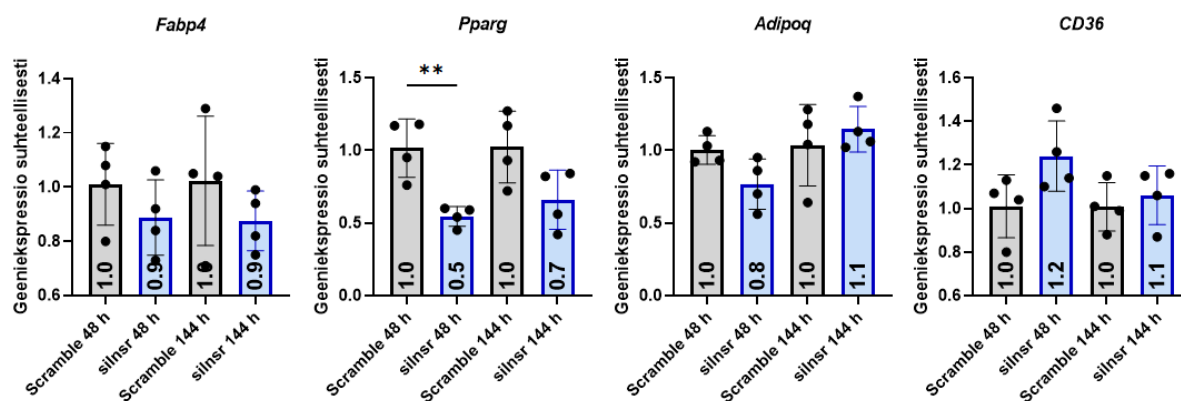
Toisin kuin adipogeeniset markkerigeenit, osteogeenisten merkkitekijöiden *Alpl*- ja *Bglap*-geenien ilmentyminen siGlut4-soluissa oli vähentynyt (kuva 11). *Alpl*:n ilmentyminen oli alentunut kontrolliin nähden 0.7 kertaisesti 144 tunnin aikapisteessä ($P = 0.0061$). *Bglap*:n ekspressiotaso määritettiin ainoastaan 144 tunnin aikapisteessä, jossa se oli 0.3 kertainen Scrambleen nähden ($P < 0.0001$)).



Kuva 11. Osteogeenisten markkereiden ilmentyminen siGLut4-soluissa Scrambleen nähden. Osteogeenisinä markkereina toimivat *Alpl*- ja *Bglap*-geenit, joista *Alpl* tehtiin kahdesta eri aikapisteestä, ja *Bglap* vain 144 tunnin aikapisteestä. ($P < 0.01$ (**); $P < 0.0001$ (***)

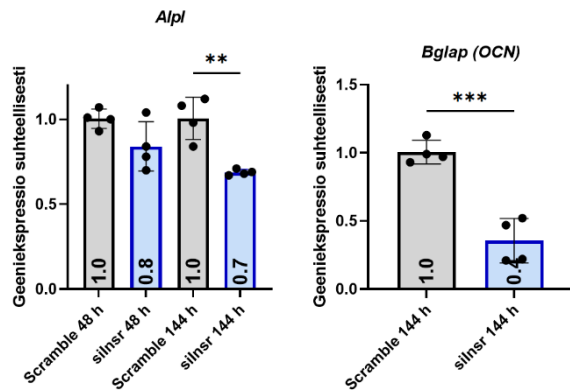
3.2.4 Adipogeeniset ja osteogeeniset merkkitekijät siInsr-soluissa

Insuliinireseptorin hiljentämisellä ei ollut huomattavaa merkitystä adipogeenisten geenien ilmentymiselle. Soluista, joissa oli hiljennetty insuliinireseptorin toiminta tilastollisesti merkittäviä eroja adipogeenisissä merkkitekijöissä tuli *Pparg*:ssä (kuva 12). *Pparg* oli alentunut suhteellisesti kontrolliin eli Scrambleen verrattuna 0.5 kertaiseksi 48 tunnin kohdilla ($P = 0.0044$). siInsr-soluissa oli adipogeenisissä merkkitekijöissä vaihtelua eri soluviljelmien kesken, nämä erot eivät ole kuitenkaan tilastollisesti merkitseviä.



Kuva 12. Adipogeeniset merkkitekijät siInsr-soluissa 48 h ja 144 h-aikapisteissä. *Fabp4*, *Pparg*, *Adipoq* ja *CD36*-geenit toimivat adipogeenisinä merkkitekijöinä, tulokset ovat suhteutettu Scrambleen aikapisteittäin. ($P < 0.01$ (**))

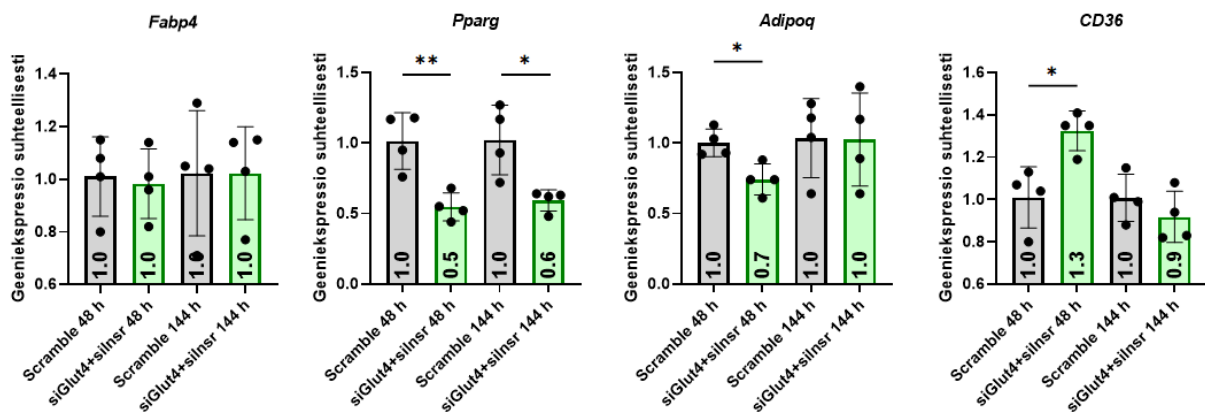
Insuliinireseptorin hiljentäminen vähensi osteogeenisten geenien ilmentymistä. Osteogeenisistä merkkitekijöistä *Alpl* oli 144 tunnin aikapisteessä 0.7 kertainen ($P = 0.0024$) ja osteokalsiinia koodaava *Bglap* 0.4 kertainen ($P = 0.0004$) kontrolliin verrattuna. *Bglap*-geenin ilmentyminen selvitetiin vain 144 tunnin aikapisteestä.



Kuva 13. Osteogeenisten markkereiden ilmentyminen siInsr-soluissa suhteellisesti Scrambleen nähden. Osteogeenisinä markkereina toimivat *Alpl* ja *Bglap*, joista *Alpl* tehtiin kahdesta eri aikapisteestä: 48 ja 144 h. *Bglap* puolestaan vain 144 tunnin aikapisteestä. ($P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***))

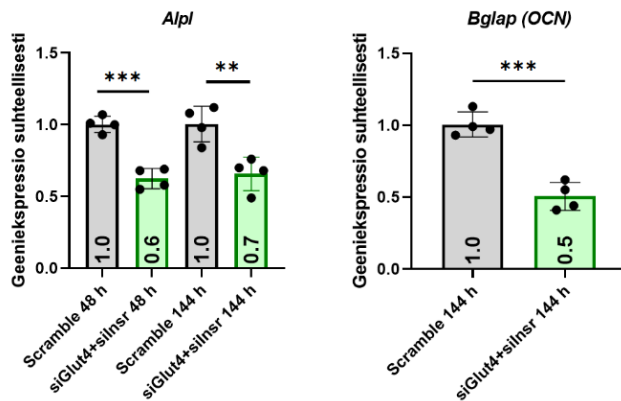
3.2.5 Adipogeeniset ja osteogeeniset merkkitekijät siGlut4+siInsr-soluissa

Yhteishiljennetyissä soluissa adipogeenisissä merkkitekijöissä ei ollut selkeää erilaistumisuuntaa, mutta osteogeeniset merkkitekijät olivat alentuneet (kuva 14). *Fabp4* ilmentymisessä ei ollut merkittäviä eroja. *Pparg* oli puolestaan 48 tunnin aikapisteessä 0.5 kertainen kontrolliin nähden ($P = 0.0058$) ja 144 tunnin kohdilla 0.6 kertainen ($P = 0.016$). *Adipoq* oli puolestaan 0.7 kertainen 48 tunnin aikapisteessä ($P = 0.013$) ja samalla tasolla kontrollin kanssa myöhemmässä aikapisteessä. *CD36* ekspressio oli koholla 1.3 kertaisesti 48 tunnin kohdilla ($P = 0.011$).



Kuva 14. Adipogeeniset markerit siGlut4+siInsr-soluissa 48 h ja 144 h-aikapisteissä. *Fabp4*, *Pparg*, *Adipoq* ja *CD36*-geenit toimivat adipogeenisinä markkereina, tulokset ovat suhteutettu Scrambleen. ($P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**))

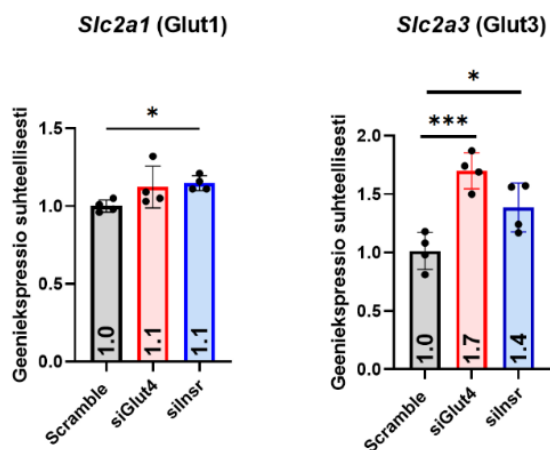
Osteogeeniset merkkitekijät *Alpl* ja *Bglap* siGlut4+siInsr-soluissa geeni-ilmentymisen tulokset ovat kuvassa 15. *Alpl* oli 48 tunnin kohdalla 0.6 kertainen kontrolliin nähden ($P = 0.0002$) ja 144 tunnin kohdalla se oli 0.7 kertainen ($P = 0.0066$). *Bglap* tehtiin vain myöhemmästä 144 tunnin aikapisteestä, jossa geeni-ilmentyminen oli 0.5 kertaista ($P = 0.0003$).



Kuva 15. Osteogeenisten markkereiden ilmentyminen siGlut4+siInsr-soluissa suhteellisesti Scrambleen nähden. Osteogeenisinä markkereina toimivat *Alpl* ja *Bglap*, joista *Alpl* tehtiin kahdesta eri aikapisteestä: 48 ja 144 h. *Bglap* puolestaan vain 144 tunnin aikapisteestä. ($P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***)

3.2.6 Hiljennysten vaikutus glukoosinkuljettimien GLUT1 ja GLUT3 ekspressioon

Geenihiljennyksen vaikutusta GLUT1- ja GLUT3-glukoosinkuljettajien ilmentymiseen tutkittiin 48 tuntia transfektiosta (kuva 16). Hiljennetyissä soluissa näkyi merkittävä GLUT3 kompensatorinen nousu, sillä siGlut4-soluissa *Slc2a3* (GLUT3) ekspressio nousi 1.7 kertaiseksi kontrolliin verrattuna ($P = 0.0008$) ja siInsr-soluissa 1.4 kertaiseksi ($P = 0.0297$). *Slc2a1* (GLUT1) ilmentyminen nousi ainoastaan siInsr-soluissa (1.1 kertainen kontrolliin verrattuna, $P = 0.0031$).

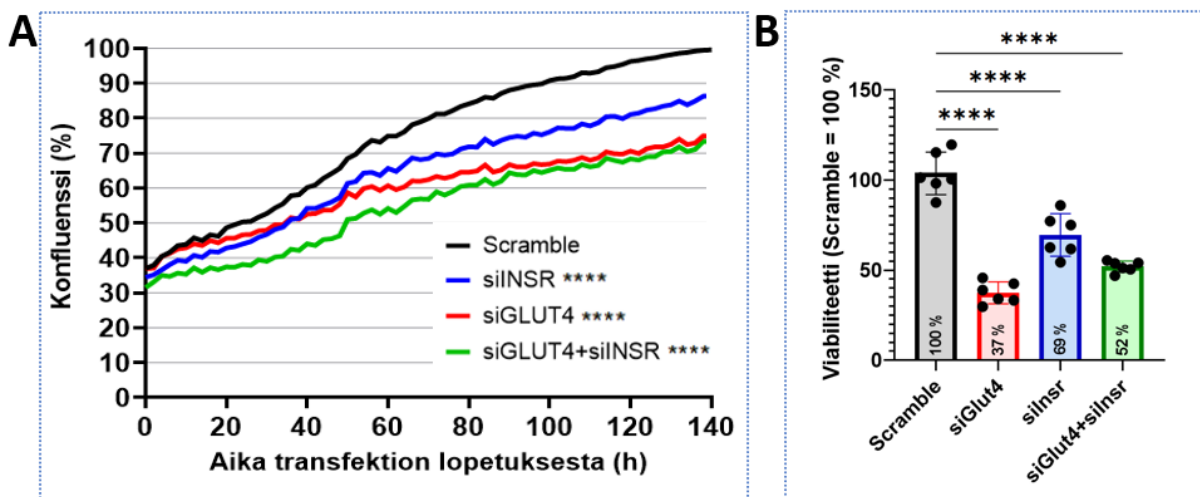


Kuva 16. *Slc2a1* ja *Slc2a3* ekspressio siGlut4 ja siInsr-soluissa suhteessa käsittelykontrolli Scrambleen. $P < 0.05$ (*); $P < 0.001$ (***)

3.3 Hiljennysten vaikutus solujen kasvuun ja elinkykyyn

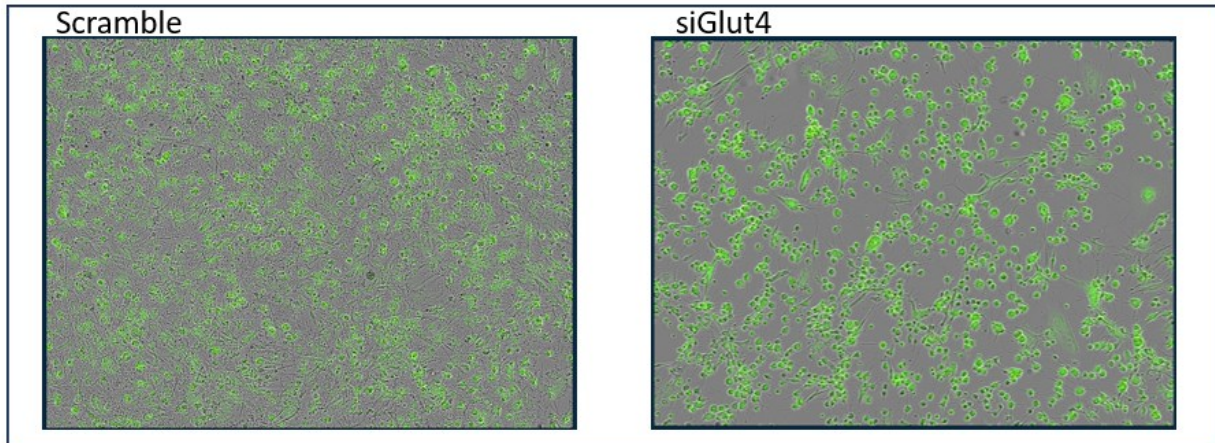
IncuCyte-kuvauslaitteella seurattiin geenihiljennysten vaikutusta solujen kasvuun. Kontrollikäsiteltyjen Scramble-solujen konfluenssi eli kasvutiheys oli alussa 37 %, ja 100 %:n konfluenssi saavutettiin 140 tunnin kuluttua transfektion lopettamisesta (kuva 17A). Sen sijaan mikään hiljennetyistä solukasvatuksista ei saavuttanut konfluenssia kokeen havaintojakson aikana (kuva 17A). Sekä *siInsr-*, *siGlut4-* tai näiden yhdistelmähiljennys johtivat merkittävään ($P < 0.0001$) laskuun solujen lisääntymisnopeudessa.

Solujen kasvuominaisuuksien lisäksi selvitettiin hiljennyksien vaikutusta solujen viabiliteettiin eli elinkykyyn kuuden päivän kuluttua transfektion lopettamisesta. Elinvykyisyyttä mitattiin AlamarBlue™ HS Cell Viability Reagent kitillä. Mittaustulokset suhteutettiin kontrollisolujen (Scramble) elinkykyyn, joka merkittiin 100 %:ksi. Sekä *siInsr-*, *siGlut4-* tai näiden yhdistelmähiljennys vähensi solujen elinkykyä merkittävästi ($P < 0.0001$) 140 tunnin aikapisteessä kontrollisoluihin verrattuna (kuva 17B). Eniten solujen elinkykyyn vaikutti GLUT4:n hiljentäminen, sillä näiden solujen elinkyky oli vain 37 % kontrollisolujen elinkelpoisuudesta. *siInsr*-solujen viabiliteetti oli 69 % ja yhdistelmähiljennettyjen solujen viabiliteetti oli 52 % kontrollisolujen elinkelpoisuudesta.



Kuva 17. Geenihiljennyksen vaikutus solujen kasvuun ja viabiliteettiin. Konfluenssin muutos 140 tunnin aikana määritettiin IncuCyte reaaliaikaisella kuvantamislaitteella (A). Viivadiagrammi kuvaa vaimennettujen solujen lisääntymistä ajan funktiona (N = 6, näytteiden keskiarvo). (B) Suhteelliset erot 6 päivää transfektion lopetuksen jälkeen kasvaneiden solujen viabiliteetissa (N=6). ($P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***) ja $P < 0.0001$ (***)

Kuvassa 18 on kaksi esimerkkikuvaa kalseiini Am-reagenssilla tehdystä värjäyksestä. Tulokset päätettiin jättää käyttämättä jatkoanalysointiin, sillä Scramble soluissa näkyi solujen mineralisaatiota ja tämä esti värjäytyneen pinta-alan konfluenssin laskemisen luotettavasti. Mineralisointeissa soluissa väriaine esti solujen täydellisen värjäytymisen. siGlut4 esimerkkikuvassa näkyi solujen täydellinen värjäytyminen, sillä mineralisaatiota ei ollut tapahtunut.

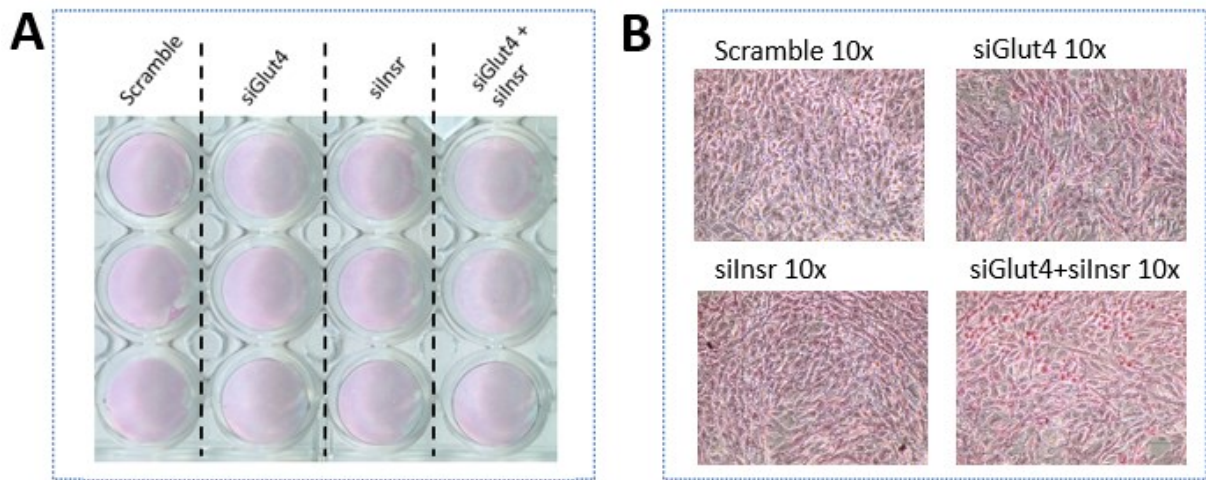


Kuva 18: Esimerkkikuvat Scramble ja siGlut4-soluista kalseiini Am-värjäyksen jälkeen. Värjäys suoritettiin 6 päivää transfektion lopettamisen jälkeen, Scramble-soluissa näkyy mineraalisaatiota ja konfluenssi on niin suuri, että väriaine ei värjää soluja täydellisesti.

3.4 Hiljennysten vaikutus solujen erilaistumiseen

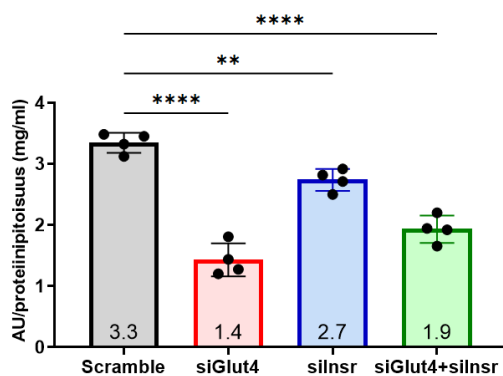
3.4.1 ALP-värjäys ja ALP-aktiivisuus

Edellä kuvatun alkalisen fosfataasin (*Alpl*) qPCR-analyysin lisäksi osteoblastien erilaistumista selvitettiin soluvärjäyksillä ja alkalisen fosfataasin (ALP) aktiivisuusmittauksilla. ALP-värjätyt solut ovat värjäytyneet kauttaaltaan punaiseksi (kuva 19A). Kuvan 19 B-osiossa puolestaan on 10-kertaisella suurennoksella otettuja kuvia ALP-värjäytyistä soluista. Kuvissa näkyy kaivojen olevan hyvin täynnä ja väriä olevan kaivoilla kauttaaltaan. Eri käsittelyjen välillä ei silmämääräisesti ole havaittavissa intensiteettieroja ALP-värjäytymisen suhteen.



Kuva 19: Kuvia ALP-värjäyistä soluista. A-osiossa on skannattu kuva kuoppalevystä ja B-osiossa on mikroskoopilla otettuja kuvia.

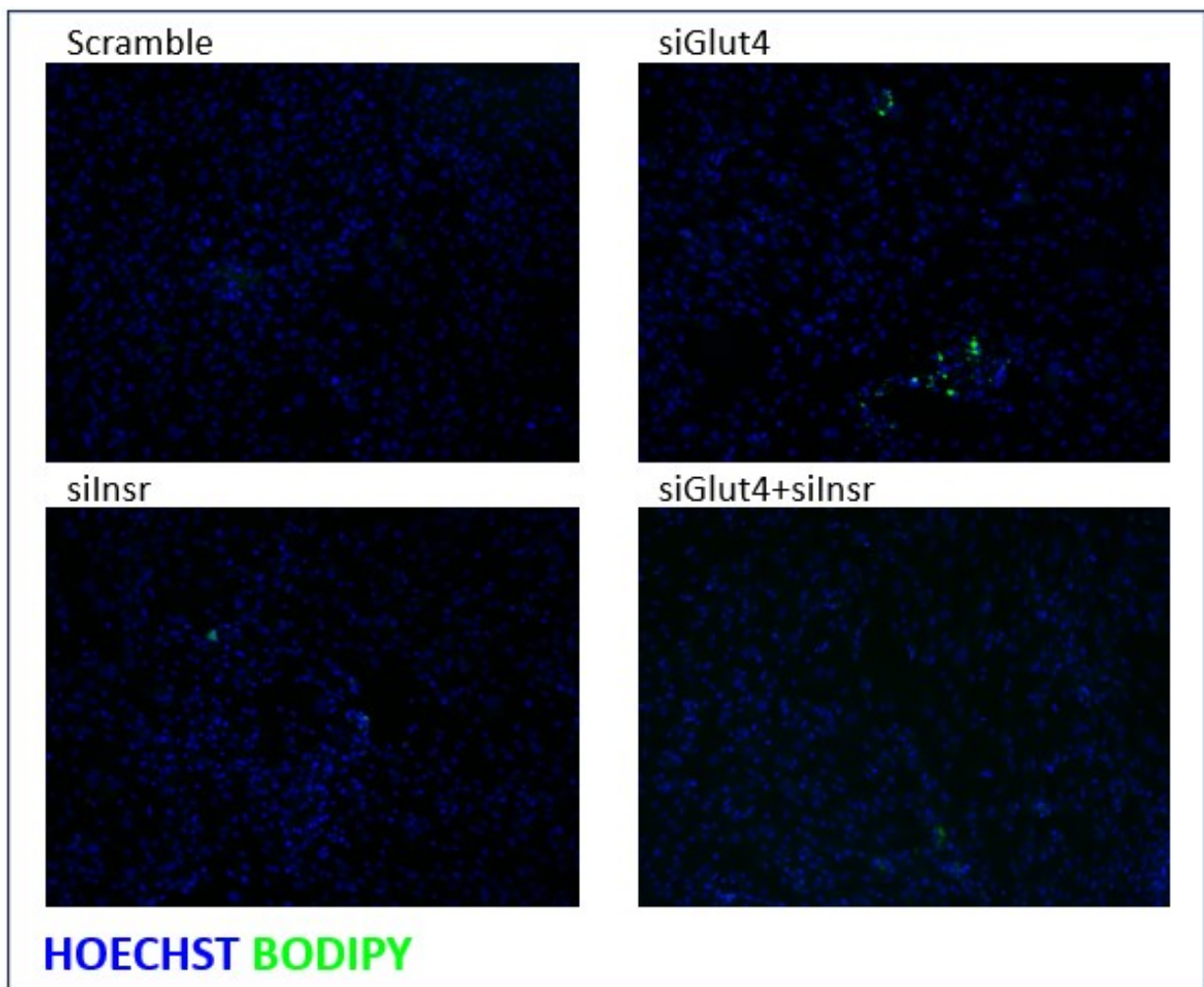
Alkalisen fosfaatin (ALP) aktiivisuus suhteessa näytteiden kokonaisproteiinipitoisuuteen määritettiin solulysaateista (kuva 20). GLUT4:n hiljentäminen vähensi merkittävästi ALP:n aktiivisuutta verrattuna kontrollisoluihin (Scramble) (43%, $P < 0.0001$). siInsr-soluissa tulos oli puolestaan 82 % ($P = 0.0044$) ja siGlut4+siInsr-soluissa 58 % ($P < 0.0001$).



Kuva 20. Hiljennettyjen solujen ALP-aktiivisuus suhteutettuna proteiinkonsentraatioon. Solut olivat kasvaneet 6 päivää transfektion lopetuksesta. ALP-aktiivisuus ja proteiinkonsentraatio mitattiin solulysaateista spektrofotometrillä ja proteiinkonsentraatio määritettiin standardisuoran avulla. ($N = 4$), ($P < 0.01$ (**); $P < 0.0001$ (***)

3.4.2 Neutraalien rasvahappojen värjääminen

Mahdollisten adiposyyttien havaitsemiseksi neutraalit rasvahapot värjättiin soluista Hoechst ja Bodipy yhdistelmävärjäyksellä. Kuvaan 21 on koottu edustavat yhdistelmäkuvat värjäyksistä. Värjäytyneiden rasvahappojen määrää ei kvantitoitu, mutta silmämääräisesti siGlut4-soluissa havaittiin värjäytyneitä rasvahappoja enemmän kuin muissa soluissa.



Kuva 21. Adiposyyttien neutraalien rasvahappojen Hoechst ja Bodipy yhdistelmävärjäys 6 päivää transfektion lopetuksen jälkeen kasvaneille soluille (10x objektiivi). Hoechst värjää DNA:ta (sininen signaali) ja Bodipy neutraaleja rasvahappoja (vihreä signaali).

4 TULOSTEN TARKASTELU

Tyypin 2 diabetekseen liittyy insuliiniresistenssi ja luiden haurastuminen, jonka mekanismit eivät ole täysin selvillä. Tässä työssä insuliiniresistenssiä mallinnettiin luuytimen soluissa hiljentämällä mesenkymaalista stroomasoluista transientisti insuliinireseptorin, insuliinista riippuvaisen GLUT4-kuljetusmolekyylin toiminta ja näiden toiminta yhdessä. Työssä selvitettiin miten insuliinisignalointiin normaalisti osallistuvien insuliinireseptorin ja GLUT4:n puuttuminen vaikuttaa luuytimen multipotenttien mesenkymaalisten stroomasolujen kasvuun, elinkykyyn ja erilaistumiseen.

4.1 *Insuliinisignaloinnin hiljentäminen vaikutti solujen erilaistumiseen*

Insuliinisignaloinnin hiljentäminen vähensi luuytimen mesenkymaalisten stroomasolujen osteoblastilinan merkkitekijöiden ilmentymistä ja solujen erilaistumista osteoblasteiksi. Osteogeenisten merkkitekijöiden eli alkalisen fosfataasin *Alpl*-geenin ja osteokalsiinin *Bglap*-geenin ilmentymistä selvitettiin RNA-tasolla. Sekä *Alpl:n* että *Bglap:n* ilmentyminen oli vähentynyt käsittelykontrolliin verrattuna kaikissa muissa paitsi GLUT4-hiljennetyissä soluissa 48 tunnin aikapisteessä. Alkalisen fosfataasin (ALP) mahdolliset määrälliset erot testattiin vielä tutkimalla ALP:n aktiivisuutta, joka varmisti ALP:n aktiivisuuden olevan alentunutta myös proteiinitasolla.

Saatu tulos on linjassa aikaisempien tutkimuksien kanssa. Hiirillä tehdyssä *in vivo* tutkimuksessa insuliinireseptorin poistaminen kypsistä osteokalsiinia ilmentävistä osteoblasteista vähensi osteoblastien muodostamista ja vaikutti osteokalsiinin erittämiseen ja tätä kautta luiden muodostumiseen (Fulzele ym., 2010). Song ym. (2023) puolestaan mallinsivat tyypin 2 diabetesta hiirimallilla, jossa streptotsosiini-pistoksilla luotiin hiiriä, joilla ei erittynyt insuliinia. Hiirien trabekulaarinen ja kortikaalinen luumassa laskivat osteoblastien aktivaation vähentymisen myötä. Wei ym. (2014) puolestaan mallinsivat insuliiniresistenssiä hiirillä estämällä insuliinireseptorin toiminnan varhaisista osteoblasteilta *in vivo*. Tutkimuksessa havaittiin, että erittäin rasvapitoista ravintoa saaneilla insuliiniresistenteillä hiirillä aktiivisen osteokalsiinin määrät tipuivat normaalia ruokavaliota nauttineisiin kontrollihiiriin verrattuna.

Li ym. (2016) tutkivat insuliinivälitteisen glukoosinkuljetuksen yhteyttä luunmuodostumiseen sekä *in vitro* että *in vivo*. He osoittivat GLUT4-toiminnan estämisen osteoblasteissa *in vitro* johtavan alentuneeseen osteoblastien kehittymiseen. Samassa tutkimuksessa GLUT4-ilmentyminen estettiin myös kudosspesifisesti osteoblasteissa *in vivo*. GLUT4-puutteisen hiiren luuston koostumus oli normaali eikä mikrotietokonetomografiakuvauksessa havaittu merkittäviä eroja reisiluun koostumuksessa 6 ja 12 viikon ikäisillä hiirillä kontrollihiirin verrattuna. Tutkimuksessa *in vitro* havaitut tulokset eivät siis toistuneet *in vivo* tasolla. GLUT4-puutteisilla hiirillä rasvakudoksen määrä kuitenkin lisääntyi ja syntyi hyperinsulinemiaa, tutkimus osoitti kuitenkin GLUT4 poistamisen osteoblasteista vaikuttavan koko kehon glukoosiaineenvaihduntaan.

Rasvasolujen erilaistumisprosessi on monivaiheinen, ja sitä säätelee useat eri transkriptiotekijät. Erittäin keskeisessä roolissa erilaistumisessa ovat muun muassa PPAR- γ , joka aktivoi adiposyyteille spesifisiä geenejä, sekä kypsien adiposyyttien muodostumiseen tarvittavat rasvahappojen sitojaproteiini 4 (FABP 4) ja adiponektiini. Myös adipogeenisten merkkitekijöiden ilmentymistä selvitettiin RNA-tasolla. GLUT4-hiljentäminen johti suurempiin muutoksiin adipogeenisissä merkkitekijöissä geeni- ja proteiinitasolla verrattuna insuliinireseptorin ja yhteishiljennyksen aikaansaamiin muutoksiin. Adipogeenisistä merkkitekijöistä *Pparg* ilmentyy erilaistumisen alkuvaiheessa, *Fabp4* ja *Cd36* ilmentyvät adiposyyttien muodostuessa, ja adiponektiini puolestaan on kypsien adiposyyttien erittämä. *Glut4* hiljennetyissä soluissa kaikki erilaistumisen alkuvaiheen merkkitekijät *Fabp4*, *Pparg* ja *CD36* olivat koholla 48 tunnin aikapisteessä. GLUT4 hiljennetyissä soluissa adiponektiinin, jota erittävät yksinomaan kypsät rasvasolut, ilmentyminen oli lisääntynyt 144 tunnin aikapisteessä, mikä viittaisi siihen, että yhä useampi solu oli erilaistunut kypsäksi adiposyytiksi. Proteiinitasolla adiposyyttilinjan erilaistumista tutkittiin värjäämällä neutraaleita rasvahappoja. Värjäytyneitä rasvahappoja näytti olevan eniten soluissa, joista oli hiljennetty GLUT4:n toiminta. Määrällistä arviota rasvahappojen määrästä ei kuitenkaan tehty.

Mielenkiintoista oli, että soluissa, joista insuliinireseptorin toiminta oli yksinään tai yhdessä GLUT4:n kanssa hiljennetty, adiposyyttilinjan päätranskriptiotekijän *Pparg*:n ilmentyminen oli alentunut kontrolliin nähden. Yhdistelmähiljennetyissä soluissa oli myös adiponektiinin ilmentyminen alentunut 48 tunnin aikapisteessä kontrolliin nähden. Se, että GLUT4:n ja insuliinireseptorin toiminnan estäminen johtivat adipogeenisissä merkkitekijöissä päinvastaiseen tulokseen ei sinänsä ole yllättävä ottaen huomioon insuliinin moninaiset vaikutukset anabolisena hormonina. Insuliinin vaikutus ei esimerkiksi rajoitu pelkästään glukoosin sisäänoton tehosta-

miseen. Tämän vuoksi insuliinisignalointireittiä ja glykolyysiä tarkemmin selvittävät tutkimukset ovat erityisen mielenkiintoisia. Eräs mielenkiintoinen tutkimus on Songin ym. (2023) solutason glukoosin kiertoa insuliinipuutteisessa ympäristössä selvittänyt työ. He hyödynsivät tutkimuksessaan radioaktiivisesti leimattua ¹³C-glukoosia ja havaitsivat insuliinivajauksen johtavan glykolyysin vajaatoimintaan ja edelleen kautta heikentyneeseen sitruunahappokiertoon. Insuliinipuutteisilla hiirillä glykolyysin aktivoiminen puolestaan johti luukadon vähenemiseen. Vastaavasti Ji ym. (2023) havaitsivat, että glykolyysin aktivoiminen johti luumassan lisääntymiseen tyypin 1 diabetes hiirimallilla.

Insuliinireseptorin toiminnan estäminen häiritsee glykolyysiä, jota pelkkä GLUT4-hiljentäminen ei suoranaisesti tee. Insuliinireseptorihiljennetyt solut kasvoivat silti GLUT4- ja yhdistelmähiljennettyjä soluja paremmin ja myös näiden elinkyky oli parempi. Insuliinireseptorihiljennetyissä soluissa sekä osteogeenisten että adipogeenisten merkkitekijöiden ilmentäminen väheni. Onkin mielenkiintoista, että mihin solulinjaan nämä insuliinireseptorihiljennetyt solut erilaistuvat. Näissä soluissa näkyi GLUT3-glukoosinkuljettimen nousua kompensatorisena insuliinivälitteisen väylän estämiselle. GLUT4 hiljennetyissä soluissa näkyi vielä voimakkaammin GLUT3:n nousu ilmeisesti kompensatorisesti, silti GLUT4-hiljennetyt solut eivät olleet yhtä elinkykyisiä.

4.2 Insuliinisignaloinnin estämisen vaikutus GLUT-kuljettimiin, solujen kasvuun ja elinkykyyn

GLUT1-glukoosinkuljetin vastaa glukoosin perustason sisäänotosta, sen ilmentyminen voi nousta esimerkiksi hypoglykemian yhteydessä (Pragallapati & Manyam, 2019). GLUT1 ilmentymisen on tutkittu nousevan myös lihassoluissa fyysisen aktiivisuuden noustessa ja glukoosin tarpeen kasvaessa (Barnard & Youngren, 1992). Tällaista kompensatiota ei tässä tapauksessa havaittu, tosin geeni-ilmentymistä tutkittiin 48-tuntia transfektiosta ja kompensatio olisi voinut olla voimakkaampaa pidemmällä aikajänteellä. Vastaavasti GLUT4-toiminnan estämisen hiiren osteoblasteista *in vitro* ei ole havaittu kompensatorisesti nostavan GLUT1-tasoja (Li ym., 2016).

Slc2a3 ilmentävän GLUT3-glukoosinkuljettimen ilmentyminen puolestaan nousi suhteellisesti kontrolliin nähden GLUT4- ja insuliinireseptorihiljennetyissä soluissa. Kyseessä on ilmeisesti kompensatio glukoosin sisäänoton tehostamiseksi, kun insuliinivälitteinen väylä on estetty. Tulos on toistoa tässä tutkimusryhmässä aiemmin tehdyille tutkimukselle, jossa GLUT4-hiljentäminen johti GLUT3 suhteellisten lähetti-RNA-tasojen nousemiseen neljä päivää transfektion lopettamisen jälkeen (Arponen ym., 2022).

Solujen kasvuun ja elinkykyyn suurin vaikutus oli GLUT4-hiljennyksellä. IncuCyte-kuvauksessa solut, joista oli hiljennetty insuliinireseptorin toiminta, kasvoivat suurempaan tiheyteen kuin GLUT4- ja yhdistelmähiljennetyt solut. Solujen elinkykyä mittaavassa alamarBlue-tes-tissä insuliinireseptorihiljennettyjen solujen elinkyky oli parempi kuin GLUT4- tai yhdistelmähiljennetyissä soluissa. Incucyte-kuvauksissa oli mukana myös käsittelemätön kontrollivil-jelmä (tuloksia ei esitetä tässä työssä), johon verraten myös käsittelykontrolli Scramblen kasvu oli heikentynyt. Solut kuitenkin pysyivät elinkykyisinä ja jatkoivat kasvuaan geenihiljennyk-sistä huolimatta, tähän osaselityksenä saattaa olla GLUT3:n kompensatorinen nousu. Solujen pinnalla voi olla myös ennen geenihiljennystä muodostuneita insuliinireseptoreita ja GLUT4-kuljettimia, jotka vaikuttavat solun glukoosinottoon vielä hiljennyskäsittelyn aikana. Lisäksi osa insuliinivälitteisestä glukoosinkuljetuksesta on soluissa yhä jäljellä, sillä geenihiljennys-teho oli suurimmillaan noin 90 %.

4.3 Tutkimuksen vahvuudet, tulevaisuuden tutkimusmahdollisuuksia ja hypoteesin taustaa

Työn vahvuutena on primäärisolujen käyttäminen, sillä primäärisolut kuvastavat paremmin todellista normaalien solujen tilannetta solutasolla kuin solulinjojen käyttö. Solulinjat ovat usein syöpäsoluja, joilla glukoosiaineenvaihdunta poikkeaa normaalista, joten tutkimukset eivät välttämättä vastaa normaalia tilannetta. Esimerkiksi MC3T3-E1 osteoblastisolulinjaa on käytetty myös tutkimuksissa, mutta nämä eivät ilmennä GLUT4-kuljetinta (Cunha ym., 2014). Työn vahvuutena on myös menetelmien toimivuus ja toistettavuus; primäärisolujen luuytimestä eristäminen, kasvattaminen, transfektoiminen ja merkkitekijöiden löytäminen ja soveltumisen varmistaminen ovat vaatineet aiempaa tutkimusta ja menetelmien optimointia. siRNA-menetelmä

osoittautui tehokkaaksi menetelmäksi kohdegeenien hiljentämiseen. Geenihiljennystehokkuus eri aikapisteissä oli samansuuntainen Rossi ym. (2005) tutkimusten kanssa, missä he selvittivät 27-mer DSiRNA:n hiljennystehoa verrattuna lyhyempiin siRNA-molekyyleihin.

Tässä työssä suoritettiin geenihiljennys, eikä geenien poistamista tai toiminnan estämistä kokonaan. Insuliiniresistenssin mallintamiseen työssä käytetty geenihiljentäminen on fysiologista tilannetta hyvin mallintava menetelmä, sillä insuliiniresistenssissä solujen kyky reagoida insuliiniin on heikentynyt, ei kokonaan estynyt (Könner & Brüning, 2012). Insuliinisignalointikaskadin näkökulmasta insuliiniresistenssin mallintaminen insuliinireseptorin ilmentymistä estämällä on kuitenkin ongelmallista, sillä esimerkiksi ihmisellä on tutkittu insuliiniresistenssin vaikuttavan insuliinisignalointikaskadissa PI3K-aktivointireittiin, mutta ei MAPK-väylään (Cusi ym., 2000). Hiljentämällä koko reseptorin toiminta ja tätä kautta myös MAPK-välitteinen signalointireitti estetään insuliinin mitogeeniset vaikutukset, jotka normaalisti insuliiniresistenssissä ei välttämättä estyisi.

Koejärjestely kesti kuusi päivää ja erityisesti insuliinireseptorihiljennetyissä soluissa näkyi ero kahden ja kuuden päivän välillä. Solujen lopullinen erilaistuminen ei välttämättä näy tutkitulla ajanjaksolla. Käytetty geenihiljennysmenetelmä tuottaa transientin geenihiljennyksen ja kuuden päivän kohdilla hiljennys oli vielä noin 70 % teholtaan. Tehtäessä merkittävästi pidempi-aikaisia viljelmiä tulisi geenihiljennys tehdä muilla keinoin tai siRNA-hiljennys tulisi toistaa samoille soluille uudestaan viljelmän aikana. Tulosten suorassa yhdistämisessä ihmisen fysiologiaan on otettava huomioon, että kyseessä on rotan primäärisoluilla tehty *in vitro* tutkimus ja luuytimen mikroympäristö eroaa *in vitro* olosuhteista merkittävästi. Monimutkaisen luuytimen mikroympäristön mallintaminen on hankalaa; havaitut aineenvaihdunnalliset muutokset *in vitro*, eivät aina toistu *in vivo* tutkimuksessa (Ning ym., 2022). Ihmisen osteoblastien toiminnan on kuitenkin tutkittu olevan lähempänä rotan kuin hiiren osteoblasteja (Booth ym., 2013).

Työn alkuhypoteesina toimii Arponen ym. (2022) tekemä aiempi tutkimus, jossa tutkittiin glukosinkuljettajien 1, 3 ja 4 hiljennyksen vaikutusta mesenkymaalisten stroomasolujen kasvamiseen *in vitro*. Hiljennetyille soluille tehtiin RNA-sekvensointi transkriptomin selvittämiseksi 48 tuntia hiljennyksen jälkeen. Sekvenssiaineistosta näkyy GLUT4-hiljennetyissä soluissa osteoblastien erilaistumisessa merkittävän tekijän WNT-signalointiin liittyvän WISP2-proteiinia koodaavan geenin ilmentymisen laskeminen kontrolliin nähden. GLUT4-hiljennetyissä soluissa näkyi myös mm. *Fabp4*- ja *Pparg*-tasojen nousu suhteellisesti kontrolliin nähden, mikä viittaisi solujen erilaistumisen siirtyneen adipogeeniseen suuntaan. Nämä havainnot saatiin

tässä työssä varmennettua ja toistettua. Työtä on jatkettu tutkimusryhmässä hiljentämällä GLUT4 toiminta hyperglykemisissä olosuhteissa. Hyperglykemia vastaa paremmin diabeettisia olosuhteita, sillä tyypin 2- diabeetikoista huomattavalla osalla ovat veren glukoositasot hieman tai runsaasti koholla (McCoy ym., 2023).

4.4 Yhteenveto

Työssä saatiin tutkittua miten insuliinisoloinnin estäminen muuttaa luuytimen mesenkymaalisten stroomasolujen erilaistumista *in vitro*. Insuliinisoloinnin hiljentäminen johti muutoksiin solujen kasvussa, erilaistumisessa ja elinkyvyssä. Solut, joissa insuliinisolointi oli puutteellista joko hiljentämällä insuliinireseptorin tai GLUT4-kuljettimen toiminta tai näiden yhdistelmä johti solujen vähentyneeseen erilaistumiseen osteoblastilinjaan geeni- ja proteiinitasolla. Insuliinisoloinnin häiritseminen näyttäisi siis vähentävän luuta muodostavien solujen muodostumista. Työssä nähtiin solutason muutoksia, joita on aiemmin tutkittu lähinnä *in vivo* (Fulzele ym., 2010; Li ym., 2016; Song ym., 2023; Wei ym., 2014).

Työn hypoteesina on, että puutteellinen insuliinisolointi vaikuttaa solujen kasvuun ja erilaistumiseen ja, että solut saattavat muuttaa erilaistumista rasvasolujen suuntaan. Hypoteesi piti paikkansa kasvun ja erilaistumisen muuttumisen osalta. Rasvasolujen suuntaan erilaistumista näkyi GLUT4-hiljennetyillä soluilla, joissa adipogeeniset merkkitekijät nousivat, muilla solulinjoilla tällaista muutosta ei näkynyt. Insuliiniresistenssi ei itsessään erilaistanut soluja rasvasolujen suuntaan, mutta insuliinivälitteisen glukoosinkuljetuksen häiritseminen näin teki.

5 KIITOKSET

Haluan kiittää lämpimästi Kaisa Ivaskaa asiantuntevasta ohjauksesta ja mahdollisuudesta tehdä tämä mielenkiintoinen Pro gradu -työ tutkimusryhmässä. Lisäksi haluan erityisesti kiittää Milja Arposta neuvoista ja ohjauksesta työn käytännön suorittamiseen, kiitän myös koko tutkimusryhmää yhteistyöstä ja avusta. Työn kirjoittamiseen liittyvästä avusta haluan kiittää biologian laitokselta Tiina Henttistä.

LÄHTEET

- Arponen, M., Jalava, N., Widjaja, N., & Ivaska, K. K. (2022). Glucose transporters GLUT1, GLUT3, and GLUT4 have different effects on osteoblast proliferation and metabolism. *Frontiers in Physiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1035516>
- Barnard, R. J., & Youngren, J. F. (1992). Regulation of glucose transport in skeletal muscle. *FASEB Journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6(14), 3238–3244. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.14.1426762>
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(2), 229–238. <https://doi.org/10.1002/jbmr.320>
- Booth, S. L., Centi, A., Smith, S. R., & Gundberg, C. (2013). The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator? *Nature Reviews Endocrinology*, 9(1), 43–55. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.201>
- Boskey, A. L. (2013). Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *BoneKEy Reports*, 2. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.181>
- Confavreux, C. B., Levine, R. L., & Karsenty, G. (2009). A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms [Article]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 310(1), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.04.004>
- Cornish, J., MacGibbon, A., Lin, J.-M., Watson, M., Callon, K. E., Tong, P. C., Dunford, J. E., van der Does, Y., Williams, G. A., Grey, A. B., Naot, D., & Reid, I. R. (2008). Modulation of Osteoclastogenesis by Fatty Acids. *Endocrinology*, 149(11), 5688–5695. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0111>
- Cunha, J. S., Ferreira, V. M., Maquigussa, E., Naves, M. A., & Boim, M. A. (2014). Effects of high glucose and high insulin concentrations on osteoblast function in vitro. *Cell and Tissue Research*, 358(1), 249–256. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1913-x>
- Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M. E., Pratipanawat, T., DeFronzo, R. A., Kahn, C. R., & Mandarino, L. J. (2000). Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase-

- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle [Article]. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(3), 311–320. <https://doi.org/10.1172/JCI7535>
- de Fougères, A., Vornlocher, H.-P., Maraganore, J., & Lieberman, J. (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(6), 443–453. <https://doi.org/10.1038/nrd2310>
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Donat, A., Knapstein, P.-R., Jiang, S., Baranowsky, A., Ballhause, T.-M., Frosch, K.-H., & Keller, J. (2021). Glucose Metabolism in Osteoblasts in Healthy and Pathophysiological Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4120. <https://doi.org/10.3390/ijms22084120>
- Fazeli, P. K., Horowitz, M. C., MacDougald, O. A., Scheller, E. L., Rodeheffer, M. S., Rosen, C. J., & Klibanski, A. (2013). Marrow Fat and Bone—New Perspectives. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(3), 935–945. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3634>
- Ferron, M., Wei, J., Yoshizawa, T., Del Fattore, A., DePinho, R. A., Teti, A., Ducy, P., & Karsenty, G. (2010). Insulin Signaling in Osteoblasts Integrates Bone Remodeling and Energy Metabolism [Article]. *Cell*, 142(2), 296–308. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.003>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fulzele, K., Riddle, R. C., DiGirolamo, D. J., Cao, X., Wan, C., Chen, D., Faugere, M.-C., Aja, S., Hussain, M. A., Brüning, J. C., & Clemens, T. L. (2010). Insulin Receptor Signaling in Osteoblasts Regulates Postnatal Bone Acquisition and Body Composition [Article]. *Cell*, 142(2), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.002>

- Gade, T. P., Motley, M. W., Beattie, B. J., Bhakta, R., Boskey, A. L., Koutcher, J. A., & Mayer-Kuckuk, P. (2011). Imaging of alkaline phosphatase activity in bone tissue [Article]. *PloS One*, 6(7), e22608–e22608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022608>
- Garofalo, R. S., Orena, S. J., Rafidi, K., Torchia, A. J., Stock, J. L., Hildebrandt, A. L., Coskran, T., Black, S. C., Brees, D. J., Wicks, J. R., McNeish, J. D., & Coleman, K. G. (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB β . *Journal of Clinical Investigation*, 112(2), 197–208. <https://doi.org/10.1172/JCI16885>
- Ghaben, A. L., & Scherer, P. E. (2019). Adipogenesis and metabolic health [Article]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(4), 242–258. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>
- Ghosh-Choudhary, S., Liu, J., & Finkel, T. (2020). Metabolic Regulation of Cell Fate and Function [Article]. *Trends in Cell Biology*, 30(3), 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.12.005>
- Griffith, J. F., Yeung, D. K. W., Ahuja, A. T., Choy, C. W. Y., Mei, W. Y., Lam, S. S. L., Lam, T. P., Chen, Z.-Y., & Leung, P. C. (2009). A study of bone marrow and subcutaneous fatty acid composition in subjects of varying bone mineral density. *Bone*, 44(6), 1092–1096. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.02.022>
- Guettier, J.-M., & Gorden, P. (2010). Insulin secretion and insulin-producing tumors [Article]. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 5(2), 217–227. <https://doi.org/10.1586/eem.09.83>
- Guo, S., & Kemphues, K. J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81(4), 611–620. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90082-9)
- Haeusler, R. A., McGraw, T. E., & Accili, D. (2018). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(1), 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>
- Hahn, T. J., Westbrook, S. L., Sullivan, T. L., Goodman, W. G., & Halstead, L. R. (1988). Glucose transport in osteoblast-enriched bone explants: characterization and insulin regulation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 3(3), 359–365. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650030317>

- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature*, 418(6894), 244–251.
<https://doi.org/10.1038/418244a>
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology*, 10(4), 413–417.
<https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7276–7280.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7276>
- Holman, G. D. (2020). Structure, function and regulation of mammalian glucose transporters of the SLC2 family. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 472(9), 1155–1175.
<https://doi.org/10.1007/s00424-020-02411-3>
- Invitrogen. (2019). *Product information sheet: alamarBlue™ HS Cell Viability Reagent*: . <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0018369-alarBlueHS-CellViabilityReagent-PI.pdf> [luettu 21.11.2023]
- James, D. E., Brown, R., Navarro, J., & Pilch, P. F. (1988). Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein [Article]. *Nature (London)*, 333(6169), 183–185. <https://doi.org/10.1038/333183a0>
- Janghorbani, M., Van Dam, R. M., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2007). Systematic Review of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Fracture [Article]. *American Journal of Epidemiology*, 166(5), 495–505. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm106>
- Ji, X., Seeley, R., Li, K., Song, F., Liao, X., Song, C., Angelozzi, M., Valeri, A., Marmo, T., Lee, W.-C., Shi, Y., & Long, F. (2023). Genetic activation of glycolysis in osteoblasts preserves bone mass in type I diabetes. *Cell Chemical Biology*, 30(9), 1053-1063.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2023.07.003>
- Kaplan, M. M. (1972). Alkaline phosphatase. *The New England journal of medicine*, 286(4), 200–202.
<https://doi.org/10.1056/NEJM197201272860407>

- Karner, C. M., & Long, F. (2018). Glucose metabolism in bone. *Bone*, *115*, 2–7.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.08.008>
- Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell*, *115*(2), 209–216. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00801-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00801-8)
- Kim, D.-H., Behlke, M. A., Rose, S. D., Chang, M.-S., Choi, S., & Rossi, J. J. (2005). Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature Biotechnology*, *23*(2), 222–226. <https://doi.org/10.1038/nbt1051>
- Kähkönen, T. E., Ivaska, K. K., Jiang, M., Büki, K. G., Väänänen, H. K., & Härkönen, P. L. (2018). Role of fibroblast growth factor receptors (FGFR) and FGFR like-1 (FGFRL1) in mesenchymal stromal cell differentiation to osteoblasts and adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *461*, 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.09.015>
- Könner, A. C., & Brüning, J. C. (2012). Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. [Article]. *Cell Metabolism*, *16*(2), 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.004>
- Lecka-Czernik, B. (2017). Diabetes, bone and glucose-lowering agents: basic biology. *Diabetologia*, *60*(7), 1163–1169. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4269-4>
- Lee, W.-C., Ji, X., Nissim, I., & Long, F. (2020). Malic Enzyme Couples Mitochondria with Aerobic Glycolysis in Osteoblasts. *Cell reports*, *32*(10), 108108.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108108>
- Li, Z., Frey, J. L., Wong, G. W., Faugere, M.-C., Wolfgang, M. J., Kim, J. K., Riddle, R. C., & Clemens, T. L. (2016). Glucose Transporter-4 Facilitates Insulin-Stimulated Glucose Uptake in Osteoblasts. *Endocrinology*, *157*(11), 4094–4103. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1583>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, *25*(4), 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ma, Y.-H. V., Schwartz, A. V., Sigurdsson, S., Hue, T. F., Lang, T. F., Harris, T. B., Rosen, C. J., Vittinghoff, E., Eiriksdottir, G., Hauksdottir, A. M., Siggeirsdottir, K., Sigurdsson, G., Okarsdottir, D., Napoli, N., Palermo, L., Gudnason, V., & Li, X. (2014). Circulating Sclerostin Associated

- With Vertebral Bone Marrow Fat in Older Men But Not Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(12), E2584–E2590. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-4493>
- Mackenzie, R., & Elliott, B. (2014). Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes [Article]. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 7(default), 55. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S48260>
- Manolagas, S. C., & Jilka, R. L. (1995). Bone Marrow, Cytokines, and Bone Remodeling — Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 332(5), 305–311. <https://doi.org/10.1056/NEJM199502023320506>
- McCoy, R. G., Faust, L., Heien, H. C., Patel, S., Caffo, B., & Ngufor, C. (2023). Longitudinal trajectories of glycemic control among U.S. Adults with newly diagnosed diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 205, 110989. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2023.110989>
- Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006), 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature02873>
- Molecular Probes. (2003). *Product Information: BODIPY Lipid Probes*. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp03792.pdf> [luettu 21.11.2023]
- Molecular Probes. (2005). *Product Information: Live/Dead viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells*. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp03224.pdf> [luettu 21.11.2023]
- Mueckler, M., & Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.001>
- Mutanen, M., Voutilainen, E., & Freese, R. (2021). *Ravitsemustiede; Hiilihydraatit ja ravintokuitu (Artikkelitunnus: rvt00049 (009.002))* (H. N. U. S. M. U. Marja Mutanen, Toim.). Kustannus Oy Duodecim.
- Mäkinen, S., Skrobuk, P., Hoang Nguyen, yen, & Koistinen, H. (2013). Insuliiniresistenssin mekanismit. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim*, 129(20), 2115–2122.

- Napoli, N., Chandran, M., Pierroz, D. D., Abrahamsen, B., Schwartz, A. V., & Ferrari, S. L. (2017). Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility [Article]. *Nature Reviews. Endocrinology*, 13(4), 208–219. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.153>
- National Library of Medicine. (2023, joulukuuta 14). *Basic Local Alignment Search Tool*. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Ning, K., Liu, S., Yang, B., Wang, R., Man, G., Wang, D., & Xu, H. (2022). Update on the effects of energy metabolism in bone marrow mesenchymal stem cells differentiation [Article]. *Molecular Metabolism (Germany)*, 58, 101450–101450. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101450>
- OriGene Technologies, I. (2023, marraskuuta 23). *siRNA (27-mer): A Potent Mechanism for Gene Silencing*. <https://www.origene.com/products/rnai/sirna-oligo-duplexes>. <https://www.origene.com/products/rnai/sirna-oligo-duplexes>
- Osborn, O., & Olefsky, J. M. (2012). The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. [Article]. *Nature Medicine*, 18(3), 363–374. <https://doi.org/10.1038/nm.2627>
- Pachot, A., Blond, J.-L., Mougin, B., & Miossec, P. (2004). Peptidylpropyl isomerase B (PPIB): a suitable reference gene for mRNA quantification in peripheral whole blood. *Journal of Biotechnology*, 114(1–2), 121–124. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.07.001>
- Parfitt, A. M. (1994). Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, 55(3), 273–286. <https://doi.org/10.1002/jcb.240550303>
- Peltola, E., Hannula, P., & Jaatinen, P. (2023). Diabetesta sairastamattoman aikuisen hypoglykemian syyt ja selvittely. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim*, 139(6), 436–445.
- Picke, A.-K., Campbell, G., Napoli, N., Hofbauer, L. C., & Rauner, M. (2019). Update on the impact of type 2 diabetes mellitus on bone metabolism and material properties. *Endocrine Connections*, 8(3), R55–R70. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0456>
- Pragallapati, S., & Manyam, R. (2019). Glucose transporter 1 in health and disease. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 23(3), 443. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_22_18

- Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M., & Mortensen, R. M. (1999). PPAR γ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro [Article]. *Molecular Cell*, 4(4), 611–617. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80211-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80211-7)
- Rossi, J. J., Kim, D.-H., Behlke, M. A., Rose, S. D., Chang, M.-S., & Choi, S. (2005). Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy [Article]. *Nature Biotechnology*, 23(2), 222–226. <https://doi.org/10.1038/nbt1051>
- Saltiel, A. R. (2021). Insulin signaling in health and disease [Article]. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(1). <https://doi.org/10.1172/JCI142241>
- Scheller, E. L., & Rosen, C. J. (2014). What's the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1311(1), 14–30. <https://doi.org/10.1111/nyas.12327>
- Setten, R. L., Rossi, J. J., & Han, S. (2019). The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(6), 421–446. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>
- Shen, L., Hu, G., & Karner, C. M. (2022). Bioenergetic Metabolism In Osteoblast Differentiation [Article]. *Current Osteoporosis Reports*, 20(1), 53–64. <https://doi.org/10.1007/s11914-022-00721-2>
- Siersbæk, R., Nielsen, R., & Mandrup, S. (2010). PPAR γ in adipocyte differentiation and metabolism – Novel insights from genome-wide studies. *FEBS Letters*, 584(15), 3242–3249. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.010>
- Sigma-Aldrich. (2023). *bisBenzimide H 33258*. 2023. <https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/product/sial/b2883> [luettu 21.11.2023]
- Song, F., Lee, W. D., Marmo, T., Ji, X., Song, C., Liao, X., Seeley, R., Yao, L., Liu, H., & Long, F. (2023). Osteoblast-intrinsic defect in glucose metabolism impairs bone formation in type II diabetic male mice [Article]. *ELife*, 12. <https://doi.org/10.7554/eLife.85714>
- Srivastava, R. K., Sapra, L., & Mishra, P. K. (2022). Osteometabolism: Metabolic Alterations in Bone Pathologies [Article]. *Cells*, 11(23), 3943. <https://doi.org/10.3390/cells11233943>

- Suda, T., Takahashi, N., & Martin, T. (1992). Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine reviews*, 13(1), 66–80. <https://doi.org/10.1210/er.13.1.66>
- Tencerova, M., Okla, M., & Kassem, M. (2019). Insulin Signaling in Bone Marrow Adipocytes. *Current Osteoporosis Reports*, 17(6), 446–454. <https://doi.org/10.1007/s11914-019-00552-8>
- Thorens, B., & Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(2), E141–E145. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00712.2009>
- Traber, G. M., & Yu, A.-M. (2023). RNAi-Based Therapeutics and Novel RNA Bioengineering Technologies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 384(1), 133–154. <https://doi.org/10.1124/jpet.122.001234>
- Virkamäki, A., & Niskanen, L. (2009). *Glukoosiainenvaihdunnan fysiologia; Endokrinologia* (S. T. D. L. Välimäki M, Toim.). Gummerus.
- Walle, M., Whittier, D. E., Frost, M., Müller, R., & Collins, C. J. (2022). Meta-analysis of Diabetes Mellitus-Associated Differences in Bone Structure Assessed by High-Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography. *Current Osteoporosis Reports*, 20(6), 398–409. <https://doi.org/10.1007/s11914-022-00755-6>
- Wang, H., Leng, Y., & Gong, Y. (2018). Bone Marrow Fat and Hematopoiesis. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00694>
- Wei, J., Ferron, M., Clarke, C. J., Hannun, Y. A., Jiang, H., Blaner, W. S., & Karsenty, G. (2014). Bone-specific insulin resistance disrupts whole-body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation [Article]. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(4), 1–13. <https://doi.org/10.1172/JCI72323>
- Weng, J., & Su, Y. (2013). Nuclear matrix-targeting of the osteogenic factor Runx2 is essential for its recognition and activation of the alkaline phosphatase gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(3), 2839–2852. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.12.021>
- White, M. F. (1997). The insulin signalling system and the IRS proteins [Article]. *Diabetologia*, 40(2), S2–S17. <https://doi.org/10.1007/s001250051387>

Zhu, X.-X., Yan, Y.-W., Chen, D., Ai, C.-Z., Lu, X., Xu, S.-S., Jiang, S., Zhong, G.-S., Chen, D.-B., & Jiang, Y.-Z. (2016). Long non-coding RNA HoxA-AS3 interacts with EZH2 to regulate lineage commitment of mesenchymal stem cells. *Oncotarget*, 7(39), 63561–63570.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.11538>

Zuo, B., Zhu, J., Li, J., Wang, C., Zhao, X., Cai, G., Li, Z., Peng, J., Wang, P., Shen, C., Huang, Y., Xu, J., Zhang, X., & Chen, X. (2015). microRNA-103a Functions as a Mechanosensitive microRNA to Inhibit Bone Formation Through Targeting Runx2 [Article]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 30(2), 330–345. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2352>