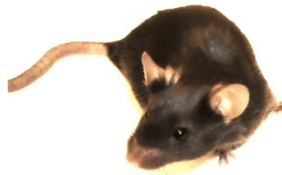


**Anpassungseffekte an ein zehnwöchiges
Lauftraining unter Einfluss von PDTC
(Pyrrolidindithiocarbamat) in der Maus**



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Franziska Röchner

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Diener

und

aus der Abteilung Sportmedizin
Fachbereich Medizin der Eberhard Karls Universität Tübingen

Betreuer: Prof. Dr. Barbara Munz

Anpassungseffekte an ein zehnwöchiges Lauftraining unter Einfluss von PDTC (Pyrrolidindithiocarbamat) in der Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Franziska Röchner

Tierärztin aus Frankfurt a. M.

Gießen, 2020

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Diener

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Barbara Munz

Tag der Disputation: 24.09.2020

**>Eine Möglichkeit, deine Augen zu öffnen, ist,
dich selbst zu fragen:
„Was wäre, wenn ich das vorher nie gesehen hätte?
Was wäre, wenn ich wüsste,
dass ich es nie wieder sehen würde?“<**

**- Rachel Carson (1907-1964,
Biologin, Zoologin, Journalistin)**

Gewidmet den Versuchstieren, deren Leben für die Wissenschaft eingesetzt
wird.

Inhaltsverzeichnis

I.	Abbildungsverzeichnis	V
II.	Tabellenverzeichnis	XVIII
III.	Abkürzungsverzeichnis	XIX
1	Einleitung	1
1.1	Muskeltypen.....	1
1.2	Aufbau des Skelettmuskels und Ablauf der Muskelkontraktion..	2
1.3	Fasertypen der Skelettmuskulatur	4
1.4	Fasertypumwandlung und metabolische Anpassungsreaktionen .	5
1.4.1	Training und Anpassung der Skelettmuskulatur	5
1.4.1.1	Zitratsynthese	7
1.4.1.2	Tbc1d1.....	8
1.4.2	Muskelaufbauende Prozesse	9
1.4.2.1	Chaperone und ihre Aufgaben in der Muskulatur	9
1.4.2.1.1	Cryab	10
1.4.2.1.2	Hsp70 und Hsp90	11
1.4.2.1.3	Unc45b.....	12
1.4.2.1.4	Smyd1	13
1.4.2.2	Nac und skNac.....	14
1.4.2.3	Myomesin1, -2 und -3	15
1.4.2.4	Akt1	16
1.4.3	Muskelabbauende Prozesse.....	17
1.4.3.1	Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	17
1.4.3.1.1	Stub1/Chip	19
1.4.3.1.2	Nedd4.....	20
1.4.3.1.3	Ufd2	21
1.4.3.1.4	Atrogin1, Murf1 und Transkriptionsfaktor Foxo1 .	22
1.4.3.1.5	Traf6	23
1.4.3.2	Rip2	24
1.4.3.3	Calpain und Calpastatin.....	25
1.4.4	Rolle des NFκB-Signalwegs bei der Trainingsanpassung ...	28
2	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	31

3	Materialien und Methoden	34
3.1	Studienaufbau und Trainingsprotokoll.....	34
3.1.1	Laufbandexperiment.....	34
3.1.2	Ruheherzfrequenzmessung.....	37
3.1.3	<i>Grip strength</i> -Messung	38
3.1.4	Gewebepräparation und -bearbeitung.....	38
3.2	Anfertigung von Kryotomschnitten.....	45
3.3	mATPase-Färbung	46
3.3.1	Chemikalien und Gebrauchslösungen	47
3.3.2	Färbeprotokoll und Auswertung.....	48
3.4	Immunfluoreszenz-Färbung	49
3.4.1	Verwendete Antikörper und Lösungen	50
3.4.2	Färbeprotokoll und Auswertung.....	50
3.5	Realtime qPCR-Analysen: Genexpressionsanalyse	52
3.5.1	RNA-Isolierung.....	53
3.5.2	Umschrieb von RNA in cDNA	54
3.5.3	Primerentwurf	55
3.5.4	Primersequenzen der verwendeten Primer	56
3.5.5	Protokoll der Realtime-PCR.....	58
3.5.6	Auswertung und Statistik	60
3.6	Proteinchemische Methoden	61
3.6.1	Proteinisolierung	61
3.6.2	Proteinbestimmung	62
3.6.3	SDS-PAGE.....	62
3.6.4	<i>Western Blot</i>	64
3.6.5	Verwendete Chemikalien und Lösungen.....	65
3.6.6	Verwendete Antikörper	67
3.6.7	Auswertung und Statistik	67
4	Ergebnisse.....	68
4.1	Gewichtsentwicklung der Mäuse in den zehn Versuchswochen	68
4.2	Ermittelte Einzelmuskelgewichte der präparierten Muskeln nach Training.....	71

4.3	Muskelkraftmessung der Mäuse nach zehn Wochen Training...	74
4.4	Messung der Ruheherzfrequenz der Versuchstiere nach zehnwöchigem Ausdauertraining.....	75
4.5	Darstellung der Mhc-Isoformen im M. soleus mittels mATPase-Färbung.....	76
4.6	Darstellung der Mhc-Isoformen im M. soleus mittels Immunfluoreszenzfärbung	78
4.7	Auswirkungen von Training und PDTC auf die Genexpression in unterschiedlichen Muskeln	81
4.7.1	Metabolische Anpassung der Muskeln	81
4.7.2	Expression fasertypspezifischer Mhc-Isoformen in den verschiedenen Versuchsgruppen.....	84
4.7.3	Expression der Marker für muskelaufbauende Prozesse.....	90
4.7.4	Expression der Marker für muskelabbauende Prozesse	104
4.8	Auswirkungen von Training und PDTC auf unterschiedliche Muskeln auf Proteinebene.....	118
4.8.1	Einfluss auf Marker für muskelaufbauende Prozesse	120
4.8.2	Einfluss auf Marker für muskelabbauende Prozesse.....	126
4.8.3	Einfluss auf IκBα als einen Marker des NFκB-Signalwegs.....	132
5	Diskussion.....	134
5.1	Auswirkungen von Training und PDTC-Behandlung auf physiologische Parameter der Versuchsmäuse	135
5.1.1	Training verminderte die Ruheherzfrequenz bei gleichbleibendem Herzmuskelgewicht	137
5.1.2	Es waren keine Unterschiede in der Kraftmessung zwischen den Gruppen darstellbar.....	139
5.1.3	Trainierte Mäuse unter PDTC zeigten ein niedrigeres Körpergewicht nach zehn Wochen Lauftraining.....	139
5.2	Fasertypanpassung und metabolische Veränderungen im Muskel nach Lauftraining und NFκB-Hemmung	140
5.2.1	Marker für „oxidativen“ Muskeltyp waren nach Training leicht erhöht	140

5.2.2	Expression der Marker <i>Zs</i> und <i>Tbc1d1</i> war hinweisend auf eine erfolgte Trainingsanpassung	145
5.3	Expression von Markern für Muskelaufbau in der Trainingsanpassung.....	147
5.3.1	Es zeigten sich divergierende Effekte auf α B-Crystallin auf Proteinebene.....	147
5.3.2	Es waren nur geringe Effekte auf Hsp90 und Hsp70 auf mRNA-Ebene nachweisbar	149
5.3.3	Training und PDTC zeigten einen synergistischen Einfluss auf das Chaperon Unc45b	151
5.3.4	Training führte zu einer leichten Induktion von <i>skNac</i> , zeigte aber keinen Einfluss auf das Chaperon Smyd1	152
5.3.5	Ausdauertraining führte zu keiner Induktion von <i>Myomesin1</i> , -2 und -3, die Konzentrationen schienen aber unter PDTC-Einfluss leicht erhöht.....	153
5.3.6	Ausdauertraining führte zu einer Induktion von <i>Akt1</i>	154
5.4	Erhöhte Konzentration von Markern des Muskelabbaus nach Lauftraining.....	155
5.4.1	Training zeigte einen Einfluss auf die Expression von Genen, die für Komponenten des UPS kodieren	156
5.4.2	Training und PDTC führten zu einer Induktion von <i>Rip2</i> ..	158
5.4.3	Training führte zu einer stärkeren Modulation des ubiquitären Calpain1 als es in der Muskelform Calpain3 bewirkte.....	159
5.5	Bedeutung von NF κ B für die Muskelfaseranpassung an Asdauertraining	161
5.5.1	PDTC zeigte keine Effekte auf die I κ B α -Konzentration im Muskel.....	162
6	Zusammenfassung	163
7	Summary	166
8	Literaturverzeichnis	169
9	Danksagung	191
10	Selbstständigkeitserklärung	193

I. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Aufbau eines Muskels aus Faserbündeln, Myofibrillen, Sarkomeren und letztlich Aktin- und Myosinfilamenten. Modifiziert nach Günther, Möckli und Studyblue (Günther, 2017, Möckli, 2015, Studyblue, 2017).....3
- Abb. 2: Tbc1d1-Funktion: Muskelkontraktion und erhöhte Insulinkonzentrationen führen zur Aktivierung der Kinasen Ampk und Akt, welche beide wiederum Tbc1d1 aktivieren können. Über Glut4-Transporter kommt es zum verstärkten Glukosetransport über das Sarkolemm.9
- Abb. 3: Funktion von Cryab: Als Chaperon verhindert das Protein Wechselwirkungen zwischen unfertigen Proteinen am endoplasmatischen Retikulum. Über Akt- und Mapk-Signalwege wird die Aktivierung von NFκB verhindert, und somit die Einleitung der Apoptose.11
- Abb. 4: Funktion von Unc45b: Unc45b kann gleichzeitig Myosin und Hsp90 binden und auch mit den Ligasen Stub1 oder Ufd2 interagieren, wodurch es eine dreifache Ubiquitinierung von sich selbst bewerkstelligt. Dies führt zum Abbau von Unc45b und reguliert somit die Myosinbildung im Muskel.....13
- Abb. 5: Vereinfachte Darstellung des Akt-Signalwegs; GF=growth factor. Die Aktivierung von Akt1 erfolgt u. a. durch Muskelkontraktion. Über Wachstumsfaktoren wird die PI3K und somit Akt1 aktiviert und vermittelt hemmende Einflüsse auf das UPS sowie eine Proteinproliferation über mTor.16
- Abb. 6: Ablauf der Ubiquitinierung: eine Kaskade aus E1-, E2- und E3-Enzymen führt zum Anheften mehrerer Ubiquitin-Moleküle an ein Protein, wodurch dieses für den Abbau markiert wird.....18
- Abb. 7: Funktion von Stub1, modifiziert nach Heimdal (Heimdal *et al.*, 2014): Ein E2-Enzym bindet an der U-box Domäne von Stub1 und vermittelt die Ubiquitinierung des an der TRP-Domäne gebundenen Proteins. Stub1 hat Bedeutung im UPS und ist Co-Chaperon für kleine Hitzeschockproteine....20
- Abb. 8: Funktion von Ufd2: Die E3-Ligase verlängert bereits vorhandene kurze Ub-Ketten und bildet mit Stub1 einen Komplex, der zu Polyubiquitinierung fähig

ist. Unc45 ist das einzige Protein, das direkt von Ufd2 ubiquitiniert werden kann.....	22
Abb. 9: Funktion von Foxo1, Atrogin1 und Murf1: Durch Muskelkontraktion oder erhöhte ROS- oder Insulinkonzentrationen kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Foxo. Dieser verhindert die Phosphorylierung von Akt, wodurch dessen hemmender Einfluss auf Atrogin1 und Murf1 wegfällt und beide in ihrer Funktion als E3-Ligasen aktiv werden.....	23
Abb. 10: Funktion von Traf6: Traf6 wird durch zelluläre Stresszustände, Lipopolysaccharide und Interleukine aktiviert und ist an zahlreichen Stoffwechselwegen beteiligt. Über NFκB und nachgeschaltete Mechanismen kommt es zur Vermittlung von katabolen Zuständen.....	24
Abb. 11: Funktion von Rip2: Nach Aktivierung von Rip2 durch zelluläre Stresszustände erfolgte eine direkte Aktivierung von NFκB nach Bindung von Ikk oder über die E3-Ligase Traf6 oder Mapk- und Jnk-Signalwege.	25
Abb. 12: Funktion von Calpain1, Calpain3 und Calpastatin. Modifiziert nach Scicchitano <i>et al.</i> , 2015: Die Aktivierung der Calpaine erfolgt kalziumabhängig und führt zu muskelabbauenden Prozessen. Eine Hemmung durch Calpastatin ist nur für Calpain1 beschrieben.....	27
Abb. 13: Aktivierung und Funktion von NFκB in der Zelle, modifiziert nach Albensi und Sun (Albensi, 2019, Sun, 2011): Der klassische Weg beschreibt die Aktivierung der Ikk, welche die Phosphorylierung von IκBα vermittelt, das anschließend ubiquitiniert und abgebaut wird. Somit ist das frei vorliegende NFκB aktiviert und transloziert in den Zellkern. Der alternative Weg umfasst eine gesteigerte Aktivität der Nik, was eine Homodimerisierung der Ikk bewirkt, welche anschließend die Aktivierung von p52 vermittelt. Im Zellkern induziert der Transkriptionsfaktor NFκB u. a. Prozesse der Apoptose, der Immunantwort und von Entzündungsvorgängen.	29
Abb. 14: Darstellung der PDTC-Wirkung: Es kommt zur Hemmung von ROS und von NFκB, wodurch das inhibitorische IκBα nicht abgebaut wird und NFκB nicht in den Zellkern translozieren kann.	30
Abb. 15: Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Marker.....	33
Abb. 16: Übersicht der vier Versuchsgruppen des Experiments.....	35

Abb. 17: Links: Laufband von oben betrachtet; rechts: Laufband und <i>Power-Station</i> von der Seite, bei maximal eingestellter Steigung von 15 °	37
Abb. 18: Ruhepulsmessung an der Schwanzvene mit dem <i>PhysioSuite</i> -Gerät von Kent-Scientific.....	37
Abb. 19: Durchführung des <i>Grip strength</i> -Tests: links mit den Vordergliedmaßen, rechts mit allen vier Beinen.	38
Abb. 20: Präparation der Muskeln der Hintergliedmaße.....	42
Abb. 21: Präparation der Muskeln der Vordergliedmaße.	44
Abb. 22: Beispiel der drei resultierenden Mhc-Isoformen: in schnell kontrahierenden Muskelfasern ist die mATPase stärker konzentriert, als in langsam kontrahierenden. Bei saurer Präinkubation wurde sie inhibiert, so dass sich Mhc I-Fasern dunkel, Mhc IIA-Fasern sehr hell und Mhc IIX-Fasern mittel stark gefärbt darstellen.....	46
Abb. 23: Reaktionsprinzip der indirekten Immunfluoreszenz: Kommerziell erworbene Primärantikörper binden Proteine der Muskelfasern und werden selbst durch anschließend hinzugefügte spezifische Sekundärantikörper gebunden. Ein verankerter Fluoreszenzfarbstoff dient der Detektion bei mikroskopischer Betrachtung unter einer bestimmten Wellenlänge.....	49
Abb. 24: Beispiel der Ansicht der Immunfluoreszenzfärbung und der Kontrollen am Schnitt eines <i>M. soleus</i> bei 550 nm, 470 nm und 365 nm sowie bei 470 nm an einem <i>M. extensor digitorum longus</i> . Mhc IIA-Fasern stellen sich rot dar, Mhc IIB-Fasern grün, Mhc-I Fasern blau und Mhc IIX-Fasern ungefärbt.....	52
Abb. 25: Gewichtsentwicklung der Mäuse als MW der Gewichts Differenz der Wochenmessung zu ihrem Ausgangsgewicht über den Trainingszeitraum von zehn Wochen, mit SD, n = 4.....	69
Abb. 26: Gewichtszunahme der Mäuse nach zehn Wochen als MW der vier Versuchsgruppen mit SD, n=4. * p < 0,05 im Vergleich der trainierten Gruppen mit und ohne PDTC-Trinkwasserbehandlung.....	70
Abb. 27: Einzelmuskelgewichte der vier Mausversuchsgruppen in mg im Verhältnis zur Körpermasse der Mäuse in g, n=4. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere	

	waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.	73
Abb. 28:	Kraftmessung der Vordergliedmaßen bzw. aller vier Gliedmaßen vor und nach Absolvieren des letzten Trainings mit einem <i>Grip strength</i> -Gerät, n = 4. Werte in g, relativ zum Körpergewicht, MW mit SD. *** p < 0,001 im Vergleich der Messung vor und nach dem Training in den Gruppen mit und ohne PDTC-Behandlung bei Messung der Vordergliedmaßenkraft.....	74
Abb. 29:	Ruheherzfrequenz der vier Vergleichsgruppen, gemessen mit dem PhysioSuite-Gerät von Kent Scientific, in Schlägen pro Minute, n=4. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum, * p < 0,05 im Vergleich von Mäusen ohne Trinkwasserbehandlung mit und ohne Training, ** p < 0,01 im Vergleich der PDTC-Mäuse mit und ohne Training, *** p < 0,001 im Vergleich unbehandelte Mäuse zu Mäusen mit Training und PDTC.	76
Abb. 30:	Beispiele der mATPase-Färbung der Mm. Solei. (A) Kontrolle + H ₂ O, (B) Training + H ₂ O, (C) Kontrolle + PDTC und (D) Training + PDTC in 10x Vergrößerung. Hell = Mhc IIA-, dunkel = Mhc I-, mittel = Mhc IIX- und -IIB-Fasern.	77
Abb. 31:	MW der Fasertypen in % im Vergleich der vier Versuchsgruppen mit SD, n = 4.	78
Abb. 32:	Beispiele der Immunfluoreszenzfärbung der Mm. solei. (A) Kontrolle + H ₂ O, (B) Training + H ₂ O, (C) Kontrolle + PDTC und (D) Training + PDTC, n = 4. Rot = Mhc IIA-, blau = Mhc I-, grün = Mhc IIB-, schwarz = Mhc IIX-Fasern.....	79
Abb. 33:	MW der Fasertypen in % im Vergleich der vier Versuchsgruppen mit SD, n = 4.	80
Abb. 34:	Relative Konzentration des ZS-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 101,65. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil,	

die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum, * $p < 0,05$ zwischen Mäusen ohne Training, mit unbehandeltem Trinkwasser zu trainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und zwischen Letzteren und untrainierten PDTC-Mäusen im EDL. ** $p < 0,01$ zwischen untrainierten PDTC-Mäusen und Mäusen mit PDTC und Training sowie zwischen Letzteren und untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser im EDL.

.....82

Abb. 35: Relative Konzentration des *Tbc1dl*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 91,13. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen Mäusen ohne Training und ohne Trinkwasserbehandlung zu untrainierten Mäusen mit PDTC sowie zwischen Letzteren und trainierten Mäusen mit PDTC im GA. Im SOL bei Mäusen ohne Trinkwasser-Behandlung zwischen trainierter und untrainierter Gruppe. ** $p < 0,01$ im EDL von untrainierten Mäusen ohne Trinkwasser-Behandlung jeweils zur Gruppe ohne PDTC, mit Training als auch zur Gruppe ohne Training mit PDTC sowie zwischen trainierten Mäusen ohne PDTC zu Mäusen mit Training und PDTC. Im SOL zwischen Mäusen mit PDTC-Behandlung mit und ohne gleichzeitigem Training. *** $p < 0,001$ zwischen unbehandelten untrainierten Mäusen und Mäusen mit PDTC und Training im SOL.83

Abb. 36: Relative Konzentration des *Mhc IIA*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 147,97. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und Training zu denen ohne Training und ohne PDTC sowie zwischen Letzteren und Mäusen mit

- sowohl Training als auch PDTC-Behandlung im TRIC. ** $p < 0,01$ zwischen untrainierten Mäusen ohne PDTC zu trainierten Mäusen ohne PDTC sowie zwischen Letzteren und untrainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung und zwischen Ersteren und Mäusen mit sowohl PDTC als auch Training im EDL. *** $p < 0,001$ im Vergleich trainierter und untrainierter Mäuse der PDTC-Gruppen im EDL..... 85
- Abb. 37: Relative Konzentration des *Mhc IIB*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 102,59. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum..... 86
- Abb. 38: Relative Konzentration des *Mhc IIX*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 103,09. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum..... 88
- Abb. 39: Relative Konzentration des *Mhc I*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 94,12. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum..... 89
- Abb. 40: Relative Konzentration des *Cryab*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 100,22. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und Mäusen mit sowohl PDTC-Behandlung als auch absolviertem Training im TRIC... 90

-
- Abb. 41: Relative Konzentration des *Hsp90*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 105,26. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen den Gruppen mit unbehandeltem Trinkwasser und Training sowie ohne Training im SOL.92
- Abb. 42: Relative Konzentration des *Hsp70*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 110,88. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.93
- Abb. 43: Relative Konzentration des *Unc45b*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 106,59. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen trainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und Mäusen ohne Training unter PDTC sowie zwischen Letzteren und trainierten Mäusen mit PDTC im EDL. ** $p < 0,01$ zwischen den trainierten Gruppen mit und ohne PDTC-Behandlung im SOL. *** $p < 0,001$ zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und Mäusen mit sowohl Training als auch PDTC-Behandlung sowie zwischen Letzteren und untrainierten Mäusen mit PDTC im SOL.94
- Abb. 44: Relative Konzentration des *Smyd1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 99,98. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil,

- die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum..... 96
- Abb. 45: Relative Konzentration des *skNac*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 91,08. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen trainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und Mäusen mit PDTC, ohne Training im GA. 97
- Abb. 46: Relative Konzentration des *Myomesin1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 119,68. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. ** $p < 0,01$ zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und Mäusen mit sowohl absolviertem Training als auch PDTC-Behandlung sowie zwischen Letzteren und trainierten Mäusen ohne PDTC im TRIC. *** $p < 0,001$ zwischen Mäusen mit PDTC-Behandlung bei absolviertem Training und ohne dieses im TRIC..... 99
- Abb. 47: Relative Konzentration des *Myomesin2*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 101,69. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum..... 100
- Abb. 48: Relative Konzentration des *Myomesin3*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 108,46. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil,

- die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.101
- Abb. 49: Relative Konzentration des *Akt1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 125,29. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ im SOL zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser bei absolviertem Training und ohne dieses. Im TRIC zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser bei absolviertem Training und ohne dieses sowie zwischen Ersteren und untrainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung und auch zwischen Ersteren und trainierten Mäusen mit PDTC.....103
- Abb. 50: Relative Konzentration des *Stub1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 124,17. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ im EDL zwischen Mäusen ohne Trinkwasserbehandlung mit und ohne Training sowie zwischen trainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und Untrainierten mit PDTC sowie zwischen Letzteren und trainierten, PDTC-behandelten Mäusen.im SOL zwischen den Gruppen von Mäusen mit PDTC-Behandlung mit und ohne Training. ** $p < 0,01$ im EDL zwischen trainierten Mäusen mit und ohne Trinkwasserbehandlung mit PDTC.104
- Abb. 51: Relative Konzentration des *Nedd4*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 99,21. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. ** $p < 0,01$ bei PDTC-behandelten Mäusen mit und ohne Training im SOL. *** $p < 0,001$

-
- zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen mit PDTC im SOL. 106
- Abb. 52: Relative Konzentration des *Ufd2*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 105,35. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. *** $p < 0,001$ zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen ohne PDTC sowie zwischen Ersteren und untrainierten Mäusen mit PDTC und zwischen Ersteren und trainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung im EDL. 107
- Abb. 53: Relative Konzentration des *Atrogin1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 101,89. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. 109
- Abb. 54: Relative Konzentration des *Murf1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 108,73. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. 110
- Abb. 55: Relative Konzentration des *Foxo1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 108,55. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung sowie zwischen Letzteren und

- Untrainierten mit PDTC und zwischen diesen und trainierten Mäusen ohne PDTC-Behandlung im EDL. ** $p < 0,01$ zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser mit und ohne Training im EDL..... 111
- Abb. 56: Relative Konzentration des *Rip2*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 102,1. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen Mäusen mit PDTC-Behandlung mit und ohne Training im TRIC. *** $p < 0,001$ zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser mit und ohne Training sowie untrainierten Mäusen ohne PDTC und Untrainierten mit PDTC-Behandlung und zwischen Ersteren und trainierten PDTC-behandelten Mäusen im GA..... 113
- Abb. 57: Relative Konzentration des *Calpain1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 115,31. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung im SOL..... 114
- Abb. 58: Relative Konzentration des *Calpain3*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 118,84. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. 115
- Abb. 59: Relative Konzentration des *Calpastatin*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 111,71. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil,

die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung im GA sowie zwischen den Mäusen mit PDTC im Trinkwasser mit und ohne Training im SOL. ** $p < 0,01$ zwischen untrainierten Mäusen mit und ohne PDTC-Behandlung im GA sowie zwischen selbigen Gruppen im SOL. *** $p < 0,001$ zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser mit und ohne Training im GA sowie zwischen selbigen Gruppen im SOL und zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung im SOL.....	117
Abb. 60: Übersicht der erhaltenen <i>Western Blot</i> -Filme.....	120
Abb. 61: Relative Konzentration des <i>Cryab</i> -Gens auf Protein-Ebene in <i>Western Blot</i> -Analysen der verschiedenen Muskeln, Normalisierte Expressionswerte, $n=4$. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen untrainierten Mäusen mit und ohne PDTC im Trinkwasser im ECR sowie zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser mit und ohne Training im FDS und zwischen Mäusen mit PDTC-Behandlung mit und ohne Training im FDS. ** $p < 0,01$ zwischen Mäusen ohne Trinkwasserbehandlung mit und ohne Training im ECR sowie zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung im FDS.....	122
Abb. 62: Relative Konzentration des <i>Unc45b</i> -Gens auf Protein-Ebene in <i>Western Blot</i> -Analysen der verschiedenen Muskeln, Normalisierte Expressionswerte, $n=4$. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen Mäusen mit PDTC-Behandlung mit und ohne absolviertem Training im RF.....	123

- Abb. 63: Relative Konzentration des *Smyd1*-Gens auf Protein-Ebene in *Western Blot*-Analysen der verschiedenen Muskeln, Normalisierte Expressionswerte, n=4. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. 125
- Abb. 64: Relative Konzentration des *Atrogin1*-Gens auf Protein-Ebene in *Western Blot*-Analysen der verschiedenen Muskeln, Normalisierte Expressionswerte, n=4. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * p < 0,05 zwischen Mäusen mit PDTC-Behandlung mit und ohne absolviertem Training im TA. ** p < 0,01 zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung im TA..... 127
- Abb. 65: Relative Konzentration des *Murf1*-Gens auf Protein-Ebene in *Western Blot*-Analysen der verschiedenen Muskeln, Normalisierte Expressionswerte, n=4. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. 129
- Abb. 66: Relative Konzentration des *Traf6*-Gens auf Protein-Ebene in *Western Blot*-Analysen der verschiedenen Muskeln, Normalisierte Expressionswerte, n=4. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * p < 0,05 zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser mit und ohne Training im ECR. 131
- Abb. 67: Relative Konzentration des *IκBα*-Gens auf Protein-Ebene in *Western Blot*-Analysen der verschiedenen Muskeln, Normalisierte Expressionswerte, n=4. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. 133

II. Tabellenverzeichnis

Tbl. 1: Kontraktile, metabolische und morphologische Eigenschaften der verschiedenen Skelettmuskelfasertypen.....	5
Tbl. 2: Faserverteilung in den in dieser Arbeit untersuchten murinen Muskeln in % (Talmadge <i>et al.</i> , 2014, Augusto <i>et al.</i> , 2004, Kammoun <i>et al.</i> , 2014, Mathewson <i>et al.</i> , 2012).....	6
Tbl. 3: Eingewöhnungs- und Trainingsprotokoll der Laufgruppe; in der PDTC-Gruppe mit PDTC-Dosierung im Trinkwasser, bei vorausgesetzter Trinkmenge von 5 ml/d.....	36
Tbl. 4: Anatomische Eigenschaften der im Experiment präparierten Muskeln der Hintergliedmaße (König&Liebich, 2009).....	39
Tbl. 5: Präparierte Vordergliedmaßenmuskulatur der Maus mit anatomischen Besonderheiten (König&Liebich, 2009, S. 188-209).....	43
Tbl. 6: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Primer.....	57
Tbl. 7: Zusammensetzung des Trenngels und des Sammelgels der SDS-PAGE. ...	63
Tbl. 8: Im Rahmen dieser Arbeit für die Erstellung von <i>Western Blots</i> eingesetzte Antikörper.....	67
Tbl. 9: MW der Gewichts Differenz der Mäuse zu ihrem Anfangsgewicht in Woche 0 in g mit SEM in %, n = 4.	69
Tbl. 10: MW der Muskelgewichte sowie von Herz und Zwerchfell relativ zum Gesamtkörpergewicht in den vier Vergleichsgruppen in mg und SEM in %, n = 4.	74
Tbl. 11: MW der Fasertypen in % im Vergleich der vier Versuchsgruppen mit SEM, n = 4.	78
Tbl. 12: MW der Fasertypen in % im Vergleich der vier Versuchsgruppen mit SEM, n = 4.	80

III. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Azetyl-CoA	Azetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Aktivierte Proteinkinase B
Ampk	<i>5' adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumperoxidsulfat
As160	<i>Akt substrate of 160 kDa</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Baff	<i>B-cell activating factor</i>
BIC	biceps brachii
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAR	<i>caspase activation and recruitment</i>
CC	<i>coiled-coil</i>
CD40	<i>Cluster of differentiation 40</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm ²	Quadratzentimeter
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Chip	<i>carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein</i>
Cryab	alpha B-Crystallin
Ct-Wert	<i>cycle threshold-Wert</i>
d	Tag

ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIA	Diaphragma
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ECR	extensor carpi radialis
EDL	extensor digitorum longus
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
<i>et al.</i>	et alii/aliae/alia
FDS	flexor digitorum superficialis
Foxo	<i>Forkhead box class O</i>
GA	gastrocnemius
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GF	<i>Growth factor</i>
Glut4	Glukosetransporter Typ 4
h	Stunde
HECT	<i>homologous to E6-AP C-terminus</i>
Hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
Hsp70	<i>heat-shock protein 70</i>
Hsp90	<i>heat-shock protein 90</i>
Hrp	Horseradish-Peroxidase
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IκB	<i>Inhibitor of kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
IκBa	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
Jnk	C-Jun-N-terminale Kinase

KO	<i>knock out</i>
l	Liter
log2	Logarithmus
M	Mol
M.	Musculus
mA	Milliampère
Mafbx	<i>Muscle atrophy F-Box</i>
Mapk	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mATPase	myofibrilläre Adenosintriphosphatase
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
Mhc	<i>Myosin-heavy-chain</i>
min	Minute
ml	Milliliter
Mlc	<i>Myosin-light-chain</i>
mm	Millimeter
mM	millimolar
MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase</i>
Murf1	<i>Muscle RING = „really interesting new Gene“ Finger-1</i>
MW	Mittelwert
MYND	<i>Myleoid, Nervy and DEAF-1</i>
Nac	<i>nascent polypeptide associated complex</i>
Nedd4	<i>neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4</i>
ng	Nanogramm
Nik	<i>NFκB-inducing kinase</i>

NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
nm	Nanometer
nM	nanomolar
Nod1	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1</i>
Nod2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
NP-40	Nonylphenolethoxylat 40
N-Terminus	Amino-Terminus
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDTC	Ammonium-Pyrrolidindithiocarbamat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RING	<i>really interesting new gene</i>
Rip2	<i>Receptor interacting protein 2</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RF	rectus femoris
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktiven Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	<i>standard deviation</i>
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden

SEM	<i>standard error of the mean</i>
SET	<i>SU(VAR)3-9, enhancer of zeste and trithorax</i>
Smyd	<i>SET and MYND Domain containing</i>
SOL	soleus
skNac	<i>skeletal muscle-specific variant of nascent polypeptide associated complex</i>
Stub1	<i>stress-induced phosphoprotein 1 homology and U-box containing protein 1</i>
TA	tibialis cranialis
Tbc1d1	<i>Tre-2/Bub2/Cdc16 domain family member 1</i>
Tbc1d4	<i>Tre-2/Bub2/Cdc16 domain family member 4</i>
Tbc1 Rab-Gap	<i>Tre-2/Bub2/Cdc16 guanosine triphosphate activating proteins</i>
Tbl.	Tabelle
Tbp	<i>TATA-box-binding-protein</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TPR	<i>Tetratricopeptide repeat</i>
Traf2	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2</i>
Traf6	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6</i>
TRIClong	triceps brachii Caput longum
Ub	Ubiquitin
Ufd2	<i>Ubiquitin fusion degradation protein 2</i>
Ufd4	<i>Ubiquitin fusion degradation protein 4</i>
Unc45	<i>uncoordinated mutant number 45</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV-Licht	Ultraviolettes-Licht
V	Volt
V.	Vena

x g	relative Zentrifugalkraft
Zs	Zitratsynthase
μl	Mikroliter

1 Einleitung

Die Muskulatur ist ein wichtiger Bestandteil des Lebens: Muskelfasern, bei höheren Organismen zu Muskeln zusammengeschlossen, ermöglichen die willkürliche Fortbewegung und somit die aktive Beteiligung an unserer Umwelt. Auch unbewusst laufen viele lebensnotwendige Vorgänge des Körpers über das Zusammenspiel von Muskeln ab: Das Zwerchfell ist der Hauptatemmuskel des Körpers, in den Wänden der Blutgefäße verlaufen Muskelfasern und die Verdauung, und somit Aufnahme von Energie, ist abhängig von enteraler Motorik. Muskulatur nimmt 40 % der Körpermasse ein und ist fähig, chemische Energie direkt in motorische umzuwandeln (Frontera&Ochala, 2015).

1.1 Muskeltypen

Anhand der mikroskopisch sichtbaren Querstreifung unterscheidet man zwischen glatter und quergestreifter Muskulatur. Glatte Muskulatur ist vegetativ innerviert, also nicht abhängig von willkürlicher Beeinflussung. Diesen Muskeltyp findet man u. a. in Hohlorganen, wie Magen, Darm und Harnblase, in Blutgefäßen, Gallengängen, Uterus und im Auge. Glatte Muskelzellen kontrahieren zwar langsamer als Skelettmuskelzellen, sind diesen jedoch in Kraft, Ausdauer und Energieeffizienz überlegen.

Im Gegensatz zur glatten Muskulatur ist – wie der Name sagt – bei der quergestreiften Muskulatur eine feine Querstreifung bei mikroskopischer Betrachtung erkennbar. Die Skelettmuskulatur ist in der Regel somatisch innerviert und zu schneller Bewegung und großer Kraftentwicklung fähig. Ein Sonderfall der quergestreiften Muskulatur ist die Herzmuskulatur: Diese ist vegetativ innerviert, ermüdet nicht und weist zusätzlich mikroskopisch sichtbare Glanzstreifen auf.

1.2 Aufbau des Skelettmuskels und Ablauf der Muskelkontraktion

Ein Skelettmuskel ist immer über eine Sehne mit einem Knochen verbunden, wobei er mehrere solcher Ursprünge aufweisen kann. Der Muskelbauch wird aus mehreren Muskelfaserbündeln gebildet, die vom bindegewebigen Epimysium zum Muskel zusammengefasst werden. Perimysium verbindet die Muskelfaserbündel miteinander, die wiederum aus mehreren Muskelfasern mit dazwischen gelagertem Endomysium bestehen (vgl. Abb. 1). Eine Muskelfaser ist stets ein Synzytium mehrerer Myofibrillen. Durch diesen Zusammenschluss kommt es dazu, dass jede Muskelfaser mehrere Zellkerne enthält und eine Länge von 1 mm bis 15 cm erreichen kann. Die Myofibrillen sind aus den dünnen Aktin- und den dicken Myosinfilamenten aufgebaut, die an sogenannten Z-Scheiben miteinander verbunden und für die namensgebende Querstreifung verantwortlich sind. Den Bereich zwischen zwei Z-Scheiben nennt man Sarkomer. Eine Myofibrille setzt sich somit aus mehreren Sarkomeren zusammen. Ein Myosinfilament ist aus mehreren hundert Myosinmolekülen aufgebaut, die wiederum aus Hexameren bestehen. Das Myosinmolekül wird aus zwei schweren (*myosin heavy chain*, Mhc) und vier leichten Myosinketten (*myosin light chain*, Mlc) gebildet. Die leichten Ketten formen den sogenannten Hals, die schweren - den Schwanzbereich und die beiden Myosinköpfe. Diese wirken als ATPase (Adenosintriphosphatase), d. h. sie können den Magnesium-ATP-Komplex binden und ATP spalten. Die Köpfe interagieren auch mit den Aktinfilamenten, worauf das Protein Troponin hemmenden Einfluss hat. Die dünnen Filamente bestehen somit aus Aktinketten, an welche jeweils eine Tropomyosinkette angelagert ist, die wiederum mit Troponinkomplexen verbunden ist. Hier unterscheidet man das Troponin T, das Tropomyosin bindet, Troponin C, das die Fähigkeit besitzt, Kalzium zu binden und das Troponin I, welches die Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin hemmt (Knechtle, 2002).

Durch Erhöhung des Kalziumspiegels im Inneren der Muskelfaser, als Antwort auf einen Nervenimpuls an der motorischen Endplatte, wird die Muskelkontraktion eingeleitet. Troponin C bindet dieses Kalzium, wodurch

das Protein seine Konformation ändert und die Myosinköpfe an Aktin binden können. Durch gleichzeitige Erhöhung der ATPase-Aktivität verändert sich auch die Konformation der Myosinköpfe und die dicken Myosinfilamente schieben sich in einer Art Ruderbewegung an Aktin entlang. Dieser Prozess verbraucht Energie durch Spaltung von ATP und der Querbrückenzyklus bedingt eine Filamentverschiebung von 10-20 nm; für eine sichtbare Bewegung muss der Ablauf also mehrfach hintereinander erfolgen.

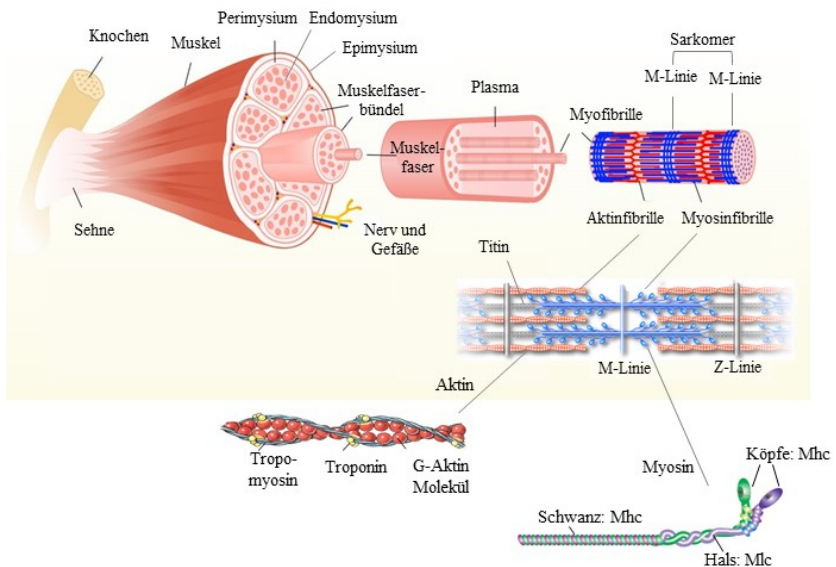


Abb. 1: Aufbau eines Muskels aus Faserbündeln, Myofibrillen, Sarkomeren und letztlich Aktin- und Myosinfilamenten. Modifiziert nach Günther, Möckli und Studyblue (Günther, 2017, Möckli, 2015, Studyblue, 2017).

1.3 Fasertypen der Skelettmuskulatur

Anhand ihrer metabolischen und kontraktilen Eigenschaften lassen sich mehrere *Myosin-heavy-chain* (Mhc) Isoformen im Skelettmuskel unterscheiden (vgl. Tbl. 1). Typ I-Fasern sind zu ausdauernder Kontraktion fähig, Typ II-Fasern eher zu schnellem Kraftaufwand. Typ I-Fasern weisen dementsprechend eine hohe Dichte an Mitochondrien, Kapillaren, Myoglobin und intramuskulären Lipiden auf. Sie decken ihren Energiebedarf durch oxidative Verbrennung von Glukose und Fettsäuren in den Mitochondrien. Dieser Muskeltyp wird auch als „rot“ und „langsam“ bezeichnet. Bewegungen können bei geringer Ermüdungstendenz lang ausdauernd, doch bei vergleichsweise geringem Kraftaufwand ausgeführt werden.

Typ II-Fasern hingegen weisen eine niedrigere Konzentration der „oxidativen“ Succinatdehydrogenase (SDH) und eine höhere Konzentration der myofibrillären Adenosintriphosphatase (mATPase) auf. Aufgrund der deutlich geringeren Zahl an enthaltenen Mitochondrien, Myoglobin und Kapillaren spricht man hier auch von „weißer“ Muskulatur (Moosburger, 1995). Typ II-Fasern können anhand der Mhc-Isoformen noch weiter unterteilt werden: Mhc IIA-Fasern sind zu schneller, ausdauernder Kraftleistung fähig und enthalten sowohl „glykolytische“, als auch „oxidative“ Enzyme in hoher Zahl. Sie weisen viele Charakteristika der Typ I-Fasern auf. Mhc IIB-Fasern, die nur bei Nagetieren vorkommen, sind sehr schnell, aber leicht ermüdbar und für kurze Belastungen mit hohem Kraftaufwand ausgelegt. Mhc IIX-, auch -IID-Fasern genannt, weisen einen eher „glykolytischen“ Metabolismus auf, sind aber immunhistochemisch auch für die SDH deutlich anfärbbar und sind bezüglich ihrer Kontraktionsgeschwindigkeit zwischen Mhc IIA- und -IIB-Fasern angesiedelt (Marini&Veicsteinas, 2010). Muskelfasern können auch parallel mehrere Isoformen bilden. Diese Muskelfasern nennt man Hybridfasern. Sie stehen bezüglich ihrer Eigenschaften zwischen spezifischen Fasertypen, wie z. B. Typ I- und IIA-Fasern. Man findet sie vermehrt während Trainingsanpassungsprozessen (Brummer *et al.*, 2013).

Fasertyp	Typ I	Typ II		
Mhc-Isoform	Mhc I	Mhc IIA	Mhc IIB	Mhc IIX
Kontraktionsgeschwindigkeit	langsam	schnell	sehr schnell	schnell
Ausdauerleistung	hoch	mittel	sehr gering	gering
„Oxidative“ Kapazität	hoch	hoch	gering	mittel
„Glykolytische“ Kapazität	gering	mittel	hoch	hoch
Myoglobingehalt	hoch	mittel	gering	gering
Kapillardichte	hoch	mittel	gering	gering
Mitochondriengehalt	hoch	mittel	gering	gering
Fettstoffwechsel	hoch	mittel	gering	gering
Farbe	rot	rot	weiß	weiß

Tbl. 1: Kontraktile, metabolische und morphologische Eigenschaften der verschiedenen Skelettmuskelfasertypen.

1.4 Fasertypumwandlung und metabolische Anpassungsreaktionen

1.4.1 Training und Anpassung der Skelettmuskulatur

Das Verhältnis der Muskelfasertypen zueinander ist bereits bei der Geburt weitgehend genetisch festgelegt (vgl. Tbl. 2). Durch verschiedene Einflüsse, wie dem Nährstoffangebot, Hypoxie, Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren kommt es aber durchaus noch zu Muskelfaserumbau und -anpassung. So kann z. B. die Kontraktilität der Fasern durch andauernde Inaktivität aber auch durch experimentelle bzw. medizinisch eingesetzte elektrische Stimulation oder auch durch körperliches Training beeinflusst werden (Marini&Veicsteinas, 2010).

Muskel	Typ I		Typ II	
	Mhc I	Mhc IIA	Mhc IIB	Mhc IIX
M. rectus femoris	2 %	14 %	18 %	66 %
M. gastrocnemius	0-1 %	17 %	84 %	0 %
M. extensor digitorum longus	0 %	11 %	89 %	0 %
M. soleus	43 %	45 %	1 %	11 %
M. triceps brachii, caput longum	5 %	17 %	55 %	23 %
M. extensor carpi radialis	0 %	0 %	63 %	37 %
M. flexor digitorum superficialis	0 %	34 %	15 %	51 %

Tbl. 2: Faserverteilung in den in dieser Arbeit untersuchten murinen Muskeln in % (Talmadge *et al.*, 2014, Augusto *et al.*, 2004, Kammoun *et al.*, 2014, Mathewson *et al.*, 2012).

Man unterscheidet grundsätzlich zwischen Ausdauer- und Krafttraining. Ausdauer bezeichnet die Fähigkeit des Muskels, wiederholte Anstrengungen eine längere Zeit lang aufrechtzuhalten. Dies geht in der Regel mit körperlicher Fitness einher, bei der auch das Herzkreislaufsystem trainiert wird. Bei Kraftleistung geht es hingegen um die Überwindung eines großen Widerstandes für einen kurzen Zeitraum. Hierzu wird Energie auf „glykolytischem“ Weg bereitgestellt und es kommt zur verstärkten Hypertrophie der Muskulatur. Ausdauer im Herzkreislaufsystem ist hierfür nicht relevant.

Durch wiederholtes Training kommt es in Muskelfasern zu einer funktionellen Anpassung wie z. B. zu einer besseren Sauerstoffverwertung, einer erhöhten Mitochondriendichte und effizienteren Energieübertragung (Drexler *et al.*, 2012, Howald *et al.*, 1985, Zoll *et al.*, 2003). Eine völlige metabolische und funktionelle Umwandlung von schnellen in langsame Muskelfasern ist nicht möglich, jedoch konnte in verschiedenen Trainingsexperimenten eine Änderung der Muskelfaserzusammensetzung

v. a. hinsichtlich der Hybridfasern nachgewiesen werden (Ausoni *et al.*, 1990, Termin *et al.*, 1989, Windisch *et al.*, 1998). Innerhalb ihrer metabolischen Möglichkeiten ist eine Adaptation der Ausdauerfasern hinsichtlich $I \leftrightarrow IIA \leftrightarrow IIX$ sowie bei schnellen Fasern $IIB \leftrightarrow IIX \leftrightarrow IIA$ möglich. Es konnte also eine Anpassung bei Krafttraining von langsamen zu schnelleren Fasern und bei Ausdauertraining von schnellen zu eher langsamen Fasern beobachtet werden (Marini&Veicsteinas, 2010).

Auch Neubildung von Muskelfasern aus sogenannten Satellitenzellen spielt eine Rolle bei der Trainingsanpassung der Muskulatur (Schiaffino&Reggiani, 2011). Satellitenzellen sitzen unter der Basalmembran der Skelettmuskelfasern und sind auch im adulten Organismus zur Differenzierung in Muskelzellen fähig.

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass sowohl die Umwandlung als auch die Neubildung von Muskelfasern für Anpassungsprozesse bedeutend ist. Um einen ungefähren Gleichgewichtszustand der Anzahl an Muskelfasern zu erhalten, muss ein Aufbau im Gesamtmuskel immer auch mit einem Abbau von Muskelfasern einhergehen. Dementsprechend sind bei jedem Muskelumbau auch Abbauprozesse aktiv.

1.4.1.1 Zitratsynthese

Die Zitratsynthese (Zs) befindet sich in Mitochondrien und katalysiert die Reaktion von Oxalazetat und Azetyl-CoA zu Zitrat und ist somit entscheidend für einen funktionierenden Zitratzyklus (Anoop *et al.*, 2003).

Die Zs ist ein häufig untersuchter Marker zur Einschätzung der „oxidativen“ Anpassung des Skelettmuskels in Antwort auf ein erfolgreiches Ausdauertraining. Ein Anstieg der im Muskel enthaltenen Konzentration kann bereits nach einmaliger körperlicher Belastung beobachtet werden, ist aber noch um ein Vielfaches stärker ausgeprägt, wenn der Organismus regelmäßiges Training durchläuft. Auch der Untersuchungszeitpunkt nach dem Training ist entscheidend für die Höhe des zu erwartenden Anstiegs (Leek *et al.*, 2001).

Ein Zusammenhang besteht ebenfalls zwischen der Zitratsynthase-Konzentration und der Mitochondriendichte im Skelettmuskel, sowie seiner „oxidativen“ Kapazität. Dies wurde z. B. über eine Korrelation mit der $\dot{V}O_2\text{max}$ (relative maximale Sauerstoffaufnahme) validiert, die die maximale Sauerstoffaufnahme angibt, zu der der Körper, bezogen auf sein Gesamtgewicht, im Zustand der Ausbelastung fähig ist (Vigelson *et al.*, 2014).

1.4.1.2 Tbc1d1

Tbc1d1 ist ein Protein der TBC Rab-Gap Familie. Für Tbc1d1 und Tbc1d4 (auch als As160 bezeichnet) wurde bereits mehrfach eine wichtige Rolle im Glukosestoffwechsel der Zelle nachgewiesen. Beide Proteine weisen eine Strukturhomologie von etwa 50 % auf. *Tbc1d1* hat mehrere Phosphorylierungsstellen, deren Funktion noch nicht ausschöpfend geklärt ist und zeigt sich verstärkt in Skelettmuskeln exprimiert, wohingegen Tbc1d4 in allen Körperzellen vorkommt (An *et al.*, 2010).

Eine höhere Konzentration von Tbc1d1 ist für „glykolytisch“ arbeitende Muskeltypen beschrieben, Tbc1d4 findet sich hingegen vermehrt in „oxidativen“ Muskelfasern (Taylor *et al.*, 2008). Tbc1d1 ist ein wichtiger Regulator des Glukosetransports in der Skelettmuskulatur, sowohl durch Insulin als auch durch Muskelkontraktion, wobei beides durch unterschiedliche Signalwege vermittelt wird. Kinasen wie Akt und Ampk (5' *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) können Tbc1d1 phosphorylieren und somit aktivieren (Jessen *et al.*, 2011). Es kommt nachfolgend zur vermehrten Translokation des Glukosetransporters Glut4 in das Sarkolemm und somit zum Anstieg der Glukosekonzentration in der Zelle (Stockli *et al.*, 2015), (vgl. Abb. 2). Aufgrund seines erhöhten Vorkommens nach körperlichem Training kann Tbc1d1 auch als Nachweis einer erfolgten Belastung dienen.

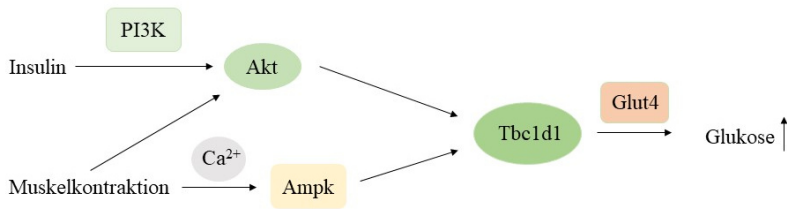


Abb. 2: Tbc1d1-Funktion: Muskelkontraktion und erhöhte Insulinkonzentrationen führen zur Aktivierung der Kinasen Ampk und Akt, welche beide wiederum Tbc1d1 aktivieren können. Über Glut4-Transporter kommt es zum verstärkten Glukosetransport über das Sarkolemm.

1.4.2 Muskelaufbauende Prozesse

1.4.2.1 Chaperone und ihre Aufgaben in der Muskulatur

Der Faserumbau in der Muskulatur ist immer sowohl mit Neubildung als auch mit Abbau von Proteinen verbunden. Chaperone sind Proteine, die die korrekte Faltung neusynthetisierter Proteine unterstützen und überwachen und somit unerlässlich für eine normale Zellfunktion sind. Der englische Name bedeutet „Anstandsdame“ und beschreibt ihre Funktion: das Bewahren von Proteinen vor schädlichen Kontakten. Die Neusynthese eines Proteins aus Aminosäuren erfolgt an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums (ER). Ihre Funktion erhalten diese Proteine erst bei Einnahme ihrer korrekten dreidimensionalen Struktur, also nach ihrer sogenannten Faltung. Einflüsse hierauf haben v. a. hydrophobe Wechselwirkungen mit dem umgebenden Milieu (Dill *et al.*, 2008).

Man unterscheidet zwei verschiedene Wirkweisen der Chaperone. Chaperone wie das kleine Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) lagern sich an die aggregationsanfälligen Stellen der Aminosäureketten an und schirmen diese auf diese Weise ab, wodurch sie das Entstehen falscher Bindungen verhindern. Haben Proteine ihre endgültige Struktur eingenommen, sind die hydrophoben Regionen in das Innere gerichtet und somit nicht mehr stark exponiert. Es kommt hierbei also zu keinem direkten Eingreifen in den Faltungsprozess durch Chaperone.

Hsp60-Chaperone hingegen formen käfigähnliche Gebilde, aus denen die Proteine in ihrer hydrophoben, also fertig gefalteten Form entlassen werden (Saibil, 2013). Dieser Vorgang verbraucht viel Energie in Form von ATP, welches parallel hydrolysiert wird.

1.4.2.1.1 Cryab

Ein Chaperon, das bei der Entstehung des Aktinfilaments mitwirkt, ist alpha B-Crystallin (Cryab). Es ist ebenfalls an der Entwicklung von Titin und Desmin beteiligt (Smith *et al.*, 2014). Versuche zeigten, dass Cryab-defiziente Mäuse nicht mehr in der Lage waren, Myozyten aus Satellitenzellen zu regenerieren und eine erhöhte Atrophie aufwiesen (Neppl *et al.*, 2014).

Cryab zählt zu den kleinen Hitzeschockproteinen. Wie diese hat es die Fähigkeit, supramolekulare Systeme zu formen, d. h. die Moleküle werden nicht durch kovalente Bindungen zusammengehalten, sondern z. B. durch Wasserstoffbrücken, Van-der-Waals-Kräfte oder hydrophobe Wechselwirkungen. Ebenfalls wie die kleinen Hitzeschockproteine findet sich auch Cryab bei hohen Temperaturen im Bereich des Zellkerns und bei normalen Temperaturen im Zytoplasma der Zelle (Klemenz *et al.*, 1991).

Ein erhöhtes Cryab-Vorkommen wurde bei verschiedenen Krankheiten und Entzündungszuständen festgestellt, was auf eine vermehrte Bildung bei zellulären Stresszuständen zurückgeführt wird (Fittipaldi *et al.*, 2015). Die Verhinderung der NFκB-induzierten Apoptose auf Reize wie oxidativen Stress und UV-Licht ist über die Akt- und Mapk-Signalwege für Cryab nachgewiesen (Hu *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2016), (vgl. Abb. 3).

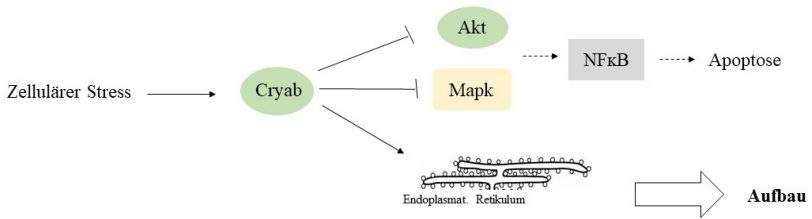


Abb. 3: Funktion von Cryab: Als Chaperon verhindert das Protein Wechselwirkungen zwischen unfertigen Proteinen am endoplasmatischen Retikulum. Über Akt- und Mapk-Signalwege wird die Aktivierung von NFκB verhindert, und somit die Einleitung der Apoptose.

1.4.2.1.2 Hsp70 und Hsp90

Chaperone wie die Hitzeschockproteine 70 (Hsp70) und -90 (Hsp90) kommen ubiquitär in allen Zellen vor. Diese beiden kleinen Hitzeschockproteine spielen eine wichtige Rolle für Proteinumbau und -funktion und wirken über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) auch am Abbau beschädigter oder nicht-funktionaler Proteine mit. Bindungspartner von Hsp70 hierbei ist die in Kapitel 1.4.3.1.1 beschriebene E3-Ligase Stub1/Chip. Hsp90 wirkt hingegen stabilisierend auf hydrophobe Bereiche der Proteine und verhindert deren Ubiquitinierung durch Hsp70 und Stub1 (Pratt *et al.*, 2010).

Hsp90 ist aus drei funktionellen Bereichen aufgebaut: Die N-terminale Domäne ist für die ATP-Bindung verantwortlich und hat selbst ATPase-Aktivität. Die mittlere und die C-terminale Domäne sind für die Zusammenlagerung der Chaperone verantwortlich (Street *et al.*, 2012).

Nach Bindung des neu synthetisierten Proteins kommt es zu einer energieverbrauchenden Konformationsänderungen von Hsp90, in deren Verlauf das Chaperon die korrekte Bildung anderer Proteine unterstützt (Taipale *et al.*, 2010).

2008 konnten Etard *et al.* zeigen, dass Hsp90 und auch Unc45b in der Z-Scheibe des Sarkomers ansässig sind. Bei Einwirken von zellulärem Stress sind beide in der Lage, zur A-Bande zu translozieren und bei Bedarf am

dortigen Myosin dessen Reparatur zu überwachen und zu unterstützen (Etard *et al.*, 2007). Für Hsp70 existiert keine solche feste Lokalisation im Sarkomer, was auch eine vielfältigere Funktion vermuten lässt. Unc45b und Hsp90 kontrollieren die korrekte Faltung der Myosin-Motordomäne, die im Myosinkopf lokalisiert ist. Nach Erfüllung dieser Aufgabe migrieren Hsp90 und Unc45b zur Z-Scheibe, wo die Histonmethyltransferase Smyd1 Unc45b als Co-Chaperon unterstützt, bevor es an der M-Linie weitere Aufgaben erfüllt (Smith *et al.*, 2014).

1.4.2.1.3 Unc45b

Es existieren zwei Isoformen von Unc45 (*uncoordinated mutant number 45*), die eine Sequenzhomologie von etwa 50 % aufweisen. Unc45a ist in Nieren, Leber, Uterus und Lunge zu finden, Unc45b fast ausschließlich in Herz- und Skelettmuskel (Price *et al.*, 2002).

Unc45b kann gleichzeitig Myosin und Hsp90 binden und hat hierbei sowohl eigene Chaperon- als auch Hsp90-Co-Chaperon Aktivität. Es kann aber auch mit den Ligasen Stub1 oder Ufd2 interagieren und durch diese eine dreifache Ubiquitinierung von sich selbst bewerkstelligen. Dies führt zum Abbau von Unc45b durch das 26S Proteasom-System (vgl. Abb. 4), ein Mechanismus, der die Bildung von Myosin reguliert (Hoppe *et al.*, 2004).

Versuche zeigten, dass ein Fehlen von Unc45b zu schweren Fehlern im Aufbau von Sarkomeren führt, wobei die Integration von Myosinfilamenten beeinträchtigt ist. Interessanterweise führt ein erhöhtes Unc45b-Vorkommen ebenfalls zu gestörtem Sarkomeraufbau (Spellmon *et al.*, 2015). Dies unterstreicht die Bedeutung des Proteins für die Entwicklung von Skelett- und Herzmuskulatur. Durch seine Unterstützung bei der Faltung des Myosinmotorproteins ist Unc45b essentiell für die Ausbildung funktioneller Muskelfasern. Zu einer möglichen regulatorischen Bedeutung bei der Fasernanpassung nach Muskeltraining existieren bisher kaum Daten.

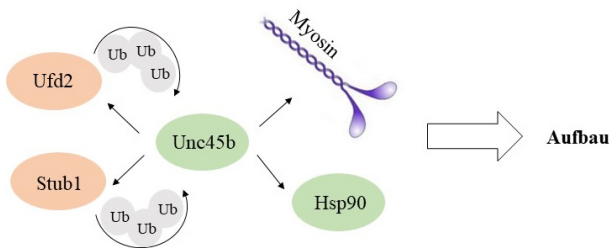


Abb. 4: Funktion von Unc45b: Unc45b kann gleichzeitig Myosin und Hsp90 binden und auch mit den Ligasen Stub1 oder Ufd2 interagieren, wodurch es eine dreifache Ubiquitinierung von sich selbst bewerkstelligt. Dies führt zum Abbau von Unc45b und reguliert somit die Myosinbildung im Muskel.

1.4.2.1.4 Smyd1

Smyd1 ist eine Histon-Methyltransferase, die an der M-Linie der Muskelsarkomere lokalisiert ist und mit Myosin interagiert (Smith *et al.*, 2014), aber auch im Zellkern gefunden werden kann. Smyd bezeichnet Proteine, die eine SET (*SU(VAR)3-9, enhancer of zeste and trithorax*) und eine MYND (*myleoid, nervy and DEAF-1*) Domäne besitzen. Die SET-Domäne beeinflusst die Transkription von Proteinen über Vermittlung der Methylierung von Lysin-Resten an Histonen. Die MYND-Domäne weist ein Zink-Finger-Motiv auf und ist für die Interaktion zwischen zwei Proteinen wichtig. Auf transkriptioneller Ebene hat sie eher hemmende Eigenschaften, indem sie Histon-Deazetylasen rekrutiert und aktiviert, was die Transkription der meisten Gene inhibiert (Spellmon *et al.*, 2015).

Man unterscheidet fünf Smyd Proteine. Smyd1 ist v. a. in Herz- und Skelettmuskelzellen zu finden und wird in der Maus auch als „mBop“ bezeichnet. Smyd1 wird eine wichtige Bedeutung bei der Sarkomerogenese zugesprochen. Tan *et al.*, 2006, fanden eine erhöhte Konzentration in langsam kontrahierenden Muskelfasern (Tan *et al.*, 2006), wohingegen Spellmon *et al.*, 2015, Smyd1-RNA nur in Herzmuskel- und schnell kontrahierenden Muskelfasern nachweisen konnten (Spellmon *et al.*, 2015).

Die Bedeutung von Smyd1 ist im Besonderen auch für die Kardiogenese untersucht worden. In *knock out*-Mäusen zeigte sich, dass Smyd^{-/-}-Embryos nicht lebensfähig waren, da es zu einer starken Fehlentwicklung des Herzens kam. Zellkulturversuche wiesen die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor skNac nach und die Beteiligung beider an der Myoblastendifferenzierung. Hierbei findet eine gemeinsame Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma statt (Sims *et al.*, 2002).

1.4.2.2 Nac und skNac

Eine ähnliche Funktion wie die zuvor beschriebenen Chaperone nimmt der „*nascent polypeptide associated complex*“ (Nac) in der Zelle ein. Nac bindet neu synthetisierte Polypeptidketten am Ribosom und verhindert deren Interaktion mit anderen Proteinen (Wiedmann *et al.*, 1994), weswegen es auch als „molekulares Chaperon“ bezeichnet werden kann. Weiterhin schützt es seine Bindungspartner vor Proteolyse (Wang *et al.*, 2010).

Untersuchungen zur Verteilung und intrazellulären Lokalisation zeigen, dass Nac im Zytosol der Zellen fast ausschließlich als Heterodimer zu finden ist (Beatrix *et al.*, 2000). Aufgebaut ist es aus einer α - und einer β -Untereinheit, die für die unterschiedlichen Funktion der beiden Proteine verantwortlich sind. Nur β -Nac kann direkt mit Ribosomen interagieren. Durch seine Fähigkeit der Wechselwirkung mit Nukleinsäuren, wie sie auf Ribosomen und im Zytosol vorzufinden sind, trägt aber auch α -Nac dazu bei, ungewollte Bindungen von Ribosom und endoplasmatischem Retikulum zu verhindern (Beatrix *et al.*, 2000).

Die herz- und skelettmuskelspezifische Variante von Nac ist skNac, dessen Hauptbindungspartner wiederum das zuvor beschriebene Chaperon Smyd1 ist.

Verschiedene Versuche konnten die Bedeutung von skNac für die Myoblastenmigration und Sarkomerogenese nachweisen. Das Expressionsniveau während der embryonalen Entwicklung ist hierbei deutlich geringer ausgeprägt als nach der Geburt, ähnlich wie es bei

Myoglobin der Fall ist. Gendefiziente Mäuse zeigen stark reduzierte Myosinkonzentrationen in den Muskelzellen und ein Fehlen der roten Muskelfasern (Park *et al.*, 2010). Experimente von Munz *et al.*, 1999, konnten auch eine Beteiligung an Regenerationsvorgängen im Muskel nachweisen: Versuchsmäusen wurde eine Wunde am Rücken zugefügt und 12 Stunden später fand sich im Bereich der Wundränder eine erhöhte Expressionsrate von *skNac* im Hautmuskel (Munz *et al.*, 1999). Yotov und St-Arnaud, 1996, konnten nachweisen, dass das Protein die transkriptionelle Aktivität am Myoglobinpromoter in der Maus fördert (Yotov&St-Arnaud, 1996). Somit könnte *skNac* vermutlich ebenfalls eine Rolle in der Bildung neuer Muskelfasern spielen.

1.4.2.3 Myomesin1, -2 und -3

Auch das Muskelprotein Myomesin zeigt sich an der Kontrolle des Sarkomerauf- und -einbaus beteiligt. Myomesin ist Teil der M-Linie im Sarkomer und dient der Verankerung der dicken Filamente Myosin und Titin (Obermann *et al.*, 1996). Myomesine zählen zu den Immunglobulinen (Auerbach *et al.*, 1999). Das Protein ist ausschließlich in quergestreifter Muskulatur zu finden, aber sowohl in langsam als auch in schnell kontrahierenden Fasern. Zur Familie gehören die Proteine Myomesin1, Myomesin2 und Myomesin3, die sich in ihrem Aufbau und in ihrer Funktion ähneln. Die entsprechenden Gene werden aber in unterschiedlichen Arten von Muskelzellen exprimiert. Insbesondere ist Myomesin1 ubiquitär in allen quergestreiften Muskeln zu finden, Myomesin2 v. a. im Herzmuskelgewebe adulter Säugetiere und in schnell kontrahierenden Skelettmuskelfasern und Myomesin3 in mittelschnellen Skelettmuskelfasern (Schoenauer *et al.*, 2008).

Durch die gezielte Störung des Sarkomeraufbaus in Zebrafischen konnte in *in-vivo* Versuchen ein starker Anstieg an *Myomesin1* induziert werden (Prill *et al.*, 2019). Weitere Studien zeigten, dass auch Myomesin3 ein sensibler Marker für Muskelschädigung ist (Rouillon *et al.*, 2015).

1.4.2.4 Akt1

Als „Aktivierte Proteinkinase B“ bezeichnet man die drei Proteinkinasen Akt1, Akt2 und Akt3, die eine Phosphatgruppe auf Proteine übertragen und somit eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielen. Das für die Serin-Threonin-Proteinkinase Akt1 kodierende Gen ist in allen Geweben exprimiert, Akt2 v. a. in insulin-sensiblen Gewebe wie braunem Fett und der Leber. Akt3 kommt ebenfalls ubiquitär vor, jedoch nur in geringer Konzentration im Skelettmuskel und in der Leber. Eine hohe Expression von *Akt*-Genen konnte auch in Tumorgewebe nachgewiesen werden (Bellacosa *et al.*, 2004).

Eine Aktivierung von Akt erfolgt durch extrazelluläre Einflüsse, wie oxidativem Stress, durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine. Ein Muskelumbau, wie er bei einer Anpassung an z. B. Trainingsreize notwendig ist, bedarf immer auch eines Abbaus von bestehenden Fasern. Dies erfolgt in der Regel durch das Ubiquitin-Proteasom-System (vgl. Kapitel 1.4.3.1). Gleichzeitig muss die Synthese neuer Proteine erfolgen. Eine Hemmung des UPS und die Induktion der Proteinsynthese erfolgt u. a. über eine Signalkaskade aus Wachstumsfaktoren (z. B. IGF-1 und Insulin), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Akt1 (Sandri *et al.*, 2006). Akt1 wirkt somit hemmend auf den Muskelabbau und ist ein wichtiger Faktor des Muskelaufbaus (vgl. Abb. 5).

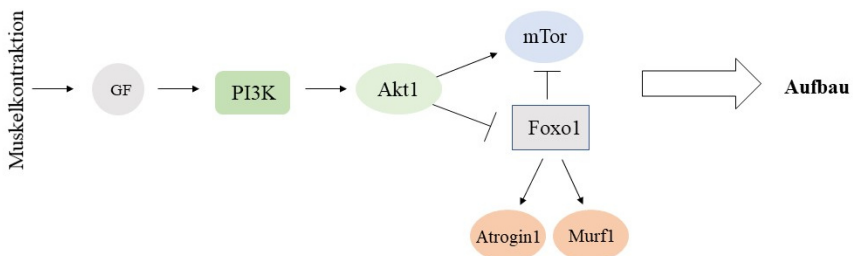


Abb. 5: Vereinfachte Darstellung des Akt-Signalwegs; GF=growth factor. Die Aktivierung von Akt1 erfolgt u. a. durch Muskelkontraktion. Über Wachstumsfaktoren wird die PI3K und somit Akt1 aktiviert und vermittelt hemmende Einflüsse auf das UPS sowie eine Proteinproliferation über mTor.

Von Geburt an zeigen Akt1-defiziente Mäuse eine verminderte Körpergröße, die sie bis ins adulte Alter beibehalten (Yang *et al.*, 2003). In Akt1 *knock out*-Mäusen konnte zudem eine verminderte Satellitenzellproliferation auf Muskelstimuli nachgewiesen werden, die unabhängig von der mTor-Regulierung ist (Moriya&Miyazaki, 2018). Bei einer Überexpression von *Akt* konnten vor allem im kardialen Gewebe Effekte beobachtet werden: Versuchstiere zeigten eine deutliche Kardiohypertrophie und verstärkte Kontraktionskraft der Herzmuskelzellen (Condorelli *et al.*, 2002).

1.4.3 Muskelabbauende Prozesse

1.4.3.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Bereits 1942 konnte der deutsch-amerikanische Biochemiker Rudolf Schönheimer durch die Markierung von Molekülen mit radioaktiven Isotopen nachweisen, dass ein kontinuierlicher Auf- und Abbau von Proteinen stattfindet. Die Lebensdauer eines Proteins variiert abhängig von seiner Funktion enorm. Strukturelle Proteine können jahrelang unverändert bleiben, einige regulatorische Proteine hingegen haben bereits wenige Minuten nach ihrer Synthese ihren Zweck erfüllt. Ebenso müssen beschädigte oder falsch-synthetisierte Proteine abgebaut werden. Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass bis zu 30 % der neu-synthetisierten Proteine niemals einen funktionellen Zustand erreichen (Schubert *et al.*, 2000).

Zum Abbau intrazellulärer Proteine dienen das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) sowie Lysosomen. Letztere sind membranumschlossene Zellorganellen, die sich frei im Zytoplasma der Zelle bewegen können. Über Endozytose nehmen sie abzubauende Stoffe auf und zerlegen sie mit Hilfe der enthaltenen Nukleasen, Lipasen und Proteinasen in ihre Grundbausteine. Eine Proteasom-Einheit besteht aus einem 20S-Kernkomplex, welcher die proteolytischen Zentren enthält, sowie aus zwei anhaftenden 19S-Komplexen, die regulatorische Aufgaben haben und für die Erkennung sowie Bindung der Proteine zuständig sind (Sorokin *et al.*, 2009). Intrazelluläre Proteine werden selektiv über Proteolyse des UPS abgebaut. Hierbei wird das

abzubauen. Protein durch Anheften von mehreren Ubiquitin-Molekülen markiert. Diese sogenannte „Ubiquitinierung“ erfolgt in einer Kaskade aus E1- (Ub-aktivierendes Enzym), E2- (Ub-konjugierendes Enzym) und E3- (E3-Ligase)-Enzymen und ist für das Proteasom das Zeichen zum Abbau dieses Proteins.

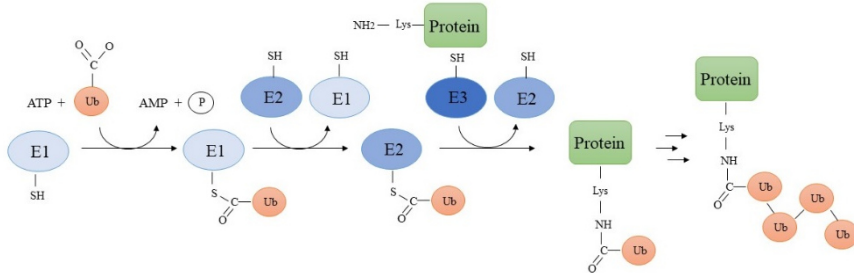


Abb. 6: Ablauf der Ubiquitinierung: eine Kaskade aus E1-, E2- und E3-Enzymen führt zum Anheften mehrerer Ubiquitin-Moleküle an ein Protein, wodurch dieses für den Abbau markiert wird.

Zunächst kommt es zu einer Thioesterbildung zwischen Ubiquitin und dem für ein Protein spezifischen E1-Enzym. Diese Aktivierung von Ubiquitin verbraucht Energie in Form von ATP. Dann überträgt ein E2-Enzym das Ubiquitin an die E3-Ligase, welche letztendlich eine Isopeptidbindung zwischen dem C-Ende des Ubiquitin-Moleküls und einem Lysin des Proteins vermittelt (vgl. Abb. 6). Eine Bindung von mindestens vier Ubiquitin-Molekülen ist erforderlich, damit ein 26S-Proteasom den Abbau des markierten Proteins einleitet. Für jedes Protein gibt es nur ein E1-Enzym, das spezifisch dessen Aktivierung anstößt. Dahingegen gibt es aber etwa 50 E2-Enzyme und über 500 mögliche E3-Ligasen (Sorokin *et al.*, 2009). Man unterscheidet zwischen zwei Hauptklassen von E3-Ligasen, den RING (*really interesting new gene*) E3-Ligasen und den HECT (*homologous to E6-AP C-terminus*) E3-Ligasen. HECT-Ligasen übernehmen ein Ubiquitin-

Molekül des E2-Enzyms und transferieren es weiter an das Substratprotein. RING-E3-Ligasen hingegen unterstützen die Interaktion zwischen E2 und Substrat, so dass Ubiquitin direkt an dieses übermittelt werden kann (Yang&Kumar, 2010).

1.4.3.1.1 Stub1/Chip

Eine *RING-finger* E3-Ubiquitin-Ligase ist z. B. Stub1/Chip. In seiner Aufgabe sowohl im Ubiquitinsystem als auch als Co-Chaperon für kleine Hitzeschockproteine wie Hsp70 und Hsp90, unterstützt es den Abbau beschädigter oder missgefalteter Proteine.

Stub1 ist aus drei Komponenten aufgebaut: der *Tetratricopeptide repeat* (TPR)-Domäne, der *coiled-coil* (CC)- und der *U-box*-Domäne. An die N-terminale TRP-Domäne binden die Proteine, die im Folgenden ubiquitiniert werden, darunter auch die Hitzeschockproteine (vgl. Abb. 7). Ein E2-Enzym bindet an die U-box-Domäne von Stub1, so dass Stub1 die Ubiquitinierung des Hitzeschockproteins bzw. direkt des Zielproteins vermittelt. Die Ubiquitinierung von Stub1 und dem Hitzeschockprotein selbst ist dabei regulatorischer Natur und führt nicht zum Abbau der beiden (Heimdal *et al.*, 2014). Als Bindungspartner von Stub1 konnten mehr als 30 Proteine identifiziert werden. Stub1 hat Bedeutung bei der Zelldifferenzierung, der Einleitung der Apoptose, der Glukokortikoidantwort sowie im p53- und in cAMP Signalwegen (McLaughlin *et al.*, 2012).

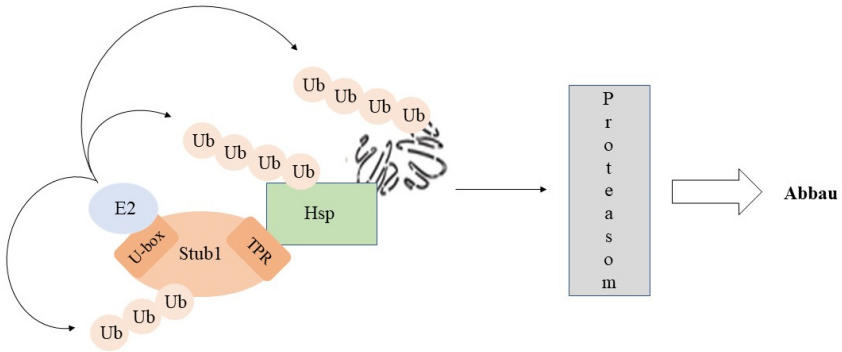


Abb. 7: Funktion von Stub1, modifiziert nach Heimdal (Heimdal *et al.*, 2014): Ein E2-Enzym bindet an der U-box Domäne von Stub1 und vermittelt die Ubiquitinierung des an der TRP-Domäne gebundenen Proteins. Stub1 hat Bedeutung im UPS und ist Co-Chaperon für kleine Hitzeschockproteine.

Im Mausmodell zeigte sich Stub1 als v. a. in der neurologischen Entwicklung bedeutsam. Gendefiziente Mäuse verstarben häufig während oder kurz nach der Geburt und wiesen Anzeichen für einen beschleunigten Alterungsprozess und einen fehlerhaften Proteinstoffwechsel auf (Heimdal *et al.*, 2014).

1.4.3.1.2 Nedd4

Nedd4 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*) ist eine E3-Ubiquitinligase, die in hoher Konzentration in Muskeln vorkommt und die Interaktion von Muskeln und Motoneuronen reguliert (Yang&Kumar, 2010). Nedd4 weist eine N-terminale Fett- und Protein-bindende C2-Domäne auf, die meist kalziumabhängig die Bindung an ein Substrat oder auch an die Phospholipidmembran vermitteln kann. Im Nager konnten drei, im Menschen sogar vier sogenannte WW-Domänen nachgewiesen werden, die für Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen zuständig sind, also die Bindung an das Substrat vermitteln. Eine C-terminale HECT-Domäne wird ebenfalls in allein Proteinen der Nedd-Familie gefunden und stabilisiert das Protein selbst (Dunn *et al.*, 2004). Vor der

Ubiquitinübertragung findet eine Thioesterbindung zwischen dem Cystin-Rest der HECT-Domäne und dem aktivierten Ubiquitin des E2-Enzyms am N-Terminus statt. HECT katalysiert nun die Übertragung von Ubiquitin an ein Substrat, das Nedd4 im WW-Bereich gebunden hat (Rotin&Kumar, 2009). In Tierexperimenten zeigte sich, dass *Nedd4* nach Denervation im murinen Muskel verstärkt exprimiert wurde (MacNeil *et al.*, 2014). *Knock out*-Mäuse bleiben in ihrer körperlichen Entwicklung zurück und, wie in Zellkulturversuchen nachgewiesen wurde, wachsen Fibroblasten ohne Nedd4-Einfluss langsamer (Yang&Kumar, 2010). Nedd4 reguliert Wachstumsfaktoren wie IGF-1 und führt zu einer verminderten Zahl an epidermalen und vaskulären Wachstumsfaktorrezeptoren (Morrione *et al.*, 1999).

1.4.3.1.3 Ufd2

Ufd2 (*Ubiquitin fusion degradation protein 2*) ist als eine RING-finger E3-Ligase ebenfalls an Sarkomerabbauprozessen beteiligt und hat Einfluss auf das Chaperon Unc45b, das für den Aufbau des Myosinfilaments eine bedeutende Rolle spielt.

Obwohl Ufd2 die Ubiquitinierung von Zielproteinen nicht selbst einleiten kann, ist das Protein auf eine besondere Art am Proteinabbau beteiligt: Ufd2 verlängert kurze Ub-Ketten, die zuvor durch das Partner-E3-Enzym Ufd4 gebildet wurden. Diese beinahe einzigartige Aktivität hat den Namen E4-Ligase geprägt (Koege *et al.*, 1999).

Es konnte nachgewiesen werden, dass das Zusammenspiel von Ufd2 mit anderen E3-Enzymen die Ubiquitinierung und den Abbau beschädigter Proteine direkt am endoplasmatischen Retikulum bewirkt. Das einzige Protein, das direkt von Ufd2 ubiquitiniert werden kann, ist Unc45b. *In-vitro*-Studien zeigten, dass Stub1 und Ufd2 einen Komplex bilden, der zur Polyubiquitinierung von Unc45 fähig ist. Einzeln können beide Proteine nur einfach Ubiquitinmoleküle übertragen, doch als Komplex erreicht Ufd2 seine

E4-Ligase-Aktivität und bewirkt die Polyubiquitinierung des Zielproteins (Hellerschmied *et al.*, 2018), (vgl. Abb. 8).

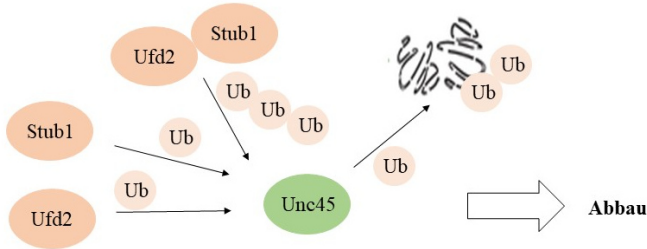


Abb. 8: Funktion von Ufd2: Die E3-Ligase verlängert bereits vorhandene kurze Ub-Ketten und bildet mit Stub1 einen Komplex, der zu Polyubiquitinierung fähig ist. Unc45 ist das einzige Protein, das direkt von Ufd2 ubiquitiniert werden kann.

Genau wie Stub1 weist auch Ufd2 eine U-box-Domäne auf, die strukturell und funktionell dem RING-Motiv entspricht und die Vermittlung der Ubiquitin-Moleküle mit Hilfe eines E2-Enzyms ermöglicht (Hellerschmied *et al.*, 2018).

1.4.3.1.4 Atrogin1, Murf1 und der Transkriptionsfaktor Foxo1

Atrogin1/MAFbx (*Muscle atrophy F-Box*) und Murf1 (*Muscle RING = „really interesting new gene“ Finger-1*) sind zwei muskelspezifische E3-Ligasen und Marker für Muskelabbauprozesse. Die Transkriptionsfaktorfamilie *Forkhead box class O* (Foxo) wurde als hauptverantwortlich für die Atroginbildung identifiziert und wird selbst durch die Proteinkinase Akt gehemmt (Milan *et al.*, 2015). Die Induktion von *Atrogin1* und *Murf1* wird von Foxo1 auf dem Umweg über Akt vermittelt: Indem es dessen Phosphorylierung verhindert, fällt der hemmende Einfluss von Akt auf Atrogin1 und Murf1 weg und beide werden vermehrt transkribiert (Stitt *et al.*, 2004), (vgl. Abb. 9).



Abb. 9: Funktion von Foxo1, Atrogin1 und Murf1: Durch Muskelkontraktion oder erhöhte ROS- oder Insulinkonzentrationen kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Foxo. Dieser verhindert die Phosphorylierung von Akt, wodurch dessen hemmender Einfluss auf Atrogin1 und Murf1 wegfällt und beide in ihrer Funktion als E3-Ligasen aktiv werden.

Wie alle E3-Ligasen besitzen beide eine Bindungsstelle für ihr Substrat, eine für ein E2 Ub-konjugierendes Enzym sowie eine weitere für Ub-Moleküle (Lecker *et al.*, 1999).

Eine erhöhte Expression von *Murf1* und/oder *Atrogin1* kann bei verschiedenen Krankheitsbildern, die mit Muskelatrophie einhergehen, beobachtet werden, z. B. bei Myasthenia gravis (Meinen *et al.*, 2012).

1.4.3.1.5 Traf6

Traf6 steht für *Tumor-necrosis-factor receptor-associated factor 6* und ist eine E3-Ubiquitin-Ligase. Traf6 kommt in Leber, Gehirn, Lunge, Milz, Thymus, Uterus und Herz vor, weist aber im Skelettmuskel die höchste Konzentration auf (Nishimura&Naito, 2005).

Die Traf-Familie beinhaltet sieben Mitglieder. Die C-terminale Traf-Domäne weist Varianzen zwischen den Familienmitgliedern auf, was sie zur Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren befähigt. Die N-terminale Zink-bindende RING-Domäne ist hingegen essentiell für die Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen (Silke&Brink, 2010).

Neben Traf2 zeigt aus der gesamten Familie nur Traf6 E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität, wobei nur Traf6 auch zu Auto-Ubiquitinierung fähig ist (Wang *et al.*, 2001).

Die Aktivierung von Traf6 initiiert mehrere Signalwege, die zum Abbau von Proteinen führen und somit zu einem katabolen Zustand der Zelle (Paul *et al.*, 2010). Versuche konnten zeigen, dass die E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität von

Traf6 eine bedeutende Rolle bei der Induktion von Muskelatrophie in Hungerzuständen besitzt (Paul *et al.*, 2012). Zudem kann Traf6 die Proteinkinase Akt ubiquitinieren, aber auch aktivieren (Yang *et al.*, 2009) und ist als Regulator von NFκB, p38Mapk und Jnk an vielen bedeutenden Signalwegen beteiligt (Kumar *et al.*, 2012). Hemmende Einflüsse auf NFκB werden hierbei sowohl über den IκB-Weg als auch über den Mapk-Signalweg vermittelt (Fernandez-Gonzalo *et al.*, 2014), (vgl. Abb. 10).

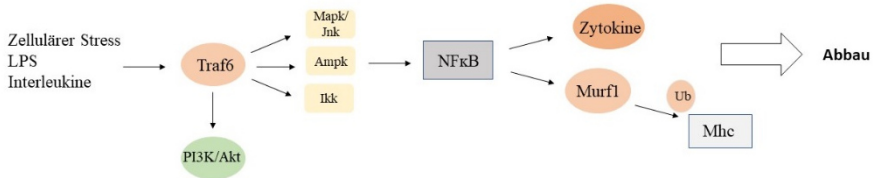


Abb. 10: Funktion von Traf6: Traf6 wird durch zelluläre Stresszustände, Lipopolysaccharide und Interleukine aktiviert und ist an zahlreichen Stoffwechselwegen beteiligt. Über NFκB und nachgeschaltete Mechanismen kommt es zur Vermittlung von katabolen Zuständen.

1.4.3.2 Rip2

Bei zellulärem Stress durch z. B. Zytokine, Infektionen, beschädigter DNA und Entzündungen kommt es zur Aktivierung von Immunzellen und evtl. sogar zum Zelltod. Die Proteine der Rip-Familie vermitteln diese Folgen und sind somit sensible Indikatoren für intra- und extrazellulären Stress (Declercq *et al.*, 2009).

Rip2 (*Receptor interacting protein 2*) gehört mit sechs weiteren Proteinen der Familie der Rezeptor-interagierenden Proteine an. Allen ist ein N-terminales Ende mit großer Sequenzhomologie zu den Serin-Threoninkinasen gemeinsam. Deutliche Unterschiede bestehen hingegen am C-terminalen Bereich, wodurch sich die unterschiedlichen Funktionen der Proteine Rip1-7 erklären. Rip2 besitzt hier als funktionale Domäne eine CAR-Region (*caspase activation and recruitment*), (Zhang *et al.*, 2010).

Für Rip2 ist die Beteiligung an einer Vielzahl von Signalwegen bekannt: es führt zur Apoptoseinduktion und Aktivierung von NFκB (Hsu *et al.*, 1996),

interagiert mit verschiedenen Mitgliedern der Traf-Familie (Thome *et al.*, 1998) und aktiviert die Map-Kinasen Erk2 und Jnk (Navas *et al.*, 1999), (vgl. Abb. 11). Untersuchungen zeigten, dass die proapoptotische Wirkung über die C-terminale CAR-Domäne vermittelt wird. Für die Aktivierung von NFκB ist hingegen das ganze intakte Protein notwendig (McCarthy *et al.*, 1998). Des Weiteren führen Phosphorylierung und Ubiquitinierung von Rip2 zur Modulierung der Immunantwort. Die intrazellulären Proteine Nod1 und Nod2, die eine Rolle bei der Wirtserkennung von Bakterien spielen, konnten in verschiedenen Entzündungsmodellen nachgewiesen werden und führen ebenfalls zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (Hasegawa *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang konnte sogar eine Autophosphorylierung von Rip2 nachgewiesen werden (Dorsch *et al.*, 2006).

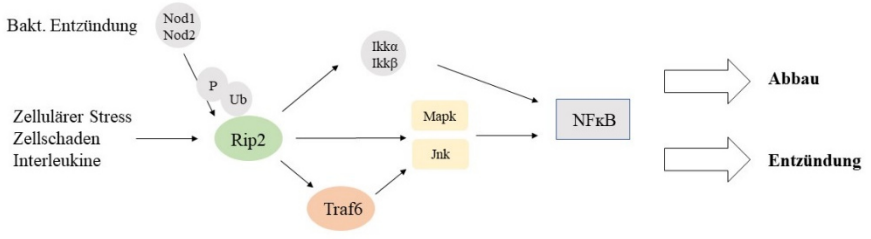


Abb. 11: Funktion von Rip2: Nach Aktivierung von Rip2 durch zelluläre Stresszustände erfolgte eine direkte Aktivierung von NFκB nach Bindung von Ikk oder über die E3-Ligase Traf6 oder Mapk- und Jnk-Signalwege.

Ein Zusammenspiel mit der E3-Ubiquitin-Ligase Traf6 ist ebenfalls bewiesen, wobei neue Studien einen kompetitiven Effekt der beiden zeigen konnten: Wird Traf6 gehemmt, so binden vermehrt Rip-Moleküle an NFκB (Kisiswa *et al.*, 2018).

1.4.3.3 Calpain und Calpastatin

Calpain ist eine Cystein-Protease im Zytosol, deren Aktivierung Kalzium benötigt. Die Protease wurde 1964 zuerst beschrieben und hatte lange Zeit unterschiedliche Namen, von denen die Bezeichnung „CANP“ (Ca^{2+} -

activated neutral protease) sich durchsetzte. Gegenstand der Forschung war v. a. die Ermittlung der Sequenz der katalytischen Untereinheit, wobei der Name „Calpain“ gebräuchlich wurde. 1990 einigte man sich schließlich auf die Verwendung dieser Bezeichnung (Sorimachi *et al.*, 2011).

Calpain1 (μ -Calpain) und *Calpain2* (*m*-Calpain) sind ubiquitär exprimierte Isoformen. Eine gewebespezifischere Form ist Calpain3, das besonders reich in Skelettmuskeln vorkommt. Calpain3 zeichnet sich mit einer Halbwertszeit von zehn Minuten durch eine sehr rasche Autolyse aus (McCartney *et al.*, 2018). Eine Beeinflussung von Vorgängen der Signaltransduktion, des Zellwachstums und der -differenzierung, der Apoptose und von weiteren zellulären Prozessen ist beschrieben. Des Weiteren konnte eine Beteiligung bei u. a. neurologischen Krankheiten, Typ 2-Diabetes und Katarakt nachgewiesen werden (Suzuki *et al.*, 2004). Aktivierte Calpaine führen zur Schwellung von Mitochondrien, Vakuolisierung des endoplasmatischen Retikulums, Sarkomerumbau und zu einer Störungen der Muskelfaservernetzung und somit zum Abbau von Muskulatur (Scicchitano *et al.*, 2015), (vgl. Abb. 12).

Vertiefende Studien zeigten, dass bezüglich der zeitlichen Entwicklung und der genetischen Lokalisation im Organismus zwischen Menschen und Mäusen erhebliche Unterschiede bestehen. Während der Embryogenese scheint Calpain3 aber bei beiden keine Bedeutung zu haben, die Protease wird erst nach der Innervation und folglich der Myoblastenfusion exprimiert (Fougerousse *et al.*, 2000). Bei Überexpression von *Calpain3* zeigen sich im Mausmodell keine phänotypischen Veränderungen; fehlen allerdings bestimmte Exone, kommt es zu verschiedensten Beeinträchtigungen, die in einer fehlerhaften Reifung der Muskelzellen resultieren oder auch nur einzelne Muskeln betreffen können (Spencer *et al.*, 2002). Beobachtet man gendefiziente Mäuse über eine längere Zeitspanne, zeigen sie eine fortschreitenden Muskeldystrophie, die den ganzen Körper betrifft und signifikant schwächer ausgeprägte Mhc I-Muskelfasern, als sie die Wildtyp-Kontrollmäuse besitzen (Fougerousse *et al.*, 2003).

Obwohl bewiesen ist, dass zur Aktivierung von Calpain Kalzium nötig ist, scheint die vorhandene Konzentration nicht der einzige entscheidende Faktor hierfür sein, da unter physiologischen Bedingungen die *in-vitro* ermittelten erforderlichen Konzentrationen an Kalzium bei weitem nicht erreicht werden (Ozaki *et al.*, 2009). Die genauen Vorgänge der Aktivierung sind somit weiterhin unklar.

Das intrazelluläre Protein Calpastatin ist dazu fähig, die Enzymaktivität von Calpain komplett zu inhibieren (vgl. Abb. 12). Aufgrund seiner großen Molekülgröße ist Calpastatin dabei in der Lage vier Calpain-Moleküle gleichzeitig zu binden (Hanna *et al.*, 2007). Diese Inhibierung konnte bisher nicht für Calpain3 nachgewiesen werden (Ono *et al.*, 2004).

skNac (*skeletal and heart muscle specific variant of nascent polypeptide-associated complex α*) ist ein bekannter Regulator der Sarkomerogenese. Es ist ein Einfluss auf die Aktivität von Calpain1 und -3 bekannt, nicht aber auf Calpain2 (Berkholz *et al.*, 2013), weswegen im Rahmen dieser Arbeit nur Calpain1 und -3 betrachtet wurden.

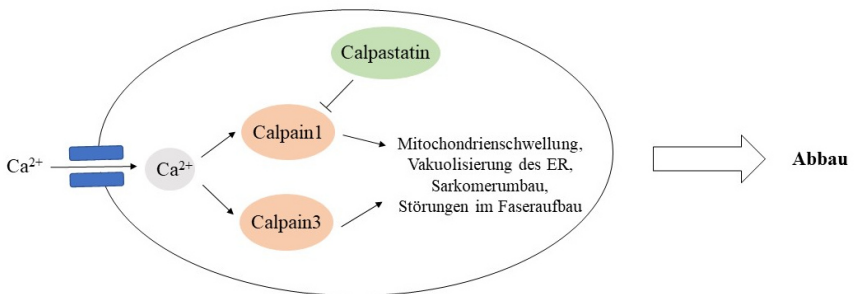


Abb. 12: Funktion von Calpain1, Calpain3 und Calpastatin. Modifiziert nach Scicchitano *et al.*, 2015: Die Aktivierung der Calpaine erfolgt kalziumabhängig und führt zu muskelabbauenden Prozessen. Eine Hemmung durch Calpastatin ist nur für Calpain1 beschrieben.

1.4.4 Rolle des NFκB-Signalwegs bei der Trainingsanpassung

NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) ist ein Transkriptionsfaktor, der in nahezu allen Körperzellen vorkommt und an der Regulation zahlreicher Signalwege beteiligt ist. Eine große Bedeutung hat NFκB u. a. in der Vermittlung der Immunantwort und bei Entzündungsvorgängen; Das Protein ist aber auch an der Regulation der Zellproliferation und der Einleitung des Zelltods maßgeblich beteiligt.

NFκB beschreibt fünf Proteine, denen eine Domäne von 300 Aminosäuren gemeinsam ist, die sogenannte Rel-Homologie-Domäne. Die fünf Proteine der NFκB-Familie werden als p50, p52, p65 (RelA), RelB und c-Rel bezeichnet. Je zwei dieser Untereinheiten bilden als Dimere ein funktionierendes NFκB-Protein. Die Rel-Homologie-Domäne ist verantwortlich für die Bindung unterschiedlicher DNA-Elemente und die IκB-Interaktion. In der Muskulatur ist das aus p50 und p65 zusammengesetzte NFκB-Dimer als hauptverantwortlicher Regulator beschrieben (Kramer&Goodyear, 2007).

Im Zytoplasma der Zelle kommt NFκB gebunden an das inhibitorische Protein IκBα (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*) vor. Durch den Einstrom von Kalzium bei Muskelkontraktion, aber auch durch die Zunahme von freien Sauerstoffradikalen (ROS) oder die Vermittlung von Zytokinen, wird NFκB aktiviert: Die sogenannte Iκk (IκB-Kinase) wird phosphoryliert und vermittelt selbst wiederum die Phosphorylierung von IκBα an Serin32 und Serin36. Durch anschließende Ubiquitinierung wird dieses dann über das Proteasomsystem abgebaut. NFκB liegt nun frei vor und kann in den Zellkern translozieren, wo es als Transkriptionsfaktor die Neusynthese unterschiedlicher Proteine induziert (Bonizzi&Karin, 2004, Zandi *et al.*, 1997). Hier vermittelt NFκB unter anderem auch die Bildung seines eigenen Inhibitors, des Proteins IκBα. Neben diesem klassischen Weg der Aktivierung von NFκB ist noch eine zweite Möglichkeit der Aktivierung beschrieben. CD40-Rezeptoren, Lymphotoxin β und der *B-cell activating factor* (Baff) aktivieren NFκB über den sogenannten alternativen Weg: Sie

steigern die Aktivität der *NFκB-inducing kinase* (Nik), was eine Homodimerisierung der Ikk bewirkt, welche anschließend die Aktivierung von p52 vermittelt (Hoesel&Schmid, 2013), (vgl. Abb. 13).

Klassische NFκB-Aktivierung:

Alternative NFκB-Aktivierung:

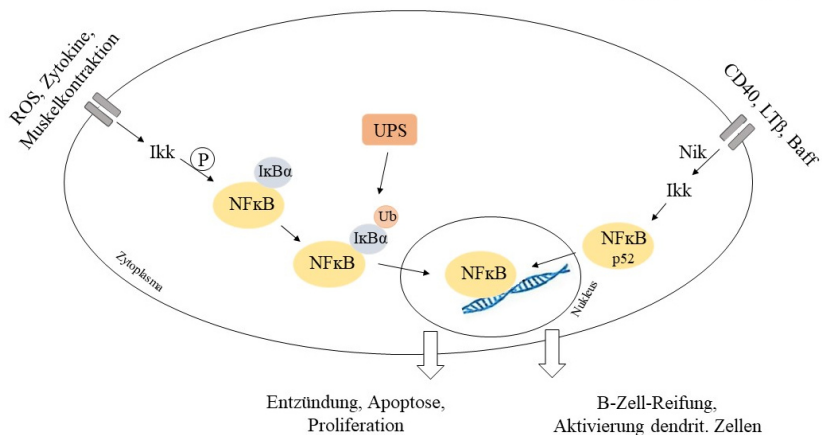


Abb. 13: Aktivierung und Funktion von NFκB in der Zelle, modifiziert nach Albensi und Sun (Albensi, 2019, Sun, 2011): Der klassische Weg beschreibt die Aktivierung der Ikk, welche die Phosphorylierung von IκBα vermittelt, das anschließend ubiquitiniert und abgebaut wird. Somit ist das frei vorliegende NFκB aktiviert und transloziert in den Zellkern. Der alternative Weg umfasst eine gesteigerte Aktivität der Nik, was eine Homodimerisierung der Ikk bewirkt, welche anschließend die Aktivierung von p52 vermittelt. Im Zellkern induziert der Transkriptionsfaktor NFκB u. a. Prozesse der Apoptose, der Immunantwort und von Entzündungsvorgängen.

Verschiedene Versuche konnten zeigen, dass NFκB auf Reize wie z. B. sarkoplasmatischen Kalziumeinstrom und durch das Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies aktiviert wird. Je nach Intensität dieses zellulären Stresses und dessen Dauer, hat dies positive oder negative Folgen für den Muskel: Bei adäquatem Ausdauertraining kommt es zur Adaptation des Muskels und verbesserter Widerstandsfähigkeit gegen diesen mechanischen, metabolischen und oxidativen Stress. Eine andauernde sarkoplasmatische Belastung führt hingegen zu Proteinabbau und Muskelatrophie, ebenfalls vermittelt durch NFκB (Kramer&Goodyear, 2007).

NFκB wird bei Muskelkontraktion, also direkt durch Training, aktiviert, ist aber auch einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren für Prozesse der Muskelatrophie: Durch die Bildung von ROS kommt es zur Aktivierung von Komponenten des UPS und v. a. über die E3-Ligasen Murf1 und Atrogin1 zum Abbau von Muskulatur (Tisdale, 2007). Des Weiteren werden bei Belastung durch z. B. Sport Entzündungsmediatoren ausgeschüttet, die ebenfalls zur Aktivierung von NFκB führen. Über die Rolle des Transkriptionsfaktors bei der Muskelanpassung nach sportlicher Betätigung ist jedoch erst sehr wenig bekannt.

Ein potenter NFκB-Inhibitor ist der chemische Stoff PDTC (Ammoniumpyrrolidindithiocarbamat), der die Abspaltung des IκBα von NFκB im Zytoplasma verhindert, so dass dieses nicht aktiviert werden kann (vgl. Abb. 14). Vorteilhaft in experimentellen Vorhaben sind hierbei v. a. die hohe Stabilität in physiologischen Lösungen, sowie die Fähigkeit von PDTC, auch Zellmembranen durchdringen zu können (Cuzzocrea *et al.*, 2002). Dithiocarbamate sind zudem starke Antioxidantien, was man sich in der Medizin z. B. durch den Einsatz bei Alkohol- und Metallvergiftungen, aber auch in der Bekämpfung verschiedener viraler Krankheiten zunutze macht (Chabicovsky *et al.*, 2010).

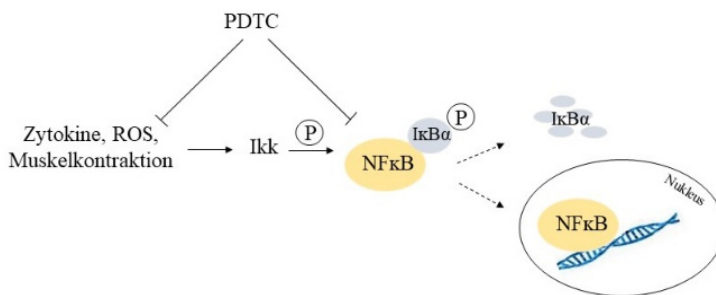


Abb. 14: Darstellung der PDTC-Wirkung: Es kommt zur Hemmung von ROS und von NFκB, wodurch das inhibitorische IκBα nicht abgebaut wird und NFκB nicht in den Zellkern translozieren kann.

Im Tierversuch mit Ratten zeigte PDTC eine potente Fähigkeit zur Protektion neurologischer Zellen; So konnte eine zeitnahe Gabe von 50 mg/kg PDTC die Größe eines induzierten Hirninfarkts deutlich reduzieren (Wang *et al.*, 2018). Durch die Blockade von NF κ B kommt es ebenfalls zur Inhibierung von Entzündungsvorgängen. Die Behandlung mit 120 mg/kg PDTC verhinderte die Entwicklung eines systemischen Schocks durch Lipopolysaccharide und TNF α in Mäusen (Lauzurica *et al.*, 1999). Auf eine antioxidante Wirkung führten Gu *et al.*, 2009, die von ihnen gefundenen positiven Effekte in der Tumorforschung zurück: Mäuse, die über das Trinkwasser täglich 100-200 mg/kg PDTC verabreicht bekamen, zeigten ein deutlich vermindertes Wachstum und eine schlechtere Gefäßversorgung der induzierten Mammatumore (Gu *et al.*, 2009). Die untersuchten Effekte auf Tumorzelllinien zeigten hier allerdings eine starke Abhängigkeit der eingesetzten PDTC-Konzentration (Tahata *et al.*, 2014).

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Durch die gezielte und wiederholte Beanspruchung von Muskelfasern kommt es zur Anpassung der intrinsischen Zustände und Vorgänge einer Zelle und somit zu einer Adaptation ihre Funktionalität betreffend. Für eine Vielzahl von Erkrankungen ist die Bedeutung der korrekten Funktion des NF κ B-Signalwegs, des Ubiquitin-Proteasom-Systems und von Chaperonen im Organismus untersucht. In dem in dieser Arbeit beschriebenen Experiment sollte geprüft werden, ob diese Signalwege auch in der Muskelfaseranpassung bei physiologischem Ausdauertraining beteiligt sind und ob sich ihre Bedeutung in verschiedenen Muskeln unterscheidet.

Insbesondere sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Wie ändert sich das Expressionsmuster von Genen, die an Muskelab-, auf- und -umbauprozessen beteiligt sind, in Antwort auf ein mehrwöchiges Ausdauertraining im murinen Skelettmuskel?

Um diese Frage zu klären, sollte die Expression der *Mhc*-Gene durch Färbemethoden in Muskelquerschnitten sowie in qPCR-Analysen dargestellt werden. Mit letzterer Methode wurden ebenfalls ausgewählte Chaperone und Mitglieder des UPS untersucht (vgl. Abb. 15).

2. Welchen Einfluss hat eine parallele Behandlung mit einem Antioxidans bzw. einem NFκB-Inhibitor auf diese Genexpressionsmuster?

Zur Beantwortung dieser Frage bekam eine Tierversuchsgruppe den NFκB-Inhibitor PDTC über das Trinkwasser verabreicht. Die erhobenen Daten werden anschließend mit denen von Mäusen ohne Training und mit Training, aber ohne PDTC, verglichen.

3. Sind nach dem in diesem Versuch durchgeführten Trainingsprotokoll Veränderungen physiologische Parameter hinweisend auf eine Anpassung an Ausdauertraining?

Diese Frage sollte durch die Erfassung der Ruheherzfrequenz und der maximal möglichen Muskelkraft der Mäuse geklärt werden.

4. In welchem Ausmaß unterscheiden sich nachgewiesene Anpassungsvorgänge in verschiedenen Extremitätenmuskeln der Mäuse?

Eine Antwort auf diese Frage sollte die Untersuchung verschiedener metabolischer und struktureller Marker in einigen ausgewählten Vorder- und Hintergliedmaßenmuskeln liefern.

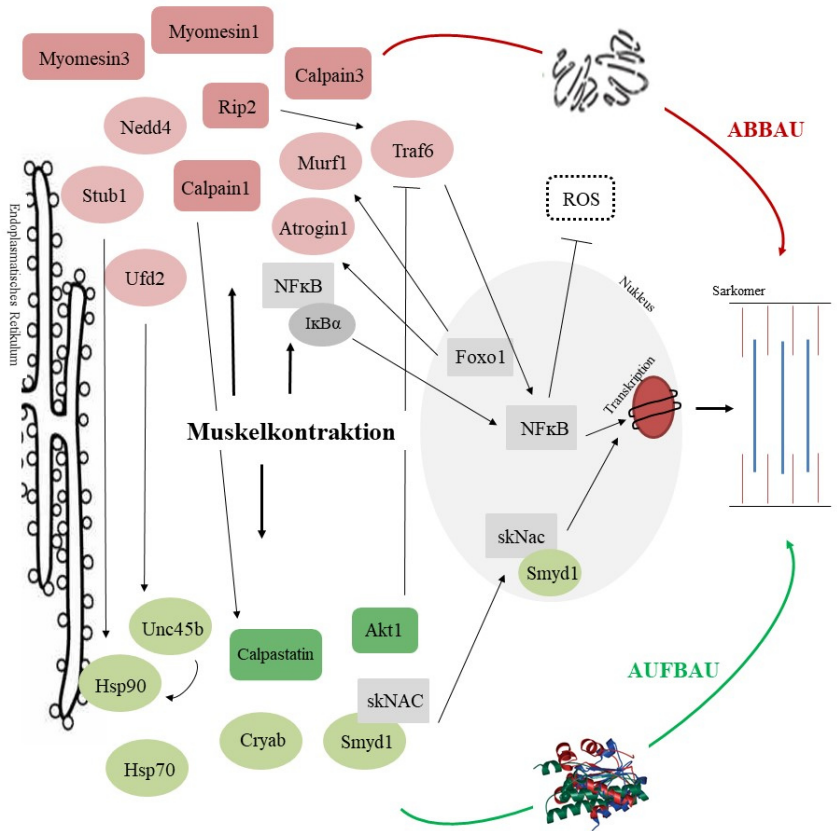


Abb. 15: Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Marker.

3 Materialien und Methoden

3.1 Studienaufbau und Trainingsprotokoll

Das Trainingsexperiment wurde mit C57BL/6J-Mäusen durchgeführt, die von der Firma Charles River bezogen wurden. Um individuelle Unterschiede so gering wie möglich zu halten wurden Mäuse des gleichen Alters und nach Möglichkeit aus dem gleichen Wurf und Tierhaltungsraum verwendet. Zudem wurden nur männliche Tiere einbezogen, so dass hormonelle Einflüsse gering gehalten werden konnten.

Die Mäuse wurden in einem klimatisierten Raum bei konstanter Temperatur von 22 °C, einer Luftfeuchte von 55 % und einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Sie lebten in einem Standardversuchstierkäfig bei Futter und Trinkwasser *ad libitum* in Zweiergruppen zusammen. Die Mäuse wurden drei Mal wöchentlich, jeweils vor dem Lauftraining, gewogen. In Trainingsprotokollen wurde das aktuelle Gewicht, auffälliges Laufverhalten und der allgemeine Gesundheitszustand festgehalten. Alle Arbeiten mit den Versuchstieren wurden entsprechend den geltenden Richtlinien der Tierschutzkommission durchgeführt. Der gesamte Tierversuch fand unter Einhaltung des geltenden Tierschutzgesetzes statt (Genehmigungsnummer M9/14, Regierungspräsidium Tübingen).

3.1.1 Laufbandexperiment

Der Tierversuch bestand aus vier Gruppen mit je vier Mäusen und wurde in der Dunkelpphase des Tierhaltungsraums durchgeführt, welche der physiologischen Aktivitätsphase der Tiere entspricht. Die Hälfte der Mäuse lief drei Mal wöchentlich über einen Zeitraum von zehn Wochen auf dem Laufband für jeweils eine Stunde. Eine Untergruppe dieser Läufer erhielt den NFκB-Inhibitor PDTC (Pyrrolidindithiocarbamat) für den gesamten Zeitraum über das Trinkwasser, der anderen Hälfte wurde unbehandeltes Trinkwasser verabreicht. Um am Ende des Versuchszeitraums Trainingseffekte darstellen zu können, wurden die anderen Mäuse als Kontrolltiere behandelt. Diese Mäuse verblieben ohne Training unter sonst

gleichen Bedingungen (vier Mäuse mit PDTC, vier mit Leitungswasser) in ihren Käfigen (vgl. Abb. 16).

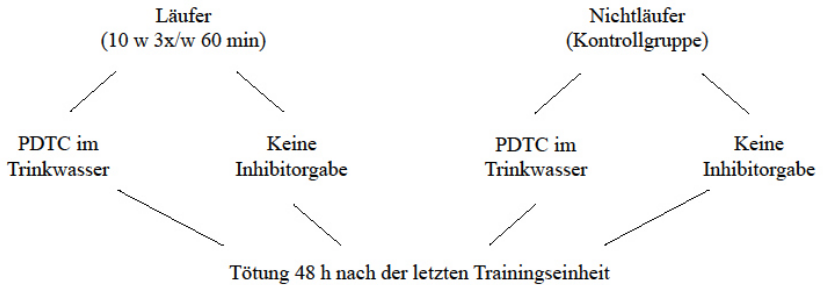


Abb. 16: Übersicht der vier Versuchsgruppen des Experiments.

Nach der Ankunft in der Tierhaltung der HNO-Klinik in Tübingen konnten sich die Mäuse zunächst zwei Tage akklimatisieren, bevor sie an die Versuchsgeräte gewöhnt wurden. Zunächst verbrachten sie einige Minuten in Ruhe auf dem Laufband und erkundeten ihre Laufspur (vgl. Abb. 17). Dann wurde das Band langsam in Bewegung gesetzt und im Verlauf der nächsten Wochen schrittweise um Geschwindigkeit und Steigung variiert, bis die Endbedingungen von 15 ° Steigung und 24 cm/sec erreicht wurden. Auch das verabreichte PDTC wurde bis zur Maximalkonzentration von 20 mg/kg KM langsam in der Dosierung gesteigert und auf das individuelle Gewicht der Mäuse bezogen jeweils neu berechnet (vgl. Tbl. 3).

	Einheit	Dauer [min]	Steigung in °	Geschwindigkeit [cm/sec]	PDTC [mg/kg KM]
Woche 0 Eingewöhnung	1	10	0	0	5
	2	10	5	10	5
	3	20	5	14	5
	4	30	5	14	5
Woche 1	1	60	5	12	10
	2	60	5	12	10
	3	60	10	12	10
Woche 2	1	60	10	14	20
	2	60	10	16	20
	3	60	10	18	20
Woche 3	1	60	10	19	20
	2	60	10	20	20
	3	60	10	21	20
Woche 4	1	60	10	22	20
	2	60	15	18	20
	3	60	15	20	20
Woche 5	1	60	15	22	20
	2	60	15	24	20
	3	60	15	24	20
Woche 6	1	60	15	24	20
	2	60	15	24	20
	3	60	15	24	20
Woche 7	1	60	15	24	20
	2	60	15	24	20
	3	60	15	24	20
Woche 8	1	60	15	24	20
	2	60	15	24	20
	3	60	15	24	20
Woche 9	1	60	15	24	20
	2	60	15	24	20
	3	60	15	24	20
Woche 10	1	60	15	24	20
	2	60	15	24	20
	3	60	15	24	20

Tbl. 3: Eingewöhnungs- und Trainingsprotokoll der Laufgruppe; in der PDTC-Gruppe mit PDTC-Dosierung im Trinkwasser, bei vorausgesetzter Trinkmenge von 5 ml/d.

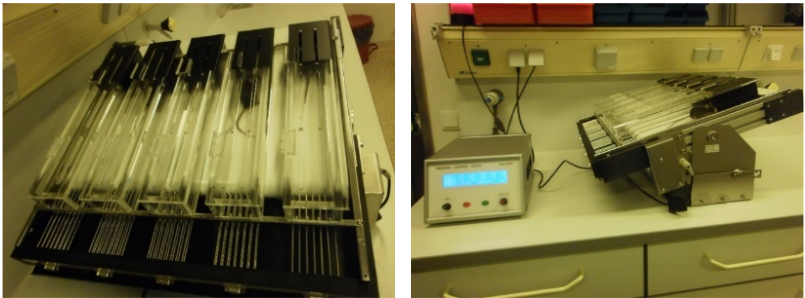


Abb. 17: Links: Laufband von oben betrachtet; rechts: Laufband und *Power-Station* von der Seite, bei maximal eingestellter Steigung von 15 °.

3.1.2 Ruheherzfrequenzmessung

24 Stunden nach ihrem letzten Lauf wurde die Ruheherzfrequenz der Mäuse mittels einer Ringmanschette im Bereich der Schwanzvenen und dem *PhysioSuite*-Gerät von Kent Scientific bestimmt (vgl. Abb. 18). Das *MouseSTAT® Pulse Oximeter & Heart Rate Monitor Module* wurde in einer Kooperation mit Frau Prof. Dr. Beer-Hammer der Pharmakologie in Tübingen verwendet.

Über eine Dauer von zehn Minuten wurden fünf Werte dokumentiert und anschließend arithmetisch gemittelt. Über eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*two-way ANOVA*) wurden die ermittelten Unterschiede auf Signifikanz überprüft. War dies der Fall wurde ein *Tukey-HSD Test* als *post-hoc Test* durchgeführt.



Abb. 18: Ruhepulsmessung an der Schwanzvene mit dem *PhysioSuite*-Gerät von Kent-Scientific.

3.1.3 Grip strength-Messung

Des Weiteren wurde ein sogenannter *Grip strength*-Test durchgeführt, um die Muskelkraft der Mäuse bestimmen zu können. Hierbei wurde ein *Grip strength-meter* der Firma Bioseb verwendet. Die Mäuse wurden jeweils so, dass sie nur mit den beiden Vorderbeinen das Gitter greifen konnten und so, dass sie mit allen vier Füßen Halt finden konnten, zu dem Gitter geführt und anschließend in einer kontinuierlichen Bewegung parallel zur Achse und dem Boden gezogen, bis sie das Gitter freigaben (vgl. Abb. 19). Die von ihnen aufgewendete maximale Kraft wurde dabei vom Gerät gemessen. Diese Messungen wurden je fünf Mal pro Maus und Messart wiederholt und anschließend gemittelt. Der Test wurde direkt vor und nach dem letzten von den Mäusen absolvierten Laufbandtraining durchgeführt. Die Ergebnisse wurden über eine zweifaktorielle Varianzanalyse und ggf. einen *post hoc Tukey-HSD*-Test interpretiert. Ein Test auf Signifikanz zwischen den Messungen vor und nach dem Training wurde aus Gründen der Relevanz nur zwischen den beiden zusammengehörigen Versuchsgruppen durchgeführt.

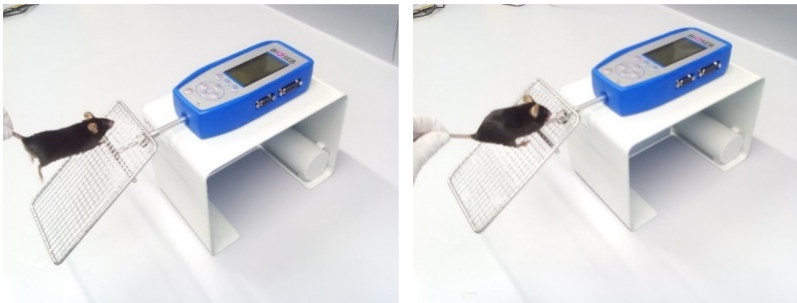


Abb. 19: Durchführung des *Grip strength*-Tests: links mit den Vordergliedmaßen, rechts mit allen vier Beinen.

3.1.4 Gewebepräparation und -bearbeitung

48 Stunden nach dem letzten Training wurden die Mäuse durch retrobulbären Blutentzug und zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose getötet, um verschiedene Organe und Gewebe präparieren zu können (vgl. Abb. 20 und

21). Das gewonnene EDTA-Blut wurde zeitnah bei 1000 xg für 5 min zentrifugiert und das Plasma anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die entnommenen Muskelproben der rechten Gliedmaße wurden gewogen, in RNA-Later verbracht und bei -20 °C für molekularbiologische Analysen aufbewahrt. Die Muskeln der linken Hintergliedmaße wurden zweigeteilt; ein Teil wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, der andere Teil wurde in schmelzendem Isopentan stehend auf einem Korkblättchen gefroren. Beide Muskelanteile wurden anschließend bis zur weiteren Bearbeitung zur Proteinextraktion bzw. zum Anfertigen von Kryotomschnitten für Färbemethoden bei -80 °C gelagert.

Zunächst erfolgte ein Hautschnitt über der Beckenregion der Maus. Durch stumpfes Präparieren wurde die Unterhaut um den Oberschenkel herum gelöst, bis das Fell nach distal über den Tarsus der Maus abgezogen werden konnte. Die entnommenen Muskeln der Hintergliedmaße und ihre anatomischen Eigenschaften sind Tbl. 4 zu entnehmen.

Name Innervation	Ursprung	Ansatz	Funktion
M. tibialis cranialis N. fibularis	Condylus lateralis tibiae	medial am Tarsus und proximal am Metatarsus	Beuger des Tarsus
M. extensor digitorum longus N. fibularis	Fossa extensoria des Condylus lateralis ossis femoris	Processus extensorius der Phalanx II-V	Zehenstrecker, Beuger des Sprunggelenks
M. gastro- cnemius N. tibialis	Tuberositas supracondylaris ossis femoris	Tuber calcanei (Achillessehne)	Strecker des Tarsus
M. soleus N. tibialis	Caput fibulae	Achillessehne	Strecker des Tarsus
M. rectus femoris N. femoralis	Corpus ossis ilium	Patella, Tuberositas tibiae	Strecker des Knies, Beuger der Hüfte

Tbl. 4: Anatomische Eigenschaften der im Experiment präparierten Muskeln der Hintergliedmaße (König&Liebich, 2009).

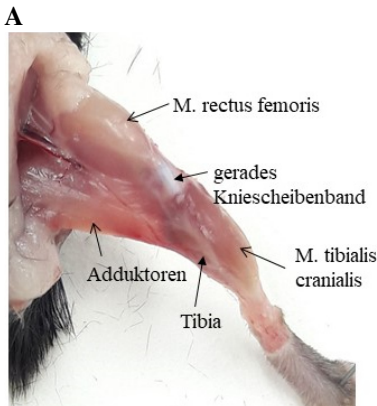
Am weitesten kranial gelegen ist der *M. tibialis cranialis* (TA), der der Tibia direkt aufliegt. Er entspringt am *Condylus lateralis tibiae* und verläuft oberflächlich unter der Haut bis zu seinem Ansatz medial am Tarsus und proximal am Metatarsus. Seine Funktion liegt in der Beugung der Fußwurzel. Nach Durchtrennen der distalen Sehne konnte der Muskel nach proximal abpräpariert werden (vgl. Abb. 20C).

Weiter lateral, zwischen dem *M. tibialis* und dem *M. fibularis longus* gelegen, befindet sich der *M. extensor digitorum longus* (EDL), der lange Zehenstrecker. Er entspringt zusammen mit anderen Muskeln in der *Fossa extensoria* des *Condylus lateralis ossis femoris*. Seine Sehne spaltet sich entsprechend der Anzahl der Zehen in vier Schenkel und inseriert am jeweiligen *Processus extensorius* des Krallenbeins. Bei Zug an der distalen Sehne streckten sich die Zehen II-V deutlich. Nach dieser erfolgreichen Identifizierung wurden auch hier distale und proximale Sehnen durchtrennt und der Muskel wurde entnommen (vgl. Abb. 20D).

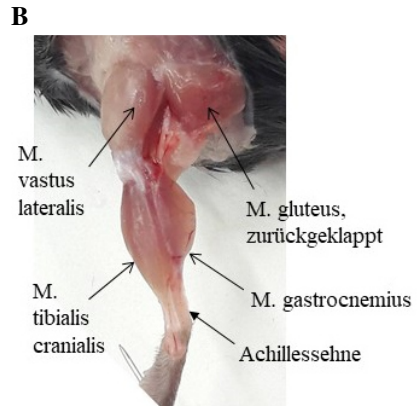
Kaudal der Tibia wurden zunächst noch Oberschenkel- und Hinterbackenmuskulatur entfernt, so dass freie Sicht auf die Strecker des Sprunggelenks bestand. Der *M. gastrocnemius* (GA) war als zweiköpfiger Wadenmuskel deutlich ausgeprägt. Er nimmt mit seinen zwei Köpfen proximal der Condylen des Femurs seinen Ursprung und bildet zusammen mit der oberflächlichen Beugesehne eine einheitliche Sehnenplatte, die Achillessehne, die am *Tuber calcanei* ansetzt. Mit dieser verschmolzen ist auch der *M. soleus* (SOL), ein schmaler Muskel, der beim Hund z. B. völlig fehlt. Er liegt kranial des *M. gastrocnemius* und endet bei gleicher Funktion, als Strecker des Sprunggelenks, ebenso in der Achillessehne.

Nach Durchtrennen der kräftigen Achillessehne am distalen Rand konnte der *M. gastrocnemius* nach oben geklappt werden und durch die verbundenen Endsehnen erhielt man freien Blick auf den *M. soleus*, der sich als schmales Band tiefrot über dem *M. gastrocnemius* absetzte. Durch vorsichtiges Trennen der Sehnen konnte er freipräpariert werden, so dass der *M. gastrocnemius* anschließend nur noch proximal gelöst werden musste (vgl. Abb. 20E+F).

Zuletzt wurde der M. rectus femoris (RF) entnommen. Dieser bildet zusammen mit dem M. vastus lateralis, dem M. vastus medialis und dem M. vastus intermedius den M. quadriceps femoris, den vierköpfigen Kniegelenksstrecker und ist am kranialen Oberschenkel gelegen (vgl. Abb. 20A+B). Die Köpfe der drei vastus Anteile entspringen direkt am Femur, der M. rectus femoris am Darmbein, wodurch er den anderen drei Anteilen kranial aufliegt. In ihrem Verlauf verschmelzen die Muskeln jedoch und inserieren gemeinsam an der Tuberositas tibiae, wobei der M. rectus femoris das Kniegelenk überspannt und das gerade Kniescheibenband bildet. Durch Durchtrennen dieses Bandes konnte der Muskel nach proximal gelöst und entnommen werden (König&Liebich, 2009, S. 259-273).



Ansicht der linken Hintergliedmaße von medial



Ansicht der linken Hintergliedmaße von lateral

C

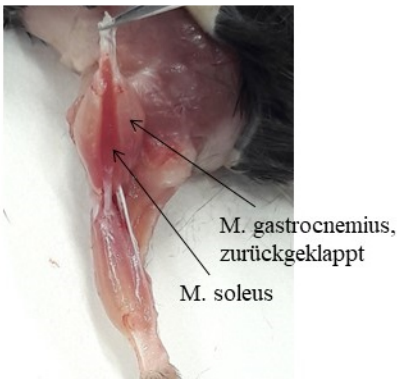


D

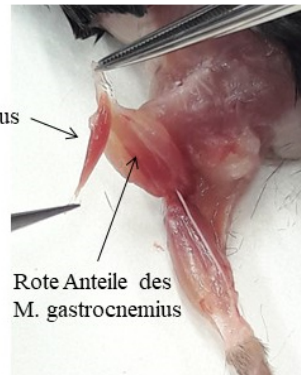


Präparation des TA (C) und des EDL (D) nach erfolgreicher Zehenstreckerprobe

E



F



Präparation des GA

Präparation des SOL

Abb. 20: Präparation der Muskeln der Hintergliedmaße.

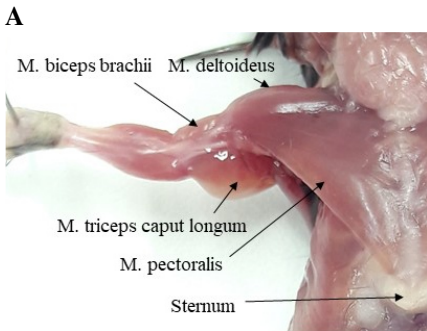
Anschließend wurde der Hautschnitt vom Abdomen bis zum Hals der Maus verlängert und das Fell über den Vordergliedmaßen entfernt. Auch hier wurde eine Reihe an Muskeln entnommen, die in Tbl. 5 aufgeführt sind:

Name Innervation	Ursprung	Ansatz	Funktion
M. triceps brachii caput longum N. radialis	kaudaler Rand der Skapula	Olekranon	Strecker des Ellbogens, Beuger der Schulter
M. biceps brachii N. musculocutaneus	Tuberculum supraglenoidale	Tuberositas radii	Strecker der Schulter, Beuger des Ellbogens
M. extensor carpi radialis N. radialis	Epicondylus lateralis humeri	Proximal am Metacarpale II und III	Strecker des Karpalgelenks
M. flexor digit. spf. N. ulnaris und N. medianus	Epicondylus medialis humeri	Proximal an der Phalanx media	Beuger des Karpalgelenks

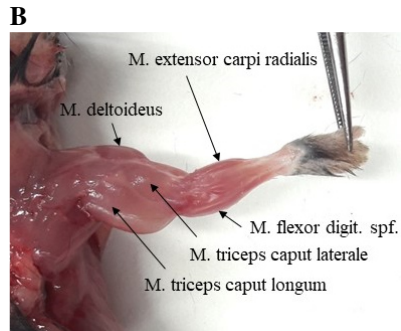
Tbl. 5: Präparierte Vordergliedmaßenmuskulatur der Maus mit anatomischen Besonderheiten (König&Liebich, 2009, S. 188-209).

Der M. triceps brachii ist der kräftigste Muskel der Vordergliedmaße und setzt sich aus vier Muskeln zusammen. Das Caput longum (TRICLong) bildet den größten Anteil, der vom kaudalen Rand der Skapula bis zum Tuber olecrani verläuft. Nach ihrer Lage bezeichnet unterscheidet man noch das Caput laterale und das Caput mediale, die lateral bzw. medial am Humerus verlaufen sowie ein Caput accessorium, welches kaudal am Humerus entspringt und mit den anderen Anteilen zusammen am Olekranon endet (vgl. Abb. 21A+B). Der M. triceps brachii ist Strecker des Ellbogens und hat ebenfalls eine wichtige Bedeutung in der Stabilisierung des Ellbogengelenks. Durch seine Lage ist das Caput longum auch an der Beugung der Schulter beteiligt (Salomon *et al.*, 2008). Das Caput longum konnte stumpf von den anderen Anteilen des M. triceps gelöst und anschließend freipräpariert werden. Der M. biceps brachii (BIC) ist ein kräftiger spindelförmiger Muskel, der sowohl Schulter- als auch Ellbogengelenk überspannt (vgl. Abb. 21D). Seinen Namen hat er durch die zweiköpfige Anatomie beim Menschen. Bei Haussäugetieren ist hingegen nur ein Kopf ausgeprägt, der am Tuberculum supraglenoidale der Skapula entspringt. Der M. biceps brachii

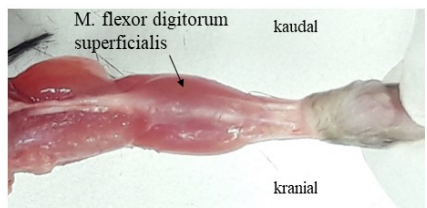
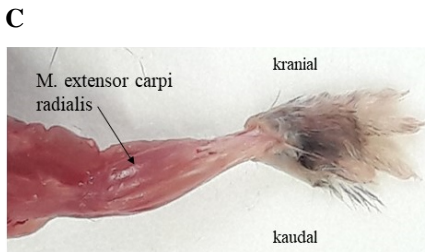
teilt sich in seinem Verlauf in zwei Schenkel, die an der Tuberositas radii und proximal an der Ulna inserieren. Seine Funktion liegt in der Beugung des Ellbogens und der Streckung der Schulter. Der M. biceps brachii wurde vorsichtig von den umliegenden Muskeln freipräpariert, an seinen Sehnen durchtrennt und entnommen (König&Liebich, 2009, S. 188f).



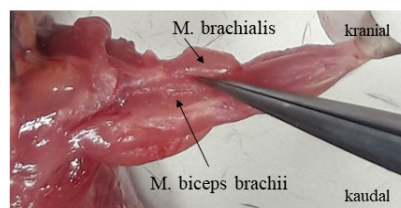
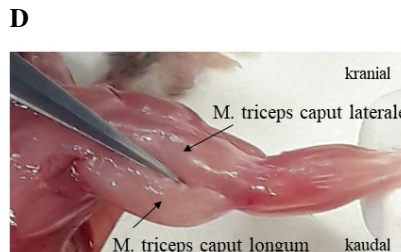
Ansicht der rechten Vordergliedmaße von ventral



Ansicht der rechten Vordergliedmaße von dorsal



Präparation der Muskel des Unterarms: ECR von palmar, FDS von plantar



Präparation der Oberarmmuskel: TRIClong in der Dorsalansicht, BIC in der Ventralansicht

Abb. 21: Präparation der Muskeln der Vordergliedmaße.

An der unteren Extremität der Mäuse war der *M. extensor carpi radialis* (ECR) gut zu identifizieren (vgl. Abb. 21C). Er ist der stärkste Strecker des Karpalgelenks und am weitesten kranial gelegen. Mit Ursprung am *Epicondylus lateralis humeri* zieht er kranial am Unterarm nach distal und setzt am zweiten und dritten Metakarpalknochen an (König&Liebich, 2009, S. 194). Kaudomedial am Unterarm gelegen findet man den *M. flexor digitorum superficialis* (FDS), einen Zehenbeuger (vgl. Abb. 21C). Er verläuft vom *Epicondylus medialis humeri* weit nach distal und endet in mehreren Sehnen an den Zehen. Nach Durchtrennen der Muskelfaszie konnte auch dieser an seinen Sehnen abgetrennt und entnommen werden.

Zuletzt erfolgte die Eröffnung des Bauchraums der Mäuse durch einen Schnitt knapp unterhalb des Sternums, so dass freie Sicht auf das Zwerchfell bestand. Das Diaphragma (DIA) wurde anschließend möglichst großflächig herausgetrennt. Nach einem Schnitt durch den Rippenbogen hindurch konnte der Brustkorb zur Seite geklappt werden und das Herz konnte nach Präparation aus dem Perikard entnommen werden, indem es an der Aorta und der V. cava abgetrennt wurde.

3.2 Anfertigung von Kryotomschnitten

Muskelproben wurden auf Trockeneis vom -80 °C Gefrierschrank zum Kryotom gebracht und dort 30 min an die eingestellten -20 °C akklimatisiert, um das Entstehen unterschiedlicher Schnittdicken zu verhindern. Das Schneiden erfolgte bei -20 °C Kammertemperatur und -25 °C Objekttemperatur. Es wurden Serienschnitte mit einer Schnittdicke von 8 µm hergestellt. Anschließend wurden die Objektträger mit den Präparaten wieder auf Trockeneis transportiert und bis zu ihrer Färbung bei -80 °C gelagert.

3.3 mATPase-Färbung

Während der Muskelkontraktion bindet und hydrolysiert die im Myosinkopf lokalisierte ATPase Adenosintri-phosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat. Die Myosin-ATPase-Aktivität korreliert hierbei mit der Kontraktionsgeschwindigkeit der Muskelfaser, so dass von der Färbeintensität direkt auf diese rückgeschlossen werden kann (Kalmar *et al.*, 2012). Bei saurer Präinkubation des Muskelschnittes wird die mATPase in schnellen Muskelfasern (Typ IIA, -IIB und -IIX) inhibiert, nicht aber in langsamen Typ I-Fasern. Gegenätzlich verhält es sich bei alkalischer Präinkubation: hier wird die mATPase in langsamen Muskelfasern inhibiert (Muscle Physiology Laboratory, 2000). Das Reaktionsprodukt Phosphat ist mikroskopisch nicht sichtbar, reagiert aber mit Kalzium zu Kalziumphosphat, welches wiederum über mehrere Schritte in Kobaltsulfid umgewandelt werden kann. Dieses erscheint makroskopisch braunschwarz (Muscle Physiology Laboratory, 2000). In der hier angewandten Färbemethode nach dem Protokoll von Richard Jonkers (Chung, 2012) lassen sich drei Muskelfasertypen unterscheiden: Nach der sauren Präinkubation bei pH=4,5 stellen sich Typ I-Fasern dunkelbraun dar, Typ IIA-Fasern sehr hell und Typ IIX- und IIB-Fasern mittel stark gefärbt (vgl. Abb. 22).

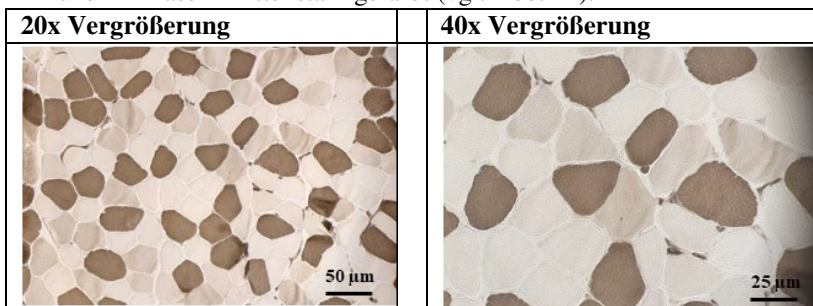


Abb. 22: Beispiel der drei resultierenden Mhc-Isoformen: in schnell kontrahierenden Muskelfasern ist die mATPase stärker konzentriert, als in langsam kontrahierenden. Bei saurer Präinkubation wurde sie inhibiert, so dass sich Mhc I-Fasern dunkel, Mhc IIA-Fasern sehr hell und Mhc IIX-Fasern mittel stark gefärbt darstellen.

3.3.1 Chemikalien und Gebrauchslösungen

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
Ammoniumsulfid	$\text{H}_8\text{N}_2\text{S}$, 20% in H_2O	Sigma Aldrich
ATP	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3\text{Na}_2 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth
Essigsäure	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	VWR
Ethanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Merck Millipore
Glyzin	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	Carl Roth
Kaliumchlorid	KCl	Sigma Aldrich
Kalziumchlorid	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth
Kobaltchlorid	$\text{Cl}_2\text{CO} \times 6 \text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich
Natriumazetat	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$	Merck Millipore
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth
Natriumhydroxid	HNaO	Merck Millipore
Roti-Histokitt		Carl Roth
Roti-Histol	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	Carl Roth
Salzsäure	HCl	Carl Roth
TRIS	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	Sigma Aldrich

Gebrauchslösung	
Saurer Präinkubationspuffer:	1,95 g Natriumazetat und 1,85 g Kaliumchlorid in 250 ml Wasser lösen, mit Essigsäure pH = 4,5 einstellen.
Waschpuffer:	12,1 g TRIS und 2,6 g Kalziumchlorid in 1 l Wasser lösen, mit Salzsäure pH = 7,8 einstellen.
Glyzin Puffer:	0,79 g Glyzin, 0,84 g Kalziumchlorid, 0,76 g Natriumchlorid und 0,38 g Natriumhydroxid in 200 ml Wasser lösen.
ATP-Inkubationslösung:	340 mg ATP in 200 ml Glyzinpuffer lösen, mit Salzsäure pH = 9,4 einstellen (immer frisch ansetzen).
1% Kalziumchloridlösung:	2 g Kalziumchlorid in 200 ml Wasser lösen.
1% Kobaltchloridlösung:	Unter dem Abzug 2 g Kobaltchlorid in 200 ml Wasser lösen.

1% Ammoniumsulfidlösung: Unter dem Abzug 2 ml Ammoniumsulfid zu 200 ml Wasser geben.

3.3.2 Färbeprotokoll und Auswertung

1. Die Objektträger wurden 45 sec im sauren Präinkubationspuffer bei pH = 4,5 inkubiert. Dies führt zur Hemmung der mATPase in schnellen Muskelfasern, nicht aber in den langsamen Typ I-Fasern.
2. Anschließend wurden die Schnitte 3 x für 1 min in den Waschpuffer bei pH = 7,8 verbracht und dann 3 x für je 1 min in *Aqua dest.* gewaschen.
3. Die Inkubation in der ATP-Lösung bei pH = 9,4 erfolgte über einen Zeitraum von 11 min hinweg.
4. Dann wurden die Schnitte zügig in die Kalziumchloridlösung überführt und anschließend wieder 3 x 1 min in *Aqua dest.* gewaschen.
5. Die Inkubation in der Kobaltchloridlösung für 3 min und anschließend
6. für 1 min in der Ammoniumsulfidlösung bedingte die Bildung des braunschwarzen Endprodukts. Danach wurde wieder 3 x 1 min lang mit *Aqua dest.* gespült.
7. Nach abgeschlossenem Färbevorgang erfolgte das Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe bei 70 %, 80 % und 95 % für je 1 min, dann wurden die Schnitte 2 x 5 min lang in 100 % Alkohol und zuletzt 5 min in Roti-Histol inkubiert.
8. Zuletzt wurden die Objektträger mit Roti-Histokitt und Deckgläsern eingedeckt.

Die Schnitte wurden unter einem HBO 50 Axiolab-Mikroskop von Zeiss bei 10 x Vergrößerung ausgewertet und mit einer Axio MRC-Kamera von Zeiss digitalisiert und dokumentiert. Es wurden die Fasern des gesamten Gesichtsfelds ausgezählt und die Anteile der einzelnen Fasertypen in Prozent dargestellt.

Die Messdaten wurden über eine zweifaktorielle Varianzanalyse und ggf. einen *post hoc Tukey-HSD*-Test auf signifikante Unterschiede überprüft.

3.4 Immunfluoreszenz-Färbung

Zur Validierung der Ergebnisse der mATPase-Färbung diente eine Immunfluoreszenzfärbung der spezifischen Mhc-Isoformen. Einige Muskelfasern sind Hybridfasern, die eine Kombination verschiedener Mhc-Isoformen enthalten. Mit der Technik der Immunhistochemie können diese mit größter Genauigkeit dargestellt werden (Kammoun *et al.*, 2014).

Bei der Immunfluoreszenz macht man sich eine Antigen-Antikörper-Reaktion zunutze. Querschnitte der Muskelfasern werden mit Primärantikörpern inkubiert, die spezifisch gegen die Proteine bestimmter Muskelfasertypen gerichtet sind. In einem zweiten Schritt werden diese wiederum von für sie spezifischen Sekundärantikörpern gebunden. Diese Sekundärantikörper sind mit einem sogenannten Fluorochrom, einem Fluoreszenzfarbstoff, markiert, der bei einer bestimmten Wellenlänge unter dem Mikroskop sichtbar ist (vgl. Abb. 23).

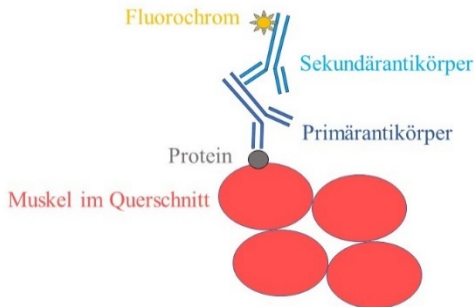


Abb. 23: Reaktionsprinzip der indirekten Immunfluoreszenz: Kommerziell erworbene Primärantikörper binden Proteine der Muskelfasern und werden selbst durch anschließend hinzugefügte spezifische Sekundärantikörper gebunden. Ein verankerter Fluoreszenzfarbstoff dient der Detektion bei mikroskopischer Betrachtung unter einer bestimmten Wellenlänge.

Da die hier verwendeten Primärantikörper isotypspezifisch waren, konnte ein Gemisch aller drei Antikörper gleichzeitig auf demselben Schnitt verwendet werden.

3.4.1 Verwendete Antikörper und Lösungen

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
<i>monoclonal anti-bovine SC-71 (Mhc IIA)</i>	1:100	DSHB
<i>monoclonal anti-bovine BA-D5 (Mhc I)</i>	unverdünn	DSHB
<i>monoclonal anti-bovine BF-F3 (Mhc IIB)</i>	1:100	DSHB
Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG1	1:350	Invitrogen
Alexa Fluor 350 goat anti-mouse IgG2b	1:100	Invitrogen
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgM	1:250	Invitrogen
Chemikalien	Firma	
BSA	Sigma Aldrich	
PBS	Sigma Aldrich	
Vectashield	Vector Laboratories	

3.4.2 Färbeprotokoll und Auswertung

1. Die Objektträger wurden aus dem -80 °C-Gefrierschrank geholt und 15 min bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden die Muskelschnitte mit einem Fettstift umkreist, um eine Barriere für die nachfolgend aufgetragenen Flüssigkeiten zu bilden. So konnte das eingesetzte Flüssigkeitsvolumen begrenzt werden.
2. Unspezifische Bindungen wurden in einer Lösung aus 5 % BSA in PBS für 30 min blockiert.
3. Dann wurden die Objektträger in der Mischung aus den drei Primärantikörperlösungen für zwei Stunden im Dunkeln bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubiert und anschließend 3 x 5 min mit PBS gewaschen.

4. Die Inkubation der Sekundärantikörper, gelöst in 1 % BSA in PBS, erfolgte für eine Stunde unter ansonsten gleichen Bedingungen wie zuvor. Zuletzt wurden die Schnitte wieder 3 x 5 min mit PBS gewaschen und
5. mit Vectashield eingedeckt. Nach einer Trockenphase von 15 min im Kühlschrank konnten die Schnitte direkt mikroskopiert und digitalisiert werden.

Das Fluoreszenzmikroskop ist mit speziellen Filtern ausgestattet, die nur das Licht der bestimmten, für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs benötigten Wellenlängen passieren lassen. Die Schnitte wurden bei 550 nm, 470 nm und 365 nm angeregt, wobei sie Licht von 605 nm, 525 nm bzw. 445 nm emittierten. Mhc IIA-Fasern stellen sich somit rot dar, Mhc IIB-Fasern grün, Mhc I-Fasern blau und Mhc IIX-Fasern ungefärbt. Die Dokumentation und Auswertung erfolgte bei zehnfacher Vergrößerung mit einer Axio HRC-Kamera von Zeiss. Hierzu wurden die Fasern des gesamten Gesichtsfelds ausgezählt und die jeweiligen Anteile der einzelnen Fasertypen in Prozent dargestellt. Um unspezifische Bindungen der Sekundärantikörper ausschließen zu können, wurde je ein Serienschnitt der gleichen Maus als Kontrolle gefärbt: Die Objektträger durchliefen dabei das gleiche Protokoll, statt dem Primärantikörper wurde allerdings 1% BSA in PBS aufgetragen. Da das Fehlen von Typ IIB-Fasern im *M. soleus* der Maus beschrieben ist, wurde als Kontrolle des entsprechenden Antikörpers ein Schnitt des *M. extensor digitorum longus* mitgeführt (vgl. Abb. 24). Ein Test auf signifikante Unterschiede der Gruppendaten wurde, wie zuvor für die mATPase-Färbung beschrieben, durchgeführt.

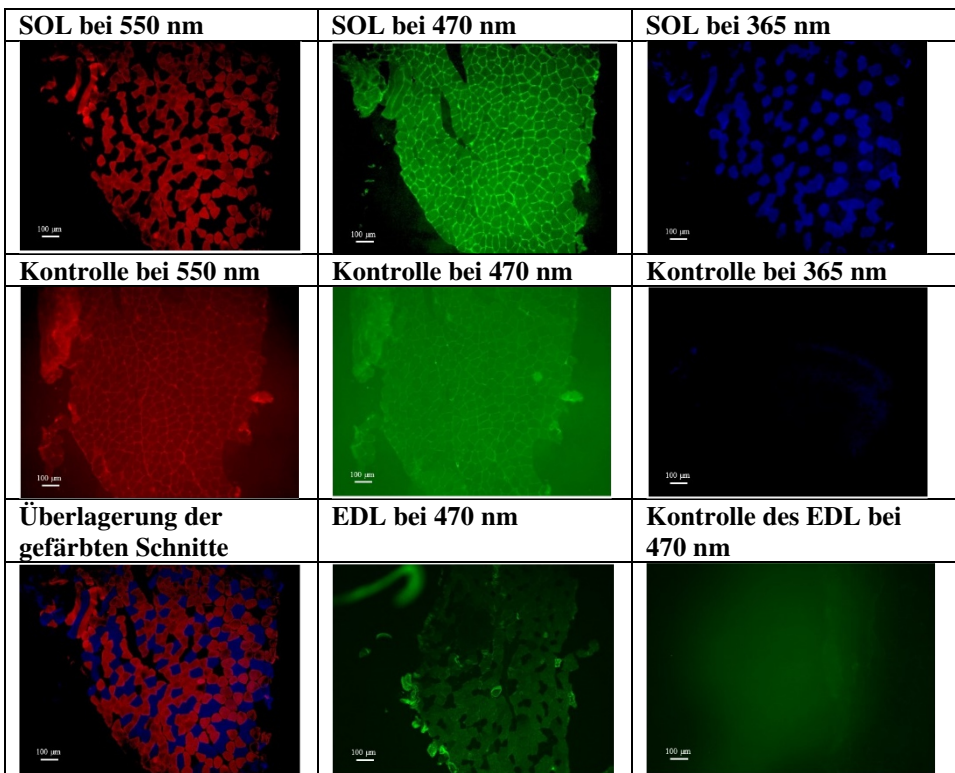


Abb. 24: Beispiel der Ansicht der Immunfluoreszenzfärbung und der Kontrollen am Schnitt eines *M. soleus* bei 550 nm, 470 nm und 365 nm sowie bei 470 nm an einem *M. extensor digitorum longus*. Mhc IIA-Fasern stellen sich rot dar, Mhc IIB-Fasern grün, Mhc-I Fasern blau und Mhc IIX-Fasern ungefärbt.

3.5 Realtime qPCR-Analysen: Genexpressionsanalyse

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren in mehreren Zyklen. Die Endprodukte können dabei quantitativ erfasst und zwischen verschiedenen Proben verglichen werden. Aus dem präparierten Gewebe wurde RNA isoliert, welche mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wurde. Diese diente als Ausgangsmaterial der

qPCR-Reaktion, bei der es unter optimalen Bedingungen in jedem Zyklus zu einer Verdopplung der Moleküle kommt. Ein Zyklus besteht aus drei Abschnitten: in der ersten Phase, der Denaturierung, wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Im folgenden Annealingprozess können Primer an diese Einzelstränge anlagern, die nun als Matrize dienen, um in der Elongationsphase die Nukleinsäuresequenzen zu vervielfältigen. Zugegebene Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in die DNA ein, so dass die Fluoreszenz proportional zur entstandenen DNA-Menge ansteigt. Der Zyklus, in dem die Fluoreszenz ein definiertes Hintergrundsignal übersteigt, wird als Ct-Wert (*cycle threshold*) bezeichnet. Der Mittelwert der drei Referenzgene Gapdh, Hpvt und Tbp diene der Normalisierung der einzelnen Probe, so dass die erhaltenen Ct-Werte unterschiedlicher Proben miteinander verglichen werden konnten.

3.5.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus dem vorliegenden Muskelgewebe erfolgte mit dem *Qiagen Fibrouse Tissue Kit*. Es wurde das Gewebe verwendet, das nach der Präparation in RNA-Later aufbewahrt worden war. Dieses dient laut Hersteller der Stabilisierung der im Gewebe vorhandenen RNA und hemmt die Aktivität von Ribonukleasen.

Auf einer Feinwaage wurden 10-30 mg Gewebe abgewogen und mit RLT-Puffer des *Kits* sowie Zirkonium-Kugeln in einem Reaktionsgefäß auf dem *Beadbug*-Gerät von Sigma Aldrich homogenisiert. Die Isolierung der RNA erfolgte nach dem Qiagen Protokoll.

Die Messung der Ausbeute wurde photometrisch im Bio Photometer von Eppendorf bei 260 nm durchgeführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

3.5.2 Umschrieb von RNA in cDNA

Da die Polymerase zur Amplifikation DNA als Matritze benötigt, muss die gewonnene RNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierzu wurde das zu pipettierende Volumen für 0,5 µg RNA berechnet, 0,5 µl Random Primer zugegeben und die entsprechende Menge nukleasefreies Wasser beigefügt, bei der ein Gesamtvolumen von 14 µl vorlag. Um Sekundärstrukturen aufzubrechen wurde das Gemisch für 5 min auf 70 °C erhitzt und danach 5 min auf Eis abgekühlt, bevor der *Mastermix* zugegeben wurde. Die *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase* (MMLV) ist ein Enzym, das auch bei hohen Temperaturen stabil ist und die vorhandene RNA in cDNA umschreibt. Die durch den Vortexmischer homogenisierten und anschließend zentrifugierten Proben wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann in einem Thermoblock 60 min auf 50 °C erhitzt, wobei die cDNA Synthese erfolgte, und zuletzt nochmals 15 min auf 70 °C erhitzt. Hierbei wurde die MMLV denaturiert und es kam zum Abstoppen der Reaktion.

Die erhaltene cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

Mastermix	Volumen pro Probe
5 x Puffer	5 µl
dNTPs	1,25 µl
MMLV	1 µl
H ₂ O	3,75 µl

Chemikalien	Firma
<i>Random Primers</i>	Promega
MMLV	Promega
nukleasefreies Wasser	Qiagen
dNTPs	Promega
5 x Puffer	Promega
Sso Fast Eva Green Supermix	Biorad

Kits und Materialien	
<i>Precellys</i>	Biozym

<i>Qiagen Fibrouse Tissue Kit</i>	Qiagen
96 Fast-PCR Platte	Sarstedt
<i>Microseal 'B' Seals</i>	Biorad

Geräte

Thermoblock HLC	Ditabis
<i>Beadbug Microtube Homogenizer</i>	Sigma Aldrich
Zentrifuge	Biozym
Vortexmischer	Bender & Hobein
<i>CFX 96 Thermal Cycler</i>	Biorad

3.5.3 Primerentwurf

Zugesetzte Primer lagern sich an ihren komplementären DNA-Strang an und bieten mit ihrem 3'-OH-Ende den Ausgangspunkt für die DNA-Replikation der Polymerase. Die in den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen eingesetzten Primer wurden zum Teil kommerziell von der Firma Qiagen erworben, zum Teil selbst entworfen.

Mit Hilfe des *Gene Sorters* der *University of California Santa Cruz* (<https://genome.ucsc.edu/>) wurde hierfür zunächst die gesuchte Sequenz identifiziert und unter Berücksichtigung möglicher *Splice*-Varianten heruntergeladen. Im Programm Primer 3 des *Whitehead Institute for Biomedical Research* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) konnten passende Primerpaare gefunden werden. Dabei wurde zur Stabilität der Reaktion darauf geachtet, dass sich das Amplikon möglichst am 3'-Ende des Transkripts befand, dass keine vier aufeinander folgenden Basen gleich waren, dass der Guanin-Cytosin-Gehalt bei 40-60 % lag und dass sich eine Gesamtlänge der Primer von 17-28 Nukleotiden ergab. Der *Sequence Massager* (<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>) vereinfachte das Bearbeiten der Sequenzen. Danach wurde mit dem Programm *NetPrimer* von *Bio-Soft* *Net* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>) die Sekundärstruktur und die Schmelztemperatur der ausgewählten Primer überprüft. Das Programm liefert unter anderem Angaben zur Bildungsaffinität von

unerwünschten *Hairpins* und Dimeren. Die Schmelztemperatur sollte ungefähr bei 60 °C liegen. Zuletzt konnte im Programm BLAST der *U.S. National Library of Medicine* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) die Spezifität der Primer geprüft werden und es wurde darüber entschieden, ob die ausgewählten Basensequenzen letztlich über die Firma *Eurofins Genomics* bestellt wurden.

3.5.4 Primersequenzen der verwendeten Primer

Primer	Sequenz bzw. Katalognummer	Firma
Akt1	For: 5'- CTG TCT CGA GAG CGT GTG TT -3' Rev: 5'- GTT CTC CAG CTT CAG GTC CC -3'	Eurofins
Atrogin1	For: 5'- GTG AGG ACC GGC TAC TGT GG -3' Rev: 5'- CAA TCC AGC TGC CCT TTG TC -3'	Eurofins
Calpain1	For: 5'- CTG GAG GCT GCA GGA ACT AC -3' Rev: 5'- CTC CCG GTT GTC ATA GTC GT -3'	Eurofins
Calpain3	For: 5'- CGA GAA ACG AGG GGA AAC CC -3' Rev: 5'- ACA GAT CTC CAT GTC GTC GC -3'	Eurofins
Calpastatin	For: 5'- TGC TGG TAC AAG ACG CAT GTT A -3' Rev: 5'- ACA TGT GGT CTG GAA GGC TG -3'	Eurofins
Cryab	For: 5'- ACG TGA AGC ACT TCT CTC CG -3' Rev: 5'- ATG TTC GTC CTG GCG TTC TT -3'	Eurofins
Foxo1	For: 5'- CCT GTC GTA CGC CGA CCT CAT CAC -3' Rev: 5'- GTC CAT GGA CGC AGC TCT TCT CCG -3'	Eurofins
Gapdh	For: 5'- TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA -3' Rev: 5'- TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG -3'	Eurofins
Hprt	For: 5'- GCA GTA CAG CCC CAA AAT GGT TAA G -3' Rev: 5'- GAC ACA AAC GTG ATT CAA ATC CCT G -3'	Eurofins
Hsp70	For: 5'- AGT CCG ACA TGA AGC ACT GG -3' Rev: 5'- ATC TCC TCC GGG AAG AAC GA -3'	Eurofins
Hsp90	For: 5'- TGT TCA TTC AGC CAC GAT GC -3' Rev: 5'- AAC TGG GCA ATT TCT GCC TG -3'	Eurofins
Mhc I	For: 5'- CCT TGG CAC CAA TGT CCC GGC TC -3' Rev: 5'- GAA GCG CAA TGC AGA GTC GGT G -3'	Eurofins
Mhc IIA	For: 5'- ATG AGC TCC GAC GCC GAG -3' Rev: 5'- TCT GTT AGC ATG AAC TGG TAG GCG -3'	Eurofins
Mhc IIB	For: 5'- CAT CTG GTA ACA CAA GAG GTG -3' Rev: 5'- ACT TCC GGA GGT AAG GAG CA -3'	Eurofins
Mhc IIX	For: 5'- GCT TCA AGT TTG GAC CCA CG -3' Rev: 5'- ACT TCC GGA GGT AAG GAG CA -3'	Eurofins

Murf1	For: 5'-GCA GCT CAT CAA GAG CAT TGT -3' Rev: 5'-CCA AAG TCA ATG GCC CTC AA -3'	Eurofins
Myomesin1	For: 5'- CAA AGC TGC TAT CGA CGT G -3' Rev: 5'- CCT GGT ACC TCA CCA ACC AC -3'	Eurofins
Myomesin2	For: 5'- CTG GCT CTT CTC CTT TGG GAA C -3' Rev: 5'- GTC CAG GAG GTACCT GGT TTG -3'	Eurofins
Myomesin3	For: 5'- GCA GAG CAC CAG AGA CTG AA -3' Rev: 5'- AGG TCA GGC ACA GGG TCT TAT -3'	Eurofins
Nedd4	QT01058799	Qiagen
Rip2	For: 5'- CGC TGC TCG ACA GTG AAA G -3' Rev: 5'- CAA TGG CCA TGC AAT ATC AG -3'	Eurofins
skNac	For: 5'- ACA GCC TCA GGG TGA GAC AG -3' Rev: 5'- CTG GGC AAA AGG AAC TTC AA -3'	Eurofins
Smyd1	For: 5'- GCA TCT TCC CCA ACC TGG GCC T -3' Rev: 5'- GGG CCC GGA GCT CAA TCC TCA T -3'	Eurofins
Stub1	For: 5'- CCC TGA TAA GAG CCC GAG TG -3' Rev: 5'- ACA AGT GGG TTC CGA GTG ATG -3'	Eurofins
Tbc1d1	For: 5'- GCG CAA ACA GAA CCT TGA CC -3' Rev: 5'- CGC AGC CTG CTT CAG CTT AC -3'	Eurofins
Tbp	For: 5'- AAG AGA GCC ACG GAC AAC TGC -3' Rev: 5'- CTT CAC ATC ACA GCT CCC CAC -3'	Eurofins
Ufd2	For: 5'- GTC ACC AGA CCG CAA TCT CA -3' Rev: 5'- GGC TCC CAA ACT AGA CAA CGA -3'	Eurofins
Unc45b	QT00168714	Qiagen
Zs	For: 5'- GCC CAG CAG CTG TAG GAT GAC C -3' Rev: 5'- GGG GCC TGT CCC TGG CGT AG-3'	Eurofins

Tbl. 6: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Primer.

In einer ideal verlaufenden qPCR verdoppelt sich die Menge an DNA in jedem durchlaufenen Zyklus, die Amplifikationseffizienz liegt also bei 100%. Die in diesem Versuch verwendeten Primer wurden auf ihre Effizienz getestet, indem eine Verdünnungsreihe und eine Standardkurve erstellt wurden. Ein erhaltener Wert von 2 entsprach nach dieser Methode einer Effizienz von 100 %. Höhere Werte sind auf die Bildung von Primerdimeren oder unspezifischen Amplifikaten zurückzuführen. Der angestrebte Ergebnisbereich lag zwischen 90 und 110 %.

3.5.5 Protokoll der Realtime-PCR

Reagenzien	Volumen pro Probe
cDNA	5 ng in 0,25 µl
H ₂ O	7,1 µl
<i>Forward Primer</i>	500 nM in 0,075 µl
<i>Reverse Primer</i>	500 nM in 0,075 µl
Eva-Green-Mix	7,5 µl
Gesamtvolumen	15 µl

Die cDNA wurde in nukleasefreiem Wasser vorverdünnt, so dass jede Genexpressionsanalyse mit der gleichen cDNA-Verdünnung erfolgen konnte. Auch die eingesetzten Primer wurden zusammen, sowie mit Wasser und Eva-Green-Mix vermischt, um aus einer Lösung alle zu untersuchenden Proben bedienen zu können. Die Proben wurden jeweils als Doppelansatz in einem Gesamtvolumen von 15 µl auf die Platte aufgetragen und es befanden sich die Proben aller zu vergleichenden Mäusen auf einer qPCR-Platte. Als Negativkontrolle dienten zwei Ansätze ohne cDNA. Die Platten wurden eine Minute bei 1400 rpm zentrifugiert, um eine gleichmäßige Verteilung aller Komponenten gewährleisten zu können. Dann wurden sie im *Biorad CFX96 Thermal Cycler* bei folgendem Programm inkubiert:

Vorgang	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initialisierung	95 °C	00:30	1
Denaturierung, Annealing und Elongation	95 °C 59 °C	00:05 00:15	je 40
Schmelzkurvenanalyse	61 °C + 0,5 °C pro Zyklus	00:10	68

Durch Erhitzen der Probe auf 95 °C erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Danach wurde die Temperatur auf einen

primerspezifischen Wert abgesenkt. Die verwendeten Primer wurden so entworfen, dass ihr Optimum bei 60 °C liegt. Hier kommt es zum Annealing-Vorgang: der Hybridisierung der Primer an ihre komplementären Matritzen-DNA. Während der nachfolgenden Elongation verlängerte die Polymerase die Primer entlang dieser Matritzen-DNA. Freie Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) sowie Magnesiumionen müssen hierfür vorhanden sein. Am Ende dieser drei Schritte lag wieder doppelsträngige DNA vor. Der Zyklus aus drei Schritten wurde 40 Mal wiederholt, wobei auch neugebildete DNA nun als Vorlage diente. Dadurch war in jedem Zyklus eine Verdopplung der zu Beginn vorhandenen Menge DNA zu erwarten.

Die Proben konnten über den sogenannten Ct-Wert („*threshold cycle*“) miteinander verglichen werden. Der Ct-Wert beschreibt die Zyklenzahl, bei der das Amplifikat erstmals in ausreichender Menge vorhanden ist, um ein messbares Fluoreszenzsignal zu erzeugen. Das heißt, ist in der Ausgangsprobe bereits eine große Menge cDNA eingesetzt worden, wird der Ct-Wert schneller erreicht und ist kleiner. Ist wenig Ausgangsmaterial vorhanden, benötigt man mehr Zyklen, um den Ct-Wert zu erreichen, und der Wert ist entsprechend größer.

Nach 40 Zyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Spezifität der PCR durchgeführt. Dazu wurde die Temperatur langsam von 61 °C auf 95 °C erhöht. Da verschiedene Fragmente unterschiedliche Schmelzpunkte aufweisen, spalten sie sich auch bei unterschiedlicher Temperatur auf, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff nicht mehr binden kann und somit keine messbare Fluoreszenz mehr erzeugt wird. Auf diese Weise können z. B. unerwünschte Primerdimere identifiziert werden.

3.5.6 Auswertung und Statistik

Die Auswertung erfolgte nach der Methode von Livak, 2001, als sogenannte ΔCt -Methode. Voraussetzung hierfür ist, dass die Effizienz der Primer nahezu 100 % beträgt.

Hierbei werden die erhaltenen Ct-Werte zunächst gegen das geometrische Mittel der Referenzgene normalisiert. Dies sind Gene, die in allen Zellen konstitutiv exprimiert werden, also in ihrer Expression unabhängig von Zelltyp und äußeren Einflüssen sind. In den hier dargestellten Versuchen wurden Gapdh (Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), Hprt (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) und Tbp (*TATA-box-binding-Protein*) hierfür herangezogen. Der ΔCt -Wert berechnet sich demnach nach folgender Formel:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{(\text{Zielgen})} - \text{Ct}_{(\text{MW Referenzgene})}$$

Da die Proben jeweils im Doppelansatz untersucht wurden, wurde anschließend der Mittelwert der beiden erhaltenen ΔCt -Werte bestimmt. Hierdurch sollen Pipettierfehler ausgeglichen werden.

In einer ideal verlaufenden qPCR verdoppelt sich die Menge amplifizierter DNA in jedem Zyklus, so dass der Ct-Wert proportional zum negativen Logarithmus der cDNA ist. Es wird also berechnet:

$$\text{Expression} = 2^{-\Delta\text{Ct}}$$

Ob die beobachteten Expressionsunterschiede signifikant waren, wurde mit einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse der log2-transformierten relativen Expressionswerte untersucht (*two-way-ANOVA*). Voraussetzung für diesen Test ist eine Normalverteilung der Werte, sowie die Unabhängigkeit der Messwerte voneinander. Die analysierten Faktoren waren hierbei das Laufbandtraining und die PDTC-Behandlung. Vorteilhaft an diesem Testverfahren ist, dass man auch eine Wechselwirkung der beiden Bedingungen zeigen kann. Ergab sich eine Signifikanz einer der Variablen oder ein Interaktionseffekt zwischen diesen, wurde noch ein *post-hoc* Tukey-Test angewandt, um zuzuordnen zu können, zwischen welchen der Untergruppen die Signifikanz detektiert worden war.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde wie folgt definiert:

- $p < 0,001 = *** =$ hochsignifikant
- $p < 0,01 = ** =$ signifikant
- $p < 0,05 = * =$ wahrscheinlich signifikant
- $p > 0,05 =$ nicht signifikant

Die Tests auf Signifikanz wurden mit dem Programm JMP 14.2.0 durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Graphiken wurden mit dem Programm GraphPad Prism5 erstellt.

3.6 Proteinchemische Methoden

3.6.1 Proteinisolierung

Zur Proteinisolierung wurden 30-40 mg des in flüssigem Stickstoff gefrorenen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Muskels abgetrennt. Dieses Muskelstück wurde zum Aufschluss der Zellmembranen in RIPA-Puffer mit 5 mM Pefabloc (zur Verhinderung der Proteindegradation durch Proteasen) gegeben und auf Eis gekühlt. Mit Hilfe des *Beadbug*-Geräts und Zirkoniumkugeln in den Reaktionsgefäßen wurden die Muskelproben homogenisiert. Anschließend wurde die Lösung in ein frisches Eppendorf-Gefäß pipettiert und 5 min auf Eis im Ultraschallbad weiter aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei $13.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hatten sich ungelöste Bindegewebsreste und Zelltrümmer abgesetzt und der Überstand enthielt das lösliche Protein. Dieses wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Geräte und Materialien

Prefilled 2.0 ml tubes, Zirconium Beads, 3.0 mm

Beadbug microtube homogenizer

3.6.2 Proteinbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung des erhaltenen Proteins wurde eine Konzentrationsbestimmung der Lösungen mit einem kommerziellen *Pierce™ BCA Protein Assay-Kit* der Firma *Thermo Fisher* durchgeführt. Eine definierte Menge der Proteinlösung wurde in RIPA-Puffer verdünnt und mit Bicinchoninsäure und Kupfersulfat nach Herstellerangaben vermischt. In einer temperaturabhängigen Reaktion reduzierten die Peptidbindungen des Proteins Cu^{2+} zu Cu^+ , wobei die Menge der resultierenden Kupferionen proportional zur Menge an Protein in der Lösung war. Zwei Moleküle Bicinchoninsäure bildeten nachfolgend einen Chelatkomplex mit einem Kupferion, wobei ein lilafarbenes Endprodukt entstand. Die optische Dichte desselben konnte bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden (Thermo Scientific User Guide, 2017). Anhand des Absorptionsspektrums von Lösungen mit bekannter Proteinmenge konnte eine Standardkurve erstellt und die gesuchte Proteinkonzentration der vorliegenden Lysate berechnet werden.

3.6.3 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld. Mit Wasser wurden die Proben so verdünnt, dass sie alle die gleiche Proteinkonzentration aufwiesen. Anschließend wurden die Lösungen mit 4 x Laemmli Probenpuffer von Biorad im Verhältnis 1:4 für 5 min auf 95 °C erhitzt. Durch das im Puffer enthaltene SDS und Mercaptoethanol wurde die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zerstört. Diese nun denaturierten Proteine wurden in Taschen eines 1 mm dicken Polyacrylamidgels pipettiert und dann elektrophoretisch in vertikale Richtung aufgetrennt. Pro Gel konnten die Proben von je zwei Mäusen pro Versuchsgruppe aufgetragen werden, sowie eine Referenzprobe, zur Normalisierung der Gele untereinander und ein Größenmarker für die resultierenden Proteinbanden. Die Gele bestanden im oberen Bereich aus einem etwa 3 cm breiten Sammelgel, welches 6 %

Acrylamid enthält. Dieses bewirkte durch den leicht sauren pH-Bereich und eine geringere Acrylamidkonzentration, dass sich die Proteine bündelten und die später sichtbare Bande scharf begrenzt war (Mahmood&Yang, 2012). Im 12 %igen Trenngel wurden die Proteine ihres Molekulargewichts entsprechend aufgetrennt, wobei große Proteine eine kürzere Laufstrecke aufwiesen, als kleine Proteine.

	Zusammensetzung des 6 %igen Sammelgels	Zusammensetzung des 12 %igen Trenngels
3M Tris-HCl, pH=8,8		0,938 ml
1M Tris-HCl, pH=6,8	500 µl	
10 % SDS	80 µl	150 µl
ddH₂O	2,82 ml	4,163 ml
40 % Acrylamid-Mix	600 µl	2,25 ml
TEMED	5 µl	7,5 µl
10 % APS	20 µl	37,5 µl

Tbl. 7: Zusammensetzung des Trenngels und des Sammelgels der SDS-PAGE.

Die Gele mit den Proteinproben waren von einem Laufpuffer umgeben. Durch das an den Proteinen angelagerte SDS waren diese negativ geladen und wanderten bei angelegter Spannung zur Kathode, in der Apparatur also nach unten. In der ersten Tasche des Gels wurde ein Größenmarker (*Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standard*, Biorad) aufgetragen, um die Größenzuordnung der resultierenden Banden gewährleisten zu können. Die Elektrophorese erfolgte die ersten 15 min bei 100 V, dann wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Anhand des Größenmarkers konnte der Bereich beobachtet werden, in dem sich die Proteine des Interesses befanden und so das Ende des Laufes bestimmt werden.

3.6.4 Western Blot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine konnten mit Hilfe von *Elektroblotting* aus dem Acrylamidgel auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Die zurechtgeschnittene Membran wurde in Methanol aktiviert und dann, wie auch das Gel, 5 min in Blotpuffer äquilibriert. Im *Semi Dry-Blotter* der Firma Biorad entspricht die untere Platte der Anode, die obere der Kathode. Entsprechend wurden luftblasenfrei auf die Anode drei Lagen in Blotpuffer getränktes Filterpapier aufgebracht, die PVDF-Membran daraufgelegt, auf diese das Acrylamidgel platziert, dann wieder drei Lagen getränktes Filterpapier aufgelegt und zuletzt wurde mit der Kathode abgeschlossen. Das Blotten erfolgte 1:10 h bei 1 mA/cm².

Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung senkrecht zur Laufrichtung des Gels wanderten nun die Proteinbanden aus dem Gel auf die Membran, wobei das Muster der zuvor getrennten Proteinbanden erhalten blieb. Die Membran wurde anschließend eine Stunde in einer Lösung aus 10 % *Skim-Milk* in PBS auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nachfolgend erfolgte die Inkubation mit einem spezifischen Primärantikörper über Nacht bei 4 °C auf dem Rollmischer. Es wurde 3 x für je 10 min mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Dann erfolgte die Inkubation mit einem entsprechenden *Horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper (vgl. Tbl 8). Weiteres Waschen für 3 x 10 min entfernte auch hier überschüssige Antikörper, wonach die ECL-Lösung auf die Membran aufgebracht wurde. Bei der Elektrochemilumineszenz (ECL)-Reaktion katalysiert HRP die Oxidation von Luminol in ein Reagenz, welches Licht emittiert. Hierdurch wird die Bindungsstelle des Primär- und Sekundärantikörperkomplexes als Bande sichtbar und das abgegebene Licht kann auf einem Röntgenfilm dargestellt werden. Nach der Exposition wird der Röntgenfilm entwickelt und fixiert. Die Membran konnte anschließend erneut gewaschen, in 10 % *SkimMilk* blockiert und für eine Analyse mit einem oder mehreren weiteren Primärantikörpern eingesetzt werden.

Entsprechend ihrer Proteingröße und der Antikörperspezies wurden bei allen im Rahmen dieser Arbeit generierten *Western Blots* die Primärantikörper in folgender Reihenfolge aufgetragen:

	Primärantikörper	Spezies	Proteingröße
1.	Smyd1	Kaninchen	56 kDa
2.	Cryab	Kaninchen	25 kDa
3.	Gapdh	Maus	40 kDa
4.	Traf6	Maus	60 kDa
5.	<i>Strippen</i> der Membran nach Herstellerprotokoll mit <i>Stripping Solution</i> der Firma <i>Thermo Fisher</i> , um gebundene Antikörper zu entfernen.		
6.	α-Tubulin	Kaninchen	55 kDa
7.	IκBα	Kaninchen	37 kDa

Eine weitere Membran der gleichen Proben wurde folgenden Antikörpern ausgesetzt:

	Primärantikörper	Spezies	Proteingröße
1.	Atrogin1	Maus	40 kDa
2.	Unc45b	Kaninchen	70 kDa
3.	Murf1	Kaninchen	35 kDa
4.	<i>Strippen</i> der Membran nach Herstellerprotokoll mit <i>Stripping Solution</i> der Firma <i>Thermo Fisher</i> , um gebundene Antikörper zu entfernen.		
5.	Gapdh	Maus	40 kDa

3.6.5 Verwendete Chemikalien und Lösungen

Chemikalie	Summenformel	Firma
40% Acrylamid	C_3H_5NO	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Serva
Bovines Serum Albumin (BSA)		Sigma Aldrich
ddH₂O	H_2O	VWR
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	Merck
Glyzin	$C_2H_5NO_2$	Carl Roth
Kaliumchlorid	KCl	Sigma Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Sigma Aldrich
Methanol	CH_3OH	Lab. honeywell

Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Carl Roth
Natronlauge	NaOH	Sigma Aldrich
Pefa-bloc SC-Protease-Inhibitor	C ₈ H ₁₀ NSO ₂ F x HCl	Carl Roth
RIPA		Thermo Fisher
Salzsäure	HCl	Carl Roth
Skim Milk-Pulver		Sigma Aldrich
Stripping-Puffer		Thermo Fisher
TEMED	C ₆ H ₁₆ N ₂	Serva
Tris	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Sigma Aldrich
Tween	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	VWR

Gebrauchslösung	
10 x PBS	1,37 M NaCl (80,06 g), 27 mM KCl (2,01 g), 100 mM Na ₂ HPO ₄ (14,196 g) und 20 mM KH ₂ PO ₄ (3,84 g) in 1 l Wasser lösen, den pH mit NaOH oder HCl auf 7,4 einstellen.
RIPA	Die kommerziell erhältliche Lösung enthält 25mM Tris-HCl pH 7,6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% Natriumdeoxycholat und 0,1% SDS.
Skim Milk-Blockierlösung	10 g <i>Skim Milk</i> -Pulver in 100 ml PBS lösen.
BSA-Blockierlösung	5 g BSA-Pulver in 100 ml PBS lösen.
PBS-T-Waschlösung	100 ml 10 x PBS mit 900 ml Wasser mischen, dem 500 µl Tween zugesetzt wurde.
3 M Tris-HCl	36,342 g Tris in 100 ml Wasser lösen, den pH-Wert mit HCl auf pH = 8,8 einstellen.
1 M Tris-HCl	12,114 g Tris in 100 ml Wasser lösen, den pH mit HCl auf pH = 6,8 einstellen.
10 % SDS	10 g SDS in 100 ml Wasser lösen.
10 % APS	Auf der Feinwaage eine kleine Menge X g APS in einem Kunststoff-Reaktionsgefäß abwiegen. Entsprechend der Formel $X/10 \cdot 100 = Y$ werden Y ml Wasser zugegeben und kräftig vermischt, bis eine homogene Lösung entstanden ist. Aliquots von 1 ml Lösung herstellen und diese bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C lagern.

10 x Laufpuffer	0,25 M Tris (30,285 g), 0,192 M Glyzin (144,13 g) und 1 % SDS (10 g) in 1 l Wasser lösen, den pH mit Tris bzw. Glyzin auf 8,3 einstellen.
1 x Laufpuffer	100 ml 10 x Laufpuffer mit 900 ml Wasser mischen.
1 x Towbin-Blotpuffer	0,606 g Tris, 2,88 g Glyzin, 40 ml Methanol und 2 ml 10 %iges SDS in 200 ml Wasser lösen.

3.6.6 Verwendete Antikörper

Primär-antikörper	Spezies	Verdünnung	Lösung	Firma
α-Tubulin	Kaninchen	1:2000	5 % BSA	Cell signaling
Atrogin1	Kaninchen	1:200	5 % Skim Milk	ECM Biosciences
Cryab	Kaninchen	1:2500	5 % Skim Milk	Abcam
IκBα	Kaninchen	1:35.000	5 % Skim Milk	Abcam
Gapdh	Maus	1:5000	5 % Skim Milk	R&D
Murf1	Kaninchen	1:1000	5 % BSA	ECM Biosciences
Smyd1	Kaninchen	1:2500	5 % Skim Milk	Abcam
Traf6	Maus	1:500	5 % Skim Milk	Santa Cruz
Unc45b	Kaninchen	1:250	5 % Skim Milk	Abcam
Sekundär-antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	
	Maus	1:35.000	Dianova	
	Kaninchen	1:35.000	Dianova	

Tbl. 8: Im Rahmen dieser Arbeit für die Erstellung von *Western Blots* eingesetzte Antikörper.

3.6.7 Auswertung und Statistik

Die erhaltenen Röntgenfilme wurden eingescannt und mit dem Computerprogramm „ImageJ“ wurde die optische Dichte der Banden

ermittelt. Diese Daten wurden gegen die *Housekeeping*-Gene und die mitgelaufene Referenzprobe normalisiert dargestellt. Mit Hilfe einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse der relativen Expressionswerte (*two-way-ANOVA*) wurde auf eine vorliegende Signifikanz der Expressionsunterschiede untersucht. Ergab sich eine solche Signifikanz der beiden Variablen Ausdauertraining oder PDTC oder ein Interaktionseffekt zwischen diesen, wurde noch ein *post-hoc Tukey-HSD* Test angewandt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde wie zuvor beschrieben definiert.

4 Ergebnisse

4.1 Gewichtsentwicklung der Mäuse in den zehn Versuchswochen

Im Experiment wurden vier Gruppen genetisch gleichartiger Mäuse verglichen: Zwei dieser Gruppen durchliefen ein Laufbandtraining, die anderen zwei Gruppen wurden nicht trainiert. Je eine Untergruppe der Läufer-Mäuse und der Nichtläufer-Mäuse erhielt über das Trinkwasser den NF κ B-Inhibitor PDTC verabreicht.

Zur Kontrolle des Gesundheitszustandes und der körperlichen Entwicklung der Mäuse wurden sie vor jeder durchgeführten Trainingseinheit gewogen. Die Gewichtsentwicklung wurde als Differenz zum Anfangsgewicht der jeweiligen Maus und als Wochendurchschnitt der vier Gruppen dargestellt (vgl. Abb. 25).

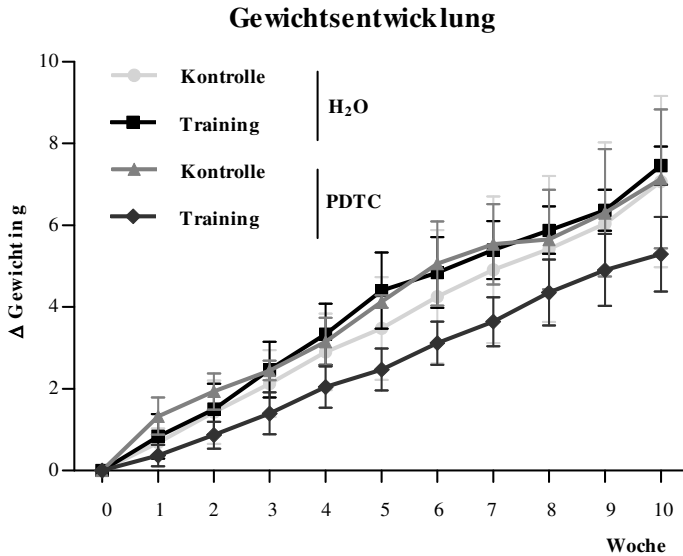


Abb. 25: Gewichtsentwicklung der Mäuse als MW der Gewichtsdiffrenz der Wochenmessung zu ihrem Ausgangsgewicht über den Trainingszeitraum von zehn Wochen, mit SD, n = 4.

	H ₂ O		PDTC	
	Kontrolle	Training	Kontrolle	Training
Woche 1	0,69 ± 0,17	0,84 ± 0,27	1,33 ± 0,23	0,37 ± 0,13
Woche 2	1,43 ± 0,39	1,51 ± 0,31	1,94 ± 0,22	0,87 ± 0,16
Woche 3	2,13 ± 0,41	2,47 ± 0,34	2,45 ± 0,18	1,40 ± 0,26
Woche 4	2,90 ± 0,47	3,34 ± 0,37	3,16 ± 0,29	2,04 ± 0,25
Woche 5	3,48 ± 0,63	4,41 ± 0,47	4,13 ± 0,08	2,48 ± 0,26
Woche 6	4,25 ± 0,82	4,85 ± 0,43	5,06 ± 0,51	3,12 ± 0,26
Woche 7	4,91 ± 0,89	5,40 ± 0,35	5,54 ± 0,49	3,64 ± 0,30
Woche 8	5,42 ± 0,89	5,88 ± 0,29	5,66 ± 0,61	4,36 ± 0,40
Woche 9	6,04 ± 1,00	6,37 ± 0,25	6,31 ± 0,78	4,91 ± 0,44
Woche 10	7,07 ± 1,05	7,46 ± 0,23	7,14 ± 0,85	5,29 ± 0,46

Tbl. 9: MW der Gewichtsdiffrenz der Mäuse zu ihrem Anfangsgewicht in Woche 0 in g mit SEM in %, n = 4.

Ab Woche drei des Versuchs zeigte sich eine beginnende Gewichtsdivergenz zwischen den Mausgruppen, die im Verlauf noch deutlicher wurde: Die Läufer, die Leitungswasser zu trinken bekamen, legten an Gewicht deutlich mehr zu, als die Läufer, die den Stoff PDTC in ihrem Trinkwasser hatten. Diese waren auch im Vergleich zu den mit PDTC-behandelten Mäusen, die nicht trainiert wurden, im Gewicht zurückgeblieben. Die zwei Gruppen, die nicht am regelmäßigen Lauf teilnahmen, unterschieden sich nicht wesentlich in ihren Körpergewichten; die PDTC-Gruppe zeigte lediglich eine minimale, aber immerhin konstant größere Gewichtszunahme (vgl. Tbl. 9).

Bei allen Mäusen war eine altersbedingte normale Gewichtszunahme innerhalb der 11 protokollierten Wochen zu verzeichnen.

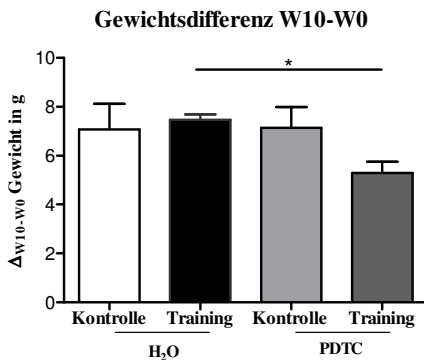


Abb. 26: Gewichtszunahme der Mäuse nach zehn Wochen als MW der vier Versuchsgruppen mit SD, n=4. * $p < 0,05$ im Vergleich der trainierten Gruppen mit und ohne PDTC-Trinkwasserbehandlung.

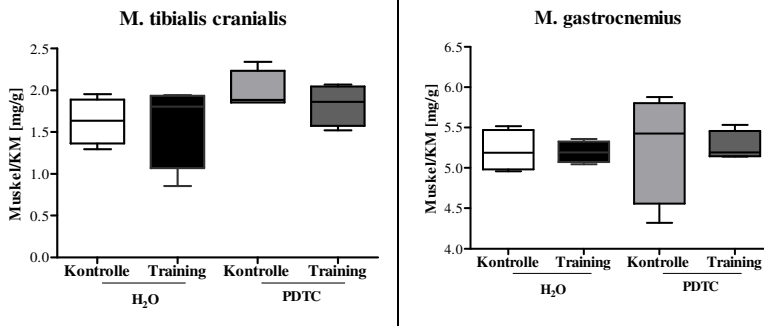
Zur besseren Veranschaulichung wurde zusätzlich die Differenz der Endgewichte der jeweiligen Mäuse in Woche zehn zu ihrem Ausgangsgewicht vor dem Training ermittelt, als Mittelwert der jeweiligen Mausgruppe dargestellt und die beobachteten Unterschiede auf Signifikanz überprüft. Abb. 26 zeigt, dass es keinen deutlichen Unterschied in den Gewichtszunahmen der ersten drei Gruppen gab, aber es scheint, dass die beiden Einflüsse Training und PDTC einen synergistischen Effekt hatten: Die

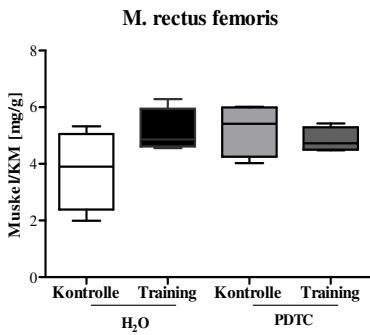
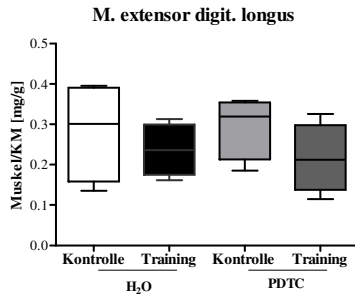
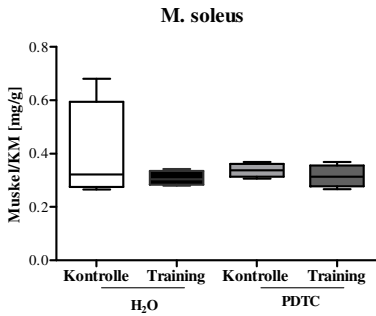
Läufergruppe, die PDTC verabreicht bekam, zeigte ein signifikant niedrigeres Gewicht, als die Läufergruppe mit unversetztem Trinkwasser. Der Unterschied gegenüber den Versuchsgruppen ohne jegliche Behandlung bzw. ohne Training, nur mit PDTC, erreichte dagegen kein signifikantes Niveau.

4.2 Ermittelte Einzelmuskelgewichte der präparierten Muskeln nach Training

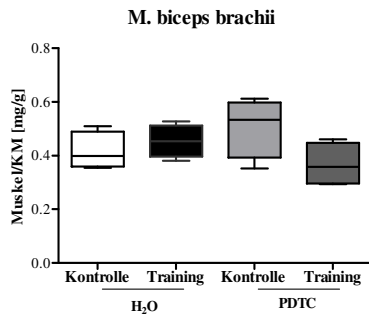
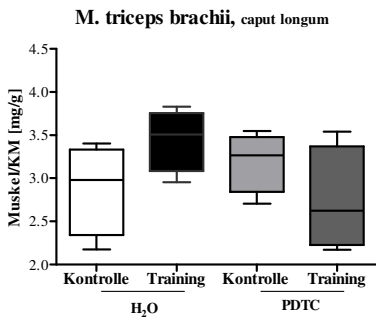
Um einen Zusammenhang zwischen Gewichtszunahme und Muskelmassezunachs untersuchen zu können, wurde auch das Gewicht der präparierten Muskeln sowie des Herzens und des Zwerchfells direkt nach deren Entnahme erfasst.

Hintergliedmaße





Vordergliedmaße



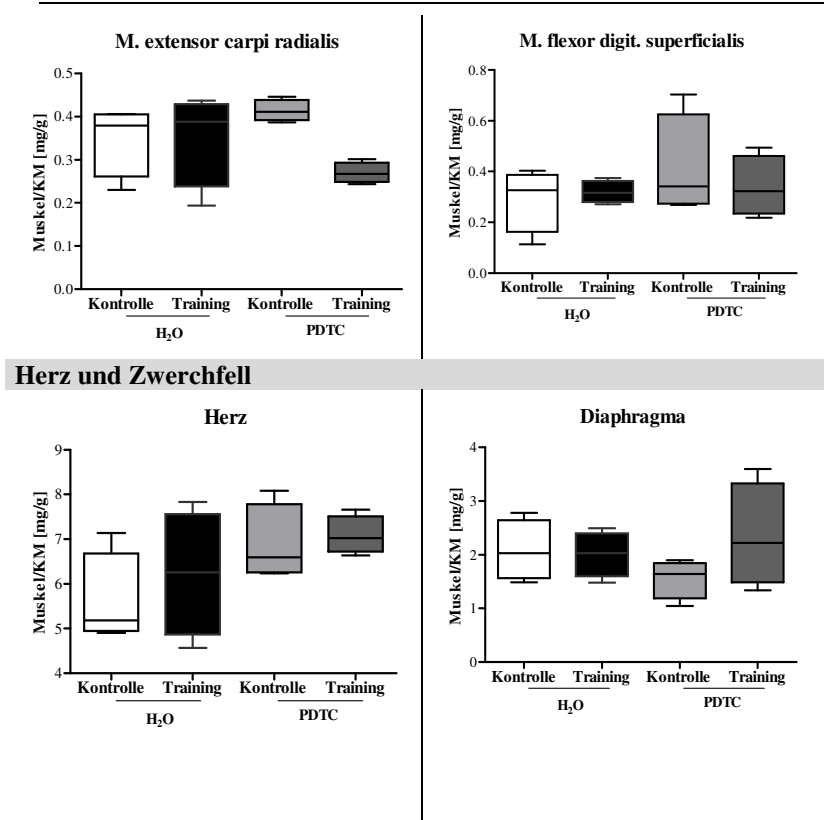


Abb. 27: Einzelmuskelgewichte der vier Mausversuchsgruppen in mg im Verhältnis zur Körpermasse der Mäuse in g, n=4. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.

	H ₂ O		PDTC	
	Kontrolle	Training	Kontrolle	Training
TA	1,63 ± 0,14	1,60 ± 0,25	1,99 ± 0,12	1,83 ± 0,12
GA	5,21 ± 0,13	5,20 ± 0,07	5,26 ± 0,34	5,26 ± 0,09
SOL	0,40 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,32 ± 0,02
EDL	0,28 ± 0,06	0,24 ± 0,03	0,30 ± 0,06	0,22 ± 0,06
RF	3,78 ± 0,70	5,14 ± 0,39	5,22 ± 0,50	4,84 ± 0,21
TRIClong	2,89 ± 0,26	3,45 ± 0,18	3,2 ± 0,18	2,74 ± 0,30

BIC	0,42 ± 0,03	0,45 ± 0,03	0,51 ± 0,06	0,37 ± 0,04
ECR	0,35 ± 0,04	0,35 ± 0,05	0,41 ± 0,01	0,27 ± 0,01
FDS	0,29 ± 0,06	0,34 ± 0,06	0,41 ± 0,10	0,34 ± 0,06
Herz	5,60 ± 0,52	6,23 ± 0,70	6,88 ± 0,43	7,09 ± 0,21
DIA	2,08 ± 0,28	2,10 ± 0,21	1,56 ± 0,18	2,34 ± 0,48

Tbl. 10: MW der Muskelgewichte sowie von Herz und Zwerchfell relativ zum Gesamtkörpergewicht in den vier Vergleichsgruppen in mg und SEM in %, n = 4.

Bei einigen Muskeln war ein tendenziell etwas niedrigeres Einzelmuskelgewicht zwischen den trainierten PDTC-Mäusen im Vergleich zu den untrainierten Mäusen mit PDTC zu sehen (vgl. Abb. 27 und Tbl. 10). Dieser Effekt war nur im Zwerchfell von gegenteiliger Richtung. Die Varianzen erreichten in keinem Fall ein signifikantes Ausmaß.

4.3 Muskelkraftmessung der Mäuse nach zehn Wochen Lauftraining

Zur Untersuchung von Auswirkungen des Trainings auf die Muskelkraft der Mäuse wurde ein sogenannter *Grip strength*-Test durchgeführt.

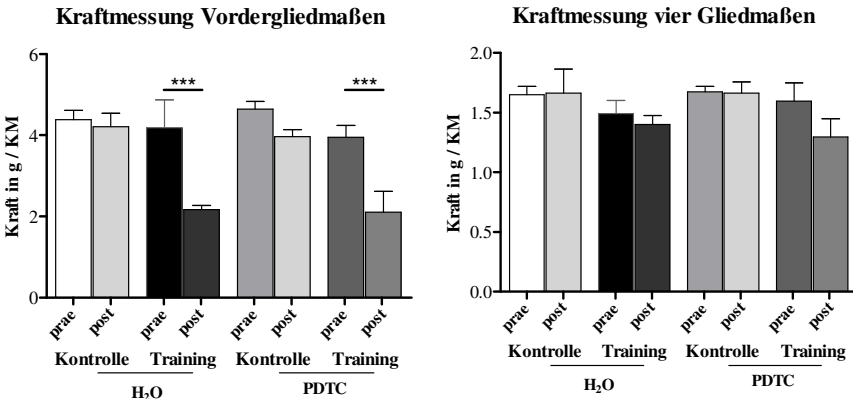


Abb. 28: Kraftmessung der Vordergliedmaßen bzw. aller vier Gliedmaßen vor und nach Absolvieren des letzten Trainings mit einem *Grip strength*-Gerät, n = 4. Werte in g, relativ zum Körpergewicht, MW mit SD. *** p < 0,001 im Vergleich der Messung vor und nach dem Training in den Gruppen mit und ohne PDTC-Behandlung bei Messung der Vordergliedmaßenkraft.

Die Kraftmessung erfolgte dabei direkt vor und nach dem letzten Training, welches die Mäuse absolvierten. Hierzu wurden sie so an das *Grip strength*-Messgerät herangeführt, das sie mit beiden Vorderbeinen bzw. mit allen vier Gliedmaßen das Gitter greifen konnten und wurden dann in einer kontinuierlichen Bewegung parallel zur Messachse wieder vom Gerät gelöst. Bei den Mäusen der Gruppen, die allesamt im Ruhezustand, d. h. vor dem Laufbandtraining, gemessen wurden, konnte hinsichtlich ihrer aufgewendeten Kraft kein Unterschied beobachtet werden. Einen großen Unterschied gab es zwischen den Messungen der Vordergliedmaßenkraft der beiden trainierten Gruppen vor und direkt nach dem von ihnen absolvierten Training (vgl. Abb. 28). Nach diesem war die von den Mäusen aufgewendete Kraft deutlich reduziert.

4.4 Messung der Ruheherzfrequenz der Versuchstiere nach zehnwöchigem Ausdauertraining

Effekte des Trainings auf die kardiorespiratorische Anpassung der Mäuse wurden über die Messung der Ruheherzfrequenz untersucht.

Die Herzfrequenz der Mäuse wurde mittels einer Ringmanschette um die Schwanzvene gemessen. Dies wurde bei allen Mäusen 24 Stunden nach dem letzten Lauf der Trainingsgruppen durchgeführt. Dabei wurde auf eine möglichst stressarme Umgebung und Manipulation der Versuchstiere geachtet.

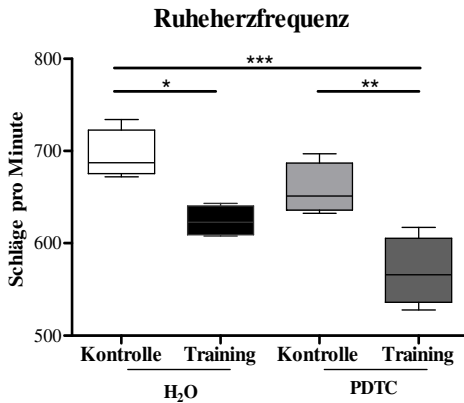


Abb. 29: Ruheherzfrequenz der vier Vergleichsgruppen, gemessen mit dem PhysioSuite-Gerät von Kent Scientific, in Schlägen pro Minute, $n=4$. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum, * $p < 0,05$ im Vergleich von Mäusen ohne Trinkwasserbehandlung mit und ohne Training, ** $p < 0,01$ im Vergleich der PDTC-Mäuse mit und ohne Training, *** $p < 0,001$ im Vergleich unbehandelte Mäuse zu Mäusen mit Training und PDTC.

Die zu beobachtende Ruheherzfrequenz der Mäuse, welche die zehn Wochen davor ein regelmäßiges Laufbandtraining absolviert hatten, war signifikant niedriger im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen (vgl. Abb. 29). Dieser Unterschied war bei den Mäusen mit PDTC-versetztem Trinkwasser noch etwas deutlicher ausgeprägt, als bei denen, die reines Leitungswasser verabreicht bekamen. Auffällig ist auch, dass bereits die Tiere unter alleiniger PDTC-Behandlung eine leicht erniedrigte Herzfrequenz zeigten, im Vergleich zu den untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser. Dieser Effekt schien bei zusätzlichem Training noch verstärkt.

4.5 Darstellung der Mhc-Isoformen im M. soleus mittels mATPase-Färbung

Eine Methode zur Bestimmung, ob und in welchem Ausmaß Muskelfaserumbau stattgefunden hat, bietet die Färbung der myofibrillären

Adenosintriphosphatase (mATPase) des Muskels (vgl. Abb. 30). Die mATPase-Aktivität korreliert direkt mit der Mhc-Expression der Muskelfaser und mit ihrer Kontraktionsgeschwindigkeit (Talmadge&Roy, 1993).

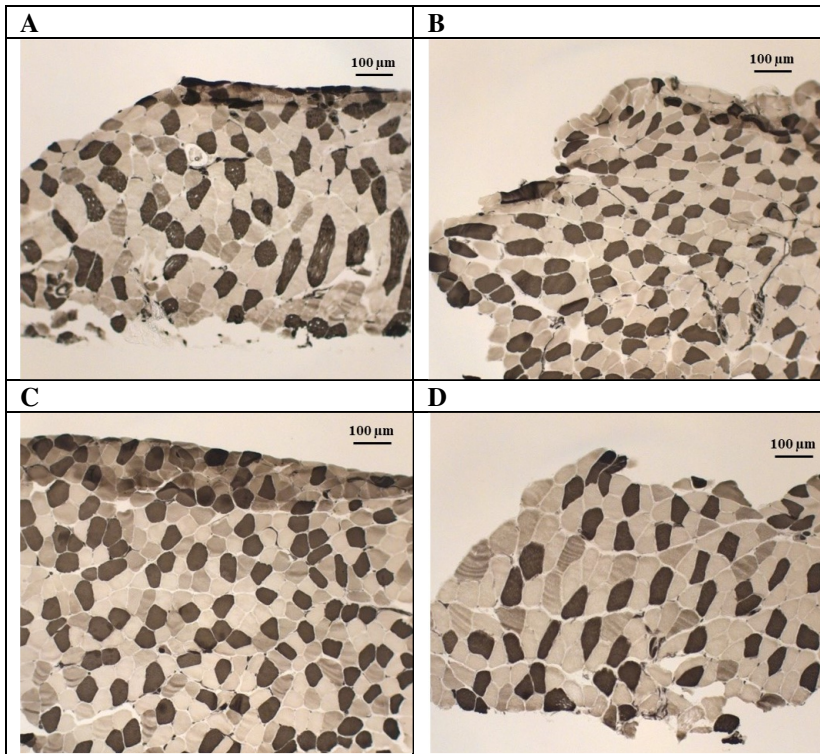


Abb. 30: Beispiele der mATPase-Färbung der Mm. Solei. (A) Kontrolle + H₂O, (B) Training + H₂O, (C) Kontrolle + PDTC und (D) Training + PDTC in 10x Vergrößerung. Hell = Mhc IIA-, dunkel = Mhc I-, mittel = Mhc IIX- und - IIB-Fasern.

Die Anzahl der jeweiligen Muskelfasertypen wurde ausgezählt und als Prozent der Gesamtfaserzahl wiedergegeben (vgl. Abb. 31).

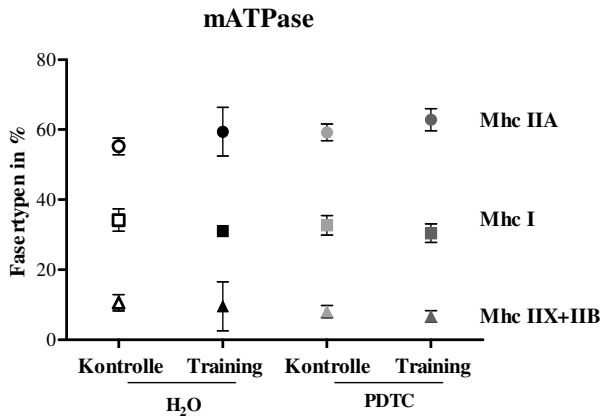


Abb. 31: MW der Fasertypen in % im Vergleich der vier Versuchsgruppen mit SD, n = 4.

	H ₂ O		PDTC	
	Kontrolle	Training	Kontrolle	Training
Mhc IIA	55,27 ± 1,18	59,21 ± 1,2	59,42 ± 3,46	62,86 ± 1,58
Mhc I	34,17 ± 1,62	32,68 ± 1,4	31,01 ± 0,58	30,45 ± 1,34
Mhc IIX/B	10,56 ± 1,16	8,10 ± 0,88	9,57 ± 3,50	6,69 ± 0,80

Tbl. 11: MW der Fasertypen in % im Vergleich der vier Versuchsgruppen mit SEM, n = 4.

Hier zeigten sich Tendenzen, dass sowohl Training als auch PDTC zu einem Anstieg der Mhc IIA-Fasern führen. Bei den Läufergruppen verringerten sich dabei prozentual die IIX/IIB-Fasern, bei den PDTC-Gruppen die Typ I-Fasern (vgl. Abb. 31 und Tbl. 11). Keiner dieser Effekte war jedoch signifikant.

4.6 Darstellung der Mhc-Isoformen im M. soleus mittels Immunfluoreszenzfärbung

Zur Verifizierung der Ergebnisse der metabolischen Färbung wurde eine zweite spezifische Färbemethode durchgeführt. Bei der Immunfluoreszenzmethode binden Mhc-spezifische Antikörper an die

Oberfläche der Muskelfasern und werden in einem zweiten Schritt sichtbar gemacht (vgl. Abb. 32).

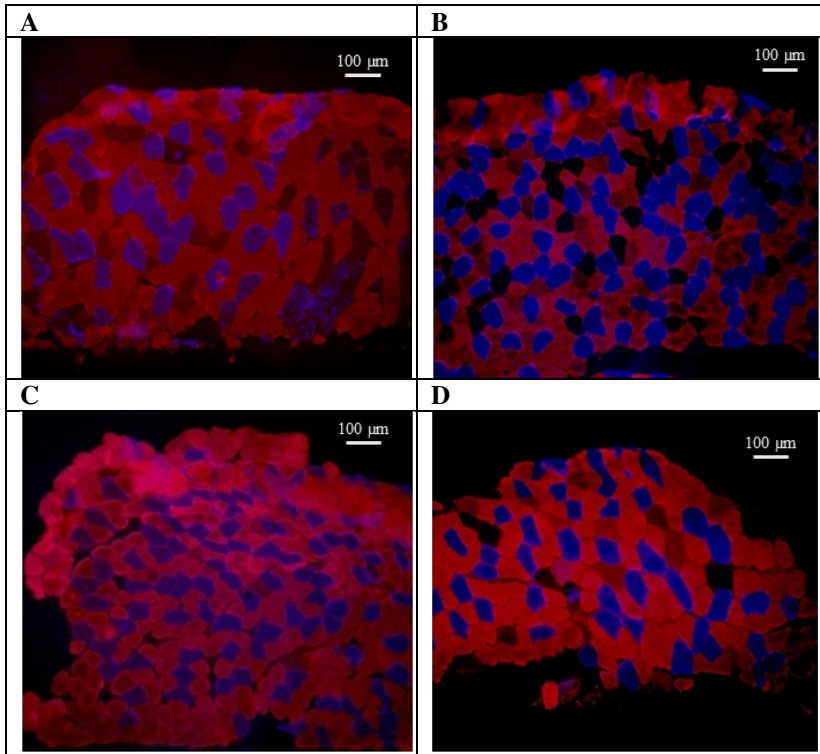


Abb. 32: Beispiele der Immunfluoreszenzfärbung der Mm. solei. (A) Kontrolle + H₂O, (B) Training + H₂O, (C) Kontrolle + PDTC und (D) Training + PDTC, n = 4. Rot = Mhc IIA-, blau = Mhc I-, grün = Mhc IIB-, schwarz = Mhc IIX-Fasern.

Die Muskelfasern wurden ausgezählt und als Prozent der Gesamtfasern wiedergegeben. Es ist deutlich zu sehen, dass kein M. soleus Mhc IIB-Fasern enthält (vgl. Tbl. 12).

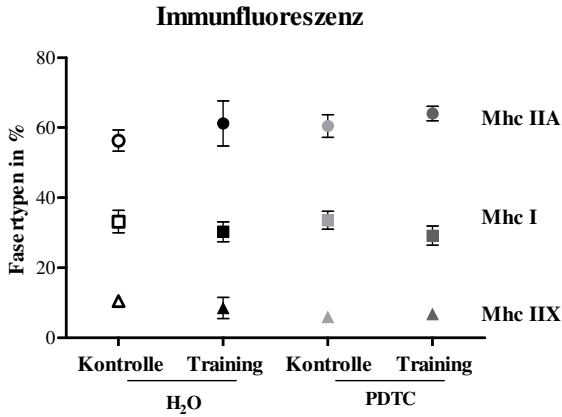


Abb. 33: MW der Fasertypen in % im Vergleich der vier Versuchsgruppen mit SD, n = 4.

	H ₂ O		PDTC	
	Kontrolle	Training	Kontrolle	Training
Mhc IIA	56,32 ± 1,50	60,52 ± 1,64	61,2 ± 3,20	64,03 ± 1,04
Mhc I	33,19 ± 1,58	33,59 ± 1,30	30,27 ± 1,42	29,18 ± 1,38
Mhc IIX	10,48 ± 1,13	5,89 ± 1,19	8,53 ± 3,03	6,78 ± 1,24
Mhc IIB	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Tbl. 12: MW der Fasertypen in % im Vergleich der vier Versuchsgruppen mit SEM, n = 4.

Die beobachtbaren Tendenzen der Immunfluoreszenzfärbung stimmten sehr gut mit den Ergebnissen der mATPase Färbung überein (vgl. Abb. 33). Mit dieser Methode war auch die Unterscheidung zwischen Mhc IIX- und Mhc IIB-Fasern möglich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Immunfluoreszenzfärbung verwendet, um einen *Fasershift* der Muskeln infolge des durchgeführten Trainings darstellen zu können.

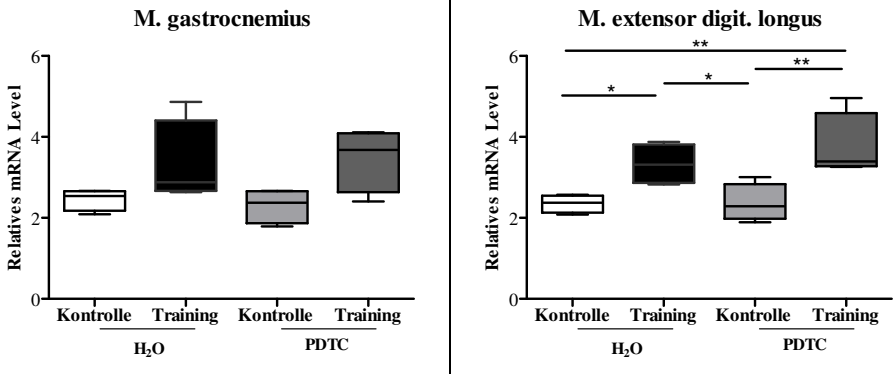
4.7 Auswirkungen von Training und PDTC auf die Genexpression in unterschiedlichen Muskeln

Mit Hilfe der *Realtime*-Polymerasekettenreaktion kann die in einem untersuchten Gewebe vorhandene Menge an mRNA bestimmt werden. Somit kann auf die Genexpression bestimmter Marker in diesem Gewebe rückgeschlossen werden.

4.7.1 Metabolische Anpassung der Muskeln

Die Zitratsynthase und das Protein Tbc1d1 sind Stoffwechselmarker, anhand deren Konzentration man Rückschlüsse auf eine erfolgte Trainingsanpassung ziehen kann.

ZS



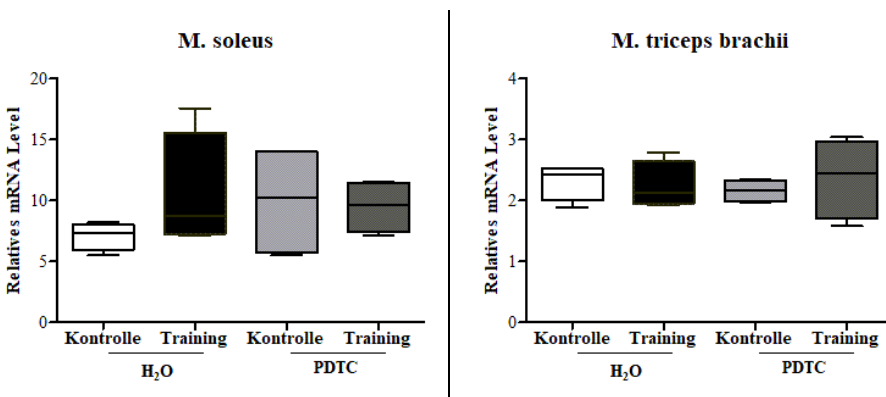


Abb. 34: Relative Konzentration des ZS-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 101,65. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum, * $p < 0,05$ zwischen Mäusen ohne Training, mit unbehandeltem Trinkwasser zu trainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und zwischen Letzteren und untrainierten PDTC-Mäusen im EDL. ** $p < 0,01$ zwischen untrainierten PDTC-Mäusen und Mäusen mit PDTC und Training sowie zwischen Letzteren und untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser im EDL.

Die Zitratsynthase ist ein essentieller Bestandteil des Zitratzyklus und somit unabdingbar für den Stoffwechsel einer Zelle. Sie korreliert mit der Mitochondriendichte im Skelettmuskel sowie seiner oxidativen Anpassung nach Belastung.

Im *M. gastrocnemius* und im *M. extensor digitorum longus* konnte durch Training eine deutliche Zunahme an Zitratsynthase nachgewiesen werden, sowohl unter PDTC als auch ohne PDTC-Einfluss. Signifikante Werte wurden allerdings nur im *M. extensor digitorum longus* erreicht. Im *M. soleus* und im *M. triceps brachii* waren keine klaren Effekte zu beobachten (vgl. Abb 34).

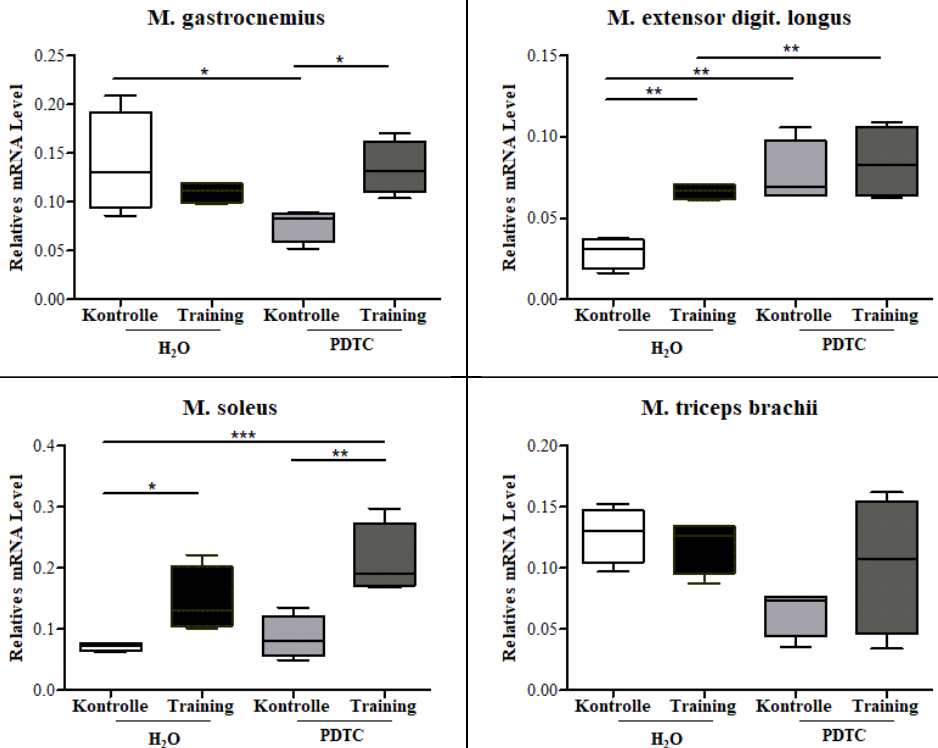
Tbc1d1

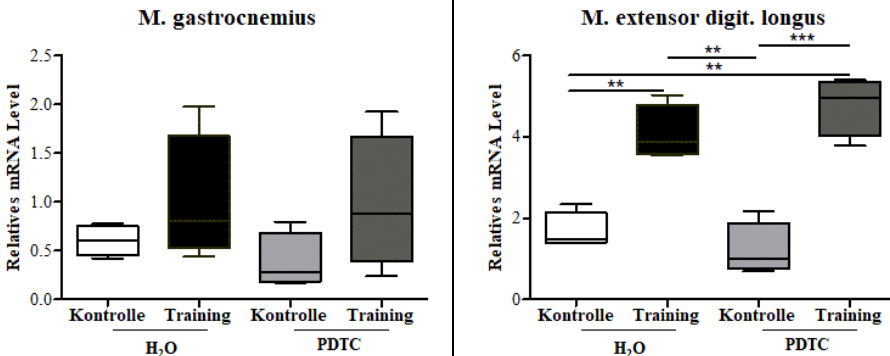
Abb. 35: Relative Konzentration des *Tbc1d1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 91,13. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen Mäusen ohne Training und ohne Trinkwasserbehandlung zu untrainierten Mäusen mit PDTC sowie zwischen Letzteren und trainierten Mäusen mit PDTC im GA. Im SOL bei Mäusen ohne Trinkwasser-Behandlung zwischen trainierter und untrainierter Gruppe. ** $p < 0,01$ im EDL von untrainierten Mäusen ohne Trinkwasser-Behandlung jeweils zur Gruppe ohne PDTC, mit Training als auch zur Gruppe ohne Training mit PDTC sowie zwischen trainierten Mäusen ohne PDTC zu Mäusen mit Training und PDTC. Im SOL zwischen Mäusen mit PDTC-Behandlung mit und ohne gleichzeitigem Training. *** $p < 0,001$ zwischen unbehandelten untrainierten Mäusen und Mäusen mit PDTC und Training im SOL.

Tbc1d1 ist ein Protein, das große Bedeutung im Glukosestoffwechsel des Skelettmuskels hat. Das entsprechende Gen ist in „glykolytischen“ Muskeln stärker exprimiert als in „oxidativen“ Fasern. Im M. soleus und im M. extensor digitorum longus konnte eine signifikante Induktion von *Tbc1d1* durch Training dargestellt werden. Diese war unter PDTC ebenfalls ausgeprägt, wobei PDTC im M. extensor digitorum longus sogar einen alleinigen Effekt zu haben schien (vgl. Abb. 35).

4.7.2 Expression fasertypspezifischer Mhc-Isoformen in den verschiedenen Versuchsgruppen

Die Myosinmoleküle in den Muskelfasern lassen sich anhand ihrer metabolischen Eigenschaften in verschiedene Typen einordnen: Mhc II-Fasern sind schnell kontrahierend, Mhc I-Fasern langsam, dafür ausdauernder.

Mhc IIA-Fasern



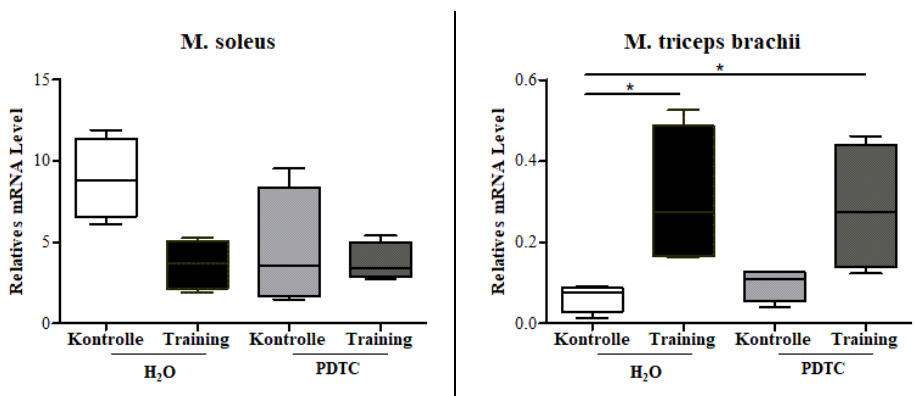


Abb. 36: Relative Konzentration des *Mhc IIA*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 147,97. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und Training zu denen ohne Training und ohne PDTC sowie zwischen Letzteren und Mäusen mit sowohl Training als auch PDTC-Behandlung im TRIC. ** $p < 0,01$ zwischen untrainierten Mäusen ohne PDTC zu trainierten Mäusen ohne PDTC sowie zwischen Letzteren und untrainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung und zwischen Ersteren und Mäusen mit sowohl PDTC als auch Training im EDL. *** $p < 0,001$ im Vergleich trainierter und untrainierter Mäuse der PDTC-Gruppen im EDL.

Im Vergleich zwischen den verschiedenen Muskeln wird deutlich, dass diese ein unterschiedliches Expressionsverhalten für das untersuchte Gen *Mhc IIA* auf mRNA-Ebene zeigen. *Mhc IIA*- Fasern sind zur schnellen aber auch ausdauernden Kontraktion fähig. Im *M. soleus*, der viele Eigenschaften eines langsam kontrahierenden Ausdauer Muskels aufweist, führte Training zu einer verminderten *Mhc IIA*-Expression, wobei dieses Verhalten bereits bei alleiniger PDTC-Gabe auftrat. Die Effekte erreichten kein signifikantes Ausmaß. Der *M. gastrocnemius* ist ein Muskel mit vorwiegend schnell kontrahierenden *Mhc*-Isoformen, der aber auch langsam kontrahierende *Mhc I*-Fasern enthält. Der *M. extensor digitorum longus* hingegen hat fast keine *Mhc I*-Fasern und besteht hauptsächlich aus *Mhc IIB*-Fasern und Mischfasern mit diesen (Augusto *et al.*, 2004). Ähnlich verhält es sich im *M. triceps brachii*, der als ein Muskel der Vordergliedmaße ebenfalls untersucht

wurde (Mathewson *et al.*, 2012). Effekte im signifikanten Bereich konnten bei den beiden zuletzt genannten Muskeln erfasst werden: Die beiden Mausgruppen, die regelmäßig auf dem Laufband trainiert wurden, wiesen eine deutlich höhere Mhc IIA-Konzentration auf als deren Vergleichsgruppen. Dieser Effekt wurde nicht durch die Gabe von PDTC beeinflusst. Auch der M. gastrocnemius zeigte Veränderungen in diese Richtung, die hier allerdings nicht als signifikant erfasst wurden (vgl. Abb. 36).

Mhc IIB-Fasern

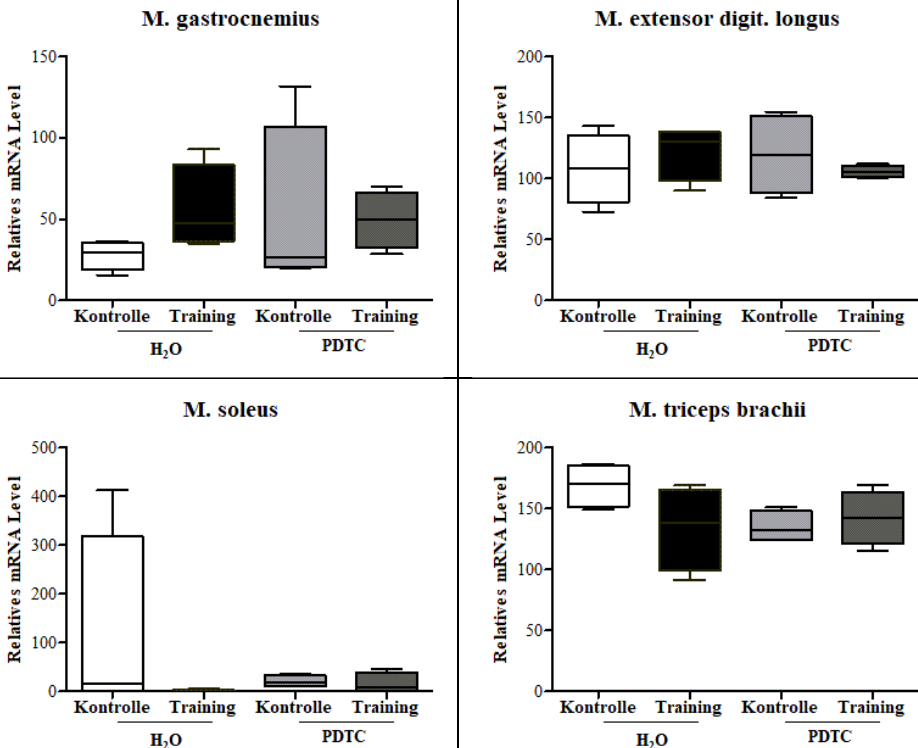
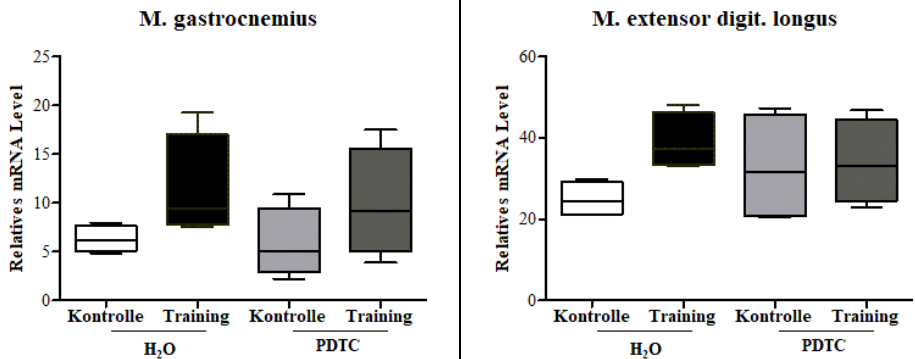


Abb. 37: Relative Konzentration des *Mhc IIB*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4,

Primereffizienz: 102,59. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.

Mhc IIB-Fasern sind zu sehr schneller Kontraktion über sehr kurze Zeit fähig. Durch experimentelle Versuche ist bekannt, dass der *M. soleus* keine Mhc IIB-Fasern aufweist (Kammoun *et al.*, 2014), was auch an den hier dargestellten Werten sichtbar wurde. In der Kontrollgruppe mit unbehandeltem Trinkwasser zeigten sich starke Expressions-Varianzen, die gemessene Konzentration an Mhc IIB im *M. soleus* war aber insgesamt sehr gering. Die anderen Muskeln zeigten keine auffälligen Unterschiede in der Mhc IIB-Konzentration durch die Reize Training oder PDTC (vgl. Abb 37).

Mhc IIX-Fasern



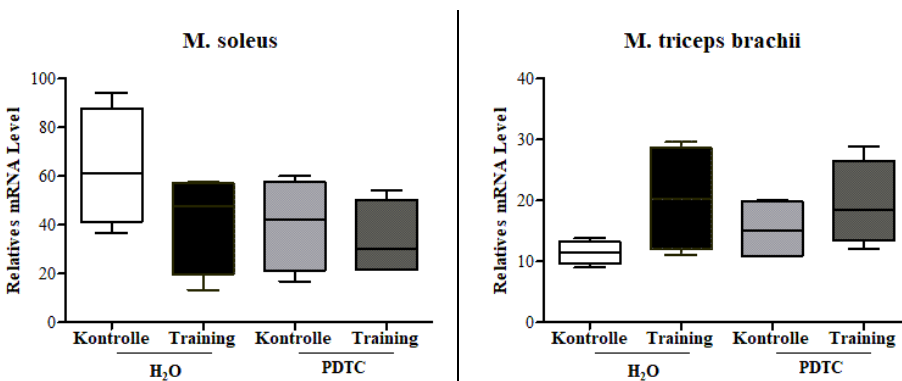


Abb. 38: Relative Konzentration des *Mhc IIX*-Gens auf mRNA-Ebene in verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 103,09. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.

Auch Mhc IIX-Fasern sind fähig zu schneller, kurzzeitiger Kontraktion, was aber etwas weniger stark ausgeprägt ist, als in den zuvor betrachteten Mhc IIB-Fasern. Außer im *M. triceps brachii* sind diese Fasertypen nur in recht geringer Anzahl vertreten.

Effekte wiesen tendenziell auf eine Zunahme dieser Fasern durch den Reiz Training im *M. extensor digitorum longus*, *M. gastrocnemius* und *M. triceps brachii* hin, erreichten aber kein signifikantes Niveau (vgl. Abb. 38).

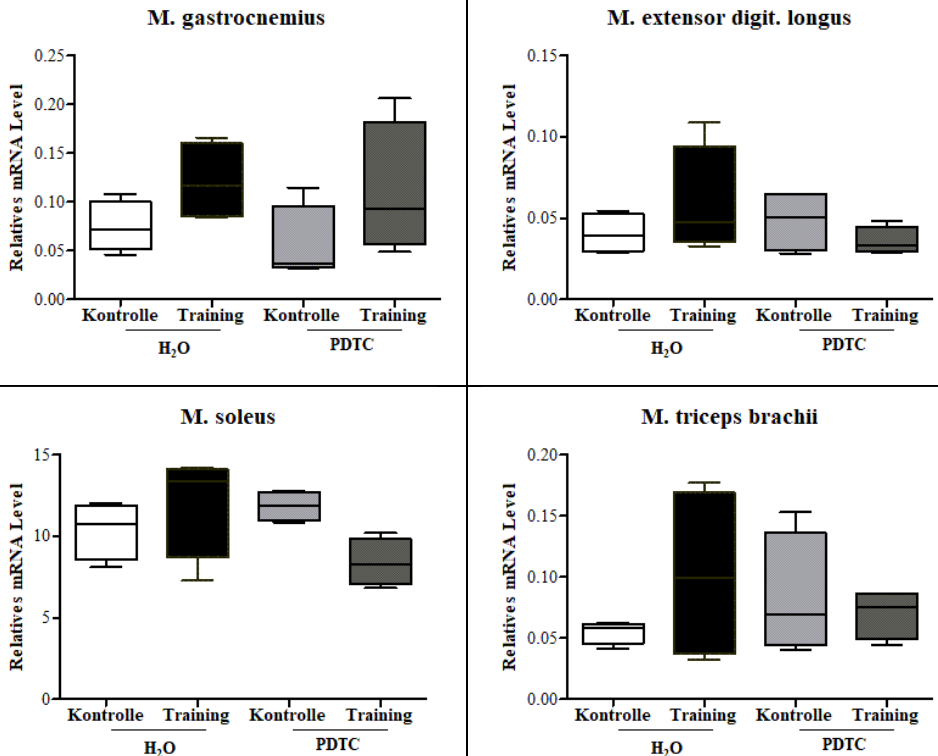
Mhc I-Fasern

Abb. 39: Relative Konzentration des *Mhc I*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 94,12. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.

Mhc I-Fasern sind im *M. soleus* und in geringem Anteil im *M. gastrocnemius* und *M. triceps brachii* beschrieben (Augusto *et al.*, 2004). Sie zählen zu den langsam kontrahierenden Muskelfasern mit hohem Ausdauervermögen. Tendenziell war eine Zunahme der Mhc I-Fasern durch den Trainingsreiz, nicht aber durch PDTC alleine, in allen untersuchten Muskeln zu beobachten.

Die Ausprägung dieser Induktion war aber in keinem Fall signifikant (vgl. Abb 39).

4.7.3 Expression der Marker für muskelaufbauende Prozesse

Im Rahmen der Anpassung von Muskulatur an wiederkehrende Reize, wie sie bei einem Ausdauertraining erfolgen, kommt es zur Umwandlung bestehender Eigenschaften sowie zur Neubildung von Proteinen.

Cryab

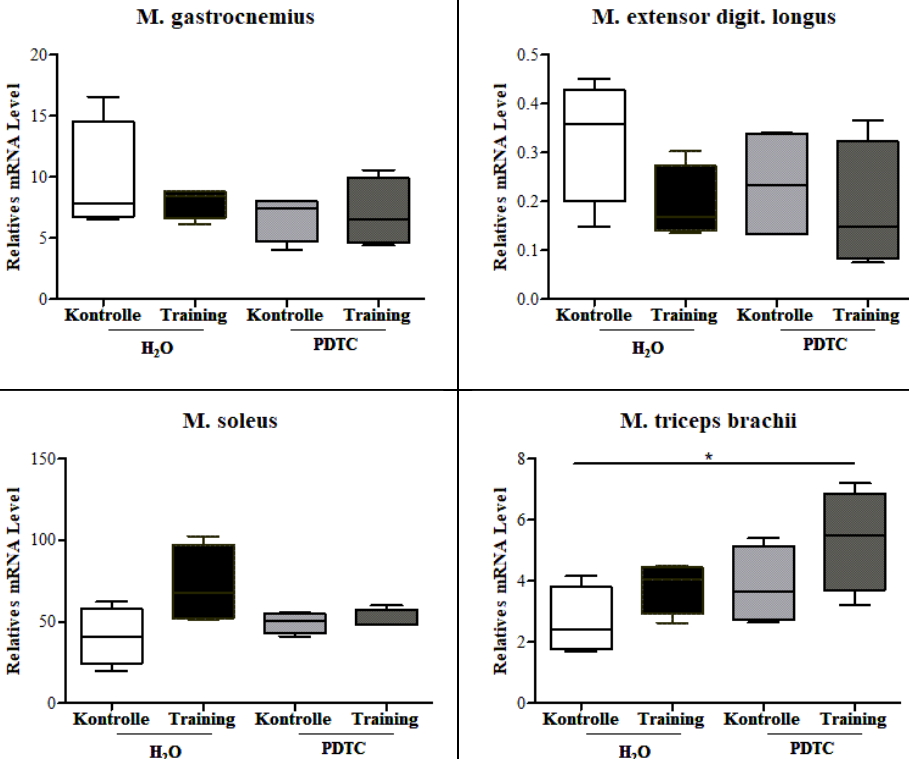
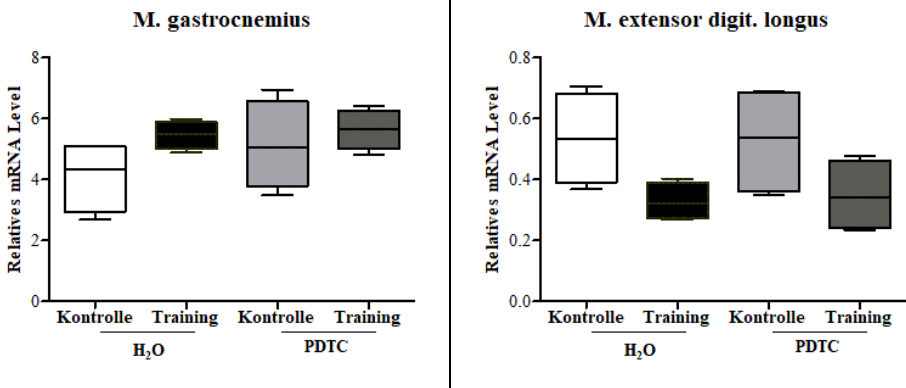


Abb. 40: Relative Konzentration des *Cryab*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 100,22. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und

dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und Mäusen mit sowohl PDTC-Behandlung als auch absolviertem Training im TRIC.

Cryab ist ein kleines Hitzeschockprotein und als Chaperon an der korrekten Bildung von Aktin beteiligt (Smith *et al.*, 2014). Zudem beeinflusst es die Myozytenbildung aus Satellitenzellen (Neppl *et al.*, 2014) und ist ein Indikator für Stresszustände in der Zelle (Fittipaldi *et al.*, 2015). Im Hintergliedmaßenmuskel *M. extensor digitorum longus* war Cryab nach Training eher reduziert, diese Veränderung erreichte aber kein signifikantes Niveau. Im *M. soleus* und im *M. triceps brachii* konnte tendenziell eine Zunahme an Cryab durch Training beobachtet werden. Bei Zusammenwirken von PDTC und Training erreichte die Induktion im *M. triceps brachii* Signifikanz (vgl. Abb. 40).

Hsp90



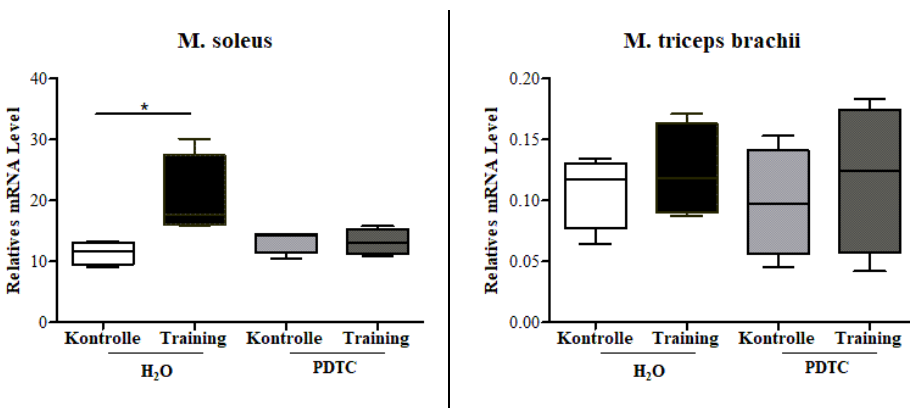


Abb. 41: Relative Konzentration des *Hsp90*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 105,26. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen den Gruppen mit unbehandeltem Trinkwasser und Training sowie ohne Training im SOL.

Das Hitzeschockprotein *Hsp90* wirkt stabilisierend auf hydrophobe Bereiche von Proteinen und verhindert deren Ubiquitinierung. Es unterstützt auch das Chaperon *Unc45b* bei dessen Funktion (Etard *et al.*, 2007).

Nur im *M. soleus* konnte eine signifikante Induktion von *Hsp90* durch Training nachgewiesen werden, ein Effekt der durch PDTC-Gabe gehemmt wurde. Auch im *M. gastrocnemius* zeigte sich eine leichte Induktion der *Hsp90*-Expression, diese erreichte aber keine Signifikanz. Im *M. extensor digitorum longus* schien die *Hsp90*-Expression unter Training eher verringert, aber auch hier war die Veränderung nicht signifikant (vgl. Abb. 41).

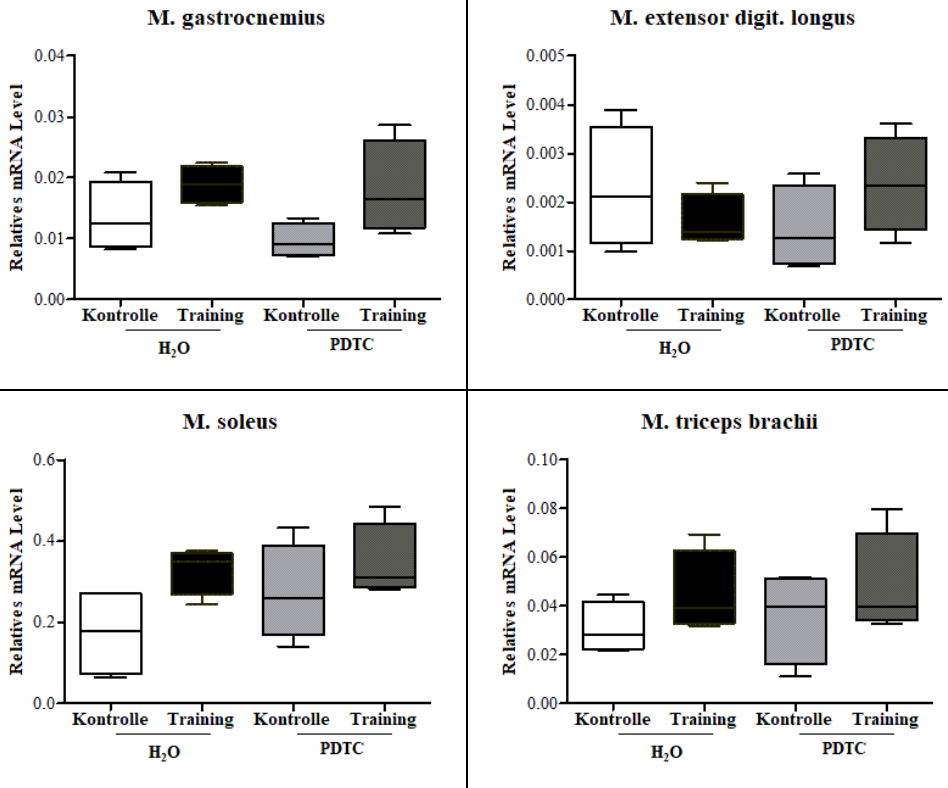
Hsp70

Abb. 42: Relative Konzentration des *Hsp70*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 110,88. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.

Ebenfalls ein ubiquitär vorkommendes Hitzeschockprotein ist Hsp70. Es interagiert v. a. mit der E3-Ligase Chip/Stub1 und unterstützt als Chaperon die korrekte Faltung von Proteinen (Pratt *et al.*, 2010).

Für die Expression des *Hsp70*-Gens konnten im Rahmen dieser Arbeit keine signifikanten Effekte nachgewiesen werden. Außer im *M. extensor digitorum*

longus zeigte sich überall eine leichte Induktion durch Training, unabhängig von der Verabreichung von PDTC (vgl. Abb. 42).

Unc5b

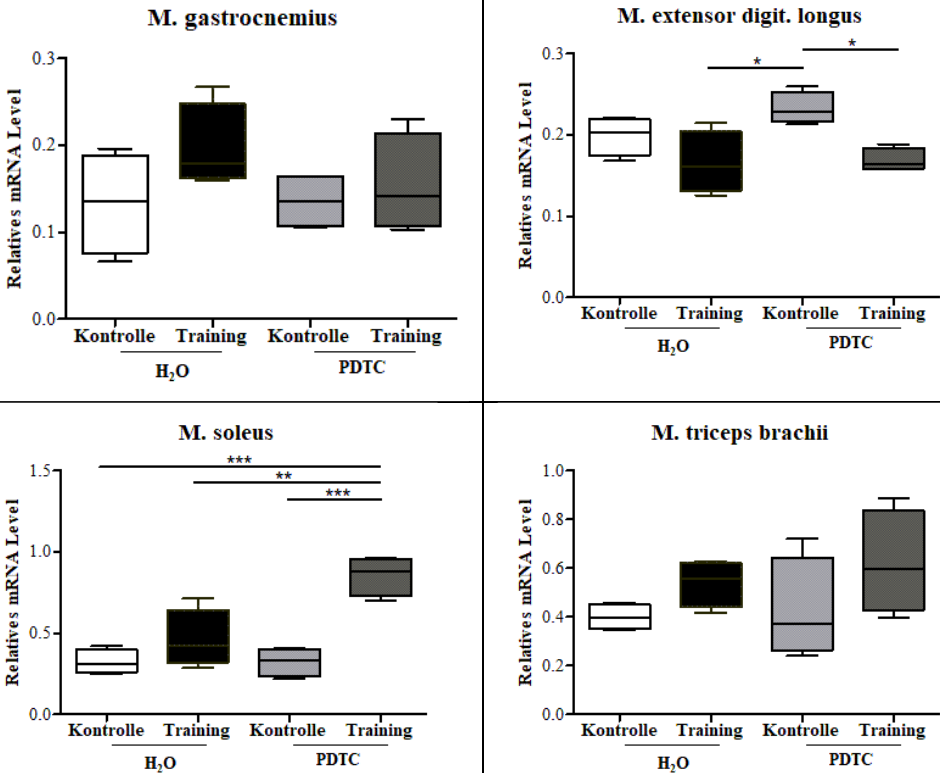
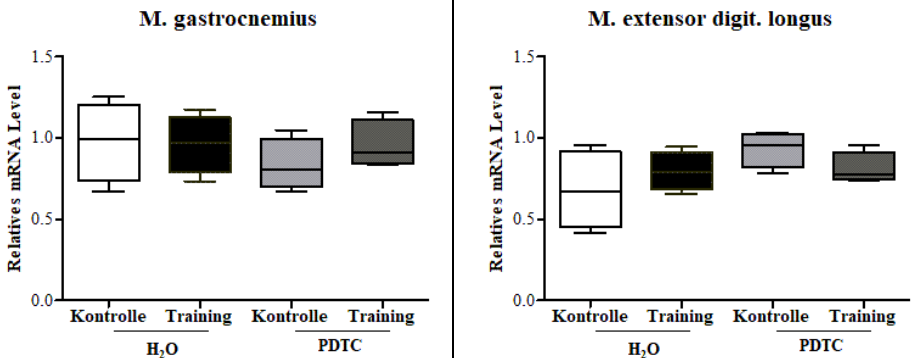


Abb. 43: Relative Konzentration des *Unc5b*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 106,59. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen trainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und Mäusen ohne Training unter PDTC sowie zwischen Letzteren und trainierten Mäusen mit PDTC im EDL. ** $p < 0,01$ zwischen den trainierten Gruppen mit und ohne PDTC-Behandlung im SOL. *** $p < 0,001$ zwischen

untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und Mäusen mit sowohl Training als auch PDTC-Behandlung sowie zwischen Letzteren und untrainierten Mäusen mit PDTC im SOL.

Unc45b unterstützt den Muskelaufbau durch seine Funktion als Chaperon, das direkt mit Myosin interagiert, sowie als Co-Chaperon für Hsp90 (Hoppe *et al.*, 2004). Ein Defizit an Unc45b und auch eine Überexpression des entsprechenden Gens führen zur fehlerhaften Bildung von Myosin und somit zu einem gestörten Sarkomeraufbau (Spellmon *et al.*, 2015). Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit zeigten in allen Muskeln außer dem M. extensor digitorum longus eine Induktion des *Unc45b*-Gens durch Training, besonders ausgeprägt unter Einfluss des NFκB-Inhibitors PDTC als zusätzlichem Faktor. Eine alleinige PDTC-Gabe hatte dagegen keinen Effekt. Im M. extensor digitorum longus, einem Muskel der Hintergliedmaßen, waren die Veränderungen paradox zu den anderen untersuchten Muskeln (vgl. Abb. 43).

Smyd1



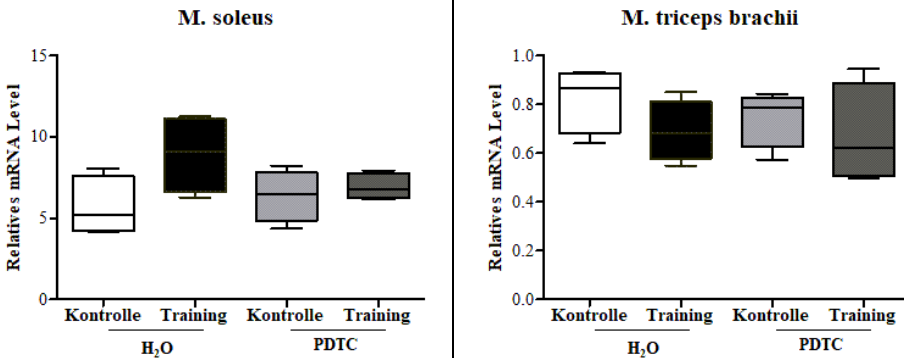


Abb. 44: Relative Konzentration des *Smyd1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 99,98. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.

Das Protein Smyd1 ist der Bindungspartner von skNac. Smyd1 ist, wie auch Myomesin, im Bereich der M-Linie der Muskelfasern lokalisiert. In Studien herrscht Uneinigkeit darüber, ob es vermehrt in langsam oder schnell kontrahierenden Muskelfasern exprimiert wird (Spellmon *et al.*, 2015, Tan *et al.*, 2006).

Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit zeigten allenfalls im langsamen M. soleus, nach Training und ohne PDTC, eine leicht erhöhte Expression von *Smyd1*. Diese war den beobachteten Veränderungen der *skNac*-Expression entgegengerichtet (vgl. Abb. 44).

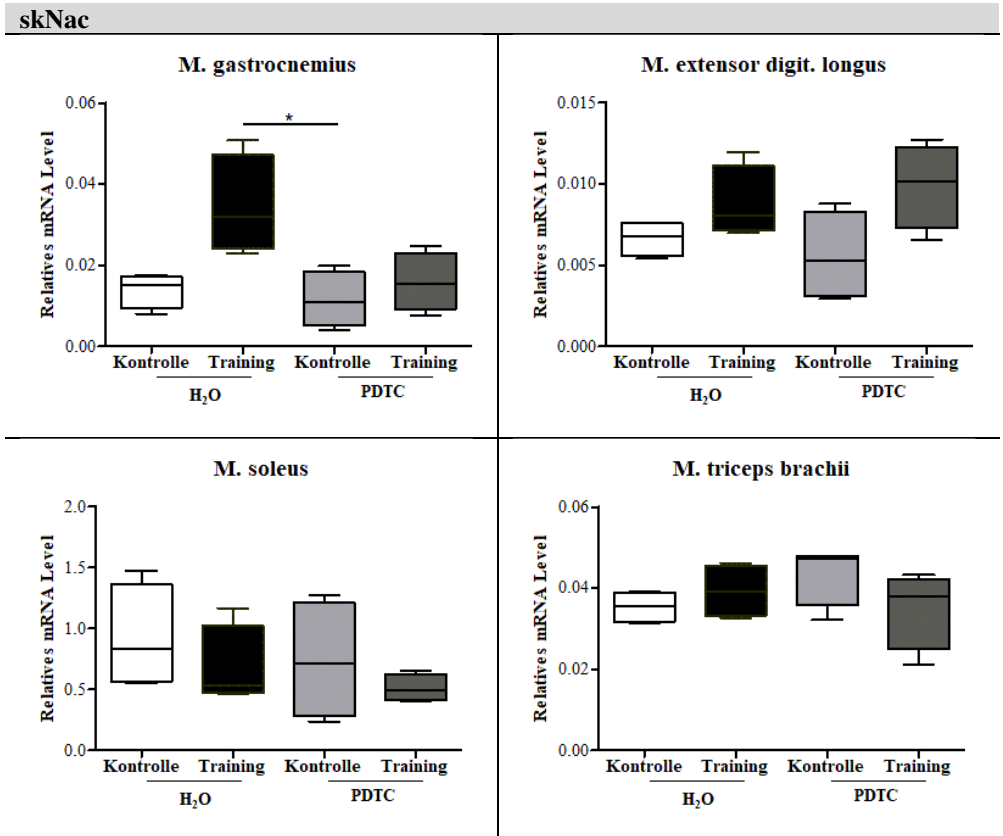


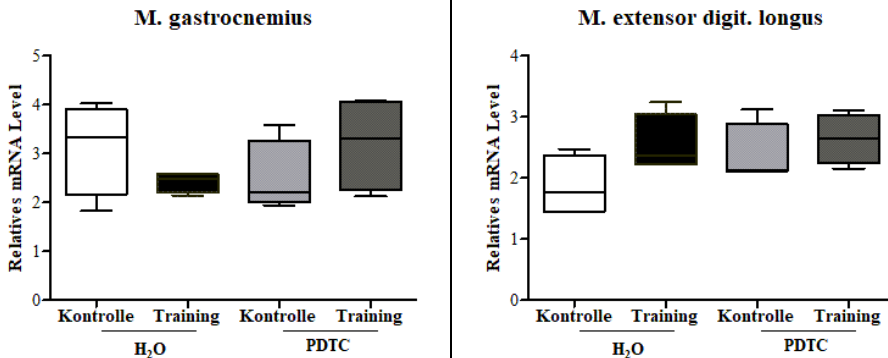
Abb. 45: Relative Konzentration des *skNac*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 91,08. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen trainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und Mäusen mit PDTC, ohne Training im GA.

skNac wird auch als molekulares Chaperon bezeichnet und tritt nur in quergestreiften Muskeln auf. Es verhindert die Interaktion neugebildeter Polypeptide mit anderen Proteinen und schützt sie vor Proteolyse (Wiedmann

et al., 1994). Mehrere Versuche konnten die Bedeutung von *skNac* für eine korrekte Sarkomerogenese aufzeigen (Park *et al.*, 2010).

In dem in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsmodell war in den vorwiegend schnell kontrahierenden Muskeltypen eine Induktion von *skNac* durch den Trainingsreiz zu sehen, die sich am deutlichsten im M. gastrocnemius und im M. extensor digitorum longus darstellte. PDTC schien diesen Effekt eher abzuschwächen. Im M. soleus, der einen hohen Anteil an langsam kontrahierenden Muskelfasern aufweist, gab es durch das Laufbandtraining sogar eine leichte Tendenz in negative Richtung (vgl. Abb. 45).

Myomesin1



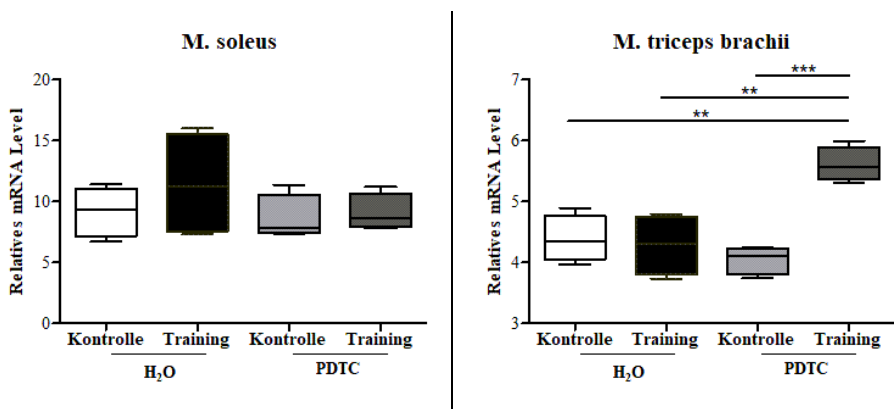


Abb. 46: Relative Konzentration des *Myomesin1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 119,68. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. ** $p < 0,01$ zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und Mäusen mit sowohl absolviertem Training als auch PDTC-Behandlung sowie zwischen Letzteren und trainierten Mäusen ohne PDTC im TRIC. *** $p < 0,001$ zwischen Mäusen mit PDTC-Behandlung bei absolviertem Training und ohne dieses im TRIC.

Myomesin1 ist ein Protein, das ubiquitär in gestreifter Muskulatur zu finden ist. Es dient der Stabilisierung der Muskelfaser und es konnten Chaperon-ähnliche Eigenschaften hinsichtlich der Kontrolle des korrekten Aufbaus und des Einbaus von Myofibrillen nachgewiesen werden (Obermann *et al.*, 1996). Myomesin1 ist ebenfalls als sensibler Marker für Muskelschädigungen detektiert worden (Prill *et al.*, 2019).

In den Muskeln der Hintergliedmaßen konnte in den Experimenten dieser Arbeit keine Beeinflussung der Expression des Gens auf mRNA-Ebene festgestellt werden. Lediglich im *M. triceps brachii*, einem Vordergliedmaßenmuskel, wurde durch das Zusammenspiel Training und PDTC eine Zunahme von Myomesin1 detektiert (vgl. Abb. 46).

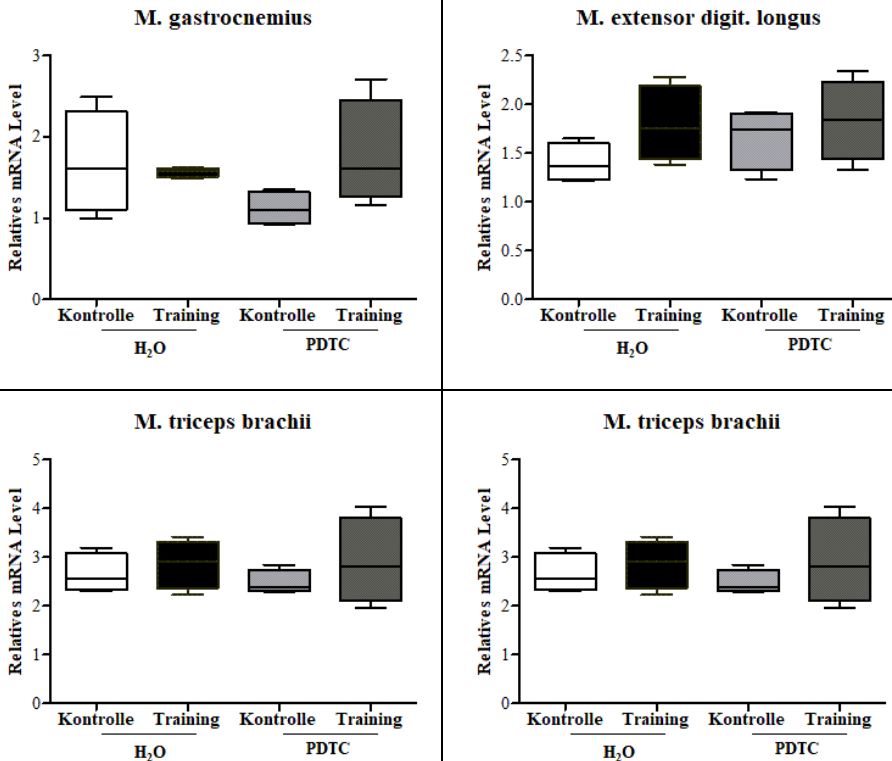
Myomesin2

Abb. 47: Relative Konzentration des *Myomesin2*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 101,69. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.

Das Muskelprotein Myomesin2 ist in Aufbau und Eigenschaften dem verwandten Myomesin1 sehr ähnlich. Myomesin2 wird v. a. in der M-Linie schneller Muskelfasertypen gefunden, den Mhc IIB-Fasern (Schoenauer *et al.*, 2008). Diese sind die hauptsächlich vorherrschenden Muskelfasern im M. gastrocnemius, im M. extensor digitorum longus und im M. triceps brachii, aber im M. soleus als nicht, oder nur geringgradig exprimiert, beschrieben.

In den qPCR Analysen ließ sich eine geringfügige Steigerung der *Myomesin2*-Expression durch den Trainingsreiz beobachten, diese erreichte allerdings keine Signifikanz (vgl. Abb. 47).

Myomesin3

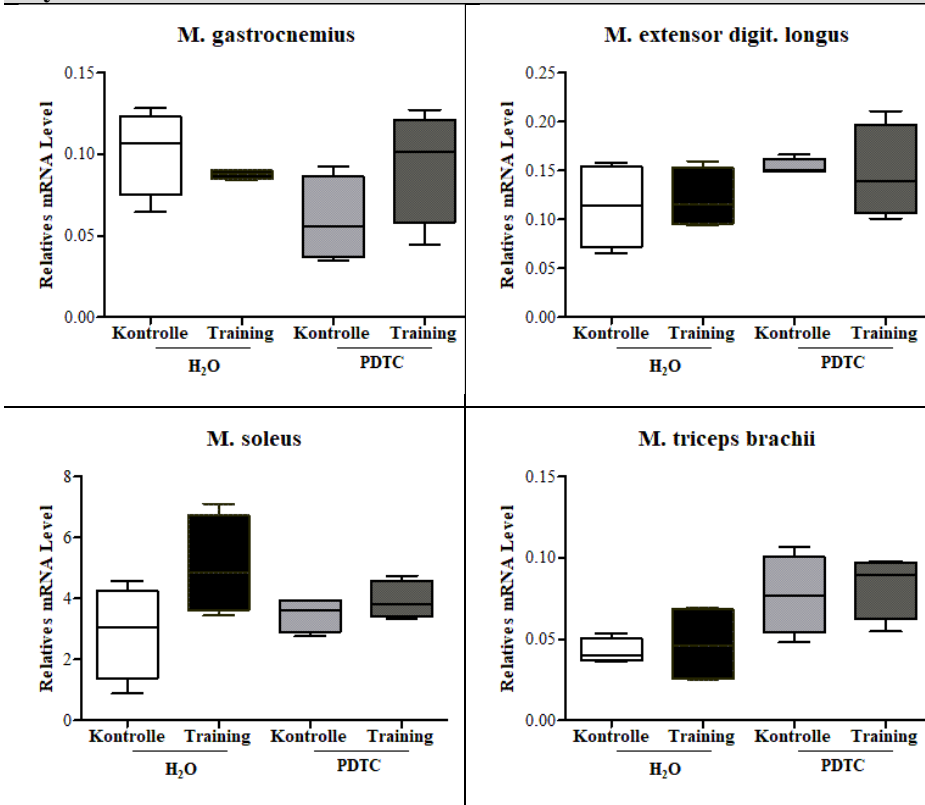
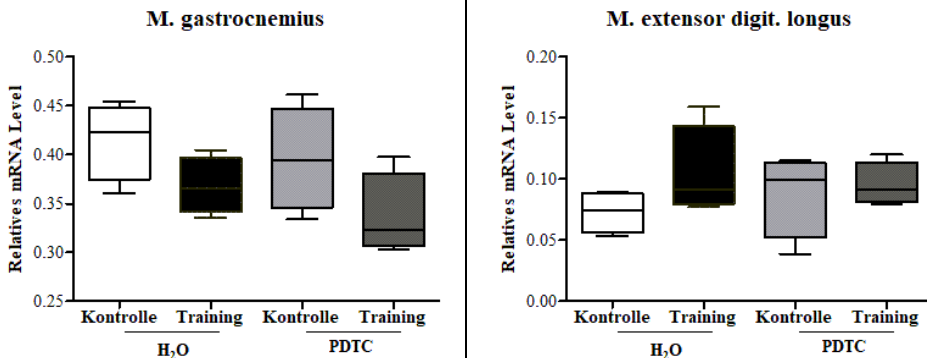


Abb. 48: Relative Konzentration des *Myomesin3*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 108,46. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.

Eine Induktion von *Myomesin3* konnte bei Zellschädigung durch übermäßiges Muskeltraining nachgewiesen werden (Rouillon *et al.*, 2015). *Myomesin3* ist, wie seine Familienmitglieder, in quergestreifter Muskulatur zu finden, im Gegensatz zu diesen aber v. a. in mittelschnell kontrahierenden Fasern, wie den Mhc IIA- und Mhc IIX-Typen (Schoenauer *et al.*, 2008). Diese sind im M. gastrocnemius und M. extensor digitorum longus nur in sehr geringer Zahl zu finden. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich keine einheitlichen Veränderungen bezüglich der *Myomesin3*-Expression in den verschiedenen Muskeln (vgl. Abb. 48).

Akt1



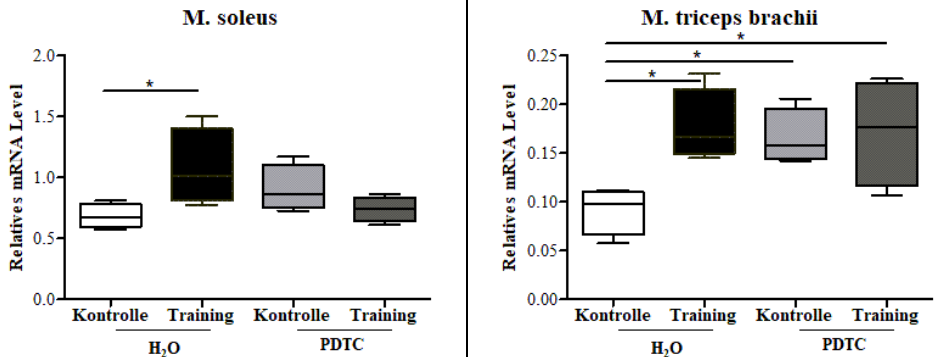


Abb. 49: Relative Konzentration des *Akt1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 125,29. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ im SOL zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser bei absolviertem Training und ohne dieses. Im TRIC zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser bei absolviertem Training und ohne dieses sowie zwischen Ersteren und untrainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung und auch zwischen Ersteren und trainierten Mäusen mit PDTC.

Verschiedene Studien konnten eine Beteiligung des PI3K-Akt-Signalwegs bei Zellproliferation und Muskelaufbau nachweisen. Akt1 ist eine ubiquitär vorkommende Serin-Threonin-Kinase, die über die Hemmung von Foxo und somit der Ligasen Atrogin1 und Murf1 den Muskelabbau behindert und gleichzeitig über die Aktivierung der Kinase mTor den Muskelaufbau fördert (Sandri *et al.*, 2006).

Versuche im Rahmen dieser Arbeit konnten sowohl im *M. soleus* als auch im *M. triceps brachii* einen signifikanten Anstieg der *Akt1*-Expression durch Training zeigen. Auch die Verabreichung von PDTC schien eine Induktion zu bewirken, wobei sich die Effekte Training und PDTC nicht gegenseitig verstärkten. Im *M. extensor digitorum longus* zeigten sich ähnliche Tendenzen, im *M. gastrocnemius* eher gegenteilige Ergebnisse (vgl. Abb. 49).

4.7.4 Expression der Marker für muskelabbauende Prozesse

Ein Muskelaufbau erfordert auch parallel ablaufende Abbauprozesse in der Muskulatur. Fehlerhaft synthetisierte, aber auch nicht mehr benötigte Proteine werden dabei in ihre Grundbausteine zerlegt.

Stub1

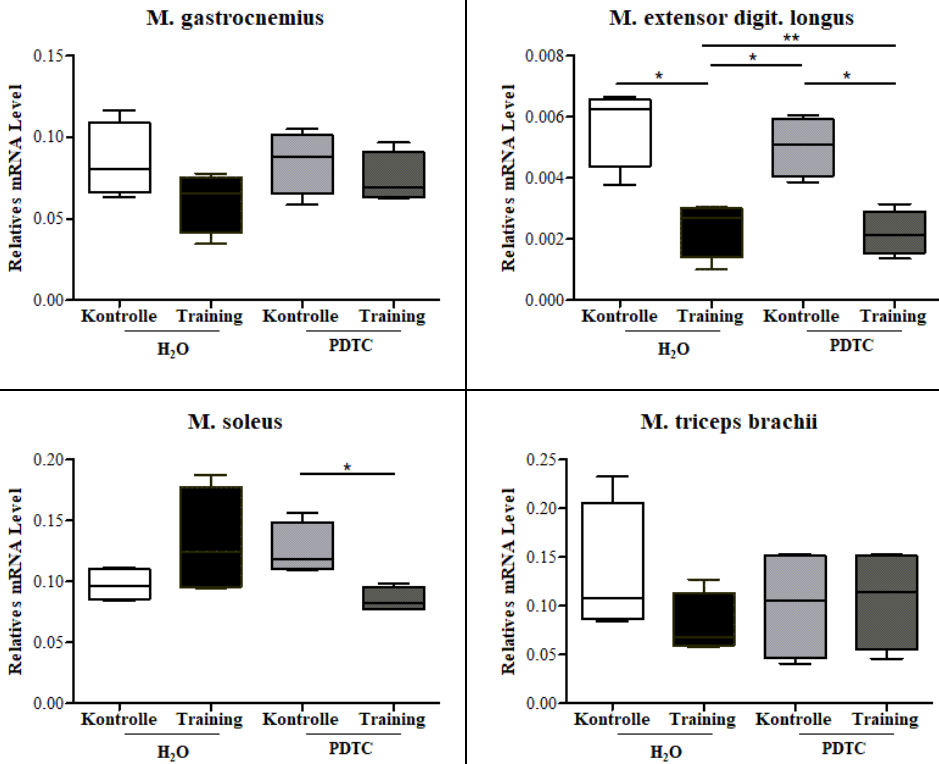


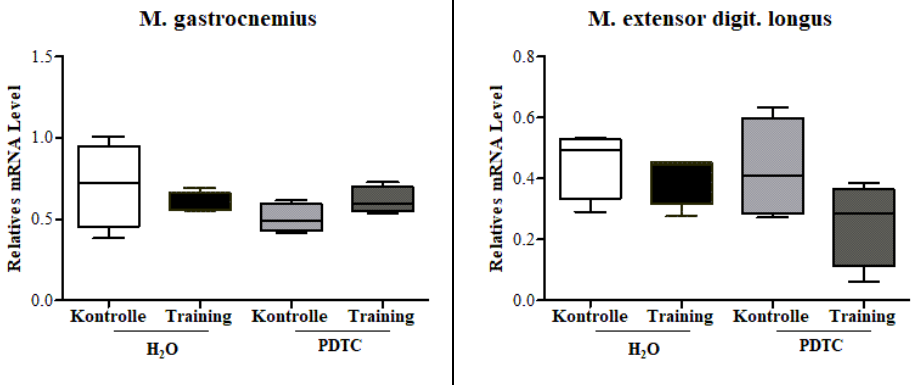
Abb. 50: Relative Konzentration des *Stub1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 124,17. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ im EDL zwischen Mäusen ohne Trinkwasserbehandlung mit und ohne Training sowie zwischen trainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und Untrainierten mit PDTC sowie zwischen Letzteren und trainierten, PDTC-behandelten Mäusen. im SOL zwischen den Gruppen von Mäusen mit PDTC-

Behandlung mit und ohne Training. ** $p < 0,01$ im EDL zwischen trainierten Mäusen mit und ohne Trinkwasserbehandlung mit PDTC.

Die E3-RING-finger-Ubiquitinligase Stub1 hat Bedeutung sowohl als Teil des Ubiquitinsystems als auch als Co-Chaperon für andere Proteine. Als Bindungspartner von Stub1 konnten mehr als 30 Proteine identifiziert werden. Stub1 zeigt eine Beteiligung bei Vorgängen der Zelldifferenzierung, der Apoptose, im Glukokortikoidstoffwechsel sowie in p53- und cAMP Signalwegen (McLaughlin *et al.*, 2012).

In allen drei untersuchten Muskeln mit vorwiegend schnell kontrahierenden Mhc-Isoformen konnte eine verminderte Konzentration von Stub1 durch Training nachgewiesen werden, die im M. extensor digitorum longus signifikantes Niveau erreichte. Auch unter PDTC-Einfluss waren ähnliche Veränderungen zu beobachten. Im langsamen M. soleus war kein Effekt von Training alleine, aber im Zusammenwirken mit PDTC zu verzeichnen (vgl. Abb. 50).

Nedd4



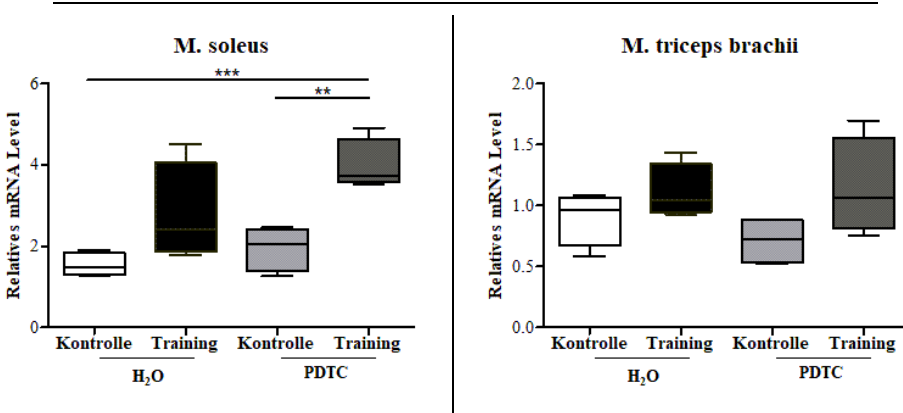


Abb. 51: Relative Konzentration des *Nedd4*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 99,21. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. ** p < 0,01 bei PDTC-behandelten Mäusen mit und ohne Training im SOL. *** p < 0,001 zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen mit PDTC im SOL.

Die Ubiquitinligase Nedd4 ist wichtig für die Entwicklung einer korrekten Nervenausbildung im Bioorganismus und wirkt v. a. über die Hemmung von Wachstumsfaktoren auf die körperliche Entwicklung ein (Yang&Kumar, 2010).

Im *M. soleus* zeigte sich eine Induktion von *Nedd4* durch Training und Training und PDTC gemeinsam. Die Gabe von PDTC alleine hatte keinen Effekt auf die *Nedd4*-Expression. In geringerem Maß konnten ähnliche Tendenzen im *M. triceps brachii* beobachtet werden, erreichten hier aber keine signifikante Ausprägung (vgl. Abb. 51).

Ufd2

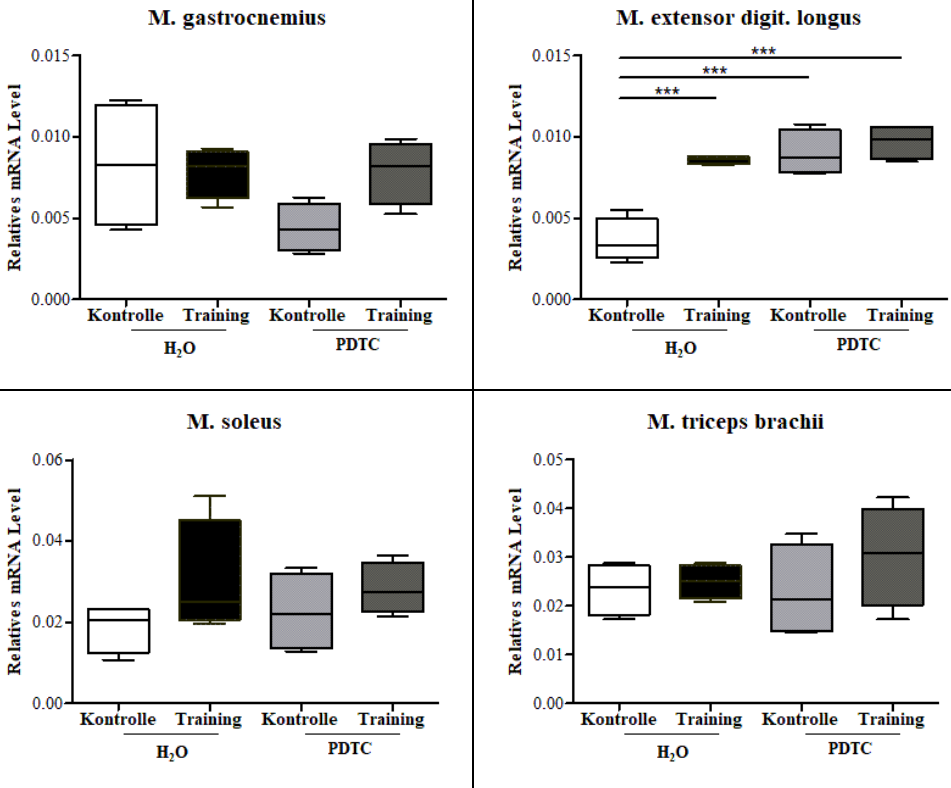
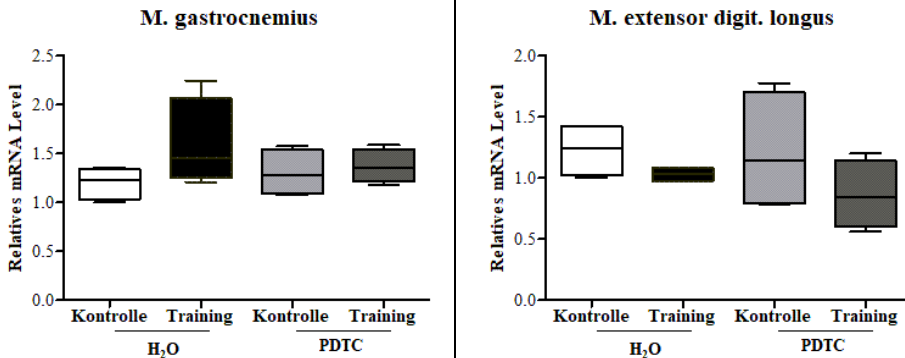


Abb. 52: Relative Konzentration des *Ufd2*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 105,35. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. *** $p < 0,001$ zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen ohne PDTC sowie zwischen Ersteren und untrainierten Mäusen mit PDTC und zwischen Ersteren und trainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung im EDL.

Ufd2 ist eine RING-finger E3-Ligase, die im Zusammenspiel mit Stub1 sogar Poly-Ubiquitinierungen vermitteln kann. Eigenständig besitzt Ufd2 keine Fähigkeit zur Ubiquitinierung, lediglich zur Verlängerung von Ub-Molekül-

Ketten, die von anderen Mitgliedern des UPS initiiert wurden. Eine Ausnahme bildet das Chaperon Unc45b: hier kann Ufd2 auch selbst die Ubiquitinierung und somit den Abbau einleiten (Hellerschmied *et al.*, 2018). In den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit konnten vor allem im M. extensor digitorum longus Effekte beobachtet werden. Durch Training wurde die Konzentration an Ufd2 signifikant erhöht. In diesem Muskel führte auch die Gabe von PDTC und die Kombination von PDTC und Training zu einer Zunahme an Ufd2. In den anderen untersuchten Muskeln schien PDTC alleine einen deutlich geringeren oder gar keinen Effekt zu haben (vgl. Abb. 52).

Atrogin1



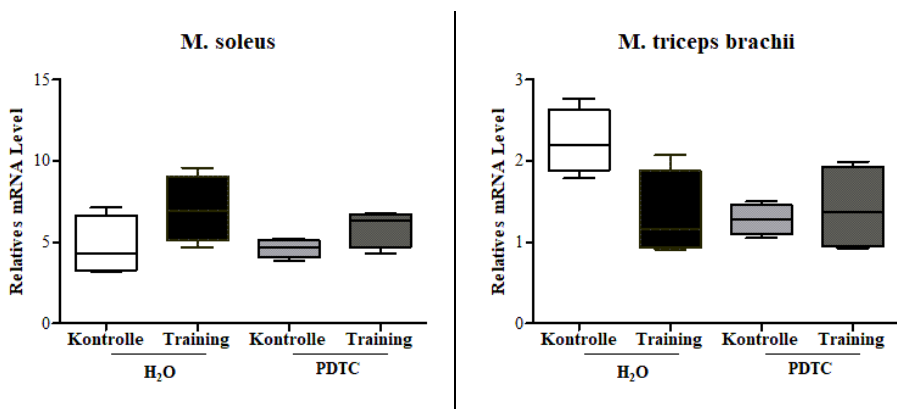


Abb. 53: Relative Konzentration des *Atrogin1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 101,89. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.

Atrogin1 gehört zum Ubiquitin-Proteasom-System und ist ein Marker für Proteinabbau im Gewebe (Milan *et al.*, 2015).

Es konnte kein Einfluss des NFκB-Inhibitors PDTC auf die Expression im Muskelgewebe festgestellt werden. Training alleine schien eine geringgradige Induktion von *Atrogin1* in den Hintergliedmaßenmuskeln *M. gastrocnemius* und *M. soleus* und den gegenteiligen Effekt im *M. triceps brachii* der Vordergliedmaße der Versuchsmäuse zu bewirken. Diese Veränderungen erreichten allerdings kein signifikantes Niveau (vgl. Abb. 53).

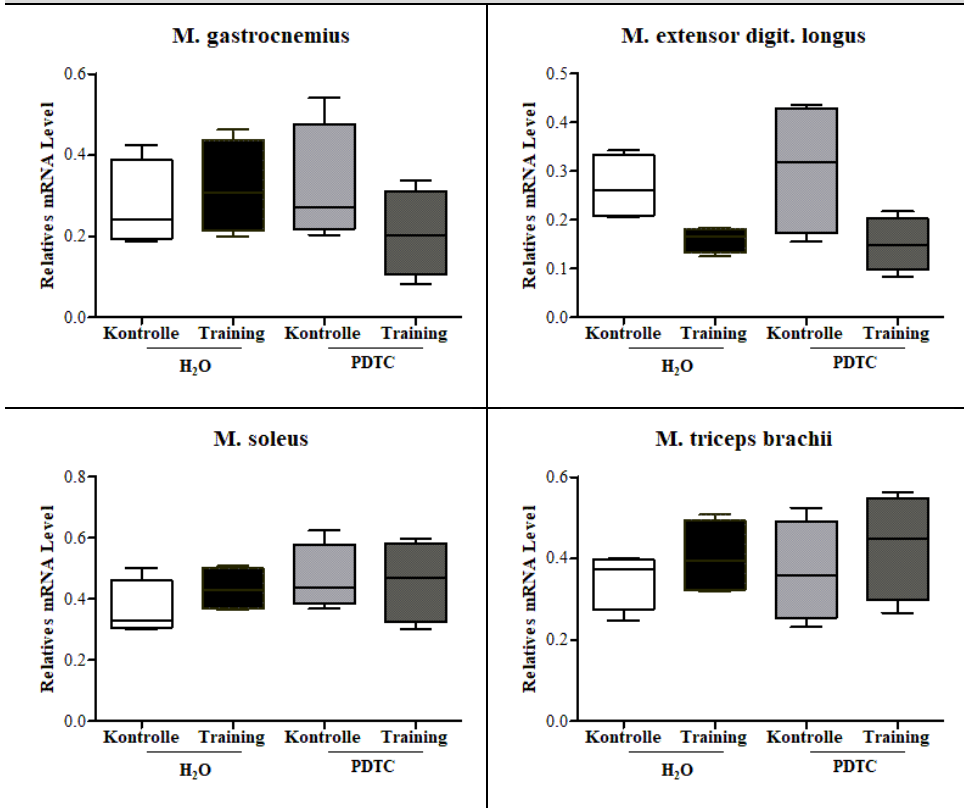
Murf1

Abb. 54: Relative Konzentration des *Murf1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 108,73. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.

Wie auch Atrogin1 gehört *Murf1* zu den muskelspezifischen E3-Ligasen und ist ein Marker für Muskelabbauprozesse (Milan *et al.*, 2015).

In dem in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsmodell konnte kein signifikanter Einfluss von Training und/oder der Inhibition von NFκB auf *Murf1* nachgewiesen werden. Im *M. extensor digitorum longus* waren

allerdings klare Tendenzen hin zu einer reduzierten Expression durch Training zu beobachten (vgl. Abb. 54).

Foxo1

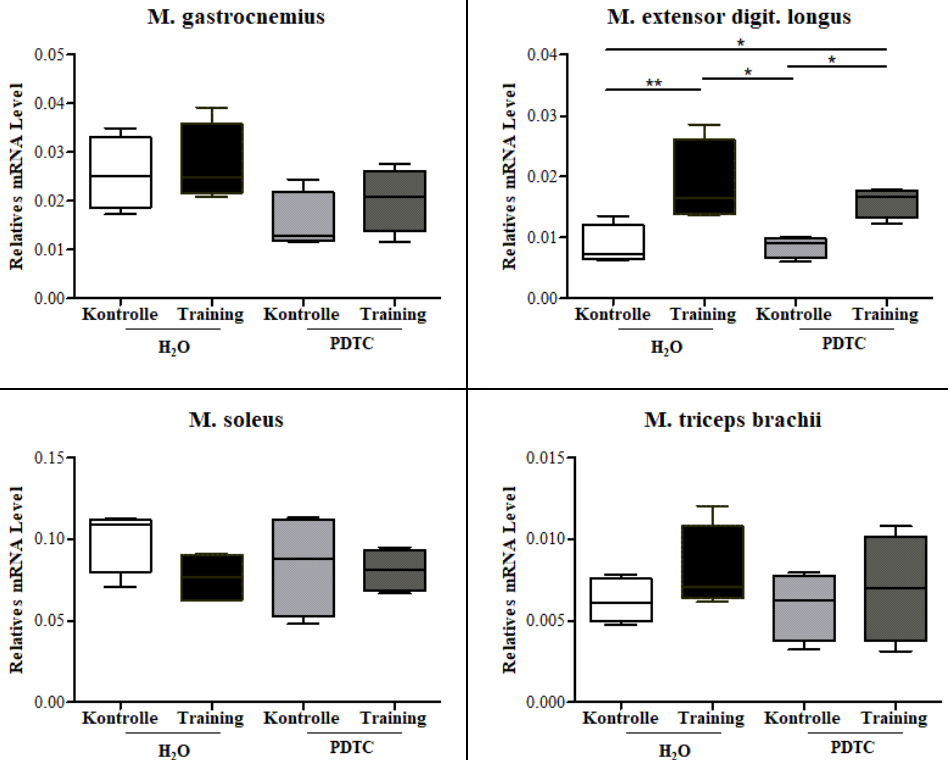
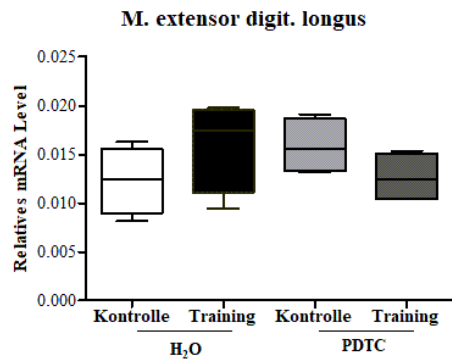
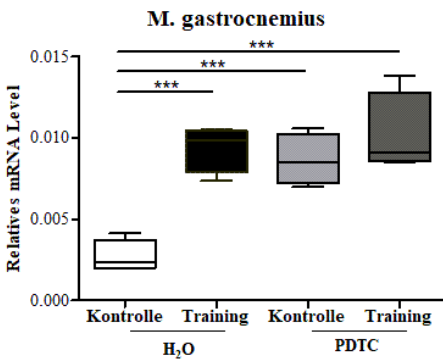


Abb. 55: Relative Konzentration des *Foxo1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 108,55. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * p < 0,05 zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung sowie zwischen Letzteren und Untrainierten mit PDTC und zwischen diesen und trainierten Mäusen ohne PDTC-Behandlung im EDL. ** p < 0,01 zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser mit und ohne Training im EDL.

Foxo1 ist ein Transkriptionsfaktor, der hauptverantwortlich für die Bildung der E3-Ligase Atrogin1 und Murf1 ist (Milan *et al.*, 2015, Sanchez *et al.*, 2019). Somit ist Foxo1 ebenfalls an Abbauprozessen im Muskel beteiligt.

Eine klare Induktion konnte nur im M. extensor digitorum longus durch Training beobachtet werden, sowohl unter PDTC-Einfluss, als auch ohne. Der M. gastrocnemius und der M. tricipes brachii zeigten ebenfalls eine tendenzielle Zunahme an Foxo1 durch Training, die aber keine Signifikanz erreichte. Im M. soleus kam es zu einer geringgradigen Reduktion des Signals (vgl. Abb. 55).

Rip2



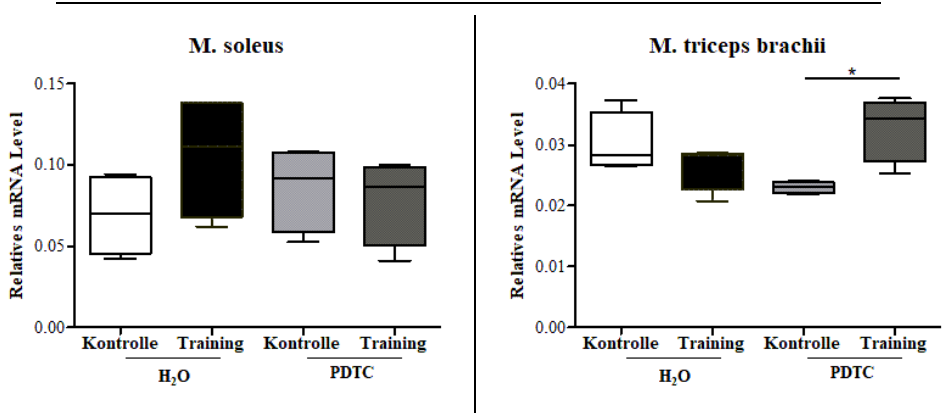


Abb. 56: Relative Konzentration des *Rip2*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 102,1. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen Mäusen mit PDTC-Behandlung mit und ohne Training im TRIC. *** $p < 0,001$ zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser mit und ohne Training sowie untrainierten Mäusen ohne PDTC und Untrainierten mit PDTC-Behandlung und zwischen Ersteren und trainierten PDTC-behandelten Mäusen im GA.

Das Rezeptor-interagierende Protein 2 (Rip2) interagiert direkt und indirekt mit NF κ B und konnte als beteiligt bei vielen katabolen Prozessen identifiziert werden (Hsu *et al.*, 1996).

In den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit konnte v. a. im M. gastrocnemius eine klare Induktion von *Rip2* durch Training und auch durch PDTC beobachtet werden. Training führte auch im M. extensor digitorum longus und im M. soleus zu einer leichten Induktion. Im M. triceps brachii erreichte diese aber nur unter Einfluss von PDTC Signifikanz (vgl. Abb. 56).

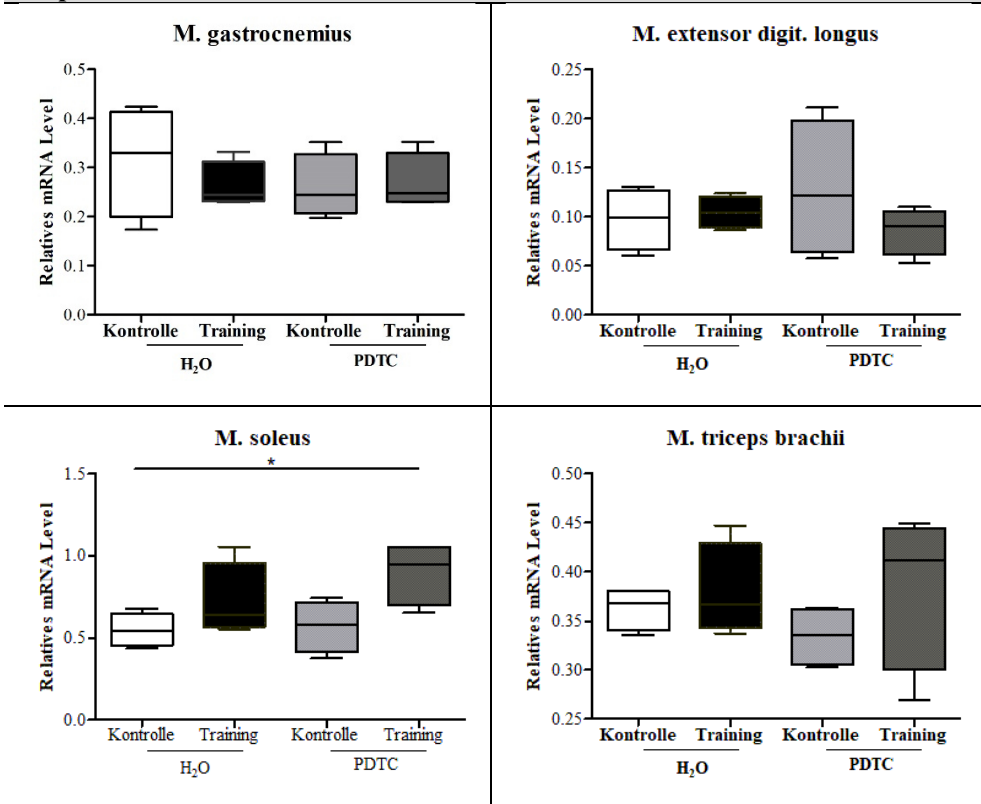
Calpain1

Abb. 57: Relative Konzentration des *Calpain1*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 115,31. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * p < 0,05 zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung im SOL.

Calpain1 beschreibt eine kalziumabhängige Protease, die ubiquitär im Gewebe vorkommt und u. a. Vorgänge der Zelldifferenzierung und der Apoptose beeinflusst (Suzuki *et al.*, 2004). Lediglich im M. soleus konnte nach Training, sowohl mit als auch ohne PDTC, eine leichte Induktion von

Calpain1 detektiert werden. PDTC schien hierbei keine solitäre Auswirkung auf die Konzentration zu haben (vgl. Abb. 57).

Calpain3

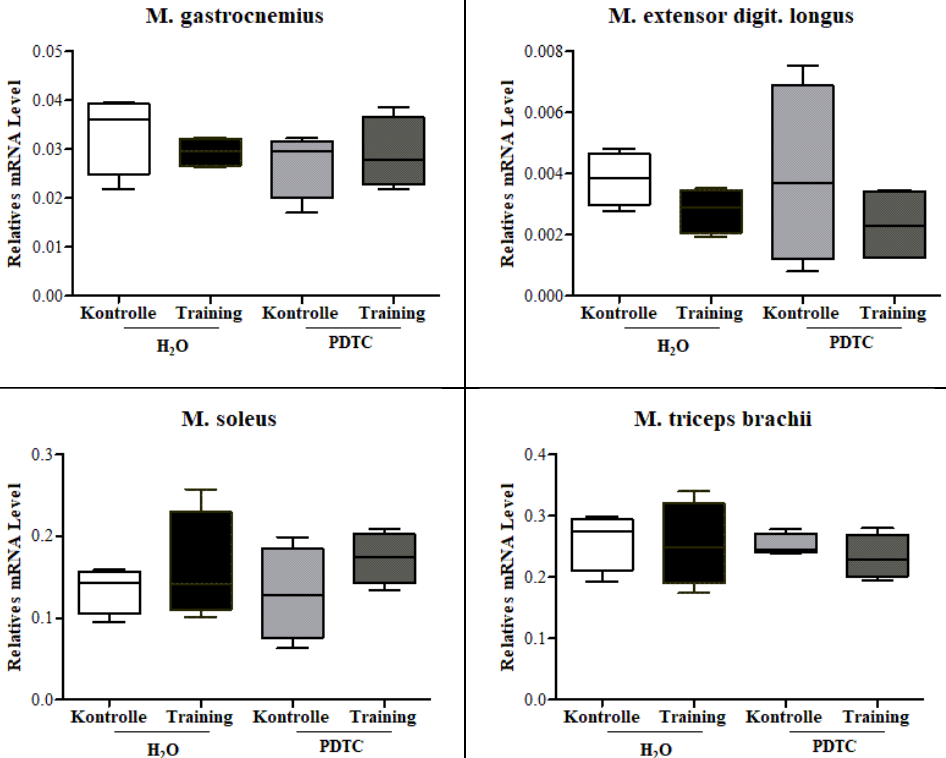
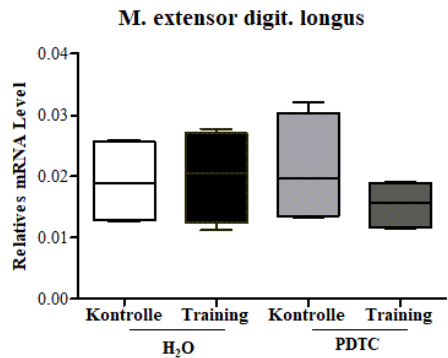
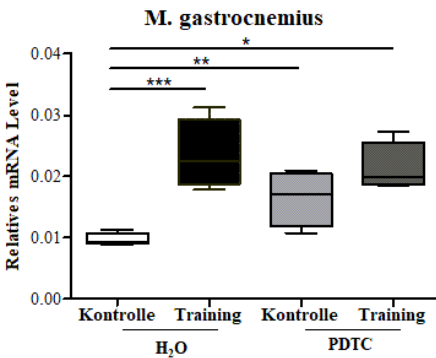


Abb. 58: Relative Konzentration des *Calpain3*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, n=4, Primereffizienz: 118,84. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.

Eine weitere Calpainisoform ist Calpain3, welches im Muskelgewebe in hoher Konzentration vorkommt, jedoch nur eine sehr geringe Halbwertszeit besitzt (McCartney *et al.*, 2018).

Auch für Calpain3 konnten lediglich im M. soleus klare Tendenzen nachgewiesen werden, die in ihrer Richtung mit denen der Isoform Calpain1 übereinstimmten. In den anderen untersuchten Muskeln schien Training eher zu einer leichten Reduktion der mRNA-Konzentration von Calpain3 zu führen. PDTC hatte dabei keine Auswirkung auf diese Veränderungen (vgl. Abb. 58).

Calpastatin



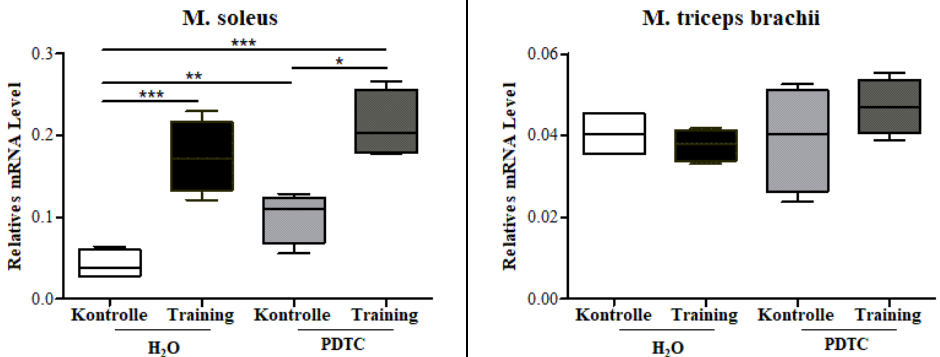


Abb. 59: Relative Konzentration des *Calpastatin*-Gens auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Muskeln der vier Versuchsgruppen im Vergleich. Normalisierte Expressionswerte, $n=4$, Primereffizienz: 111,71. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung im GA sowie zwischen den Mäusen mit PDTC im Trinkwasser mit und ohne Training im SOL. ** $p < 0,01$ zwischen untrainierten Mäusen mit und ohne PDTC-Behandlung im GA sowie zwischen selbigen Gruppen im SOL. *** $p < 0,001$ zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser mit und ohne Training im GA sowie zwischen selbigen Gruppen im SOL und zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung im SOL.

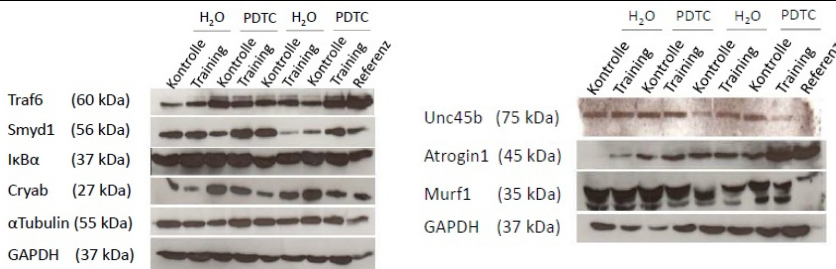
Calpastatin ist ein Protein, das Calpain1 hemmt und somit dem Muskelabbau entgegenwirkt (Hanna *et al.*, 2007, Ono *et al.*, 2004).

Hier konnte sowohl im *M. gastrocnemius* als auch im *M. soleus* eine klare Induktion durch Training erkannt werden. Auch für die Mäuse mit PDTC im Trinkwasser ist in diesen Muskeln eine Zunahme an Calpastatin zu beobachten, die durch zusätzliches Training noch verstärkt wurde. Im *M. extensor digitorum longus* und im *M. triceps brachii* konnten keine Effekte nachgewiesen werden (vgl. Abb. 59).

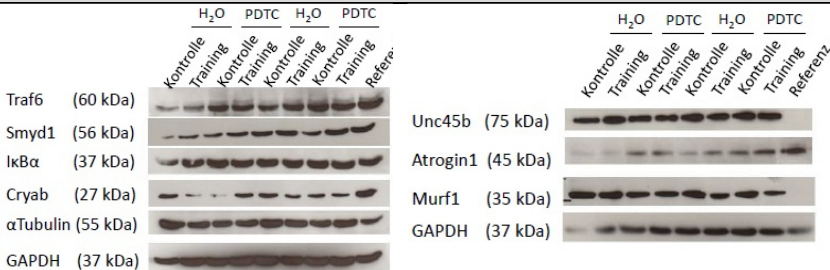
4.8 Auswirkungen von Training und PDTC auf unterschiedliche Muskeln auf Proteinebene

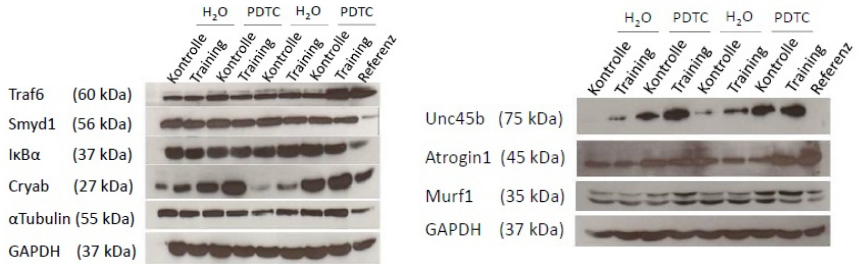
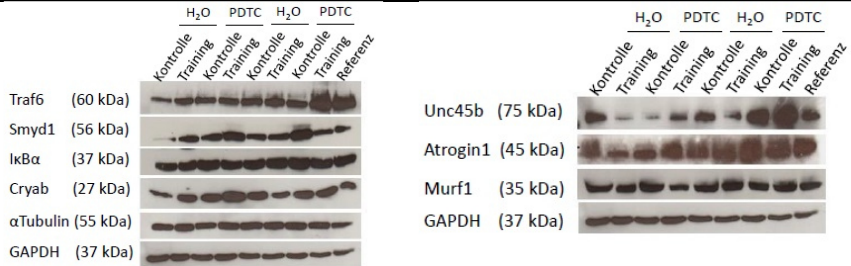
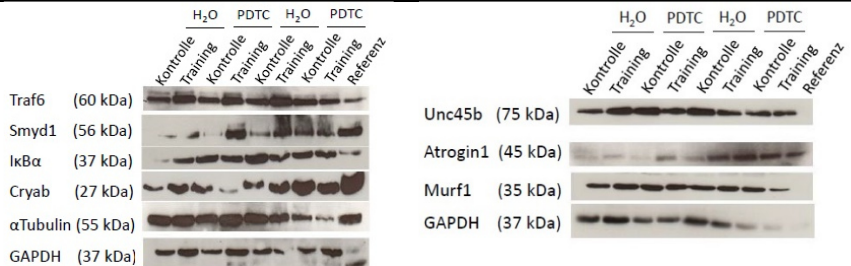
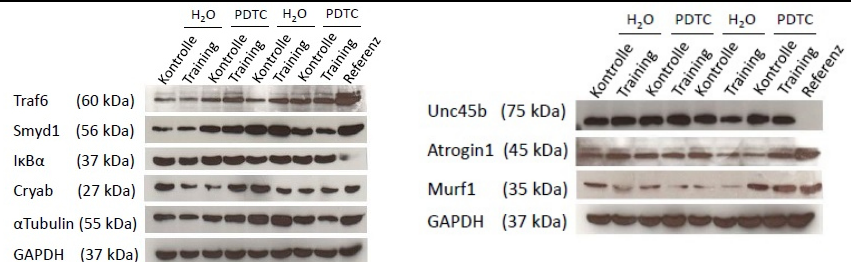
Nach der Präparation der Versuchsmäuse wurde aus einem Teil des Muskelgewebes Protein isoliert und durch die Methoden der SDS-PAGE und des *Western Blots* aufgetrennt und dargestellt. Durch die Zugabe definierter Antikörper konnten die untersuchten Proteine zwischen den Versuchsgruppen in Relation zueinander gesetzt werden, um eine Änderung im Konzentrationsniveau beurteilen zu können (vgl. Abb. 60).

M. gastrocnemius



M. tibialis cranialis



M. rectus femoris**M. extensor digitorum longus****M. soleus****M. triceps brachii**

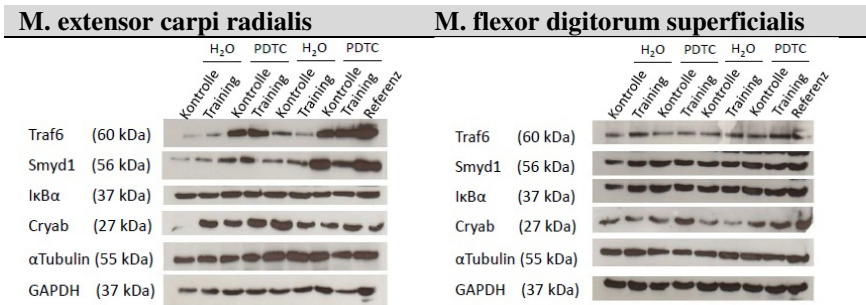
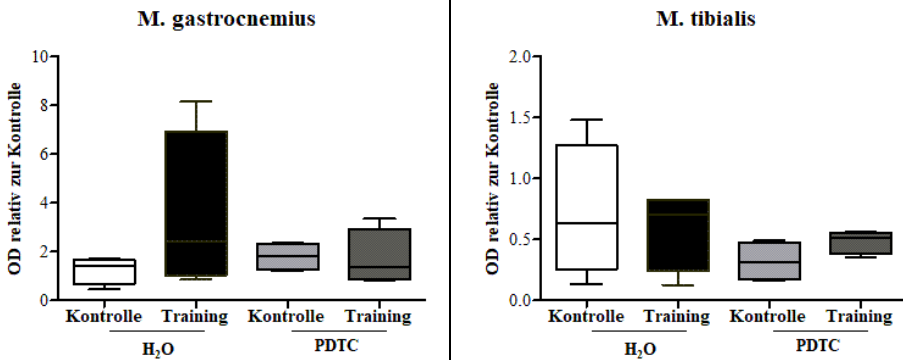


Abb. 60: Übersicht der erhaltenen Western Blot-Filme.

4.8.1 Einfluss auf Marker für muskelaufbauende Prozesse

Im Rahmen der Anpassung an Ausdauertraining kommt es zu verschiedenen Adaptationsprozessen im Muskel, was sich u. a. in der vermehrten Synthese bestimmter Proteine niederschlägt.

Cryab



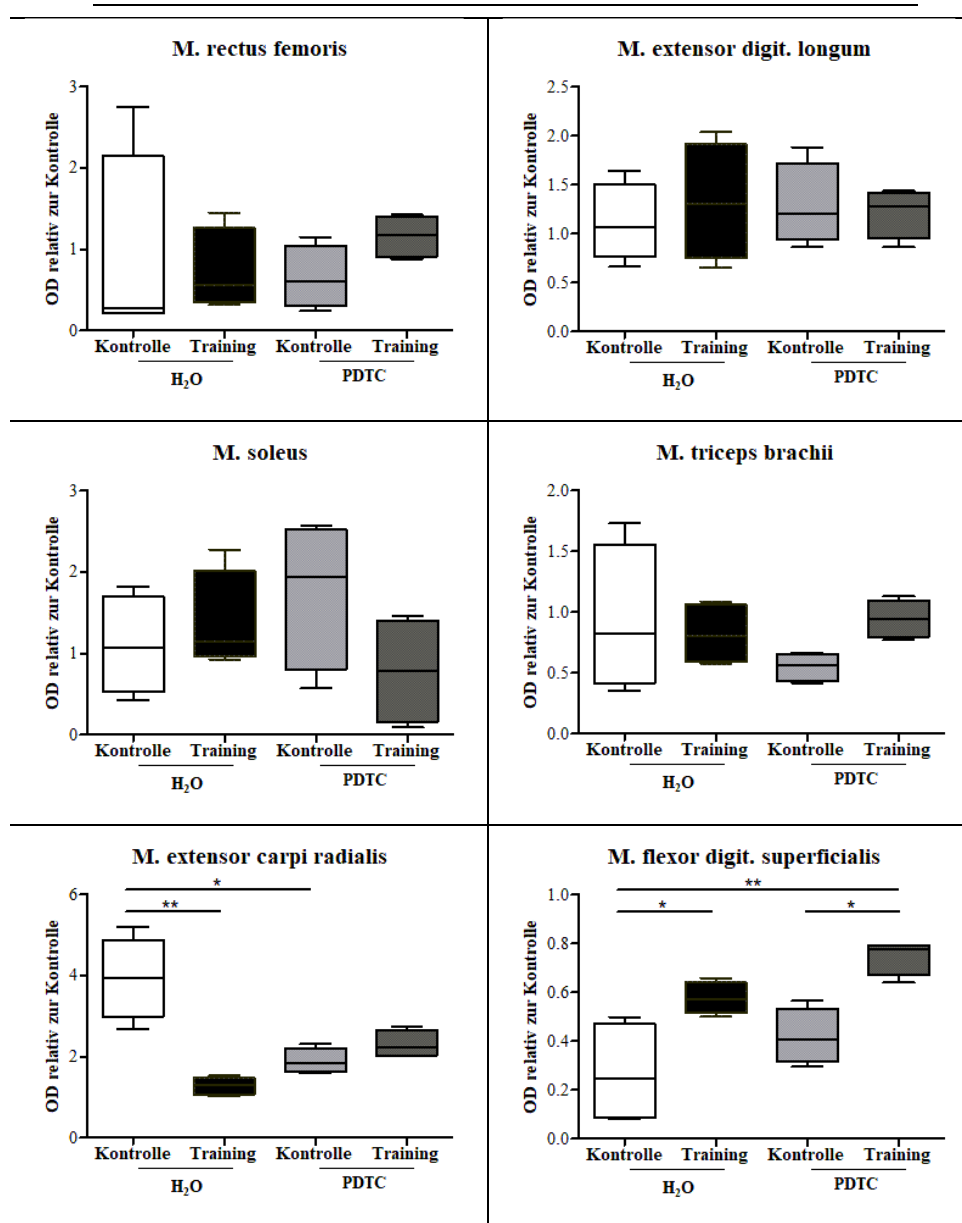
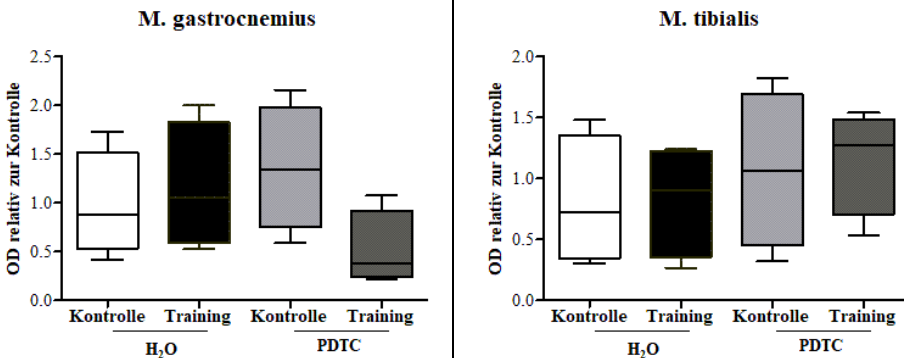


Abb. 61: Relative Konzentration des *Cryab*-Gens auf Protein-Ebene in *Western Blot*-Analysen der verschiedenen Muskeln, Normalisierte Expressionswerte, $n=4$. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen untrainierten Mäusen mit und ohne PDTC im Trinkwasser im ECR sowie zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser mit und ohne Training im FDS und zwischen Mäusen mit PDTC-Behandlung mit und ohne Training im FDS. ** $p < 0,01$ zwischen Mäusen ohne Trinkwasserbehandlung mit und ohne Training im ECR sowie zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung im FDS.

α B-Crystallin ist ein Chaperon und kleines Hitzeschockprotein, das bei der Bildung des Aktinfilaments mitwirkt (Smith *et al.*, 2014).

In dem in dieser Arbeit durchgeführten Experiment zeigte sich in den meisten Muskeln keine Veränderungen der *Cryab*-Proteinkonzentration. Im M. extensor carpi radialis war eine deutliche Verminderung durch Training und auch PDTC zu beobachten; Der M. flexor digitorum superficialis wiederum zeigte einen Anstieg an *Cryab* nach Training im Muskelgewebe (vgl. Abb. 61).

Unc45b



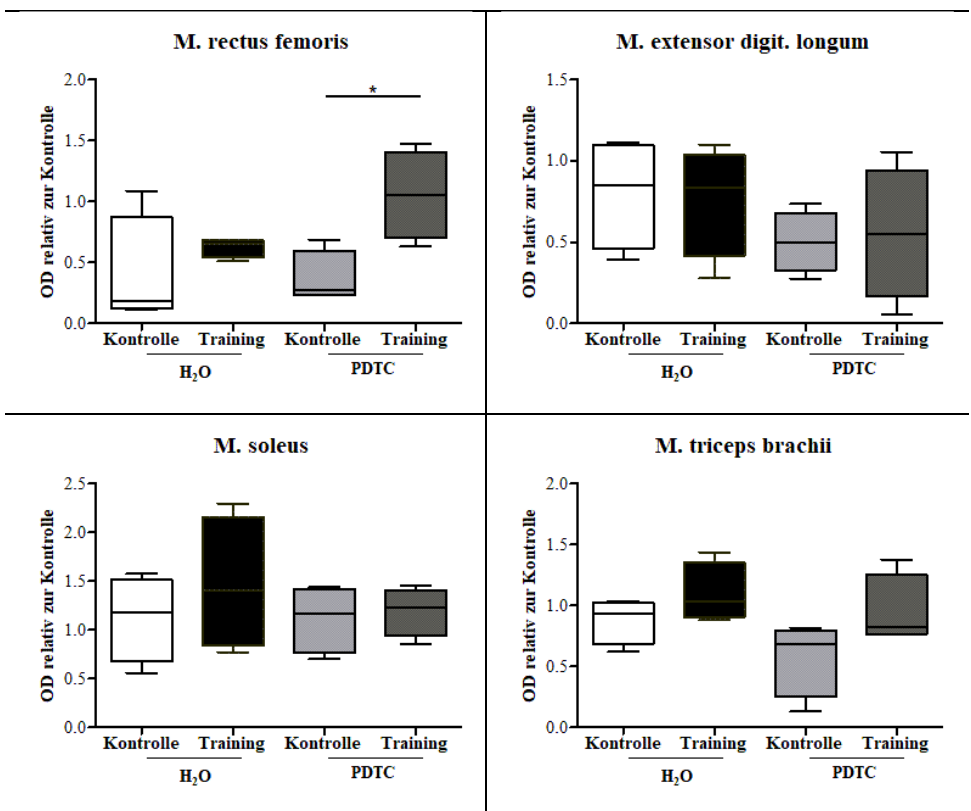


Abb. 62: Relative Konzentration des *Unc45b*-Gens auf Protein-Ebene in *Western Blot*-Analysen der verschiedenen Muskeln, Normalisierte Expressionswerte, n=4. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.
* $p < 0,05$ zwischen Mäusen mit PDTC-Behandlung mit und ohne absolviertem Training im RF.

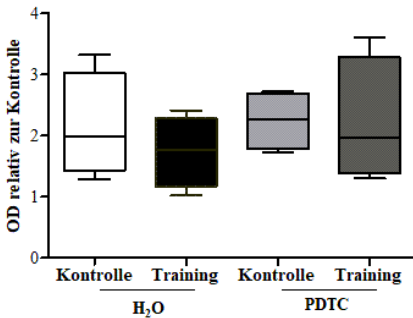
Unc45b ist ebenfalls ein Chaperon und interagiert direkt mit Myosin und Hsp90 (Hoppe *et al.*, 2004). Versuche anderer Experimentatoren zeigten, dass Unc45b entscheidend für den korrekten Sarkomeraufbau ist (Spellmon *et al.*, 2015).

Im M. rectus femoris, im M. triceps brachii und geringgradig auch im M. tibialis war auf Proteinebene eine Induktion des für Unc45b kodierenden

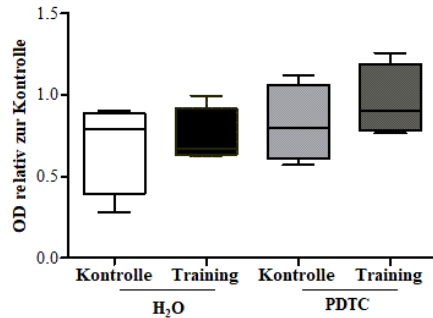
Gens durch Training, geringgradig verstärkt durch PDTC, zu erkennen. Nur im M. rectus femoris, bei Zusammenwirken von Training und PDTC, war dieser Effekt von signifikantem Ausmaß (vgl. Abb. 62).

Smyd1

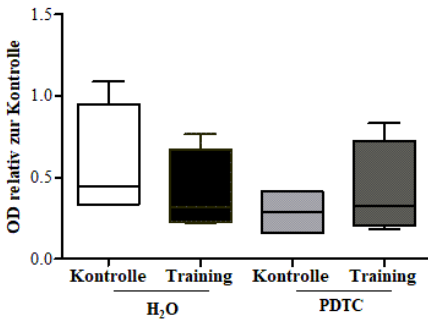
M. gastrocnemius



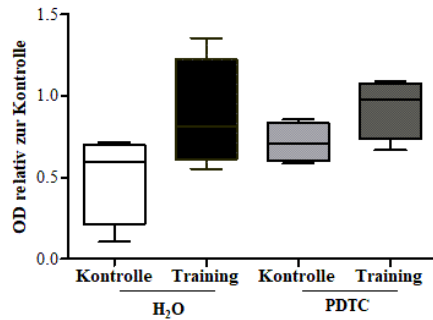
M. tibialis



M. rectus femoris



M. extensor digit. longum



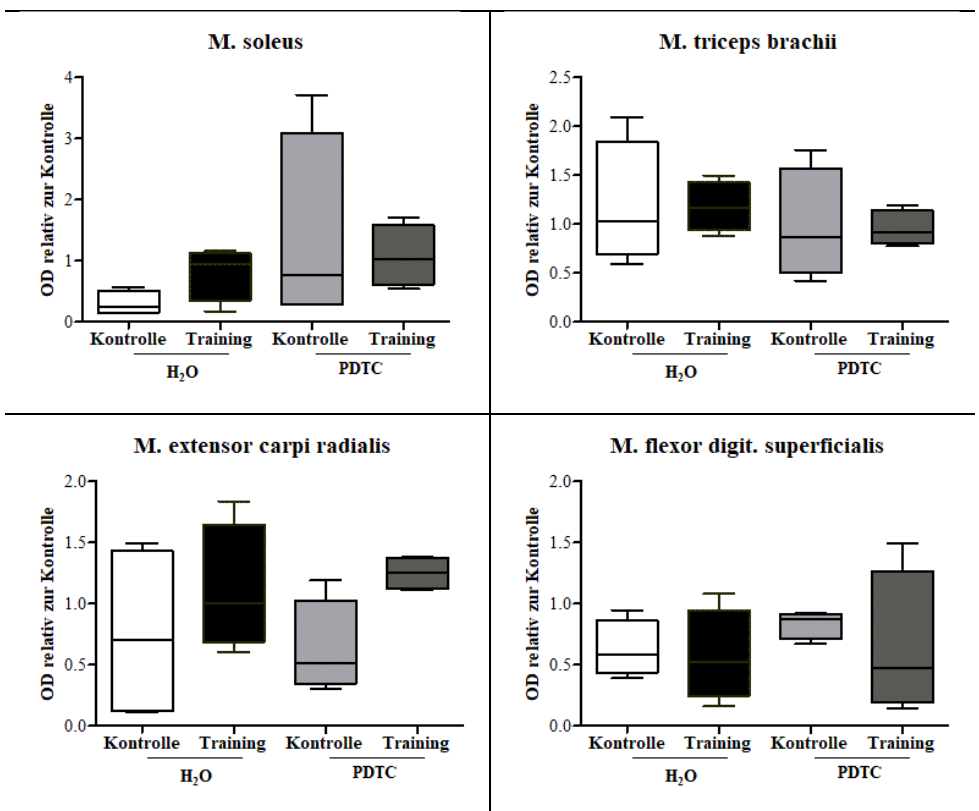


Abb. 63: Relative Konzentration des *Smyd1*-Gens auf Protein-Ebene in *Western Blot*-Analysen der verschiedenen Muskeln, Normalisierte Expressionswerte, n=4. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.

Smyd1 ist eine Histon-Methyltransferase und der Hauptbindungspartner von skNac, der muskelspezifischen Variante von Naca. Als Chaperon unterstützt Smyd1 die Bildung und korrekte Faltung von neu synthetisierten Proteinen am Ribosom (Smith *et al.*, 2014).

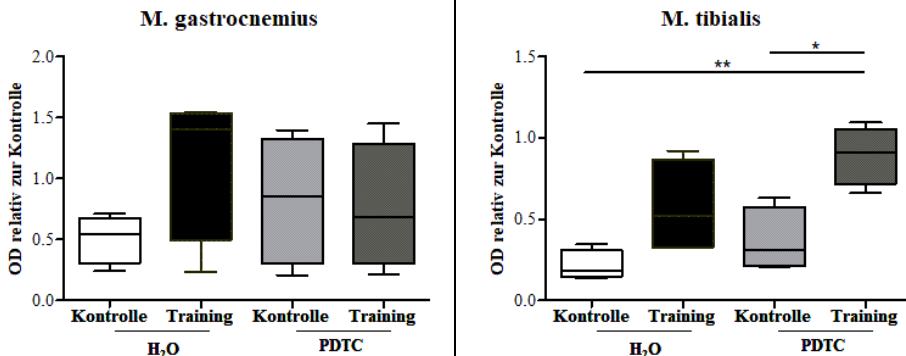
In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen war auf Proteinebene keine einheitliche Regulierung von Smyd1 durch die Faktoren

Training oder PDTC-Gabe zu erkennen. Im *M. extensor digitorum longus*, *M. soleus* und *M. extensor carpi radialis* war eine leichte Induktion von *Symdl* durch Training zu beobachten, diese erreichte allerdings kein signifikantes Niveau. Der *M. gastrocnemius*, der *M. rectus femoris* und der *M. flexor digitorum superficialis* zeigten eher gegenläufige Tendenzen, mit geringgradig erniedrigten Konzentrationen von *Smyd1* im Muskelgewebe der trainierten Mäuse (vgl. Abb. 63).

4.8.2 Einfluss auf Marker für muskelabbauende Prozesse

Umwandlungsprozesse im Muskel erfordern ebenfalls einen kontrollierten Abbau von Proteinen.

Atrogin1



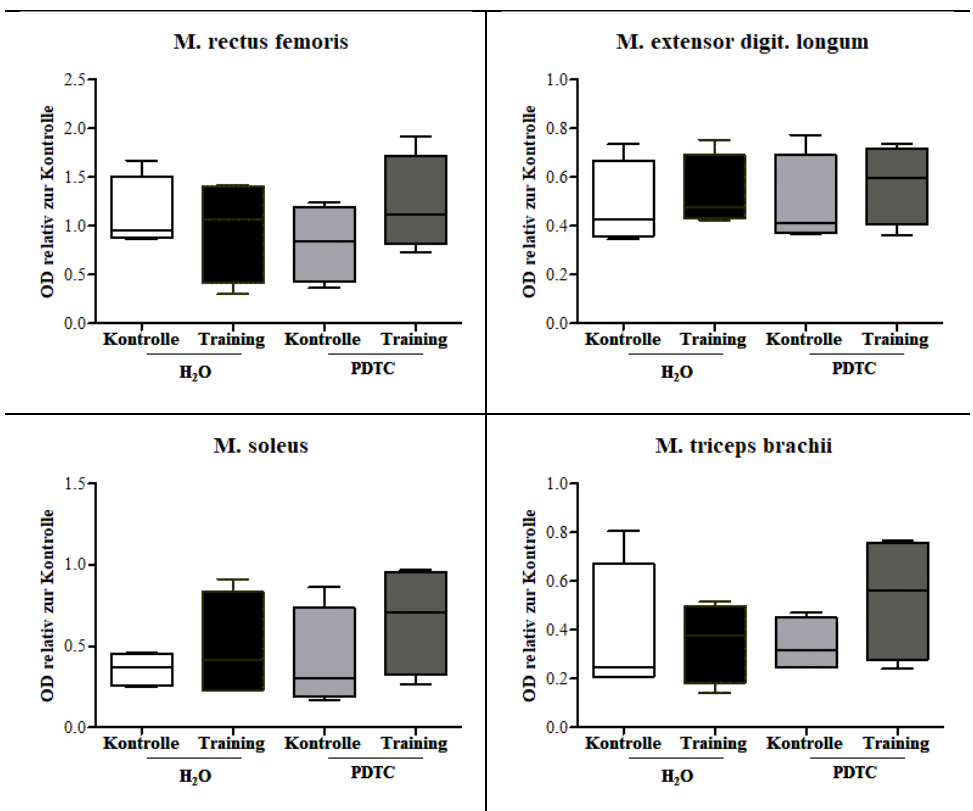


Abb. 64: Relative Konzentration des *Atrogin1*-Gens auf Protein-Ebene in *Western Blot*-Analysen der verschiedenen Muskeln, Normalisierte Expressionswerte, n=4. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen Mäusen mit PDTC-Behandlung mit und ohne absolviertem Training im TA. ** $p < 0,01$ zwischen untrainierten Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser und trainierten Mäusen mit PDTC-Behandlung im TA.

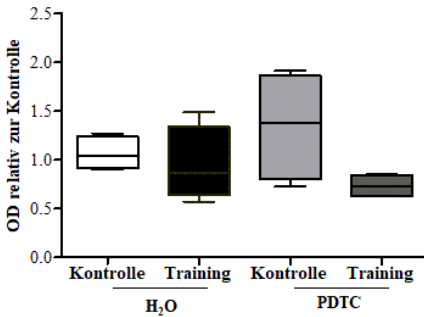
Atrogin1, auch *MAFbx* genannt, ist eine muskelspezifische E3-Ligase und ein Marker für Muskelabbauprozesse (Milan *et al.*, 2015).

Im *M. tibialis cranialis* zeigte sich eine deutliche Induktion von *Atrogin1* durch Training, die durch PDTC noch verstärkt wurde und Signifikanz erreichte. Geringer ausgeprägt war eine Veränderung gleicher Richtung bei

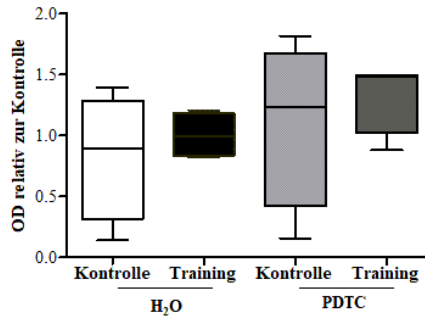
Zusammenwirken von Training und PDTC auch in den anderen untersuchten Muskeln zu erkennen (vgl. Abb. 64).

Murf1

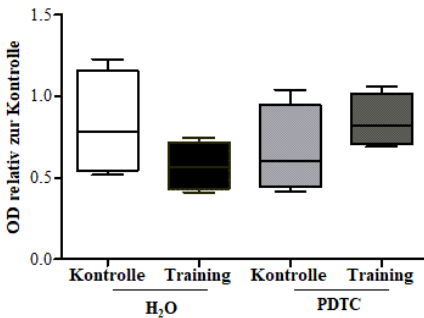
M. gastrocnemius



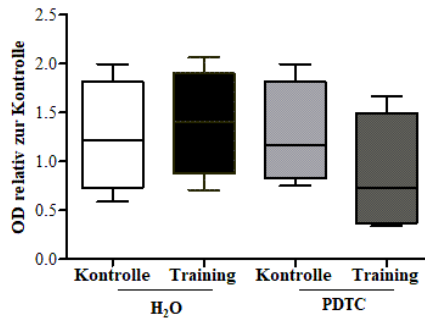
M. tibialis



M. rectus femoris



M. extensor digit. longum



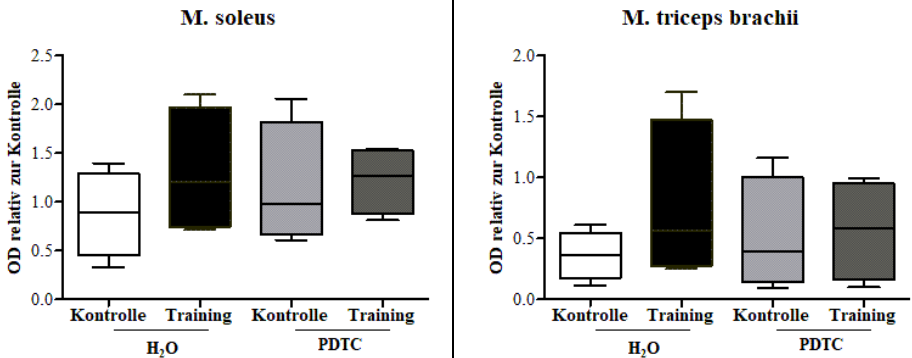
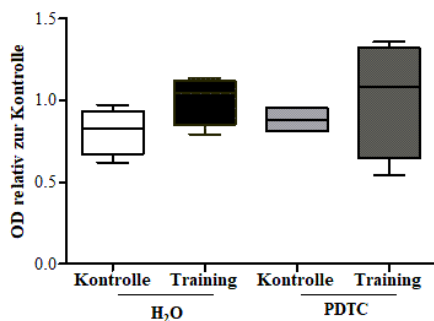
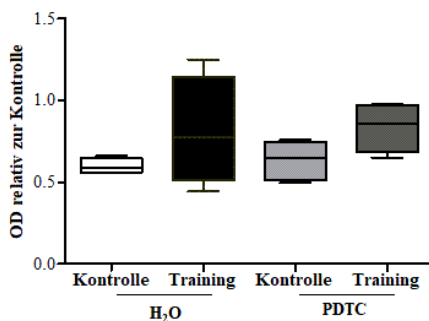
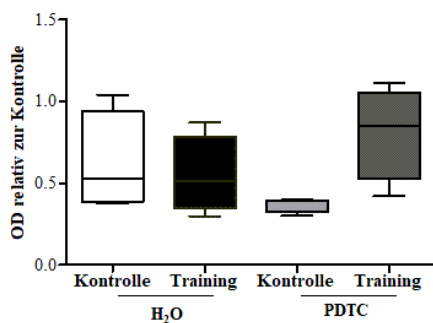
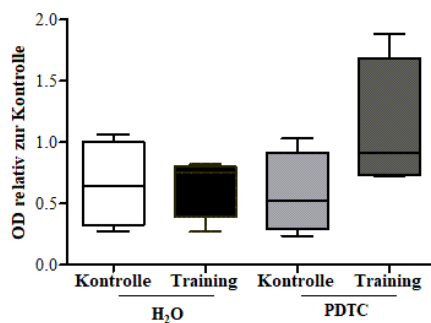
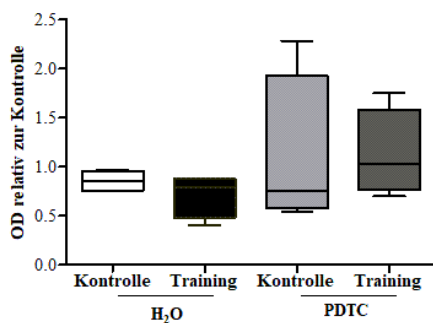
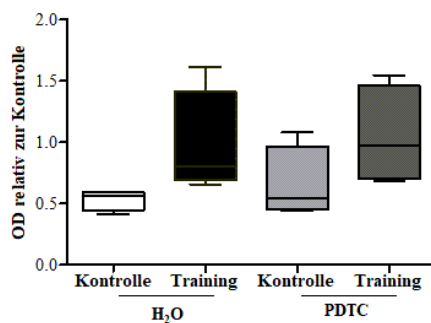


Abb. 65: Relative Konzentration des *Murf1*-Gens auf Protein-Ebene in *Western Blot*-Analysen der verschiedenen Muskeln, Normalisierte Expressionswerte, $n=4$. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.

Murf1 ist ebenfalls eine muskelspezifische E3-Ligase und wird, wie Atrogin1, durch den Transkriptionsfaktor Foxo1 reguliert (Milan *et al.*, 2015).

In dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experiment waren auf Proteinebene keine einheitlichen Konzentrationsveränderungen von Murf1 durch die Reize Training bzw. PDTC in den verschiedenen Muskeln zu erkennen (vgl. Abb. 65).

Traf6

M. gastrocnemius**M. tibialis****M. rectus femoris****M. extensor digit. longum****M. soleus****M. triceps brachii**

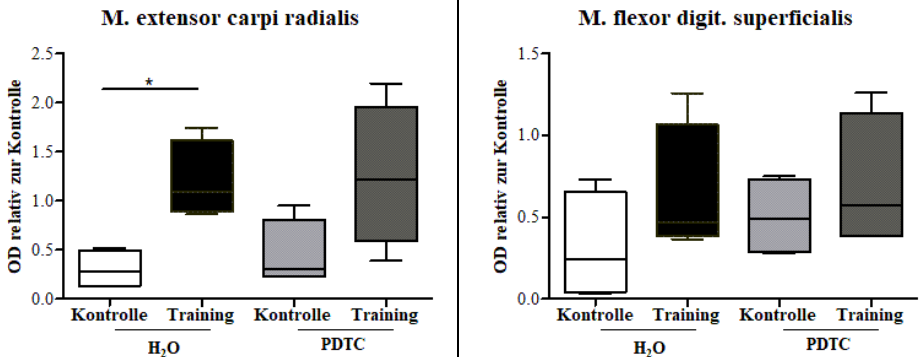
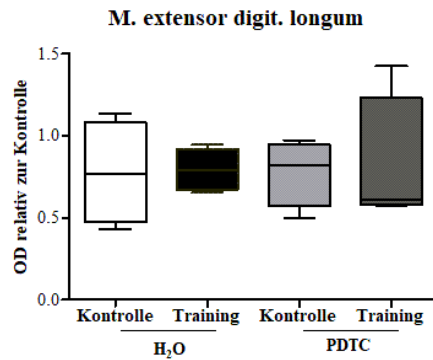
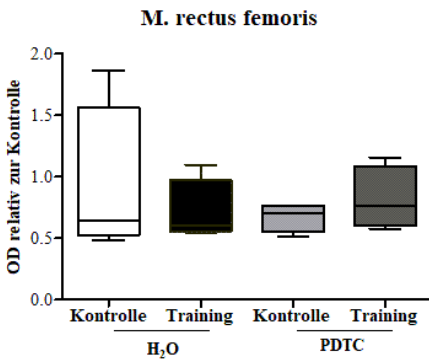
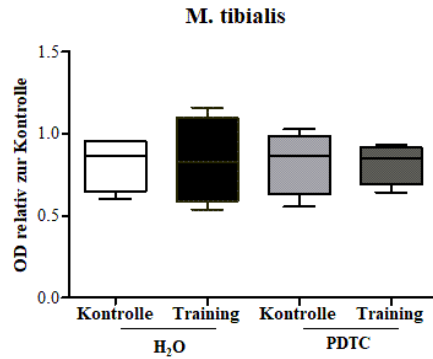
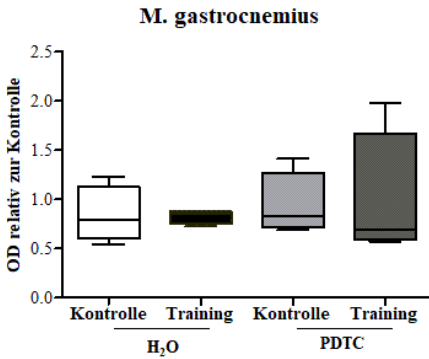


Abb. 66: Relative Konzentration des *Traf6*-Gens auf Protein-Ebene in *Western Blot*-Analysen der verschiedenen Muskeln, Normalisierte Expressionswerte, n=4. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$ zwischen Mäusen mit unbehandeltem Trinkwasser mit und ohne Training im ECR.

Traf6 ist eine E3-Ubiquitin-Ligase. Das entsprechende Gen ist in der Skelettmuskulatur besonders hoch exprimiert. Über verschiedene Signalwege und die Beeinflussung von NF κ B führt Traf6 zum Abbau von Gewebe und letztendlich zur Muskelatrophie (Nishimura&Naito, 2005).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zeigte sich nur eine leichte, aber einheitliche Reaktion der Muskelfasern auf Traf6. Durch Muskeltraining, unabhängig von der Behandlung der Mäuse mit dem NF κ B-Inhibitor PDTC, war in den meisten untersuchten Muskeln eine Induktion der *Traf6*-Expression auf Proteinebene festzustellen, welche allerdings nur im M. extensor carpi radialis signifikant war. PDTC alleine hatte dagegen keinen Einfluss (vgl. Abb. 66).

4.8.3 Einfluss auf I κ B α als einen Marker des NF κ B-Signalwegs**I κ B α** 

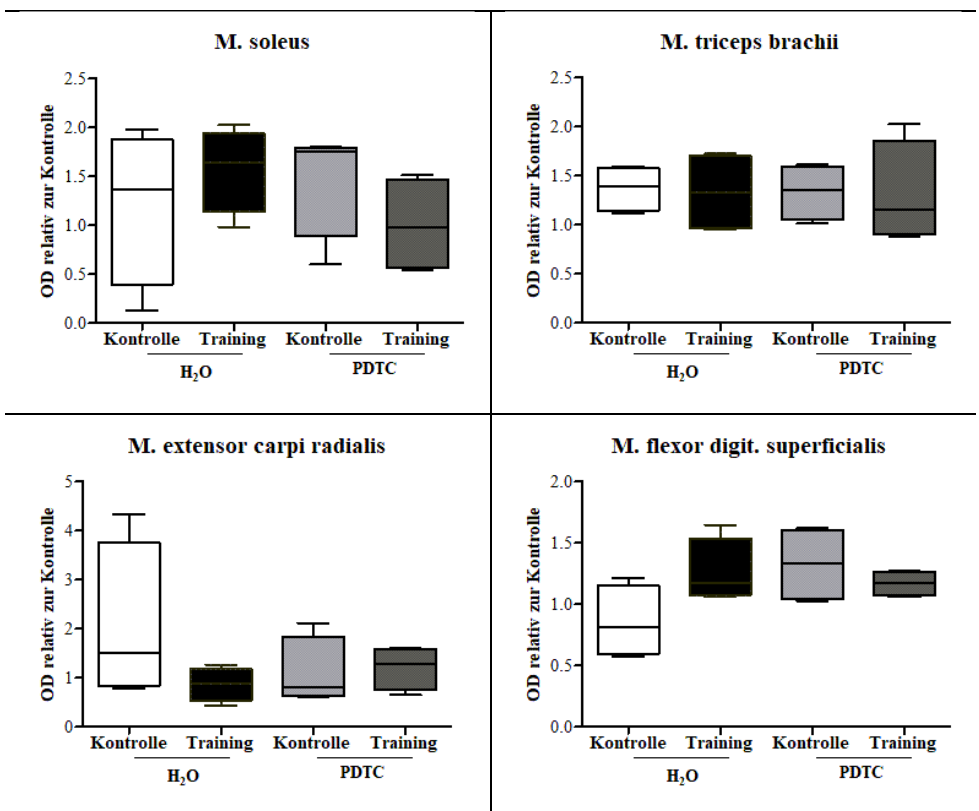


Abb. 67: Relative Konzentration des *IkBa*-Gens auf Protein-Ebene in *Western Blot*-Analysen der verschiedenen Muskeln, Normalisierte Expressionswerte, n=4. Die Größe der Box beschreibt den Abstand zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, die mittlere waagrechte Linie den Median und die obere bzw. untere waagrechte Linie das gemessene Maximum bzw. Minimum.

$\text{IkB}\alpha$ ist das inhibitorische Protein, das $\text{NF}\kappa\text{B}$ im Zytoplasma der Zelle bindet. Erst nach dessen Abspaltung kann das freie $\text{NF}\kappa\text{B}$ in den Zellkern translozieren und seine Funktion als Transkriptionsfaktor wahrnehmen (Kramer&Goodyear, 2007).

In den in dieser Arbeit untersuchten Muskeln war keine eindeutige Veränderung der $\text{IkB}\alpha$ -Konzentration auf Proteinebene festzustellen. Nur im *M. flexor digitorum superficialis* kam es zu einer geringen Zunahme von

IkBa, sowohl durch Training als auch durch die Behandlung mit PDTC. Diese erreichte aber kein signifikantes Niveau (vgl. Abb. 67).

5 Diskussion

Die positiven Effekte von regelmäßigem Ausdauertraining auf die Gesundheit des Organismus sind vielfältig und Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Eine der Haupttodesursachen weltweit ist z. B. immer noch ein Herzinfarkt: Ausdauertraining vermindert nachweislich die Verkalkung von Gefäßen und die Ausprägung von Bluthochdruck und kann somit das Herzinfarktrisiko senken (Yusuf *et al.*, 2004). Auch bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ist eine deutliche Verbesserung der psychischen und physischen Lebensqualität zu verzeichnen, wenn sie regelmäßig Sport treiben (Chan *et al.*, 2016). Die Skelettmuskulatur ist das Gewebe, das den Außenreiz „Bewegung“ mit als Erstes wahrnimmt und dadurch vermutlich auch Einfluss auf Anpassungsleistungen des gesamten Organismus hat. Zudem finden auch in der Muskulatur selbst vielfältige Adaptationsreaktionen in Antwort auf Belastung statt, insbesondere eine Änderung der Eigenschaften von Muskelfasern, verbunden mit Prozessen des Muskelab-, auf- und -umbaus. Die genauen Mechanismen dieser Anpassungsreaktionen sind bisher erst unvollständig erforscht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Anpassungsreaktionen ein regelmäßiges Lauftraining im Skelettmuskel induziert, mit einem besonderen Schwerpunkt auf der Expression von Genen, welche für Proteine kodieren, die an Prozessen des Muskelauf-, ab- und -umbaus beteiligt sind. Parallel sollte analysiert werden, ob der Transkriptionsfaktor NFκB, welcher in zahlreiche Prozesse des Muskelumbaus involviert ist, eine Rolle bei der Trainingsanpassung spielt. Schließlich sollte eruiert werden, ob es Unterschiede hinsichtlich der Anpassung in verschiedenen Skelettmuskeltypen gibt.

Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden sowohl physiologische Daten der Versuchstiere erfasst, als auch metabolische- und Immunfluoreszenzfärbungen von Muskelfaserquerschnitten hergestellt sowie Untersuchungen auf RNA- und Proteinebene durchgeführt.

5.1 Auswirkungen von Training und PDTC-Behandlung auf physiologische Parameter der Versuchsmäuse

Die Bedingungen des angewandten Trainings wurden unter Berücksichtigung der Daten anderer Arbeitsgruppen gewählt, die vergleichbare Fragestellungen untersucht hatten. Die entsprechenden publizierten Trainingsprotokolle unterscheiden sich jedoch stark hinsichtlich der Frequenz des Trainings, der Laufgeschwindigkeit und -dauer und der Steigung, mit der das Laufband eingestellt war.

Einige Experimentatoren versuchten den Punkt zu evaluieren, an dem Mäuse zu erschöpft zum Weiterlaufen waren. Im Experiment von Denti *et al.*, 2006, liefen die Mäuse bei 0 ° Steigung zunächst für 5 min bei einer Geschwindigkeit von 5 m/min. Anschließend wurde die Laufbandgeschwindigkeit jede Minute um 1 m/min gesteigert, bis die Mäuse mindestens 20 sec auf der Sitzplatte verweilten, obwohl sie durch diese Elektroschocks verabreicht bekamen. Im Durchschnitt erreichten die C57BL/6J-Mäuse diesen Punkt nach 20 min Training, also bei einer Maximalgeschwindigkeit von 20 m/min bzw. 33 cm/sec (Denti *et al.*, 2006). Brunelli *et al.*, 2007, begannen in ihrem Experiment bei 0 ° Steigung ebenfalls mit einer Akklimatisationsphase von 5 min bei 5 m/min und erhöhten anschließend alle 3 min um 1 m/min bis zu einer Geschwindigkeit von 9 m/min, was 15 cm/sec entspricht. Die Versuchsmäuse hielten dabei durchschnittlich 60 min Training durch, bis sie mehr als 20 sec auf der Elektroschockplatte sitzen blieben (Brunelli *et al.*, 2007).

Da Training bis zur Erschöpfung zu einer Schädigung von kontraktile Fasern und Membranphospholipiden führt (Armstrong *et al.*, 1991), war es in dem hier durchgeführten Versuch wichtig, diesen Punkt zu vermeiden.

Zudem ist ein solches Experiment mit extremem Stress für die Tiere verbunden und sollte daher aus tierschutzrechtlichen Gründen nach Möglichkeit nicht durchgeführt werden.

In den im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Experimenten wurde das Laufbandtraining in seiner Intensität und Dauer langsam angepasst. Beginnend bei 0 ° Steigung und 5 cm/sec für 10 min erreichten die Mäuse nach fünf Wochen mit drei Mal Training pro Woche ihre Endbedingungen von 15 ° Steigung bei 24 cm/sec (14,4 m/min) für 60 min. Die Sitzplatte zu Beginn der Laufbandspur stand dabei nicht unter Strom und wurde dennoch zu keiner Zeit mehr als wenige Sekunden von den Mäusen genutzt. Sehr selten war es nötig, die Tiere durch sanfte Berührung zum Weiterlaufen zu motivieren. Dem Empfinden der Experimentatoren nach wurden die Trainingsstunden von den Mäusen positiv aufgenommen und sie absolvierten das Training zu jeder Zeit ohne Überlastungsanzeichen.

Interessant ist auch der Vergleich zu Studien zum freiwilligen Laufverhalten von Mäusen. Hierbei wird den Tieren eine Laufmöglichkeit, meist in Form eines Lauftellers, in ihrem gewohnten Käfig zur Verfügung gestellt und über eine angeschlossene Apparatur die täglich zurückgelegte Strecke und maximale von den Mäusen gelaufene Geschwindigkeit gemessen, ohne dass ein von außen einwirkender Reiz auf die Versuchstiere einwirkt. Experimente zeigten hierbei Spitzenwerte von über 30 km, die die Mäuse am Tag freiwillig zurücklegten, wobei sie nicht mit kontinuierlicher Geschwindigkeit liefen, sondern immer wieder kleine Pausen einlegten (Goh&Ladiges, 2015). Ein weiteres Experiment zu freiwilligem Training von Allen *et al.* wies eine durchschnittliche Laufdauer von 4,3 h/d bei einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 26,4 m/min und einer somit im Schnitt erreichten Distanz von 6,8 km/d nach (Allen *et al.*, 2001).

In den meisten Laufbandexperimenten, die in der Literatur beschrieben sind, wird auf die Untersuchung von ein bis zwei Hintergliedmaßenmuskeln zurückgegriffen. Sicherlich ist ein Grund hierfür auch die Vergleichbarkeit mit am Menschen durchgeführten Laufbandstudien: Diese beschränken sich in der Regel auf eine Belastung der Beine, was aber nicht dem

physiologischen Bewegungsablauf der Mäuse entspricht. Versuche zur Einschätzung der Beanspruchung der Vordergliedmaßen im physiologischen Lauf auf vier Beinen wären somit vermutlich aufschlussreich.

Die Überprüfung, ob eine Anpassung des Organismus an die körperliche Leistung erfolgt, kann auf unterschiedliche Arten durchgeführt werden. In Trainingsstudien beim Menschen ist das üblichste Verfahren die Messung der $\dot{V}O_2\text{max}$. Dieser Wert beschreibt die maximale Sauerstoffmenge pro Zeit, die der Körper am Ende einer erschöpfenden Belastung aufnehmen kann, und wird über die Ausatemluft gemessen. Relativ neue Studien haben Versuchsmechanismen und Protokolle etabliert, die dieses Verfahren auch bei Mäusen ermöglichen (Ayachi *et al.*, 2016). Aus Gründen der Praktikabilität wurde in dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch jedoch auf die Messung von Ruheherzfrequenz und Muskelkraft als physiologische Parameter zurückgegriffen. In RNA-Analysen wurden zudem bestimmte Marker untersucht, deren Genexpression durch Ausdauertraining reguliert wird.

5.1.1 Training verminderte die Ruheherzfrequenz bei gleichbleibendem Herzmuskelgewicht

Die Messung der Ruheherzfrequenz erfolgte sowohl bei den Kontrolltieren als auch den Versuchstieren 24 Stunden nach Beendigung des letzten Trainingsprotokolls. Es wurde darauf geachtet, dass die Mäuse ihre Umgebung und das Messverfahren als so wenig stressbehaftet wie möglich empfanden, indem ihnen zum Beispiel eine Rückzugsmöglichkeit geboten wurde. Fünf Werte wurden über eine Zeitdauer von zehn Minuten ermittelt und anschließend arithmetisch gemittelt.

Eine Vielzahl an Versuchen konnte eine niedrigere Ruheherzfrequenz bei Ausdauersportlern nachweisen, die auf die Wirkung des Nervus vagus und strukturelle Veränderung im Sinusknoten zurückgeführt werden (Herzig *et al.*, 2018). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen ergab sich in dem in dieser Arbeit beschriebenen Versuch eine klare Reduktion der

Ruheherzfrequenz bei den Mäusen, die das zehnwöchige Training durchlaufen hatten. Etwas deutlicher zeigten sich die Effekte noch unter Einfluss von PDTC, welches den Transkriptionsfaktor NF κ B inhibiert.

Vella *et al.*, 2012, beschrieben einen Anstieg der NF κ B-Aktivität nach Krafttraining (Vella *et al.*, 2012), wohingegen nach Ausdauertraining eine Reduktion beobachtet wurde, die dem Abbau von Muskulatur entgegen wirken soll (Liu&Chang, 2018). Es ist also möglich, dass die verminderte NF κ B-Aktivität nach PDTC-Behandlung die Ruheherzfrequenz negativ beeinflusst. Die entsprechenden Mechanismen sind allerdings noch völlig unklar.

Versuche zeigten außerdem, dass ausdauertrainierte Sportler einen größeren Herzmuskel aufweisen als Untrainierte (Herzig *et al.*, 2018). Auch bei den Mäusen in dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch wurde das Herzmuskelgewicht nach der Tötung bestimmt, es ergaben sich aber keine signifikanten Veränderungen. Eine Tendenz zu höherem Gewicht konnte aber sowohl in Zusammenhang mit dem Training, als auch nach PDTC-Gabe festgestellt werden. Es ist allerdings zu bedenken, dass das Gesamtgewicht eines Mäuseherzens bei ca. 150-250 mg liegt, so dass kleinste Veränderungen in Bezug auf die Präparation schon große Auswirkungen auf das gemessene Gewicht haben können. So war es zum Beispiel praktisch nicht möglich, die Präparation immer an exakt der gleichen Stelle der Gefäßverbindungen durchzuführen. Auch das nach der Tötung durch Blutentzug verbliebene Restvolumen an Blut in den Herzkammern war nicht genau zu bestimmen und beeinflusste das ermittelte Gesamtgewicht. Insofern ist zu bezweifeln, dass absolut gesehen kleine Unterschiede, auch wenn sie im relativen Vergleich bedeutend sein könnten, mit diesem Verfahren überhaupt dargestellt werden können.

5.1.2 Es waren keine Unterschiede in der Kraftmessung zwischen den Gruppen darstellbar

Ein weiterer physiologischer Parameter um die Muskelzunahme der Mäuse detektieren zu können, ist der Vergleich der maximalen Muskelkraft, zu der trainierte und untrainierte Mäuse fähig sind. Hierzu wird in vielen Studien der sogenannte *Grip strength*-Test durchgeführt. Die entsprechende Versuchsausrüstung besteht aus einem Gitter, in das ein Sensor eingebaut ist, welcher mit einer Feder verbunden ist. Die Maus greift das Gitter mit beiden Vorderbeinen oder allen vier Gliedmaßen und die Apparatur misst die Kraft, die zum Lösen der Maus überwunden werden muss.

Der *Grip strength*-Test ergab bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tieren keine Unterschiede zwischen den einzelnen experimentellen Gruppen. Dem subjektiven Empfinden der Experimentatoren nach wandten die Mäuse aus nicht geklärten Gründen bei den Versuchen jedoch nicht ihre maximale Kraft auf. In diesem Fall wären die Daten nicht aussagekräftig. Der große Unterschied zwischen der Kraftaufwendung vor und nach dem Training kann als Gewöhnungs- oder Ermüdungseffekt erklärt werden. Die gemessene Kraft lag mit 100-170 g etwa im gleichen Bereich, den auch andere Arbeitsgruppen bei unbehandelten Wildtyp-Mäusen erzielten (Wiesmann *et al.*, 2018, Takeshita *et al.*, 2017). Wiesmann *et al.*, 2018, z. B. nutzten das *Grip strength*-Messverfahren um in ihren Versuchen eine verminderte Kraft bzw. Greiffähigkeit der Mäuse nach induziertem Schlaganfall nachzuweisen (Wiesmann *et al.*, 2018).

5.1.3 Trainierte Mäuse unter PDTC zeigten ein niedrigeres Körpergewicht nach zehn Wochen Lauftraining

Alle Mäuse verzeichneten eine altersentsprechende, adäquate Gewichtszunahme; Es bestand kein Unterschied in der körperlichen Entwicklung der Tiere der beiden Kontrollgruppen. PDTC alleine hatte somit grundsätzlich keinen Effekt auf die physische Entwicklung der Mäuse. Einen deutlichen Unterschied konnte man allerdings im Vergleich des Gewichts der

Tiere der Läufergruppen sehen: Die Läufer unter PDTC-Behandlung blieben, gegenüber den Mäusen, die unbehandeltes Trinkwasser erhalten hatten, im Gesamtgewicht um ca. 2 g zurück. Dies entspricht einem verminderten Gewicht von fast 30 % der Gesamtkörpermasse gegenüber der Läufer-Kontrollgruppe. In etwa der gleiche Gewichtsunterschied bestand gegenüber den beiden untrainierten Versuchsgruppen. Dies legt die Vermutung nahe, dass PDTC Aspekte der Trainingsanpassung, z. B. eine Muskelhypertrophie, blockieren könnte, während durch das Training gleichzeitig weniger Fettreserven als in den Nichtläufer-Kontrollgruppen aufgebaut wurden.

Um diese These zu validieren und eine genauere Aussage über eine potentielle Muskelhypertrophie treffen zu können, wurde auch das Einzelmuskelgewicht der präparierten Organe erfasst. Hier war allerdings kein messbarer Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen. Wie bereits im Zusammenhang der Diskussion des Herzgewichts beschrieben war aber auch hier die Messungenauigkeit recht groß, da das Probenmaterial sehr klein war, was eine exakte Präparation nicht immer ermöglichte. In weiteren Studien sollte daher die Körperzusammensetzung, insbesondere der Fettanteil der Mäuse, analysiert werden.

5.2 Fasertypanpassung und metabolische Veränderungen im Muskel nach Lauftraining und NFκB-Hemmung

5.2.1 Marker für „oxidativen“ Muskeltyp waren nach Training leicht erhöht

Durch regelmäßige Beanspruchung eines Muskels durchläuft dieser metabolische und strukturelle Veränderungen. Typischerweise führt Krafttraining zu einer Zunahme des Zellvolumens. Versuche zeigten zudem, dass auch in Antwort auf ein Ausdauertraining eine Hypertrophie ausgebildet werden kann, und zwar grundsätzlich in allen Fasertypen. In manchen Muskeln zeigte sich diese in Versuchen anderer Experimentatoren allerdings bei schnell kontrahierenden Fasern stärker ausgeprägt als bei langsam kontrahierenden Fasern (Alway *et al.*, 1989). Zudem kommt es bei

Ausdauertraining zu einem Faserumbau: Schnell, aber sehr kurz kontrahierende Mhc IIB-Fasern nehmen ab, zugunsten der Mhc IIA-Fasern, die zu etwas längerer Kontraktion fähig sind (Adams *et al.*, 1993). Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Färbungen der Mhc-Isoformen durchgeführt, als auch die Expression der entsprechenden Gene auf RNA-Ebene untersucht. Bei der Darstellung der relativen Anteile an Fasern an der Gesamtfaserzahl, wie sie in Färbemethoden ermittelt wird, muss dabei die Zunahme einer spezifischen Isotypform immer mit der Abnahme einer anderen vergesellschaftet sein. Bei entsprechenden qPCR-Analysen kann eine Zunahme des Signals hingegen prinzipiell alle Fasertypen gleichzeitig betreffen.

Mehrere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass Denervation in langsam arbeitenden Muskeltypen zur relativen Abnahme von langsam kontrahierenden Fasern führt, wobei es in schnellen Muskeltypen zur Verminderung der schnellen Isoformen kommt (Huey&Bodine, 1998, Jakubiec-Puka *et al.*, 1999).

Entsprechend zeigten qPCR-Experimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein recht unterschiedliches Bild: Der M. extensor digitorum longus ist ein Muskel der Hintergliedmaße, der für die Streckung der Zehen und die Beugung des Sprunggelenks zuständig ist. Er enthält im untrainierten Zustand mit etwa 88 % fast nur Mhc IIB-Fasern, wenige Mhc IIA-Fasern und keine Mhc IIX- oder Mhc I-Fasern (vgl. Tbl. 2). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zeigte sich, kongruent zu den Ergebnissen anderer Studien, eine Steigerung des Anteils von Mhc IIA-Fasern im M. extensor digitorum longus durch Training auf mRNA-Ebene. Dies war sowohl bei Mäusen unter als auch ohne PDTC-Einfluss zu beobachten, wobei PDTC alleine keinen Effekt auf die Fasertypverteilung hatte. Mit der Methode der qPCR-Analyse konnte somit keine Veränderung der *Mhc IIB*- und *Mhc I*-Genexpression beobachtet werden und *Mhc IIX* war in nicht signifikantem Ausmaß leicht induziert.

Ein ähnliches, aber nicht ganz so ausgeprägtes Bild, zeigte sich im M. gastrocnemius, dem kräftigsten Strecker des Sprunggelenks. Dieser ist

ähnlich aufgebaut, wie der *M. extensor digitorum longus*, mit über 80 % Mhc IIB-Fasern, knapp 20 % Mhc IIA-Fasern, sowie nur wenigen Mhc IIX- und Mhc I-Isoformen. In den in dieser Arbeit durchgeführten qPCR-Analysen war ein Anstieg der *Mhc I*-Genexpression zu beobachten, welcher aber keine Signifikanz erreichte. Beschriebene Versuche mit menschlichen Probanden zeigten ebenfalls eine Zunahme der Mhc I-Fasern z. B. nach Ausdauertraining mit dem Fahrrad (Howald *et al.*, 1985) und bei Langstreckenläufen (Jansson *et al.*, 1978), wohingegen nach mehrwöchigem Sprinttraining eine Abnahme dieser Fasern zu verzeichnen war (Esbjornsson *et al.*, 1993).

Ein Muskel der Vordergliedmaße ist der *M. triceps brachii*, der für die Streckung des Ellbogens und die Beugung der Schulter verantwortlich ist. Das in diesem Experiment untersuchte *Caput longum* weist ebenfalls eine von Mhc IIB dominierte Zusammensetzung auf, wobei sich zusätzlich Mhc IIX- und Mhc IIA-Fasern zu fast gleichen Teilen im Muskel finden. Auch hier war in qPCR-Analysen ein deutlicher Anstieg des Anteils der Mhc IIA-Fasern zu beobachten. Mhc IIX- und Mhc I-Fasern nahmen ebenfalls zu, Mhc IIB-Fasern hingegen veränderten ihre Menge nicht wesentlich.

Der *M. soleus* ist nun ein Muskel mit eher „oxidativen“ Eigenschaften: Mit etwa 37 % Mhc I-Fasern weist er den höchsten Anteil dieses Fasertyps in einem murinen Muskel auf (Kammoun *et al.*, 2014, Augusto *et al.*, 2004). Fast genauso häufig vertreten sind die Mhc IIA-Fasern, wohingegen sich Mhc IIB-Fasern gar nicht finden und Mhc IIX nur zu einem Anteil von etwa 10 %. Der *M. soleus* ist fest mit dem *M. gastrocnemius* verbunden und ebenfalls für die Streckung des Tarsus zuständig. Hier ergab sich bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qPCR-Analysen ein gegenteiliges Bild zu den anderen, eher „glykolytisch“ aufgebauten Muskeln: Die zuvor vermehrt aufgetretenen Mhc IIA-Fasern zeigten sich nun vermindert, wobei dieser Effekt kein signifikantes Niveau erreichte. Mhc IIB-Fasern waren weiterhin nicht vertreten, was sich im kaum vorhandenen Expressionsniveau des entsprechenden *Mhc*-Gens widerspiegelte. Auch die Menge der Mhc IIX-Fasern sank geringgradig und die langsam kontrahierenden Mhc I-Fasern

nahmen unter Training leicht zu, was bei zusätzlicher PDTC-Verabreichung aber nicht mehr zu beobachten war. Die kontraktile Eigenschaften der Fasertypen korrelieren mit ihrem Gehalt an SDH und mATPase, so dass anhand des Färbeverhaltens von Muskelquerschnitten auf die enthaltenen Fasern rückgeschlossen werden kann. Eine Zuordnung der Fasern zu entsprechenden Mhc-Typen ist auch durch die Methode der Immunfluoreszenzfärbung einzelner Mhc-Subtypen möglich. Als einziger Extremitätenmuskel der Mhc I-Fasern in hoher Anzahl aufweist und somit recht ausdauernd arbeitet, wird der M. soleus sehr häufig zur Betrachtung von Trainingseffekten herangezogen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit bei der Durchführung der Immunfluoreszenz- und der metabolischen Färbung ebenfalls auf diesen Muskel zurückgegriffen: Das vollständige Fehlen von Mhc IIB-Fasern in diesem Muskel bestätigte sich im Färbeverhalten bei beiden Methoden und auch ein geringgradiges Absinken an Mhc IIX-Fasern in Muskeln trainierter Mäuse stimmte mit den Daten der qPCR-Analyse überein. Anders verhält es sich bei den Mhc I- und Mhc IIA-Fasern: Auf mRNA-Ebene war ein Anstieg an Mhc I und ein Abfall an Mhc IIA zu beobachten, in der mATPase Färbung sowie der Immunfluoreszenzfärbung war dies nun genau umgekehrt. Eine Erklärung könnte hier die Größe der Muskelfasern bieten. Die Auswertung des Färbeverhaltens beschränkte sich auf die reine Anzahl der positiven Muskelfaserquerschnitte. Es wurde keine Aussage über eine eventuelle Änderung des Querschnitts dieser Fasern getroffen. Denkbar wäre es, dass zwar prozentual weniger Mhc I-anfärbbare Fasern im Muskel vorkamen, diese aber einen größeren Durchmesser und damit einhergehend eine höhere Konzentration an Mhc I aufwiesen. In diesem Zusammenhang wäre eine Messung der Größe der Muskelquerschnitte der vier Vergleichsgruppen interessant.

Einige Autoren beschreiben die Möglichkeit des Fasershifts nach Ausdauertraining nur zwischen den verschiedenen schnellen Mhc II-Fasertypen, nicht jedoch zwischen Mhc II- und Mhc I-Subtypen (Karp, 2001, Scott *et al.*, 2001). Dies könnte erklären, warum es im M. soleus, der bereits

ein hohes „oxidatives“ Potential aufweist, weniger starke Veränderungen gab als in den eher „glykolytisch“ und somit schnell arbeitenden Muskeln.

Zudem bleibt ebenfalls zu bedenken, dass einige Muskelfasern durchaus mehrere Mhc-Isoformen enthalten können (Pette&Staron, 2000). Untersuchungen an Einzelfasern konnten zeigen, dass die Faserbestimmung aufgrund des histochemischen Verhaltens nicht immer einer exakten Mhc-Zuordnung entspricht, da auch innerhalb der Einzelfaser mehrere Myosin-Isoformen bestehen können (Pereira Sant'Ana *et al.*, 1997, Wada *et al.*, 1995). Diese Fasern werden als Hybrid- oder Übergangsfasern bezeichnet, da sie sich v. a. in Zuständen des Muskelfaserumbaus finden.

Auch die Entnahmestelle innerhalb des gleichen Muskels ist von Bedeutung: so befinden sich an der Oberfläche des Muskels eher Typ II-Fasern, während in tieferen Regionen vermehrt Typ I-Fasern zu finden sind (Knechtle, 2002, Kohn&Myburgh, 2007). Gut zu sehen war dies im Rahmen dieser Arbeit z. B. am M. gastrocnemius (vgl. Abb. 20F), bei dem bereits mit bloßem Auge rote und weiße Anteile unterschieden werden konnten. Auch durch diesen Zustand war eine exakte Probenentnahme und Vergleichbarkeit dieser Proben zwischen den Versuchstieren erschwert.

Unklar ist zudem, ob das durchgeführte Trainingsprotokoll alle Muskeln in gleichem Maße belastet hat. Durch die eingesetzte Steigung und die natürliche Bewegungsphysiologie von Mäusen ist es denkbar, dass zumindest die Vordergliedmaßen eher eine Art Kraft- und kein Ausdauertraining durchlaufen haben.

Unter PDTC-Einfluss konnte dagegen keine klare Tendenz einer Veränderung des Expressionsniveaus der *Mhc*-Gene oder des relativen Anteils verschiedener Muskelfasertypen, weder mit noch ohne Training, beobachtet werden. PDTC, und somit vermutlich auch NFκB, schienen in dem in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsmodell also keinen stark ausgeprägten Effekt auf den Muskelfaserumbau zu haben.

5.2.2 Expression der Marker *Zs* und *Tbc1d1* war hinweisend auf eine erfolgte Trainingsanpassung

Eine Vielzahl an Studien konnte nachweisen, dass es bei Trainingsanpassung zu einer Erhöhung der Zitratsynthase in der Muskulatur kommt. Die Zitratsynthase ist ein Enzym, welches in Mitochondrien vorkommt und für den Ablauf des Zitratzyklus essentiell ist. Die Aktivität der Zitratsynthase wurde in den meisten Versuchen photometrisch bestimmt (Bruce *et al.*, 2004, Carter *et al.*, 2001, Howarth *et al.*, 2004, Jeppesen *et al.*, 2006), wobei je nach verwendetem Experimentprotokoll sehr unterschiedlich ausgeprägte Aktivitätszunahmen des Enzyms gemessen wurden. Ein Zusammenhang besteht ebenfalls zwischen der Menge an gemessener *Zs*-Aktivität und dem Ausmaß an geschädigter mitochondrialer Membran (Leek *et al.*, 2001), weswegen die Art der Präparation des Gewebes einen großen Einfluss auf die gemessenen Werte haben kann. In dem hier beschriebenen Versuch wurde daher nicht die Aktivität, sondern die *Zs*-Expression auf mRNA-Ebene für mehrere Muskeln bestimmt: Im M. extensor digitorum longus erreichte die *Zs*-Induktion in Antwort auf das Training, sowohl unter PDTC als auch ohne Verabreichung des NFκB-Inhibitors, signifikantes Niveau. Auch im M. gastrocnemius war eine deutliche Zunahme zu sehen, im M. soleus und M. triceps brachii verlief die Induktion weniger eindeutig, es waren aber ebenfalls entsprechende Tendenzen zu beobachten. Dies spricht dafür, dass in allen untersuchten Muskeln, jedoch vermutlich in sehr unterschiedlicher Ausprägung, eine Anpassung hin zu einem „oxidativeren“ Stoffwechsel stattgefunden hat.

Tbc1d1 ist wiederum ein Protein, das vermehrt in „glykolytisch“ geprägten Muskeln vorkommt. Nach Muskelkontraktion vermittelt *Tbc1d1* die Glukose-Aufnahme in den Muskel.

Tbc1d1^{-/-}-Mäuse zeigen eine normale Gewichtsentwicklung und einen ungestörten Insulinstoffwechsel, aber bleiben in der Leistungsfähigkeit gegenüber Wildtypmäusen zurück. In einem Laufbandexperiment, das bis zur Erschöpfung der Mäuse durchgeführt wurde, erreichten die *knock out*-Mäuse mit ca. 60 min deutlich geringere Zeiten als eine Wildtyp-Kontrollgruppe mit

durchschnittlich 90 min bei gleicher Geschwindigkeit und Steigung (Stockli *et al.*, 2015). Interessanterweise konnte in dem Versuchsaufbau dieser Arbeit die deutlichste trainingsbedingte Induktion von *Tbc1d1* im „oxidativen“ M. soleus nachgewiesen werden. Sowohl mit als auch ohne PDTC-Gabe erreichte die Veränderung ein signifikantes Niveau. In Versuchen anderer Wissenschaftler war die Fähigkeit zur Aufnahme von Glukose in *knock out*-Mäusen im „glykolytischen“ M. extensor digitorum longus reduziert, jedoch nicht im „oxidativen“ M. soleus. Weiße („glykolytische“) Teile des M. quadriceps der *knock out*-Tiere waren zur Glukoseaufnahme ebenfalls in deutlich geringerem Maße fähig als rote Teile desselben Muskels. Diese wiesen zudem eine ähnliche Konzentration an Glut4-Protein auf wie Gewebe von genetisch unveränderten Mäusen (Stockli *et al.*, 2015). *Tbc1d1* scheint im „oxidativ“ geprägten Muskel also keine bedeutende Rolle für die Glukoseaufnahme zu spielen.

In dem in dieser Arbeit beschriebenen Experiment war auch im M. extensor digitorum longus nach Ausdauertraining eine signifikante Steigerung der *Tbc1d1*-Expression nachzuweisen, welche unter PDTC-Einfluss allerdings nicht mehr zu beobachten war. In Bezug auf die Mhc-Typologie ähnlich aufgebaut ist der M. gastrocnemius, wobei PDTC alleine hier, wie auch im M. triceps brachii, in den beiden Nichtläufer-Gruppen einen inhibierenden Effekt auf die *Tbc1d1*-Expression zu haben schien, der bei gleichzeitigem Training wieder aufgehoben war.

Zusammengefasst ist somit festzuhalten, dass auch das *Tbc1d1*-Expressionsmuster für metabolische Muskelanpassung in Antwort auf das hier durchgeführte Trainingsprotokoll spricht, wobei zwischen den verschiedenen Muskeln große Unterschiede bestehen. Dabei scheint es für die Anpassungseffekte von großer Relevanz zu sein, ob der jeweilige Muskel grundsätzlich eher „oxidativ“ oder eher „glykolytisch“ geprägt ist. Zudem wurden bezüglich des PDTC-Effekts große Varianzen beobachtet, was darauf hindeuten könnte, dass auch die Rolle von NFκB bei der Regulierung der metabolischen Anpassung sehr stark vom jeweiligen Muskeltyp abhängen könnte.

5.3 Expression von Markern für Muskelaufbau in der Trainingsanpassung
Auch wenn keine große Zunahme an Muskelmasse stattfindet kommt es zu einem kontinuierlichen Muskelfaserumbau. Beschädigte Zellen werden ersetzt und auch eine Neusynthese von Zellen findet statt. Hierfür besitzt jeder Muskel einen Pool an sogenannten Satellitenzellen, die noch teilungsfähig und nur gering differenziert sind und in der Homöostase, bei Hypertrophie und auch Zellerneuerungen ihren Einsatz finden (Zammit, 2008). Zusätzlich werden permanent neue Proteine synthetisiert, welche in ihre funktionelle Form gefaltet werden müssen.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit befassten sich in diesem Zusammenhang auch mit einer möglichen Beteiligung von Chaperonen an der Trainingsanpassung des Skelettmuskels. Dies sind Proteine, die als Faltungshelfer am Ribosom den korrekten Aufbau und somit eine ungestörte Funktion von dort neusynthetisierten Proteinen koordinieren. Chaperone arbeiten in vielen Fällen eng mit dem UPS zusammen und eine Induktion der Expression von z. B. für Hitzeschockproteine, welche ebenfalls zu dieser Gruppe gehören, kodierenden Genen, konnte nach akutem Muskeltraining bereits mehrfach nachgewiesen werden (Milne&Noble, 2002). Die genauen Zusammenhänge und Regulationsmechanismen hierbei sind allerdings noch nicht abschließend bekannt.

5.3.1 Es zeigten sich divergierende Effekte auf α B-Crystallin auf Proteinebene

Bei der Faltung des Aktinfilaments mitwirkend ist das kleine Hitzeschockprotein α B-Crystallin, das bei steigenden Temperaturen im Zellkern und unter normalen Bedingungen im Zytoplasma der Zelle zu finden ist. Die Bedeutung von Cryab wurde bisher hauptsächlich nach akutem Muskeltraining untersucht. In einer Studie von 2019 konnten Jacko *et al.* dabei nachweisen, dass das Auffinden erhöhter Cryab-Proteinkonzentrationen stark abhängig von der Trainingsintensität ist. Die Muskelbiopsieentnahme erfolgte in dieser Studie 30 min nach

abgeschlossener Sporteinheit und es zeigte sich nur nach hoher Kraftanstrengung ein Effekt in den *Western Blot*-Analysen (Jacko *et al.*, 2019). In dem in dieser Arbeit beschriebenen Versuch wurden sowohl Untersuchungen auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene durchgeführt. Signifikante Ergebnisse ergaben sich in SDS-PAGE-Analysen im *M. flexor digitorum superficialis*, in welchem Training sowohl unter PDTC-Einfluss, als auch ohne zu einer Induktion von *Cryab* führte. Im *extensor carpi radialis*, ebenfalls einem Vordergliedmaßenmuskel, kam es nach Training allerdings zu einer signifikanten Abnahme der *Cryab*-Proteinkonzentration. Jacko *et al.*, 2019, variierten in ihren Versuchen auch die verschiedenen Arten an Belastung, wie Kraft- und Ausdauertraining, und die Trainingsintensität. Eine Induktion von *Cryab* fand in der von ihnen durchgeführten Studie unter allen Trainingsbedingungen in Mhc I-Fasern, jedoch nur bei Krafttraining auch in Mhc II-Muskelfasern statt (Jacko *et al.*, 2019).

Der *M. flexor digitorum superficialis* und der *M. extensor carpi radialis* weisen beide vorwiegend Mhc II-Fasern auf, wobei der *M. flexor digitorum superficialis* eine sehr hohe Anzahl an Mhc IIX-Fasern besitzt, die sich bei Trainingsanpassung am schnellsten in andere Fasertypen umwandeln können. Im Gegensatz zum *M. flexor digitorum superficialis* besitzt der *M. extensor carpi radialis* keine Mhc IIA-Fasern und besteht zu mehr als 60 % aus den schnellsten und am wenigsten ausdauernden Mhc IIB-Fasern. Als Ursache für die voneinander abweichenden Ergebnisse denkbar wäre, neben der etwas divergierenden Fasertypzusammensetzung, noch eine unterschiedlich erfolgte Belastung der Muskeln: Durch das Überwinden der Steigung und das physiologische Gangbild der Maus auf vier Gliedmaßen ist es durchaus möglich, dass Strecker und Beuger der Vordergliedmaße durch das Training unterschiedlich belastet wurden.

In den in dieser Arbeit durchgeführten qPCR-Analysen wurden im *M. extensor carpi radialis*, kongruent zu der gemessenen Proteinkonzentration, verringerte Werte für *Cryab* nach Training nachgewiesen, die hier allerdings keine Signifikanz erreichten. Im *M. soleus* konnte eine tendenzielle Zunahme der *Cryab*-Expression beobachtet werden, die aber nur im *M. triceps brachii*

(wieder ein Vordergliedmaßenmuskel), bei gleichzeitigem Einfluss von Training und PDTC, signifikantes Ausmaß erreichte. Dies stimmt mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein, die dafür sprechen, dass es nach Training zu keiner Veränderung der *Cryab*-Expression auf mRNA-Ebene kommt (Ogata *et al.*, 2009) und dass die Regulierung vermutlich posttranskriptionell erfolgt. Weitere Untersuchungen weisen dabei darauf hin, dass die entsprechenden Regulationsmechanismen auch auf der Entstehung von Muskelwärme und ROS durch Muskeltraining zurückzuführen sein könnten (Dimauro *et al.*, 2016).

5.3.2 Es waren nur geringe Effekte auf Hsp90 und Hsp70 auf mRNA-Ebene nachweisbar

Ebenfalls Hitzeschockproteine sind die Chaperone Hsp90 und Hsp70, die beide ubiquitär vorkommen und deren Bedeutung v. a. in ihrer katalytischen Wirkung auf andere Proteine liegen. Hsp70 ist hierbei gleichmäßig im Muskel verteilt, wohingegen Hsp90 seine Aufgabe im Bereich des Myosin-Filaments hat (Etard *et al.*, 2007). Verschiedene Studien zeigten eine Induktion von *Hsp70* nach Muskelschädigung durch exzessive Muskelbeanspruchung (Morton *et al.*, 2009, Paulsen *et al.*, 2009, Senf *et al.*, 2013). In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der mRNA-Konzentration von Hsp70 und Hsp90 konnte kein großer Effekt des absolvierten Trainings auf beide Marker nachgewiesen werden. Außer im *M. extensor digitorum longus*, der in trainierten Mäusen eine erniedrigte Konzentration beider Chaperone zeigte, führte Training fast immer zu einer nur geringgradigen Induktion der für diese beiden kodierenden Gene. Dies ist kongruent mit einer Laufbandstudie an Ratten von Milne und Noble aus 2002, die die Effekte von Training auf die *Hsp70*-Expression in Abhängigkeit der Trainingsintensität beschrieben. In diesen Untersuchungen ergaben sich ebenfalls Unterschiede bezüglich der Expression in verschiedenen Muskelfasern: In roten Muskelanteilen des *M. vastus lateralis* zeigten sich nach Training erhöhte Proteinkonzentrationen für Hsp70, in den weißen

Anteilen des gleichen Muskels hingegen nicht. Auch der „oxidative“ M. soleus reagierte mit einem eigenen Reaktionsmuster: Zunächst kam es durch Training zu einer vermehrten Hsp70-Proteinkonzentration, die aber bei höheren Belastungen sogar wieder rückläufig war (Milne&Noble, 2002). In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten kam es auf mRNA-Ebene im M. soleus zu einer signifikanten Induktion von *Hsp 90*, die allerdings unter Einfluss von PDTC nicht mehr zu beobachten war. Auch die gefundenen Konzentrationen der beiden Hitzeschockproteine im M. extensor digitorum longus waren besonders auffällig: In diesem „glykolytischen“ Hintergliedmaßenmuskel zeigten sich sogar gegenteilige Tendenzen: Die Expression der Gene für *Hsp70* und *Hsp90* war auf mRNA-Ebene nach Training in nicht-signifikantem Maße verringert.

Die Reaktionsmuster für Hsp70 und Hsp90 scheinen demnach stark abhängig vom untersuchten Muskel sowie vom Belastungs- und Untersuchungszeitpunkt zu sein und sich vorwiegend auf Proteinebene abzuspielen.

Für Hsp70 ist ebenfalls beschrieben, dass es in seiner extrazellulären Form an Entzündungsvorgängen mitwirkt: Ein wahrscheinlicher Bindungspartner ist RAGE, der sogenannte „*receptor for advanced glycation endproducts*“, der über den MAPK-Signalweg zur Aktivierung von NFκB führt. Dies wiederum hat die Freisetzung von Zytokinen zur Folge (Somensi *et al.*, 2017). Auch Hsp90 aktiviert NFκB, was man sich z. B. bei Einsatz von Medikamenten mit Anti-Hitzeschockprotein-Wirkung zunutze macht (Thangjam *et al.*, 2016). In den in dieser Arbeit gewonnenen Versuchsergebnissen waren die Effekte unter Einfluss von PDTC, also bei blockierter NFκB Wirkung, allerdings unverändert in ihrer Ausprägung.

5.3.3 Training und PDTC zeigten einen synergistischen Einfluss auf das Chaperon Unc45b

Eine Co-Chaperon-Wirkung ist u. a. für Hsp90 und Unc45b beschrieben.

Die Daten dieser Arbeit zeigten Effekte auf Unc45b, die v. a. unter PDTC-Einfluss stattfanden. Hier war auf mRNA-Ebene im *M. extensor digitorum longus* eine Reduktion der *Unc45b*-Expression nachzuweisen. Diese war auch unter Training alleine induziert, erreichte aber erst bei Zugabe von PDTC signifikantes Ausmaß. Im *M. soleus* kam es zu gegensätzlichen Effekten: *Unc45b* zeigte sich unter Training etwas verstärkt induziert, was ebenfalls bei PDTC-Zugabe Signifikanz erreichte. Auf Proteinebene konnte im SDS-PAGE-Verfahren im *M. rectus femoris* sowie etwas geringer ausgeprägt im *M. triceps brachii* ebenfalls eine Induktion bei PDTC und Trainingsreiz nachgewiesen werden, wohingegen die Proteinkonzentration im *M. gastrocnemius* bei gemeinsamer Wirkung von Training und PDTC deutlich sank.

Eine direkte Regulierung von Unc45b durch NFκB ist bisher nicht bekannt. Da es keine reinen PDTC-Auswirkungen gab, die Veränderungen aber unter PDTC eindeutiger ausfielen, scheint dieser Effekt vor allem im Zusammenhang mit Training wichtig zu sein.

Unc45b gilt als wichtigstes Chaperon im Muskel für die Kontrolle von Myosinaufbau

und -funktion. Entdeckt wurde es zunächst im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und ist bisher hauptsächlich in diesem, im Zebrafisch und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* erforscht. In höheren Organismen ist Unc45b v. a. für die Myosinreifung während der Muskelentwicklung (Srikakulam&Winkelmann, 2004) und für die Kontrolle der korrekten Myosinfunktion, zusammen mit dem bereits zuvor beschriebenen Hitzeschockprotein Hsp90 und der UPS-Ligase Ufd2, von Bedeutung (Hellerschmied *et al.*, 2019). Als Chaperon schützt es Myosin unter Stressbedingungen vor Abbauprozessen (Lee *et al.*, 2014). Über eine Rolle des Proteins während der physiologischen Muskelfunktion oder der Trainingsanpassung ist bisher nichts bekannt. Die Erkenntnisse dieser Arbeit

geben erste Hinweise auf eine Regulierung von *Unc45b* durch Ausdauertraining und eine mögliche Beteiligung des NF κ B-Signalwegs an diesem Effekt, was in weiterführenden Analysen genauer untersucht werden sollte.

5.3.4 Training führte zu einer leichten Induktion von *skNac*, zeigte aber keinen Einfluss auf das Chaperon *Smyd1*

Verschiedene Versuche haben die Bedeutung von *skNac* für die Myoblastenmigration und Sarkomerogenese gezeigt (Berkholz *et al.*, 2013). Gendefiziente Mäuse weisen zudem deutlich reduzierte Myosinkonzentrationen in den Muskelzellen und ein Fehlen der roten Muskelfasern auf (Park *et al.*, 2010). In Zellkulturversuchen konnte ein Einfluss von *skNac* auf die Ausbildung einer korrekten Sarkomerogenese nachgewiesen werden: Obwohl nach *skNac*-Depletion die absoluten Mengen an Aktin und Myosin in der Muskelzelle nicht beeinträchtigt waren, zeigte sich ein ungeordneter Aufbau der Fasern (Berger *et al.*, 2012, Berkholz *et al.*, 2018). Zudem ist ein wichtiger Bindungspartner von *skNac* das Protein *Smyd1*, welches sowohl als Methyltransferase agieren kann, als auch die Deazetylierung von Histonen vermittelt. Diese Fähigkeiten legen eine Rolle als transkriptioneller Regulator nahe. Bisher wurde dies allerdings hauptsächlich in Zellkulturversuchen und in transgenen Organismen untersucht. Über die physiologische Bedeutung von *skNac* und *Smyd1* bei der Trainingsanpassung des Skelettmuskels ist bisher nichts bekannt.

In den in dieser Arbeit nach Ausdauertraining untersuchten Muskelproben konnte auf mRNA-Ebene keine deutliche Regulierung von *Smyd1* durch Training oder PDTC nachgewiesen werden. Es zeigte sich auf mRNA-Ebene lediglich eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der *Smyd1*-Expression im *M. soleus* durch Training. Auf Proteinebene waren die detektierten Effekte in allen untersuchten Muskeln ebenfalls sehr gering, wobei sich eine tendenzielle Induktion nach Training im *M. extensor digitorum longus*, im *M. soleus* und im *M. extensor carpi radialis* zeigte. Für *skNac* hingegen

konnte in qPCR-Analysen eine eindeutige trainingsbedingte Induktion im „glykolytischen“ M. gastrocnemius und im M. extensor digitorum longus beobachtet werden, die in Ersterem auch signifikante Ausmaße erreichte.

Versuche von Stewart *et al.*, 2016, mit *Smyd1-knock out*-Mäusen zeigten in unterschiedlichen untersuchten Muskeltypen jeweils ähnliche basale Konzentrationen des Proteins. In schnell-kontrahierenden Muskelfasern war die auftretende Hypotrophie der Muskelfasern und der regional gestörte Faseraufbau allerdings stärker ausgeprägt als in langsam-kontrahierenden Fasern (Stewart *et al.*, 2016). Dies legt eine faserspezifische Bedeutung von *Smyd1* nahe, welcher eventuell spezifische Funktionen des skNac-*Smyd1*-Dimers zugrundeliegen. In diesem Zusammenhang ist die Tatsache interessant, dass im Rahmen dieser Arbeit eine deutliche trainingsinduzierte *skNac*-Induktion nur im „glykolytischen“ M. gastrocnemius beobachtet wurde. Somit scheinen skNac und *Smyd1* in schnell-kontrahierenden Muskeltypen größeren Einfluss bezüglich der Trainingsanpassung zu haben.

5.3.5 Ausdauertraining führte zu keiner Induktion von *Myomesin1*, -2 und -3, die Konzentrationen schienen aber unter PDTC-Einfluss leicht erhöht

Als Bestandteil der M-Linie im Sarkomer dient Myomesin als Verankerung der dicken Filamente Myosin und Titin (Obermann *et al.*, 1996) und ist an der Kontrolle des Sarkomerauf- und -umbaus beteiligt. Das Protein ist ausschließlich in quergestreifter Muskulatur zu finden, wobei Myomesin1 ubiquitär in allen quergestreiften Muskeln nachgewiesen wurde, Myomesin2 v. a. im Herzmuskelgewebe adulter Säugetiere und in schnell kontrahierenden Skelettmuskelfasern und Myomesin3 in mittelschnellen Skelettmuskelfasern (Schoenauer *et al.*, 2008).

Die für Myomesin1, -2 und -3 kodierenden Gene zeigten im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen kein verändertes Expressionsmuster auf mRNA-Ebene für den Reiz Training alleine. Für *Myomesin1* im M. triceps brachii konnte eine klare Induktion bei

gleichzeitigem Einfluss von sowohl Training als auch PDTC beobachtet werden. Bei Zusammenwirken dieser beiden Faktoren kam es im M. gastrocnemius ebenfalls zu einer leichten Induktion, die sowohl für *Myomesin1* als auch -2 und -3 nachzuvollziehen war.

Für *Myomesin2* konnte eine tendenzielle geringgradige Zunahme der Expression nach Training in allen untersuchten Muskeln nachvollzogen werden. Die mRNA-Konzentration von *Myomesin3* schien in den meisten untersuchten Muskeln durch PDTC geringgradig erhöht, was sich bei zusätzlichem Training noch etwas verstärkt. Ein direkter Einfluss von NFκB auf Myomesine ist nicht bekannt, die Ergebnisse dieser Arbeit könnten aber durchaus eine Relevanz in dieser Richtung andeuten.

5.3.6 Ausdauertraining führte zu einer Induktion von *Akt1*

Ein Signalweg mit großer Bedeutung für die Proteinsynthese ist der mTor/Akt-Signalweg. Moriya und Miyazaki führten 2018 ein Experiment durch, bei dem chirurgisch der M. gastrocnemius und der M. soleus in den Hintergliedmaßen der Mäuse entfernt wurde, was zu einer Überbelastung des im Weiteren untersuchten M. plantaris führte. In Akt-defizienten Mäusen blieb die zu erwartende Hypertrophie in diesem Muskel aus, was auf eine verminderte Satellitenzellproliferation zurückzuführen war. Hierbei fand allerdings keine Beeinflussung der Proteinsynthese über mTor statt (Moriya&Miyazaki, 2018). Obwohl Akt ein bekannter Aktivator von mTor ist, kann es also auch noch auf anderem Wege den Muskelaufbau unterstützen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Konzentration von Akt1 in trainierten Mäusen untersucht: Besonders ausgeprägt zeigte sich eine Induktion des *Akt1*-Gens im M. triceps brachii und im M. soleus nach Training. Auch im M. extensor digitorum longus war eine deutliche trainingsbedingte Expressionszunahme von *Akt1* zu beobachten, erreichte hier aber keine Signifikanz. V. a. im M. triceps brachii schien auch PDTC einen fördernden Einfluss zu haben. Im Gegensatz zu den anderen Muskeln sank die Konzentration an Akt1 im M. gastrocnemius nach

Training ab, unabhängig von der Behandlung mit PDTTC. Dieser Effekt war allerdings ebenfalls nicht signifikant.

Da eine Induktion des *Akt/mTor*-Signalwegs bei Zuständen der Hypertrophie beschrieben ist, ist die in dieser Arbeit gefundene Expressionserhöhung passend zu den Resultaten anderer Studien (Bodine *et al.*, 2001). Für Akt ist ebenfalls eine hemmende Wirkung auf den Transkriptionsfaktor Foxo beschrieben, welcher für die Bildung der E3-Ligase Atrogin1 hauptverantwortlich ist. Im M. triceps brachii und im M. soleus, die wie zuvor beschrieben eine trainingsbedingte Induktion von *Akt1* zeigten, fand passenderweise keine Induktion des *Foxo1*-Gens auf mRNA-Ebene durch Training statt. Andere Muskeln zeigten hier durchaus eine gesteigerte Expression (vgl. 5.4.1).

Ebenfalls im Zusammenspiel mit Akt arbeitet die E3-Ubiquitinligase Traf6. Unter physiologischen Bedingungen ist Akt hauptsächlich im Zytosol der Zelle zu finden. Für die Aktivierung durch z. B. Wachstumsfaktoren ist aber eine Translokation zur Plasmamembran notwendig. Yang *et al.* konnten nachweisen, dass eine Ubiquitinierung von Akt die Grundvoraussetzung für diese Membranaffinität und die nachfolgend mögliche Phosphorylierung ist. Hauptverantwortlich hierfür ist Traf6 (Yang *et al.*, 2009). Die in dieser Arbeit untersuchten Traf6-Proteinkonzentrationen zeigten im Vordergliedmaßenmuskel M. extensor carpi radialis eine signifikante Steigerung durch den Trainingsreiz, welche sich aber auch in den meisten anderen untersuchten Muskeln nachvollziehen ließ (vgl. 5.4.1). Auch dies ist hinweisend auf eine mögliche Beteiligung von Akt am Muskelumbau.

5.4 Erhöhte Konzentration von Markern des Muskelabbaus nach Lauftraining

Jegliche Art des körperlichen Trainings induziert eine Vielzahl von Anpassungsreaktionen im gesamten Organismus und insbesondere auch im Skelettmuskel. Hierfür müssen nicht nur zahlreiche Proteine neu aufgebaut, sondern auch viele abgebaut werden (Dohm *et al.*, 1987). Eine in dieser

Arbeit aufgestellte These war, dass das UPS maßgeblich an diesem Vorgang beteiligt ist.

5.4.1 Training zeigte einen Einfluss auf die Expression von Genen, die für Komponenten des UPS kodieren

Das UPS umfasst eine Vielzahl von Ligasen, u. a. *Stub1* und *Ufd2*, beides E3-RING-finger-Ligasen. Gemeinsam sind diese beiden sogar zur Polyubiquitinierung ihrer Zielproteine fähig. Für *Stub1* zeigte sich v. a. im M. extensor digitorum longus ein deutliches Absinken der Expression nach Training, welche auch in den anderen untersuchten „glykolytischen“ Muskeln nachvollzogen werden konnte und im „oxidativen“ M. soleus nur unter Wirkung von PDTC deutlich ausgeprägt war. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei *Ufd2* ein ganz anderes Expressionsmuster: Hier führte Training zu einer Induktion, die v. a. im M. extensor digitorum longus deutlich wurde, in dem auch PDTC einen fördernden Effekt hatte. Da *Ufd2* nicht eigenständig die Ubiquitinierung einleiten kann, ist es auf andere Mitglieder des UPS angewiesen (Koegl *et al.*, 1999).

Die E3-Ubiquitinligase *Nedd4* wirkt v. a. über die Hemmung von Wachstumsfaktoren (Morrione *et al.*, 1999) und beeinflusst die korrekte Nervenausbildung (Yang&Kumar, 2010). Auch hier konnte im M. soleus eine deutliche, im M. triceps brachii zumindest eine tendenzielle Induktion des entsprechenden Gens nachgewiesen werden, die unter PDTC in ersterem Muskel auch Signifikanz erreichte. Es existieren sehr wenige Studien über die Expression von *Nedd4* unter nicht-krankhaften Bedingungen. Eine klare Induktion wird nach Denervation und Muskelatrophie durch Inaktivität beobachtet, wofür die Interaktion mit dem Protein Notch1 entscheidend ist. Bei Muskelabbau aufgrund von Diabetes oder durch Hunger konnte allerdings keine *Nedd4*-Induktion beobachtet werden (Koncarevic *et al.*, 2007). Umso interessanter ist es, dass im Kontext dieser Arbeit eine verstärkte Expression bereits im physiologischen Muskelumbau aufgezeigt werden konnte.

Der Transkriptionsfaktor Foxo1 wurde auf RNA-Ebene untersucht. Auch hier war eine durch Training induzierte verstärkte Expression des entsprechenden Gens festzustellen, die sich v. a. im M. extensor digitorum longus niederschlug. Foxo1 ist ein bekannter Aktivator der E3-Ligasen Murf1 und Atrogin1 (Milan *et al.*, 2015). Die Atrogin1-Konzentration wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst auf Proteinebene untersucht und zeigte hierbei eine deutliche trainingsinduzierte Steigerung im M. tibialis, die etwas geringer ausgeprägt auch im M. triceps brachii und im M. soleus zu beobachten war. Auf mRNA-Ebene konnten dagegen keine signifikanten Effekte auf Atrogin1 und Murf1 nachgewiesen werden. Die in Bezug auf Atrogin1 und Murf1 beobachteten Trends entsprachen sich allerdings auffällig: So kam es im M. gastrocnemius und im M. soleus zu einer leichten trainingsbedingten Zunahme beider Marker, wohingegen die Expression beider Gene im M. extensor digitorum longus eher vermindert war.

Traf6 ist ein Protein, das NFκB direkt und indirekt beeinflussen kann und eine nachfolgende Muskelatrophie vermittelt (Kumar *et al.*, 2012). In *Western Blot*-Analysen zeigte sich in den meisten im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Muskeln eine leichte Induktion der *Traf6*-Expression durch Training, die im M. extensor carpi radialis sogar signifikante Ausprägung erreichte. Oghbaei *et al.* führten 2017 eine Laufbandstudie mit Ratten durch, bei denen durch die Gabe von Streptozocin ein Diabetes induziert wurde. Nach 60-tägigem Training konnte im Nierengewebe der Läufer ohne Diabetes eine Zunahme an Traf6 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, die im Gewebe der Tiere mit zusätzlich bestehender Diabeteserkrankung signifikantes Ausmaß erreichte (Oghbaei *et al.*, 2017). Dies stimmt mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen überein, die eine potentielle Beteiligung von Traf6 in der Trainingsanpassung andeuten.

In einem bestimmten Maße wird der Abbau von Muskelgewebe und -protein benötigt, um neuen Muskel anderer Eigenschaften aufbauen zu können und ist somit wünschenswert, ein überschießender Abbau würde allerdings zur Atrophie führen. Viele Studien haben sich bereits mit der Beteiligung von Traf6, Atrogin1 und Murf1 bei der tumor- und hungerassoziierten Kachexie

beschäftigt. Allerdings haben bisher nur wenige Autoren die Rolle des UPS bei der physiologischen Muskelanpassung an Training evaluiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten hier durchaus eine Relevanz an.

5.4.2 Training und PDTC führten zu einer Induktion von *Rip2*

Unabhängig vom UPS agiert das Protein Rip2, wobei es ähnliche Folgen vermittelt. Über mehrere Signalwege vermittelt Rip2 die Aktivierung von NFκB (Thome *et al.*, 1998, Inohara *et al.*, 1998) sowie die Einleitung der Apoptose und kann die Immunantwort modulieren (Magalhaes *et al.*, 2011). Die Überexpression von *Rip2* führt nachweislich zu Apoptose und Zelltod. Dies wird unter anderem über Traf6 vermittelt, das Bestandteil des Ubiquitin-Proteasom-Systems ist (vgl. 5.4.1).

Auf RNA-Ebene konnte im Rahmen dieser Arbeit eine klare Induktion von *Rip2* in Antwort auf Training und auch PDTC im M. gastrocnemius beobachtet werden. Eine Induktion der *Rip2*-Genexpression durch NFκB ist beschrieben und wird über Zytokine vermittelt (Yin *et al.*, 2010). Studien zeigen, dass es bei akutem Muskeltraining zunächst zu einer vermehrten Ausschüttung bestimmter Zytokine kommt (Pedersen&Febbraio, 2008, Peake *et al.*, 2015, Sugama *et al.*, 2015), wohingegen sich die Konzentration von Entzündungsmediatoren unter regelmäßigem Ausdauertraining, wie es im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, wieder vermindert (Bjornstad *et al.*, 2008). Ein Einfluss von Zytokinen als Ursache für die beobachtete trainingsbedingte Induktion von Rip2 ist daher eher unwahrscheinlich.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten stellte sich die *Rip2*-Induktion im M. gastrocnemius ebenfalls unter Gabe von PDTC dar und im M. triceps brachii war ein Trainingseffekt ebenfalls nur unter Einfluss von PDTC sichtbar. Auch für Rip2 ist die Aktivierung von NFκB nachgewiesen, daher ist die Expressionsänderung des entsprechenden Gens unter PDTC von großem Interesse. Da PDTC zu einer Hemmung von NFκB führt, könnte die erhöhte Rip2-Konzentration als kompensatorischer Effekt erklärt werden. Versuche zur tumorassoziierten Kachexie von Nai aus dem Jahr 2007 zeigen,

dass PDTC ebenfalls hemmend auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie z. B. IL-6 wirkt. Diese Versuche konnten positive Effekte von PDTC sowohl auf Tumorgroße, Gesamtkörpergewicht und auch Gewicht des M. gastrocnemius der Versuchsmäuse zeigen (Nai *et al.*, 2007). Auch dies unterstützt die These, dass Zytokine keinen Einfluss auf die in diesem Versuch beobachtete Induktion von *Rip2* haben.

5.4.3 Training führte zu einer stärkeren Modulation des ubiquitären Calpain1 als es in der Muskelform Calpain3 bewirkte

Nicht dem UPS zugehörig, aber am Abbau von Zellen beteiligt, sind Calpaine. Calpain1 ist hierbei eine Cystein-Protease, die in allen Zelltypen zu finden ist und mit Apoptose und Myogenese in Zusammenhang gebracht wird (Goll *et al.*, 2008). *Calpain3* ist hingegen hauptsächlich in Skelettmuskelgewebe exprimiert und hat Aufgaben im Bereich des Sarkomerumbaus. Die Konzentration im Muskelgewebe ist dabei etwa um das zehnfache höher als die der ubiquitären Form Calpain1 (Sorimachi *et al.*, 1989).

Versuche in der Humanmedizin, in denen eine einzelne anstrengende Trainingseinheit von 2,5-3,5 Stunden Dauer auf dem Fahrrad durchgeführt wurde, zeigten keine Beeinflussung der Calpainkonzentration im beanspruchten M. vastus lateralis (Murphy *et al.*, 2006). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Laufbandexperimenten konnte dagegen gezeigt werden, dass das ubiquitär exprimierte *Calpain1* in Antwort auf das mehrwöchige Lauftraining induziert wurde, was bei gleichzeitigem Einsatz von PDTC im M. soleus sogar Signifikanz erreichte. Auch im M. triceps brachii konnten die gleichen Tendenzen nachvollzogen werden. Für *Calpain3* waren diese Veränderungen dagegen im M. soleus deutlich schwächer ausgeprägt und in den anderen Muskeln gar nicht vorhanden. Training alleine schien sogar eher einen reduzierenden Effekt auf die Calpain3-Konzentration zu haben. Interessanterweise gab es allerdings durch Training im M. soleus und im M. gastrocnemius eine klare Induktion von

Calpastatin, welches für einen Calpain1-Inhibitor kodiert. Gewebeassoziiertes Calpastatin weist vier sich wiederholende Domänen auf, die jeweils ein ubiquitäres Calpain-Molekül binden können (De Tullio *et al.*, 2018). Umso mehr Bedeutung gewinnt die deutliche Induktion durch Training, da bereits mit geringen Veränderungen der Menge des Inhibitors eine große Anzahl an Substratproteinen abgedeckt werden kann. Kongruent zur Induktion von *Calpastatin* ist auch die stärkere Beeinflussung von Calpain1 im Gegensatz zu Calpain3, da Calpastatin keinen Einfluss auf die skelettmuskelspezifische Variante Calpain3 hat.

Da sich bisherige Untersuchungen auf die Beteiligung von Calpain an krankhaften Zuständen konzentriert haben, ist es durchaus bemerkenswert, dass auch bei Ausdauertraining eine Regulierung von Calpain stattfindet und auch, dass diese für die ubiquitäre Form deutlicher ausfällt als für die skelettmuskelspezifische Variante Calpain3. Die Aufgaben von Calpain1 liegen in der Myogenese und Apoptose und weniger im Sarkomerumbau, wie es bei Calpain3 der Fall ist (Berkholz *et al.*, 2013). Demzufolge kann man davon ausgehen, dass das hier verwendete Trainingsprogramm auch einen Einfluss auf die beiden zuerst genannten Prozesse hatte.

Ein regulatorischer Zusammenhang könnte auch zwischen dem zuvor beschriebenen Smyd1-skNac-Komplex und den Calpain-Proteasen bestehen: Versuche zeigten, dass eine Hemmung der *skNac*-Expression zu einer erhöhten *Calpain1*-Expression führt, wodurch verschiedene Prozesse der Skelettmuskelplastizität in Anpassung an das Training reguliert werden könnten, insbesondere die Sarkomerogenese und die Migration von Satellitenzellen (Berkholz *et al.*, 2013). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass im Rahmen dieser Arbeit lediglich im „oxidativen“ M. soleus eine Induktion von *Calpain1* durch Training zu beobachten war. In diesem Muskel zeigte sich skNac nach Training tatsächlich etwas erniedrigt, wobei diese Veränderung keine Signifikanz erreichte. Dies legt ebenfalls eine faserspezifisch unterschiedliche Regulierung des Calpainwegs durch skNac-Smyd1 nahe, was für die

Anpassung des Muskels an unterschiedliche Trainingsformen von Bedeutung sein könnte.

5.5 Bedeutung von NFκB für die Muskelfaseranpassung an Training

Eine wichtige Frage, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beantwortet werden sollte, betraf die Bedeutung des NFκB-Signalwegs bei der Muskelanpassung. Hierfür wurde einer Gruppe von Mäusen der NFκB-Inhibitor PDTC über das Trinkwasser verabreicht. PDTC verhindert die Abspaltung des inhibitorisch wirkenden IκBα von NFκB, wodurch dieses nicht aus dem Plasma der Zelle in den Zellkern translozieren und dort seine Wirkung entfalten kann.

Moderates Training kann den fortschreitenden Muskelabbau unter krankhaften Bedingungen, wie zum Beispiel einem Diabetesleiden, vermindern. Unter exzessiver Belastung kommt es durch NFκB-Vermittlung allerdings zur Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems und somit zur verstärkten Atrophie (Liu&Chang, 2018). Stresszustände im Muskel führen unter anderem auch zur Aktivierung von Entzündungsmediatoren; Dies erklärt, warum der Einsatz von Entzündungshemmern, wie z. B. den pflanzlichen Isoflavonen, die UPS-vermittelte Atrophie teilweise hemmen kann. Auch dies wird u. a. durch die Blockierung von NFκB vermittelt (Hirasaka *et al.*, 2013).

Muskeltraining führt zur Aktivierung der Ampk (Birk&Wojtaszewski, 2006, Dreyer *et al.*, 2006, Koopman *et al.*, 2006), welche wiederum NFκB (Hattori *et al.*, 2006) und mTor (Inoki *et al.*, 2003) hemmt und somit einer krankheitsbedingten Muskelatrophie entgegen wirkt. Akut kommt es durch Muskelkontraktion aber zu einer Erhöhung der NFκB-Aktivität (Kim *et al.*, 2009, Cuevas *et al.*, 2005), die vermutlich als Reaktion auf eine vermehrte Bildung von ROS zurückzuführen ist. Bei wiederholtem Training kann dieser moderate wiederkehrende zelluläre Stress zu einer verbesserten Anpassung und somit zu einem Schutz vor Zuständen chronisch erhöhter ROS-Konzentrationen führen (Kramer&Goodyear, 2007, Gomez-Cabrera *et al.*,

2008). D. h., auch wenn Training kurzfristig zu einem Stresszustand in der Zelle führt, der sich durch eine Erhöhung von NF κ B und ROS ausdrückt, kommt es durch diese wiederkehrende Situation bei Ausdauertraining zu einer Anpassung des Muskels und einer verbesserten Reaktion auf ebendiesen Stress: Antioxidative Enzyme werden gebildet und übermäßige ROS und aktiviertes NF κ B wird gehemmt, ein Zustand, der v. a. bei der Prävention chronischer Erkrankungen wie Diabetes wünschenswert ist. Versuche konnten z. B. auch eine deutlich verminderte Herzinfarktgröße nach vorangegangener PDTC-Gabe zeigen (Pfeilschifter *et al.*, 2010).

Die Wirkung von PDTC unterscheidet sich in verschiedenen Geweben: Im Skelettmuskel erscheint dabei insbesondere eine Beeinflussung des Mapk- und Akt-Signalwegs zum Erhalt der Muskelmasse bedeutsam (Miao *et al.*, 2017). Obwohl sich die Forscher einig sind, dass PDTC eine bedeutende Wirkung auf das Krankheitsbild der tumorbedingten Kachexie hat und somit eine große Rolle beim Muskelumbau spielt, sind die genauen Wege, auf denen dieses geschieht, noch immer unklar und vermutlich durch das Zusammenspiel mehrerer Faktoren beeinflusst.

5.5.1 PDTC zeigte keine Effekte auf die I κ B α -Konzentration im Muskel
Um die Rolle von NF κ B bei der Trainingsanpassung untersuchen zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der NF κ B-Inhibitor PDTC eingesetzt, der direkt die Abspaltung von I κ B α von NF κ B verhindert und dadurch I κ B α stabilisiert. Somit hätten nach PDTC-Behandlung höhere I κ B α -Konzentrationen im Muskel beobachtet werden sollen. Um dies zu überprüfen, wurde die Proteinkonzentration von I κ B α im Muskelgewebe anhand von SDS-PAGE analysiert. Im M. flexor digitorum superficialis schien sowohl Training als auch PDTC zu einer geringen Erhöhung von I κ B α zu führen, dieser Effekt erreichte allerdings keine signifikante Ausprägung. In allen anderen untersuchten Muskeln gab es keine klaren Veränderungen der I κ B α -Konzentration unter PDTC-Einfluss und auch nicht durch das absolvierte Ausdauertraining. Eine Ursache hierfür könnte die Tatsache sein,

dass die eingesetzte Konzentration von PDTC im Trinkwasser eher niedrig im Vergleich zu anderen etablierten Versuchsprotokollen gewählt wurde. Des Weiteren muss auch die Frage nach der adäquaten Messmethode gestellt werden. SDS-PAGE-Analysen sind in der Auswertung recht fehleranfällig und nur deutliche Varianzen zwischen den verschiedenen Gruppen können mit dieser Methode eindeutig dargestellt werden. Liegt im Muskel z. B. nur eine geringe NFκB-Aktivität vor und die Konzentration an IκBα ist bereits im Grundzustand sehr hoch, so kann eine Änderung nicht immer ersichtlich werden. Zudem ist auch die Gruppengröße mit n=4 recht klein gewählt, was ebenfalls zur Fehleranfälligkeit der Methode beiträgt.

Aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen Effekte auf physiologischer und metabolischer Ebene der Mäuse scheint dennoch durchaus eine Wirkung des Hemmstoffs im Organismus stattgefunden zu haben.

Andere Experimentatoren konnten eine Beeinflussung der IκBα-Konzentration auch durch erfolgtes Muskeltraining nachweisen. Song *et al.* führten 2006 ein Laufbandtraining mit Ratten durch und konnten erhöhte Konzentrationen an phosphoryliertem IκBα im M. gastrocnemius nach Training nachweisen (Song *et al.*, 2006). In einer Studie von Lee *et al.*, 2015, wurden erhöhte IκBα-Proteinkonzentrationen dagegen nur nach großer Belastung im Muskel nachgewiesen. Ein moderates Laufbandtraining führte in den Versuchsmäusen zu keiner Veränderung der Expression (Lee *et al.*, 2015). Auch das Alter hat einen Einfluss auf die gefundenen Werte: So wurde in älteren Tiere eine geringere NFκB- und auch IκBα Konzentration gefunden, als im Muskelgewebe jüngerer Ratten (Song *et al.*, 2006).

6 Zusammenfassung

Die positiven Effekte von körperlichem Training bei der Prävention verschiedenster Krankheiten sind von großer Bedeutung und Gegenstand zahlreicher Studien. Sie beruhen auf Anpassungsreaktionen des Körpers, speziell auch der Skelettmuskulatur und erfolgen auf zahlreichen Ebenen.

Hierfür ist einerseits die Neusynthese und Faltung einer Vielzahl spezifischer Proteine erforderlich, andererseits auch ein kontrollierter Proteinabbau. Eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen spielen sogenannte molekulare Chaperone sowie Proteinabbausysteme wie das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), die durch verschiedene übergeordnete Signalwege, insbesondere den Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NFκB), kontrolliert werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, zu analysieren, zu welchen Anpassungsreaktionen ein zehnwöchiges regelmäßiges Lauftraining in der murinen Skelettmuskulatur führt. Dabei sollte ein besonderer Fokus auf metabolischen Anpassungsreaktionen, insbesondere der Fasertypspezifizierung, sowie der Regulation von Genen liegen, die für molekulare Chaperone und Komponenten des UPS kodieren. Zudem sollte der Einfluss des Transkriptionsfaktors NFκB auf die muskuläre Anpassung untersucht werden, indem einem Teil der Mäuse der NFκB-Inhibitor PDTC (Pyrrolidindithiocarbamat) verabreicht wurde. Die NFκB-Hemmung konnte in Skelettmuskelpunkten nicht direkt nachgewiesen werden, wenngleich, wie nachfolgend dargestellt, die PDTC-Behandlung zahlreiche muskuläre Anpassungsreaktionen beeinflusste. Diese sind also ggf. auf alternative Wirkmechanismen des PDTCs, z. B. seine Eigenschaften als Antioxidans und Radikalfänger, zurückzuführen.

Insgesamt belegen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Anpassung der Mäuse an das Training auf verschiedenen Ebenen. Ein physiologischer Parameter in diesem Zusammenhang ist die erniedrigte Ruheherzfrequenz der Läufergruppe, die unter PDTC, aus bisher noch unklaren Gründen, sogar noch niedriger war. Auffällig war zudem ein vermindertes Gesamtgewicht der Mäuse, die ein Lauftraining unter PDTC-Behandlung absolviert hatten, im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Dabei ließ sich allerdings nicht nachweisen, dass der detektierte Gewichtsunterschied auf eine unterschiedliche Muskelmasse zurückzuführen war. Untersuchungen zur Expression von Genen, die für fasertypspezifische „langsame, oxidative“ oder „schnelle, glykolytische“ Myosine kodieren, zeigten in den

„glykolytischen“ Muskeln v. a. eine Zunahme an „intermediären“ *Myosin-heavy-chain* (Mhc) IIA-Fasern in den trainierten Gruppen. Im „oxidativen“ M. soleus war ein Zuwachs dieser Fasern nur durch fasertypspezifische Färbemethoden nachzuvollziehen, bei relativer Verringerung der Mhc I-Fasern. Dies ist, wie in Antwort auf ein Ausdauertraining zu erwarten, insgesamt eher ein Signal in eine „oxidative“ Richtung, welches im M. soleus, der bereits im Grundzustand eine deutlich „oxidativere“ Zusammensetzung aufweist, geringer ausfiel. Auch für weitere metabolische Marker wurde eine differentielle Expression in Antwort auf das Training gefunden: Das für die Zitratsynthase, einen Marker für „oxidativen“ Muskelstoffwechsel, kodierende Gen, war im M. gastrocnemius induziert. *Tre-2/Bub2/Cdc16 domain family member 1 (Tbc1d1)* hingegen spiegelt das „glykolytische“ Potential eines Muskels wider und war im M. gastrocnemius reduziert, aber im M. soleus und im M. extensor digitorum longus induziert. Ein Effekt von PDTC war in keiner dieser Untersuchungen zu verzeichnen. Weiterhin konnte eine differentielle Expression zahlreicher Gene, die für molekulare Chaperone und andere muskelaufbauende Prozesse kodieren, in Antwort auf das Training nachgewiesen werden. Die Expression der für Calpastatin und *uncoordinated mutant number 45b* (Unc45b) kodierenden Gene zeigte unter Einfluss von PDTC klare Effekte, wobei diese für das Chaperon Unc45b widersprüchlich waren: Im M. extensor digitorum longus war eine Reduktion, im M. soleus eine Induktion nachzuweisen, die sich jeweils bei gleichzeitigem PDTC-Einfluss verstärkte. Auch auf Proteinebene ergab sich für den M. rectus femoris und M. triceps brachii eine Induktion bei gleichzeitiger PDTC-Behandlung. Da sich die meisten der Effekte unter PDTC deutlich verstärkten, scheint dieses einen Signaltransduktionsweg zu hemmen, der die Expression der Gene vermittelt, die für die untersuchten molekularen Chaperone kodieren. Auf der anderen Seite fanden sich nur geringe Auswirkungen des Trainings auf die für die Hitzeschockproteine *heat-shock protein 90* (Hsp90), *heat-shock protein 70* (Hsp70) und alpha B-Crystallin (Cryab) kodierenden Gene.

Eine weitere Frage galt der Beteiligung von Abbauprozessen, insbesondere dem UPS bei Anpassungsreaktionen an Ausdauertraining. Es konnte eine Induktion von *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (Traff6)*, *Forkhead box class O (Foxo1)*, *neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4 (Nedd4)*, *Ubiquitin fusion degradation protein 2 (Ufd2)* und *Calpain1* in Antwort auf das Training nachgewiesen werden, wobei die Ausprägung der Veränderungen abhängig von dem jeweils untersuchten Muskeltyp war. Die *stress-induced phosphoprotein 1 homology and U-box containing protein 1 (Stub1)*-Konzentration war dagegen vermindert.

Zusammenfassend konnte somit eine differentielle Expression zahlreicher Gene, die für metabolische Faktoren, Komponenten proteinabbauender Systeme und molekulare Chaperone kodieren, in Antwort auf das Training gezeigt werden. Die Effekte waren allerdings in vielen Fällen sehr stark von der Natur des jeweils betrachteten Muskels abhängig, ein Aspekt, dem in zukünftigen Studien zur Trainingsanpassung der Skelettmuskulatur deutlich mehr Beachtung geschenkt werden sollte.

7 Summary

The positive effects of endurance exercise are of great importance in the prevention of various diseases and subject to numerous studies. They are based on specific adaptation reactions of the body, particularly of skeletal muscle, and occur at various levels. On the one hand, this requires the *de novo* synthesis and folding of a multitude of specific proteins, on the other hand, controlled protein degradation is a central factor. In this context, so called molecular chaperones and also protein degradation systems like the ubiquitin-proteasome-system (UPS) play a crucial role. They are controlled by various upstream signaling pathways, particularly the transcription factor nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells NFκB.

The purpose of this study was the analysis of the characteristics of adaptation to a ten-week treadmill experiment in murine skeletal muscle. Of specific

interest were mechanisms of metabolic adaptation, particularly of fiber type specification, and the regulation of genes that encode molecular chaperones and members of the UPS. Furthermore, a potential role of the transcription factor NFκB was analyzed by treating one experimental group with the NFκB inhibitor Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). Despite the fact that blockade of NFκB activity in skeletal muscle could not be proven directly, numerous effects of PDTC treatment on various aspects of skeletal muscle adaptation were observed. This is most likely the result of other modes of action of PDTC, e. g. its nature as an antioxidant and radical catcher.

Altogether the results of this study give evidence of an adaptation process at diverse levels. A physiological signal in this context is the reduction of the resting heart rate in exercising mice, which, for unknown reasons, was even more pronounced under PDTC treatment. In addition, a remarkable finding was the reduced total body weight of mice that exercised in parallel to PDTC treatment in comparison to all other groups. Nevertheless, since there was no weight difference with regard to individual muscles, it is unlikely that this weight difference is the result of differences in total muscle mass. Analysis of expression of genes encoding for fiber type-specific „slow, oxidative“ and „fast, glycolytic“ myosins revealed an increase of „intermediate“ Myosin-heavy-chain (Mhc) IIA-fibers in „glycolytic“ muscles in the trained group. By contrast the „oxidative“ soleus muscle showed an increase in these fibers only when the method of fiber-specific staining was applied for analysis, accompanied by a relative reduction in Mhc I-fibers. Altogether, this is rather an „oxidative“ trend, as had to be expected in response to endurance exercise. The diverging result obtained in the soleus muscle, might be due to the basically more “oxidative” composition of this muscle.

Genes encoding other metabolic markers also showed differential expression in response to exercise: the gene encoding citrate synthase, a marker for „oxidative“ muscle metabolism, was induced in M. gastrocnemius. By contrast, the *Tre-2/Bub2/Cdc16 domain family member 1 (Tbc1d1)* gene, a marker for glycolytic potential of a muscle showed reduced expression in M.

gastrocnemius, but was induced the soleus muscle and the extensor digitorum longus muscle. PDTC, by contrast, had no effect in this context.

Furthermore we could detect differential expression of numerous genes encoding molecular chaperones and other regulators of enhanced muscle formation in response to exercise. The expression of the genes encoding calpastatin and unc45b showed a clear response to PDTC treatment, whereupon effects differed in case of *uncoordinated mutant number 45 (unc45b)*: there was a reduction in the extensor digitorum longus muscle and an induction in the soleus muscle with exercise, both more distinct under PDTC treatment. In the rectus femoris muscle and the triceps brachii muscle, there was also an induction at the protein level under PDTC treatment. Most of the effects were enhanced with PDTC, thus, this compound seems to block a signaling pathway which mediates expression of genes encoding a set of molecular chaperones. On the other hand, there was only little effect of exercise on *heat-shock protein 90 (Hsp90)*, *heat-shock protein 70 (Hsp70)* and *alpha B-crystallin (Cryab)* genes.

Another aim of the study was to reveal the involvement of degradation, specifically the UPS, in adaptation to endurance exercise. Remarkably, there was an induction of *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (Traf6)*, *Forkhead box class O (Foxo1)*, *neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4 (Nedd4)*, *Ubiquitin fusion degradation protein 2 (Ufd2)* and *Calpain1* in response to exercise, however the effects differed depending on the examined muscle type. By contrast, the concentration of stress-induced phosphoprotein 1 homology and U-box containing protein 1 (Stub1) was reduced.

In summary, differential expression of numerous genes encoding metabolic regulators, components of protein degradation systems and molecular chaperones could be shown in response to exercise. Frequently, the results varied depending on the nature of the examined muscle. Consequently, future studies on skeletal muscle adaptation to exercise should pay more attention to this issue.

8 Literaturverzeichnis

- ADAMS, G. R., HATHER, B. M., BALDWIN, K. M. & DUDLEY, G. A.** (1993) Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J Appl Physiol* (1985), 74, 911-5.
- ALBENSI, B. C.** (2019) What Is Nuclear Factor Kappa B (NF-kappaB) Doing in and to the Mitochondrion? *Front Cell Dev Biol*, 7, 154.
- ALLEN, D. L., HARRISON, B. C., MAASS, A., BELL, M. L., BYRNES, W. C. & LEINWAND, L. A.** (2001) Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol* (1985), 90, 1900-8.
- ALWAY, S. E., MACDOUGALL, J. D. & SALE, D. G.** (1989) Contractile adaptations in the human triceps surae after isometric exercise. *J Appl Physiol* (1985), 66, 2725-32.
- AN, D., TOYODA, T., TAYLOR, E. B., YU, H., FUJII, N., HIRSHMAN, M. F. & GOODYEAR, L. J.** (2010) TBC1D1 regulates insulin- and contraction-induced glucose transport in mouse skeletal muscle. *Diabetes*, 59, 1358-65.
- ANOOP, V. M., BASU, U., MCCAMMON, M. T., MCALISTER-HENN, L. & TAYLOR, G. J.** (2003) Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol*, 132, 2205-17.
- ARMSTRONG, R. B., WARREN, G. L. & WARREN, J. A.** (1991) Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med*, 12, 184-207.
- AUERBACH, D., BANTLE, S., KELLER, S., HINDERLING, V., LEU, M., EHLE, E. & PERRIARD, J. C.** (1999) Different domains of the M-band protein myomesin are involved in myosin binding and M-band targeting. *Mol Biol Cell*, 10, 1297-308.
- AUGUSTO, V., PADOVANI, C. R. & ROCHA CAMPOS, G. E.** (2004) Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice. *Braz. J. morphol. Sci.*, 21, 89-94.
- AUSONI, S., GORZA, L., SCHIAFFINO, S., GUNDERSEN, K. & LOMO, T.** (1990) Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J Neurosci*, 10, 153-60.

-
- AYACHI, M., NIEL, R., MOMKEN, I., BILLAT, V. L. & MILLEHAMARD, L.** (2016) Validation of a Ramp Running Protocol for Determination of the True VO₂max in Mice. *Front Physiol*, 7, 372.
- BEATRIX, B., SAKAI, H. & WIEDMANN, M.** (2000) The a and b Subunit of the Nascent Polypeptide-associated Complex Have Distinct Functions. *The Journal of biological chemistry*, 275, 37838–37845.
- BELLACOSA, A., TESTA, J. R., MOORE, R. & LARUE, L.** (2004) A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer Biol Ther*, 3, 268-75.
- BERGER, F., BERKHOLZ, J., BREUSTEDT, T., PLOEN, D. & MUNZ, B.** (2012) Skeletal muscle-specific variant of nascent polypeptide associated complex alpha (skNAC): implications for a specific role in mammalian myoblast differentiation. *Eur J Cell Biol*, 91, 150-5.
- BERKHOLZ, J., EBERLE, R., BOLLER, K. & MUNZ, B.** (2018) siRNA-mediated inhibition of skNAC and Smyd1 expression disrupts myofibril organization: Immunofluorescence and electron microscopy study in C2C12 cells. *Micron*, 108, 6-10.
- BERKHOLZ, J., ZAKRZEWICZ, A. & MUNZ, B.** (2013) skNAC depletion stimulates myoblast migration and perturbs sarcomerogenesis by enhancing calpain 1 and 3 activity. *Biochem J*, 453, 303-10.
- BIRK, J. B. & WOJTASZEWSKI, J. F.** (2006) Predominant alpha2/beta2/gamma3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. *J Physiol*, 577, 1021-32.
- BJORNSTAD, H. H., BRUVIK, J., BJORNSTAD, A. B., HJELLESTAD, B. L., DAMAS, J. K. & AUKRUST, P.** (2008) Exercise training decreases plasma levels of soluble CD40 ligand and P-selectin in patients with chronic heart failure. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 15, 43-8.
- BODINE, S. C., STITT, T. N., GONZALEZ, M., KLINE, W. O., STOVER, G. L., BAUERLEIN, R., ZLOTCHENKO, E., SCRIMGEOUR, A., LAWRENCE, J. C., GLASS, D. J. & YANCOPOULOS, G. D.** (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, 3, 1014-9.

-
- BONIZZU, G. & KARIN, M.** (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, 25, 280-8.
- BRUCE, C. R., KRIKETOS, A. D., COONEY, G. J. & HAWLEY, J. A.** (2004) Disassociation of muscle triglyceride content and insulin sensitivity after exercise training in patients with Type 2 diabetes. *Diabetologia*, 47, 23-30.
- BRUMMER, H., ZHANG, M. Y., PIDDOUBNY, M. & MEDLER, S.** (2013) Hybrid fibers transform into distinct fiber types in maturing mouse muscles. *Cells Tissues Organs*, 198, 227-36.
- BRUNELLI, S., SCIORATI, C., D'ANTONA, G., INNOCENZI, A., COVARELLO, D., GALVEZ, B. G., PERROTTA, C., MONOPOLI, A., SANVITO, F., BOTTINELLI, R., ONGINI, E., COSSU, G. & CLEMENTI, E.** (2007) Nitric oxide release combined with nonsteroidal antiinflammatory activity prevents muscular dystrophy pathology and enhances stem cell therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 264-9.
- CARTER, S. L., RENNIE, C. D., HAMILTON, S. J. & TARNOPOLSKY** (2001) Changes in skeletal muscle in males and females following endurance training. *Can J Physiol Pharmacol*, 79, 386-92.
- CHABICOVSKY, M., PRIESCHL-GRASSAUER, E., SEIPELT, J., MUSTER, T., SZOLAR, O. H., HEBAR, A. & DOBLHOFF-DIER, O.** (2010) Pre-clinical safety evaluation of pyrrolidine dithiocarbamate. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 107, 758-67.
- CHAN, D., GREEN, S., FIATARONE SINGH, M., BARNARD, R. & CHEEMA, B. S.** (2016) Development, feasibility, and efficacy of a customized exercise device to deliver intradialytic resistance training in patients with end stage renal disease: Non-randomized controlled crossover trial. *Hemodial Int*, 20, 650-660.
- CHUNG, N.** (2012) Einfluss von körperlicher Aktivität auf antioxidative Enzyme und mitochondriale Signalproteine in der Skelettmuskulatur von TypII-Diabetikern. *Sportwissenschaftliche Dissertation*, Deutsche Sporthochschule Köln.
- CONDORELLI, G., DRUSCO, A., STASSI, G., BELLACOSA, A., RONCARATI, R., IACCARINO, G., RUSSO, M. A., GU, Y.,**

- DALTON, N., CHUNG, C., LATRONICO, M. V., NAPOLI, C., SADOSHIMA, J., CROCE, C. M. & ROSS, J., JR.** (2002) Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12333-8.
- CUEVAS, M. J., ALMAR, M., GARCIA-GLEZ, J. C., GARCIA-LOPEZ, D., DE PAZ, J. A., ALVEAR-ORDENES, I. & GONZALEZ-GALLEGO, J.** (2005) Changes in oxidative stress markers and NF-kappaB activation induced by sprint exercise. *Free Radic Res*, 39, 431-9.
- CUZZOCREA, S., CHATTERJEE, P. K., MAZZON, E., DUGO, L., SERRAINO, I., BRITTI, D., MAZZULLO, G., CAPUTI, A. P. & THIEMERMANN, C.** (2002) Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation. *Br J Pharmacol*, 135, 496-510.
- DE TULLIO, R., FRANCHI, A., MARTINES, A., AVERNA, M., PEDRAZZI, M., MELLONI, E. & SPARATORE, B.** (2018) Unexpected role of the L-domain of calpastatin during the autoproteolytic activation of human erythrocyte calpain. *Biosci Rep*, 38.
- DECLERCQ, W., VANDEN BERGHE, T. & VANDENABEELE, P.** (2009) RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell*, 138, 229-32.
- DENTI, M. A., ROSA, A., D'ANTONA, G., STHANDIER, O., DE ANGELIS, F. G., NICOLETTI, C., ALLOCCA, M., PANSARASA, O., PARENTE, V., MUSARO, A., AURICCHIO, A., BOTTINELLI, R. & BOZZONI, I.** (2006) Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 3758-63.
- DILL, K. A., OZKAN, S. B., SHELL, M. S. & WEIKL, T. R.** (2008) The protein folding problem. *Annu Rev Biophys*, 37, 289-316.
- DIMAURO, I., MERCATELLI, N., ANTONIONI, A., GRAZIOLI, E., FITTIPALDI, S., BARONE, R., MACALUSO, F., DI FELICE, V. & CAPOROSSI, D.** (2016) Exercise-Induced Activation and Translocation of α B-Crystallin in Skeletal Muscle Depends upon Fiber Type and Oxidative Stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, S36-S37.

- DOHM, G. L., TAPSCOTT, E. B. & KASPEREK, G. J.** (1987) Protein degradation during endurance exercise and recovery. *Med Sci Sports Exerc*, 19, S166-71.
- DORSCH, M., WANG, A., CHENG, H., LU, C., BIELECKI, A., CHARRON, K., CLAUSER, K., REN, H., POLAKIEWICZ, R. D., PARSONS, T., LI, P., OCAIN, T. & XU, Y.** (2006) Identification of a regulatory autophosphorylation site in the serine-threonine kinase RIP2. *Cell Signal*, 18, 2223-9.
- DREXLER, H. C., RUHS, A., KONZER, A., MENDLER, L., BRUCKSKOTTEN, M., LOOSO, M., GUNTHER, S., BOETTGER, T., KRUGER, M. & BRAUN, T.** (2012) On marathons and Sprints: an integrated quantitative proteomics and transcriptomics analysis of differences between slow and fast muscle fibers. *Mol Cell Proteomics*, 11, M111.010801.
- DREYER, H. C., FUJITA, S., CADENAS, J. G., CHINKES, D. L., VOLPI, E. & RASMUSSEN, B. B.** (2006) Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *J Physiol*, 576, 613-24.
- DUNN, R., KLOS, D. A., ADLER, A. S. & HICKE, L.** (2004) The C2 domain of the Rsp5 ubiquitin ligase binds membrane phosphoinositides and directs ubiquitination of endosomal cargo. *J Cell Biol*, 165, 135-44.
- ESBJORNSSON, M., HELLSTEN-WESTING, Y., BALSOM, P. D., SJODIN, B. & JANSSON, E.** (1993) Muscle fibre type changes with sprint training: effect of training pattern. *Acta Physiol Scand*, 149, 245-6.
- ETARD, C., BEHRA, M., FISCHER, N., HUTCHESON, D., GEISLER, R. & STRAHLE, U.** (2007) The UCS factor Steif/Unc-45b interacts with the heat shock protein Hsp90a during myofibrillogenesis. *Dev Biol*, 308, 133-43.
- FERNANDEZ-GONZALO, R., DE PAZ, J. A., RODRIGUEZ-MIGUELEZ, P., CUEVAS, M. J. & GONZALEZ-GALLEGO, J.** (2014) TLR4-mediated blunting of inflammatory responses to eccentric exercise in young women. *Mediators Inflamm*, 2014, 479395.

-
- FITTIPALDI, S., MERCATELLI, N., DIMAURO, I., JACKSON, M. J., PARONETTO, M. P. & CAPOROSSI, D.** (2015) Alpha B-crystallin induction in skeletal muscle cells under redox imbalance is mediated by a JNK-dependent regulatory mechanism. *Free Radic Biol Med*, 86, 331-42.
- FOUGEROUSSE, F., BULLEN, P., HERASSE, M., LINDSAY, S., RICHARD, I., WILSON, D., SUEL, L., DURAND, M., ROBSON, S., ABITBOL, M., BECKMANN, J. S. & STRACHAN, T.** (2000) Human-mouse differences in the embryonic expression patterns of developmental control genes and disease genes. *Hum Mol Genet*, 9, 165-73.
- FOUGEROUSSE, F., GONIN, P., DURAND, M., RICHARD, I. & RAYMACKERS, J. M.** (2003) Force impairment in calpain 3-deficient mice is not correlated with mechanical disruption. *Muscle Nerve*, 27, 616-23.
- FRONTERA, W. R. & OCHALA, J.** (2015) Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*, 96, 183-95.
- GOH, J. & LADIGES, W.** (2015) Voluntary Wheel Running in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*, 5, 283-290.
- GOLL, D. E., NETI, G., MARES, S. W. & THOMPSON, V. F.** (2008) Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci*, 86, E19-35.
- GOMEZ-CABRERA, M. C., DOMENECH, E. & VINA, J.** (2008) Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*, 44, 126-31.
- GU, J. W., YOUNG, E., BUSBY, B., COVINGTON, J. & JOHNSON, J. W.** (2009) Oral administration of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTc) inhibits VEGF expression, tumor angiogenesis, and growth of breast cancer in female mice. *Cancer Biol Ther*, 8, 514-21.
- GÜNTHER, S.** (2017) Muscle oscillations & waves [Online]. s.guenther.eu. Available: <https://sguenther.eu/science/muscle-waves/> [Accessed 29.06.2017].
- HANNA, R. A., GARCIA-DIAZ, B. E. & DAVIES, P. L.** (2007) Calpastatin simultaneously binds four calpains with different kinetic constants. *FEBS Lett*, 581, 2894-8.

- HASEGAWA, M., FUJIMOTO, Y., LUCAS, P. C., NAKANO, H., FUKASE, K., NUNEZ, G. & INOHARA, N.** (2008) A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *Embo j*, 27, 373-83.
- HATTORI, Y., SUZUKI, K., HATTORI, S. & KASAI, K.** (2006) Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension*, 47, 1183-8.
- HEIMDAL, K., SANCHEZ-GUIXE, M., AUKRUST, I., BOLLERSLEV, J., BRULAND, O., JABLONSKI, G. E., ERICHSEN, A. K., GUDE, E., KOHT, J. A., ERDAL, S., FISKERSTRAND, T., HAUKANES, B. I., BOMAN, H., BJORKHAUG, L., TALLAKSEN, C. M., KNAPPSKOG, P. M. & JOHANSSON, S.** (2014) STUB1 mutations in autosomal recessive ataxias - evidence for mutation-specific clinical heterogeneity. *Orphanet J Rare Dis*, 9, 146.
- HELLERSCHMIED, D., LEHNER, A., FRANICEVIC, N., ARNESE, R., JOHNSON, C., VOGEL, A., MEINHART, A., KURZBAUER, R., DESZCZ, L., GAZDA, L., GEEVES, M. & CLAUSEN, T.** (2019) Molecular features of the UNC-45 chaperone critical for binding and folding muscle myosin. *Nat Commun*, 10, 4781.
- HELLERSCHMIED, D., ROESSLER, M., LEHNER, A., GAZDA, L., STEJSKAL, K., IMRE, R., MECHTLER, K., DAMMERMAN, A. & CLAUSEN, T.** (2018) UFD-2 is an adaptor-assisted E3 ligase targeting unfolded proteins. *Nat Commun*, 9, 484.
- HERZIG, D., ASATRYAN, B., BRUGGER, N., ESER, P. & WILHELM, M.** (2018) The Association Between Endurance Training and Heart Rate Variability: The Confounding Role of Heart Rate. *Front Physiol*, 9, 756.
- HIRASAKA, K., MAEDA, T., IKEDA, C., HARUNA, M., KOHNO, S., ABE, T., OCHI, A., MUKAI, R., OARADA, M., ESHIMA-KONDO, S., OHNO, A., OKUMURA, Y., TERAOKA, J. & NIKAWA, T.** (2013) Isoflavones derived from soy beans prevent MuRF1-mediated muscle atrophy in C2C12 myotubes through SIRT1 activation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 59, 317-24.

- HOESEL, B. & SCHMID, J. A.** (2013) The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*, 12, 86.
- HOPPE, T., CASSATA, G., BARRAL, J. M., SPRINGER, W., HUTAGALUNG, A. H., EPSTEIN, H. F. & BAUMEISTER, R.** (2004) Regulation of the myosin-directed chaperone UNC-45 by a novel E3/E4-multiubiquitylation complex in *C. elegans*. *Cell*, 118, 337-49.
- HOWALD, H., HOPPELER, H., CLAASSEN, H., MATHIEU, O. & STRAUB, R.** (1985) Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflugers Arch*, 403, 369-76.
- HOWARTH, K. R., LEBLANC, P. J., HEIGENHAUSER, G. J. & GIBALA, M. J.** (2004) Effect of endurance training on muscle TCA cycle metabolism during exercise in humans. *J Appl Physiol* (1985), 97, 579-84.
- HSU, H., HUANG, J., SHU, H. B., BAICHWAL, V. & GOEDEL, D. V.** (1996) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*, 4, 387-96.
- HU, W. F., GONG, L., CAO, Z., MA, H., JI, W., DENG, M., LIU, M., HU, X. H., CHEN, P., YAN, Q., CHEN, H. G., LIU, J., SUN, S., ZHANG, L., LIU, J. P., WAWROUSEK, E. & LI, D. W.** (2012) alphaA- and alphaB-crystallins interact with caspase-3 and Bax to guard mouse lens development. *Curr Mol Med*, 12, 177-87.
- HUEY, K. A. & BODINE, S. C.** (1998) Changes in myosin mRNA and protein expression in denervated rat soleus and tibialis anterior. *Eur J Biochem*, 256, 45-50.
- INOHARA, N., DEL PESO, L., KOSEKI, T., CHEN, S. & NUNEZ, G.** (1998) RICK, a novel protein kinase containing a caspase recruitment domain, interacts with CLARP and regulates CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 273, 12296-300.
- INOKI, K., LI, Y., XU, T. & GUAN, K. L.** (2003) Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*, 17, 1829-34.
- JACKO, D., BERSINER, K., HEBCHEN, J., DE MAREES, M., BLOCH, W. & GEHLERT, S.** (2019) Phosphorylation of alphaB-

- crystallin and its cytoskeleton association differs in skeletal myofiber types depending on resistance exercise intensity and volume. *J Appl Physiol* (1985), 126, 1607-1618.
- JAKUBIEC-PUKA, A., CIECHOMSKA, I., MORGA, J. & MATUSIAK, A.** (1999) Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 122, 355-62.
- JANSSON, E., SJODIN, B. & TESCH, P.** (1978) Changes in muscle fibre type distribution in man after physical training. A sign of fibre type transformation? *Acta Physiol Scand*, 104, 235-7.
- JEPPESEN, T. D., SCHWARTZ, M., OLSEN, D. B., WIBRAND, F., KRAG, T., DUNO, M., HAUERSLEV, S. & VISSING, J.** (2006) Aerobic training is safe and improves exercise capacity in patients with mitochondrial myopathy. *Brain*, 129, 3402-12.
- JESSEN, N., AN, D., LIHN, A. S., NYGREN, J., HIRSHMAN, M. F., THORELL, A. & GOODYEAR, L. J.** (2011) Exercise increases TBC1D1 phosphorylation in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301, E164-71.
- KALMAR, B., BLANCO, G. & GREENSMITH, L.** (2012) Determination of Muscle Fiber Type in Rodents. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2, 231-43.
- KAMMOUN, M., CASSAR-MALEK, I., MEUNIER, B. & PICARD, B.** (2014) A simplified immunohistochemical classification of skeletal muscle fibres in mouse. *Eur J Histochem*, 58, 2254.
- KARP, J. R.** (2001) Muscle Fiber Types and Training. *Strength & Conditioning Journal*, 23, 21.
- KIM, S. Y., JUN, T. W., LEE, Y. S., NA, H. K., SURH, Y. J. & SONG, W.** (2009) Effects of exercise on cyclooxygenase-2 expression and nuclear factor-kappaB DNA binding in human peripheral blood mononuclear cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1171, 464-71.
- KISISWA, L., FERNANDEZ-SUAREZ, D., SERGAKI, M. C. & IBANEZ, C. F.** (2018) RIP2 Gates TRAF6 Interaction with Death Receptor p75(NTR) to Regulate Cerebellar Granule Neuron Survival. *Cell Rep*, 24, 1013-1024.

-
- KLEMENZ, R., FROHLI, E., STEIGER, R. H., SCHAFER, R. & AOYAMA, A.** (1991) Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3652-6.
- KNECHTLE, B.** (2002) Leistung und Ernährung im Sport. *Aktuelle Sportphysiologie*, Aufl., Basel, Karger S.
- KOEGEL, M., HOPPE, T., SCHLENKER, S., ULRICH, H. D., MAYER, T. U. & JENTSCH, S.** (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, 96, 635-44.
- KOHN, T. A. & MYBURGH, K. H.** (2007) Regional specialization of rat quadriceps myosin heavy chain isoforms occurring in distal to proximal parts of middle and deep regions is not mirrored by citrate synthase activity. *J Anat*, 210, 8-18.
- KONCAREVIC, A., JACKMAN, R. W. & KANDARIAN, S. C.** (2007) The ubiquitin-protein ligase Nedd4 targets Notch1 in skeletal muscle and distinguishes the subset of atrophies caused by reduced muscle tension. *Faseb j*, 21, 427-37.
- KÖNIG, H. E. & LIEBICH, H.-G.** (2009) Muskeln der Vorder- oder Schultergliedmaße. *Anatomie der Haussäugetiere*, 4. Aufl., Stuttgart, Schattauer.
- KOOPMAN, R., ZORENC, A. H., GRANSIER, R. J., CAMERON-SMITH, D. & VAN LOON, L. J.** (2006) Increase in S6K1 phosphorylation in human skeletal muscle following resistance exercise occurs mainly in type II muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290, E1245-52.
- KRAMER, H. F. & GOODYEAR, L. J.** (2007) Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), 103, 388-95.
- KUMAR, A., BHATNAGAR, S. & PAUL, P. K.** (2012) TWEAK and TRAF6 regulate skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 15, 233-9.
- LAUZURICA, P., MARTINEZ-MARTINEZ, S., MARAZUELA, M., GOMEZ DEL ARCO, P., MARTINEZ, C., SANCHEZ-MADRID, F. & REDONDO, J. M.** (1999) Pyrrolidine dithiocarbamate protects mice from lethal shock induced by LPS or TNF-alpha. *Eur J Immunol*, 29, 1890-900.

-
- LECKER, S. H., SOLOMON, V., MITCH, W. E. & GOLDBERG, A. L.** (1999) Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr*, 129, 227s-237s.
- LEE, C. F., MELKANI, G. C. & BERNSTEIN, S. I.** (2014) The UNC-45 myosin chaperone: from worms to flies to vertebrates. *Int Rev Cell Mol Biol*, 313, 103-44.
- LEE, S., KIM, M., LIM, W., KIM, T. & KANG, C.** (2015) Strenuous exercise induces mitochondrial damage in skeletal muscle of old mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 461, 354-60.
- LEEK, B. T., MUDALIAR, S. R., HENRY, R., MATHIEU-COSTELLO, O. & RICHARDSON, R. S.** (2001) Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280, R441-7.
- LIU, E. S., RAIMANN, A., CHAE, B. T., MARTINS, J. S., BACCARINI, M. & DEMAY, M. B.** (2016) c-Raf promotes angiogenesis during normal growth plate maturation. *Development*, 143, 348-55.
- LIU, H. W. & CHANG, S. J.** (2018) Moderate Exercise Suppresses NF-kappaB Signaling and Activates the SIRT1-AMPK-PGC1alpha Axis to Attenuate Muscle Loss in Diabetic db/db Mice. *Front Physiol*, 9, 636.
- MACNEIL, L. G., GLOVER, E., BERGSTRA, T. G., SAFDAR, A. & TARNOPOLSKY, M. A.** (2014) The order of exercise during concurrent training for rehabilitation does not alter acute genetic expression, mitochondrial enzyme activity or improvements in muscle function. *PLoS One*, 9, e109189.
- MAGALHAES, J. G., LEE, J., GEDDES, K., RUBINO, S., PHILPOTT, D. J. & GIRARDIN, S. E.** (2011) Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands. *Eur J Immunol*, 41, 1445-55.
- MAHMOOD, T. & YANG, P. C.** (2012) Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*, 4, 429-34.
- MARINI, M. & VEICSTEINAS, A.** (2010) The exercised skeletal muscle: a review. *European Journal Translational Myology*, 20, 105-120.

-
- MATHEWSON, M. A., CHAPMAN, M. A., HENTZEN, E. R., FRIDEN, J. & LIEBER, R. L.** (2012) Anatomical, architectural, and biochemical diversity of the murine forelimb muscles. *J Anat*, 221, 443-51.
- MCCARTHY, J. V., NI, J. & DIXIT, V. M.** (1998) RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem*, 273, 16968-75.
- MCCARTNEY, C. E., YE, Q., CAMPBELL, R. L. & DAVIES, P. L.** (2018) Insertion sequence 1 from calpain-3 is functional in calpain-2 as an internal propeptide. *J Biol Chem*, 293, 17716-17730.
- MCLAUGHLIN, B., BUENDIA, M. A., SABORIDO, T. P., PALUBINSKY, A. M., STANKOWSKI, J. N. & STANWOOD, G. D.** (2012) Haploinsufficiency of the E3 ubiquitin ligase C-terminus of heat shock cognate 70 interacting protein (CHIP) produces specific behavioral impairments. *PLoS One*, 7, e36340.
- MEINEN, S., LIN, S., RUEGG, M. A. & PUNGA, A. R.** (2012) Fatigue and muscle atrophy in a mouse model of myasthenia gravis is paralleled by loss of sarcolemmal nNOS. *PLoS One*, 7, e44148.
- MIAO, C., LV, Y., ZHANG, W., CHAI, X., FENG, L., FANG, Y., LIU, X. & ZHANG, X.** (2017) Pyrrolidine Dithiocarbamate (PDTC) Attenuates Cancer Cachexia by Affecting Muscle Atrophy and Fat Lipolysis. *Front Pharmacol*, 8, 915.
- MILAN, G., ROMANELLO, V., PESCATORE, F., ARMANI, A., PAIK, J. H., FRASSON, L., SEYDEL, A., ZHAO, J., ABRAHAM, R., GOLDBERG, A. L., BLAAUW, B., DEPINHO, R. A. & SANDRI, M.** (2015) Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nat Commun*, 6, 6670.
- MILNE, K. J. & NOBLE, E. G.** (2002) Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *J Appl Physiol* (1985), 93, 561-8.
- MÖCKLI, F.** (2015) Muskel-Aufbau [Online]. Fitness Island. Available: <https://www.fitness-island.ch/muskel-aufbau> [Accessed 29.06.2017].

-
- MOOSBURGER, K.** (1995) Die Muskuläre Energiebereitstellung im Sport [Online]. Innsbruck: Sportmagazin. Available: <http://www.dr-moosburger.at/pub/pub023.pdf> [Accessed 30.06.2017].
- MORIYA, N. & MIYAZAKI, M.** (2018) Akt1 deficiency diminishes skeletal muscle hypertrophy by reducing satellite cell proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 314, R741-r751.
- MORRIONE, A., PLANT, P., VALENTINIS, B., STAUB, O., KUMAR, S., ROTIN, D. & BASERGA, R.** (1999) mGrb10 interacts with Nedd4. *J Biol Chem*, 274, 24094-9.
- MORTON, J. P., KAYANI, A. C., MCARDLE, A. & DRUST, B.** (2009) The exercise-induced stress response of skeletal muscle, with specific emphasis on humans. *Sports Med*, 39, 643-62.
- MUNZ, B., WIEDMANN, M., LOCHMULLER, H. & WERNER, S.** (1999) Cloning of novel injury-regulated genes. Implications for an important role of the muscle-specific protein skNAC in muscle repair. *J Biol Chem*, 274, 13305-10.
- MURPHY, R. M., SNOW, R. J. & LAMB, G. D.** (2006) mu-Calpain and calpain-3 are not autolyzed with exhaustive exercise in humans. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290, C116-22.
- MUSCLE PHYSIOLOGY LABORATORY** (2000) Using Histochemistry to Determine Muscle Properties [Online]. University of California. Available: <http://muscle.ucsd.edu/musintro/histochem.shtml> [Accessed 09.06.2017].
- NAI, Y. J., JIANG, Z. W., WANG, Z. M., LI, N. & LI, J. S.** (2007) Prevention of cancer cachexia by pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) in colon 26 tumor-bearing mice. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 31, 18-25.
- NAVAS, T. A., BALDWIN, D. T. & STEWART, T. A.** (1999) RIP2 is a Raf1-activated mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*, 274, 33684-90.
- NEPPL, R. L., KATAOKA, M. & WANG, D. Z.** (2014) Crystallin- α B regulates skeletal muscle homeostasis via modulation of argonaute2 activity. *J Biol Chem*, 289, 17240-8.

- NISHIMURA, M. & NAITO, S.** (2005) Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull*, 28, 886-92.
- OBERMANN, W. M., GAUTEL, M., STEINER, F., VAN DER VEN, P. F., WEBER, K. & FURST, D. O.** (1996) The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol*, 134, 1441-53.
- OGATA, T., OISHI, Y., HIGASHIDA, K., HIGUCHI, M. & MURAOKA, I.** (2009) Prolonged exercise training induces long-term enhancement of HSP70 expression in rat plantaris muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296, R1557-63.
- OGHBAEI, H., AHMADI ASL, N. & SHEIKHZADEH, F.** (2017) Can regular moderate exercise lead to changes in miRNA-146a and its adapter proteins in the kidney of streptozotocin-induced diabetic male rats? *Endocr Regul*, 51, 145-152.
- ONO, Y., KAKINUMA, K., TORII, F., IRIE, A., NAKAGAWA, K., LABEIT, S., ABE, K., SUZUKI, K. & SORIMACHI, H.** (2004) Possible regulation of the conventional calpain system by skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3. *J Biol Chem*, 279, 2761-71.
- OZAKI, T., YAMASHITA, T. & ISHIGURO, S.** (2009) Mitochondrial m-calpain plays a role in the release of truncated apoptosis-inducing factor from the mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 1848-59.
- PARK, C. Y., PIERCE, S. A., VON DREHLE, M., IVEY, K. N., MORGAN, J. A., BLAU, H. M. & SRIVASTAVA, D.** (2010) skNAC, a Smyd1-interacting transcription factor, is involved in cardiac development and skeletal muscle growth and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 20750-5.
- PAUL, P. K., BHATNAGAR, S., MISHRA, V., SRIVASTAVA, S., DARNAY, B. G., CHOI, Y. & KUMAR, A.** (2012) The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. *Mol Cell Biol*, 32, 1248-59.
- PAUL, P. K., GUPTA, S. K., BHATNAGAR, S., PANGULURI, S. K., DARNAY, B. G., CHOI, Y. & KUMAR, A.** (2010) Targeted

- ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. *J Cell Biol*, 191, 1395-411.
- PAULSEN, G., LAURITZEN, F., BAYER, M. L., KALHOVDE, J. M., UGELSTAD, I., OWE, S. G., HALLEN, J., BERGERSEN, L. H. & RAASTAD, T.** (2009) Subcellular movement and expression of HSP27, alphaB-crystallin, and HSP70 after two bouts of eccentric exercise in humans. *J Appl Physiol* (1985), 107, 570-82.
- PEAKE, J. M., DELLA GATTA, P., SUZUKI, K. & NIEMAN, D. C.** (2015) Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev*, 21, 8-25.
- PEDERSEN, B. K. & FEBBRAIO, M. A.** (2008) Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*, 88, 1379-406.
- PEREIRA SANT'ANA, J. A., ENNION, S., SARGEANT, A. J., MOORMAN, A. F. & GOLDSPIK, G.** (1997) Comparison of the molecular, antigenic and ATPase determinants of fast myosin heavy chains in rat and human: a single-fibre study. *Pflugers Arch*, 435, 151-63.
- PETTE, D. & STARON, R. S.** (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech*, 50, 500-9.
- PFEILSCHIFTER, W., CZECH, B., HOFFMANN, B. P., SUJAK, M., KAHLES, T., STEINMETZ, H., NEUMANN-HAEFELIN, T. & PFEILSCHIFTER, J.** (2010) Pyrrolidine dithiocarbamate activates p38 MAPK and protects brain endothelial cells from apoptosis: a mechanism for the protective effect in stroke? *Neurochem Res*, 35, 1391-401.
- PRATT, W. B., MORISHIMA, Y., PENG, H. M. & OSAWA, Y.** (2010) Proposal for a role of the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery in making triage decisions when proteins undergo oxidative and toxic damage. *Exp Biol Med* (Maywood), 235, 278-89.
- PRICE, M. G., LANDSVERK, M. L., BARRAL, J. M. & EPSTEIN, H. F.** (2002) Two mammalian UNC-45 isoforms are related to distinct cytoskeletal and muscle-specific functions. *J Cell Sci*, 115, 4013-23.

-
- PRILL, K., CARLISLE, C., STANNARD, M., WINDSOR REID, P. J. & PILGRIM, D. B.** (2019) Myomesin is part of an integrity pathway that responds to sarcomere damage and disease. *PLoS One*, 14, e0224206.
- ROTIN, D. & KUMAR, S.** (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 398-409.
- ROUILLON, J., POUPIOT, J., ZOCEVIC, A., AMOR, F., LEGER, T., GARCIA, C., CAMADRO, J. M., WONG, B., PINILLA, R., COSETTE, J., COENEN-STASS, A. M., MCCLOREY, G., ROBERTS, T. C., WOOD, M. J., SERVAIS, L., UDD, B., VOIT, T., RICHARD, I. & SVINARTCHOUK, F.** (2015) Serum proteomic profiling reveals fragments of MYOM3 as potential biomarkers for monitoring the outcome of therapeutic interventions in muscular dystrophies. *Hum Mol Genet*, 24, 4916-32.
- SAIBIL, H.** (2013) Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 630-42.
- SALOMON, F.-V., GEYER, H. & GILLE, U.** (2008) *Anatomie für die Tiermedizin*, 2. Aufl., Stuttgart, Enke.
- SANCHEZ, A. M., CANDA, R. & BERNARDI, H.** (2019) Recent Data on Cellular Component Turnover: Focus on Adaptations to Physical Exercise. *Cells*, 8.
- SANDRI, M., LIN, J., HANDSCHIN, C., YANG, W., ARANY, Z. P., LECKER, S. H., GOLDBERG, A. L. & SPIEGELMAN, B. M.** (2006) PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 16260-5.
- SCHIAFFINO, S. & REGGIANI, C.** (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, 91, 1447-531.
- SCHOENAUER, R., LANGE, S., HIRSCHY, A., EHLE, E., PERRIARD, J. C. & AGARKOVA, I.** (2008) Myomesin 3, a novel structural component of the M-band in striated muscle. *J Mol Biol*, 376, 338-51.
- SCHUBERT, U., ANTON, L. C., GIBBS, J., NORBURY, C. C., YEWDELL, J. W. & BENNINK, J. R.** (2000) Rapid degradation

- of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404, 770-4.
- SCICCHITANO, B. M., FARALDI, M. & MUSARO, A.** (2015) The Proteolytic Systems of Muscle Wasting. *Recent Adv DNA Gene Seq*, 9, 26-35.
- SCOTT, W., STEVENS, J. & BINDER-MACLEOD, S. A.** (2001) Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther*, 81, 1810-6.
- SENF, S. M., HOWARD, T. M., AHN, B., FERREIRA, L. F. & JUDGE, A. R.** (2013) Loss of the inducible Hsp70 delays the inflammatory response to skeletal muscle injury and severely impairs muscle regeneration. *PLoS One*, 8, e62687.
- SILKE, J. & BRINK, R.** (2010) Regulation of TNFRSF and innate immune signalling complexes by TRAFs and cIAPs. *Cell Death Differ*, 17, 35-45.
- SIMS, R. J., 3RD, WEIHE, E. K., ZHU, L., O'MALLEY, S., HARRISS, J. V. & GOTTLIEB, P. D.** (2002) m-Bop, a repressor protein essential for cardiogenesis, interacts with skNAC, a heart- and muscle-specific transcription factor. *J Biol Chem*, 277, 26524-9.
- SMITH, D. A., CARLAND, C. R., GUO, Y. & BERNSTEIN, S. I.** (2014) Getting folded: chaperone proteins in muscle development, maintenance and disease. *Anat Rec (Hoboken)*, 297, 1637-49.
- SOMENSI, N., BRUM, P. O., DE MIRANDA RAMOS, V., GASPAROTTO, J., ZANOTTO-FILHO, A., ROSTIROLLA, D. C., DA SILVA MORRONE, M., MOREIRA, J. C. F. & PENS GELAIN, D.** (2017) Extracellular HSP70 Activates ERK1/2, NF- κ B and Pro-Inflammatory Gene Transcription Through Binding with RAGE in A549 Human Lung Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem*, 42, 2507-2522.
- SONG, W., KWAK, H. B. & LAWLER, J. M.** (2006) Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal*, 8, 517-28.
- SORIMACHI, H., HATA, S. & ONO, Y.** (2011) Calpain chronicle--an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 87, 287-327.

- SORIMACHI, H., IMAJOH-OHMI, S., EMORI, Y., KAWASAKI, H., OHNO, S., MINAMI, Y. & SUZUKI, K.** (1989) Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 264, 20106-11.
- SOROKIN, A. V., KIM, E. R. & OVCHINNIKOV, L. P.** (2009) Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Mosc)*, 74, 1411-42.
- SPELLMON, N., HOLCOMB, J., TRESCOTT, L., SIRINUPONG, N. & YANG, Z.** (2015) Structure and function of SET and MYND domain-containing proteins. *Int J Mol Sci*, 16, 1406-28.
- SPENCER, M. J., GUYON, J. R., SORIMACHI, H., POTTS, A., RICHARD, I., HERASSE, M., CHAMBERLAIN, J., DALKILIC, I., KUNKEL, L. M. & BECKMANN, J. S.** (2002) Stable expression of calpain 3 from a muscle transgene in vivo: immature muscle in transgenic mice suggests a role for calpain 3 in muscle maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8874-9.
- SRIKAKULAM, R. & WINKELMANN, D. A.** (2004) Chaperone-mediated folding and assembly of myosin in striated muscle. *J Cell Sci*, 117, 641-52.
- STEWART, M. D., LOPEZ, S., NAGANDLA, H., SOIBAM, B., BENHAM, A., NGUYEN, J., VALENZUELA, N., WU, H. J., BURNS, A. R., RASMUSSEN, T. L., TUCKER, H. O. & SCHWARTZ, R. J.** (2016) Mouse myofibers lacking the SMYD1 methyltransferase are susceptible to atrophy, internalization of nuclei and myofibrillar disarray. *Dis Model Mech*, 9, 347-59.
- STITT, T. N., DRUJAN, D., CLARKE, B. A., PANARO, F., TIMOFEYVA, Y., KLINE, W. O., GONZALEZ, M., YANCOPOULOS, G. D. & GLASS, D. J.** (2004) The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*, 14, 395-403.
- STOCKLI, J., MEOLI, C. C., HOFFMAN, N. J., FAZAKERLEY, D. J., PANT, H., CLEASBY, M. E., MA, X., KLEINERT, M., BRANDON, A. E., LOPEZ, J. A., COONEY, G. J. & JAMES, D. E.** (2015) The RabGAP TBC1D1 plays a central role in exercise-

- regulated glucose metabolism in skeletal muscle. *Diabetes*, 64, 1914-22.
- STREET, T. O., LAVERY, L. A., VERBA, K. A., LEE, C. T., MAYER, M. P. & AGARD, D. A.** (2012) Cross-monomer substrate contacts reposition the Hsp90 N-terminal domain and prime the chaperone activity. *J Mol Biol*, 415, 3-15.
- STUDYBLUE** (2017) The physiology of skeletal muscle [Online]. University of Plymouth. Available: <https://www.studyblue.com/notes/note/n/the-physiology-of-skeletal-muscle/deck/11685908> [Accessed 29.06.2017].
- SUGAMA, K., SUZUKI, K., YOSHITANI, K., SHIRAISHI, K., MIURA, S., YOSHIOKA, H., MORI, Y. & KOMETANI, T.** (2015) Changes of thioredoxin, oxidative stress markers, inflammation and muscle/renal damage following intensive endurance exercise. *Exerc Immunol Rev*, 21, 130-42.
- SUN, S. C.** (2011) Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res*, 21, 71-85.
- SUZUKI, K., HATA, S., KAWABATA, Y. & SORIMACHI, H.** (2004) Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, 53 Suppl 1, S12-8.
- TAHATA, S., YUAN, B., KIKUCHI, H., TAKAGI, N., HIRANO, T. & TOYODA, H.** (2014) Cytotoxic effects of pyrrolidine dithiocarbamate in small-cell lung cancer cells, alone and in combination with cisplatin. *Int J Oncol*, 45, 1749-59.
- TAIPALE, M., JAROSZ, D. F. & LINDQUIST, S.** (2010) HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 515-28.
- TAKESHITA, H., YAMAMOTO, K., NOZATO, S., INAGAKI, T., TSUCHIMUCHI, H., SHIRAI, M., YAMAMOTO, R., IMAIZUMI, Y., HONGYO, K., YOKOYAMA, S., TAKEDA, M., OGURO, R., TAKAMI, Y., ITOH, N., TAKEYA, Y., SUGIMOTO, K., FUKADA, S. I. & RAKUGI, H.** (2017) Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline in skeletal muscle function in male mice. *Sci Rep*, 7, 42323.

-
- TALMADGE, R. J., ACOSTA, W. & GARLAND, T., JR.** (2014) Myosin heavy chain isoform expression in adult and juvenile mini-muscle mice bred for high-voluntary wheel running. *Mech Dev*, 134, 16-30.
- TALMADGE, R. J. & ROY, R. R.** (1993) Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* (1985), 75, 2337-40.
- TAN, X., ROTLLANT, J., LI, H., DE DEYNE, P. & DU, S. J.** (2006) SmyD1, a histone methyltransferase, is required for myofibril organization and muscle contraction in zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2713-8.
- TAYLOR, E. B., AN, D., KRAMER, H. F., YU, H., FUJII, N. L., ROECKL, K. S., BOWLES, N., HIRSHMAN, M. F., XIE, J., FEENER, E. P. & GOODYEAR, L. J.** (2008) Discovery of TBC1D1 as an insulin-, AICAR-, and contraction-stimulated signaling nexus in mouse skeletal muscle. *J Biol Chem*, 283, 9787-96.
- TERMIN, A., STARON, R. S. & PETTE, D.** (1989) Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulation of rat fast hindlimb muscles. A single-fiber study. *Eur J Biochem*, 186, 749-54.
- THANGJAM, G. S., BIRMPAS, C., BARABUTIS, N., GREGORY, B. W., CLEMENS, M. A., NEWTON, J. R., FULTON, D. & CATRAVAS, J. D.** (2016) Hsp90 inhibition suppresses NF-kappaB transcriptional activation via Sirt-2 in human lung microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 310, L964-74.
- THERMO SCIENTIFIC USER GUIDE** (2017) *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, Rockford, IL, USA.
- THOME, M., HOFMANN, K., BURNS, K., MARTINON, F., BODMER, J. L., MATTMANN, C. & TSCHOPP, J.** (1998) Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol*, 8, 885-8.
- TISDALE, M. J.** (2007) Is there a common mechanism linking muscle wasting in various disease types? *Curr Opin Support Palliat Care*, 1, 287-92.

- VELLA, L., CALDOW, M. K., LARSEN, A. E., TASSONI, D., DELLA GATTA, P. A., GRAN, P., RUSSELL, A. P. & CAMERON-SMITH, D.** (2012) Resistance exercise increases NF-kappaB activity in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302, R667-73.
- VIGELSO, A., ANDERSEN, N. B. & DELA, F.** (2014) The relationship between skeletal muscle mitochondrial citrate synthase activity and whole body oxygen uptake adaptations in response to exercise training. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 6, 84-101.
- WADA, M., HAMALAINEN, N. & PETTE, D.** (1995) Isomyosin patterns of single type IIB, IID and IIA fibres from rabbit skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 16, 237-42.
- WANG, C., DENG, L., HONG, M., AKKARAJU, G. R., INOUE, J. & CHEN, Z. J.** (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, 412, 346-51.
- WANG, L., ZHANG, W., WANG, L., ZHANG, X. C., LI, X. & RAO, Z.** (2010) Crystal structures of NAC domains of human nascent polypeptide-associated complex (NAC) and its alphaNAC subunit. *Protein Cell*, 1, 406-416.
- WANG, Z., SHAN, W., CAO, J., WINTERMARK, M., HUANG, W. & ZUO, Z.** (2018) Early administration of pyrrolidine dithiocarbamate extends the therapeutic time window of tissue plasminogen activator in a male rat model of embolic stroke. *J Neurosci Res*, 96, 449-458.
- WIEDMANN, B., SAKAI, H., DAVIS, T. A. & WIEDMANN, M.** (1994) A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*, 370, 434-40.
- WIESMANN, M., TIMMER, N. M., ZINNHARDT, B., REINHARD, D., ELIGEHAUSEN, S., KONIGS, A., BEN JEDDI, H., DEDEREN, P. J., JACOBS, A. H. & KILIAAN, A. J.** (2018) Effect of a multnutrient intervention after ischemic stroke in female C57Bl/6 mice. *J Neurochem*, 144, 549-564.
- WINDISCH, A., GUNDERSEN, K., SZABOLCS, M. J., GRUBER, H. & LOMO, T.** (1998) Fast to slow transformation of denervated and electrically stimulated rat muscle. *J Physiol*, 510 (Pt 2), 623-32.

- YANG, B. & KUMAR, S.** (2010) Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell Death Differ*, 17, 68-77.
- YANG, W. L., WANG, J., CHAN, C. H., LEE, S. W., CAMPOS, A. D., LAMOTHE, B., HUR, L., GRABINER, B. C., LIN, X., DARNAY, B. G. & LIN, H. K.** (2009) The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science*, 325, 1134-8.
- YANG, Z. Z., TSCHOPP, O., HEMMINGS-MIESZCZAK, M., FENG, J., BRODBECK, D., PERENTES, E. & HEMMINGS, B. A.** (2003) Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J Biol Chem*, 278, 32124-31.
- YIN, X., KRIKORIAN, P., LOGAN, T. & CSIZMADIA, V.** (2010) Induction of RIP-2 kinase by proinflammatory cytokines is mediated via NF-kappaB signaling pathways and involves a novel feed-forward regulatory mechanism. *Mol Cell Biochem*, 333, 251-9.
- YOTOV, W. V. & ST-ARNAUD, R.** (1996) Differential splicing-in of a proline-rich exon converts alphaNAC into a muscle-specific transcription factor. *Genes Dev*, 10, 1763-72.
- YUSUF, S., HAWKEN, S., OUNPUU, S., DANS, T., AVEZUM, A., LANAS, F., MCQUEEN, M., BUDAJ, A., PAIS, P., VARIGOS, J. & LISHENG, L.** (2004) Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, 364, 937-52.
- ZAMMIT, P. S.** (2008) All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? *J Cell Sci*, 121, 2975-82.
- ZANDI, E., ROTHWART, D. M., DELHASE, M., HAYAKAWA, M. & KARIN, M.** (1997) The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*, 91, 243-52.
- ZHANG, D., LIN, J. & HAN, J.** (2010) Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *Cell Mol Immunol*, 7, 243-9.
- ZOLL, J., KOULMANN, N., BAHİ, L., VENTURA-CLAPIER, R. & BIGARD, A. X.** (2003) Quantitative and qualitative adaptation of skeletal muscle mitochondria to increased physical activity. *J Cell Physiol*, 194, 186-93.

9 Danksagung

Ganz herzlichen Dank nicht nur für die unzählige fachliche Hilfe, die ich im Rahmen meiner Promotion erfahren durfte, sondern auch für die vielen wertvollen Menschen, die ich in den letzten Jahren kennengelernt habe!

Frau Prof. Dr. Barbara Munz: Danke für die Überlassung des Themas und die freundlichen, sehr kompetenten und immer schnellen Hilfestellungen auf allen Ebenen. Dass du sogar selbst mit Hand angelegt hast, als wir tatkräftige Unterstützung gebrauchen konnten, war für mich ein Zeichen deiner Leidenschaft für das Thema und deiner Einsatzbereitschaft bei der Betreuung!

Herr Prof. Dr. Martin Diener: Vielen Dank für die Übernahme meiner Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin, die konstruktiven Verbesserungsvorschläge und die angebotene Unterstützung bei auftauchenden Fragen. Ihr Besuch in Tübingen zeugt von Engagement und Einsatzwillen für meine Forschungsarbeit!

Frau Dr. Angelika Schmitt: Ich danke dir für die Einarbeitung in viele der in dieser Arbeit dargestellten labortechnischen Methoden, für die fachliche Hilfe bei Fragen, die täglichen Gespräche und deine Hilfsbereitschaft im wissenschaftlichen und im privaten Bereich!

Herr Thomas Beiter: Vielen Dank für deine zahlreichen Hilfestellungen, dein offenes Ohr bei Problemen und dein Engagement, diese zu lösen! Ohne dich wäre es nicht das Gleiche gewesen!

Frau Annunziata Fragasso: Danke für deine Unterstützung auf allen Ebenen und auch für deine freundliche und immer hilfsbereite Art! Du hast meine Laborerfahrung zu etwas ganz Besonderem gemacht!

Meine Eltern: Ihr habt mich in jedem Jahr meines Lebens unterstützt, nicht nur im Studium und während dem Verfassen der Dissertation, durch warme Mahlzeiten, Babysitten und Druckerfarbe.

Wolfgang: Vielen Dank, dass es dich gibt und für die unzähligen Situationen in denen du mich geduldig neu motiviert und mir den Rücken freigehalten hast. Und nicht zuletzt für das größte Geschenk meines Lebens:

Rosalie: Danke, dass du bist, wie du bist. Mit dir unter dem Herzen und später auf dem Schoß war es zwar nicht immer ganz einfach, in eine wissenschaftliche Denkweise zu finden, aber du machst jeden Tag meines Lebens unvergesslich und wertvoll!

10 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Franziska Röchner, 25.06.2020