

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ –
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

Σπηλιώτου Βάια

**«Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης με τη μέθοδο
των μικροσυστοιχιών (microarrays) σε μυ
αρουραίου μετά από άσκηση»**

Λάρισα 2011

**«Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης με τη μέθοδο των
μικροσυστοιχιών (microarrays) σε μυ αρουραίου μετά από
άσκηση»**

Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

**Κουρέτας Δημήτρης, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα
Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Λιαδάκη Καλλιόπη, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας –
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Στάγκος Δημήτρης, Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα
Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1. Γενικά για τους μύες	11
1.2. Μηχανισμός μυϊκής συστολής	13
1.3. Πηγές ενέργειας στους μύες	14
1.4. Μεταβολισμός των υδατανθράκων στους σκελετικούς μύες	15
1.4.1. Μεταβολισμός του γλυκογόνου στους σκελετικούς μύες	15
1.4.2. Μεταβολισμός της γλυκόζης στους σκελετικούς μύες	17
1.4.3. Μεταβολισμός του πυροσταφυλικού οξέος στους σκελετικούς μύες	19
1.4.4. Κύκλος του Krebs	19
1.4.5. Οξειδωτική φωσφορυλίωση	20
1.4.6. Μεταβολισμός του γαλακτικού οξέος στους σκελετικούς μύες	21
1.5. Μεταβολισμός των λιπιδίων στους σκελετικούς μύες	22
1.6. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες στους σκελετικούς μύες	23
1.6.1. Παραγωγή ελευθέρων ριζών	24
1.6.2. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	24
1.6.3. Οξειδωτικό στρες	25
1.7. Τύποι άσκησης	25
2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (MICROARRAYS)	26
2.1. Ιστορικό	26
2.2. Αρχές λειτουργίας μικροσυστοιχιών	26
2.3. Φωτολιθογραφική σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων	27
2.3.1. Τρόπος κατασκευής	27
2.3.2. Τρόπος χρήσης	30
2.4. Στικτές μικροσυστοιχίες ή μικροσυστοιχίες cDNA	32
2.4.1. Τρόπος κατασκευής	32
2.4.2. Τρόπος χρήσης	32
3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ	34

- 3.1. Υπάρχουσες μελέτες για την επίδραση της άσκησης στη γονιδιακή έκφραση σε διάφορους ιστούς (εκτός των σκελετικών μυών) με την τεχνική των μικροσυστοιχιών 34
- 3.2. Επίδραση της άσκησης στη γονιδιακή έκφραση στους σκελετικούς μύες 36
- 3.2.1. Υπάρχουσες μελέτες για την επίδραση της άσκησης στη γονιδιακή έκφραση στους σκελετικούς μύες με την τεχνική των μικροσυστοιχιών 36
- 3.2.2. Υπάρχουσες μελέτες για την επίδραση της άσκησης στη γονιδιακή έκφραση στους σκελετικούς μύες με την τεχνική *real – time PCR* και *real- time RT PCR* 39
- 3.2.2.1. Μελέτη έκφρασης GLUT-4, ΗΧΚ2 (εξοκινάση-2), γλυκογενίνης, υποδοχέα ινσουλίνης, IRS1, IRS2 39
- 3.2.2.2. Μελέτη έκφρασης της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από το AMP (AMP-activated protein-kinase -AMPK) 40
- 3.2.2.3. Μελέτη έκφρασης της τρανσλοκάσης των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Translocase, FAT), τρανσφεράσης της καρνιτίνης (Carnitine Palmytoyltransferase 1, CPT1), λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (lipoprotein lipase, LPL) 42
- 3.2.2.4. Μελέτη έκφρασης του PPAR-γ coactivator-1 (PGC-1) 42
- 3.2.2.5. Μελέτη έκφρασης του παράγοντα που ενεργοποιείται από την υποξία (Hypoxia Inducible Factor1 – HIF-1) και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor –VEGF) 43
- 3.2.2.6. Μελέτη έκφρασης της ενδοθηλιακής συνθάσης του οξειδίου του αζώτου (endothelial Nitric Oxide Synthase-eNOS ή NOS3). 44
- 3.2.2.7. Μελέτη έκφρασης του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα 1 (Insulin- like Growth Factor 1) 45
- 3.2.2.8. Μελέτη έκφρασης μυογενίνης, μυστατίνης και MyoD 46
- 3.2.2.9. Μελέτη έκφρασης κυτοκινών και πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι σηματοδότησης μέσω κυτοκινών (SOCS2, COX2, SAA1, SAA2). 46
- 3.2.2.10. Μελέτη έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων 48

3.2.2.11.	Μελέτη έκφρασης των μιτοχονδριακών αποσυνδεδεμένων πρωτεϊνών (uncoupling proteins -UCPs)	48
3.2.2.12.	Μελέτη έκφρασης ΑΤΡάσης Ca ²⁺ (sarcoendoplasmic reticulum calcium transport ATPase- SERCA) και αντλίας Na ⁺ - K ⁺	49
ΣΚΟΠΟΣ		51
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ		52
4.1.	Πειραματόζωα	52
4.2.	Εξοικείωση των επιμύων στην κολύμβηση	52
4.3.	Πρωτόκολλο κολύμβησης	52
4.4.	Συλλογή δειγμάτων	52
4.5.	Απομόνωση RNA	53
4.5.1.	Αντιδραστήρια	53
4.5.2.	Πρωτόκολλο απομόνωσης	54
4.6.	Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του RNA	55
4.7.	Μετατροπή του ολικού RNA σε νοηματικό μονόκλωνο cDNA	58
4.7.1.	Σύνθεση μονόκλωνου cDNA	59
4.7.2.	Σύνθεση δίκλωνου cDNA	59
4.7.3.	Σύνθεση cRNA με μεταγραφή <i>in vitro</i>	60
4.7.4.	Καθαρισμός του cRNA	61
4.7.5.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του cRNA	62
4.7.6.	Σύνθεση 2 ^{ου} κύκλου cDNA (νοηματικού)	62
4.7.7.	Υδρόλυση με RNase H	64
4.7.8.	Καθαρισμός του μονόκλωνου cDNA	64
4.7.9.	Ποσοτικοποίηση του μονόκλωνου cDNA	65
4.7.10.	Κατάτμηση του μονόκλωνου cDNA	66
4.7.11.	Σήμανση του μονόκλωνου cDNA	68
4.7.12.	Υβριδοποίηση	68
4.8.	Κανονικοποίηση αποτελεσμάτων	69
4.9.	Ανάλυση διαφορικής έκφρασης γονιδίων	69
4.10.	Ανάλυση βασικών συστατικών (PCA)	70
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ		71
5.1.	Συσχέτιση δειγμάτων	71

5.2.	Principal Component Analysis (PCA)	71
5.3.	Διαφορές στην έκφραση των γονιδίων (Fold change analysis)	74
5.4.	Λειτουργική κατηγοριοποίηση των γονιδίων που υπερ-εκφράστηκαν και υπο-εκφράστηκαν με την άσκηση	90
5.5.	Δίκτυα και μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται (Ingenuity pathway analysis)	92
5.6.	Δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Cytoscape analysis)	99
6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	103
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	105
	ΠΗΓΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	125

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ - ΠΙΝΑΚΩΝ - ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Εικόνες

Εικόνα 1: Σχηματική παράσταση της οργάνωσης σκελετικού μυός σε επίπεδο αδρής, λεπτής και μοριακής δομής.	12
Εικόνα 2: Σηματοδοτικό μονοπάτι γλυκογονοσύνθεσης	16
Εικόνα 3: Γλυκόλυση	18
Εικόνα 4: Ο κύκλος του Krebs	20
Εικόνα 5: Φωτολιθογραφική σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων	29
Εικόνα 6: Απεικόνιση των πλήρως συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων και των ολιγονουκλεοτιδίων με αναντιστοιχία	30
Εικόνα 7: Τρόπος χρήσης τσιπ ολιγονουκλεοτιδίων Affymetrix	31
Εικόνα 8: Τρόπος χρήσης στικτών μικροσυστοιχιών	33
Εικόνα 9: Απεικόνιση όλων των δειγμάτων σε τρισδιάστατο γενωμικό χώρο με βάση τα 3 κύρια βασικά συστατικά (principal components) PC1, PC2 και PC3.	72
Εικόνα 10: Δισδιάστατη απεικόνιση όλων των δειγμάτων στο γενωμικό χώρο των δύο βασικών συστατικών (principal components) PC1 και PC2.	73
Εικόνα 11: Δισδιάστατη απεικόνιση όλων των δειγμάτων στο γενωμικό χώρο των δύο βασικών συστατικών (principal components) PC1 και PC3.	73
Εικόνα 12: Δισδιάστατη απεικόνιση όλων των δειγμάτων στο γενωμικό χώρο των δύο βασικών συστατικών (principal components) PC2 και PC3.	74
Εικόνα 13: 1 ^ο δίκτυο γονιδίων	94
Εικόνα 14: 2 ^ο δίκτυο γονιδίων	95
Εικόνα 15: 3 ^ο δίκτυο γονιδίων	96
Εικόνα 16: 4 ^ο δίκτυο γονιδίων	97
Εικόνα 17: 5 ^ο δίκτυο γονιδίων	98
Εικόνα 18: Δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων	100
Εικόνα 19: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών RND1 και RHOB	101
Εικόνα 20: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών BMP2 , CTGF, THBS και μεταξύ ADAMTS1 και CTGF	102

Πίνακες

Πίνακας 1: Αποτελέσματα φωτομέτρησης ολικού RNA (UV Vis – Eppendorf)	57
Πίνακας 2 : Αποτελέσματα φωτομέτρησης ολικού RNA (NanoDrop Spectrophotometer)	57
Πίνακας 3: Μίγμα για τη σύνθεση μονόκλωνου cDNA (First-strand Master Mix)	59
Πίνακας 4: Μίγμα για τη σύνθεση δίκλωνου cDNA (Second-strand Master Mix)	60

Πίνακας 5 : Μίγμα μεταγραφής in vitro (IVT Master Mix)	60
Πίνακας 6: Μίγμα δέσμησης cRNA (cRNA Binding Mix)	61
Πίνακας 7 : Αποτελέσματα φωτομέτρησης του cRNA	62
Πίνακας 8: Παρασκευή διαλυμάτων cRNA	63
Πίνακας 9 : Μίγμα σύνθεσης cDNA 2 ^{ου} κύκλου (2 nd - cycle Master Mix)	64
Πίνακας 10: Μίγμα δέσμησης cDNA (cDNA Binding Mix)	65
Πίνακας 11: Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των δειγμάτων	66
Πίνακας 12: Προετοιμασία μονόκλωνου cDNA για κατάτμηση	67
Πίνακας 13: Μίγμα κατάτμησης (Fragmentation Master Mix)	67
Πίνακας 14: Μίγμα σήμανσης	68
Πίνακας 15: Μίγμα υβριδοποίησης	69
Πίνακας 16: Συντελεστές συσχέτισης δειγμάτων	71
Πίνακας 17: Γονίδια που υπερ-εκφράστηκαν και διαφορά της έκφρασής τους	75
Πίνακας 18: Γονίδια που υπο-εκφράστηκαν και διαφορά της έκφρασής τους	78
Πίνακας 19: Δίκτυα γονιδίων όπου συμμετέχουν τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση	93
Πίνακας 20: Μοριακές και κυτταρικές λειτουργίες των γονιδίων που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση	98
Πίνακας 21 : Μονοπάτια μετάδοσης σήματος στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται	99
Διαγράμματα	
<i>Διάγραμμα 1: Λειτουργική κατηγοριοποίηση γονιδίων που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση</i>	91
<i>Διάγραμμα 2: Λειτουργική κατηγοριοποίηση γονιδίων που υπο-εκφράζονται με την άσκηση</i>	92

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ένα μέρος αυτής πραγματοποιήθηκε στον τομέα Ανάλυσης Μικροσυστοιχιών της Ακαδημίας Αθηνών και στον τομέα Πληροφορικής του νοσοκομείου Παιδων Βοστώνης Η.Π.Α. Η εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της εκπόνησης μεταπτυχιακής διατριβής του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας - Μοριακή Γενετική - Διαγνωστικοί Δείκτες».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών κ. Κουρέτα Δημήτρη για την ευκαιρία που μου έδωσε ώστε να εκπονήσω τη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή.

Επίσης ευχαριστώ θερμά την κ. Λιαδάκη Καλλιόπη, Λέκτορα του Τμήματος Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας, για την καθοδήγηση που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής διατριβής, τις χρήσιμες υποδείξεις και τις συμβουλές της, καθώς και για τη συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή.

Θερμές ευχαριστίες ανήκουν και στον κ. Βεσκούκη Αριστείδη, διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας, για το χειρισμό των πειραματόζων και την προετοιμασία των δειγμάτων της μελέτης, στο προσωπικό του τομέα Ανάλυσης Μικροσυστοιχιών της Ακαδημίας Αθηνών καθώς και στους Dr. Alvin Kho (Children's Hospital Informatics Program, Boston, U.S.A) και Αμούτζια Γρηγόρη, Λέκτορα του Τμήματος Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας, για τη σημαντική συμβολή τους στην ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον κ. Στάγκο Δημήτρη, Λέκτορα του Τμήματος Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας, για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά το σύζυγό μου και τα δυο μου παιδιά για την υπομονή τους, την υποστήριξη και την αγάπη τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η άσκηση επηρεάζει μεταβολικά μονοπάτια καθώς και την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων σε σκελετικούς μύες. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση της εξαντλητικής αερόβιας άσκησης σε σκελετικούς μύες επίμυων, σε μεγάλη κλίμακα, εφαρμόζοντας την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δέκα ένηβοι αρσενικοί επίμυες εκ των οποίων οι μισοί υποβλήθηκαν σε εξαντλητική αερόβια κολύμβηση σε ειδική δεξαμενή. Αμέσως μετά την άσκηση απομονώθηκε χειρουργικά ο μακρός εκτείνων τους δακτύλους (EDL) σκελετικός μυς. Ακολούθησε εξαγωγή ολικού RNA από τους μύες και παραγωγή και σήμανση του cDNA της κωδικής αλυσίδας. Τα δείγματα υβριδοποιήθηκαν σε μικροσυστοιχίες Affymetrix (Rat Gene 1 ST Array) που περιλαμβάνουν περίπου 29.214 γονίδια επίμυων. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν και αναλύθηκαν ως προς την διαφορά έκφρασης. Ταυτοποιήθηκαν 86 γονίδια που υπερ-εκφράζονται (το επίπεδο έκφρασης είναι πάνω από 1.5 φορές) μετά την άσκηση και 11 γονίδια που υπο-εκφράζονται σε σχέση με την ηρεμία. Μεγάλο ποσοστό γονιδίων που υπερ-εκφράζονται κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, ένζυμα και μόρια που συμμετέχουν σε μονοπάτια μετάδοσης σήματος, ενώ αρκετά είναι και εκείνα που οι λειτουργίες τους έως τώρα είναι άγνωστες. Επίσης ταυτοποιήθηκαν δίκτυα και μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται. Συγκεκριμένα τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται συμμετέχουν σε δίκτυα που οι λειτουργίες τους σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης, κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος. Επίσης τα γονίδια αυτά συμμετέχουν σε μονοπάτια μετάδοσης σήματος που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση και τη φλεγμονή, την κυτταρική διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των μυών. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη οδήγησε στην ταυτοποίηση των μοριακών μηχανισμών που επηρεάζονται από τον συγκεκριμένο τύπο άσκησης και με τον τρόπο αυτό συντελεί στην βαθύτερη κατανόηση της επίδρασης της άσκησης σε σκελετικούς μύες.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

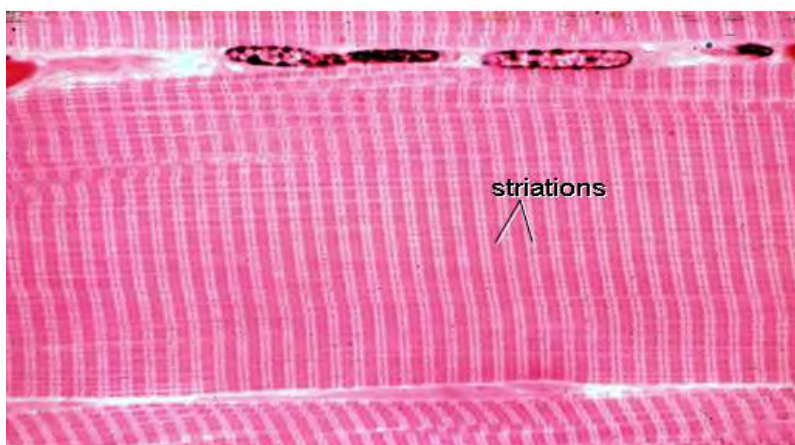
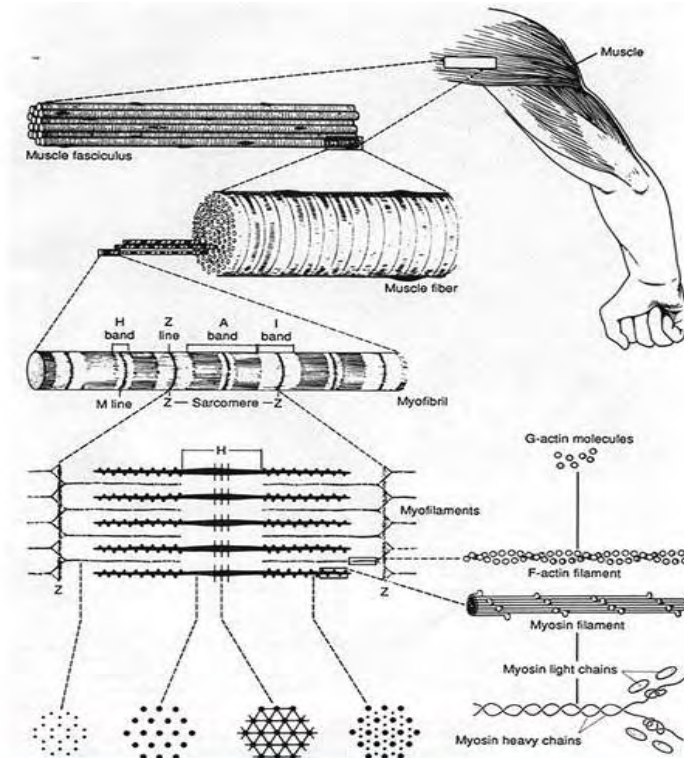
1.1. Γενικά για τους μύες

Όλες οι μηχανικές λειτουργίες του οργανισμού των θηλαστικών απαιτούν μυϊκή δραστηριότητα. Ανάμεσα σ' αυτές είναι η κίνηση του σκελετού, η λειτουργία της καρδιάς, των αιμοφόρων αγγείων, του γαστρεντερικού σωλήνα και άλλες. Το μυϊκό σύστημα αποτελείται από μύες, που ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: σκελετικούς μύες, καρδιακό μυ και λείους μύες. Οι σκελετικοί μύες βρίσκονται στο σκελετό του σώματος και προσφύονται στα οστά, ο καρδιακός μυς σχηματίζει το μυοκάρδιο και οι λείοι μύες σχηματίζουν το μυώδες τμήμα του τοιχώματος των σπλάχνων και των αιμοφόρων αγγείων. Η λειτουργία των σκελετικών μυών υπόκειται στη βούληση και ελέγχεται από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Οι λείοι μύες λειτουργούν ανεξάρτητα από τη βούληση και δέχονται νευρικές ίνες από το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Ο καρδιακός μυς λειτουργεί αυτόματα και ρυθμικά και επιπλέον δέχεται νευρικές ίνες από το αυτόνομο νευρικό σύστημα⁽¹⁾.

Οι σκελετικοί ή γραμμωτοί μύες αποτελούνται από δεσμίδες μυϊκών ινών. Κάθε μυϊκή ίνα περιβάλλεται από το σαρκείλημα, το οποίο αποτελείται από την κυτταρική μεμβράνη της μυϊκής ίνας (που δε διαφέρει από την κυτταρική μεμβράνη των άλλων κυττάρων) και από το εξωτερικό πέταλο, που ταυτίζεται με το βασικό υμένα των επιθηλιακών κυττάρων. Κάθε μυϊκή ίνα αποτελείται από πολλά μυϊκά ινίδια τα οποία συνιστούν τη συστατική ουσία της μυϊκής ίνας. Τα μυϊκά ινίδια έχουν πάχος 1-2 μm και φορά παράλληλη προς τον επιμήκη άξονα της μυϊκής ίνας. Συγκροτούνται από διαδοχικά τμήματα διαφορετικής πυκνότητας, σκοτεινά και διαυγή. Επειδή αυτά τα τμήματα βρίσκονται στα ίδια επίπεδα, η μυϊκή ίνα εμφανίζει εγκάρσιες γραμμώσεις, σκοτεινές και φωτεινές, που παράγονται από τα αντίστοιχα τμήματα των μυϊκών ινιδίων. Κάθε φωτεινό τμήμα διασχίζεται στο μέσο του από μια λεπτή, σκοτεινή γραμμή που ονομάζεται γραμμή Z. Το μεταξύ δύο διαδοχικών γραμμών Z τμήμα του μυϊκού ινιδίου λέγεται σαρκομερίδιο⁽²⁾.

Τα μυϊκά ινίδια αποτελούνται από τα μυϊκά νημάτια που διακρίνονται σε δύο είδη, τα παχιά και τα λεπτά. Τα παχιά νημάτια αποτελούνται από μυοσίνη, ενώ τα λεπτά νημάτια κυρίως από ακτίνη, τροπομυοσίνη και τροπονίνη. Το ένα άκρο των λεπτών νηματίων προσφύεται στη γραμμή Z, ενώ το άλλο είναι ελεύθερο και απολήγει ανάμεσα στα παχιά νημάτια. Τα δύο είδη νηματίων αλληλοσυνδέονται μέσω εγκάρσιων γεφυρών που είναι μέρος των μορίων της μυοσίνης. Ανάμεσα στα μυϊκά ινίδια και το σαρκείλημα βρίσκεται μικρή ποσότητα κυτταροπλάσματος, το σαρκόπλασμα, όπου βρίσκονται πολλοί πυρήνες, μιτοχόνδρια, γλυκογόνο και

σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες όπως μιοσφαιρίνη ⁽²⁾ (εικόνα 1). Μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης των μυϊκών ινών και του βασικού υμένα, δηλαδή ενσωματωμένα στο σαρκείλημα, βρίσκονται τα κύτταρα-δορυφόροι (satellite cells). Αυτά είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα, ικανά να διαφοροποιηθούν σε μυοβλάστες κατά την ανάπτυξη και υπό συνθήκες αναγέννησης του μυϊκού ιστού⁽³⁾. Στους μύες των ενήλικων θηλαστικών τα περισσότερα κύτταρα-δορυφόροι βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας. Ενεργοποιούνται και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται μετά από εξωγενή ερεθίσματα όπως η έντονη άσκηση και το μυϊκό τραύμα⁽⁴⁾.



Εικόνα 1: Σχηματική παράσταση της οργάνωσης σκελετικού μύος σε επίπεδο αδρής, λεπτής και μοριακής δομής.

1.2. Μηχανισμός της μυϊκής συστολής

Για τη σύσπαση των σκελετικών μυών είναι απαραίτητη η λήψη ηλεκτρικών σημάτων από τον εγκέφαλο τα οποία φτάνουν στους μύες διαμέσου του νωτιαίου μυελού και των κινητικών νευρώνων. Η ηλεκτρική μετάδοση των νευρικών σημάτων οφείλεται σε μετακινήσεις ιόντων Na^+ και K^+ διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης των νευρώνων. Σε κατάσταση ηρεμίας, ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που εκτείνεται σε όλο το πάχος της κυτταρικής μεμβράνης πετυχαίνει άντληση Na^+-K^+ σε αντίθετες κατευθύνσεις με σύγχρονη υδρόλυση ATP (αντλία Na^+-K^+), διατηρώντας το δυναμικό ηρεμίας. Σε κατάσταση διέγερσης, προκαλείται στιγμιαία εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης λόγω εισροής Na^+ από το εξωκυτταρικό υγρό προς το κυτταρόπλασμα⁽⁵⁾.

Καθώς ένας κινητικός νευρώνας πλησιάζει ένα μυ, χωρίζεται σε εκατοντάδες ή χιλιάδες κλάδους, καθένας από τους οποίους συνδέεται με ένα μυϊκό κύτταρο. Η σύνδεση αυτή καλείται σύναψη. Όταν στη σύναψη φτάνουν δυναμικά δράσης από τους κινητικούς νευρώνες, απελευθερώνονται στο συναπτικό χώρο μόρια ακετυλοχολίνης. Η ακετυλοχολίνη είναι ο νευροδιαβιβαστής που μεταφέρει το σήμα για συστολή από το νευρώνα στο μυ μέσω σύνδεσής της στον υποδοχέα ακετυλοχολίνης (νικοτινικός υποδοχέας) ο οποίος βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των μυϊκών κυττάρων. Όταν δύο μόρια ακετυλοχολίνης συνδεθούν στο νικοτινικό υποδοχέα, αυτός αλλάζει διαμόρφωση και επιτρέπει τη διέλευση ιόντων Na^+ , K^+ ως εξής: τα Na^+ μετακινούνται από το εξωκυτταρικό υγρό προς το κυτταρόπλασμα και τα K^+ αντίθετα. Έτσι η μεμβράνη του μυϊκού κυττάρου εκπολώνεται κι εμφανίζεται ένα νέο δυναμικό δράσης. Αυτό μεταδίδεται στο εσωτερικό της μυϊκής ίνας ταξιδεύοντας κατά μήκος ενός συστήματος εγκάρσιων σωληναρίων (σύστημα T). Το σύστημα αυτό αποτελεί συνέχεια του σαρκευλήματος και επικοινωνεί με ένα μεμβρανώδες σύστημα μικρών σάκων που λέγεται σαρκοπλασματικό δίκτυο. Αυτό αποτελεί μια δεξαμενή ιόντων Ca^{2+} που δημιουργείται με τη βοήθεια ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών της μεμβράνης του, της αντλίας Ca^{2+} , η οποία αποσύρει Ca^{2+} από το κυτταρόπλασμα με δαπάνη ενέργειας (ATPάση Ca^{2+}). Η διατήρηση, σε κατάσταση ηρεμίας, των υψηλών συγκεντρώσεων Ca^{2+} μέσα στο σαρκοπλασματικό δίκτυο (10.000 φορές υψηλότερη από εκείνη του σαρκοπλάσματος) πετυχαίνεται με την καλμοδουλίνη, μια πρωτεΐνη που απαντάται στο εσωτερικό του σαρκοπλασματικού δικτύου και που διαθέτει πολλές θέσεις δέσμευσης για τα Ca^{2+} ^(1,6,7).

Η μετάδοση ενός δυναμικού δράσης από το σαρκείλημα στο σύστημα T προκαλεί την αλλαγή στη διαμόρφωση μιας άλλης εγκάρσιας πρωτεΐνης της μεμβράνης του σαρκοπλασματικού δικτύου, με αποτέλεσμα τη γρήγορη έξοδο Ca^{2+} προς το σαρκόπλασμα. Τα Ca^{2+} αλληλεπιδρούν με την τροπομυοσίνη και επιτρέπουν την αλληλεπίδραση της ακτίνης με τη μυοσίνη (ενεργητική μετακίνηση των παχιών κατά μήκος των λεπτών νηματίων - μοντέλο των συρόμενων νηματίων)⁽⁶⁾. Όταν σταματήσει το ερέθισμα για τη μυϊκή συστολή, η ΑΤΡάση Ca^{2+} επαναφέρει τα Ca^{2+} μέσα στο σαρκοπλασματικό δίκτυο.

1.3. Πηγές ενέργειας στους μύες

Για τη σύσπαση του μυός είναι απαραίτητη η κατανάλωση ενέργειας. Το ATP είναι η κύρια, άμεση πηγή ενέργειας για το μυ. Εκτός από το ATP υπάρχει στο μυ και μια άλλη πλούσια σε ενέργεια ένωση, η φωσφοκρεατίνη, η οποία υδρολύεται σε κρεατίνη και σε φωσφορικές ρίζες (ενώσεις υψηλής ενέργειας). Όταν οι μύες βρίσκονται σε χαλάρωση, φωσφορικές ρίζες από το ATP μεταφέρονται στην κρεατίνη και σχηματίζεται φωσφοκρεατίνη. Κατά τη σύσπαση του μυός η φωσφοκρεατίνη υδρολύεται και με τις φωσφορικές ρίζες που παρέχει σχηματίζονται ATP και ADP. Έτσι, υπάρχει διαθέσιμη ενέργεια για να συνεχίσει ο μυς να συσπάται⁽⁸⁾.

Μεγάλο μέρος της ενέργειας για το σχηματισμό ATP και φωσφοκρεατίνης προέρχεται από τη διάσπαση της γλυκόζης. Οι σκελετικοί μύες και ο καρδιακός μυς αξιοποιούν επίσης για παραγωγή ενέργειας και ελεύθερα λιπαρά οξέα, που είτε τα προσλαμβάνουν από το αίμα, είτε παράγονται στους ίδιους τους μύες. Τέλος, η αξιοποίηση των πρωτεϊνών για την παραγωγή ενέργειας στους μύες είναι αμελητέα, ακόμη και κατά τη διάρκεια παρατεταμένης άσκησης. Οι περισσότερες μελέτες την εκτιμούν στο 3 έως 6% της συνολικής ενεργειακής δαπάνης.

Οι μυϊκές ίνες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την ταχύτητα της σύσπασης και με ιστοχημικά, κυρίως, χαρακτηριστικά σε τρεις τουλάχιστον κατηγορίες: 1) σε «ταχείες» με γλυκολυτική δραστηριότητα, 2) σε «ταχείες» με γλυκολυτική και οξειδωτική δραστηριότητα και 3) σε «βραδείες» με οξειδωτική δραστηριότητα⁽⁹⁾. Οι «ταχείες» μυϊκές ίνες με γλυκολυτική δραστηριότητα είναι ικανές για ταχείες συσπάσεις για σύντομα χρονικά διαστήματα. Σ' αυτές κυριαρχεί ο αναερόβιος μεταβολισμός, ενώ περιέχουν, σε σχέση με τις «βραδείες» μυϊκές ίνες, λιγότερη μυοσφαιρίνη, λιγότερα λιπίδια, λιγότερα μιτοχόνδρια, περισσότερο γλυκογόνο, περισσότερη φωσφορυλάση (για την αποδόμηση του γλυκογόνου), έχουν μεγαλύτερη διάμετρο και παρουσιάζουν πιο εκτεταμένο και οργανωμένο

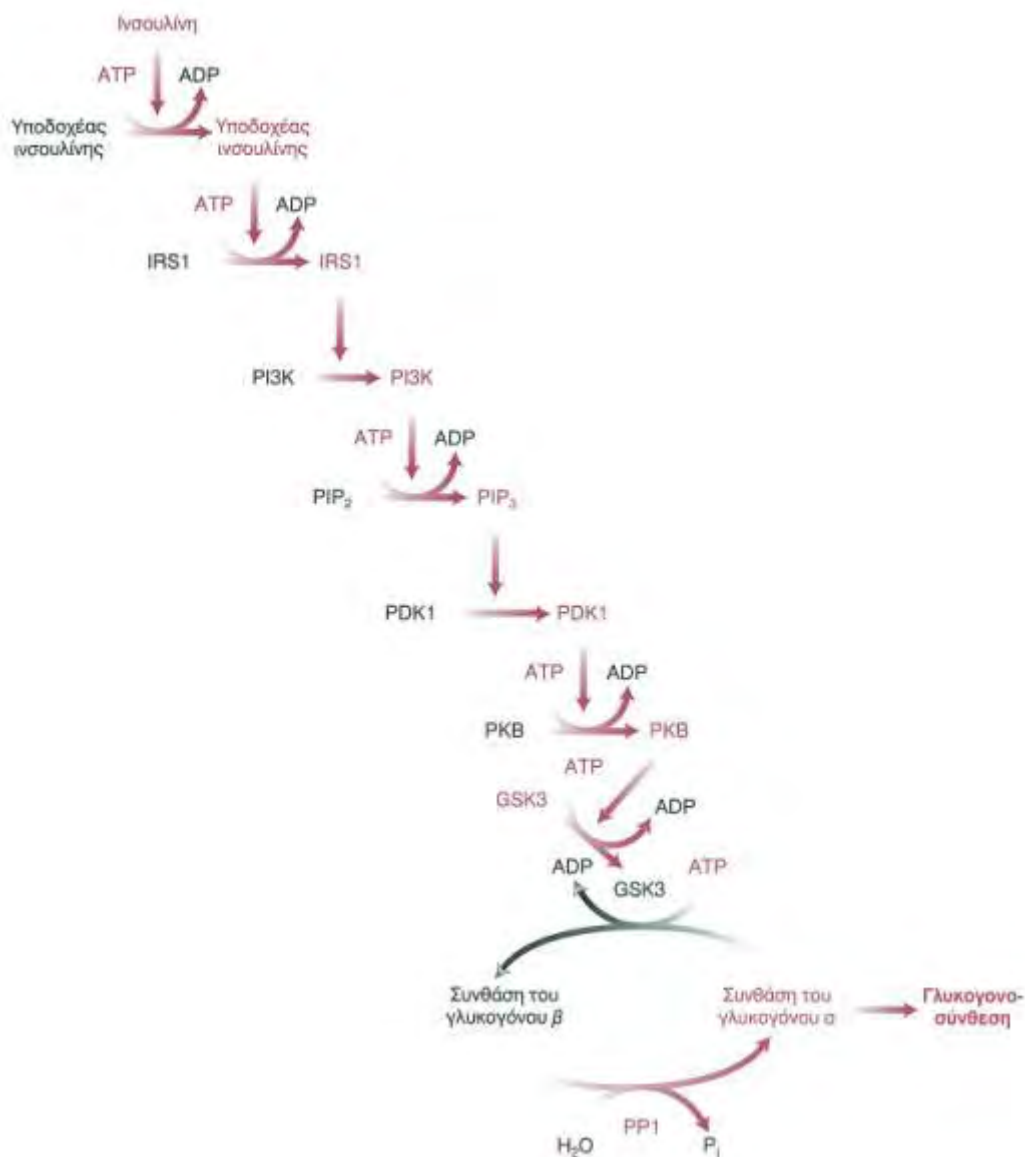
σαρκοπλασματικό δίκτυο, το οποίο συσσωρεύει και ελευθερώνει ταχύτερα τα ιόντα ασβεστίου. Οι «βραδείες» με οξειδωτική δραστηριότητα μυϊκές ίνες έχουν τα αντίθετα χαρακτηριστικά από τις «ταχείες» ίνες με γλυκολυτική δραστηριότητα. Τέλος, οι «ταχείες» με γλυκολυτική και οξειδωτική δραστηριότητα μυϊκές ίνες έχουν ιδιότητες περίπου ενδιάμεσες των ιδιοτήτων των δύο άλλων κατηγοριών μυϊκών ινών⁽⁹⁾.

1.4. Μεταβολισμός των υδατανθράκων στους σκελετικούς μύες

1.4.1. Μεταβολισμός του γλυκογόνου στους σκελετικούς μύες

Κύρια πηγή του ηπατικού και του μυϊκού γλυκογόνου είναι οι υδατάνθρακες της τροφής, όπως το άμυλο και η σακχαρόζη. Αυτοί οι πολυσακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες υδρολύονται στα κύτταρα των λαχνών του εντερικού επιθηλίου προς μονοσακχαρίτες, κυρίως γλυκόζη. Η γλυκόζη μέσω της πυλαίας φλέβας φτάνει στο ήπαρ, όπου κατακρατείται ένα μέρος της για το σχηματισμό του ηπατικού γλυκογόνου, ενώ το υπόλοιπο φτάνει σε διάφορα άλλα όργανα, μεταξύ των οποίων οι σκελετικοί μύες, όπου συντίθεται το μυϊκό γλυκογόνο⁽⁶⁾.

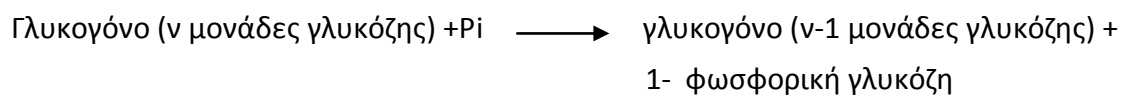
Για την είσοδο της γλυκόζης στα μυϊκά κύτταρα αλλά και στα κύτταρα του λιπώδους ιστού είναι απαραίτητη η δράση της ορμόνης ινσουλίνης. Η ινσουλίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που συντίθεται και εκκρίνεται από τα β κύτταρα του παγκρέατος. Η έκκριση ινσουλίνης εξαρτάται από τη συγκέντρωση γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος. Όταν η τελευταία αυξάνεται μετά από ένα γεύμα λόγω της πέψης των υδατανθράκων, αυξάνεται και η ταχύτητα έκκρισης ινσουλίνης από το πάγκρεας⁽¹⁾. Η ινσουλίνη συνδέεται στον υποδοχέα της που βρίσκεται στη μεμβράνη των μυϊκών (και των λιπωδών) κυττάρων. Η σύνδεση αυτή προκαλεί την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα, ο οποίος έτσι ενεργοποιείται και μπορεί να φωσφορυλιώσει άλλες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων τις πρωτεΐνες IRS1 και IRS2 (υπόστρωμα του υποδοχέα της ινσουλίνης, *Insulin Receptor Substrate*). Από εδώ ξεκινά ένα πολύπλοκο σηματοδοτικό μονοπάτι που καταλήγει στην ενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου, με αποτέλεσμα την επαγωγή της γλυκογονοσύνθεσης⁽⁷⁾ (εικόνα 2).



Εικόνα 2: Σηματοδοτικό μονοπάτι γλυκογονοσύνθεσης

Η γλυκογονοσύνθεση συνίσταται στη διαδοχική προσθήκη μονάδων γλυκόζης σε μια επιμηκυνόμενη αλυσίδα με την καταλυτική δράση αρχικά της γλυκογενίνης, η οποία λειτουργεί ως εκκινήτης όπου προστίθενται μονομερή γλυκόζης⁽¹⁰⁾ και στη συνέχεια της συνθάσης του γλυκογόνου η οποία επεκτείνει την αλυσίδα.

Για την απόδοση ενέργειας που απαιτείται για τη σύσπαση του μυός, είναι απαραίτητο να συμβεί γλυκογονόλυση κατά την οποία το γλυκογόνο χάνει, τη μια μετά την άλλη, μονάδες γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του με τη δράση του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου:



Κατά την άσκηση επιταχύνεται η γλυκογονόλυση με διάφορους τρόπους. Η πρώτη μεταβολή που επιταχύνει τη διάσπαση του γλυκογόνου κατά τη μυϊκή σύσπαση είναι η αύξηση στο Pi ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης του ATP. Επειδή το Pi είναι υπόστρωμα στην παραπάνω αντίδραση, η αύξησή του επιταχύνει τη γλυκογονόλυση. Μάλιστα αυτό πετυχαίνεται από τα πρώτα δευτερόλεπτα της μυϊκής σύσπασης. Οι άλλες μεταβολές που επιταχύνουν τη γλυκογονόλυση καταλήγουν στην άμεση ή έμμεση ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Συγκεκριμένα, ο υψηλός βαθμός υδρόλυσης του ATP κατά την άσκηση προκαλεί αύξηση του AMP, το οποίο είναι αλλοστερικός ενεργοποιητής της φωσφορυλάσης. Επίσης, κατά τη μυϊκή συστολή απελευθερώνονται Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο, τα οποία συνδέονται με την καλμοδουλίνη. Αυτή αλλάζει διαμόρφωση και ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης, ένζυμο που με τη σειρά του ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου⁽⁷⁾. Τέλος, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ενεργοποιείται από την αύξηση της συγκέντρωσης της ορμόνης αδρεναλίνης στο αίμα. Η άσκηση, ακόμα και η προσμονή της, διεγείρει το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, το οποίο, μεταξύ άλλων, αυξάνει την έκκριση αδρεναλίνης (και άλλων κατεχολαμινών) από τη μυελώδη μοίρα των επινεφριδίων. Η αδρεναλίνη που φτάνει στα μυϊκά κύτταρα προκαλεί τελικά ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μέσω μιας σειράς μοριακών αλληλεπιδράσεων που ονομάζονται καταρράκτης του κυκλικού AMP (cAMP)⁽¹⁾.

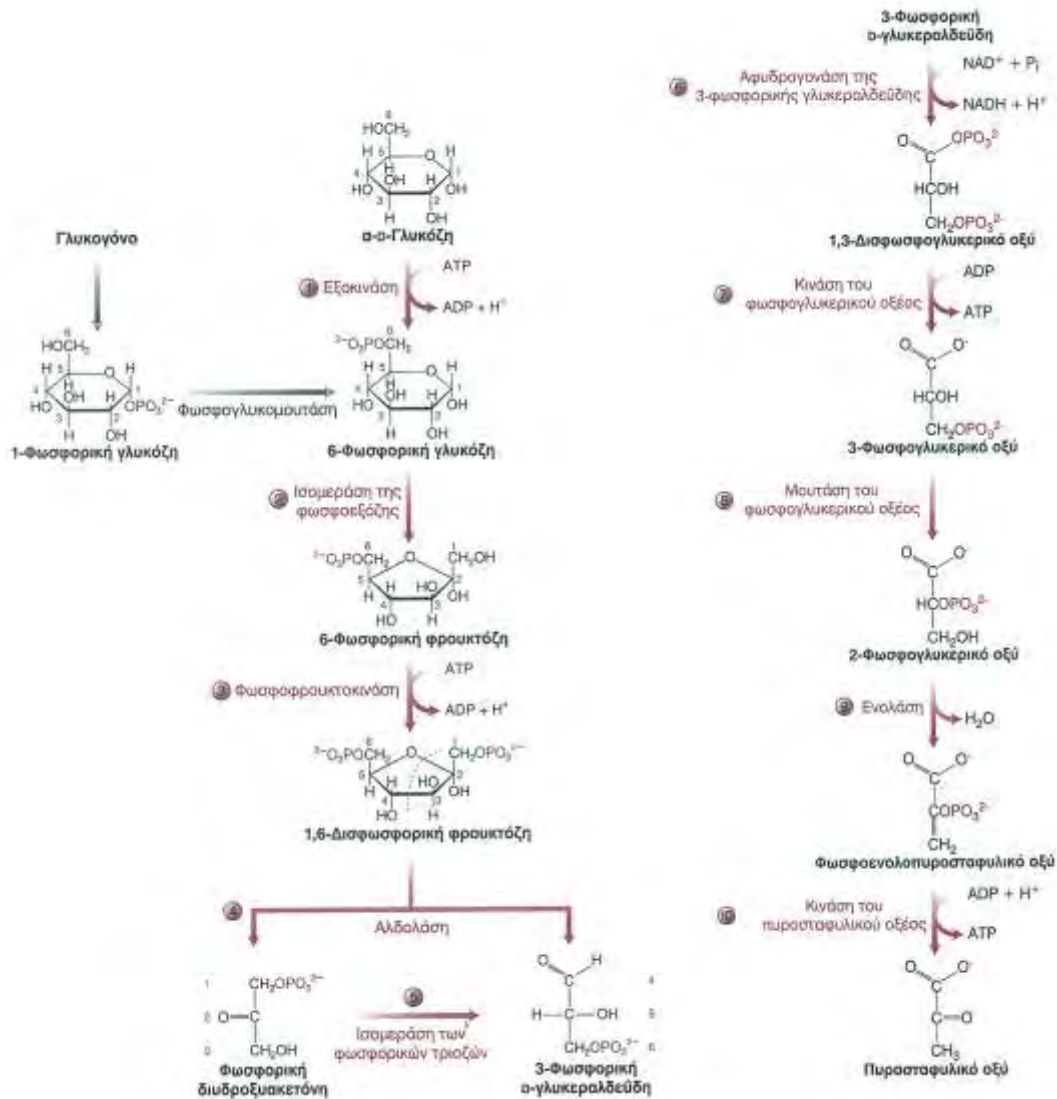
1.4.2. Μεταβολισμός της γλυκόζης στους σκελετικούς μύες

Η γλυκόζη και η 1-φωσφορική γλυκόζη, που παράγεται κατά τη διάσπαση του γλυκογόνου, αποδίδουν ενέργεια μέσω της γλυκόλυσης, δηλαδή της διάσπασης της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ. Η γλυκόζη που προέρχεται από την τροφή ή προκύπτει από σύνθεση από μη υδατανθρακικές πηγές εισέρχεται παθητικά στα μυϊκά κύτταρα με τη βοήθεια των μεταφορέων γλυκόζης (Glucose Transporter, GLUT) που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη των μυϊκών κυττάρων. Οι αφθονότεροι μεταφορείς γλυκόζης στα μυϊκά κύτταρα είναι οι GLUT4, οι οποίοι δεν βρίσκονται μόνιμα στην κυτταρική μεμβράνη, αλλά μετακινούνται μεταξύ ενός πληθυσμού ενδοκυτταρικών κυστιδίων και της κυτταρικής μεμβράνης. Η μυϊκή σύσπαση αλλά και η ινσουλίνη προκαλούν αύξηση της μετακίνησης των GLUT4 προς την κυτταρική μεμβράνη⁽⁶⁾.

Φαίνεται λοιπόν ότι ο ρόλος της ινσουλίνης στο μεταβολισμό στους σκελετικούς μύες είναι διπλός: Από τη μια πλευρά επάγει την είσοδο της γλυκόζης στα μυϊκά κύτταρα μέσω αύξησης της μετακίνησης των GLUT4 προς την κυτταρική

μεμβράνη, ενώ από την άλλη επάγει τη γλυκογονοσύνθεση ενεργοποιώντας τη συνθάση του γλυκογόνου.

Η γλυκόλυση είναι αναερόβια διεργασία. Αποτελείται από 10 αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στο σαρκόπλασμα και καταλύονται από διάφορα ένζυμα. Ολόκληρο το μονοπάτι φαίνεται στην εικόνα 3.



Εικόνα 3: Γλυκόλυση

Η άσκηση μπορεί να αυξήσει την ταχύτητα της γλυκόλυσης στους μύες κατά εκατοντάδες φορές και με περισσότερους από έναν μηχανισμούς: Οι ασκούμενοι μύες προσλαμβάνουν περισσότερη γλυκόζη από το αίμα λόγω αύξησης της αιματικής ροής σ' αυτούς αλλά και λόγω της αύξησης του αριθμού των GLUT4 στην κυτταρική μεμβράνη. Επιπλέον με την άσκηση επιταχύνεται η γλυκογονόλυση, οπότε αυξάνεται η συγκέντρωση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, που είναι

υπόστρωμα της δεύτερης αντίδρασης της γλυκόλυσης. Επίσης η άσκηση επιταχύνει τη γλυκόλυση μέσω αλλοστερικής ρύθμισης της φωσφοφρουκτοκινάσης, του ενζύμου που καταλύει την τρίτη αντίδραση. Η δράση της φωσφοφρουκτοκινάσης αναστέλλεται από το ATP και από τη φωσφοκρεατίνη. Αυτό σημαίνει ότι όταν οι συγκεντρώσεις του ATP και της φωσφοκρεατίνης αρχίζουν να μειώνονται με την έναρξη της άσκησης, η φωσφοφρουκτοκινάση ενεργοποιείται. Με τον ίδιο τρόπο (ATP και φωσφοκρεατίνη) ρυθμίζεται και η κινάση του πυροσταφυλικού οξέος, το ένζυμο που καταλύει την τελευταία αντίδραση της γλυκόλυσης⁽⁶⁾.

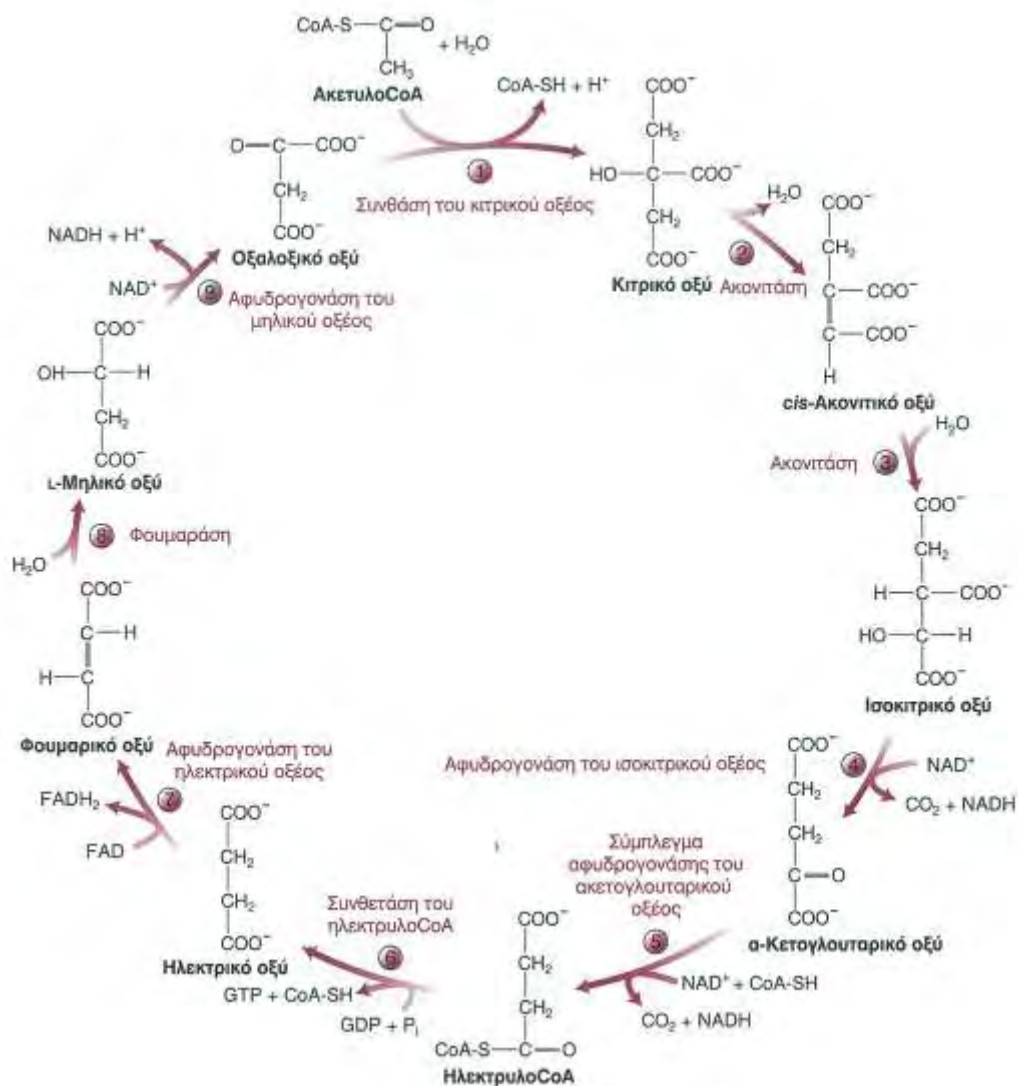
1.4.3. Μεταβολισμός του πυροσταφυλικού οξέος στους σκελετικούς μύες

Το πυροσταφυλικό οξύ που παράγεται κατά τη γλυκόλυση εισέρχεται στα μιτοχόνδρια όπου αντιδρά με το συνένζυμο A (CoA) δημιουργώντας το ακετυλοσυνένζυμο A, ενώ ταυτόχρονα οξειδώνεται από το NAD⁺. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από τρία ένζυμα που απαρτίζουν το σύμπλεγμα της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος. Το σύμπλεγμα αυτό, όταν είναι φωσφορυλιωμένο είναι ανενεργό, γεγονός που συμβαίνει σε κατάσταση ηρεμίας των μυών, ενώ όταν είναι αποφωσφορυλιωμένο είναι ενεργό, γεγονός που συμβαίνει κατά την άσκηση, λόγω ενεργοποίησης της αντίστοιχης φωσφατάσης και καταστολής της αντίστοιχης κινάσης. Η φωσφατάση ενεργοποιείται από τα Ca²⁺ που απελευθερώνεται από το σαρκοπλασματικό δίκτυο κατά την άσκηση και από τα Mg²⁺. Η κινάση αναστέλλεται από το πυροσταφυλικό οξύ το οποίο αυξάνεται λόγω της αυξημένης ταχύτητας της γλυκόλυσης⁽⁶⁾.

1.4.4. Κύκλος του Krebs

Ο κύκλος του Krebs είναι μια σειρά εννέα ενζυμικών αντιδράσεων που επεξεργάζονται την ακετυλομάδα του ακετυλοCoA, το οποίο προέρχεται από την οξείδωση των υδατανθράκων, αλλά και των λιπών και των πρωτεϊνών. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η ακετυλομάδα να οξειδωθεί σε διοξείδιο του άνθρακα, ενώ οι μεταβολίτες του κύκλου αποκαθίστανται μετά από μια πλήρη στροφή (εικόνα 4). Η ταχύτητα οξείδωσης της ακετυλομάδας μέσω του κύκλου του Krebs μπορεί ακόμα και να εκατονταπλασιαστεί κατά την έντονη άσκηση. Αυτό οφείλεται κυρίως στην αύξηση της συγκέντρωσης του ακετυλοCoA που παράγεται από την επιταχυμένη οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος. Επιπλέον ο κύκλος του Krebs επιταχύνεται κατά την άσκηση μέσω αλλοστερικής ρύθμισης των ενζύμων συνθάση κιτρικού οξέος, αφυδρογονάση ισοκιτρικού οξέος και αφυδρογονάση α-κετογλουταρικού οξέος. Τα δύο πρώτα αναστέλλονται από την υψηλή συγκέντρωση του ATP και συνεπώς ενεργοποιούνται λόγω της μείωσης της συγκέντρωσης του ATP που συμβαίνει κατά την άσκηση. Τα δυο τελευταία ενεργοποιούνται από τα Ca²⁺ των

μιτοχονδρίων, των οποίων η συγκέντρωση αυξάνεται κατά την παρατεταμένη άσκηση⁽⁵⁾.



Εικόνα 4: Ο κύκλος του Krebs

1.4.5. Οξειδωτική φωσφορύλιωση

Τα NADH και FADH₂ που παράγονται στα μιτοχόνδρια κατά την οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος και τον κύκλο του Krebs οξειδώνονται προς NAD⁺ και FAD⁺ μεταφέροντας τα ηλεκτρόνια τους στο οξυγόνο της αναπνοής, το οποίο μεταφέρεται στα κύτταρα από το αίμα. Αυτό γίνεται μέσω ενός πολύπλοκου συστήματος που αποτελείται από τρία μεγάλα πρωτεϊνικά συμπλέγματα (οξειδοαναγωγή NADH-Q, οξειδοαναγωγή Q-κυτοχρώματος c, οξειδάση κυτοχρώματος c) και δύο ευκίνητους μεταφορείς ηλεκτρονίων (συνένζυμο Q,

κυτόχρωμα c) και ονομάζεται αναπνευστική αλυσίδα. Τελικά κάθε μόριο οξυγόνου προσλαμβάνει 4 ηλεκτρόνια, εκτός από ορισμένα που προσλαμβάνουν 1, δημιουργώντας έτσι τη ρίζα του υπεροξειδίου (O_2^-). Η ρίζα αυτή αλλά και άλλες που παράγονται με αυτόν ή με άλλους τρόπους τείνουν να αφαιρούν ηλεκτρόνια από διάφορα βιομόρια στην περιοχή τους προκειμένου να τα ζευγαρώσουν με τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια τους. Η παραγωγή ριζών αυξάνεται κατά την άσκηση (όπως θα αναλυθεί παρακάτω) και γι' αυτό το λόγο προσελκύει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών⁽⁵⁾.

Κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας παράγεται ενέργεια η οποία χρησιμοποιείται για την παραγωγή ATP από ADP. Ο παράγοντας που κυρίως καθορίζει την ταχύτητα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι η συγκέντρωση του υποστρώματός της, του ADP. Καθώς το ADP αυξάνεται σ' έναν ασκούμενο μυ, επιταχύνεται η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η ανασύνθεση του ATP. Έτσι επιταχύνεται η αναγέννηση των NAD^+ και FAD^+ , τα οποία είναι απαραίτητα οξειδωτικά μέσα για τη γλυκόλυση, την οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος και τον κύκλο του Krebs⁽⁶⁾.

1.4.6. Μεταβολισμός του γαλακτικού οξέος στους σκελετικούς μύες

Όπως προαναφέρθηκε, η γλυκόλυση συνοδεύεται από μετατροπή του NAD^+ σε $NADH$ και για να διατηρηθεί η ταχύτητα της γλυκόλυσης πρέπει να αναγεννιέται το NAD^+ . Ένας τρόπος αναγέννησης του NAD^+ είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας με τελικό τους αποδέκτη το οξυγόνο. Επειδή όμως τα εμπλεκόμενα βήματα είναι πολλά, η αερόβια μετατροπή του $NADH$ σε NAD^+ είναι χρονοβόρα. Έτσι, όταν η ένταση της άσκησης ξεπερνά ένα ορισμένο σημείο, η ταχύτητα παραγωγής $NADH$ στη γλυκόλυση ξεπερνά την ταχύτητα αερόβιας αναγέννησης του NAD^+ . Στο σημείο αυτό ξεκινά η αναερόβια μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ⁽¹¹⁾.

Η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ πραγματοποιείται στα σαρκόπλασμα και καταλύεται από την αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος. Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στο μυ μπορεί να τριπλασιαστεί κατά τη μέγιστη άσκηση, υποδεικνύοντας μαζικό αναερόβιο καταβολισμό των υδατανθράκων. Αυτό συνοδεύεται από αύξηση της οξύτητας του σαρκοπλάσματος, αφού η μετατροπή γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ συνοδεύεται από παραγωγή πρωτονίων^(12,13).

Το γαλακτικό οξύ που παράγεται σ' έναν έντονα ασκούμενο μυ αποβάλλεται από τη μυϊκή ίνα και εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος. Από εκεί εισέρχεται

σε όργανα όπου η συγκέντρωσή του είναι χαμηλότερη από εκείνη στο αίμα, όπως είναι η καρδιά και το ήπαρ, και, σε μικρότερο ποσοστό, ο εγκέφαλος και οι νεφροί.

1.5. Μεταβολισμός των λιπιδίων στους σκελετικούς μύες

Τα λιπίδια είναι μια ετερογενής οικογένεια βιολογικών ενώσεων με χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Δύο κατηγορίες λιπιδίων παρουσιάζουν ενδιαφέρον για το μεταβολισμό στους σκελετικούς μύες, τα λιπαρά οξέα και οι τριακυλογλυκερόλες.

Η σύνθεση των λιπαρών οξέων ξεκινά από το ακετυλοCoA, το οποίο με τη δράση της καρβοξυλάσης του ακετυλοCoA μετατρέπεται σε μηλονυλοCoA και από αυτό στη συνέχεια με μια σειρά αντιδράσεων που καταλύονται από τη συνθάση των λιπαρών οξέων προκύπτει το παλμιτικό οξύ. Από το παλμιτικό οξύ προέρχονται όλα τα λιπαρά οξέα⁽⁵⁾.

Τα λιπαρά οξέα μπορούν να προκύψουν από τη λιπόλυση των τριακυλογλυκερολών του λιπώδους ιστού. Η άσκηση επιταχύνει τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό μέσω της αυξημένης έκκρισης αδρεναλίνης και νοραδρεναλίνης από τις απολήξεις νευρώνων του συμπαθητικού συστήματος. Αυτές οι ορμόνες συνδέονται σε β αδρενεργικούς υποδοχείς που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη των λιποκυττάρων και ενεργοποιούν τον καταρράκτη του cAMP, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της λιπάσης της τριακυλογλυκερόλης και την υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών σε λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Αυτά εξέρχονται στο πλάσμα του αίματος. Η γλυκερόλη είναι διαλυτή στο νερό και κυκλοφορεί εύκολα, ενώ τα λιπαρά οξέα είναι δυσδιάλυτα και μεταφέρονται από την αλβουμίνη⁽¹⁾.

Στο αίμα κυκλοφορούν οι τριακυλογλυκερόλες που προέρχονται από την τροφή. Επειδή αυτές είναι αδιάλυτες στο νερό, είναι ενσωματωμένες σε λιποπρωτεΐνες, που είναι σφαιρικά συσσωματώματα λιπιδίων και πρωτεϊνών και που διακρίνονται σε 4 σημαντικές κατηγορίες (χυλομικά, λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας ή VLDL, λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας ή LDL και λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας ή HDL). Αυτές οι λιποπρωτεΐνες φθάνουν στους σκελετικούς μύες, στο λιπώδη και σε άλλους ιστούς. Για την είσοδό τους σε αυτούς είναι απαραίτητη η προηγούμενη διάσπασή τους από το ένζυμο λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL). Αυτή παράγεται στα κύτταρα των σκελετικών μυών, του λιπώδους και άλλων ιστών και εξέρχεται στα τριχοειδή αγγεία⁽⁶⁾.

Η είσοδος των λιπαρών οξέων στα μυϊκά κύτταρα διευκολύνεται από πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης, η κυριότερη από τις οποίες είναι η τρανσλοκάση των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Translocase, FAT) ή CD36. Τα λιπαρά

οξέα που εισέρχονται στους μύες από το πλάσμα καθώς και τα λιπαρά οξέα που προέρχονται από την υδρόλυση των μυοκυτταρικών τριακυλογλυκερολών αποικοδομούνται με σκοπό την παραγωγή ενέργειας⁽⁷⁾.

Η αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων γίνεται μέσω του μονοπατιού της β-οξειδωσης, που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια. Τα λιπαρά οξέα, αφού προηγουμένως μετατραπούν σε ακυλοCoA, εισέρχονται στα μιτοχόνδρια με τη βοήθεια της καρνιτίνης και του ενζύμου παλμιτοϋλτρανσφεράση της καρνιτίνης (Carnitine Palmytoyltransferase 1, CPT1)⁽⁵⁾. Τα τελικά προϊόντα της β-οξειδωσης είναι το ακετυλοCoA, το οποίο εισέρχεται στον κύκλο του Krebs και τα FADH₂ και NADH που οξειδώνονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων για να παράγουν μεγάλα ποσά ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης⁽⁷⁾. Κατά τη μυϊκή σύσπαση επιταχύνεται η β-οξειδωση των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια των σκελετικών μυών κυρίως μέσω της αύξησης της συγκέντρωσής τους. Η αύξηση αυτή οφείλεται στην ενεργοποίηση της λιπόλυσης των τριακυλογλυκερολών στο λιπώδη ιστό, στην αυξημένη ροή του αίματος στους ασκούμενους μύες (που έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη είσοδο λιπαρών οξέων στα μυϊκά κύτταρα), στην αυξημένη μετακίνηση του FAT/CD36 από μια ενδοκυτταρική δεξαμενή προς την κυτταρική μεμβράνη και στη διέγερση της λιπόλυσης μέσα στους σκελετικούς μύες. Επιπλέον η β-οξειδωση επιταχύνεται κατά τη μυϊκή σύσπαση αφού τα προϊόντα της (ακετυλοCoA, FADH₂ και NADH) καταναλώνονται ταχύτατα στον κύκλο του Krebs, στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση⁽⁶⁾.

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων παίζει μια ομάδα πυρηνικών πρωτεϊνών, γνωστοί ως υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πολλαπλασιαστές υπεροξυσωμάτων (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, PPARs). Υπάρχουν τρεις ισομορφές: PPAR-α, PPAR-γ και PPAR-δ⁽¹⁴⁾. Μεγάλη σημασία για το μεταβολισμό στους σκελετικούς μύες και στο λιπώδη ιστό έχουν οι PPAR-γ^(15, 16).

Η β-οξειδωση λαμβάνει χώρα και στα υπεροξυσώματα όπου καταβολίζονται υποστρώματα που δεν οξειδώνονται στα μιτοχόνδρια, όπως τα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, τα δικαρβοξυλικά λιπαρά οξέα και η χοληστερόλη⁽¹⁴⁾.

1.6. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες στους σκελετικούς μύες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους⁽¹⁷⁾. Αυτό μπορεί να γίνει είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από αυτή τη

στιβάδα⁽¹⁸⁾. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα ασταθείς και για να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στιβάδα αντιδρούν με άλλα μόρια οξειδώνοντάς τα. Στον οργανισμό οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με διάφορα βιομόρια όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, επηρεάζοντας τη φυσιολογική δράση τους.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μια ετερογενής ομάδα ατόμων και μορίων. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο κι ένα ηλεκτρόνιο. Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS), οι δραστικές μορφές θείου (RSS) και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS)⁽¹⁹⁾. Στον οργανισμό οι ρίζες που συναντώνται συνηθέστερα είναι οι ROS. Σ' αυτές ανήκουν οι ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot}), αλκοξειδίου (RO^{\cdot}), υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot}) και οι μη ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), υποβρωμιώδες οξύ ($HOBr$), όζον (O_3) και μονήρες οξυγόνο (1O_2).

1.6.1. Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών παράγεται ενδογενώς κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων⁽²⁰⁾. Αυτό συμβαίνει γιατί πολλά ηλεκτρόνια μπορούν να διαφύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων. Επειδή το οξυγόνο είναι αυτό που καταναλώνεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες είναι ROS.

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν επίσης να προκύψουν και μετά από τη δράση εξωγενών παραγόντων, όπως το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου, η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, τα βιομηχανικά απόβλητα, διάφορα φάρμακα, το αλκοόλ και η διατροφή⁽¹⁸⁾.

1.6.2. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικά ορίζονται οι ουσίες που όταν βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορούν να καθυστερήσουν ή να αναστείλουν την οξείδωση του υποστρώματος αυτού⁽²¹⁾. Τα αντιοξειδωτικά ασκούν την δράση τους εμποδίζοντας το σχηματισμό ελευθέρων ριζών ή μετατρέποντας τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικές ουσίες ή συμμετέχοντας στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά είναι τα ένζυμα υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), καταλάση (CAT), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR). Υπάρχουν και μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί όπως

οι βιταμίνες E και C, η β-καροτίνη, το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο⁽²¹⁾.

1.6.3. Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι μια διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικών-αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων⁽²²⁾. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκύψει μετά από την επίδραση τόσο εξωγενών όσο και ενδογενών παραγόντων. Εξωγενείς παράγοντες είναι ξеноβιοτικές ουσίες, παθογόνα βακτήρια και ιοί, όζον και υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, ακτινοβολία, διατροφή, κάπνισμα, φάρμακα. Ενδογενείς παράγοντες είναι ένζυμα, όπως η οξειδάση της ξανθίνης και ο αερόβιος μεταβολισμός των μιτοχονδρίων κατά την έντονη άσκηση.

1.7. Τύποι άσκησης

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος ταξινόμησης των διαφόρων τύπων άσκησης είναι η άσκηση αντοχής, η άσκηση με αντιστάσεις και η άσκηση ταχύτητας. Η άσκηση αντοχής χαρακτηρίζεται από παρατεταμένες συνεχείς ή διακεκομμένες περιόδους συσταλτικής δραστηριότητας έναντι χαμηλής αντίστασης (χαλαρό τρέξιμο - τζόγκινγκ). Η άσκηση με αντιστάσεις περιλαμβάνει σύντομες περιόδους συσταλτικής δραστηριότητας έναντι υψηλής αντίστασης (άρση βαρών). Τέλος, η άσκηση ταχύτητας χαρακτηρίζεται από σύντομες περιόδους μέγιστης συσταλτικής δραστηριότητας έναντι χαμηλής αντίστασης (αγωνιστική κολύμβηση)⁽⁶⁾.

Ένας άλλος τρόπος ταξινόμησης της άσκησης είναι η περιγραφή της με τους όρους αερόβια και αναερόβια. Στην αερόβια άσκηση η ενέργεια προέρχεται κυρίως από βιοχημικές διεργασίες που απαιτούν οξυγόνο, ενώ η αναερόβια άσκηση αντλεί ενέργεια από διεργασίες που δεν απαιτούν οξυγόνο.

2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (MICROARRAYS)

2.1. Ιστορικό

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό και τον ποιοτικό προσδιορισμό νουκλεϊκών οξέων σε ένα πολύπλοκο βιολογικό δείγμα, όπως σε ένα εκχύλισμα ιστών ή κυττάρων, είναι το στύπωμα κατά Southern, το στύπωμα τύπου Northern και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)⁽²³⁾. Παρόλο που οι τεχνικές αυτές είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές, στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται για την ανάλυση μιας αλληλουχίας ή λίγων διαφορετικών αλληλουχιών DNA ή RNA κάθε φορά. Για τη μελέτη πολλών αλληλουχιών ταυτόχρονα αναπτύχθηκαν τα «στυπώματα κουκκίδας» (dot blots) και τα «στυπώματα σχισμής» (slot blots). Σ' αυτά, διαφορετικά τμήματα DNA αποδιατάσσονται και στη συνέχεια προσδένονται το ένα δίπλα στο άλλο σε ένα φίλτρο, είτε χειρωνακτικά είτε με μια ειδική συσκευή. Για να προσδιοριστεί η παρουσία ή η απουσία μιας αλληλουχίας σε ένα βιολογικό δείγμα, απομονώνεται το DNA ή το mRNA του δείγματος, σημαίνεται και ακολούθως υβριδοποιείται στο φίλτρο, όπως ακριβώς συμβαίνει στο στύπωμα κατά Southern. Με αυτή την τεχνική αυξήθηκε σημαντικά ο αριθμός των διαφορετικών νουκλεϊκών οξέων που μπορούσαν να αναλυθούν ανά πείραμα. Παρόλα αυτά, αυτές οι μέθοδοι δεν επιτρέπουν τη μελέτη του τεράστιου αριθμού αλληλουχιών που προέκυψαν από τα προγράμματα αλληλούχισης γονιδιωμάτων. Συνεπώς, έπρεπε να βρεθούν τεχνικές που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάλυση των επιπέδων έκφρασης χιλιάδων γονιδίων σε πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και κάτω από ποικίλες πειραματικές συνθήκες⁽²³⁾. Για τον σκοπό αυτό στις αρχές της δεκαετίας του 1990, αναπτύχθηκε η τεχνική των μικροσυστοιχιών (microarrays), η οποία επιτρέπει την υβριδοποίηση δεκάδων ή ακόμη και εκατοντάδων χιλιάδων νουκλεϊκών οξέων σε ένα μόνο πείραμα⁽²⁴⁾.

2.2. Αρχές λειτουργίας μικροσυστοιχιών

Η αρχή της μεθόδου των μικροσυστοιχιών βασίζεται στη σήμανση μεταγράφων που απομονώνονται από βιολογικά δείγματα και στην υβριδοποίησή τους στους ανιχνευτές της μικροσυστοιχίας με σκοπό να προσδιοριστεί η ποσότητα ή το σχετικό επίπεδο έκφρασης κάθε μεταγράφου. Στα συμβατικά πρωτόκολλα, ολικό RNA απομονώνεται από το βιολογικό δείγμα και κατόπιν υφίσταται αντίστροφη μεταγραφή ώστε να σχηματιστεί cDNA. Στη συνέχεια το cDNA σημαίνεται με φθορίζοντα μόρια. Το σημασμένο μόριο υβριδοποιείται στην αντικειμενοφόρο

πλάκα της μικροσυστοιχίας. Μετά από τη διαδικασία υβριδοποίησης και την έντονη έκπλυση της πλάκας για την αφαίρεση της περίσσειας των μορίων στόχου που δεν υβριδοποιήθηκαν, η μικροσυστοιχία σαρώνεται ώστε να διαπιστωθούν τα επίπεδα υβριδοποίησης του ανιχνευτή. Αυτά υποδηλώνουν τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης στο εξεταζόμενο δείγμα⁽²⁵⁾.

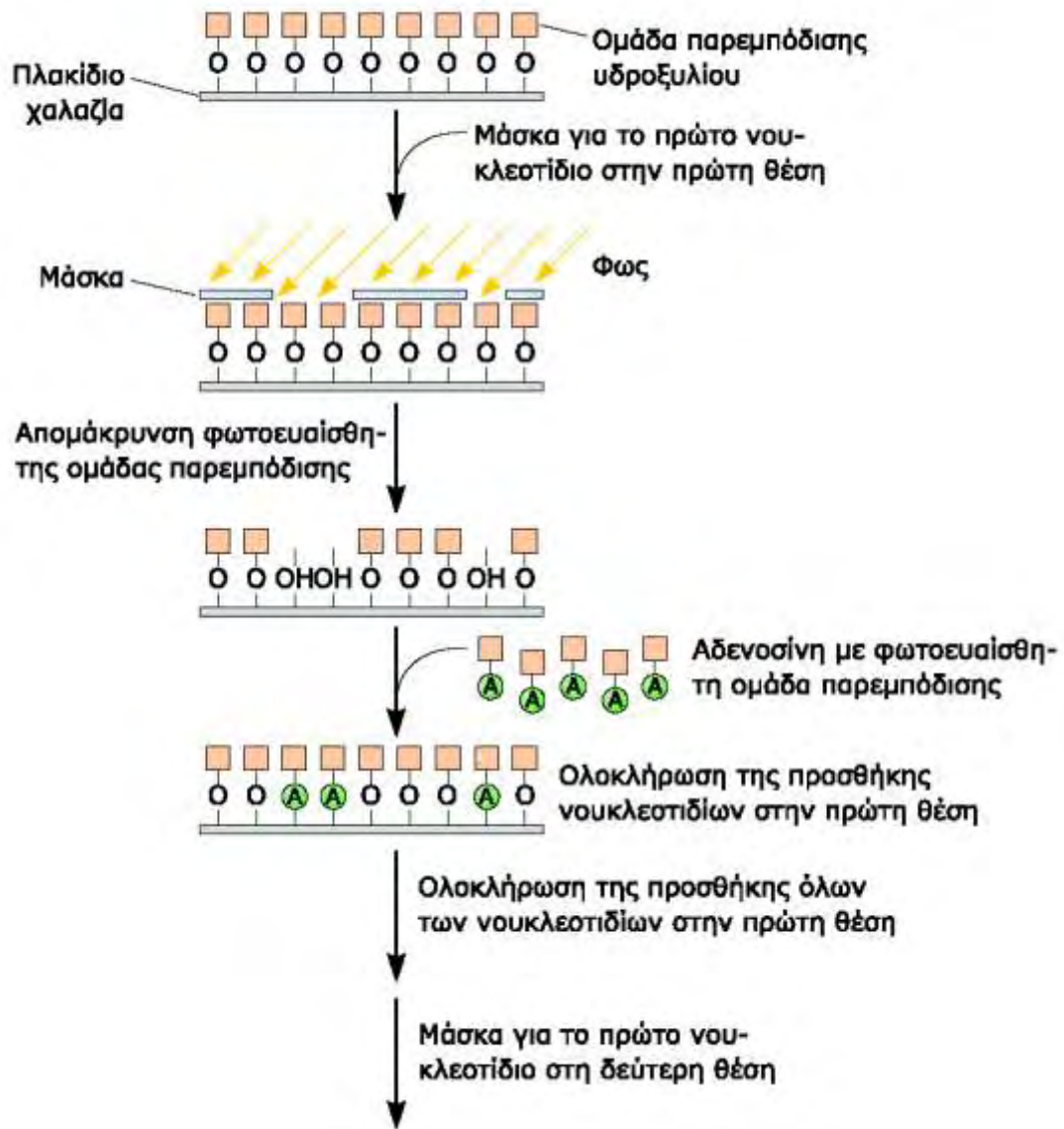
Έχουν αναπτυχθεί δύο τρόποι κατασκευής μικροσυστοιχιών. Σύμφωνα με τη μία προσέγγιση, τα ολιγονουκλεοτίδια της μικροσυστοιχίας συντίθενται και ταυτόχρονα καθλώνονται πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα, το ένα δίπλα στο άλλο (φωτολιθογραφική σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων). Σύμφωνα με την άλλη προσέγγιση, κλώνοι DNA, προϊόντα PCR ή ολιγονουκλεοτίδια, αφού πρώτα συντεθούν, προσδένονται σε γυάλινο πλακίδιο με ρομποτική μέθοδο (στικτές μικροσυστοιχίες)⁽²³⁾.

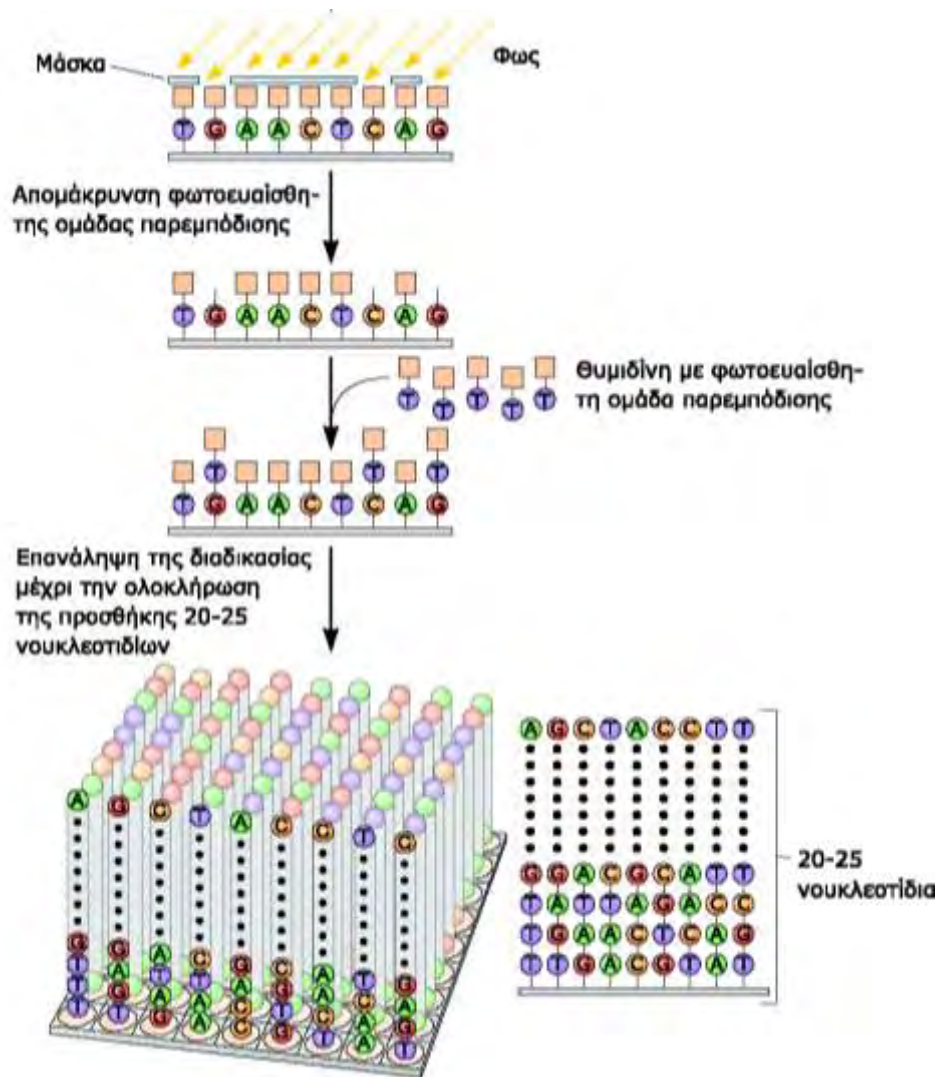
2.3. Φωτολιθογραφική σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων

2.3.1. Τρόπος κατασκευής

Η τεχνολογία αυτή, η οποία αναπτύχθηκε από την εταιρεία Affymetrix, αναφέρεται συχνά και ως τεχνολογία «τσιπ ολιγονουκλεοτιδίων» ή GeneChip, επειδή η σύνθεσή τους μοιάζει με αυτή ενός τσιπ για υπολογιστή. Κατά το πρώτο βήμα της διαδικασίας, ένα λεπτό πλακίδιο χαλαζία επιστρώνεται με τον παράγοντα παρεμπόδισης. Αυτός είναι μία φωτοευαίσθητη χημική ουσία που εμποδίζει την πρόσδεση των ολιγονουκλεοτιδίων στην επιφάνεια του πλακιδίου. Στη συνέχεια, το τσιπ καλύπτεται με μία μάσκα και εκτίθεται σε φωτισμό^(26, 27). Η μάσκα αυτή φέρει οπές οι οποίες αντιστοιχούν στις περιοχές του τσιπ όπου πρόκειται να προστεθεί το πρώτο νουκλεοτίδιο π.χ. η αδενοσίνη. Το φως που περνά διαμέσου των οπών αυτών καταστρέφει τον παράγοντα παρεμπόδισης και στη συνέχεια προστίθεται η αδενοσίνη εμβάπτιζοντας το τσιπ σε μια ενεργοποιημένη μορφή dATP. Τα ενεργοποιημένα αυτά νουκλεοτίδια φέρουν έναν παράγοντα παρεμπόδισης, ώστε μετά την πρόσδεσή τους, για μια ακόμη φορά, η σύνθεση να παρεμποδίζεται σε όλες τις θέσεις της επιφάνειας του πλακιδίου. Η περίσσεια του dATP που δεν έχει προσδεθεί ξεπλένεται και χρησιμοποιείται μια νέα μάσκα, η οποία επιτρέπει την έκθεση στο φως μόνο των θέσεων στις οποίες το πρώτο νουκλεοτίδιο είναι G. Ακολουθεί εμβάπτιση σε μια ενεργοποιημένη μορφή dGTP. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τα νουκλεοτίδια C και T, ώστε στη μικροσυστοιχία να τοποθετηθεί η πρώτη βάση των ολιγονουκλεοτιδίων. Η σύνθεση συνεχίζεται με τις τέσσερις βάσεις της δεύτερης θέσης. Οι βάσεις αυτές και όλες οι επόμενες

συνδέονται στην αυξανόμενη ολιγονουκλεοτιδική αλυσίδα με φωσφοδιεστερικό δεσμό (εικόνα 5).

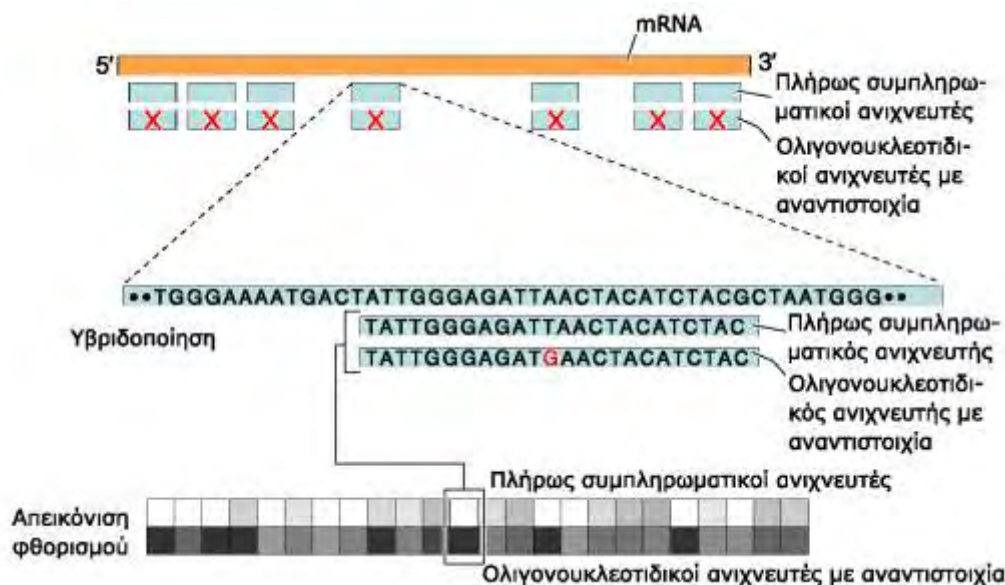




Εικόνα 5: Φωτολιθογραφική σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων

Η παραπάνω διαδικασία λαμβάνει χώρα μέχρι να δημιουργηθούν ολιγονουκλεοτίδια μήκους 20-25 βάσεων (25μερή). Συνήθως για κάθε γονίδιο κατασκευάζονται 22 διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια. 11 από αυτά έχουν την ακριβή αλληλουχία διαφόρων τμημάτων του mRNA που μεταγράφεται από το γονίδιο, ενώ τα άλλα 11 έχουν αλληλουχία όμοια με τα προηγούμενα, με εξαίρεση μία λανθασμένη βάση στο κέντρο του 25μερούς, συνήθως στο 13^ο νουκλεοτίδιο⁽²⁸⁾. Ο σχεδιασμός αυτός γίνεται για διάφορους λόγους. Έχοντας 11 ολιγονουκλεοτίδια που είναι πανομοιότυπα με το μετάγραφο κάθε γονιδίου, λαμβάνονται πολλές ανεξάρτητες μετρήσεις κι έτσι η ποσότητα του μεταγράφου υπολογίζεται με μεγαλύτερη ακρίβεια. Τα 11 ολιγονουκλεοτίδια με αναντιστοιχίες στην αλληλουχία βοηθούν στον προσδιορισμό του μη ειδικού σήματος κάθε ολιγονουκλεοτιδίου κατά την υβριδοποίηση γιατί έχουν ελάχιστη ή καμία ικανότητα υβριδοποίησης με

το δείγμα mRNA που μελετάται. Το σήμα της υβριδοποίησης των ολιγονουκλεοτιδίων με την αναντιστοιχία αφαιρείται από το σήμα των ολιγονουκλεοτιδίων πλήρους συμπληρωματικότητας, ώστε να υπολογιστεί ο βαθμός υβριδοποίησης της αλληλουχίας που μελετάται. Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο μέσος όρος των καθαρών σημάτων των ολιγονουκλεοτιδίων πλήρους αντιστοιχίας για κάθε μόριο, ώστε να υπολογιστούν τα επίπεδα του mRNA ή της γονιδιωματικής περιοχής που υπήρχαν στο δείγμα⁽²³⁾ (εικόνα 6).

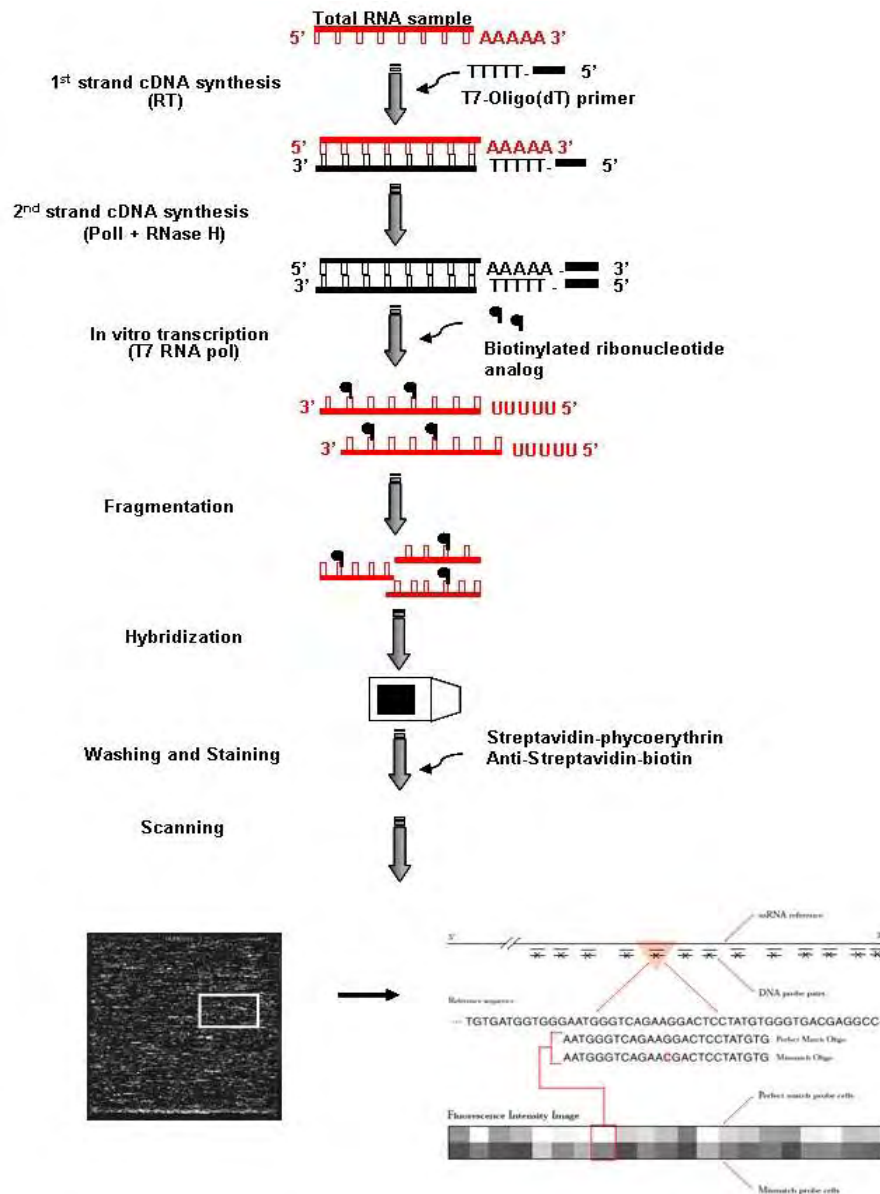


Εικόνα 6: Απεικόνιση των πλήρως συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων και των ολιγονουκλεοτιδίων με αναντιστοιχία

2.3.2. Τρόπος χρήσης

Με τα τσιπ ολιγονουκλεοτιδίων είναι δυνατός ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των επιπέδων πολλών διαφορετικών μορίων νουκλεϊκών οξέων σε ένα βιολογικό δείγμα. Το μείγμα των νουκλεϊκών οξέων απομονώνεται από τα κύτταρα ή τους ιστούς που μας ενδιαφέρουν και σημαίνεται με μία φθορίζουσα ετικέτα. Σε ορισμένα πειράματα τα mRNA που απομονώνονται «τεμαχίζονται» και τα επιμέρους τμήματά τους σημαίνονται, ενώ σε άλλα το mRNA μετατρέπεται σε cDNA, το οποίο και σημαίνεται. Στη συνέχεια, η μικροσυστοιχία επωάζεται με το δείγμα, ώστε τα σημασμένα τμήματα να βρουν τα συμπληρωματικά τους ανάμεσα στα μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια που είναι καθηλωμένα στο τσιπ. Μετά την υβριδοποίηση το τσιπ ξεπλένεται για να απομακρυνθούν τα σημασμένα τμήματα που δεν υβριδοποιήθηκαν και η μικροσυστοιχία τοποθετείται σε ειδική συσκευή η οποία τη σαρώνει και ανιχνεύει την ένταση του φθορισμού σε κάθε σημείο. Τα αποτελέσματα συλλέγονται από έναν υπολογιστή, ο οποίος τα αναλύει για να υπολογιστεί η ποσότητα του κάθε σημασμένου τμήματος που προσδέθηκε στο τσιπ.

Όπως προαναφέρθηκε, το μη ειδικό σήμα που λαμβάνεται από τα ολιγονουκλεοτίδια με αναντιστοιχία αφαιρείται από το σήμα των αντίστοιχων νουκλεοτιδίων που υβριδοποιούνται πλήρως. Μετά από αυτή τη διόρθωση υπολογίζεται η μέση τιμή έντασης για τα πολλαπλά ολιγονουκλεοτίδια που αντιπροσωπεύουν ένα γονίδιο⁽²³⁾ (εικόνα 7).



Εικόνα 7. Τρόπος χρήσης τσιπ ολιγονουκλεοτιδίων Affymetrix

2.4. Στικτές μικροσυστοιχίες ή μικροσυστοιχίες cDNA

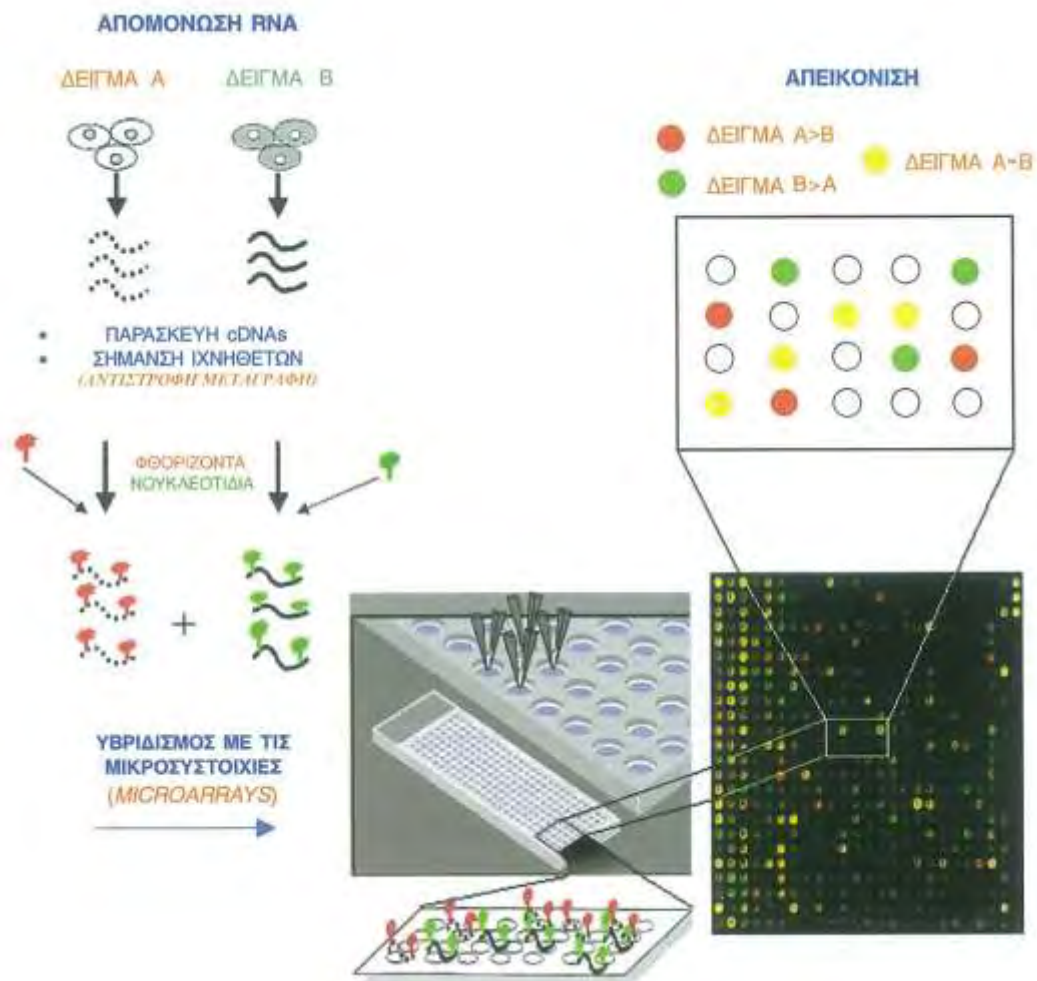
2.4.1. Τρόπος κατασκευής

Για την κατασκευή των στικτών μικροσυστοιχιών είναι απαραίτητο να ληφθούν πλασμιδιακοί κλώνοι cDNA των γονιδίων που πρόκειται να μελετηθούν. Με τη βοήθεια της PCR γίνεται ενίσχυση των κλώνων αυτών. Ακολουθεί αποδιάταξη των δίκλωνων προϊόντων της PCR, τα οποία στη συνέχεια καθηλώνονται σε ένα γυάλινο πλακίδιο με τη βοήθεια μιας ρομποτικής συσκευής. Επειδή τα τμήματα DNA σε κάθε σημείο είναι πολύ μεγάλα σε σχέση με τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται στην μέθοδο Affymetrix Genechip (από εκατοντάδες έως χιλιάδες βάσεις) η υβριδοποίηση γίνεται με μεγαλύτερη εξειδίκευση κι έτσι χρειάζεται μόνο ένας σημείο για την ανάλυση κάθε γονιδίου. Αφού τα μεγαλύτερα γονιδιώματα περιέχουν γύρω στα 20.000 γονίδια, μία στικτή μικροσυστοιχία cDNA είναι αρκετή για την ανάλυση όλων των γονιδίων ενός οργανισμού⁽²³⁾.

2.4.2. Τρόπος χρήσης

Στις στικτές μικροσυστοιχίες τα πειράματα είναι πιο ακριβή όταν χρησιμοποιούνται ως δείγματα δύο διαφορετικοί πληθυσμοί mRNA (στρατηγική των δύο χρωστικών). Ο ένας αποτελεί το δείγμα αναφοράς και προέρχεται από φυσιολογικού ιστού ενός ατόμου, ενώ ο άλλος αποτελεί το δείγμα ελέγχου του οποίου τη γονιδιακή έκφραση θέλουμε να μελετήσουμε και προέρχεται από τον ίδιο ιστό του ίδιου ατόμου, αλλά από διαφορετικό κυτταρικό πληθυσμό. Και οι δύο πληθυσμοί mRNA υφίστανται αντίστροφη μεταγραφή και τα cDNA που προκύπτουν σημαίνονται, τα μεν cDNA του δείγματος αναφοράς συνήθως με τη χρωστική Cy3 (που φθορίζει στην περιοχή του πράσινου χρώματος), τα δε cDNA του δείγματος ελέγχου με τη χρωστική Cy5 (που φθορίζει στην περιοχή του κόκκινου χρώματος). Ίσες ποσότητες των δύο σημασμένων δειγμάτων αναμειγνύονται και υβριδοποιούνται στη μικροσυστοιχία. Μία συσκευή ανίχνευσης φθορισμού προσδιορίζει την αναλογία (το λόγο) των σημάτων υβριδοποίησης των δύο φθοριζουσών ομάδων που υπάρχουν σε κάθε σημείο της μικροσυστοιχίας. Αν σε ένα σημείο η ένταση του πράσινου φθορισμού είναι υψηλότερη απ' ό,τι η ένταση του κόκκινου, αυτό σημαίνει ότι το mRNA του γονιδίου αυτού εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στο δείγμα αναφοράς απ' ό,τι στο δείγμα ελέγχου. Αν η ένταση του κόκκινου φθορισμού είναι υψηλότερη απ' ό,τι η ένταση του πράσινου, τότε το mRNA του γονιδίου αυτού εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στο δείγμα ελέγχου απ' ό,τι στο δείγμα αναφοράς. Τα σημεία στα οποία οι δύο εντάσεις είναι ίδιες εμφανίζονται με κίτρινο χρώμα και

αντιστοιχούν σε γονίδια που εκφράζονται σε ίδια επίπεδα και στα δύο δείγματα⁽²⁹⁾ (εικόνα 8).



Εικόνα 8: Τρόπος χρήσης στικτών μικροσυστοιχιών

Κατά τη στρατηγική αυτή, το δείγμα αναφοράς λειτουργεί ως εσωτερικός μάρτυρας. Τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου στο υπό εξέταση δείγμα προσδιορίζονται σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα στο δείγμα αναφοράς. Έτσι μειώνονται κατά πολύ οι αποκλίσεις από πείραμα σε πείραμα, οι οποίες οφείλονται σε τεχνικούς λόγους, για παράδειγμα διαφορές στη συγκέντρωση του DNA ή στις συνθήκες υβριδοποίησης⁽²³⁾.

3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ

Κάθε φυσικό ερέθισμα μπορεί να επηρεάσει το βαθμό έκφρασης γονιδίων που ήδη εκφράζονται σε έναν τύπο κυττάρων, αλλά δεν μπορεί να προκαλέσει την έκφραση γονιδίων που δεν εκφράζονται σ' έναν συγκεκριμένο τύπο κυττάρων. Η ρύθμιση αυτή μπορεί να είναι είτε επαγωγή (τα προϊόντα του γονιδίου αυξάνονται) ή καταστολή (τα προϊόντα του γονιδίου μειώνονται). Η επαγωγή είναι ο συχνότερος τρόπος ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς⁽⁶⁾.

Ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων μπορεί να συμβεί σε κάποιο από τα εξής στάδια: α) μεταγραφή του DNA σε RNA, β) ωρίμανση του RNA (προσθήκη polyA ουράς, μάτισμα), γ) μεταφορά του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα για μετάφραση, δ) σταθερότητα του mRNA, ε) μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνη, στ) σταθερότητα της πρωτεΐνης, ζ) μετα-μεταφραστική τροποποίηση και στόχευση της πρωτεΐνης. Οι περισσότερες από τις παραπάνω διεργασίες αποτελούνται από μικρότερα βήματα, τα οποία μπορεί να ελέγχονται ξεχωριστά⁽⁶⁾.

3.1. Υπάρχουσες μελέτες για την επίδραση της άσκησης στη γονιδιακή έκφραση σε διάφορους ιστούς (εκτός των σκελετικών μυών) με την τεχνική των μικροσυστοιχιών

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στον άνθρωπο και στα πειραματόζωα σχετικά με την επίδραση διαφόρων τύπων άσκησης στη γονιδιακή έκφραση σε ιστούς. Η πλειοψηφία των μελετών εστιάζεται σε κύτταρα του περιφερικού αίματος. Συγκεκριμένα, σε ανθρώπινα μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος, η άσκηση με αντιστάσεις προκάλεσε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση, τη φλεγμονή και την κυτταρική επικοινωνία⁽³⁰⁾. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν μικροσυστοιχίες Affymetrix GeneChip. Μια άλλη μελέτη χρησιμοποίησε τη μικροσυστοιχία της εταιρείας Agilent και παρατήρησε ότι η 4ωρη αερόβια άσκηση προκάλεσε αλλαγή στην έκφραση γονιδίων των λευκοκυττάρων που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση⁽³¹⁾. Σε ανθρώπινα μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος, μετά από άσκηση 30 λεπτών σε κυκλοεργόμετρο και ανάλυση με την τεχνολογία Affymetrix, διαπιστώθηκε μεταβολή στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, τη φλεγμονή και την αναγέννηση ιστών⁽³²⁾. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία Affymetrix, έχει αναλυθεί η επίδραση τρίμηνης αερόβιας άσκησης στη γονιδιακή έκφραση σε πρόδρομα κύτταρα μυελού των οστών (CD133(+)) ασθενών

με στεφανιαία νόσο. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι υπερ-εκφράστηκαν 59 γονίδια και υπο-εκφράστηκαν 23. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με το μεταβολισμό των υδατανθράκων, τον κυτταρικό κύκλο, την κυτταρική ανάπτυξη και σηματοδότηση και τη μεταφορά ουσιών. Ακόμα διαπιστώθηκε ότι στα 2/3 των ασθενών το προφίλ γονιδιακής έκφρασης μετά την άσκηση προσομοίαζε αυτό των υγιών ατόμων⁽³³⁾.

Σε αρκετές μελέτες ανάλυσης της επίδρασης της άσκησης στη γονιδιακή έκφραση σε κύτταρα του περιφερικού αίματος έχουν χρησιμοποιηθεί και οι μικροσυστοιχίες cDNA. Συγκεκριμένα, στον άνθρωπο, αερόβια άσκηση διάρκειας μίας ώρας αλλά και εξαντλητική άσκηση προκάλεσαν σημαντική υπερ-έκφραση γονιδίων υποδοχέων νευροδιαβιβαστών⁽³⁴⁾. Επίσης, εξαντλητική άσκηση (μαραθώνιος) προκάλεσε υπερ-έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή, την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου⁽³⁵⁾. Σε μια άλλη μελέτη συγκρίθηκε η γονιδιακή έκφραση στα λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος μετά από ήπια και εξαντλητική άσκηση (στα ίδια άτομα) και παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών της μεσοκυττάριας ουσίας, καναλιών καλίου και ογκογονιδίων⁽³⁶⁾.

Σε πειραματόζωα έχει μελετηθεί η επίδραση διαφόρων τύπων άσκησης στη γονιδιακή έκφραση στα κύτταρα του μυοκαρδίου με την τεχνολογία Affymetrix. Χρόνια άσκηση αντοχής σε ποντίκια προκάλεσε την υπερέκφραση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (αMLC-1). Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι η αMLC-1 αυξάνεται σε ανθρώπινη καρδιακή υπερτροφία και σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στο ασβέστιο⁽³⁷⁾. Μια άλλη μελέτη σε επίμυες έδειξε ότι άσκηση 30 λεπτών προκάλεσε αλλαγές στην έκφραση λίγων γονιδίων σε καρδιομυοκύτταρα (Atf3, Fos, Apold1, Pxdn)⁽³⁸⁾. Σε μια άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν επίμυες από σειρά γενεών με παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο, παρόμοιους με αυτούς του μεταβολικού συνδρόμου στον άνθρωπο. Η αερόβια άσκηση προκάλεσε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα που σχετίζονται με το μεταβολισμό, την αύξηση κυττάρων και τη μετάδοση σήματος⁽³⁹⁾. Χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες cDNA συγκρίθηκε η γονιδιακή έκφραση στο ενδοθήλιο των αγγείων και της αριστερής κοιλίας σε επίμυες που υποβλήθηκαν σε χρόνια αερόβια άσκηση, με αυτή σε επίμυες που τους χορηγήθηκαν αντιοξειδωτικά. Βρέθηκε ότι υπήρξαν αλλαγές στην έκφραση της IL-6 και μιας πρωτεΐνης ομόλογης της Ras⁽⁴⁰⁾. Επίσης έχουν γίνει μελέτες με μικροσυστοιχίες cDNA για την επίδραση αερόβιας άσκησης στη γονιδιακή έκφραση στο ήπαρ επιμύων και διαπιστώθηκε αύξηση στην έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη μετάδοση σήματος⁽⁴¹⁾. Επιπλέον μελετήθηκαν παχύσαρκα ποντίκια στο ήπαρ των οποίων παρατηρήθηκε ότι υπερ-

εκφράστηκαν γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό, την ανοσολογική απόκριση και τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς⁽⁴²⁾. Τέλος μελετήθηκε η επίδραση κολύμβησης μίας ώρας την ημέρα, 5 ημέρες την εβδομάδα, για 2 εβδομάδες, στη γονιδιακή έκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου σε επίμυες. Βρέθηκε ότι στο λεπτό έντερο υπερ-εκφράστηκαν γονίδια που σχετίζονται με τη μεταφορά Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , γλυκόζης και αμινοξέων στο εσωτερικό των επιθηλιακών κυττάρων, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στο παχύ έντερο⁽⁴³⁾. Τέλος μελετήθηκε η επίδραση εντατικής άσκησης στη γονιδιακή έκφραση στα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος αλόγου με την τεχνολογία Affymetrix. Αμέσως μετά το πέρας της άσκησης διαπιστώθηκε ότι επηρεάστηκε η έκφραση 132 γονιδίων, που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση και τη φλεγμονή. 24 ώρες μετά, η έκφραση των γονιδίων αυτών επανήλθε στις τιμές ηρεμίας⁽⁴⁴⁾.

3.2. Επίδραση της άσκησης στη γονιδιακή έκφραση στους σκελετικούς μύες

Ο σκελετικός μυς μπορεί πολύ εύκολα να προσαρμόζεται στις συνεχώς μεταβαλλόμενες συνθήκες και απαιτήσεις του περιβάλλοντος και ιδιαίτερα στις απαιτήσεις της άσκησης. Η εκπληκτική αυτή ικανότητα αυτή περιγράφεται συχνά με τον όρο μυϊκή πλαστικότητα και οφείλεται σε αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης⁽⁴⁵⁾. Η επίδραση της άσκησης στη γονιδιακή έκφραση στους σκελετικούς μύες οφείλεται σε κάποιες μεταβολές που προκαλεί η αυξημένη συστατική δραστηριότητα. Οι κυριότερες από αυτές τις μεταβολές είναι: α) Η αύξηση της σαρκοπλασματικής συγκέντρωσης Ca^{2+} λόγω απελευθέρωσης Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο με τη διέγερση της μυϊκής ίνας, β) η μείωση της συγκέντρωσης του ATP και η άμεση αύξηση των συγκεντρώσεων των ADP και AMP, γ) η μείωση της συγκέντρωσης του γλυκογόνου, δ) η μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου (υποξία) λόγω αυξημένης κατανάλωσης στην αναπνευστική αλυσίδα, ε) η αύξηση της συγκέντρωσης των ελευθέρων ριζών, στ) η μείωση του pH κατά την αναερόβια άσκηση, ζ) η εφαρμογή τάσης (διάταση) στη μυϊκή ίνα, η) η ενεργοποίηση πρωτεϊνών και η πρόσδεσή τους σε κυτταρικούς υποδοχείς.

3.2.1. Υπάρχουσες μελέτες για την επίδραση της άσκησης στη γονιδιακή έκφραση στους σκελετικούς μύες με την τεχνική των μικροσυστοιχιών

Με τη χρήση των μικροσυστοιχιών αποκαλύφθηκε ότι η άσκηση επιδρά στην έκφραση πολλών γονιδίων στους σκελετικούς μύες τα οποία, πριν την ανάπτυξη αυτών των τεχνικών, δεν είχαν συσχετιστεί καθόλου με την άσκηση. Οι μελέτες της

επίδρασης διαφόρων τύπων άσκησης στη γονιδιακή έκφραση στους σκελετικούς μύες ανθρώπου αναλύονται στη συνέχεια.

Η μελέτη του έξω πλατέος μηριαίου μύος σε επαγγελματίες ποδηλάτες έδειξε ότι με την άσκηση αυτή υπερεκφράζονται τα γονίδια δύο ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA, μεταγραφικών παραγόντων, πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος, γλυκολυτικών ενζύμων και παραγόντων που σχετίζονται με το μεταβολισμό στεροειδών ορμονών⁽⁴⁶⁾. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση τρίμηνης άσκησης στον ίδιο μυ ηλικιωμένων ανδρών και βρέθηκε ότι επηρεάστηκε η έκφραση 397 από τα 14500 γονίδια που ελέγχθηκαν. Τα περισσότερα από τα γονίδια που υπερ-εκφράστηκαν σχετίζονται με την ανταλλαγή ενέργειας, με την αποφωσφορύλιωση πρωτεϊνών και με βιοσυνθετικά μονοπάτια, ενώ αυτά που υπο-εκφράστηκαν σχετίζονται με καταβολισμό πρωτεϊνών και ριβοσωμάτων⁽⁴⁷⁾. Σε άλλη μελέτη νεαρά και ηλικιωμένα άτομα υποβλήθηκαν σε άσκηση αντιστάσεων για 26 εβδομάδες, 2 φορές την εβδομάδα. Συγκρίθηκε αρχικά η γονιδιακή έκφραση στον έξω πλατύ μηριαίο μυ στους μάρτυρες και βρέθηκε ότι οι κυριότερες διαφορές στην έκφραση ανάμεσα στα νεαρά και στα ηλικιωμένα άτομα αφορούσαν γονίδια του πυρηνικού DNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας καθώς και γονίδια του μιτοχονδριακού DNA που υπο-εκφράζονται με την πάροδο της ηλικίας. Μετά την άσκηση η σύγκριση έδειξε ότι το προφίλ γονιδιακής έκφρασης των ασκούμενων ηλικιωμένων ατόμων προσομοιάζει αυτό των νεαρών ατόμων⁽⁴⁸⁾. Επίσης βρέθηκαν διαφορές στη γονιδιακή έκφραση στο δικέφαλο βραχιόνιο μυ νεαρών ανδρών και γυναικών, μετά από καθημερινά αυξανόμενη άσκηση με αντιστάσεις για 12 εβδομάδες. Πριν την άσκηση, στους μύες των γυναικών τα επίπεδα mRNA των γονιδίων που εμπλέκονται στην οξείδωση των λιπιδίων και στις διεργασίες μεταγραφής - μετάφρασης ήταν υψηλότερα από εκείνα των ανδρών, ενώ μετά την άσκηση οι κυριότερες διαφορές αφορούσαν γονίδια που εμπλέκονται στη σηματοδότηση⁽⁴⁹⁾. Επιπλέον αναλύθηκε και η επίδραση 48ωρης ακινησίας στη γονιδιακή έκφραση στον πλατύ μηριαίο μυ του ανθρώπου. Υπερ-εκφράστηκαν γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος και τα γονίδια των μεταλλοθειονίνων, ενώ υπο-εκφράστηκαν γονίδια μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας και του κολλαγόνου 3 & 4⁽⁵⁰⁾. Αναλύθηκε η επίδραση της ηλικίας, του φύλου και της άσκησης με διατάσεις διάρκειας 9 εβδομάδων στη γονιδιακή έκφραση στον έξω πλατύ μηριαίο μυ του ανθρώπου. Τα επίπεδα της έκφρασης περίπου 200 γονιδίων ήταν διαφορετικά ανάμεσα σε άνδρες και γυναίκες, ενώ 50 γονίδια εκφράστηκαν διαφορετικά σε νεαρά και ηλικιωμένα άτομα. 69 γονίδια επηρεάστηκαν από την άσκηση με τον ίδιο

τρόπο σε όλα τα άτομα, ανεξαρτήτως ηλικίας και φύλου⁽⁵¹⁾. Σε μια άλλη μελέτη αναλύθηκε η γονιδιακή έκφραση στον πλατύ μηριαίο μυ ατόμων που έκαναν χρόνια άσκηση με διατάσεις, ατόμων που έκαναν άσκηση αντοχής και ατόμων που δεν ασκήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια EIFSJ, LDHB, LMO4, MDH1, SLC16A7 και UTRN⁽⁵²⁾. Ακόμη, κατά τη διάρκεια αποκατάστασης από ποδηλασία μέχρι εξάντλησης, υπερ-εκφράστηκαν στον πλατύ μηριαίο μυ του ανθρώπου γονίδια που σχετίζονται με μεταβολισμό και βιογένεση μιτοχονδρίων, απόκριση στο οξειδωτικό στρες, αντλίες μεταφοράς ιόντων, πρωτεόλυση, απόπτωση, κυτταρική διαφοροποίηση και μεταγραφική ενεργότητα⁽⁵³⁾. Μια άλλη μελέτη χρησιμοποίησε μικροσυστοιχίες ειδικές για τα γονίδια που εκφράζονται στους μύες και ανέλυσε την επίδραση άσκησης σε κυκλοεργόμετρο χαμηλής έντασης στη γονιδιακή έκφραση σε ανθρώπινο πλατύ μηριαίο μυ. Πολύ λίγα γονίδια υπερ-εκφράστηκαν, ενώ μετά από 24 ώρες τα γονίδια αυτά επανήλθαν στις βασικές τους τιμές⁽⁵⁴⁾. Σε γυναίκες αμέσως μετά την εμμηνόπαυση έγινε σύγκριση γονιδιακής έκφρασης στον πλατύ μηριαίο μυ ανάμεσα σε άτομα που ασκήθηκαν και σε άτομα που έλαβαν οιστρογόνα. Στα άτομα που έλαβαν οιστρογόνα υπερ-εκφράστηκαν γονίδια που σχετίζονται με τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, ενώ και στις 2 ομάδες υπερ-εκφράστηκαν γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό και την ανάπτυξη των μυών⁽⁵⁵⁾. Επίσης συγκρίθηκε η γονιδιακή έκφραση σε ανθρώπινους σκελετικούς μύες μετά από έκκεντρη άσκηση και μετά από χορήγηση 17-β οιστραδιόλης. Η άσκηση προκάλεσε υπερ-έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αναγέννηση των μυών, ενώ αυτά δεν επηρεάστηκαν από τη χορήγηση της 17-β οιστραδιόλης⁽⁵⁶⁾. Έγινε επίσης σύγκριση των μεταβολών στη γονιδιακή έκφραση στους σκελετικούς μύες ανδρών, γυναικών πριν την ωορρηξία (10^η μέρα κύκλου) και γυναικών σε ωχρινική φάση (25^η μέρα κύκλου) που πραγματοποίησαν αερόβια άσκηση. Στις τελευταίες υπερ-εκφράστηκαν γονίδια που σχετίζονται με αντιφλεγμονώδεις διεργασίες⁽⁵⁷⁾.

Εκτός από τον άνθρωπο παρόμοιες μελέτες έχουν γίνει και σε πειραματόζωα. Μετά από αερόβια άσκηση μελετήθηκε ο υποκνημίδιος μυς επιμύων και παρατηρήθηκαν αλλαγές στην έκφραση 52 γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό, την απόπτωση, τη μυϊκή σύσπαση, τη σηματοδότηση, την αναγέννηση των ιστών και τη φλεγμονή⁽⁵⁸⁾. Επίσης, σε ποντίκια έγινε σύγκριση γονιδιακής έκφρασης μεταξύ βραδειών – οξειδωτικών μυών (υποκνημίδιος) και ταχειών – γλυκολυτικών (μακρός εκτείνων τους δακτύλους) και σύγκριση γονιδιακής έκφρασης στον πελματιαίο μυ πριν και μετά από τρέξιμο. Βρέθηκαν 70 γονίδια που η έκφρασή τους ήταν διαφορετική ανάμεσα στον υποκνημίδιο και στο μακρό

εκτείνοντα τους δακτύλους, ενώ 15 γονίδια υπερ-εκφράστηκαν στον πελματιαίο μυ μετά το τρέξιμο⁽⁵⁹⁾. Επιπλέον, σκύλοι υποβλήθηκαν σε τρέξιμο για μεγάλη απόσταση και διαπιστώθηκε ότι υπερ-εκφράστηκαν γονίδια που σχετίζονται με τη μυϊκή αύξηση και την αναγέννηση, τον ενδιάμεσο μεταβολισμό και την ανοσολογική απόκριση⁽⁶⁰⁾. Στο μέσο γλουτιαίο μυ αλόγων έγινε σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης ανάμεσα στην κατάσταση ηρεμίας, αμέσως μετά την άσκηση σε κινούμενο διάδρομο και 4 ώρες μετά το πέρας της άσκησης. Αμέσως μετά την άσκηση διαπιστώθηκε ότι υπερ-εκφράστηκαν γονίδια που σχετίζονται με απόκριση στο στρες, μεταβολισμό και ενδοκυτταρική σηματοδότηση, ενώ 4 ώρες μετά υπερ-εκφράστηκαν γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό, την κυτταρική προσκόλληση, το μονοπάτι MAPK, το μονοπάτι της ινσουλίνης και με μονοπάτια που σχετίζονται με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2⁽⁶¹⁾. Τέλος, ποντίκια υποβλήθηκαν σε τρέξιμο για 3 και 12 ώρες, καθώς και για 4 εβδομάδες και συγκρίθηκε η γονιδιακή έκφραση στον πελματιαίο μυ ανάμεσα σ' αυτές τις καταστάσεις. Διαπιστώθηκαν διαφορές στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση, τον κυτταρικό κύκλο, την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση, τη μετάδοση σήματος και την απόπτωση⁽⁶²⁾.

3.2.2. Υπάρχουσες μελέτες για την επίδραση της άσκησης στη γονιδιακή έκφραση στους σκελετικούς μύες με την τεχνική *real-time PCR* και *real-time RT PCR*

Οι τεχνικές αυτές εστιάζονται στην ανάλυση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται ειδικοί εκκινητές για τα συγκεκριμένα γονίδια.

3.2.2.1. Μελέτη έκφρασης μεταφορέα γλυκόζης (GLUT-4), εξοκινάσης-2 (HXK2), γλυκογενίνης, υποδοχέα ινσουλίνης, IRS1, IRS2

Όπως προαναφέρθηκε, ένας από τους παράγοντες που ευθύνεται για την αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης από τους ασκούμενους μύες είναι η αύξηση του αριθμού των μεταφορέων γλυκόζης (GLUT-4) στην κυτταρική μεμβράνη. Η μυϊκή σύσπαση αλλά και η ινσουλίνη προκαλούν αύξηση της μετακίνησης των GLUT-4 προς την κυτταρική μεμβράνη^(63,64). Ο βιοχημικός μηχανισμός της επίδρασης της άσκησης σε αυτό το φαινόμενο δεν είναι απόλυτα γνωστός⁽⁶⁵⁾ αλλά πιστεύεται ότι είναι διαφορετικός από το μηχανισμό δράσης της ινσουλίνης⁽⁶⁶⁾.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου GLUT-4 μετά από άσκηση, πιθανολογώντας ότι σ' αυτό εμπλέκεται η αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης Ca^{2+} και το ενεργειακό φορτίο του κυττάρου⁽⁶⁷⁾. Ταυτόχρονα με την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου GLUT-4 έχει βρεθεί ότι η

άσκηση επάγει και άλλα γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό της γλυκόζης, όπως τα γονίδια της εξοκινάσης-2 και της γλυκογενίνης. Η εξοκινάση-2 καταλύει τη μετατροπή της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη κατά την πρώτη αντίδραση της γλυκόλυσης⁽⁶⁸⁾, ενώ η γλυκογενίνη αποτελεί τον εκκινητή της σύνθεσης του μυϊκού γλυκογόνου. Συγκεκριμένα στον άνθρωπο μετά από ποδηλασία 60 λεπτών, τα γονίδια GLUT-4, εξοκινάσης και γλυκογενίνης υπερ-εκφράστηκαν αμέσως μετά την άσκηση και παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα 3 ώρες μετά το πέρας αυτής⁽⁶⁹⁾. Υπήρξε επίσης μελέτη όπου βρέθηκε ότι η επαγωγή της έκφρασης του GLUT-4 και της εξοκινάσης-2 ως συνέπεια άσκησης στον άνθρωπο αναστέλλεται αν, αμέσως μετά την άσκηση, χορηγηθεί τροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες⁽⁷⁰⁾. Στον αγκωνιαίο μυ επίμυος βρέθηκε ότι, μετά από εξάωρη κολύμβηση για μία έως 5 μέρες, η έκφραση του GLUT-4 και του υποδοχέα ινσουλίνης διπλασιάστηκε την πρώτη μέρα, χωρίς περαιτέρω μεταβολή τις επόμενες μέρες. Επηρεάστηκε επίσης η έκφραση των υποστρωμάτων 1 & 2 του υποδοχέα ινσουλίνης (IRS1 & IRS2), η οποία αυξήθηκε κατά 2,6 φορές. Φαίνεται λοιπόν ότι η άσκηση επηρεάζει αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης που σχετίζεται με το μεταβολισμό της γλυκόζης⁽⁷¹⁾. Τέλος έχει αναλυθεί η επίδραση κολύμβησης διάρκειας 8 εβδομάδων στα επίπεδα mRNA του GLUT-4 σε σκελετικούς μύες επιμύων που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Παρατηρήθηκε σημαντική υπερέκφραση του γονιδίου GLUT-4⁽⁷²⁾. Όλες οι παραπάνω προσαρμογές στοχεύουν στην ικανοποίηση των αυξημένων απαιτήσεων των σκελετικών μυών σε γλυκόζη κατά την άσκηση.

3.2.2.2. Μελέτη έκφρασης της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από το AMP (AMP-activated protein kinase, AMPK)

Η AMPK είναι μια ετεροτριμερής πρωτεΐνη που περιλαμβάνει μια καταλυτική (α) υπομονάδα και δυο ρυθμιστικές (β, γ) υπομονάδες. Στα θηλαστικά υπάρχουν διάφορες ισομορφές που περιέχουν 2 διαφορετικές α υπομονάδες (α1, α2), 2 διαφορετικές β υπομονάδες (β1, β2) και 3 διαφορετικές γ υπομονάδες (γ1, γ2, γ3). Η AMPK εκφράζεται σε διάφορα όργανα, όπως το ήπαρ, ο εγκέφαλος και οι σκελετικοί μύες όπου εμπλέκεται στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων⁽⁷³⁾. Στους σκελετικούς μύες υπερέχει η ισομορφή α2, β2, γ1. Η AMPK ενεργοποιείται κατά τη μυϊκή σύσπαση, ως συνέπεια της αύξησης του λόγου AMP/ATP, αφού το AMP είναι αλλοστερικός ενεργοποιητής της⁽⁷⁴⁾. Η ενεργοποιημένη AMPK μετακινείται στον πυρήνα όπου με τη σειρά της ενεργοποιεί 2 μεταγραφικούς παράγοντες: τον παράγοντα ενίσχυσης των μυοκυττάρων (myocyte enhancer factor 2, MEF2) που επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου GLUT-4

και τους πυρηνικούς αναπνευστικούς παράγοντες 1 & 2 (nuclear respiratory factor 1 & 2, NRF 1 & NRF 2) που ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν τις περισσότερες πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας^(75,76).

Έχουν γίνει πολλές μελέτες όπου αναλύεται η επίδραση της άσκησης στην έκφραση και στη δραστικότητα της AMPK σε σκελετικούς μύες θηλαστικών. Σε μια από αυτές, αναλύθηκε η δραστικότητα των α1 και α2 υπομονάδων της AMPK στον έξω πλατύ μηριαίο μυ του ανθρώπου, μετά από γρήγορη ποδηλασία για 20 και 60 λεπτά, καθώς και 30 λεπτά μετά το πέρας της άσκησης. Η δραστικότητα της α2 υπομονάδας αυξήθηκε σημαντικά, ενώ αυτή της α1 δε μεταβλήθηκε. Αυτό σημαίνει ότι η υπομονάδα α2 είναι αυτή που κυρίως εμπλέκεται στις μεταβολικές προσαρμογές των σκελετικών μυών κατά την άσκηση⁽⁷⁷⁾. Επίσης αναλύθηκε η επίδραση ποδηλασίας διάρκειας μίας ώρας στη μεταγραφή και στη δραστικότητα της α2 υπομονάδας της AMPK σε ανθρώπινο έξω πλατύ μηριαίο μυ. Τα επίπεδα του mRNA δε μεταβλήθηκαν, όπως επίσης και η συνολική ποσότητα της α2 υπομονάδας. Ωστόσο, αυξήθηκαν σημαντικά τα επίπεδα της ενδοπυρηνικής α2 υπομονάδας, πράγμα που σημαίνει ότι αυτή μετακινήθηκε από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα προκειμένου να επιτελέσει τη λειτουργία της⁽⁷⁸⁾. Μια άλλη μελέτη ασχολήθηκε με την επίδραση της άσκησης στην έκφραση και τη δραστικότητα των υπομονάδων α1 και α2 της AMPK μετά από γρήγορη ποδηλασία για 20 και 45 λεπτά, καθώς και 30 λεπτά μετά το πέρας της άσκησης σε έξω πλατύ μηριαίο μυ ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και υγιών ανθρώπων. Βρέθηκε ότι δεν υπήρξε καμία μεταβολή στη δραστικότητα της α1 υπομονάδας, ενώ υπήρξε μια ελαφριά αύξηση στην έκφρασή της και στις δυο ομάδες. Αντίθετα, τα επίπεδα mRNA της υπομονάδας α2 αυξήθηκαν και στις δυο ομάδες κατά περίπου 65%, όπως και τα επίπεδα δραστικότητας της υπομονάδας α2. Το κύριο εύρημα αυτής της μελέτης ήταν ότι και στα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 η άσκηση λειτούργησε φυσιολογικά, αυξάνοντας τα επίπεδα της α2 υπομονάδας της AMPK⁽⁷⁹⁾. Συγκρίθηκαν ακόμη οι επιδράσεις ποδηλασίας διάρκειας μίας ώρας στην έκφραση των γονιδίων AMPK και GLUT-4 στους σκελετικούς μύες υγιών ανθρώπων και ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Τα επίπεδα του mRNA του GLUT-4 και της υπομονάδας α2 της AMPK αυξήθηκαν εξίσου στα ασθενή και υγιή άτομα⁽⁸⁰⁾. Τα παραπάνω ευρήματα είναι πολύ σημαντικά, δεδομένου ότι η AMPK, μέσω της επαγωγής της έκφρασης του GLUT-4 σε σκελετικούς μύες, αυξάνει την είσοδο της γλυκόζης στα μυϊκά κύτταρα με ένα μονοπάτι ανεξάρτητο από τη δράση της ινσουλίνης^(79,80).

3.2.2.3. Μελέτη έκφρασης της τρανσλοκάσης των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Translocase, FAT), τρανσφοράσης της καρνιτίνης (Carnitine Palmytoyltransferase 1, CPT1), λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (lipoprotein lipase, LPL)

Μία μελέτη στον άνθρωπο έχει δείξει ότι ποδηλασία 60 λεπτών την ημέρα για 9 μέρες προκάλεσε υπερέκφραση των γονιδίων FAT και CPT1 στον έξω πλατύ μηριαίο μυ, με αποτέλεσμα την αύξηση της εισόδου λιπαρών οξέων στα μυϊκά κύτταρα και στα μιτοχόνδρια και την αύξηση του ρυθμού της β-οξειδωσης⁽⁸¹⁾. Επίσης μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων σε ανθρώπινο έξω πλατύ μηριαίο μυ μετά από πενήνήμερη άσκηση μεγάλης αντοχής. Παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση των γονιδίων της LPL κατά 3,9 φορές και του PPAR-γ κατά 1,7 φορές⁽⁸²⁾. Ανάλογη μελέτη έχει γίνει και σε επίμυες, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε πρόγραμμα κολύμβησης διάρκειας 8 εβδομάδων με συνεχώς αυξανόμενα βάρη προσδεμένα στην ουρά τους. 48 ώρες μετά το πέρας της άσκησης διαπιστώθηκε υπερ-έκφραση των επιπέδων της LPL στο μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μυ αλλά υπο-έκφραση στον υποκνημίδιο μυ⁽⁸³⁾.

3.2.2.4. Μελέτη έκφρασης των συν-ενεργοποιητών του PPAR-γ (PPAR-γ coactivator-1, PGC-1)

Οι PGC-1 είναι μια ομάδα πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τον PGC-1α, τον PGC-1β και τον PRC. Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται στη ρύθμιση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων^(84,85,86,87). Ο PGC-1α σχετίζεται με τη διατήρηση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και του περιεχομένου τους στους σκελετικούς μύες των θηλαστικών^(86,88,89). Συγκεκριμένα, ο PGC-1α αλληλεπιδρά με τους πυρηνικούς αναπνευστικούς παράγοντες 1 και 2 (nuclear respiratory factor 1 & 2, NRF-1 & NRF-2), οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν τις περισσότερες πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας. Επίσης, ο PGC-1α επάγει την έκφραση του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα A (mitochondrial transcription factor A, Tfam), ο οποίος στη συνέχεια ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA^(90,91). Επιπλέον, ο PGC-1α ρυθμίζει τη λειτουργία του υποδοχέα που σχετίζεται με οιστρογόνα (estrogen-related receptor-α, ERRα), ο οποίος αλληλεπιδρά με τους υποκινητές ορισμένων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας^(92,93,94). Τέλος, ο PGC-1α ενεργοποιεί τον PPAR-δ, ο οποίος επάγει την έκφραση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών^(95,96).

Έχει δειχθεί ότι ο PGC-1α φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη p38 (mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)^(97,98). Η άσκηση έχει σαν αποτέλεσμα την γρήγορη ενεργοποίηση της p38 MAPK^(99,100), η οποία προωθεί και την ενεργοποίηση του PGC-1α, αλλά και την επαγωγή της έκφρασής του

φωσφορυλιώνοντας τον υποκινητή του γονιδίου του PGC-1 α^(101,102). Σε αρκετές μελέτες έχει βρεθεί ότι διάφοροι τύποι άσκησης προκαλούν γρήγορη αύξηση στα επίπεδα του mRNA του PGC-1α στους σκελετικούς μύες σε άνθρωπο και σε πειραματόζωα. Συγκεκριμένα, κολύμβηση μικρής διάρκειας για 5 μέρες προκάλεσε το διπλασιασμό των επιπέδων του mRNA του PGC-1 α στους σκελετικούς μύες επιμύων⁽¹⁰³⁾. Επίσης, στον αγκωνιαίο μυ επιμύων τα επίπεδα του mRNA του PGC-1 α αυξήθηκαν κατά 154% και 163%, μετά από κολύμβηση 2 ωρών την ημέρα για 3 και 7 ημέρες αντίστοιχα⁽¹⁰⁴⁾. Στον ίδιο μυ οχταπλασιάστηκαν τα επίπεδα του mRNA του PGC-1α μετά από κολύμβηση χαμηλής έντασης διάρκειας 6 ωρών⁽¹⁰⁵⁾, ενώ στο γαστροκνήμιο μυ επιμύων μετά από τρέξιμο σε τροχό για 45 λεπτά, η έκφραση του γονιδίου του PGC-1 α αυξήθηκε κατά 3,5 φορές⁽¹⁰⁶⁾. Τέλος, σε ανθρώπινο έξω πλατύ μηριαίο μυ, ασκήσεις διατάσεων επί 4 εβδομάδες προκάλεσαν την αύξηση των επιπέδων του mRNA του PGC-1 α κατά 7 ως 10 φορές, με μέγιστη τιμή 2 ώρες μετά το πέρας της άσκησης⁽¹⁰⁷⁾.

3.2.2.5. Μελέτη έκφρασης του παράγοντα που ενεργοποιείται από την υποξία (Hypoxia Inducible Factor1, HIF-1) και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)

Ο HIF-1 είναι μεταγραφικός παράγοντας και αποτελεί το σπουδαιότερο ρυθμιστή της ομοιόστασης του οξυγόνου. Παρουσία οξυγόνου ο HIF-1 αποδομείται από πρωτεάσες, ενώ σε συνθήκες υποξίας ενεργοποιεί γονίδια απαραίτητα για την προσαρμογή του κυττάρου σε αυτές. Συγκεκριμένα, σε συνθήκες υποξίας, ο HIF-1 εισέρχεται στον πυρήνα, όπου συνδέεται στο στοιχείο που ανταποκρίνεται στην υποξία (hypoxia responsive element, HRE), μια αλληλουχία που βρίσκεται στους υποκινητές πολλών γονιδίων, μεταξύ των οποίων και το γονίδιο VEGF. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του HIF-1 και του HRE αυξάνει την μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου VEGF⁽¹⁰⁸⁾. Για την κυκλοφορία της πρωτεΐνης VEGF μέσα στο κύτταρο και κυρίως για τη μετακίνησή της μεταξύ ενδοπλασματικού δικτύου και συσκευής Golgi είναι απαραίτητη η σύνδεσή της με την πρωτεΐνη που ρυθμίζεται από οξυγόνο (oxygen-regulated protein-150, ORP-150)⁽¹⁰⁹⁾. Η δραστηριότητα του VEGF εξαρτάται επίσης από την παρουσία δύο ειδικών υποδοχέων, των Flt-1 και Flk-1/KDR. Η αλληλουχία HRE βρίσκεται επίσης στους υποκινητές των γονιδίων ORP-150 και Flt-1⁽¹¹⁰⁾, πράγμα που σημαίνει ότι η υποξία μέσω του HIF-1 επάγει την μεταγραφή όλων αυτών των γονιδίων. Ο VEGF παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση που συμβαίνει κατά τη διάρκεια φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων, όπως η εμβρυονική ανάπτυξη, η επούλωση των τραυμάτων, η ισχαιμία και η καρκινογένεση. Ο VEGF προκαλεί

αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και ασκεί μιτογόνο δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων^(111,112).

Πολλές μελέτες έχουν αναλύσει την επίδραση της άσκησης στα επίπεδα του mRNA των γονιδίων HIF-1 και VEGF στον άνθρωπο και στα πειραματόζωα. Σε σκελετικούς μύες επιμύων, άσκηση αντοχής προκάλεσε υπερέκφραση του VEGF⁽¹¹³⁾, ενώ άσκηση σε τροχό αύξησε 3-6 φορές την έκφραση των γονιδίων VEGF, Flt-1 και Flk-1/KDR⁽¹¹⁴⁾. Επίσης έχουν αναλυθεί και οι διαφορές στην έκφραση του VEGF ανάμεσα στα διάφορα είδη κυττάρων των μυών (τύποι μυϊκών ινών, ενδοθηλιακά) μετά από άσκηση. Μετά από σύντομη άσκηση σε τροχό ελάχιστες διαφορές βρέθηκαν χρησιμοποιώντας υβριδοποίηση *in situ* στον γαστροκνήμιο μυ επιμύων⁽¹¹⁵⁾. Αντίθετα, με τη μέθοδο *real-time* PCR, και εξετάζοντας όχι ολόκληρο τον πελματιαίο μυ επιμύων, αλλά μεμονωμένες μυϊκές ίνες βρέθηκε ότι, μετά από τρέξιμο διάρκειας 90 λεπτών με μικρά διαλείμματα σε κλίση 10%, υπήρξε σημαντική αύξηση στα επίπεδα του mRNA του VEGF στις γλυκολυτικές (ταχείες) μυϊκές ίνες⁽¹⁰⁸⁾. Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε αύξηση στην έκφραση του γονιδίου Flt-1 κατά 108% στον πελματιαίο μυ μετά από άσκηση σε τροχό, καθώς επίσης και του γονιδίου ORP-150 κατά 92%, ενώ δεν υπήρξε καμία μεταβολή στην έκφραση του HIF-1.

Μια μελέτη σε σκελετικούς μύες ανθρώπου μετά από άσκηση αντοχής, έδειξε ότι η έκφραση των γονιδίων VEGF και HIF-1 αυξήθηκε ελάχιστα⁽¹¹⁶⁾. Επίσης σε μια άλλη μελέτη, μετά από έντονη άσκηση διάρκειας 45 λεπτών, δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα επίπεδα του mRNA του HIF-1 στον έξω πλατύ μηριαίο μυ, ενώ αντίθετα αυξήθηκε σημαντικά η συγκέντρωση της πρωτεΐνης HIF-1. Βρέθηκε επίσης ότι η ενδοπυρηνική συγκέντρωση της HIF-1 πριν την έναρξη της άσκησης ήταν πολύ μικρή, ενώ αντίθετα 30 λεπτά μετά την έναρξη της άσκησης αυξήθηκε σημαντικά. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η άσκηση δεν επιδρά στη μεταγραφική ικανότητα του γονιδίου HIF-1, αλλά στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης και στη μετακίνησή της στον πυρήνα. Στην ίδια μελέτη, διαπιστώθηκε υπερέκφραση του γονιδίου VEGF⁽¹¹⁷⁾.

3.2.2.6. Μελέτη έκφρασης της ενδοθηλιακής συνθάσης του οξειδίου του αζώτου (endothelial Nitric Oxide Synthase, eNOS ή NOS3).

Η ενδοθηλιακή συνθάση του οξειδίου του αζώτου είναι μια από τις τρεις ισομορφές της συνθάσης του οξειδίου του αζώτου. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων η eNOS καταλύει τη μετατροπή του αμινοξέος L- αργινίνη σε L- κιτρουλλίνη και στην αέρια ελεύθερη ρίζα οξείδιο του αζώτου (NO). Το NO διαχέεται στους λείους μύες των αιμοφόρων αγγείων και προκαλεί τη χαλάρωσή τους, με αποτέλεσμα την

αγγειοδιαστολή⁽¹¹⁸⁾. Μελέτες σε επίμυες έδειξαν ότι μετά από άσκηση σε τροχό αυξήθηκε η έκφραση του γονιδίου eNOS στο γαστροκνήμιο και στον υποκνημίδιο μυ⁽¹¹⁹⁾. Επίσης, η εξαντλητική άσκηση προκάλεσε υπερέκφραση του γονιδίου eNOS στο γαστροκνήμιο μυ ποντικών⁽¹²⁰⁾.

3.2.2.7. Μελέτη έκφρασης του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα 1 (Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1)

Ο IGF-1, γνωστός και σαν σωματομεδίνη C, είναι μια πρωτεϊνική ορμόνη που έχει παρόμοια μοριακή δομή με την ινσουλίνη. Παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη κατά την παιδική ηλικία και συνεχίζει να έχει αναβολικά αποτελέσματα στους ενήλικες⁽¹⁾. Ο IGF-1 παράγεται κυρίως στο ήπαρ μετά από διέγερση από την αυξητική ορμόνη. Δρα σαν ενδοκρινής ορμόνη μετά από τη σύνδεσή του στον υποδοχέα του που βρίσκεται σε πολλούς τύπους κυττάρων και ιστών, ιδιαίτερα σε σκελετικούς μύες, οστά, χόνδρους, νεφρούς, νεύρα, κύτταρα του αιμοποιητικού ιστού και πνεύμονες. Ο IGF-1 συνδέεται επίσης στον υποδοχέα της ινσουλίνης με πολύ μικρότερη ωστόσο συγγένεια⁽⁷⁾. Εκτός από το ήπαρ, ο IGF-1 παράγεται και στους σκελετικούς μύες. Επιπλέον, από το γονίδιο του IGF-1 με εναλλακτικό μάτισμα προκύπτει ο μηχανοαυξητικός παράγοντας (Mechano-Growth Factor, MGF). Ο MGF διαθέτει αυτοκρινικές και παρακρινικές λειτουργίες, δηλαδή μπορεί να δράσει είτε στα κύτταρα που τον συνέθεσαν είτε σε γειτονικά κύτταρα⁽¹²¹⁾.

Η δράση των MGF και IGF-1 είναι μιτογόνος. Η σύνδεσή τους στον υποδοχέα τους, τον IGF-1R (υποδοχέας με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης), προκαλεί ενεργοποίηση του υποδοχέα με αυτοφωσφορυλίωση και θέτει σε λειτουργία έναν καταρράκτη αλληλεπιδράσεων που οδηγούν στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB). Η PKB με τη σειρά της απενεργοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος επάγει την έκφραση ενός αναστολέα του κυτταρικού κύκλου. Σαν αποτέλεσμα επάγεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων - δορυφόρων. Ένα από τα θυγατρικά κύτταρα συγχωνεύεται με τη μητρική ίνα, προσφέροντας έτσι ένα νέο πυρήνα και περισσότερο DNA για τη σύνθεση mRNA και πρωτεϊνών. Αυτό με τη σειρά του αυξάνει τη διατομή της μυϊκής ίνας, με συνέπεια τη μυϊκή υπερτροφία. Το βασικότερο ερέθισμα για την παραγωγή του MGF στους σκελετικούς μύες είναι η έντονη άσκηση με αντιστάσεις, η διάταση ή η ηλεκτρική διέγερση⁽¹²¹⁾.

Πολλές μελέτες έχουν αναλύσει τη σχέση διαφόρων μορφών άσκησης με την έκφραση του IGF-1 και του MGF στους σκελετικούς μύες, αλλά τα αποτελέσματα δε συμφωνούν μεταξύ τους. Η χρόνια άσκηση (12 εβδομάδες) επιμύων με ελεύθερη πρόσβαση σε τροχό δεν επηρέασε σημαντικά την έκφραση του IGF-1 στον γαστροκνήμιο, τον έξω πλατύ μηριαίο και τον υποκνημίδιο μυ⁽¹²²⁾. Μια άλλη μελέτη

έδειξε επίσης ότι η έκφραση του IGF-1 δεν επηρεάστηκε από άσκηση με διατάσεις για 14 μέρες στον υποκνημίδιο μυ σε επίμυες⁽¹²³⁾. Αντίθετα έχει δειχτεί ότι ορισμένα είδη άσκησης επάγουν την έκφραση του IGF-1. Ενδεικτικά στον άνθρωπο, μετά από συνδυασμό ασκήσεων με αντιστάσεις, προκλήθηκε αύξηση της έκφρασης του IGF-1 στον έξω πλατύ μηριαίο μυ^(124,125). Επίσης στον άνθρωπο, έκκεντρη ποδηλασία μίας ώρας προκάλεσε σημαντική αύξηση των επιπέδων του mRNA του MGF, σε αντίθεση με αυτών του IGF-1, που παρέμεινε αμετάβλητο. Αυτό σημαίνει ότι η έκφραση των δυο αυτών παραγόντων ρυθμίζεται με διαφορετικούς τρόπους⁽¹²⁶⁾.

3.2.2.8. Μελέτη έκφρασης μυογενίνης, MyoD και μιοστατίνης

Η μυογενίνη και ο MyoD είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούν γονίδια που συμμετέχουν στη μυογένεση και στη διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων. Αυτό γίνεται προκαλώντας την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων - δορυφόρων και το γρήγορο πολλαπλασιασμό τους⁽¹²⁷⁾. Έχει δειχτεί ότι σύντομη άσκηση με υψηλές αντιστάσεις στον άνθρωπο προκαλεί αύξηση στην έκφραση της μυογενίνης και του MyoD στους σκελετικούς μύες, με παράλληλη αύξηση στην έκφραση της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης⁽¹²⁸⁾.

Η μιοστατίνη (γνωστή και σαν αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης 8) είναι πρωτεΐνη που παράγεται στα κύτταρα των σκελετικών μυών και αναστέλλει τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των μυών συνδεόμενη στον υποδοχέα της (ακτιβίνη τύπου 2, activin II). Η άσκηση με αντιστάσεις για 6 και 12 εβδομάδες οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της μιοστατίνης, αλλά μείωση της έκφρασης του γονιδίου του υποδοχέα της και τελικώς δεν υπήρξε καμία επίδραση στη μάζα των σκελετικών μυών ανθρώπου⁽¹²⁹⁾.

3.2.2.9. Μελέτη έκφρασης κυτοκινών και πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι σηματοδότησης μέσω κυτοκινών (SOCS2, COX2, SAA1, SAA2).

Η κυκλοξυγενάση 2 (COX2) ανήκει στην οικογένεια των κυκλοξυγενασών οι οποίες είναι ένζυμα που καταλύουν το σχηματισμό των προστανοειδών (προσταγλανδίνες, προστακυκλίνη, θρομβοξανία), ουσίες που συμμετέχουν στην εμφάνιση των συμπτωμάτων φλεγμονής⁽¹³⁰⁾. Οι κυτοκίνες είναι πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα λευκά αιμοσφαίρια και άλλα κύτταρα ως απάντηση σε συγκεκριμένα ερεθίσματα. Γνωστές κυτοκίνες είναι οι ιντερλευκίνες (IL 1-25), οι ιντερφερόνες (INF), η ερυθροποιητίνη, η αυξητική ορμόνη και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor, TNF)⁽⁷⁾. Οι κυτοκίνες ρυθμίζουν την ένταση και τη διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης διεγείροντας ή αναστέλλοντας την ενεργοποίηση, πολλαπλασιασμό και/ή διαφοροποίηση διαφόρων κυττάρων και ρυθμίζοντας την έκκριση αντισωμάτων ή άλλων κυτοκινών. Πολλές από τις

κυτοκίνες χαρακτηρίζονται ως αυτοκρινείς ορμόνες, δηλαδή δρουν τοπικά και ο στόχος τους είναι κύτταρα του ίδιου ή παρόμοιου τύπου με τα κύτταρα που παράγουν τις κυτοκίνες. Επίσης βοηθούν στην αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων⁽⁷⁾. Στους σκελετικούς μύες εκφράζονται οι κυτοκίνες TNF-α, IL-6, IL-8, IL-15 και IL-18⁽¹³¹⁾. Η ιντερλευκίνη 15 (IL-15) είναι μια κυτοκίνη που εκφράζεται στους σκελετικούς μύες και λειτουργεί ως αυξητικός παράγοντας⁽¹³²⁾. Η IL-15 διεγείρει τη διαφοροποίηση των μυών σε συνθήκες όπου αναστέλλονται οι ισχυρές αναβολικές επιδράσεις του IGF-1⁽¹³³⁾. Η δράση της IL-15 δε συνίσταται στη διέγερση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων - δορυφόρων όπως ο IGF-1, αλλά στη διέγερση της πρωτεϊνοσύνθεσης και την αναστολή της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών στα ήδη διαφοροποιημένα μυϊκά κύτταρα⁽¹³⁴⁾.

Μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν ότι τα επίπεδα του mRNA της IL-15 στους σκελετικούς μύες δεν άλλαξαν αμέσως μετά από τρέξιμο διάρκειας 3 ωρών⁽¹³⁵⁾, ούτε αμέσως μετά από αγώνα άρσης βαρών διάρκειας 2 ωρών⁽¹³⁶⁾. Ωστόσο, σε μια άλλη μελέτη, τα επίπεδα της IL-15 του πλάσματος αυξήθηκαν αμέσως μετά το πέρας έντονης άσκησης με αντιστάσεις⁽¹³⁷⁾. Αντίθετα, έχει βρεθεί ότι η άσκηση με αντιστάσεις στον άνθρωπο προκαλεί αύξηση στα επίπεδα του mRNA της IL-15 στους μύες τρικέφαλο μηριαίο, έξω πλατύ μηριαίο και υποκνημίδιο, 24 ώρες μετά το πέρας αυτής, ενώ 48 ώρες μετά τα επίπεδα αυτά επανέρχονται στα αρχικά. Μάλιστα, τα επίπεδα της έκφρασης ήταν διαφορετικά ανάμεσα στους τρεις αυτούς μύες, πιθανότατα λόγω της διαφορετικής σύστασής τους (διαφορετικά ποσοστά ταχειών - βραδειών μυϊκών ινών). Τα επίπεδα όμως της πρωτεΐνης IL-15 στους μύες αυτούς και στο πλάσμα δε μεταβλήθηκαν στα ίδια χρονικά διαστήματα⁽¹³⁸⁾. Πιθανολογείται ότι η IL-15 βρίσκεται στα μυϊκά κύτταρα σε μια μεταφραστικά ανενεργό μορφή η οποία αποθηκεύεται στα κύτταρα για μετέπειτα μετάφραση⁽¹³⁹⁾. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την εμφάνιση φλεγμονής στον έξω πλατύ μηριαίο μυ μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών μετά από άσκηση χαμηλών αντιστάσεων. Υπερ-εκφράστηκαν τα γονίδια TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, SOCS2, COX2, SAA1, SAA2, ενώ δε μεταβλήθηκε η έκφραση των IL-2, IL-5, IL-10, IL-12⁽¹⁴⁰⁾. Επίσης παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης της IL-8 στον έξω πλατύ μηριαίο μυ ανθρώπου μετά από ποδηλασία και διατάσεις αυξήθηκαν σημαντικά. Επειδή παρόμοια αύξηση δεν παρατηρήθηκε στην IL-8 του πλάσματος, πιθανολογείται ότι η IL-8 παίζει τοπικό ρόλο στους σκελετικούς μύες⁽¹⁴¹⁾. Σε άλλη μελέτη διαπιστώθηκε η υπερ-έκφραση των γονιδίων SOCS-3 και IL-6 στον υποκνημίδιο και πελματιαίο μυ επιμύων μετά από άσκηση σε τροχό για 12 εβδομάδες⁽¹⁴²⁾.

3.2.2.10. Μελέτη έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων

Πολλές έρευνες που έγιναν τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η άσκηση, ιδίως η έντονη, σχετίζεται με αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών και συνεπώς με την εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Η πρώτη μελέτη που έδειξε αυτή τη σχέση μεταξύ άσκησης και οξειδωτικού στρες πραγματοποιήθηκε το 1982⁽¹⁴³⁾. Στη συνέχεια υπήρξαν πολλές άλλες μελέτες, που συσχέτισαν την άσκηση με το οξειδωτικό στρες^(144,145,146,147,148,149,150). Παράλληλα όμως, η άσκηση επάγει την ανάπτυξη αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Έχει βρεθεί ότι στο γαστροκνήμιο μυ επιμύων, μετά από εξαντλητική άσκηση, αυξήθηκε η δραστηριότητα των πρωτεϊνών που αποτελούν το μονοπάτι των MAP (mitogen-activated protein) κινασών p38, ERK1 και ERK2 με αποτέλεσμα των ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κappa B και την υπερέκφραση του γονιδίου SOD⁽¹²⁰⁾. Σε μία άλλη μελέτη επίμυες ασκήθηκαν σε τροχό επί 2 ώρες την ημέρα, 5 ημέρες την εβδομάδα για 10 εβδομάδες. Παρατηρήθηκε ότι υπερ-εκφράστηκε το γονίδιο της Cu-Zn SOD, ενώ τα επίπεδα της έκφρασης των Mn-SOD και GPX δε μεταβλήθηκαν, παρόλο που αυξήθηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών Mn-SOD και GPX κατά 62-66%. Φαίνεται λοιπόν ότι η επαγωγή της σύνθεσης των Mn-SOD και GPX ρυθμίζεται σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο⁽¹⁵¹⁾. Σε πρόσφατη μελέτη αναλύθηκε η επίδραση της χορήγησης φυσικών αντιοξειδωτικών ουσιών (βιταμίνη C, 1000mg/ημέρα και βιταμίνη E, 400 IU/ημέρα) σε ανθρώπους κατά τη διάρκεια άσκησης 4 εβδομάδων. Βρέθηκε ότι στους σκελετικούς μύες των μαρτύρων (στους οποίους δε χορηγήθηκαν αντιοξειδωτικά) υπερ-εκφράστηκαν τα γονίδια των ενζύμων SOD, CAT και GPX, καθώς επίσης και τα γονίδια των PGC1α, PGC1β και PPARγ. Αντίθετα, στους ανθρώπους στους οποίους χορηγήθηκαν αντιοξειδωτικά, δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων⁽¹⁵²⁾.

3.2.2.11. Μελέτη έκφρασης των μιτοχονδριακών αποσυνδεδεμένων πρωτεϊνών (uncoupling proteins, UCPs)

Οι UCPs είναι μέλη μιας μεγάλης οικογένειας πρωτεϊνών μεταφορέων ανιόντων. Οι UCPs διευκολύνουν τη μεταφορά των ανιόντων από την εσωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων προς την εξωτερική και την, κατ' αντίθετη φορά, μεταφορά των πρωτονίων. Η ισομορφή UCP3 εκφράζεται στους σκελετικούς μύες όπου πιστεύεται ότι μειώνει την παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες⁽¹⁵³⁾.

Λίγες μελέτες έχουν γίνει σχετικά με την επίδραση της άσκησης στην έκφραση της UCP3 στους σκελετικούς μύες. Στο γαστροκνήμιο μυ επιμύων, κολύμβηση για 2 εβδομάδες προκάλεσε την αύξηση των επιπέδων του mRNA της

UCP3 κατά 14 έως 18 φορές 3 ώρες μετά το πέρας της άσκησης, ενώ 22 ώρες μετά τα επίπεδα του mRNA επανήλθαν στις τιμές ηρεμίας. Επίσης, αύξηση κατά 7 φορές παρατηρήθηκε στα επίπεδα του mRNA της UCP3 στο μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μυ επιμύων μετά από γρήγορο τρέξιμο σε τροχό για 30 λεπτά⁽¹⁵⁴⁾. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη σε επίμυες, αναλύθηκαν τα επίπεδα του mRNA της UCP3 στους σκελετικούς μύες κατά τη διάρκεια και μετά το πέρας παρατεταμένης άσκησης. Στα πρώτα 45 λεπτά της άσκησης η έκφραση του γονιδίου της UCP3 επταπλασιάστηκε και παρέμεινε σε αυτά τα επίπεδα και στα επόμενα 150 λεπτά. 24 ώρες μετά το πέρας της άσκησης τα επίπεδα της έκφρασης επανήλθαν σταδιακά σε τιμές ηρεμίας. Παράλληλα, διαπιστώθηκε ότι, παρόλο που η συγκέντρωση των ROS παρέμενε κατά τη διάρκεια της άσκησης σε υψηλά επίπεδα, 150 λεπτά μετά την έναρξή της παρουσίασε μια δραματική πτώση. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η δράση της πρωτεΐνης UCP3 έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή ROS⁽¹⁵⁵⁾. Τέλος, μια μελέτη στον άνθρωπο έδειξε ότι ποδηλασία με συνεχώς αυξανόμενη ένταση προκάλεσε σημαντική αύξηση στην έκφραση του γονιδίου UCP3 στον έξω πλατύ μηριαίο μυ⁽¹⁵⁶⁾.

3.2.2.12. Μελέτη έκφρασης της ATPάσης Ca²⁺ (sarcoendoplasmic reticulum calcium transport ATPase, SERCA) και της αντλίας Na⁺ - K⁺

Η ATPάση Ca²⁺ είναι μια αντλία που διατηρεί τη συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου στο σαρκοπλασματικό δίκτυο σε υψηλά επίπεδα, έτσι ώστε αυτά να είναι διαθέσιμα κατά τη μυϊκή σύσπαση. Η αντλία SERCA συναντάται σε περισσότερες από 10 ισομορφές, οι οποίες προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα 3 γονιδίων. Η έκφραση και η δραστηριότητα της αντλίας SERCA μειώνονται κατά το γήρας και σε περιπτώσεις καρδιακής ανεπάρκειας⁽¹⁵⁷⁾. Στο γαστροκνήμιο και υποκνημίδιο μυ επιμύων, μετά από άσκηση χαμηλής αλλά και υψηλής έντασης, υπερ-εκφράστηκε το γονίδιο της ισομορφής SERCA2α, ενώ δεν υπήρξε καμία μεταβολή στην έκφραση της SERCA1α⁽¹⁵⁸⁾.

Η αντλία Na⁺-K⁺ αποτελεί το κυριότερο σύστημα ενεργητικής μεταφοράς. Είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης μέσω του οποίου πετυχαίνεται άντληση Na⁺-K⁺ σε αντίθετες κατευθύνσεις με κατανάλωση ενέργειας. Αυτό δημιουργεί ιοντικές βαθμιδώσεις οι οποίες, μεταξύ άλλων, συμμετέχουν στη διατήρηση του δυναμικού της μεμβράνης του κυττάρου. Η μετάδοση των νευρικών ώσεων στους σκελετικούς μύες με τη μορφή του δυναμικού δράσης οφείλεται στη στιγμιαία εκπόλωση του δυναμικού της μεμβράνης⁽⁵⁾. Η αντλία αποτελείται από την καταλυτική υπομονάδα α, την υπομονάδα β που συμμετέχει στη σταθερότητα του πρωτεϊνικού συμπλόκου και την υπομονάδα γ που δεν εκφράζεται σε όλους τους

τύπους κυττάρων και διαφοροποιεί τη συγγένεια της αντλίας με το ATP και τα Na^+ , K^+ ⁽¹⁵⁹⁾. Σε μελέτες που έχουν γίνει για την επίδραση της άσκησης στα επίπεδα έκφρασης της αντλίας Na^+-K^+ στους σκελετικούς μύες έχουν βρεθεί τα εξής: στον άνθρωπο, μετά από διατάσεις και άσκηση αντοχής υπερ-εκφράστηκαν τα γονίδια των α και β υπομονάδων της αντλίας στον έξω πλατύ μηριαίο μυ. Το ίδιο συνέβη και στον έξω πλατύ μηριαίο και κατιόντα θωρακικό μυ αλόγου μετά από άσκηση αντοχής ^(160,161,162).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη σε μεγάλη κλίμακα των αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση στο μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους (EDL) μυ επιμύων μετά από εξαντλητική αερόβια κολύμβηση με την τεχνική των μικροσυστοιχιών (microarrays) με στόχο την ανάδειξη των μοριακών μηχανισμών που επηρεάζονται από το συγκεκριμένο τύπο άσκησης και την εύρεση νέων γονιδίων που σχετίζονται με την άσκηση.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Πειραματόζωα

Δέκα ένηβοι αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar, ηλικίας 9 εβδομάδων και βάρους 285±5 g (mean± SEM) αποκτήθηκαν από το ελληνικό ινστιτούτο Pasteur (Αθήνα). Οι επίμυες επί 7 ημέρες ζούσαν κάτω από ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (12 ώρες φως / 12 ώρες σκοτάδι στους 20°C) σε κλουβιά των τριών. Είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Οι δέκα επίμυες χωρίστηκαν σε δυο πειραματικές ομάδες: α) επίμυες οι οποίοι θανατώθηκαν χωρίς να ασκηθούν και β) επίμυες που έκαναν άσκηση και θανατώθηκαν μία ώρα μετά.

4.2. Εξοικείωση των επιμύων στην κολύμβηση

Οι επίμυες της ομάδας β για 5 μέρες εξοικειώθηκαν με το νερό. Πιο συγκεκριμένα την πρώτη ημέρα έμειναν σε δεξαμενή με διάμετρο 1m, βάθος 0,7m και θερμοκρασία νερού 33-36°C, για 10 λεπτά χωρίς βάρος στη βάση της ουράς τους. Τις επόμενες 2 μέρες οι επίμυες κολύπησαν για 10 λεπτά με βάρος που αντιστοιχούσε στο 1% του σωματικού τους βάρους και τις 2 τελευταίες μέρες το βάρος αυξήθηκε στο 2%. Τελικά, οι επίμυες ξεκουράστηκαν για 3 μέρες πριν πραγματοποιηθεί το πρωτόκολλο κολύμβησης.

4.3. Πρωτόκολλο κολύμβησης

Οι επίμυες της ομάδας β ασκήθηκαν ο καθένας μόνος του μέχρι εξάντλησης σε δεξαμενή με διάμετρο 1m, βάθος 0,7m και θερμοκρασία νερού 33-36°C. Ένα μόνιμο βάρος που αντιστοιχούσε στο 4% του σωματικού βάρους κάθε επίμυος προσαρμόστηκε στη βάση της ουράς τους για να εξασφαλιστεί ότι οι επίμυες θα ασκούσαν συνεχόμενα. Οι επίμυες παρακολουθούνταν συνεχώς και θεωρούνταν ότι έφταναν στην εξάντληση όταν δεν μπορούσαν να διατηρήσουν για αρκετή ώρα τη μύτη τους έξω από το νερό. Το κολύμπι επιλέχθηκε επειδή είναι ένα είδος άσκησης που, σε αντίθεση με το τρέξιμο, προκαλεί πολύ μικρή μυϊκή καταστροφή⁽¹⁴⁷⁾. Έτσι, η επίδραση της άσκησης στη γονιδιακή έκφραση δεν ήταν αποτέλεσμα της μυϊκής καταστροφής αλλά της ίδιας της άσκησης⁽¹⁵⁰⁾.

4.4. Συλλογή δειγμάτων

Οι επίμυες και των δύο ομάδων θανατώθηκαν με αποκεφαλισμό μετά από σύντομη έκθεση σε αιθέρα. Από κάθε πειραματόζωο συλλέχθηκε χειρουργικά ο μυς μακρός

εκτείνων τους δακτύλους (extensor digitorum longus - EDL). Ο μυς αυτός επιλέχθηκε γιατί παρουσιάζει έντονη συσταλτική δραστηριότητα κατά την κολύμβηση. Ακολούθησε απευθείας πάγωμα των μυών σε υγρό άζωτο και συντήρηση σε θερμοκρασία -80 °C. Ο κάθε μυς ζύγιζε περίπου 50 mg.

4.5. Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση του RNA από το μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μω των πειραματόζων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που αναπτύχθηκε από τους Chomczynski και Sacchi^(163,164) η οποία στηρίζεται στη χρήση του αντιδραστηρίου *TRIZol*.

4.5.1. Αντιδραστήρια

- *TRIZol®(Invitrogen)*: Το *TRIZol®* είναι μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης το οποίο, κατά την ομογενοποίηση του δείγματος, ξεχωρίζει το ολικό RNA από τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά. Συγκεκριμένα, η φαινόλη που περιέχει έχει την ιδιότητα να αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και να διαχωρίζει τα νουκλεϊκά οξέα.
- *Νερό (DEPC- Treated, Ambion)*. Το αντιδραστήριο αυτό παρασκευάζεται τοποθετώντας αποσταγμένο νερό σε γυάλινους σωλήνες (RNase-free) και προσθέτοντας διαιθυλπυροκαρβονικό (DEPC) σε κατόγκον αναλογία 0,01% και ακολουθεί αποστείρωση.
- *Αιθανόλη 75% (Ethanol absolute for analysis, Merck)*. Η αιθανόλη αραιώθηκε σε νερό (DEPC-Treated). Το διάλυμα διατηρείται στους -20 °C.
- *Ισοπροπανόλη (2- propanol GR for analyse, Merck)*.
- *Γλυκογόνο (20 μg/μl Invitrogen)*. Το γλυκογόνο λειτουργεί ως φορέας που οδηγεί το RNA στην υδατική φάση. Παραμένει στην υδατική φάση και κατακρημνίζεται μαζί με το RNA, χωρίς να παρεμβαίνει στη μετέπειτα σύνθεση του cDNA. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C.
- *Χλωροφόρμιο (Trichloromethane stabilized with 50ppm of amylene, Panreac)*. Το χλωροφόρμιο επιτρέπει στο μίγμα να διαχωριστεί σε υδατική και οργανική φάση. Επίσης, προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών και απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατική φάση.
- *RNaseZap® (Ambion)*. Το *RNaseZap* περιέχει τρία ενεργά συστατικά που εξουδετερώνουν τις ριβονουκλεάσες (RNάσες) χωρίς να επηρεάζονται άλλες ενζυμικές διεργασίες.

4.5.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης

Κατά τη διαδικασία της απομόνωσης του RNA από τους ιστούς μπορεί να γίνει τυχαία επιμόλυνση των δειγμάτων από ριβονουκλεάσες (ribonucleases ή RNases - RNάσες). Οι RNάσες είναι ένζυμα που καταλύουν την αποδόμηση του RNA σε μικρότερα κομμάτια. Τα κύτταρα όλων των ζωντανών οργανισμών περιέχουν RNάσες διαφόρων υπο-ομάδων. Επειδή οι RNάσες είναι πολύ κοινά ένζυμα και εκκρίνονται από διάφορους τύπους κυττάρων, μόρια RNA που βρίσκονται εξωκυτταρικά είναι πολύ ευαίσθητα στη δράση των RNασών⁽¹⁶⁵⁾. Για το λόγο αυτό σε όλα τα στάδια απομόνωσης που αναφέρονται παρακάτω τα δείγματα διατηρούνται σε θερμοκρασία 4°C για να αποφεύγεται η δράση των ενζύμων αυτών και συνεπώς η αποδόμηση του RNA.

Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής: Ο πάγκος εργασίας και οι πιπέτες που χρησιμοποιούνται πλένονται με RNaseZap και σκουπίζονται με απορροφητικό χαρτί. Τα σκεύη και εργαλεία (γουδί, λαβή νυστεριού, λαβίδα, στέλεχος ομογενοποιητή) πλένονται με RNaseZap, ξεπλένονται με αποσταγμένο νερό, υποβάλλονται σε υγρή αποστείρωση στους 120°C για 40 λεπτά και στεγνώνουν στους 37°C επί 24 ώρες. Για κάθε mg ιστού χρησιμοποιείται 1 ml αντιδραστήριου TRIzol® το οποίο προστίθεται σε κάθε δείγμα σε δύο στάδια: Αρχικά πριν την προσθήκη του ιστού τοποθετούνται 500 μl TRIzol στον ένα σωλήνα. Ο μυς μεταφέρεται από την κατάψυξη στο κρύο γουδί και τεμαχίζεται με αποστειρωμένη κρύα λάμα νυστεριού μιας χρήσης. Τα τεμάχια του μυός τοποθετούνται με τη βοήθεια της λαβίδας στον κρύο σωλήνα με το TRIzol. Το δείγμα ομογενοποιείται σε ηλεκτρικό ομογενοποιητή (IKA-WERKE, ULTRA-TURRAX T25 basic) σε σταδιακά αυξανόμενο αριθμό στροφών, από 6.500 έως 13.500 στροφές ανά λεπτό. Η ομογενοποίηση γίνεται με μικρές παύσεις και κάθε φορά διαρκεί ελάχιστα (το πολύ ένα λεπτό). Στα μεσοδιαστήματα ο σωλήνας με το δείγμα τοποθετείται στον πάγο. Τα παραπάνω συμβάλλουν στην αποφυγή υπερθέρμανσης του δείγματος κατά την ομογενοποίηση, κάτι που θα είχε ως συνέπεια την αποδόμηση του RNA. Στο δείγμα προστίθενται ακόμη 500 μl TRIzol και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Έτσι αρχίζει να δημιουργείται ίζημα που περιέχει κυτταρικά υπολείμματα και αδιάλυτα συστατικά. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 10.000 στροφές ανά λεπτό (rpm) σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα που προκύπτει περιέχει κυρίως κυτταρικές μεμβράνες, πολυσακχαρίτες και DNA μεγάλου μοριακού βάρους. Το υπερκείμενο, στο οποίο παραμένει το ολικό RNA, μεταφέρεται σε νέο σωλήνα (ependorf 1,5 ml) και προστίθενται 20 μg γλυκογόνου ανά ml TRIzol και 250 μl χλωροφορμίου. Το δείγμα

αναδεύεται δυνατά με το χέρι για 30 δευτερόλεπτα και υποβάλλεται σε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Σ' αυτό το σημείο πραγματοποιείται ο διαχωρισμός του μίγματος σε τρεις φάσεις. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 10.000 rpm σε θερμοκρασία 4°C. Έτσι το μίγμα χωρίζεται στην κατώτερη ερυθρή οργανική φάση (φάση φαινόλης – χλωροφορμίου), στην ενδιάμεση φάση και στην ανώτερη άχρωμη υδατική φάση. Το RNA παραμένει αποκλειστικά στην υδατική φάση, ενώ στην οργανική φάση παραμένουν το DNA και οι πρωτεΐνες. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα στον οποίο προστίθενται 500 μl ισοπροπανόλης και γίνεται πολύ καλή ανάμειξη του μείγματος. Ακολουθεί επώαση του δείγματος για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 10.000 rpm σε θερμοκρασία 4°C με σκοπό την κατακρήμνιση του RNA. Στο τέλος της φυγοκέντρησης το RNA έχει την όψη λευκού ιζήματος (σαν τζελ) κολλημένου στη βάση του σωλήνα. Η ισοπροπανόλη αφαιρείται με πολλή προσοχή, ώστε να μην ξεκολλήσει το ίζημα. Στη συνέχεια το δείγμα πλένεται με 1 ml αιθανόλης 75% και φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 7.500 rpm σε θερμοκρασία 4°C. Η αιθανόλη αφαιρείται με πολλή προσοχή, ώστε να μην ξεκολλήσει το ίζημα. Ακολουθεί εκ νέου πλύση με 1 ml αιθανόλης 75% και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 7.500 rpm σε θερμοκρασία 4°C. Η αιθανόλη αφαιρείται με πολλή προσοχή, ώστε να μην ξεκολλήσει το ίζημα. Με τη χρήση της ισοπροπανόλης και της αιθανόλης πετυχαίνεται η κατακρήμνιση του RNA. Αυτό συμβαίνει επειδή το RNA, λόγω της ιονικής του φύσης, παραμένει αδιάλυτο σ' αυτούς τους οργανικούς διαλύτες. Στη συνέχεια το δείγμα ξηραίνεται σε απαγωγό εστία για 20 λεπτά. Στόχος είναι να εξατμιστεί η αιθανόλη εντελώς και να μείνει μόνο το RNA, το οποίο είναι κολλημένο στη βάση του σωλήνα. Είναι όμως σημαντικό να μην ξηρανθεί τελείως το ίζημα για να μη μειωθεί η διαλυτότητα του RNA. Ακολουθεί προσθήκη 103 μl νερού σε κάθε δείγμα (DEPC-Treated) και καλή ανάμειξη για την πλήρη επαναδιάλυση του RNA. Τα δείγματα αποθηκεύονται σε καταψύκτη με θερμοκρασία -80 °C.

4.6. Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του ολικού RNA

Ο έλεγχος της ποσότητας και της ποιότητας του RNA γίνεται με φωτομέτρηση. Η φωτομέτρηση βασίζεται στο γεγονός ότι το RNA απορροφά στο υπεριώδες φως με μέγιστο στα 260 nm, λόγω της ύπαρξης των αρωματικών βάσεων, δηλαδή της αδερίνης, της ουρακίλης, της γουανίνης και της κυτοσίνης. Με τη φωτομέτρηση είναι δυνατός ο προσδιορισμός της καθαρότητας και της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος RNA. Εκτιμάται ότι ένα δείγμα RNA (ή μονόκλωνου DNA) με συγκέντρωση

40 µg/ml αντιστοιχεί σε οπτική πυκνότητα (απορρόφηση σε 260 nm) ίση με 1. Με βάση το γεγονός αυτό μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του RNA στο δείγμα μας από τον εξής τύπο: Συγκέντρωση (µg/ml)= $OD_{260} \times 40$ x συντελεστής αραιώσης.

Επιπλέον πραγματοποιείται μέτρηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 280 nm. Ο βαθμός της απορρόφησης στα 280 nm αντιστοιχεί στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών που βρίσκονται με τη μορφή προσμείξεων στο δείγμα του RNA. Ο λόγος των απορροφήσεων στα 260 προς 280 (260/280) αποτελεί δείκτη του περιεχομένου νουκλεϊκών οξέων/πρωτεϊνών στο δείγμα, δηλαδή της καθαρότητας του απομονωμένου RNA και πρέπει να έχει τιμές από 1,8 έως 2. Όταν ο λόγος αυτός είναι αρκετά μικρότερος σημαίνει ότι το δείγμα περιέχει πολλές πρωτεΐνες ή υπολείμματα φαινόλης από τον καθαρισμό.

Τέλος τα δείγματα εκτίθενται σε υπεριώδες φως σε μήκος κύματος 230 nm. Η απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη οργανικών υπολειμμάτων ή αλάτων στο δείγμα του RNA. Ο λόγος 260/230 πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 1,5.

Ο υπολογισμός των απορροφήσεων πραγματοποιήθηκε με χρήση φωτομέτρου UV Vis – Eppendorf. Αναλυτικά τα δείγματα αραιώνονται 1:100 (συγκεκριμένα σε 2 µl RNA προστίθενται 198 µl διαλύματος Tris 10 mM, pH 7,5). Ως δείγμα αναφοράς (blanc) χρησιμοποιούνται 200 µl διαλύματος Tris 10 mM, pH 7,5 για τον μηδενισμό του φωτομέτρου. Οι μετρήσεις έγιναν σε κυψελίδα eppendorf UVette.

Τα δείγματα που προέρχονται από τους επίμυες που δεν ασκήθηκαν (δείγματα σε ηρεμία) σημαίνονται από 1 - 5 και τα δείγματα που προέρχονται από τους επίμυες που ασκήθηκαν (δείγματα μετά από άσκηση) σημαίνονται από 6 -10. Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης δίνονται στον πίνακα 1 .

Πίνακας 1: Αποτελέσματα φωτομέτρησης ολικού RNA (UV Vis – Eppendorf)

Δείγμα	Συγκέντρωση ολικού RNA (ng/μl)	Λόγος απορρόφησης 260/280	Λόγος απορρόφησης 260/230
1	412	1,91	2,24
2	563	1,79	1,88
3	704	1,84	2,21
4	454	1,88	2,09
5	415	1,78	2,04
6	600	1,81	2,01
7	340	2,05	3,15
8	380	1,92	2,37
9	335	1,84	2,21
10	475	1,92	2,04

Εκτιμάται ότι από κάθε mg μυϊκού ιστού απομονώθηκαν 1 – 1,5 μg ολικού RNA. Συγκεκριμένη ποσότητα (4 μl) από κάθε δείγμα εστάλη στον τομέα Ανάλυσης Μικροσυστοιχιών της Ακαδημίας Αθηνών για τη συνέχιση της διαδικασίας. Εκεί εκτιμήθηκε η συγκέντρωση και η ποιότητα του ολικού RNA με χρήση NanoDrop Spectrophotometer. Τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα φωτομέτρησης ολικού RNA (NanoDrop Spectrophotometer)

Δείγμα	Συγκέντρωση ολικού RNA (ng/μl)	Λόγος απορρόφησης 260/280	Λόγος απορρόφησης 260/230
1	257,8	1,85	2,26
2	314,2	1,81	2,13
3	386,7	2,01	2,14
4	265,7	1,81	2,21
5	292,1	1,85	2,23
6	342,7	1,88	2,14
7	254,4	1,84	2,29
8	218,5	1,94	2,02
9	185,7	1,83	2,3
10	302,8	1,84	2,34

Επειδή η φωτομέτρηση με χρήση του NanoDrop Spectrophotometer χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια (επειδή μετράται 1 μl δείγματος), χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα αυτής για τη συνέχιση της διαδικασίας.

4.7. Μετατροπή του ολικού RNA σε νοηματικό μονόκλωνο cDNA

Για να γίνει ανάλυση όλου του τρανσκριπτώματος (ολικού mRNA) του σκελετικού μυός με την τεχνολογία Affymetrix, είναι απαραίτητη η κατάλληλη προετοιμασία των δειγμάτων RNA που απομονώθηκαν. Αυτό έγινε με τη χρήση του Ambion WT (Whole Transcript) Expression Kit το οποίο είναι συμβατό με την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης του ανθρώπου, του ποντικού και του επίμουσ με το σύστημα Affymetrix GeneChip® ST (Sense Target) Arrays. Το Ambion® WT Expression Kit παράγει νοηματικό cDNA, το οποίο είναι κατάλληλο για κατάτμηση και σήμανση με το Affymetrix GeneChip® WT Terminal Labeling Kit.

Στο Ambion WT Expression Kit εφαρμόζεται μια μέθοδος αντίστροφης μεταγραφής στην οποία μεταγράφονται μόνο τα poly-A mRNA. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή της Applied Biosystems (AB Veriti® Thermal Cycler). Για τον έλεγχο των αντιδραστηρίων παράλληλα με τα δείγματα RNA, πραγματοποιείται και αντίστροφη μεταγραφή του δείγματος ελέγχου το οποίο αποτελείται από 1mg/ml ολικού RNA από κύτταρα HeLa.

Επιπλέον για τον έλεγχο της διαδικασίας της σήμανσης του στόχου, χρησιμοποιείται μάρτυρας poly-A RNA ο οποίος αποτελείται από πολυαδενυλιωμένα μετάγραφα γονιδίων του *Bacillus subtilis* που δεν υπάρχουν στα ευκαρυωτικά κύτταρα (lys, phe, thr, dap). Αυτά συντίθενται *in vitro* και αναμειγνύονται με τα δείγματα του ολικού RNA σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Για την επίτευξη αυτών των συγκεντρώσεων πραγματοποιούνται οι κατάλληλες αραιώσεις του poly-A RNA control stock με το poly-A RNA control dil buffer, τα οποία αποτελούν το Affymetrix GeneChip Poly-A RNA Control Kit. Οι poly-A RNA μάρτυρες στη συνέχεια ενισχύονται και σημαίνονται μαζί με τα δείγματα του ολικού RNA, αφού στην αντίδραση συμπεριλαμβάνονται και εκκινητές ειδικοί για τα γονίδια του *Bacillus subtilis* που προαναφέρθηκαν. Με αυτόν τον τρόπο, επειδή οι μάρτυρες αυτοί βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση, διαπιστώνεται το αν υπάρχουν διαφορές στην αντίστροφη μεταγραφή και τη σήμανση ανάμεσα στα γονίδια που υπερ-εκφράζονται και σ' αυτά που υπο-εκφράζονται.

4.7.1. Σύνθεση μονόκλωνου cDNA

Αυτή είναι μια αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, στην οποία χρησιμοποιούνται εκκινητές που περιέχουν τον υποκινητή T7 (oligo(dT)-T7 promoter primers). Τα ένζυμα που συμμετέχουν είναι ένας αναστολέας ριβονουκλεασών και η αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία ενσωματώνει dNTPs στο 3' άκρο των εκκινητών. Το προϊόν της αντίδρασης είναι μονόκλωνο cDNA που περιέχει τον υποκινητή T7. Για τη σύνθεση μονόκλωνου cDNA χρησιμοποιήθηκε το Ambion® WT Expression Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο αναλυτικά η όλη διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: Προετοιμάζεται το μίγμα για τη σύνθεση του μονόκλωνου cDNA (First-strand Master Mix) σύμφωνα με τον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Μίγμα για τη σύνθεση μονόκλωνου cDNA (First-strand Master Mix)

Συστατικά	Όγκος (μl) για κάθε δείγμα
First-strand buffer mix (μίγμα buffer)	4
First-strand enzyme mix (μίγμα ενζύμων)	1

Ακολουθεί καλή ανάμειξη με ήπια ανάδευση, σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec) για να συσσωρευτεί το μίγμα στον πυθμένα του σωλήνα και μεταφορά 5 μl από το First-strand Master Mix σε σωλήνες για PCR. Στη συνέχεια προστίθενται 5 μl (100 ng) RNA σε κάθε σωλήνα, γίνεται ήπια ανάδευση, σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec) και επώαση των δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή στις εξής συνθήκες: 25°C για 60 λεπτά, 42°C για 60 λεπτά, 4°C για 2 λεπτά. Αμέσως μετά ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec) και επώαση στον πάγο για 2 λεπτά. Τα δείγματα χρησιμοποιούνται απευθείας για τη σύνθεση του δίκλωνου cDNA.

4.7.2. Σύνθεση δίκλωνου cDNA

Με αυτή τη διαδικασία, το μονόκλωνο cDNA μετατρέπεται σε δίκλωνο cDNA, το οποίο στη συνέχεια μεταγράφεται. Αυτό πετυχαίνεται με τη χρήση των ενζύμων DNA πολυμεράση και RNase H. Η RNase H αποδομεί το RNA ενώ ταυτόχρονα η DNA πολυμεράση συνθέτει τη δεύτερη αλυσίδα cDNA ενσωματώνοντας dNTPs. Για τη σύνθεση του δίκλωνου cDNA χρησιμοποιήθηκε το Ambion® WT Expression Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο αναλυτικά η όλη διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: Προετοιμάζεται το μίγμα για τη σύνθεση του δίκλωνου cDNA (Second-strand Master Mix) στον πάγο σύμφωνα με τον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Μίγμα για τη σύνθεση δίκλωνου cDNA (Second-strand Master Mix)

Συστατικά	Όγκος (μl) για κάθε δείγμα
Nuclease-free water	32,5
Second-strand Buffer Mix	12,5
Second-strand Enzyme Mix	5

Ακολουθεί καλή ανάμειξη με ήπια ανάδευση, σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec) για να συσσωρευτεί το μίγμα στον πυθμένα του σωλήνα και μεταφορά 50 μl από το Second-strand Master Mix σε κάθε δείγμα (10μl) μονόκλωνου cDNA. Στη συνέχεια γίνεται καλή ανάμειξη με ήπια ανάδευση, σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec) και επώαση των δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή στις εξής συνθήκες: 16°C για 60 λεπτά, 65°C για 10 λεπτά, 4°C για 2 λεπτά. Αμέσως μετά ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec) και επώαση στον πάγο για 2 λεπτά. Τα δείγματα χρησιμοποιούνται απευθείας για τη σύνθεση cRNA με μεταγραφή *in vitro*.

4.7.3. Σύνθεση cRNA με μεταγραφή *in vitro*

Με αυτή τη διαδικασία, το δίκλωνο cDNA μεταγράφεται *in vitro* με τη βοήθεια του ενζύμου T7 RNA πολυμεράση το οποίο ενσωματώνει dNTPs παράγοντας αντισηματικό cRNA. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην πρωτότυπη τεχνολογία μεταγραφής *in vitro*, γνωστή σαν Eberwine ή μέθοδος RT-IVT⁽¹⁶⁶⁾. Για τη σύνθεση cRNA με μεταγραφή *in vitro* χρησιμοποιήθηκε το Ambion® WT Expression Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο αναλυτικά η όλη διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: Προετοιμάζεται το μίγμα μεταγραφής *in vitro* (IVT Master Mix) σε θερμοκρασία δωματίου σε σωλήνα ελεύθερο από νουκλεάσες σύμφωνα με τον πίνακα 5.

Πίνακας 5 : Μίγμα μεταγραφής *in vitro* (IVT Master Mix)

Συστατικά	Όγκος (μl) για κάθε δείγμα
IVT Buffer Mix	24
IVT Enzyme Mix	6

Ακολουθεί καλή ανάμειξη με ήπια ανάδευση, σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec) για να συσσωρευτεί το μίγμα στον πυθμένα του σωλήνα και μεταφορά 30 μl από το IVT Master Mix σε κάθε δείγμα (60 μl) δίκλωνου cDNA. Στη συνέχεια γίνεται καλή ανάμειξη με ήπια ανάδευση, σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec) και επώαση των

δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή στις εξής συνθήκες: 40°C για 16 ώρες και μετέπειτα παραμονή σε 4 °C για 12 ώρες. Αμέσως μετά ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec) και επώαση στον πάγο για 2 λεπτά. Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν σε -20°C μέχρι περαιτέρω μεταχείριση ή να χρησιμοποιηθούν απευθείας για τον καθαρισμό του cRNA.

4.7.4. Καθαρισμός του cRNA

Με αυτή τη διαδικασία, απομακρύνονται από τα δείγματα ένζυμα, άλατα, ανόργανες ενώσεις του φωσφόρου και μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια προκειμένου να αυξηθεί η σταθερότητα του cRNA. Για τον καθαρισμό του cRNA χρησιμοποιήθηκε το Ambion® WT Expression Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο αναλυτικά η όλη διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: Διαλύεται καλά το διάλυμα δέσμησης νουκλεϊκών οξέων (Nucleic Acid Binding Buffer) με θέρμανση (σε < 50°C) και αναδεύονται έντονα τα μαγνητικά σφαιρίδια δέσμησης νουκλεϊκών οξέων (Nucleic Acid Binding Beads) για να διαλυθούν τελείως. Προετοιμάζεται το μίγμα δέσμησης cRNA (cRNA Binding Mix) σε θερμοκρασία δωματίου, σε σωλήνα ελεύθερο από νουκλεάσες σύμφωνα με τον πίνακα 6:

Πίνακας 6: Μίγμα δέσμησης cRNA (cRNA Binding Mix)

Συστατικά	Όγκος (μl) για κάθε δείγμα
Nucleic Acid Binding Beads	10
Nucleic Acid Binding Buffer	50

Σε κάθε δείγμα προστίθενται 60 μl cRNA Binding Mix και ακολουθεί ήπια ανάμειξη και μεταφορά κάθε δείγματος σε πηγαδάκι τρυβλίου U-Bottom. Προστίθενται 60 μl ισοπροπανόλης 100% και το μίγμα αναμειγνύεται ήπια ώστε το cRNA να δεσμευτεί στα σφαιρίδια. Το τρυβλίο τοποθετείται σε μαγνητική συσκευή και μετά τη δέσμηση των σφαιριδίων (μετά από 5 λεπτά περίπου), το μίγμα είναι διαυγές, ενώ τα μαγνητικά σφαιρίδια δημιουργούν ίζημα. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και το τρυβλίο απομακρύνεται από τη μαγνητική συσκευή. Ακολουθεί προσθήκη 100 μl 100% αιθανόλης σε κάθε δείγμα και αργή ανάδευση για 1 λεπτό. Αμέσως μετά το τρυβλίο τοποθετείται στη μαγνητική συσκευή, δεσμεύονται τα μαγνητικά σφαιρίδια, αφαιρείται το υπερκείμενο προσεκτικά και το τρυβλίο απομακρύνεται από τη μαγνητική συσκευή, όπως προηγουμένως. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά. Ακολουθεί τοποθέτηση του τρυβλίου σε αναδευτήρα, έντονη ανάδευση για 1 λεπτό και ξήρανση του

διαλύματος για να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη. Προστίθενται σε κάθε δείγμα 40 μl προθερμασμένου (55 έως 58°C) διαλύματος έκλουσης cRNA (το οποίο περιλαμβάνεται στο Ambion® WT Expression Kit) για την απομάκρυνση του cRNA από τα μαγνητικά σφαιρίδια και γίνεται επώαση για 2 λεπτά. Ακολουθεί έντονη ανάδευση του τρυβλίου για 3 λεπτά για να διαλυθούν τελείως τα μαγνητικά σφαιρίδια και τοποθέτηση του τρυβλίου σε μαγνητική συσκευή για τη δέσμευση των μαγνητικών σφαιριδίων. Τέλος, μεταφέρεται το υπερκείμενο, που περιέχει το cRNA, σε ελεύθερο από νουκλεάσες σωληνάριο και τοποθετείται στον πάγο για άμεση εκκίνηση της σύνθεσης 2^{ου} κύκλου cDNA. Τα δείγματα μπορούν επίσης να αποθηκευτούν σε -20°C μέχρι περαιτέρω μεταχείριση.

4.7.5. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του cRNA

Η ποσότητα του cRNA εξαρτάται από την ποσότητα και την ποιότητα του poly-A RNA. Η συγκέντρωση του cRNA υπολογίστηκε με φωτομέτρηση, με χρήση του NanoDrop Spectrophotometer στο οποίο μετρήθηκε 1μl από κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης δίνονται στον πίνακα 7:

Πίνακας 7: Αποτελέσματα φωτομέτρησης του cRNA

Δείγμα	Συγκέντρωση cRNA (ng/μl)	Λόγος απορρόφησης 260/280	Λόγος απορρόφησης 260/230
1	767	2,18	2,36
2	804,8	2,19	2,32
3	745,4	2,17	2,27
4	743	2,15	2,39
5	764,5	2,18	2,42
6	633,3	2,18	2,39
7	811,5	2,16	2,4
8	723,5	2,18	2,4
9	549,8	2,13	1,85
10	697,2	2,17	2,34

4.7.6. Σύνθεση 2^{ου} κύκλου cDNA (νοηματικού)

Με αυτή τη διαδικασία, το cRNA υφίσταται αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιώντας τυχαίους εκκινητές, με αποτέλεσμα να παραχθεί νοηματικό cDNA. Το ένζυμο που συμμετέχει είναι η αντίστροφη μεταγραφάση η οποία ενσωματώνει

dNTPs στο 3' άκρο των εκκινητών. Το νοηματικό cDNA περιέχει dUTP σε συγκεκριμένη αναλογία σε σχέση με τα dTTP. Απαιτούνται 10 µg cRNA σε όγκο 22 µl. Η παρασκευή των διαλυμάτων 10 µg /22 µl γίνεται στον πάγο σύμφωνα με τον πίνακα 8:

Πίνακας 8: Παρασκευή διαλυμάτων cRNA

Δείγμα	Συγκέντρ. cRNA (ng/µl)	Συγκέντρ. cRNA (µg/µl)	Όγκος δείγματος (µl) που περιέχει 10 µg cRNA	Όγκος (µl) νερού που προστίθεται έως τα 22 µl
1	767	0,7670	13,10	8,90
2	804,8	0,8048	12,45	9,55
3	745,4	0,7454	13,45	8,55
4	743	0,7430	13,45	8,55
5	764,5	0,7645	13,10	8,90
6	633,3	0,6333	15,80	6,20
7	811,5	0,8115	12,35	9,65
8	723,5	0,7235	13,90	8,10
9	549,8	0,5498	18,20	3,80
10	697,2	0,6972	14,35	7,65

Για τη σύνθεση νοηματικού cDNA χρησιμοποιήθηκε το Ambion® WT Expression Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο αναλυτικά η όλη διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: Στον πάγο, σε σωλήνες ειδικούς για PCR, πραγματοποιείται ανάμειξη 22µl cRNA (10µg) (πίνακας 8) και 2µl τυχαίων εκκινητών. Ακολουθεί ήπια ανάδευση, σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec), τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο και επώασή τους στο θερμοκυκλοποιητή στις εξής συνθήκες: 70°C για 5 λεπτά, 25°C για 5 λεπτά, 4°C για 2 λεπτά. Αμέσως μετά ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec) και προετοιμασία του μίγματος σύνθεσης cDNA 2^{ου} κύκλου (2nd- cycle Master Mix) σε θερμοκρασία δωματίου σε σωλήνα ελεύθερο από νουκλεάσες, σύμφωνα με τον πίνακα 9.

Πίνακας 9 : Μίγμα σύνθεσης cDNA 2^{ου} κύκλου (2nd- cycle Master Mix)

Συστατικά	Όγκος (μl) για κάθε δείγμα
2 nd - cycle Buffer Mix	8
2 nd - cycle Enzyme Mix	8

Στη συνέχεια γίνεται καλή ανάμειξη με ήπια ανάδευση, σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec) για να συσσωρευτεί το μίγμα στον πυθμένα του σωλήνα και μεταφορά 16 μl από το 2nd- cycle Master Mix σε κάθε δείγμα cRNA/τυχαίων εκκινητών (24 μl). Ακολουθεί καλή ανάμειξη με ήπια ανάδευση, σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec) και επώαση των δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή στις εξής συνθήκες: 25°C για 10 λεπτά, 42°C για 90 λεπτά, 70°C για 10 λεπτά, 4°C για 2 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec), τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο και άμεση εκκίνηση της υδρόλυσης με RNase H.

4.7.7. Υδρόλυση με RNase H

Η RNase H διασπά τη μήτρα cRNA αφήνοντας μονόκλωνο cDNA. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: Προστίθενται 2μl RNase H στο προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης, γίνεται καλή ανάμειξη με ήπια ανάδευση και σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec) για να συσσωρευτεί το μίγμα στον πυθμένα του σωλήνα. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή στις εξής συνθήκες: 37°C για 45 λεπτά, 95°C για 5 λεπτά, 4°C για 2 λεπτά. Μετά από σύντομη φυγοκέντρηση (5 sec) τα δείγματα διατηρούνται στον πάγο και ακολουθεί ο καθαρισμός του μονόκλωνου cDNA.

4.7.8. Καθαρισμός του μονόκλωνου cDNA

Ο καθαρισμός του μονόκλωνου cDNA γίνεται με σκοπό την απομάκρυνση ενζύμων, αλάτων και μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων, ώστε το μονόκλωνο cDNA να είναι κατάλληλο για κατάτμηση, σήμανση και υβριδοποίηση σε μικροσυστοιχίες. Η όλη διαδικασία είναι η εξής: Αρχικά πραγματοποιείται έντονη ανάδευση των σφαιριδίων δέσμησης νουκλεϊκών οξέων (Nucleic Acid Binding Beads) για να διαλυθούν τελείως και προετοιμάζεται το μίγμα δέσμησης cDNA (cDNA Binding Mix) σε θερμοκρασία δωματίου, σε σωλήνα ελεύθερο από νουκλεάσες σύμφωνα με τον πίνακα 10.

Πίνακας 10: Μίγμα δέσμευσης cDNA (cDNA Binding Mix)

Συστατικά	Όγκος (μl) για κάθε δείγμα
Nucleic Acid Binding Beads	10
Nucleic Acid Binding Buffer	50

Σε κάθε δείγμα προστίθενται 18 μl νερού ώστε ο τελικός όγκος να είναι 60 μl. Προστίθενται επίσης σε κάθε δείγμα 60 μl cDNA Binding Mix και γίνεται ήπια ανάμειξη και μεταφορά κάθε δείγματος σε πηγαδάκι τρυβλίου U-Bottom. Προστίθενται 120 μl αιθανόλης 100% και γίνεται ανάμειξη με ήπια ανάδευση για 2 λεπτά, ώστε το cRNA να δεσμευτεί στα σφαιρίδια. Το τρυβλίο τοποθετείται σε μαγνητική συσκευή. Μετά τη δέσμευση των σφαιριδίων (μετά από 5 λεπτά περίπου), το μίγμα είναι διαυγές, ενώ τα μαγνητικά σφαιρίδια δημιουργούν ίζημα. Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και το τρυβλίο απομακρύνεται από τη μαγνητική συσκευή. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 100 μl 100% αιθανόλης και γίνεται αργή ανάδευση για 1 λεπτό. Ακολουθεί ξανά τοποθέτηση του τρυβλίου στη μαγνητική συσκευή, δέσμευση των μαγνητικών σφαιριδίων, αφαίρεση του υπερκειμένου και απομάκρυνση του τρυβλίου από τη μαγνητική συσκευή. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά. Ακολουθεί τοποθέτηση του τρυβλίου σε αναδευτήρα, έντονη ανάδευση για 1 λεπτό και ξήρανση του διαλύματος για να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 30 μl προθερμασμένου (55 έως 58°C) διαλύματος έκλουσης (το οποίο περιλαμβάνεται στο Ambion® WT Expression Kit) για την απομάκρυνση του cRNA από τα μαγνητικά σφαιρίδια και επώαση για 2 λεπτά. Ακολουθεί έντονη ανάδευση του τρυβλίου για 3 λεπτά για να διαλυθούν τελείως τα μαγνητικά σφαιρίδια και τοποθέτηση του τρυβλίου σε μαγνητική συσκευή για τη δέσμευση των μαγνητικών σφαιριδίων. Το υπερκείμενο, που περιέχει το cDNA, μεταφέρεται σε σωλήνα ελεύθερο από νουκλεάσες και τα δείγματα τοποθετούνται σε -20°C για 12 ώρες, μέχρι περαιτέρω μεταχείρισης.

4.7.9. Ποσοτικοποίηση του μονόκλωνου cDNA

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του μονόκλωνου cDNA προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση, με χρήση του NanoDrop Spectrophotometer. Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης δίνονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11: Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας των δειγμάτων

Δείγμα	Συγκέντρωση μονόκλωνου cDNA (ng/μl)	Λόγος απορρόφησης 260/280	Λόγος απορρόφησης 260/230
1	211,4	2,02	2,04
2	229,4	2,01	1,64
3	220,2	2,02	1,63
4	216,9	1,99	1,93
5	216,9	2,01	1,82
6	194,4	2,00	1,97
7	200,6	2,02	1,85
8	198,1	2,01	1,65
9	196,0	2,01	1,99
10	191,3	2,01	2,10

4.7.10. Κατάτμηση του μονόκλωνου cDNA

Για την κατάτμηση του μονόκλωνου cDNA χρησιμοποιήθηκε το GeneChip WT Terminal Labeling Kit της εταιρείας Affymetrix, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, για κάθε δείγμα απαιτούνται 5,5 μg μονόκλωνου cDNA σε όγκο 31,2 μl και παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τον πίνακα 12.

Πίνακας 12: Προετοιμασία μονόκλωνου cDNA για κατάτμηση

Δείγμα	Συγκέντρωση μονόκλωνου cDNA (ng/μl)	Συγκέντρωση μονόκλωνου cDNA (μg/μl)	Όγκος δείγματος (μl) που περιέχει 5,5 μg μονόκλωνου cDNA	Όγκος (μl) νερού που προστίθεται έως τα 31,2 μl
1	211,4	0,2114	26,1	5,1
2	229,4	0,2294	24,0	7,2
3	220,2	0,2202	25,0	6,2
4	216,9	0,2169	25,5	5,7
5	216,9	0,2169	25,5	5,7
6	194,4	0,1944	28,4	2,8
7	200,6	0,2006	27,5	3,7
8	198,1	0,1981	27,9	3,3
9	196,0	0,1960	28,1	3,1
10	191,3	0,1913	28,9	2,3

Η κατάτμηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια των ενζύμων Uracil-DNA Glycosylase (UDG) και Apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease 1. Η UDG αφαιρεί τα μόρια ουρακίλης από το μονόκλωνο cDNA δημιουργώντας έτσι κενές θέσεις (θέσεις χωρίς πουρίνες - πυριμιδίνες), ενώ η APE1 διασπά τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που βρίσκονται πλησίον των θέσεων αυτών, προς το 5' άκρο⁽¹⁶⁷⁾. Η όλη διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: Αρχικά προετοιμάζεται το μίγμα κατάτμησης (Fragmentation Master Mix) σύμφωνα με τον πίνακα 13.

Πίνακας 13: Μίγμα κατάτμησης (Fragmentation Master Mix)

Συστατικά	Όγκος για κάθε δείγμα
Νερό (ελεύθερο από RNάσες)	10 μl
Διάλυμα κατάτμησης cDNA (10x)	4,8 μl
UDG, 10U/μl	1,0 μl
APE 1, 1,000 U/μl	1,0 μl

Σε κάθε δείγμα προστίθενται 16,8 μl από το μίγμα κατάτμησης, γίνεται ήπια ανάδευση και επώαση των δειγμάτων σε: 37°C για 60 λεπτά, 93 °C για 2 λεπτά, 4°C

για 2 λεπτά. 45 μl από κάθε δείγμα μεταφέρονται σε νέους σωλήνες και τα δείγματα αποθηκεύονται σε -20°C .

4.7.11. Σήμανση του μονόκλωνου cDNA

Για τη σήμανση του μονόκλωνου cDNA χρησιμοποιήθηκε το GeneChip WT Terminal Labeling Kit της εταιρείας Affymetrix, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η σήμανση πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου τρανσφεράση τερματικών δεοξυνουκλεοτιδίων (Terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT), η οποία καταλύει την προσθήκη σημασμένων με βιοτίνη νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του μονόκλωνου cDNA. Η όλη διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: Αρχικά προετοιμάζεται το μίγμα σήμανσης σύμφωνα με τον πίνακα 14. Ακολουθεί ανάμειξη και επώαση των δειγμάτων στις ακόλουθες συνθήκες: 37°C για 60 λεπτά, 70°C για 10 λεπτά, 4°C για 2 λεπτά.

Πίνακας 14: Μίγμα σήμανσης

Συστατικά	Όγκος (μl) για κάθε δείγμα
Κατατμημένο μονόκλωνο DNA	45
5xTdT Buffer	12
TdT	2
DNA Labeling Reagent, 5mM	1

4.7.12. Υβριδοποίηση

Για την υβριδοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια του Gene Chip Hybridization kit, της εταιρείας Affymetrix. Σε αυτά περιλαμβάνεται ολιγονουκλεοτίδιο ελέγχου (Control Oligo B2) το οποίο παρέχει ευθυγράμμιση (alignment) κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων από τον υπολογιστή. Επίσης περιλαμβάνεται ένα μείγμα ελέγχου (20xEukaryotic hybridization Control) το οποίο περιέχει τρία γονίδια της *E. coli* (bioB, bioC, bioD) και ένα του βακτηριοφάγου P1 (cre). Αυτά χρησιμεύουν για να ελέγχεται η πορεία της υβριδοποίησης και να είναι εύκολη η σύγκριση αποτελεσμάτων από διαφορετικά πειράματα, αφού υβριδοποιούνται στους ειδικούς ανιχνευτές που περιέχει το Gene Chip Hybridization kit. Η όλη διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: Αρχικά προετοιμάζεται το μίγμα υβριδοποίησης το οποίο αναμιγνύεται με το κατατμημένο και σημασμένο DNA στις αναλογίες που αναγράφονται στον πίνακα 15. Ακολουθεί ήπια ανάδευση του κάθε δείγματος, θέρμανση στους 99°C για 5 λεπτά, ψύξη στους 45°C για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 1 λεπτό. 80 μl από το κάθε

δείγμα τοποθετούνται στο GeneChip ST Array (Rat 1.0 ST Array, Affymetrix) και ακολουθεί επώαση του GeneChip ST Array στον κλίβανο υβριδοποίησης, στους 45°C, στις 60 rpm για 17 ώρες.

Πίνακας 15: Μίγμα υβριδοποίησης

Συστατικά	Όγκος (μl) για κάθε δείγμα	Τελική συγκέντρωση
Κατατηρημένο και σημασμένο DNA	27	25 ng/ μl
Control Oligonucleotide B2 (3nM)	1,7	50 pM
20x Eukaryotic hybridization Controls (bioB, bioC, bioD, cre)	5	1,5, 5, 25, 100 pM, αντίστοιχα
2x Hybridization Mix	50	1x
DMSO	7	7%
Νερό ελεύθερο από νουκλεάσες	Μέχρι 100	

4.8. Κανονικοποίηση αποτελεσμάτων

Το πρόγραμμα RMA (Robust Multi-array Averaging) χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτική κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων μεταξύ όλων των δειγμάτων - μικροσυστοιχιών. Το πρόγραμμα αυτό δίνει για κάθε ανιχνευτή της μικροσυστοιχίας (probe) μια απόλυτη τιμή που δεν είναι σε γραμμική, αλλά σε λογαριθμική (log2) κλίμακα. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν κανονικοποιημένες τιμές για τους 29.214 ανιχνευτές της κάθε μικροσυστοιχίας (Rat 1.0 ST Array).

4.9. Ανάλυση διαφορικής έκφρασης γονιδίων (geometric fold change analysis)

Η ανάλυση της διαφορικής έκφρασης γονιδίων πραγματοποιείται με σκοπό την ταυτοποίηση γονιδίων που παρουσιάζουν στατιστικά διαφορετικό επίπεδο έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων που ασκήθηκαν (6-10) σε σύγκριση με τα δείγματα που είναι σε ηρεμία (1-5). Το κριτήριο που ακολουθείται για το κάθε γονίδιο (ανιχνευτή) της μικροσυστοιχίας είναι το εξής:

$$|\text{AvgLF2}| - \text{StdLF2} > \text{NoiseLF2}$$

Όπου AvgLF η μέση τιμή, StdLF η διακύμανση και NoiseLF ο θόρυβος. Η AvgLF2 αναλογεί στον \log_2 της διαφοράς έκφρασης (fold change) των δειγμάτων {6-10} σε σχέση με τα δείγματα {1-5}. Επειδή οι τιμές που προκύπτουν από την κανονικοποίηση με το πρόγραμμα RMA είναι σε λογαριθμική κλίμακα (όπως προαναφέρθηκε) η διαφορά έκφρασης προκύπτει από την αριθμητική αφαίρεση του Avg{6-10} από το Avg{1-5}. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας ως όριο υπερ-έκφρασης και υπο-έκφρασης την τιμή 1.5 ταυτοποιούνται ανιχνευτές με στατιστικά σημαντικές αλλαγές στην έκφρασή τους μεταξύ των δειγμάτων. Για τους ανιχνευτές αυτούς η διαφορά έκφρασης μετατρέπεται από λογαριθμική κλίμακα σε απόλυτες τιμές.

4.10. Ανάλυση βασικών συστατικών (PCA)

Η PCA (Principal Component analysis) για τα δεδομένα όλων των μικροσυστοιχιών πραγματοποιήθηκε όπως έχει δημοσιευθεί από τους Misra et al⁽¹⁶⁸⁾. Αναλυτικά ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια των οποίων η ένταση (έκφραση) σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν (10) παρουσίαζε συντελεστή συσχέτισης πάνω από ένα, για παράδειγμα ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια που τα προφίλ τους δεν είναι επίπεδα (flat) σε όλα τα δείγματα. Με την ανάλυση αυτή το κάθε δείγμα αποκτά ένα μοριακό προφίλ με βάση τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών και στη συνέχεια τα δείγματα μπορούν να παρασταθούν γραφικά σε άξονες με x , y , και z συντεταγμένες (είτε σε δύο είτε σε τρεις διαστάσεις).

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Συσχέτιση δειγμάτων

Οι συντελεστές συσχέτισης (Pearson correlation coefficients) μεταξύ των δειγμάτων υπολογίστηκαν για το σύνολο των ανιχνευτών (probes) της μικροσυστοιχίας και δίνονται στον πίνακα 16. Υπήρξε πολύ καλή συσχέτιση των δειγμάτων, αφού οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης κυμάνθηκαν από 0,971 έως 0,99.

Πίνακας 16: Συντελεστές συσχέτισης δειγμάτων

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	0,982	0,98	0,974	0,986	0,987	0,983	0,98	0,986	0,985
2	0,982	1	0,988	0,982	0,986	0,986	0,99	0,982	0,99	0,981
3	0,98	0,988	1	0,989	0,984	0,987	0,989	0,987	0,988	0,976
4	0,974	0,982	0,989	1	0,978	0,985	0,986	0,99	0,984	0,971
5	0,986	0,986	0,984	0,978	1	0,985	0,988	0,982	0,989	0,984
6	0,987	0,986	0,987	0,985	0,985	1	0,989	0,99	0,991	0,983
7	0,983	0,99	0,989	0,986	0,988	0,989	1	0,988	0,992	0,984
8	0,98	0,982	0,987	0,99	0,982	0,99	0,988	1	0,988	0,978
9	0,986	0,99	0,988	0,984	0,989	0,991	0,992	0,988	1	0,985
10	0,985	0,981	0,976	0,971	0,984	0,983	0,984	0,978	0,985	1

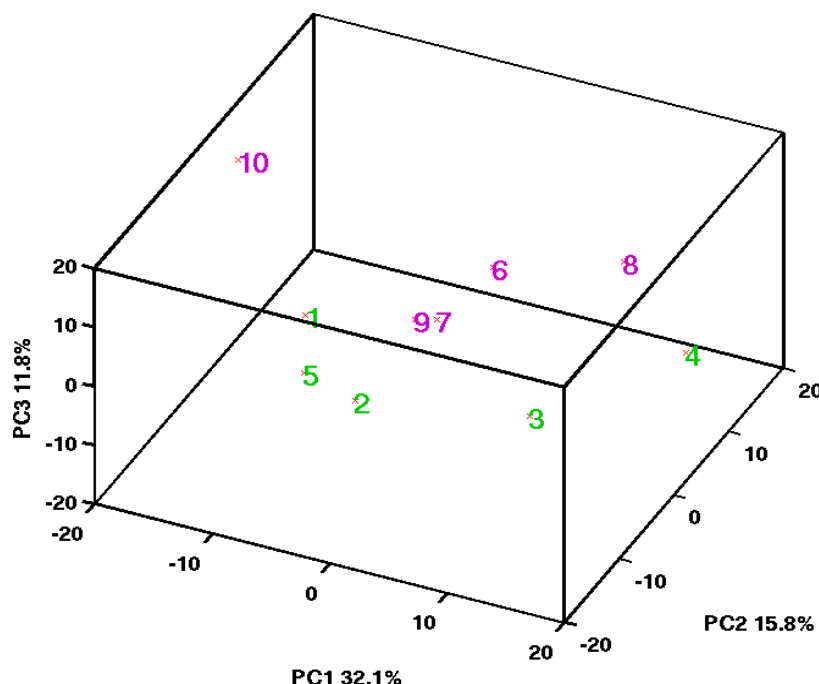
Η ανάλυση των δεδομένων των μικροσυστοιχιών πραγματοποιήθηκε με τους ακόλουθους τρόπους:

- α) Principal Component Analysis (PCA)
- β) Ταυτοποίηση γονιδίων που υπερ-εκφράζονται ή υπο-εκφράζονται με την άσκηση σε σύγκριση με την ηρεμία (fold change analysis)
- γ) Λειτουργική κατηγοριοποίηση των γονιδίων που υπερ-εκφράζονται και υπο-εκφράζονται με την άσκηση
- δ) Εύρεση δικτύων και μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται (Ingenuity pathway analysis)
- ε) Εκτίμηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών-προϊόντων γονιδίων που υπερ-εκφράζονται (cytoscape)

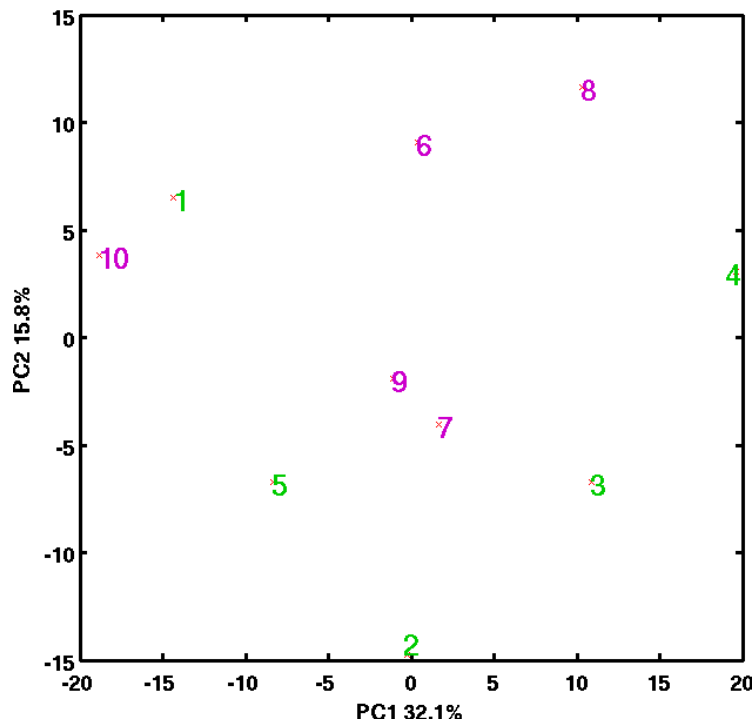
5.2. Principal Component Analysis (PCA)

Στην ανάλυση αυτή ελέγχεται το σύνολο των γονιδίων των μικροσυστοιχιών και των 10 δειγμάτων. Με τη χρήση των μικροσυστοιχιών παίρνουμε το βαθμό έκφρασης

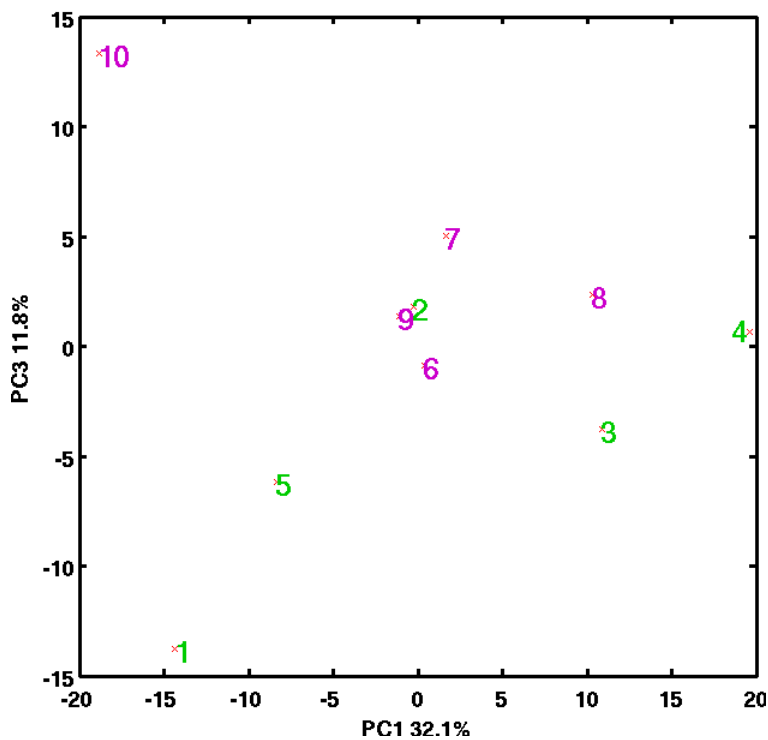
ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων σε διαφορετικά άτομα ή /και σε διαφορετικές πειραματικές καταστάσεις. Στην παρούσα μελέτη υπάρχουν οι μύες 10 διαφορετικών ζώων σε ηρεμία και άσκηση. Κάθε γονίδιο μπορεί να θεωρηθεί ως παράγοντας ή μεταβλητή (variable) του κάθε ατόμου. Αν μελετούσαμε μόνο 2 γονίδια θα μπορούσαμε να κάνουμε ένα γράφημα διασποράς και να δούμε την σχέση αυτών των 2 γονιδίων (παραγόντων, μεταβλητών) στο σκελετικό μυ ενός μόνο ζώου. Αλλά επειδή έχουμε πάρα πολλά γονίδια είναι πολύ δύσκολο να το δούμε αυτό στο χώρο. Μπορούμε λοιπόν να ακολουθήσουμε μια μαθηματική διαδικασία, η οποία έχει στόχο να μειώσει όλες αυτές τις μεταβλητές-γονίδια (που συσχετίζονται μεταξύ τους) σε λίγες μεταβλητές οι οποίες δεν σχετίζονται μεταξύ τους. Αυτές οι μεταβλητές είναι το πολύ 3 και καλούνται principal components (βασικά συστατικά). Ο μαθηματικός μετασχηματισμός γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε η πρώτη μεταβλητή (PC1) να αντιπροσωπεύει την πιο μεγάλη διακύμανση των δεδομένων. Τα επόμενα principal components αναλογούν στην υπόλοιπη διακύμανση. Στη συνέχεια απεικονίζουμε τα δείγματά μας είτε σε 2 διαστάσεις, είτε σε 3. Ενδεικτικά η PC1 αναλογεί στο 32.1% των γονιδίων, η PC2 στο 15.8% των γονιδίων και η PC3 στο 11.8% των γονιδίων (εικόνες 9, 10, 11, 12).



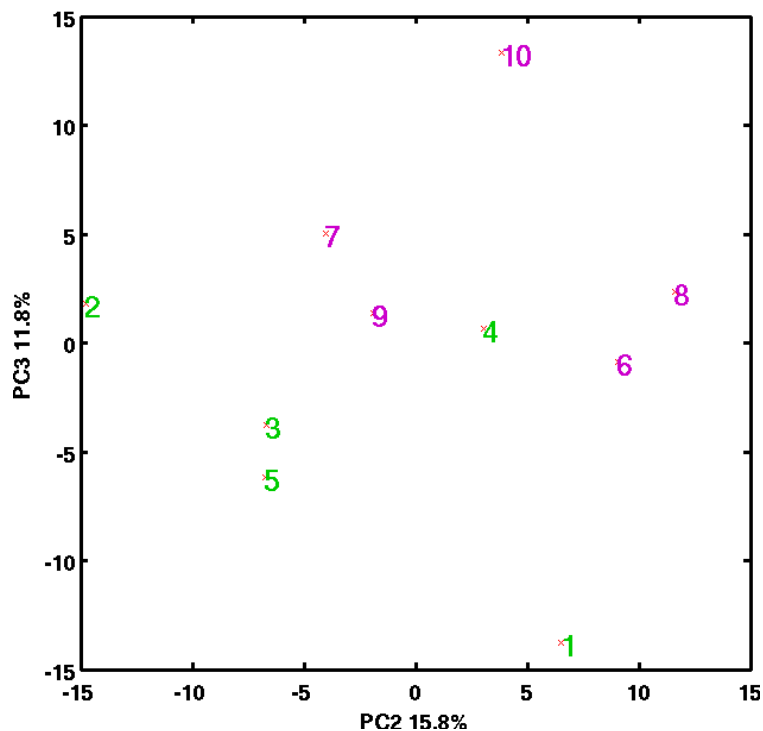
Εικόνα 9: Απεικόνιση όλων των δειγμάτων σε τρισδιάστατο γενωμικό χώρο με βάση τα 3 κύρια βασικά συστατικά (principal components) PC1, PC2 και PC3.



Εικόνα 10: Δισδιάστατη απεικόνιση όλων των δειγμάτων στο γενωμικό χώρο των δύο βασικών συστατικών (*principal components*) PC1 και PC2.



Εικόνα 11: Δισδιάστατη απεικόνιση όλων των δειγμάτων στο γενωμικό χώρο των δύο βασικών συστατικών (*principal components*) PC1 και PC3.



Εικόνα 12: Δισδιάστατη απεικόνιση όλων των δειγμάτων στο γενωμικό χώρο των δύο βασικών συστατικών (principal components) PC2 και PC3.

Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι δεν υπάρχει ομαδοποίηση των δειγμάτων μεταξύ των μυών σε ηρεμία (δείγματα 1-5) και των μυών μετά από άσκηση (δείγματα 6-10). Άρα δεν υπάρχει ξεκάθαρος διαχωρισμός των δειγμάτων σε επίπεδο μεταγραφής. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τα δείγματα της μελέτης αφορούν ένα ιστό (σκελετικό μυ) με μεγάλη πολυπλοκότητα και εμφανίζεται μεγάλη διακύμανση μεταξύ των ζώων, γεγονός που πιθανώς να μην παρατηρούνταν αν η μελέτη αφορούσε αμιγείς κυτταρικούς πληθυσμούς.

5.3. Διαφορές στην έκφραση των γονιδίων (Fold change analysis)

Λαμβάνοντας υπόψη ως όριο υπερ-έκφρασης και υπο-έκφρασης τη 1,5 φορά, στους επίμυες που ασκήθηκαν σε σύγκριση με αυτούς που παρέμειναν σε ηρεμία υπερ-εκφράστηκαν 86 γονίδια. Τη μικρότερη αύξηση στην έκφραση (κατά 1,51 φορές) παρουσίασε μια αλληλουχία για την οποία η εταιρεία Affymetrix δεν παρέχει αντιστοίχιση σε συγκεκριμένο γονίδιο, ενώ τη μεγαλύτερη αύξηση στην έκφραση (κατά 6,8 φορές) παρουσίασε το γονίδιο *Aroid1*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων που παίζει ρόλο στη σηματοδότηση στο εσωτερικό των κυττάρων αυτών, στη λειτουργία των αιμοφόρων

αγγείων και στην αγγειογένεση⁽¹⁶⁹⁾. Στον πίνακα 17 φαίνονται αναλυτικά τα γονίδια που υπερ-εκφράστηκαν και η διαφορά στην έκφραση τους.

Πίνακας 17: Γονίδια που υπερ-εκφράστηκαν και διαφορά της έκφρασής τους

A/A	RAT ARRAY 1 ST PROBE ID	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΔΙΑΦΟΡΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
1	10708896	Lrrc32	1,81
2	10709844	Wee1	1,88
3	10714450	RGD1359349	2,01
4	10717233	Ctgf	2,51
5	10717331	Sgk1	4,13
6	10719616	PVR	1,82
7	10720215	Zfp36	5,68
8	10721865	Ppp1r15a	2,06
9	10744376	Bcl6b	2,13
10	10750848	Nfkbiz	1,97
11	10752839	Adamts1	1,83
12	10754943	Hes1	2,93
13	10761047	Serpine1	4,80
14	10764551	Ptgs2	2,30
15	10764773	Rgs16	2,23
16	10768332	Rgs2	4,72
17	10781273	Stc1	3,57
18	10781337	Egr3	1,91
19	10782271	Plau	1,85
20	10789653	Irs2	3,07
21	10790670	Klf2	3,59
22	10794800	RGD1311307	1,90
23	10795616	Crem	1,97
24	10796149	Pfkfb3	2,75
25	10796411	Mt1a	4,88
26	10797527	Gadd45g	2,84
27	10799291	Klf6	2,23
28	10800140	Snrpd1	2,02
29	10800919	Egr1	2,07
30	10806585	Junb	6,82
31	10806685	Ier2	1,82
32	10809392	Mt1a	5,94
33	10809399	Mt2A	5,34

A/A	RAT ARRAY 1 ST PROBE ID	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΔΙΑΦΟΡΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
34	10812689	Enc1	2,57
35	10815281	Ccrn4l	2,43
36	10821689	Ptger4	1,88
37	10823508	Ccnl1	1,84
38	10825702	Cttnbp2nl	2,13
39	10827231	Cyr61	5,34
40	10827989	Mt2A	5,93
41	10830189	Gja1	1,98
42	10832197	Sik1	7,58
43	10834022	Arrdc3	3,25
44	10834138	Nrarp	1,81
45	10840138	Bmp2	1,89
46	10840890	Id1	2,15
47	10844331	Lcn2	2,02
48	10844339	Slc25a25	5,06
49	10845384	Nr4a2	7,04
50	10858160	LOC500300	3,82
51	10859262	Apold1	15,73
52	10864185	Adamts9	3,41
53	10868940	Nr4a3	7,32
54	10870342	Pde4b	1,92
55	10873814	Klf4	4,34
56	10874193	Errfi1	3,79
57	10874903	Pi15	2,03
58	10876838	Klf4	3,65
59	10878938	Plk3	2,61
60	10880293	Map3k6	2,26
61	10889177	Rhob	3,21
62	10890024	Nfkbia	3,45
63	10899387	Nr4a1	2,39
64	10903459	Klf10	2,03
65	10904511	Arc	3,63
66	10906926	Rnd1	2,48
67	10923338	Coq10b	5,78
68	10924687	Kcne4	1,85
69	10933716	Sat1	1,89
70	10939516	Tsc22d3	1,82
71	10940529	Cebpd	2,26

A/A	RAT ARRAY 1 ST PROBE ID	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΔΙΑΦΟΡΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
72	10940627	Thbs1	2,94
73	10940628	Fosb	2,20
74	10940647	Fosl2	2,20
75	10700286	--	2,04
76	10701164	--	1,86
77	10709858	--	2,27
78	10716934	--	1,94
79	10785895	--	1,81
80	10789488	--	1,93
81	10789490	--	1,80
82	10789492	--	1,86
83	10812214	--	8,32
84	10813949	--	5,57
85	10813951	--	2,79
86	10845603	--	2,34
87	10857403	--	2,35
88	10881812	--	1,98
89	10937867	--	2,17

Για τις στήλες στις οποίες δεν αναγράφεται συγκεκριμένο γονίδιο (--) η εταιρεία Affymetrix δεν δίνει πληροφορίες για αντιστοίχιση σε συγκεκριμένο γονίδιο (πιθανώς αναλογούν σε Expressed Sequence Tags - ESTs).

Τα γονίδια Mt1A, Mt2A και Klf4 αναφέρονται στον πίνακα 17 δύο φορές γιατί στη μικροσυστοιχία έδωσαν σήμα υπερ-έκφρασης 2 ολιγονουκλεοτίδια για το κάθε γονίδιο.

Τα γονίδια που υπο-εκφράστηκαν ήταν μόνο 11. Το γονίδιο με την μικρότερη υπο-έκφραση (1,54 φορές) είναι μια αλληλουχία για την οποία η εταιρεία Affymetrix δεν παρέχει αντιστοίχιση σε συγκεκριμένο γονίδιο, ενώ το γονίδιο Lpar6 παρουσίασε την μεγαλύτερη υπο-έκφραση (2,3 φορές). Το γονίδιο Lpar6 κωδικοποιεί έναν υποδοχέα που συμμετέχει σε μονοπάτι μετάδοσης σήματος που σχετίζεται σε κυτταρική επικοινωνία, αλλά μέχρι του παρόντος δεν έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία πιθανή δράση σε σκελετικούς μύες.

Στον πίνακα 18 φαίνονται αναλυτικά τα γονίδια που υπο-εκφράστηκαν καθώς και η διαφορά της έκφρασής τους.

Πίνακας 18: Γονίδια που υπο-εκφράστηκαν και διαφορά της έκφρασής τους

A/A	RAT ARRAY 1 ST PROBE ID	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΔΙΑΦΟΡΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
1	10767160	LOC680073	-1,66
2	10769672	Rgs4	-1,61
3	10781441	Lpar6	-2,28
4	10852595	Sox18	-1,67
5	10855383	Gimap9	-2,19
6	10700262	--	-1,54
7	10700650	--	-1,59
8	10700980	--	-1,55
9	10701145	--	-2,06
10	10720531	--	-1,57
11	10803216	--	-1,96

Στη συνέχεια παραθέτονται αναλυτικά πληροφορίες για το κάθε γονίδιο που υπερ-εκφράστηκε με την άσκηση.

1) ADAMTS1 (ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1) και ADAMTS9 (ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 9)

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας ADAMTS είναι πρωτεΐνάσες απαραίτητες για τη φυσιολογική ανάπτυξη, τη γονιμότητα, τη μορφολογία και τη λειτουργία των οργάνων. Επίσης έχουν κατασταλτική δράση έναντι της αγγειογένεσης και σχετίζονται με διάφορες φλεγμονώδεις εξεργασίες, όπως και με την ανάπτυξη της καρκινικής καχεξίας^(170,171,172).

2) ID1 (inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι του τύπου έλικα- βρόχος-έλικα (HLH) που δημιουργεί ετεροδιμερή με μέλη της ομάδας των μεταγραφικών παραγόντων bHLH, των οποίων και αναστέλλει τη μεταγραφική δραστηριότητα. Παίζει ρόλο στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων⁽¹⁷³⁾.

3) IRS2 (insulin receptor substrate 2)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι σηματοδοτικό μόριο – προσαρμογέας του κυτταροπλάσματος το οποίο φωσφορυλιώνεται από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα ινσουλίνης. Από εδώ ξεκινά ένα πολύπλοκο σηματοδοτικό μονοπάτι που καταλήγει στην ενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου, με αποτέλεσμα την επαγωγή της γλυκογονοσύνθεσης⁽⁷⁾.

4) PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο αυτό είναι κινάση που ενεργοποιεί αλλοστερικά την 6-φωσφοφρουκτο-1-κινάση (PFK-1), με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού της γλυκόλυσης⁽¹⁷⁴⁾.

5) KLF2 (Kruppel-like factor 2), KLF4 (Kruppel-like factor 4), KLF6 (Kruppel-like factor 6) και KLF10 (Kruppel-like factor 10)

Οι παράγοντες Kruppel-like (KLFs) είναι μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων με δακτύλιο ψευδαργύρου που εκφράζονται σε πολλούς τύπους κυττάρων. Ο παράγων KLF2 ρυθμίζει τη μετανάστευση των T-λεμφοκυττάρων επάγοντας την έκφραση του υποδοχέα που συνδέεται με τα λιπίδια (lipid-binding receptor, S1P1) και της σελεκτίνης CD62L⁽¹⁷⁵⁾. Ο KLF4 στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα *in vitro* επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης p21 και αναστέλλει την έκφραση της κυκλίνης D1, οδηγώντας στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την αναστολή της καρκινογένεσης⁽²⁰⁷⁾. Όπως ο KLF4, ο KLF6 έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει *in vitro* αντικαρκινική δράση⁽¹⁷⁷⁾. Η έκφραση του KLF10 επάγεται από τη δράση των TGF-β 1,2 και 3, του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και της BMP2 (bone morphogenetic protein-2) και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη φλεγμονή⁽¹⁷⁸⁾. Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι οι παράγοντες KLF, μέσω της ERK5 παίζουν ρόλο – κλειδί στη διαφοροποίηση των σκελετικών μυών⁽¹⁷⁹⁾.

6) CTGF (connective tissue growth factor)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι ηπαρινο-συνδεόμενος αυξητικός παράγοντας πλούσιος σε κυστεΐνη. Προάγει την ανάπτυξη, την προσκόλληση και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση. Η μεταγραφή του CTGF επάγεται από τη δράση του βασικού αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF) και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF)⁽¹⁸⁰⁾. Ο CTGF συνδέεται με μια πρωτεογλυκάνη του χόνδρινου ιστού, ρυθμίζοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων⁽¹⁸¹⁾. Ο CTGF εμπλέκεται στην ανάπλαση της εξωκυττάριας ουσίας κατά την επούλωση των τραυμάτων καθώς και σε άλλες διαδικασίες δημιουργίας ινώδους συνδετικού ιστού. Τέλος, μπορεί να επάγει την έκφραση των μεταλλοπρωτεασών της εξωκυττάριας ουσίας αλλά και των αναστολέων τους, με αποτέλεσμα να ελέγχει τόσο τη σύνθεση όσο και την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας⁽¹⁸²⁾. Εντούτοις, ο ακριβής ρόλος του CTGF στα μυϊκά κύτταρα παραμένει άγνωστος. Μια μελέτη έδειξε ότι οι μυοβλάστες συνθέτουν CTGF μετά από επίδραση του TGF-β και του λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA) και ότι ο CTGF

παρουσιάζει σημαντική ανασταλτική επίδραση στη διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων. Αυτό γίνεται μειώνοντας τη μετακίνηση της μυογενίνης στον πυρήνα⁽¹⁸³⁾.

7) APOLD1 (apolipoprotein L domain containing 1)

Η APOLD1 είναι πρωτεΐνη πρώιμης απόκρισης των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων και πιθανώς παίζει ρόλο στη σηματοδότηση στο εσωτερικό των κυττάρων αυτών και στη λειτουργία των αιμοφόρων αγγείων. Έχει συσχετισθεί με την αγγειογένεση και με μεταβολές στην αιμάτωση του εγκεφάλου καθώς επηρεάζει τη διαπερατότητα του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού⁽¹⁶⁹⁾.

8) ARC (activity-regulated cytoskeleton-associated protein)

Η ARC (γνωστή και ως Arg3.1) ανήκει στις πρωτεΐνες πρώιμης απόκρισης που εκφράζεται κυρίως στα νευρικά κύτταρα αμέσως μετά την ηλεκτρική διέγερση των κυττάρων αυτών και συσσωρεύεται σε μεγάλο ποσοστό στους δενδρίτες τους, σχηματίζοντας συνδέσεις με την ακτίνη του κυτταροσκελετού. Παίζει σημαντικό ρόλο στους μοριακούς μηχανισμούς της μάθησης και της μνήμης^(184,185).

9) ARRDC3 (arrestin domain containing 3)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο αυτό είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της λειτουργίας των β2-αδρενεργικών υποδοχέων. Συγκεκριμένα, δρώντας σαν πρωτεΐνη-προσαρμογέα, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη NEDD4, μια λιγάση ουβικουιτίνης, η οποία στη συνέχεια συνδέεται στον β2-αδρενεργικό υποδοχέα και τον απενεργοποιεί. Αυτό συμβαίνει μετά από μακρόχρονη διέγερση του υποδοχέα⁽¹⁸⁶⁾.

10) BCL6B (B-cell CLL/lymphoma 6, member B)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων με δακτύλιο ψευδαργύρου. Καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τον έλεγχο της ενεργοποίησης, διαφοροποίησης και απόπτωσης των λεμφοκυττάρων μέσα στο βλαστικό τους κέντρο και είναι απαραίτητη για την έξοδο των φυσιολογικών B- λεμφοκυττάρων από το βλαστικό τους κέντρο. Μεταλλάξεις στο γονίδιο BCL6B έχουν συσχετιστεί με κάποιες μορφές του λεμφώματος non-Hodgkin's⁽¹⁸⁷⁾.

11) BMP2 (bone morphogenetic protein 2)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο αυτό ανήκει στην υπερικογένεια των μεταμορφωτικών αυξητικών παραγόντων β (TGF- β) και εμπλέκεται στο σχηματισμό των οστών και των χόνδρων⁽¹⁸⁸⁾.

12) CCNL1 (cyclin L1)

Η κυκλίνη L1 συνδέεται με την αντίστοιχη κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση (CDK11) και εμπλέκεται στη ρύθμιση της διαδικασίας του ματίσματος του RNA⁽¹⁸⁹⁾.

13) CCRN4L (CCR4 carbon catabolite repression 4-like)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τη Nocturnin, έναν μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει τον κirkάδιο ρυθμό στον *Xenopus laevis*⁽¹⁹⁰⁾.

14) CEBPD (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta)

Η πρωτεΐνη CEBPD είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται σαν ομοδιμερές σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA. Μπορεί επίσης να σχηματίζει ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη CEBP-α. Ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των μακροφάγων, καθώς και με τις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις⁽¹⁹¹⁾.

15) CREM (cAMP responsive element modulator)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι ένας bZIP μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται σε μια αλληλουχία DNA, κοινή σε πολλούς υποκινητές γονιδίων των θηλαστικών, αλλά και των ιών. Η λειτουργία της, όπως αναφέρεται στη βάση πληροφοριών Pubmed, σχετίζεται με τη σηματοδότηση μέσω του cAMP κυρίως κατά τη διάρκεια του κύκλου των σπερματογονίων, αλλά και άλλων μεταβολικών εξεργασιών⁽¹⁹²⁾.

16) CYR61 (cysteine-rich protein 61)

Η πρωτεΐνη CYR61 είναι ηπαρινο-συνδεόμενος αυξητικός παράγοντας πρώιμης απόκρισης πλούσιος σε κυστεΐνη. Δρώντας σαν εξωκυτταρικό σηματοδοτικό μόριο προάγει την προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω αλληλεπίδρασης με ιντεγκρίνες και επιπλέον αυξάνει τη σύνθεση του DNA στα κύτταρα αυτά. Η μεταγραφή του CYR61 επάγεται από τη δράση του bFGF και του VEGF⁽¹⁹³⁾.

17) EGR1 (early growth response 1) και EGR3 (early growth response 3)

Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια ανήκουν στην οικογένεια EGR των πρωτεϊνών τύπου C2H2 με δακτύλιο ψευδαργύρου. Είναι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων που ελέγχουν την ανάπτυξη του μυϊκού ιστού, των λεμφοκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των νευρώνων⁽¹⁹¹⁾. Η πρωτεΐνη EGR1 παρουσιάζει ξεχωριστό προφίλ έκφρασης στον εγκέφαλο, όπου πιθανολογείται ότι η δράση της σχετίζεται με τη δραστηριότητα και την πλαστικότητα των νευρώνων⁽¹⁹⁴⁾.

18) ENC1 (ectodermal-neural cortex 1)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο (γνωστή και ως NRP/B - nuclear restricted protein/brain) είναι πρωτεΐνη του πυρήνα που συνδέεται με την ακτίνη του κυτταροσκελετού και εκφράζεται κατά κύριο λόγο στον εγκέφαλο του

εμβρύου αλλά και των ενήλικων ατόμων. Επάγει την διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων σε σύνδεση με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (p110-RB)⁽¹⁹⁵⁾.

19) ERRFI1 (ERBB receptor feedback inhibitor 1)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι κυτταροπλασματική σηματοδοτική πρωτεΐνη που αναστέλλει τη μιτογόνο δραστηριότητα της ErbB-2⁽¹⁹⁶⁾.

20) FOSB (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B) και FOSL2 (FOS-like antigen 2)

Η οικογένεια των γονιδίων Fos περιλαμβάνει τα μέλη FOS, FOSB, FOSL1 και FOSL2. Οι πρωτεΐνες που παράγονται από αυτά τα γονίδια, διμερίζονται με τις πρωτεΐνες της οικογένειας JUN, δημιουργώντας το σύμπλεγμα των μεταγραφικών παραγόντων AP-1. Αυτοί ενεργοποιούν γονίδια που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, το μετασχηματισμό και την απόπτωση των κυττάρων⁽¹⁹⁷⁾.

21) GADD45G (growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma)

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο αυξάνονται παρουσία στρεσογόνων παραγόντων που διακόπτουν την αύξηση των κυττάρων και παραγόντων που προκαλούν βλάβες στο DNA, όπως οι ακτινοβολίες γ και UV. Η GADD45G είναι σηματοδοτικό μόριο που συμμετέχει στην ενεργοποίηση του μονοπατιού p38/JNK μέσω των κινασών MTK1/MEKK4⁽¹⁹⁸⁾.

22) GJA1 (gap junction protein, alpha 1), 43kDa

Το γονίδιο αυτό ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων των κοννεξινών. Κάθε κοννεξίνη χαρακτηρίζεται με αριθμό που αντιστοιχεί στο M.B. της. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο (connexin 43), είναι συστατικό των χασμοσυνδέσμων, οι οποίοι είναι διακυτταρικά κανάλια ανάμεσα σε παρακείμενα κύτταρα, τα οποία επιτρέπουν τη μεταφορά ιόντων, μεταβολιτών και δευτέρων διαβιβαστών μικρότερων του 1 kDa. Η πρωτεΐνη GJA1 είναι η σημαντικότερη στους χασμοσυνδέσμους της καρδιάς, παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στη συγχρονισμένη σύσπαση των καρδιακών μυϊκών κυττάρων⁽¹⁹⁹⁾. Επίσης έχει δειχθεί ότι υπερ-εκφράζεται στους σκελετικούς μύες κατά τη διάρκεια της αναγέννησης των μυών αυτών μετά από τραύμα. Πιθανώς ο ρόλος της είναι, σε συνδυασμό και με άλλες κοννεξίνες, η επικοινωνία και ο συγχρονισμός μεταξύ των μυοβλαστών κατά τη διάρκεια της αναγέννησης των σκελετικών μυών^(200,201,202).

23) HES1 (hairy and enhancer of split 1)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων με μορφή έλικα-βρόχος-έλικα (HLH). Όπως αναφέρεται στη βάση πληροφοριών Pubmed, δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της μυογένεσης καταστέλλοντας τη μεταγραφή των γονιδίων MYOD1 και ASH1.

24) IER2 (immediate early response 2)

Η πρωτεΐνη IER2 (γνωστή και ως ETR101) είναι πρωτεΐνη πρώιμης απόκρισης και πιθανολογείται ότι λειτουργεί σαν μεταγραφικός παράγοντας⁽²⁰³⁾.

25) JUNB (jun B proto-oncogene)

Η πρωτεΐνη JUNB είναι μεταγραφικός παράγοντας που δημιουργεί διμερή με την JUN τα οποία έχουν μειωμένη ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης. Έτσι αναστέλλονται οι λειτουργίες της JUN που είναι κυρίως η επαγωγή του κυτταρικού κύκλου, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό η JUNB λειτουργεί ογκοκατασταλτικά. Έχει επίσης βρεθεί ότι, όταν υπερεκφράζεται στους σκελετικούς μύες, προκαλεί υπερτροφία όχι μέσω του πολλαπλασιασμού των δορυφόρων κυττάρων, αλλά μέσω αύξησης της πρωτεϊνοσύνθεσης⁽²⁰⁴⁾.

26) KCNE4 (potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη και λειτουργεί ως κανάλι K^+ . Αποτελείται από μια α - υπομονάδα η οποία σταθεροποιεί το διμερές και από μια β - υπομονάδα που ασκεί τη λειτουργία του καναλιού K^+ ⁽²⁰⁵⁾.

27) LCN2 (lipocalin 2)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανήκει στην υπερικογένεια των λιποκαλινών, οι οποίες εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης και στην ευαισθησία στην ινσουλίνη. Για ορισμένους τύπους κυττάρων, όπως τα νεφρικά κύτταρα, λειτουργεί σαν αυξητικός παράγοντας και παράγοντας διαφοροποίησης. Τέλος η LCN2 παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και αναστέλλει την τοξικότητα του H_2O_2 που είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες οξειδωτικού στρες^(206,207).

28) LRRC32 (leucine rich repeat containing 32)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο περιέχει 20 επαναλαμβανόμενα μοτίβα πλούσια σε λευκίνη. Είναι μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη και είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του TGF- β στην κυτταρική μεμβράνη⁽²⁰⁸⁾.

29) MAP3K6 (mitogen-activated protein kinase 6)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης η οποία ενεργοποιεί τη MAPK7 και μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση του VEGF και σε συνθήκες υποξίας αλλά και παρουσία οξυγόνου. Έτσι, η MAP3K6 παίζει καθοριστικό ρόλο στην αγγειογένεση και την ογκογένεση⁽²⁰⁹⁾.

30) MT1A (metallothionein 1A) και MT2A (metallothionein 2A)

Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια ανήκουν στην οικογένεια των μεταλλοθειονινών οι οποίες εμπλέκονται στο μεταβολισμό, τη μεταφορά και την αποθήκευση ιχνοστοιχείων όπως ο ψευδάργυρος, ο χαλκός και ο σίδηρος, καθώς και στην αποτοξίνωση από βαρέα μέταλλα, ιδιαίτερα από το κάδμιο. Επίσης εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες και προστατεύουν το DNA από τη δράση των ακτινοβολιών^(210,211).

31) NFKBIA (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) και NFKBIZ (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta)

Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια ανήκουν στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NFKBI που αναστέλλουν τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα NFKB δεσμεύοντάς τον στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή μορφή^(212,213). Το γονίδιο NFKBIA παρουσιάζει μεταλλάξεις σε κάποια κύτταρα του λεμφώματος Hodgkin, με αποτέλεσμα η αντίστοιχη πρωτεΐνη να είναι ανενεργή και ο NFKB να παραμένει συνεχώς σε ενεργή μορφή, γεγονός που συμβάλλει στην εμφάνιση της κακοήθειας⁽²¹⁴⁾.

32) NR4A1 (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1), NR4A2 (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2) και NR4A3 (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3)

Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά ανήκουν στην υπεροικογένεια πυρηνικών υποδοχέων στεροειδών ορμονών NR4A οι οποίοι εμπλέκονται στα μονοπάτια της κυτταρικής επιβίωσης και της απόπτωσης. Παρόλο που έχει δείχτει ότι η έκφραση των γονιδίων αυτών επάγει την επιβίωση των κυττάρων, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του NR4A1 μπορεί να προκαλέσει απόπτωση. Στους σκελετικούς μύες οι NR4A ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων⁽²¹⁵⁾.

33) NRARP (NOTCH-regulated ankyrin repeat protein)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο λειτουργεί σαν προσαρμογέας μεταξύ του υποδοχέα Notch και της πρωτεΐνης Wnt στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Το μονοπάτι αυτό σχετίζεται με τη σταθερότητα των νεοσχηματιζόμενων αιμοφόρων αγγείων⁽²¹⁶⁾.

34) PDE4B (phosphodiesterase 4B, cAMP-specific)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανήκει στην ομάδα των φωσφοδιεστερασών κυκλικών νουκλεοτιδίων (PDEs), οι οποίες ρυθμίζουν τη

συγκέντρωση του cAMP στο εσωτερικό των κυττάρων παίζοντας έτσι ρόλο στη μετάδοση σήματος. Η PDE4B υδρολύει το cAMP⁽⁷⁾.

35) PI15 (peptidase inhibitor 15)

Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί έναν αναστολέα θρυψίνης. Η πρωτεΐνη PI15 έχει ομοιότητα με τα αλλεργιογόνα των εντόμων, ορισμένες πρωτεΐνες των θηλαστικών που εντοπίζονται στους όρχεις και κάποιες φυτικές πρωτεΐνες. Πιθανότατα παίζει κάποιο ρόλο στο νευρικό σύστημα, αφού η έκφρασή της αυξάνεται στα κύτταρα του νευροβλαστώματος και του γλοιοβλαστώματος⁽²¹⁷⁾.

36) PLAU (plasminogen activator, urokinase)

Η PLAU είναι μια πρωτεάση σερίνης η οποία, όπως αναφέρεται στη βάση πληροφοριών Pubmed, εμπλέκεται στην αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας και πιθανότατα στον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Μετατρέπει το πλασμινογόνο σε πλασμίνη.

37) PLK3 (polo-like kinase 3)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι κινάση σερίνης/θρεονίνης και εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην καρκινογένεση. Τελευταία έχει δείχτεί ότι, φωσφορυλιώνοντας τον HIF1α, η κινάση PLK3 παίζει καθοριστικό ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι που σχετίζεται με την υποξία⁽²¹⁸⁾.

38) GADD34 (PPP1R15A protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A)

Τα επίπεδα της έκφρασης αυτού του γονιδίου αυξάνονται σε καταστάσεις στρες, όπως υποξία, ακτινοβολίες, μολύνσεις από ιούς. Στις καταστάσεις αυτές φωσφορυλιώνεται ο παράγοντας έναρξης πρωτεϊνοσύνθεσης 2α (eIF2α_α) κι έτσι αναστέλλεται η πρωτεϊνοσύνθεση. Παραδόξως, αυτό οδηγεί στη μετάφραση κάποιων mRNAs, όπως του μεταγραφικού παράγοντα ATF4, ο οποίος επάγει την έκφραση κάποιων γονιδίων, μεταξύ των οποίων και του PPP1R15A. Η πρωτεΐνη PPP1R15A, λειτουργώντας σαν σηματοδοτικό μόριο, αλληλεπιδρά με την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 η οποία ενεργοποιείται και αποφωσφορυλιώνει τον eIF2α_α. Μ' αυτόν τον τρόπο αποκαθίσταται η πρωτεϊνοσύνθεση⁽²¹⁹⁾.

39) PTGER4 (prostaglandin E receptor 4, subtype EP4)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCR). Είναι ένας από τους 4 υποδοχείς της προσταγλανδίνης E2 (PGE2) και, μέσω αυτής, ρυθμίζει τα επίπεδα και τη σταθερότητα του mRNA της κυκλοοξυγενάσης-2, οδηγεί στη φωσφορυλίωση της κινάσης-3 της συνθάσης του γλυκογόνου και εμπλέκεται στην εμφάνιση της φλεγμονής⁽¹³⁰⁾.

40) PTGS2 (prostaglandin G/H synthase 2)

Η πρωτεΐνη PTGS, γνωστή και ως κυκλοοξυγενάση, είναι το ένζυμο – κλειδί για τη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών, οι οποίες εμπλέκονται στην εμφάνιση της φλεγμονής αλλά και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Υπάρχουν δύο ισοένζυμα, τα PTGS1 και PTGS2, τα οποία διαφέρουν στον τρόπο ρύθμισής τους και στη διασπορά τους στους ιστούς⁽²²⁰⁾.

41) PVR (poliovirus receptor)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο, όπως αναφέρεται στη βάση πληροφοριών Pubmed, είναι διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Η εξωκυτταρική περιοχή συμβάλλει στην προσκόλληση του κυττάρου στην εξωκυττάρια ουσία. Χρησιμεύει ως υποδοχέας των πολιοϊών.

42) RGS2 (regulator of G-protein signaling 2) και RGS16 (regulator of G-protein signaling 16)

Οι πρωτεΐνες RGS είναι μόρια που ρυθμίζουν τη δράση GTPάσης της α- υπομονάδας των ετεροτριμερών G πρωτεϊνών, αυξάνοντας το ρυθμό υδρόλυσης του GTP. Έχουν συνεπώς ανασταλτική δράση στη σηματοδότηση των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες. Στην οικογένεια αυτή ανήκει η πρωτεΐνη RGS2 η οποία εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των κυττάρων του μυελού των οστών, και η πρωτεΐνη RGS16, η οποία πιθανολογείται ότι παίζει κάποιο ρόλο στην κινητική της μετάδοσης των οπτικών ερεθισμάτων⁽²²¹⁾.

43) RHOB (ras homolog gene family, member B) και RND1 (Rho family GTPase 1)

Οι πρωτεΐνες RHO είναι μικρές GTPάσες που εντοπίζονται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, ενεργοποιούνται μετά από διέγερση υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας και συνδέονται σε άλλες πρωτεΐνες - προσαρμογείς. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδιοργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού. Επίσης, εμπλέκονται στην κυτταρική μετανάστευση και προσκόλληση, στον έλεγχο της αύξησης των κυττάρων και στη μετακίνηση ουσιών διαμέσου των μεμβρανών. Η RHOB πιθανότατα ρυθμίζει τη διασπορά των κυτοκινών και την κυτταρική επιβίωση. Η RND1 ανήκει σε μια υποομάδα της οικογένειας των Rho GTPασών που εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο και στο ήπαρ^(222,223,224).

44) SAT1 (spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1)

Η SAT1 είναι μία ακετυλοτρανσφεράση και συμμετέχει στον καταβολισμό των πολυαμινών. Καταλύει την ακετυλίωση της σπερμιδίνης και της σπερμίνης και τα προϊόντα της αντίδρασης αυτής είτε αποβάλλονται από το κύτταρο είτε

οξειδώνονται από την οξειδάση των ακετυλοπολυαμινών. Καθώς οι πολυαμίνες παίζουν καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογική αύξηση των κυττάρων αλλά και στην καρκινογένεση, η SAT1 είναι ένα ένζυμο κλειδί σ' αυτές τις διαδικασίες⁽²²⁵⁾.

45) SERPINE1 (serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανήκει στην υπερικογένεια των πρωτεασών αναστολέων σερίνης (σερπίνες). Είναι ο κυριότερος αναστολέας του ενεργοποιού του ιστικού πλασμινογόνου (tPA) και της ουροκινάσης (uPA). Αυτό σημαίνει ότι η SERPINE1 είναι αναστολέας της ινωδόλυσης⁽²²⁶⁾.

46) SGK1 (serum/glucocorticoid regulated kinase 1)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που εμπλέκεται στην κυτταρική επιβίωση, στη νευρική διεγερσιμότητα και στην απέκκριση νατρίου από τους νεφρούς ενεργοποιώντας κάποια κανάλια καλίου, νατρίου και χλωρίου. Υψηλά επίπεδα έκφρασης της SGK1 προκαλούν υπέρταση και διαβητική νεφροπάθεια⁽²²⁷⁾. Στο επίπεδο των σκελετικών μυών, η SGK1 ρυθμίζει την ανοχή στη γλυκόζη σε συνάρτηση με την πρόσληψη αλάτων με την τροφή⁽²²⁸⁾.

47) SIK1 (salt-inducible kinase 1)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι μία κινάση της οποίας η δράση εξαρτάται από τη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου στην τροφή. Ενεργοποιεί κυτταροπλασματικούς μεταφορείς ιόντων, όπως η ATP-άση Na^+, K^+ ⁽²²⁹⁾. Στο επίπεδο των σκελετικών μυών, η SIK1 επάγει την επιβίωση των μυϊκών κυττάρων⁽²³⁰⁾.

48) SLC25A25 (solute carrier family 25), member 25

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανήκει στην υπερικογένεια των διαλυτών μιτοχονδριακών μεταφορέων (mitochondrial solute carrier, MSC), πρωτεϊνών υπεύθυνων για τη μεταφορά μεταβολιτών διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων⁽²³¹⁾.

49) SNRPD1 (small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide)

Η πρωτεΐνη SNRPD1, όπως αναφέρεται στη βάση πληροφοριών Pubmed, είναι μία μικρή πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη που λειτουργεί σαν προσαρμογέας μέσω μη ειδικών ηλεκτροστατικών δεσμών με το RNA.

50) STC1 (stanniocalcin 1)

Το γονίδιο STC1 κωδικοποιεί μία εκκρινόμενη ομοδιμερή γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται σε πολλούς ιστούς και έχει αυτοκρινή και παρακρινή δράση. Η πρωτεΐνη αυτή παίζει ρόλο στη ρύθμιση της μεταφοράς του ασβεστίου και του φωσφόρου

διαμέσου των κυττάρων του εντέρου και των νεφρών, επιδρώντας έτσι στην ομοιόσταση του ασβεστίου και του φωσφόρου. Επίσης, αναστέλλει τη μετανάστευση των μακροφάγων διαμέσου του ενδοθηλίου των αγγείων και την ενεργοποίηση του μονοπατιού c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) και NF-κappaB που οδηγεί στην εμφάνιση φλεγμονής. Παράλληλα, στα μακροφάγα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων μειώνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου επάγοντας την έκφραση των UCP2 (uncoupling protein-2). Έτσι παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση⁽²³²⁾.

51) THBS1 (thrombospondin 1)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι υπομονάδα μιας ομοτριμερούς γλυκοπρωτεΐνης η οποία παράγεται και εκκρίνεται από πολλούς τύπους κυττάρων και δημιουργεί συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων, αλλά και μεταξύ των κυττάρων και της θεμέλιας ουσίας. Μπορεί να συνδεθεί στο ινωδογόνο, στο κολλαγόνο τύπου V και σε ιντεγκρίνες κι έτσι εμπλέκεται στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, την αγγειογένεση και την ογκογένεση⁽²³³⁾.

52) TSC22D3 (TSC22 domain family, member 3)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι πρωτεΐνη τύπου «φερμουάρ λευκίνης» που λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας. Η επίδραση των γλυκοκορτικοειδών και της ιντερλευκίνης 10 προκαλεί αύξηση της έκφρασης του γονιδίου TSC22D3. Φαίνεται ότι μέσω της πρωτεΐνης TSC22D3 ασκείται η αντιφλεγμονώδης και ανοσοκατασταλτική δράση των γλυκοκορτικοειδών και της ιντερλευκίνης 10⁽²³⁴⁾.

53) WEE1 (WEE1 homolog, *S. pombe*)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι μια κινάση τυροσίνης που εντοπίζεται στον πυρήνα και που απενεργοποιεί το σύμπλοκο CDC2/κυκλίνη B φωσφορυλιώνοντάς το. Έτσι λειτουργεί σαν αναστολέας του κυτταρικού κύκλου. Κατά τη διάρκεια της φάσης G2 του κυτταρικού κύκλου και της μίτωσης, η πρωτεΐνη WEE1 διασπάται για να επιτραπεί η συνέχιση της μιτωτικής διαδικασίας⁽²³⁵⁾.

54) ZFP36 (zinc finger protein 36 homolog)

Η ZFP36, γνωστή και ως Tristetraprolin (TTP), είναι μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται σε αλληλουχίες πλούσιες σε AU (AU-rich elements - AREs) στην 3-μη μεταφραζόμενη περιοχή του mRNA κάποιων κυτοκινών (μεταξύ των οποίων και του TNF-α) προκαλώντας την αποδόμησή του. Η έκφραση του γονιδίου ZFP36 επάγεται σε συνθήκες υποξίας κατά τις οποίες υπερεκφράζεται και το γονίδιο HIF-1 α. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η πρωτεΐνη ZFP36 συνδέεται στις AREs του mRNA του HIF-

1α προκαλώντας την αποδόμησή του, με συνέπεια η ZFP36 να αποτελεί ρυθμιστή της έκφρασης του HIF-1 α ^(236,237).

55) COQ10B (coenzyme Q10 homolog B, *S. cerevisiae*)

Οι πρωτεΐνες COQ είναι συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, αλλά συμμετέχουν και σε άλλες μεταβολικές διεργασίες του κυττάρου, όπως σηματοδότηση και ρύθμιση έκφρασης υποδοχέων⁽²³⁸⁾.

56) LOC500300

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο λέγεται και DEPP (decidual protein induced by progesterone). Η έκφρασή της επάγεται από την προγεστερόνη και αυτή με τη σειρά της επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Elk-1⁽²³⁹⁾.

57) RGD1311307 (όμοια με την πρωτεΐνη 1300014I06Rik [*Rattus norvegicus*])

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο, σύμφωνα με τη βάση πληροφοριών Pubmed, είναι πρωτεΐνη – προσαρμογέας που δημιουργεί συνδέσεις με τη φωσφατυδυλο-ινοσιτόλη.

58) RGD1359349 (όμοια με την υποθετική πρωτεΐνη MGC34760 [*Rattus norvegicus*])

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο, σύμφωνα με τη βάση πληροφοριών Pubmed, είναι διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη.

Στη συνέχεια παραθέτονται αναλυτικά πληροφορίες για το κάθε γονίδιο που υποεκφράστηκε με την άσκηση.

1) GIMAP9 (GTPase, IMAP family member 9)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι GTPάση που εντοπίζεται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, ενεργοποιείται μετά από διέγερση υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας και συνδέεται σε άλλες πρωτεΐνες – προσαρμογείς. Ανήκει στην υπο-οικογένεια των GTPασών που σχετίζονται με την ανοσολογική απάντηση (immuno-associated nucleotide –IAN- subfamily). Εμπλέκεται στην επιβίωση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος⁽²⁴⁰⁾.

2) LPAR6 (lysophosphatidic acid receptor 6)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι υποδοχέας του λυσοφωσφατιδικού οξέος που συνδέεται με G πρωτεΐνες (GPCR), ο οποίος σχετίζεται με τη διατήρηση του τριχωτού της κεφαλής στον άνθρωπο⁽²⁴¹⁾.

3) RGS4 (regulator of G-protein signaling 4)

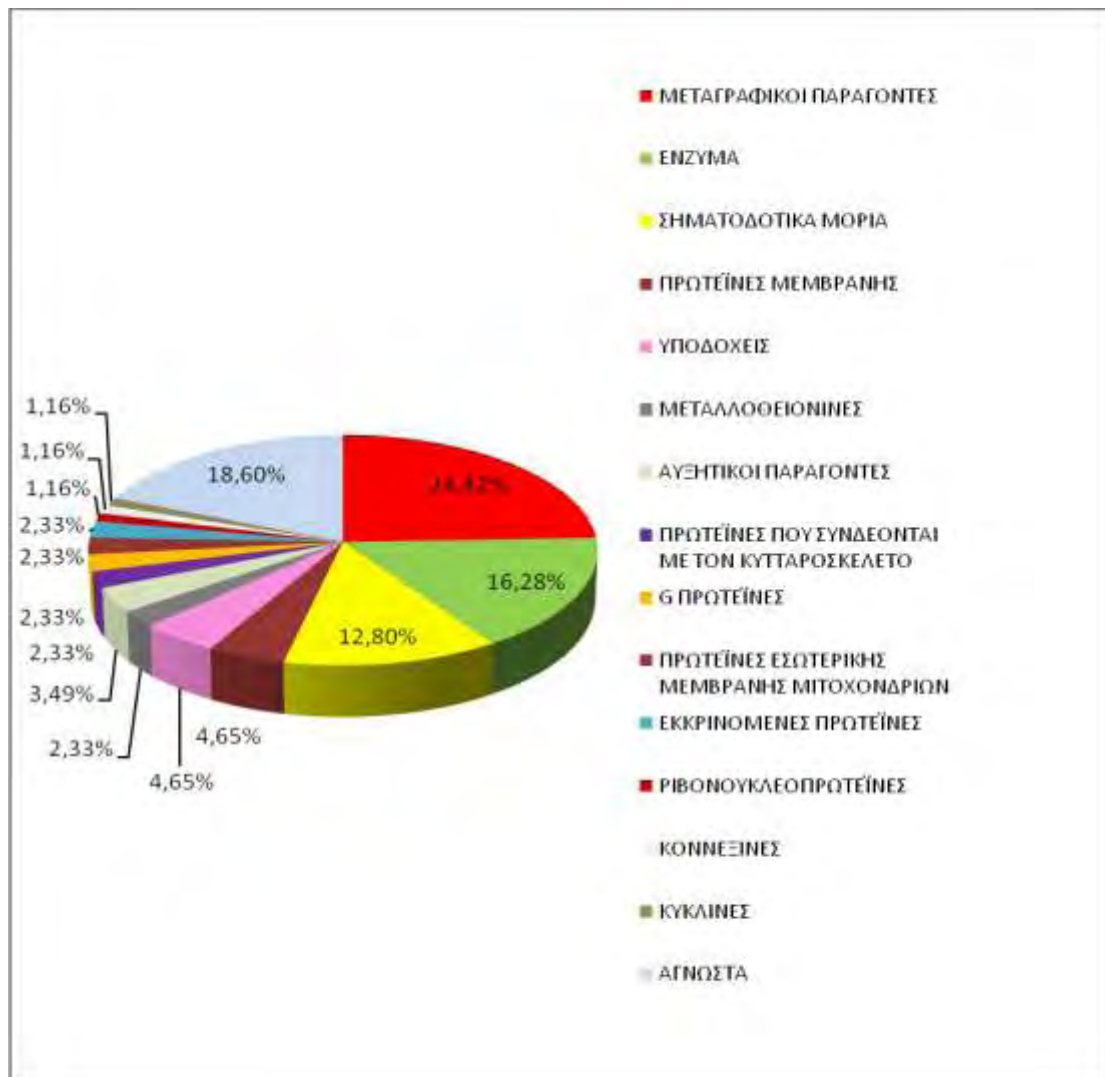
Οι πρωτεΐνες RGS είναι μόρια που ρυθμίζουν τη δράση GTPάσης της α- υπομονάδας των ετεροτριμερών G πρωτεϊνών, αυξάνοντας το ρυθμό υδρόλυσης του GTP. Έχουν συνεπώς ανασταλτική δράση στη σηματοδότηση των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες⁽²²¹⁾.

4) SOX18 (SRY (sex determining region Y)-box 18)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων SOX (SRY-related HMG-box) και σχετίζεται με την ανάπτυξη του τριχωτού της κεφαλής, των αιμοφόρων και των λεμφοφόρων αγγείων. Μεταλλάξεις του γονιδίου SOX18 έχουν συσχετιστεί με διάφορες μορφές του συνδρόμου υποτρίχωση- λεμφοίδημα- τηλαγγειεκτασία⁽²⁴²⁾.

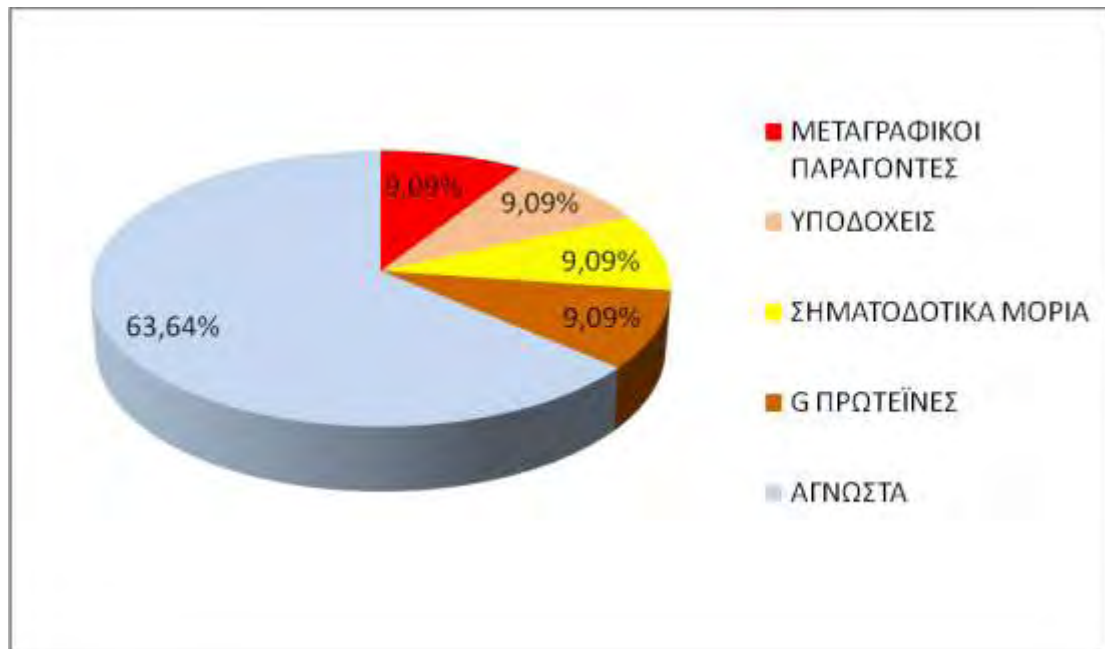
5.4. Λειτουργική κατηγοριοποίηση των γονιδίων που υπερ-εκφράζονται και υπο-εκφράζονται με την άσκηση

Από τα 86 γονίδια που υπερ-εκφράστηκαν, 24,42% κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, 16,28% ένζυμα, 12,8% σηματοδοτικά μόρια, 4,65% πρωτεΐνες μεμβρανών, 4,65% πρωτεΐνες-υποδοχείς, 2,33% μεταλλοθειονίνες, 3,49% αυξητικούς παράγοντες, 2,33% πρωτεΐνες που συνδέονται με τον κυτταροσκελετό, 2,33% G πρωτεΐνες, 2,33% πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, 2,33% εκκρινόμενες πρωτεΐνες, 1,16% κυκλίνες, 1,16% ριβονουκλεοπρωτεΐνες, 1,16% κοννεξίνες, ενώ 18,6% των γονιδίων επιτελούν άγνωστες λειτουργίες (διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Λειτουργική κατηγοριοποίηση γονιδίων που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση

Από τα 11 γονίδια που υπο-εκφράστηκαν, 9,09% κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, 9,09% πρωτεΐνες-υποδοχείς, 9,09% σηματοδοτικά μόρια, 9,09% G πρωτεΐνες, ενώ 63,64% των γονιδίων επιτελούν άγνωστες λειτουργίες (διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2: Λειτουργική κατηγοριοποίηση γονιδίων που υπο-εκφράζονται με την άσκηση

Είναι εμφανές ότι η εξαντλητική άσκηση προκάλεσε την υπερ-έκφραση πολλών μεταγραφικών παραγόντων, αλλά, επειδή τα πειραματόζωα θανατώθηκαν αμέσως μετά το πέρας της άσκησης, δεν πρόλαβε να εκδηλωθεί η δράση τους στην επαγωγή ή αναστολή της έκφρασης των γονιδίων στόχων τους. Πιθανώς γι' αυτό το λόγο τα γονίδια που υπο-εκφράστηκαν ήταν τόσο λίγα.

Επειδή τα γονίδια που υπο-εκφράστηκαν ήταν πολύ λίγα, είναι πολύ δύσκολο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω λεπτομερείς αναλύσεις. Συνεπώς οι αναλύσεις που περιγράφονται στην συνέχεια αφορούν μόνο τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση.

5.5. Δίκτυα και μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται (Ingenuity pathway analysis)

Με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής Ingenuity pathway analysis βρέθηκε ότι τα γονίδια που υπερ-εκφράστηκαν συμμετέχουν σε 5 δίκτυα γονιδίων που δεν αλληλεπικαλύπτονται. Στον πίνακα 19 φαίνονται τα γονίδια που συμμετέχουν σε κάθε δίκτυο, ενώ με έντονα γράμματα φαίνονται τα γονίδια που υπερ-εκφράστηκαν με την εξαντλητική άσκηση. Στη δεξιά στήλη αναφέρονται οι βασικές λειτουργίες του κάθε δικτύου.

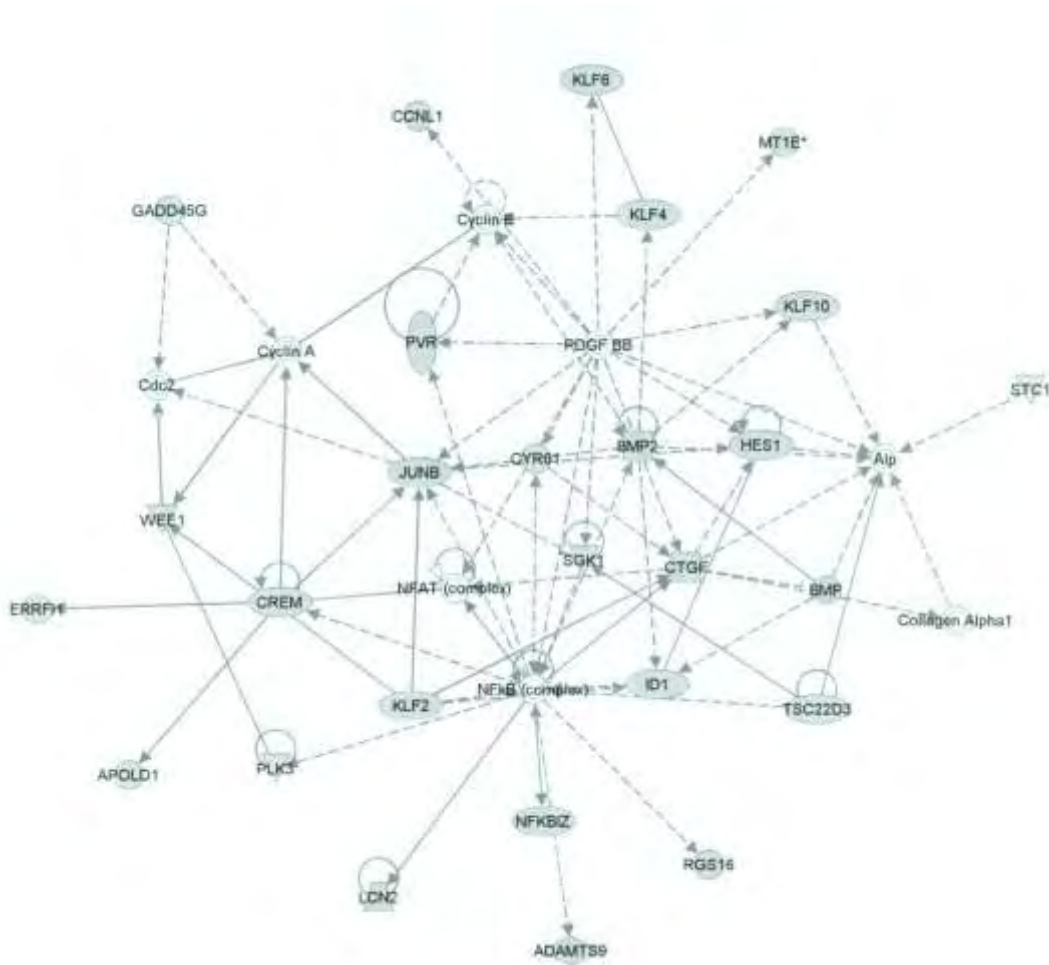
Πίνακας 19: Δίκτυα γονιδίων όπου συμμετέχουν τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση

	Molecules in Network	Score	Focus Molecule	Top Functions
1	ADAMTS9, Alp, APOLD1, BMP, BMP2, CCN1, Cdc2, Collagen Alpha1, CREM, CTGF, Cyclin A, Cyclin E, CYR61, ERRF1, GADD45G, HES1, ID1, JUNB, KLF2, KLF4, KLF6, KLF10, LCN2, MT1E*, NFAT (complex), NFkB (complex), NFKB1Z, PDGF BB, PLK3, PVR, RGS16, SGK1, STC1, TSC22D3, WEE1	63	26	Increased Levels of Alkaline Phosphatase, Reproductive System Disease, Cellular Growth and Proliferation
2	ADAMTS1, Ag1, Cbp/p300, Collagen type IV, Cret, EGR1, EGR3, ENC1, ERK1/2, FSH, GJA1, ICG, IRS2, Laminin, LDL, Lf, LRP, LRRC32, MAP2K1/2, Me1, NR4A1, NR4A3, P38 MAPK, Pdgf (complex), PFKFB3, Plc(s), PLAU, PTGS2, RGS2, RHOB, SERPINE1, STK1, Sos, Tgf beta, Vngf	32	16	Cardiovascular System Development and Function, Lymphoid Tissue Structure and Development, Cell-mediated Immune Response
3	ARC, BCL6B, C3, CCRN4L, CTTNBP2NL, DAP, Egr-ErbB2, ERBB2, FAM134B*, GBE1, GRTP1*, Histone H4, HPGDS, IFTT1B, Tfnar, IKBKG, IL17D, IL1B, LTBP3, Nmp, NR4A2, NRARP, NKN, P4HA2, PELI3, PEM3, PLAC8, PPM1L, PPP1R14A, PPP2CA, SCG5, SLC25A25, SPINT1, STAT4, TRIM1E	16	9	Cellular Compromise, Cellular Development, Cell-To-Cell Signaling and Interaction
4	Z6s Proteasome, Akt, ARRD3, Calmodulin, C32, Collagen type I, ERK, Histone H3, IER2, IgG, IKK (complex), IL1, IL12 (complex), Immunoglobulin, Insulin, Interferon alpha, Jnk, MT1F*, Nfat (family), NFkB (family), NFKBIA, p85 (p43), PDE4B, PI3K (complex), Pla, PPP1R15A, Ras, RNA polymerase II, SAT1, SNRPD1, SRC, TCR, Trf, Ubiquitin, ZFP36	14	9	Cell Morphology, Digestive System Development and Function, Inflammatory Disease
5	ADCY, ARHGAP26, ATP2A2, IAS, C10orf10, Caspase, CHST2, COQ10B, DUSP7, EPGN, ethylene glycol, Focal adhesion kinase, GALR3, GPR126, GPR176, HRH3, HRH4, HTRIF, LPAR4, LRRI3, MAP3K6, MAP3K9, Mapk, MAPKB, NMUR3, norepinephrine, PDEBB, PEBP4, PTGER4, RND1, ROPH4, SNX13, TNF, TNN, WNT10A	8	5	Cell Signaling, Molecular Transport, Nucleic Acid Metabolism

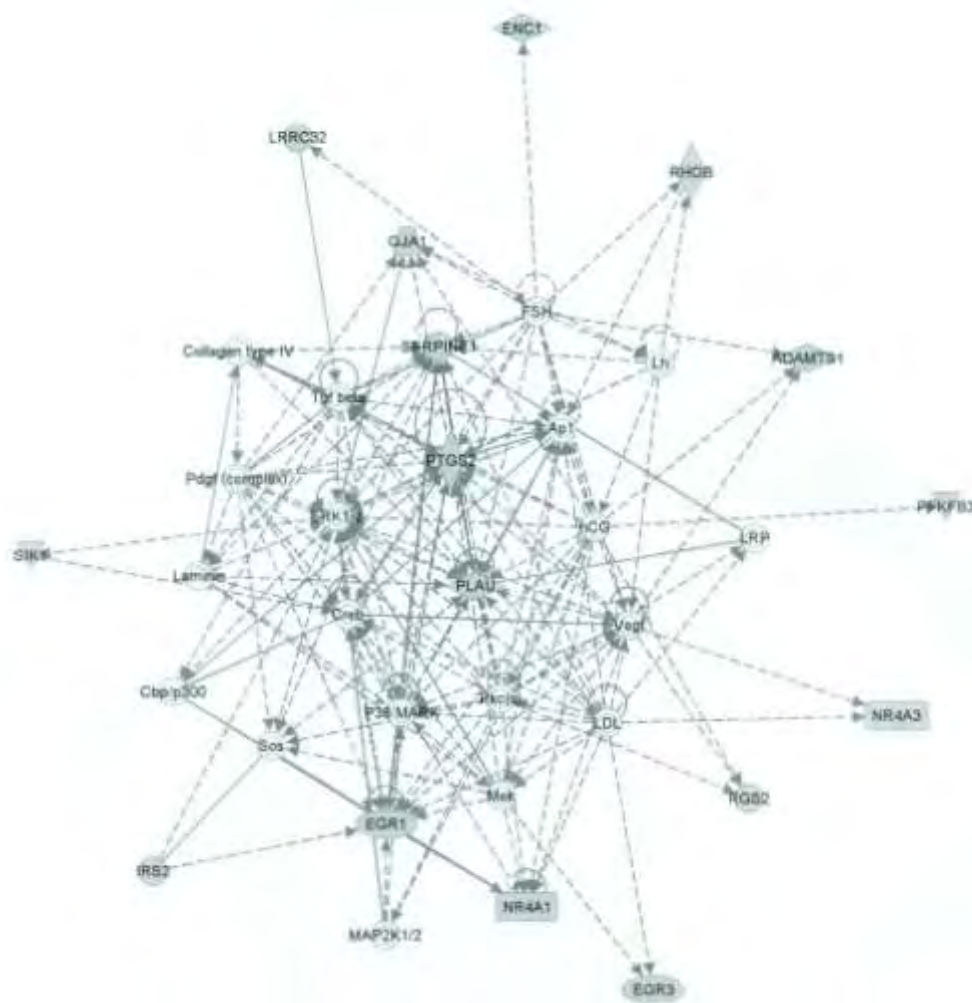
Στο πρώτο δίκτυο γονιδίων που περιλαμβάνει 35 γονίδια συμμετέχουν 26 από τα γονίδια που υπερ-εκφράστηκαν στην παρούσα μελέτη. Το δίκτυο αυτό σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης και κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό (εικόνα 13). Στο δεύτερο δίκτυο γονιδίων που περιλαμβάνει 35 γονίδια συμμετέχουν 16 από τα γονίδια που υπερ-εκφράστηκαν στην παρούσα μελέτη. Το δίκτυο αυτό σχετίζεται με την ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος και την κυτταρική ανοσία (εικόνα 14). Στο τρίτο δίκτυο γονιδίων που περιλαμβάνει 35 γονίδια συμμετέχουν 9 από τα γονίδια που υπερ-εκφράστηκαν στην παρούσα μελέτη. Το δίκτυο αυτό σχετίζεται με κυτταρική ανάπτυξη, κυτταρική σηματοδότηση και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις (εικόνα 15). Στο τέταρτο δίκτυο γονιδίων που περιλαμβάνει 35 γονίδια συμμετέχουν 9 από τα γονίδια που υπερ-εκφράστηκαν στην παρούσα μελέτη. Το δίκτυο αυτό σχετίζεται με μορφολογία των κυττάρων, ανάπτυξη και λειτουργία του πεπτικού συστήματος και φλεγμονώδεις καταστάσεις (εικόνα 16). Στο πέμπτο δίκτυο γονιδίων που περιλαμβάνει 35 γονίδια συμμετέχουν 5 από τα γονίδια που υπερ-εκφράστηκαν στην παρούσα μελέτη. Το δίκτυο αυτό σχετίζεται με μετάδοση σήματος, μεταφορά ουσιών και μεταβολισμό νουκλεϊκών οξέων (εικόνα 17).

Στις εικόνες 13, 14, 15, 16 & 17 με γκρι χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια του δικτύου που υπερ-εκφράστηκαν με την άσκηση, ενώ με λευκό χρώμα απεικονίζονται τα υπόλοιπα γονίδια του δικτύου και με βέλη σημειώνονται οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Ενδεικτικά στην εικόνα 13 το γονίδιο της αλκαλικής φωσφατάσης δεν υπερ-εκφράζεται με την άσκηση, όμως η έκφρασή του ρυθμίζεται

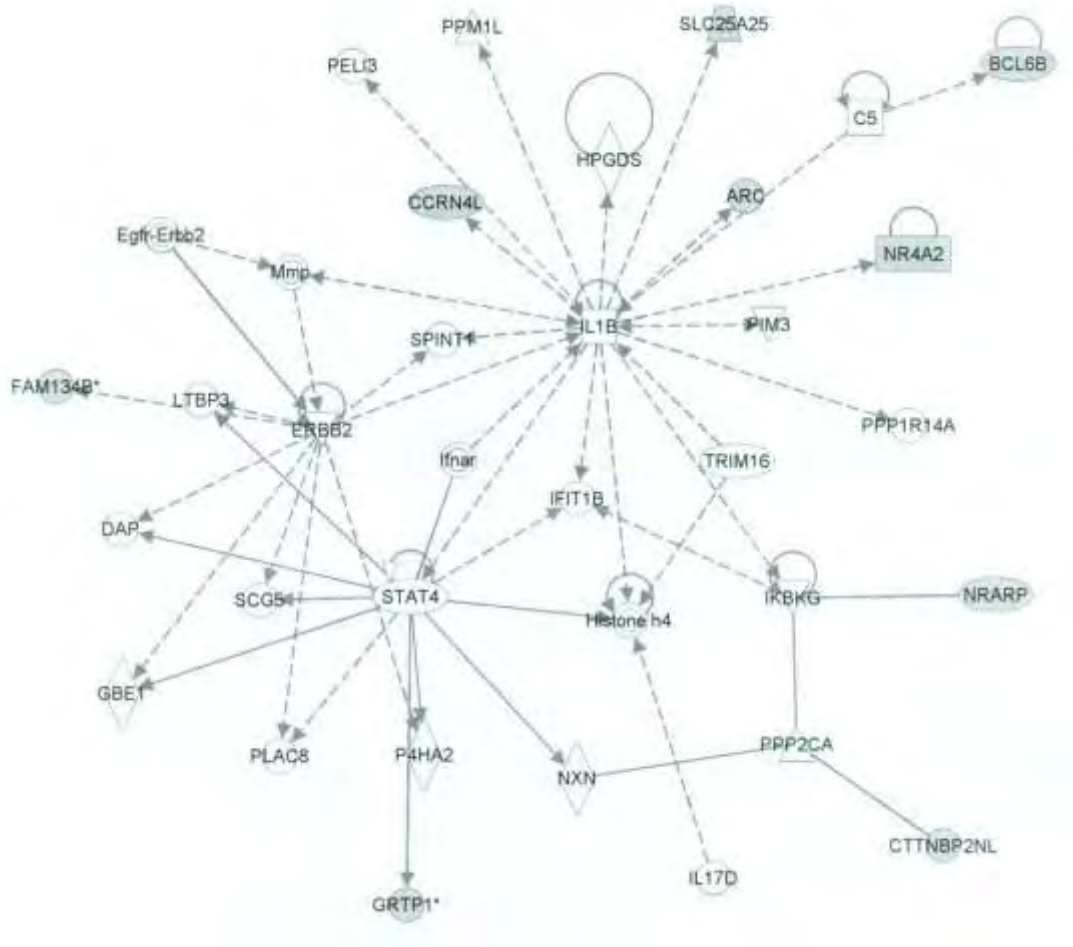
από πολλά άλλα γονίδια που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση (Klf10, Stc1, Hes1, Tsc22d3, Ctgf).



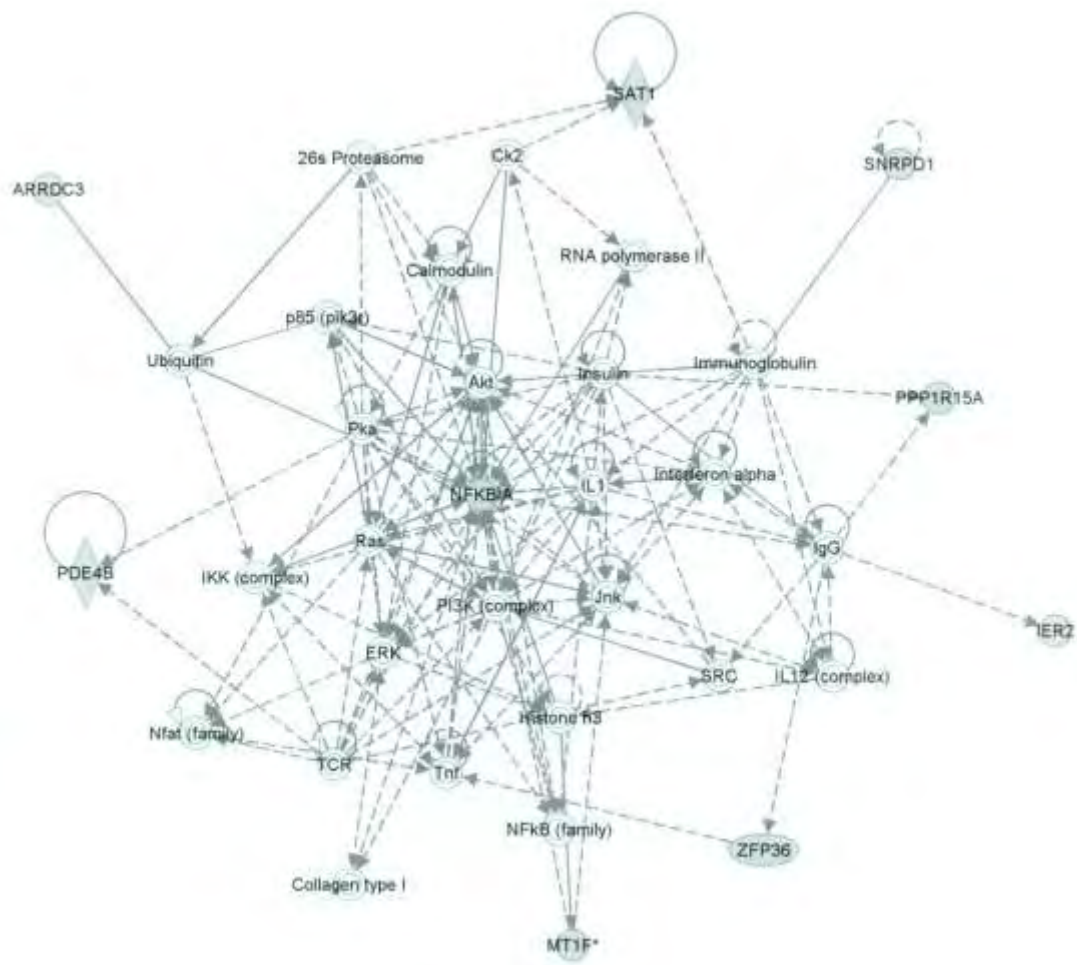
Εικόνα 13: 1^ο δίκτυο γονιδίων όπου συμμετέχουν 26 από τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση. Το δίκτυο αυτό σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης και κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό.



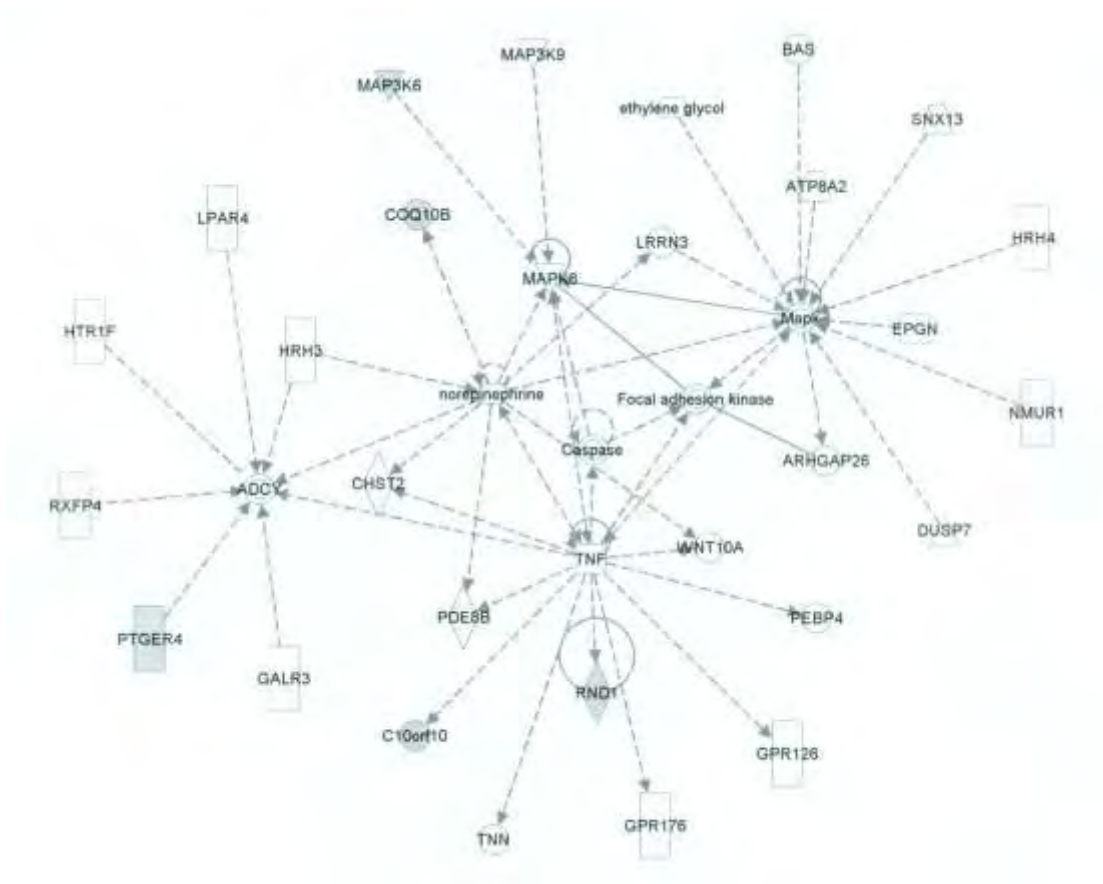
Εικόνα 14: 2^ο δίκτυο γονιδίων όπου συμμετέχουν 16 από τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση. Το δίκτυο αυτό σχετίζεται με την ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος και την κυτταρική ανοσία.



Εικόνα 15: 3^ο δίκτυο γονιδίων όπου συμμετέχουν 9 από τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση. Το δίκτυο αυτό σχετίζεται με κυτταρική ανάπτυξη, κυτταρική σηματοδότηση και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις.



Εικόνα 16: 4^ο δίκτυο γονιδίων όπου συμμετέχουν 9 από τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση. Το δίκτυο αυτό σχετίζεται με μορφολογία των κυττάρων, ανάπτυξη και λειτουργία του πεπτικού συστήματος και φλεγμονώδεις καταστάσεις.



Εικόνα 17: 5^ο δίκτυο γονιδίων όπου συμμετέχουν 5 από τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση. Το δίκτυο αυτό σχετίζεται με μετάδοση σήματος, μεταφορά ουσιών και μεταβολισμό νουκλεϊκών οξέων.

Ανεξάρτητα με το δίκτυο που συμμετέχει κάθε γονίδιο που υπερ-εκφράζεται με την άσκηση, είναι σημαντική η εύρεση των κυτταρικών λειτουργιών που επιτελούν τα γονίδια αυτά. Οι λειτουργίες αυτές σχετίζονται με κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό, κυτταρικό θάνατο, κυτταρική ανάπτυξη και έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και δίνονται στον πίνακα 20.

Πίνακας 20: Μοριακές και κυτταρικές λειτουργίες των γονιδίων που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση

Molecular and Cellular Functions

Name	p-value	# Molecules
Cellular Growth and Proliferation	1.42E-14 - 4.82E-03	44
Cell Death	7.62E-12 - 5.10E-03	40
Cellular Development	1.37E-08 - 5.06E-03	36
Cell Cycle	3.39E-08 - 5.10E-03	24
Cellular Compromise	1.69E-07 - 3.32E-03	8

Με το πρόγραμμα Ingenuity pathway analysis βρέθηκαν επίσης τα μονοπάτια μετάδοσης σήματος στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση και δίνονται στον πίνακα 21.

Πίνακας 21 : Μονοπάτια μετάδοσης σήματος στα οποία συμμετέχουν τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται

Top Canonical Pathways	
Name	p-value
IL-17A Signaling in Fibroblasts	6.21E-04
Glucocorticoid Receptor Signaling	1.4E-03
ILK Signaling	9.16E-03
MIF-mediated Glucocorticoid Regulation	1.02E-02
IGF-1 Signaling	1.22E-02

Παρατηρούμε ότι τρία μονοπάτια (IL-17A Signaling in Fibroblasts, Glucocorticoid Receptor Signaling και MIF-mediated Glucocorticoid regulation) σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση και τη φλεγμονή. Συγκεκριμένα η ιντερλευκίνη 17α εκκρινόμενη από ενεργοποιημένα T- κύτταρα αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα της ο οποίος εκφράζεται σε πολλά κύτταρα στο σώμα, όπως ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα⁽⁷⁾. Ο παράγοντας MIF (macrophage Migration Inhibitory Factor) μαζί με τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν την έναρξη και την ένταση της ανοσολογικής απόκρισης και φλεγμονής⁽²⁴³⁾. Φαίνεται λοιπόν ξεκάθαρα η παρουσία φλεγμονής.

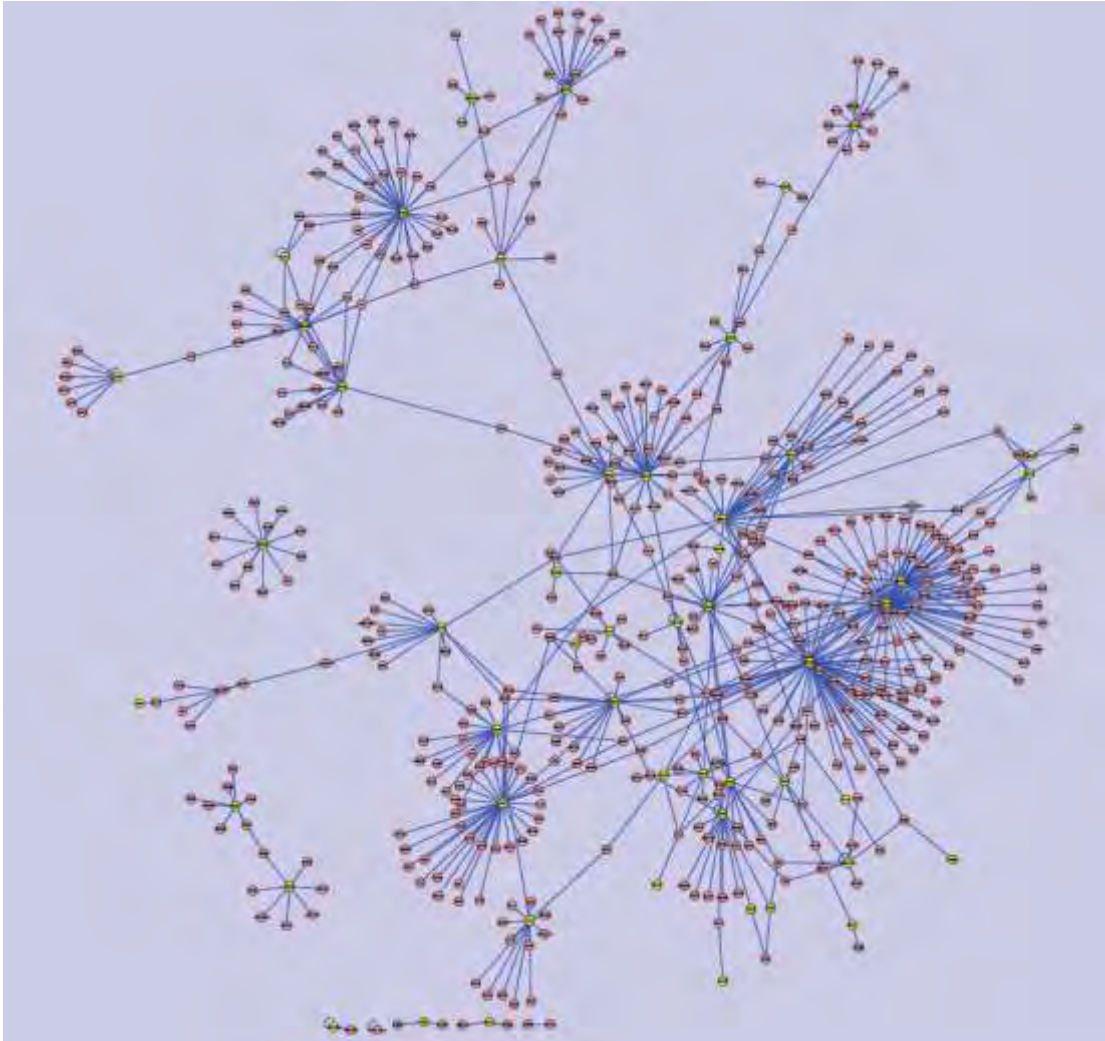
Το μονοπάτι ILK παίρνει το όνομά του από την Integrin Linked Kinase (κινάση που συνδέεται με ιντεγκρίνες). Είναι μονοπάτι που συνδέει την εξωκυττάρια ουσία με ιντεγκρίνες-πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης- και την ακτίνη του κυτταροσκελετού. Η εξωκυττάρια ουσία αποτελεί το δομικό υπόβαθρο που είναι απαραίτητο για το σχηματισμό των ιστών και των οργάνων. Δημιουργεί συνδέσεις με μόρια της επιφάνειας των κυττάρων και επηρεάζει ποικίλλα ενδοκυτταρικά μονοπάτια μετάδοσης σήματος που σχετίζονται με την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Ένα από αυτά είναι το μονοπάτι της ILK⁽²⁴⁴⁾.

Τέλος τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται συμμετέχουν στο μονοπάτι του IGF-1, ο οποίος όπως έχει αναφερθεί αποτελεί σημαντικό παράγοντα της ανάπτυξης των μυών.

5.6. Δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Cytoscape analysis)

Με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής cytoscape και χρησιμοποιώντας την HPRD (Human Protein Reference Database) γίνεται έλεγχος για το αν τα προϊόντα των

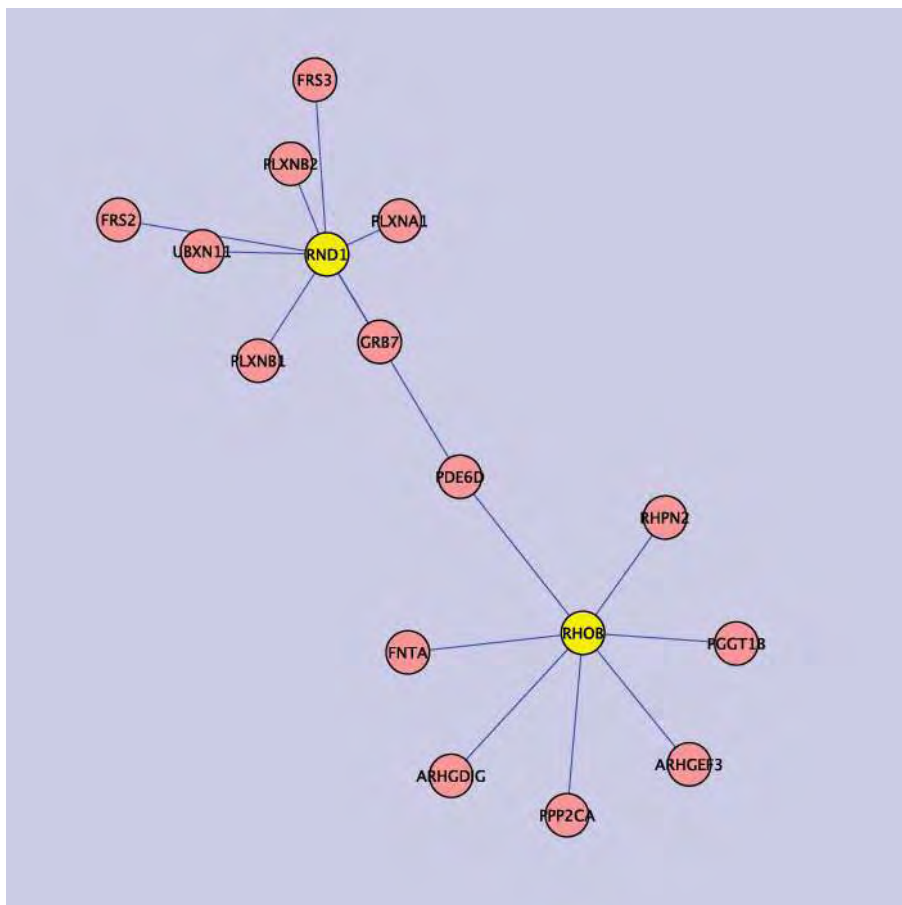
γονιδίων που υπερ-εκφράζονται αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες και με ποιες. Η HPRD είναι μια βάση δεδομένων που περιέχει όλες τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ανθρώπινων πρωτεϊνών που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία, είτε σε *in vivo*, είτε σε *in vitro* συστήματα. Το πρόγραμμα cytoscape απεικονίζει τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις ως δίκτυο, στο οποίο δε γίνεται καμία αναφορά στη λειτουργία των αλληλεπιδράσεων. Το δίκτυο αυτό απεικονίζεται στην εικόνα 18.



Εικόνα 18: Δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων

Με πορτοκαλί κύκλους συμβολίζονται οι πρωτεΐνες του δικτύου, ενώ με κίτρινο χρώμα συμβολίζονται οι πρωτεΐνες που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση. Εδώ δεν περιλαμβάνονται όλες οι πρωτεΐνες που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση γιατί κάποιες από αυτές έχουν άγνωστες λειτουργίες ενώ για άλλες δεν έχουν αναφερθεί αλληλεπιδράσεις ή δεν υπάρχει ομολογία με τις πρωτεΐνες του ανθρώπου.

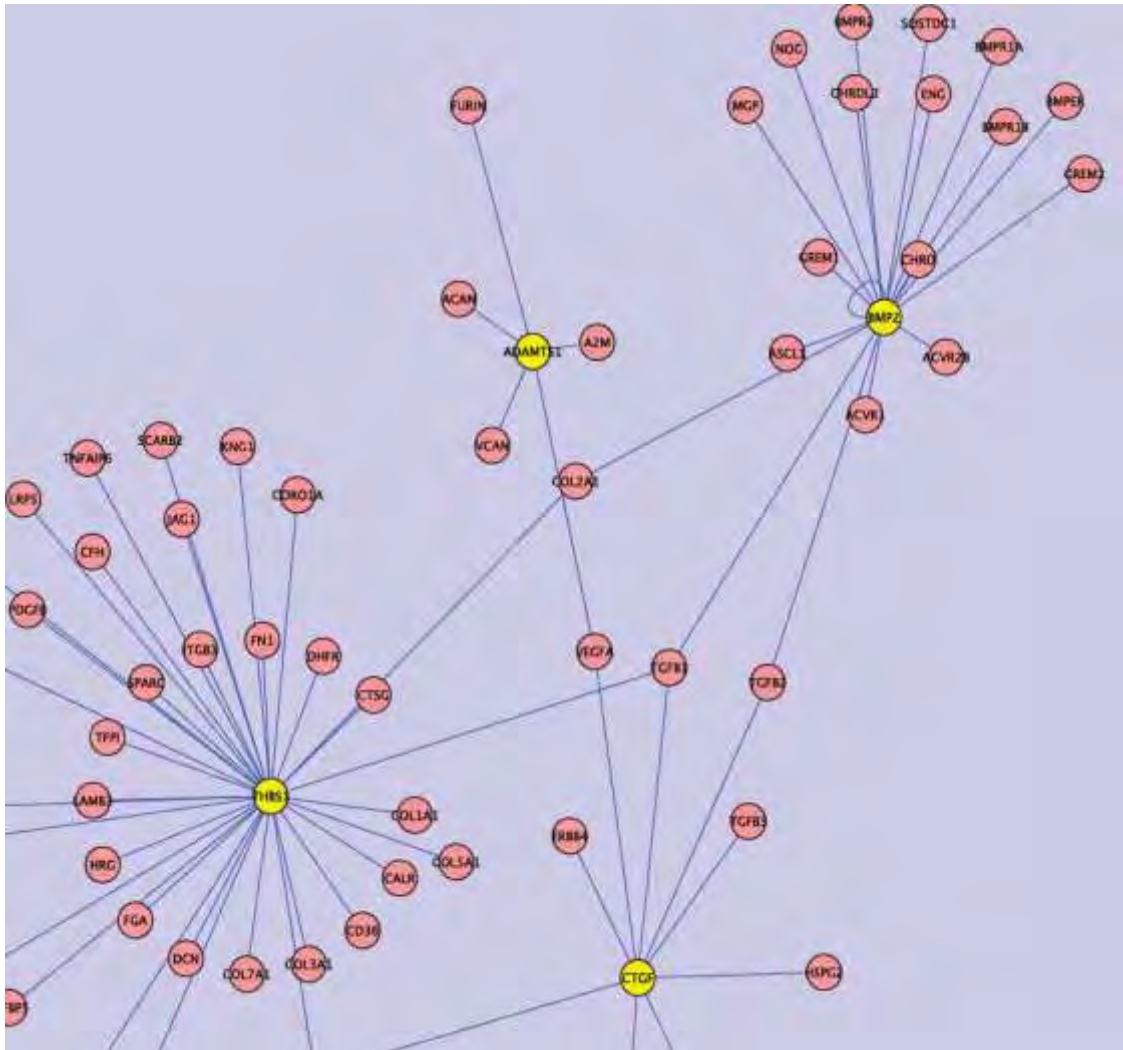
Μπορούμε να επικεντρωθούμε σε μέρη αυτού του δικτύου για περαιτέρω μελέτη όπως αυτό που απεικονίζεται στην εικόνα 19. Παρατηρούμε ότι οι πρωτεΐνες RND1 (Rho family GTPase 1) και RHOB (ras homolog gene family, member B) που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση δεν αλληλεπιδρούν άμεσα αλλά μέσω δυο άλλων πρωτεϊνών, των GRB7 και PDE6D, οι οποίες δεν βρέθηκαν να υπερ-εκφράζονται με την άσκηση, εντούτοις εκφράζονται σε σκελετικούς μύες τόσο σε ηρεμία όσο και στην άσκηση. Οι πρωτεΐνες RND1 (Rho family GTPase 1) και RHOB (ras homolog gene family, member B) είναι μικρές GTPάσες που εντοπίζονται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, ενεργοποιούνται μετά από διέγερση υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας και συνδέονται σε άλλες πρωτεΐνες - προσαρμογείς. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδιοργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού. Επίσης, εμπλέκονται στην κυτταρική μετανάστευση και προσκόλληση, στον έλεγχο της αύξησης των κυττάρων και στη μετακίνηση ουσιών διαμέσου των μεμβρανών. Η RHOB πιθανότατα ρυθμίζει τη διασπορά των κυτοκινών και την κυτταρική επιβίωση^(222,223,224).



Εικόνα 19: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών RND1 και RHOB

Ομοίως, στο τμήμα του δικτύου της εικόνας 20, οι πρωτεΐνες BMP2 (bone morphogenetic protein 2), CTGF (connective tissue growth factor) και THBS

(thrombospondin 1) που υπερ-εκφράζονται με την άσκηση αλληλεπιδρούν μέσω της πρωτεΐνης TGFB1, η οποία σχετίζεται με τη μυϊκή αναγέννηση⁽²⁴⁵⁾. Επίσης οι πρωτεΐνες ADAMTS1 (ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1) και CTGF (connective tissue growth factor) αλληλεπιδρούν μέσω του VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor), ο οποίος σχετίζεται με την αγγειογένεση^(111,112). Οι πρωτεΐνες TGFB1 και VEGFA δεν βρέθηκαν να υπερ-εκφράζονται με την άσκηση, εντούτοις εκφράζονται σε σκελετικούς μύες τόσο σε ηρεμία όσο και στην άσκηση.



Εικόνα 20: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών BMP2 , CTGF, THBS και μεταξύ ADAMTS1 και CTGF

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η επίδραση διαφόρων τύπων άσκησης στη γονιδιακή έκφραση σε σκελετικούς μύες θηλαστικών έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης διαφόρων ερευνητών. Η επίδραση αυτή έχει μελετηθεί με τις μεθόδους της ιστολογικής εξέτασης, της πρωτεομικής ανάλυσης ή, τα τελευταία χρόνια, με ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική των μικροσυστοιχιών για την ανάλυση της έκφρασης όλων των γονιδίων στο μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους μυ (EDL) επίμυων μετά από εξαντλητική αερόβια κολύμβηση. Μέχρι τώρα δεν έχει μελετηθεί η επίδραση αυτού του τύπου άσκησης σε σκελετικούς μύες.

Στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε ότι η συγκεκριμένη άσκηση επηρεάζει την έκφραση γονιδίων των οποίων οι λειτουργίες σχετίζονται με τη μυϊκή αναγέννηση (π.χ. GJA1, CTGF, Cyr61, Id1), το οξειδωτικό στρες (π.χ. Mt1a, Mt1b, Lcn2), τη φλεγμονή και την υποξία (π.χ. Ptgs2, Ptger4, Stc1, Plk3), τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση (π.χ. Nr4a1, Nr4a2, Nr4a3, Gadd45g) και το μεταβολισμό (π.χ. Pfkfb3, Irs2). Τα γονίδια αυτά θα αποτελέσουν στόχο περαιτέρω μελέτης.

Επιπλέον ταυτοποιήθηκαν μονοπάτια μετάδοσης σήματος που ενεργοποιούνται με το συγκεκριμένο τύπο άσκησης. Αυτά περιλαμβάνουν μονοπάτια που σχετίζονται με τη φλεγμονή και ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση αλλά και μονοπάτια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των μυών και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Η επιλογή αυτού του τύπου άσκησης (αερόβια κολύμβηση) έγινε με σκοπό την πρόκληση μικρής μυϊκής καταστροφής, σε αντίθεση με άλλους τύπους άσκησης, που χρησιμοποιούνται συχνά, όπως το τρέξιμο, στο οποίο η μυϊκή καταστροφή είναι πολύ μεγαλύτερη. Έτσι η επίδραση της άσκησης στη γονιδιακή έκφραση δεν θα είναι αποτέλεσμα της μυϊκής καταστροφής αλλά κυρίως της ίδιας της άσκησης. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε αυξημένη φλεγμονή στα ασκούμενα ζώα.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η επιλογή του EDL έγινε γιατί ο μυς αυτός παρουσιάζει έντονη συσταλτική δραστηριότητα κατά την κολύμβηση. Επιπλέον ο EDL ανήκει στην κατηγορία των μυών που αποτελούνται αποκλειστικά από μυϊκές ίνες ταχείας συστολής με αποτέλεσμα να μπορεί να αναπτύσσει δύναμη και να χαλαρώνει σχετικά γρήγορα, σε αντίθεση με άλλους τύπους μυών που αποτελούνται από μυϊκές ίνες βραδείας συστολής (π.χ. υποκνημίδιος μυς). Μπορούμε να υποθέσουμε ότι η επίδραση αυτού του τύπου άσκησης στην γονιδιακή έκφραση πιθανώς να εμφανίσει μεγαλύτερες διαφορές αν συγκριθούν μυϊκές ίνες ταχείας και βραδείας συστολής.

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι στο σύνολο των 29.214 μεταγράφων που εξετάστηκαν παρουσιάστηκαν διαφορές στην έκφραση μικρού αριθμού γονιδίων. Συγκεκριμένα 86 υπερ-εκφράστηκαν, ενώ πολύ λιγότερα (11) υπο-εκφράστηκαν. Επιπλέον ένα μεγάλο ποσοστό (24%) από τα γονίδια που υπερ-εκφράστηκαν με την εξαντλητική άσκηση είναι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι όπως είναι γνωστό με τη δράση τους ρυθμίζουν την έκφραση πολλών άλλων γονιδίων, είτε μέσω ενεργοποίησης είτε μέσω αναστολής. Από την άλλη πλευρά, με βάση το γεγονός ότι τα γονίδια που υπο-εκφράστηκαν είναι πολύ λίγα φαίνεται ότι η υπερ-έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων πιθανώς δεν έχει ολοκληρώσει τη δράση της σε περαιτέρω στόχους. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα πειραματόζωα θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση, και όχι κάποιες ώρες μετά. Με τη λογική αυτή θα ήταν ενδιαφέρουσα μια παρόμοια μελέτη ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης λίγες ώρες μετά το πέρας εξαντλητικής άσκησης.

Τέλος η ανάλυση αυτή μας επέτρεψε να ταυτοποιήσουμε δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (κάποια απλά και κάποια πιο περίπλοκα), οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν σημαντικό αντικείμενο για περαιτέρω μελέτες. Σε αρχικό στάδιο όμως είναι σημαντικό τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης να επιβεβαιωθούν χρησιμοποιώντας μια ανεξάρτητη τεχνική, όπως την real-time PCR.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Σμοκοβίτης Αθ. Φυσιολογία. Εκδοτικός οίκος αφών Κυριακίδη. Θεσσαλονίκη 1990.
2. Μιχαήλ Σ. Ιστολογία. 2^η Έκδοση. Θεσσαλονίκη 1986.
3. Wagers AJ, Conboy IM. Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell*. 2005 Sep 9; 122(5):659-67.
4. Dhawan J, Rando TA. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol*. 2005 Dec; 15(12):666-73.
5. Τρακατέλλης Α. Βιοχημεία. Τόμος Α', μέρος 2, μέρος 3α. Εκδοτικός οίκος αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη 1990.
6. Mougios V. Βιοχημεία της άσκησης. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. Αθήνα 2008.
7. Ζίφα Αμ. Διακυτταρική επικοινωνία- Μεταγωγή σήματος. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας 2009.
8. Σμοκοβίτης Αθ. Θέματα Φυσιολογίας Ζωικής Παραγωγής. Θεσσαλονίκη 1997.
9. Fiske and Subbarow. The nature of the "inorganic phosphate" in voluntary muscle. *Science* 22 April 1927: 401-403.
10. Smythe C, Cohen P. The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur. J. Biochem*. 1991 Sep 15;200(3):625-31.
11. McArdle W, Katch F, Katch V. Φυσιολογία της άσκησης. Τόμος 1. 2^η έκδοση. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. Αθήνα 2001.
12. Idström JP, Subramanian VH, Chance B, Scherstén T, Bylund-Fellenius AC. Energy metabolism in relation to oxygen supply in contracting rat skeletal muscle. *Fed Proc*. 1986 Dec; 45(13):2937-41.
13. Idström JP, Subramanian VH, Chance B, Scherstén T, Bylund-Fellenius AC. Biochemical and ³¹P-NMR studies of the energy metabolism in relation to oxygen supply in rat skeletal muscle during exercise. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1984; 169:489-96.
14. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*. 2001; 21:193-230.
15. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev*. 1995 Oct; 5(5):571-6.
16. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM,

- Staels B, Wahli W (2006). "International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors". *Pharmacol. Rev.* 58 (4): 726–41
17. Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5:156-70.
 18. Mylonas C, Kouretas D. 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* 13:295-309.
 19. Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol. Chem.* 2002; 383:375-88
 20. Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise- induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 2001; 10:125-40)
 21. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and chemistry.* New York: Oxford Science Publications. 1998.
 22. Sies H. *Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants.* New York: Academic Press. 1991.
 23. Watson JD, Caudy AA, Myers RM, Witkowski JA. Ανασυνδυασμένο DNA. Γονίδια και γονιδιώματα- Μια συνοπτική παρουσίαση. 3^η αγγλική έκδοση- 1^η ελληνική έκδοση. Επιστημονικές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και σία Ο.Ε. 2007.
 24. Schulze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays — a technology review. *Nature Cell Biology* 3, E190 - E195 (2001) doi:10.1038/35087138
 25. Patrinos GP, Ansorge W. Μοριακή Διαγνωστική. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. 2008.
 26. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science.* 1991 Feb 15; 251(4995):767-73.
 27. Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams CL. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature.* 1993 Aug 5; 364(6437):555-6.
 28. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 May 24 ; 91(11):5022-6.
 29. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995 Oct 20 ; 270(5235):467-70.
 30. Carlson LA, Tighe SW, Kenefick RW, Dragon J, Westcott NW, Leclair RJ. Changes in transcriptional output of human peripheral blood mononuclear cells following resistance exercise. *Eur J Appl Physiol* 2011 Mar.

31. Nakamura S, Kobayashi M, Sugino T, Kajimoto O, Matoba R, Matsubara K. Effect of exercise on gene expression profile in unfractionated peripheral blood leucocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010 Jan 1; 391(1): 846-51. Epub 2009 Nov 27.
32. Connolly PH, Caiozzo VJ, Zaldivar F, Nemet D, Larson J, Hung SP, Heck JD, Hatfield GW, Cooper DM. Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Appl Physiol.* 2004 Oct; 97(4): 1461-9. Epub 2004 Jun 11.
33. Liu D, Glaser AP, Patibandla S, Blum A, Munson PJ, McCoy JP, Raghavachari N, Cannon RO. Transcriptional profiling of CD133(+) cells in coronary artery disease and effects of exercise on gene expression. *Cytotherapy.* 2011. Feb; 13(2):227-36.
34. Kawai T, Morita K, Masuda K, Nishida K, Sekiyama A, Teshima-Kondo S, Nakaya Y, Ohta M, Saito T, Rokutan K. Physical exercise-associated gene expression signatures in peripheral blood. *Clin J Sport Med.* 2007 Sep; 17(5):375-83.
35. Zieker D, Zieker J, Dietzsch J, Burnet M, Northoff H, Fehrenbach E. C-DNA microarray analysis as a research tool for expression profiling in human peripheral blood following exercise. *Exerc. Immunol Rev.* 2005; 11:86-96.
36. Buttner P, Mosig S, Lechtermann A, Funke H, Mooren FC. Exercise affects the gene expression profiles of human white blood cells. *J Appl Physiol* 102: 26-36, 2007.
37. Diffie GM, Seversen EA, Stein TD, Johnson JA. Microarray expression analysis of effects of exercise training: increase in atrial MLC-1 in rat ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003. Mar; 284(3):H830-7.
38. Simonsen ML, Alessio HM, White P, Newsom DL, Hagerman AE. Acute physical activity effects on cardiac gene expression. *Exp. Physiol.* 2010. Nov; 95(11):1071-80.
39. Bye A, Langaas M, Hoydal MA, Kemi OJ, Heinrich G, Koch LG, Britton SL, Najjar SM, Ellingsen O, Wisloff U. Aerobic- capacity dependent differences in cardiac gene expression. *Physiol Genomics.* 2008. Mar 14; 33(1):100-9.
40. Matsumoto A, Mason SR, Fletcher-Bader T, Ward LC, Marsh SA, Wilce PA, Fassett RG, de Haan JB, Coombes JS. Effects of exercise and antioxidant supplementation on endothelial gene expression. *Int. J. Cardiol.* 2011. Feb 3.
41. Aoi W, Ichiishi E, Sakamoto N, Tsujimoto A, Tokuda H, Yoshikawa T. Effect of exercise on hepatic gene expression in rats: a microarray analysis. *Life Sci.* 2004. Nov 12; 75(26):3117.
42. Lee KY, Kim SJ, Cha YS, So JR, Park JS, Kang KS, Chon TW. Effect of exercise on hepatic gene expression in an obese mouse model using cDNA microarrays. *Obesity (Silver Spring).* 2006. Aug; 14(8):1294-302.
43. Teerapornpuntakit J, Dorkkam N, Wongdee K, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Endurance swimming stimulates trans epithelial calcium transport and alters the

- expression of genes related to calcium absorption in the intestine of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Apr; 296(4):E775-86.
44. Capomaccio S, Cappelli K, Barrey E, Felicetti M, Silvestrelli M, Verini- Supplizi A. Microarray analysis after strenuous exercise in peripheral blood mononuclear cells of endurance horses. *Anim. Genet.* 2010. Dec ; 41 Suppl2:166-75.
 45. Flück M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003; 146:159-216.
 46. Wittwer M, Billeter R, Hoppeler H, Flück M. Regulatory gene expression in skeletal muscle of highly endurance-trained humans. *Acta Physiol Scand.* 2004 Feb; 180(2):217-27.
 47. Radom-Aizik S, Hayek S, Shahar I, Rechavi G, Kaminski N, Ben-Dov I. Effects of aerobic training on gene expression in skeletal muscle of elderly men. *Med Sci Sports Exerc.* 2005 Oct; 37(10):1680-96.
 48. Melov S, Tarnopolsky MA, Beckman K, Felkey K, Hubbard A (2007) Resistance Exercise Reverses Aging in Human Skeletal Muscle. *PLoS ONE* 2(5): e465.
 49. Liu D, Sartor MA, Nader GA, Gutmann L, Treutelaar MK, Pistilli EE, IglayReger HB, Burant CF, Hoffman EP, Gordon PM. Skeletal muscle gene expression in response to resistance exercise: sex specific regulation. *BMC Genomics* 2010, 11:659
 50. Urso ML, Scrimgeour AG, Chen YW, Thompson PD, Clarkson PM. Analysis of human skeletal muscle after 48h immobilization reveals alterations in mRNA and protein for extracellular matrix components. *J Appl Physiol.* 2006 Oct; 101(4):1136-48.
 51. Roth SM, Ferrell RE, Peters DG, Metter EJ, Hurley BF, Rogers MA. Influence of age, sex, and strength training on human muscle gene expression determined by microarray. *Physiol Genomics.* 2002 September 3; 10(3): 181–190.
 52. Stepto NK, Coffey VG, Carey AL, Ponnampalam AP, Canny BJ, Powell D, Hawley JA. Global gene expression in skeletal muscle from well-trained strength and endurance athletes. *Medicine & Science in Sports & Exercise.* March 2009-vol.41-issue 3-546-565.
 53. Mahoney DJ, Parise G, Melov S, Safdar A, Tarnopolsky MA. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB J.* 2005.Sep; 19(11):1498-500.
 54. Klossner S, Dapp C, Schmutz S, Vogt M, Hoppeler H, Fluck M. Muscle transcriptome adaptations with mild eccentric ergometer exercise. *Pflugers Arch.* 2007.Dec; 455(3):555-62.
 55. Pollanen E, Fey V, Tormakangas T, Ronkainen PH, Taaffe DR, Takala T, Koskinen S, Cheng S, Puolakka J, Kujala UM, Suominen H, Sipila S, Kovanen V. Power training

- and postmenopausal hormone therapy affect transcriptional control of specific co-regulated gene clusters in skeletal muscle. *Age (Dordr)*. 2010 Sep; 32(3):347-63.
56. MacNeil LG, Melov S, Hubbard AE, Baker SK, Tarnopolsky MA. Eccentric exercise activates novel transcriptional regulation of hypertrophic signaling pathways not affected by hormone changes. *PLoS One*. 2010 May 18;5(5):e10695.
 57. Northoff H, Symons S, Zieker D, Schaible EV, Schafer K, Thoma S, Loffler M, Abbasi A, Simon P, Niess AM, Fehrenbach E. Gender- and menstrual phase dependent regulation of inflammatory gene expression in response to aerobic exercise. *Exerc.Immunol Rev*. 2008;14:86-103.
 58. McKenzie MJ, Goldfarb AH. Aerobic exercise bout effects on gene transcription in the rat soleus. *Med Sci Sports Exerc*. 2007 Sep; 39(9):1515-21.
 59. Wu H, Gallardo T, Olson EN, Williams RS, Shohet RV. Transcriptional analysis of mouse skeletal myofiber diversity and adaptation to endurance exercise. *J Muscle Res Cell Motil*. 2003;24(8):587-92.
 60. Brass EP, Peters MA, Hinchcliff KW, He YD, Ulrich RG. Temporal pattern of skeletal muscle gene expression following endurance exercise in Alaskan sled dogs. *J Appl Physiol*. 2009 Aug; 107(2):605-12.
 61. McGivney BA, Eivers SS, MacHugh DE, MacLeod JN, O’Gorman GM, Park SD, Katz LM, Hill EW. Transcriptional adaptations following exercise in thoroughbred horse skeletal muscle highlights molecular mechanisms that lead to muscle hypertrophy. *BMC Genomics*. 2009 Dec 30; 10:638.
 62. Choi S, Liu X, Li P, Akimoto T, Lee SY, Zhang M, Yan Z. Transcriptional profiling in mouse skeletal muscle following a single bout of voluntary running: evidence of increased cell proliferation. *J Appl Physiol*. 2005 Dec; 99(6):2406-15.
 63. Cushman SW, Goodyear LJ, Pilch PF, Ralston E, Galbo H, Ploug T, Kristiansen S, Klip A. Molecular mechanisms involved in GLUT4 translocation in muscle during insulin and contraction stimulation. *Adv Exp Med Biol*. 1998; 441:63-71.
 64. James DE, Brown R, Navarro J, Pilch PF. Insulin- regulatable tissues express a unique insulin- sensitive glucose transport protein. *Nature* 333, 183-185. 1988.
 65. Cushman SW, Goodyear LJ, Pilch PF, Ralston E, Galbo H, Ploug T, Kristiansen S, Klip A. Molecular mechanisms involved in GLUT4 translocation in muscle during insulin and contraction stimulation. *Adv Exp Med Biol*. 1998; 441:63-71.
 66. Lund S, Holman GD, Schmitz O, Pedersen O. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 1995 June 20; 92(13): 5817-5821.

67. MacLean PS, Zheng D, Dohm GL. Muscle glucose transporter (GLUT 4) gene expression during exercise. *Exerc Sport Sci Rev.* 2000 Oct; 28(4):148-52.
68. Bustamante E, Pedersen P. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 74, No. 9, pp. 3735-3739, September 1977.
69. Kraniou Y, Cameron-Smith D, Misso M, Collier G, Hargreaves M. Effects of exercise on GLUT-4 and glycogenin gene expression in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2001 Jan;90 (1):401-2.
70. Cheng IS, Lee NY, Liu KL, Liao SF, Huang CH, Kuo CH. Effect of postexercise carbohydrate supplementation on glucose uptake-associated gene expression in the human skeletal muscle. *J Nutr Biochem.* 2005 May; 16(5):267-71.
71. Chibalin AV, Yu M, Ryder JW, Song XM, Galuska D, Krook A, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan 4; 97(1):38-43.
72. Zhaosheng T, Li Y, Chengying G, Land Y, Lian Z. Effect of exercise on the expression of adiponectin mRNA and GLUT4 mRNA in type 2 diabetic rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology -- Medical Sciences -- Volume 25, Number 2, 191-193.*
73. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in health and disease *Physiol Rev* 89: 1025–1078, 2009;doi:10.1152/physrev.00011.2008.
74. Kemp BE, Mitchelhill K, Stapleton D, Michell B, Chen ZP, Witters L. Dealing with the energy demand: the AMP- activated protein kinase (Review article). *Trends Biochem Sci* 24:22-25, 1999.
75. Zheng D, MacLean P, Pohnert S, Knight J, Olson A, Winder W, Dohm G. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP- activated protein kinase. *J Appl Physiol* 91:1073-1083, 2001.
76. Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, Young LH, Semenkovich CF, Shulman GI. Chronic activation of AMP-kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol* 281:E1340-E1346, 2001.
77. Fujii N, Hayashi T, Hirshman MF, Smith JT, Habinowski S A, Kaijser L. Exercise Induces Isoform-Specific Increase in 5'AMP-Activated Protein Kinase Activity in Human Skeletal Muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 273, Issue 3, 14 July 2000, Pages 1150-1155.

78. McGee SL, Howlett KF, Starkie RL, Cameron-Smith J, Kemp BE, Hargreaves M. Exercise increases Nuclear AMPK α 2 in human skeletal muscle. *Diabetes* 52:926-928, 2003.
79. Musi N, Fujii N, Hirshman MF, Ekberg I, Fröberg S, Ljungqvist O, Thorell A, Goodyear L J. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Activated in Muscle of Subjects With Type 2 Diabetes During Exercise. *Diabetes*. 2001 May; 50(5):921-7.
80. Yeo SE, McGee SL, Garnham A, McConell G, Hargreaves M. The effects of exercise on skeletal muscle GLUT4 expression in patients with type 2 diabetes . *FASEB J*. April 2010 24 989.5
81. Tunstall RJ, Mehan KA, Wadley GD, Collier GR, Bonen A, Hargreaves M, Cameron-Smith D . Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Jul; 283(1):E66-72.
82. Helge JW, Rehrer NJ, Pilegaard H, Manning P, Lucas SJ, Gerrard DF, Cotter JD. Increased fat oxidation and regulation of metabolic genes with ultraendurance exercise. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007 Sep; 191(1):77-86.
83. Gore M, Fiebig R, Hollander J, Leeuwenburgh C, Ohno H, Ji LL. Effect of exercise on lipoprotein lipase activity and expression in skeletal muscle of the rat. *Science & Sports*, Volume 15, Issue 5, September-October 2000, Pages 254-257
84. Lin J, Wu H, Tarr PT et al. Transcriptional co-activator PGC-1 drives the formation of slow- twitch muscle fibres. *Nature*. 2002; 418(6899):797-801.
85. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, et al. Restoration of insulin- sensitive glucose transporter (GLUT-4) gene expression in muscle cells by the transcriptional co-activator PGC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98(7):3820-3825.
86. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic co-activator PGC-1. *Cell*. 1999; 98(1):115-124.
87. Lin J, Tarr PT, Yang R et al. PGC-1 β in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*.2003; 278(33):30843-30848.
88. Adhihetty PJ, Uguccioni G, Leick L, Hidalgo J, Pilegaard H, Hood DA. The role of PGC-1 α on mitochondrial function and apoptotic susceptibility in muscle. *Am.J.Physiol*.2009; 297(1):C217-225.
89. Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 α cooperates with peroxisome proliferator- activated receptor α in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Molecular and cellular Biology*. 2000; 20(5):1868-1876.

90. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1, NRF-2) and PGC-1 family coactivators. . *Molecular and cellular Biology*. 2005; 25(4):1354-1366.
91. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006; 97(4): 673-683.
92. Hus JM, Kopp RP, Kelly DP. Peroxisome proliferator- activated receptor coactivator –1 α (PGC-1 α) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor – α and – γ . *J Biol. Chem*. 2002; 277:40265-40274.
93. Schreiber SN, Knutti D, Brogli K, Uhlmann T, Kralli A. The transcriptional co-activator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen- related receptor α (ERR α). *J Biol Chem* 2003; 278:9013-9018.
94. Schreiber SN, Emter R, Hock MB et al. The estrogen- related receptor α (ERR α) functions in PPAR- γ coactivator 1 α (PGC-1 α) - induced mitochondrial biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101(17):6472-6477.
95. Narkar VA, Downes M, Yu RT et al. AMPK and PPAR- δ agonists are exercise mimetics. *Cell* 2008;134(3):405-415
96. Wang YX, Zhang CL, Yu RT, et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR- δ . *PloS Biology*. 2004;2(10,article e294)
97. Puigserver P, Rhee J, Lin J et al. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPAR- γ coactivator- 1. *Mol Cell* 2001; 8:971-982.
98. Knutti D, Kressler D, Kralli A. Regulation of the transcriptional co-activator PGC-1 via MAPK sensitive interaction of PPAR- γ coactivator 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9713-9718.
99. Boppart MD, Asp S, Wojtaszewski JFP, Fielding RA, Mohr T, Goodyear LJ. Marathon running transiently increases c-Jun NH₂-terminal kinase and p38 activities in human skeletal muscle. *J Physiol* 2000; 526.3:663-669.
100. Widegren U, Jiang XJ, Krook A et al. Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. *FASEB J* 1998; 12:1379-1389.
101. Wright DC, Han D-H, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE, Holloszy JO. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1 α expression. *J Biol Chem* 2007; 282:194-199.

102. Akimoto T, Pohnert SC, Li P et al. Exercise stimulates PGC-1 α transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem* 2005; 280:19587-19593.
103. Baar K, Wende AR, Jones TE et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: Rapid increase in the transcriptional co-activator PGC-1. *FASEB J* 2002; 16:1879-1886.
104. Goto M, Terada S, Kato M et al. cDNA cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epithroclearis muscle in swimming- exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274:350-354.
105. Terada S, Goto M, Kato M, Kawanaka K, Shimokawa T, Tabata I. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epithroclearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296:350-354.
106. Miura S, Kawanaka K, Kai Y, Tamura M, Goto M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Ezaki O. An increase in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) mRNA in response to exercise is mediated by beta-adrenergic receptor activation. *Endocrinology*. 2007 Jul; 148(7):3441-8.
107. Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2003; 546:851-858.
108. Birot J. G O., Koulmann N, Peinnequin A. Bigard X A. Exercise-induced expression of vascular endothelial growth factor mRNA in rat skeletal muscle is dependent on fibre type. *J Physiol* 2003. 552.1, 213-221.
109. Ozawa K, Kondo T, Hori O, Kitao Y, Stern DM, Eisenmerger W, Ogawa S, Ohshima T. 2001. Expression of the oxygen-regulated protein ORP-150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. *J Clin Invest* 108, 41-50.
110. Gerber H-P, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. *J Biol Chem* 1997. 272, 23659-23667.
111. Folkman J, Shin Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992. 267, 10931-10934.
112. Ferrara N. 2001. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1358- 1366.
113. Kivelä R, Silvennoinen M, Lehti M, Kainulainen H, Vihko V. Effects of acute exercise, exercise training, and diabetes on the expression of lymphangiogenic growth factors and lymphatic vessels in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Oct; 293(4):H2573-9.

114. Lloyd PG, Prior BM, Yang HT, Terjung RL. 2003. Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol* 284, H1668-1678.
115. Brutsaert TD, Gavin TP, Fu Z, Breen EC, Tang K, Mathieu-Costello O, Wagner PD. 2002. Regional differences in expression of VEGF mRNA in rat gastrocnemius following 1 h exercise or electrical stimulation. *BMC Physiol* 2, 8-18.
116. Ookawara T, Suzuki K, Haga S, Ha S, Chung KS, Toshinai K, Hamaoka T, Katsumura T, Takemasa T, Mizuno M, Hitomi Y, Kizaki T, Suzuki K, Ohno H. Transcription regulation of gene expression in human skeletal muscle in response to endurance training. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2002; 111(1-4):41-54.
117. Ameln H, Gustafsson T, Sundberg CJ, Okamoto K, Jansson E, Poellinger L, Makino Y. Physiological activation of hypoxia inducible factor-1 in human skeletal muscle. *FASEB* 2005;19:1009-1011
118. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci*. 1999 Jul;55(8-9):1078-87.
119. Spier SA, Delp MD, Meininger CJ, Donato AJ, Ramsey MW, Muller-Delp JM. Effects of ageing and exercise training on endothelium-dependent vasodilatation and structure of rat skeletal muscle arterioles. *J Physiol*. 2004 May 1;556(Pt 3):947-58. Epub 2004 Mar 5.
120. Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardó FV, Sastre J, Ji LL, Viña J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*. 2005 Aug 15; 567(Pt 1):113-20. Epub 2005 Jun 2.
121. Hill M, Goldspink G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. 2003 Jun 1; 549(Pt 2):409-18. Epub 2003 Apr 11 *J Physiol*.
122. Matsakas A, Nikolaidis MG, Kokalás N, Mougios V, Diel P. Effect of voluntary exercise on the expression of IGF-I and androgen receptor in three rat skeletal muscles and on serum IGF-I and testosterone levels. *Int J Sports Med*. 2004 Oct; 25(7):502-8.
123. Leĩsoo TA, Turtikova OV, Shenkman BS [Insulin-like growth factor-I splice-variants expression and myosatellite cells in the rat m. soleus under unloading and passive stretch] *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2010 Mar; 96(3):226-36.

124. Wilborn CD, Taylor LW, Greenwood M, Kreider RB, Willoughby DSEffects of different intensities of resistance exercise on regulators of myogenesis. *J Strength Cond Res.* 2009 Nov; 23(8):2179-87.
125. Hameed M, Lange KH, Andersen JL, Schjerling P, Kjaer M, Harridge SD, Goldspink G. The effect of recombinant human growth hormone and resistance training on IGF-I mRNA expression in the muscles of elderly men. *J Physiol.* 2004 Feb 15; 555(Pt 1):231-40. Epub 2003 Oct 17.
126. Hameed M, Toft AD, Pedersen BK, Harridge SD, Goldspink G.Scand J .Effects of eccentric cycling exercise on IGF-I splice variant expression in the muscles of young and elderly people. *Med Sci Sports*2008 Aug;18(4):447-52. Epub 2007 Dec 7.
127. Zhang K, Sha J, and. Harter ML. Activation of Cdc6 by MyoD is associated with the expansion of quiescent myogenic satellite cells. *The Journal of Cell Biology,* 2010; DOI: 10.1083/jcb.200904144.
128. Willoughby DS, Nelson MJ. Myosin heavy-chain mRNA expression after a single session of heavy-resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2002 Aug; 34(8):1262-9.
129. Willoughby DS. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. *Med Sci Sports Exerc.* 2004 Apr; 36(4):574-82.
130. Pedro J. Silva, Pedro A. Fernandes and Maria J. Ramos (2003) A theoretical study of radical-only and combined radical/carbocationic mechanisms of arachidonic acid cyclooxygenation by prostaglandin H synthase. *Theoretical Chemistry Accounts,* 110, 345-351.
131. Carey AL, Watt MJ, Febbraio MA. Cytokine gene expression in human skeletal muscle during concentric contraction: evidence that IL-8, like IL-6, is influenced by glycogen availability. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004 Aug; 287(2):R322-7. Epub 2004 Apr 8.
132. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C , Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdieh M et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 13 May 1994: Vol. 264 no. 5161 pp. 965-968
133. Quinn L S, Haug K L Damon S E. Interleukin-15 Stimulates C2 Skeletal Myoblast Differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 239, Issue 1, 9 October 1997, Pages 6-10
134. Quinn LS, Strait-Bodey L, Anderson BG, Argilés JM, Havel PJ. Interleukin-15 stimulates adiponectin secretion by 3T3-L1 adipocytes: Evidence for a skeletal muscle-to-fat signaling pathway *Cell Biol Int.* 2005 Jun; 29(6):449-57.

135. Nieman DC, Davis JM, Henson DA, Walberg-Rankin J, Shute M, Dumke CL, Utter AC, Vinci DM, Carson JA, Brown A, Lee WJ, McAnulty SR, McAnulty LS. Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run. *J Appl Physiol*. 2003 May; 94(5):1917-25. Epub 2003 Jan 17.
136. Nieman DC, Davis JM, Brown VA, Henson DA, Dumke CL, Utter AC, Vinci DM, Downs MF, Smith JC, Carson J, Brown A, McAnulty SR, McAnulty LS. Influence of carbohydrate ingestion on immune changes after 2 h of intensive resistance training. *J Appl. Physiol*. 96, 2004, 1292-1298.
137. Riechman SE, Balasekaran G, Roth SM, Ferrell RE. Association of interleukin-15 protein and interleukin-15 receptor genetic variation with resistance exercise training responses. *J. Appl. Physiol*.97, 2004, 2214-2219.
138. Nielsen AR, Mounier R, Plomgaard P, Mortensen OH , Penkowa M, Speerschneider T, Pilegaard H, Pedersen B K. Expression of interleukin-15 in human skeletal muscle – effect of exercise and muscle fibre type composition *J Physiol* 584.1 (2007) pp 305–312 305
139. Bamford RN, DeFilippis AP, Azimi N, Kurys G, Waldmann TA. The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control. *J Immunol*. 1998 May 1; 160(9):4418-26.
140. Buford TW, Cooke MB, Willoughby DS. Resistance exercise-induced changes of inflammatory gene expression within human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2009 Nov; 107(4):463-71. Epub 2009 Aug 11.
141. Akerstrom T, Steensberg A, Keller P, Keller C, Penkowa M, Pedersen BK. Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2005 Mar 1; 563(Pt 2):507-16. Epub 2004 Dec 23.
142. Spangenburg EE, Brown DA, Johnson MS, Moore RL. Exercise increases SOCS-3 expression in rat skeletal muscle: potential relationship to IL-6 expression. *J Physiol*. 2006 May 1; 572(Pt 3):839-48.
143. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res Commun*. 1982 ;107:1198-205.
144. Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, Vuorimaa T, Ahotupa M. Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidant defences. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22(3):509-13.
145. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*. 1993 Feb; 25(2):218-24.

146. Liu ML, Bergholm R, Makimattila S, Lahdenpera S, Valkonen M, Hilden H et al. A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *Am J Physiol* 1999; 276:E1083-E1091
147. Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med.*2001; 31:911-922.
148. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol. Behav.* 2005; 84(1):1-7.
149. Michalidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Koutedakis Y, Papassotiropoulos I, Kouretas D. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 39:1107-1113; 2007.
150. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med.* 2008; 38(7):579-606.
151. Gore M, Fiebig R, Hollander J, Leeuwenburgh C, Ohno H, Ji LL. Endurance training alters antioxidant enzyme gene expression in rat skeletal muscle *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76(12): 1139–1145 (1998).
152. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehnopf M, Kahn C R, Bluher M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *PNAS* 2009.
153. Brand MD. Uncoupling to survive. The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* 2000.35:811-820.
154. Tsuboyama-Kasaoka N, Tsunoda N, Maruyama K, Takahashi M, Kim H, Ikemoto S, Ezaki O. Up-regulation of uncoupling protein 3 (UCP3) mRNA by exercise training and down-regulation of UCP3 by denervation in skeletal muscles. *Biochem and Biophys Res Com.*1998. 247(2)498-503.
155. Jiang N, Zhang G, Bo H, Qu J, Ma G, Cao D, Wen L, Liu S, Ji LL, Zhang Y. Upregulation of uncoupling protein-3 in skeletal muscle during exercise: a potential antioxidant function. *Free Radic Biol Med.* 2009. 46: 138-45.
156. Noland RC, Hickner RC, Jimenez-Linan M, Vidal-Puig A, Zheng D, Dohm GL, Cortright RN. Acute endurance exercise increases skeletal muscle uncoupling protein-3 gene expression in rodents. *Metabolism.*2003 52:152-8.
157. Kubo H, Libonati J, Kendrick ZV, Paolone A, Gaughan JP, Houser SR. Differential effects of exercise training on skeletal muscle SERCA gene expression. *Med.Sci.Sports Exerc.* Vol.35, No 1, pp 27-31, 2003.

158. Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 2007 0
159. Jerry B. Lingrel. Na,K-ATPase: Isoform structure, function and expression. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, Vol. 24, No 3, 1992.
160. Murphy KT, Snow RJ, Petersen AC, Murphy RM, Mollica J, Lee JS, Garnham AP, Aughey RJ, Leppik JA, Medved I, Cameron-Smith D, McKenna MJ. Intense exercise up-regulates Na⁺,K⁺-ATPase isoform mRNA, but not protein expression in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2004 Apr 15; 556(Pt 2):507-19.
161. Murphy KT, Aughey RJ, Petersen AC, Clark SA, Goodman C, Hawley JA, Cameron-Smith D, Snow RJ, McKenna MJ. Effects of endurance training status and sex differences on Na⁺, K⁺-pump mRNA expression, content and maximal activity in human skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007 Mar; 189(3):259-69.
162. Van den Burg MM, Eizema K, de Graaf-Roelfsema E, van Breda E, Wijnberg ID, van der Kolk JH, Everts ME. Effects of acute exercise and long-term exercise on total Na⁺,K⁺ -ATPase content and Na⁺,K⁺ -ATPase isoform expression profile in equine muscle. *Am J Vet Res*. 2009 Jul; 70(7):895-901.
163. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-159
164. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*. 2006; 1(2):581-5.
165. D'Alessio G and Riordan JF, eds. (1997) *Ribonucleases: Structures and Functions*, Academic Press.
166. Van Gelder RN, Von Zastrowt M E, Yools A, Dement WC, Barchast JD, Eberwinet JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA (cerebellum/guanine nucleotide-binding protein/T7 RNA polymerase/Purkinje cell) *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol. 87, pp. 1663-1667, March 1990.
167. Mol CD, Izumi T, Mitra S, Tainer JA. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 DNA repair and coordination. *Nature* 403, 451-456 2000.
168. Misra J, Schmitt W, Hwang D, Hsiao LL, Gullans S, Stephanopoulos G. Interactive exploration of microarray gene expression patterns in a reduced dimensional space, *Genome Res*. 12 (2002) (1112-1120).

169. Regard JB, Scheek S, Borbiev T, Lanahan AA, Schneider A, Demetriades AM, Hiemisch H, Barnes CA, Verin AD, Worley PF. Verge: a novel vascular early response gene. *J Neurosci*. 2004 Apr 21;24(16):4092-103.
170. Luque A, Carpiso D, Iruela-Arispe ML. ADAMTS1/METH1 Inhibits Endothelial Cell Proliferation by Direct Binding and Sequestration of VEGF₁₆₅. 2003. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 23656-23665.
171. Shindo T, Kurihara H, Kuno K, Yokoyama H, Wada T, Kurihara Y, Imai T, Wang Y, Ogata M, Nishimatsu H, Moriyama N, Oh-hashii Y, Morita H, Ishikawa T, Nagai R, Yazaki Y, Matsushima K. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest*. 2000 May 15; 105(10): 1345–1352.
172. Lo PH, Lung HL, Cheung AK, Apte SS, Chan KW, Kwong FM, Ko JM, Cheng Y, Law S, Srivastava G, Zabarovsky ER, Tsao SW, Tang JC, Stanbridge EJ, Lung ML.. Extracellular protease ADAMTS9 suppresses esophageal and nasopharyngeal carcinoma tumor formation by inhibiting angiogenesis. *Cancer Res*. 2010 Jul 1; 70(13):5567-76.
173. Wong YC, Wang X, Ling MT. Id-1 expression and cell survival. *Apoptosis*. 2004; 9(3):279-89.
174. Minchenko A, Leshchinsky I, Opentanova I, Nang S, Srinivas V, Armstead V, Caro J . Hypoxia-inducible Factor-1-mediated Expression of the 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) Gene and its possible role in the Warburg effect. February 22, 2002. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 6183-6187.
175. Carlson C M, Endrizzi BT, Wu J, Ding X, Weinreich M A, Walsh E R, Wani M A, Lingrel JB, Hogquist K A, Jameson S C. Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* 442, 299-302. 2006.
176. Hu W, Hofstetter WL, Li H, Zhou Y, He Y, Pataer A, Wang L, Xie K, Swisher SG, Fang B. Putative tumor-suppressive function of Kruppel-like factor 4 in primary lung carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009 Sep 15;15(18):5688-95.
177. Reeves HL, Narla G, Oqunbiyi O, Hag A, Katz A, Benzeno S, Hod E, Harpaz N, Goldberg S, Tal-Kremer S, Eng F, Arthur MJP, Martignetti JA, Friedman S. Kruppel-like factor6 (KLF6) is a tumor-suppressor gene frequently inactivated in colorectal cancer. *Gastroenterology*. Volume 126, Issue 4 , Pages 1090-1103, April 2004

178. Subramaniam M, Hawse JR, Rajamannan NM, Ingle JN, Spelsberg TC. Functional role of KLF10 in multiple disease processes. *Biofactors*. 2010 Jan-Feb; 36(1):8-18.
179. Sunadome K, Yamamoto T, Ebisuya M, Kondoh K, Sehara-Fujisawa A, Nishida E. ERK5 Regulates Muscle Cell Fusion through Klf Transcription Factors. *Developmental Cell*, Volume 20, Issue 2, 192-205, 15 February 2011
180. Brigstock DR. Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61). 2002. *Angiogenesis* 5:153-165.
181. Nishida T et al. CTGF/Hcs24, hypertrophic chondrocyte-specific gene product, interacts with perlecan in regulating the proliferation and differentiation of chondrocytes. 2003. *J Cell Physiol* 196:265-275.
182. Ivkovic S et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. 2003. *Development* 130:2779-2791.
183. Vial C, Zúñiga LM, Cabello-Verrugio C, Cañón P, Fadic R, Brandan E. Skeletal muscle cells express the profibrotic cytokine connective tissue growth factor (CTGF/CCN2), which induces their dedifferentiation. *J Cell Physiol*. 2008 May; 215(2):410-21.
184. Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Worley PF. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeletal-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. 1995. *Neuron*. 14:433-445.
185. Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. 1995. *Proc Nat Acad Sci*. 6; 92(12):57 34-38.
186. Nabhan JF, Pan H, Lu Q. Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the beta2-adrenergic receptor. *EMBO Rep*. 2010 Aug; 11(8):605-11.
187. Pasqualucci L, Bereschenko O, Niu H, Klein U, Basso K, Guglielmino R, Cattoretti G, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: the role of Bcl-6. *Leuk Lymphoma*. 2003; 44 Suppl 3:S5-12.
188. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004 Dec; 22(4):233-41.
189. Loyer P, Trembley JH, Grenet JA, Busson A, Corlu A, Zhao W, Kocak M, Kidd VJ, Lahti JM. Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and

- splicing factors: influence of cyclin L isoforms on splice site selection. *J Biol Chem.* 2008 Mar 21; 283(12):7721-32.
190. Loireau MP, Heidmann T. Characterization of a mammalian gene related to the yeast CCR4 general transcription factor and revealed by transposon insertion. *J Biol Chem.* 1999 Oct 22; 274(43):31068-75.
191. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. 1991. *Genes Dev* 5 (9): 1538–52.
192. Don J, Stelzer G. The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Feb 22; 187(1-2):115-24.
193. Schütze N, Kunzi-Rapp K, Wagemanns R, Nöth U, Jatzke S, Jakob F. Expression, purification, and functional testing of recombinant CYR61/CCN1. *Protein Expr Purif.* 2005 Jul; 42(1):219-25.
194. Knapka, E, Kaczmarek, L. A gene for Neuronal Plasticity in the Mammalian Brain: Zif286/Egr1/NGFI-A/Krox-24/TIS-8/ZENK? 2004. *Progress in Neurobiology* 74.
195. Kim TA, Lim J, Ota S, Raja S, Rogers R, Rivnay B, Avraham H, Avraham S. NRP/B, a novel nuclear matrix protein, associates with p110 (RB) and is involved in neuronal differentiation. *J Cell Biol.* 1998 May 4; 141(3):553-66.
196. Takekawa M, Saito H. A Family of Stress-Inducible GADD45-like Proteins Mediate Activation of the Stress-Responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell*, Volume 95, Issue 4, 521-530, 1998
197. Durchdewald M, Angel P, Hess J. The transcription factor Fos: a Janus-type regulator in health and disease. *Histol Histopathol.* 2009 Nov; 24(11):1451-61.
198. Fiorentino L, Pertica C, Fiorini M, Talora C, Crescenzi M, Castellani L, Alemà S, Benedetti P, Segatto O. Inhibition of ErbB-2 mitogenic and transforming activity by RALT, a mitogen-induced signal transducer which binds to the ErbB-2 kinase domain. *Mol Cell Biol.* 2000 Oct; 20(20):7735-50.
199. Giepman BN. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res.* 2004 May 1; 62(2):233-45.
200. Araya R, Eckardt D, Maxeiner S, Krüger O, Theis M, Willecke K, Sáez JC. Expression of connexins during differentiation and regeneration of skeletal muscle: functional relevance of connexin43. *J Cell Sci.* 2005 Jan 1; 118(Pt 1):27-37. Epub 2004 Dec 15.
201. Gorbe A, Becker DL, Dux L, Krenacs L, Krenacs T. In differentiating prefusion myoblasts connexin43 gap junction coupling is upregulated before

- myoblast alignment then reduced in post-mitotic cells. *Histochemistry and Cell Biology* Volume 125, Number 6, 705-716
202. Trovato-Salinaro A, Belluardo N, Frinchi M, von Maltzahn J, Willecke K, Condorelli DF, Mudò G. Regulation of connexin gene expression during skeletal muscle regeneration in the adult rat. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009 Mar; 296(3):C593-606.
203. Takaya T, Kasatani K, Noguchi S, Nikawa J. Functional analyses of immediate early gene ETR101 expressed in yeast. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009 Jul;73(7):1653-60.
204. Raffaello A, Milan G, Masiero E, Carnio S, Lee D, Lanfranchi G, Goldberg AL, Sandri M. JunB transcription factor maintains skeletal muscle mass and promotes hypertrophy. *J Cell Biol*. 2010 Oct 4; 191(1):101-13.
205. Solé L, Roura-Ferrer M, Pérez-Verdaguer M, Oliveras A, Calvo M, Fernández-Fernández JM, Felipe A. KCNE4 suppresses Kv1.3 currents by modulating trafficking, surface expression and channel gating. *J Cell Sci*. 2009 Oct 15; 122(Pt 20):3738-48. Epub 2009 Sep 22.
206. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, Barasch J. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Feb; 18(2):407-13.
207. Roudkenar MH, Halabian R, Ghasemipour Z, Roushandeh AM, Rouhbakhsh M, Nekogoftar M, Kuwahara Y, Fukumoto M, Shokrgozar MA. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin acts as a protective factor against H₂O₂ toxicity. *Arch Med Res*. 2008 Aug; 39(6):560-6.
208. Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 11; 106(32):13445-50.
209. Eto N, Miyagishi M, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. Mitogen-activated protein 3 kinase 6 mediates angiogenic and tumorigenic effects via vascular endothelial growth factor expression. *Am J Pathol*. 2009 Apr; 174(4):1553-63.
210. Sutherland DE, Willans MJ, Stillman MJ. Supermetalation of the beta domain of human metallothionein 1a. *Biochemistry*. 2010 May 4; 49(17):3593-601.
211. Jie L, Kaifeng S, Dian Y, Lin A, Binggen R. Characterization of expression and stability of recombinant cystein-rich protein human MT1A from yeast. *Protein Pept Lett*. 2005 Aug; 12(6):567-71.

212. Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an I κ B/NF- κ B complex. 1998. *Cell* 95 (6): 749–58.
213. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. 1995. *Genes Dev.* 9 (22): 2723–35.
214. Cabannes E, Khan G, Aillet F, Jarrett RF, Hay RT. Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . 1999. *Oncogene* 18 (20): 3063–70.
215. Emi Kawasaki E, Hokari F, Sasaki M, Sakai A, Koshinaka K, Kawanaka K. Role of local muscle contractile activity in the exercise-induced increase in NR4A receptor mRNA expression. *Journal of Applied Physiology* June 2009 vol. 106 no. 6 1826-1831.
216. Phng LK, Potente M, Leslie JD, Babbage J, Nyqvist D, Lobov I, Ondr JK, Rao S, Lang RA, Thurston G, Gerhardt H. Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Dev Cell.* 2009 Jan; 16 (1):70-82.
217. Yamakawa, T, Miyata, S, Ogawa, N, Koshikawa, N, Yasumitsu, H, Kanamori, T, Miyazaki, K. cDNA cloning of a novel trypsin inhibitor with similarity to pathogenesis-related proteins, and its frequent expression in human brain cancer cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1998.
218. Xu D, Yao Y, Lu L, Costa M, Dai W. Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1 α . *J Biol Chem.* 2010 Dec 10; 285(50):38944-50.
219. Lee YY, Cevallos RC, Jan E. An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2 α phosphorylation. *J Biol Chem.* 2009 Mar 13; 284(11):6661-73.
220. Dubois R N, Abramson S B, Crofford L, Gupta R A, Simon L S., Van De Putte B A, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease *The FASEB Journal.* 1998; 12:1063-1073.
221. Siderovski DP, Willard FS. The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein α subunits. *Int J Biol Sci.* 2005 ;1(2):51-66.
222. Primeau M, Lamarche-Vane N. A brief overview of the small Rho GTPase. *Med Sci (Paris).* 2008 Feb; 24(2):157-62.
223. Fritz G, Kaina B. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets.* 2006 Feb;6(1):1-14

224. Nobes CD, Lauritzen I, Mattei MG, Paris S, Hall A, Chardin P. A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol.* 1998 Apr 6; 141(1):187-97.
225. Pegg AE. Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Jun; 294(6):E995-1010.
226. Mimuro J. Type 1 plasminogen activator inhibitor: its role in biological reactions. *Rinsho Ketsueki.* 1991 May; 32(5):487-9.
227. Loffing J, Flores SY, Staub O. Sgk kinases and their role in epithelial transport. *Annu Rev Physiol.* 2006; 68:461-90.
228. Boini KM, Hennige AM, Huang DY, Friedrich B, Palmada M, Boehmer C, Grahammer F, Artunc F, Ullrich S, Avram D, Osswald H, Wulff P, Kuhl D, Vallon V, Häring HU, Lang F. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 mediates salt sensitivity of glucose tolerance. *Diabetes.* 2006 Jul; 55(7):2059-66.
229. Bertorello AM, Zhu JK. SIK1/SOS2 networks: decoding sodium signals via calcium-responsive protein kinase pathways. *Pflugers Arch.* 2009 Jul; 458(3):613-9
230. Berdeaux R, Goebel N, Banaszynski L, Takemori H, Wandless T, Shelton D, Montminy M. SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. *Nature Medicine* volume 13 [number 5] May 2007 597.
231. Bresciani R, Pizzo MT, Della Monica A, Barlati S, Monti E, Borsani G. Cellular expression and alternative splicing of SLC25A23, a member of the mitochondrial Ca²⁺-dependent solute carrier gene family. *Gene.* 2005 Jan 31; 345(2):173-82.
232. Sheikh-Hamad D. Mammalian stanniocalcin-1 activates mitochondrial antioxidant pathways: new paradigms for regulation of macrophages and endothelium. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010 Feb; 298(2):F248-54.
233. Esemuede N, Lee T, Pierre-Paul D, Sumpio BE, Gahtan V. The role of thrombospondin-1 in human disease. *J Surg Res.* 2004 Nov; 122(1):135-42.
234. Ayroldi E, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J.* 2009 Nov; 23(11):3649-58.
235. Masuda H, Fong CS, Ohtsuki C, Haraguchi T, Hiraoka Y. Spatiotemporal regulations of Wee1 at the G2/M transition. *Mol Biol Cell.* 2011 Mar; 22(5):555-69.
236. Carballo E, Lai WS, Blakeshear PJ. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. 1998. *Science* 281 (5379): 1001–5.
237. Kim TW, Yim S, Choi BJ, Jang Y, Lee JJ, Sohn BH, Yoo HS, Yeom YI, Park KC. Tristetraprolin regulates the stability of HIF-1alpha mRNA during prolonged hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 1; 391(1):963-8.

238. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jan 28; 1660(1-2):171-99.
239. Watanabe H, Nonoguchi K, Sakurai T, Masuda T, Itoh K, Fujita J. A novel protein Depp, which is induced by progesterone in human endometrial stromal cells activates Elk-1 transcription factor. *Mol Hum Reprod*. 2005 Jul; 11(7):471-6.
240. Krücken J, Schroetel RM, Müller IU, Saïdani N, Marinovski P, Benten WP, Stamm O, Wunderlich F. Comparative analysis of the human gimap gene cluster encoding a novel GTPase family. *Gene*. 2004 Oct 27; 341:291-304.
241. Pasternack SM, von Kügelgen I, Aboud KA, Lee YA, Rüschemdorf F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nürnberg P, Nöthen MM, Betz RC. G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet*. 2008 Mar; 40(3):329-34.
242. François M, Caprini A, Hosking B, Orsenigo F, Wilhelm D, Browne C, Paavonen K, Karnezis T, Shayan R, Downes M, Davidson T, Tutt D, Cheah KS, Stacker SA, Muscat GE, Achen MG, Dejana E, Koopman P. Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature*. 2008 Dec 4;456(7222):643-7.
243. Nishihira J, Mitsuyama K. Overview of the role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des*. 2009; 15(18):2104-9.
244. Fässler R. How ILK and kindlins cooperate to orchestrate integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Oct; 21(5):670-5.
245. Gardner S, Alzhanov D, Knollman P, Kuninger D, Rotwein P. TGF- β inhibits muscle differentiation by blocking autocrine signaling pathways initiated by IGF-II. *Mol Endocrinol*. 2011 Jan; 25(1):128-37.

ΠΗΓΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική παράσταση της οργάνωσης σκελετικού μυός σε επίπεδο αδρής, λεπτής και μοριακής δομής.

Πηγή: Μιχαήλ Σ. Ιστολογία. 2^η Έκδοση. Θεσσαλονίκη 1986.

Εικόνα 2: Σηματοδοτικό μονοπάτι γλυκογονοσύνθεσης

Πηγή: Mougios V. Βιοχημεία της άσκησης. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. Αθήνα 2008.

Εικόνα 3: Γλυκόλυση

Πηγή: Mougios V. Βιοχημεία της άσκησης. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. Αθήνα 2008.

Εικόνα 4: Ο κύκλος του Krebs

Πηγή: Mougios V. Βιοχημεία της άσκησης. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. Αθήνα 2008.

Εικόνα 5: Φωτολιθογραφική σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων

Πηγή: Watson JD, Caudy AA, Myers RM, Witkowski JA. Ανασυνδυασμένο DNA. Γονίδια και γονιδιώματα- Μια συνοπτική παρουσίαση. 3^η αγγλική έκδοση- 1^η ελληνική έκδοση. Επιστημονικές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και σία Ο.Ε. 2007.

Εικόνα 6: Απεικόνιση των πλήρως συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων και των ολιγονουκλεοτιδίων με αναντιστοιχία

Πηγή: Watson JD, Caudy AA, Myers RM, Witkowski JA. Ανασυνδυασμένο DNA. Γονίδια και γονιδιώματα- Μια συνοπτική παρουσίαση. 3^η αγγλική έκδοση- 1^η ελληνική έκδοση. Επιστημονικές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και σία Ο.Ε. 2007.

Εικόνα 7: Τρόπος χρήσης τσιπ ολιγονουκλεοτιδίων Affymetrix

Πηγή: Δικτυακός τόπος εταιρείας Affymetrix

Εικόνα 8: Τρόπος χρήσης στικτών μικροσυστοιχιών

Πηγή: Μαργαρίτης Λ.Χ., Γαλανόπουλος Β.Κ., Κεραμάρης Κ.Ε., Μαρίνος Ε.Σ., Παπασιδέρη Ι.Σ., Στραβοπόδης Δ.Ι., Τρουγκάκος Ι.Π. Βιολογία κυττάρου. 4^η έκδοση. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας 2004.