

Identification of Single Nucleotide Changes in Genes Associated to Muscle Hypertrophy and Strength in an Elite Weightlifter Using Whole Exome Sequencing: A Case Report

Ebrahimi-Torkamani B¹, Siahkouchian M*¹, Khazani A², Anoshirvani S¹, Bolboli L¹, Asadi F³

1. Department of Physical Education and Sport Sciences, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

2. Department of Physical Education and Sport Sciences, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

3. Department of Molecular Genetics, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.

* *Corresponding author.* Tel: +989031546050, Fax: +984531505000, E-mail: Iba.ayden@yahoo.com

Received: Feb 20, 2021 Accepted: May 20, 2021

ABSTRACT

Background & objectives: Over the last couple of decades, research has focused on attempting to understand the genetic influence on sports performance. Whole exome sequencing (WES) has great potential to explore all possible genetic variants associated with physical performance. However, this new technique has not been used in sports genetics research. Therefore the aim of this case study was to report new variants in genes involved in skeletal muscles strength (ACE, NOS3, IGF1R, IL-6) in an elite weightlifter using WES.

Methods: After obtaining a written testimony from a 32-year-old man, who is a member of the Iranian national weightlifting team, 5 cc of blood was taken and then DNA was extracted. DNA samples were analyzed using the whole exome sequencing method.

Results: Whole exome sequencing analysis revealed a missense variant (99454613G>A) in IGF1R, 22771156C>T polymorphism in IL-6, 150695726T>C and 150704250C>G polymorphisms in NOS3 and 61573761T>C and 61564052A>G in ACE genes.

Conclusion: Results of whole exome sequencing analysis revealed a missense variant and polymorphism in muscle strength and hypertrophy related genes in this elite weightlifter. However, other studies with larger sample sizes are needed to investigate the relationship between these variants and power athlete status.

Keywords: Whole Exome Sequencing; Muscle Strength; Weightlifter; Muscular Hypertrophy; Variant; ACE

شناسایی تغییرات تک نوکلئوتیدی در ژن‌های مرتبط با هایپرتروفی و قدرت عضلانی در یک وزنه‌بردار نخبه با استفاده از روش توالی‌یابی کل‌اگزوم: یک گزارش موردی

بهمن ابراهیمی ترکمانی^۱، معرفت سیاه‌کوهیان^{۱*}، علی خازنی^۲، سجاد انوشیروانی^۱، لطفعلی بلبلی^۱، فاطمه اسدی^۳

۱. گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲. گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، اردبیل، ایران

۳. گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد علوم و تحقیقات فارس، فارس، ایران.

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۰۳۱۵۴۶۰۵۰ فاکس: ۰۴۵۳۱۵۰۵۰۰۰ پست الکترونیک: Iba.ayden@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: در طی دو دهه گذشته، تحقیقات زیادی برای درک تأثیر ژنتیک بر عملکرد ورزشی تمرکز داشته‌اند. توالی‌یابی کل‌اگزوم پتانسیل زیادی برای شناسایی واریانت‌های ژنتیکی مرتبط با عملکرد جسمانی دارد، اما با این وجود در تحقیقات ژنتیک ورزشی هنوز از این تکنیک جدید استفاده نشده است. بنابراین هدف از نگارش مقاله حاضر گزارش واریانت‌های جدید در ژن‌های درگیر در قدرت و هایپرتروفی عضلانی (ACE، NOS3، IGF1R و IL-6) در یکی از قهرمانان وزنه‌برداری جهان با استفاده از روش توالی‌یابی کل‌اگزوم بود.

روش کار: پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی از یکی از ورزشکاران عضو تیم ملی وزنه‌برداری مردان، ۵ سی‌سی خون دریافت شد و پس از استخراج DNA از نمونه خون، با استفاده از روش توالی‌یابی کل‌اگزوم مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از توالی‌یابی کل‌اگزوم نشان دهنده وجود واریانت بد معنی (99454613G>A) در ژن IGF1R، پلی‌مورفیسم (22771156C>T) در ژن IL-6، پلی‌مورفیسم‌های (61564052A>G و 61573761T>C) در ژن ACE و پلی‌مورفیسم‌های (150695726T>C و 150704250C>G) در ژن NOS3 بود.

نتیجه‌گیری: نتایج تجزیه و تحلیل توالی‌یابی کل‌اگزوم واریانت و پلی‌مورفیسم‌هایی را در ژن‌های مرتبط با هایپرتروفی و قدرت عضلانی در این وزنه‌بردار نخبه نشان داد. تحقیقات دیگری با حجم نمونه بیشتر جهت بررسی ارتباط این واریانت و پلی‌مورفیسم‌ها با عملکرد ورزشکاران قدرتی مورد نیاز است.

واژه‌های کلیدی: توالی‌یابی کل‌اگزوم، قدرت عضلانی، وزنه‌بردار، هایپرتروفی عضلانی، واریانت، ACE

دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۳۰

ورزشکاران نخبه تا حد زیادی تحت تأثیر عوامل ژنتیکی قرار دارد [۱] و تفاوت در توالی DNA افراد مسئول تمایز در صفات ورزشی است [۲]. در دو دهه

مقدمه
عملکرد ورزشی یک ویژگی پیچیده است که تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی قرار دارد. عملکرد

گذشته، شواهد قانع کننده‌ای درباره ارتباط بین برخی از ژن‌ها با عملکرد ورزشی به دست آمده است [۴،۳]. از طرفی اخیراً پیشرفت در روش‌های تعیین توالی DNA و ژنوتیپ این امکان را فراهم کرده تا برخی از تنوع‌های ژنتیکی فردی که بیانگر عملکرد ورزشی هستند شناسایی شود [۶،۵]. یکی از شاخص‌های مهم ژنتیکی که اخیراً در زمینه ترکیب بدنی مورد بررسی قرار گرفته است پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی می‌باشد. پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی به تغییراتی گفته می‌شود که در آن یک تک نوکلئوتید در توالی ژنوم بین اعضای یک گونه بیولوژیکی یا بین جفت‌های کروموزوم در یک موجود رخ می‌دهد. با توجه به دو رشته‌ای بودن DNA و مکمل بودن دو رشته هرگونه جابجایی در یک رشته تغییری در رشته دیگر و بازهای مکمل ایجاد خواهد کرد. پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در شناسایی ژن‌های کاندیدا که در بیماری و صفات فنوتیپی نقش دارند مفید هستند. پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی می‌توانند بعنوان نشانگر ژنتیکی برای ساخت نقش‌های ژنتیکی با غلظت بالا و مطالعات مرتبط با بیماری‌ها به کار روند [۸،۷].

در ارتباط با فعالیت ورزشی مطالعات گسترده در سراسر جهان نشان می‌دهد عناصر ژنتیکی تاثیر زیادی بر اجزای عملکرد ورزشی همچون استقامت، قدرت، توان، انعطاف پذیری، هماهنگی عصبی عضلانی، ویژگی‌های روانشناختی و سایر ویژگی‌های مهم در ورزش دارند [۹]. تحقیقات صورت گرفته در این زمینه نشان می‌دهند برخی از ژن‌های تنظیم کننده سیستم رنین آنژیوتانسین با قدرت عضلانی ارتباط معنی‌داری دارند. سیستم رنین آنژیوتانسین (RAS) یکی از سیستم‌های هورمونی است که وظیفه کنترل حجم خون، عملکرد سیستم گردش خون و فشار خون را بر عهده دارد. سیستم رنین آنژیوتانسین همچنین با تنظیم پرفیوژن موضعی، که می‌تواند فعالیت متابولیکی را تعدیل کند عملکرد عضلات اسکلتی را کنترل می‌کند. تأثیر گذارترین عامل در سیستم رنین آنژیوتانسین،

آنژیوتانسین II است که یک پپتید منقبض کننده قوی عروق و محرک آلدوسترون می‌باشد که فشار خون، تعادل مایعات و الکترولیت‌ها را کنترل می‌کند. آنژیوتانسین II علاوه بر تنظیم فشار خون، ممکن است بر عملکرد عضلات اسکلتی هم تأثیر بگذارد [۱۰]. یکی از ژن‌هایی که در ارتباط با عملکرد ورزشی بیشتر مورد توجه می‌باشد و تحقیقات گسترده‌ای در زمینه‌ای ارتباط پلی‌مورفیسم‌های آن با عملکرد ورزشی در ورزشکاران و همچنین در زمینه ارتباط بین این پلی‌مورفیسم‌ها و فیزیولوژی عضلات صورت گرفته است، ژن ACE می‌باشد. این ژن که در قلب و عضلات اسکلتی یافت می‌شود با سطح آمادگی جسمانی مبتنی بر عملکرد قلبی-تنفسی و عملکرد بی‌هوایی ارتباط نزدیکی دارد [۱۱]. در این رابطه ژینوسین و همکاران گزارش کردند افراد با ژنوتیپ DD عملکرد بهتری در ورزش‌های قدرتی و توانی دارند [۱۲]. از طرفی عضلات اسکلتی ظرفیت بیان چندین سایتوکاین از جمله IL6, IL5, و IL8 را دارد که در مجموع به عنوان مایوکاین نامیده می‌شوند [۱۳]. در این میان اینترلوکین-6 (IL6) توجه زیادی را به خود جلب کرده است و برخی از پژوهشگران به دلیل اثرات پلیوتروپیک آن در حین فعالیت جسمانی از آن به عنوان یک عامل ورزشی یاد می‌کنند [۱۴]. ژن IL-6، که در بازوی کوتاه کروموزوم ۷ قرار دارد (7p21) علاوه بر سیستم ایمنی [۱۵] در ترمیم و هیپرتروفی عضلات پس از آسیب‌های ایجاد شده در نتیجه تمرینات ورزشی نقش دارد [۱۶،۱۷]. تحقیقات صورت گرفته در این زمینه بیانگر نقش محوری این پروتئین در روند ترمیم عضلات و هیپرتروفی پس از آسیب عضلانی ناشی از فعالیت ورزشی است [۱۷]. در این زمینه یامین و همکاران ارتباط معنی‌دار قوی بین آلل C پلی‌مورفیسم IL6-174 G/C با افزایش سطوح کراتین کیناز سرم، به عنوان شاخص آسیب عضلانی گزارش کردند [۱۸]. همچنین یامین و همکاران گزارش کردند آلل G پلی‌مورفیسم IL6

174G/C- می‌تواند در عملکردهای مبتنی بر سرعت/ قدرت تاثیر گذار باشد [۱۸]. از دیگر ژن‌هایی که ارتباط آن با عملکرد ورزشکاران قدرتی نخبه گزارش شده است ژن NOS3 می‌باشد. یکی از مهمترین فاکتورهای آزادشونده از اندوتلیوم، نیتریک اکساید است. نیتریک اکساید یک رادیکال آزاد است که به‌وسیله آنزیم نیتریک اکساید سنتاز از ال- آرژینین ساخته می‌شود و در فرآیندهای گوناگون همچون انتقال عصبی، اعمال عروقی، دفاع و التهاب درگیر است. NO نقش مهمی در ترمیم و احیاء میوکارد دارد [۱۹]. همچنین شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد NO همچنین در جذب گلوکز عضله اسکلتی انسان در حین ورزش دخیل است (مک کانل و کینگول ۲۰۰۶). ژن NOS3 که eNOS را کدگذاری می‌کند در کروموزم 7q36 قرار دارد یکی از ژن‌های تاثیر گذار در عملکرد ورزشکاران نخبه می‌باشد و ارتباط معنی‌داری بین این ژن با عملکرد ورزشکاران نخبه گزارش شده است [۲۰-۲۲].

از طرف دیگر علی‌رغم وراثت پذیری نسبتاً بالای عملکردهای مرتبط با قدرت و توان عضلانی، تا کنون ۷۰ پلی‌مورفیسم ژنی در ارتباط با عملکرد ورزشکاران قدرتی شناسایی شده است و جستجوی واریانت‌های ژنتیکی که زمینه‌ساز موفقیت در انواع خاصی از ورزش هستند، یک کار چالش‌برانگیز می‌باشد [۲۳]. در دهه اخیر با ظهور تکنولوژی توالی‌یابی نسل جدید (NGS)، توالی‌یابی ژن‌ها و شناسایی واریانت‌ها وارد عرصه جدیدی شده است. فناوری توالی‌یابی کل اگزوم (WES) امکان شناسایی انواع جهش در ژن‌هایی که قبلاً با فعالیت ورزشی در ارتباط بودند را فراهم کرده است اما در ژنتیک ورزشی استفاده از این تکنیک جهت شناسایی واریانت‌های ژنی مرتبط با فعالیت ورزشی هنوز گزارش نشده است. بنابراین هدف از تحقیق حاضر گزارش واریانت‌های جدید در ژن‌های مرتبط با قدرت عضلانی در ژنوم یکی از قهرمانان

وزنه‌برداری جهان با استفاده از روش توالی‌یابی کل اگزوم بود.

روش کار

مطالعه حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اردبیل (IR.ARUMS.REC.1398.548) تایید شد. پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی از یک وزنه‌بردار مرد نخبه ۳۲ ساله (وزن ۱۶۰/۳، قد ۱۹۰/۱) که در تمام رده‌های سنی عضو تیم ملی وزنه‌برداری بوده همچنین موفق به کسب ۶ مدال طلا و ۲ مدال نقره در رده‌های سنی مختلف در گروه وزنی ۱۰۵+ در مسابقات جهانی و آسیایی شده است، مقدار ۵ میلی‌لیتر نمونه خونی جهت بررسی توالی‌یابی کل اگزوم گرفته شد.

پس از کسب رضایت‌نامه کتبی، ۵ میلی‌لیتر خون از نمونه مورد بررسی گرفته و در لوله آزمایش حاوی EDTA ریخته شد. ابتدا DNA ژنومی از خون آزمودنی با استفاده از کیت GenET Bio مطابق با دستورالعمل استخراج شد. برای بررسی ژن‌ها، توالی‌یابی نسل جدید^۱ بکار گرفته شد. نواحی کدینگ و نواحی اینترون/ اگزون کل ژن‌ها با استفاده از کیت SureSelect V4 kit (Agilent, Santa Clara, CA) کپیچر شدند و سپس کتابخانه‌های کپیچر شده با سیستم Illumina Hiseq4000 (Illumina Inc) San Diego, CA, USA فراهم شده توسط Beijing Genomics Institute توالی‌یابی شد. سپس اطلاعات خام حاصل از توالی‌یابی، با مرجع ژنوم انسان (GRCh37/hg19) با کاربرد BWA-0.7.15 هم‌تراز می‌شوند. سپس از ابزار Picard (<https://github.com/broadinstitute/picard>) جهت حذف خوانش‌های مضاعف استفاده شد. پس از آن فراخوانی واریانت‌ها با ابزار آنالیز ژنوم^۲ GTAK انجام شد که از طریق نرم افزارهای خاص اطلاعاتی

¹ Next Generation Sequencing

² Genome Analysis Tool Kit

کیناز-۳ را فعال می کند که شامل گروهی از کینازهای هتروداایمریک است که از زیرمجموعه های تنظیمی و کاتالیکی تشکیل می شود [۲۹]. به ویژه فعال شدن ایزوفریم PI3K(110 α) که در توسعه هایپرتروفی فیزیولوژیکی قلبی دخالت دارد [۳۰]. در حالی که ارتباط بین فعالیت ورزشی و IGF-I به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است [۳۲،۳۱]. در مورد تأثیر تمرینات ورزشی بر IGF-IR اطلاعات بسیار کمی در دست است. با این حال مطالعات حیوانی نقش اساسی IGF-IR را در هایپرتروفی کاردیومیوسیت پس از شرکت در فعالیت های ورزشی را نشان داده اند [۳۲-۳۴].

نتایج تحقیق حاضر همچنین نشان دهنده وجود پلی مورفیسیم های G>A(61564052A) و C>T(61573761T) در ژن ACE بود. شواهد زیادی پیرامون نقش مثبت آلل D ژن ACE در عملکردهای قدرتی و توانی ورزشکاران نخبه وجود دارد. در این ارتباط بورایتا^۴ و همکاران شیوع بالاتر ژنوتیپ DD و یا آلل D را در ورزشکاران قدرتی/ توانی گزارش کردند [۳۵]. چاربنو^۵ و همکاران [۳۶] و همچنین ژائو^۶ و همکاران [۳۷] نشان دادند که آلل D وابسته به قدرت و حجم های بالاتر عضلات است. از سازوکارهای بالقوه ای که به وسیله آن ها سطوح مختلف آنژیوتانسین II می تواند عملکرد انسان را متاثر کند از طریق اثر آنها به عنوان محرک مستقیم رشد سلولی (هر دوی هایپرتروفیک و هایپرپلاستیک). القای عوامل رشد درون زاد مختلف و تسهیل انتقال عصبی سمپاتیک به وسیله افزایش رهایش نورآدرنالین از پایانه های اعصاب محیطی سمپاتیک و دستگاه عصبی مرکزی هستند.

از دیگر نتایج تحقیق حاضر وجود پلی مورفیسیم هایی (150704250C>G و 150695726T>C) در ژن

نقش دارد. پلی مورفیسیم - 174 C/G(rs1800795) در پروموتور ژن IL6 (موقعیت: 7p21) پاسخ رونویسی را تغییر می دهد. رویز^۱ و همکاران پلی مورفیسیم G/C-174 IL6 را در مردان ورزشکار نخبه (استقامتی و قدرتی) و گروه کنترل غیر ورزشکار بررسی کردند و نتایج آنها نشان داد فراوانی ژنوتیپ GG و آلل G در ورزشکاران قدرتی در مقایسه با ورزشکاران استقامتی و افراد غیر ورزشکار به طور قابل توجهی بالاتر بود [۲۴]. همچنین این نتایج در تحقیق ایدر و همکاران تکرار شد [۱۴].

از دیگر یافته های تحقیق حاضر شناسایی واریانت بدمعنی (99454613G>A) در ژن IGF1R بود. در بررسی مسیرهای پیام رسانی وابسته به فعالیت ورزشی اذعان شده است هایپرتروفی فیزیولوژیکی ابتدا از راه عامل رشد شبه انسولینی-۱^۲ محقق می شود [۲۵]. همچنین گزارش شده است تاثیرات IGF-I ناشی از فعالیت ورزشی از طریق تعامل با گیرنده آن (IGF-IR) ایجاد می شود [۲۶].

IGF-1 به وسیله کبد و به مقدار کمتر در قلب تولید می شود. فعالیت ورزشی باعث ترشح IGF-1 به جریان خون می شود و بیان قلبی را IGF-1 تحریک می کند. IGF-1 در بافت قلب به گیرنده تیروزین کیناز خود که IGF-1R است متصل می شود و آبشار PI3K-Akt را فعال می کند [۲۷]. گزارش شده است موش هایی که بیان بیش از حد IGF-1 را تجربه کرده اند، افزایش اندازه قلب را تجربه کرده که این افزایش حجم، از راه هایپرتروفی و هایپرپلازی میوسیت های قلبی مشخص شده است و از قلب در برابر آسیب های ایسکمی و نارسایی های قلبی محافظت می کند [۲۸]. همچنین فعال شدن گیرنده IGF-1 رخ مانه هایپرتروفی فیزیولوژیکی را با افزایش اندازه میوسیت های قلبی تکرار می کند و عملکرد انقباضی آن را حفظ می کند. IGF-1R، فسفوانیوزیتید

³ Phosphoinositide 3-kinases - PI3K

⁴ Boraita

⁵ Charbonneau

⁶ Zhao

¹ Ruiz

² Insulin-like Growth Factor 1

و همچنین عدم همکاری ورزشکاران نخبه در این شرایط، در نهایت یک نفر از ورزشکاران تیم ملی وزنه برداری حاضر به همکاری شد که نتایج آن به صورت گزارش موردی تهیه شد.

نتیجه گیری

عملکرد ورزشکاران نخبه تا حد زیادی تحت تاثیر ژنتیک قرار دارد. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشانگر وجود واریانت جدید و پلی مورفیسم‌های مرتبط با قدرت و هایپرتروفی عضلانی در آگروم ورزشکار نخبه مورد بررسی بود. واریانت و پلی مورفیسم‌های شناسایی شده ممکن است در موفقیت ورزشکاران نخبه تاثیر گذار باشد و با توجه به این که محدودیت اصلی تحقیق حاضر تعداد کم نمونه بود لذا جهت بررسی ارتباط بین این واریانت و پلی مورفیسم‌ها با عملکرد ورزشکاران قدرتی و رکورد وزنه برداران تحقیقات جدید با تعداد زیادی از ورزشکاران مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی دانشگاه محقق اردبیلی می باشد. بدینوسیله از همکاری ورزشکار محترم و همچنین تمامی کسانی که در انجام این پژوهش محققین را یاری کردند تقدیر و تشکر می گردد.

NOS3 بود. ژن NOS3 یکی از ژن‌های کاندید برای بیان اختلاف بین افراد در فنوتیپ‌های مرتبط با سلامت و ظرفیت ورزشی می باشد [۳۸]. این ژن آنزیم eNOS را کدگذاری می کند، آنزیمی که سنتز NO را کاتالیز می کند و نقش اساسی در تنظیم سیستم‌های مهم بدن و عملکرد آنها دارد. همچنین علاوه بر تنظیم مستقیم تن عروق، خون‌رسانی به بافت‌ها (از جمله عضلات در حال فعالیت) در محافظت از قلب و جذب گلوکز مستقل از انسولین نیز نقش مهمی دارد [۳۹،۱۹].

به طور کلی، با در نظر گرفتن این واقعیت که خون‌رسانی به عضلات در حال فعالیت باعث تحمل عملکرد شدید می شود [۴۰] و همچنین تاثیر تنظیمی که NO بر میزان رگ‌های خونی دارد، NOS3 می تواند کاندیدای خوبی برای عملکرد استقامتی بالا باشد. با این وجود در مطالعات مختلف ارتباط بین پلی مورفیسم‌های این ژن با عملکرد ورزشکاران نخبه قدرتی گزارش شده است [۲۱،۱۰]. این یافته‌ها تا حدودی می تواند به نقش NO در هایپرتروفی عضلات نسبت داده شود، زیرا آلل T بیش از حد در ورزشکاران قدرتی بیان می شود [۲۱]. مهمترین محدودیت تحقیق حاضر تعداد کم نمونه بود که در ابتدا محققین قصد داشتند تحقیق را با تعداد بیشتری از ورزشکاران نخبه قدرتی انجام دهند ولی با توجه به اپیدمی کرونا در کشور و محدودیت‌های ناشی از آن

References

- 1- Daniel MG, North KN. Genes and human elite athletic performance. *Hum Genet.* 2005 Apr;116(5):331-9.
- 2- Tural E, Kara N, Agaoglu SA, Elbistan M, Tasmektepligil MY, Imamoglu O. PPAR- α and PPARGC1A gene variants have strong effects on aerobic performance of Turkish elite endurance athletes. *Mol Biol Rep.* 2014 Sep;41(9):5799-804.
- 3- Puthuchery Z, Skipworth JR, Rawal J, Loosemore M, Van Someren K, Montgomery HE. Genetic influences in sport and physical performance. *Sports medicine.* 2011 Oct 1; 41(10):845-59.
- 4- Ma F, Yang Y, Li X, Zhou F, Gao C, Li M, et al. The association of sport performance with ACE and ACTN3 genetic polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. *PloS one.* 2013 Jan ;8(1):e54685.
- 5- Yang N, MacArthur DG, Gulbin JP, Hahn AG, Beggs AH, Eastal S, et al. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *Am J Hum Genet.* 2003 Sep;73(3):627-31.

- 6- Yang N, Macarthur DG, Wolde B, Onyvera VO, Boit MK, Lau S, et al. The ACTN3 R577X polymorphism in East and West African athletes. *Med sci sports exerci*. 2007 Nov; 39(11):1985-8.
- 7- Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007 Oct;9:289-320.
- 8- Xu J-Y, Xu G-B, Chen S-L. A new method for SNP discovery. *BioTechniques*. 2018 Apr;46(3):201-8.
- 9- Tanisawa K, Wang G, Seto J, Verdouka I, Twycross-Lewis R, Karanikolou A, et al. Sport and exercise genomics: the FIMS 2019 consensus statement update. *Br J Sports Med*. 2020 Aug;54(16):969-75.
- 10- Maciejewska-Skrendo A, Ciężczyk P, Chycki J, Sawczuk M, Smółka W. Genetic markers associated with power athlete status. *J Hum Kinet*. 2019 Aug ;68(1):17-36.
- 11- Kim K, Ahn N, Park J, Koh J, Jung S, Kim S, et al. Association of angiotensin-converting enzyme I/D and α -actinin-3 R577X genotypes with metabolic syndrome risk factors in Korean children. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2016 Sep;10:S125-S32.
- 12- Gineviciene V, Jakaitiene A, Aksenov M, Aksenova A, Astratenkova ADI, Egorova E, et al. Association analysis of ACE, ACTN3 and PPARGC1A gene polymorphisms in two cohorts of European strength and power athletes. *Biol Sport*. 2016 Sep;33(3):199.
- 13- Pedersen BK, Åkerström TC, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *J APPL Physio*. 2007 Sep; 103(3):1093-8.
- 14- Eider J, Cieszczyk P, Leońska-Duniec A, Maciejewska A, Sawczuk M, Ficek K, et al. Association of the 174 G/C polymorphism of the IL6 gene in Polish power-orientated athletes. *J Sports Med Phys Fitness*. 2013 Feb; 53(1):88-92.
- 15- Amir O, Amir R, Yamin C, Attias E, Eynon N, Sagiv M, et al. The ACE deletion allele is associated with Israeli elite endurance athletes. *Exp Physiol*. 2007 Sep; 92(5):881-6.
- 16- McKay BR, De Lisio M, Johnston AP, O'Reilly CE, Phillips SM, Tarnopolsky MA, et al. Association of interleukin-6 signalling with the muscle stem cell response following muscle-lengthening contractions in humans. *PloS one*. 2009 Jun 24; 4(6):e6027.
- 17- Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardí M, Muñoz-Cánoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell metab*. 2008 Jan; 7(1):33-44.
- 18- Yamin C, Duarte JAR, Oliveira JMF, Amir O, Sagiv M, Eynon N, et al. IL6 (-174) and TNFA (-308) promoter polymorphisms are associated with systemic creatine kinase response to eccentric exercise. *Eur J APPL Physiol*. 2008 Oct; 104(3):579-86.
- 19- Otani H. The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling. *Antioxidants Redox Signal*. 2009 Aug; 11(8):1913-28.
- 20- Saunders CJ, Xenophontos SL, Cariolou MA, Anastassiades LC, Noakes TD, Collins M. The bradykinin β 2 receptor (BDKRB2) and endothelial nitric oxide synthase 3 (NOS3) genes and endurance performance during Ironman Triathlons. *Hum Mol Genet*. 2006 Mar 15; 15(6):979-87.
- 21- Gómez-Gallego F, Ruiz JR, Buxens A, Artieda M, Arteta D, Santiago C, et al. The -786 T/C polymorphism of the NOS3 gene is associated with elite performance in power sports. *Eur J APPL Physiol*. 2009 Nov; 107(5):565-9.
- 22- Zmijewski P, Ciężczyk P, Ahmetov II, Gronek P, Lulińska-Kuklik E, Dornowski M, et al. The NOS3 G894T (rs1799983) and -786T/C (rs2070744) polymorphisms are associated with elite swimmer status. *Bio Sport*. 2018 Dec; 35(4):313-319.
- 23- Boulygina EA, Borisov OV, Valeeva EV, Semenova EA, Kostyukova ES, Kulemin NA, et al. Whole genome sequencing of elite athletes. *Biol Sport*. 2020 Sep; 37(3):295-304.
- 24- Ruiz JR, Buxens A, Artieda M, Arteta D, Santiago C, Rodríguez-Romo G, et al. The -174 G/C polymorphism of the IL6 gene is associated with elite power performance. *J Sci Med sport*. 2010 Sep; 13(5):549-53.
- 25- Frystyk J. Exercise and the growth hormone-insulin-like growth factor axis. *Med Sci Sports Exerc*. 2010 Jan; 42(1):58-66.

- 26- Philippou A, Halapas A, Maridaki M, Koutsilieris M. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* Jul-Sep 2007; 7(3):208-18.
- 27- Ben-Zaken S, Meckel Y, Dror N, Nemet D, Eliakim A. IGF-I and IGF-I receptor polymorphisms among elite swimmers. *Pediatr Exerc Sci.* 2014 Nov; 26(4):470-6.
- 28- Welch S, Plank D, Witt S, Glascock B, Schaefer E, Chimenti S, et al. Cardiac-specific IGF-1 expression attenuates dilated cardiomyopathy in tropomodulin-overexpressing transgenic mice. *Circ Res.* 2002 Apr 5; 90(6):641-8.
- 29- Kajstura J, Fiordaliso F, Andreoli AM, Li B, Chimenti S, Medow MS, et al. IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress. *Diabetes.* 2001 Jun; 50(6): 1414-1424.
- 30- Lin RC, Weeks KL, Gao X-M, Williams RB, Bernardo BC, Kiriazis H, et al. PI3K (p110 α) protects against myocardial infarction-induced heart failure: identification of PI3K-regulated miRNA and mRNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Apr; 30(4):724-32.
- 31- Eliakim A, Nemet D. Exercise training, physical fitness and the growth hormone-insulin-like growth factor-1 axis and cytokine balance. *Cytokines, growth mediators and physical activity in children during puberty.* *Med Sport Sci.* 2010 Oct; 55:128-140.
- 32- Nemet D, Eliakim A. Growth hormone-insulin-like growth factor-1 and inflammatory response to a single exercise bout in children and adolescents. *Med Sport Sci.* 2010 Oct;55:141-55.
- 33- Kim J, Wende A, Sena S, Theobald H, Soto J, Sloan C, et al. Abel 2008 ED. Insulinlike growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Endocrinol.* 2008 Nov; 22(11):2531-43.
- 34- Scheinowitz M, Kessler-Icekson G, Freimann S, Zimmermann R, Schaper W, Golomb E, et al. Short- and long-term swimming exercise training increases myocardial insulin-like growth factor-I gene expression. *Growth Horm IGF Res.* 2003 Feb; 13(1):19-25.
- 35- Boraita A, de la Rosa A, Heras ME, Ana I, Canda A, Rabadán M, et al. Cardiovascular adaptation, functional capacity, and angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism in elite athletes. *Rev Esp Cardiol.* 2010 Jul; 63(7):810-9.
- 36- Charbonneau DE, Hanson ED, Ludlow AT, Delmonico MJ, Hurley BF, Roth SM. ACE genotype and the muscle hypertrophic and strength responses to strength training. *Medicine and science in sports and exercise.* *Med Sci Sports Exerc.* 2008 Apr; 40(4):677-83.
- 37- Zhao B, Mochhala SM, Tham S-y, Lu J, Chia M, Byrne C, et al. Relationship between angiotensin-converting enzyme ID polymorphism and VO₂max of Chinese males. *Life sciences.* 2003 Oct, 73(20):2625-2630
- 38- Bray MS, Hagberg JM, Perusse L, Rankinen T, Roth SM, Wolfarth B, et al. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update. *Med Sci Sports Exerc.* 2009 Jan; 41(1):35-73.
- 39- Heydemann A, McNally E. NO more muscle fatigue. *J clin invest.* 2009 Mar; 119(3):448-50.
- 40- Wagner PD. New ideas on limitations to VO₂max. *Exerc Sport Sci Rev.* 2000 Jan; 28(1):10-4.