

**LUURANKOLIAHAKSEN GEENIEKSPRESSIO JA PERIN-
NÖLLINEN KESTÄVYYSSUORITUSKYKY**

Katri Pullinen

Kandidaatin tutkielma

LFY.A005

Kevät 2007

Liikuntabiologian laitos

Jyväskylän yliopisto

Työn ohjaajat: Antti Mero, Riikka

Kivelä, Maarit Lehti

TIIVISTELMÄ

Pullinen, Katri 2007. Luurankoliuksen geeniekspressio ja perinnöllinen kestävyyskyky. Liikuntabiologian laitos, Jyväskylän yliopisto. Liikuntafysiologian Kandidaatin tutkielma, 49 s.

Perinnöllistä kestävyyskykyä ja kestävyysharjoittelun aiheuttamia adaptaatioita voidaan tutkia geeniekspressiotasolla tekemällä microarray-analyysi. Kestävyysharjoittelun aiheuttamia adaptaatioita tutkittaessa on havaittu muun muassa mitokondrioiden biogeneesiin ja metaboliaan liittyvien geenien ilmenemisen kasvua. Kestävyyskyvyn perinnöllisyyttä ei ole tutkittu geeniekspressiotasolla ihmisillä eikä eläimillä. Ihmisillä se on erittäin hankalaa, joten sitä varten voidaan luoda eläinkantoja, joissa geneettinen ja ympäristön vaihtelu on minimoitu. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, minkälaisia eroja löytyy perinnöllisesti korkean ja matalan juoksupasiteetin rottien, jotka eivät harjoitelleet, luurankoliuksen geenien ilmenemisessä ja mitkä geenit tai geeniryhmät ovat yhteydessä kestävyyskykyyn.

Koe-eläiminä oli geneettisesti heterogeenisten rottien (N:NIH kanta) jälkeläisiä. 12 korkean (HCR) ja 12 matalan (LCR) juoksupasiteetin rotan m. gastrocnemiuksesta otettiin näyte microarray-analyysiä varten. Microarray-analyysissä käytettiin Illuminan RatRef-12 Expression BeadChip sirua ja tulokset analysoitiin R-kielillä ja Bioconductorin siihen lisäämällä paketeilla. Jokaiselle geenille laskettiin intensiteetti-arvojen keskiarvo, keskihajonta ja kertamuutos. Kiinnostavat geenit suodatettiin perustuen muokattuun P-arvoon. Annotaatiossa käytettiin DAVID bioinformatiikka webtyökalua ja muita internetin geenitietokantasivustoja.

Geenien ilmenemismuutosten määrä ja suunta laskettiin merkitsevyytasoilla 0,01, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 ja 0,25. Merkitsevyytasoilla 0,01 31 geenin ekspressio oli kasvanut ja 23 geenin ekspressio laskenut. Suurin osa muutoksista tapahtui pienillä intensiteeteillä ja moni näistä muutoksista oli melko pieni. Merkitsevyytasoilla 0,05 geenit luokiteltiin eri ryhmiin. Geenien ilmeneminen oli suurempaa HCR rotilla mitokondrioon, karboksyylihappometaboliaan, lipidimetaboliaan, oksidoreduktaasiaktiivisuuteen ja immuunivasteeseen liittyvissä geneeissä. Geenien ilmeneminen oli suurempaa LCR rotilla lipidikataboliaan, solujen tukirangan proteiinien sitoutumiseen ja proteiinimetaboliaan liittyvissä geneeissä.

Tutkimuksessa havaitut geeniekspressioerot HCR ja LCR rottien välillä selittävät eroja kestävyyskyvyssä. Suuremmat ilmenemistasot lipidimetaboliaan liittyvillä geneeillä kertovat paremmasta rasvojen hajotuskyvystä ja rasvahappojen nopeammasta ja tehokkaammasta hapetuksesta, jolloin rasvoja pystytään käyttämään paremmin energianlähteenä. Myös mitokondrioiden kyky tuottaa ATP:ta on parempi, mistä kertoo sitruunahappokierron ja elektroninsiirtoketjun geenien ekspression kasvu.

Avainsanat: kestävyyskyky, luurankolihas, geeniekspressio, perinnöllisyys

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ

1 JOHDANTO.....	5
2 PERINNÖLLISYYS JA KESTÄVYSSUORITUSKYKY	
2.1 Kestävyysuorituskyky ja sitä selittävät tekijät.....	7
2.2 Perinnöllisyyden vaikutus kestävyysuorituskykyyn	
2.2.1 Kestävyysuorituskyky kokonaisuutena.....	8
2.2.2 Maksimaalinen hapenotto (VO ₂ max).....	9
2.2.3 Lihaskudostaso.....	9
3 KESTÄVYSSHARJOITTELU JA LUURANKOLIAKSEN ADAPTAATIO	
3.1 Lihassolutyypit ja lihassolujakauma.....	11
3.2 Energiantuotto ja energiavarastot.....	12
3.3 Verenkierto ja kapillarisaatio.....	13
3.4 Mitokondriot ja entsyymiaktiivisuudet.....	14
4 KESTÄVYSSHARJOITTELUN VAIKUTUS LUURANKOLIAKSEN GEENIEN ILMENEMISEEN	
4.1 Geenien ilmeneminen.....	16
4.2 Yksittäinen kestävyysuoritus.....	16
4.3 Kestävyysuoritusjakso.....	18
4.4 Pitkäaikainen kestävyysuoritus.....	19
5 TUTKIMUSONGELMA JA HYPOTEESIT.....	21
6 MENETELMÄT	
6.1 Koe-eläimet ja koeasetelma.....	22
6.2 Aineiston analyysi	
6.2.1 RNA eristys.....	23

6.2.2 Microarray-analyysi.....	24
6.3 Tilastollinen analyysi.....	25
7 TULOKSET	
7.1 Geenien ilmenemismuutosten määrä ja suunta eri merkitsevyystasoilla.....	28
7.2 Muutokset geeneittäin merkitsevyystasolla 0,01.....	28
7.3 Geenien ilmenemismuutosten määrä ja suunta eri ryhmissä merkitsevyystasolla 0,05.....	29
8 POHDINTA	
8.1 Päätulokset.....	36
8.2 Lipidimetabolia.....	36
8.3 Energiantuotto.....	37
8.4 Yhteenveto.....	38
9 LÄHTEET	42
10 LIITE 1. R:n esimerkkikoodi datan käsittelystä	46
LIITE 2. R:n esimerkkikoodi tietojen keräämisestä DAVID:ia varten.....	49

1 JOHDANTO

Kestävyys- ja suorituskyvyn perinnöllisyyttä on tutkittu pääasiassa kaksostutkimuksilla ja perheillä tehtävien tutkimusten kautta (esim. Rico-Sanz ym. 2003; Bouchard ym. 1986). Näiden tutkimusten perusteella tiedetään, että perinnöllisyydellä on vaikutusta kestävyys- ja suorituskykyyn. Kestävyys- ja suorituskykyä ja sen perinnöllisyyttä on tutkittu ihmisillä kokonaisuutena sekä selvittämällä yksittäisten kestävyys- ja suorituskykyä selittävien tekijöiden perinnöllisyyttä. Esimerkiksi maksimaaliseen hapenotto- ja suorituskykyyn ($VO_2\text{max/kg}$) geneettisillä tekijöillä uskotaan olevan noin 40 % vaikutus. (Bouchard ym. 1996.) Lihas- ja energiametaboliareittien entsyymien aktiivisuuksia pidetään ainakin osittain periytyvinä ominaisuuksina (Rico-Sanz ym. 2003; Hamel ym. 1986). Vaikka kestävyys- ja suorituskyky määräytyykin osittain perinnöllisesti, voidaan siihen vaikuttaa huomattavasti myös harjoittelulla. Perinnöllisyyden ja harjoittelun osuudet kestävyys- ja suorituskyvyn taustalla on kuitenkin vielä epäselvät. (McArdle ym. 2001, 236–237.)

Kestävyys- ja suorituskyvyn aiheuttamia adaptaatioita luurankolihas- ja suorituskykyssä on tutkittu 1900-luvun puolivälin jälkeen paljon (esim. Holloszy 1967). Sitten 2000-luvun puolella tutkimuksessa on alettu hyödyntämään microarray- eli mikrosiruteknologiaa (esim. Mahoney ym. 2005). Mikrosiruteknologiaa käytetään geenien ilmenemisen tutkimiseen. Sen avulla voidaan tutkia geenien ekspressiota koko genomin tasolla. (Wong 2005, 15.) Mikrosiruteknologian avulla pystytään tutkimaan luurankolihas- ja suorituskyvyn geenien ilmenemistä ja miten kestävyys- ja suorituskyvyn harjoittelu on vaikuttanut ilmenemistasoihin vertaamalla geeniekspressiota ennen kestävyys- ja suorituskyvyn harjoittelua ja kestävyys- ja suorituskyvyn harjoittelun jälkeen. Yksittäisen kestävyys- ja suorituskyvyn harjoituksen on todettu aktivoivan muun muassa metaboliaa ja mitokondrioiden biogeneesiin liittyviä geenejä. (Mahoney ym. 2005.)

Kestävyys- ja suorituskyvyn perinnöllisyydestä geeniekspressiotasolla ei ole vielä tutkimuksia. Eläintutkimukset ovat tällä hetkellä ainoa lähestymistapa, koska kestävyys- ja suorituskyvyn perinnöllisyyttä on hankalaa tutkia ihmisillä. Kestävyys- ja suorituskyvyn perinnöllisyyttä voidaan tutkia eläinmallien avulla. Tällöin perinnöllisen kestävyys- ja suorituskyvyn taustalla olevia tekijöitä voidaan määrittää luotettavammin, koska geneettinen ja

ympäristön vaihtelu voidaan minimoida. Samaan tarkkuuteen ei ihmisillä tehtävillä tutkimuksilla päästä. (Koch & Britton 2001.)

Tässä tutkimuksessa kestävyys- ja suorituskyvyn perinnöllisyyttä on tutkittu perinnöllisesti korkean (HCR) ja matalan (LCR) juoksukapasiteetin rotilla. Ero kestävyys- ja suorituskyvyssä rottien välillä johtuu nimenomaan perinnöllisistä tekijöistä eikä kestävyys- ja suorituskyvyn harjoittelusta, koska rotat eivät harjoittele. Tutkittaessa luurankolihas- ja kestävyys- ja suorituskyvyn perinnöllisyyttä lähtökohtana ovat kestävyys- ja suorituskyvyn harjoittelututkimukset ja kestävyys- ja suorituskyvyn harjoittelun aikaansaamat muutokset luurankolihas- ja kestävyys- ja suorituskyvyn geenien ilmenemisessä, koska aikaisempia tutkimuksia perinnöllisistä luurankolihas- ja kestävyys- ja suorituskyvyn geeniekspressioeroista ei ole. Tämän tutkimuksen tarkoituksena onkin selvittää, minkälaisia eroja löytyy perinnöllisesti korkean ja matalan juoksukapasiteetin rottien luurankolihas- ja kestävyys- ja suorituskyvyn geenien ilmenemisessä ja mitkä geenit tai geeniryhmät ovat yhteydessä kestävyys- ja suorituskykyyn.

2 PERINNÖLLISYYS JA KESTÄVYYSSUORITUSKYKY

2.1 Kestävyysuorituskyky ja sitä selittävät tekijät

Kestävyys määritellään ajaksi, jonka henkilö jaksaa tehdä työtä tietyllä intensiteetillä (Bompa 1999, 344). Elimistön kyky vastustaa väsymystä fyysisen kuormituksen aikana kertoo kestävyiden tasosta (Keskinen ym. 2004, 51). Kestävyys voidaan jakaa yleiseen ja spesifiseen kestävyteen. Kun puhutaan yleisestä kestävydestä, tarkoitetaan kykyä suoriutua tehtävästä, jossa käytetään useita lihasryhmiä ja useita kehon systeemejä (neurouskulaarinen systeemi, hengitys- ja verenkiertoelimistö, keskushermosto). Spesifinen suorituskyky liittyy tietyn urheilulajin vaatimuksiin, ja sen perustana on yleinen kestävyys. (Bompa 1999, 344.)

Kestävyysuorituskyky tarkoittaa aerobista potentiaalia eli kehon kykyä tuottaa energiaa hapen avulla (Bompa 1999, 346). Aerobinen energiantuotto eli energiantuotto hapen läsnä ollessa muuttuu hallitsevimmaksi, kun suorituksen kesto ylittää kaksi minuuttia (McArdle ym. 2001, 165). Kestävyysuorituskykyyn vaikuttaa maksimaalinen hapenotto-
kyky (VO_2max), pitkäaikainen aerobinen kestävyys, suorituksen taloudellisuus ja hermolihasjärjestelmän suorituskykyisyys (Keskinen ym. 2004, 51). Maksimaalista hapenotto-
kykyä pidetään tärkeimpänä kestävyysuorituskyvyn määrittäjänä (McArdle ym. 2001, 231). Hengitys- ja verenkiertoelimistön ja lihassolujen kyky kuljettaa happea ke-
hossa rajoittaa aerobista tehoa ja kapasiteettia joten hapenkuljetussysteemin kehittämi-
nen on kestävyysuorituskyvyn kannalta oleellista (Bompa 1999, 346). Myös lihasten
kyky käyttää happea ja lihaskudostason tekijät (kapillaaritiheys, entsyymit, mitokondri-
ot, lihassolutyypit) vaikuttavat kestävyysuorituskykyyn (McArdle ym. 2001, 231).

2.2 Perinnöllisyyden vaikutus kestävyysuorituskykyyn

2.2.1 Kestävyysuorituskyky kokonaisuutena

Useimmat fyysiseen suorituskykyyn ja siten kestävyysuorituskykyyn liittyvät tekijät ovat perinnöllisiä (MacArthur & North 2005; McArdle ym. 2001, 236). Sitä, missä määrin perintötekijät määräävät jotakin ominaisuutta ja kuinka paljon harjoittelulla voidaan vaikuttaa, ei vielä tarkkaan tiedetä (McArdle ym. 2001, 236–237). Perinnöllisyyden on todettu vaikuttavan merkittävästi kestävyysuorituskykyyn, huomattavasti enemmän kuin maksimaaliseen aerobiseen tehoon (Bouchard ym. 1986). Tarpeeksi kuormittava harjoitusohjelma parantaa jokaisen henkilön kuntoa, mutta miten paljon kunto voi parantua ja kuinka suuria adaptaatioita harjoitus voi saada aikaan, määräytyy perinnöllisyyden mukaan. Henkilön herkkyys maksimaaliselle aerobiselle tai anaerobiselle harjoittelulle riippuu paljon geneeistä. (McArdle ym. 2001, 484–485.) Arvioitaessa perinnöllisyyden osuutta kestävyysuorituskyvystä kaksostutkimusten ja perhetutkimusten kautta kaksostutkimuksista saadaan yleensä suurempia geneettisten tekijöiden osuuksia. Tuloksia pitää kuitenkin tulkita varauksella, koska esimerkiksi geneettisiä vaikutuksia ja ei-geneettisiä perhevaikutuksia ei välttämättä voida erottaa toisistaan. (Bouchard ym. 1998.)

Sekä Bouchard ym. (1986) että Hamel ym. (1986) ovat tutkineet kestävyysuorituskyvyn perinnöllisyyttä mittaamalla kokonaistyön 90 minuutin maksimaalisessa polkupyöräergometritestissä. Bouchard ym. (1986) löysivät merkittävän geneettisen vaikutuksen kestävyysuorituskykyyn huomioiden kuitenkin sen, että koko vaikutus ei välttämättä liity perinnöllisyyteen vaan ympäristötekijät pitää ottaa huomioon. Perinnöllisyyden osuuden todettiin olevan 60–65 % kestävyysuorituskyvystä rasvatonta kehonpainoa kohden (FFM kg) ja noin 70 % suuruinen koko kehonpainoa kohden (kg) (Bouchard ym. 1986). Hamelin ym. (1986) mukaan kestävyysuorituskyvyn aiheuttama vaste kestävyysuorituskyvyssä määräytyy suurelta osin (65–80 %) perintötekijöiden mukaan. Etenkin kun päästään lähelle omaa maksimia kestävyysuorituskyvyssä, geneettisen kontrollin osuus kasvaa harjoitusvasteen määrittäjänä (Hamel ym. 1986).

2.2.2 Maksimaalinen hapenottokyky (VO_2max)

Nykyään uskotaan, että perintötekijät selittävät 25–40 % maksimaalisesta hapenottokyvystä (VO_2max) (McArdle ym. 2001, 236–237). Bouchard ym. (1986) tutki maksimaalisen hapenottokyvyn perinnöllisyyttä kaksostutkimuksessaan. VO_2max :n perinnöllisyys suhteutettuna kehon painoon ($\text{VO}_2\text{max/kg}$) arvioitiin 40 % suuruiseksi, kun taas perinnöllisyys rasvatonta kehonpainoa kohden ($\text{VO}_2\text{max/FFW kg}$) oli kuitenkin enää vain 10 %. 10 % arviota pidettiin realistisempänä 40 % arvion ollessa todennäköisesti liian korkea otettaessa huomioon mahdolliset ympäristön vaikutukset $\text{VO}_2\text{max/kg}$:ssa. (Bouchard ym. 1986.) Perinnöllisyyden osuudeksi maksimaalisessa hapenottokyvystä (suhteutettuna kehon massaan, $\text{VO}_2\text{max/kg}$) on saatu suurempikin, noin 50 % suuruinen arvio. Tähän vaikutti ainakin osittain, geneettisten tekijöiden lisäksi, perheympäristö, joten se on maksimaalinen perinnöllisyyden vaikutus geneettisen vaikutuksen jäädessä todennäköisesti alle 50 %:n. (Bouchard ym. 1998.) Hamelin ym. (1986) mukaan kestävyysharjoittelun aiheuttama vaste VO_2max :ssa määräytyy suurelta osin (65–80 %) perintötekijöiden mukaan.

2.2.3 Lihaskudostaso

Lihassolujakauman perinnöllisyydestä on kaksi näkemystä: lihassolujakauma määräytyy täysin perintötekijöiden mukaan tai lihassolujakauma määräytyy vain osittain perintötekijöiden mukaan ja siihen voidaan vaikuttaa fyysisellä aktiivisuudella. (Simoneau & Bouchard 1995.) Taylorin ja Bachmanin (1999) mukaan lihassolujakauma määräytyy ainakin osittain perinnöllisesti. Siihen voidaan vaikuttaa fyysisellä aktiivisuudella, mutta kuinka merkittävästi, se on vielä epäselvää. (Taylor & Bachmann 1999.) Hamelin ym. (1986) mukaan yksilöiden välinen vaihtelevuus lihassolujakaumassa on geneettisesti määrätty eikä kestävyysharjoittelu vaikuttanut siihen merkittävästi. Rico-Sanz ym. (2003) eivät löytäneet merkittävää vastaavuutta lihassolutyypin osuuksien ja perinnöllisyyden välillä, joten pääasiallisen vaikutuksen lihassolujakaumaan todettiin olevan fyysisellä aktiivisuudella. Simoneau ja Bouchard (1995) arvioivat ympäristöllä olevan noin 40 % ja geneettisillä tekijöillä noin 45 % merkitys yksilöiden välisten lihasso-

lujakaumien eroon. Jäljelle jäävä 15 % selitettiin näytteenotosta tulleilla virheillä ja teknisillä virheillä. (Simoneau & Bouchard 1995.)

Perintötekijöillä saattaa olla vaikutusta lihassolujen poikkipinta-alaan, johon kuitenkin voidaan vaikuttaa myös harjoittelulla. Ainoastaan tyypin I lihassolujen pinta-alan todettiin olevan osittain periytyvää. Muuten voidaan sanoa, että ympäristötekijöillä on suuri rooli lihasten pinta-alan määrittäjänä. (Rico-Sanz ym. 2003.)

Genotyyppi on tärkeä tekijä kapillaarien kehittämisessä oksidatiivisille lihaksille, ja genotyyppi vaikuttaaakin tyypin I ja II lihassolujen kapillaaritiheyksiin sekä solujen pinta-alaan kapillaaria kohden. Kuitenkaan kestävyysharjoittelun aiheuttamaan kapillaaritiheyden kasvuun ei vaikuta merkittävästi perintötekijät vaan enemmän fyysisen aktiivisuuden metaboliset vaatimukset. (Rico-Sanz ym. 2003.)

Perinnöllisillä tekijöillä on suuri vaikutus energiametaboliareittien entsyymien aktiivisuuksiin kuten korkeaenergisten fosfaattien, hiilihydraatti- ja rasva-aineenvaihdunnan entsyymeihin. Monotsygooteilla kaksosilla oli suurempi yhtäläisyys fosfofruktokinaasi, oksaaliglutaraatti dehydrogenaasi, glyseraldehydi fosfaattidehydrogenaasi ja 3- β -hydroksiasyyli CoA dehydrogenaasi entsyymien aktiivisuuksissa kuin ditsygooteilla kaksosilla. (Rico-Sanz ym. 2003.) Energiametaboliareittien entsyymien vaste kestävyysharjoitteluun on osittain perinnöllistä (Rico-Sanz ym. 2003; Hamel ym. 1986). Perimä vaikuttaa etenkin kun ollaan lähellä henkilökohtaista maksimaalista suorituskykyä (Hamel ym. 1986). Useiden fosfageeni-, glykolyyttisiin ja oksidatiivisiin energiametaboliareitteihin liittyvien entsyymien aktiivisuudet kasvoivat kestävyysharjoitteluohjelman seurauksena ja nämä muutokset olivat hyvin samankaltaisia samaan perheeseen kuuluvilla koehenkilöillä. (Rico-Sanz ym. 2003.)

3 KESTÄVYYSHARJOITTELU JA LUURANKOLIIHAKSEN ADAPTAATIO

3.1 Lihassolutyypit ja lihassolujakauma

Lihassolutyyppejä voidaan määrittää niiden rakenteellisten ja toiminnallisten ominaisuuksien erojen perusteella. Eräs tapa on käyttää myosiinin raskasketjujen isoformeja määrittämisen perustana. Lihassolussa voi olla joko vain yhtä myosiinin raskasketjun isoformia tai useampia isoformeja. Näiden perusteella lihassolut voidaan jakaa hitaiksi tyyppin I soluiksi ja kolmeksi nopeaksi tyyppiä, jotka ovat Iia, Iid (käytetään myös nimeä Iix) ja Iib. (Pette & Staron 2000.)

Lihassolujakauma mukautuu säännölliseen kestävyysharjoitteluun (Rico-Sanz ym. 2003; Taylor & Bachman 1999). Vielä ei tiedetä, kuinka suuria muutoksia kestävyysharjoittelu voi saada aikaan lihassolujakaumassa (Taylor & Bachman 1999). Tyyppin I lihassolujen osuuden on todettu kasvavan aerobisen harjoittelun seurauksena (Rico-Sanz ym. 2003; Thayer ym. 2000). Tyyppin Iix lihassolujen osuus taas pienenee (Rico-Sanz ym. 2003). Yleisesti ottaen kestävyysharjoittelun seurauksena tyyppin I lihassolujen osuus kasvaa suuremmaksi kuin tyyppin II lihassolujen osuus (Thayer ym. 2000).

Lihassolutyyppien muutoksesta toiseksi ihmisillä kestävyysharjoittelun seurauksena on tällä hetkellä vain rajoitetusti todisteita (Thayer ym. 2000). Kestävyysharjoittelu saattaa aiheuttaa tyyppin Iib lihassolujen muuttumista tyyppin Iia lihassoluiksi (McArdle ym. 2001, 533; Thayer ym. 2000). Lihassolut voivat siitä edelleen muuttua tyyppin I soluiksi, jos takana on vähintään kymmenen vuoden kestävyysharjoittelu. Tällöin tyyppin I lihassolujen osuus kasvaa ja lihas on siten erittäin sopeutunut aerobiseen työhön. Jos lihassolu on muuttunut tyyppin Iib solusta tyyppin Iia soluksi, sillä voi olla rajoittunut kapasiteetti kasvattaa oksidatiivista potentiaaliaan kestävyysharjoittelun seurauksena. (Thayer ym. 2000.) Hamel ym. (1986) eivät kuitenkaan havainneet lihassolutyyppien muutoksia 15 viikon kestävyysharjoitusohjelman jälkeen.

Kestävyysharjoittelun seurauksena hitaiden lihassolujen pinta-ala kasvaa. Tämä on kuitenkin spesifistä harjoittelulle, joten vaikutus kohdistuu vain aktiivisiin lihaksiin. (McArdle ym. 2001, 467, 477; Thayer ym. 2000.) Nopeiden lihassolujen pinta-ala ei muutu, mutta niiden oksidatiivinen potentiaali paranee (McArdle ym. 2001, 467, 477).

3.2 Energiatuotto ja energiavarastot

Kestävyysharjoittelun seurauksena lihasten kapasiteetti tuottaa adenosiinitrifosfaattia (ATP) aerobisesti paranee, kun taas kyky tuottaa ATP:ta anaerobisesti ei muutu (Oscal & Holloszy 1971). Lihassolut, sekä nopeat että hitaat, maksimoivat aerobisen potentiaalinsa kestävyysharjoittelun seurauksena (McArdle ym. 2001, 467; Taylor & Bachman 1999). Kuitenkin tyypin I ja IIa lihassolut pystyvät paremmin hyödyntämään aerobisia metabolisia energiantuottoreittejä kuin tyypin IIb lihassolut (Taylor & Bachman 1999). Kestävyysharjoittelun seurauksena eri substraattien käyttö energiantuotannossa submaksimaalisessa kuormituksessa muuttuu: rasvojen metabolia kasvaa ja hiilihydraattien metabolia vähenee (McArdle ym. 2001, 467; Taylor & Bachman 1999; Matoba & Gollnick 1984). Tällöin veren glukoosin homeostaasi säilyy paremmin, mihin vaikuttaa myös parantunut maksan glukoneogeesikapasiteetti (McArdle ym. 2001, 467).

Rasvojen katabolia kasvaa kestävyysharjoittelun seurauksena. Kyky mobilisoida, kuljettaa ja hapettaa rasvahappoja paranee submaksimaalisessa kuormituksessa, jolloin rasvahapoista saadaan enemmän energiaa. (McArdle ym. 2001, 467.) Lihasten sisäiset triglyseridivarastot kasvavat (McArdle ym. 2001, 467; Matoba & Gollnick 1984). Lihakset pystyvät myös käyttämään tehokkaammin näitä triglyseridivarastoja ensisijaisena rasvahappojen lähteenä, vaikka rasvahappoja myös vapautuu helpommin rasvakudoksesta (McArdle ym. 2001, 467; Taylor & Bachman 1999). Solunsisäisten lipidivarastojen kasvu keskittyy yleensä mitokondrioiden lähelle, jolloin ne ovat helposti käytettävissä mitokondrioissa aerobisessa energiantuotannossa. Tämän takia aerobisesti harjoitettu lihas käyttää mitokondrioissa hapetuksessa enemmän rasvoja kuin hiilihydraatteja. (Hoppeler 1986.)

Aerobisesti harjoitetuilla lihaksilla on parempi kapasiteetti hapettaa hiilihydraatteja maksimaalisessa kuormituksessa (McArdle ym. 2001, 467). Submaksimaalisessa kuormituksessa taas hiilihydraattien käyttö energianlähteenä vähenee rasvahappojen käytön kasvaessa, jolloin glykogeenia säästyy (McArdle ym. 2001, 467; Taylor & Bachman 1999; Matoba & Gollnick 1984). Lihaksen glykokeenin käyttö vähenee ja glukoosia vapautuu vähemmän maksasta (glykogenolyysi ja glukoneogeneesi) vereen (McArdle ym. 2001, 467). Kun aktiivisissa lihaksissa käytetään vähemmän glykogeenia, muodostuu myös vähemmän laktaattia (Matoba & Gollnick 1984). Oikeanlainen ravinto yhdistettynä kestävyysharjoitteluun kasvattaa lihaksen glykokeenivarastoja. Lihaksen kapasiteetti säästää glykogeenia on suorassa suhteessa kestävyysharjoittelun aiheuttamaan aktiivisuustason kasvuun Krebsin syklistä ja elektroninsiirtoketjussa. (Taylor & Bachman 1999.)

3.3 Verenkierto ja kapillarisaatio

Kestävyysharjoittelun vaikutuksesta luurankolihasen verenkierto kasvaa maksimaalisessa kuormituksessa. Tämä johtuu suuremmasta maksimaalisesta sydämen työmäärästä, verenkierron tehokkaammasta siirtymisestä ei-aktiivisilta kudoksilta lihaksille, kapillaarien määrän kasvusta ja valtimoiden ja laskimoiden poikkipinta-alan kasvusta. Submaksimaalisessa kuormituksessa kestävyysharjoittelun seurauksena suurin osa verenkierrosta ohjautuu oksidatiivisille lihaksille (paljon tyyppin I lihassoluja) matalaoksidatiivisten lihasten sijaan (paljon tyyppin IIb lihassoluja). Aktiivinen lihas tarvitsee submaksimaalisessa kuormituksessa suhteellisesti vähemmän verta, koska lihaksen kyky kuljettaa, irrottaa ja käyttää happea on parantunut. (McArdle ym. 2001, 474.)

Lihaksen kapillaaritiheys kasvaa kestävyysharjoittelun seurauksena (Rico-Sanz ym. 2003; McArdle ym. 2001, 362; Matoba & Gollnick 1984). Tämän takia sama verimäärä kulkee kauemmin saman lihastilavuuden läpi ja lihassoluilla on suurempi aineenvaihtopinta-ala (Matoba & Gollnick 1984). Kapillaarien suhde lihassolua kohden on suurempi kestävyysharjoittelujakson jälkeen. Tämä tekee hapen, ravintoaineiden ja hormonien kulkeutumisen lihassolulle helpommaksi ja sekä lämpö että aineenvaihdunnan sivutuotteet kulkeutuvat helpommin pois lihassoluista. (McArdle ym. 2001, 362.) Voi-

daan sanoa myös, että lihassolun pinta-alan suhde kapillaaria kohden pienenee kestävyysharjoittelun seurauksena, minkä Rico-Sanz ym. (2003) havaitsi tapahtuvan kaikissa lihassolutyypeissä. Kapillarisaatiota tapahtuu korkeaintensiteettisen kestävyysharjoittelun jälkeen yhtä paljon hitaiden ja nopeiden lihassolujen ympärillä (Jensen ym. 2004).

3.4 Mitokondriot ja entsyymiaktiivisuudet

Aerobisesti harjoitetussa lihaksessa on enemmän ja suurempia mitokondrioita (McArdle ym. 2001, 467; Taylor & Bachman 1999; Matoba & Gollnick 1984). Tämän vuoksi metaboliiteilla, kofaktoreilla ja aineenvaihdunnan lopputuotteilla on suurempi siirtymispinta-ala (Taylor & Bachman 1999). Sarkolemmen alaisten mitokondrioiden on todettu lisääntyvän enemmän kuin fibrillien välisten mitokondrioiden ja muutokset mitokondrioidissa keskittyvät vain lihaksiin, jotka osallistuvat mekaanisen energian tuottoon (Hoppeler 1986).

Entsyymejä syntetisoidaan enemmän, jolloin niiden aktiivisuus myös kasvaa (Taylor & Bachman 1999; Hamel ym. 1986). Etenkin tyypin I lihassoluissa mitokondrioiden tiheys ja mitokondrioiden entsyymien aktiivisuus, kuten sukkiinaattidehydrogenaasin (SDH) aktiivisuus kasvaa (Taylor & Bachman 1999). Myös sytokromioksidaasin ja sitraattisyntetaasin aktiivisuuden on todettu kasvavan (Short ym. 2003; Taylor & Bachman 1999). SDH:n ja sytokromioksidaasin aktiivisuuden muutoksen suuruus on suorassa suhteessa mitokondrioiden tilavuuden muutokseen (Hoppeler 1986).

Holloszyn tutkimus (1967) oli ensimmäisiä tutkimuksia, joka osoitti mitokondrioiden määrän kasvavan rotilla kestävyysharjoittelun seurauksena. Mitokondrioiden kokonaisproteiinimäärä kasvoi 60 %. Myös mitokondrioiden kyky hapettaa pyruvaattia kaksinkertaistui kestävyysharjoittelun johdosta. Lihasten sytokromi c:n, joka on hengitysketjun yksi komponentti, aktiivisuus kasvoi kestävyysharjoittelun seurauksena, kun kestävyysharjoittelu oli tarpeeksi kuormittavaa. Mitokondrioiden elektroninsiirtoketjun aktiivisuuden kasvu johtui siten hengitysketjun entsyymiaktiivisuuksien (sytokromioksidaasi, sukkiinaattioksidaasi, sukkiinaattidehydrogenaasi, nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti (NADH tai DPNH) dehydrogenaasi, nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti

(NADH tai DPNH) sytokromi c reduktaasi) kasvusta. Kestävyysharjoittelun johdosta mitokondrioilla oli parempi respiratorinen kontrolli ja tiukasti säädelty oksidatiivinen fosforylaatio. (Holloszy 1967.) Tämän seurauksena ATP:n muodostamiskapasiteetti oksidatiivisen fosforylaation kautta paranee (McArdle ym. 2001; Taylor & Bachman 1999; Holloszy 1967).

Kestävyysharjoittelu saa aikaan koordinoitua ja määrällistä kasvua luurankolihasen mitokondrioiden rakenneosissa, kuten esimerkiksi mitochondrial coupling factorissa (F_1). F_1 on mitokondrion kristojen rakennekomponentti ja merkittävä tekijä, joka yhdistää fosforylaation hapetukseen. F_1 :n määrä kasvaa samassa suhteessa hengitysketjun komponenttien (adenosiinitrifosfaasi, sytokromi c) kanssa aerobisen harjoittelun seurauksena. (Oscal & Holloszy 1971.)

Kovatehoinen kestävyysharjoittelu nostaa glykolyyttisten entsyymien, fosfofruktokinaasin ja heksokinaasin, aktiivisuutta, glykokeenin käyttöön ja varastoitumiseen osallistuvien entsyymien sekä lipoproteiinilipaasin aktiivisuutta (Taylor & Bachman 1999). Myös 15 viikon koko ajan tehoiltaan kasvava kestävyysharjoitteluohjelma nosti heksokinaasin ja fosfofruktokinaasin aktiivisuutta (Hamel ym. 1986). β -oksidaatioon osallistuvien entsyymien aktiivisuus kasvaa kestävyysharjoittelun seurauksena, mikä johtaa rasvahappojen suurempaan hapettamiseen (Taylor & Bachman 1999; Matoba & Gollnick 1984).

4 KESTÄVYYSHARJOITTELUN VAIKUTUS LUURANKOLIHAKSEN GEENIEN ILMENEMISEEN

4.1 Geenien ilmeneminen

Geenien ilmeneminen eli ekspressoituminen tarkoittaa geenin proteiinituotteen muodostumista. Geenien ilmeneminen koostuu useasta vaiheesta: mRNA:n synteesi, mRNA:n transkription jälkeinen muokkaus, mRNA:n hajotus, translaatio, proteiinin translaation jälkeinen muokkaus, proteiinien hajotus ja proteiinien kuljetus kohteeseen. Geenien ilmeneminen on tarkasti säädeltyä, koska eri vaiheet vaativat paljon energiaa ja saatavilla oleva energia pyritään käyttämään optimaalisesti. Säätelystä voi tapahtua jokaisessa geenien ilmenemisen vaiheessa. Tehokkaimmat säätelymekanismit toimivat ilmenemisen alussa transkription aloituksen tasolla. (Nelson & Cox 2000, 1072–1073.)

Vain osa koko genomien geneeistä ekspressoituu tietyllä hetkellä. Housekeeping geneiksi kutsutaan niitä geneejiä, joiden tuotteita tarvitaan koko ajan tietty määrä ja nämä geenit ekspressoituvat jokaisessa solussa koko ajan lähes vakiotasolla. Toisten geenien ekspressio taas vaihtelee tilanteen ja ajankohdan mukaan. Esimerkiksi solun erikoistuminen tiettyyn toimintoon tai solun energianlähteen muuttuminen saavat aikaan tiettyjen geenien ekspression kasvun tai laskun. (Nelson & Cox 2000, 1072–1074.)

4.2 Yksittäinen kestävyysharjoitus

Yksittäisen kestävyysasuorituksen on todettu aiheuttavan sekä välittömiä että vasta tietyn ajan jälkeen tapahtuvia muutoksia geenien ilmenemisessä. Joidenkin geenien ekspressio voi myös palata normaalitasolleen melko nopeasti, kun taas niiden geenien, joilla on pitkittynyt vaste, ekspressio vasta muuttuu, kun toisten palaa normaalitasolleen. (Mahoney ym. 2005.)

Mahoney ym. (2005) tutki yksittäisen kestävyysasuorituksen vaikutusta geenien ekspressiotasoihin sekä kolme että 48 tuntia harjoituksen jälkeen. Määrällisesti enemmän

muutoksia tapahtui heti (kolme tuntia) harjoituksen jälkeen kuin kahden vuorokauden kuluttua. Näiden geenien arveltiin olevan tärkeitä harjoituksesta palautumiseen ja adaptaatioon liittyviä geenejä. Metaboliaan ja mitokondrioiden biogeneesiin liittyvien geenien (PGC1 α , PDK4, PPAR α , PPAR δ , PPAR γ , FOXO1, NRBF-2) ekspressio kasvoi nopeasti ja koordinoitusti ja liittyi rasvojen käyttöön energianlähteenä (etenkin harjoituksen loppuksi) sekä mitokondrioiden kapasiteettiin käyttäen rasvoja energiantuotannossa. Hapistressiin (MTI–VII) ja signaalointiin liittyvien geenien nopeasti kasvanut ekspressio kertoi happiradikaalien käsittelyn lisääntyneestä tarpeesta heti harjoituksen jälkeen. Elektrolyyttitasapainoon liittyvien geenien (β 3, SERCA3, CLCN4) ekspressio kasvoi myös. Solun stressiin, proteolyysiin, apoptoosiin ja replikaatioon liittyvien geenien ekspressio kasvoi. Tämä osoittaa, että kestävyysharjoituksen, joka aiheuttaa lihasvaurioita, tulehdusta ja apoptoosia, vaste syntyy transkriptiotasolla. (Mahoney ym. 2005.)

Yksittäisen kestävyysharjoituksen on todettu aiheuttavan PGC-1 α :n ilmenemisen kasvua harjoituksen jälkeen (Mahoney ym. 2005; Norrbom ym. 2003; Pilegaard ym. 2003). PGC-1 α (peroxisome proliferator activated receptor co-activator 1 α) on eräs tekijä, joka osallistuu kestävyysharjoittelun aiheuttamien toiminnallisten ja rakenteellisten muutosten säätelyyn. PGC-1 α pystyy sitoutumaan ja vaikuttamaan useaan transkriptiofaktoriin ja on olennainen lihassolutyypissä ja lihassolujen oksidatiivista kapasiteettia määräävä tekijä. (Norrbom ym. 2003.) Uskotaan myös, että PGC-1 α :lla on tärkeä rooli mitokondrioiden biogeneesiin liittyvien geenien aktivoinnissa (Pilegaard ym. 2003). Norrbom ym. (2003) havaitsi PGC-1 α :n mRNA tasojen kasvun 45 minuutin polvenojennusharjoituksen jälkeen. Solujen metaboliaan liittyvät tekijät olivat tärkeitä PGC-1 α geenin ilmenemistasojen kasvussa. MCIP-1:n mRNA tasot kasvoivat harjoituksen jälkeen, mikä saattaa kertoa, että harjoitus aktivoi kalsineurinin, joka taas liittyy PGC-1 α :n transkription aktivaatioon. (Norrbom ym. 2003.) Toisessa polvenojennusharjoituksessa PGC-1 α :n mRNA tasot olivat korkeimmillaan kaksi tuntia harjoituksen jälkeen. PGC-1 α :lla saattaa siten olla tärkeä rooli lihaksen harjoitusvasteeseen liittyvien geenien transkription aktivoimisessa. (Pilegaard ym. 2003.) Sekä Norrbom ym. (2003) että Pilegaard ym. (2003) ehdottavat, että kestävyysharjoituksen aiheuttamaa PGC-1 α :n aktivoitumista saattaa selittää kalsiumin signaalintimekanismit, kuten kalsineurinin signaalintireitin sensitiivisyyden kasvu.

4.3 Kestävyysharjoittelujakso

Kestävyysharjoittelujakson jälkeen on todettu muutoksia useiden geenien ilmenemisessä (Radom-Aizik ym. 2005; Timmons ym. 2005; Wu ym. 2003). Vanhoilla, fyysisesti inaktiivisilla miehillä tehdyssä tutkimuksessa useat lihaksen rakenteeseen, supistumiseen ja kehittymiseen sekä energiantuottoreitteihin liittyvät geenit yliekspressoituivat ja lihaksen kataboliaan liittyvät geenit aliekspressoituvat kolmen kuukauden kestävävysharjoittelun jälkeen. Lihaksen kasvuun ja toimintaan sekä signaalinvälitykseen ja hemin biosynteesiin liittyvät geenit, jotka yliekspressoituvat, ovat tärkeitä lihaksen kehittymiselle ja harjoittelulla aikaansaadun suorituskyvyn ylläpidolle. Proteiinien hajoamiseen ja transkription säätelyyn liittyvien geenien (esim. myogeneesia inhiboiva HES-1) ekspressio pieneni, kuten myös 35 ribosomaalisen proteiinin geenin ekspressio, mikä kertoo luurankolihasen vasteesta harjoittelulle. (Radom-Aizik ym. 2005.)

Oksidatiivisten geenien (OXPHOS geeniperhe) ekspression on todettu kasvavan miehillä kestävävysharjoitusjakson jälkeen (Timmons ym. 2005). Myös oksidatiiviseen fosforylaatioon liittyvien mitokondrioproteiinien tason on todettu kasvavan hiirillä, jotka saivat juosta vapaaehtoisesti juoksupyörässä (Wu ym. 2003). Mitokondriaalisten geenien lähetti RNA-tasot kasvoivat COX4 ja ND4 geenien kohdalla neljän kuukauden kestävävysharjoittelun seurauksena. Myös mitokondrioiden biogeneesiin liittyvien geenien (PGC-1 α (energiantuottoreittien avainsäätelijä), NRF-1 (transkriptiofaktori), TFAM (oksidatiivisen metaboliaan liittyvä geeni)) ekspressio kasvoi. (Short ym. 2003.) Mitokondrioiden entsyymien aktiivisuudet kasvavat kestävävysharjoittelun seurauksena ja tämä näkyy myös geeniekspressiotasolla. Lipidien metaboliaan liittyvien geenien ekspressio kasvaa aerobisen harjoittelun seurauksena, mikä kertoo lisääntyneestä lihaksen rasvojen käytöstä hiilihydraattien kustannuksella. (Radom-Aizik ym. 2005.)

Ekspression kasvua on havaittu myös solun ulkopuolisen matriksin (ECM) uudelleenorganisointumiseen liittyvissä geneeissä (ECM:n kehittyminen ja kypsyminen). Kestävävysharjoittelujakso pienensi dystrofiinigeenin ekspressiota. Dystrofiini liittyy mekaanisten signaalien välittämiseen ECM:stä solun sisälle solurankaan. Integrini ja lamiini signaalintisytemien komponenttien ekspressio nousi kestävävysharjoittelujakson jälkeen, mikä kertoi toiminnallisista adaptaatioista vasteena lihasten aktiivisuudelle.

Lihaksen PPAR δ :n aktivoitumisen on todettu liittyvän parantuneeseen fyysiseen kestävyys suorituskykyyn ja lihastyypin muuttumiseen toiseksi. PPAR δ :n aktiivinen muoto saa aikaan oksidatiivisten entsyymien määrän kasvua, mitokondrioiden biogeneesiä ja tyypin I lihassolujen supistukseen liittyvien proteiinien tuotantoa. Nimenomaan PPAR δ :n aktivoituminen tai aktivoiva signaali on olennainen, ei niinkään pelkkä PPAR δ :n tasojen kasvu. Sitä, miten kestävyys harjoittelu aiheuttaa PPAR δ :n aktiivisuuden kasvua, ei vielä tarkkaan tiedetä. Kestävyys harjoittelu aikaansaa rasvojen käytön kasvua, ja siten rasvahappojen ja niiden aineenvaihduntatuotteiden epäillään aktivoivan PPAR δ :aa. Toisen mallin mukaan kestävyys harjoittelun kasvattaa PGC-1 α :n ekspresiota, joka sitten aktivoi PPAR δ :n. (Wang ym. 2004.)

5 TUTKIMUSONGELMA JA HYPOTEESIT

Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää perinnöllisyyden ja kestävyysuorituskyvyn välistä yhteyttä tutkimalla perinnöllisesti korkean (HCR) ja matalan (LCR) juoksukapasiteetin rottien luurankolihasen (m. gastrocnemius eli kaksoiskantalihas) geeniekspressoeroja. Tutkimuksen avulla yritetään saada tietoa perinnöllisen kestävyysuorituskyvyn taustalla olevista mekanismeista sekä hyvään ja huonoon kestävyysuorituskykyyn yhteydessä olevista geneistä ja niiden ilmenemistasojen eroista HCR ja LCR rottien välillä.

Tutkimusongelma

- Minkälaisia eroja löytyy perinnöllisesti korkean ja matalan juoksukapasiteetin rottien luurankolihasen geenien ilmenemisessä?

Hypoteesit

1. Aerobiseen energiantuottoon mitokondriossa liittyvien geenien ilmeneminen on suurempaa HCR rotilla kuin LCR rotilla.
2. Rasvojen aineenvaihduntaan liittyvien geenien ilmeneminen on suurempaa HCR rotilla kuin LCR rotilla.

6 MENETELMÄT

6.1 Koe-eläimet ja koeasetelma

Tutkimuksessa käytetyt rotat olivat Kansallisen Terveystieteiden tutkimuskeskuksen (the National Institutes of Health) geneettisesti heterogeenisten rottien (N:NIH kanta) jälkeläisiä. Kannan luominen aloitettiin vuonna 1996. Lähtöpopulaatioon kuului 96 uros- ja naarasrottaa, joilla ei ollut samoja vanhempia, jotta geneettinen vaihtelu olisi suurempaa. Kaksi rottaa eli samassa häkissä ja ne saivat ruokaa ja vettä. Valo-pimeärytmi oli 12:12 tuntia. (Koch & Britton 2001.)

Jokaiselta rotalta arvioitiin aerobinen juoksukapasiteetti kymmenen viikon ikäisenä. Tämä protokolla kesti kaksi viikkoa. Ensimmäisellä viikolla rottia totutettiin juoksupyörään asteittain kovenevalla vauhdilla. Toisella viikolla arvioitiin jokaisen rotan maksimaalinen kestävyysjuoksukapasiteetti viiden päivän aikana. Jokaisena päivänä rotta juoksi tietyn protokollan mukaan niin kauan, kunnes ei enää jaksanut. Näiden päivien yksittäistä pisintä juostua matkaa (metreissä) käytettiin aerobisen kestävyyskapasiteetin arviona ja sitä pidettiin tärkeimpänä kestävyysjuoksukapasiteetin perinnölliseen komponenttiin liittyvänä tekijänä. (Koch & Britton 2001.)

Juostun matkan perusteella valittiin molemmista sukupuolista 13 parhaan ja 13 heikoin kapasiteetin rottaa, jotka risteytettiin omissa ryhmissään satunnaisesti keskenään. Jälkeläisiä kasvatettiin samalla tavalla ja niille tehtiin samanlainen aerobisen juoksukapasiteetin arviointi kuin ensimmäiselle sukupolvelle ja jaettiin hyvän ja heikon suorituskyvyn ryhmiin samoin perustein. (Koch & Britton 2001.)

Lähtöpopulaatio juoksi 355 ± 11 m (naaraat juoksivat pidemmälle kuin urokset). Kuidun sukupolven kohdalla linjojen välinen juoksukapasiteetti erosi 171 % heikon juoksukapasiteetin rottien (LCR) juostessa 310 ± 8 m ja HCR rottien juostessa 839 ± 21 m. Suurin osa syntyneestä erosta johtui korkean juoksukapasiteetin rotissa (HCR) tapahtuneista muutoksista. (Koch & Britton 2001.) 11. sukupolven kohdalla ero oli kasvanut

suuremmaksi 347 %:iin HCR rottien juostessa 853 ± 315 m ja LCR rottien juostessa 191 ± 70 m (Wisløff ym. 2005).

Tutkimukseen mukaan otetut rotat olivat lähtöpopulaation rottien jälkeläisiä 18. sukupolvessa ja kaikki olivat naaraita. Rotat kuuluivat kahteen ryhmään: hyvän (HCR) ja huonon (LCR) juoksukapasiteetin rottiin. Molemmissa ryhmissä oli 12 rottaa. Rotat tuotiin USA:sta Suomeen Jyväskylän yliopiston koe-eläintiloihin, jossa ne asuivat (kaksi rottaa samassa häkissä) ensin – palauduttuaan matkasta – juoksupyörällisissä häkeissä kolmen viikon ajan ja sen jälkeen kuuden viikon ajan häkeissä, joissa ei ollut juoksupyörää. Valo-pimeärytmi oli 12:12 tuntia, ilmankosteus rottien asuinhuoneessa oli noin 75 % ja lämpötila 20 °C. Rotilla oli häkeissään vettä ja ruokaa.

6.2 Aineiston analyysi

6.2.1 RNA eristys

Rotat olivat kahdeksan kuukauden ikäisiä, kun ne lopetettiin niskamurrolla ja preparoitiin heti sen jälkeen. Tähän tutkimukseen otettiin mukaan pohjekompleksista gastrocnemius lihas, josta otettiin jokaiselta 24 rotalta näytteet microarray-analyysiä varten.

Rottien oikean jalan gastrocnemiuksesta eristettiin totaali-RNA:ta käyttäen TRIzol[®]-reagenssia (Invitrogen). Lihasnäyte homogenisoitiin kyseessä olevaan liuokseen, joka suojelee RNA:ta, hajottaa soluja ja liuottaa solun osia ja näytteen paino määritettiin. Kloroformin lisäyksen ja sentrifugoinnin jälkeen syntynyt vesifaasi, joka sisältää RNA:n, kerättiin pipetillä uuteen eppendorf-putkeen, johon RNA saostettiin. Pelletti liuotettiin DEPC-veteen ja totaali-RNA oli saatu eristetyksi.

RNA-pitoisuuden ja laadun määrittämiseksi tehtiin laimennos, josta mitattiin spektrofotometrillä absorbanssit aallonpituuksilla 260 nm ja 280 nm. RNA:n konsentraatio saatiin kaavasta: $c(\text{RNA}) = A_{260} \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{laim. kerroin}$. A_{260} / A_{280} suhde kertoo näytteen puhtaudesta, joka on puhtaalle RNA:lle 2. RNA-näytteet ajettiin myös agarosigeelissä,

jolla tarkistettiin, että RNA on ehjää. Näytteiden RNA:t ovat ehjiä, jos geelillä nähdään UV-valossa kaksi juovaa (28S ja 18S ribosomaalinen RNA).

6.2.2 Microarray-analyysi

Microarray-analyysi tehtiin Turun biotekniikkakeskuksen microarray-keskuksessa. Analyysissä käytettiin Illuminan (USA, San Diego) BeadArray teknologiaa. BeadArray-teknologia perustuu mikrokaivoihin tasaisesti kiinnittyviin – joko optisiin kuituihin tai piilevyihin - kolmen mikrometrin piipisaroihin. Pisaroissa (bead) olevat tietyn oligonukleotidin sadattuhannet kopiot toimivat tunnistussekvenssinä Illuminan analyyseissä (DNA, RNA). BeadArray teknologian vahvuuksia ovat erinomainen laatukontrolli, jokaisen elementin suuri edustavuus ja joustavuus. 96-sample Array Matrix ja multi-sample BeadChip ovat Illuminan kaksi formaattia, joita käytetään DNA- ja RNA-sovelluksissa. (Illumina 2007.)

Tässä tutkimuksessa käytettiin Illuminan RatRef-12 Expression BeadChip sirua (kuva 1), jolla voidaan tutkia rotan koko genomia (Illumina 2007). Kahdelle sirulle hybridisoiittiin kaikki 24 näytettä (12 HCR, 12 LCR). RatRef-12 Expression BeadChip sirulla on yli 22000 koetinta (22523), joiden valinnassa on käytetty NCBI RefSeq tietokantaa (Release 16) (Illumina 2007).



Kuva 1. Illuminan RatRef-12 Expression BeadChip siru, johon voidaan hybridisoida 12 näytettä.
<http://www.illumina.com> (2007)

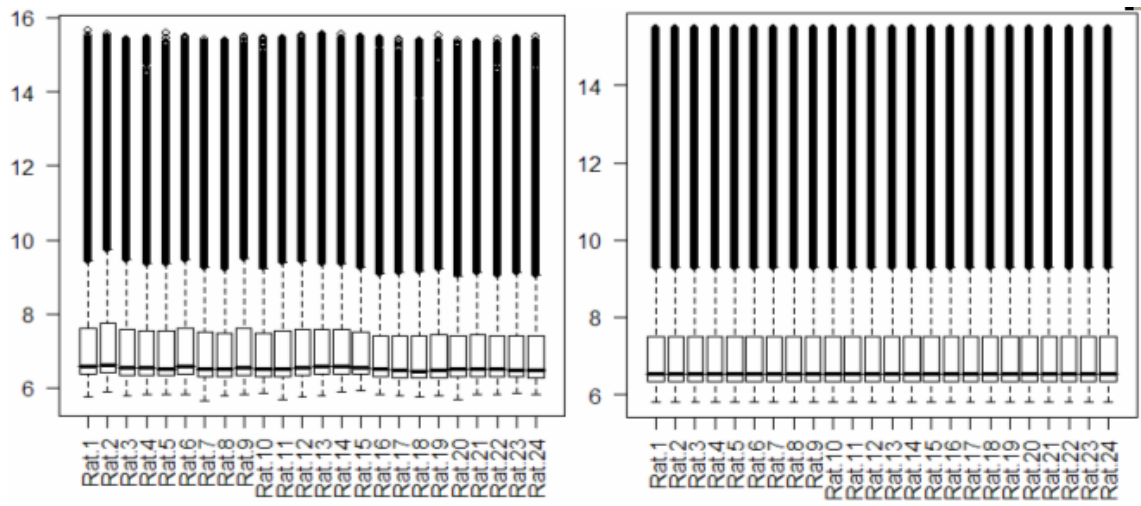
Illuminan microarray-analyysissä on kolme vaihetta: näytteen merkkäus, hybridisaatio ja tulosten analysointi. Näytteiden merkkäamisvaiheessa RNA käännetään cDNA:ksi, puhdistetaan ja yhdistetään hybridisaatioreagenssien kanssa. Hybridisaatiovaiheeseen kuuluu näytteiden hybridisointi, viisi pesua ja viimeisenä kuivaus. Illuminan microarray-analyysin loppuvaiheessa sirut skannataan ja sen jälkeen analysoidaan data. (Finnish DNA Microarray Centre 2007.) Tutkimuksen siruille (kaksi RatRef-12 Expression BeadChip sirua) tehtiin kaksi skannausta, joista valittiin parempi (PMT-arvo 551). Hybridisaation kontrolliraportin, jonka mukaan muun muassa häiriön (noise) intensiteetti oli tarpeeksi pieni verrattuna taustan intensiteettiin ja housekeeping geenien signaali oli selkeästi suurempi kuin kaikkien geenien keskimääräinen signaali, perusteella voidaan sanoa, että näytteet olivat hyvälaatuisia.

6.3 Microarray-tulosten tilastollinen analyysi

Microarray-tulosten analysointiin käytettiin R-kieltä/ympäristöä, joka sisältää tilastollisia ja graafisia tekniikoita. R on vapaasti ladattavissa internetistä (<http://www.R-project.org>) ja sitä voidaan laajentaa erilaisilla paketeilla. (R Development Core Team 2006.) Osa paketeista on R:n omia paketteja. Lisää paketteja genomidatan analyysiin ja tulkintaan voi ladata Bioconductorin internetsivuilta (<http://www.bioconductor.org>) (Gentleman ym. 2004). Analyysissä käytettiin seuraavia R:n ja Bioconductorin paketteja: beadarray (Dunning 2006), affy (Irizarry 2006), amap (Lucas 2007), limma (Smyth 2004), genefilter (Gentleman 2007) ja gplots (Warnes 2006).

Datan käsittely R:llä (liite 1) alkoi intensiteettisignaaliarvojen poiminnalla microarray-analyysistä saadusta tiedostosta. Tiedostoa muutettiin hieman poistamalla kaksi viimeistä saraketta, joissa oli ontologiatietoja, tiedoston käsittelyn helpottamiseksi. Nämä tiedot lisättiin myöhemmin lopulliseen tiedostoon. Datan laadusta saatiin käsitys piirtämällä boxplot-kuvaajat näytteistä (kuva 2). Jakaumat olivat lähes samanlaisia, mikä kertoo hyvästä laadusta. Datan normalisointiin käytettiin affy-paketin quantiles-normalisointia (Irizarry 2006). Normalisoinnin jälkeen näytteiden jakaumat olivat samanlaisia (kuva

2).



Kuva 2. Näytteiden boxplot-kuvaajat ennen (vasen) ja jälkeen (oikea) normalisoinnin.

Tämän jälkeen laskettiin Pearsonin korrelaatiokeroimet ja klusteroitiin näytteet vastaavalla Pearsonin metriikalla. Korrelaatiot olivat erittäin hyviä, joten tekninen variaatio oli todella pientä. Datalle tehtiin lineaarinen mallinnus limma-paketilla (Smyth 2004). Tässä käytettiin Bayesin mallinnusta. Kaikille geneille laskettiin t-statistiikan mukaiset P-arvot, mutta lisäksi laskettiin muunnetut P-arvot (adjusted p-values, adjPVal) Benjamin-Hochberg algoritmilla, mikä kontrolloi väärin löydösten määrää (false discovery rate). Tämän on todettu olevan luotettavampi ja tehokkaampi. Sekä HCR että LCR ryhmille laskettiin jokaiselle geenille intensiteettiarvojen keskiarvo, keskihajonta ja logFC (FC=fold change, kertamuutos). Lopullisiin tietoihin lisättiin vielä tarvittavat annotaatiot ja tallennettiin koko sirun tiedot yhdeksi tiedostoksi. Kiinnostavat geenit suodatettiin perustuen muokattuun P-arvoon, jolloin saatiin erilaisia listoja yliekspressoituneista ja aliekspressoituneista geneistä halutulla ehdolla HCR ja LCR ryhmien välillä. Muokattua P-arvoa eli merkitsevyytensä vaihdeltiin sen ollessa pienimmillään 0,01 ja suurimmillaan 0,25. Tämän perusteella saatiin geenilistoja, joissa oli eri määrä genejä ehtojen mukaan. Kaikkien geenien listaan lisättiin lopuksi Rat12Asta-paketilla EntrezID:t (liite 2), mikä helpottaa annotaatiota.

Annotaatioissa käytettiin DAVID bioinformatiikka webtyökalua (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) (Dennis ym. 2003). DAVID:ssa on annotaatio-työkaluja, joiden avulla voidaan analysoida geenilistojen taustalla olevia biologisia merkityksiä. Tätä varten merkittävien geenien listoista kerättiin R:llä EntrezID:t erilli-

seen tiedostoon (liite 2), joka syötettiin DAVID:iin. Merkitsevyydellä 0,01 muuttuneiden geenien tietoja kerättiin DAVID:n geenitiedoista ja lisäksi käytettiin UniProt (www.uniprot.org) ja NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) internetsivustoja. Merkitsevyydellä 0,05 geenien ryhmittelyyn käytettiin DAVID:n Functional Annotation – työkalua. Geenit ryhmiteltiin Gene Ontology –termien mukaisesti. Ryhmittelyssä käytettiin DAVID:n P-arvoa eli EASE-scorea, joka on modifioitu Fisher Exact P-Value. Lisäksi geenien säätelyreittien selvittämisessä käytettiin GenMapp (<http://www.genmapp.org/>) ja KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) internetsivustoja.

7 TULOKSET

7.1 Geenien ilmenemismuutosten määrä ja suunta eri merkitsevyystasoilla

Geenien ilmenemismuutosten määrittämiseen käytettiin kuutta eri merkitsevyystasoa (muokattu P-arvo, adjPVal), kun korkean juoksupasiteetin rottia (HCR) verrattiin matalan juoksupasiteetin rottiin (LCR). Tiukimmalla merkitsevyystasolla ($P < 0,01$) muutoksia löytyi vähiten (54 kpl). Yli- ja aliekspressoituneiden geenien määrä HCR ja LCR rottien välillä oli suunnilleen sama eron ollessa suurimmillaan 29 merkitsevyystasolla 0,15. Merkitsevyystasot ja niillä löydetty muutokset näkyvät taulukossa 1.

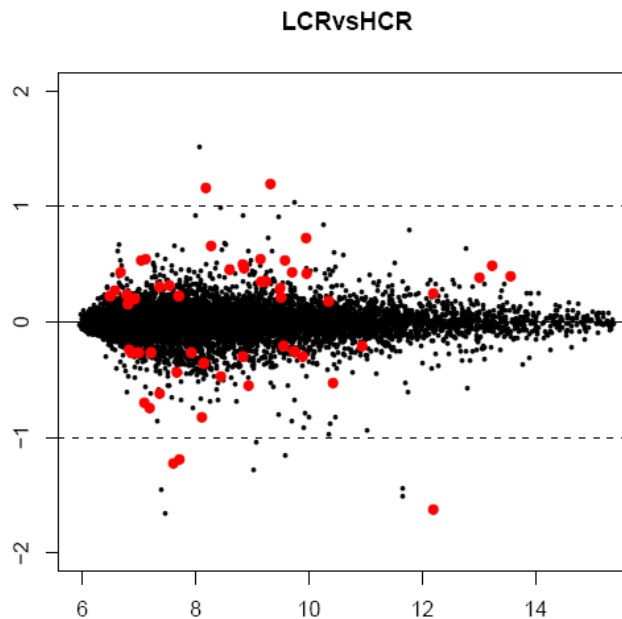
Taulukko 1. Geenien ekspressiomuutokset eri merkitsevyystasoilla, kun HCR rottia verrataan LCR rottiin. Ekspressio \uparrow = ekspressio suurempi HCR rotilla. Ekspressio \downarrow = ekspressio suurempi LCR rotilla.

Merkitsevyystaso	Ekspressio \uparrow	Ekspressio \downarrow	Muutoksia yhteensä
0,01	31	23	54
0,05	126	113	239
0,1	270	274	544
0,15	380	409	789
0,2	500	523	1023
0,25	636	653	1289

7.2 Muutokset geneittäin merkitsevyystasolla 0,01

Merkitsevyystasolla 0,01 löytyi yhteensä 54 muutosta HCR ja LCR rottien välillä. 31 geenin ekspressio oli suurempi HCR rotilla kuin LCR rotilla ja 23 geenin ekspressio oli suurempi LCR rotilla kuin HCR rotilla. (Taulukko 1.) Taulukossa 2 esitetään geenit, joiden ekspressio oli suurempi HCR rotilla verrattuna LCR rottiin. Taulukossa 3 esitetään geenit, joiden ekspressio oli suurempi LCR rotilla verrattuna HCR rottiin. Geenit on järjestetty kummassakin taulukossa merkitsevyysjärjestykseen alkaen geenistä, jonka muutos on ollut tilastollisesti merkittävin. Molemmassa taulukoissa on jokaisen geenin Entrez ID, muokattu P-arvo (adjPVal), geenin nimi, proteiinin nimi ja tehtävä (jos löydetty). Kuvassa 1 on esitetty kaikki merkitsevyystasolla 0,01 muuttuneet geenit punai-

sella MA-plot-kuvaajassa. Suurin osa tilastollisesti merkittävistä muutoksista on tapahtunut pienillä intensiteeteillä ja moni näistä muutoksista on ollut melko pieni.



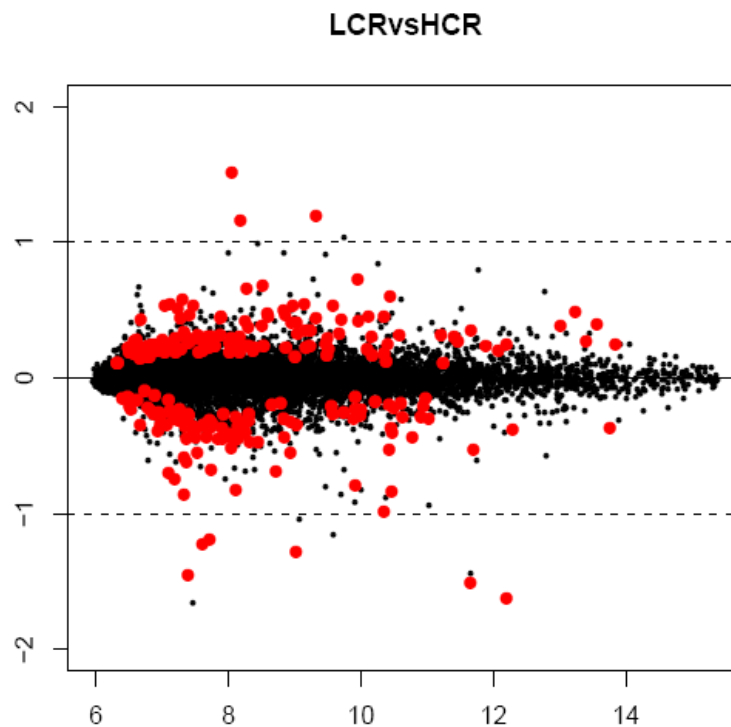
Kuva 3. Muuttuneet geenit punaisella merkitsevyystasolla 0,01. y-akseli: muutoksen suunta ja suuruus. x-akseli: intensiteetti.

7.3 Geenien ilmenemismuutosten määrä ja suunta eri ryhmissä merkitsevyystasolla 0,05

Merkitsevyystasolla 0,05 muuttuneiden geenien määrä ja ilmenemismuutosten suunta eri ryhmissä on esitetty taulukossa 4. Seitsemän mitokondrioon ja yhdeksän karboksyylihappometaboliaan liittyvän geenin ilmeneminen oli suurempaa ($P < 0,01$) HCR rotilla. Muuttuneet mitokondrioon liittyvät geenit koodasivat mitokondrion ulomman ja sisemmän kalvon rakenneosia. Lipidimetaboliaan liittyvien geenien ilmeneminen oli myös suurempaa ($P < 0,1$) HCR rotilla lukuun ottamatta kolmea lipidikataboliaan liittyvää geeniä (Srd5a2, Pccb, Pla2g7), joiden ekspressio oli suurempaa ($P < 0,01$) LCR rotilla. Lipidimetabolian alaluokista erityisesti rasvahappometaboliaan liittyvien neljän geenin (Hadhb, Acadsb, Prkag2, Cpt1a), joista kolme osallistuu rasvojen β -oksidointiin (Hadhb, Acadsb, Cpt1a) ekspressio oli suurempi HCR rotilla, $P < 0,1$ ja $P < 0,01$ vastaavasti. Oksidoreduktaasiaktiivisuuteen ja immuunivasteeseen liittyvien geenien ilmeneminen oli suurempaa ($P < 0,1$) HCR rotilla. LCR rotilla ilmeneminen oli suurempaa

kuudessa solujen tukirangan proteiinien sitoutumiseen liittyvässä geenissä ($P < 0,01$) sekä 16 proteiinimetaboliaan liittyvässä geenissä ($P < 0,05$).

Kuvassa 2 on kaikki merkitsevyydellä 0,05 muuttuneet geenit merkitty punaisella MA-plot-kuvaajassa. Suurin osa muutoksista on tapahtunut pienillä intensiteeteillä. Verrattuna merkitsevyydellä 0,01 nyt lähes kaikki suurimmat muutoksetkin ovat tilastollisesti merkittävien muutosten joukossa.



Kuva 4. Muuttuneet geenit punaisella merkitsevyydellä 0,05. y-akseli: muutoksen suunta ja suuruus. x-akseli: intensiteetti.

Taulukko 2. Geenit, joiden ekspressio oli suurempi HCR rotilla kuin LCR rotilla merkitsevyytasolla 0,01.

ENTREZ ID	adj.P.Val	Geeni	Proteiini	Tehtävä
	1.31E-06	LOC367398	similar to 60S ribosomal protein L17 (L23)	ribosomin 60S alayksikön komponentti; translaatio
291434	3.63E-06	Rp117	60S ribosomal protein L17	ribosomin 60S alayksikön komponentti; translaatio
	0.000147118	LOC360435	hypothetical gene supported by NM_017354	proteiinia koodaava geeni
	0.000316415	LOC499677	similar to Lix1 homolog (mouse) like	proteiinia koodaava geeni
	0.000520318	Zadh1	zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 1 (predicted)	sinkki-ionien sitominen
500950	0.000541571	RGD1565419	similar to zinc finger protein 75	ihmisellä vastaava sinkki-ionien sitominen; transkription säätely
294945	0.00076378	RGD1562890	hypothetical LOC294945	hypothetical protein XP_238219 (predicted)
373542	0.002010146	Stk25	serine/threonine kinase 25 (STE20 homolog, yeast)	ATP:n sitominen; proteiinien aminohappojen fosforylaatio
24368	0.002870303	Fh	fumarate hydratase 1, mitochondrial precursor	sitruunahappokierron entsyymi
286938	0.003121881	Gimap4	GTPase, IMAP family member 4	GTPase aktiivisuus; nucleotidien (GTP) sitominen
171047	0.003134952	Rcl	c-Myc-responsive protein Rcl	solujen proliferaatio ja c-Myc-välitteinen transformaatio
312903	0.003134952	Tram1	translocation associated membrane protein 1	eritettävien proteiinien siirto ER:n kalvon läpi
315973	0.003634033	RDG1306270	similar to acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 11 (predicted)	lipidimetabolia, entsyymi
300988	0.003967781	Tex264	putative secreted protein ZSIG11	spermatogeneesi
25202	0.004413906	Gucy1b3	Guanylate cyclase soluble subunit beta-1	guanylaattisyklaasi aktiivisuus; hemin sitominen; cGMP biosynteettinen prosessi; solusisäinen signaalintikaskadi
308796	0.004545811	Mesdc2	Mesoderm development candiate 2	osallistuu ihmisellä ja hiirellä mesodermin kehittymiseen
54243	0.004618007	Crry	Complement receptor related protein	komplementin aktivaation negatiivinen säätely
315547	0.004618007	Foxred1	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 1 (predicted)	aminohappojen kuljetus ja metabolia
192259	0.004618007	Phlpb	phospholipase B	lipaasiaktiivisuus; lipidien metaboliset prosessit
	0.004881273	Mrpl40	mitochondrial ribosomal protein L40	mitokondriaalinen ribosomi
24230	0.005252732	Tspo	peripheral-type benzodiazepine receptor	reseptoriaktiivisuus, perifeeriset benzodiazepiini tunnistuskohdat
25670	0.005589916	IL-15	interleukin 15	sytokiini, joka stimuloi T-lymfosyytien proliferaatiota
	0.006844732	LOC501447	similar to RIKEN cDNA 4930555G01	proteiinia koodaava geeni
288272	0.007046029	RGD1310778	similar to Putative protein C21orf45 (predicted)	
64015	0.007343966	Khdrbs3	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 3	toimii välittäjänä vaihtoehtoisten silmikointikohtien valinnassa; solun kasvun negatiivinen säätelijä, inhiboi solujen proliferaatiota
362899	0.007343966	RGD1564315	similar to NIPA-like domain containing 2	
246298	0.008084899	Retsat	all-trans-13,14-dihydroretinol saturase	retinolisaturaasi, retinolin metabolinen prosessi; eletroninsiirto

25313	0.008084899	EGF	Pro-epidermal growth factor precursor (contains epidermal growth factor)	stimuloi useiden epidermaali- ja epiteelikudosten kasvua; MAP kinaasi välitteiset signalointireitit; EGF reseptori signalointireitit; proteiinikinaasikaskadi; proteiinien erityksen säätely
311462	0.008084899	Btbd3	BTB (POZ) domain containing 3 (predicted)	ihmisellä ja hiirellä proteiinien sitominen
314304	0.008135515	RGD1564089	similar to peroxisomal long chain acyl-CoA thioesterase Ia	katalysoi ihmisellä asyyli-CoA:n hydrolyysiä vapaiksi rasvahapoiksi ja CoA:ksi
	0.00823555	RGD1305592	similar to RIKEN cDNA 2900092E17 (predicted)	proteiinia koodaava geeni

Taulukko 3. Geenit, joiden ekspressio oli suurempi LCR rotilla kuin HCR rotilla merkitsevyydellä 0,01.

ENTREZID	adj.P.Val	Geeni	Proteiini	Tehtävä
292539	2.02E-06	RGD1562905	similar to 60S ribosomal protein L17 (predicted)	ihmisellä ribosomaalinen proteiini; RNA sitominen; translaatio
361869	3.63E-06	RGD1565093	similar to Rpl17 protein (predicted)	ihmisellä ribosomaalinen proteiini; RNA sitominen; translaatio
	1.12E-05	LOC290704	similar to palladin	ihmisellä aktiinia sisältävien mikrofilamenttien osa
	1.12E-05	Mrps10	mitochondrial ribosomal protein S10 (predicted)	mitkondriaalinen ribosomi
	1.16E-05	Akr1b10	aldo-keto reductase family 1, member B10 (predicted)	aldehyydien pelkistys
290907	2.28E-05	Lig4	ligase IV, DNA, ATP-dependent (predicted)	ihmisellä DNA:n korjaus ja replikaatio
192276	0.000149273	Coro7	Coronin-7	saattaa osallistua AK-5 kasvaimen hylkimiseen ja spontaaniin regressioon
116468	0.000541571	Rfc2	replication factor C (activator 1) 2	replikaatiotekijä 40 kDa alayksikkö; solujen proliferaatio; DNA replikaatio; ATP:n ja nukleotidin sitominen; nukleosiditrifosfaatti aktiivisuus
288455	0.000932871	RGD1305831	similar to Pomp CG9324-PA	proteasomin kehittymiseen liittyvä tekijä
299193	0.002816437	RGD1309669	similar to Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase (predicted)	katalysoi asyyli-CoA:n hydrolyysiä vapaiksi rasvahapoiksi ja CoA:ksi
56824	0.004545811	Ifit1	Glucocorticoid-attenuated response gene 16 product	reagoi inflammatorisiin stimuluksiin
295457	0.004618007	RGD1566242	similar to CG1458-PA	CDGSH-type zinc finger
	0.004618007	LOC497803	hypothetical gene supported by NM_178095	proteiinia koodaava geeni
	0.004618007	RGD1566242	similar to RIKEN cDNA 1500009M05 (predicted)	proteiinia koodaava geeni
499018	0.004618007	RGD1560015	similar to glycoprotein, synaptic 2 (predicted)	pitkäketjuisten rasvahappojen pidentymiseen osallistuva tekijä
295248	0.004881273	Zfp67	zinc finger protein 67 (predicted)	ihmisellä sinkki-ionien sitominen
299313	0.005252732	Uxt	similar to ubiquitously-expressed transcript isoform 1	beta-tubuliinin sitominen; proteiinien laskostuminen; mikrotubulusten solun tukirangan organisointi and biogeneesi; centrosomin organisointi and biogeneesi
300644	0.006320854	RDG1305443	similar to CG3304-PA, isoform A	
	0.006775105	RT1-A2	RT1 class Ia, locus A2	antigeenin esittely
83582	0.007081652	Polr1b	RNA polymerase I subunit 2	DNA-riippuvainen RNA polymeraasi, joka katalysoi transkriptiota
	0.007858342	RGD1309929	similar to RIKEN cDNA 0610016J10 gene	proteiinia koodaava geeni
296651	0.00823555	Psm5	similar to 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	osa proteasomia, jota tarvitaan ubikitiinista riippuvaan proteolyysiin
	0.009558714	LOC497831	hypothetical gene supported by NM_175869	proteiinia koodaava geeni

Taulukko 4. Merkitsevyydellä 0,05 muuttuneiden geenien luokittelu ryhmiin. P-arvo on DA-VID:ssa ryhmittelyn merkitsevyydessä käytetty arvo. ↑ = Geenin ekspressio suurempi HCR rotilla. ↓ = Geenin ekspressio suurempi LCR rotilla.

Geeni (proteiini)	EntrezID	↑ ↓
MITOKONDRIO (P < 0,01)		7
Opa1 (Optic atrophy protein 1 homolog)	171116	
Chchd3 predicted	296966	
Hadhb (Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial precursor)	171155	
Bckdhb (2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial precursor)	29711	
MGC94152 (similar to hypothetical protein MGC7537)	303922	
Cpt1a (Carnitine O-palmitoyltransferase I)	25757	
Tspo (peripheral-type benzodiazepine receptor (translocator protein))	24230	
KARBOKSYYLHAPPOMETABOLIA (P < 0,01)		9
Fh1 (fumarate hydratase 1, mitochondrial precursor)	24368	
EGF (epidermal growth factor)	25313	
Hadhb (Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial precursor)	171155	
Gpt1 (Glutamic pyruvic transaminase 1, soluble)	81670	
Acadsb (Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor)	25618	
Bckdhb (2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial precursor)	29711	
Me3 predicted (similar to malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial)	361602	
Prkag2 (Prkag2 protein)	373545	
Cpt1a (Carnitine O-palmitoyltransferase I)	25757	
LIPIDIMETABOLIA (P < 0,1)		7
Serinc3 (Serine incorporator 3)	296350	
Hadhb (Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial precursor)	171155	
ApoE (Apolipoprotein E)	25728	
Phlpb (phospholipase B)	192259	
Acadsb (Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor)	25618	
Prkag2 (Prkag2 protein)	373545	
Cpt1a (Carnitine O-palmitoyltransferase I)	25757	
LIPIDIKATABOLIA (P < 0,01)		3
Srd5a2 (Steroid 5-alpha-reductase 2)	64677	
Pccb (Propionyl coenzyme A carboxylase, beta polypeptide)	24624	
Pla2g7 (Phospholipase A2, group VII)	301265	
OKSIDOREDUKTAASIAKTIIVISUUS (P < 0,1)		7
Nqo2 (NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2)	291084	
Ldhd (lactate dehydrogenase D)	307858	
Slc35c2 (similar to Solute carrier family 35, member C2)	311637	
Hadhb (Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial precursor)	171155	
Acadsb (Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor)	25618	
Bckdhb (2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial precursor)	29711	
Me3 predicted (similar to malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial)	361602	
IMMUUNIVASTE (P < 0,1)		8
Nfe2l1 predicted (nuclear factor, erythroid derived 2,-like 1 (predicted))	360610	
Ada (Adenosine deaminase)	24165	
IL-15 (interleukin 15)	25670	
Crry (complement receptor related protein)	54243	
Tapbp (Tap-binding protein)	25217	
Cd2bp2 predicted (CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2 (predicted))	293505	
B2m (Beta-2-microglobulin precursor)	24223	
APT2 (Antigen peptide transporter 2)	24812	
PROTEIINIMETABOLIA (P < 0,05)		16
Sgk (Serum/glucocorticoid regulated kinase)	29517	
RGD1304686 (Similar to 2010003J03Rik protein)	293673	

Spn (Sialophorin)	24796
Bzw1 (Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1)	363232
Mapk6 (Mitogen-activated protein kinase 6)	58840
Rock2 (Rho-associated protein kinase 2)	25537
Npepps (Puromycin-sensitive aminopeptidase)	50558
Map1a (Microtubule-associated protein 1A)	25152
Trak2 (Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosomal region candidate gene 3 protein homolog)	171086
Uxt (Ubiquitously expressed transcript)	299313
Mgea5 (Meningioma-expressed antigen 5)	154968
Rpl27a (60S ribosomal protein L27a)	293418
Mrpl45 predicted (similar to mitochondrial ribosomal protein L45)	287656
Sf3b1 (Spliceosomal protein SAP155)	84486
Ogt (UDP-N-acetylglucosamine--peptide N-acetylglucosaminyltransferase 110 kDa subunit)	26295
Eef2k (Eukaryotic elongation factor-2 kinase)	25435
SOLUN TUKIRANGAN PROTEINIEN SITOUTUMINEN (P < 0,01)	
Rhcg (Ammonium transporter Rh type C)	293048
Kif1b (Kinesin-like protein KIF1B)	117548
Rock2 (Rho-associated protein kinase 2)	25537
Map1a (Microtubule-associated protein 1A)	25152
Hook1 predicted (similar to Hook1 protein)	313370
RGD1304580 (Hypothetical protein RGD1304580)	292781

6

8 POHDINTA

8.1 Päätulokset

Perinnöllisesti korkean (HCR) ja matalan (LCR) juoksukapasiteetin rottien, jotka eivät harjoitelleet, välillä löytyi eroja luurankolihasgeenien ilmenemisessä. HCR rotilla geenien ilmeneminen oli suurempaa lipidimetaboliaan, aerobiseen energiantuottoon (mitokondriogeenit), karboksyylihappometaboliaan, immuunivasteeseen ja oksidoreduktaasiaktiivisuuteen liittyvissä geneeissä. LCR rotilla geenien ilmeneminen taas oli suurempaa proteiinimetaboliaan, lipidikataboliaan ja solujen tukirangan proteiinien sitoutumiseen liittyvissä geneeissä. Nämä geeniekspresioerot kertovat erosta kestävyys-suorituskyvyssä HCR ja LCR rottien välillä.

8.2 Lipidimetabolia

HCR rotilla lipidimetaboliaan, etenkin rasvahappometaboliaan, liittyvien geenien ilmeneminen oli suurempaa kuin LCR rotilla. Random-Aizik ym. (2005) havaitsi myös lipidimetabolian liittyvien geenien ilmenemistasojen kasvua kestävyysharjoittelujakson jälkeen. Kuvassa 3 esitetään merkittävimmät eroavaisuudet HCR ja LCR rottien välillä rasvahappometabolian entsyymejä koodaavien geenien ilmenemisessä. Lipoproteiinilipaasi (Lpl) on entsyymi, joka hydrolysoi triasyyliglyseroleja glyseroliksi ja rasvahapoiksi kudosten hiussuonissa (Nelson & Cox 2000, 601). Lipoproteiinilipaasin ekspresio ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi HCR ja LCR rottien välillä, mutta kertamuutos oli 25 %, joka saattaa kuitenkin olla fysiologisesti merkitsevä. Lipoproteiinilipaasin suurempi aktiivisuus HCR rotilla saattaa kertoa solujen tehostuneesta rasvahappojen sisäänotosta, koska rasvahappoja on enemmän saatavilla. Tällöin rasvahappoja pystytään käyttämään paremmin energiaksi ja triglyseridien uudelleenmuodostamiseen lihaksessa.

Rasvahappojen kuljetukseen mitokondrion kalvolla osallistuvien geenien ekspresion havaittiin myös olevan suurempi HCR rotilla. Karnitiinipalmityyylitransferaasi 1a

(Cpt1a) ja karnitiinipalmityylitransferaasi 1b (Cpt1b) katalysoivat pitkäketjuisten rasvahappojen siirtymistä mitokondrion sisäkalvon läpi (Nelson & Cox 2000, 603). Näiden geenien ekspressio oli suurempi HCR rotilla. Cpt1a:n ja Cpt1b:n toiminta on eräs säätelykohta rasvahappojen hapetuksessa mitokondrioissa, millä on vaikutusta rasvahappojen hapetuksen nopeuteen (Nelson & Cox 2000, 603). HCR rotilla näiden geenien aktiivisuus oli suurempi ja siten rasvojen hapetus nopeampaa ja tehokkaampaa. Tällä voidaan ajatella olevan positiivinen vaikutus kestävyysuorituskykyyn rasvojen käytön ollessa tehokkaampaa.

Apolipoproteiini E (ApoE) osallistuu plasman rasvahappojen kuljetukseen lihakseen. Fosfolipaasi B (Phlpb) on lipolyttinen entsyymi, joka osallistuu ruoan rasvojen ja fosfolipidien hajotukseen. (Nelson & Cox 2000, 456, 807.) Molempien geenien ilmeneminen oli suurempaa HCR rotilla. Nämä muutokset yhdessä muiden lipidimetaboliageenien muutosten kanssa kertovat HCR rottien paremmasta rasvojen hajotuskyvystä, jolloin rasvoja on enemmän käytettävissä energiantuottoon sekä rasvojen tehokkaammasta hyödyntämisestä energiantuotossa, mikä taasen selittää HCR rottien parempaa kestävyysuorituskykyä.

8.3 Energiantuotto

Aerobiseen energiantuottoon liittyvien geenien ilmeneminen, koskien sitruunahappokiertoa ja elektroninsiirtoketjua, oli HCR rotilla suurempaa. Oksidatiivisten geenien ilmenemistasojen kasvua on havaittu myös kestävyysharjoittelujaksoa koskevissa tutkimuksissa: sekä ihmisillä (Timmons ym. 2005) että hiirillä (Wu ym. 2003). Sitruunahappokierto, joka tapahtuu mitokondrioissa, on osa hiilihydraattien, rasvojen ja proteiinien energiantuottoreittiä, jossa hapen läsnä ollessa muodostuu vettä, hiilidioksidia ja adenosiinitrifosfaattia (ATP) ja vapautuu elektroneja elektroninsiirtoketjuun. Elektroninsiirtoketju, joka tapahtuu mitokondrion sisäkalvolla, on viimeinen osa soluhengitystä ja siinä muodostuu vettä ja suuri määrä ATP:ta. (Nelson & Cox 2000, 568, 659.) Sitruunahappokierrosta löytyneet merkittävimmät eroavaisuudet HCR ja LCR rottien välillä sitruunahappokierron entsyymejä koodaavien geenien ilmenemisessä esitetään kuvassa 3. Elektroninsiirtoketjussa merkittävin eroavaisuus HCR ja LCR rottien välillä oli

sytokromi c oksidaasin alayksikkö VIc:n aktiivisuudessa ($P < 0,2$; kertamuutos 12 %) sekä kahdessa NADH dehydrogenaasin alayksikössä ($P < 0,2$). Sekä sitruunahappokier-
ron että elektroninsiirtoketjun entsyymien geenien ilmenemisen kasvu HCR rotilla ker-
too lihaksen parantuneesta aerobisesta energiantuottokyvystä, mikä suoraan tukee pa-
rempaa kestävyysuorituskykyä. Myös mitokondrion sisäkalvon entsyymien geenien
suurempi ilmeneminen HCR rotilla kertoo tehostuneesta elektroninsiirtoketjun toimin-
nasta ja siten mitokondrioiden paremmasta kyvystä tuottaa ATP:ta. Sekä kestävyyshar-
joittelujakson että yksittäisen kestävyysharjoituksen jälkeen on myös havaittu mito-
kondrioiden biogeneesiin liittyvien geenien ilmenemistasojen kasvua (Mahoney ym.
2005; Random-Aizik ym. 2005).

Pyruvaattidehydrogenaasikinaasi, isoentsyymi 4 (PDK4) vähentää glukoosin käyttöä
energiantuotteenä inhihoimalla pyruvaattidehydrogenaasikompleksia (PDC), joka osal-
listuu pyruvaatin muuttamiseen asetyyli-CoA:ksi. Tällöin glykolyttiset tuotteet eivät
pääse mitokondrioon hapetettavaksi. (Pilegaard ym. 2000.) PDK4:n ilmeneminen oli
suurempaa ($P < 0,2$) HCR rotilla kertamuutoksen ollessa 69 %. Sekä Mahoney ym.
(2005) että Pilegaard ym. (2000) havaitsivat PDK4:n ekspression kasvun yksittäisen
kestävyysuorituksen jälkeen. Tämä tukee käsitystä, että rasvojen käyttö energiantuot-
teenä on kasvanut ja hiilihydraattien vähentynyt. Kestävyysuorituksen jälkeen
PDK4:n kasvanut ekspressio kertoo myös epäsuorasti lipidien käytöstä energiantuot-
teenä, kun glykogeenia resyntetisoidaan. (Pilegaard ym. 2000.) Rasvojen osuuden kasvun
energiantuotannossa on havainnut myös Random-Aizik ym. (2005) kestävyysuoritte-
lujakson jälkeen. Havaittu PDK4:n suurempi aktiivisuus HCR rotilla kertonee siitä, että
rasvojen osuus energiantuotossa on suurempi kuin hiilihydraattien. Koska sekä glu-
koosia käytetään energiantuotteenä vähemmän että rasvoista saadaan helpommin energi-
aa, kestävyuden voisi ajatella olevan parempi, koska glukoosia säästyy ja laktaattia ei
muodostu niin paljon kestävyystyypissä kuormituksessa.

8.4 Yhteenveto

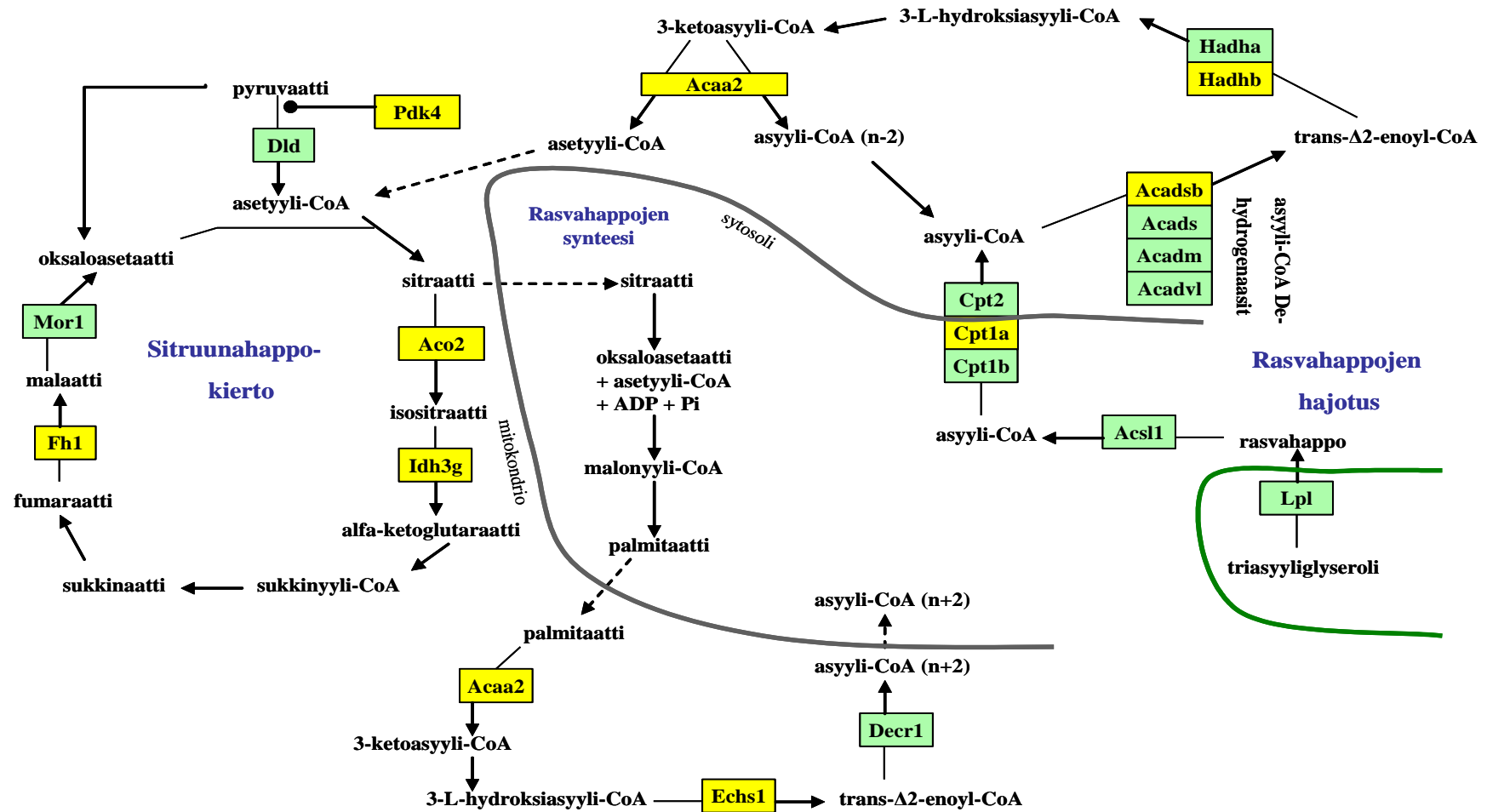
Havaitut eroavaisuudet luurankolihasen geenien ilmenemistasoissa kertoo, että tietyillä
luurankolihasen geneilla on suurempi ilmenemistaso HCR rotilla verrattuna LCR

rottiin, mikä selittänee HCR rottien parempaa kestävyysuorituskykyä. HCR rottien parempaa kestävyysuorituskykyä tukee lipidimetabolialla ja aerobista energia-aineenvaihduntaa koskevat löydökset. Rasvahappometabolian entsyymien geenien suuremmista ilmenemistasoista, kuten myös muiden lipidimetaboliaan liittyvien geenien suuremmasta ilmenemisestä yhdessä sitruunahappokierron ja elektroninsiirtoketjun geenien ilmenemisen kasvun lisäksi voidaan päätellä, että rasvojen käyttö on tehokkaampaa HCR rotilla. LCR rotat eivät siten pysty hyödyntämään rasvoja energiantuotannossa yhtä nopeasti ja tehokkaasti. Paremman kestävyysuorituskyvyn puolesta puhuu myös se, että rasvoja pystytään käyttämään tehokkaammin ja glukoosia säästyy (PDK4).

Havaitut geenien ilmenemisen eroavaisuudet perinnöllisesti korkean ja matalan kestävyysuorituskyvyn välillä eivät olleet yhteneväisiä Wittwer ym. (2004) löydösten kanssa, jotka koskivat pitkään harjoitelleita mieskestävyyssurheilijoita. Vaikka näiden kestävyysurheilijoiden tiettyjen geenien ekspressio erosi harjoittelemattomista, niin näiden geenien ekspressio ei eronnut perinnöllisesti korkean ja matalan kestävyysuorituskyvyn rottien välillä. Toisaalta vain muutamaa geeniä tutkittiin tarkemmin, mutta toisaalta tämä saattaa kertoa osittain myös siitä, että kestävyysurjoittelun vastegeenit ovat ainakin osittain eri genejä kuin perinnöllisestä suorituskyvystä vastaavat geenit. Mahoney ym. (2005) mukaan kestävyysurjoituksen jälkeisellä homeostaasin palautumisella ja kestävyysurjoittelun aikaansaamilla adaptaatioilla on ainakin osittain eri vastegeenit. Tämä voisi siten tukea sitä, että myös perinnöllisen kestävyysuorituskyvyn taustalla on sellaisia genejä, jotka eivät aktivoidu kestävyysurjoittelun seurauksena. Esimerkiksi PGC-1 α :n ilmenemistaso ei eronnut HCR ja LCR rottien välillä, vaikka useammassa tutkimuksessa PGC-1 α :aa on pidetty tärkeänä kestävyysurjoittelun rakenteellisten ja toiminnallisten adaptaatioiden säätelijänä (esim. Norrbom ym. 2003).

Perinnöllisen kestävyysuorituskyvyn taustalla olevia genejä ei ole tutkittu paljoa, joten tulevaisuudessa tätä aluetta tulee tutkia enemmän. Ihmisillä se on kuitenkin hankalaa, joten tällä hetkellä eläintutkimukset näyttävät olevan parhain lähestymistapa. Tällöin kuitenkin pitää huomioida, että tulosten yleistettävyys eläimiltä ihmisille ei ole täysin suoraviivaista, koska esimerkiksi ihmisen ja rotan genomit eroavat toisistaan jonkin verran. Kun tietoa perinnöllisen suorituskyvyn taustalla olevista geneistä saadaan enemmän, on niitä myös helpompi vertailla kestävyysurjoittelun aikaansaamiin muu-

toksiin geenien ekspressiossa ja tutkia sitä, onko kestävyys harjoittelulla ja perinnöllisellä kestävyys suorituskyvyllä samoja vastegeenejä. Opittaessa tuntemaan paremmin perinnöllisen kestävyys suorituskyvyn takana olevia geenejä ihmisillä voidaan pohtia myös sitä, pystytäänkö tätä tietoa hyödyntämään esimerkiksi urheilulahjakkuuksien etsinnässä tekemällä jonkinlainen geneettinen analyysi nuorelle urheilijalle. Toisaalta lisäksi pitäisi vielä saada todisteita siitä, että geenillä todellakin olisi ennustusarvoa aikuisiän kestävyys suorituskykyyn, jotta tästä olisi hyötyä.



Kuva 3. Kokonaiskuva tärkeimmistä proteiineista, jotka osallistuvat sitruunahappokiertoon ja rasvahappometaboliaan ja joiden geenien ilmenemisessä havaittiin ero HCR ja LCR rottien välillä. Keltainen väri: $P < 0,2$. Vaalean vihreä väri: ero ei tilastollisesti merkitsevä, mutta kertamuutos $> 10\%$ -> voi olla fysiologisesti merkitsevä.

9 LÄHTEET

- Bompa, T. O. 1999. Periodization: theory and methodology of training. *Human Kinetics*.
- Bouchard, C., Daw, E. W., Rice, T., Pérusse, L., Gagnon, J., Province, M. A., Leon, A. S., Rao, D. C., Skinner, J. S. & Wilmore, J. H. 1998. Familial resemblance for VO₂max in the sedentary state: the HERITAGE family study. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 30(2), 252–258.
- Bouchard, C., Lesage, R., Lortie, G., Simoneau, J-A., Hamel, P., Boulay, M. R., Pérusse, L., Thériault, G. & Leblanc, C. 1986. Aerobic performance in brothers, dizygotic and monozygotic twins. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 18(6), 639–646.
- Dennis, G. Jr, Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Clifford Lane, H. & Lempicki, R. A. 2003. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biology*, 4:R60.
- Dunning, M., Smith, M. & Camilier, I. 2006. Beadarray: Quality control and low-level analysis of BeadArrays. R package version 1.2.2.
- Finnish DNA Microarray Centre. 2007. <http://microarrays.btk.fi>. 24.3.2007.
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettlings, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A. J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J. YH. & Zhang J. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*, 5(10), R80.
- Gentleman, R., Carey, V. & Huber, W. 2007. Genefilter: genefilter: methods for filtering genes from microarray experiments. R package version 1.12.0.
- Hamel, P., Simoneau, J-A, Lortie, G., Boulay, M. R. & Bouchard, C. 1986. Heredity and muscle adaptation to endurance training. *Medicinen and Science in Sports and Exercise*, 18(6), 690–696.
- Holloszy, J. O. 1967. Biochemical adaptations in muscle: effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 242(9), 2278–2282.

- Hoppeler, H. 1986. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *International Journal of Sports Medicine*, 7(4), 187–204.
- Illumina. 2007. <http://www.illumina.com>. 24.3.2007.
- Irizarry, R. A., Gautier, L., Bolstad, B. M. & Miller, C. 2006. Affy: Methods for Affymetrix Oligonucleotide Arrays. R package version 1.12.2.
- Jensen, L., Bangsbo, J. & Hellsten, Y. 2004. Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 1, 557(Pt 2), 571–582.
- Koch, L. G. & Britton, S. L. 2001. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiological Genomics*, 5, 45–52.
- Keskinen, K. L., Häkkinen, K. & Kallinen, M. 2004. Kuntotestauksen käsikirja. Liikuntatieteellinen Seura ry.
- Lucas, A. 2007. Amap: Another Multidimensional Analysis Package. R package version 0.7-3.
- MacArthur, D. G. & North, K. N. 2005. Genes and human elite athletic performance. *Human Genetics*, 116, 331–339.
- Mahoney, D. J., Parise, G., Melov, S., Safdar, A. & Tarnopolsky, M. A. 2005. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *The FASEB Journal*.
- Matoba, H. & Gollnick, P. D. 1984. Response of skeletal muscle to training. *Sports Medicine*, 1, 240–251.
- McArdle, W. D., Katch, F. I. & Katch, V. L. 2001. Exercise physiology. Energy, nutrition, and human performance. Lippincott Williams & Wilkins.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers.
- Norrbom, J., Sundberg, C. J., Ameln, H., Kraus, W. E., Jansson, E. & Gustafsson, T. 2004. PGC-1 α mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 96, 189–194.
- Oscal, L. B. & Holloszy, J. O. 1971. Biochemical adaptations in muscle: II. Reponse of mitochondrial adenosine triphosphatase, creatine phosphokinase, and adenylate kinase activities in skeletal muscle to exercise. *The Journal of Biological Chemistry*, 246(22), 25, 6968–6972.
- Pérusse, L., Gagnon, J., Province, M. A., Rao, D. C., Wilmore, J. H., Leon, A. S., Bouchard, C. & Skinner, J. S. 2001. Familial aggregation of submaximal aerobic per-

- formance in the HERITAGE family study. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 33(4), 597–604.
- Pette, D. & Staron, R. S. 2000. Myosin isoforms, muscle fiber types and transitions. *Microscopy Research and Technique*, 50, 500–509.
- Pilegaard, H., Ordway, G. A., Saltin, B. & Neufer, P. D. 2000. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 279, E806–E814.
- Pilegaard, H., Saltin, B. & Neufer, P. D. 2003. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 546.3, 851–858.
- Radom-Aizik, S., Hayek, S., Shahar, I., Rechavi, G., Kaminski, N. & Ben-Dov, I. 2005. Effects of aerobic training on gene expression in skeletal muscle of elderly men. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 37(10), 1680–1696.
- R Development Core Team (2006). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rico-Sanz, J., Rankinen, T., Joannis, D. R., Leon, A. S., Skinner, J. S., Wilmore, J. H., Rao, D. C. & Bouchard, C. 2003. Familial resemblance for muscle phenotypes in the HERITAGE family study. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 35(8), 1360–1366.
- Short, K. R., Vittone, J. L., Bigelow, M. L., Proctor, D. N., Rizza, R. A., Coenen-Schinke, J. M. & Sreekumaran Nair, K. 2003. Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. *Diabetes*, 52, 1888–1896.
- Simoneau, J-A. & Bouchard, C. 1995. Genetic determinism of fiber type proportion in human skeletal muscle. *FASEB Journal*, 9, 1091–1095.
- Smyth, G. K. 2004. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3, 1, article 3.
- Taylor, A. W. & Bachman, L. 1999. The effects of endurance training on muscle fibre types and enzyme activities. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 24(1), 41–53.

- Thayer, R., Collins, J., Noble, E. G. & Taylor, A. W. 2000. A decade of aerobic endurance training: Histological evidence for fibre type transformation. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 40, 284–290.
- Timmons, J. A., Larsson, O., Jansson, E., Fischer, H., Gustafsson, T., Greenhaff, P. L., Riddén, J., Rachman, J., Peyrard-Janvid, M., Wahlestedt, C. & Sundberg, C. J. 2005. Human muscle gene expression responses to endurance training provide a novel perspective on Duchenne muscular dystrophy. *The FASEB Journal*, 19, 750–760.
- Wang, Y-X., Zhang, C-L., Yu, R. T., Cho, H. K., Nelson, M. C., Bayuga-Ocampo, C. R., Ham, J., Kang, H. & Evans, R. M. 2004. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ . *Plos Biology*, 2(10), 1532–1539.
- Warnes, G. R. 2006. Gplots: Various R programming tools for plotting data. R package version 2.3.2.
- Wisløff, U., Najjar, S. M., Ellingsen, O., Haram, P. M., Swoap, S., Al-Share, Q., Fernstrom, M., Rezaei, K., Lee, S. J., Koch, L. G. & Britton, S. L. 2001. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science*, 307, 418–420.
- Wittwer, M., Billeter, R., Hoppeler, H. & Flück, M. 2004. Regulatory gene expression in skeletal muscle of highly endurance-trained humans. *Acta Physiol Scand*, 180, 217–227.
- Wong, G. 2005. Introduction. Teoksessa Tuimala, J. & Laine, M. M.(toim.) *DNA Microarray Data Analysis*. CSC, 15–24.
- Wu, H., Gallardo, T., Olson, E. N., Sanders Williams, R. & Shoheit, R. V. 2003. Transcriptional analysis of mouse skeletal myofiber diversity and adaptation to endurance exercise. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 24, 587–592.

LIITE 1. R:n esimerkkikoodi datan käsittelystä

```

#DATAN SISÄÄNLUKEMINEN:
RawData=read.csv("060083_20070125 PMT 551 modified.csv")

dim(RawData)
str(RawData)
names(RawData)

RawData$Index=rownames(RawData) #Lisätään Index-sarake: Uniikit rivinimet, voi helposti tarkistaa
järjestyksen

RawData$Index[1:10]

#SIGNAALIARVOJEN POIMIMINEN
exprsV=as.data.frame(RawData[,grep("AVG_Signal", names(RawData))]) #Kerätään datasta vain inten-
siteetit

names(exprsV)

#SARAKKEIDEN UDELLEENNIMEÄMINEN:
colnames(exprsV)=gsub(".AVG_Signal", "", colnames(exprsV))

#BOX-PLOTIT
boxplot(log2(exprsV), las = 2, names=colnames(exprsV)) #Datan laatu, näytteiden jakaumat

#KUVIEN TALLENTAMINEN
dev.print(pdf, file="boxplotit1.pdf")

#SCATTER JA MA-PLOTIT:
groups=c(1,1,0,0,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1,0,0,1,1) #näyteryhmät: 1=HCR, 0=LCR

library(beadarray)

plotMAXY(exprsV) #MA ja scatterplotit kaikista näytteistä

plotMAXY(exprsV, arrays=which(groups==0), names=names(exprsV)) #MA ja scatterplotit valituista
näytteistä (LCR)

plotMA(exprsV, array1=1, array2=3) #MA-plotit valituista näytteistä

#NORMALISOINTI:

library(affy)
exprsV.quantile=as.data.frame(normalize.quantiles(as.matrix(exprsV)))

colnames(exprsV.quantile)=colnames(exprsV)

boxplot(log2(exprsV.quantile), las = 2, names=colnames(exprsV.quantile))

#KLUSTEROINTI VASTAAVALLA PEARSONIN METRIKALLA:

library(amap)

hc=hcluster(t(log2(as.matrix(exprsV.quantile))), method="pearson", link="ave")
plot(hc, main="Klusterointi Pearsonin metriikalla", xlab="", sub="")

```

```

dev.print(pdf, file="klusterointi.pdf")

#PEARSONIN KORRELAATIOT:

corTable=cor(log2(exprsV.quantile)) #Korrelaatiomatriksi

write.csv(round(corTable,2), file="korrelaatiot.csv") #Pyöristetään korrelaatiot kahden desimaalin tarkkuudelle

#LIMMA-ANALYYSI:

library(limma)

design=model.matrix(~-1+factor(groups))
colnames(design)=c("LCR","HCR")

fit=lmFit(log2(exprsV.quantile),design)

cont.matrix=makeContrasts(HCRvsLCR=HCR-LCR, levels=design) #Kontrastimatriksi, verrataan HCR ja LCR ryhmiä

fit=contrasts.fit(fit,cont.matrix)
ebFit=eBayes(fit)
allTops=topTable(ebFit,adjust="BH",number=length(ebFit$coefficients)) #Kaikki geenit, muunnetaan p-arvot BH-algoritilla
allTops=allTops[order(as.numeric(allTops$ID), decreasing=F),] #järjestetään alkuperäisen taulukon mukaiseen järjestykseen

topTable(ebFit, adjust="BH", sort.by="P", number=10) #10 parasta

#TULOSTIETOJEN KOKOAMINEN YHTEEN:
AllData=cbind("TargetID"=RawData$TargetID, allTops)

#Intensiteettiarvojen keskiarvot kummallekin ryhmälle, kullekin geenille:
AllData$HCR_mean=rowMeans(exprsV.quantile[,groups==1]) #HCR mean
AllData$LCR_mean=rowMeans(exprsV.quantile[,groups==0]) #LCR mean

#Intensiteettiarvojen keskihajonnat kummallekin ryhmälle, kullekin geenille:
library(genefilter)
AllData$HCR_sd=rowSds(exprsV.quantile[,groups==1])
AllData$LCR_sd=rowSds(exprsV.quantile[,groups==0])

#Logratio-arvoa (logFC) vastaava fold change arvo:
library(gplots)
AllData$FC=logratio2foldchange(AllData$logFC, base=2)

#Annotaatio-sarakkeet:

AllData$Accession=RawData$ACCESSION
AllData$Symbol=RawData$SYMBOL
AllData$Probe_sequence=RawData$PROBE_SEQUENCE
AllData$Definition=RawData$DEFINITION
AllData$Type=RawData$TYPE
AllData$GID=RawData$GID

#Järjestetään sarakkeet loogiseen järjestykseen:
AllData=AllData[,c(1,3,12,8,9,10,11,5,6,13:18)]

dim(AllData)

```

```
pyoristetyt=cbind("TargetID"=AllData$TargetID, round(AllData[,2:3],2), round(AllData[,4:7]), All-
Data[,8:15])
```

```
#Koko sirun tiedot tiedostoon:
```

```
write.csv(pyoristetyt[order(pyoristetyt$adj.P.Val, decreasing=F),],"kaikkiGeenit260307.csv",
row.names=F)
```

```
write.table(pyoristetyt[order(pyoristetyt$adj.P.Val, decreasing=F),],"kaikkiGeenit260307.txt",
row.names=F, sep="\t")
```

```
#KIINNOSTAVIEN GEENIEN SUODATTAMINEN JA TIEDOSTOON KIRJOITTAMINEN
```

```
#Suodatusparametrit
```

```
#logFC=0.1
```

```
adj.P.Val=0.05
```

```
#upreguloidut
```

```
up=pyoristetyt[AllData$logFC>logFC & AllData$adj.P.Val<adj.P.Val,]
```

```
nrow(up) #Rivien määrä, kuinka monta geeniä toteuttaa ehdot
```

```
#downreguloidut
```

```
down=pyoristetyt[AllData$logFC< -logFC & AllData$adj.P.Val<adj.P.Val,]
```

```
nrow(down) #Rivien määrä, kuinka monta geeniä toteuttaa ehdot
```

```
#Järjestetään rivit korjatun p-arvon mukaan
```

```
up=up[order(up$adj.P.Val),]
```

```
tdstoNimi="upReguloidut260307.csv"
```

```
write.csv(up, tdstoNimi, row.names=F)
```

```
down=down[order(down$adj.P.Val),]
```

```
tdstoNimi="downReguloidut260307.csv"
```

```
write.csv(down, tdstoNimi, row.names=F)
```

```
#MA-plot tulosgeneille:
```

```
plotMA(as.matrix(AllData[,c(4,5)]), array1=1, array2=2, genesTo-
```

```
Label=row.names(AllData[AllData$adj.P.Val<adj.P.Val ,]), main="LCRvsHCR")
```

```
dev.print(pdf, file="maplot_LCRvsHCR.pdf")
```


LIITE 2. R:n esimerkkikoodi tietojen keräämisestä Davidia varten

```
# Ladataan rotta-annotaatiopaketti:
library(Rat12Asta)

# Printtaa paketin tiedot:
Rat12Asta()

# Tallenna Entrez id:t data frameksi
EG=as.list(Rat12AstaENTREZID)

EGeg=c()
for(x in names(EG)){
  EGeg=append(EGeg, EG[[x]])
}

EG=data.frame("SEQ_ID"=names(EG), "ENTREZID"=EGeg)

EG[1:10,] #printtaa muutaman rivin malliksi

# Lue sisään merkittävien geenien listat:

tdstoNimi="upReguloidut260307.csv"
#tdstoNimi="downReguloidut260307.csv"
# tdstoNimi=""

tdsto=read.csv(tdstoNimi)

# Poimi merkittävien geenien listassa olevat EG id:t:
tdstoAndEG=na.omit(EG[EG$SEQ_ID%in%tdsto$TargetID==T,])[,2]
length(tdstoAndEG)

#kirjoita eg id:t tiedostoon:
outTdstoNimi="upEG126.csv"
"outTdstoNimi="downEG112.csv"
# outTdstoNimi=""

write.table(tdstoAndEG, outTdstoNimi, row.names=F, col.names=F)

# Tausta EG:T (tarvitsee tehdä vain kerran)
# bg=na.omit(EG,)[,2]
# write.csv(bg, "bgEG.csv",row.names=F)
```