

**MARP - PROTEIINIPERHEEN PROTEIINIEN mRNA –
MÄÄRÄT VENYMIS - LYHENEMISSYKLI - TYYPPISEN
KUORMITUKSEN JÄLKEEN**

Riina Flink

Kandidaatin tutkielma

Liikuntafysiologia

Kevät 2010

Liikuntabiologian laitos

Jyväskylän yliopisto

Työn ohjaajat: Lehti M. ja

Juutinen T.

TIIVISTELMÄ

Riina Flink. 2010. MARP – proteiiniperheen proteiinien mRNA – määrät venymis – lyhenemissykli – tyyppisen – kuormituksen jälkeen. Kandidaatin tutkielma, Liikuntafysiologia. Liikuntabiologian laitos, Jyväskylän yliopisto. 37s.

MARP (muscle ankyrin repeat protein) – proteiiniperheen proteiinien arvellaan olevan mukana etenkin luurankolihasen adaptoitumisessa paljon eksentristä lihasliikettä sisältävään harjoitukseen. Arvellaan, että ne saattavat ehkäistä muun muassa soluvaurioita. Niiden ilmenemistä fyysisen rasituksen yhteydessä on kuitenkin tutkittu ihmisillä vasta yhdessä tutkimuksessa (Lehti ym .2009) ja tietoa tarvitaan lisää. Tämän tutkimuksen tarkoituksena olikin tutkia, miten CARP:in (cardiac ankyrin repeat protein), Ankrd2:n (ankyrin repeat protein 2) ja DARP:in (diabetes ankyrin repeat protein) mRNA (messenger RNA) - määrät muuttuvat SSC (stretch- shortening- cycle) - kuormituksen seurauksena. Määrittäessä käytettiin RT-PCR (Real –Time polymerase chain reaction) – tekniikkaa. Yhdeksän koehenkilöä suorittivat saman protokollan, jossa he tekivät yhden jalan hyppyjä siihen tarkoitettuun kelaan uupumukseen saakka, mutta maksimissaan 20 minuuttia. Kontrollibiopsia otettiin väsyttämättömän jalan Vastus Lateraliksesta ennen kuormitusta. Väsytetyn jalan Vastus Lateraliksesta otettiin biopsiat heti kuormituksen jälkeen ja 3 tuntia kuormituksesta. CARP:in mRNA - määrä nousi heti kuormituksen jälkeen (1740 % ± 4323 % kontrolliarvosta, P=0,01) kolmen tunnin jälkeisen määrän ollessa kuitenkin tilastollisesti merkitsevästi vielä tätäkin suurempi (10184 % ± 11676 % kontrolliarvosta, P= 0,01). Ankrd2:n mRNA määrissä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä muutoksia, mutta keskiarvoisesti konsentraatio oli kuitenkin huomattavasti noussut kolmen tunnin jälkeen kuormituksesta (164 % ± 147 % kontrolliarvosta). DARP:in mRNA - määrissä ei tapahtunut huomattavia muutoksia. Nämä tulokset ovat samansuuntaisia kuin edellisen samankaltaisen tutkimuksen tulokset (Lehti ym. 2009). Tulosten perusteella voidaan päätellä, että CARP:in vaste kuormitukseen on hyvin nopea ja voimakas. Lisäksi Ankrd2:n tulokset viittaavat siihen, että sen vaste ei ole niin nopea, mutta sen määrä olisi voinut ehkä nousta kolmen tunnin jälkeen kuormituksesta. Kummankin proteiinin kohdalla keskihajonnat olivat kuitenkin suuria ja esimerkiksi CARP:in kohdalla jopa viiden koehenkilön heti kuormituksen jälkeinen arvo oli kontrolliarvoa pienempi. Niinpä vaihtelut ovat hyvin suuria ja lisätutkimuksia tulisi tehdä isommalla koehenkilömäärällä. Lisäksi MARP:eja tulisi tutkia myös proteiinitasolla, sillä mRNA ja proteiinitaso eivät aina vastaa toisiaan.

Avainsanat: MARP, CARP, Ankrd2, DARP, PCR, biopsia, mRNA, lihas

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ

1 JOHDANTO	3
2 LIHAKSEN RAKENNE.....	4
3 MARP – PROTEIINIT	6
3.1 Lokalisaatio	6
3.2 Toiminta	8
4 SSC – KUORMITUS JA MARP:IT	11
4.1 SSC- kuormitus ja lihassoluvauriot.....	11
4.2 MARP:ien lisääntyminen liikunnan jälkeen	13
5 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TUTKIMUSONGELMAT JA HYPOTEEESIT	16
6 MENETELMÄT	17
6.1 Koehenkilöt	17
6.2 Protokolla	17
6.3 Biopsiat	18
6.4 mRNA - määrän määrittäminen	19
6.4.1 RNA:n eristys.....	19
6.4.2 cDNA:ksi kääntäminen	20
6.4.3 Kvantitatiivinen Real-Time PCR	20
6.4.4 Tulosten käsittely	21
7 TULOKSET	22
8 POHDINTA	25
LÄHTEET.....	30
LIITE 1.....	36

1 JOHDANTO

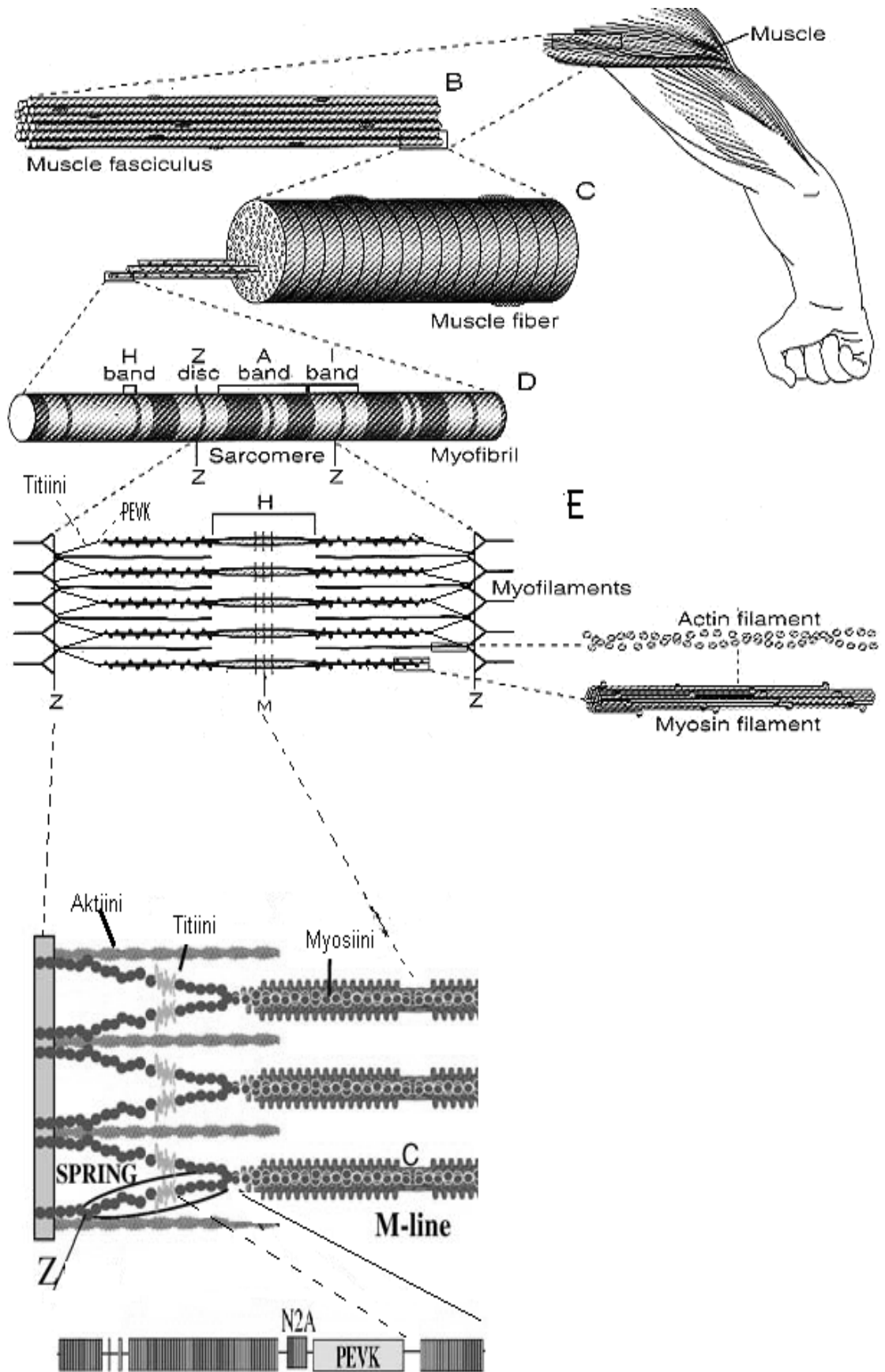
Ihmisen luonnollisessa liikkeessä, kuten kävelyssä toistuu SSC (stretch - shortening - cycle) - sykli eli luurankolihasvenymis - lyhenemis - sykli. SSC - liike sisältää paljon eksentristä lihastyötä. Eksentrisen lihastyön on todistettu aiheuttavan paljon lihassoluvaurioita. MARP:ien (muscle ankyrin repeat protein) on todistettu lisääntyvän eniten juuri sellaisissa liikkeissä, joista aiheutuu lihassoluvaurioita. Niinpä SSC - liikkeen oletetaan saavan aikaan MARP:ien lisääntymisen.

MARP - proteiiniperheeseen kuuluvia proteiineja ovat CARP (cardiac ankyrin repeat protein), Ankrd2 (ankyrin repeat protein 2) ja DARP (diabetes ankyrin repeat protein). Niitä on havaittu elimistöstä etenkin erilaisten stressitilanteiden yhteydessä. CARP:ia ja DARP:ia on havaittu eniten sydänlihaksessa kun taas Ankrd2:a ilmenee eniten luurankolihasissa. Lihaksien sarkomeereissa MARP:it vuorovaikuttavat titiinin kanssa, johon ne ovat kiinnittyneinä. Proteiinit siirtyvät etenkin luurankolihasvenymisen yhteydessä sarkomeerin I - alueelta lihassolun tumaan. Tumassa ne voivat kiinnittyä tiettyihin transkriptiotekijöihin ollen näin mukana tumassa ja sarkoplasman välisessä signaaloinnissa. Kuitenkaan MARP:ien tarkkoista tehtävistä elimistössä ei ole varmuutta. Mitä ilmeisimmin ne vaikuttavat ainakin luurankolihasvenymisen lihaksen adaptoitumiseen. Viimeaikaiset tutkimukset ovat tuoneet asiaan paljon selvyttä ja ajatellaankin, että varsinkin CARP ja Ankrd2 tunnistavat erityisesti lihaksen venytystä. Ne voivat olla tärkeitä sarkomeerin stabiilisuuden lisäämisessä ja soluvaurioiden ehkäisemisessä. Lisäksi ne saattavat olla välttämättömiä soluvaurioiden täydellisessä korjaantumisessa.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää MARP:ien mRNA määrien muutosta lihassoluissa kelkkahyppelyn eli SSC - liikkeen seurauksena. Tarkoituksena on varmistella edellisen Lehti ym. (2009) tutkimuksen tuloksia. Kyseinen tutkimus oli ensimmäinen ihmistutkimus jossa tutkittiin MARP:ien ilmenemistä kuormituksen yhteydessä. Tämän vuoksi tällaisia tutkimuksia tarvitaan lisää. Hypoteesina on, että niin kuin edellisessäkin tutkimuksessa, myös tässä tutkimuksessa CARP:in ja Ankrd2:n mRNA määrät kasvavat kuormituksen seurauksena. Tutkimus on osa laajempaa tutkimusta, jossa selvitetään kelkkahyppelyn eli SSC - liikkeen vaikutusta lihaksen titiinin kanssa vuorovaikutuksessa olevien proteiinien ilmenemiseen.

2 LIHAKSEN RAKENNE

Lihasku rakautuu moniin rakenneyksikköihin (kuva 1). Koko lihas koostuu lihassolukimpuista eli fasikuluksista (kuva 1B). Fasikulukset koostuvat useista lihassoluista (kuva 1C), jotka ovat useimmiten koko lihaksen pituisia. Kuitenkin lihassolut voivat olla myös lyhyempiä kuin lihas. Halkaisijaltaan lihassolut ovat 10 – 80 mikrometriä. Lihassolut muodostuvat useista tuhansista myofibrilleistä (kuva 1D). Myofibrillit koostuvat myosiini - ja aktiinifilamenteista (kuva 1E), jotka ovat vastuussa lihaksen supistumisesta. Lihaksen pienin toiminnallinen yksikkö on sarkomeeri (kuva 1D), jossa aktiini- ja myosiinifilamentit (myofilamentit) menevät lomittain lihaksen supistuessa. Yksittäinen sarkomeeri rajoittuu Z - levyihin, joihin aktiinifilamentit ovat kiinnittyneinä. Sarkomeerin keskiviivaa sanotaan M - viivaksi. Lepoasennossa sarkomeeri on noin 2 mikrometriä pitkä. Sarkomeerista voidaan erottaa vaaleita alueita, jotka koostuvat ainoastaan aktiinifilamenteista (I-alueet, isotrooppisia polarisoituneelle valolle). Vaaleiden alueiden keskelle jäävä alue sen sijaan sisältää myös myosiinifilamenteja (A - alue, anisotrooppisia polarisoituneelle valolle). Myofilamentit pysyvät paikoillaan elimistön suurimman proteiinin, titiinin avulla. (Guyton & Hall 2000, 67 - 68.) Titiini sijaitsee sarkomeerissa aktiinin ja myosiinin välissä, kiinnittyen PEVK - elementillä myosiiniin ja muodostaen näin kolmannen filamenttijärjestelmän (Miller ym. 2003, kuva 1E). Se on kierteinen ja venyvä rakenne, joka vastustaa luurankolihaksen sarkomeerin liiallista venymistä (Horowitz ym. 1989). Lisäksi se tekee myofibrillistä yhtenäisen, sillä kaksi titiiniä ulottuu koko sarkomeerin yli (Fürst ym. 1988).



KUVA 1. Lihaksen rakenne. (Mukaeltu Guyton & Hall 2000, 68, Granzier ym. 2005)

3 MARP – PROTEIINIT

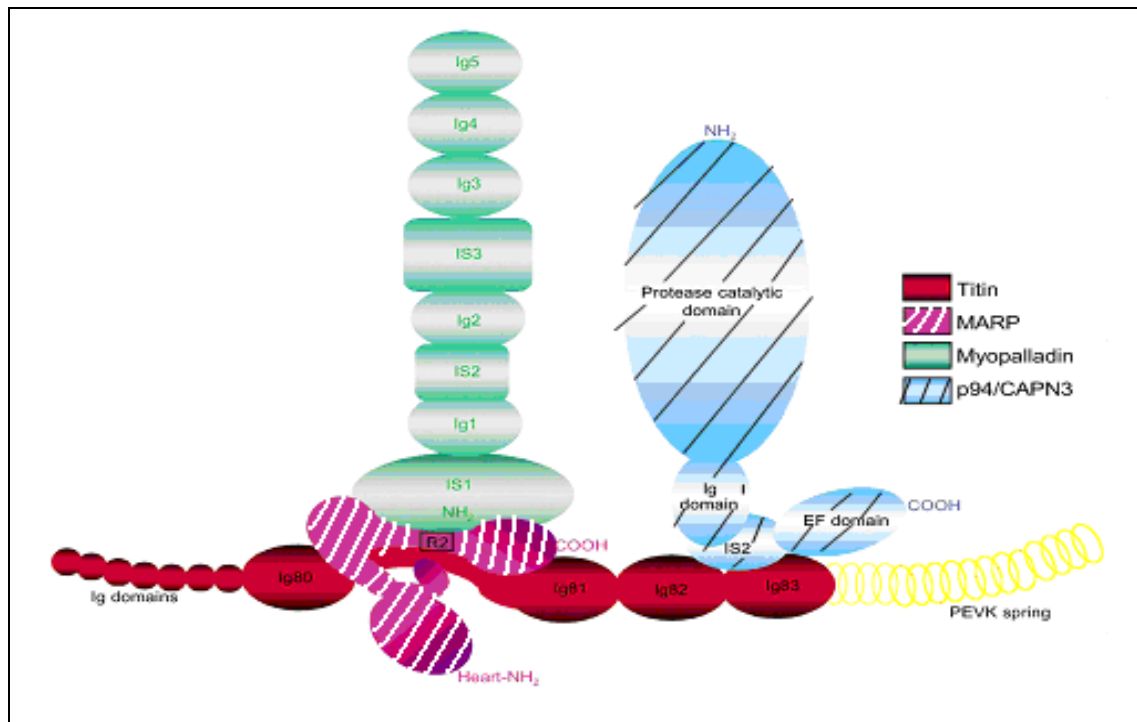
MARP (muscle ankyrin repeat protein) - proteiiniperheeseen kuuluvat CARP (cardiac ankyrin repeat protein), Ankrd2 (ankyrin repeat protein 2) ja DARP (diabetes ankyrin repeat protein). Niitä on tutkittu toistaiseksi vähän. Kuitenkin niiden lokalisaatio eli sijainti elimistössä on melko varma, vaikkakin erilaiset mekaaniset stimulaatiot vaikuttavat niiden lokalisaatioon. MARP:ien toiminnallisesta ja rakenteellisesta merkityksestä on viime aikoina saatu lisää tietoa, mutta asia vaatii vielä lisäselvitystä ja edellisten tutkimustulosten varmistelua.

MARP:it ovat noin 50 % :sesti homologisia eli hyvin samankaltaisia rakenteeltaan (Miller ym. 2003). Proteiinien isoformit vaihtelevat riippuen siitä, ovatko ne sydän- vai luurankolihasessa (Miller ym. 2003). Barash ym. (2007) tulokset osoittivatkin, että yhden MARP - proteiinin poissaolo ei vaikuta merkittävästi lihassolun toimintaan tai rakenteeseen, eli ilmeisestikin toiset MARP:it pystyvät korvaamaan toiset. Jotta eroja normaali lihassoluun saadaan aikaan, täytyy lihassolusta poistaa kaikki kolme MARP proteiinia. Niinpä jää epäselväksi, että miksi kolmea eri proteiinia ylipäätään on. (Barash ym. 2007.)

3.1 Lokalisaatio

CARP:ia ja DARP:ia esiintyy eniten sydänlihaksessa (Miller ym. 2003), kun taas Ankrd2:ta esiintyy eniten luurankolihasissa (Ishiguro ym. 2002). Erityisesti Ankrd2:ta ilmenee hitaiden lihassolujen sytoplasmassa ja tumissa (Ishiguro ym. 2002). Myös CARP:ia ja DARP:ia on havaittu sekä luurankolihasen tumissa että sarkomeereissa (Miller ym. 2003). Samoin kuin Ankrd2:ta, myös CARP:ia ilmenee enemmän hitaissa kuin nopeissa lihassoluissa (Gautel ym. 2008). MARP:it sijaitsevat suurimman osan luurankolihasessa olemastaan ajasta sarkomeerin I - alueella kiinnittyneenä titiinin N2A regiiniin (Miller ym. 2003). Titiini ja MARP:it ovatkin vahvassa vuorovaikutuksessa toistensa kanssa (Barash ym. 2007). Titiinin lisäksi MARP:eista ainakin CARP on kiinnittyneenä myopalladiniin (Bang ym. 2001), mahdollisesti myös muihin sarkomee-

rin rakenteisiin, kuten desmiiniin (Witt ym. 2005) ja calpain proteaasi p94:ään (Miller ym. 2003, kuva 2). Ankrd2:n on osoitettu olevan kiinnittyneenä telethoniin (Kojic ym. 2004).



KUVA 2. MARP:ien lokalisaatio. Ei mittaskaalassa. (Mukaeltu Miller ym. 2003.)

Vaikka CARP:ia ja Ankrd2 - proteiinia on havaittu enimmäkseen (niiden ollessa lihas-soluissa) nimenomaan sarkomeereissä, esiintyy niitä myös lihassolujen tumissa. Ankrd2 - proteiini siirtyy myrkyn tai kuivan jään aiheuttamien lihassoluvaurioiden seurauksena lihassolujen sarkomeerin I - alueelta tumaan (Tsukamoto ym. 2008). Sydämessä passiivinen sydänlihaksen venytys saa aikaan sekä Ankrd2:n että CARP:in osittaisen siirtymisen tumaan (Miller ym. 2003).

Kaikkia MARP:eja on havaittu paitsi luurankolihasessa, myös sydänlihaksessa. Kuitenkin MARP:ien muodostumispaikoissa on eroja, sillä esimerkiksi CARP:ia muodostuu koko sydämessä, kun taas Ankrd2:ta muodostuu vain kammioissa. Lisäksi aikuisen ja 11 - viikkoisen sikiön välillä on eroja, sillä Ankrd2:ta ei havaittu sikiön sydämessä lähes lainkaan vaikka aikuisen ihmisen sydämessä määrät olivat melko suuria. (Ishiguro ym. 2002.) DARP:ia on havaittu sydän- ja luurankolihas-solujen lisäksi ruskeassa rasvassa (Ikeda ym. 2003).

3.2 Toiminta

MARP:eilla on tärkeä rooli sekä rakenteellisesti että toiminnallisesti lihassoluissa (Barash ym. 2007). Ne tunnistavat erityisesti mekaanisen ärsytyksen (Kemp ym. 2000, Miller ym. 2003), venytyksen (Kemp ym. 2000) sekä supistumistyyppin eli onko supistuminen isometristä vai eksentristä (Hentzen ym. 2006). MARP proteiinit myös stabiloivat sarkomeerin rakennetta ja estävät sarkomeerin liiallisen venymisen. Lisäksi niillä voi olla vaikutusta muiden proteiinien transkriptioon. MARP:it ovatkin todennäköisesti mukana myofibrillaarisessa signaloinnissa. Ne voivat toimia muun muassa inhibiittoreina MyoD - geenille ja lihaksen LIM - geenille. (Barash ym. 2007.) MyoD on mukana erityisesti lihaksen uusiutumisessa (Yablonka-Reuveni ym. 1999) ja lihaksen LIM - proteiini osallistuu lihaksen adaptaatioon harjoituksen seurauksena (Willmann ym. 2001). Lisäksi sekä CARP:in (Zou 1997) että Ankrd2:n (Kojic ym. 2004) on osoitettu pystyvän liittymään tumassa tiettyihin transkriptiotekijöihin (transkription käynnistävät tekijät), joka osoittaa, että MARP:eilla saattaa olla tärkeä rooli tuman ja sytoplasman välisessä signaloinnissa ja erityisesti paineen tunnistamisessa (Kojic ym. 2004).

Barash ym. (2007) tutkivat MARP:ien rakenteellisia ja toiminnallisia tehtäviä luurankolihaksen sarkomeerissä. He poistivat hiirien lihaksista joko kaikki MARP:it (MKO, triple MARP - knock out - lihakset) tai vain jotkin MARP:it. Ne lihakset joista poistettiin vain osa MARP:eista, toimivat samalla tavalla kuin kontrollilihakset, joista mitään MARP:ia ei ollut poistettu. Sen sijaan MKO - lihakset erosivat kontrollilihaksista monella tavalla. Monet MKO - lihakset olivat kontrollilihaksia löysempiä, kun lihaksia venytettiin hitaalla nopeudella. Sen sijaan nopeasti venytettäessä ei lihasten ominaisuuksissa havaittu eroja. Tämä osoittaa, että MARP:eilla on merkitystä lihasfiiberin jäykkyyden lisääjänä. Lisäksi sarkomeerin ja titiinin lepopituus oli pidempi MKO - lihaksen lihassoluilla kuin kontrollilihaksen lihassoluilla. Barash ym. (2007) arvelevat tämän johduvan titiinin eri isoformista. Eli MARP:ien poistamisella on merkitystä titiinin isoformiin. Sekä sarkomeerin pituuden muutoksen että titiinin isoformin muutoksen taustalta tutkijat päättelivät, että MARP:it jäykistävät titiiniä joko suoraan tai edesauttavat titiinin kiinnittymistä aktiiniin. Tätä kautta MARP:it jäykistävät titiiniä ja sarkomeeriä.

Samassa tutkimuksessa Barash ym. (2007) havaitsivat, että maksimaalinen vääntömomentti laski eksentrisen harjoitteen seurauksena enemmän MKO- kuin kontrollihiirillä. Tämä johtunee sarkomeerin rakenteen epästabiilisuudesta. Aktiini ja myosiinifilamentit menevät ikään kuin epäjärjestykseen kun sarkomeeri venyy liikaa. MARP:ien oletetaan nimenomaan estävän tämän liiallisen venymisen stabiloiden näin sarkomeeriä. Tämän pohjalta voidaankin ajatella, että MARP:ien tehtävän solussa on suojella sitä liiallisesta venymiseltä ja tätä kautta ehkäistä soluvaurioiden syntymistä. (Barash ym. 2007.) Voi myös olla, että MARP:it kiinnittyvät paitsi titiiniin ja myopalladiiniin (Miller ym. 2003), myös muihin sarkomeerin rakenteisiin, koska niillä on niin suuri merkitys sarkomeerin stabiilisuuden lisääjänä (Barash ym. 2007).

Tutkimuksessa havaittiinkin, että eksentrisen harjoite sai aikaan enemmän soluvaurioita MKO -lihaksissa kuin kontrollilihaksissa. Sen sijaan soluvauriot palautuivat yhtä nopeasti tai MKO - hiiret palautuivat jopa nopeammin kuin kontrollihiiret, joka osoittaa, että MARP:eja ei välttämättä tarvita tavalliseen palautumiseen. Barash ym. (2007) arvelivat tämä johtuvan MyoD- ja lihaksen LIM - proteiinien suurentuneesta konsentraatiosta MARP proteiinien poissa ollessa. Kyseisten proteiinien lisääntyminen osoittaa, että MARP:it ovat joko suoraan vuorovaikutuksessa MyoD- ja LIM- proteiineihin inhiboimalla niiden muodostumista tai sitten suurentuneet lihasvauriot lisäävät kyseisten proteiinien määrää. (Barash ym. 2007.)

Tulosten perusteella tutkijat pohtivat, että vaikka palautuminen olikin yhtä nopeaa sekä kontrolli- että MKO- hiirillä, niin onko palautuminen kuitenkaan solutasolla täydellistä ilman MARP:eja. Jos pieniäkin soluvaurioita jää, niin pidemmällä aikavälillä se johtaa solun toiminnanhäiriöihin. (Barash ym. 2007.)

CARP. *CARP*:in on arveltu olevan yksi kaikista nopeimmin reagoivista proteiineista lihasadaptaation yhteydessä (Barash ym. 2004). Sen on myös havaittu olevan päätekijä sydänlihaksen hypertrofiassa (Aihara ym. 2000) ja olevan siten mukana myös sydänlihaksen kehityksessä eli kardiogeneesissä (Zou 1997). *CARP* pystyy liittymään sydänlihassolun tumassa transkriptiotekijään nimeltä YB-1. *CARP*:in ja YB-1:n yhdiste taas vaikuttaa HF-1-TK promoottoriin niin, että sydänspesifisen myosiinin (ventricular specific myosin light chain-2) muodostuminen lisääntyy. (Zou ym. 1997.) *CARP*:in muodostuminen sydänlihaksessa lisääntyy, kun lihasta venytetään (Miller ym. 2003). Lisäk-

si CARP:in on havaittu lisääntyvän luurankolihasessa atrofian (Nakada ym. 2003) ja denervaation jälkeen (Tsukamoto ym. 2002) sekä hypertrofian (Carson ym. 2001) ja angiogeneesin eli verisuonten muodostumisen (Shi ym. 2005) yhteydessä. Lisäksi erilaiset harjoitukset, kuten kelkkahyppely (Lehti ym. 2009) ja eksentriset supistukset (Hentzen ym. 2006) lisäävät CARP:in ilmenemistä. CARP:in on havaittu olevan yhteydessä vääntömomentin laskuun eksentrisen väsytyksen jälkeen. Mitä enemmän vääntömomentti laskee, sitä enemmän CARP lisääntyy. (Hentzen ym. 2006.)

Ankrd2. Ankrd2 on samantyyppinen kuin CARP ja niiden arvellaan toimivan samalla tavalla, sillä erolla että Ankrd2:a esiintyy lähinnä tyyppin 1 lihassoluissa (Kemp ym. 2000). Sen on havaittu lisääntyvän erityisesti kun on immobilisoitu raaja venytysasentoon, luurankolihasen denervaation jälkeen (Kemp ym. 2000) sekä kasvainten yhteydessä (Ishiguro ym. 2005). Lihassolujen erilaistumiseen, myotuubien stabilointiin ja apoptoosiin eli solukuolemaan osallistuminen viittaa siihen, että Ankrd2 - proteiinilla on tärkeä tehtävä lihassolujen kehityksessä (Bang ym. 2008). Tähän tuo myös tukea se, että Ankrd2 - proteiinia on vähemmän dystrofisissa lihaksissa (Pallavicini ym. 2001). Lisäksi sen on todistettu olevan osallisina passiivisen venytyksen aiheuttamaan hypertofiaan. Passiivinen venytys (eläimellä) lisääkin Ankrd2:n määrää nelinkertaisesti. (Kemp ym. 2000.) Pallavicini ym. (2001) pohtivatkin, että Ankrd2 -proteiinilla saattaa olla osallisuutta lihassolujen muuttumisessa hitaista soluista nopeiksi esimerkiksi harjoittelun seurauksena. Ankrd2 -proteiini saattaa olla osallisena myös vaurioituneiden lihassolujen korjaukseen tarvittavien geenien ilmenemisessä (Tsukamoto ym. 2008). Ankrd2:n on todistettu pystyvän liittymään solun tumassa joihinkin transkriptiotekijöihin, kuten transkriptiotekijä p53: seen. Näiden yhdiste pystyy taas vaikuttamaan p21 WAF1/KIP1 promootoriin. Tämän seurauksena tietyn kasvainta estävän geenin ilmeneminen lisääntyy. (Kojic ym. 2004.)

DARP. DARP:in sen sijaan on havaittu olevan yhteydessä tyyppin 2 diabetekseen ja insuliiniresistenssiin hiirillä (Ikeda ym. 2003). Ikeda ym. (2003) mukaan DARP:illa saattaa olla tehtävä nimenomaan vapaiden rasvahappojen rasva-aineenvaihdunnassa. Niinpä voi olettaa, että DARP:illa on rooli myös energiametaboliassa. DARP:in konsentraatio riippuu ravitsemustilasta. DARP:ia onkin havaittu erityisesti nälkiintymisestä palautumisen yhteydessä. (Ikeda ym. 2003.)

4 SSC – KUORMITUS JA MARP:IT

MARP:ien on havaittu lisääntyvän eniten nimenomaan niissä kuormituksissa, joissa ilmenee soluvaurioita. Mekanismit, joilla lihassolut suojautuvat vaurioilta, ovat epäselviä. On kuitenkin arveltu, että MARP:eilla on osuutta lihassoluvaurioiden ehkäisemisessä tai parantamisessa. Se, lisääntyvätkö MARP:it itse kuormituksen vai soluvaurioiden seurauksena, on toistaiseksi epäselvää. (Barash ym. 2004.) Lisäksi MARP:eja on tutkittu toistaiseksi ihmisillä vai kertaalleen (Lehti ym. 2009), muiden tutkimusten ollessa eläinkoikeita Lihassoluvaurioita saadaan kaikista eniten aikaan sellaisella kuormituksella joka sisältää suurimmaksi osaksi eksentristä lihastyötä (McCully & Faulkner 1985, Sorichter ym. 1997). SSC – liike on juuri tällainen liike.

4.1 SSC- kuormitus ja lihassoluvauriot

SSC - (stretch - shortening- cycle) eli venymis - lyhenemis - sykli tarkoittaa sellaista liikettä, jossa aktiivista venytystä eli eksentristä liikettä seuraa konsentrisen liike. Tällainen liike toistuu esimerkiksi kävellessä, juostessa ja hyppiessä (Komi 1984). Tällainen liike sisältää paljon eksentristä liikettä (Komi ym. 1984) ja saa sen kautta aikaan paljon lihassoluvaurioita (Armstrong ym. 1983).

Alamäkijuoksun on havaittu saavan aikaan enemmän lihassoluvaurioita kuin ylämäkijuoksun. Tämä johtuu ilmeisesti siitä, että alamäkijuoksussa liike on suurimmaksi osaksi eksentristä, kun taas ylämäkijuoksu sisältää yhtä paljon sekä konsentristä että eksentristä liikettä. Kummatkin kuormitukset saivat aikaan soluvaurioista kertovien entsyymien välittömän nousun, mutta alamäkijuoksun jälkeen entsyymien konsentraatio nousi vielä lisää muutaman päivän päästä suorituksesta. Kummassakin suorituksessa syvällä olevat hitaat lihassolut olivat kaikista eniten vahingoittuneita ja samojen lihassolujen sisään kerääntyi päivän päästä kuormituksesta makrofaageja. (Armstrong ym. 1983.) Schwane ym. (1983) eivät havainneet tasojuoksun aiheuttavan viivästynyttä lihaskipua (DOMS, delayed onset muscle soreness) eivätkä lihassoluvaurioista kertovien entsyymien nousua. Alamäkijuoksussa DOMSia havaittiin muutaman päivän jälkeen suorituk-

sesta. Valkosolujen, kuten makrofaagien, ei havaittu olevan yhteydessä lihassoluvaurioiden määrään. Tutkijat tulivat tulosten perusteella johtopäätökseen, että entsyymitasojen nousu ja DOMS johtuvat lihassolujen rakenteellisesta rikkoutumisesta eksentristen liikkeiden seurauksena.

Eksentrisen kuormituksen jälkeen osa lihassoluista vaurioituu ja maksimaalinen isometrisen voima on ainakin kolme päivää alkutasoa alhaisempi. Sen sijaan isometrisen kuormituksen tai passiivisen venytyksen jälkeen huomattavaa voiman laskua tai lihassolujen vaurioitumista ei ole havaittavissa kolmantena päivänä kuormituksesta. (Koh ym. 2001.)

Ei ole vielä aivan selvää miksi soluvaurioita muodostuu juuri eksentrisen kuormituksen jälkeen. Friden ym. (1998) päättelivät, että heidän tutkimuksessaan, jossa koehenkilöt suorittivat eksentrisiä liikkeitä, soluvauriot johtuivat monesta eri syystä. Syitä olivat muun muassa solutukirangan vioittuminen, Z ja A - linjan epäjärjestäytyminen ja solujen rakenteen rikkoutuminen. Solun pinnan rikkoutumisen lisäksi lihassoluissa havaittiin ylisupistuneita alueita ja invaasiota, eli valkosolujen (kuten makrofaagien) kerääntymistä alueelle. Lihassolun rikkoutuessa ja sen toiminnan häiriintyessä jäljelle jäävät eheät solut jännittyvät rikkoutuneidenkin solujen sijasta ja kuormituksen edetessä yhä pienempi osa lihaksesta kuormittuu. Tällöin yhdelle lihassolulle tulee enemmän painetta kuin mitä tulisi, jos koko lihas olisi toimintakykyinen. (Friden ym. 1998.) Vaurioituneissa soluissa on havaittu myös akuuttia nesteen kerääntymistä, joka johtuu hiussuonten läpäisevyyden suurentumisesta (MacIntyre ym. 1996) sekä solunsisäisen kalsiumin lisääntymistä (Amstrong ym. 1991).

Yo ym. (2002) tutkivat, että onko totta, että lihassoluvaurioiden yhteydessä menetetään desmiiniä (solutukirangan proteiini) ja sarkolemma (lihassolukalvo) vaurioituu. He havaitsivat, että kumpaakaan ei tapahdu eksentristen liikkeiden seurauksena vaikka DOMSia havaittiinkin. Tulokset olivat päinvastaisia monelle aiemmalle tutkimukselle (McNail & Khakee 1992, Lieber ym. 1996).

Lihassoluvaurioiden määrää tutkitaan mittaamalla erilaisten yhdisteiden määrää veressä. Eniten on käytetty veren seerumin kreatiinikinaasikonsentraation mittausta. Konsentraation ajatellaan olevan yhteydessä soluvaurioiden määrään (Nosaka ym. 1992b), vaikka

kin joissain tutkimuksissa on osoitettu, että kreatiinikinaasikonsentraatio ei välttämättä vastaa soluvaurioiden määrää (Nosaka ym. 1992a). Kreatiinikinaasikonsentraatiota on kuitenkin pidetty soluvaurioiden mittarina myös kelkkahypelyn jälkeen. Kreatiinikinaasikonsentraatio on korkeimmillaan kahden päivän päästä kelkkakuormituksesta. (Horita ym. 1996.)

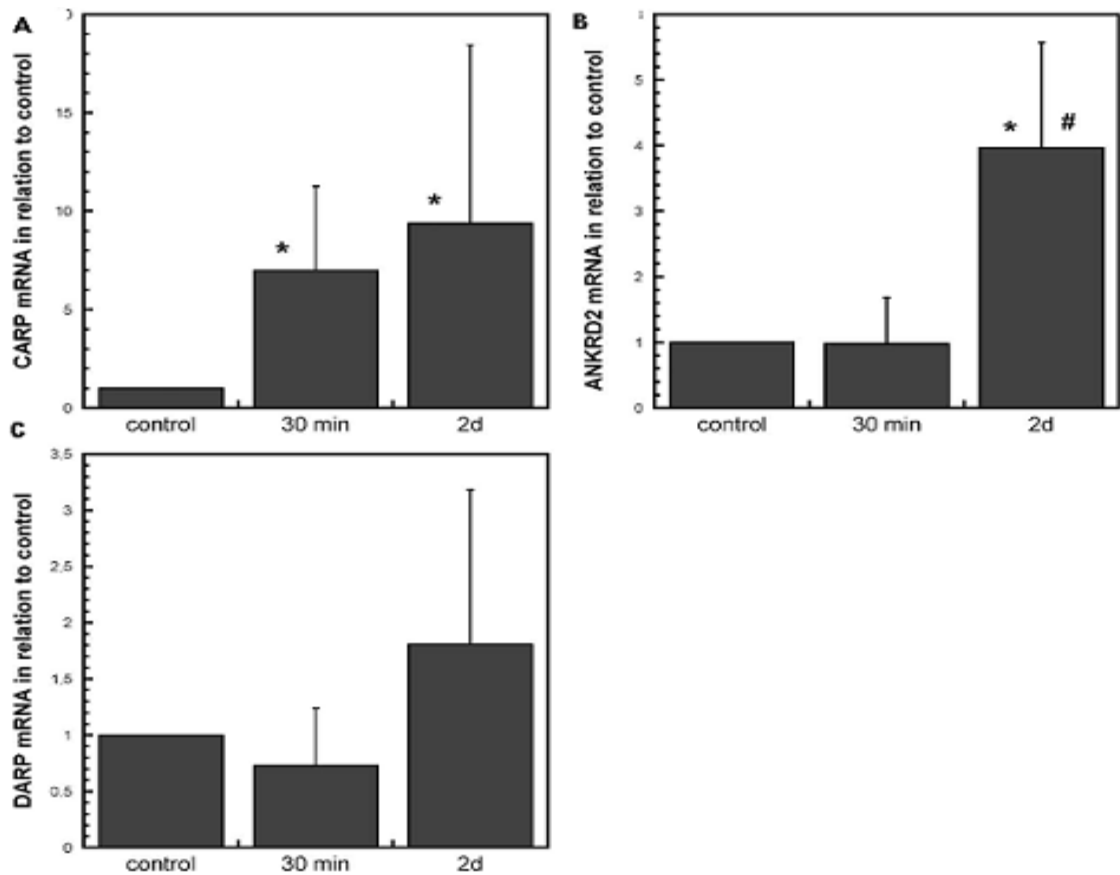
Kreatiinikinaasikonsentraation lisäksi aspartaatti aminotransferaasin, laktaatti dehydrogenaasin, alaniini aminotransferaasin ja myoglobiinin on havaittu nousevan raskaan eksentrisen harjoituksen seurauksena. Kuitenkaan niiden määrät eivät nousseet yhtä paljon kuin kreatiinikinaasin. Kaikkien yhdisteiden konsentraatiot nousivat merkitsevästi vasta kahden päivän päästä kuormituksesta. Tätä ilmiötä kutsutaan viivästyneeksi lihasvaurioksi. Tähän on syynä ilmeisesti se, että vahingoittuneet lihassolut pystyvät vapauttamaan proteiineja viiveellä tai sitten proteiinit eivät pysty lähtemään solunsisäisestä tilasta kuin vasta 40 tunnin kuluttua vaurioitumisesta. Kaikkien yhdisteiden konsentraatiopiikit havaittiin vasta 3 - 5 päivän päästä kuormituksesta. (Nosaka ym. 1992b). Toisaalta rottien alamäkijuoksuharjoittelussa esimerkiksi kreatiinikinaasi ja laktaatti dehydrogenaasin konsentraatiot nousivat välittömästi suorituksen jälkeen, mutta myös tässä tutkimuksessa konsentraatiopiikki havaittiin vasta kahden päivän kuluttua suorituksesta. (Amstrong ym. 1983).

4.2 MARP:ien lisääntyminen liikunnan jälkeen

MARP - proteiinien konsentraatiot ovat fyysisestä kuormituksesta palautumisen yhteydessä jonkinlaisessa suhteessa vääntömomentin laskuun (Barash ym. 2004). Kaikista selvin korrelaatio heti kuormituksen jälkeen on CARP:illa. Mitä enemmän vääntömomentti laskee kuormituksen seurauksena, sitä enemmän CARP:ia muodostuu lihaksissa. (Hentzen ym. 2006.)

Lehti ym. (2009) tutkivat MARP:ien mRNA määrien muutosta ihmisten SSC - kuormituksen seurauksena. 30 minuutin ja kahden päivän päästä yhden jalan kelkkahypely kuormituksesta otettiin biopsiat, joista määritettiin mRNA konsentraatioiden muutokset verrattuna kontrollitasoon. Kontrollibiopsia otettiin ei - väsytetystä jalasta kaksi päivää

kuormituksen jälkeen. Tulokset osoittivat, että SSC - kuormitus lisää CARP:in ja Ankrd2:n mRNA konsentraatiota. Tutkijat pohtivat, että CARP saattaa olla yksi ensimmäisistä geneistä, joka reagoi kuormitukseen, sillä CARP:in mRNA määrä oli lisääntynyt jo 30 minuuttia kuormituksen jälkeen 7 - kertaiseksi. Konsentraatio pysyi koholla kaksi päivää kuormituksen jälkeen, ollen silloin 9 – kertainen. Tosin viidellä kahdeksasta koehenkilöstä CARP:in mRNA määrä oli vähentynyt 30 minuutin kohdalla mitatusta arvosta kahden päivän jälkeen mitattuun arvoon, vaikka keskiarvo näyttääkin siltä, että kahden päivän jälkeinen konsentraatio olisi suurempi. Sen sijaan Ankrd2:n mRNA - konsentraatio ei ollut noussut 30 minuutin jälkeen kuormituksesta, mutta kahden päivän päästä kuormituksesta määrä oli nelinkertaistunut kontrollitasoon nähden. DARP:in mRNA määrän ei havaittu nousevan missään vaiheessa kuormituksen seurauksena (kuva3). Kyseinen tutkimus oli ensimmäinen ihmistutkimus, jossa CARP:in ja Ankrd2:n havaittiin lisääntyvän kuormituksen jälkeen. Aiemmin MARP proteiinien määrien muutoksia kuormituksen seurauksena oli tutkittu vain eläinkokein.



KUVA 3. CARP:in (A), Ankrd2:n (B) ja DARP:in (C) mRNA määrät verrattuna kontrolleihin 30 minuutin ja kahden päivän (2d) jälkeen kuormituksesta. * $P < 0,05$ verrattuna kontrolliin, # $P < 0,05$ verrattuna 30 minuutin kohdalla olevaan mRNA määrään. (Mukaeltu Lehti ym. 2009.)

Barash ym. (2004) havaitsivat eläinkokeissa eksentrisen harjoituksen lisäävän kaikkien MARP - perheen proteiinien muodostumista kuormitetuissa lihaksissa. CARP:in määrä kuormitetuissa lihaksissa oli 12 tunnin jälkeen kuormituksesta 9-kertainen kuormittamattomiin kontralateraalisiin (vastaavat osat vartalon toisella puolella) lihaksiin nähden. Konsentraatio palautui lähtötasolleen 24 tunnin kuluessa. CARP:in äärimmäisen nopean ja runsaan lisääntymisen oletetaan olevan merkinä siitä, että kyseinen geeni on yksi merkittävimmistä geneistä, jotka toimivat lihasadaptaation yhteydessä. Mielenkiintoista on myös se, että kontralateraalisten lihasten CARP tuotanto oli vähentynyt merkittävästi 48 tunnin kuluttua kuormituksesta. Ankrd2 lisääntyi kuormitetuissa lihaksissa samansuuntaisesti kuin CARP. Konsentraatio oli suurimmillaan 12 tuntia kuormituksesta, jolloin se oli 6 - kertainen kontralateraalisiin lihaksiin nähden. Konsentraatio palautui lähtötasolleen 48 tunnin aikana.

Samassa kuormituksessa DARP:in määrä nousi sekä kuormitetuissa että kontralateraalisisissa lihaksissa, verrattuna kontrollihiiriin. Sen sijaan jalkojen välillä ei ollut eroja. Tutkijat rohkenevat epäillä, että virhelähteenä saattaa olla kontrollihiirien ja kuormituksessa olevien hiirien välinen ero kyseisen geenin lepotoiminnassa, jolloin DARP:in lisääntyminen ei ole todellista. Isometrinen harjoite ja passiivinen lihaksen venytys saivat aikaan vain pienen MARP - proteiinien lisääntymisen. Tästä voidaan päätellä, että MARP:it lisääntyvät nimenomaan soluvaurioita lisäävän kuormituksen jälkeen. (Barash ym. 2004.) Toisaalta taas Kemp ym. (2000) saivat Ankrd2 lisääntymään myös sellaisen venytyksen seurauksena, joka ei välttämättä saanut aikaan soluvaurioita.

Hentzen ym. (2006) havaitsivat CARP:in lisääntyvän hiirillä sekä isometrisessä että eksentrisessä kuormituksessa. Muutos lähtötasoon oli kuitenkin myös tässä tutkimuksessa suurempi eksentrisen kuin isometrisen kuormituksen jälkeen. Ankrd2 sen sijaan lisääntyi vain eksentrisen kuormituksen seurauksena. CARP lisääntyi suhteessa enemmän kuin Ankrd2. Ankrd2:n lisääntymisen ei havaittu olevan yhteydessä siihen, että minkä taajuisia sähköstimulaatioita harjoituksen aikana annettiin, toisin kuin CARP:in lisääntymisen. Tutkijat tulivat johtopäätökseen, että CARP:in lisäksi myös Ankrd2 tunnistaa lihaksen supistumistyyppin, mutta se ei tunnista ulkoista kudosaärsytystä.

5 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TUTKIMUSONGELMAT JA HYPOTEESIT

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia MARP:ien (muscle ankyrin repeat protein) ilmenemisen muutosta lihassoluissa kelkkahyppelykuormituksen seurauksena. Tulosten perusteella pystytään epäsuorasti arvioimaan kyseisten proteiinien synteesissä tapahtuvaa nopeuden muutosta. Usein, vaikkakaan ei aina, mRNA ja proteiinitason muutokset ovat yhteydessä toisiinsa. Kun mRNA lisääntyy, lisääntyy myös kyseisen proteiinin määrä ja aktiivisuus.

Tutkimusongelma. Lisääntykö CARP:in, Ankrd2:n ja DARP:in määrä lihassoluissa SSC (stretch shortening cycle) -kuormituksen seurauksena?

Hypoteesit:

- CARP:in mRNA:n määrä nousee nopeasti kuormituksen seurauksena ja pysyy koholla ainakin kolme tuntia.
- Ankrd2:n mRNA:n määrä on noussut viimeistään kolmen tunnin jälkeen kuormituksesta.
- DARP:in mRNA määrä ei nouse merkitsevästi protokollan aikana.

6 MENETELMÄT

6.1 Koehenkilöt

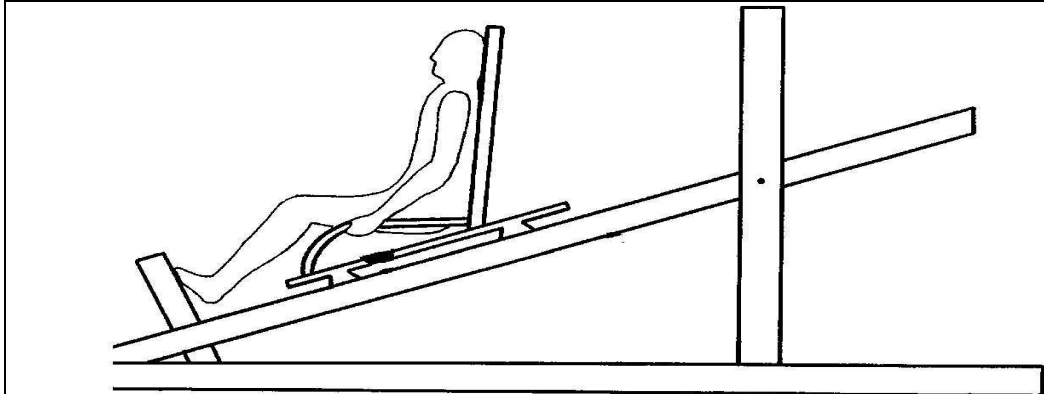
Yhdeksän vapaaehtoista miestä (26 ± 6 vuotta, 180 ± 8 senttimetriä, 78 ± 11 kilogrammaa) suorittivat saman protokollan. Mitään muita kriteereitä ei ollut, kun että he ovat nuorehkoja aikuisia. Siksi myös esimerkiksi harjoittelutaustat olivat hyvin erilaisia. Heitä informoitiin tutkimuksen tarkoituksesta, kaikista tulevista toimenpiteistä ja mahdollisista riskeistä tutkimukseen liittyen ennen kuin he allekirjoittivat suostumuskaavakkeen. Tutkimus tehtiin Helsingin julistuksen mukaisesti ja sen oli hyväksynyt Jyväskylän yliopiston eettinen toimikunta.

6.2 Protokolla

Jokainen koehenkilö toisti saman protokolla. Koehenkilö sai 2,5 tuntia ennen kuormitusta energiapatukan (180 kCal) ja vettä. Tätä ennen he olivat paastonneet yön yli. Kuormitus alkoi verryttelemällä polkupyöräergometrillä noin 10 minuuttia, jonka jälkeen hän siirtyi kelkkaan (Liikuntabiologian laitos, kulma 23 astetta, kuva 4). Kelkassa hän sai tehdä yhden- ja kahdenjalan verryttelyhyppyjä, jonka jälkeen mitattiin isometrisessä maksimivoimamittauksessa käytetty polvikulma (107 astetta) ja oikea pudotuskorkeus (suorien jalkojen pituuteen lisättiin 40 senttimetriä). Tämän jälkeen mitattiin kummankin jalan maksimivoimat (MVC) erikseen, kummastakin jalasta kolmesti. Tämän jälkeen koehenkilö suoritti 10 maksimaalista pudotushyppyä kummallakin jalalla erikseen (1 hyppy/5 s). Dominoivan jalan suorituksista kirjattiin parhaan hypyn korkeus. Tämän jälkeen alkoi dominoivan jalan väsytyk-

Koehenkilö hyppi dominoivalla jalalla 50 % maksimikorkeudesta niin kauan kuin jaksoi (7-20 minuuttia). Koehenkilöä ohjattiin verbaalisesti oikean korkeuden saavuttamiseksi. Kun koehenkilö ei jaksanut enää tehdä 50 % hyppyjä, hän jatkoi vielä hyppimistä niin kauan kuin jalka nousi maasta, täydelliseen uupumukseen saakka. Välittömästi väsytyksen jälkeen suoritettiin uudestaan 10 maksimaalista hyppyä kummallakin jalalla erik-

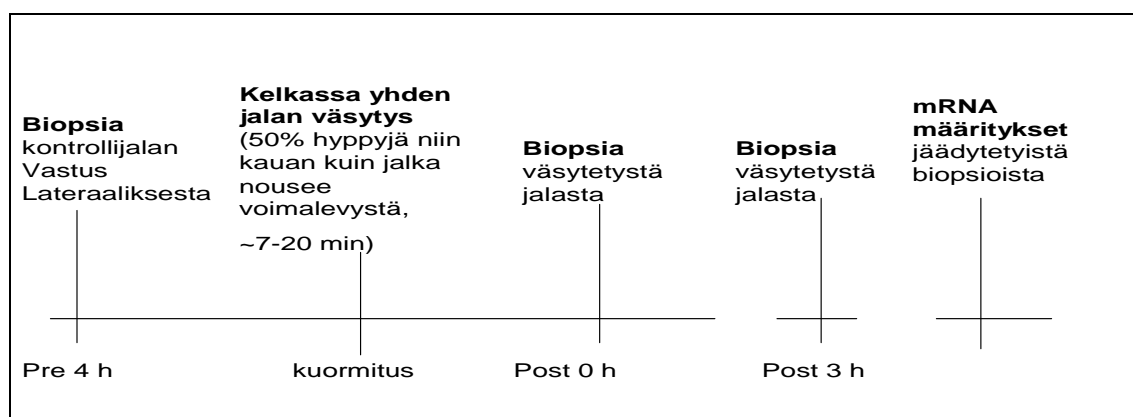
seen, ensin ei – dominoivalla jalalla. Tämän jälkeen määritettiin MVC:t uudestaan kummastakin jalasta kolmesti. Noin puoli tuntia tämän jälkeen koehenkilö sai energia-patukan ja vettä. Noin 3,5 tuntia yhden jalan väsytyksestä mitattiin vielä MVC:t sekä maksimihyppyykorkeudet kummastakin jalasta.



KUVA 4. Kelkka, jolla hyppelykuormitus suoritettiin (Mukaeltu Strojnik & Komi 1998).

6.3 Biopsiat

Koehenkilöltä otettiin biopsia noin 4 tuntia ennen kuormitusta ei - dominoivan jalan (kontrollijalka) Vastus Lateraliksesta. Kyseinen näyte toimi kontrollinäytteenä (pre-näyte). Dominoivasta jalasta näyte otettiin heti kuormituksen jälkeen ja noin 3 tuntia kuormituksen jälkeen. Näytteet otettiin keskikohdasta lihasta paikallispuudutuksen avulla. Biopsiat jäädettiin upottamalla folioon kääritty näyte nestetyöllä jäädytettyyn isopentaaniin. Näytteitä säilytettiin -80 celsius asteessa myöhempiä analyysejä varten.



KUVA 5. Protokolla.

6.4 mRNA - määrän määrittäminen

Kun määritetään mRNA (messenger RNA, lähetti- RNA) – määrää, eristetään lihasnäytteestä ensin kaikki mahdollinen RNA. Sen jälkeen mRNA koodataan cDNA:ksi (komplementaarinen DNA), jotta lopuksi cDNA:sta voidaan tehdä kopioita PCR (polymerase chain reaction) - laitteen avulla. RT (Real Time)- PCR – kone tunnistaa tätä kautta halutun cDNA:n määrän, joka siis vastaa alkuperäistä mRNA – määrää.

6.4.1 RNA:n eristys

Määrittäessä näytteen mRNA:n konsentraatiota, ensimmäiseksi biopsioista täytyy eristää kaikki mahdollinen RNA. Tätä varten biopsia täytyy aluksi saada liukenemaan nesteeseen eli solurakenne täytyy saada rikottua. Tämä tapahtuu homogenoimalla biopsia TRI Reagent® Solution – reagenssin (Applied Biosystems) avulla. Reagenssi sisältää soluja rikkovia ja RNA:ta suojaavia aineita. Menetelmässä biopsia ja TRI – reagenssi homogenoidaan homogenointilaitteessa (FastPrep, FP120/ BIO101, ThermoSavant, Gaithersburg, MD) siihen tarkoitetuissa putkissa (Lysing Matrix D, MP biomedical, Saksa). Tämän jälkeen RNA saadaan eristetyksi liuoksesta lisäämällä nesteeseen kloroformia ja sentrifugoimalla. Tällöin putken päälle syntyy vesifaasi, johon RNA on kerääntynyt. Tämä faasi otetaan varovaisesti talteen, varomalla ottamasta alemmaa faasia, sillä alemmassa faasissa on erityisesti DNA:ta, joka vaikuttaa totaali RNA- näytteen puhtauteen. RNA saadaan saostetuksi talteen otetusta faasista lisäämällä siihen isopropanolia ja sentrifugoimalla putki. RNA saostuu näin putken pohjalle. Kun saostunut RNA on eristetty nesteestä, se vielä pestään 75 %:lla etanolilla, ilmakeivataan ja liuotetaan RNAasi vapaaseen veteen (DEPC, dietyylipyrokarbonaatti - vesi).

Totaali- RNA- eristyksen jälkeen tarkistettiin vielä näytteen puhtaus ja konsentraatio spektrofotometrillä (NanoDrop, ND- 1000, Thermo Scientific, USA). Puhtaus määritetään yleisesti mittaamalla näytteiden absorbanssit aallonpituuksilla 260 ja 280. RNA absorboi aallonpituutta 260 ja DNA aallonpituutta 280, joten mitä isompi näiden suhde on, sitä puhtaampaa RNA on. Suhteen tulee olla lähellä 2:ta. Jos RNA on epäpuhdasta, erityisesti seuraavassa vaiheessa (cDNA:ksi kääntäminen) tapahtuu reaktioita, jotka teke-

vät tuloksista epäluotettavia. Näytteistä otettiin ylös myös RNA – konsentraatiot, jotka spektrofotometri antoi suoraan.

6.4.2 cDNA:ksi kääntäminen

Totaali RNA:n eristyksen jälkeen kaikki RNA tulee kääntää komplementaariksi DNA:ksi (cDNA), jotta tietyn geenin mRNA:n määrä voidaan määrittää PCR- (polymerase chain reaction) tekniikan avulla. Käytimme tässä High- Capacity cDNA Archive kittiä (Applied Biosystems). Tätä varten kaikki näytteet sekoitettiin PCR – putkissa RT mastermix liuokseen. Mastermix sisältää PCR:ään tarvittavia satunnaisia alukkeita, puskuriliuosta, nukleotideja (A, T, C, G), MultiScribe Reverse käänteiskopioija - entsyymiä ja DEPC - vettä. Näytteen määrä laskettiin näytteiden alkuperäisistä RNA - konsentraatioista niin, että jokaiseen PCR - putkeen tuli sama määrä RNA:ta. RNA:n lisäksi putkiin lisättiin DEPC - vettä niin, että putken yhteistilavuudeksi tuli 20 mikrogrammaa. Putkille suoritettiin PCR - ajo (Eppendorf PCR - laite, Eppendorf AG, No: 5345011249, Hamburg).

6.4.3 Kvantitatiivinen Real-Time PCR

Varsinainen tiettyjen geenien mRNA:n määrän määrittäminen aloitettiin tekemällä cDNA - näytteistä standardisuoran näytteet. Tämän lisäksi itse templaattit laimennettiin sopiviksi (1nanogramma/mikrolitra), jotta niitä voitiin käyttää PCR - ajossa. PCR:ssä käytettiin TaqMan metodia. Kyseisessä metodissa näytteeseen lisättävä mastermix sisältää koettimia, joissa on kiinni fluoresoivia partikkeleita (ei fluoresoi vielä ollessaan kiinni koettimissa). Kun cDNA kopioita syntyy, fluoresoivat partikkelit irtoavat koettimista ja PCR - kone tunnistaa fluoresenssin vahvuuden. Niinpä mitä aikaisemmin näyte on fluoresoiva, sitä enemmän näyte sisältää kyseessä olevaa cDNA:ta. Tämän kautta ohjelma laskee alkuperäiset kyseessä olevan geenin (esim. CARP) cDNA konsentraatiot käyttäen apunaan standardisuoraa. Jotta ohjelman laskemia konsentraatioita voidaan käyttää hyväksi, pitää ne suhteuttaa niin sanottuihin housekeeping - geeneihin (geenit jotka ilmenevät aina samanlailla, riippumatta siitä onko lihasta vaikkapa kuormitettu). Tutki-

mukksessa käytettiin housekeeping geeninä Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenaasia (GAPDH).

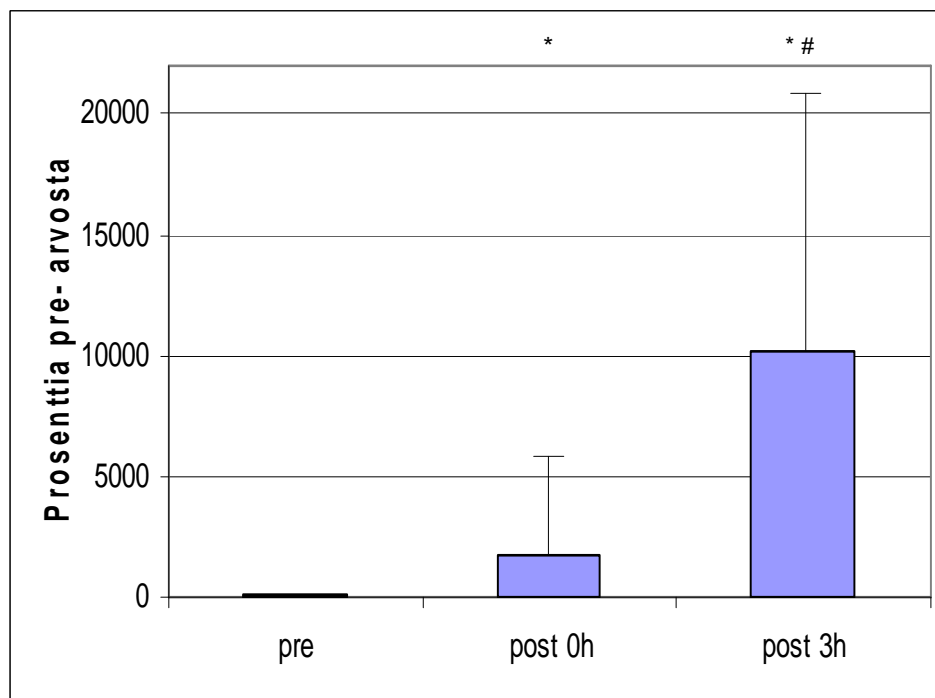
PCR - levyn kaivoihin ensiksi pipetoitava PCR mastermix valmistettiin vedestä, Taq-Man mastermixistä (Applied Biosystems) ja mitattavan geenin alukkeista, jotka tilattiin valmiina Applied Biosystemsiltä (CARP: Hs00173317_m1, Ankrd2: Hs00220469_m1, DARP: Hs00329135_m1, GAPDH: Hs99999905_m1). Tätä PCR - mixiä pipetoitiin jokaisen PCR - levyn kaivoon 18 ul. Tämän jälkeen ensimmäisiin kaivoihin pipetoitiin blankit eli vedet (2ul) ja seuraaviin standardisuoran näytteet (2ul). Loppuihin kaivoihin pipetoitiin kolminkertaiset rinnakkaisnäytteet eri templaatteja eli alkuperäisen mRNA:n cDNA näytteitä (2ul). Jokaisessa näytekauvossa oli tällöin noin 2 ng totaali - RNA:ta. Näytteet ajettiin erikseen jokaiselle geenille Real Time PCR laitteella (7300 Real Time PCR system, AB Applied Biosystems, serial no: 273001412, Signapore 2005).

6.4.4 Tulosten käsittely

PCR - ohjelma laski jokaisen geenin cDNA – määrän (joka vastaa mRNA - määrää) automaattisesti standardisuoran avulla. Konsentraatiot normalisoitiin housekeeping – geeni GAPDH:iin. Tämän jälkeen laskettiin kaikkien koehenkilöiden suhteelliset muutokset omaan lähtötaso (pre) arvoon. Kolmesta rinnakkaisnäytteestä käytettiin keskiarvoa. Tilastolliset analyysit tehtiin SPSS 15 ohjelmalla käyttäen nonparametrisia Friedmanin ja Wilcoxonin testejä. Nonparametriset testit valittiin koehenkilöiden vähäisen määrän vuoksi. Tilastollisen merkitsevyyden rajaksi valittiin $P < 0,05$ (yksisuuntainen).

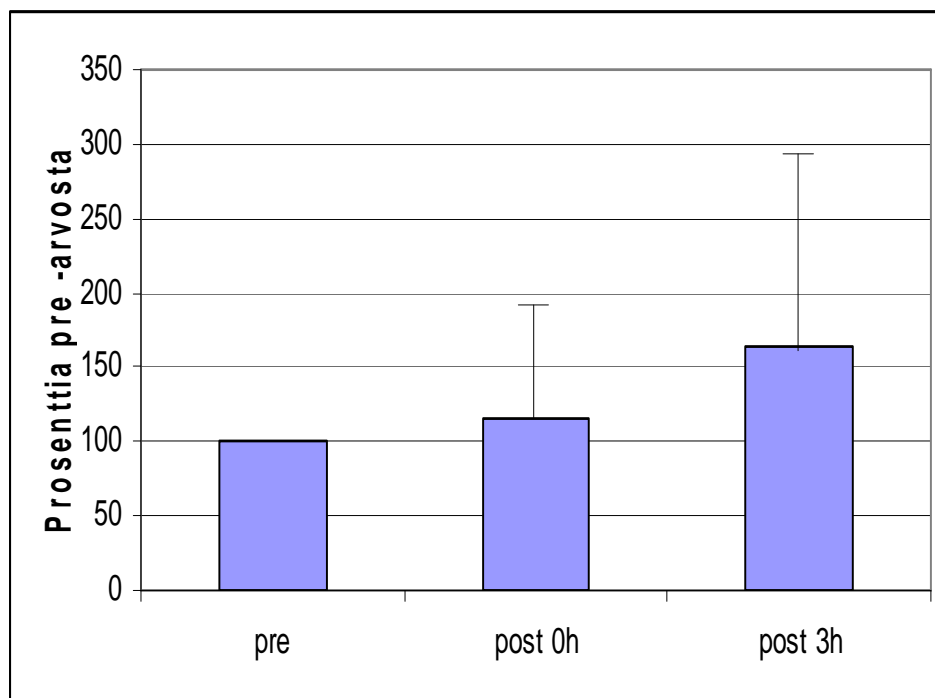
7 TULOKSET

CARP. *CARP*:in mRNA - määrissä havaittiin suurimmat muutokset. Heti kuormituksen jälkeen määrä oli lisääntynyt noin 17 – kertaiseksi (1740 % ± 4323 % pre - arvosta) lähtötasoon verrattuna. Huomattavaa kuitenkin on, että viidellä yhdeksästä koehenkilöstä konsentraatio oli tässä aikapisteessä kontrolliarvoa pienempi. Keskiarvoa lisää voimakkaasti yhden koehenkilön arvo joka oli yli 132-ertainen omaan kontrolliinsa nähden. Kolme tuntia kuormituksesta *CARP*:in mRNA - määrä oli keskimäärin jopa 102 – kertaistunut (10184 % ± 11676 % pre - arvosta). Tässä aikapisteessä ei ollut yksittäistä poikkeavaa koehenkilöä, joka vetäisi keskiarvoa jompaankumpaan suuntaan. Jokaisella koehenkilöllä kolmen tunnin jälkeinen arvo oli suurempi kuin heti kuormituksen jälkeinen. Kummassakin aikapisteessä muutos lähtötasoon oli tilastollisesti merkitsevä (kuva 6).



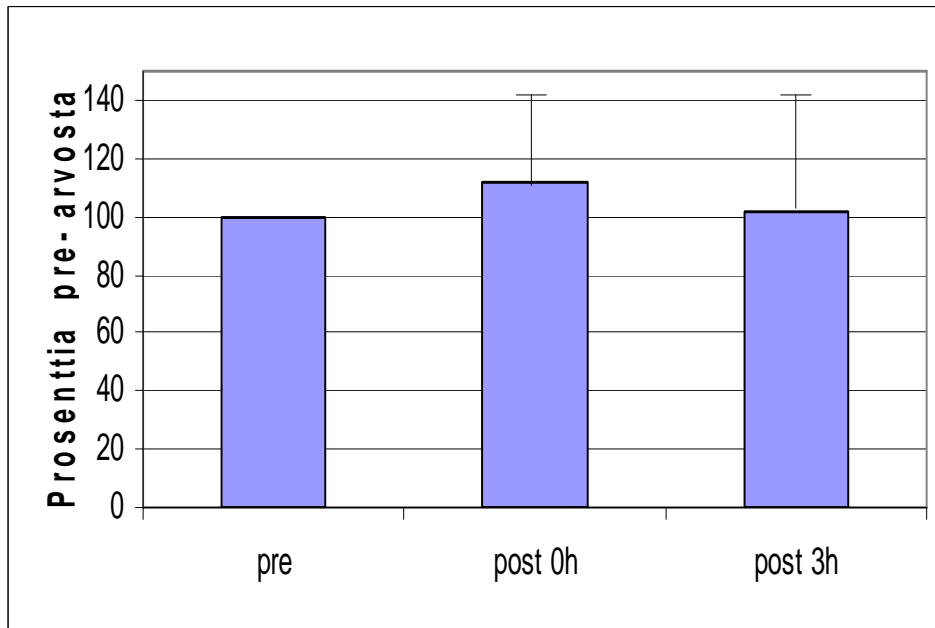
KUVA 6. *CARP*: in mRNA – määrä (keskiarvo ± keskihajonta) eri aikapisteissä suhteutettuna lähtötason arvoon (%). * Muutos tilastollisesti merkitsevä ($P < 0,05$) verrattuna pre- arvoon. #Muutos tilastollisesti merkitsevä ($P < 0,05$) verrattuna post 0h –arvoon.

Ankrd2. *Ankrd2*:n mRNA - määrien muutokset eivät olleet tilastollisesti merkitseviä, mutta keskiarvot erosivat kuitenkin lähtöarvosta (kuva 7). Heti kuormituksen jälkeen määrä oli noussut 15 % (115 % \pm 75 % pre - arvosta) lähtöarvoon verrattuna. Tämänkin proteiinin kohdalla muutoksissa oli kuitenkin suurta vaihtelua ja heti kuormituksen jälkeen neljän koehenkilön *Ankrd2* mRNA - määrät olivat kontrollimääriä alhaisemmat. Kolme tuntia kuormituksesta mRNA:n määrä oli noussut keskimäärin 64 % (164 % \pm 147 % pre - arvosta) lähtöarvosta, mutta tässäkin kohtaa kolmen koehenkilön mRNA - määrät olivat sekä kontrollitasoa että heti kuormituksen jälkeistä arvoa matalammat.



KUVA 7. *Ankrd2*:n mRNA – määrä (keskiarvo \pm keskihajonta) eri aikapisteissä suhteutettuna pre – arvoon (%).

DARP. *DARP*:in mRNA - määrissä ei tapahtunut suuria muutoksia protokollan aikana (kuva 8). Heti kuormituksen jälkeen määrä oli noussut 12 % (112 % \pm 33 % pre - arvosta) ja kolmen tunnin kuluttua määrä oli vain 2 % (102 % \pm 40 % pre - arvosta) lähtötasoa korkeammalla. Keskihajonnatkaan eivät olleet yhtä suuret kuin kahdessa muussa *MARP*:issa. Suurin yksittäisen koehenkilön ero kontrollinäytteeseen oli mRNA:n kaksinkertaistuminen heti kuormituksen jälkeen. mRNA – määrien vaihtelut eivät olleet tilastollisesti merkitseviä missään vaiheessa protokollaa.



KUVA 8. DARP:in mRNA määrät (keskiarvo \pm keskihajonta) eri aikapisteissä verrattuna pre – arvoon.

8 POHDINTA

CARP. *CARP*:in mRNA - määrä nousi voimakkaasti SSC – kuormituksen seurauksena. Tulos oli hypoteesin mukainen. *CARP*:in mRNA määrä oli heti kuormituksen jälkeen 17 -ertainen lähtötasoon nähden. Kolmen tunnin jälkeen kuormituksesta määrä oli jopa 102 - kertaistunut. Kahden kuormituksen välisen mittauksenkin määrissä oli tilastollisesti merkitsevä ero toisiinsa. Tulokset vahvistavat Lehti ym. (2009) päätelmiä siitä, että *CARP* on yksi nopeimmin ilmenevistä geneistä SSC - kuormituksen jälkeen. Nopeasta vasteesta voidaan myös päätellä, että sillä on jonkinlainen tehtävä lihaksen adaptoitumisessa sellaiseen harjoitukseen, jonka seurauksena syntyy paljon soluvaurioita. Tässä tutkimuksessa saadut muutokset ovat vielä huomattavasti suurempia kuin aiemman ihmistutkimuksen, jossa kuormituksen jälkeinen mRNA konsentraatio oli vain 7-kertainen kontrollitasoon nähden. Kuitenkin myös Lehti ym. (2009) havaitsivat koehenkilöiden väliset suuret erot. Myös heidän tutkimuksessaan suurimmalla osalla koehenkilöistä *CARP*:in mRNA - määrä oli kontrollitasoa matalampi heti kuormituksen jälkeen, mutta yhdellä määrä oli 30- kertaistunut kontrollitasoon verrattuna. Tosin Lehti ym. (2009) tutkimuksessa kuormituksen jälkeinen näyte otettiin puoli tuntia kuormituksen jälkeen kun tässä tutkimuksessa näyte pyrittiin ottamaan mahdollisimman nopeasti kuormituksen jälkeen.

Ankrd2. *Ankrd2*:n mRNA:n määrä ei tässä tutkimuksessa tilastollisesti merkitsevästi muuttunut, toisin kuin Lehti ym. (2009) tutkimuksessa. Niinpä hypoteesi ei aivan toteutunut. Kuitenkin keskiarvoissa on nähtävissä, että määrä on nousemaan päin. Heti kuormituksen jälkeen määrä ei ole vielä noussut paljoa, mutta kolmen tunnin jälkeen kuormituksesta määrä on 150 % kontrolliarvosta. Hypoteesinakin oli, että määrä olisi noussut viimeistään kolmen tunnin päästä kuormituksesta. Tulokset vahvistavat aiemman samankaltaisen tutkimuksen tuloksia (Lehti ym. 2009), sillä myöskään aiemmassa tutkimuksessa *Ankrd2*:n mRNA - määrä ei ollut noussut heti kuormituksen jälkeen, mutta kahden päivän päästä huomattiin tilastollisesti merkitsevä ero kontrollitasoon nähden. Niinpä näiden kahden tutkimuksen perusteella voisi päätellä, että *Ankrd2*:n mRNA - määrä alkaa nousta muutaman tunnin jälkeen kuormituksesta ja on koholla ainakin muutaman päivän. Kuitenkaan tulokset eivät ole aivan yksiselitteisiä, sillä keskihajonnat

ovat kummassakin tutkimuksessa suuret ja lisäksi tässä tutkimuksessa tulokset eivät ole tilastollisesti merkitseviä.

Ankrd2:n ja CARP:in määrien muutokset eivät näyttäneet ainakaan silmämääräisesti olevan riippuvaisia toisistaan. Tämä tarkoittaa, että jos jollain koehenkilöllä CARP:in mRNA - määrä nousi huomattavasti, niin Ankrd2:n mRNA - määrä ei välttämättä nousut yhtään. Tämä osoittaisi, että kyseisten geenien ilmenemistä säätelevät eri tekijät, vaikka ne ovatkin niin samankaltaisia toistensa kanssa.

DARP. *DARP*:in mRNA määrissä ei tapahtunut tilastollisesti merkitseviä muutoksia protokollan aikana. Tämä oli hypoteesinakin aiempien eläintutkimusten ja Lehti ym. (2009) tutkimuksen perusteella. Myöskään keskiarvoissa ei tapahtunut suuria muutoksia ja keskihajonnat olivat pieniä. Tämä tulos on sinällään merkitsevä, sillä se vahvistaa aiempien tutkimusten tuloksia. Melko varmasti voidaankin sanoa, että *DARP*:in määrä ei merkitsevästi nouse minkäänlaisen kuormituksen seurauksena. Mutta tietenkään kaikkia mahdollisia lihasten kuormituksia ei ole *DARP*:in osalta tutkittu, joten kyllähän sellainenkin liike voi löytyä, joka lisää *DARP*:in ilmenemistä. Kuitenkin olettaisin, että paljon eksentristä liikettä sisältävä lihastyö on juuri sellainen jonka pitäisi saada *DARP*:in määrät nousemaan. Mutta koska niin ei käynyt, onkin mahdollista, että *DARP*:in pääasiallinen tehtävä on jossain muualla kuin lihaksien adaptaatioon liittyvissä asioissa. Myöskin aiemmin on ehdotettu, että sen tehtävä olisi nimenomaan rasva-aineenvaihdunnassa (Ikeda ym. 2003).

Kaikkien proteiinien mRNA – määrien kontrolliarvoissa (pre-arvot) oli paljon pienempi keskihajonta kuin palautumisen aikaisissa arvoissa. Tarkasteltaessa poikkeuksellisten koehenkilöiden kontrolliarvoja, ei niissä havaittu mitään huomattavaa. Jos kontrolliarvotkin olisivat olleet keskiarvoa huomattavasti korkeammat, olisi voinut ajatella, että koehenkilön lihassolut ilmentävät yleisesti herkemmin ja enemmän kyseistä proteiinia. Kuitenkin lähtöarvoista pystyi havainnoimaan edellisten tutkimusten (esim. Miller ym. 2003) tulokset siltä osin, että CARP:ia on lihassoluissa vähemmän kuin Ankrd2:ta. Ankrd2:n ja *DARP*:in määrien ollessa suunnilleen samat, oli CARP:in määrä yli kymmenkertaisesti pienempi. Tosin aiemmin on havaittu, että myös *DARP*:ia olisi enemmän sydämessä kuin lihassoluissa, mutta koska emme tutkineet sydänlihaksen *DARP* - mää-

riä, emme voi sanoa ettei sydämen DARP – konsentraatio olisi vielä suurempi kuin li-
hassolujen DARP – määrä.

Tässä tutkimuksessa tutkittiin proteiineja vain transkriptiotasolla. Usein mRNA:n -
määrän lisääntyessä puhutaan, että proteiinimäärä yleisesti lisääntyy. Kuitenkaan kai-
kesta mRNA:sta ei aina synny toimivaa proteiinia. Valmiin proteiinin synty on kiinni
myös translaation onnistumisesta sekä lopullisen proteiinin aktivoimisesta joko fosfory-
loinnin tai defosforyloinnin kautta. Lisäksi MARP:it voivat aiempien tutkimusten mu-
kaan liikkua esimerkiksi sytoplasmasta tumaan (esim. Tsukamoto ym. 2008), joten tä-
mäkin vaikuttaa niiden toimintaan. Onhan selvää, että esimerkiksi CARP ei voi osallis-
tua transkriptioon (kiinnittymällä transkriptiotekijöihin) ellei se kulkeudu ensin tumaan.
Jotta proteiinimäärien muutoksista voitaisiin olla varmoja, täytyisi proteiinien määrää
tutkia myös esimerkiksi Western blottauksella tai immunohistokemiallisella tutkimuk-
sella. Tämän kautta saataisiin tietoon, paljonko mRNA:sta oikeasti jatkaa valmiiksi pro-
teiiniksi. Kuitenkin aiemmissa eläintutkimuksissa on näitä proteiineja tutkittu sekä
mRNA - että proteiinitasolla, eikä lukemissani tutkimusartikkeleissa ole mainittu, että
näiden välillä olisi suurta eroa. mRNA - tason tutkiminen on kuitenkin paljon helpom-
paa kuin proteiinitason määrittäminen. Etenkin kuormituksen jälkeen näytteenoton ajankohta
vaikuttaa proteiineihin paljon voimakkaammin kuin mRNA:han. Eri proteiinit nimittäin
syntetisoituvat eri vauhtia ja saattavat myös hajota nopeasti valmistuttuaan. Siksi on
vaikea tietää mihin aikapisteeseen minkäkin proteiinin konsentraatiopiikki ajoittuu. Tä-
män selvittämiseksi tarvittaisiin paljon eri aikapisteissä otettuja biopsioita. Ihmisellä
usean biopsian ottaminen on kuitenkin epämiellyttävää, joten on helpompaa ottaa vain
muutama biopsia ja määrittää mRNA – tasot. Immunohistokemiallinen värjäys olisi ol-
lut myös siitä hyvä, että siinä olisi nähnyt, onko CARP ja Ankrd2 siirtyneet tumaan
kuormituksen seurauksena, niin kuin joissain tutkimuksissa on todettu (esim. Tsukamo-
to ym. 2008).

Tuloksiin saattaa vaikuttaa se, että biopsianottoaikaa ei määritetty tarkasti. Esimerkiksi
heti kuormituksen jälkeinen biopsia otettiin vain niin nopeasti kuin pystyttiin. Voi olla,
että koehenkilöiden näytteenotto – ajat erosivat useita minuutteja, joka vaikuttaa vah-
vasti mRNA – tason tuloksiin. Lisäksi koehenkilöiden kuormituksen aiheuttama väsy-
mys saattoi olla eritasoista. Jotkut hyppivät niin kauan kuin vain jalat eivät pettäneet al-
ta ja jotkut lopettivat aikaisemmin. Joillekin koehenkilöille kuormitus oli sen verran ke-

vyt, että heitä jouduttiin pyytämään lopettamaan kuormitus 20 minuuttia hypittyään, sillä väsymystä ei ilmennyt. Kuormituksen rasittavuuden erot ilmenivät myös eritasoisina lihaskipuina seuraavana päivänä. Jos koehenkilöitä olisi ollut enemmän, olisikin ollut mielenkiintoista tutkia lihasväsymyksen (maksimivoiman lasku) ja MARP:ien konsentraatioiden korrelaatioita. Näin olisi saatu selville, että lisääntykö MARP:it sitä enemmän, mitä enemmän ilmenee lihasväsymystä, niin kuin olettaa saattaa.

Olisi ollut hyvä, jos koehenkilöitä olisi ollut enemmän. Se olisi pienentänyt keskihajontoja ja tuonut enemmän tilastollista merkitsevyyttä. Koehenkilöitä oli alun perin kymmenen, mutta yhden koehenkilön biopsian käsittely ei onnistunut. Onneksi koehenkilö, joka jouduttiin jättämään pois analyyseistä, oli muutenkin poikkeuksellinen, sillä hän ei ollut lähes lainkaan uupunut kuormituksen jälkeen. Lisäksi olisi ollut mielenkiintoista tutkia *Ankrd2*:n muutosta vähän pidemmällä aikavälillä. Tämän ja Lehti ym. (2009) tutkimusten perusteella *Ankrd2*:n mRNA - määrä ei ehdi nousta tilastollisesti merkitsevästi vielä kolmen tunnin jälkeen kuormituksesta, mutta kuitenkin se on noussut 48 tunnin päästä kuormituksesta. Arvoitukseksi siis jää, että milloin tapahtuu tämä selvempi mRNA:n konsentraation nousu vai nouseeko konsentraatio tasaisesti muutaman päivän ajan.

Alkuperäinen tutkimussuunnitelma muuttui myös sen osalta, että analysoinnissa käytettiin vain yhtä housekeeping – geeniä. PCR:ssä ajettiin myös ribosomaalinen RNA – geeni (18s), mutta ajo ei onnistunut. Yleensä tulokset normalisoidaan vähintään kahteen housekeeping - geeniin. Mutta ainakin Lehti ym. (2009) tekivät aiempien tutkimusten perusteella johtopäätöksen, että juuri GAPDH on kaikista vakain geeni kuormitustutkimuksissa. Lisäksi heidän omassa tutkimuksessaan 18s ja GAPDH antoivat lähes samantyyppiset tulokset.

Kokonaisuudessaan tutkimus kuitenkin onnistui ilman suurempia ongelmia. Tuloksia voidaan pitää luotettavina, sillä kolmen rinnakkaisnäytteen konsentraatiotkin olivat lähes samat. Tuloksista vain yksi *DARP*:in tulos jouduttiin jättämään analyysien ulkopuolelle, sillä sen keskihajonta oli liian suuri verrattuna kahteen muuhun rinnakkaisnäytteeseen. Myös totaali- RNA – näytteet olivat melko puhtaita, kaikkien spektrofotometrillä mitatun 260/280 – absorbointisuhteen ollessa yli 1,8 (liite 1). Lisäksi tuloksista voidaan päätellä, että kaikki RNA pysyi ehjänä eristyksen jälkeen, vaikka eheyttä ei tarkastettu

ajamalla näytettä geelissä, niin kuin usein tehdään. Geeliä ei ajettu sen vuoksi, että biopsiat olivat niin pieniä, että geelissä ei mitään ilmeisimmin olisi näkynyt mitään.

Yhteenveto. Tämän tutkimuksen perusteella kelkkahyppely – kuormitus lisää CARP:in mRNA konsentraatiota tilastollisesti merkitsevästi. Konsentraatio oli kolme tuntia kuormituksen jälkeen korkeampi (102 -ertainen kontrollitasoon nähden) kuin heti kuormituksen jälkeen (17 -ertainen kontrollitasoon nähden). Tämän perusteella voidaan päätellä, että CARPilla todellakin on jonkinlainen tehtävä lihaksen adaptoitumisessa paljon eksentristä lihastyötä sisältävään harjoitukseen. Ankrd2:n mRNA - määrissä ei löytynyt tilastollisesti merkitseviä eroja, mutta keskiarvoisesti määrä nousi kolmen tunnin kohdalle (1,5 –ertainen kontrollitasoon nähden). Sekä CARP:in että Ankrd2:n kohdalla koehenkilöiden väliset vaihtelut ja keskihajonnat olivat suuria. Monilla kuormituksen jälkeiset arvot olivat jopa lähtöarvoja matalampia. Tämä tuo tuloksiin hieman epävarmuutta. DARP:in mRNA konsentraatioissa ei havaittu huomattavia muutoksia lähtöarvoon nähden.

Tulosten varmistamiseksi ja tulosten suurien keskihajontojen vuoksi lisätutkimuksia tulisi tehdä isommilla koehenkilömäärillä. Lisäksi varsinkin Ankrd2:n osalta tulisi aikapisteet suunnitella hieman erilaisiksi, jotta saataisiin selville, että milloin kyseisen proteiinin mRNA - määrä nousee merkitsevästi. Myös proteiinitason mittauksia tulisi tehdä ihmisillä, sillä ei ole varmaa, muodostuuko kaikesta mRNA:sta valmista proteiinia.

LÄHTEET

Aihara, Y., Kurabayashi, M., Saito, Y., Ohyama, Y., Tanaka, T., Takeda, S., Tomaru, K., Sekiguchi, K., Arai, M., Nakamura, T. & Nagai, R. 2000. Cardiac Ankyrin Repeat Protein Is a Novel Marker of Cardiac Hypertrophy. Role of M-CAT Element Within the Promoter. *Hypertension* 36, 48 - 53

Armstrong, R., Ogilvie, R. & Schwane, J. 1983. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 54(1), 80 - 93

Bang, M., Mudry, R., McElhinny, A., Trombitás, K., Geach, A., Yamasaki, R., Sorimachi, H., Granzier, H., Gregorio, C. & Labeit, S. 2001. Myopalladin, a Novel 145-Kilodalton Sarcomeric Protein with Multiple Roles in Z-Disc and I-Band Protein Assemblies. *The Journal of Cell Biology* 153, 413 - 427

Barash, I., Mathew, L., Ryan, A., Chen, J. & Lieber, R. 2004. Rapid muscle-specific gene expression changes after a single bout of eccentric contractions in the mouse. *The American Journal of Physiology - Cell Physiology* 286, C355 - C364

Barash, I., Bang, M., Mathew, L., Greaser, M., Chen, J. & Lieber, R. 2007. Structural and regulatory roles of muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle. *The American Journal of Physiology - Cell Physiology* 293, C218 - C227

Carson, J., Nettleton, D. & Reecy, J. 2001. Differential gene expression in the rat soleus muscle during early work overload-induced hypertrophy. *The FASEB Journal express* 16, 207 - 209

Chen, Y., Nader, G., Baar, K., Fedele, M., Hoffman, E. & Esser, K. 2002. Response of rat muscle to acute resistance exercise defined by transcriptional and translational profiling. *Journal of Physiology* 545.1, 27 - 41

Fridén, J. & Lieber, R. 1998. Segmental muscle fiber lesions after repetitive eccentric contractions. *Cell and Tissue Research*: 293, 165 - 171

Fürst, D., Osborn, M., Nave, R. & Weber, K. 1988. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: A map of often nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *The Journal of Cell Biology* 106, 1563 – 1572

Gautel M. 2008. The sarcomere and the nucleus: functional links to hypertrophy, atrophy and sarcopenia. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 642, 176 – 191

Granzier, H., Wu, Y., Siegfried, L., LeWinter, L. 2005. Titin: Physiological Function and Role in Cardiomyopathy and Failure. *Heart Failure Reviews* 10, 211–223

Guyton, A. C. & Hall, J. E. 2000. *Textbook of medical Physiology*. W.B. Saunders Company. Philadelphia.

Hentzen, E., Lahey, M., Peters, D., Mathew, L., Barash, I., Fridén J. & Lieber, R. 2006. Stress-dependent and -independent expression of the myogenic regulatory factors and the *MARP* genes after eccentric contractions in rats. *The Journal of Physiology* 570.1, 157 - 167

Horita, T., Komi, P., Nicol, C. & Kyröläinen, H. 1996. Stretch shortening cycle fatigue: interactions among joint stiffness, reflex, and muscle mechanical performance in the drop jump. *European Journal of Applied Physiology* 73, 393 - 403

Horowitz, R., Maruyama, K., and Podolsky, R. J. 1989. Elastic behavior of connectin filaments during thick filament movement in activated skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology* 109, 2169 - 2176

Ikeda, K., Emoto, N., Matsuo, M. & Yokoyama, M. 2003 Molecular Identification and Characterization of a Novel Nuclear Protein Whose Expression Is Up-regulated in Insulin-resistant Animals. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (6), 3514 - 3520

Ishiguro, B., Ishida, T., Takeuchi, K., Osaki, M., Araki, N., Okada, E., Takahashi, S., Saito, M., Watanabe, M., Nakada, C., Tsukamoto, Y., Sato, K., Ito, K., Fukayama, M., Mori, S., Ito, H. & Moriyama, M. 2002. Carp, a Cardiac Ankyrin-Repeated Protein, and Its New Homologue, Arpp, Are Differentially Expressed in Heart, Skeletal Muscle, and Rhabdomyosarcomas. *American Journal of Pathology*. 160(5), 1767 - 1778

Ishiguro, N., Motoi, T., Osaki, M., Araki, N., Minamizaki, T., Moriyama, M. Ito, H. & Yoshida, H. 2005. Immunohistochemical analysis of a muscle ankyrin-repeat protein, Arpp, in paraffin-embedded tumors: evaluation of Arpp as a tumor marker for rhabdomyosarcoma. *Human Pathology* 36, 620 - 625

Kemp, T., Sadusky, T., Saltisi, F., Carey, N., Moss, J., Yang, S., Sassoon, D., Goldspink, G. & Coulton, G. 2000 Identification of *Ankrd2*, a Novel Skeletal Muscle Gene Coding for a Stretch-Responsive Ankyrin-Repeat Protein. *Genomics* 66, 229 – 241

Kojic, S., Medeot, E., Guccione, E., Krmac, H., Zara, I., Martinelli, V., Valle, G. & Faulkner, G. 2004. The *Ankrd2* protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle. *Journal of Molecular Biology* 339 (2): 313- 325

Komi, P. 1984. Physiological and biomechanical correlates of muscle function: effects of muscle structure and stretch-shortening cycle on force and speed. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 12, 81 - 121

Koh, T. & Brooks, S. 2001. Lengthening contractions are not required to induce protection from contraction-induced muscle injury. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative, and Comparative Physiology* 281, R155 - R161

Lehti, M., Kivelä, R., Komi, P., Komulainen, J., Kainulainen, H. & Kyröläinen, H. 2009. Effects of fatiguing jumping exercise on mRNA expression of titin-complex proteins and calpains. *Journal of Applied Physiology* 106, 1419 - 1424

Lieber, R., Thornell, R-E & Fridén, J. 1996. Muscle cytoskeletal disruption occurs within the first 15 min of cyclic eccentric contractions. *Journal of Applied Physiology* 77, 1926 - 1934

MacIntyre, D., Reid, W., Lyster, D., Szasz, I. & McKenzie, D. 1996. Presence of WBC, decreased strength, and delayed soreness in muscle after eccentric exercise. *Journal of Applied Physiology* 80(3), 1006 - 1013

McCully, K. & Faulkner, J. 1985. Injury to skeletal muscle fibers of mice following lengthening contractions. *Journal of Applied Physiology* 59, 119 - 126

McNail P. & Khakee, R. 1992. Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage. *American Journal of Pathology* 140, 1097 - 1109

Miller, M., Bang, M., Witt, C., Labeit, D., Trombitas, C., Watanabe, K., Granzier, H., McElhinny, A., Gregorio, C. & Labeit, S. 2003. The Muscle Ankyrin Repeat Proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a Family of Titin Filamentbased Stress Response Molecules. *Journal of Molecular Biology* 333, 951- 964

Nakada, C., Oka, A., Nonaka, I., Sato, K., Mori, S., Ito, H. & Moriyama, M. 2003. Cardiac ankyrin repeat protein is preferentially induced in atrophic myofibers of congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathology International* 53, 653 - 658

Nosaka, K. & Clarkson, P. 1992a. Relationship between post-exercise plasma CK elevation and muscle mass involved in the exercise. *International Journal of Sports Medicine* 13(6), 471 - 475

Nosaka, K., Clarkson, P. & Apple, F. 1992b. Time course of serum protein changes after strenuous exercise of the forearm flexors. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119(2), 183 - 8

Pallavicini, A., Kojic, S., Bean, C., Vainzof, M., Salamon, M., Ievolella, C., Bortolotto,*G., Pacchioni, B., Zatz, M., Lanfranchi, G., Faulkner, G. & Valle, G. 2001. Characterization of Human Skeletal Muscle Ankrd2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285, 378 - 386

Schwane, J., Johnson, S., Vandenakker, C. & Armstrong, R. 1983. Delayed-onset muscular soreness and plasma CPK and LDH activities after downhill running. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 15(1), 1 - 82

Shi Y., Reitmaier B., Regenbogen J., Slowey R., Opalenik S., Wolf E., Goppelt A. & Davidson J. 2005. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is up-regulated during wound healing and induces angiogenesis in experimental granulation tissue. *American Journal of Pathology* 166, 303 - 312

Strojnik, V. & Komi, P. V. 1998. Neuromuscular fatigue after maximal stretch – shortening cycle exercise. *Journal of Applied Physiology* 84, 344- 350

Tsukamoto, Y., Senda, T., Nakano, T., Nakada, C., Hida, T., Ishiguro, N., Kondo, G., Baba, T., Sato, K., Osaki, M., Mori, S., Ito, H. and Moriyama, M. 2002. Arpp, a New Homolog of Carp, Is Preferentially Expressed in Type 1 Skeletal Muscle Fibers and Is Markedly Induced by Denervation. *Laboratory Investigation* 82(5), 645 - 55

Tsukamoto, Y., Hijiya, N., Yano, S., Yokoyama, S., Nakada, C., Uchida, T., Matsuura, K. & Moriyama, M. 2008. Arpp/Ankrd2, a member of the muscle ankyrin repeat proteins (MARPs), translocates from the I-band to the nucleus after muscle injury. *Histochemistry and Cell Biology* 129, 55 - 64

Yablonka-Reuveni, Z., Rudnicki, M., Rivera, A., Primig, M., Anderson, J. & Natanson, P. 1999. The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. *Development Biology* 210, 440 - 455

Yu, J., Malm, C. & Thornell, L. 2002. Eccentric contractions leading to DOMS do not cause loss of desmin nor fibre necrosis in human muscle. *Histochemistry and Cell Biology* 118, 29 - 34

Zou, Y., Evans, S., Chen, J., Kuo, H., Harvey, R., & Chien, K. 1997. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development* 124, 793 - 804

Witt,S., Labeit, D., Granzier, H., Labeit, S. & Witt, C. 2005. Dimerization of the cardiac ankyrin protein CARP: Implications for MARP titin-based signalling. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 26, 401 - 408

Willmann, R., Kusch, J., Sultan, K., Schneider, A. & Pette, D. 2001. Muscle LIM protein is upregulated in fast skeletal muscle during transition toward slower phenotypes. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 280, C273 - C279

LIITTEET

LIITE 1. RNA – eristyksen tuloksia.

PVM	kh ID	[RNA] (ug/ml)	260/280- suhde	biopsian	
				koko (mg)	RNA yield* (ug/mg)
17.2.2010	41 a	127	1,88	19	0,3324
17.2.2010	41 a	125,6	1,9	19	
22.2.2010	41 b	137,2	1,93	8,7	0,771
22.2.2010	41 b	131,1	1,9	8,7	
17.2.2010	41 c	46	1,87	15,3	0,1485
17.2.2010	41 c	44,9	1,82	15,3	
19.2.2010	42 a	262,21	2,07	33,4	0,3906
19.2.2010	42 a	259,69	2,08	33,4	
12.2.2010	42 b	223,9	1,97	37,5	0,29687
12.2.2010	42 b	221,4	1,93	37,5	
22.2.2010	42 c	209,1	1,98	65,1	0,1633
22.2.2010	42 c	216,3	2	65,1	
17.2.2010	43 a	314,7	1,97	41,5	0,3793
17.2.2010	43 a	314,6	1,96	41,5	
17.2.2010	43 b	130,9	1,93	18,3	0,3801
17.2.2010	43 b	147,3	1,91	18,3	
17.2.2010	43 c	81,7	1,83	19,5	0,2091
17.2.2010	43 c	81,4	1,87	19,5	
22.2.2010	44 a	390,8	1,96	38	0,507
22.2.2010	44 a	379,8	1,95	38	
12.2.2010	44 b	183,5	1,87	23,6	0,37097
12.2.2010	44 b	166,7	1,88	23,6	
22.2.2010	44 c	70,3	1,93	17,4	0,25
22.2.2010	44 c	104	1,94	17,4	
19.2.2010	45 a	140,26	2,14	22,1	0,3225
19.2.2010	45 a	144,89	2,07	22,1	
22.2.2010	45 b	151,1	1,96	39,6	0,19
22.2.2010	45 b	149,9	1,97	39,6	
17.2.2010	45 c	105,9	1,89	20,8	0,2523

17.2.2010	45 c	104	1,9	20,8	
22.2.2010	46 a	340,8	1,95	38,3	0,4287
22.2.2010	46 a	316,1	1,95	38,3	
18.2.2010	46 b	157,9	2,06	39,7	0,2064
18.2.2010	46 b	167,92	2,07	39,7	
22.2.2010	46 c	155,6	1,91	18	0,4105
22.2.2010	46 c	140,6	1,92	18	
22.2.2010	47 a	77,3	1,88	17,4	0,2254
22.2.2010	47 a	79,59	1,86	17,4	
22.2.2010	47 b	43	1,86	6,5	0,325
22.2.2010	47 b	41,6	1,91		
	47 c				
	47 c				
19.2.2010	48 a	522,37	2,09	41	0,637
19.2.2010	48 a	522,37	2,14	41	
22.2.2010	48 b	233,9	2	42,3	0,3098
22.2.2010	48 b	290,4	1,99	42,3	
22.2.2010	48 c	156,1	1,96	30,2	0,251
22.2.2010	48 c	147,1	1,96	30,2	
22.2.2010	49 a	391,3	2	46,7	0,3952
22.2.2010	49 a	346,9	2	46,7	
22.2.2010	49 b	212	1,94	19,8	0,54
22.2.2010	49 b	215,7	1,93	19,8	
22.2.2010	49 c	239,8	1,95	32,9	0,3837
22.2.2010	49 c	265,2	1,97	32,9	
19.2.2010	50 a	166,47	2,12	56,1	0,1474
19.2.2010	50 a	164,42	2,12	56,1	
12.2.2010	50 b	1209,4	2	61,2	0,60082
12.2.2010	50 b	658,7	1,97	61,2	
12.2.2010	50 b	812,1	1,98	61,2	
12.2.2010	50 c	363	1,93	63,9	0,36952
12.2.2010	50 c	581,5	1,96	63,9	

*RNA yield= paljonko totaali RNA:ta biopsiassa (ug/mg)

HUOM! ID:istä on poistettu nimikirjaimet koehenkilön tunnistamisen välttämiseksi.

ID- koodeissa:

- a = kontrollinäyte (pre)
- b = post 0h näyte
- c = post 3h näyte