

PAWEŁ CIĘSZCZYK
KRZYSZTOF KRUPECKI
AGNIESZKA MACIEJEWSKA
MAREK SAWCZUK
AGATA LEOŃSKA-DUNIEC
MAREK KOLBOWICZ

**GENETYKA W SPORCIE WYCZYNOWYM
– ROLA I ZNACZENIE POSZCZEGÓLNYCH FORM
POLIMORFICZNYCH GENU ACE
U WIOŚLARZY O WYSOKICH KWALIFIKACJACH**
**Genetics in professional sport – role and importance of different
polymorphism of ACE gene in high elite rowers**

Słowa kluczowe: *ACE, polimorfizm, wysiłek fizyczny, wioślarze*

Keywords: *ACE, gene polymorphism, endurance performance, Polish rowers*

1. Wstęp

Gen ACE (The Angiotensin Converting Enzyme Gene) jest jednym z najczęściej badanych genów w kontekście genetycznych uwarunkowań predyspozycji sportowych. Polimorfizm insercyjno-delecyjny w obrębie 16. intronu tego genu został po raz pierwszy opisany przez Rigat i wsp. [14], przy czym pierwszy artykuł dowodzący znaczenia tego polimorfizmu dla sportu opublikowali w „Nature” w 1998 r. Montgomery i wsp. [10]. Pierwsze artykuły oparte na badaniach polskich sportowców ukazały się dopiero w 2009 i 2010 r. [3, 4].

Produkt tego genu, enzym konwertujący angiotensynę I w II, to kluczowy element układu renina-angiotensyna (RAS), odpowiedzialnego za regulację ciśnienia krwi, jednego z głównych czynników decydujących o wydolności całego organizmu [1]. Regulacja ciśnienia poprzez ACE ma charakter wielokierunkowy – angiotensyna II podnosi ciśnienie krwi, a w układzie kalikreina-kininy katalizuje dezaktywację bradykininy, czynnika obniżającego ciśnienie krwi [11].

ACE ma swój locus w chromosomie 17, w pozycji 17q23.3, jego długość zaś to 44770bp. Produkt ekspresji dla tego genu może pojawiać się w dwóch formach, ze względu na różny sposób odczytu genów w różnych tkankach. Pierwsza z nich, nazywana somatyczną lub śródbłonkową, koduje najdłuższy łańcuch polipeptydowy (1306 aminokwasów) i składa się z 46 egzonów, druga (charakterystyczna dla jąder) ma promotor wewnątrz genu (między 21. a 22. egzonem pierwszej formy) [12].

U ludzi można zaobserwować polimorfizm insercyjno-delecyjny w 16. intronie genu ACE, objawiający się obecnością lub brakiem 287. nukleotydowej sekwencji Alu, a to jest podstawą do odróżnienia allelu I oraz D. Genotyp DD jest związany ze zwiększonym stężeniem enzymu ACE we krwi i tkankach, co sprzyja wzrostowi ciśnienia krwi oraz predysponuje do nadciśnienia i przerostu lewej komory serca [2, 16, 17]. Genotyp II jest z kolei związany ze zwiększoną wytrzymałością i wydolnością mięśni, wywołaną między innymi zwiększoną proporcją włókien wolnokurczliwych (typ I) w mięśniach [8, 21].

W niniejszej pracy przedmiotem analizy był polimorfizm insercyjno-delecyjny genu ACE. Badanie miało na celu sprawdzenie hipotezy o związku między genotypem ACE i osiągnięciami sportowymi wioślarzy polskiej kadry narodowej. Grupa ta, w opinii autorów niniejszej publikacji, jest najodpowiedniejsza ze względu na specyfikę wymagań wysiłkowych w tej dyscyplinie sportowej.

2. Cel badań

Głównym celem niniejszych badań jest ocena możliwości wykorzystania polimorfizmu insercyjno-delecyjnego genu ACE w procesie poszukiwania talentu sportowego w sportach wytrzymałościowych.

3. Materiały i metody badań

Badaniu poddanych zostało 55 wioślarzy. Pierwszą podgrupę w grupie eksperymentalnej stanowiło 30 zawodników kadry narodowej, w zdecydowanej większości zawodników powołanych do reprezentowania naszego kraju na igrzyskach olimpijskich w Pekinie (byli to utytułowani zawodnicy z dużym stażem treningowym, między innymi medaliści olimpijscy i medaliści mistrzostw świata). Drugą podgrupę spośród objętych badaniem wioślarzy stanowiło 25 zawodników w wieku 18–22 lat (zawodnicy z krótszym stażem treningowym, przeważnie finaliści mistrzostw Polski).

Grupę kontrolną stanowiło 115 losowo dobranych ochotników w wieku 19–23 lat (studentów Uniwersytetu Szczecińskiego). Uczestnicy badań z tej grupy nigdy nie uprawiali wyczynowo żadnej dyscypliny sportowej.

Wszyscy badani należeli do rasy białej, co pozwoliło wyeliminować różnice związane z częstością występowania poszczególnych form genów u różnych ras ludzkich. Wszystkie procedury użyte w niniejszym badaniu uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej Pomorskiej Akademii Medycznej.

Materiał do badań pobierano z komórek nabłonka jamy ustnej (przy użyciu szpatułek Puritan, USA). Po dokonaniu wymazu komórki zawieszone były w roztworze buforującym (Sigma, Germany). Następnie przeprowadzano izolację DNA przy użyciu GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma, Germany), zgodnie z instrukcją producenta. Amplifikacja PCR polimorficznego regionu genu ACE pozwoliła na namnożenie produktu zawierającego fragment insercyjny (I) lub bez tego fragmentu (D).

Do określenia genotypu ACE użyto tylko jednej pary starterów (ACEfor: CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT i ACRev: GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA). Długość produktów amplifikacji wynosiła w przybliżeniu 490bp (dla alelu I) i 190bp (dla alelu D), podobnie jak w innych badaniach [17]. 10 µl mieszaniny reakcyjnej PCR zawierało: 1 µl izolatu DNA; 0.5 U Taq polimerazy DNA w buforze (pH = 8,0; Sigma, Germany); 1x bufor PCR (pH = 8,7; Sigma, Germany); 15 mM MgCl₂; 4 pM starterów „ACEfor” i „ACRev” (Oligo, Poland) w buforze TE (pH = 8); 0,75 nM każdego z dNTP.

Amplifikacji dokonano za pomocą Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research (USA) i T-Gradient Biometra (Germany). Thermal-time PCR – wstępna denaturacja w 94°C przez 300 s, 30 cykli (denaturacja w 92°C przez 60 s, przyłączanie starterów 58°C przez 60 s, wydłużenie łańcucha przy 72°C przez 150s), a następnie końcowe wydłużanie przy 72°C przez 360 s.

Uzyskane rezultaty badań zostały poddane analizie statystycznej. Do oszacowania różnic rozkładów genotypów i częstości występowania poszczególnych alleli w badanych grupach (dwóch podgrupach grupy eksperymentalnej i w grupie kontrolnej) wykorzystano test χ^2 . Wszystkie obliczenia prowadzone były przy założonym poziomie istotności $P < 0,05$.

4. Wyniki

W przypadku grupy badanej amplifikacja ze starterami ACEfor i ACErev w dziesięciu próbkach dała produkt długości 190bp, odpowiadający delecynemu allelowi D genu ACE. W siedemnastu próbkach powstały produkty 490bp charakterystyczne dla alelu inercyjnego I ACE, a w 20 próbkach zaobserwowano typ heterozygotyczny ID (rys. 1).



Rys. 1. Przykład produktów amplifikacji genu ACE starterami ACEfor i ACErev. Pierwsza linia od lewej (1) – genotyp ID heterozygotyczny, druga linia od lewej (2) – genotyp homozygotyczny DD, trzecia linia od lewej (3) – genotyp homozygotyczny II, ostatnia linia od lewej (M) – marker masy molekularnej

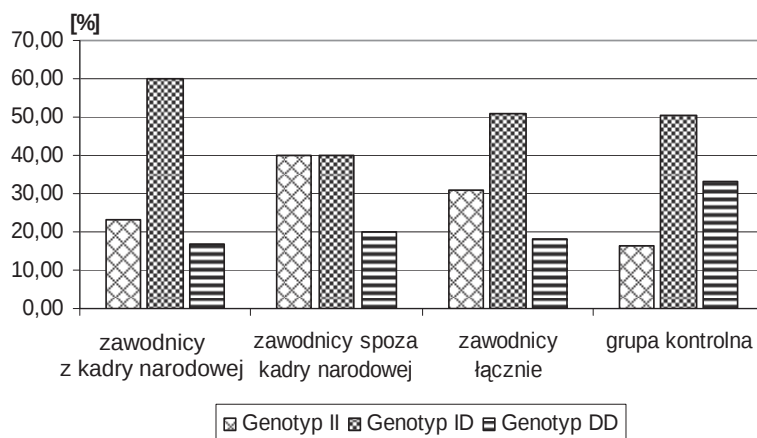
Rozkład genotypu ACE wśród badanych i w grupie kontrolnej był zgodny z prawem Hardiego-Weinberga. Rozkład genotypów ACE i alleli przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

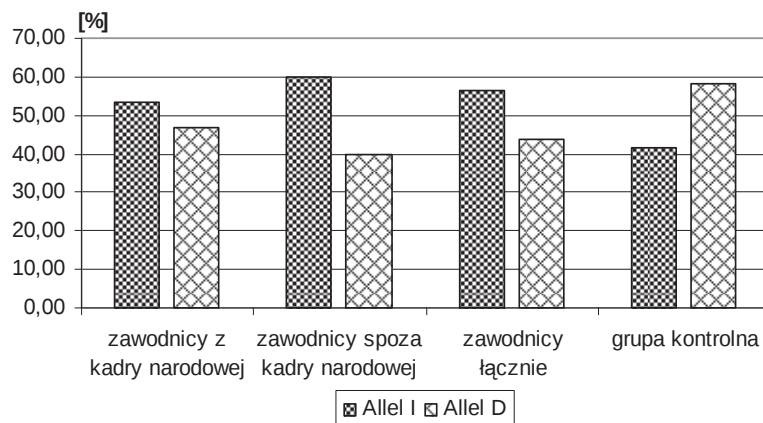
Częstość występowania alleli insercyjnych (I)
i delecyjnych (D) genu ACE oraz poszczególnych genotypów.
Zestawiono wartości bezwzględne oraz ich odsetek (w nawiasach).
Literą „n” oznaczono liczebności poszczególnych grup

Poszczególne grupy	Allele genu ACE		Genotyp ACE		
	I	D	II	ID	DD
Kadra narodowa (n = 30)	32 (53,3%)	28 (46,7%)	7 (23,3%)	18 (60%)	5 (16,7%)
Zawodnicy niepowołani do kadry narodowej (n = 25)	30 (60%)	20 (40%)	10 (40%)	10 (40%)	5 (20%)
Wszyscy zawodnicy łącznie (n = 55)	62 (56,3%)	48 (43,7%)	17 (30,9%)	28 (50,9%)	10 (18,2%)
Grupa kontrolna (n = 115)	96 (41,7%)	134 (58,3%)	19 (16,5%)	58 (50,4%)	38 (33,1%)

Rozkład genotypów (rys. 2) w obrębie grupy badanej (30,9% II, 50,9% ID, 18,2% DD) różnił się w sposób istotny statystycznie ($p = 0,037$) od rozkładu genotypów w grupie kontrolnej (16,5% II, 50,4% ID, 33,1% DD). Na poziom istotności wpływ miała niewątpliwie wysoka częstość występowania allelu I u wioślarzy (56,3% vs. 41,7,3%, $P = 0,011$) (rys. 3).



Rys. 2. Częstość występowania poszczególnych genotypów ACE



Rys. 3. Częstość występowania alleli I i D genu ACE

5. Dyskusja

Osiągnięcia sportowe zależą od wielu czynników środowiskowych, behawioralnych i genetycznych. Uważa się, że zmienność międzyosobnicza dotycząca ekspresji genowej zależy głównie od polimorfizmu sekwencji DNA. Na tej podstawie można postawić tezę, że zdefiniowanie osobniczych predyspozycji genetycznych może być oszacowane za pomocą obserwacji szczególnych loci genetycznych i znalezienia istotnych w tym względzie polimorfizmów DNA.

Pierwsze doniesienia o polimorfizmie genu ACE skupiały się na allelu D i jego związku z niektórymi patologiami, takimi jak skłonność do nadciśnienia tętniczego i przerostu lewej komory serca [2, 16]). W pracach dotyczących medycyny sportowej i fizjologii allel D jest opisywany jako czynnik odpowiedzialny za predyspozycje do wykonywania wysiłków beztlenowych oraz zwiększenie siły mięśni. Potwierdzają to chociażby badania przeprowadzone wśród pływaków krótkodystansowych, u których wykazano większą częstość występowania allelu D w porównaniu z grupą kontrolną [19]. Dodatknią korelację allelu D z poziomem siły mięśniowej wykazał z kolei Folland i wsp. [6]. Przeprowadzony przez nich eksperyment dowodził, że allel D jest związany ze wzrostem siły mięśnia czworogłowego uda w wyniku dziewięciotygodniowego siłowego treningu izometrycznego.

Sugeruje się, że allel I genu ACE może być związany ze zwiększeniem predyspozycji do wykonywania wysiłków tlenowych (a więc wysiłków zgodnych z profilem analizowanej przez nas dyscypliny sportowej – wioślarstwa). Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazywały na silny związek allelu I i wytrzymałości u wioślarzy. Taki sam związek zaobserwowano w rozkładzie genotypu – wioślarze wykazywali wyższy poziom genotypu II.

Niniejsze rezultaty znajdują potwierdzenie w wynikach badań przeprowadzonych wśród czołowych zawodników innych dyscyplin, w których wykonywane wysiłki oparte są na procesach aerobowych: alpinistów [10] i wioślarzy długodystansowych [7]). W obu tych przypadkach wykazano bowiem zwiększoną częstość występowania allelu I u sportowców w porównaniu z grupami kontrolnymi. Fakt ten pośrednio potwierdza przypuszczenia McArthur i North [8]), według których allel I w zwiększonym stopniu warunkuje wywołanie reakcji potreningowych organizmu, polegających na wzroście wytrzymałości mięśniowej, między innymi poprzez zwiększenie wydajności mechanizmów dostarczania tlenu do mięśni szkieletowych.

Analizując wszystkie aspekty allelu I pod kątem poszczególnych procesów fizjologicznych zachodzących w organizmie, stopniowo można pokazać wpływ tej formy genu na poziom wydolności aerobowej organizmu. Dzięki usprawnieniu mechanizmów transportu i efektywności wykorzystywania substratów energetycznych (w tym przypadku przede wszystkim glukozy) oraz adaptacji enzymów odpowiedzialnych za katabolizm glukozy, podnosi się wydajność mięśni szkieletowych [18, 20]. Zwiększona wydajność tego rodzaju procesów biochemicznych na poziomie komórkowym racjonalizuje z kolei gospodarkę magazynową innych substratów energetycznych organizmu, w szczególności jego rezerw glikogenowych [9].

Wykazano również ujemną korelację allelu I z aktywnością genu ACE. Zatem w tym przypadku ta forma genu może być kojarzona ze zmniejszeniem obciążenia następczego serca, mniejszą skłonnością do miażdżycy i zmniejszonym ryzykiem patologicznego przerostu komory. Wysoce prawdopodobne jest, iż to właśnie te parametry warunkują efektywność i niezawodną pracę układu krążeniowego w czasie wykonywania wysiłków wytrzymałościowych [7].

Jak już wspomniano, genotyp II jest mocno związany z mniejszą aktywnością enzymu ACE, co może być spowodowane obecnością wyciszacza transkrypcyjnego zlokalizowanego w obrębie sekwencji Alu [15]. Obecność takiego wyciszacza znacznie obniża ekspresję genu ACE u osobników z genotypem II.

Z kolei jest raczej mało prawdopodobne, by polimorfizm I/D był związany z czynnikami regulującymi ekspresję genu hormonu wzrostu, znajdującego się *notabene* w dużej bliskości z genem ACE. Fizjologiczna interakcja wydaje się być w tym przypadku bardziej prawdopodobna ze względu na fakt, że wyższy poziom angiotensyny II stymuluje uwalnianie hormonu wzrostu poprzez receptor angiotensyny II typu 1 [5].

6. Wnioski

Reasumując, zebrane w toku badań rezultaty zdają się potwierdzać istotny związek allelu I genu ACE z osiągnięciami sportowymi w dyscyplinach, w których przeważają wysiłki o charakterze tlenowym.

Wyniki niniejszej pracy wskazują na możliwość wykorzystania polimorfizmu inercyjno-delecyjnego jako markera służącego wyszukiwaniu talentów sportowych w tzw. sportach wytrzymałościowych.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Alvarez R., Terrados N., Ortolano R., i wsp., 2000: *Genetic variation in the renin-angiotensin system and athletic performance*, „European Journal of Applied Physiology”, 82, s. 117–120.
- [2] Cambien F., Poirier O., Lecerf L., i wsp., 1992: *Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potential risk factor for myocardial infarction*, „Nature”, 359, s. 641–644.
- [3] Ciężczyk P., Krupecki K., Maciejewska A. i wsp., 2009: *The Angiotensin Converting Enzyme Gene I/D Polymorphism in Polish Rowers*, „International Journal of Sports Medicine”, 30, s. 624–627.
- [4] Ciężczyk P., Maciejewska A., Sawczuk M. i wsp., 2010: *The Angiotensin Converting Enzyme Gene I/D Polymorphism in Elite Polish and Lithuanian Judo Players*, „Biology of Sport”, 27 (2), s. 119–122.
- [5] Coiro V., Volpi R., Capretti L., i wsp., 1998: *Stimulation of ACTH and GH release by angiotensin II in normal men is mediated by the AT1 receptor subtype*, „Regulatory Peptides”, 74, s. 27–30.

-
- [6] Folland J., Leach B., Little T., i wsp., 2000: *Angiotensin-converting enzyme genotype affects the response of human skeletal muscle to functional overload*, „Experimental Physiology”, 85, s. 575–579.
- [7] Gayagay G., Yu B., Hambly B., i wsp., 1998: *Elite endurance athletes and the ACE I allele – the role of genes in athletic performance*. „Human Genetics”, 103, s. 48–50.
- [8] McArthur D.G., North K.N., 2005: *Genes and human elite athletic performance*, „Human Genetics”, 116, s. 331–339.
- [9] Montgomery H., Clarkson P., Barnard M., i wsp., 1999: *Angiotensin-converting-enzyme gene insertion/deletion polymorphism and response to physical training*, „Lancet”, 353, s. 541–545.
- [10] Montgomery H.E., Marshall R., Hemingway H., i wsp., 1998: *Human gene for physical performance*, „Nature”, 393, s. 221–222.
- [11] Moreau M.E., Garbacki N., Molinaro G., i wsp., 2005: *The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets*, „Journal of Pharmacological Science”, 99, s. 6–38.
- [12] Rella M., Elliot J.L., Revett T.J., i wsp., 2007: *Identification and characterisation of the angiotensin converting enzyme-3 (ACE3) gene: a novel mammalian homologue of ACE*, „Genomics”, 8, s. 194–205.
- [13] Rieder M.J., Taylor S.L., Clark A.G., Nickerson D.A., 1999: *Sequence variation in the human angiotensin converting*, „Nature Genetics”, 22, s. 59–62.
- [14] Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F. i wsp., 1990: *An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels*, „Journal of Clinical Investigation”, 86, s. 1343–1346.
- [15] Tomilin N.V., Iguchi-Ariga S.M., Ariga H., 1990: *Transcription and replication silencer element is present within conserved region of human Alu repeats interacting with nuclear protein*, „FEBS Letters”, 263, s. 69–72.
- [16] Ueda S., Elliott H.L., Morton J.J., Connell J.M., 1995: *Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme*, „Hypertension”, 25, s. 1266–1269.
- [17] Waliszewski K., Słomski R., Jura J., i wsp., 2003: *Zmiany częstości alleli i rozkładu genotypów genu ACE w populacji chorych na tętniaka aorty brzusznej*, „Nowiny Lekarskie”, 72, s. 169–175.
- [18] Williams A.G., Rayson M.P., Jubb M., i wsp., 2000: *The ACE gene and muscle performance*, „Nature”, 403, s. 614–615.
- [19] Woods D., Hickman M., Jamshidi Y., i wsp., 2001: *Elite swimmers and the D allele of the ACE I/D polymorphism*, „Human Genetics”, 108, s. 230–232.

- [20] Woods D.R., Humphries S.E., Montgomery H.E., 2000: *The ACE I/D polymorphism and human physical performance*, „Trends in Endocrinology and Metabolism”, 11, s. 416–420.
- [21] Zhang B., Tanaka H., Shono N., i wsp., 2003: *The I allele of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with an increased percentage of slow-twitch type I fibers in human skeletal muscle*, „Clinical Genetics”, 63, s. 139–144.

**GENETICS IN PROFESSIONAL SPORT – ROLE AND IMPORTANCE
OF DIFFERENT POLYMORPHISM
OF ACE GENE IN HIGH ELLITE ROWERS**

Summary

ACE is the most often investigated gene in the context of genetic conditioning of sports-predispositions, because the product of this gene (an enzyme converting angiotensin I into II) is acknowledged to be a key-element in the renin-angiotensin system (RAS renin-angiotensin system), a system responsible for the regulation of blood pressure – one of the main factors deciding the efficiency of the whole body. In this study DNA polymorphism derived from the *ACE* gene was studied in Polish national rowers in order to examine the hypothesis that *ACE* genotype is associated with athletes performance.

Translation: Paweł Ciężczyk